

(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2017-501157

(P2017-501157A)

(43) 公表日 平成29年1月12日(2017.1.12)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
A61K 39/395 (2006.01)	A61K 39/395 D	4B064
C07K 16/18 (2006.01)	C07K 16/18	4C085
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46	4H045
C07K 16/28 (2006.01)	C07K 16/28	
A61P 35/00 (2006.01)	A61P 35/00	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 114 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-539902 (P2016-539902)  
 (86) (22) 出願日 平成26年12月17日 (2014.12.17)  
 (85) 翻訳文提出日 平成28年8月10日 (2016.8.10)  
 (86) 国際出願番号 PCT/US2014/070983  
 (87) 国際公開番号 W02015/095410  
 (87) 国際公開日 平成27年6月25日 (2015.6.25)  
 (31) 優先権主張番号 62/034,766  
 (32) 優先日 平成26年8月7日 (2014.8.7)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 61/917,264  
 (32) 優先日 平成25年12月17日 (2013.12.17)  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 509012625  
 ジェネンテック, インコーポレイテッド  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア州 サウス  
 サンフランシスコ ディーエヌエー  
 ウェイ 1  
 (74) 代理人 110002077  
 園田・小林特許業務法人  
 (72) 発明者 キム, ジョン  
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 940  
 80, サウス サンフランシスコ, デ  
 ィーエヌエー ウェイ 1, シー/オー  
 ジェネンテック, インコーポレイテ  
 ド  
 Fターム(参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01

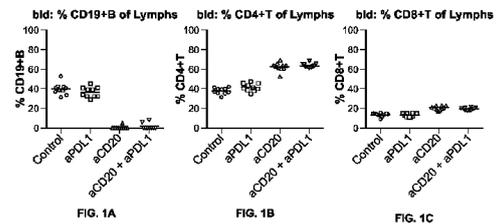
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 PD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を使用してがんを治療する方法

(57) 【要約】

本発明は、PD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を含む併用治療、並びにがんの治療のために腫瘍免疫原性を増加させる方法などの、増強された免疫原性が所望される状態を治療する方法を含む、その使用のための方法を記載する。

【選択図】 図1



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

有効量の PD - 1 軸結合アンタゴニスト及び抗 CD 2 0 抗体を個体に投与することを含む、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるための方法。

## 【請求項 2】

PD - 1 軸結合アンタゴニストが、PD - 1 結合アンタゴニスト、PD - L 1 結合アンタゴニスト及び PD - L 2 結合アンタゴニストからなる群から選択される、請求項 1 に記載の方法。

## 【請求項 3】

PD - 1 軸結合アンタゴニストが PD - 1 結合アンタゴニストである、請求項 2 に記載の方法。 10

## 【請求項 4】

PD - 1 結合アンタゴニストが、そのリガンド結合パートナーへの PD - 1 の結合を阻害する、請求項 3 に記載の方法。

## 【請求項 5】

PD - 1 結合アンタゴニストが、PD - L 1 への PD - 1 の結合を阻害する、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 6】

PD - 1 結合アンタゴニストが、PD - L 2 への PD - 1 の結合を阻害する、請求項 4 に記載の方法。 20

## 【請求項 7】

PD - 1 結合アンタゴニストが、PD - L 1 及び PD - L 2 の両方への PD - 1 の結合を阻害する、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 8】

PD - 1 結合アンタゴニストが抗体である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 9】

PD - 1 結合アンタゴニストが MDX - 1 1 0 6 である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 10】

PD - 1 結合アンタゴニストが Merck 3 7 4 5 である、請求項 8 に記載の方法。

## 【請求項 11】

PD - 1 結合アンタゴニストが CT - 0 1 1 である、請求項 8 に記載の方法。 30

## 【請求項 12】

PD - 1 結合アンタゴニストが AMP - 2 2 4 である、請求項 4 に記載の方法。

## 【請求項 13】

PD - 1 軸結合アンタゴニストが PD - L 1 結合アンタゴニストである、請求項 2 に記載の方法。

## 【請求項 14】

PD - L 1 結合アンタゴニストが、PD - 1 への PD - L 1 の結合を阻害する、請求項 1 3 に記載の方法。

## 【請求項 15】

PD - L 1 結合アンタゴニストが、B 7 - 1 への PD - L 1 の結合を阻害する、請求項 1 3 に記載の方法。 40

## 【請求項 16】

PD - L 1 結合アンタゴニストが、PD - 1 及び B 7 - 1 の両方への PD - L 1 の結合を阻害する、請求項 1 3 に記載の方法。

## 【請求項 17】

PD - L 1 結合アンタゴニストが抗 PD - L 1 抗体である、請求項 1 3 に記載の方法。

## 【請求項 18】

抗 PD - L 1 抗体がモノクローナル抗体である、請求項 1 7 に記載の方法。

## 【請求項 19】

抗PD-L1抗体が、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv及び(Fab')<sub>2</sub>断片からなる群から選択される抗体断片である、請求項17に記載の方法。

【請求項20】

抗PD-L1抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項17から19の何れか一項に記載の方法。

【請求項21】

PD-L1結合アンタゴニストが、YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105及びMEDI4736からなる群から選択される、請求項13に記載の方法。

【請求項22】

抗PD-L1抗体が、配列番号15のHVR-H1配列、配列番号16のHVR-H2配列及び配列番号3のHVR-H3配列を含む重鎖；並びに配列番号17のHVR-L1配列、配列番号18のHVR-L2配列及び配列番号19のHVR-L3配列を含む軽鎖を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項23】

抗PD-L1抗体が、配列番号24のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項17に記載の方法。

【請求項24】

PD-1軸結合アンタゴニストがPD-L2結合アンタゴニストである、請求項2に記載の方法。

【請求項25】

PD-L2結合アンタゴニストが抗体である、請求項24に記載の方法。

【請求項26】

PD-L2結合アンタゴニストがイムノアドヘシンである、請求項24に記載の方法。

【請求項27】

抗体が、EU番号付けに従って297位においてAsnからAlaへの置換を有するヒトIgG1である、請求項8、17から23及び25の何れか一項に記載の方法。

【請求項28】

抗CD20抗体がヒト化B-Ly1抗体である、請求項1から27の何れか一項に記載の方法。

【請求項29】

抗CD20抗体がGA101抗体である、請求項1から27の何れか一項に記載の方法。

【請求項30】

GA101が、配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗ヒトCD20抗体である、請求項29に記載の方法。

【請求項31】

GA101抗体が、配列番号56のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号57のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む、請求項30に記載の方法。

【請求項32】

GA101抗体が、配列番号58のアミノ酸配列及び配列番号59のアミノ酸配列を含む、請求項30に記載の方法。

【請求項33】

GA101抗体がオビヌツズマブである、請求項30に記載の方法。

【請求項34】

GA101抗体が、配列番号58のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号59のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性

10

20

30

40

50

を有するアミノ酸配列を含む、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 35】

抗 CD20 抗体が多重特異性抗体である、請求項 1 から 27 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 36】

抗 CD20 抗体が二重特異性抗体である、請求項 1 から 27 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 37】

個体がヒトである、請求項 1 から 36 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 38】

個体のがんを有する、又はがんと診断されている、請求項 1 から 37 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 39】

がんが CD20 発現がんである、請求項 1 から 38 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 40】

がんが非固形腫瘍である、請求項 1 から 39 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 41】

がんが、リンパ腫又は白血病である、請求項 40 に記載の方法。

【請求項 42】

白血病が、慢性リンパ球性白血病 (CLL) 又は急性骨髄性白血病 (AML) である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 43】

リンパ腫が非ホジキンリンパ腫 (NHL) である、請求項 41 に記載の方法。

【請求項 44】

個体が、再発した又は難治性の又は以前に治療されていない慢性リンパ球性白血病に罹患している、請求項 39 又は 40 に記載の方法。

【請求項 45】

個体が、難治性の又は再発した濾胞性リンパ腫又はびまん性大 B 細胞型リンパ腫 (DLBCL) に罹患している、請求項 44 に記載の方法。

【請求項 46】

治療が、治療の休止後に、個体において持続性の応答をもたらす、請求項 1 から 45 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 47】

抗 CD20 抗体又は PD-1 軸結合アンタゴニストが、持続的に又は断続的に投与される、請求項 1 から 46 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 48】

抗 CD20 抗体が、PD-1 軸結合アンタゴニストの前に投与される、請求項 1 から 47 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 49】

抗 CD20 抗体が、PD-1 軸結合アンタゴニストと同時に投与される、請求項 1 から 47 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 50】

抗 CD20 抗体が、PD-1 軸結合アンタゴニストの後に投与される、請求項 1 から 47 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 51】

有効量の PD-1 軸結合アンタゴニスト及び抗 CD20 抗体の組合せを投与することを含む、がんを有する個体において免疫機能を増強する方法。

【請求項 52】

個体中の CD8<sup>+</sup> T 細胞が、組合せの投与の前と比較して増強されたプライミング、活性化、増殖及び / 又は細胞溶解活性を有する、請求項 51 に記載の方法。

10

20

30

40

50

## 【請求項 5 3】

C D 8 T細胞活性化が、組合せの投与の前と比較して上昇した頻度の - I F N + C D 8 T細胞及び / 又は増強された細胞溶解活性によって特徴付けられる、請求項 5 1 に記載の方法。

## 【請求項 5 4】

C D 8 T細胞の数が、組合せの投与の前と比較して上昇する、請求項 5 1 に記載の方法。

## 【請求項 5 5】

C D 8 T細胞が抗原特異的 C D 8 T細胞である、請求項 5 1 から 5 4 の何れか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 5 6】

P D - 1 軸結合アンタゴニストが、P D - 1 結合アンタゴニスト、P D - L 1 結合アンタゴニスト及び P D - L 2 結合アンタゴニストからなる群から選択される、請求項 5 1 から 5 5 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 5 7】

P D - 1 軸結合アンタゴニストが P D - 1 結合アンタゴニストである、請求項 5 6 に記載の方法。

## 【請求項 5 8】

P D - 1 結合アンタゴニストが、そのリガンド結合パートナーへの P D - 1 の結合を阻害する、請求項 5 7 に記載の方法。

20

## 【請求項 5 9】

P D - 1 結合アンタゴニストが、P D - L 1 への P D - 1 の結合を阻害する、請求項 5 7 に記載の方法。

## 【請求項 6 0】

P D - 1 結合アンタゴニストが、P D - L 2 への P D - 1 の結合を阻害する、請求項 5 7 に記載の方法。

## 【請求項 6 1】

P D - 1 結合アンタゴニストが、P D - L 1 及び P D - L 2 の両方への P D - 1 の結合を阻害する、請求項 5 7 に記載の方法。

## 【請求項 6 2】

P D - 1 結合アンタゴニストが抗 P D - 1 抗体である、請求項 5 7 に記載の方法。

30

## 【請求項 6 3】

P D - 1 結合アンタゴニストが、M D X - 1 1 0 6、M e r c k 3 7 4 5 又は C T - 0 1 1 である、請求項 6 2 に記載の方法。

## 【請求項 6 4】

P D - 1 結合アンタゴニストが A M P - 2 2 4 である、請求項 5 7 に記載の方法。

## 【請求項 6 5】

P D - 1 軸結合アンタゴニストが P D - L 1 結合アンタゴニストである、請求項 5 6 に記載の方法。

## 【請求項 6 6】

P D - L 1 結合アンタゴニストが、P D - 1 への P D - L 1 の結合を阻害する、請求項 6 5 に記載の方法。

40

## 【請求項 6 7】

P D - L 1 結合アンタゴニストが、B 7 - 1 への P D - L 1 の結合を阻害する、請求項 6 5 に記載の方法。

## 【請求項 6 8】

P D - L 1 結合アンタゴニストが、P D - 1 及び B 7 - 1 の両方への P D - L 1 の結合を阻害する、請求項 6 5 に記載の方法。

## 【請求項 6 9】

P D - L 1 結合アンタゴニストが抗 P D - L 1 抗体である、請求項 6 5 に記載の方法。

50

## 【請求項 70】

抗PD-L1抗体がモノクローナル抗体である、請求項69に記載の方法。

## 【請求項 71】

抗PD-L1抗体が、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv及び(Fab')<sub>2</sub>断片からなる群から選択される抗体断片である、請求項69に記載の方法。

## 【請求項 72】

抗PD-L1抗体が、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項69から71の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 73】

前記PD-L1結合アンタゴニストが、YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105及びMEDI4736からなる群から選択される、請求項65に記載の方法。

10

## 【請求項 74】

抗PD-L1抗体が、配列番号15のHVR-H1配列、配列番号16のHVR-H2配列及び配列番号3のHVR-H3配列を含む重鎖；並びに配列番号17のHVR-L1配列、配列番号18のHVR-L2配列及び配列番号19のHVR-L3配列を含む軽鎖を含む、請求項69から72の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 75】

抗PD-L1抗体が、配列番号24のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項74に記載の方法。

20

## 【請求項 76】

PD-1軸結合アンタゴニストがPD-L2結合アンタゴニストである、請求項56に記載の方法。

## 【請求項 77】

PD-L2結合アンタゴニストが抗体である、請求項76に記載の方法。

## 【請求項 78】

PD-L2結合アンタゴニストがイムノアドヘシンである、請求項76に記載の方法。

## 【請求項 79】

抗体が、EU番号付けに従って297位においてAsnからAlaへの置換を有するヒトIgG1である、62、69から75及び77の何れか一項に記載の方法。

30

## 【請求項 80】

抗CD20抗体がヒト化B-Ly1抗体である、請求項51から79の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 81】

抗CD20抗体がGA101抗体である、請求項51から79の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 82】

GA101が、配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗ヒトCD20抗体である、請求項81に記載の方法。

40

## 【請求項 83】

GA101抗体が、配列番号56のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号57のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む、請求項81に記載の方法。

## 【請求項 84】

GA101抗体が、配列番号58のアミノ酸配列及び配列番号59のアミノ酸配列を含む、請求項81に記載の方法。

## 【請求項 85】

GA101抗体がオビヌツズマブである、請求項81に記載の方法。

50

## 【請求項 86】

G A 1 0 1 抗体が、配列番号 5 8 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号 5 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 8 1 に記載の方法。

## 【請求項 87】

抗 C D 2 0 抗体が多重特異性抗体である、請求項 5 1 から 7 9 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 88】

抗 C D 2 0 抗体が二重特異性抗体である、請求項 5 1 から 7 9 の何れか一項に記載の方法。

10

## 【請求項 89】

個体がヒトである、請求項 5 1 から 8 8 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 90】

個体のがんを有する、又はがんと診断されている、請求項 5 1 から 8 9 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 91】

がんが C D 2 0 発現がんである、請求項 5 1 から 9 0 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 92】

がんが非固形腫瘍である、請求項 5 1 から 9 1 の何れか一項に記載の方法。

20

## 【請求項 93】

がんが、リンパ腫又は白血病である、請求項 9 2 に記載の方法。

## 【請求項 94】

白血病が、慢性リンパ球性白血病 ( C L L ) 又は急性骨髄性白血病 ( A M L ) である、請求項 9 3 に記載の方法。

## 【請求項 95】

リンパ腫が非ホジキンリンパ腫 ( N H L ) である、請求項 9 3 に記載の方法。

## 【請求項 96】

個体が、再発した又は難治性の又は以前に治療されていない慢性リンパ球性白血病に罹患している、請求項 9 1 に記載の方法。

30

## 【請求項 97】

個体が、難治性の又は再発した濾胞性リンパ腫又はびまん性大 B 細胞型リンパ腫 ( D L B C L ) に罹患している、請求項 9 6 に記載の方法。

## 【請求項 98】

抗 C D 2 0 抗体又は P D - 1 軸結合アンタゴニストが、持続的に又は断続的に投与される、請求項 5 1 から 9 7 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 99】

抗 C D 2 0 抗体が、P D - 1 軸結合アンタゴニストの前に投与される、請求項 5 1 から 9 8 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 100】

抗 C D 2 0 抗体が、P D - 1 軸結合アンタゴニストと同時に投与される、請求項 5 1 から 9 8 の何れか一項に記載の方法。

40

## 【請求項 101】

抗 C D 2 0 抗体が、P D - 1 軸結合アンタゴニストの後に投与される、請求項 5 1 から 9 8 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 102】

P D - 1 軸結合アンタゴニスト又は抗 C D 2 0 抗体が、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植により、吸入により、髄腔内、脳室内又は鼻腔内投与される、請求項 1 から 1 0 1 の何れか一項に記載の方法。

## 【請求項 103】

抗 P D - L 1 抗体が、3 週間毎に 1 回、1 2 0 0 m g の用量で個体に静脈内投与される

50

、請求項 23、24、74 及び 75 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 104】

抗 CD20 抗体が、サイクル 1 の 1、8 及び 15 日目、並びにサイクル 2 から 8 の 1 日目に 1 回、1000 mg の用量で個体に静脈内投与される、請求項 30 から 34 及び 82 から 85 の何れか一項に記載の方法。

【請求項 105】

PD-1 軸結合アンタゴニスト、及び個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるために抗 CD20 抗体と組み合わせて PD-1 軸結合アンタゴニストを使用するための説明書を含む添付文書を含む、キット。

【請求項 106】

PD-1 軸結合アンタゴニスト及び抗 CD20 抗体を含む、キット。

【請求項 107】

個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるために PD-1 軸結合アンタゴニスト及び抗 CD20 抗体を使用するための説明書を含む添付文書をさらに含む、請求項 106 に記載のキット。

【請求項 108】

抗 CD20 抗体、及び個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるために PD-1 軸結合アンタゴニストと組み合わせて抗 CD20 抗体を使用するための説明書を含む添付文書を含む、キット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願とのクロスリファレンス

本出願は、各々その全内容が本明細書に出典明示により援用される、2013年12月17日出願の米国仮特許出願第61/917264号及び2014年8月7日出願の米国仮特許出願第62/034766号の優先権の利益を主張する。

【0002】

ASCIIテキストファイルでの配列表の提出

ASCIIテキストファイルでの以下の提出の内容は、その全内容が本明細書に出典明示により援用される：配列表のコンピューター読み込み可能な形態(CRF)(ファイル名：146392027940SeqList.txt、記録日：2014年12月16日、サイズ：57KB)。

【背景技術】

【0003】

T細胞への2つの異なるシグナルの提供は、抗原提示細胞(APC)による静止Tリンパ球のリンパ球活性化についての広く受容されたモデルである。Lafferty等、Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci. 53:27-42(1975)。このモデルは、非自己からの自己の識別及び免疫寛容をさらに提供する。Bretscher等、Science 169:1042-1049(1970); Bretscher、P. A.、P. N. A. S. USA 96:185-190(1999); Jenkins等、J. Exp. Med. 165:302-319(1987)。一次シグナル、又は抗原特異的シグナルは、主要組織適合性遺伝子複合体(MHC)の状況において提示された外来抗原ペプチドの認識後にT細胞受容体(TCR)を介して伝達される。第2の又は共刺激シグナルは、抗原提示細胞(APC)上に発現された共刺激分子によってT細胞に送達され、T細胞を誘導して、クローン増殖、サイトカイン分泌及びエフェクター機能を促進させる。Lenschow等、Ann. Rev. Immunol. 14:233(1996)。共刺激の非存在下では、T細胞は、抗原刺激に対して不応性になり得、有効な免疫応答を開始せず、消耗、又は外来抗原に対する寛容をさらに生じ得る。

【0004】

10

20

30

40

50

この2シグナルモデルでは、T細胞は、陽性及び陰性の両方の二次共刺激シグナルを受ける。かかる陽性及び陰性シグナルの調節は、免疫寛容を維持し、自己免疫を防止しつつ、宿主の防御免疫応答を最大化するために重要である。陰性二次シグナルは、T細胞寛容の誘導に必要であると思われるが、陽性シグナルは、T細胞活性化を促進する。単純な2シグナルモデルは、ナイーブリンパ球についての妥当な説明をなおも提供するが、宿主の免疫応答は、ダイナミックなプロセスであり、共刺激シグナルは、抗原曝露されたT細胞にも提供され得る。共刺激の機構は、治療的に興味を持たれるが、それは、共刺激シグナルの操作が、細胞ベースの免疫応答を増強又は終結させるための手段を提供することが示されているからである。近年、T細胞機能不全又はアネルギーが、阻害受容体、プログラム死1ポリペプチド(PD-1)の誘導された持続性の発現と同時発生的に生じることが発見されている。結果として、PD-1、並びにプログラム死リガンド1(PD-L1)及びプログラム死リガンド2(PD-L2)などの、PD-1との相互作用を介してシグナル伝達する他の分子の治療的標的化は、強く興味を持たれる領域である。

10

20

30

40

50

#### 【0005】

PD-L1は、多くのがんにおいて過剰発現され、予後不良と関連する場合が多い(Okazaki T等, Intern. Immun. 2007 19(7):813)(Thompson RH等, Cancer Res 2006, 66(7):3381)。興味深いことに、腫瘍反応性T細胞上のPD-1の上方調節が、障害された抗腫瘍免疫応答に寄与し得ることを示す、正常組織中のTリンパ球及び末梢血Tリンパ球とは対照的に、腫瘍浸潤性Tリンパ球の大部分は、PD-1を優勢に発現する(Blood 2009 114(8):1537)。これは、T細胞活性化の減弱及び免疫監視の回避を生じるための、PD-1発現T細胞と相互作用するPD-L1発現腫瘍細胞によって媒介されるPD-L1シグナル伝達の活用起因し得る(Sharpe等, Nat Rev 2002)(Keir ME等, 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677)。したがって、PD-L1/PD-1相互作用の障害は、腫瘍のCD8+T細胞媒介性死滅を増強し得る。

#### 【0006】

その直接的リガンド(例えば、PD-L1、PD-L2)を介したPD-1軸シグナル伝達の障害は、がんの治療のためのT細胞免疫(例えば、腫瘍免疫)を増強するための手段として提案されてきた。さらに、結合パートナーB7-1へのPD-L1の結合を阻害することによって、T細胞免疫と類似の増強が観察されている。さらに、PD-1シグナル伝達の障害を、腫瘍細胞において調節解除される他のシグナル伝達経路(例えば、MAPK経路、「MEK」と組み合わせることで、治療有効性をさらに増強し得る。しかし、最適な治療的処置は、PD-1遮断単独によっては提供されない独自の免疫増強特性を任意選択的にさらに含む、腫瘍増殖を直接障害する薬剤と、PD-1受容体/リガンド相互作用の遮断を組み合わせる。種々のがんの発達を治療、安定化、予防及び/又は遅延させるためのかかる最適な療法が、なおも必要とされている。

#### 【0007】

本明細書に開示される全ての参考文献、刊行物及び特許出願は、その全内容が本明細書に出典明示により援用される。

#### 【発明の概要】

#### 【0008】

一態様では、有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を個体に投与することを含む、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるための方法が、本明細書で提供される。

#### 【0009】

別の一態様では、有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体の組合せを投与することを含む、がんを有する個体において免疫機能を増強する方法が、本明細書で提供される。一部の実施態様では、この個体中のCD8+T細胞は、この組合せの投与の前と比較して増強されたプライミング、活性化、増殖及び/又は細胞溶解活性を有する。一部の実施態様では、このCD8+T細胞活性化は、この組合せの投与の前と比較して上昇した頻度のIFN+CD8+T細胞及び/又は増強された細胞溶解活性によって

特徴付けられる。一部の実施態様では、CD8 T細胞の数は、この組合せの投与の前と比較して上昇する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞は、抗原特異的CD8 T細胞である。

【0010】

別の一態様では、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるための医薬の製造におけるヒトPD-1軸結合アンタゴニストの使用であって、医薬は、ヒトPD-1軸結合アンタゴニスト及び任意選択の薬学的に許容される担体を含み、治療は、抗CD20抗体及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせた医薬の投与を含む、使用が、本明細書で提供される。

【0011】

別の一態様では、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるための医薬の製造における抗CD20抗体の使用であって、医薬は、抗CD20抗体及び任意選択の薬学的に許容される担体を含み、治療は、ヒトPD-1軸結合アンタゴニスト及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせた医薬の投与を含む、使用が、本明細書で提供される。

【0012】

別の一態様では、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させる際の使用のための、ヒトPD-1軸結合アンタゴニスト及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む組成物であって、治療は、第2の組成物と組み合わせたこの組成物の投与を含み、第2の組成物は、抗CD20抗体及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む、組成物が、本明細書で提供される。

【0013】

別の一態様では、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させる際の使用のための、抗CD20抗体及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む組成物であって、治療は、第2の組成物と組み合わせたこの組成物の投与を含み、第2の組成物は、ヒトPD-1軸結合アンタゴニスト及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む、組成物が、本明細書で提供される。

【0014】

別の一態様では、がんを有する個体において免疫機能を増強するための医薬の製造における、ヒトPD-1軸結合アンタゴニストの使用であって、医薬は、ヒトPD-1軸結合アンタゴニスト及び任意選択の薬学的に許容される担体を含み、この治療は、抗CD20抗体及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせたこの医薬の投与を含む、使用が本明細書で提供される。一部の実施態様では、この個体中のCD8 T細胞は、この組合せの投与の前と比較して増強されたプライミング、活性化、増殖及び/又は細胞溶解活性を有する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞活性化は、この組合せの投与の前と比較して上昇した頻度のIFN $\gamma$ CD8 T細胞及び/又は増強された細胞溶解活性によって特徴付けられる。一部の実施態様では、CD8 T細胞の数は、この組合せの投与の前と比較して上昇する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞は、抗原特異的CD8 T細胞である。

【0015】

別の一態様では、がんを有する個体において免疫機能を増強するための医薬の製造における、抗CD20抗体の使用であって、この医薬は、抗CD20抗体及び任意選択の薬学的に許容される担体を含み、この治療は、ヒトPD-1軸結合アンタゴニスト及び任意選択的の薬学的に許容される担体を含む組成物と組み合わせたこの医薬の投与を含む、使用が本明細書で提供される。一部の実施態様では、この個体中のCD8 T細胞は、この組合せの投与の前と比較して増強されたプライミング、活性化、増殖及び/又は細胞溶解活性を有する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞活性化は、この組合せの投与の前と比較して上昇した頻度のIFN $\gamma$ CD8 T細胞及び/又は増強された細胞溶解活性によって特徴付けられる。一部の実施態様では、CD8 T細胞の数は、この組合せの投与の前と比較して上昇する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞は、抗原特異的

10

20

30

40

50

CD8 T細胞である。

【0016】

別の一態様では、がんを有する個体において免疫機能を増強することにおける使用のための、ヒトPD-1軸結合アンタゴニスト及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む組成物であって、この治療は、第2の組成物と組み合わせたこの組成物の投与を含み、この第2の組成物は、抗CD20抗体及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む、組成物が本明細書で提供される。一部の実施態様では、この個体中のCD8 T細胞は、この組合せの投与の前と比較して増強されたプライミング、活性化、増殖及び/又は細胞溶解活性を有する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞活性化は、この組合せの投与の前と比較して上昇した頻度のIFN<sup>+</sup>CD8 T細胞及び/又は増強された細胞溶解活性によって特徴付けられる。一部の実施態様では、CD8 T細胞の数は、この組合せの投与の前と比較して上昇する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞は、抗原特異的CD8 T細胞である。

10

【0017】

別の一態様では、がんを有する個体において免疫機能を増強することにおける使用のための、抗CD20抗体及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む組成物であって、この治療は、第2の組成物と組み合わせたこの組成物の投与を含み、この第2の組成物は、ヒトPD-1軸結合アンタゴニスト及び任意選択の薬学的に許容される担体を含む、組成物が本明細書で提供される。一部の実施態様では、この個体中のCD8 T細胞は、この組合せの投与の前と比較して増強されたプライミング、活性化、増殖及び/又は細胞溶解活性を有する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞活性化は、この組合せの投与の前と比較して上昇した頻度のIFN<sup>+</sup>CD8 T細胞及び/又は増強された細胞溶解活性によって特徴付けられる。一部の実施態様では、CD8 T細胞の数は、この組合せの投与の前と比較して上昇する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞は、抗原特異的CD8 T細胞である。

20

【0018】

上及び本明細書に記載される方法、使用、組成物及びキットの一部の実施態様では、このがんは、非固形腫瘍である。一部の実施態様では、このがんは、リンパ腫又は白血病である。一部の実施態様では、この白血病は、慢性リンパ球性白血病(CLL)又は急性骨髄性白血病(AML)である。一部の実施態様では、このリンパ腫は、濾胞性リンパ腫(FL)、びまん性大B細胞型リンパ腫(DLBCL)又は非ホジキンリンパ腫(NHL)である。

30

【0019】

上及び本明細書に記載される方法、使用、組成物及びキットの一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニスト、PD-L1結合アンタゴニスト及びPD-L2結合アンタゴニストからなる群から選択される。一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニストは、PD-1結合アンタゴニストである。一部の実施態様では、このPD-1結合アンタゴニストは、そのリガンド結合パートナーへのPD-1の結合を阻害する。一部の実施態様では、このPD-1結合アンタゴニストは、PD-L1へのPD-1の結合、PD-L2へのPD-1の結合、又はPD-L1及びPD-L2の両方へのPD-1の結合を阻害する。一部の実施態様では、このPD-1結合アンタゴニストは、抗体である。一部の実施態様では、このPD-1結合アンタゴニストは、MDX-1106、Merck 3475、CT-011又はAMP-224である。一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニストは、PD-L1結合アンタゴニストである。一部の実施態様では、このPD-L1結合アンタゴニストは、PD-1へのPD-L1の結合、B7-1へのPD-L1の結合、又はPD-1及びB7-1の両方へのPD-L1の結合を阻害する。一部の実施態様では、このPD-L1結合アンタゴニストは、抗PD-L1抗体である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、モノクローナル抗体である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv及び(Fab')<sub>2</sub>断片からなる群から選択される抗体断片

40

50

である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、ヒト化抗体又はヒト抗体である。一部の実施態様では、このPD-L1結合アンタゴニストは、YW243、55、S70、MPDL3280A、MDX-1105及びMEDI4736からなる群から選択される。一部の実施態様では、この抗体は、配列番号15のHVR-H1配列、配列番号16のHVR-H2配列及び配列番号3のHVR-H3配列を含む重鎖；並びに配列番号17のHVR-L1配列、配列番号18のHVR-L2配列及び配列番号19のHVR-L3配列を含む軽鎖を含む。一部の実施態様では、この抗体は、配列番号24若しくは28のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、配列番号26に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号27に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。一部の  
10 実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニストは、PD-L2結合アンタゴニストである。一部の実施態様では、このPD-L2結合アンタゴニストは、抗体である。一部の実施態様では、このPD-L2結合アンタゴニストは、イムノアドヘシンである。一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニストは、1又は複数の非グリコシル化部位突然変異（例えば、置換）を含む抗体（例えば、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体又は抗PD-L2抗体）である。一部の実施態様では、この置換突然変異には、アミノ酸位置N297、L234、L235及びD265（EU番号付け）における1又は複数の置換が含まれる。一部の実施態様では、この置換突然変異は、N297G、N297A、L234A、L235A及びD265A（EU番号付け）からなる群から選択される。一部の実施態  
20 様では、この抗体は、ヒトIgG1である。一部の実施態様では、この抗体（例えば、抗PD1抗体、抗PD-L1抗体又は抗PD-L2抗体）は、EU番号付けに従って297位においてAsnからAlaへの置換を有するヒトIgG1である。

#### 【0020】

上及び本明細書に記載される方法、使用、組成物及びキットの一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、本明細書に記載されるリツキシマブである。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、本明細書に記載されるヒト化B-Ly1抗体である。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、本明細書に記載されるGA101抗体である。一部の  
30 実施態様では、このGA101は、配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗ヒトCD20抗体である。一部の実施態様では、このGA101抗体は、配列番号56のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号57のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む。一部の実施態様では、このGA101抗体は、配列番号58のアミノ酸配列及び配列番号59のアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、このGA101抗体は、オビヌツズマブとして公知である。一部の実施態様では、上記GA101抗体は、オビヌツズマブではない。一部の実施態様では、このGA101抗体は、配列番号58のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号59のアミノ酸配列と少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、リツキシマブでもオビヌツズマブでもない。  
40

#### 【0021】

上及び本明細書に記載される方法、使用、組成物及びキットの一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、多重特異性抗体である。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、二重特異性抗体である。

#### 【0022】

上及び本明細書に記載される方法、使用、組成物及びキットの一部の実施態様では、この抗CD20抗体又はPD-1軸結合アンタゴニストは、持続的に投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体又はPD-1軸結合アンタゴニストは、断続的に投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、PD-1軸結合アンタゴニストの前に投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、PD-1軸結合アンタゴニ  
50

ストと同時に投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、PD-1軸結合アンタゴニストの後に投与される。一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニスト及び/又は抗CD20抗体は、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植により、吸入により、髄腔内、脳室内又は鼻腔内投与される。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、3週間毎に1回、1200mgの用量で個体に静脈内投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、サイクル1の1、8及び15日目、並びにサイクル2から8の1日目に1回、1000mgの用量で個体に静脈内投与される。一部の実施態様では、この個体はヒトである。

#### 【0023】

別の一態様では、PD-1軸結合アンタゴニスト、及び個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるために抗CD20抗体と組み合わせてPD-1軸結合アンタゴニストを使用するための説明書を含む添付文書を含むキットが、本明細書で提供される。別の一態様では、PD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を含むキットが、本明細書で提供される。一部の実施態様では、このキットは、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるためにPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を使用するための説明書を含む添付文書をさらに含む。別の一態様では、抗CD20抗体、及び個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるためにPD-1軸結合アンタゴニストと組み合わせて抗CD20抗体を使用するための説明書を含む添付文書を含むキットが、本明細書で提供される。別の一態様では、PD-1軸結合アンタゴニスト、及びがんを有する個体において免疫機能を増強するために抗CD20抗体と組み合わせてPD-1軸結合アンタゴニストを使用するための説明書を含む添付文書を含むキットが、本明細書で提供される。別の一態様では、PD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体、並びにがんを有する個体において免疫機能を増強するためにPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を使用するための説明書を含む添付文書を含むキットが、本明細書で提供される。別の一態様では、抗CD20抗体、及びがんを有する個体において免疫機能を増強するためにPD-1軸結合アンタゴニストと組み合わせて抗CD20抗体を使用するための説明書を含む添付文書を含むキットが、本明細書で提供される。

#### 【0024】

上及び本明細書に記載される方法、使用、組成物及びキットの一部の実施態様では、この個体はヒトである。一部の実施態様では、この個体は、がんを有する、又はがんと診断されている。一部の実施態様では、この個体は、再発した又は難治性のがん（例えば、非固形腫瘍）に罹患している。一部の実施態様では、この個体は、白血病（例えば、CLL、AML）又はリンパ腫（例えば、NHL）に罹患している。一部の実施態様では、この個体は、再発した又は難治性の又は以前に治療されていないCLLに罹患している。一部の実施態様では、この個体は、難治性の又は再発した濾胞性リンパ腫又はびまん性大B細胞型リンパ腫（DLBCL）に罹患している。

#### 【0025】

本明細書に記載される種々の実施態様の特性のうち1つ、一部又は全てが組み合わせられて、本発明の他の実施態様を形成し得ることを、理解すべきである。本発明のこれら及び他の態様は、当業者に明らかとなる。本発明のこれら及び他の実施態様は、以下の詳細な説明によってさらに記載される。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0026】

【図1】B細胞枯渇に対する、抗CD20抗体と組み合わせた抗PD-L1抗体の投与の効果を決めるために実施した実験の結果を示す図である。図1Aは、CD19+Bリンパ球のパーセント(%)を示す。図1Bは、CD4+Tリンパ球のパーセント(%)を示す。図1Cは、CD8+Tリンパ球のパーセント(%)を示す。

【図2】A20細胞を使用したマウスモデルにおける腫瘍増殖に対する、抗CD20抗体と組み合わせた抗PD-L1抗体の投与の効果を決めるために実施した実験の結果を示す図である。治療群1-4は、実施例2に詳細に記載されている。これらのグラフは、個

10

20

30

40

50

々のプロット (Trellisプロット) を示し、経時的な各治療の腫瘍容積の「三次スプラインフィット」を示す。これは、治療群毎の全てのデータをフィットさせる最良の滑らかな曲線を選択する数学的アルゴリズムである。

【図3】 A20pRK-CD20-GFP細胞を使用したマウスモデルにおける腫瘍増殖に対する、抗CD20抗体と組み合わせた抗PD-L1抗体の投与の効果を決定するために実施した実験の結果を示す図である。治療群1-6は、実施例2に詳細に記載されている。これらのグラフは、個々のプロット (Trellisプロット) を示し、経時的な各治療の腫瘍容積の「三次スプラインフィット」を示す。これは、治療群毎の全てのデータをフィットさせる最良の滑らかな曲線を選択する数学的アルゴリズムである。

【発明を実施するための形態】

10

【0027】

#### I. 一般的技術

本明細書に記載又は言及される技術及び手順は、一般に十分に理解されており、例えば、 Sambrook等、Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3rd edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel等編、(2003)); シリーズ Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames及びG.R. Taylor編(1995))、Harlow及びLane編(1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney編(1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait編、1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis編、1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney)編、1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather及びP.E. Roberts、1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle、J.B. Griffiths及びD.G. Newell編、1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir及びC.C. Blackwell編); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M. Miller及びM.P. Calos編、1987); PCR: The Polymerase Chain Reaction、(Mullis等編、1994); Current Protocols in Immunology (J.E. Coligan等編、1991); Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons、1999); Immunobiology (C.A. Janeway及びP. Travers、1997); Antibodies (P. Finch、1997); Antibodies: A Practical Approach (D. Catty. 編、IRL Press、1988-1989); Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd及びC. Dean編、Oxford University Press、2000); Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow及びD. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1999); The Antibodies (M. Zanetti及びJ.D. Capra編、Harwood Academic Publishers、1995); 並びに Cancer: Princ

20

30

40

50

iples and Practice of Oncology (V. T. DeVita 等編、J. B. Lippincott Company、1993)に記載された広く利用される方法など、当業者によって、従来の方法を使用して、一般に使用される。

#### 【0028】

##### II. 定義

用語「アンタゴニスト」は、最も広い意味で使用され、本明細書に開示される天然ポリペプチドの生物活性を部分的又は完全にブロック、阻害又は中和する任意の分子を含む。類似の様式で、用語「アゴニスト」は、最も広い意味で使用され、本明細書に開示される天然ポリペプチドの生物活性を模倣する任意の分子を含む。適切なアゴニスト又はアンタゴニスト分子には、具体的には、アゴニスト又はアンタゴニスト抗体又は抗体断片、天然ポリペプチドの断片又はアミノ酸配列変異体、ペプチド、アンチセンスオリゴヌクレオチド、有機低分子などが含まれる。ポリペプチドのアゴニスト又はアンタゴニストを同定するための方法は、ポリペプチドを候補アゴニスト又はアンタゴニスト分子と接触させ、そのポリペプチドと通常関連する1又は複数の生物活性における検出可能な変化を測定することを含み得る。

