

(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2014-520784

(P2014-520784A)

(43) 公表日 平成26年8月25日 (2014. 8. 25)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006. 01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006. 01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/00 (2006. 01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 35/02 (2006. 01)	A 6 1 P 35/02	
A 6 1 P 29/00 (2006. 01)	A 6 1 P 29/00	
審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 21 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2014-517813 (P2014-517813)	(71) 出願人	502247787
(86) (22) 出願日	平成24年7月6日 (2012. 7. 6)		モルフォシス・アー・ゲー
(85) 翻訳文提出日	平成26年1月22日 (2014. 1. 22)		ドイツ連邦共和国 8 2 1 5 2 ・マルティン
(86) 国際出願番号	PCT/EP2012/063207		スリード／ブラネッグ, レナークリストー
(87) 国際公開番号	W02013/004806		シュトラッセ 4 8
(87) 国際公開日	平成25年1月10日 (2013. 1. 10)	(74) 代理人	100091096
(31) 優先権主張番号	11172865.5		弁理士 平木 祐輔
(32) 優先日	平成23年7月6日 (2011. 7. 6)	(74) 代理人	100118773
(33) 優先権主張国	欧州特許庁 (EP)		弁理士 藤田 節
(31) 優先権主張番号	61/504, 744	(74) 代理人	100122389
(32) 優先日	平成23年7月6日 (2011. 7. 6)		弁理士 新井 栄一
(33) 優先権主張国	米国 (US)	(74) 代理人	100111741
			弁理士 田中 夏夫
		(74) 代理人	100169971
			弁理士 菊田 尚子
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 抗CD20抗体と抗GM-CSF抗体との治療的組合せおよびその使用

(57) 【要約】

本開示は、抗CD20抗体と抗GM-CSF抗体との薬学的組合せを記載する。上記の組み合わせはB細胞悪性腫瘍および炎症性疾患の治療において非常に有効である。

【選択図】 図 1

Figure 1/1

MOF103:

Variable Heavy Chain Peptide (CDRs are bold and underlined):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFETSSYWMH**WYVRQAPGKLEWVS**GIENKYAGGAI**
YYAASYKGRFTISRDNKNTLYLQWNSLR AEDTAVYYC**ARGFTDE**WGQGLTVTVSS

Variable Heavy Chain DNA:

CAGGTGCAGCTGGTCTGAGTCTGGCGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCGAGCCTGAGACT
 GAGCTGTGCCGCGCAGCGGCTTCACTTCAGCAGCTACTGGATGAAGTGGTGAGGCAGG
 QCCCTGGCAAGGGCCCTGGAGTGGGTGTCCGGGCATCGAGACAAGTATGCCGGCGAGGCC
 ACCTACTACGCCGCGAGCGTGAAGGGCCGTTCCACCATCAGCCGGGACACAGCAAGAA
 GACCGCTGTAGCTGCAGATGAACAGCGCTGAGGGCCGAGAGACCGCGGTGTAGTACTGTGC
 CAGGGGCTTCGGCACCGGATTCTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACAGTCAGCTCA

Variable Light Chain Peptide (CDRs are bold and underlined):

DIETQPPSVSVAPGQATARISC**SGDSIGKKYAY**WYQQKPGQAPLVLY**KKRPS**GIPIERFSGSNS
 ENATITLTISGTQAEADYYC**SAWGDKGM**VFGGGTKLTVLGG

Variable Heavy Chain DNA:

GACATCGAGCTGACCGAGCGCCCGAGCGGTGTCTGTGGCCCTGGCCAGAGCGCCCGGAT
 GAGCTGCTCGGGGACAGCATCGGCAGGAAGTADGCCTACTGGTATCAGCAGAGCCCG
 GCGAGGCCCGCGTGTGTGATCTACAAGAGCGGCCCGAGCGGCATCCCGAGCGGTTTC
 AGCGGCAGCAACAGCGCGCACACGCCACCTGACCATCAGCGGCACCCAGCGCGAGGA
 CGAGGCCGACTACTGTCTCGGCTGGGGCGACAGGCGCATGGTGTGGCGGGCGGAA
 CAAAGTTAACGTGTGTGGGCGAG

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

医薬における使用のための、CD20に特異的なモノクローナル抗体と、GM-CSFに特異的なモノクローナル抗体との相乗的組合せ。

【請求項 2】

医薬における使用がB細胞悪性腫瘍の治療である、請求項 1 記載の相乗的組合せ。

【請求項 3】

B細胞悪性腫瘍が、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、MALT（粘膜関連リンパ組織）リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、B細胞前リンパ球性白血病、B細胞リンパ腫（例えば種々の形態のホジキン病、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)）、白血病（例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL；B細胞慢性リンパ性白血病(BCLL)ともいう）、有毛細胞白血病および慢性筋原性(myoblastic)白血病）および骨髓腫（例えば多発性骨髓腫）から選択される、請求項 2 記載の相乗的組合せ。

10

【請求項 4】

医薬における使用が炎症性疾患の治療である、請求項 1 記載の相乗的組合せ。

【請求項 5】

炎症性疾患が、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、筋炎、多発性硬化症、視神経脊髄炎、アテローム性動脈硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス、腎炎、糸球体腎炎、自己免疫性肝胆汁性疾患、移植片対宿主病、アトピー性皮膚炎、喘息、神経変性疾患（例えばアルツハイマー病）、脱髄性多発神経根障害、神経障害性疼痛、アテローム性動脈硬化症、加齢性黄斑変性症、糖尿病性腎症、サルコイドーシスによるブドウ膜炎、または糖尿病から選択される、請求項 4 記載の相乗的組合せ。

20

【請求項 6】

CD20に特異的な抗体と、GM-CSFに特異的な抗体とを別個に投与する、請求項 1～5 のいずれか 1 項記載の相乗的組合せ。

【請求項 7】

CD20に特異的な抗体をGM-CSFに特異的な抗体より前に投与する、請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の相乗的組合せ。

30

【請求項 8】

GM-CSFに特異的な抗体をCD20に特異的な抗体より前に投与する、請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の相乗的組合せ。

【請求項 9】

GM-CSFに特異的な抗体とCD20に特異的な抗体とをほぼ同時に投与する、請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の相乗的組合せ。

【請求項 10】

CD20に特異的な抗体が以下のアミノ酸配列：

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRRMSSLVGPTQSFFMRESKT
LGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTWVYPLWGGIMYIISGSLLAATEK
NSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYIN
IYNCEPANPSEKNSPSTQYCYISQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKR
TCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEEE
TETNFPEPPQDQESSPIENDSSP.

40

を含むポリペプチドに結合する、請求項 1～9 のいずれか 1 項記載の相乗的組合せ。

【請求項 11】

CD20に特異的な抗体が、配列SYNMHのHCDR1領域、配列AIYPGNGDTSYNQKFKGのHCDR2領域、

50

配列STYYGGDWYFNVのHCDR3領域、配列RASSSVSYIHのLCDR1領域、配列ATSNLASのLCDR2領域、および配列QQWTSNPPTのLCDR3領域を含むCD20に特異的な抗体である、請求項10記載の相乗的組合せ。

【請求項12】

CD20に特異的な抗体が、配列SYNMHのHCDR1領域、配列AIYPGNGDTSYNQKFVKのHCDR2領域、配列STYYGGDWYFNVのHCDR3領域、配列RASSSVSYIHのLCDR1領域、配列ATSNLASのLCDR2領域、および配列QQWTSNPPTのLCDR3領域を含むCD20に特異的な抗体と交差競合する抗体である、請求項10記載の相乗的組合せ。

【請求項13】

GM-CSFに特異的な抗体が以下のアミノ酸配列：

10

MWLQSLLLLGTVACSIAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARRLLNLSRDTAEM
NETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS�TKLKGPLTMMASHYKQHCP
PTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE.

を含むポリペプチドに結合する、請求項1～12のいずれか1項記載の相乗的組合せ。

【請求項14】

GM-CSFに特異的な抗体が、配列GFTFSSYWMNのHCDR1領域、配列GIENKYAGGATYYAASVKGのHCDR2領域、配列GFGTDFのHCDR3領域、配列SGDSIGKKYAYのLCDR1領域、配列KKRPSのLCDR2領域、および配列SAWGDKGMのLCDR3領域を含むGM-CSFに特異的な抗体である、請求項10記載

20

の相乗的組合せ。

【請求項15】

GM-CSFに特異的な抗体が、配列GFTFSSYWMNのHCDR1領域、配列GIENKYAGGATYYAASVKGのHCDR2領域、配列GFGTDFのHCDR3領域、配列SGDSIGKKYAYのLCDR1領域、配列KKRPSのLCDR2領域、および配列SAWGDKGMのLCDR3領域を含むGM-CSFに特異的な抗体と交差競合する抗体である、請求項10記載の相乗的組合せ。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願への相互参照

30

本出願は、2011年7月6日に出願された米国仮出願第61/504,744号に基づく優先権を主張し、参照によりその全体を本明細書に組み入れる。

【0002】

発明の分野

本出願は、関節リウマチおよび多発性硬化症等の炎症性疾患、およびB細胞悪性腫瘍等の血液疾患の治療のための併用療法に関する。

【背景技術】

【0003】

CD20

CD20は全ての成熟B細胞の表面上に発現するグリコシル化リンタンパク質である。ヒトにおいては、CD20はMS4A1遺伝子によってコードされている。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。この発生のタンパク質ファミリーのメンバーは共通の構造的特徴と類似のイントロン/エクソンのスプライシング境界を特徴とし、造血細胞および非リンパ系組織内で独特の発現パターンを示す。この遺伝子はB細胞から形質細胞への発生および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、11q12にファミリーメンバーのクラスター内で局在する。この遺伝子の選択的スプライシングの結果、同じタンパク質をコードする2種の転写変異体が生じる。CD20は、最初と最後を除くB細胞の発生の全ての段階で発現する。それは後期のプロB細胞から記憶細胞まで存在するが、初期のプロB細胞または形質芽細胞(plasma blasts)および形質細胞上には存在しない。B細胞リンパ腫、有毛細胞白血病、B細胞慢性リ

40

50

ンパ性白血病、および黒色腫瘍幹細胞上に見出される。

【 0 0 0 4 】

CD20は数種のモノクローナル抗体 (mAb)、例えば全てのB細胞リンパ腫および白血病の治療における活性薬剤である、リツキシマブ (rituximab)、イブリツモマブ・チウキセタン (ibritumomab tiuxetan)、およびトシツモマブ (tositumomab) の標的である。抗CD20抗体のオフアツムマブ (ofatumumab) (Genmab) は2009年10月にFDAにより慢性リンパ性白血病に対して認可されている。更なる数多くの抗CD20抗体薬が開発され、または開発中であり、例えばAME-133v (Applied Molecular Evolution)、オクレリズマブ (ocrelizumab) (Roche, Biogen Idec)、TRU-015 (Trubion)、およびIMMU-106 (ベルツズマブ (veltuzumab); Immunomedics) が挙げられる。

10

【 0 0 0 5 】

抗体FMC7は、FMC7抗原としても知られるCD20のコンフォメーション変異体を認識すると思われる。

【 0 0 0 6 】

GM-CSF

GM-CSF (顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子) は、マクロファージ、T細胞、肥満細胞、内皮細胞、および繊維芽細胞によって分泌されるタンパク質である。GM-CSFは白血球増殖因子として機能するサイトカインである。GM-CSFは幹細胞を刺激して顆粒球 (好中球、好酸球、および好塩基球) および単球を産生する。単球は循環から抜け出して組織に移動し、そこでマクロファージに成熟する。すなわち、それは免疫 / 炎症カスケードの一部であり、このカスケードによって、少数のマクロファージの活性化から、感染と闘うために重要なプロセスであるその数の増加に速やかに到ることができる。このタンパク質の活性形態は単量体として細胞外に見出される。ヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子は成熟形態ではグリコシル化されている。GM-CSFは関節リウマチの関節部に多量に見出されており、GM-CSFをブロックすることで炎症または障害を低減することができる。

20

【 0 0 0 7 】

GM-CSFをブロックするためにいくつかの治療薬 (例えばMOR103)、例えば抗GM-CSF mAbであるMOR103 (MorphoSys) が開発されている。他の開発中の抗GM-CSF抗体治療薬としてはKB002およびKB003 (KaloBios) およびMT203 (Micromet and Nycomed) がある。他の会社、例えばMorphotek、Evec、Boehringer IngelheimおよびAmgenも同様に抗GM-CSF抗体を開発中か、既に開発している。

30

【 0 0 0 8 】

併用療法

抗CD20 mAbおよび抗GM-CSF mAbは個々に、または他の薬剤との併用療法で使用されているが、これらは疾患の治療において一緒に使用されたことはない。抗GM-CSF mAbは炎症性疾患の治療のために開発されている。抗CD20 mAbは主としてB細胞悪性腫瘍の治療のために使用されているが、関節リウマチのためにも使用されている。更に、抗CD20 mAbは多発性硬化症のための臨床試験において有望な結果を示している。にもかかわらず、上記の疾患および障害に罹患した患者にとって、新規かつ優れた治療がまだ緊急に必要とされている。いくつかの開示、例えばWO2010/115554、WO2000/027428、WO2000/047228およびWO2003/068821において、抗CD20 mAbとGM-CSFまたはGM-CSF由来のペプチドとの併用療法の可能性について大まかな言及がなされているが、抗GM-CSF mAbとの組合せを例示したものはない。