10

#### 【0029】

用語「アプタマー」とは、ポリペプチドなどの標的分子に結合することが可能な核酸分子を指す。例えば、本発明のアプタマーは、B - r a f ポリペプチドに、又はB - r a f の発現若しくは活性をモジュレートするシグナル伝達経路中の分子に、特異的に結合し得る。アプタマーの生成及び治療的使用は、当該技術分野で十分確立されている。例えば、米国特許第5475096号、及び加齢性黄斑変性を治療するためのMacugen（登録商標）(Eyeteck、New York)の治療有効性を参照のこと。

20

#### 【0030】

用語「PD - 1 軸結合アンタゴニスト」とは、PD - 1 シグナル伝達軸に対するシグナル伝達から生じるT細胞機能不全を除去するように、PD - 1 軸結合パートナーとその結合パートナーのうちいずれか1又は複数との相互作用を阻害する分子であり、T細胞機能（例えば、増殖、サイトカイン産生、標的細胞死滅）を回復又は増強させる結果となる。本明細書で使用する場合、PD - 1 軸結合アンタゴニストには、PD - 1 結合アンタゴニスト、PD - L 1 結合アンタゴニスト及びPD - L 2 結合アンタゴニストが含まれる。

#### 【0031】

用語「PD - 1 結合アンタゴニスト」とは、PD - 1 とPD - L 1、PD - L 2 などのその結合パートナーのうち1又は複数との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、ブロック、阻害、無効化又は干渉する分子である。一部の実施態様では、このPD - 1 結合アンタゴニストは、その結合パートナーへのPD - 1 の結合を阻害する分子である。具体的な一態様では、このPD - 1 結合アンタゴニストは、PD - L 1 及び/又はPD - L 2 へのPD - 1 の結合を阻害する。例えば、PD - 1 結合アンタゴニストには、抗PD - 1 抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、並びにPD - 1 とPD - L 1 及び/又はPD - L 2 との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、ブロック、阻害、無効化又は干渉する他の分子が含まれる。一実施態様では、PD - 1 結合アンタゴニストは、機能不全性T細胞をあまり機能不全でなくする（例えば、抗原認識に対するエフェクター応答を増強する）ように、PD - 1 を介したシグナル伝達を媒介したTリンパ球上で発現される細胞表面タンパク質によって又はそれを介して媒介される陰性共刺激シグナルを低減させる。一部の実施態様では、このPD - 1 結合アンタゴニストは、抗PD - 1 抗体である。具体的な一態様では、PD - 1 結合アンタゴニストは、本明細書に記載されるMDX - 1106である。別の具体的な一態様では、PD - 1 結合アンタゴニストは、本明細書に記載されるMerck 3475である。別の具体的な一態様では、PD - 1 結合アンタゴニストは、本明細書に記載されるCT - 011である。

30

40

#### 【0032】

用語「PD - L 1 結合アンタゴニスト」とは、PD - L 1 とPD - 1、B7 - 1 などのその結合パートナーのうちいずれか1又は複数との相互作用から生じるシグナル伝達を減

50

少、ブロック、阻害、無効化又は干渉する分子である。一部の実施態様では、PD-L1結合アンタゴニストは、その結合パートナーへのPD-L1の結合を阻害する分子である。具体的な一態様では、このPD-L1結合アンタゴニストは、PD-1及び/又はB7-1へのPD-L1の結合を阻害する。一部の実施態様では、このPD-L1結合アンタゴニストには、抗PD-L1抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、並びにPD-L1とPD-1、B7-1などのその結合パートナーのうち1又は複数との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、ブロック、阻害、無効化又は干渉する他の分子が含まれる。一実施態様では、PD-L1結合アンタゴニストは、機能不全性T細胞をあまり機能不全でなくする（例えば、抗原認識に対するエフェクター応答を増強する）ように、PD-L1を介したシグナル伝達を媒介したTリンパ球上で発現される細胞表面タンパク質によって又はそれを介して媒介される陰性共刺激シグナルを低減させる。一部の実施態様では、PD-L1結合アンタゴニストは、抗PD-L1抗体である。具体的な一態様では、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載されるYW243.55.S70である。別の具体的な一態様では、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載されるMDX-1105である。なお別の具体的な一態様では、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載されるMPDL3280Aである。

10

#### 【0033】

用語「PD-L2結合アンタゴニスト」とは、PD-L2とPD-1などのその結合パートナーのうちいずれか1又は複数との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、ブロック、阻害、無効化又は干渉する分子である。一部の実施態様では、PD-L2結合アンタゴニストは、その結合パートナーへのPD-L2の結合を阻害する分子である。具体的な一態様では、このPD-L2結合アンタゴニストは、PD-1へのPD-L2の結合を阻害する。一部の実施態様では、このPD-L2アンタゴニストには、抗PD-L2抗体、その抗原結合断片、イムノアドヘシン、融合タンパク質、オリゴペプチド、並びにPD-L2とPD-1などのその結合パートナーのうちいずれか1又は複数との相互作用から生じるシグナル伝達を減少、ブロック、阻害、無効化又は干渉する他の分子が含まれる。一実施態様では、PD-L2結合アンタゴニストは、機能不全性T細胞をあまり機能不全でなくする（例えば、抗原認識に対するエフェクター応答を増強する）ように、PD-L2を介したシグナル伝達を媒介したTリンパ球上で発現される細胞表面タンパク質によって又はそれを介して媒介される陰性共刺激シグナルを低減させる。一部の実施態様では、PD-L2結合アンタゴニストは、イムノアドヘシンである。

20

30

#### 【0034】

用語「機能不全」とは、免疫機能不全の状況において、抗原性刺激に対する免疫応答性が低減した状態を指す。この用語は、抗原認識が生じ得るが、次の免疫応答が、感染又は腫瘍増殖を制御するには効果がない、消耗及び/又はアネルギーの両方の共通要素を含む。

#### 【0035】

用語「機能不全性」は、本明細書で使用する場合、抗原認識に対する不応性又は無応答性、具体的には、抗原認識を下流のT細胞エフェクター機能、例えば、増殖、サイトカイン産生（例えば、IL-2）及び/又は標的細胞死滅へと変換する能力の障害もまた含む。

40

#### 【0036】

用語「アネルギー」とは、T細胞受容体を介して送達される不完全又は不十分なシグナル（例えば、ras活性化の非存在下での細胞内Ca<sup>2+</sup>における増加）から生じる、抗原刺激に対する無応答性の状態を指す。T細胞アネルギーは、共刺激の非存在下での抗原による刺激の際にも生じ得、共刺激の状況であっても、抗原による引き続く活性化に対して不応性になる細胞を生じる。この無応答性状態は、インターロイキン-2の存在によってしばしば覆され得る。アネルギー性T細胞は、クローン増殖を受けず、及び/又はエフェクター機能を獲得しない。

#### 【0037】

50

用語「消耗」とは、多くの慢性感染及びがんの間に生じる持続性のTCRシグナル伝達から生じるT細胞機能不全の状態としての、T細胞消耗を指す。これは、不完全な又は欠損したシグナル伝達を介してではなく、持続性のシグナル伝達から生じるという点で、アネルギーから識別される。これは、乏しいエフェクター機能、阻害受容体の持続性の発現、及び機能的エフェクター又はメモリーT細胞のものとは異なる転写状態によって規定される。消耗は、感染及び腫瘍の最適な制御を防止する。消耗は、外的陰性調節経路（例えば、免疫調節性サイトカイン）並びに細胞固有の陰性調節（共刺激）経路（PD-1、B7-H3、B7-H4など）の両方から生じ得る。

#### 【0038】

「T細胞機能を増強する」とは、持続性の若しくは増幅された生物学的機能を有するように、又は消耗した若しくは不活性なT細胞を更新若しくは再活性化するようにT細胞を誘導する、そのようにさせる又はそのように刺激することを意味する。T細胞機能を増強することの例には、以下が含まれる：介入前のそのようなレベルと比較した、CD8<sup>+</sup>T細胞からのインターフェロンの増加した分泌、増加した増殖、増加した抗原応答性（例えば、ウイルス、病原体又は腫瘍のクリアランス）。一実施態様では、増強のレベルは、少なくとも50%、あるいは60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%又は200%である。この増強を測定する様式は、当業者に公知である。

10

#### 【0039】

「T細胞機能不全性障害」は、抗原性刺激に対する応答性の減少によって特徴付けられる、T細胞の障害又は状態である。特定の一実施態様では、T細胞機能不全性障害は、PD-1を介した不適切な増加したシグナル伝達と特異的に関連する障害である。別の一実施態様では、T細胞機能不全性障害は、T細胞が、アネルギー性であるか、又はサイトカインを分泌する能力、増殖する能力若しくは細胞傷害活性を実行する能力が減少している、障害である。具体的な一態様では、この減少した応答性は、免疫原を発現する病原体又は腫瘍の、効果がない制御を生じる。T細胞機能不全によって特徴を明らかにされたT細胞機能不全性障害の例には、未解決の急性感染、慢性感染及び腫瘍免疫が含まれる。

20

#### 【0040】

「腫瘍免疫」とは、腫瘍が免疫認識及びクリアランスを逃れるプロセスを指す。したがって、治療概念として、腫瘍免疫は、かかる回避が減弱され、腫瘍が免疫系によって認識及び攻撃される場合に、「治療される」。腫瘍認識の例には、腫瘍結合、腫瘍収縮及び腫瘍クリアランスが含まれる。

30

#### 【0041】

「免疫原性」とは、特定の物質が免疫応答を誘発する能力を指す。腫瘍は、免疫原性であり、腫瘍免疫原性を増強させることは、免疫応答による腫瘍細胞のクリアランスを助ける。腫瘍免疫原性を増強させることの例には、抗PD-L抗体及び抗CD20抗体による治療が含まれる。

#### 【0042】

「持続性の応答」とは、治療の休止後に腫瘍増殖を低減させることに対する持続性の効果を指す。例えば、腫瘍サイズは、投与期の開始時のサイズと比較して、同じ又はより小さいままであり得る。一部の実施態様では、この持続性の応答は、治療持続期間と少なくとも同じ持続期間、治療持続期間の少なくとも1.5x、2.0x、2.5x又は3.0xの長さの持続期間を有する。

40

#### 【0043】

本明細書で使用する場合、「がん」及び「がん性」とは、調節されない細胞増殖によって典型的には特徴を明らかにされた、哺乳動物における生理的状态を指す、又はそれを記述する。この定義には、良性及び悪性がん、並びに休眠腫瘍又は微小転移が含まれる。がんの例には、カルシノーマ、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫及び白血病が含まれるがこれらに限定されない。かかるがんのより特定の例には、扁平上皮がん、肺がん（小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺癌、及び肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜のがん、肝細胞がん、胃（gastric）又は胃（stomach）がん（胃腸がんを含む）、膵臓がん、膠芽細胞腫、子宮頸

50

がん、卵巣がん、肝臓がん、膀胱がん、肝がん、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜又は子宮癌、唾液腺癌、腎臓又は腎がん、肝臓がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝細胞癌及び種々の型の頭頸部がん、並びにB細胞リンパ腫（低悪性度/濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）；小リンパ球性（SL）NHL；中悪性度/濾胞性NHL；中悪性度びまん性NHL；高悪性度免疫芽球性NHL；高悪性度リンパ芽球性NHL；高悪性度小型非切れ込み核細胞性NHL；巨大腫瘍病変NHL；マントル細胞リンパ腫；AIDS関連リンパ腫；及びワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症を含む）；慢性リンパ球性白血病（CLL）；急性リンパ芽球性白血病（ALL）；ヘアリー細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；及び移植後リンパ増殖性障害（PTLD）、並びに母斑症と関連する異常な血管増殖、浮腫（例えば、脳腫瘍に関連するもの）、メイグス症候群が含まれるがこれらに限定されない。がんの例には、上記型のがんのいずれかの原発腫瘍、又は上記型のがんのいずれか由来の、第2の部位における転移性腫瘍が含まれ得る。

10

## 【0044】

用語「抗体」には、モノクローナル抗体（免疫グロブリンFc領域を有する全長抗体を含む）、ポリエピトープ特異性を有する抗体組成物、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体、ディアボディ（diabody）及び単鎖分子、並びに抗体断片（例えば、Fab、F(ab')<sub>2</sub>及びFv）が含まれる。用語「免疫グロブリン」（Ig）は、本明細書で「抗体」と相互交換可能に使用される。

## 【0045】

基本的4鎖抗体単位は、2つの同一の軽（L）鎖及び2つの同一の重（H）鎖から構成されるヘテロテトラマー糖タンパク質である。IgM抗体は、J鎖と呼ばれるさらなるポリペプチドと一緒に、5つの基本的ヘテロテトラマー単位からなり、10個の抗原結合部位を含むが、IgA抗体は、J鎖と組み合わせ、多価集合体を形成するように重合し得る2-5の基本的4鎖単位を含む。IgGの場合、この4鎖単位は、一般に、約150,000ダルトンである。各L鎖は、1つのジスルフィド共有結合によってH鎖に連結されるが、2つのH鎖は、H鎖アイソタイプに依存して、1又は複数のジスルフィド結合によって互いに連結される。各H及びL鎖は、一定の間隔を空けた鎖内ジスルフィド架橋もまた有する。各H鎖は、N末端において1つの可変ドメイン（V<sub>H</sub>）を有し、その後、及び鎖の各々については3つの定常ドメイン（C<sub>H</sub>）を有し、μ及びアイソタイプについては4つのC<sub>H</sub>ドメインを有する。各L鎖は、N末端において1つの可変ドメイン（V<sub>L</sub>）を有し、その後、その他方の末端において1つの定常ドメインを有する。V<sub>L</sub>は、V<sub>H</sub>とアラインされ、C<sub>L</sub>は、重鎖の第1の定常ドメイン（C<sub>H1</sub>）とアラインされる。特定のアミノ酸残基が、軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとの間の接触面を形成すると考えられる。V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>のペアリングは、一緒になって、単一抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性については、例えば、Basic and Clinical Immunology, 8th Edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr及びTristram G. Parslow（編）、Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, p71及びChapter 6を参照のこと。任意の脊椎動物種由来のL鎖は、それらの定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ及びラムダと呼ばれる2つの明確に異なる型のうち1つに割り当てられ得る。それらの重鎖の定常ドメイン（CH）のアミノ酸配列に依存して、免疫グロブリンは、異なるクラス又はアイソタイプに割り当てられ得る。それぞれ、及びμと呼ばれる重鎖を有する、免疫グロブリンの5つのクラス：IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMが存在する。及びクラスは、CH配列及び機能における比較的軽微な差異に基づいて、サブクラスへとさらに分割され、例えば、ヒトは、以下のサブクラス発現する：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2を。

20

30

40

## 【0046】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ、「V<sub>H</sub>」及び「V<sub>L</sub>」と呼ばれ得

50

る。これらのドメインは、一般的には、(同じクラスの他の抗体と比較して)抗体の最も可変性の部分であり、抗原結合部位を含む。

【0047】

用語「可変」とは、可変ドメインの特定のセグメントが、抗体間で配列が広範に異なるという事実を指す。Vドメインは、抗原結合を媒介し、その特定の抗原に対する特定の抗体の特異性を規定する。しかし、可変性は、可変ドメインの全スパンを通じて均等に分布するわけではない。その代り、可変性は、軽鎖及び重鎖の両方の可変ドメイン中の、超可変領域(HVR)と呼ばれる3つのセグメントに濃縮される。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる。天然の重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、各々、ベータ-シート構造を接続し、一部の場合にはベータ-シート構造の一部を形成するループを形成する3つのHVRによって接続された、ベータ-シート立体配置を主として取る4つのFR領域を含む。各鎖中のHVRは、FR領域によって、他方の鎖由来のHVRとごく接近して一緒に維持され、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する(Kabat等, Sequences of Immunological Interest, Fifth Edition, National Institute of Health, Bethesda, MD (1991)を参照のこと)。定常ドメインは、抗原への抗体の結合に直接関与しないが、種々のエフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害における抗体の関与を示す。

10

【0048】

用語「モノクローナル抗体」とは、本明細書で使用する場合、実質的に均一な抗体の集団から取得された抗体を指し、即ち、この集団を構成する個々の抗体は、微量で存在し得る可能な天然に存在する突然変異及び/又は翻訳後修飾(例えば、異性化、アミド化)を除き、同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原性部位に対するものである。異なる決定基(エピトープ)に対する異なる抗体を典型的には含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は、抗原上の単一決定基に対するものである。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ培養物によって合成され、他の免疫グロブリンが夾雑していないという点で、有利である。修飾語「モノクローナル」は、抗体の実質的に均一な集団から取得されるという抗体の特性を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするとは解釈されるべきではない。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、例えば以下を含む種々の技術によって作製され得る：ハイブリドーマ法(例えば、Kohler及びMilstein, Nature, 256: 495-97 (1975); Hongo等, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow等, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>nd</sup> ed. 1988); Hamming等, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981)、組換えDNA法(例えば、米国特許第4816567号を参照のこと)、ファージディスプレイテクノロジー(例えば、Clackson等, Nature, 352: 624-628 (1991); Marks等, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992); Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2): 299-310 (2004); Lee等, J. Mol. Biol. 340(5): 1073-1093 (2004); Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34): 12467-12472 (2004); 及びLee等, J. Immunol. Methods 284(1-2): 119-132 (2004)を参照のこと)、並びにヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座又は遺伝子の一部又は全てを有する動物においてヒト又はヒト様抗体を産生するためのテクノロジー(例えば、国際公開第1998/24893号; 国際公開第1996/34096号; 国際公開第1996/33735号; 国際公開第1991/10741号; Jakobovits等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993); Jakobovits等, Nature 362: 255-258 (1993); Bruggemann等, Year in Immunol. 7:33 (1993); 米国特許第5545807号; 米国特許第5545806号; 米国特許第5569825号; 米国特許第5625126号; 米国特許第5633425号; 及び米国特許第5661016号; Marks等, Bio/Technology 10: 779-783 (1992); Lonberg等, Nature 368: 856-859 (1994); Morrison, Nature 368: 812-813 (1994); Fishwild等, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996); Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996); 並びにLonberg及びHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)を参照のこと)。

20

30

40

50

## 【0049】

用語「ネイキッド抗体」とは、細胞傷害性部分又は放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。

## 【0050】

用語「全長抗体」、「インタクトな抗体」又は「全抗体」は、相互交換可能に使用されて、抗体断片とは対照的に、その実質的にインタクトな形態での抗体を指す。特に、全抗体には、Fc領域を含む重鎖及び軽鎖を有するものが含まれる。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）又はそのアミノ酸配列変異体であり得る。一部の場合には、インタクトな抗体は、1又は複数のエフェクター機能を有し得る。

10

## 【0051】

「抗体断片」は、インタクトな抗体の一部分、好ましくは、インタクトな抗体の抗原結合及び/又は可変領域を含む。抗体断片の例には、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>及びFv断片；ディアボディ；直鎖状抗体（米国特許第5641870号、実施例2；Zapata等，Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]を参照のこと）；単鎖抗体分子、並びに抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれる。抗体のパパイン消化は、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片、及び1つの残留「Fc」断片、容易に結晶化するその能力を反映する命名、を生じた。このFab断片は、H鎖の可変領域ドメイン（V<sub>H</sub>）及び1つの重鎖の第1の定常ドメイン（C<sub>H</sub>1）と共に、L鎖全体からなる。各Fab断片は、抗原結合に関して一価である、即ち、単一抗原結合部位を有する。抗体のペプシン処理は、異なる抗原結合活性を有する2つのジスルフィド連結されたFab断片に大まかに対応し、抗原を架橋することがなおも可能である、単一の大きいF(ab')<sub>2</sub>断片を生じる。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1又は複数のシステインを含むC<sub>H</sub>1ドメインのカルボキシ末端において数個のさらなる残基を有する分、Fab断片とは異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基（複数可）が遊離チオール基を有する、Fab'についての本明細書での命名である。F(ab')<sub>2</sub>抗体断片は、元々、それらの間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として産生された。抗体断片の他の化学カップリングも公知である。

20

## 【0052】

Fc断片は、ジスルフィドによって一緒にされた両方のH鎖のカルボキシ末端部分を含む。抗体のエフェクター機能は、Fc領域中の配列によって決定され、この領域は、特定の型の細胞上で見出されるFc受容体（FcR）によっても認識される。

30

## 【0053】

「Fv」は、完全な抗原認識及び抗原結合部位を含む最小抗体断片である。この断片は、緊密に非共有結合的に会合した1つの重鎖及び1つの軽鎖可変領域ドメインのダイマーからなる。これら2つのドメインのフォールディングから、抗原結合のためのアミノ酸残基に寄与し、抗体に抗原結合特異性を付与する、6つの超可変ループ（各々H及びL鎖由来の3つのループ）を生じる。しかし、単一可変ドメイン（又は抗原に対して特異的な3つのHVRのみを含むFvの半分）でさえ、結合部位全体よりもより低い親和性ではあるが、抗原を認識及び結合する能力を有する。

40

## 【0054】

「sFv」又は「scFv」としても略称される「単鎖Fv」は、単一ポリペプチド鎖へと接続されたV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、このsFvポリペプチドは、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとの間に、抗原結合にとって所望の構造をscFvが形成するのを可能にするポリペプチドリンカーをさらに含む。sFvの総説については、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg及びMoore編、Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994)を参照のこと。

## 【0055】

50

本発明の抗体の「機能的断片」は、インタクトな抗体の抗原結合若しくは可変領域、又は修飾されたFcR結合能力を保持する若しくは有する抗体のFc領域を一般には含む、インタクトな抗体の一部を含む。抗体断片の例には、直鎖状抗体、単鎖抗体分子及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が含まれる。

【0056】

用語「ディアボディ」とは、Vドメインの鎖間ペアリングが達成されるが鎖内ペアリングが達成されないように、V<sub>H</sub>ドメインとV<sub>L</sub>ドメインとの間に短いリンカー（約5 - 10残基）を有するsFv断片（上述の段落を参照のこと）を構築することによって調製され、それによって、二価断片、即ち、2つの抗原結合部位を有する断片を生じる、小さい抗体断片を指す。二重特異性ディアボディは、2つの抗体のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインが異なるポリペプチド鎖上に存在する、2つの「クロスオーバー」sFv断片のヘテロダイマーである。ディアボディは、例えば、EP404097；国際公開第93/11161号；Hollinger等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448（1993）中に、より詳細に記載される。

【0057】

本明細書のモノクローナル抗体には、重鎖及び/又は軽鎖の一部が、特定の種に由来する抗体又は特定の抗体クラス若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又は相同であるが、鎖（複数可）の残部が、別の種に由来する抗体又は別の抗体クラス若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又は相同である「キメラ」抗体（免疫グロブリン）、並びにそれらが所望の生物活性を示す限りにおいてかかる抗体の断片が、具体的に含まれる（米国特許第4816567号；Morrison等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855（1984））。本明細書の目的のキメラ抗体には、抗体の抗原結合領域が、例えば目的の抗原を用いてマカクザルを免疫化することによって産生される抗体から誘導される、PRIMATTZED（登録商標）抗体が含まれる。本明細書で使用する場合、「ヒト化抗体」は、「キメラ抗体」のサブセットとして使用される。

【0058】

非ヒト（例えば、マウス）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリン由来の最小配列を含むキメラ抗体である。一実施態様では、ヒト化抗体は、レシピエントのHVR（以降定義する）由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び/又は能力を有する、マウス、ラット、ウサギ又は非ヒト霊長類などの非ヒト種（ドナー抗体）のHVR由来の残基によって置き換えられた、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一部の例では、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク（「FR」）残基は、対応する非ヒト残基によって置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体中にもドナー抗体中にも見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、結合親和性などの抗体性能をさらに洗練するために行われ得る。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つの、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、ここで、超可変ループの全て又は実質的に全ては、非ヒト免疫グロブリン配列のものと対応し、FR領域の全て又は実質的に全ては、ヒト免疫グロブリン配列のものであるが、これらのFR領域は、例えば結合親和性、異性化、免疫原性などの抗体性能を改善する、1又は複数の個々のFR残基置換を含み得る。FR中のこれらのアミノ酸置換の数は、典型的には、H鎖中に6以下、L鎖中に3以下である。このヒト化抗体は、任意選択的に、典型的にはヒト免疫グロブリンのものである、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分もまた含む。さらなる詳細については、例えば、Jones等、Nature 321:522-525（1986）；Riechmann等、Nature 332:323-329（1988）；及びPresta、Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596（1992）を参照のこと。例えば、Vaswani及びHamilton、Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1:105-115（1998）；Harris、Biochem. Soc. Transactions 23:1035-1038（1995）；Hurle及びGross、Curr. Op. Biotech. 5:428-433（1994）；並びに米国特許第6982321号及び米国特許第7087409号もまた参照の

10

20

30

40

50

こと。

【0059】

「ヒト抗体」は、ヒトによって産生され、及び/又は本明細書に開示されるようなヒト抗体を作製するための技術のいずれかを使用して作製された抗体のものと対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を具体的に排除する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリーを含む、当該技術分野で公知の種々の技術を使用して産生され得る。Hoogenboom及びWinter、*J. Mol. Biol.*、227:381(1991); Marks等、*J. Mol. Biol.*、222:581(1991)。ヒトモノクローナル抗体の調製のために、Cole等、*Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*、Alan R. Liss、p.77(1985); Boerner等、*J. Immunol.*、147(1):86-95(1991)に記載される方法もまた、利用可能である。van Dijk及びvan de Winkel、*Curr. Opin. Pharmacol.*、5:368-74(2001)もまた参照のこと。ヒト抗体は、抗原性曝露に应答してかかる抗体を産生するように修飾されているが、その内因性の遺伝子座が無能にされている、トランスジェニック動物、例えば、免疫ゼノマウス(xenomice)に抗原を投与することによって調製され得る(例えば、XENOMOUSE(商標)テクノロジーに関しては、米国特許第6075181号及び米国特許第6150584号を参照のこと)。例えば、ヒトB細胞ハイブリドーマテクノロジーを介して生成されるヒト抗体に関しては、Li等、*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*、103:3557-3562(2006)もまた参照のこと。

10

20

【0060】

用語「超可変領域」、「HVR」又は「HV」とは、本明細書で使用する場合、配列が超可変である及び/又は構造的に規定されたループを形成する、抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つのHVRを含む;3つはVH中(H1、H2、H3)、3つはVL中(L1、L2、L3)。天然抗体では、H3及びL3は、最も多様な6つのHVRを示し、特に、H3は、抗体に繊細な特異性を付与することにおいて独自の役割を果たすと考えられている。例えば、Xu等、*Immunity* 13:37-45(2000); Johnson及びWu、*Methods in Molecular Biology* 248:1-25(Lo編、Human Press、Totowa、NJ、2003)を参照のこと。実際、重鎖のみからなる天然に存在するラクダ科の抗体は、軽鎖の非存在下で、機能的かつ安定である。例えば、Hamers-Casterman等、*Nature* 363:446-448(1993); Sherif等、*Nature Struct. Biol.* 3:733-736(1996)を参照のこと。

30

【0061】

いくつかのHVR描写が使用されており、本明細書において包含される。カバット相補性決定領域(CDR)は、配列可変性に基づいており、最も一般的に使用されるものである(Kabat等、*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。Chothiaは、代わりに、構造的ループの位置に言及している(Chothia及びLesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917(1987))。AbM HVRは、カバットのHVRとChothiaの構造的ループとの間の妥協を示しており、Oxford MolecularのAbM抗体モデル化ソフトウェアによって使用されている。「接触(contact)」HVRは、入手可能な複雑な結晶構造の解析に基づく。これらのHVRの各々由来の残基は、以下に示される。

40

ループ	カバット	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (カバット番号付け)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 番号付け)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

10

## 【0062】

HVRは、以下のような「拡大HVR」を含み得る：VL中の24-36又は24-34(L1)、46-56又は50-56(L2)及び89-97又は89-96(L3)並びにVH中の26-35(H1)、50-65又は49-65(H2)及び93-102、94-102又は95-102(H3)。これらの可変ドメイン残基は、これらの定義の各々について、Kabab等、上記に従って番号付けされる。

## 【0063】

表現「カバットと同様の可変ドメイン残基番号付け」又は「カバットと同様のアミノ酸位置番号付け」及びそれらのバリエーションは、Kabab等、上記中の抗体のコンパイルの重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインのために使用される番号付け系を指す。この番号付け系を使用して、実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFR若しくはHVRの短縮又はそれら中への挿入に対応する、より少ない又はさらなるアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後の単一アミノ酸挿入(カバットに従う残基52a)及び重鎖FRの残基82の後の挿入された残基(例えば、カバットに従う残基82a、82b及び82cなど)を含み得る。残基のカバット番号付けは、抗体の配列と「標準的な」カバット番号付けされた配列との相同性の領域におけるアラインメントによって、所与の抗体について決定され得る。

20

30

## 【0064】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、本明細書に定義されるようなHVR残基以外の可変ドメイン残基である。

## 【0065】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」又は「アクセプターヒトフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVL又はVHフレームワーク配列の選択において最も共通して存在するアミノ酸残基を示すフレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVL又はVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループからである。一般に、配列のサブグループは、Kabab等、Sequences of Proteins of Immunological Interest、5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service、National Institutes of Health、Bethesda、MD(1991)と同様のサブグループである。例がVLについて含まれ、このサブグループは、Kabab等、上記と同様の、サブグループC<sub>1</sub>、C<sub>2</sub>、C<sub>3</sub>又はC<sub>4</sub>であり得る。さらに、VHについて、このサブグループは、Kabab等、上記と同様の、サブグループI、サブグループII又はサブグループIIIであり得る。あるいは、ヒトコンセンサスフレームワークは、例えば、ドナーフレームワーク配列を種々のヒトフレームワーク配列の収集とアラインさせることによって、ドナーフレームワークに対するその相同性に基づいてヒトフレームワーク残基が選択される場合に、その特定の残基において上記から誘導され得る。ヒト免疫グロブリンフレームワーク「から誘導される」アクセプターヒトフレームワーク、又はヒトコンセンサスフレ

40

50

ムワークは、その同じアミノ酸配列を含み得るか、又は既存のアミノ酸配列変化を含み得る。一部の実施態様では、既存のアミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下又は2以下である。

【0066】

「VHサブグループIIIコンセンサスフレームワーク」は、Kabata等、上記の可変重鎖サブグループIII中のアミノ酸配列から取得されるコンセンサス配列を含む。一実施態様では、このVHサブグループIIIコンセンサスフレームワークのアミノ酸配列は、以下の配列の各々の少なくとも一部分又は全てを含む：

EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAAS (HC-FR1) (配列番号4)  
、WVRQAPGKGLEWV (HC-FR2)、(配列番号5)、RFTISADTS  
KNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (HC-FR3、配列番号6)、WG  
QGT LVT VSA (HC-FR4)、(配列番号7)。

10

【0067】

「VLカップIコンセンサスフレームワーク」は、Kabata等、上記の可変軽鎖カップサブグループI中のアミノ酸配列から取得されるコンセンサス配列を含む。一実施態様では、このVHサブグループIコンセンサスフレームワークのアミノ酸配列は、以下の配列の各々の少なくとも一部分又は全てを含む：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (LC-FR1) (配列番号11)、  
WYQQKPKAPKLLIY (LC-FR2) (配列番号12)、GVPSRFSG  
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (LC-FR3) (配列番号13)  
、FGQGTKVEIKR (LC-FR4) (配列番号14)。

20

【0068】

例えばFc領域の特定の位置における「アミノ酸修飾」とは、特定の残基の置換若しくは欠失、又は特定の残基に隣接する少なくとも1つのアミノ酸残基の挿入を指す。特定の残基に「隣接する」挿入は、その1から2残基以内の挿入を意味する。この挿入は、特定の残基に対してN末端又はC末端であり得る。本明細書の好ましいアミノ酸修飾は、置換である。

【0069】

「親和性成熟した」抗体は、その1又は複数のHVR中に、改変(複数可)を有さない親抗体と比較して、抗原に対する抗体の親和性における改善を生じる1又は複数の改変を有するものである。一実施態様では、親和性成熟した抗体は、標的抗原に対して、ナノモル又はさらにはピコモルの親和性を有する。親和性成熟した抗体は、当該技術分野で公知の手順によって産生される。例えば、Marks等、Bio/Technology 10:779-783(1992)は、VHドメイン及びVLドメインシャッフリングによる親和性成熟を記載している。HVR及び/又はフレームワーク残基のランダム突然変異誘発は、例えば以下によって記載されている：Barbas等 Proc Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813(1994)；Schier等 Gene 169:147-155(1995)；Yelton等 J. Immunol. 155:1994-2004(1995)；Jackson等、J. Immunol. 154(7):3310-9(1995)；及びHawkins等、J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)。

30

40

【0070】

本明細書で使用する場合、用語「~に特異的に結合する」又は「~に対して特異的である」とは、測定可能かつ再現性のある相互作用、例えば、生体分子を含む分子の不均一な集団の存在下での標的の存在を決定する、標的と抗体との間の結合を指す。例えば、標的(これはエピトープであり得る)に特異的に結合する抗体は、他の標的に結合するよりも、より大きい親和性、結合活性で、より容易に、及び/又はより長い持続期間で、この標的を結合する抗体である。一実施態様では、無関係な標的への抗体の結合の程度は、例えばラジオイムノアッセイ(RIA)によって測定される場合、標的への抗体の結合の約10%未満である。特定の実施態様では、標的に特異的に結合する抗体は、1 μM、1

50

0.0 nM、1.0 nM、1 nM又は0.1 nMの解離定数(K<sub>d</sub>)を有する。特定の  
実施態様では、抗体は、異なる種由来のタンパク質間で保存されたタンパク質上のエピト  
ープに特異的に結合する。別の実施態様では、特異的結合は、排他的な結合を含み得る  
が、それを必要としない。

#### 【0071】

本明細書で使用する場合、用語「イムノアドヘシン」は、異種タンパク質(「アドヘシ  
ン」)の結合特異性を免疫グロブリン定常ドメインのエフェクター機能と組み合わせる、  
抗体様分子を指定する。構造的に、イムノアドヘシンは、抗体の抗原認識及び結合部位以  
外の所望の結合特異性を有するアミノ酸配列(即ち、「異種」である)と、免疫グロブリン  
定常ドメイン配列との融合物を含む。イムノアドヘシン分子のアドヘシン部分は、典型  
的には、受容体又はリガンドの結合部位を少なくとも含む近接するアミノ酸配列である。  
イムノアドヘシン中の免疫グロブリン定常ドメイン配列は、任意の免疫グロブリン、例え  
ば、IgG-1、IgG-2(IgG2A及びIgG2Bを含む)、IgG-3若しくは  
IgG-4サブタイプ、IgA(IgA-1及びIgA-2を含む)、IgE、IgD又  
はIgMから取得され得る。これらのIg融合物は、好ましくは、Ig分子内の少なくと  
も1つの可変領域の代わりに、本明細書に記載されるポリペプチド又は抗体のドメインの  
置換を含む。特に好ましい一実施態様では、この免疫グロブリン融合物は、IgG1分子  
のヒンジ、CH2及びCH3、又はヒンジ、CH1、CH2及びCH3領域を含む。免疫  
グロブリン融合物の産生については、1995年6月27日に発行された米国特許第54  
28130号もまた参照のこと。例えば、本発明の併用療法に有用な第2の医薬として有用  
なイムノアドヘシンには、免疫グロブリン配列の定常ドメインに融合された、PD-L  
1若しくはPD-L2の細胞外若しくはPD-1結合部分、あるいはPD-1の細胞外又  
はPD-L1若しくはPD-L2結合部分を含むポリペプチド、例えば、それぞれ、PD  
-L1 ECD-Fc、PD-L2 ECD-Fc及びPD-1 ECD-Fcが含まれ  
る。Ig Fcと細胞表面受容体のECDとのイムノアドヘシン組合せは、可溶型受容体  
と呼ばれる場合がある。

#### 【0072】

「融合タンパク質」及び「融合ポリペプチド」とは、共有結合的に一緒に連結された2  
つの部分を有するポリペプチドを指し、これらの部分の各々は、異なる特性を有するポリ  
ペプチドである。この特性は、生物特性、例えば、インビトロ又はインビボでの活性であり  
得る。この特性は、単純な化学的又は物理的特性、例えば、標的分子への結合、反応の  
触媒などでもあり得る。これら2つの部分は、単一のペプチド結合によって直接、又はペ  
プチドリンカーを介してであるが互いにリーディングフレームに、連結され得る。

#### 【0073】

「PD-1オリゴペプチド」、「PD-L1オリゴペプチド」又は「PD-L2オリゴ  
ペプチド」は、本明細書に記載されるように、それぞれ受容体、リガンド又はシグナル伝  
達成分を含む、それぞれPD-1、PD-L1又はPD-L2陰性共刺激ポリペプチドに  
好ましくは特異的に結合するオリゴペプチドである。かかるオリゴペプチドは、公知のオリ  
ゴペプチド合成方法を使用して化学的に合成され得、又は組換えテクノロジーを使用し  
て調製若しくは精製され得る。かかるオリゴペプチドは、通常、少なくとも約5アミノ酸  
長、あるいは少なくとも約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、4  
3、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、8  
3、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96  
、97、98、99、又は100アミノ酸長又はそれ超である。かかるオリゴペプチドは  
、周知の技術を使用して同定され得る。これに関して、ポリペプチド標的に特異的に結合  
することが可能なオリゴペプチドについてオリゴペプチドライブラリーをスクリーニング

10

20

30

40

50

するための技術が、当該技術分野で周知であることに留意されたい（例えば、米国特許第 5 5 5 6 7 6 2 号、米国特許第 5 7 5 0 3 7 3 号、米国特許第 4 7 0 8 8 7 1 号、米国特許第 4 8 3 3 0 9 2 号、米国特許第 5 2 2 3 4 0 9 号、米国特許第 5 4 0 3 4 8 4 号、米国特許第 5 5 7 1 6 8 9 号、米国特許第 5 6 6 3 1 4 3 号；P C T 国際公開第 8 4 / 0 3 5 0 6 号及び国際公開第 8 4 / 0 3 5 6 4 号；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81:3998-4002 (1984)；Geysen等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 82:178-182 (1985)；Geysen等, Synthetic Peptides as Antigens, 130-149 (1986)；Geysen等, J. Immunol. Meth., 102:259-274 (1987)；Schoofs等, J. Immunol., 140:611-616 (1988)、Cwirla, S. E.等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6378 (1990)；Lowman, H.B.等 Biochemistry, 30:10832 (1991)；Clackson, T.等 Nature, 352: 624 (1991)；Marks, J. D.等, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)；Kang, A.S.等 Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:8363 (1991)並びにSmith, G. P., Current Opin. Biotechnol., 2:668 (1991)を参照のこと）。

10

## 【0074】

「ブロック」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物活性を阻害又は低減させるものである。一部の実施態様では、ブロック抗体又はアンタゴニスト抗体は、実質的に又は完全に、抗原の生物活性を阻害する。本発明の抗 P D - L 1 抗体は、抗原刺激に対する機能不全性状態から T 細胞による機能的応答（例えば、増殖、サイトカイン産生、標的細胞死滅）を回復させるように、P D - 1 を介したシグナル伝達をブロックする。

## 【0075】

「アゴニスト」又は活性化抗体は、それが結合する抗原によるシグナル伝達を増強又は開始させるものである。一部の実施態様では、アゴニスト抗体は、天然リガンドの存在なしに、シグナル伝達を引き起こす又は活性化する。

20

## 【0076】

本明細書で、用語「F c 領域」は、天然配列 F c 領域及び変異体 F c 領域を含む、免疫グロブリン重鎖の C 末端領域を規定するために使用される。免疫グロブリン重鎖の F c 領域の境界は変動し得るが、ヒト I g G 重鎖 F c 領域は、通常、C y s 2 2 6 位におけるアミノ酸残基から又は P r o 2 3 0 から、そのカルボキシル末端まで伸びると定義される。F c 領域の C 末端リジン（E U 番号付け系に従って残基 4 4 7）は、例えば、抗体の産生若しくは精製の間、又は抗体の重鎖をコードする核酸を組換え操作することによって、除去され得る。したがって、インタクトな抗体の組成物は、全ての K 4 4 7 残基が除去された抗体集団、K 4 4 7 残基が除去されていない抗体集団、並びに K 4 4 7 残基あり及びなしの抗体の混合物を有する抗体集団を含み得る。本発明の抗体における使用のための適切な天然配列 F c 領域には、ヒト I g G 1、I g G 2（I g G 2 A、I g G 2 B）、I g G 3 及び I g G 4 が含まれる。

30

## 【0077】

「F c 受容体」又は「F c R」は、抗体の F c 領域に結合する受容体を記述する。好ましい F c R は、天然配列ヒト F c R である。さらに、好ましい F c R は、I g G 抗体に結合するもの（ガンマ受容体）であり、これには、これらの受容体の対立遺伝子変異体及び選択的スプライス形態を含む F c R I、F c R I I 及び F c R I I I サブクラスの受容体が含まれ、F c R I I 受容体には、その細胞質ドメインが主に異なる類似のアミノ酸配列を有する、F c R I I A（「活性化受容体」）及び F c R I I B（「阻害受容体」）が含まれる。活性化受容体 F c R I I A は、その細胞質ドメイン中に免疫受容体活性化チロシンモチーフ（I T A M）を含む。阻害受容体 F c R I I B は、その細胞質ドメイン中に免疫受容体チロシン - ベース阻害モチーフ（I T I M）を含む（M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)を参照のこと。F c R は、R a v e t c h 及び K i n e t、Annu. Rev. Immunol. 9: 457 - 92 (1991)；C a p e l 等、Immunomethods 4: 25 - 34 (1994)；並びに d e H a a s 等、J. Lab. Clin. Med. 126: 330 - 41 (1995)に概説される。将来同定されるものを含む他の F c R は、本明細書の用語「F c R」によって包含

40

50

される。

【0078】

用語「Fc受容体」又は「FcR」には、胎児への母体IgGの移行を担う新生児受容体FcRnもまた含まれる。Guyer等、J. Immunol. 117: 587 (1976)及びKim等、J. Immunol. 24: 249 (1994)。FcRnへの結合を測定する方法は、公知である(例えば、Ghetie及びWard, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997); Ghetie等, Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997); Hinton等, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6 (2004); 国際公開第2004/92219号(Hinton等))を参照のこと。FcRnへのインビボ結合及びヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドの血清半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス若しくはトランスフェクトされたヒト細胞株において、又は変異体Fc領域を有するポリペプチドが投与される霊長類において、アッセイされ得る。国際公開第2004/42072号(Presta)は、FcRへの結合を改善又は減退させた抗体変異体を記述している。例えば、Shields等、J. Biol. Chem. 9(2): 6591-6604 (2001)もまた参照のこと。

10

【0079】

語句「実質的に低減された」又は「実質的に異なる」は、本明細書で使用する場合、2つの数値(一般に、一方は分子と関連し、他方は参照/コンパレータ分子と関連する)間の十分に高い程度の差異を示し、その結果、当業者は、これら2つの値間の差異を、これらの値(例えばKd値)によって測定された生物特性の状況内で統計的に有意であるとみなす。これら2つの値間の差異は、例えば、参照/コンパレータ分子についての値の関数として、約10%超、約20%超、約30%超、約40%超及び/又は約50%超である。

20

【0080】

用語「実質的に類似」又は「実質的に同じ」は、本明細書で使用する場合、2つの数値(例えば、一方は本発明の抗体と関連し、他方は参照/コンパレータ抗体と関連する)間の十分に高い程度の類似性を示し、その結果、当業者は、これら2つの値間の差異を、これらの値(例えばKd値)によって測定された生物特性の状況内でほとんど又は全く生物学的に及び/又は統計的に有意でないとはみなす。これら2つの値間の差異は、例えば、参照/コンパレータ値の関数として、約50%未満、約40%未満、約30%未満、約20%未満及び/又は約10%未満である。

30

【0081】

「担体」には、本明細書で使用する場合、使用される投薬量及び濃度においてそれに曝露されている細胞又は哺乳動物にとって非毒性である、薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定剤が含まれる。しばしば、生理学的に許容される担体は、pH緩衝水溶液である。生理学的に許容される担体の例には、以下が含まれる: バッファー、例えば、ホスフェート、シトレート及び他の有機酸; アスコルビン酸を含む抗酸化剤; 低分子量(約10残基未満)ポリペプチド; タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン; 親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン; アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン又はリジン; グルコース、マンノース又はデキストリンを含む、単糖類、二糖類及び他の糖(炭水化物); キレート剤、例えば、EDTA; 糖アルコール、例えば、マンニトール又はソルビトール; 塩形成対イオン、例えば、ナトリウム; 並びに/又は非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN(商標)、ポリエチレングリコール(PEG)及びPLURONICS(商標)。

40

【0082】

「添付文書」とは、適応症、用法、投薬量、投与、禁忌症、包装された製品と組み合わせられる他の医薬、及び/又はかかる医薬の使用に関する警告などについての情報を含む、医薬の市販の包装中に通例含まれる指示に関する情報を含む、医薬の市販の包装中に通例含まれる説明書を指す。

【0083】

50

本明細書で使用する場合、用語「治療」とは、臨床病理学の過程の間に、治療されている個体又は細胞の天然の過程を改変するように設計された臨床的介入を指す。治療の望ましい効果には、疾患進行の速度を減少させること、病状を改善又は緩和すること、及び寛解又は予後の改善が含まれる。例えば、個体は、がん性細胞の増殖を低減させること（又はがん性細胞を破壊すること）、疾患から生じる症候を減少させること、疾患に罹患している者の生活の質を増加させること、疾患を治療するために必要とされる他の薬物療法の用量を減少させること、疾患の進行を遅延させること、及び/又は個体の生存を延長させることが含まれるがこれらに限定されない、がんに関連する1又は複数の症候が軽減又は排除される場合に、首尾よく「治療される」。

【0084】

本明細書で使用する場合、「疾患の進行を遅延させる」とは、疾患（例えば、がん）の発達を延期する、邪魔する、減速する、遅らせる、安定化する、及び/又は先延ばしにすることを意味する。この遅延は、治療されている疾患及び/又は個体の履歴に依存して、変動する長さの時間であり得る。当業者に明らかなように、十分な又は顕著な遅延は、個体が疾患を発達させないという点において、事実上、予防を包含し得る。例えば、後期がん、例えば、転移の発達が、遅延され得る。

【0085】

本明細書で使用する場合、「がんの再発を低減又は阻害する」は、腫瘍若しくはがんの再発又は腫瘍若しくはがんの進行を低減又は阻害することを意味する。本明細書に開示する場合、がんの再発及び/又はがんの進行には、がんの転移が含まれるがこれに限定されない。

【0086】

「有効量」は、特定の障害の測定可能な改善又は予防をもたらすために必要とされる、少なくとも最小濃度である。本明細書では、有効量は、患者の病状、年齢、性別及び体重、並びに抗体が個体において所望の応答を惹起する能力などの因子に従って変動し得る。有効量は、治療的に有益な効果が治療の任意の毒性又は有害な効果を上回る量でもある。予防的使用について、有益な又は所望の結果には、リスクを排除若しくは低減させること、重症度を低下させること、又は疾患、その合併症、及び疾患の発達の中に示される中間の病理学的表現型の生化学的、組織学的及び/若しくは行動学的症候を含む疾患の発病を遅延させることなどの結果が含まれる。治療的使用について、有益な又は所望の結果には、疾患から生じる1若しくは複数の症候を減少させること、疾患に罹患している者の生活の質を増加させること、疾患を治療するために必要とされる他の薬物療法の用量を減少させること、標的化などを介した別の薬物療法の効果を増強すること、疾患の進行を遅延させること、及び/又は生存を延長させることなどの臨床結果が含まれる。がん又は腫瘍の場合、有効量の薬物は、がん細胞の数を低減させること；腫瘍サイズを低減させること；末梢臓器中へのがん細胞浸潤を阻害すること（即ち、ある程度まで減速させること、又は望ましくは停止させること）；腫瘍転移を阻害すること（即ち、ある程度まで減速させること、又は望ましくは停止させること）；腫瘍増殖をある程度まで阻害すること；及び/又は障害と関連する症候のうち1若しくは複数がある程度まで軽減することにおいて、効果を有し得る。有効量は、1又は複数の投与で投与され得る。本発明の目的のために、薬物、化合物又は薬学的組成物の有効量は、直接的又は間接的にのいずれかで予防的又は治療的処置を達成するために十分な量である。臨床的状况において理解されるように、薬物、化合物又は薬学的組成物の有効量は、別の薬物、化合物又は薬学的組成物と併せて達成されてもされなくてもよい。したがって、「有効量」は、1又は複数の治療剤を投与する状況において考慮され得、1又は複数の他の薬剤と併せて所望の結果が達成され得る又は達成される場合、単一の薬剤が有効量で与えられるとみなされ得る。

【0087】

本明細書で使用する場合、「～と併せて」とは、別の治療モダリティーに加えた、1つの治療モダリティーの投与を指す。このように、「～と併せて」とは、個体への他の治療モダリティーの投与の前、その間又はその後の、1つの治療モダリティーの投与を指す。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 8 】

本明細書で使用する場合、「完全寛解」又は「CR」とは、全ての標的病変の消失を指す；「部分寛解」又は「PR」とは、ベースラインSLDを参照とした、標的病変の最長の直径の合計（SLD）における少なくとも30%の減少を指す；「安定」又は「SD」とは、治療開始以降の最小のSLDを参照とした、PRに適格であるのに不十分な標的病変の収縮、またPDに適格であるのに不十分な増加、を指す。

## 【 0 0 8 9 】

本明細書で使用する場合、「進行性疾患」又は「PD」とは、治療開始以降に記録された最小のSLDを参照とした、標的病変のSLDにおける少なくとも20%の増加、又は1若しくは複数の新たな病変の存在を指す。

10

## 【 0 0 9 0 】

本明細書で使用する場合、「無増悪生存」（PFS）とは、治療されている疾患（例えば、がん）がその間に悪化しない、治療の間及びその後の時間の長さを指す。無増悪生存には、患者が完全寛解又は部分寛解を経験した時間の量、並びに患者が安定を経験した時間の量が含まれ得る。

## 【 0 0 9 1 】

本明細書で使用する場合、「全奏効率」（ORR）とは、完全寛解（CR）率及び部分寛解（PR）率の合計を指す。

## 【 0 0 9 2 】

本明細書で使用する場合、「全生存」とは、特定の持続期間の時間の後に生きているであろう、群中の個体の百分率を指す。

20

## 【 0 0 9 3 】

「化学療法剤」は、がんの治療において有用な化学化合物である。化学療法剤の例には、アルキル化剤、例えば、チオテバ及びシクロホスファミド（シトキサン（登録商標））；スルホン酸アルキル、例えば、ブスルファン、インプロスルファン及びピボスルファン；アジリジン、例えば、ベンゾドパ（benzodopa）、カルボコン、メツレドパ（meturedopa）及びウレドパ（uredopa）；アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホラミド、トリエチレンチオホスホルアミド及びトリメチローロメラミン（trimethylololomelamine）を含む、エチレンイミン及びメチルメラミン；アセトゲニン（特に、プラタシン及びプラタシノン（bullatacinone））；デルタ-9-テトラヒドロカンナビノール（ドロナビノール、MARINOL（登録商標））；ベータ-ラパコン（beta-lapachone）；ラパコール（lapachol）；コルヒチン；ベツリン酸；カンプトテシン（合成アナログトポテカン（ハイカムチン（登録商標））、CPT-11（イリノテカン、CAMPTOSAR（登録商標））、アセチルカンプトテシン、スコポレクチン（scopolactin）及び9-アミノカンプトテシンを含む）；プリオスタチン；ペメトレキセド；カリスタチン；CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン（carzolesin）及びビゼレシン合成アナログを含む）；ポドフィロトキシシン；ポドフィリン酸（podophyllinic acid）；テニポシド；クリプトフィシン（特に、クリプトフィシン1及びクリプトフィシン8）；ドラスタチン；デュオカルマイシン（合成アナログ、KW-2189及びCB1-TM1を含む）；エリュテロピン；パンクラチスタチン（pancratistatin）；TLK-286；CDP323、経口アルファ-4インテグリン阻害剤；サルコジクチン（sarcodictyin）；スポンジスタチン（spongistatin）；ナイトロジェンマスタード、例えば、クロラムブシル、クロルナファジン、コロホスファミド（cholophosphamide）、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベンピチン（novembichin）、フェネステリン（phenesteryne）、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタード；ニトロソウレア類、例えば、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン及びラニムスチン；抗生物質、例えば、エンジイン抗生物質（例えば、カリケアマイシン、特に、カリケ

30

40

50

アマイシガンマ 1 I 及びカリケアマイシンオメガ I 1 (例えば、Nicolaou等、Angew. Chem Intl. Ed. Engl., 33: 183-186 (1994)を参照のこと) ; ダインマイシン (d y n e m i c i n) A を含むダインマイシン ; エスペラミシン ; 並びにネオカルジノスタチンク  
 ロモフォア及び関連の色素タンパク質エンジン抗生物質発色団)、アクラシノマイシン  
 、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシ  
 ン (c a c t i n o m y c i n)、カラビシン (c a r a b i c i n)、カルミノマイシ  
 ン、カルチノフィリン (c a r z i n o p h i l i n)、クロモマイシン、ダクチノマイ  
 シン、ダウノルピシン、デトルピシン (d e t o r u b i c i n)、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L -  
 ノルロイシン、ドキシソルピシン (アドリアマイシン (登録商標)、モルホリノ - ドキシソル  
 ピシン、シアノモルホリノ - ドキシソルピシン、2 - ピロリノ - ドキシソルピシン、ドキシソル  
 ピシン H C l リポソーム注射 (ドキシル (登録商標)) 及びデオキシドキシソルピシンを  
 含む)、エビルピシン、エソルピシン (e s o r u b i c i n)、イダルピシン、マルセロ  
 マイシン (m a r c e l l o m y c i n)、マイトマイシン、例えば、マイトマイシン C  
 、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポルフィロマ  
 イシン、ピューロマイシン、ケラマイシン (q u e l a m y c i n)、ロドルピシン (r  
 o d o r u b i c i n)、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベ  
 ニメクス、ジノスタチン、ゾルピシン ; 代謝拮抗剤、例えば、メトトレキサート、ゲムシ  
 タピン (ジェムザール (登録商標))、テガフル (U F T O R A L (登録商標))、カ  
 ベシタピン (ゼローダ (登録商標))、エボチロン及び 5 - フルオロウラシル (5 - F U  
 ) ; 葉酸アナログ、例えば、デノプテリン (d e n o p t e r i n)、メトトレキサート  
 、プテロプテリン (p t e r o p t e r i n)、トリメトトレキサート ; プリンアナログ、  
 例えば、フルダラビン、6 - メルカプトプリン、チアミプリン (t h i a m i p r i n e  
 )、チオグアニン ; ピリミジンアナログ、例えば、アンシタピン、アザシチジン、6 - ア  
 ザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノ  
 シタピン、フロクスウリジン及びイマチニブ (2 - フェニルアミノピリミジン誘導体)、  
 並びに他の c - K i t 阻害剤 ; 抗副腎剤、例えば、アミノグルテチミド、ミトタン、トリ  
 ロスタン ; 葉酸補充薬、例えば、フロリン酸 (f r o l i n i c a c i d) ; アセグラ  
 トン ; アルドホスファミドグリコシド (a l d o p h o s p h a m i d e g l y c o s  
 i d e) ; アミノレプリン酸 ; エニルウラシル ; アムサクリン ; ベストラブシル (b e s  
 t r a b u c i l) ; ビスアントレン (b i s a n t r e n e) ; エダトレキサート ; デ  
 フォファミン (d e f o f a m i n e) ; デメコルチン ; ジアジコン (d i a z i q u o  
 n e) ; エフロルニチン ; 酢酸エルピチニウム (e l l i p t i n i u m a c e t a t  
 e) ; エトグルシド ; 硝酸ガリウム ; ヒドロキシウレア ; レンチナン ; ロニダミン ; メイ  
 タンシノイド、例えば、メイタンシン及びアンサミトシン (a n s a m i t o c i n) ;  
 ミトグアゾン ; ミトキサントロン ; モピダンモール (m o p i d a n m o l) ; ニトラエ  
 リン (n i t r a e r i n e) ; ペントスタチン ; フェナメット (p h e n a m e t) ; ビラルピシ  
 ン ; ロサキサントロン (l o s o x a n t r o n e) ; 2 - エチルヒドラジド ; プロカル  
 バジン ; P S K (登録商標) 多糖複合体 (J H S N a t u r a l P r o d u c t s、  
 E u g e n e、O R) ; ラゾキサ ; リゾキシン (r h i z o x i n) ; シゾフィラン ;  
 スピロゲルマニウム ; テヌアゾン酸 ; トリアジコン ; 2 , 2 ' , 2 " - トリクロロトリエ  
 チルアミン ; トリコテセン (特に、T - 2 毒素、ベラクリン A (v e r r a c u r i n  
 A)、ロリジン A 及びアングイジン (a n g u i d i n e) ) ; ウレタン ; ビンデシン (E L D I S I N E (登録商標)、F I L D E S I N (登録商標)) ; ダカルバジン ; マン  
 ノムスチン ; ミトブロニトール ; ミトラクトール ; ピボプロマン ; ガシトシン (g a c y  
 t o s i n e) ; アラビノシド (「A r a - C」) ; チオテバ ; タキソイド、例えば、パ  
 クリタキセル (タキソール (登録商標))、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製  
 剤 (アブラキサ (商標)) 及びドキセタキセル (d o x e t a x e l) (タキソテール  
 (登録商標)) ; クロラムブシル ; 6 - チオグアニン ; メルカプトプリン ; メトトレキサ  
 ート ; 白金アナログ、例えば、シスプラチン及びカルボプラチン ; ビンブラスチン (V E  
 L B A N (登録商標)) ; 白金 ; エトボシド (V P - 1 6) ; イホスファミド ; ミトキサ

10

20

30

40

50

ントロン；ピンクリスチン（ONCOVIN（登録商標））；オキサリプラチン；ロイコボリン；ビノレルピン（NAVELBINE（登録商標））；ノバントロン（novantrone）；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノプテリン；イバンドロネート；トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）；レチノイド、例えば、レチノイン酸；上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体；並びに上記のうち2以上の組合せ、例えば、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン及びブレドニゾロンの併用療法についての略号、CHOP、並びに5-FU及びロイコボリンと組み合わせてオキサリプラチン（ELOXATIN（商標））を用いる治療レジメンについての略号、FOLFOXが含まれる。

#### 【0094】

化学療法剤のさらなる例には、がんの増殖を促進し得るホルモンの効果を調節、低減、ブロック又は阻害するように作用し、全身性又は全身治療の形態である場合が多い、抗ホルモン剤が含まれる。これらは、ホルモン自体であり得る。例には、例えば、タモキシフェン（NOLVADEX（登録商標）タモキシフェンを含む）、ラロキシフェン（EVIESTA（登録商標））、ドロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン及びトレミフェン（FARESTON（登録商標））を含む、抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）；抗プロゲステロン；エストロゲン受容体下方制御因子（ERD）；エストロゲン受容体アンタゴニスト、例えば、フルベストラント（FASLODEX（登録商標））；卵巣を抑制又はシャットダウンするように機能する薬剤、例えば、黄体形成ホルモン放出ホルモン（LHRH）アゴニスト、例えば、酢酸リュープロリド（LUPRON（登録商標））及びELIGARD（登録商標）、酢酸ゴセレリン、酢酸ブセレリン及びトリプトレリン；抗アンドロゲン、例えば、フルタミド、ニルタミド及びピカルタミド；並びに副腎においてエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、例えば、4（5）-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール（MEGASE（登録商標））、エキセメスタン（AROMASIN（登録商標））、ホルメスタン、ファドロゾール、ポロゾール（RIVISOR（登録商標））、レトロゾール（FEMARA（登録商標））及びアナストロゾール（ARIMIDEX（登録商標））などが含まれる。さらに、化学療法剤のかかる定義には、ビスホスホネート、例えば、クロドロネート（例えば、BONEFOS（登録商標）又はOSTAC（登録商標））、エチドロネート（DIDROCAL（登録商標））、NE-58095、ゾレドロ酸/ゾレドロネート（ZOMETHA（登録商標））、アレンドロネート（FOSAMAX（登録商標））、パミドロネート（AREDIA（登録商標））、チルドロネート（SKELID（登録商標））又はリセドロネート（ACTONEL（登録商標））；並びにトキシサシタピン（1,3-ジオキソランヌクレオシドシトシナナログ）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、特に、異常な細胞増殖に関与するシグナル伝達経路中の遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC-アルファ、Raf、H-Ras及び上皮増殖因子受容体（EGF-R）など；ワクチン、例えば、THERATOPE（登録商標）ワクチン及び遺伝子療法ワクチン、例えば、ALLOVECTIN（登録商標）ワクチン、LEUVECTIN（登録商標）ワクチン及びVAXID（登録商標）ワクチン；トポイソメラーゼ1阻害剤（例えば、LURTOTECAN（登録商標））；抗エストロゲン、例えば、フルベストラント；Kit阻害剤、例えば、イマチニブ又はEXEL-0862（チロシンキナーゼ阻害剤）；EGFR阻害剤、例えば、エルロチニブ又はセツキシマブ；抗VEGF阻害剤、例えば、ベバシズマブ；イリノテカン；rmRH（例えば、ABARELIX（登録商標））；ラパチニブ及びニトシル酸ラパチニブ（GW572016としても公知のErbB-2及びEGFR二重チロシンキナーゼ低分子阻害剤）；17AAG（ヒートショックタンパク質（Hsp）90毒であるゲルダナマイシン誘導体）、並びに上記のいずれかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体が含まれる。

#### 【0095】

本明細書で使用する場合、用語「サイトカイン」とは、別の細胞に対して細胞間メディ

10

20

30

40

50

エーターとして作用する、又はそのタンパク質を産生する細胞に対して自己分泌効果を有する、1つの細胞集団によって放出されるタンパク質を一般に指す。かかるサイトカインの例には、リンホカイン、モノカイン；インターロイキン（「IL」）、例えば、PROLEUKIN（登録商標）rIL-2を含む、IL-1、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17A-F、IL-18からIL-29（例えばIL-23）、IL-31；腫瘍壊死因子、例えば、TNF-又はTNF-、TGF-1-3；並びに白血病阻害性因子（「LIF」）、毛様体神経栄養因子（「CNTF」）、CNTF様サイトカイン（「CLC」）、カルジオトロフィン（「CT」）及びkitリガンド（「KL」）を含む他のポリペプチド因子が含まれる。

10

## 【0096】

本明細書で使用する場合、用語「ケモカイン」とは、白血球の走化性及び活性化を選択的に誘導する能力を有する可溶性因子（例えば、サイトカイン）を指す。これらは、血管新生、炎症、創傷治癒及び腫瘍発生のプロセスもまた誘発する。ケモカインの例には、IL-8、マウスケラチノサイト化学誘引物質（KC）のヒトホモログが含まれる。

## 【0097】

「CD20」とは、本明細書で使用する場合、ヒトBリンパ球抗原CD20（CD20、Bリンパ球表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5及びLF5としても公知；その配列は、SwissProtデータベースエントリー番号P11836によって特徴付けられる）を指し、これは、プレB及び成熟Bリンパ球上に位置するおよそ35kDの分子量を有する疎水性膜貫通タンパク質である（Valentine, M.A.等, J. Biol. Chem. 264(19) (1989) 11282-11287；Tedder, T.F.等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 (1988) 208-12；Stamenkovic, I.等, J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-80；Einfeld, D.A.等, EMBO J. 7 (1988) 711-7；Tedder, T.F.等, J. Immunol. 142 (1989) 2560-8）。対応するヒト遺伝子は、MS4A1としても公知の、膜貫通4-ドメイン、サブファミリーA、メンバー1である。この遺伝子は、膜貫通4A遺伝子ファミリーのメンバーをコードする。この新生タンパク質ファミリーのメンバーは、共通の構造的特徴及び類似のイントロン/エクソンスプライス境界によって特徴を明らかにされ、造血細胞及び非リンパ系組織間で独自の発現パターンを示す。この遺伝子は、B細胞の発生及び形質細胞への分化において役割を果たすBリンパ球表面分子をコードする。このファミリーメンバーは、ファミリーメンバーのクラスター間で、11q12に局在する。この遺伝子の選択的スプライシングは、同じタンパク質をコードする2つの転写変異体を生じる。

20

30

## 【0098】

用語「CD20」及び「CD20抗原」は、本明細書で相互交換可能に使用され、これには、細胞によって天然に発現される又はCD20遺伝子でトランスフェクトされた細胞上で発現される、ヒトCD20の任意の変異体、アイソフォーム及び種ホモログが含まれる。CD20抗原への本発明の抗体の結合は、CD20を不活性化することによって、CD20を発現する細胞（例えば、腫瘍細胞）の死滅を媒介する。CD20を発現する細胞の死滅は、以下の機構のうち1又は複数によって生じ得る：細胞死/アポトーシス誘導、ADCC及びCDC。

40

## 【0099】

CD20の同義語には、当該技術分野で認識されるように、Bリンパ球抗原CD20、Bリンパ球表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5及びLF5が含まれる。

## 【0100】

本発明に従う用語「抗CD20抗体」は、CD20抗原に特異的に結合する抗体である。CD20抗原への抗CD20抗体の結合特性及び生物活性に依存して、2つの型の抗CD20抗体（I形及びII型抗CD20抗体）が、Cragg, M.S.等, Blood 103 (2004) 2738-2743；及びCragg, M.S.等, Blood 101 (2003) 1045-1052に従って識別され得る、表1を参照のこと。

表 1: I 形及び II 型抗 CD20 抗体の特性

I型抗CD20抗体	II型抗CD20抗体
I型CD20エピトープ	II型CD20エピトープ
脂質ラフトにCD20を局在化させる	脂質ラフトにCD20を局在化させない
増加したCDC (IgG1アイソタイプの場合)	減少したCDC (IgG1アイソタイプの場合)
ADCC活性 (IgG1アイソタイプの場合)	ADCC 活性 (IgG1 アイソタイプの場合)
完全結合能	低減された結合能
同型凝集	より強い同型凝集
架橋の際のアポトーシス誘導	架橋なしの強い細胞死誘導

10

## 【0101】

20

II型抗CD20抗体の例には、例えば、ヒト化B-Ly1抗体IgG1（国際公開第2005/044859号に開示されるキメラヒト化IgG1抗体）、11B8 IgG1（国際公開第2004/035607号に開示される）及びAT80 IgG1が含まれる。典型的には、IgG1アイソタイプのII型抗CD20抗体は、特徴的CDC特性を示す。II型抗CD20抗体は、IgG1アイソタイプのI型抗体と比較して、減少したCDC（IgG1アイソタイプの場合）を有する。

## 【0102】

I型抗CD20抗体の例には、例えば、リツキシマブ、HI47 IgG3（ECACC、ハイブリドーマ）、2C6 IgG1（国際公開第2005/103081号に開示される）、2F2 IgG1（国際公開第2004/035607号及び国際公開第2005/103081号に開示される）及び2H7 IgG1（国際公開第2004/056312号に開示される）が含まれる。

30

## 【0103】

本発明に従うアフコシル化された抗CD20抗体は、好ましくは、II型抗CD20抗体であり、より好ましくは、国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号に記載されるようなアフコシル化されたヒト化B-Ly1抗体である。

## 【0104】

「リツキシマブ」抗体（参照抗体；I型抗CD20抗体の例）は、ヒトCD20抗原に対する、遺伝子操作されたキメラヒトガンマ1マウス定常ドメイン含有モノクローナル抗体である。しかし、この抗体は、糖鎖操作もアフコシル化もされておらず、したがって、少なくとも85%のフコースの量を有する。このキメラ抗体は、ヒトガンマ1定常ドメインを含み、IDEC Pharmaceuticals Corporationに譲渡された、1998年4月17日に発行された米国特許第5736137号（Anderson等）において名称「C2B8」によって同定される。リツキシマブは、再発した又は難治性の低悪性度又は濾胞性の、CD20陽性のB細胞非ホジキンリンパ腫を有する患者の治療のために承認されている。インビトロ作用機序研究は、リツキシマブがヒト補体依存性細胞傷害（CDC）を示すことを示している（Reff, M.E. 等, Blood 83(2) (1994) 435-445）。さらに、リツキシマブは、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を測定するアッセイにおいて活性を示す。

40

50

## 【0105】

用語「GA101抗体」とは、本明細書で使用する場合、ヒトCD20を結合する以下の抗体のうちいずれか1つを指す：(1)配列番号50のアミノ酸配列を含むHVR-H1、配列番号51のアミノ酸配列を含むHVR-H2、配列番号52のアミノ酸配列を含むHVR-H3、配列番号53のアミノ酸配列を含むHVR-L1、配列番号54のアミノ酸配列を含むHVR-L2及び配列番号55のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体；(2)配列番号56のアミノ酸配列を含むVHドメイン及び配列番号57のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む抗体、(3)配列番号58のアミノ酸配列及び配列番号59のアミノ酸配列を含む抗体；(4)オビヌツズマブとして公知の抗体、又は(5)配列番号58のアミノ酸配列と、少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号59のアミノ酸配列と、少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗体。一実施態様では、このGA101抗体は、IgG1アイソタイプ抗体である。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、ヒト化B-Ly1抗体である。

10

## 【0106】

用語「ヒト化B-Ly1抗体」とは、IgG1由来のヒト定常ドメインとのキメラ化及びその後のヒト化(国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号を参照のこと)によって、マウスモノクローナル抗CD20抗体B-Ly1(マウス重鎖の可変領域(VH)：配列番号30；マウス軽鎖の可変領域(VL)：配列番号31-Poppema, S.及びVisser, L., Biotest Bulletin 3 (1987) 131-139を参照のこと)から取得された、国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号に開示されたヒト化B-Ly1抗体を指す。これらの「ヒト化B-Ly1抗体」は、国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号に詳細に開示されている。

20

## 【0107】

一実施態様では、この「ヒト化B-Ly1抗体」は、配列番号32から配列番号48(国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号のB-HH2からB-HH9及びB-HL8からB-HL17に対応する)の群から選択される重鎖の可変領域(VH)を有する。具体的な一実施態様では、かかる可変ドメインは、配列番号32、33、36、38、40、42及び44(国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号のB-HH2、BHH-3、B-HH6、B-HH8、B-HL8、B-HL11及びB-HL13に対応する)からなる群から選択される。具体的な一実施態様では、この「ヒト化B-Ly1抗体」は、配列番号49の軽鎖の可変領域(VL)(国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号のB-KV1に対応する)を有する。具体的な一実施態様では、この「ヒト化B-Ly1抗体」は、配列番号36の重鎖の可変領域(VH)(国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号のB-HH6に対応する)及び配列番号49の軽鎖の可変領域(VL)(国際公開第2005/044859号及び国際公開第2007/031875号のB-KV1に対応する)を有する。さらに、一実施態様では、このヒト化B-Ly1抗体は、IgG1抗体である。本発明によれば、かかるアフコシル化されたヒト化B-Ly1抗体は、国際公開第2005/044859号、国際公開第2004/065540号、国際公開第2007/031875号、Umana, P.等、Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180及び国際公開第99/154342号に記載される手順に従って、Fc領域において糖鎖操作(GE)される。一実施態様では、このアフコシル化された糖鎖操作ヒト化B-Ly1は、B-HH6-B-KV1 GEである。一実施態様では、この抗CD20抗体は、オビヌツズマブ(推奨INN、WHO Drug Information, Vol. 26, No. 4, 2012, p. 453)である。本明細書で使用する場合、オビヌツズマブは、GA101又はRO5072759と同義である。これは、全ての以前のバージョン(例えば、Vol. 25, No. 1, 2011, p.75-76)に取って代わり、アフツズマブとして以前に公知である(推奨INN、WHO Drug Info

30

40

50

rmation, Vol. 23, No. 2, 2009, p. 176; Vol. 22, No. 2, 2008, p. 124)。一部の実施態様では、このヒト化 B - L y 1 抗体は、配列番号 6 0 のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む抗体、又はその抗原結合断片である。一部の実施態様では、このヒト化 B - L y 1 抗体は、配列番号 6 0 の 3 つの重鎖 C D R を含む重鎖可変領域及び配列番号 6 1 の 3 つの軽鎖 C D R を含む軽鎖可変領域を含む。

重鎖 (配列番号 6 0)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR 50  
 IFPGDGDYDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV 100  
 FDGYWLVYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150  
 YFPEPVTVSW NSGALTSQVH TFAVLQSSG LYSLSVTVTV PSSSLGTQTY 200  
 ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250  
 DTLMI SRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300  
 TYRVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350  
 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPPV 400  
 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG 449

10

軽鎖 (配列番号 6 1)

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSL LHSNGITYLYW YLQKPGQSPQ 50  
 LLIIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP 100  
 YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYPREAK 150  
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDYSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE 200  
 VTHQGLSSPV TKSFNRGEC 219

20

【 0 1 0 8 】

一部の実施態様では、このヒト化 B - L y 1 抗体は、アフコシル化された糖鎖操作ヒト化 B - L y 1 である。かかる糖鎖操作ヒト化 B - L y 1 抗体は、Fc 領域中に改変されたパターンのグリコシル化を有し、好ましくは、低減されたレベルのフコース残基を有する。好ましくは、フコースの量は、Asn 297 におけるオリゴ糖の総量の 60% 以下である (一実施態様では、フコースの量は、40% と 60% との間であり、別の一実施態様では、フコースの量は、50% 以下であり、なお別の一実施態様では、フコースの量は、30% 以下である)。さらに、Fc 領域のオリゴ糖は、好ましくは二分されている。これらの糖鎖操作ヒト化 B - L y 1 抗体は、増加した ADC C を有する。

30

【 0 1 0 9 】

「リツキシマブと比較した抗 CD 20 抗体の Raji 細胞 (ATCC - No. CCL - 86) 上の CD 20 への結合能の比」は、実施例 2 に記載したように、Raji 細胞 (ATCC - No. CCL - 86) と共に、FACS Array (Becton Dickinson) において、Cy5 にコンジュゲートされた抗 CD 20 抗体及び Cy5 にコンジュゲートされたリツキシマブを使用する直接的免疫蛍光測定値 (平均蛍光発光強度 (MFI) が測定される) によって決定され、以下のように計算される：

Raji細胞(ATCC - No. CCL - 86)上のCD20への結合能の比 =

$$\frac{\text{MFI}(\text{Cy5} - \text{抗CD20抗体})}{\text{MFI}(\text{Cy5} - \text{リツキシマブ})} \div \frac{\text{Cy5} - \text{標識比}(\text{Cy5} - \text{リツキシマブ})}{\text{Cy5} - \text{標識比}(\text{Cy5} - \text{抗CD20抗体})}$$

40

【 0 1 1 0 】

MFI は、平均蛍光性強度である。この「Cy5 - 標識比」は、本明細書で、分子抗体 1 つ当たりの Cy5 - 標識分子の数を意味する。

【 0 1 1 1 】

典型的には、上記 II 型抗 CD 20 抗体は、0.3 から 0.6 の、一実施態様では 0.35 から 0.55 の、なお別の一実施態様では 0.4 から 0.5 の、リツキシマブと比較した上記第 2 の抗 CD 20 抗体の Raji 細胞 (ATCC - No. CCL - 86) 上の CD 20 への結合能の比を有する。

50

## 【 0 1 1 2 】

一実施態様では、上記 I I 型抗 C D 2 0 抗体、例えば、G A 1 0 1 抗体は、増加した抗体依存性細胞傷害 ( A D C C ) を有する。

## 【 0 1 1 3 】

「増加した抗体依存性細胞傷害 ( A D C C ) を有する抗体」とは、この用語が本明細書で定義される場合、当業者に公知の任意の適切な方法によって決定されるような増加した A D C C を有する抗体を意味する。1つの受容されたインビトロ A D C C アッセイは、以下の通りである：

1) このアッセイは、抗体の抗原結合領域によって認識される標的抗原を発現することが公知の標的細胞を使用する；

2) このアッセイは、エフェクター細胞として、ランダムに選択された健康なドナーの血液から単離されたヒト末梢血単核細胞 ( P B M C ) を使用する；

3) このアッセイは、以下のプロトコールに従って実施される：

i) P B M C が、標準的な密度遠心分離手順を使用して単離され、R P M I 細胞培養培地中に  $5 \times 10^6$  細胞 / m l で懸濁される；

i i) 標的細胞が、標準的な組織培養方法によって増殖され、90% よりも高い生存率で指数増殖期から回収され、R P M I 細胞培養培地中で洗浄され、100 マイクロキュリーの  $^{51}Cr$  で標識され、細胞培養培地で2回洗浄され、 $10^5$  細胞 / m l の密度で細胞培養培地中に再懸濁される；

i i i) 100 マイクロリットルの上記最終標的細胞懸濁物が、96 ウェルマイクロタイタープレートの各ウェルに移される；

i v) 抗体が、細胞培養培地中で  $4000 \text{ ng / ml}$  から  $0.04 \text{ ng / ml}$  まで段階希釈され、50 マイクロリットルの得られた抗体溶液が、96 ウェルマイクロタイタープレート中の標的細胞に添加され、上記濃度範囲全体をカバーする3重の種々の抗体濃度で試験される；

v) 最大放出 ( M R ) コントロールについて、標識された標的細胞を含むプレート中の3つのさらなるウェルが、抗体溶液 (上記時点 i v) の代わりに、非イオン性洗剤 ( N o n i d e t , S i g m a , S t . L o u i s ) の 2 % ( V N ) 水溶液 50 マイクロリットルを受ける；

v i) 自然放出 ( S R ) コントロールについて、標識された標的細胞を含むプレート中の3つのさらなるウェルが、抗体溶液 (上記時点 i v) の代わりに、50 マイクロリットルの R P M I 細胞培養培地を受ける；

v i i) 次いで、この96 ウェルマイクロタイタープレートは、 $50 \times g$  で1分間遠心分離され、4 で1時間インキュベートされる；

v i i i) 50 マイクロリットルの P B M C 懸濁物 (上記時点 i) が、25 : 1 のエフェクター : 標的細胞比を生じるように各ウェルに添加され、プレートが、 $37$  で4時間にわたって 5 % C O 2 大気下でインキュベーター中に配置される；

i x) 各ウェルから無細胞上清が回収され、実験的に放出された放射性 ( E R ) が、ガンマカウンターを使用して定量化される；

x) 特異的溶解の百分率が、式  $( E R - M R ) / ( M R - S R ) \times 100$  に従って各抗体濃度について計算され、式中、E R は、その抗体濃度について定量化された平均放射性であり (上記時点 i x を参照のこと)、M R は、M R コントロール (上記時点 v を参照のこと) について定量化された平均放射性であり (上記時点 i x を参照のこと)、S R は、S R コントロール (上記時点 v i を参照のこと) について定量化された平均放射性である (上記時点 i x を参照のこと)；