40

【 0 0 0 9 】

Sakagami等 (Am J Respir Crit Care Med (2010) 182, 49-61) は、抗GM-CSF自己抗体が健常な動物において肺胞タンパク症 (PAP) の分子的、細胞的、および組織学的特徴を再現できることを報告している。Sakagami等は生検によって証明されたPAP患者から単離したポリクローナルGM-CSF自己抗体を使用している。Sakagami等は抗GM-CSF抗体による治療を報告も示唆もしておらず、その反対に、そのような抗GM-CSF抗体が特定の疾患または症状、すなわちPAPを 引き起こしたり誘導したり することができるということを示してい

50

る。従って、Sakagami等は、抗GM-CSF抗体、特にいかなるモノクローナル抗GM-CSF抗体によるいかなる疾患の治療も開示していない。Sakagami等はまた、その論文で、そのような抗GM-CSF自己抗体の存在下、抗CD20によるB細胞の枯渇が強く増大し、B細胞の再構成が強く抑制されるという偶然見出した知見をも報告している。しかしながら、そのような知見を説明し得るメカニズムについての理論は現在存在しない。

【0010】

更に、抗CD20-抗GM-CSF併用療法の有用性を否定する報告がある。Kavuru等 (Eur Respir J. 2011 38:1361-7) およびVallerskog等 (Clin Immunol (2007) 122, 62-74) を参照されたい。これらの文献は、Kavuruが抗GM-CSF抗体の存在下で抗CD20 mAbを用いているにもかかわらず、抗CD20 mAbによる治療後に同様のB細胞枯渇レベルを示している。この知見から、抗GM-CSF抗体の存在がB細胞を枯渇させる抗CD20 mAbの有効性を増大させないことが示唆されている。Kavuru等は特発性肺胞タンパク症 (PAP) の患者において、抗CD20 mAbのリツキシマブによる治療後にB細胞が枯渇することを示している。PAPは抗GM-CSF抗体の存在を特徴とする。B細胞集団の回復は治療後約6カ月で観察された。Vallerskog等は全身性エリテマトーデス (SLE) 患者におけるリツキシマブ治療後のB細胞枯渇を研究している。彼らもやはり治療後約6カ月でのB細胞の回復を見出している。しかしながら、PAPとは異なり、SLE患者は抗GM-CSF自己抗体を特徴とはしない。従って、Kavuru等およびVallerskog等の研究から得られた同様の結果から、抗CD20抗体と抗GM-CSF抗体との組合せが、抗CD20 mAb単独と比較してB細胞の枯渇を増大させないことがむしろ示唆される。

10

20

【発明の概要】

【0011】

特定の態様において、本発明は、医薬における使用のための、CD20に特異的な抗体と、GM-CSFに特異的な抗体との相乗的組合せに関する。特定の好ましい態様において、CD20に特異的な抗体とGM-CSFに特異的な抗体とはモノクローナル抗体である。

【0012】

上記の相乗的組合せは、B細胞悪性腫瘍、例えば非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、MALT (粘膜関連リンパ組織) リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、B細胞前リンパ球性白血病、B細胞リンパ腫 (例えば種々の形態のホジキン病、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL))、白血病 (例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL))、慢性リンパ性白血病(CLL; B細胞慢性リンパ性白血病(BCLL)ともいう)、有毛細胞白血病および慢性筋原性(myoblastic)白血病)および骨髄腫 (例えば多発性骨髄腫) の治療に使用することができる。

30

【0013】

上記の相乗的組合せはまた、炎症性疾患、例えば潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、筋炎、多発性硬化症、視神経脊髄炎、アテローム性動脈硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス、腎炎、糸球体腎炎、自己免疫性胆汁性疾患、移植片対宿主病、アトピー性皮膚炎、喘息、神経変性疾患 (例えばアルツハイマー病)、脱髄性多発神経根障害、神経障害性疼痛、アテローム性動脈硬化症、加齢性黄斑変性症、糖尿病性腎症、サルコイドーシスによるブドウ膜炎、または糖尿病の治療に使用することもできる。

40

【0014】

特定の態様において、本発明の相乗的組合せの成分は別個に投与される。CD20に特異的な抗体は、GM-CSFに特異的な抗体より前に投与することができる。あるいはまた、GM-CSFに特異的な抗体は、CD20に特異的な抗体より前に投与することができる。特定の態様において、本発明の相乗的組合せの成分は、同時に、またはほぼ同時に投与される。

【0015】

CD20に特異的な抗体、例えばリツキシマブ (Rituximab)、イブリツモマブ (Ibritumomab)、トシツモマブ (Tositumomab)、ベキサール (Bexxar)、オフアツムマブ (Ofatumumab)、オクレリズマブ (Ocrelizumab)、BLX-301、ベルツズマブ (Veltuzumab)、DXL625、または本発明に言及され、もしくは当分野において公知のCD20に特異的な任意の他の

50

抗体を、本発明を実施するために使用することができる。同様に、GM-CSFに特異的な任意の抗体、例えばMOR103、またはWO2006111353、US20090297532、WO2007049472、US20080317757、WO2009064399、US20100122819、WO2003068920、US20040053365、WO2007092939、US20080292641、WO2008141391、US20100297135、WO2009038760、US 12/675,013、WO2009062238、US20100297135、WO2009134805、US20090274706、WO2010124163、US20100291075に開示された抗GM-CSF抗体のいずれか、または本発明に言及され、もしくは当分野において公知のGM-CSFに特異的な任意の他の抗体を、本発明を実施するために使用することができる。特定の態様において、GM-CSFに特異的な抗体は、配列GFTFSSYWMNのHCDR1領域、配列GIE NKYAGGATYYAASVKGのHCDR2領域、配列GFGTDFのHCDR3領域、配列SGDSIGKKYAYのLCDR1領域、配列KKRPSのLCDR2領域、および配列SAWGDKGMのLCDR3領域を含む。

10

【図面の簡単な説明】

【0016】

【図1】 MOR04357のアミノ酸配列およびDNA配列を示す。

【発明を実施するための形態】

【0017】

「相乗効果」、「相乗作用」または「相乗的」とは、組合せの予測される相加的效果を超えることを意味する。ある組合せの「相乗効果」、「相乗作用」または「相乗的」効果は、Chou等および/またはClarke等の方法によって決定される。Ting-Chao Chou, Theoretical Basis, Experimental Design, and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies, Pharmacol Rev 58:621-681 (2006) (参照によりその全体を組み入れる)を参照されたい。また、Clarke et al., Issues in experimental design and endpoint analysis in the study of experimental cytotoxic agents in vivo in breast cancer and other models, Breast Cancer Research and Treatment 46:255-278 (1997) (参照によりその全体を組み入れる)を参照されたい。