4) 「増加した A D C C」は、上記試験した抗体濃度範囲内で観察された特異的溶解の最大百分率における増加、及び / 又は上記試験した抗体濃度範囲内で観察された特異的溶解の最大百分率の半分を達成するために必要とされる抗体の濃度における低減のいずれかとして定義される。一実施態様では、A D C C における増加は、コンパレータ抗体 (増加した A D C C を欠く) が、G n T I I I を過剰発現するように操作された宿主細胞及び /

10

20

30

40

50

又はフコシルトランスフェラーゼ8 (FUT8) 遺伝子からの低減された発現を有するように操作された宿主細胞 (例えば、FUT8 ノックアウトのために操作されたものを含む) によって産生されたのではないことを除いて、当業者に公知の同じ標準的な産生、精製、製剤化及び貯蔵方法を使用して、上記アッセイを用いて測定され、同じ抗体によって媒介され、同じ型の宿主細胞によって産生されたADCCに対して、相対的である。

#### 【0114】

上記「増加したADCC」は、例えば、上記抗体の突然変異及び/又は糖鎖操作によって取得され得る。一実施態様では、この抗体は、例えば、国際公開第2003/011878号 (Jean-Mairet等); 米国特許第6602684号 (Umana等); 米国特許出願公開第2005/0123546号 (Umana等)、Umana, P. 等、Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180) 中の、GlcNAcによって二分された、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖を有するように糖鎖操作される。別の一実施態様では、この抗体は、タンパク質フコシル化が欠損している宿主細胞 (例えば、Lec13 CHO細胞、又はアルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子 (FUT8) が欠失された若しくはFUT遺伝子発現がノックダウンされた細胞) において抗体を発現させることによって、Fc領域に結合された糖 (炭水化物) 上のフコースを欠くように糖鎖操作される (例えば、Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y. 等, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); 及び国際公開第2003/085107号を参照のこと)。なお別の一実施態様では、この抗体配列は、ADCCを増強するように、そのFc領域において操作されている (例えば、一実施態様では、かかる操作された抗体変異体は、Fc領域の298位、333位及び/又は334位 (残基のEU番号付け) において1又は複数のアミノ酸置換を有するFc領域を含む)。

#### 【0115】

用語「補体依存性細胞傷害 (CDC)」とは、補体の存在下での、本発明に従う抗体によるヒト腫瘍標的細胞の溶解を指す。CDCは、補体の存在下での、本発明に従う抗CD20抗体によるCD20発現細胞の調製物の処理によって測定され得る。CDCは、抗体が、100nMの濃度において、4時間後に腫瘍細胞の20%以上の溶解 (細胞死) を誘導する場合に、見出される。一実施態様では、このアッセイは、<sup>51</sup>Cr又はEu標識された腫瘍細胞及び放出された<sup>51</sup>Cr又はEuの測定値を用いて実施される。コントロールには、抗体なしの、腫瘍標的細胞と補体とのインキュベーションが含まれる。

#### 【0116】

用語「CD20抗原」の発現」は、細胞、例えば、T細胞又はB細胞における顕著なレベルのCD20抗原の発現を示すことを意図する。一実施態様では、本発明の方法に従って治療される患者は、B細胞腫瘍又はがん上に顕著なレベルのCD20を発現する。「CD20発現がん」を有する患者は、当該技術分野で公知の標準的なアッセイによって決定され得る。例えば、CD20抗原発現は、免疫組織化学的 (IHC) 検出、FACSを使用して、又は対応するmRNAのPCRベースの検出を介して、測定される。

#### 【0117】

用語「CD20発現がん」とは、本明細書で使用する場合、がん細胞がCD20抗原の発現を示す全てのがんを指す。かかるCD20発現がんは、例えば、以下のがんのいずれかの難治性型を含む、リンパ腫、リンパ性白血病、肺がん、非小細胞肺 (NSCL) がん、細気管支肺胞上皮細胞肺がん、骨がん、膵臓がん、皮膚がん、頭頸部がん、皮膚又は眼内黒色腫、子宮がん、卵巣がん、直腸がん、肛門領域のがん、胃 (stomach) がん、胃 (gastric) がん、結腸がん、乳がん、子宮がん、卵管癌、子宮内膜癌、子宮頸癌、膣癌、外陰癌、ホジキン病、食道がん、小腸がん、内分泌系のがん、甲状腺がん、副甲状腺がん、副腎がん、軟組織の肉腫、尿道がん、陰茎がん、前立腺がん、膀胱がん、腎臓又は尿管のがん、腎細胞癌、腎盂癌、中皮腫、肝細胞がん、胆道がん、中枢神経系 (CNS) の腫瘍、脊椎腫瘍、脳幹神経膠腫、多形神経膠芽腫、星状細胞腫、シュワン細胞腫、上衣腫、髓芽腫、髄膜腫、扁平上皮癌、下垂体腺腫、又は上記がんのうち1若しくは複数の組合せで

10

20

30

40

50

あり得る。

【0118】

一実施態様では、CD20発現がんとは、本明細書で使用する場合、リンパ腫（例えば、B細胞非ホジキンリンパ腫（NHL））及びリンパ性白血病を指す。かかるリンパ腫及びリンパ性白血病には、例えば、a）濾胞性リンパ腫、b）小型非切れ込み核細胞性リンパ腫／バーキットリンパ腫（風土性バーキットリンパ腫、散発性バーキットリンパ腫及び非バーキットリンパ腫を含む）、c）辺縁帯リンパ腫（節外性辺縁帯B細胞リンパ腫（粘膜関連リンパ組織リンパ腫、MALT）、節性辺縁帯B細胞リンパ腫及び脾性辺縁帯リンパ腫を含む）、d）マンツル細胞リンパ腫（MCL）、e）大細胞型リンパ腫（B細胞びまん性大細胞型リンパ腫（DLCL）、びまん性混合細胞型リンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、縦隔原発B細胞性リンパ腫、血管中心性リンパ腫 - 肺性B細胞性リンパ腫を含む）、f）ヘアリー細胞白血病、g）リンパ球性リンパ腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症、h）急性リンパ球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）／小リンパ球性リンパ腫（SLL）、B細胞性前リンパ球性白血病、i）形質細胞腫瘍、形質細胞性骨髄腫、多発性骨髄腫、形質細胞腫、j）ホジキン病が含まれる。

10

【0119】

一実施態様では、このCD20発現がんは、B細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）である。別の一実施態様では、このCD20発現がんは、マンツル細胞リンパ腫（MCL）、急性リンパ球性白血病（ALL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、B細胞びまん性大細胞型リンパ腫（DLCL）、バーキットリンパ腫、ヘアリー細胞白血病、濾胞性リンパ腫、多発性骨髄腫、辺縁帯リンパ腫、移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、HIV関連リンパ腫、ワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症又は原発性CNSリンパ腫である。

20

【0120】

「再発した又は難治性の」CLLには、本明細書で使用する場合、少なくとも1回の事前の化学療法を含む治療レジメンを受けたCLL患者が含まれる。再発した患者は、一般に、事前の化学療法を含む治療レジメンに対する応答の後に進行性疾患を発達させた。難治性患者は、一般に、最後の事前の化学療法を含むレジメンに応答できなかったか、又はその6ヵ月以内に再発した。

30

【0121】

「以前に治療されていない」CLLには、本明細書で使用する場合、CLLと診断されているが、一般に、事前の化学療法も免疫療法も受けていない患者が含まれる。緊急事態、局所領域的放射線療法（例えば、圧迫性の徴候又は症候の救済のため）又はコルチコステロイドの履歴を有する患者は、以前に治療されていないとなおもみなされ得る。

40

【0122】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用する場合、単数形「1つの(a)」、「又は(or)」及び「この(the)」は、文脈が明らかに他を示さない限り、複数の指示対象を含む。

【0123】

本明細書の「約」値又はパラメータに対する言及は、その値又はパラメータ自体に関する変動を含む（及び記述する）。例えば、「約X」に言及する記述は、「X」の記述を含む。

40

【0124】

本明細書に記載される本発明の態様及びバリエーションは、その態様及びバリエーション「からなる」及び／又はそれら「から本質的になる」ことを含むと理解される。

【0125】

III. 方法

一態様では、有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を個体に投与することを含む、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるための方法が、本明細書で提供される。

50

## 【 0 1 2 6 】

本発明の方法は、増強された免疫原性が所望される状態を治療すること、例えば、がんの治療のために腫瘍免疫原性を増加させることにおいて、使用を見出し得る。非固形腫瘍であるがんが含まれるがそれに限定されない種々のがんが治療され得、又はそれらの進行が遅延され得る。一部の実施態様では、このがんは、リンパ腫又は白血病である。一部の実施態様では、この白血病は、慢性リンパ球性白血病（CLL）又は急性骨髄性白血病（AML）である。一部の実施態様では、このリンパ腫は、濾胞性リンパ腫（FL）、びまん性大B細胞型リンパ腫（DLBCL）又は非ホジキンリンパ腫（NHL）である。

## 【 0 1 2 7 】

上記がんは、CD20発現がんの治療を含め、抗CD20抗体及びPD-1軸結合アンタゴニストで治療され得る。一部の実施態様では、治療される個体は、CD20発現がん罹患している。

10

## 【 0 1 2 8 】

一実施態様では、この抗CD20抗体は、0.3から0.6の、一実施態様では0.35から0.55の、別の一実施態様では0.4から0.5の、リツキシマブと比較した上記II型抗CD20抗体のRaji細胞（ATCC-No. CCL-86）上のCD20への結合能の比を有する。

## 【 0 1 2 9 】

一実施態様では、上記II型抗CD20抗体は、GA101抗体である。

## 【 0 1 3 0 】

一実施態様では、上記II型抗CD20抗体は、増加した抗体依存性細胞傷害（ADCC）を有する。

20

## 【 0 1 3 1 】

本明細書で提供される、患者におけるがんの治療の方法の特定の実施態様では、このがんは、非固形腫瘍である。一実施態様では、この非固形腫瘍は、CD20発現非固形腫瘍である。本明細書で提供される方法で治療され得る例示的な非固形腫瘍には、例えば、白血病又はリンパ腫が含まれる。一実施態様では、この非固形腫瘍は、B細胞リンパ腫である。

## 【 0 1 3 2 】

一実施態様では、このCD20発現がんは、B細胞非ホジキンリンパ腫（NHL）である。

30

## 【 0 1 3 3 】

一部の実施態様では、この個体は、がんを有する、又はがんを発達させるリスクがある。一部の実施態様では、この治療は、治療の休止後に、個体において持続性の応答をもたらす。一部の実施態様では、この個体は、早期段階又は後期段階にあり得るがんを有する。一部の実施態様では、このがんは、転移性である。一部の実施態様では、この個体はヒトである。

## 【 0 1 3 4 】

一部の実施態様では、この個体は、哺乳動物、例えば、家畜化動物（例えば、乳牛、ヒツジ、ネコ、イヌ及びウマ）、霊長類（例えば、ヒト及び非ヒト霊長類、例えばサル）、ウサギ及びげっ歯類（例えば、マウス及びラット）である。一部の実施態様では、治療される個体は、ヒトである。

40

## 【 0 1 3 5 】

別の一態様では、有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を投与することを含む、がんを有する個体において免疫機能を増強する方法が、本明細書で提供される。

## 【 0 1 3 6 】

一部の実施態様では、この個体中のCD8 T細胞は、PD-1経路アンタゴニスト及び抗CD20抗体の投与の前と比較して増強されたプライミング、活性化、増殖及び/又は細胞溶解活性を有する。一部の実施態様では、このCD8 T細胞プライミングは、C

50

D 8 T細胞における上昇したCD44発現及び/又は増強された細胞溶解活性によって特徴付けられる。一部の実施態様では、このCD8 T細胞活性化は、上昇した頻度のIFN<sup>+</sup>CD8 T細胞によって特徴付けられる。一部の実施態様では、このCD8 T細胞は、抗原特異的T細胞である。一部の実施態様では、PD-L1表面発現を介したシグナル伝達による免疫回避は、阻害される。

【0137】

一部の実施態様では、この個体中のがん細胞は、PD-1経路アンタゴニスト及び抗CD20抗体の投与の前と比較して、MHCクラスI抗原発現の上昇した発現を有する。

【0138】

一部の実施態様では、この個体中の抗原提示細胞は、PD-1経路アンタゴニスト及び抗CD20抗体の投与の前と比較して増強された成熟及び活性化を有する。一部の実施態様では、ここで、この抗原提示細胞は、樹状細胞である。一部の実施態様では、この抗原提示細胞の成熟は、増加した頻度のCD83<sup>+</sup>樹状細胞によって特徴付けられる。一部の実施態様では、この抗原提示細胞の活性化は、樹状細胞上のCD80及びCD86の上昇した発現によって特徴付けられる。

10

【0139】

一部の実施態様では、個体におけるサイトカインIL-10及び/又はケモカインIL-8、マウスKCのヒトホモログの血清レベルは、抗PD-L1抗体及び抗CD20抗体の投与の前と比較して低減される。

【0140】

一部の実施態様では、このがんは、上昇したレベルのT細胞浸潤を有する。

20

【0141】

一部の実施態様では、本発明の併用療法は、PD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体の投与を含む。このPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体は、当該技術分野で公知の任意の適切な様式で投与され得る。例えば、このPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体は、連続的に(異なる時点で)又は同時発生的に(同時に)投与され得る。

【0142】

一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニスト又は抗CD20抗体は、持続的に投与される。一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニスト又は抗CD20抗体は、断続的に投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、PD-1軸結合アンタゴニストの投与の前に投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、PD-1軸結合アンタゴニストの投与と同時に投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、PD-1軸結合アンタゴニストの投与の後に投与される。

30

【0143】

一部の実施態様では、さらなる療法を投与することをさらに含む、有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を個体に投与することを含む、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるための方法が、提供される。このさらなる療法は、放射線療法、手術(例えば、腫瘍摘出手術及び乳房切除術)、化学療法、遺伝子療法、DNA療法、ウイルス療法、RNA療法、免疫療法、骨髄移植、ナノ療法(nanotherapy)、モノクローナル抗体療法、又は上述の組合せであり得る。このさらなる療法は、アジュバント又はネオアジュバント療法の形態であり得る。一部の実施態様では、このさらなる療法は、低分子酵素阻害剤又は抗転移剤の投与である。一部の実施態様では、このさらなる療法は、副作用制限剤(例えば、治療の副作用の発生及び/又は重症度を低下させるための目的の薬剤、例えば、抗悪心剤など)の投与である。一部の実施態様では、このさらなる療法は、放射線療法である。一部の実施態様では、このさらなる療法は、手術である。一部の実施態様では、このさらなる療法は、放射線療法及び手術の組合せである。一部の実施態様では、このさらなる療法は、ガンマ照射である。一部の実施態様では、このさらなる療法は、PI3K/AKT/mTOR経路を標的化する療法、HSP90阻害剤、チューブリン阻害剤、アポトーシス阻害剤及び/又は化学防御剤である。この

40

50

さらなる療法は、本明細書に上記される化学療法剤のうち1又は複数であり得る。

【0144】

このPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体は、同じ投与経路又は異なる投与経路によって投与され得る。一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニストは、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植により、吸入により、髄腔内、脳室内又は鼻腔内投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、静脈内、筋肉内、皮下、局所、経口、経皮、腹腔内、眼窩内、移植により、吸入により、髄腔内、脳室内又は鼻腔内投与される。有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体が、疾患の予防又は治療のために投与され得る。PD-1軸結合アンタゴニスト及び/又は抗CD20抗体の適切な投薬量は、治療される疾患の型、PD-1軸結合

10

【0145】

一部の実施態様では、がんを治療する方法は、成功の見込みが低くても実施されるが、これは、患者の病歴及び推定された生存予想値を考慮してもやはり、全体的な有益な行動指針を誘導すると思われる。一部の実施態様では、この抗CD20抗体及びPD-1軸結合アンタゴニストは、共投与される、例えば、2つの別々の製剤としての上記抗CD20抗体及びPD-1軸結合アンタゴニストの投与。この共投与は、同時に、又はいずれかの順序で連続的であり得る。さらなる一実施態様では、両方(又は全て)の活性剤がそれらの生物活性を同時に発揮する期間が存在する。上記抗CD20抗体及びPD-1軸結合アンタゴニストは、同時に又は連続的にのいずれかで(例えば、連続的注入を通じた静脈内(i.v.)を介して)共投与される。両方の治療剤が連続的に共投与される場合、これらの薬剤は、「特定の期間」分離された2つの別々の投与で投与される。用語、特定の期間は、1時間から15日間までのいずれかを意味する。例えば、これらの薬剤の一方は、他方の薬剤の投与から約15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2若しくは1日以内、又は24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2若しくは1時間以内に投与され得、一実施態様では、この特定の期間は、10、9、8、7、6、5、4、3、2若しくは1日間、又は24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2若しくは

20

30

【0146】

一部の実施態様では、同時(simultaneous)投与とは、同時に(at the same time)、又は通常は1時間未満の短い期間内を意味する。

【0147】

本明細書で使用する場合、投薬期間は、各治療剤が少なくとも1回投与された期間を意味する。投薬サイクルは、通常、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又は30日間であり、一実施態様では、6、7、8、9、10、11、12、13又は14日間、例えば、7又は14日間である。

40

【0148】

一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニストは、抗PD-L1抗体である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、3週間毎に1回、1200mgの用量で個体に静脈内投与される。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、抗CD20抗体と共に投与される。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、サイクル1の1、8及び15日目、並びにサイクル2から8の1日目に1回、1000mgの用量で個体に静脈内投与される。

【0149】

当該技術分野で公知の又は以下に記載されるPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体のいずれかが、これらの方法において使用され得る。

50

## 【 0 1 5 0 】

## P D - 1 軸 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト

有効量のヒト P D - 1 軸 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト 及 び 抗 C D 2 0 抗 体 を 個 体 に 投 与 す る こ と を 含 む、個 体 に お い て が ん を 治 療 す る 又 は そ の 進 行 を 遅 延 さ せ る た め の 方 法 が、本 明 細 書 で 提 供 さ れ る。例 え ば、P D - 1 軸 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト に は、P D - 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト、P D - L 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト 及 び P D - L 2 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト が 含 ま れ る。「P D - 1」の 代 替 的 名 称 に は、C D 2 7 9 及 び S L E B 2 が 含 ま れ る。「P D - L 1」の 代 替 的 名 称 に は、B 7 - H 1、B 7 - 4、C D 2 7 4 及 び B 7 - H が 含 ま れ る。「P D - L 2」の 代 替 的 名 称 に は、B 7 - D C、B t d c 及 び C D 2 7 3 が 含 ま れ る。一 部 の 実 施 態 様 で は、P D - 1、P D - L 1 及 び P D - L 2 は、ヒ ト の P D - 1、P D - L 1 及 び P D - L 2 で あ る。

10

## 【 0 1 5 1 】

一 部 の 実 施 態 様 で は、こ の P D - 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト は、そ の リ ガ ン ド 結 合 パ ー ト ナ ー へ の P D - 1 の 結 合 を 阻 害 す る 分 子 で あ る。具 体 的 な 一 態 様 で は、こ の P D - 1 リ ガ ン ド 結 合 パ ー ト ナ ー は、P D - L 1 及 び / 又 は P D - L 2 で あ る。別 の 一 実 施 態 様 で は、P D - L 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト は、そ の 結 合 パ ー ト ナ ー へ の P D - L 1 の 結 合 を 阻 害 す る 分 子 で あ る。具 体 的 な 一 態 様 で は、P D - L 1 結 合 パ ー ト ナ ー は、P D - 1 及 び / 又 は B 7 - 1 で あ る。別 の 一 実 施 態 様 で は、こ の P D - L 2 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト は、そ の 結 合 パ ー ト ナ ー へ の P D - L 2 の 結 合 を 阻 害 す る 分 子 で あ る。具 体 的 な 一 態 様 で は、P D - L 2 結 合 パ ー ト ナ ー は、P D - 1 で あ る。こ の ア ン タ ゴ ニ ス ト は、抗 体、そ の 抗 原 結 合 断 片、イ ム ノ ア ド ヘ シ ン、融 合 タ ン パ ク 質 又 は オ リ ゴ ペ プ チ ド で あ り 得 る。

20

## 【 0 1 5 2 】

一 部 の 実 施 態 様 で は、こ の P D - 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト は、抗 P D - 1 抗 体 (例 え ば、ヒ ト 抗 体、ヒ ト 化 抗 体 又 は キ メ ラ 抗 体) で あ る。一 部 の 実 施 態 様 で は、こ の 抗 P D - 1 抗 体 は、M D X - 1 1 0 6 (ニ ボ ル マ プ、M D X - 1 1 0 6 - 0 4、O N O - 4 5 3 8、B M S - 9 3 6 5 5 8 及 び O P D I V O (登 録 商 標) と し て も 公 知)、M e r c k 3 4 7 5 (ペ ン プ ロ リ ズ マ プ、M K - 3 4 7 5、ラ ム プ ロ リ ズ マ プ、K E Y T R U D A (登 録 商 標) 及 び S C H - 9 0 0 4 7 5 と し て も 公 知) 及 び C T - 0 1 1 (ピ デ ィ リ ズ マ プ、h B A T 及 び h B A T - 1 と し て も 公 知) か ら な る 群 か ら 選 択 さ れ る。一 部 の 実 施 態 様 で は、こ の P D - 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト は、イ ム ノ ア ド ヘ シ ン (例 え ば、定 常 領 域 (例 え ば、免 疫 グ ロ ブ リ ン 配 列 の F c 領 域) に 融 合 さ れ た P D - L 1 又 は P D - L 2 の 細 胞 外 又 は P D - 1 結 合 部 分 を 含 む イ ム ノ ア ド ヘ シ ン) で あ る。一 部 の 実 施 態 様 で は、こ の P D - 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト は、A M P - 2 2 4 (B 7 - D C I g と し て も 公 知) で あ る。一 部 の 実 施 態 様 で は、こ の P D - L 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト は、抗 P D - L 1 抗 体 で あ る。一 部 の 実 施 態 様 で は、こ の 抗 P D - L 1 結 合 ア ン タ ゴ ニ ス ト は、Y W 2 4 3 . 5 5 . S 7 0、M P D L 3 2 8 0 A、M D X - 1 1 0 5 及 び M E D I 4 7 3 6 か ら な る 群 か ら 選 択 さ れ る。B M S - 9 3 6 5 5 9 と し て も 公 知 の M D X - 1 1 0 5 は、国 際 公 開 第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号 に 記 載 さ れ た 抗 P D - L 1 抗 体 で あ る。抗 体 Y W 2 4 3 . 5 5 . S 7 0 (そ れ ぞ れ、配 列 番 号 2 0 及 び 2 1 に 示 さ れ る 重 鎖 及 び 軽 鎖 可 変 領 域 配 列) は、国 際 公 開 第 2 0 1 0 / 0 7 7 6 3 4 号 A 1 に 記 載 さ れ る 抗 P D - L 1 で あ る。M E D I 4 7 3 6 は、国 際 公 開 第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 号 及 び 米 国 特 許 出 願 公 開 第 2 0 1 3 / 0 3 4 5 5 9 号 に 記 載 さ れ た 抗 P D - L 1 抗 体 で あ る。O N O - 4 5 3 8 又 は B M S - 9 3 6 5 5 8 と し て も 公 知 の M D X - 1 1 0 6 は、国 際 公 開 第 2 0 0 6 / 1 2 1 1 6 8 号 に 記 載 さ れ た 抗 P D - 1 抗 体 で あ る。M K - 3 4 7 5 又 は S C H - 9 0 0 4 7 5 と し て も 公 知 の M e r c k 3 7 4 5 は、国 際 公 開 第 2 0 0 9 / 1 1 4 3 3 5 号 に 記 載 さ れ た 抗 P D - 1 抗 体 で あ る。h B A T 又 は h B A T - 1 と し て も 公 知 の C T - 0 1 1 は、国 際 公 開 第 2 0 0 9 / 1 0 1 6 1 1 号 に 記 載 さ れ た 抗 P D - 1 抗 体 で あ る。B 7 - D C I g と し て も 公 知 の A M P - 2 2 4 は、国 際 公 開 第 2 0 1 0 / 0 2 7 8 2 7 号 及 び 国 際 公 開 第 2 0 1 1 / 0 6 6 3 4 2 号 に 記 載 さ れ た P D - L 2 - F c 融 合 可 溶 型 受 容 体 で あ る。

30

40

## 【 0 1 5 3 】

50

一部の実施態様では、この抗PD-1抗体は、MDX-1106である。「MDX-1106」の代替的名称には、MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558又はニボルマブが含まれる。一部の実施態様では、この抗PD-1抗体は、ニボルマブ(CAS登録番号:946414-94-4)である。なおさらなる一実施態様では、配列番号22由来の重鎖可変領域アミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び/又は配列番号23由来の軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗PD-1抗体が提供される。なおさらなる一実施態様では、重鎖及び/又は軽鎖配列を含む単離された抗PD-1抗体が提供され、ここで、

(a)この重鎖配列は、重鎖配列:

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQA 10  
 PGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLF  
 LQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGT LVTVSSASTKGPS  
 VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT  
 SGVHTFPAVLQSSGLYSLSVVTVPSSSLGT KTYTCNVDH  
 KPSNTKVDKRVESKYGP PCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKP  
 KDTLMISRTP E V T C V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D G V E V H N A  
 KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGL  
 LPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCL  
 LVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTT P P V L D S D G S F F L Y  
 SRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGLGK 20  
 (配列番号22)、

と、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列同一性を有し、又は

【0154】

(b)この軽鎖配列は、軽鎖配列:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQK 30  
 GQAPRLLIYDASNRA TGI PARFSGSGSGTDFTLTISSLEP  
 EDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPS VFI FPP  
 SDEQLKSGTASVVC LLN NF Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
 ESVTEQDSK D S T Y S L S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
 LSSPVTKSFNRGEC(配列番号23)

と、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列同一性を有する。

【0155】

本発明の方法に有用な抗PD-L1抗体の例、及びそれを作製する方法は、本明細書に出典明示により援用されるPCT特許出願国際公開第2010/077634号A1に記載されている。

【0156】

一部の実施態様では、このPD-1軸結合アンタゴニストは、抗PD-L1抗体である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、PD-L1とPD-1との間及び/又はPD-L1とB7-1との間の結合を阻害することが可能である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、モノクローナル抗体である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv及び(Fab')<sub>2</sub>断片からなる群から選択される抗体断片である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、ヒト化抗体である。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、ヒト抗体である。

【0157】

国際公開第2010/077634号A1及び米国特許第8217149号に記載されるものなどの、本発明において有用な抗PD-L1抗体は、かかる抗体を含む組成物を含

め、がんを治療するために抗CD20抗体と組み合わせて使用され得る。一部の実施態様では、この抗PD-L1抗体は、配列番号20のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0158】

一実施態様では、この抗PD-L1抗体は、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3配列を含む重鎖可変領域ポリペプチドを含有し、ここで、

(a) このHVR-H1配列は、GFTFSX<sub>1</sub>SWIH(配列番号1)であり；

(b) このHVR-H2配列は、AWIX<sub>2</sub>PYGG SX<sub>3</sub>YYADSVK G(配列番号2)であり；

(c) このHVR-H3配列は、RHWPGGFDY(配列番号3)であり；

ここでさらに、X<sub>1</sub>は、D又はGであり；X<sub>2</sub>は、S又はLであり；X<sub>3</sub>は、T又はSである。

10

【0159】

具体的な一態様では、X<sub>1</sub>はDであり；X<sub>2</sub>はSであり、X<sub>3</sub>はTである。別の一態様では、このポリペプチドは、式：(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)に従う、HVR間に並置された可変領域重鎖フレームワーク配列をさらに含む。なお別の一態様では、これらのフレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列に由来する。さらなる一態様では、これらのフレームワーク配列は、VHサブグループIIIコンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらのフレームワーク配列のうち少なくとも1つは、以下である：

HC-FR1は、EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAAS(配列番号4)であり

HC-FR2は、WVRQAPGKGLEWV(配列番号5)であり

HC-FR3は、RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(配列番号6)であり

HC-FR4は、WGQGTLVTVSA(配列番号7)である。

【0160】

なおさらなる一態様では、この重鎖ポリペプチドは、HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3を含む可変領域軽鎖とさらに組み合わせられ、ここで、

(a) このHVR-L1配列は、RASQX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>A(配列番号8)であり；

(b) このHVR-L2配列は、SASX<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>S(配列番号9)であり；

(c) このHVR-L3配列は、QQX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>PX<sub>15</sub>T(配列番号10)であり；

ここで、さらにX<sub>4</sub>は、D又はVであり；X<sub>5</sub>は、V又はIであり；X<sub>6</sub>は、S又はNであり；X<sub>7</sub>は、A又はFであり；X<sub>8</sub>は、V又はLであり；X<sub>9</sub>は、F又はTであり；X<sub>10</sub>は、Y又はAであり；X<sub>11</sub>は、Y、G、F又はSであり；X<sub>12</sub>は、L、Y、F又はWであり；X<sub>13</sub>は、Y、N、A、T、G、F又はIであり；X<sub>14</sub>は、H、V、P、T又はIであり；X<sub>15</sub>は、A、W、R、P又はTである。

30

40

【0161】

なおさらなる一態様では、X<sub>4</sub>はDであり；X<sub>5</sub>はVであり；X<sub>6</sub>はSであり；X<sub>7</sub>はAであり；X<sub>8</sub>はVであり；X<sub>9</sub>はFであり；X<sub>10</sub>はYであり；X<sub>11</sub>はYであり；X<sub>12</sub>はLであり；X<sub>13</sub>はYであり；X<sub>14</sub>はHであり；X<sub>15</sub>はAである。なおさらなる一態様では、この軽鎖は、式：(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)に従う、HVR間に並置された可変領域軽鎖フレームワーク配列をさらに含む。なおさらなる一態様では、これらのフレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列に由来する。なおさらなる一態様では、これらのフレームワーク配列は、VLカップIコンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらのフレームワーク配列のう

50

ち少なくとも1つは、以下である：

LC - FR 1は、DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITC（配列番号11）であり

LC - FR 2は、WYQQKPGKAPKLLIY（配列番号12）であり

LC - FR 3は、GVPSTRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC（配列番号13）であり

LC - FR 4は、FGQGTKVEIKR（配列番号14）である。

【0162】

別の実施態様では、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む単離された抗PD - L1抗体又は抗原結合断片が提供され、ここで、

(a) この重鎖は、HVR - H1、HVR - H2及びHVR - H3を含み、ここでさらに、

(i) このHVR - H1配列は、GFTFSX<sub>1</sub>SWIHであり；（配列番号1）

(ii) このHVR - H2配列は、AWIX<sub>2</sub>PYGG SX<sub>3</sub>YYADSVK G（配列番号2）であり

(iii) このHVR - H3配列は、RHWPGGFDY（配列番号3）であり、

(b) この軽鎖は、HVR - L1、HVR - L2及びHVR - L3を含み、ここでさらに、

(i) このHVR - L1配列は、RASQX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>TX<sub>7</sub>X<sub>8</sub>A（配列番号8）であり

(ii) このHVR - L2配列は、SASX<sub>9</sub>LX<sub>10</sub>Sであり；（配列番号9）かつ

(iii) このHVR - L3配列は、QQX<sub>11</sub>X<sub>12</sub>X<sub>13</sub>X<sub>14</sub>PX<sub>15</sub>Tであり；（配列番号10）

ここで、さらにX<sub>1</sub>は、D又はGであり；X<sub>2</sub>は、S又はLであり；X<sub>3</sub>は、T又はSであり；X<sub>4</sub>は、D又はVであり；X<sub>5</sub>は、V又はIであり；X<sub>6</sub>は、S又はNであり；X<sub>7</sub>は、A又はFであり；X<sub>8</sub>は、V又はLであり；X<sub>9</sub>は、F又はTであり；X<sub>10</sub>は、Y又はAであり；X<sub>11</sub>は、Y、G、F又はSであり；X<sub>12</sub>は、L、Y、F又はWであり；X<sub>13</sub>は、Y、N、A、T、G、F又はIであり；X<sub>14</sub>は、H、V、P、T又はIであり；X<sub>15</sub>は、A、W、R、P又はTである。

【0163】

具体的な一態様では、X<sub>1</sub>はDであり；X<sub>2</sub>はSであり、X<sub>3</sub>はTである。別の態様では、X<sub>4</sub>はDであり；X<sub>5</sub>はVであり；X<sub>6</sub>はSであり；X<sub>7</sub>はAであり；X<sub>8</sub>はVであり；X<sub>9</sub>はFであり；X<sub>10</sub>はYであり；X<sub>11</sub>はYであり；X<sub>12</sub>はLであり；X<sub>13</sub>はYであり；X<sub>14</sub>はHであり；X<sub>15</sub>はAである。なお別の態様では、X<sub>1</sub>はDであり；X<sub>2</sub>はSであり、X<sub>3</sub>はTであり、X<sub>4</sub>はDであり；X<sub>5</sub>はVであり；X<sub>6</sub>はSであり；X<sub>7</sub>はAであり；X<sub>8</sub>はVであり；X<sub>9</sub>はFであり；X<sub>10</sub>はYであり；X<sub>11</sub>はYであり；X<sub>12</sub>はLであり；X<sub>13</sub>はYであり；X<sub>14</sub>はHであり、X<sub>15</sub>はAである。

【0164】

さらなる一態様では、この重鎖可変領域は、(HC - FR 1) - (HVR - H1) - (HC - FR 2) - (HVR - H2) - (HC - FR 3) - (HVR - H3) - (HC - FR 4)として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含み、この軽鎖可変領域は、(LC - FR 1) - (HVR - L1) - (LC - FR 2) - (HVR - L2) - (LC - FR 3) - (HVR - L3) - (LC - FR 4)として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含む。なおさらなる一態様では、これらのフレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列に由来する。なおさらなる一態様では、これらの重鎖フレームワーク配列は、カバットサブグループI、II又はIII配列に由来する。なおさらなる一態様では、この重鎖フレームワーク配列は、VHサブグループIIIコンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの重鎖

10

20

30

40

50

フレームワーク配列のうち1又は複数は以下である：

HC - FR 1 EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAAS (配列番号4)

HC - FR 2 WVRQAPGKGLEWV (配列番号5)

HC - FR 3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAR  
(配列番号6)

HC - FR 4 WGQGT LVTVSA (配列番号7)。

【0165】

なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、カバットカップI、II、III又はIVサブグループ配列に由来する。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、VLカップIコンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列のうち1又は複数は、以下である：

LC - FR 1 DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC (配列番号11)

LC - FR 2 WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号12)

LC - FR 3 GVPSTRFSGSGSGTDF TLTISSLQPE D F A T Y Y C  
(配列番号13)

LC - FR 4 FGQGT KVEIKR (配列番号14)。

【0166】

なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、ヒト又はマウスの定常領域をさらに含む。なおさらなる一態様では、このヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。なおさらなる具体的な一態様では、このヒト定常領域は、IgG1である。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3からなる群から選択される。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG2Aである。なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、低減された又は最小のエフェクター機能を有する。なおさらなる具体的な一態様では、この最小のエフェクター機能は、「エフェクターなしFc突然変異」又は非グリコシル化から生じる。なおさらなる一実施態様では、このエフェクターなしFc突然変異は、定常領域中のN297A又はD265A/N297A置換である。

【0167】

なお別の一実施態様では、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む抗PD-L1抗体が提供され、ここで、

(a) この重鎖は、それぞれ、GFTFSDSWIH (配列番号15)、AWISPYGGSTYYADSVK G (配列番号16)及びRHWPGGFDY (配列番号3)と少なくとも85%の配列同一性を有する、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3配列をさらに含む、又は

(b) この軽鎖は、それぞれ、RASQDVSTAVA (配列番号17)、SASFLYS (配列番号18)及びQQYLYHPAT (配列番号19)と少なくとも85%の配列同一性を有する、HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3配列をさらに含む。

【0168】

具体的な一態様では、この配列同一性は、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。別の一態様では、この重鎖可変領域は、(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含み、この軽鎖可変領域は、(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含む。なお別の一態様では、これらのフレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列に由来する。なおさらなる一態様では、これらの重鎖フレームワーク配列は、カバットサブグループI、II又はIII配列に由来する。なおさらなる一態様では、この重鎖フレームワーク配列は、VHサブグループIIIコンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの重鎖

10

20

30

40

50

フレームワーク配列のうち1又は複数は、以下である：

HC - FR 1 EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAAS (配列番号4)

HC - FR 2 WVRQAPGKGLEWV (配列番号5)

HC - FR 3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR  
(配列番号6)

HC - FR 4 WGQGTLVTVSA (配列番号7)。

【0169】

なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、カバットカップI、II、III又はIVサブグループ配列に由来する。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、VLカップIコンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列のうち1又は複数は、以下である：

LC - FR 1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (配列番号11)

LC - FR 2 WYQQKPKGKAPKLLIY (配列番号12)

LC - FR 3 GVPSPRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC  
(配列番号13)

LC - FR 4 FGQGTKVEIKR (配列番号14)。

【0170】

なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、ヒト又はマウスの定常領域をさらに含む。なおさらなる一態様では、このヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。なおさらなる具体的な一態様では、このヒト定常領域は、IgG1である。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3からなる群から選択される。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG2Aである。なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、低減された又は最小のエフェクター機能を有する。なおさらなる具体的な一態様では、この最小のエフェクター機能は、「エフェクターなしFc突然変異」又は非グリコシル化から生じる。なおさらなる一実施態様では、このエフェクターなしFc突然変異は、定常領域中のN297A又はD265A/N297A置換である。

【0171】

なおさらなる一実施態様では、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む単離された抗PD-L1抗体が提供され、ここで、

(a) この重鎖配列は、重鎖配列：

EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFS DSWIHWVRQA  
PGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARRRHWPGGF D YWGQGTLVTVSA (配  
列番号20)、

と少なくとも85%の配列同一性を有し、又は

(b) この軽鎖配列は、軽鎖配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPK  
GKAPKLLIYSASF L YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQP  
EDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (配列番号21)

と少なくとも85%の配列同一性を有する。

【0172】

具体的な一態様では、この配列同一性は、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。別の一態様では、この重鎖可変領域は、(HC - FR1) - (HVR - H1) - (HC - FR2) - (HVR - H2) - (HC - FR3) - (HVR - H3) - (HC - FR4)として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含み、この軽鎖可変領域は、(LC - FR1) - (HVR - L1) - (LC - FR2) - (HVR - L2) - (LC - FR3) - (HVR - L3) - (LC - FR4)として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含む。なお別の一態様では、これらのフレー

10

20

30

40

50

ムワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列に由来する。さらなる一態様では、これらの重鎖フレームワーク配列は、カバットサブグループ I、II 又は III 配列に由来する。なおさらなる一態様では、この重鎖フレームワーク配列は、VH サブグループ III コンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの重鎖フレームワーク配列のうち 1 又は複数は、以下である：

HC - FR 1 EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAAS (配列番号 4)

HC - FR 2 WVRQAPGKGLEWV (配列番号 5)

HC - FR 3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (配列番号 6)

HC - FR 4 WGQGT LVT VSA (配列番号 7)。

【0173】

なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、カバットカップ I、II、III 又は IV サブグループ配列に由来する。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、VL カップ I コンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列のうち 1 又は複数は、以下である：

LC - FR 1 DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITC (配列番号 11)

LC - FR 2 WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号 12)

LC - FR 3 GVP SRFSGSGSGTDF TLTIS SLQPE D F A T Y Y C (配列番号 13)

LC - FR 4 FGQGT KVEIKR (配列番号 14)。

【0174】

なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、ヒト又はマウスの定常領域をさらに含む。なおさらなる一態様では、このヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4 からなる群から選択される。なおさらなる具体的な一態様では、このヒト定常領域は、IgG1 である。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3 からなる群から選択される。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG2A である。なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、低減された又は最小のエフェクター機能を有する。なおさらなる具体的な一態様では、この最小のエフェクター機能は、原核細胞における産生から生じる。なおさらなる具体的な一態様では、この最小のエフェクター機能は、「エフェクターなしFc突然変異」又は非グリコシル化から生じる。なおさらなる一実施態様では、このエフェクターなしFc突然変異は、定常領域中の N297A 又は D265A / N297A 置換である。

【0175】

別のさらなる一実施態様では、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む単離された抗 PD-L1 抗体であって、

(a) この重鎖配列は、

重鎖配列：

EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAASGFT FSDSWIHWVRQA  
PGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY  
LQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVT VSS (配  
列番号 24)

と少なくとも 85% の配列同一性を有し、又は

(b) この軽鎖配列は、軽鎖配列：

DIQMTQSPSSLSASVGD RVTITCRASQDVSTAVAWYQQK P  
GKAPKLLIY SASF LYS GVP SRFSGSGSGTDF TLTIS SL  
QPE D F A T Y Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R (配列番号 21)

と少なくとも 85% の配列同一性を有する、単離された抗 PD-L1 抗体が提供される。

【0176】

なおさらなる一実施態様では、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む単離された抗 PDL1 抗体であって、

10

20

30

40

50

( a ) この重鎖配列は、重鎖配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQA  
PGKGLEWVAWI SPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTA  
YLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVTVSSA  
STK ( 配列番号 28 )

と少なくとも 85% の配列同一性を有し、又は

( b ) この軽鎖配列は、軽鎖配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVSTAVAWYQQKPK  
GKAPKLLIYSAF LYSVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ  
PEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR ( 配列番号 29 )

10

と少なくとも 85% の配列同一性を有する、単離された抗 PDL1 抗体が提供される。

【 0177 】

具体的な一態様では、この配列同一性は、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。別の一態様では、この重鎖可変領域は、( HC - FR1 ) - ( HVR - H1 ) - ( HC - FR2 ) - ( HVR - H2 ) - ( HC - FR3 ) - ( HVR - H3 ) - ( HC - FR4 ) として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含み、この軽鎖可変領域は、( LC - FR1 ) - ( HVR - L1 ) - ( LC - FR2 ) - ( HVR - L2 ) - ( LC - FR3 ) - ( HVR - L3 ) - ( LC - FR4 ) として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含む。なお別の一態様では、これらのフレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列に由来する。さらなる一態様では、これらの重鎖フレームワーク配列は、カバットサブグループ I、II又はIII配列に由来する。なおさらなる一態様では、この重鎖フレームワーク配列は、VHサブグループ IIIコンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの重鎖フレームワーク配列のうち1又は複数は、以下である：

20

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS ( 配列番号 4 )  
HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV ( 配列番号 5 )  
HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAR ( 配列番号 6 )  
HC-FR4 WGQGT LVTVSS ( 配列番号 25 )。

【 0178 】

なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、カバットカップ I、II、III又はIVサブグループ配列に由来する。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、VLカップ Iコンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列のうち1又は複数は、以下である：

30

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC ( 配列番号 11 )  
LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY ( 配列番号 12 )  
LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC ( 配列番号 13 )  
LC-FR4 FGQGTKVEIKR ( 配列番号 14 )。

【 0179 】

なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、ヒト又はマウスの定常領域をさらに含む。なおさらなる一態様では、このヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。なおさらなる具体的な一態様では、このヒト定常領域は、IgG1である。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3からなる群から選択される。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG2Aである。なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、低減された又は最小のエフェクター機能を有する。なおさらなる具体的な一態様では、最小のエフェクター機能は、原核細胞における産生から生じる。なおさらなる具体的な一態様では、この最小のエフェクター機能は、「エフェクターなしFc突然変異」又は非グリコシル化から生じる。なおさらなる一実施態様では、このエフェクターなしFc突然変異は、定常領域中のN297A又はD265A/N297A置換である。

40

50

## 【0180】

なお別の実施態様では、この抗PD-1抗体は、MPDL3280Aである。なおさらなる実施態様では、配列番号24由来の重鎖可変領域アミノ酸配列を含む重鎖可変領域及び/又は配列番号25由来の軽鎖可変領域アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、単離された抗PD-1抗体が提供される。なおさらなる実施態様では、重鎖及び/又は軽鎖配列を含む単離された抗PD-1抗体であって、

(a)この重鎖配列は、重鎖配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTTFSDSWIHWVRQA  
 PGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAY  
 LQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGT LVT VSSAS  
 TKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWN  
 SGALTS G VHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTV P SSS L GTQTYI  
 CNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPS  
 VFLFP P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V  
 DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY  
 KCKVSNKALPAPIEKTKISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMT  
 KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPVL D  
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK  
 SLSLSPG (配列番号26)

10

と、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列同一性を有し、又は

20

(b)この軽鎖配列は、

軽鎖配列：

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQK P  
 GKAPKLLIYSASF LYS G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P  
 EDFATY Y C Q Q Y L Y H P A T F G Q G T K V E I K R T V A A P S V F I F P P  
 SDEQLKSGTASVVC L L N N F Y P R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q  
 ESVTEQDSKDYSL S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G  
 LSSPVTKSFNRGEC (配列番号27)

30

と、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも91%、少なくとも92%、少なくとも93%、少なくとも94%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、少なくとも99%又は100%の配列同一性を有する、単離された抗PD-1抗体が提供される。

## 【0181】

なおさらなる実施態様では、本発明は、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と組み合わせて上記抗PD-L1抗体のいずれかを含む組成物を提供する。

## 【0182】

なおさらなる実施態様では、抗PD-L1抗体の軽鎖又は重鎖可変領域配列をコードする単離された核酸であって、

40

(a)この重鎖は、それぞれ、GFTTFSDSWIH (配列番号15)、AWISPYGGSTYYADSVK G (配列番号16)及びRHWPGGFDY (配列番号3)と少なくとも85%の配列同一性を有する、HVR-H1、HVR-H2及びHVR-H3配列をさらに含み、

(b)この軽鎖は、それぞれ、RASQDVSTAVA (配列番号17)、SASF L Y S (配列番号18)及びQQYLYHPAT (配列番号19)と少なくとも85%の配列同一性を有する、HVR-L1、HVR-L2及びHVR-L3配列をさらに含む、単離された核酸が提供される。

## 【0183】

具体的な態様では、この配列同一性は、86%、87%、88%、89%、90%、

50

91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又は100%である。一態様では、この重鎖可変領域は、(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含み、この軽鎖可変領域は、(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)として、HVR間に並置された1又は複数のフレームワーク配列を含む。なお別の態様では、これらのフレームワーク配列は、ヒトコンセンサスフレームワーク配列に由来する。さらなる一態様では、これらの重鎖フレームワーク配列は、カバットサブグループI、II又はIII配列に由来する。なおさらなる一態様では、この重鎖フレームワーク配列は、VHサブグループII I I I コンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの重鎖フレームワーク配列のうち1又は複数は、以下である：

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQP GGS LRLSCAAS (配列番号4)  
 HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (配列番号5)  
 HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLR AEDTAVYYCAR (配列番号6)  
 HC-FR4 WGQGT LVTVSA (配列番号7)。

#### 【0184】

なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、カバットカップI、II、III又はIVサブグループ配列に由来する。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列は、VLカップI I I コンセンサスフレームワークである。なおさらなる一態様では、これらの軽鎖フレームワーク配列のうち1又は複数は、以下である：

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC (配列番号11)  
 LC-FR2 WYQQKPKAPKLLIY (配列番号12)  
 LC-FR3 GVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE D F A T Y Y C (配列番号13)  
 LC-FR4 FGQGT KVEIKR (配列番号14)。

#### 【0185】

なおさらなる具体的な一態様では、本明細書に記載される抗体(例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体又は抗PD-L2抗体)は、ヒト又はマウスの定常領域をさらに含む。なおさらなる一態様では、このヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。なおさらなる具体的な一態様では、このヒト定常領域は、IgG1である。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3からなる群から選択される。なおさらなる一態様では、このマウス定常領域は、IgG2Aである。なおさらなる具体的な一態様では、この抗体は、低減された又は最小のエフェクター機能を有する。なおさらなる具体的な一態様では、この最小のエフェクター機能は、原核細胞における産生から生じる。なおさらなる具体的な一態様では、この最小のエフェクター機能は、「エフェクターなしFc突然変異」又は非グリコシル化から生じる。なおさらなる一態様では、このエフェクターなしFc突然変異は、定常領域中のN297A又はD265A/N297A置換である。

#### 【0186】

なおさらなる一態様では、本明細書に記載される抗体のいずれかをコードする単離された核酸が本明細書で提供される。一部の実施態様では、この核酸は、以前に記載した抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体又は抗PD-L2抗体のいずれかをコードする核酸の発現に適切なベクターをさらに含む。なおさらなる具体的な一態様では、このベクターは、核酸の発現に適切な宿主細胞をさらに含む。なおさらなる具体的な一態様では、この宿主細胞は、真核細胞又は原核細胞である。なおさらなる具体的な一態様では、この真核細胞は、哺乳動物細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)である。

#### 【0187】

抗体又はその抗原結合断片は、当該技術分野で公知の方法を使用して、例えば、以前に

10

20

30

40

50

記載した抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体若しくは抗PD-L2抗体又は抗原結合断片のいずれかをコードする核酸を発現に適切な形態を含む宿主細胞を、かかる抗体又は断片を産生するのに適切な条件下で培養すること、及びこの抗体又は断片を回収することを含むプロセスによって、作製され得る。

【0188】

なおさらなる一実施態様では、本発明は、本明細書に提供されるような抗PD-L1、抗PD-1若しくは抗PD-L2抗体又はそれらの抗原結合断片及び少なくとも一つの薬学的に許容される担体を含む組成物を提供する。一部の実施態様では、個体に投与される抗PD-L1、抗PD-1若しくは抗PD-L2抗体又はそれらの抗原結合断片は、1又は複数の薬学的に許容される担体を含む組成物である。本明細書に記載される又は当該技術分野で公知の薬学的に許容される担体のいずれかが、使用され得る。

10

【0189】

一部の実施態様では、本明細書に記載される抗PD-L1抗体は、約60mg/mLの量の抗体、約20mMの濃度のヒスチジンアセテート、約120mMの濃度のショ糖、及び0.04% (w/v)の濃度のポリソルベート(例えば、ポリソルベート20)を含む製剤中にあり、この製剤は、約5.8のpHを有する。一部の実施態様では、本明細書に記載される抗PD-L1抗体は、約125mg/mLの量の抗体、約20mMの濃度のヒスチジンアセテート、約240mMの濃度のショ糖、及び0.02% (w/v)の濃度のポリソルベート(例えば、ポリソルベート20)を含む製剤中にあり、この製剤は、約5.5のpHを有する。

20

【0190】

抗CD20抗体

有効量のPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を個体に投与することを含む、個体においてがんを治療する又はその進行を遅延させるための方法が、本明細書で提供される。当該技術分野で公知の及び本明細書に記載される任意のCD20抗体が、これらの方法において使用され得る。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、ヒトCD20に結合する。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、I型抗体又はII型抗体である。一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、アフコシル化されている。

【0191】

II型抗CD20抗体の例には、例えば、ヒト化B-Ly1抗体IgG1(国際公開第2005/044859号に開示されるキメラヒト化IgG1抗体)、11B8 IgG1(国際公開第2004/035607号に開示される)及びAT80 IgG1が含まれる。典型的には、IgG1アイソタイプのII型抗CD20抗体は、特徴的CDC特性を示す。II型抗CD20抗体は、IgG1アイソタイプのI型抗体と比較して、減少したCDC(IgG1アイソタイプの場合)を有する。

30

【0192】

I型抗CD20抗体の例には、例えば、リツキシマブ、HI47 IgG3(EGACC、ハイブリドーマ)、2C6 IgG1(国際公開第2005/103081号に開示される)、2F2 IgG1(国際公開第2004/035607号及び国際公開第2005/103081号に開示される)及び2H7 IgG1(国際公開第2004/056312号に開示される)が含まれる。

40

【0193】

一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、本明細書に記載されるGA101抗体である。一部の実施態様では、この抗CD20は、ヒトCD20を結合する以下の抗体のうちいずれか1つである：(1)GYAFSY(配列番号50)のアミノ酸配列を含むHVR-H1、FPGDGD TD(配列番号51)のアミノ酸配列を含むHVR-H2、NVFDGYWL VY(配列番号52)のアミノ酸配列を含むHVR-H3、RSSKSL LHSNGIT YLY(配列番号53)のアミノ酸配列を含むHVR-L1、QMSNL V S(配列番号54)のアミノ酸配列を含むHVR-L2及びAQNLELPYT(配列番号55)のアミノ酸配列を含むHVR-L3を含む抗体；(2)配列番号56のアミノ酸

50

配列を含むVHドメイン及び配列番号57のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む抗体、(3)配列番号58のアミノ酸配列及び配列番号59のアミノ酸配列を含む抗体；(4)オビヌツズマブとして公知の抗体、又は(5)配列番号58のアミノ酸配列と、少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含み、配列番号59のアミノ酸配列と、少なくとも95%、96%、97%、98%若しくは99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗体。一実施態様では、このGA101抗体は、IgG1アイソタイプ抗体である。

【0194】

一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、配列番号56のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)及び配列番号57のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む。

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQA  
 PGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAY  
 MELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVT VSS (配列番号56)

DIVMTQTPLSLPVT PGEPA S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W  
 YLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
 SRVEAEDVGVYYCAQNL E L P Y T F G G G T K V E I K R T V (配列番号57)

【0195】

一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、配列番号58のアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号59のアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQA  
 PGQGLEWMGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAY  
 MELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT LVT VSS A

STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW  
 NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSLVVTVPSSSLGTQTY  
 ICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP  
 SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY  
 VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE  
 YKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL  
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL  
 DSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQ  
 KSLSLSPG (配列番号58)

DIVMTQTPLSLPVT PGEPA S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W  
 YLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI  
 SRVEAEDVGVYYCAQNL E L P Y T F G G G T K V E I K R T V A A P S V  
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ  
 SGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACE  
 VTHQGLSSSPVTKSFNRGEC (配列番号59)

【0196】

一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、ヒト化B-Ly1抗体である。一部の実施態様では、このヒト化B-Ly1抗体は、配列番号60の3つの重鎖CDRを含む重鎖可変領域及び配列番号61の3つの軽鎖CDRを含む軽鎖可変領域を含む。一部の実施態様では、このヒト化B-Ly1抗体は、配列番号60の配列を含む重鎖及び配列番号61の配列を含む軽鎖を含む。

重鎖(配列番号60)

QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR 50  
 IFPGDGD TDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV 100  
 FDGYWLVYWG QGT LVT VSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150  
 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFP AVLQSSG LYSLSLVVTV PSSSLGTQTY 200

10

20

30

40

50

ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250  
 DTLMI SRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300  
 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350  
 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 400  
 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG 449  
 軽鎖 (配列番号 61)  
 DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLI HSNGITYLYW YLQKPGQSPQ 50  
 LLIQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP 100  
 YTFGGGTKVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVCL LNNFYPREAK 150  
 VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE 200  
 VTHQGLSSPV TKSFNREGC 219

10

【0197】

一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、アフコシル化された糖鎖操作抗体である。かかる糖鎖操作抗体は、Fc領域中に改変されたパターンのグリコシル化を有し、好ましくは、低減されたレベルのフコース残基を有する。好ましくは、フコースの量は、Asn297におけるオリゴ糖の総量の60%以下である（一実施態様では、フコースの量は、40%と60%との間であり、別の一実施態様では、フコースの量は、50%以下であり、なお別の一実施態様では、フコースの量は、30%以下である）。さらに、Fc領域のオリゴ糖は、好ましくは二分されている。これらの糖鎖操作ヒト化抗CD20（例えば、B-Ly1）抗体は、増加したADCCを有する。

20

【0198】

このオリゴ糖成分は、物理的安定性、プロテアーゼ攻撃に対する耐性、免疫系との相互作用、薬物動態及び特異的生物活性を含む、治療的糖タンパク質の有効性に関連する特性に顕著に影響を与え得る。かかる特性は、オリゴ糖の存在又は非存在だけでなく、その特定の構造にも依存し得る。オリゴ糖構造と糖タンパク質機能との間の幾分かの一般化がなされ得る。例えば、特定のオリゴ糖構造は、特定の糖（炭水化物）結合タンパク質との相互作用を介して血流からの糖タンパク質の迅速なクリアランスを媒介するが、その他は、抗体によって結合され得、望ましくない免疫反応を誘発する（Jenkins, N.等, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-81）。

30

【0199】

哺乳動物細胞は、ヒト適用のために最も適合性の形態でタンパク質をグリコシル化するそれらの能力に起因して、治療的糖タンパク質の産生のために好ましい宿主である（Cumming, D.A.等, Glycobiology 1 (1991) 115-30; Jenkins, N.等, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-81）。細菌は、タンパク質を非常に稀にしかグリコシル化せず、酵母、糸状菌、昆虫及び植物細胞などの他の型の一般的宿主と同様、血流からの迅速なクリアランス、望ましくない免疫相互作用、及び一部の特定の場合には低減された生物活性と関連する、グリコシル化パターンを生じる。哺乳動物細胞の中で、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞は、過去20年間の間に最も一般的に使用されてきた。適切なグリコシル化パターンを与えることに加えて、これらの細胞は、遺伝的に安定な、高度に増殖性の（productive）クローン性細胞株の一貫した生成を可能にする。これらは、無血清培地を使用して単純なバイオリクター中で高密度になるまで培養され得、安全かつ再現性の高いバイオプロセスの開発を可能にする。他の一般に使用される動物細胞には、ベビーハムスター腎臓（BHK）細胞、NSO-及びSP2/0-マウス骨髄腫細胞が含まれる。より最近、トランスジェニック動物からの産生もまた試験された（Jenkins, N.等, Nature Biotechnol. 14 (1996) 975-981）。

40

【0200】

全ての抗体は、重鎖定常領域中の保存された位置に糖鎖（炭水化物）構造を含み、各アイソタイプは、タンパク質アセンブリ、分泌又は機能的活性に可变的に影響を与える異なるアレイのN結合型糖鎖（炭水化物）構造を有する（Wright, A.及びMorrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32）。結合したN結合型糖鎖（炭水化物）の構造は、プロ

50

セシングの程度に依存してかなり変動し、高マンノース、多重分枝状及び二分岐の複合オリゴ糖を含み得る (Wright, A. 及び Morrison, S.L., Trends Biotech. 15 (1997) 26-32)。典型的には、同等なモノクローナル抗体が複数のグリコフォームとして存在するように、特定のグリコシル化部位において結合したコアオリゴ糖構造の不均一なプロセシングが存在する。同様に、抗体のグリコシル化における大きな差異が細胞株間で生じ、軽微な差異さえもが、異なる培養条件下で増殖した所与の細胞株について見られることが示されている (Lifely, M.R. 等, Glycobiology 5(8) (1995) 813-22)。

#### 【0201】

単純な産生プロセスを維持し、顕著な望ましくない副作用を潜在的に回避しつつ、力価における大きな増加を得るための1つの方法は、Umana, P. 等, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180 及び米国特許第6602684号に記載されるように、それらのオリゴ糖成分を操作することによって、モノクローナル抗体の天然の細胞媒介性エフェクター機能を増強することである。がん免疫療法において最も一般的に使用される抗体、IgG1型抗体は、各CH2ドメイン中のAsn297において保存されたN結合グリコシル化部位を有する糖タンパク質である。Asn297に結合した2つの複合二分岐オリゴ糖は、CH2ドメイン間に埋め込まれ、ポリペプチド骨格との広範な接触を形成し、それらの存在は、抗体が、抗体依存性細胞傷害(ADCC)などのエフェクター機能を媒介するために必須である (Lifely, M.R. 等, Glycobiology 5 (1995) 813-822; Jefferis, R. 等, Immunol. Rev. 163 (1998) 59-76; Wright, A. 及び Morrison, S.L., Trends Biotechnol. 15 (1997) 26-32)。

10

20

#### 【0202】

チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞における、二分されたオリゴ糖の形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼ、(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼI11('GnTII17y)の過剰発現は、操作されたCHO細胞によって産生された抗神経芽腫キメラモノクローナル抗体(chCE7)のインビトロADCC活性を顕著に増加させることが、以前に示されている(その全内容が本明細書に出典明示により援用される、Umana, P. 等, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; 及び国際公開第99/154342号を参照のこと)。抗体chCE7は、高い腫瘍親和性及び特異性を有するが、GnTII酵素を欠く標準的な工業的細胞株において産生された場合には臨床的に有用であるには小さすぎる力価を有する、非コンジュゲートモノクローナル抗体の大きいクラスに属する (Umana, P. 等, Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180)。この研究は、ADCC活性の大きな増加が、天然に存在する抗体において見出されるレベルを上回った、二分された非フコシル化オリゴ糖を含む定常領域(Fc)関連の二分されたオリゴ糖の割合における増加もまたもたらずGnTIIを発現するように抗体産生細胞を操作することによって得られ得ることを示した最初のものである。

30

#### 【0203】

一部の実施態様では、この抗CD20抗体は、多重特異性抗体又は二重特異性抗体である。

#### 【0204】

##### IV. 抗体調製

本明細書に記載される抗体は、抗体を生成するために当該技術分野で利用可能な技術を使用して調製され、その例示的な方法は、以下のセクションに、より詳細に記載されている。

40

#### 【0205】

この抗体は、目的の抗原(即ち、PD-L1(例えばヒトPD-L1)、又はCD20(例えばヒトCD20))に対するものである。好ましくは、この抗原は、生物学的に重要なポリペプチドであり、障害に罹患している哺乳動物へのこの抗体の投与は、その哺乳動物において治療的利益を生じ得る。

#### 【0206】

50

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、 $1 \mu\text{M}$ 、 $150 \text{ nM}$ 、 $100 \text{ nM}$ 、 $50 \text{ nM}$ 、 $10 \text{ nM}$ 、 $1 \text{ nM}$ 、 $0.1 \text{ nM}$ 、 $0.01 \text{ nM}$ 又は $0.001 \text{ nM}$ （例えば、 $10^{-8} \text{ M}$ 以下、例えば、 $10^{-8} \text{ M}$ から $10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M}$ から $10^{-13} \text{ M}$ ）の目的の具体的な抗原への解離定数（ $K_d$ ）を有する。

#### 【0207】

一実施態様では、 $K_d$ は、以下のアッセイによって記載されるように、Fabバージョンの目的の抗体及びその抗原を用いて実施される放射標識抗原結合アッセイ（RIA）によって測定される。抗原に対するFabの溶液結合親和性は、標識されていない抗原の滴定系列の存在下で、最小濃度の（ $^{125}\text{I}$ ）標識された抗原によってFabを平衡化し、次いで、抗Fab抗体でコートされたプレートを用いて結合した抗原を捕捉することによって測定される（例えば、Chen等、J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)を参照のこと）。アッセイのための条件を確立するために、MICRO TITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）が、 $50 \text{ mM}$ 炭酸ナトリウム（ $\text{pH } 9.6$ ）中 $5 \mu\text{g/ml}$ の捕捉抗Fab抗体（Cappel Labs）で一晩コートされ、引き続いて、室温（およそ $23^\circ\text{C}$ ）で2から5時間にわたってPBS中2%（w/v）のウシ血清アルブミンでブロッキングされる。非吸着剤プレート（Nunc # 269620）中で、 $100 \text{ pM}$ 又は $26 \text{ pM}$ の $[^{125}\text{I}]$ -抗原が、目的のFabの段階希釈と混合される。次いで、目的のFabは、一晩インキュベートされる；しかし、このインキュベーションは、平衡化が達成されることを確実にするために、より長い期間（例えば、約65時間）にわたって継続し得る。その後、この混合物は、室温でのインキュベーション（例えば1時間にわたる）のために、捕捉プレートに移される。次いで、溶液が除去され、プレートが、PBS中0.1%のポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））で8回洗浄される。プレートが乾燥したら、 $150 \mu\text{l}$ ウェルの閃光物質（MICROSCINT-20（商標）；Packard）が添加され、プレートは、TOPCOUNT（商標）ガンマカウンター（Packard）で10分間計数される。最大結合の20%以下を与える各Fabの濃度は、競合的結合アッセイにおける使用のために選択される。

10

20

#### 【0208】

別の実施態様によれば、 $K_d$ は、 $\sim 10$ 反応単位（RU）で、固定化されている抗原CM5チップと共に25でBIACORE（登録商標）-2000又はBIACORE（登録商標）-3000（BIACORE, Inc., Piscataway, NJ）を使用する表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。簡潔に述べると、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIACORE, Inc.）は、供給業者の指示書に従ってN-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）及びN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて活性化される。抗原は、およそ10反応単位（RU）のカップリングされたタンパク質を達成するために、 $5 \mu\text{l/分}$ の流速での注入前に、 $10 \text{ mM}$ 酢酸ナトリウム、 $\text{pH } 4.8$ で $5 \mu\text{g/ml}$ （ $\sim 0.2 \mu\text{M}$ ）に希釈される。抗原の注入後、 $1 \text{ M}$ エタノールアミンが、未反応の基をブロッキングするために注入される。反応速度論的な測定のため、0.05%ポリソルベート20（TWEEN-20（商標））界面活性剤を有するPBS（PBST）中2倍段階希釈のFab（ $0.78 \text{ nM}$  -  $500 \text{ nM}$ ）が、およそ $25 \mu\text{l/分}$ の流速で25で注入される。会合速度（association rate）（ $k_{on}$ ）及び解離速度（ $k_{off}$ ）は、会合及び解離センサーグラムを同時にフィットさせることによって、単純な一対一Langmuir結合モデル（BIACORE（登録商標）Evaluation Softwareバージョン3.2）を使用して計算される。平衡解離定数（ $K_d$ ）は、比 $k_{off}/k_{on}$ として計算される。例えば、Chen等、J. Mol. Biol. 293:865-881（1999）を参照のこと。会合速度（on-rate）が、上記表面プラズモン共鳴アッセイによって $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を超える場合、この会合速度（on-rate）は、ストップフロー装置分光光度計（Aviv Instruments）又は攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO（商標）分光光度計

30

40

50

(ThermoSpectronic)などの分光計で測定した場合、漸増濃度の抗原の存在下で、PBS、pH7.2中の20nM抗抗原抗体(Fab形態)の、25における蛍光放出強度(励起=295nm;放出=340nm、16nm帯域通過)における増加又は減少を測定する蛍光消光技術を使用することによって、決定され得る。

#### 【0209】

##### (i) 抗原調製

他の分子に任意選択的にコンジュゲートされた可溶性抗原又はその断片は、抗体を生成するための免疫原として使用され得る。膜貫通分子、例えば、受容体について、これらの断片(例えば、受容体の細胞外ドメイン)は、免疫原として使用され得る。あるいは、膜貫通分子を発現する細胞が、免疫原として使用され得る。かかる細胞は、天然供給源(例えば、がん細胞株)から誘導され得るか、又は膜貫通分子を発現するように組換え技術によって形質転換された細胞であり得る。抗体を調製するために有用な他の抗原及びその形態は、当業者に明らかである。

10

#### 【0210】

##### (ii) 特定の抗体ベースの方法

ポリクローナル抗体は、好ましくは、適切な抗原及びアジュバントの複数回の皮下(s.c)又は腹腔内(i.p)注射によって、動物において惹起される。二官能性又は誘導体化剤、例えば、マレイミドベンゾイルスルホスクシンイミドエステル(システイン残基を介したコンジュゲーション)、N-ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する)、グルタルアルデヒド、無水コハク酸、 $\text{SOCl}_2$ 又は $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ 、式中、R及び $\text{R}^1$ は、異なるアルキル基である、を使用して、免疫化される種において免疫原性であるタンパク質、例えば、キーホールリンペットヘモシアニン、血清アルブミン、ウシサイログロブリン又はダイストリプシン阻害因子に、適切な抗原をコンジュゲートさせることが有用であり得る。

20

#### 【0211】

動物は、例えば、100 $\mu\text{g}$ 又は5 $\mu\text{g}$ のタンパク質又はコンジュゲート(それぞれ、ウサギ又はマウスについて)を、3容積の完全フロイントアジュバントと組み合わせ、この溶液を複数の部位に皮内注射することによって、抗原、免疫原性コンジュゲート又は誘導体に対して免疫化される。1カ月後、動物は、完全フロイントアジュバント中で、元の量の1/5から1/10のペプチド又はコンジュゲートにより、複数の部位における皮下注射によって追加免疫される。7から14日間後、動物は出血させられ、血清が、抗体価についてアッセイされる。動物は、力価がプラトーになるまで追加免疫される。好ましくは、この動物は、同じ抗原のコンジュゲートではあるが、異なるタンパク質に及び/又は異なる架橋試薬を介してコンジュゲートされたコンジュゲートで、追加免疫される。コンジュゲートは、タンパク質融合物として組換え細胞培養物中에서도作製され得る。また、凝集剤、例えばミョウバンが、免疫応答を増強するために適切に使用される。

30

#### 【0212】

本発明のモノクローナル抗体は、Kohler等、Nature、256:495(1975)によって最初に記載され、例えば、Hongo等、Hybridoma、14(3):253-260(1995)、Harlow等、Antibodies: A Laboratory Manual、(Cold Spring Harbor Laboratory Press、2nd ed. 1988); Hammerling等、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier、N.Y.、1981)、及びヒト-ヒトハイブリドーマに関するNi、Xiandai Mianyixue、26(4):265-268(2006)中にさらに記載されたハイブリドーマ法を使用して作製され得る。さらなる方法には、例えば、ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト天然IgM抗体に関する米国特許第7189826号に記載される方法が含まれる。ヒトハイブリドーマテクノロジー(トリオマテクノロジー)は、Vollmers及びBrandlein、Histology and Histopathology、20(3):927-

40

50

937 (2005) 並びに Vollmers 及び Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27 (3) : 185 - 91 (2005) に記載されている。

#### 【0213】

種々の他のハイブリドーマ技術については、例えば、米国特許出願公開第2006/258841号；米国特許出願公開第2006/183887号（完全ヒト抗体）、米国特許出願公開第2006/059575号；米国特許出願公開第2005/287149号；米国特許出願公開第2005/100546号；米国特許出願公開第2005/026229号；並びに米国特許第7078492号及び米国特許第7153507号を参照のこと。ハイブリドーマ法を使用してモノクローナル抗体を産生するための例示的なプロトコールは、以下に記載される。一実施態様では、マウス又は他の適切な宿主動物、例えば、ハムスターは、免疫化のために使用されるタンパク質に特異的に結合する抗体を産生する又は産生することが可能なリンパ球を惹起するために免疫化される。抗体は、本発明のポリペプチド又はその断片、及びアジュバント、例えば、モノホスホリルリピドA (MPL) / トレハロースジコリノミコラート (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.) の複数回の皮下 (sc) 又は腹腔内 (ip) 注射によって、動物において惹起される。本発明のポリペプチド (例えば、抗原) 又はその断片は、当該技術分野で周知の方法、例えば組換え方法を使用して調製され得、そのうちいくつかは、本明細書にさらに記載される。免疫化した動物由来の血清が、抗抗原抗体についてアッセイされ、追加免疫免疫化が、任意選択的に投与される。抗抗原抗体を産生する動物からリンパ球が単離される。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。

10

20

#### 【0214】

次いで、リンパ球は、ハイブリドーマ細胞を形成するために、適切な融剤、例えばポリエチレングリコールを使用して、骨髓腫細胞と融合される。例えば、Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986) を参照のこと。効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による抗体の安定な高レベル産生を支持し、HAT培地などの培地に対して感受性である骨髓腫細胞が、使用され得る。例示的な骨髓腫細胞には、マウス骨髓腫株、例えば、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, Calif. USA から入手可能なMOPC - 21及びMPC - 11マウス腫瘍由来のもの、及びアメリカンタイプカルチャーコレクション、Rockville, Md. USA から入手可能なSP - 2又はX63 - Ag8 - 653細胞が含まれるが、これらに限定されない。ヒト骨髓腫及びマウス - ヒトヘテロ骨髓腫 (heteromyeloma) 細胞株もまた、ヒトモノクローナル抗体の産生のために記載されている (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur 等, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

30

#### 【0215】

こうして調製されたハイブリドーマ細胞は、適切な培地、例えば、未融合の親骨髓腫細胞の増殖又は生存を阻害する1又は複数の物質を含む培地中で、播種及び増殖される。例えば、親骨髓腫細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ (HGPR T 又は HPR T) を欠く場合、ハイブリドーマのための培地は、典型的には、HGPR T 欠損細胞の増殖を防止する物質、ヒポキサンチン、アミノプテリン及びチミジンを含む (HAT培地)。好ましくは、無血清ハイブリドーマ細胞培養法は、例えば、Even 等, Trends in Biotechnology, 24 (3), 105 - 108 (2006) に記載されるように、動物由来の血清、例えば、ウシ胎児血清の使用を低減させるために使用される。

40

#### 【0216】

50

ハイブリドーマ細胞培養物の生産性を改善するためのツールとしてのオリゴペプチドが、*Franek, Trends in Monoclonal Antibody Research, 111-122 (2005)*に記載されている。具体的には、標準的な培地は、特定のアミノ酸（アラニン、セリン、アスパラギン、プロリン）が、又はタンパク質加水分解物画分が富化されており、アポトシスは、3から6アミノ酸残基から構成される合成オリゴペプチドによって顕著に抑制され得る。これらのペプチドは、ミリモル又はそれより高い濃度で存在する。

#### 【0217】

ハイブリドーマ細胞が増殖している培地は、本発明の抗体に結合するモノクローナル抗体の産生についてアッセイされ得る。ハイブリドーマ細胞によって産生されるモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降法によって、又はインビトロ結合アッセイ、例えば、ラジオイムノアッセイ（RIA）若しくは酵素結合性免疫吸着検定法（ELISA）によって、決定され得る。モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、スクッチャード解析によって決定され得る。例えば、*Munson等, Anal. Biochem., 107:220 (1980)*を参照のこと。

#### 【0218】

所望の特異性、親和性及び/又は活性の抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定された後、それらのクローンは、限界希釈手順によってサブクロニングされ得、標準的な方法によって増殖され得る。例えば、*Goding*、上記を参照のこと。この目的のために適切な培地には、例えば、D-MEM又はRPMI-1640培地が含まれる。さらに、ハイブリドーマ細胞は、動物において腹水腫瘍としてインビボで増殖され得る。これらのサブクロンによって分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析又はアフィニティークロマトグラフィーなどの従来免疫グロブリン精製手順によって、培地、腹水又は血清から適切に分離される。ハイブリドーマ細胞からのタンパク質の単離のための1つの手順は、米国特許出願公開第2005/176122号及び米国特許第6919436号に記載されている。この方法は、結合プロセスにおいて、最小の塩、例えば、リオトロピックな塩を使用すること、及び好ましくは、溶出プロセスにおいて少量の有機溶媒もまた使用することを含む。

#### 【0219】

##### (iii) ライブラリー由来抗体

本発明の抗体は、所望の活性（単数又は複数）を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、種々の方法が、実施例3に記載される方法など、ファージディスプレイライブラリーを生成し、所望の結合特性を有する抗体についてかかるライブラリーをスクリーニングするために、当該技術分野で公知である。さらなる方法は、例えば、*Hoogenboom等, Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等編, Human Press, Totowa, NJ, 2001)*に概説され、例えば、*McCafferty等, Nature 348:552-554*; *Clackson等, Nature 352:624-628 (1991)*; *Marks等, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)*; *Marks及びBradbury, Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo編, Human Press, Totowa, NJ, 2003)*; *Sidhu等, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004)*; *Lee等, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)*; *Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)*; 並びに *Lee等, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)* にさらに記載されている。

#### 【0220】

特定のファージディスプレイ法では、VH及びVL遺伝子のレパートリーは、ポリメラ

10

20

30

40

50

ーゼ連鎖反応 (PCR) によって別々にクローニングされ、Winter 等、Ann. Rev. Immunol.、12: 433 - 455 (1994) に記載されるように、抗原結合ファージについて次いでスクリーニングされ得るファージライブラリーにおいてランダムに組換えられる。ファージは、典型的には、単鎖 Fv (scFv) 断片又は Fab 断片のいずれかとして、抗体断片をディスプレイする。免疫化された供給源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要なしに、免疫原に対して高親和性の抗体を提供する。あるいは、ナイーブなレパートリーが、Griffiths 等、EMBO J、12: 725 - 734 (1993) に記載されるように、いずれの免疫化もなしに、広範な非自己及びまた自己抗原に対する抗体の単一供給源を提供するために、(例えば、ヒトから) クローニングされ得る。最後に、ナイーブなライブラリーは、Hoogenboom 及び Winter、J. Mol. Biol.、227: 381 - 388 (1992) によって記載されるように、再編成されていない V 遺伝子セグメントを幹細胞からクローニングし、高度に可変性の CDR 3 領域をコードし、再編成をインビトロで達成するためにランダム配列を含む PCR プライマーを使用することによって、合成的にも作製され得る。ヒト抗体ファージライブラリーを記載している特許公開には、例えば、以下が含まれる：米国特許第 5750373 号並びに米国特許出願公開第 2005/0079574 号、米国特許出願公開第 2005/0119455 号、米国特許出願公開第 2005/0266000 号、米国特許出願公開第 2007/0117126 号、米国特許出願公開第 2007/0160598 号、米国特許出願公開第 2007/0237764 号、米国特許出願公開第 2007/0292936 号及び米国特許出願公開第 2009/0002360 号。