20

【0018】

用語「抗体」は、IgG、IgM、IgA、IgDおよびIgE等の任意のアイソタイプを含むモノクローナル抗体を意味する。IgG抗体は、ジスルフィド結合で結合された2つの同一の重鎖と2つの同一の軽鎖から構成される。それぞれの重鎖および軽鎖は定常領域と可変領域を含む。可変領域はそれぞれ「相補性決定領域」(「CDR」)または「超可変領域」と呼ばれる3つのセグメントを含み、これらが主として抗原のエピトープへの結合に関わっている。これらはN-末端から順に番号付けされて、CDR1、CDR2、およびCDR3と呼ばれている。CDRの外側にある可変領域のより高度に保存された部分は「フレームワーク領域」と呼ばれている。「抗体断片」とは、それぞれがCDRとフレームワーク領域とを含む、少なくとも1つの可変重鎖または可変軽鎖を含む、Fv、scFv、dsFv、Fab、Fab'、F(ab')₂断片、または他の断片を意味する。

30

【0019】

用語「モノクローナル」は、当分野において典型的に使用される意味、すなわちB細胞などの抗体産生細胞の単クローンから生じ、結合する抗原上の単一のエピトープを認識する抗体もしくは抗体断片を意味するものとして理解されるべきである。

【0020】

「VH」は抗体または抗体断片の免疫グロブリン重鎖の可変領域を指す。「VL」は抗体または抗体断片の免疫グロブリン軽鎖の可変領域を指す。

40

【0021】

本明細書において、「CDR」はChothia等またはKabat等によって定義されたものである。Chothia C, Lesk AM. (1987) Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. J Mol Biol., 196(4):901-17 (参照によりその全体を組み入れる)を参照されたい。また、Kabat E.A, Wu T.T., Perry H.M., Gottesman K.S.およびFoeller C. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. 5th edit., NIH Publication no. 91-3242, US Dept. of Health and Human Services, Washington, DC (参照によりその全体を組み入れる)を参照されたい。

50

【 0 0 2 2 】

用語「GM-CSF」および「GMCSF」は、GM-CSFまたは顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子として知られるタンパク質をいい、以下の同義語を有する：コロニー刺激因子2、CSF2、GMCSF、GM-CSF、顆粒球 - マクロファージコロニー刺激因子、MGC131935、MGC138897、Molgramostin、Sargramostim。ヒトGM-CSFは(UniProt P04141)のアミノ酸配列を有する：

MWLQSLLLLGTVACISAPARSPSPSTQPWEHVNAIQEARLLNLSRDTAAEM
NETVEVISEMFDLQEPTCLQTRLELYKQGLRGS�TKLKGPLTMMASHYKQHCP
PTPETSCATQIITFESFKENLKDFLLVIPFDCWEPVQE

10

【 0 0 2 3 】

「MOR103」は、図1にアミノ酸配列およびDNA配列を示す抗GM-CSF抗体である。「MOR103」および「MOR04357」および「MOR4357」が図1に示す抗体を記載する同義語として使用される。MOR04357は、配列GFTFSSYWMNのHCDR1領域、配列GIENKYAGGATYYAASVKGのHCDR2領域、配列GFGTDFのHCDR3領域、配列SGDSIGKKYAYのLCDR1領域、配列KKRPSのLCDR2領域、および配列SAWGDKGMのLCDR3領域を含む。MOR04357は配列：

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKYA
GGATYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLV
TVSS

20

の可変重鎖と、配列：

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERF
SGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ.

の可変軽鎖とを含む。

【 0 0 2 4 】

特定の実施形態において、GM-CSFに特異的な抗体は、配列GFTFSSYWMNのHCDR1領域、配列GIENKYAGGATYYAASVKGのHCDR2領域、配列GFGTDFのHCDR3領域、配列SGDSIGKKYAYのLCDR1領域、配列KKRPSのLCDR2領域、および配列SAWGDKGMのLCDR3領域を含むGM-CSFに特異的な抗体と交差競合する抗体である。

30

【 0 0 2 5 】

特定の実施形態において、GM-CSFに特異的な抗体は、配列GFTFSSYWMNのHCDR1領域、配列GIENKYAGGATYYAASVKGのHCDR2領域、配列GFGTDFのHCDR3領域、配列SGDSIGKKYAYのLCDR1領域、配列KKRPSのLCDR2領域、および配列SAWGDKGMのLCDR3領域を含むGM-CSFに特異的な抗体と同じエピトープに結合する抗体である。

【 0 0 2 6 】

特定の実施形態において、本発明は、CD20に特異的な抗体と、GM-CSFに特異的な抗体との相乗的組合せを提供し、ここで、GM-CSFに特異的な抗体は、配列GFTFSSYWMNのHCDR1領域、配列GIENKYAGGATYYAASVKGのHCDR2領域、配列GFGTDFのHCDR3領域、配列SGDSIGKKYAYのLCDR1領域、配列KKRPSのLCDR2領域、および配列SAWGDKGMのLCDR3領域を含む。

40

【 0 0 2 7 】

特定の実施形態において、本発明は、CD20に特異的な抗体と、GM-CSFに特異的な抗体との相乗的組合せを提供し、ここで、GM-CSFに特異的な抗体は、配列：

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYWMNWVRQAPGKGLEWVSGIENKYA
GGATYYAASVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGFGTDFWGQGTLV
TVSS

50

の可変重鎖と、配列：

DIELTQPPSVSVAPGQTARISCSGDSIGKKYAYWYQQKPGQAPVLVIYKKRPSGIPERF
SGSNSGNTATLTISGTQAEDEADYYCSAWGDKGMVFGGGTKLTVLGQ.

の可変軽鎖とを含む。

【 0 0 2 8 】

GM-CSFに特異的な抗体としては、Micromet（現在はAmgen）によって開発されたGM-CSFに対する完全ヒトIgG1であるナミルマブ（namilumab）（MT-203）、Morphotek（Eisai）によって開発されたGM-CSFを標的とする完全ヒトmAbであるMORAb-022、およびヒトIgG記憶B細胞由来のGM-CSF抗体（Theraclone Sciences、以前はSpaltudaq）が挙げられる。GM-CSFに特異的な他の抗体は、WO2006111353（U.S. 11/918,368、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（Micromet）、WO2007049472（U.S. 12/149,009、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（Evec）、WO2009064399（U.S. 12/681,396、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（Evec, Boehringer Ingelheim）、WO2003068920（U.S. 10/365,123、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（Ludwig Institute for Cancer Research）、WO2007092939（U.S. 11/672,902、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（Morphotek）、WO2008141391（U.S. 12/601,514、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（CRC for Asthma and Airways）、WO2009038760（U.S. 12/675,013、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（Amgen）、WO2009062238（U.S. 12/742,467、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（CRC for Asthma and Airways）、WO2009134805（U.S. 12/431,661、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（Kalobios）およびWO2010124163（U.S. 12/766,444、参照により本明細書に明示的に組み入れる）（Theraclone）に記載されている。上記の特許および特許出願に開示された全ての抗体を本発明において使用することができる。