10

20

**【0221】**

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体又は抗体断片は、本明細書で、ヒト抗体又はヒト抗体断片とみなされる。

**【0222】****(iv) キメラ、ヒト化及びヒト抗体**

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、キメラ抗体である。特定のキメラ抗体は、例えば、米国特許 4816567 号；及び Morrison 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、81: 6851 - 6855 (1984) に記載されている。1つの例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域 (例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、又は非ヒト霊長類、例えばサル由来の可変領域) 及びヒト定常領域を含む。さらなる一例では、キメラ抗体は、クラス又はサブクラスが親抗体のものから変化している「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体には、その抗原結合断片が含まれる。

30

**【0223】**

特定の実施態様では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持したまま、ヒトに対する免疫原性を低減させるためにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、HVR、例えば CDR (又はその一部) が非ヒト抗体に由来し、FR (又はその一部) がヒト抗体配列に由来する、1又は複数の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意選択的に、ヒト定常領域の少なくとも一部分もまた含む。一部の実施態様では、ヒト化抗体中の一部の FR 残基は、例えば、抗体の特異性又は親和性を回復させる又は改善するために、非ヒト抗体 (例えば、HVR 残基がそこから誘導される抗体) 由来の対応する残基で置換される。

40

**【0224】**

ヒト化抗体及びそれらを作製する方法は、例えば、Almagro 及び Franssón、Front. Biosci. 13: 1619 - 1633 (2008) に概説され、例えば、Riechmann 等、Nature 332: 323 - 329 (1988)；Queen 等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 10029 - 10033 (1989)；米国特許第 5821337 号、米国特許第 7527791 号、米国特許第 6982321 号及び米国特許第 7087409 号；Kashmiri 等、Methods 36: 25 - 34 (2005) (SDR (a-CDR) 移植を記載している)；Padlan、Mol. Immunol. 28: 489 - 498 (1991) (「リ

50

サーフェイシング」を記載している) ; Dal l ' A c q u a 等、M e t h o d s 36 : 43 - 60 ( 2005 ) ( 「 F R シャッフリング」を記載している) ; 並びに O s b o u r n 等、M e t h o d s 36 : 61 - 68 ( 2005 ) 及び K l i m k a 等、B r . J . C a n c e r , 83 : 252 - 260 ( 2000 ) ( F R シャッフリングのための「ガイドされた選択」手法を記載している) にさらに記載されている。

【0225】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、以下が含まれるがこれらに限定されない: 「ベストフィット」方法を使用して選択されたフレームワーク領域(例えば、S i m s 等 J . I m m u n o l . 151:2296 (1993)を参照のこと); 軽鎖又は重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列由来のフレームワーク領域(例えば、C a r t e r 等 P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 89:4285 (1992); 及び P r e s t a 等 J . I m m u n o l . , 151:2623 (1993)を参照のこと); ヒト成熟(体細胞性に突然変異した)フレームワーク領域又はヒト生殖系フレームワーク領域(例えば、A l m a g r o 及び F r a n s s o n , F r o n t . B i o s c i . 13:1619-1633 (2008)を参照のこと); 並びに F R ライブラリーをスクリーニングすることから誘導されたフレームワーク領域(例えば、B a c a 等 , J . B i o l . C h e m . 272:10678-10684 (1997)及び R o s o k 等 , J . B i o l . C h e m . 271:22611-22618 (1996)を参照のこと)。

10

【0226】

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当該技術分野で公知の種々の技術を使用して産生され得る。ヒト抗体は、v a n D i j k 及び v a n d e W i n k e l , C u r r . O p i n . P h a r m a c o l . 5 : 368 - 74 ( 2001 ) 並びに L o n b e r g , C u r r . O p i n . I m m u n o l . 20 : 450 - 459 ( 2008 ) に、一般に記載されている。

20

【0227】

ヒト抗体は、抗原性曝露に応答して、インタクトなヒト抗体又はヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって、調製され得る。かかる動物は、典型的には、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全て又は一部分を含み、これが、内因性の免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、又は染色体外に存在する若しくは動物の染色体中にランダムに組み込まれる。かかるトランスジェニックマウスでは、内因性の免疫グロブリン遺伝子座は、一般に、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を取得するための方法の概説については、L o n b e r g , N a t . B i o t e c h . 23 : 1117 - 1125 ( 2005 ) を参照のこと。例えば、X E N O M O U S E ( 商標 ) テクノロジーを記載している米国特許第 6075181号及び米国特許第 6150584号; H U M A B ( 登録商標 ) テクノロジーを記載している米国特許第 5770429号; K - M M O U S E ( 登録商標 ) テクノロジーを記載している米国特許第 7041870号、及び V E L O C I M O U S E ( 登録商標 ) テクノロジーを記載している米国特許出願公開第 2007/0061900号もまた参照のこと。かかる動物によって生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに修飾され得る。

30

【0228】

ヒト抗体は、ハイブリドーマベースの方法によっても作製され得る。ヒトモノクローナル抗体の産生のためのヒト骨髓腫及びマウス - ヒトヘテロ骨髓腫細胞株は、記載されている(例えば、K o z b o r J . I m m u n o l . , 133: 3001 (1984); B r o d e u r 等 , M o n o c l o n a l A n t i b o d y P r o d u c t i o n T e c h n i q u e s a n d A p p l i c a t i o n s , p p . 51-63 (M a r c e l D e k k e r , I n c . , N e w Y o r k , 1987); 及び B o e r n e r 等 , J . I m m u n o l . , 147: 86 (1991)を参照のこと)。ヒトB細胞ハイブリドーマテクノロジーを介して生成されたヒト抗体は、L i 等 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 103 : 3557 - 3562 ( 2006 ) にも記載されている。さらなる方法には、例えば、米国特許第 7189826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒト I g M 抗体の産生を記載している)及び N i , X i a n d a i M i a n y i x u e , 26 ( 4 ) : 265 - 268 ( 2006 ) (ヒト - ヒトハイブリドーマを記載している)に記載された方法が含まれる。ヒトハイブリドーマテクノロジー

40

50

(トリオーマテクノロジー)は、Vollmers及びBrandlein、Histology and Histopathology、20(3):927-937(2005)並びにVollmers及びBrandlein、Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology、27(3):185-91(2005)にも記載されている。

#### 【0229】

ヒト抗体は、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択されたFvクローン可変ドメイン配列を単離することによっても生成され得る。次いで、かかる可変ドメイン配列は、所望のヒト定常ドメインと組み合わせられ得る。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術は、以下に記載される。

#### 【0230】

##### (v)抗体断片

抗体断片は、伝統的手段、例えば酵素的消化によって、又は組換え技術によって、生成され得る。特定の場合では、抗体全体ではなく抗体断片を使用することに利点がある。より小さいサイズの断片は、迅速なクリアランスを可能にし、固形腫瘍への改善されたアクセスをもたらす得る。特定の抗体断片の概説については、Hudson等(2003)Nat. Med. 9:129-134を参照のこと。

#### 【0231】

種々の技術が、抗体断片の産生のために開発されてきた。伝統的には、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解消化を介して誘導された(例えば、Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); 及びBrennan等, Science, 229:81 (1985)を参照のこと)。しかし、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞によって直接産生され得る。Fab、Fv及びscFv抗体断片は全て、大腸菌(E. coli)中で発現され得、大腸菌から分泌され得、したがって、大量のこれらの断片の容易な産生を可能にする。抗体断片は、上で議論した抗体ファージライブラリーから単離され得る。あるいは、Fab'-SH断片は、大腸菌から直接回収され得、F(ab')<sub>2</sub>断片を形成するために化学カップリングされ得る(Carter等, Bio/Technology 10:163-167 (1992))。別の手法によれば、F(ab')<sub>2</sub>断片は、組換え宿主細胞培養物から直接単離され得る。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含む、増加したインビボ半減期を有するFab及びF(ab')<sub>2</sub>断片は、米国特許第5869046号に記載されている。抗体断片の産生のための他の技術は、熟練の施術者に明らかである。特定の実施態様では、抗体は、単鎖Fv断片(scFv)である。国際公開第93/16185号;米国特許第5571894号;及び米国特許第5587458号を参照のこと。Fv及びscFvは、定常領域を欠く、インタクトな結合部位を有する唯一の種である;したがって、これらは、インビボでの使用の間の低減された非特異的結合に適切であり得る。scFv融合タンパク質は、scFvのアミノ末端又はカルボキシ末端のいずれかにおいて、エフェクタータンパク質の融合を生じるように、構築され得る。Antibody Engineering、編Borrebaeck、上記を参照のこと。この抗体断片は、例えば、米国特許第5641870号などに記載される、「直鎖状抗体」でもあり得る。かかる直鎖状抗体は、単一特異性又は二重特異性であり得る。

#### 【0232】

##### (vi)多重特異性抗体

多重特異性抗体は、少なくとも2つの異なるエピトープに対する結合特異性を有し、ここで、これらのエピトープは、通常、異なる抗原に由来する。かかる分子は通常、2つの異なるエピトープにのみ結合するが(即ち、二重特異性抗体、BsAb)、さらなる特異性を有する抗体、例えば、三重特異性抗体が、本明細書で使用する場合、この表現によって包含される。二重特異性抗体は、全長抗体又は抗体断片(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二重特異性抗体)として調製され得る。

#### 【0233】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当該技術分野で公知である。全長二重特異性

10

20

30

40

50

抗体の伝統的な産生は、2つの免疫グロブリン重鎖 - 軽鎖対の共発現に基づき、ここで、これら2つの鎖は、異なる特異性を有する (Millstein等, Nature, 305:537-539 (1983))。免疫グロブリン重鎖及び軽鎖のランダムな仕分けに起因して、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10の異なる抗体分子の潜在的混合物を産生し、このうち1つだけが、正確な二重特異性構造を有する。通常はアフィニティークロマトグラフィー工程によって実施される正確な分子の精製は、かなり厄介であり、産物収量は低い。類似の手順が、国際公開第93/08829号及びTrauneker等、EMBO J., 10:3655-3659(1991)に開示されている。

#### 【0234】

二重特異性抗体を作製するための当該技術分野で公知の1つの手法は、「ノブ・イントゥー・ホール」又は「突出・イントゥー・空洞」手法である(例えば、米国特許第5731168号を参照のこと)。この手法では、2つの免疫グロブリンポリペプチド(例えば、重鎖ポリペプチド)は、各々、接触面を含む。一方の免疫グロブリンポリペプチドの接触面は、他方の免疫グロブリンポリペプチド上の対応する接触面と相互作用し、それによって、2つの免疫グロブリンポリペプチドを会合させる。これらの接触面は、一方の免疫グロブリンポリペプチドの接触面中に位置する「ノブ」又は「突出」(これらの用語は、本明細書で相互交換可能に使用され得る)が、他方の免疫グロブリンポリペプチドの接触面中に位置する「ホール」又は「空洞」(これらの用語は、本明細書で相互交換可能に使用され得る)と対応するように、操作され得る。一部の実施態様では、このホールは、ノブと同一又は類似のサイズのものであり、2つの接触面が相互作用する場合に、一方の接触面のノブが他方の接触面の対応するホールにおいて位置付け可能であるように、適切に位置付けられる。理論に束縛されることは望まないが、これは、ヘテロ多量体を安定化し、ホモ多量体などの他の種よりも、ヘテロ多量体の形成を好むと考えられる。一部の実施態様では、この手法は、2つの異なる免疫グロブリンポリペプチドのヘテロ多量体化を促進して、異なるエピトープに対する結合特異性を有する2つの免疫グロブリンポリペプチドを含む二重特異性抗体を創出するために使用され得る。

#### 【0235】

一部の実施態様では、ノブは、小さいアミノ酸側鎖を、より大きい側鎖で置き換えることによって、構築され得る。一部の実施態様では、ホールは、大きいアミノ酸側鎖を、より小さい側鎖で置き換えることによって、構築され得る。ノブ若しくはホールは、元の接触面中に存在し得るか、又はこれらは、合成により導入され得る。例えば、ノブ又はホールは、少なくとも1つの「元の」アミノ酸残基を少なくとも1つの「移入」アミノ酸残基で置き換えるように、接触面をコードする核酸配列を改変することによって、合成により導入され得る。核酸配列を改変するための方法には、当該技術分野で周知の標準的な分子生物学技術が含まれ得る。種々のアミノ酸残基の側鎖容積は、以下の表に示される。一部の実施態様では、元の残基は、小さい側鎖容積を有し(例えば、アラニン、アスパラギン、アスパラギン酸、グリシン、セリン、スレオニン又はバリン)、ノブを形成するための移入残基は、天然に存在するアミノ酸であり、これには、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファンが含まれ得る。一部の実施態様では、元の残基は、大きい側鎖容積を有し(例えば、アルギニン、フェニルアラニン、チロシン及びトリプトファン)、ホールを形成するための移入残基は、天然に存在するアミノ酸であり、これには、アラニン、セリン、スレオニン及びバリンが含まれる。

10

20

30

40

表2: アミノ酸残基の特性

アミノ酸	一文字略号	質量 <sup>a</sup> (ダルトン)	容積 <sup>b</sup> (Å <sup>3</sup> )	露出面積 <sup>c</sup> (Å <sup>2</sup> )
アラニン(Ala)	A	71.08	88.6	115
アルギニン(Arg)	R	156.20	173.4	225
アスパラギン(Asn)	N	114.11	117.7	160
アスパラギン酸(Asp)	D	115.09	111.1	150
システイン(Cys)	C	103.14	108.5	135
グルタミン(Gln)	Q	128.14	143.9	180
グルタミン酸(Glu)	E	129.12	138.4	190
グリシン(Gly)	G	57.06	60.1	75
ヒスチジン(His)	H	137.15	153.2	195
イソロイシン(Ile)	I	113.17	166.7	175
ロイシン(Leu)	L	113.17	166.7	170
リジン(Lys)	K	128.18	168.6	200
メチオニン(Met)	M	131.21	162.9	185
フェニルアラニン(Phe)	F	147.18	189.9	210
プロリン(Pro)	P	97.12	122.7	145
セリン(Ser)	S	87.08	89.0	115
スレオニン(Thr)	T	101.11	116.1	140
トリプトファン(Trp)	W	186.21	227.8	255
チロシン(Tyr)	Y	163.18	193.6	230
バリン(Val)	V	99.14	140.0	155

<sup>a</sup>アミノ酸の分子量マイナス水の分子量。Handbook of Chemistry and Physics、43<sup>rd</sup> ed.Cleveland、Chemical Rubber Publishing Co.、1961 由来の値。

<sup>b</sup>A.A.Zamyatin、Prog.Biophys.Mol.Biol.24:107-123、1972 由来の値。

<sup>c</sup>C.Chothia、J.Mol.Biol.105:1-14、1975 由来の値。露出面積は、この参考文献の図 6-20 に規定される。

### 【 0 2 3 6 】

一部の実施態様では、ノブ又はホールを形成するための元の残基は、ヘテロ多量体の 3 次元構造に基づいて同定される。3 次元構造を取得するための当該技術分野で公知の技術には、X 線結晶学及び NMR が含まれ得る。一部の実施態様では、この接触面は、免疫グロブリン定常ドメインの CH3 ドメインである。これらの実施態様では、ヒト IgG<sub>1</sub> の CH3 / CH3 接触面には、4 つのアンチパラレル鎖上に位置する各ドメイン上の 16 の残基が関与する。理論に束縛されることは望まないが、突然変異した残基は、好ましくは、ノブが、パートナー CH3 ドメイン中の補償的ホールではなく、周囲の溶媒によって収容され得るというリスクを最小化するために、2 つの中心的アンチパラレル鎖上に位置する。一部の実施態様では、2 つの免疫グロブリンポリペプチド中の対応するノブ及び

10

20

30

40

50

ホールを形成する突然変異は、以下の表中に提供される 1 又は複数の対に対応する。

表3: 対応するノブ形成及びホール形成突然変異の例示的なセット

第 1 の免疫グロブリンの CH3	第 2 の免疫グロブリンの CH3
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W:Y407T
T366W:F405W	T394S:Y407A
F405W:Y407A	T366W:T394S
F405W	T394S

10

【 0 2 3 7 】

突然変異は、元の残基、次にカバット番号付け系を使用した位置、次いで移入残基によって示される（全ての残基は、一文字アミノ酸コードで与えられる）。複数の突然変異は、コロンによって分離される。

20

【 0 2 3 8 】

一部の実施態様では、免疫グロブリンポリペプチドは、上記表 3 に列挙された 1 又は複数のアミノ酸置換を含む CH3 ドメインを含む。一部の実施態様では、二重特異性抗体は、表 3 の左の列に列挙された 1 又は複数のアミノ酸置換を含む CH3 ドメインを含む第 1 の免疫グロブリンポリペプチド、及び表 3 の右の列に列挙された 1 又は複数の対応するアミノ酸置換を含む CH3 ドメインを含む第 2 の免疫グロブリンポリペプチドを含む。

【 0 2 3 9 】

上に議論したような DNA の突然変異の後、1 又は複数の対応するノブ形成又はホール形成突然変異を有する修飾された免疫グロブリンポリペプチドをコードするポリヌクレオチドは、当該技術分野で公知の標準的な組換え技術及び細胞系を使用して発現及び精製され得る。例えば、米国特許第 5 7 3 1 1 6 8 号；米国特許第 5 8 0 7 7 0 6 号；米国特許第 5 8 2 1 3 3 3 号；米国特許第 7 6 4 2 2 2 8 号；米国特許第 7 6 9 5 9 3 6 号；米国特許第 8 2 1 6 8 0 5 号；米国特許出願公開第 2 0 1 3 / 0 0 8 9 5 5 3 号；及び *Spies* 等、*Nature Biotechnology* 31: 753 - 758、2013 を参照のこと。修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、原核宿主細胞、例えば大腸菌、又は真核宿主細胞、例えば CHO 細胞を使用して産生され得る。対応するノブ保有及びホール保有免疫グロブリンポリペプチドは、共培養物中の宿主細胞において発現され得、ヘテロ多量体として一緒に精製され得るか、又はそれらは、単一培養物中で発現され得、別々に精製され得、インビトロでアSEMBL され得る。一部の実施態様では、細菌宿主細胞の 2 つの株（一方は、ノブを有する免疫グロブリンポリペプチドを発現し、他方は、ホールを有する免疫グロブリンポリペプチドを発現する）が、当該技術分野で公知の標準的な細菌培養技術を使用して共培養される。一部の実施態様では、これら 2 つの株は、例えば、培養物中で等しい発現レベルを達成するために、特定の比で混合され得る。一部の実施態様では、これら 2 つの株は、50:50、60:40 又は 70:30 の比で混合され得る。ポリペプチド発現後、これらの細胞は、一緒に溶解され得、タンパク質が抽出され得る。ホモ多量体種対ヘテロ多量体種の存在比を測定することを可能にする当該技術分野で公知の標準的な技術には、サイズ排除クロマトグラフィーが含まれ得る。一部の実施態様では、各修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、標準的な組換え技術を使用して

30

40

50

別々に発現され、インビトロで一緒にアセンブルされ得る。アセンブリは、例えば、各修飾された免疫グロブリンポリペプチドを精製し、混合し、等質量でそれらを一緒にインキュベートし、ジスルフィドを還元し（例えば、ジチオスレイトールを用いて処理することによって）、濃縮し、ポリペプチドを再酸化することによって、達成され得る。形成された二重特異性抗体は、陽イオン交換クロマトグラフィーを含む標準的な技術を使用して精製され得、サイズ排除クロマトグラフィーを含む標準的な技術を使用して測定され得る。これらの方法のより詳細な説明については、Speiss等、Nat Biotechnol 31:753-8、2013を参照のこと。一部の実施態様では、修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、CHO細胞中で別々に発現され得、上記方法を使用してインビトロでアセンブルされ得る。

10

#### 【0240】

異なる手法によれば、所望の結合特異性（抗体-抗原結合部位）を有する抗体可変ドメインが、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。この融合は、好ましくは、ヒンジ、CH<sub>2</sub>及びCH<sub>3</sub>領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常ドメインとの融合である。融合物のうちの少なくとも1つ中に存在する軽鎖結合に必要な部位を含む第1の重鎖定常領域（CH<sub>1</sub>）を有することが典型的である。免疫グロブリン重鎖融合物、及び所望の場合、免疫グロブリン軽鎖をコードするDNAは、別々の発現ベクター中に挿入され、適切な宿主生物中に共トランスフェクトされる。これは、構築において使用される3つのポリペプチド鎖の不等な比が最適な収量を提供する実施態様において、3つのポリペプチド断片の相互の割合を調整することにおいて、大きな柔軟性を提供する。しかし、等しい比での少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高い収量を生じる場合、又はそのような比が特に重要なものでない場合、1つの発現ベクター中に2つ又は3つ全てのポリペプチド鎖についてのコード配列を挿入することが可能である。

20

#### 【0241】

この手法の一実施態様では、二重特異性抗体は、一方のアーム中の第1の結合特異性を有するハイブリッド免疫グロブリン重鎖、及び他方のアーム中のハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖対（第2の結合特異性を提供する）から構成される。二重特異性分子の半分のみにおける免疫グロブリン軽鎖の存在は、分離の容易な方法を提供するので、この非対称構造は、望ましくない免疫グロブリン鎖組合せからの所望の二重特異性化合物の分離を促進することが見出された。この手法は、国際公開第94/04690号に開示されている。二重特異性抗体を生成することのさらなる詳細については、例えば、Suresh等、Methods in Enzymology、121:210（1986）を参照のこと。

30

#### 【0242】

国際公開第96/27011号に記載された別の手法によれば、抗体分子の対間の接触面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロダイマーの百分率を最小化するために操作され得る。1つの接触面は、抗体定常ドメインのCH<sub>3</sub>ドメインの少なくとも一部を構成する。この方法では、第1の抗体分子の接触面由来の1又は複数の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖（例えば、チロシン又はトリプトファン）で置き換えられる。大きい側鎖（複数可）と同一又は類似のサイズの補償的「空洞」は、大きいアミノ酸側鎖をより小さいもの（例えば、アラニン又はスレオニン）で置き換えることによって、第2の抗体分子の接触面上に創出される。これは、ホモダイマーなどの他の望ましくない最終産物を越えて、ヘテロダイマーの収量を増加させるための機構を提供する。

40

#### 【0243】

二重特異性抗体には、架橋又は「ヘテロコンジュゲート」抗体が含まれる。例えば、このヘテロコンジュゲート中の抗体の一方は、アビジンにカップリングされ得、他方は、ビオチンにカップリングされ得る。かかる抗体は、例えば、望ましくない細胞へと免疫系細胞を標的化するため（米国特許第4676980号）、及びHIV感染の治療のため（国際公開第91/00360号、国際公開第92/200373号及びEP03089）に提唱されている。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋法を使用して作製され

50

得る。適切な架橋剤は、当該技術分野で周知であり、いくつかの架橋技術と一緒に、米国特許第4676980号に開示されている。

【0244】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技術もまた、文献中に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学結合を使用して調製され得る。Brennan等、Science、229:81(1985)は、インタクトな抗体が、F(ab')<sub>2</sub>断片を生成するためにタンパク質分解性に切断される手順を記載している。これらの断片は、隣接ジチオールを安定化し、分子間ジスルフィド形成を防止するために、ジチオール錯化剤亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元される。次いで、生成されたF(ab')断片は、チオニトロベンゾエート(TNB)誘導体に変換される。次いで、F(ab')-TNB誘導体の一方は、メルカプトエチルアミンによる還元によってF(ab')-チオールに再変換され、二重特異性抗体を形成するために、等モル量の他方のF(ab')-TNB誘導体と混合される。産生された二重特異性抗体は、酵素の選択的固定化のための薬剤として使用され得る。

10

【0245】

近年の進歩により、二重特異性抗体を形成するために化学カップリングされ得るF(ab')-SH断片の、大腸菌からの直接的回収が促進されている。Shalaby等、J. Exp. Med.、175:217-225(1992)は、完全ヒト化二重特異性抗体F(ab')<sub>2</sub>分子の産生を記載している。各F(ab')断片は、大腸菌から別々に分泌され、二重特異性抗体を形成するために、インビトロの定方向化学カップリングに供される。

【0246】

二重特異性抗体断片を組換え細胞培養物から直接作製及び単離するための種々の技術もまた、記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して産生されている。Kostelny等、J. Immunol.、148(5):1547-1553(1992)。Fos及びJunタンパク質由来のロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合によって、2つの異なる抗体のF(ab')部分に連結された。抗体ホモダイマーは、モノマーを形成するためにヒンジ領域において還元され、次いで、抗体ヘテロダイマーを形成するために再酸化された。この方法は、抗体ホモダイマーの産生のためにも利用され得る。Hollinger等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444-6448(1993)によって記載された「ディアボディ」テクノロジーは、二重特異性抗体断片を作製するための代替的機構を提供している。これらの断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間のペアリングを可能にするには短すぎるリンカーによって軽鎖可変ドメイン(V<sub>L</sub>)に接続された重鎖可変ドメイン(V<sub>H</sub>)を含む。したがって、一方の断片のV<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>ドメインは、他方の断片の相補的V<sub>L</sub>及びV<sub>H</sub>ドメインとペアリングするようにされ、それによって、2つの抗原結合部位を形成する。単鎖Fc(sFc)ダイマーの使用によって二重特異性抗体断片を作製するための別の戦略もまた、報告されている。Gruber等、J. Immunol.、152:5368(1994)を参照のこと。

20

30

【0247】

二重特異性抗体断片を作製するための別の技術は、「二重特異性T細胞エンゲージャー」又はBiTE(登録商標)手法である(例えば、国際公開第2004/106381号、国際公開第2005/061547号、国際公開第2007/042261号及び国際公開第2008/119567号を参照のこと)。この手法は、単一ポリペプチド上に配置された2つの抗体可変ドメインを利用する。例えば、単一ポリペプチド鎖は、2つのドメイン間の分子内会合を可能にするのに十分な長さのポリペプチドリンカーによって分離された可変重鎖(V<sub>H</sub>)及び可変軽鎖(V<sub>L</sub>)ドメインを各々が有する、2つの単鎖Fc(sFc)断片を含む。この単一ポリペプチドは、2つのsFc断片間にポリペプチドスペーサー配列をさらに含む。各sFcは、異なるエピトープを認識し、これらのエピトープは、異なる細胞型に対して特異的であり得、その結果、2つの異なる細胞型の細胞は、各sFcがその同族エピトープとエンゲージされる場合に、近位になる又は係留される。この手法の1つの特定の実施態様は、悪性又は腫瘍細胞などの標的細胞によって

40

50

発現された細胞表面抗原を認識する別の s c F v に連結された、免疫細胞によって発現された細胞表面抗原、例えば、T細胞上のCD3ポリペプチドを認識する s c F v を含む。

【0248】

これは単一ポリペプチドであるので、この二重特異性T細胞エンゲージャーは、当該技術分野で公知の任意の原核又は真核細胞発現系、例えば、CHO細胞株を使用して発現され得る。しかし、特異的精製技術（例えば、EP1691833を参照のこと）が、モノマーの目的の活性以外の生物活性を有し得る他の多量体種から、モノマー二重特異性T細胞エンゲージャーを分離するために、必要であり得る。1つの例示的精製スキームでは、分泌されたポリペプチドを含む溶液は、金属アフィニティークロマトグラフィーに最初に供され、ポリペプチドは、イミダゾール濃度の勾配で溶出される。この溶出液は、陰イオン交換クロマトグラフィーを使用してさらに精製され、ポリペプチドは、塩化ナトリウム濃度の勾配を使用して溶出される。最後に、この溶出液は、多量体種からモノマーを分離するために、サイズ排除クロマトグラフィーに供される。

10

【0249】

2つよりも多い結合価を有する抗体が企図される。例えば、三重特異性抗体が調製され得る。Tuft等 J. Immunol. 147:60 (1991)。

【0250】

(vii) 単一ドメイン抗体

一部の実施態様では、本発明の抗体は、単一ドメイン抗体である。単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て若しくは一部分又は軽鎖可変ドメインの全て若しくは一部分を含む単一ポリペプチド鎖である。特定の実施態様では、単一ドメイン抗体は、ヒト単一ドメイン抗体である(Domantis, Inc., Waltham, Mass.; 例えば、米国特許第6248516号B1を参照のこと)。一実施態様では、単一ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全て又は一部分からなる。

20

【0251】

(viii) 抗体変異体

一部の実施態様では、本明細書に記載される抗体のアミノ酸配列修飾(複数可)が企図される。例えば、抗体の結合親和性及び/又は他の生物特性を改善することが望まれ得る。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードするヌクレオチド配列中に適切な変化を導入することによって、又はペプチド合成によって、調製され得る。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列からの残基の欠失、及び/又はかかるアミノ酸配列中への残基の挿入、及び/又はかかるアミノ酸配列内の残基の置換が含まれる。欠失、挿入及び置換の任意の組合せが、最終コンストラクトが所望の特性を有することを条件として、最終コンストラクトに到達するために行われ得る。アミノ酸改変は、配列が作製された時点で、対象抗体アミノ酸配列中に導入され得る。

30

【0252】

(ix) 置換、挿入及び欠失変異体

特定の実施態様では、1又は複数のアミノ酸置換を有する抗体変異体が提供される。置換突然変異誘発のための目的の部位には、HVR及びFRが含まれる。保存的置換は、表1中に、「保存的置換」の見出しの下に示される。より実質的な変化は、表1中に、「例示的置換」の見出しの下に提供され、アミノ酸側鎖クラスを参照して以下にさらに記載される。アミノ酸置換は、目的の抗体中に導入され得、産物が、所望の活性、例えば、保持/改善された抗原結合、減少した免疫原性又は改善されたADCC若しくはCDCについてスクリーニングされ得る。

40

表4: 例示的置換。

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

10

20

30

40

50

## 【 0 2 5 3 】

アミノ酸は、共通する側鎖特性に従ってグループ分けされ得る：

- a . 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- b . 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- c . 酸性：Asp、Glu；
- d . 塩基性：His、Lys、Arg；
- e . 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro；
- f . 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

## 【 0 2 5 4 】

非保存的置換は、これらのクラスのうち1つのメンバーを別のクラスに交換することを伴う。

## 【 0 2 5 5 】

1つの型の置換変異体には、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の1又は複数の超可変領域残基を置換することが関与する。一般に、さらなる研究のために選択される得られた変異体（複数可）は、親抗体と比較して、特定の生物特性における修飾（例えば、改

善) (例えば、増加した親和性、低減された免疫原性) を有し、及び/又は親抗体の特定の生物特性を実質的に保持している。例示的な置換変異体は、例えば、本明細書に記載されるものなどのファージディスプレイベースの親和性成熟技術を使用して簡便に生成され得る、親和性成熟抗体である。簡潔に述べると、1又は複数のHVR残基が突然変異され、変異体抗体がファージ上にディスプレイされ、特定の生物活性(例えば、結合親和性)についてスクリーニングされる。

#### 【0256】

改変(例えば、置換)は、例えば、抗体親和性を改善するために、HVR中に作製され得る。かかる改変は、HVR「ホットスポット」、即ち、体細胞成熟プロセスの間に高頻度で突然変異を受けるコドンによってコードされる残基(例えば、Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)を参照のこと)、及び/又はSDR(a-CDR)において作製され得、得られた変異体のVH又はVLは、結合親和性について試験される。二次ライブラリーを構築しそこから再選択することによる親和性成熟は、例えば、Hoogenboom等、*Methods in Molecular Biology* 178:1-37(O'Brien等編、Human Press, Totowa, NJ、(2001))中に記載されている。親和性成熟の一部の実施態様では、多様性が、種々の方法のいずれか(例えば、エラーブローンPCR、鎖シャッフリング又はオリゴヌクレオチド指定突然変異)によって、成熟のために選択された可変遺伝子中に導入される。次いで、二次ライブラリーが創出される。次いで、このライブラリーは、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定するためにスクリーニングされる。多様性を導入するための別の方法には、いくつかのHVR残基(例えば、一度に4-6残基)がランダム化される、HVR指定手法が関与する。抗原結合に関与するHVR残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発又はモデル化を使用して、具体的に同定され得る。特に、CDR-H3及びCDR-L3が標的化される場合が多い。

#### 【0257】

特定の実施態様では、置換、挿入又は欠失は、かかる改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低減させない限り、1又は複数のHVR内で生じ得る。例えば、結合親和性を実質的に低減させない保存的改変(例えば、本明細書で提供されるような保存的置換)が、HVR中に作製され得る。かかる改変は、HVR「ホットスポット」又はSDRの外側であり得る。上に提供される変異体VH及びVL配列の特定の実施態様では、各HVRのいずれかは未改変であるか、又は1、2若しくは3以下のアミノ酸置換を含む。

#### 【0258】

突然変異誘発のために標的化され得る抗体の残基又は領域の同定のための有用な方法は、Cunningham及びWells(1989) *Science*, 244:1081-1085に記載されるように、「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、抗体と抗原との相互作用が影響されるかどうかを決定するために、標的残基(例えば、荷電残基、例えば、arg、asp、his、lys及びglu)の残基又は群が同定され、中性又は負に荷電したアミノ酸(例えば、アラニン又はポリアラニン)によって置き換えられる。さらなる置換が、最初の置換に対する機能的感受性を示すアミノ酸位置において導入され得る。あるいは、又はさらに、抗体と抗原との間の接触点を同定するための抗原-抗体複合体の結晶構造。かかる接触残基及び隣接残基は、置換のための候補として、標的化又は排除され得る。変異体は、それらが所望の特性を含むかどうかを決定するために、スクリーニングされ得る。

#### 【0259】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100以上の残基を含むポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端及び/又はカルボキシル末端融合、並びに単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、酵素(例えば、ADEPTについて)又は抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドへの、抗体のN末端又はC末端への融合が含まれる。

。

10

20

30

40

50

## 【0260】

## (x) グリコシル化変異体

特定の実施態様では、本明細書で提供される抗体は、抗体がグリコシル化される程度を増加又は減少させるように改変される。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、1又は複数のグリコシル化部位が創出又は除去されるように、アミノ酸配列を改変することによって、簡便に達成され得る。

## 【0261】

抗体がFc領域を含む場合、それに結合した糖(炭水化物)が改変され得る。哺乳動物細胞によって産生される天然抗体は、典型的には、Fc領域のCH2ドメインのAsn297にN-結合によって一般に結合された、分枝状の二分岐オリゴ糖を含む。例えば、Wright等 TIBTECH 15:26-32(1997)を参照のこと。このオリゴ糖には、種々の糖(炭水化物)、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、ガラクトース及びシアル酸、並びに二分岐オリゴ糖構造の「幹」中のGlcNAcに結合したフコースが含まれ得る。一部の実施態様では、本発明の抗体中のオリゴ糖の修飾は、特定の改善された特性を有する抗体変異体を創出するために、行われ得る。

10

## 【0262】

一実施態様では、Fc領域を含む抗体変異体が提供され、ここで、Fc領域に結合した糖(炭水化物)構造は、ADCC機能を改善し得るフコースが低減されている、又はフコースを欠く。具体的には、野生型CHO細胞において産生された同じ抗体上のフコースの量と比較して低減されたフコースを有する抗体が、本明細書で企図される。即ち、これらは、天然CHO細胞(例えば、天然グリコシル化パターンを生じるCHO細胞、例えば、天然FUT8遺伝子を含むCHO細胞)によって産生される場合に別のやり方で有するフコースよりも低い量のフコースを有することによって特徴付けられる。特定の実施態様では、この抗体は、その上のN-結合グリカンの約50%、40%、30%、20%、10%又は5%未満がフコースを含む抗体である。例えば、かかる抗体中のフコースの量は、1%から80%まで、1%から65%まで、5%から65%まで、又は20%から40%までであり得る。特定の実施態様では、この抗体は、その上のN-結合グリカンのいずれもがフコースを含まない抗体であり、即ち、ここで、この抗体は、完全にフコースがない、又はフコースを有さない、又はアフコシル化されている。フコースの量は、例えば国際公開第2008/077546号に記載されるように、MALDI-TOF質量分析によって測定される場合、Asn297に結合した全ての糖構造体(例えば、複合体、ハイブリッド及び高マンノース構造)の合計に対するAsn297における糖鎖内のフコースの平均量を計算することによって、決定される。Asn297とは、Fc領域中の約297位(Fc領域残基のEu番号付け)に位置するアスパラギン残基を指す;しかし、Asn297は、抗体における軽微な配列差異に起因して、297位の約±3アミノ酸上流又は下流、即ち、294位と300位との間も位置し得る。かかるフコシル化変異体は、改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許出願公開第2003/0157108号(Presta, L.);米国特許出願公開第2004/0093621号(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)を参照のこと。「脱フコシル化」又は「フコース欠損」抗体変異体に関する刊行物の例には、以下が含まれる:US2003/0157108;WO2000/61739;WO2001/29246;US2003/0115614;US2002/0164328;US2004/0093621;US2004/0132140;US2004/0110704;US2004/0110282;US2004/0109865;WO2003/085119;WO2003/084570;WO2005/035586;WO2005/035778;WO2005/053742;WO2002/031140;Okazaki等J.Mol.Biol.336:1239-1249(2004);Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng.87:614(2004)。脱フコシル化抗体を産生することが可能な細胞株の例には、以下が含まれる:タンパク質フコシル化が欠損したLec13

20

30

40

50

CHO細胞 (Ripka等 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 米国特許出願公開第2003/0157108号A1、Prestal, L; 及び国際公開第2004/056312号A1、Adams等、特に、実施例11)、及びノックアウト細胞株、例えば、アルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子FUT8ノックアウトCHO細胞 (例えば、Yamane-Ohnuki等 Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004); Kanda, Y.等, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006); 及び国際公開第2003/085107号を参照のこと)。

#### 【0263】

抗体変異体には、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分された、二分されたオリゴ糖が、さらに提供される。かかる抗体変異体は、低減されたフコシル化及び/又は改善されたADCC機能を有し得る。かかる抗体変異体の例は、例えば、国際公開第2003/011878号 (Jean-Mairet等); 米国特許第6602684号 (Umana等); 米国特許出願公開第2005/0123546号 (Umana等)、及びFerrara等、Biotechnology and Bioengineering、93(5):851-861(2006)に記載されている。Fc領域に結合したオリゴ糖中に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体変異体もまた、提供される。かかる抗体変異体は、改善されたCDC機能を有し得る。かかる抗体変異体は、例えば、国際公開第1997/30087号 (Patel等); 国際公開第1998/58964号 (Raju, S.); 及び国際公開第1999/22764号 (Raju, S.)に記載されている。

#### 【0264】

特定の実施態様では、本明細書に記載されるFc領域を含む抗体変異体は、FcRIIに結合することが可能である。特定の実施態様では、本明細書に記載されるFc領域を含む抗体変異体は、ヒトエフェクター細胞の存在下でADCC活性を有する、又はヒト野生型IgG1Fc領域を含む他の点では同じ抗体と比較して、ヒトエフェクター細胞の存在下で増加したADCC活性を有する。