【 0 0 2 9 】

上記の特許に開示された抗体のいくつかは、リストの形式で併用療法についても大まかに言及している。しかしながら、抗GM-CSF抗体との併用療法についてはいずれも開示していない。GM-CSFに対して特異的な抗体とIL17アンタゴニストとの特定の併用療法が、WO 2009/133103（Micromet）に開示されている。

【 0 0 3 0 】

用語「CD20」は、CD20またはMS4A1として知られるタンパク質をいい、以下の同義語を有する：B1、Bリンパ球抗原CD20、Bリンパ球表面抗原B1、Bp35、CD20、CVID5、LEU-16、白血球表面抗原Leu-16、膜貫通型4-ドメインサブファミリーAメンバー1、MGC3969、MS4A2、S7。ヒトCD20は（UniProt P011836）のアミノ酸配列を有する：

MTTPRNSVNGTFPAEPMKGPIAMQSGPKPLFRMSSLVGPTQSFFMRESKT
LGAVQIMNGLFHIALGGLLMIPAGIYAPICVTWVYPLWGGIMYIISGSLLAATEK
NSRKCLVKGKMIMNSLSLFAAISGMILSIMDILNIKISHFLKMESLNFIRAHTPYIN
YINCEPANPSEKNSPSTQYCYISQSLFLGILSVMLIFAFFQELVIAGIVENEWKR
TCSRPKSNIVLLSAEEKKEQTIEIKEEVVGLTETSSQPKNEEDIEIPIQEEEEEE
TETNFPEPPQDQESSPIENDSSP

【 0 0 3 1 】

CD20抗原に特異的な抗体の例としては、以下のものが挙げられる：CD20を標的とするキメラpan-B抗体である、現在は「リツキシマブ（Rituximab）」（「リツキサン（RITUXAN（登録商標）」））と呼ばれる「C2B8」（米国特許第5,736,137号、参照により本明細書に明示的に組み入れる）；イットリウム-[90]にキレートさせるためにMX-DTPAに共有結合させたマウスIgG1 mAbである、「Y2B8」もしくは「イブリツモマブ・チウキセタン（Ibritumomab Tiuxetan）」 ZEVALIN（登録商標）と命名されたイットリウム-[90]-標識2B8マウス

抗体（米国特許第5,736,137号、参照により本明細書に明示的に組み入れる）；「トシツモマブ（Tositumomab）」とも呼ばれるマウスIgG2a「B1」（場合により放射性¹³¹Iで標識されて「¹³¹I-B1」抗体となる）（ヨウ素¹³¹ トシツモマブ、ベキサール（BEXXAR（商標）））（米国特許第5,595,721号、参照により本明細書に明示的に組み入れる）；マウスモノクローナル抗体「1F5」（Press等、Blood 69（2）:584-591（1987）および「フレームワークパッチ（framework patched）」もしくはヒト化1F5等のその変異体（WO03/002607, Leung, S.; ATCC登録番号 HB-96450）；マウス2H7およびキメラ2H7抗体（米国特許第5,677,180, 参照により本明細書に明示的に組み入れる）；オクレリズマブ（ocrelizumab）（PRO-70769）としても知られるヒト化2H7；CD20 huMax-CD20上の新規エピトープに対する完全ヒトIgG 1であるオフアツムマブ（Ofatumumab）（Arzerra）（Genmab, Denmark; WO2004/035607（U.S. 10/687,799, 参照により本明細書に明示的に組み入れる））；CD20に対する完全ヒト化および最適化IgG1 mAbであるAME-133（オカラツズマブ（ocaratumumab）；Applied Molecular Evolution）；A20抗体またはキメラもしくはヒト化A20抗体（それぞれcA20, hA20）等のその変異体（U.S. 10/366,709, 参照により本明細書に明示的に組み入れる, Immunomedics）；およびInternational Leukocyte Typing Workshopから入手可能なモノクローナル抗体L27、G28-2、93-1B3、B-CIもしくはNU-B2（Valentine等、Leukocyte Typing III（McMichael, Ed., p. 440, Oxford University Press（1987））。更に、好適な抗体として、例えばBiogen Idec/Genentech/Rocheの第三世代のヒト化抗-CD20-抗体である抗体GA101（オビヌツズマブ（obinutuzumab））が挙げられる。更に、Biolex TherapeuticsのBLX-301、最適化されたグリコシル化を有するヒト化抗CD20もしくはベルツズマブ（Veltuzumab）（hA20）、Immunomedicsの第二世代のヒト化抗-CD20抗体もしくはDXL625、ベルツズマブの誘導体、例えばベルツズマブの2価抗-CD20 IgGおよびミラツズマブ（milatuzumab）由来のFabの安定化二量体対から構成されるIBC Pharmaceuticals（Immunomedics）の二重特異性6価抗体、InNexus社のダイナミック架橋技術（InNexus' Dynamic Cross Linking technology）で強化されたInexus Biotechnologyの抗-CD20 mAb（いずれもヒト化抗-CD20抗体）が好適である。更なる好適な抗体は、BM-ca（ヒト化抗-CD20抗体（Int J Oncol. 2011 Feb;38（2）:335-44））、C2H7（キメラ抗-CD20抗体（Mol Immunol. 2008 May;45（10）:2861-8））、PR 0131921（Genentechによって開発された第三世代の抗-CD20抗体）、Reditux（Dr Reddy'sによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品（biosimilar version））、PBO-326（Probiomedによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、Zenotechによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、TL-011（Tevaによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、CMAB304（Shanghai CP Guojianによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、GP-2013（Sandoz（Novartis）によって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、SAIT-101（Samsung BioLogicsによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、Intas Biopharmaceuticalsによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、CT-P10（Celltrionによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、Biocadによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、ウブリツキシマブ（Ublituximab）（LFB-R603、GTC Biotherapeutics（LFB Biotechnologies）によって開発されたCD20を標的とするトランスジェニックにより作製されたmAb）、PF-05280586（Pfizerによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品と推測される）、Lymphomun（Bi-20, Trion Pharmaによって開発された三官能性（trifunctional）抗-CD20および抗-CD3抗体）、Natco Pharmaによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、iBioによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、Gedeon Richter/Stadaによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、Curaxysによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、Coherus Biosciences/Daiichi Sankyoによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、BioXpressによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品、BT-D004（Protheonによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、AP-052（Aprogenによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、BioXpressによって開発されたオフアツムマブ（ofatumumab）のバイオ後続品、MG-1106（Green Crossによって開発されたリツキシマブのバイオ後続品）、IBI-301（Innovent Biologicsによって開発されたCD20に対するヒト化モノクローナル抗体）、BVX-20（Vaccinexによって開発されたCD20に対するヒト化mAb）、20-C2

-2b (Immunomedicsによって開発されたCD20およびヒト白血球抗原-DR (HLA-DR)を標的とする二重特異性mAb-IFN)、MEDI-552 (MedImmune/AstraZenecaによって開発)、NeoRx (現在はPoniard Pharmaceuticals)によって開発された抗-CD20/ストレプトアビジンコンジュゲート、Favril (現在はMMRGlobal)によって開発された第二世代の抗-CD20ヒト抗体、TRU-015, Trubion/Emergent BioSolutionsによって開発された抗-CD20抗体断片、並びに種々の会社および機関 (entity) による他の前臨床的アプローチである。上記の公表物、参考文献、特許および特許出願全てを参照によりその全体を組み入れる。そこに開示された全ての抗体を本発明において使用することができる。

【 0 0 3 2 】

本発明の特定の好ましい実施形態において、CD20に特異的な抗体はリツキサン (rituxan) である。リツキサンは、配列SYNMHのHCDR1領域、配列AIYPGNGDTSYNQKFKGのHCDR2領域、配列STYYGGDWYFNVのHCDR3領域、配列RASSSVSYIHのLCDR1領域、配列ATSNLASのLCDR2領域、および配列QQWTSNPPTのLCDR3領域を含む。リツキサンは、配列：

QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFT**SYNMH**WVKQTPGRGLEW
GAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR
STYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSAASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG
 CLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL
 GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFP

PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE
 QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
 PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 GK,

の可変重鎖と、配列：

QIVLSQSPAILSASPGEKVTMT**CRASSSVSYI**HWFQQKPGSSPKPWIY**ATSNL**
ASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEI
 KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNFFYPREAKVQWKVDNALQSGN
 SQESVTEQDSKDSTYSLSSLTTLTKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
 GEC.

の可変軽鎖とを含む。

【 0 0 3 3 】

特定の実施形態において、CD20に特異的な抗体は、配列SYNMHのHCDR1領域、配列AIYPGNGDTSYNQKFKGのHCDR2領域、配列STYYGGDWYFNVのHCDR3領域、配列RASSSVSYIHのLCDR1領域、配列ATSNLASのLCDR2領域、および配列QQWTSNPPTのLCDR3領域を含むCD20に特異的な抗体と交差競合する抗体である。

【 0 0 3 4 】

特定の実施形態において、CD20に特異的な抗体は、配列SYNMHのHCDR1領域、配列AIYPGNGDTSYNQKFKGのHCDR2領域、配列STYYGGDWYFNVのHCDR3領域、配列RASSSVSYIHのLCDR1領域、配列ATSNLASのLCDR2領域、および配列QQWTSNPPTのLCDR3領域を含むCD20に特異的な抗体と同じエピトープに結合する抗体である。

【 0 0 3 5 】

「組合せ」とは、2以上の要素 (item)、例えばCD20に特異的な抗体およびGM-CSFに特異的な抗体等の化合物を意味する。

10

20

30

40

50

【0036】

本開示はまた、上記の組合せを含む組合せ、医薬、および医薬組成物に関する。本発明の相乗的組合せの2つの成分、すなわちCD20に特異的な抗体とGM-CSFに特異的な抗体とは、一緒に、または別個に投与することができる。一緒に投与する場合、2つの成分は、製薬上許容される担体または賦形剤を含み得る1つの医薬組成物中に一緒に製剤化されていても良い。あるいはまた、2つの成分は、異なる医薬組成物中に製剤化されていても良い。従って、本発明の特定の実施形態において、CD20に特異的な抗体とGM-CSFに特異的な抗体とを含む相乗的組合せは、別個に投与される。この場合、2つの成分は同時に、または続いて投与することができる。

【0037】

本発明の特定の好ましい実施形態において、CD20に特異的な抗体はモノクローナル抗体である。本発明の他の好ましい実施形態において、GM-CSFに特異的な抗体はモノクローナル抗体である。本発明の最も好ましい実施形態において、CD20に特異的な抗体およびGM-CSFに特異的な抗体はモノクローナル抗体である。

【0038】

本発明の特定の実施形態において、本発明の相乗的組合せはCD20に特異的な抗体を含み、このCD20に特異的な抗体は、リツキシマブ、イブリツモマブ、トシツモマブ、ベキサール、オフアツムマブ、オクレリズマブ、BLX-301、ベルツズマブおよびDXL625から選択される。好ましい実施形態において、CD20に特異的な抗体はリツキサンである。

【0039】

本発明の特定の実施形態において、本発明の相乗的組合せはGM-CSFに特異的な抗体を含み、ここでGM-CSFに特異的な抗体は、MOR103、またはWO2006111353、WO2007049472、WO2009064399、WO2003068920、WO2007092939、WO2008141391、WO2009038760、WO2009062238、WO2009134805またはWO2010124163に開示された抗GM-CSF抗体のいずれかから選択される。

【0040】

本発明の特定の実施形態において、CD20に特異的な抗体は、GM-CSFに特異的な抗体よりも前に投与される。本発明の他の実施形態において、GM-CSFに特異的な抗体は、CD20に特異的な抗体よりも前に投与される。

【0041】

本発明の更に他の実施形態において、GM-CSFに特異的な抗体とCD20に特異的な抗体とは同時に投与される。この文脈において、用語「同時に」とは、2つの組成物がほぼ同時に、すなわち同時か、または互いの直後に投与される（例えば第1の抗体を含む一方の注射を第2の抗体を含む第2の注射の直前に投与する）状況を指す。

【0042】

医薬組成物は、活性剤、例えばヒトにおける治療的用途のための抗体、を含む。医薬組成物は、許容される担体または賦形剤を含み得る。

【0043】

「投与される」または「投与」としては、限定するものではないが、注入可能な形態、例えば静脈内、筋肉内、皮内もしくは皮下経路、または粘膜経路、例えば鼻スプレーもしくは吸入用エアゾールによる送達、または摂取可能な溶液、カプセルもしくは錠剤としての送達が挙げられる。

【0044】

化合物または組合せの「治療的有効量」とは、所定の疾患もしくは障害およびその合併症の臨床徴候を治療、軽減または部分的に停止させるのに十分な量をいう。特定の治療目的のために有効な量は、疾患または障害の重症度、並びに被験者の体重および全身状態に依存するであろう。適切な投与量の決定は、慣例の実験により、数値のマトリクスを構築し、マトリクスの種々の点を試験することによって達成することができ、それらは全て熟練した医師または臨床科学者の通常の技術範囲内のものであることが理解されるであろう。