#### 【0265】

##### (xi) Fc領域変異体

特定の実施態様では、1又は複数のアミノ酸修飾が、本明細書で提供される抗体のFc領域中に導入され得、それによって、Fc領域変異体を生成する。このFc領域変異体は、1又は複数のアミノ酸位置においてアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含むヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域) を含み得る。

#### 【0266】

特定の実施態様では、本発明は、一部ではあるが全てではないエフェクター機能を有する抗体変異体を企図し、これにより、かかる抗体変異体は、インビボでの抗体の半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能 (例えば、補体及びADCC) が不要又は有害である適用のための、望ましい候補になる。インビトロ及び/又はインビボの細胞傷害性アッセイが、CDC及び/又はADCC活性の低減/枯渇を確認するために実施され得る。例えば、抗体が、FcR結合を欠く (したがって、ADCC活性を欠く可能性が高い) が、FcRn結合能を保持することを確実にするために、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイが実施され得る。ADCCを媒介するための初代細胞、NK細胞は、FcRIIIのみを発現するが、単球は、FcRI、FcRII及びFcRIIIを発現する。造血細胞上でのFcR発現は、Ravetch及びKinet、Annu. Rev. Immunol. 9:457-492(1991)のp464の表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するためのインビトロアッセイの非限定的な例は、米国特許第5500362号 (例えば、Hellstrom, I.等 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)を参照のこと) 及びHellstrom, I等, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 米国特許第5821337号 (Bruggemann, M.等, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照のこと)に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ方法が使

用され得る（例えば、フローサイトメトリー用のACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA；及びCytotoxic 96（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照のこと）。かかるアッセイのために有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）及びナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。あるいは、又はさらに、目的の分子のADCC活性は、例えば、Clynes等 Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656（1998）に開示されるものなどの動物モデルにおいて、インビボで評価され得る。C1q結合アッセイもまた、抗体がC1qを結合することができず、したがってCDC活性を欠くことを確認するために、実施され得る。例えば、国際公開第2006/029879号及び国際公開第2005/100402号におけるC1q及びC3c結合ELISAを参照のこと。補体活性化を評価するために、CDCアッセイが実施され得る（例えば、Gazzano-Santoro等, J. Immunol. Methods 202:163（1996）；Cragg, M.S.等, Blood 101:1045-1052（2003）；並びにCragg, M.S.及びM.J. Glennie, Blood 103:2738-2743（2004）を参照のこと）。FcRn結合及びインビボクリアランス/半減期の決定もまた、当該技術分野で公知の方法を使用して実施され得る（例えば、Petkova, S.B.等, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769（2006）を参照のこと）。

10

#### 【0267】

低減されたエフェクター機能を有する抗体には、Fc領域の残基238、265、269、270、297、327及び329のうち1又は複数の置換を有するものが含まれる（米国特許第6737056号）。かかるFc突然変異体には、残基265及び297のアラニンへの置換を有するいわゆる「DANA」Fc突然変異体を含む、アミノ酸位置265、269、270、297及び327のうち2つ以上において置換を有するFc突然変異体が含まれる（米国特許第7332581号）。

20

#### 【0268】

FcRへの改善又は減退された結合を有する特定の抗体変異体が記載されている（例えば、米国特許6737056号；国際公開第2004/056312号及びShields等, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604（2001）を参照のこと）。

#### 【0269】

特定の実施態様では、抗体変異体は、ADCCを改善する1又は複数のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の298位、333位及び/又は334位（残基のEU番号付け）における置換を有するFc領域を含む。例示的な一実施態様では、そのFc領域中に以下のアミノ酸置換を含む抗体：S298A、E333A及びK334A。

30

#### 【0270】

一部の実施態様では、改変された（即ち、改善又は減退されたのいずれかの）C1q結合及び/又は補体依存性細胞傷害（CDC）を生じる改変が、例えば、米国特許第6194551号、国際公開第99/51642号及びIdusogie等 J. Immunol. 164:4178-4184（2000）に記載されるように、Fc領域中に作製される。

#### 【0271】

増加した半減期、及び胎児への母体IgGの移行を担う新生児Fc受容体（FcRn）（Guyer等, J. Immunol. 117:587（1976）及びKim等, J. Immunol. 24:249（1994））に対する改善された結合を有する抗体は、米国特許出願公開第2005/0014934号A1（Hinton等）に記載されている。これらの抗体は、その中にFcRnへのFc領域の結合を改善する1又は複数の置換を有するFc領域を含む。かかるFc変異体には、Fc領域残基：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434のうち1又は複数における置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものが含まれる（米国特許第7371826号）。Fc領域変異体の他の例については、Duncan及びWinter, Nature 322:738-

40

50

40(1988);米国特許5648260号;米国特許5624821号;並びに国際公開第94/29351号もまた参照のこと。

【0272】

(xii) 抗体誘導体

本発明の抗体は、当該技術分野で公知であり、容易に入手可能なさらなる非タンパク質性部分を含むように、さらに修飾され得る。特定の実施態様では、抗体の誘導体化に適切な部分は、水溶性ポリマーである。水溶性ポリマーの非限定的な例には、以下が含まれるがこれらに限定されない：ポリエチレングリコール(PEG)、エチレングリコール/プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1,3-ジオキソラン、ポリ-1,3,6-トリオキサン、エチレン/無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸(ホモポリマー又はランダム共重合体のいずれか)、及びデキストラン又はポリ(n-ビニルピロリドン)ポリエチレングリコール、プロプロピレングリコール(propropylene glycol)ホモポリマー、ポリプロピレンオキシド/エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール(例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール、並びにそれらの混合物。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して、製造における利点を有し得る。このポリマーは、任意の分子量のものであり得、分枝状又は非分枝状であり得る。抗体に結合したポリマーの数は、変動し得、1つよりも多いポリマーが結合している場合、それらは、同じ又は異なる分子であり得る。一般に、誘導体化に使用されるポリマーの数及び/又は型は、改善すべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体が規定された条件下で療法に使用されるかどうかなどが含まれるがこれらに限定されない考慮に基づいて、決定され得る。

10

20

【0273】

(xiii) ベクター、宿主細胞及び組換え方法

抗体は、組換え方法を使用しても産生され得る。抗抗原抗体の組換え産生のために、抗体をコードする核酸が単離され、さらなるクローニング(DNAの増幅)又は発現のために、複製可能なベクター中に挿入される。抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して(例えば、抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することが可能なオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって)容易に単離及び配列決定され得る。多くのベクターが利用可能である。ベクター成分には、一般に、以下のうち1又は複数が含まれるがこれらに限定されない：シグナル配列、複製開始点、1又は複数のマーカー遺伝子、エンハンサーエレメント、プロモーター及び転写終結配列。

30

【0274】

(a) シグナル配列成分

本発明の抗体は、直接組換え産生され得るだけでなく、好ましくはシグナル配列又は成熟タンパク質若しくはポリペプチドのN末端において特異的切断部位を有する他のポリペプチドである、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても、産生され得る。選択された異種シグナル配列は、好ましくは、宿主細胞によって認識及びプロセシングされる(例えば、シグナルペプチターゼによって切断される)シグナル配列である。天然抗体シグナル配列を認識及びプロセシングしない原核宿主細胞のために、このシグナル配列は、例えば、アルカリホスファターゼ、ペニシリナーゼ、lpp又は熱安定性エンテロトキシンIIリーダーの群から選択される原核生物シグナル配列によって置換される。酵母分泌のために、天然シグナル配列は、例えば、酵母インベルターゼリーダー、a因子リーダー(サッカロミセス属(Saccharomyces)及びクワイベロミセス(Kluyveromyces)の-因子リーダーを含む)、若しくは酸性ホスファターゼリーダー、カンジダ・アルビカンス(C.albicans)グルコアミラーゼリーダー、又は国際公開第90/13646号に記載されるシグナルによって、置換され得る。哺乳動物細胞発現では、哺乳動物シグナル配列並びにウイルス分泌リーダー、例えば、単純ヘルペスgDシグナルが、利用可能である。

40

【0275】

50

## (b) 複製開始点

発現及びクローニングベクターの両方が、1又は複数の選択された宿主細胞においてベクターが複製するのを可能にする核酸配列を含む。一般に、クローニングベクターでは、この配列は、宿主染色体DNAとは独立してベクターが複製するのを可能にするものであり、複製開始点又は自律的に複製する配列が含まれる。かかる配列は、種々の細菌、酵母及びウイルスについて周知である。プラスミドpBR322由来の複製開始点は、ほとんどのグラム陰性細菌に適切であり、2 $\mu$ プラスミド開始点は、酵母に適切であり、種々のウイルス開始点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV又はBPV)が、哺乳動物細胞においてクローニングベクターとして有用である。一般に、複製開始点成分は、哺乳動物発現ベクターには必要でない(SV40開始点は、それが早期プロモーターを含むことのみ起因して、典型的に使用され得る)。

10

## 【0276】

## (c) 選択遺伝子成分

発現及びクローニングベクターは、選択マーカーとも呼ばれる選択遺伝子を含み得る。典型的な選択遺伝子は、(a)抗生物質若しくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート若しくはテトラサイクリンに対する耐性を付与するタンパク質、(b)栄養要求性欠損を補完するタンパク質、又は(c)複合培地からは利用可能でない必須栄養素を供給するタンパク質をコードする、例えば、桿菌(*Bacilli*)のためのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子。

20

## 【0277】

選択スキームの一例は、宿主細胞の増殖を停止させる薬物を利用する。異種遺伝子で首尾よく形質転換された細胞は、薬物耐性を付与するタンパク質を産生し、したがって、選択レジメンを生き残る。かかる優性選択の例は、薬物ネオマイシン、ミコフェノール酸及びハイグロマイシンを使用する。

## 【0278】

哺乳動物細胞に適切な選択マーカーの別の例は、抗体コード核酸を取り込む能力がある細胞の同定を可能にするもの、例えば、DHFR、グルタミンシンターゼ(GS)、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン-I及び-II、好ましくは霊長類メタロチオネイン遺伝子、アデノシンデアミナーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼなどである。

30

## 【0279】

例えば、DHFR遺伝子で形質転換された細胞は、メトトレキサート(Mtx)、DHFRの競合的アンタゴニストを含む培地中で形質転換体を培養することによって同定される。これらの条件下で、DHFR遺伝子は、任意の他の共形質転換された核酸と一緒に増幅される。内因性のDHFR活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞株(例えば、ATCC CRL-9096)が使用され得る。

## 【0280】

あるいは、GS遺伝子で形質転換された細胞は、L-メチオニンスルホキシイミン(Msx)、GSの阻害剤を含む培地中で形質転換体を培養することによって同定される。これらの条件下で、GS遺伝子は、任意の他の共形質転換された核酸と一緒に増幅される。GS選択/増幅系は、上記DHFR選択/増幅系と組み合わせて使用され得る。

40

## 【0281】

あるいは、目的の抗体、野生型DHFR遺伝子及び別の選択マーカー、例えば、アミノグリコシド3'-ホスホトランスフェラーゼ(APH)をコードするDNA配列で形質転換又は共形質転換された宿主細胞(特に、内因性のDHFRを含む野生型宿主)は、その選択マーカーのための選択剤、例えば、アミノグリコシド抗生物質、例えば、カナマイシン、ネオマイシン又はG418を含む培地中での細胞増殖によって選択され得る。米国特許第4965199号を参照のこと。

## 【0282】

酵母での使用に適切な選択遺伝子は、酵母プラスミドYRp7中に存在するtrp1遺伝子である(Stinchcomb等, Nature, 282:39 (1979))。このtrp1遺伝子は、トリブ

50

トファン中で増殖する能力を欠く酵母の突然変異体株、例えば、ATCC番号44076又はPEP4-1に選択マーカーを提供する。Jones、Genetics、85:12(1977)。次いで、酵母宿主細胞ゲノム中のtrp1病変の存在が、トリプトファンの非存在下での増殖によって形質転換を検出するための有効な環境を提供する。同様に、Leu2欠損酵母株(ATCC 20,622又は38,626)は、Leu2遺伝子を有する公知のプラスミドによって補完される。

#### 【0283】

さらに、1.6 μm環状プラスミドpKD1由来のベクターは、クレイベロミセス酵母の形質転換に使用され得る。あるいは、組換え仔ウシキモシンの大規模産生のための発現系が、クレイベロミセス・ラクチス(K.lactis)について報告された。Van den Berg、Bio/Technology、8:135(1990)。クレイベロミセスの工業株による成熟組換えヒト血清アルブミンの分泌のための安定な多コピー発現ベクターもまた、開示されている。Fleer等、Bio/Technology、9:968-975(1991)。

10

#### 【0284】

##### (d)プロモーター成分

発現及びクローニングベクターは、一般に、宿主生物によって認識され、抗体をコードする核酸に動作可能に連結された、プロモーターを含む。原核生物宿主との使用に適切なプロモーターには、phoAプロモーター、 $\lambda$ -ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリホスファターゼプロモーター、トリプトファン(trp)プロモーター系、並びにハイブリッドプロモーター、例えば、tacプロモーターが含まれる。しかし、他の公知の細菌プロモーターが適切である。細菌系における使用のためのプロモーターは、抗体をコードするDNAに動作可能に連結されたシャインダルガノ(S.D.)配列もまた含む。

20

#### 【0285】

プロモーター配列は、真核生物について公知である。事実上全ての真核生物遺伝子が、転写が開始される部位からおよそ25から30塩基上流に位置するATリッチ領域を有する。多くの遺伝子の転写の開始から70から80塩基上流に見出される別の配列は、CNCAAT領域であり、ここで、Nは任意のヌクレオチドであり得る。ほとんどの真核生物遺伝子の3'末端には、コード配列の3'末端へのポリAテイルの付加のためのシグナルであり得るAATAAA配列がある。これらの配列は全て、真核生物発現ベクター中に適切に挿入される。

30

#### 【0286】

酵母宿主との使用に適切なプロモーター配列の例には、3-ホスホグリセリン酸キナーゼ又は他の解糖酵素、例えば、エノラーゼ、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、ヘキソキナーゼ、ピルビン酸デカルボキシラーゼ、ホスホフルクトキナーゼ、グルコース-6-リン酸イソメラーゼ、3-ホスホグリセリン酸ムターゼ、ピルビン酸キナーゼ、トリオースリン酸イソメラーゼ、ホスホグルコースイソメラーゼ及びグルコキナーゼについてのプロモーターが含まれる。

#### 【0287】

増殖条件によって制御される転写のさらなる利点を有する誘導性プロモーターである他の酵母プロモーターは、アルコールデヒドロゲナーゼ2、イソチトクロムC(isochromoc)、酸性ホスファターゼ、窒素代謝と関連する分解性酵素、メタロチオネイン、グリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ、並びにマルトース及びガラクトース利用を担う酵素についてのプロモーター領域である。酵母発現での使用に適切なベクター及びプロモーターは、EP73657にさらに記載されている。酵母エンハンサーもまた、酵母プロモーターと共に有利に使用される。

40

#### 【0288】

哺乳動物宿主細胞におけるベクターからの抗体転写は、例えば、ウイルス、例えば、ポリオマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(例えば、アデノウイルス2)、ウシ

50

パピローマウイルス、トリ肉腫ウイルス、サイトメガロウイルス、レトロウイルス、B型肝炎ウイルス、シミアンウイルス40(SV40)のゲノムから、又は異種哺乳動物プロモーター、例えば、アクチンプロモーター若しくは免疫グロブリンプロモーターから、熱ショックプロモーターから取得されたプロモーターによって制御され得るが、かかるプロモーターが宿主細胞系と適合性であることを条件とする。

#### 【0289】

SV40ウイルスの早期及び後期プロモーターは、簡便には、SV40ウイルス複製開始点もまた含むSV40制限断片として取得される。ヒトサイトメガロウイルスの最早期プロモーターは、簡便には、HindIII-E制限断片として取得される。ウシパピローマウイルスをベクターとして使用して哺乳動物宿主においてDNAを発現させるための系は、米国特許第4419446号に開示されている。この系の修飾は、米国特許第4601978号に記載されている。単純ヘルペスウイルス由来のチミジンキナーゼプロモーターの制御下でのマウス細胞におけるヒト-インターフェロンcDNAの発現については、Reyes等、Nature 297:598-601(1982)もまた参照のこと。あるいは、ラウス肉腫ウイルス長末端反復が、プロモーターとして使用され得る。

10

#### 【0290】

##### (e) エンハンサーエレメント成分

高等真核生物による本発明の抗体をコードするDNAの転写は、ベクター中にエンハンサー配列を挿入することによってしばしば増加される。多くのエンハンサー配列が、現在、哺乳動物遺伝子から公知である(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、 $\alpha$ -フェトプロテイン及びインスリン)。しかし、典型的には、真核細胞ウイルス由来のエンハンサーを使用する。例には、複製開始点(bp100-270)の後ろ側のSV40エンハンサー、サイトメガロウイルス早期プロモーターエンハンサー、複製開始点の後ろ側のポリオマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核性プロモーターの活性化のための増強エレメントについては、Yaniv、Nature 297:17-18(1982)もまた参照のこと。エンハンサーは、抗体コード配列に対して5'側又は3'側の位置においてベクター中にスプライスされ得るが、好ましくは、プロモーターの5'側の部位に位置する。

20

#### 【0291】

##### (f) 転写終結成分

真核宿主細胞(酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、又は他の多細胞生物由来の有核細胞)において使用される発現ベクターは、転写の終結及びmRNAの安定化に必要な配列もまた含む。かかる配列は、真核生物又はウイルスのDNA又はcDNAの5'非翻訳領域及び時折3'非翻訳領域から、一般に入手可能である。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分においてポリアデニル化断片として転写されるヌクレオチドセグメントを含む。1つの有用な転写終結成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。国際公開第94/11026号及びそこに開示された発現ベクターを参照のこと。

30

#### 【0292】

##### (g) 宿主細胞の選択及び形質転換

本明細書のベクター中のDNAをクローニング又は発現するために適切な宿主細胞は、上記原核生物、酵母又は高等真核生物細胞である。この目的のために適切な原核生物には、真正細菌、例えば、グラム陰性又はグラム陽性生物、例えば、腸内細菌科、例えば、大腸菌属(*Escherichia*)、例えば、大腸菌、エンテロバクター属(*Enterobacter*)、エルウイニア属(*Erwinia*)、クレブシエラ属(*Klebsiella*)、プロテウス属(*Proteus*)、サルモネラ属(*Salmonella*)、例えば、ネズミチフス菌(*Salmonella typhimurium*)、セラチア属(*Serratia*)、例えば、セラチア・マルセサンス(*Serratia marcescans*)、及びシゲラ属(*Shigella*)、並びに桿菌、例えば、枯草菌(*B. subtilis*)及びパチルス・リケニフォルミス(*B. licheniformis*)

40

50

mis) (例えば、1989年4月12日に公開されたDD266710中に開示されたバチルス・リケニフォルミス (*B. licheniformis*) 41P)、シュードモナス属 (*Pseudomonas*)、例えば、緑膿菌 (*P. aeruginosa*)、及びストレプトミセス属 (*Streptomyces*) が含まれる。1つの好ましい大腸菌クローニング宿主は、大腸菌294 (ATCC 31, 446) であるが、他の株、例えば、大腸菌B、大腸菌X1776 (ATCC 31, 537) 及び大腸菌W3110 (ATCC 27, 325) が適切である。これらの例は、限定ではなく例示である。

#### 【0293】

全長抗体、抗体融合タンパク質及び抗体断片は、特に、グリコシル化及びFcエフェクター機能が不要な場合、例えば、治療抗体が、腫瘍細胞破壊においてそれ自体有効性を示す細胞傷害性剤 (例えば、毒素) にコンジュゲートされる場合、細菌において産生され得る。全長抗体は、循環におけるより長い半減期を有する。大腸菌における産生は、より速く、よりコスト効率が高い。細菌における抗体断片及びポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5648237号 (Carter等)、米国特許第5789199号 (Joly等)、発現及び分泌を最適化するための翻訳開始領域 (TIR) 及びシグナル配列を記載する米国特許第5840523号 (Simmons等) を参照のこと。大腸菌における抗体断片の発現を記載する、Charlton、Methods in Molecular Biology、Vol. 248 (B.K.C. Lo編、Humana Press、Totowa、N.J.、2003)、pp. 245 - 254もまた参照のこと。発現後、抗体は、可溶型画分中の大腸菌細胞ペーストから単離され得、例えば、アイソタイプに依存して、プロテインA又はGカラムを介して精製され得る。例えばCHO細胞において発現された抗体を精製するためのプロセスと類似の最終精製が、実施され得る。

10

20

#### 【0294】

原核生物に加えて、真核微生物、例えば、糸状菌又は酵母は、抗体コードベクターに適切なクローニング又は発現宿主である。サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*) 又は一般的なパン酵母は、下等真核宿主微生物のなかで最も一般的に使用される。しかし、いくつかの他の属、種及び株が、一般に入手可能であり、本明細書で有用である、例えば、分裂酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) ; クルイペロミセス宿主、例えば、クルイペロミセス・ラクチス、クルイペロミセス・フラジリス (*K. fragilis*) (ATCC 12, 424)、クルイペロミセス・ブルガリカス (*K. bulgaricus*) (ATCC 16, 045)、クルイペロミセス・ウィッカーハミー (*K. wickerhamii*) (ATCC 24, 178)、クルイペロミセス・ワルティ (*K. waltii*) (ATCC 56, 500)、クルイペロミセス・ドロソフィラルム (*K. drosophilum*) (ATCC 36, 906)、クルイペロミセス・サーモトレランス (*K. thermotolerans*) 及びクルイペロミセス・マルシアヌス (*K. marxianus*) など; ヤロウミア属 (*Yarrowia*) (EP402226); ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*) (EP183070); カンジダ属 (*Candida*) ; トリコデルマ・リージア (*Trichoderma reesia*) (EP244234); アカパンカビ (*Neurospora crassa*); シュワンニオミセス属 (*Schwanniomyces*)、例えば、シュワンニオミセス・オクシデンタリス (*Schwanniomyces occidentalis*); 並びに糸状菌、例えば、アカパンカビ属 (*Neurospora*)、アオカビ属 (*Penicillium*)、トリポクラディウム属 (*Tolyposcladium*) など、及びアスペルギルス (*Aspergillus*) 宿主、例えば、アスペルギルス・ニデュランス (*A. nidulans*) 及びアスペルギルス・ニガー (*A. niger*)。治療タンパク質の産生のための酵母及び糸状菌の使用を議論する概説については、例えば、Gerngross、Nat. Biotech. 22: 1409 - 1414 (2004) を参照のこと。

30

40

#### 【0295】

50

グリコシル化経路が「ヒト化」され、部分的に又は完全にヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の産生を生じる、特定の真菌及び酵母株が選択され得る。例えば、Li等、Nat. Biotech. 24:210-215(2006)(ピキア・パストリスにおけるグリコシル化経路のヒト化を記載している);及びGerngross等、上記を参照のこと。

#### 【0296】

グリコシル化された抗体の発現に適切な宿主細胞は、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)からも誘導される。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のパキウウイルス株及び変異体、並びにヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*)(イモムシ)、ネッタイシマカ(*Aedes aegypti*)(蚊)、ヒトスジシマカ(*Aedes albopictus*)(蚊)、キイロショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)(ショウジョウバエ)及びカイコガ(*Bombyx mori*)などの宿主由来の対応する許容昆虫宿主細胞が、同定されている。トランスフェクションのための種々のウイルス株、例えば、アウトグラフィ・カリフォルニカ(*Autographa californica*)NPVのL-1変異体及びカイコガNPVのBm-5株が、公に入手可能であり、かかるウイルスは、特にヨトウガ細胞のトランスフェクションのために、本発明に従って本明細書でウイルスとして使用され得る。

10

#### 【0297】

ワタ、トウモロコシ、ジャガイモ、ダイズ、ペチュニア、トマト、ウキクサ(アマ科(*Linaceae*))、アルファルファ(タルウマゴヤシ(*M. truncatula*))及びタバコの植物細胞培養物もまた、宿主として利用され得る。例えば、米国特許第5959177号、米国特許第6040498号、米国特許第6420548号、米国特許第7125978号及び米国特許第6417429号(トランスジェニック植物において抗体を産生するためのPLANTIBODIES(商標)テクノロジーを記載している)を参照のこと。

20

#### 【0298】

脊椎動物細胞が宿主として使用され得、培養物(組織培養物)中での脊椎動物細胞の繁殖は、常套的手順になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL 1651);ヒト胚腎臓株(懸濁培養での増殖のためにサブクローニングされた293又は293細胞、Graham等、J. Gen Virol. 36:59(1977));ベビーハムスター腎臓細胞(BHK、ATCC CCL 10);マウスセルトリ細胞(TM4、Mather, Biol. Reprod. 23:243-251(1980));サル腎臓細胞(CV1 ATCC CCL 70);アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76、ATCC CRL-1587);ヒト子宮頸癌細胞(HELA、ATCC CCL 2);イヌ腎臓細胞(MDCK、ATCC CCL 34);buffaloラット肝臓細胞(BRL 3A、ATCC CRL 1442);ヒト肺細胞(W138、ATCC CCL 75);ヒト肝臓細胞(Hep G2、HB 8065);マウス乳房腫瘍(MMT 060562、ATCC CCL 51);TRI細胞(Mather等、Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68(1982));MRC 5細胞;FS4細胞;及びヒト肝がん株(Hep G2)である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR<sup>-</sup>CHO細胞(Urlaub等、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216(1980))を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞;並びに骨髄腫細胞株、例えば、NS0及びSp2/0が含まれる。抗体産生に適切な特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki及びWu、Methods in Molecular Biology, Vol. 248(B.K.C. Lo編、Humana Press、Totowa、N.J.、2003)、pp. 255-268を参照のこと。

30

40

#### 【0299】

宿主細胞は、抗体産生のために上記発現又はクローニングベクターで形質転換され、プロモーターを誘導するため、形質転換体を選択するため、又は所望の配列をコードする遺

50

伝子を増幅するために必要に応じて修飾された従来の栄養培地中で培養される。

【0300】

(h) 宿主細胞を培養する

本発明の抗体を産生するために使用される宿主細胞は、種々の培地中で培養され得る。市販の培地、例えば、Ham's F10 (Sigma)、最小必須培地 (MEM)、(Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 及びダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM)、Sigma) が、宿主細胞を培養するために適切である。さらに、Ham等、Meth. Enz. 58:44 (1979)、Barnes等、Anal. Biochem. 102:255 (1980)、米国特許第4767704号；米国特許第4657866号；米国特許第4927762号；米国特許第4560655号；若しくは米国特許第5122469号；国際公開第90/03430号；国際公開第87/00195号；又は米国再特許第30985号に記載された培地のいずれかが、宿主細胞のための培地として使用され得る。これらの培地のいずれかには、必要に応じて、ホルモン及び/又は他の増殖因子 (例えば、インスリン、トランスフェリン又は上皮増殖因子)、塩 (例えば、塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム及びリン酸塩)、バッファー (例えば、HEPES)、ヌクレオチド (例えば、アデノシン及びチミジン)、抗生物質 (例えば、GENTAMYCIN (商標) 薬物)、微量元素 (マイクロモル範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物として規定される)、並びにグルコース又は等価なエネルギー供給源が補充され得る。任意の他の必要なサプリメントもまた、当業者に公知の適切な濃度で含まれ得る。培養条件、例えば、温度、pHなどは、発現のために選択された宿主細胞と共に以前に使用されたものであり、当業者に明らかである。

10

20

【0301】

(xiv) 抗体の精製

組換え技術を使用する場合、抗体は、細胞内で産生され得、細胞周辺腔中に、又は培地に直接分泌され得る。抗体が細胞内で産生される場合、第1の工程として、宿主細胞又は溶解された断片のいずれかの特定のデブリが、例えば、遠心分離又は限外濾過によって除去される。Carter等、Bio/Technology 10:163-167 (1992) は、大腸菌の細胞周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順を記載している。簡潔に述べると、細胞ペーストが、酢酸ナトリウム (pH 3.5)、EDTA 及びフェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) の存在下で、約30分にわたって解凍される。細胞破片は、遠心分離によって除去され得る。抗体が培地中に分泌される場合、かかる発現系からの上清は、一般に、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、Amicon又はMillipore Pellicon限外濾過ユニットを使用して、最初に濃縮される。プロテアーゼ阻害剤、例えば、PMSFが、タンパク質分解を阻害するために、上述の工程のいずれか中に含まれ得、抗生物質が、偶発的な夾雑物の増殖を防止するために含まれ得る。

30

【0302】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析及びアフィニティークロマトグラフィーを使用して精製され得、アフィニティークロマトグラフィーが、典型的に好ましい精製工程の1つの中にある。親和性リガンドとしてのプロテインAの適切性は、抗体中に存在する任意の免疫グロブリンFcドメインの種及びアイソタイプに依存する。プロテインAは、ヒト 1、 2 又は 4 重鎖に基づく抗体を精製するために使用され得る (Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983))。プロテインGは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト 3 に推奨される (Guss等, EMBO J. 5:15671575 (1986))。親和性リガンドが結合されるマトリックスは、アガロースである場合が最も多いが、他のマトリックスが利用可能である。機械的に安定なマトリックス、例えば、孔制御ガラス又はポリ (スチレンジビニル) ベンゼンは、アガロースを用いて達成できるものよりも、速い流速及び短い処理時間を可能にする。抗体が C<sub>H</sub>3ドメインを含む場合、Bakerbond ABX (商標) 樹脂 (J. T. Baker, Phillipsburg, N. J.) が

40

50

、精製に有用である。タンパク質精製のための他の技術、例えば、イオン交換カラム上での分画、エタノール沈殿、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、陰イオン又は陽イオン交換樹脂（例えば、ポリアスパラギン酸カラム）上のヘパリンSEPHAROSE（商標）クロマトグラフィー上でのクロマトグラフィー、クロマトフォーカシング、SDS-PAGE、及び硫酸アンモニウム沈殿もまた、回収される抗体に依存して利用可能である。

#### 【0303】

一般に、研究、試験及び臨床における使用のための抗体を調製するための種々の方法は、上記方法と一致して、及び/又は目的の特定の抗体のために当業者に適切と思われるように、当該技術分野で十分に確立されている。

10

#### 【0304】

生物学的に活性な抗体を選択する

上記のように産生された抗体は、治療展望から有益な特性を有する抗体を選択するため、又は抗体の生物活性を保持する製剤若しくは条件を選択するために、1又は複数の「生物活性」アッセイに供され得る。抗体は、その抗体が惹起された抗原に結合するその能力について選択され得る。例えば、当該技術分野で公知の方法（例えば、ELISA、ウェスタンブロットなど）が使用され得る。

#### 【0305】

例えば、抗PD-L1抗体について、抗体の抗原結合特性は、PD-L1に結合する能力を検出するアッセイにおいて評価され得る。一部の実施態様では、抗体の結合は、例えば、飽和結合；ELISA；及び/又は競合アッセイ（例えば、RIA）によって決定される。また、抗体は、例えば、治療剤としてのその効率を評価するために、他の生物活性アッセイに供され得る。かかるアッセイは、当該技術分野で公知であり、標的抗原及び抗体についての目的の使用に依存する。例えば、抗体によるPD-L1遮断の生物学的効果は、例えば、米国特許第8217149号に記載されるように、CD8+T細胞、リンパ球性脈絡髄膜炎ウイルス（LCMV）マウスモデル及び/又は同系腫瘍モデルにおいて評価され得る。

20

#### 【0306】

目的の抗原上の特定のエピトープに結合する抗体（例えば、PD-L1への実施例の抗PD-L1抗体の結合をブロックするもの）についてスクリーニングするために、常套的クロスブロッキングアッセイ、例えば、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)に記載されるものが、実施され得る。あるいは、例えば、Champe等、J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)に記載されるようなエピトープマッピングが、目的のエピトープに抗体が結合するかどうかを決定するために実施され得る。

30

#### 【0307】

薬学的組成物及び製剤

PD-1軸結合アンタゴニスト及び/又は本明細書に記載される抗体（例えば、抗PD-L1抗体又は抗CD20抗体）及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物及び製剤もまた、本明細書で提供される。

40

#### 【0308】

本明細書に記載されるような薬学的組成物及び製剤は、所望の程度の純度を有する活性成分（例えば、抗体又はポリペプチド）及び/又は抗HER2抗体を、1又は複数の任意選択の薬学的に許容される担体（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. 編 (1980)）と混合することによって、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態で、調製され得る。薬学的に許容される担体は、一般に、使用される投薬量及び濃度においてレシピエントにとって非毒性であり、これには、以下が含まれるがこれらに限定されない：バッファー、例えば、ホスフェート、シトレート及び他の有機酸；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（例えば、オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムク

50

ロリド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチル又はベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチル又はプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン又はリジン；グルコース、マンノース又はデキストリンを含む、単糖類、二糖類及び他の糖（炭水化物）；キレート剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、ショ糖、マンニトール、トレハロース又はソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；及び/又は非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）。本明細書の例示的な薬学的に許容される担体には、間質薬物分散剤、例えば、可溶性中性-活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質（SHASEGP）、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rHuPH20（HYLENE X（登録商標）、Baxter International, Inc.）がさらに含まれる。rHuPH20を含む、特定の例示的SHASEGP及び使用の方法は、米国特許出願公開第2005/0260186号及び米国特許出願公開第2006/0104968号に記載されている。一態様では、SHASEGPは、1又は複数のさらなるグリコサミノグリカナーゼ（glycosaminoglycanase）、例えばコンドロイチナーゼと組み合わせられる。

10

20

#### 【0309】

例示的な凍結乾燥抗体製剤は、米国特許第6267958号に記載されている。水性抗体製剤には、米国特許第6171586号及び国際公開第2006/044908号に記載されるものが含まれ、後者の製剤は、ヒスチジンアセテートバッファーを含む。

#### 【0310】

本明細書の組成物及び製剤は、治療されている特定の適応症にとって必要な場合には1つよりも多い活性成分、好ましくは、互いに有害な影響を与えない相補的活性を有するもの、もまた含み得る。かかる活性成分は、意図した目的のために有効な量で組合せ中に適切に存在する。

#### 【0311】

活性成分は、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロース若しくはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセル中に、コロイド状薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル）中に、又はマクロエマルジョン中に、封入され得る。かかる技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. 編（1980）に開示されている。

30

#### 【0312】

徐放性調製物が調製され得る。徐放性調製物の例には、抗体を含む固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、このマトリックスは、造形品、例えば、フィルム又はマイクロカプセルの形態である。インビボ投与に使用される製剤は、一般に滅菌である。無菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を介した濾過によって、容易に達成され得る。

40

#### 【0313】

##### V. キット

別の一態様では、個体においてがんを治療する若しくはその進行を遅延させるため又はがんを有する個体の免疫機能を増強するための、PD-L1軸結合アンタゴニスト及び/又は抗CD20抗体を含むキットが提供される。一部の実施態様では、このキットは、PD-1軸結合アンタゴニスト、及び個体においてがんを治療する若しくはその進行を遅延させるため又はがんを有する個体の免疫機能を増強するために抗CD20抗体と組み合わせるための説明書を含む添付文書を含む。一部の実施態様では、このキットは、抗CD20抗体、及び個体においてがんを治療する若し

50

くはその進行を遅延させるため又はがんを有する個体の免疫機能を増強するためにPD-1軸結合アンタゴニストと組み合わせて抗CD20抗体を使用するための説明書を含む添付文書を含む。一部の実施態様では、このキットは、PD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体、並びに個体においてがんを治療する若しくはその進行を遅延させるため又はがんを有する個体の免疫機能を増強するためにPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体を使用するための説明書を含む添付文書を含む。本明細書に記載されるPD-1軸結合アンタゴニスト及び/又は抗CD20抗体のいずれかが、キット中に含まれる。

#### 【0314】

一部の実施態様では、このキットは、本明細書に記載されるPD-1軸結合アンタゴニスト及び抗CD20抗体のうち1又は複数を含む容器を含む。適切な容器には、例えば、ビン、バイアル（例えば、二重チャンパーバイアル）、シリンジ（例えば、単一又は二重チャンパーシリンジ）及び試験管が含まれる。この容器は、種々の材料、例えば、ガラス又はプラスチックから形成され得る。一部の実施態様では、このキットは、ラベル（例えば、この容器上の又はこの容器に関連した）又は添付文書を含み得る。このラベル又は添付文書は、その中に含まれる化合物が、個体においてがんを治療する若しくはその進行を遅延させるため又はがんを有する個体の免疫機能を増強するために有用であり得る又は意図され得ることを示し得る。このキットは、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針及びシリンジを含む、商業的及び使用者の観点から望ましい他の材料を、さらに含み得る。

#### 【0315】

抗CD20抗体の配列

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> amino acid sequence of variable region of the heavy chain (VH) of murine monoclonal anti-CD20 antibody B-Ly1

<400> 30

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

<210> 31

<211> 103

<212> PRT  
<213> Mus sp.