【0045】

10

20

30

40

50

「B細胞悪性腫瘍」とは、B細胞の任意の型の白血病またはリンパ腫を含む。B細胞悪性腫瘍としては、限定するものではないが、以下のものが挙げられる：非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、MALT（粘膜関連リンパ組織）リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、B細胞前リンパ球性白血病、B細胞リンパ腫（例えば種々の形態のホジキン病、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)および関連リンパ腫(例えばヴァルデンストレームマクログロブリン血症(リンパ形質細胞性リンパ腫もしくは免疫細胞腫とも呼ばれる)または中枢神経系リンパ腫))、白血病(例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL；B細胞慢性リンパ性白血病(BCLL)ともいう)、有毛細胞白血病および慢性筋原性(myoblastic)白血病)および骨髄腫（例えば多発性骨髄腫）。
更なるB細胞悪性腫瘍としては、小リンパ球性リンパ腫、B細胞前リンパ球性白血病、リンパ形質細胞性リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、形質細胞性骨髄腫、孤立性骨形質細胞腫、骨外性形質細胞腫、粘膜関連（MALT）リンパ組織の節外性辺縁帯B細胞リンパ腫、節性辺縁帯B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、縦隔（胸腺）大細胞型B細胞リンパ腫、血管内大細胞型B細胞リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、バーキットリンパ腫/白血病、境界型リンパ腫、悪性度不明のB細胞増殖、リンパ腫様肉芽腫症、および移植後のリンパ増殖性疾患が挙げられる。

10

20

30

40

50

【0046】

本発明の特定の実施形態において、本発明の相乗的組合せは、B細胞悪性腫瘍の治療に使用される。他の実施形態において、B細胞悪性腫瘍は、非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、原発性滲出液リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、MALT（粘膜関連リンパ組織）リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、B細胞前リンパ球性白血病、B細胞リンパ腫（例えば種々の形態のホジキン病、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)）、白血病(例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL；B細胞慢性リンパ性白血病(BCLL)ともいう)、有毛細胞白血病および慢性筋原性(myoblastic)白血病)および骨髄腫（例えば多発性骨髄腫）から選択される。

【0047】

本明細書で使用する「炎症性疾患」とは、免疫系が異常に活性化された任意の疾患、障害、又は状態をいう。炎症性疾患は、例えば潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、筋炎、多発性硬化症、視神経脊髄炎、アテローム性動脈硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス（例えば中枢神経系のループス(lupus)もしくはループス腎炎）、腎炎、糸球体腎炎、自己免疫性胆汁性疾患（例えば自己免疫性肝炎、原発性胆汁性肝硬変、もしくは原発性硬化性胆管炎）、移植片対宿主病、アトピー性皮膚炎、喘息、神経変性疾患（例えばアルツハイマー病）、脱髄性多発神経根障害（例えばギラン・バレー症候群もしくは慢性炎症性脱髄性多発神経根障害）、神経障害性疼痛、癌による臓痛、アテローム性動脈硬化症、加齢性黄斑変性症、糖尿病性腎症、サルコイドーシスによるブドウ膜炎、または糖尿病であり得る。

【0048】

本発明の特定の実施形態において、本発明の相乗的組合せは炎症性疾患の治療に使用される。他の実施形態において、炎症性疾患は、潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、筋炎、多発性硬化症、視神経脊髄炎、アテローム性動脈硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス、腎炎、糸球体腎炎、自己免疫性胆汁性疾患、移植片対宿主病、アトピー性皮膚炎、喘息、神経変性疾患（例えばアルツハイマー病）、脱髄性多発神経根障害、神経障害性疼痛、アテローム性動脈硬化症、加齢性黄斑変性症、糖尿病性腎症、サルコイドーシスによるブドウ膜炎、または糖尿病から選択される。

【0049】

特定の実施形態において、本発明は、CD20に特異的な抗体とGM-CSFに特異的な抗体との相乗的組合せで患者を治療する方法を提供する。特定の実施形態において、患者の治療はB細胞悪性腫瘍、例えば非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、小リンパ球性リンパ

腫、原発性滲出液リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、MA LT（粘膜関連リンパ組織）リンパ腫、有毛細胞白血病、慢性リンパ球性白血病、B細胞前リンパ球性白血病、B細胞リンパ腫（例えば種々の形態のホジキン病、B細胞非ホジキンリンパ腫(NHL)）、白血病（例えば急性リンパ芽球性白血病(ALL)、慢性リンパ性白血病(CLL; B細胞慢性リンパ性白血病(BCLL)ともいう)、有毛細胞白血病および慢性筋原性(myoblastic)白血病）および骨髄腫（例えば多発性骨髄腫）から選択されるB細胞悪性腫瘍の治療である。他の実施形態において、患者の治療は炎症性疾患、例えば潰瘍性大腸炎、クローン病、炎症性腸疾患、関節リウマチ、筋炎、多発性硬化症、視神経脊髄炎、アテローム性動脈硬化症、乾癬、全身性エリテマトーデス、腎炎、糸球体腎炎、自己免疫性胆汁性疾患、移植片対宿主病、アトピー性皮膚炎、喘息、神経変性疾患（例えばアルツハイマー病）、脱髄性多発神経根障害、神経障害性疼痛、アテローム性動脈硬化症、加齢性黄斑変性症、糖尿病性腎症、サルコイドーシスによるブドウ膜炎、または糖尿病から選択される炎症性疾患の治療である。

10

20

30

40

50

【0050】

in vitroおよびin vivoのモデルは、特定の化合物または化合物の組合せがヒトの体内でどのように作用するのかを予測するものと考えられる。そこで、CD20に特異的な抗体とGM-CSFに特異的な抗体との組合せを関連モデルで試験する。化合物をin vitroまたはin vivoで組み合わせた場合、組合せが相加的効果のみを有することが予想される。本発明者等は、予想外にも、CD20に特異的な抗体とGM-CSFに特異的な抗体との組合せが相乗作用を示すことを見出した。この2つの抗体の組合せは、それぞれの抗体単独の個々の活性よりも有意に強く、またこの組合せで予測される活性の計算値よりも有意に強いものである。この組合せの相乗効果は、この相乗的組合せが臨床的に使用される全ての疾患および障害の治療において有用であろう。これには上記の適応症、すなわちB細胞悪性腫瘍および炎症性疾患が含まれる。