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<223> amino acid sequence of variable region of the light chain (VL) of murine monoclonal anti-CD20 antibody B-Ly1

<400> 31

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

10

20

<210> 32  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial

30

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HH2)

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser  
1                   5                   10                   15  
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
                  20                   25                   30  
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
                  35                   40                   45  
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
                  50                   55                   60  
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
65                   70                   75                   80  
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                  85                   90                   95  
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

40

50

100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 33  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220> 10  
 <223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH)  
 of humanized B-Ly1 antibody (B-HH3)

<400> 33

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

<210> 34  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH)  
 of humanized B-Ly1 antibody (B-HH4) 40

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser  
 20 25 30  
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 35 40 45 50

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110  
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 115

10

&lt;210&gt; 35

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH)  
 of humanized B-Ly1 antibody (B-HH5)

20

&lt;400&gt; 35

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

30

40

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH)  
 of humanized B-Ly1 antibody (B-HH6)

50

&lt;400&gt; 36

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

10

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 119

20

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH)  
 of humanized B-Ly1 antibody (B-HH7)

&lt;400&gt; 37

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

30

40

&lt;210&gt; 38

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

50



Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH)  
of humanized B-Ly1 antibody (B-HL8)

10

<400> 40

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

20

30

<210> 41

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH)  
of humanized B-Ly1 antibody (B-HL10)

40

<400> 41

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser  
20 25 30  
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50



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

10

<210> 44  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

20

<220>  
 <223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH)  
 of humanized B-Ly1 antibody (B-HL13)

<400> 44

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

30

40

<210> 45  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

50



Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 47  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HL16) 10

<400> 47

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

<210> 48  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> Artificial

<220>

<223> amino acid sequences of variable region of the heavy chain (VH) of humanized B-Ly1 antibody (B-HL17) 40

<400> 48

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser  
20 25 30  
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe  
50



<210> 51  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220>  
 <223> Sequence of HVR-H2 of GA101 Antibody 10  
  
 <400> 51  
  
 Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp  
 1 5  
  
 <210> 52  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> Artificial 20  
  
 <220>  
 <223> Sequence of HVR-H3 of GA101 Antibody  
  
 <400> 52  
  
 Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr  
 1 5 10  
  
 <210> 53  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Artificial 30  
  
 <220>  
 <223> Sequence of HVR-L1 of GA101 Antibody  
  
 <400> 53 40  
  
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr  
 1 5 10 15  
  
 <210> 54  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Artificial  
  
 <220> 50

<223> Sequence of HVR-L2 of GA101 Antibody

<400> 54

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser  
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sequence of HVR-L3 of GA101 Antibody

<400> 55

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr  
1 5

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> Artificial

<220>

<223> Sequence of VH of GA101 Antibody

<400> 56

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

10

20

30

40

50

<210> 57  
 <211> 115  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequence of VL of GA101 Antibody

<400> 57

10

```

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

20

<210> 58  
 <211> 448  
 <212> PRT  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Sequence of Heavy Chain Full Sequence of GA101 Antibody

<400> 58

40

```

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1           5           10           15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
           20           25           30
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
           35           40           45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
           50           55           60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
           85           90           95
  
```

50



<220>

<223> Sequence of Light Chain Full Sequence of GA101 Antibody

<400> 59

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

10

20

30

【実施例】

【0316】

本発明は、例示として提供され、限定を意味しない以下の実施例を参照して、さらに理解され得る。

【0317】

実施例1：再発した/難治性の濾胞性リンパ腫及びびまん性大B細胞型リンパ腫を有する患者においてオビヌツズマブと共に投与されたMPDL3280Aの安全性及び薬理学研究

40

この第1相介入的非盲検多施設グローバル研究は、難治性の又は再発した濾胞性リンパ腫(FL)又はびまん性大B細胞型リンパ腫(DLBCL)を有する患者に組み合わせて投与された静脈内MPDL3280A(即ち、抗PD-L1抗体)及びオビヌツズマブ(即ち、抗CD20抗体)の安全性、忍容性及び薬物動態を評価するために設計される。この研究の期待される持続期間は、およそ44ヶ月である。この研究設計は、治療、単一群割り当て、非盲検、非ランダム化安全性研究である。

【0318】

ステージ1の主要評価項目は、(a)最大21日間の時間枠内での用量制限毒性(DL

50

T)の発生率及び(b)最大21日間の時間枠内で観察されたDLTの性質、である。

【0319】

副次評価項目は、以下である：(a)最大44ヶ月の時間枠における、National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events (NCI CTCAE) v4.0に従ってグレート分けされた有害事象(AE)の発生率、(b)最大44ヶ月の時間枠における抗治療抗体応答の発生率；(c)サイクル2の1日目におけるMPDL3280Aの最大血清濃度(Cmax)；(d)サイクル1、3、4及び9の1日目並びに研究終結時におけるMPDL3280Aの最小血清濃度(Cmin)；並びに(e)サイクル1-4の1日目及びサイクル1の8日目における、オビヌツズマブの事前用量及び注入血清濃度の端(Cmax、Cmin)。

10

【0320】

この研究の推定登録数は、52個体である。この研究には2つのアームが存在する。第1のアームは、実験的安全性評価ステージ(ステージ1)である。第1のアーム中に割り当てられた介入は、(a)MPDL3280A：21日のオビヌツズマブ導入期間後の、3週間毎にIV投与される1200mgのMPDL3280A、及び(b)オビヌツズマブ：1日目(第1の用量は分割され、2日間にわたって投与される)、サイクル1の8及び15日目、並びにサイクル2から8の1日目にIV投与される、1000mgのオビヌツズマブ、である。第2のアームは、展開ステージ(ステージ2)である。第2のアーム中に割り当てられた介入は、(a)MPDL3280A：21日のオビヌツズマブ導入期間後の、3週間毎にIV投与される1200mgのMPDL3280A、及び(b)オビヌツズマブ：1日目(第1の用量は分割され、2日間にわたって投与される)、サイクル1の8及び15日目、並びにサイクル2から8の1日目にIV投与される、1000mgのオビヌツズマブ、である。

20

【0321】

18歳以上の両方の性別の個体が、この研究に適格である。組み入れ基準は以下である：(a)組織学的に報告された、CD20陽性の再発した又は難治性(以前の治療の6ヵ月以内に再発したと定義される)の濾胞性リンパ腫(FL)又は縦隔原発B細胞性大細胞型リンパ腫(PMBCL)を含むびまん性大B細胞型リンパ腫(DLBC)；(b)スクリーニングの時点での骨髄生検(スクリーニング前の3ヶ月以内にそれを実施した場合を除く)；(c)0又は1のEastern Cooperative Oncology Group(ECOG)活動指標、(d)平均余命12週間；(e)Revised Response Criteria for Malignant Lymphomaによって定義されるような、コンピュータ断層撮影(CT)スキャン又はMRIによる、その最も大きい寸法における少なくとも1つの二次元的に測定可能な病変2cm；(f)適切な血液学的及び終末器官機能；(g)出産可能性のある女性患者及び出産可能性のあるパートナーを有する男性患者について、高度に有効な形態(複数可)の避妊を使用することへの同意(患者及び/又はパートナーによる)；並びに(h)保存腫瘍組織。

30

【0322】

除外基準は以下である：(a)中枢神経系リンパ腫、軟髄膜リンパ腫又は高悪性度若しくはDLBCLへの形質転換の組織学的証拠；(b)グレード3bのFL、小リンパ球性リンパ腫(SLL)又はワルデンシュトレーム型マクログロブリン血症(WM)；(c)制御されない胸水貯留、心膜液貯留、又は反復性のドレナージ手順(1ヵ月に1回又はより頻繁に)を必要とする腹水症\*；(d)ビスホスホネート療法又はデノスマブの継続的な使用を必要とする、制御されない高カルシウム血症又は症候性高カルシウム血症；(e)モノクローナル抗体療法に対する重症のアレルギー又はアナフィラキシー反応の履歴；(f)<30mg/日のプレドニゾン/プレドニゾロンと等価な用量で非ホジキンリンパ腫以外の適応症のために投与される場合を除き、サイクル1の開始前の4週間以内のコルチコステロイドによる定期的な治療；(g)妊娠中及び授乳中の女性；(h)自己免疫疾患の履歴；(i)確認された進行性多巣性白質脳症(PML)の履歴を有する患者；(j)

40

50

) 事前の同種異系骨髄移植又は事前の実質臓器移植を有する患者 ; ( k ) 特発性肺線維症、器質化肺炎 ( 例えば、閉塞性細気管支炎 )、薬物誘導性間質性肺炎、特発性間質性肺炎、又はスクリーニング時の胸部 C T スキャン毎の活動性間質性肺炎の証拠の履歴 \* \* ; ( l ) H I V についての陽性試験 ; ( m ) 慢性 B 型肝炎感染の履歴、又は活動性若しくは慢性の B 型肝炎若しくは C 型肝炎についての陽性試験結果 ; ( m ) 顕著な心血管疾患、例えば、心疾患 ( New York Heart Association Class I I 以上 )、直近 3 ヶ月以内の心筋梗塞、不安定な不整脈又は不安定狭心症 ; ( n ) 過敏症又はオピヌツズマブによる事前治療 ; ( o ) 研究登録前の 12 ヶ月以内のフルダラビン又は C a m p a t h ( 登録商標 ) ; ( p ) C D 137 アゴニスト、又は抗 C T L A 4、抗 P D - 1 及び抗 P D - L 1 治療抗体を含む免疫チェックポイント遮断療法による事前治療 ; ( q ) サイクル 1、1 日目の前の、6 週間又は薬物の 5 半減期以内のいずれか短い方の、全身性免疫賦活剤 ( インターフェロン、インターロイキン - 2 が含まれるがこれらに限定されない ) による治療 ; 並びに ( r ) サイクル 1、1 日目の前の 2 週間以内の、プレドニゾン、シクロホスファミド、アザチオプリン、メトトレキサート、サリドマイド及び抗腫瘍壊死因子 ( 抗 T N F ) 剤が含まれるがこれらに限定されない全身性免疫抑制薬物療法による治療 \* \* \* 。

10

\* 留置カテーテルを有する患者は、適格である。

\* \* 照射野中の放射線間質性肺炎 ( 線維症 ) の履歴は許容される。

\* \* \* 吸入されたコルチコステロイド及びミネラルコルチコイドは許容される。

20

### 【 0 3 2 3 】

実施例 2 : マウスにおける腫瘍容積及びリンパ球集団に対する、抗 P D - L 1 抗体と組み合わせた抗 C D 20 抗体の効果

マウスに、100  $\mu$  l と 200  $\mu$  l との間の容積中の、H B S S + マトリゲル中 250 万の A 20 細胞を、右片側性胸郭領域中に皮下接種した。これらのマウスに、腫瘍を増殖させた。腫瘍が、およそ 80 - 150 mm<sup>3</sup> ( 0 日目、接種のおよそ 6 日後 ) の平均腫瘍容積に達したときに、これらのマウスを、以下に概説する治療群中に採用した。治療を 0 日目に開始した。これらの治療群中に採用されなかったマウス ( 即ち、異なる腫瘍容積に起因する ) は、安楽死させた。

### 【 0 3 2 4 】

治療群 :

30

1 . 0 日目、3 日目の抗 R a g w e e d ( m I g G 2 a ) 10 m g / k g 用量、10 日目及び 17 日目の 5 m g / k g I P + M u I g G 1 抗 g p 120 9338、10 m g / k g I P、T I W x 3 n = 10

2 . 0 日目、3 日目の抗 R a g w e e d ( m I g G 2 a ) 10 m g / k g 用量、10 日目及び 17 日目の 5 m g / k g I P + M u I g G 1 抗 P D - L 1 6 E 11 . 1 . 9、10 m g / k g、I P、T I W x 3 n = 10

3 . 0 日目、3 日目の M u I g G 2 a 抗 C D 20 R a g w e e d / 5 D 2 10 m g / k g 用量、10 日目及び 17 日目の 5 m g / k g + M u I g G 1 g p 120 9338、10 m g / k g、I P、T I W x 3 n = 10

4 . 0 日目、3 日目の M u I g G 2 a 抗 C D 20 R a g w e e d / 5 D 2 10 m g / k g 用量、10 日目及び 17 日目の 5 m g / k g + M u I g G 1 抗 P D - L 1 6 E 11 . 1 . 9、10 m g / k g、I P、T I W x 3 n = 10

40

### 【 0 3 2 5 】

M u I g G 1 抗 g p 120、M u I g G 2 a 抗 P D - L 1 を、3、5、7、10、12、14、17、19 及び 21 日目に投与した。組合せ群中の抗体を、次々に投薬した。組み合わせた用量容積は、マウス 1 匹当たり 300  $\mu$  L を超えた。抗 P D - L 1 抗体を、P B S 又は 20 m M ヒスチジンアセテート、240 m M ショ糖、0 . 02 % ポリソルベート 20 ( T w e e n - 20 )、p H = 5 . 5 中に希釈した。

### 【 0 3 2 6 】

全てのマウスを、4 日目又は 5 日目に出血させて、B 細胞枯渇の効率を決定した。血液

50

を、イソフルラン誘導性麻酔（効果のために吸入）下で眼窩出血によって収集した（収集容積は200 $\mu$ lを超えた）。眼窩を交互に入れ替えた。各治療群について、%CD19+Bリンパ球、%CD4+Tリンパ球及び%CD8+Tリンパ球を決定するための4日目の血液FACS解析が、それぞれ、図1A、図1B及び図1Cに示される。

#### 【0327】

測定値及び体重を、1週間当たり少なくとも2回収集した。>15%の体重減少を示すマウスを、毎日計量し、>20%の体重を喪失した場合、安楽死させた。研究全体を通じて、全てのマウスの臨床観察を、1週間に2回実施した。有害な臨床的問題を示すマウスを、重症度に依存して、例えば最大で1日1回、より頻繁に観察した。瀕死の場合、マウスを安楽死させた。腫瘍容積が3,000mm<sup>3</sup>を超えたとき、又は3ヶ月後に腫瘍が形成しなかった場合に、マウスを安楽死させた。以前の研究により、8週間後に、残留腫瘍は、低減された増殖速度を有し、有意に悪性度が低いことが示されている。これらの残留腫瘍を、1週間に1回測定し、計量した。8週間後に存在する任意の大きい又は積極的に増殖している腫瘍について、これらの特定のマウスについての測定値及び体重を、1週間に2回収集した。各治療群についての腫瘍容積対時間（0日目と30日目との間）のプロットを、図2に示す。混合モデル化手法を使用して、同じ動物からの腫瘍容積の反復された測定値を経時的に解析した。Pinheiro等、Stat Med. 2014 May 10; 33(10):1646-61 (Epub 2013 Dec 3)。この手法は、研究の終了前の反復された測定値及び中程度の離脱の両方を扱う。3次回帰スプラインを使用して、異なる治療におけるlog<sub>2</sub>（腫瘍容積）の経時変化に非線形プロファイルをフィットさせた。フィッティングを、nlmeパッケージ、バージョン3.1.108 (R Foundation for Statistical Computing; Vienna, Austria) を使用して、R、バージョン2.15.2内の線形混合効果モデル (linear mixed effects model) を介して実施した。抗CD20抗体と組み合わせた抗PD-L1抗体による治療は、いずれかの単一薬剤による治療よりも、腫瘍増殖を阻害し、腫瘍増殖を遅延させるにあたって、より有効であった。

10

20

#### 【0328】

上記実験を、A20pRK-CD20-GFPを用いてマウスにおいて反復した。100匹のマウスに、上記のように250万のA20pRK-CD20-GFP細胞を接種し、これらのマウスに、腫瘍を増殖させた。腫瘍が、およそ100-200mm<sup>3</sup>（0日目、接種のおよそ7日後）の平均腫瘍容積に達したときに、動物を、以下に概説する治療群中に採用した。治療を0日目に開始した（例えば、異なる腫瘍容積に起因して以下の治療群中に採用されなかったマウスは、安楽死させた）。

30

#### 【0329】

治療群：

1. - 2日目、1日目の抗Ragweed (mIgG2a) 10mg/kg用量、8日目及び15日目の5mg/kg IP+Mu IgG1 抗gp120 9338、10mg/kg IP、tiw $\times$ 3 n=10

2. - 2日目、1日目の抗Ragweed (mIgG2a) 10mg/kg用量、8日目及び15日目の5mg/kg IP+Mu IgG2a 抗PDL1 25A1 DANA、10mg/kg、IP、tiw $\times$ 3 n=10

3. - 2日目、1日目のMu IgG2a 抗CD20 Ragweed / 5D2 10mg/kg用量、8日目及び15日目の5mg/kg + Mu IgG1 gp120 9338、10mg/kg、IP、tiw $\times$ 3 n=10

4. - 2日目、1日目のMu IgG2a 抗CD20 Ragweed / 5D2 10mg/kg用量、8日目及び15日目の5mg/kg + Mu IgG2a 抗PDL1 25A1 DANA、10mg/kg、IP、tiw $\times$ 3 n=10

5. 1日目のMu IgG2a 抗hCD20 2H7 - mIgG2a / 5D2 10mg/kg並びに8日目及び15日目の5mg/kg + Mu IgG1 gp120 9

40

50

338、10mg/kg、IP、tiw×3 n=10

6.1日目のMu IgG2a 抗hCD20 2H7-mIgG2a/5D2 10mg/kg並びに8日目及び15日目の5mg/kg+Mu IgG2a 抗PD-L1 25A1 DANA、10mg/kg、IP、tiw×3 n=10

【0330】

Mu IgG1 抗gp120、Mu IgG2a 抗PD-L1を、3、5、7、10、12、14、17、19及び21日目に投与した。組合せ群中の抗体を、次々に投薬した。組み合わせた用量容積は、マウス1匹当たり300μLを超えた。抗PD-L1抗体を、PBS又は20mMヒスチジンアセテート、240mMショ糖、0.02%ポリソルベート20(Tween-20)、pH=5.5中に希釈した。

10

【0331】

全ての動物を、2日目又は3日目に出血させて、B細胞枯渇の効率を決定した。血液を、イソフルラン誘導性麻酔(効果のために吸入)下で眼窩出血によって収集した(収集容積は200μlを超えなかった)。眼窩を交互に入れ替えた。

【0332】

測定値及び体重を、1週間当たり少なくとも2回収集した。>15%の体重減少を示すマウスを、毎日計量し、>20%の体重を喪失した場合、安楽死させた。研究全体を通じて、全てのマウスの臨床観察を、1週間に2回実施した。有害な臨床的問題を示すマウスを、重症度に依存して、例えば最大で1日1回、より頻繁に観察した。瀕死の場合、マウスを安楽死させた。腫瘍容積が3,000mm<sup>3</sup>を超えたとき、又は3ヶ月後に腫瘍が形成しなかった場合に、マウスを安楽死させた。以前の研究により、8週間後に、残留腫瘍は、低減された増殖速度を有し、有意に悪性度が低いことが示されている。これらの残留腫瘍を、1週間に1回測定し、計量した。8週間後に存在する任意の大きい又は積極的に増殖している腫瘍について、これらの特定のマウスについての測定値及び体重を、1週間に2回収集した。各治療群についての腫瘍容積対時間(0日目と30日目との間)のプロットを、図3に示す。図2に利用したのと同じ混合モデル化手法を使用して、同じ動物からの腫瘍容積の反復された測定値を経時的に解析した。抗CD20抗体と組み合わせた抗PD-L1抗体による治療は、いずれかの単一薬剤による治療よりも、腫瘍増殖を阻害し、腫瘍増殖を遅延させるにあたって、より有効であった。

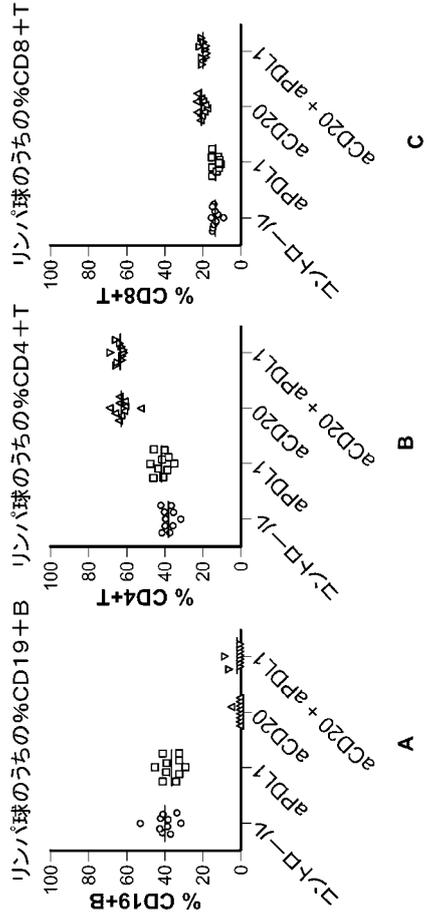
20

【0333】

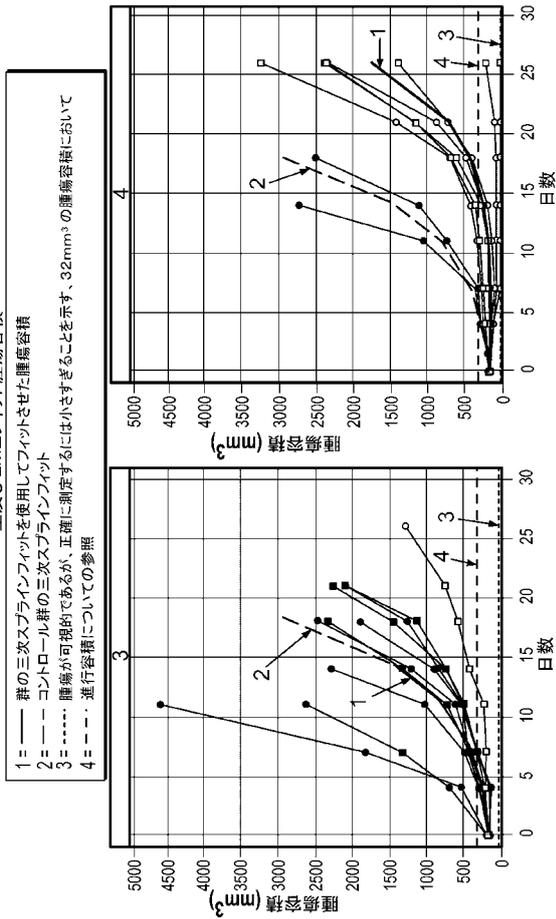
本明細書に引用される全ての特許、特許出願、文書及び論文は、その全内容が本明細書に出典明示により援用される。

30

【 図 1 】



【 図 2 - 2 】

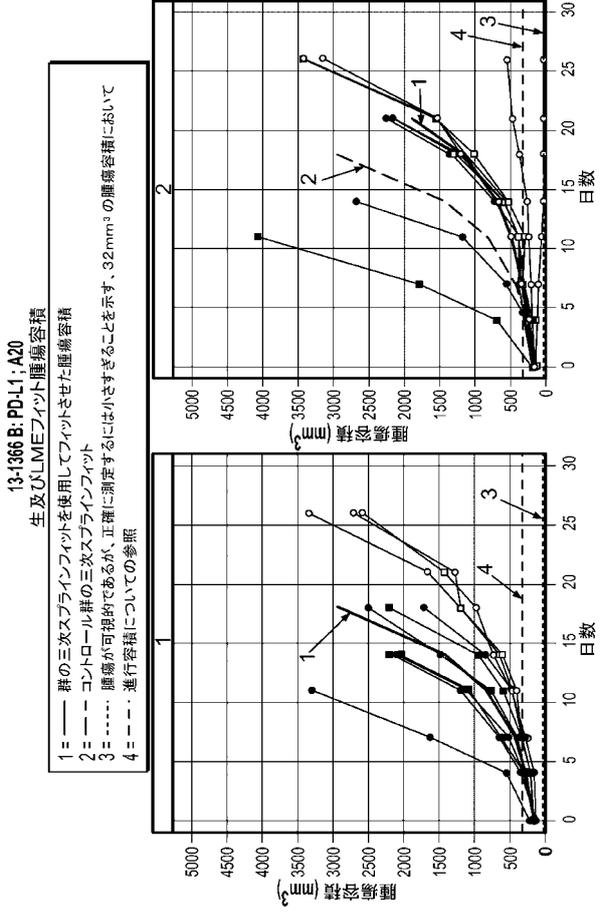


13-1366 B: PD-L1; A20

生及びLMEフィット腫瘍容積

- 1 = 群の三次スプラインフィットを使用してフィットさせた腫瘍容積
- 2 = 群の三次スプラインフィットを使用してフィットさせた腫瘍容積
- 3 = 腫瘍が可視的であるが、正確に測定するには小さすぎることを示す、32mm<sup>3</sup>の腫瘍容積において
- 4 = 進行容積についての参照

【 図 2 - 1 】



13-1366 B: PD-L1; A20

生及びLMEフィット腫瘍容積

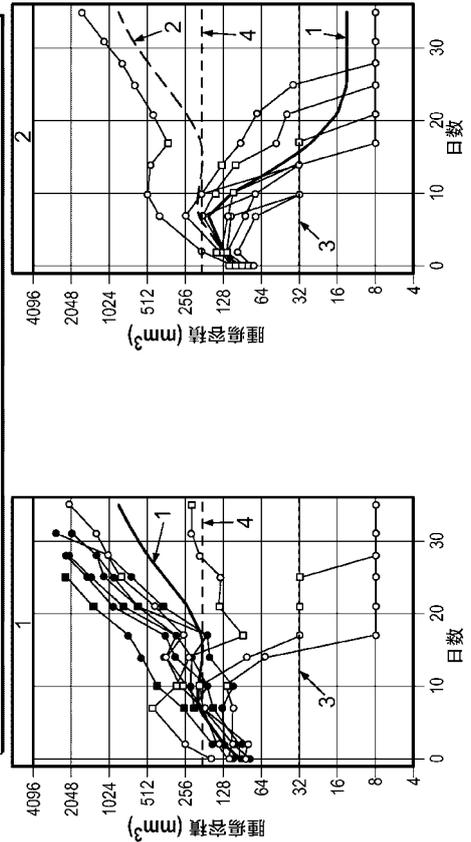
- 1 = 群の三次スプラインフィットを使用してフィットさせた腫瘍容積
- 2 = 群の三次スプラインフィットを使用してフィットさせた腫瘍容積
- 3 = 腫瘍が可視的であるが、正確に測定するには小さすぎることを示す、32mm<sup>3</sup>の腫瘍容積において
- 4 = 進行容積についての参照

【 図 2 - 1 】

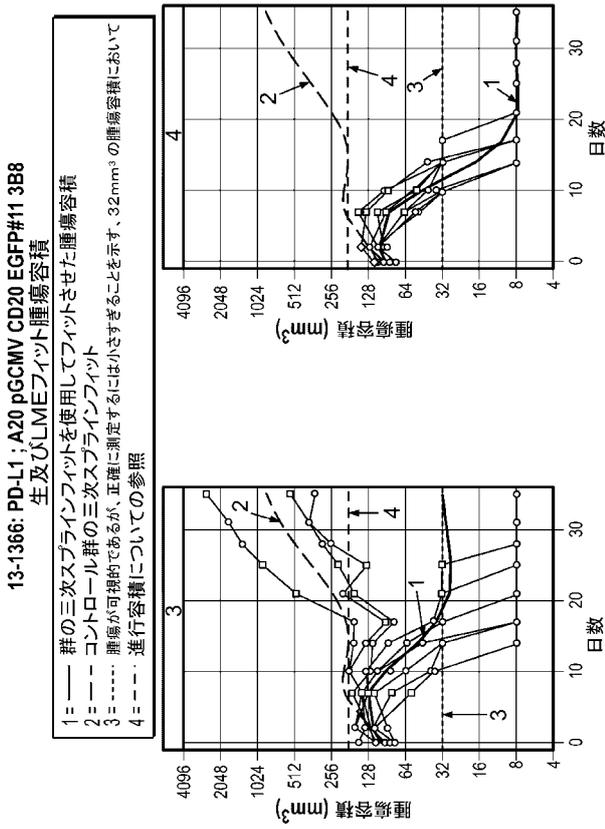
13-1366: PD-L1; A20 pGCMV CD20 EGFP#11 3B8

生及びLMEフィット腫瘍容積

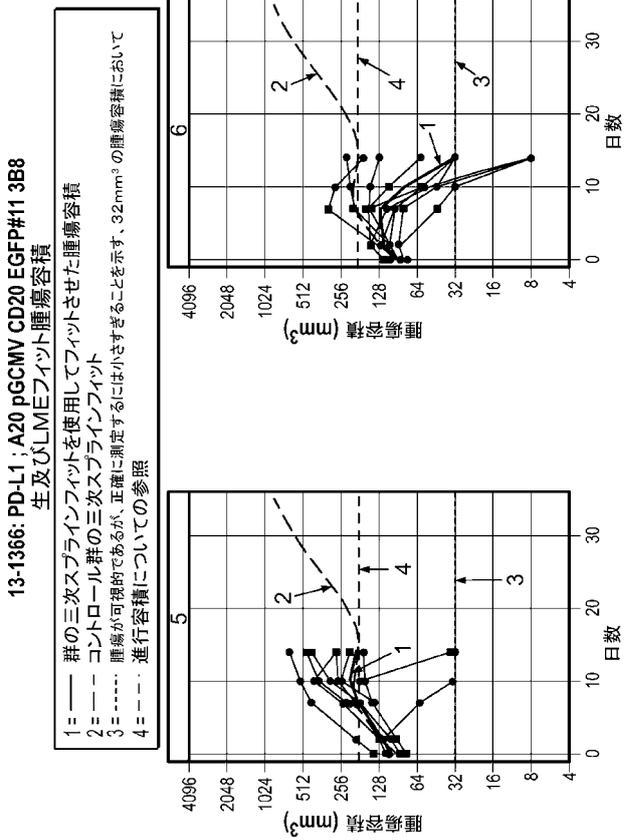
- 1 = 群の三次スプラインフィットを使用してフィットさせた腫瘍容積
- 2 = 群の三次スプラインフィットを使用してフィットさせた腫瘍容積
- 3 = 腫瘍が可視的であるが、正確に測定するには小さすぎることを示す、32mm<sup>3</sup>の腫瘍容積において
- 4 = 進行容積についての参照



【 図 3 - 2 】



【 図 3 - 3 】



【 配列表 】

2017501157000001.app

## 【 国際調査報告 】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/070983
---

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> INV. C07K16/28 A61K39/395 A61P35/02 ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K		
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, BIOSIS		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WESTIN JASON R ET AL: "Safety and activity of PD1 blockade by pidilizumab in combination with rituximab in patients with relapsed follicular lymphoma: a single group, open-label, phase 2 trial.", THE LANCET. ONCOLOGY JAN 2014, vol. 15, no. 1, 11 December 2013 (2013-12-11), pages 69-77, XP002737602, ISSN: 1474-5488	1-8,11, 27, 35-41, 43, 46-63, 79, 87-93, 95, 98-108
Y	the whole document	9-23, 64-75
	-----	-/--
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box O.		
<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 21 May 2015		Date of mailing of the international search report 28/05/2015
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 Bumb, Peter

4

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US2014/070983**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.:  
3-23, 57-75(completely); 1, 2, 27, 35-41, 43, 46-56, 79, 87-93, 95  
98-108(partially)
  
4.  No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**Remark on Protest**

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

International Application No. PCT/US2014/070983

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

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

1. claims: 3-12, 57-64(completely); 1, 2, 27, 35-41, 43, 46-56, 79, 87-93, 95, 98-108(partially)

A method for treating or delaying progression of cancer in an individual or enhancement of immune function in an individual having cancer with a combination of a PD-1 axis binding antagonist and an anti-CD20 antibody, wherein the PD-1 axis binding antagonist is a PD-1 binding antagonist.

---

2. claims: 13-23, 65-75(completely); 1, 2, 27, 35-41, 43, 46-56, 79, 87-93, 95, 98-108(partially)

A method for treating or delaying progression of cancer in an individual or enhancement of immune function in an individual having cancer with a combination of a PD-1 axis binding antagonist and an anti-CD20 antibody, wherein the PD-1 axis binding antagonist is a PD-L1 binding antagonist.

---

3. claims: 24-26, 76-78(completely); 1, 2, 27, 35-41, 43, 46-56, 79, 87-93, 95, 98-108(partially)

A method for treating or delaying progression of cancer in an individual or enhancement of immune function in an individual having cancer with a combination of a PD-1 axis binding antagonist and an anti-CD20 antibody, wherein the PD-1 axis binding antagonist is a PD-L2 binding antagonist.

---

4. claims: 28, 80(completely); 1, 2, 27, 35-41, 43, 46-56, 79, 87-93, 95, 98-108(partially)

A method for treating or delaying progression of cancer in an individual or enhancement of immune function in an individual having cancer with a combination of a PD-1 axis binding antagonist and an anti-CD20 antibody, wherein the anti-CD20 antibody is a humanized B-Ly1 antibody.

---

5. claims: 29-34, 81-86(completely); 1, 2, 27, 35-41, 43, 46-56, 79, 87-93, 95, 98-108(partially)

A method for treating or delaying progression of cancer in an individual or enhancement of immune function in an individual having cancer with a combination of a PD-1 axis binding antagonist and an anti-CD20 antibody, wherein the anti-CD20 antibody is a GA101 antibody.

International Application No. PCT/US2014/070983

## FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

---

6. claims: 42, 44, 94, 96(completely); 1, 2, 27, 35-41, 43, 46-56, 79, 87-93, 95, 98-108(partially)

A method for treating or delaying progression of cancer in an individual or enhancement of immune function in an individual having cancer with a combination of a PD-1 axis binding antagonist and an anti-CD20 antibody, wherein the cancer is CLL or AML .

---

7. claims: 45, 97(completely); 1, 2, 27, 35-41, 43, 46-56, 79, 87-93, 95, 98-108(partially)

A method for treating or delaying progression of cancer in an individual or enhancement of immune function in an individual having cancer with a combination of a PD-1 axis binding antagonist and an anti-CD20 antibody, wherein the cancer is DLBCL .

---

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/070983
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2012 (2012-11), WESTIN JASON R ET AL: "Phase II Safety and Efficacy Study of CT-011, a Humanized Anti-PD-1 Monoclonal Antibody, in Combination with Rituximab in Patients with Relapsed Follicular Lymphoma", XP002737603, Database accession no. PREV201300231922	1-8,11, 37-41, 43, 46-63, 89-93, 95, 98-102, 105-108
Y	the whole document  & BLOOD, vol. 120, no. 21, November 2012 (2012-11), page 793, 54TH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 08 -11, 2012 ISSN: 0006-4971(print) -----	13-23, 65-75
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2012 (2012-11), CHU FULIANG ET AL: "Immunological Effects and Predictive Gene Signatures in Patients with Relapsed Follicular Lymphoma Treated with CT-011, a Humanized Anti-PD-1 Monoclonal Antibody", XP055138386, Database accession no. PREV201300232051	1-8,11, 37-41, 43, 46-63, 89-93, 95, 98-102, 105-108
Y	the whole document  & BLOOD, vol. 120, no. 21, November 2012 (2012-11), page 162, 54TH ANNUAL MEETING AND EXPOSITION OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY (ASH); ATLANTA, GA, USA; DECEMBER 08 -11, 2012 ISSN: 0006-4971(print) -----	13-23, 65-75
X	DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; November 2009 (2009-11), CHU FULIANG ET AL: "In Vitro and In Vivo Effects of CT-011, a Humanized Anti-PD-1 Monoclonal Antibody, in Combination with Rituximab against Human B-Cell Lymphomas", XP002737604, Database accession no. PREV201000351718	1-8,11, 38-41, 43, 46-63, 90-93, 95, 98-102, 105-108
Y	the whole document  -/--	13-23, 65-75

4

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

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2014/070983
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	& BLOOD, vol. 114, no. 22, November 2009 (2009-11), page 302, 51ST ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN-SOCIETY-OF-HEMATOLOGY; NEW ORLEANS, LA, USA; DECEMBER 05 -08, 2009 ISSN: 0006-4971(print)	
Y	----- TOPALIAN SUZANNE L ET AL: "Targeting the PD-1/B7-H1(PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity.", CURRENT OPINION IN IMMUNOLOGY APR 2012, vol. 24, no. 2, April 2012 (2012-04), pages 207-212, XP002714810, ISSN: 1879-0372 page 209	9-12,64
Y	----- WO 2013/181634 A2 (SORRENTO THERAPEUTICS INC [US]) 5 December 2013 (2013-12-05) examples 3-6,12-15 pages 61,63	13-23, 65-75
Y	----- WO 2008/085562 A2 (UNIV JOHNS HOPKINS [US]; PARDOLL DREW [US]; CHEN LIEPING [US]; DRAKE C) 17 July 2008 (2008-07-17) pages 1,20,21	13-23, 65-75
Y	----- WO 2010/019570 A2 (MEDAREX INC [US]; THUDIUM KENT B [US]; KORMAN ALAN J [US]; LEBLANC HEI) 18 February 2010 (2010-02-18) page 69	13-23, 65-75
Y	----- WO 2008/156713 A2 (WYETH CORP [US]; TRUBION PHARMACEUTICALS INC [US]; DAMLE NITIN K [US];) 24 December 2008 (2008-12-24) paragraph [0247] - paragraph [0283] paragraph [0148]	13-23, 65-75
Y	----- M. SZNOL ET AL: "Antagonist Antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the Treatment of Advanced Human Cancer", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 19, no. 5, 1 March 2013 (2013-03-01), pages 1021-1034, XP055123957, ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-2063 the whole document	13-23, 65-75
Y	----- WO 2013/019906 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]; MAECKER HEATHER [US]; IRVI) 7 February 2013 (2013-02-07) sequences 21,24 paragraphs [0014], [0036] - [0038]	13-23, 65-75

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/070983

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2013181634 A2	05-12-2013	AU 2013267161 A1	20-11-2014
		CA 2872030 A1	05-12-2013
		CO 7160115 A2	15-01-2015
		EP 2854843 A2	08-04-2015
		KR 20150042751 A	21-04-2015
		US 2013323249 A1	05-12-2013
		WO 2013181634 A2	05-12-2013
WO 2008085562 A2	17-07-2008	AU 2007342338 A1	17-07-2008
		CA 2663521 A1	17-07-2008
		EP 2061504 A2	27-05-2009
		JP 2010504356 A	12-02-2010
		US 2009304711 A1	10-12-2009
		WO 2008085562 A2	17-07-2008
WO 2010019570 A2	18-02-2010	AR 072999 A1	06-10-2010
		AU 2009282134 A1	18-02-2010
		AU 2014221286 A1	02-10-2014
		CA 2734335 A1	18-02-2010
		CL 2013002062 A1	10-01-2014
		CN 102176921 A	07-09-2011
		CN 103923213 A	16-07-2014
		CO 6351751 A2	20-12-2011
		EA 201100340 A1	30-08-2011
		EP 2320940 A2	18-05-2011
		JP 5647981 B2	07-01-2015
		JP 2012500006 A	05-01-2012
		KR 20110050507 A	13-05-2011
		NZ 590991 A	30-11-2012
		NZ 602780 A	30-04-2014
		PE 03062011 A1	21-05-2011
		PE 16582014 A1	08-11-2014
		TW 201019958 A	01-06-2010
		US 2011150892 A1	23-06-2011
		WO 2010019570 A2	18-02-2010
WO 2008156713 A2	24-12-2008	AU 2008266952 A1	24-12-2008
		CA 2691322 A1	24-12-2008
		CN 101842389 A	22-09-2010
		CO 6251370 A2	21-02-2011
		EP 2164871 A2	24-03-2010
		JP 2010531137 A	24-09-2010
		KR 20100044160 A	29-04-2010
		RU 2010100638 A	20-07-2011
		US 2010330089 A1	30-12-2010
		WO 2008156713 A2	24-12-2008
		WO 2013019906 A1	07-02-2013
AU 2012290121 A1	09-05-2013		
CA 2843595 A1	07-02-2013		
CN 103842030 A	04-06-2014		
CO 6900118 A2	20-03-2014		
CR 20140034 A	23-07-2014		
EA 201490369 A1	29-08-2014		
EC SP14013223 A	31-03-2014		
EP 2739358 A1	11-06-2014		
JP 2014525918 A	02-10-2014		
KR 20140063643 A	27-05-2014		

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2006)

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

PCT/US2014/070983

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		MA 35366 B1	01-08-2014
		PE 16932014 A1	24-11-2014
		TW 201318638 A	16-05-2013
		US 2014341902 A1	20-11-2014
		WO 2013019906 A1	07-02-2013
-----			

## フロントページの続き

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
<b>A 6 1 P 35/02 (2006.01)</b>	A 6 1 K 39/395	N
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T
	A 6 1 P 35/02	
	C 1 2 P 21/08	

(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, 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, KN, KP, KR, 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, UA, UG, US

Fターム(参考) 4C085 AA13 AA14 AA16 BB01 BB36 CC02 EE03 GG01  
4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 CA40 DA76 EA20 FA74