【実施例1】

【0051】

GM-CSF欠損(GM-CSF^{-/-})マウスの作製

GM-CSF^{-/-}マウスの作製は、Stanley等(1994)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:5592に記載されている。簡潔に説明すれば、GM-CSF遺伝子が破壊された129/OLA由来ES細胞(H-2b)をC57BL/6(H-2b)宿主胚盤胞にマイクロインジェクションすることによってキメラマウスを作製した。変異したGM-CSFアレルの生殖系列伝達物質をC57BL/6マウスと11世代にわたって交配させてGM-CSF^{+/-}マウスを得、これを異種交配して実験に用いるGM-CSF^{-/-}、GM-CSF^{+/-}、およびGM-CSF^{+/+}マウスを取得した。GM-CSF遺伝子型の状態は尾のDNAのPCR解析によって決定した。動物には標準的なげっ歯類用の食餌と水を自由に与え、おがくずを敷いたケージで同性の同腹子と一緒に飼育した。双方の性別のマウスを8~15週齢で実験に使用した。

【実施例2】

【0052】

in vivo実験：GM-CSF^{-/-}マウスにおけるB細胞枯渇

この実験では、GM-CSF^{-/-}ノックアウトマウスにおけるB細胞枯渇に対する抗CD20抗体の影響を実証する。GM-CSF^{-/-}ノックアウトマウスと野生型株の対照マウスとを、250 μg (i.p)の抗マウスCD20 IgG2a抗体(クローン18B12; US 20070136826を参照されたい)の週用量で3回(3 weekly doses)処置する。

【0053】

抗CD20抗体で処置した後の様々な時点で双方のマウスの末梢血および脾臓から得られるB細胞集団を回収し、CD22およびCD19陽性についてフローサイトメトリーでモニタリングする。いずれのマウスにおいても末梢血および脾臓においてB細胞は枯渇するが、いずれの場合も、野生型C57BL/6対照マウスと比較してGM-CSF^{-/-}マウスでは有意により長期間B細胞の枯渇が持続する。

【0054】

このことから、GM-CSFとCD20の双方の組合せ枯渇によって、統計的に有意な延長されたB細胞枯渇が得られる。

【実施例3】

【0055】

in vivo実験：B細胞リンパ腫モデルにおけるB細胞枯渇

5×10⁶個のCD20陽性マウスBリンパ腫細胞（BL3750；Minard-Colin等（Blood(2008) 112, 1205-13）に記載されたように単離する）を免疫応答性同系C57BL/6マウスの腹部に皮下（s.c.）接種する。次いでマウスを4つの異なる処置群（1群10-15匹のマウス）に分け、腫瘍接種3日後に処置する：

1群：対照群；アイソタイプ対照抗体（マウスIgG2a）

2群：抗マウスCD20抗体（マウスIgG2a；クローン18B12）

3群：抗マウスGM-CSF抗体（ラットIgG2a；クローン22E9）

4群：抗マウスCD20クローン18B12および抗マウスGM-CSF抗体クローン22E9

次いでマウスを指示された抗体で処置する（毎週250μg/用量）。抗マウスCD20抗体、例えばマウスCD20と交差反応する任意のCD20抗体を使用して、抗体のエフェクター機能を介してB細胞の枯渇に到らせる。ここで、例示的な抗マウスGM-CSF抗体として、我々はIgG2aアイソタイプのラット抗マウスGM-CSF特異的抗体である22E9を使用する。22E9はAbD Serotec（Martinsried, Germany; Cat.No.1023501）から購入する。別の供給業者、例えばeBioscience（San Diego, CA, USA, Cat.No.14-7331）が存在する。

【0056】

双方の抗体で処置されたマウス、すなわち4群のマウスは、他の処置群と比較して、腫瘍増殖の統計的に有意な遅延、および生存時間の増大を示す。このことから、抗CD20 - 抗GM-CSFの組合せ療法が、それぞれの単独療法のいずれよりも高くかつ有意により有効であることが実証される。

【実施例4】

【0057】

in vivo実験：カニクイザルにおけるB細胞枯渇

全てのカニクイザルを抗CD20ヒトIgG1抗体（リツキシマブ）の静注（i.v.）での2回の連続投与（1日目に10μg/kgおよび3日目に1000μg/kg）で処置する。処置群1の動物には更に1日目にヒトIgG1抗GM-CSF中和抗体（MOR103；5000μg/kg i.v.）を同時投与し、対照群2には同じ注射量の生理食塩水を投与する。

【0058】

双方の群のカニクイザルのB細胞集団を処置後の様々な時点で回収し、フローサイトメトリーでモニタリングする。この目的で大腿静脈から静脈血サンプルを採取した。B細胞の計数はFACSによって測定した。リンパ球を光散乱によって特定・ゲーティングして、リンパ球ゲート中のCD19陽性B細胞の頻度変化を測定した。

【0059】

双方の処置群でB細胞は枯渇するが、抗CD20抗体単独で処置した群と比較して、双方の抗体、すなわち抗CD20抗体および抗GM-CSF抗体で処置したカニクイザルの群で有意により長期間B細胞の枯渇が持続する。

【0060】

このことから、GM-CSFおよびCD20の双方の組合せ枯渇によって、統計的に有意な延長されたB細胞の枯渇が得られる。

【実施例5】

【0061】

Elisaに基づく交差競合アッセイ

抗CD20抗体または別のCD20結合剤の交差競合は、以下の標準的な方法に従ってELISAアッセイを用いて検出することができる。同様に、抗GM-CSF抗体または別のGM-CSF結合剤の交差競合を検出することができる。

【0062】

ELISAアッセイの一般的な原理は、ELISAプレートのウェル上に抗CD20（または抗GM-CSF）抗体を被覆することを含む。次いで、過剰量の第2の交差競合の可能性のある抗CD20（または抗GM-CSF）抗体を溶液中に添加する（すなわちELISAプレートに結合しない）。続いて、限られた量のCD20-Fc（またはGM-CSF-Fc）をウェルに添加する。

【0063】

ウェルに被覆される抗体と溶液中の抗体とは、限られた量のCD20（またはGM-CSF）分子の結合について競合するであろう。次いでプレートを洗浄して被覆された抗体に結合していないCD20（GM-CSF）分子を除去し、また第2の、溶液相の抗体、並びに、第2の溶液相の抗体とCD20（GM-CSF）とで形成される任意の複合体も除去する。次いで結合したCD20（GM-CSF）の量を、適切なCD20（GM-CSF）検出試薬を用いて測定する。従って、CD20（GM-CSF）を、例えばFc、Flag等のタグと融合させ、これを適切なタグ特異的抗体を介して検出することができる。

10

【0064】

被覆された抗体と交差競合する溶液中の抗体は、第2の溶液相の抗体の非存在下で被覆抗体が結合できるCD20（GM-CSF）分子の数と比較して、被覆抗体が結合できるCD20（GM-CSF）分子の数の減少を生じさせることができるであろう。

【0065】

このアッセイを、Ab-XおよびAb-Yと呼ぶ2つの抗体について以下により詳細に更に記載する。Ab-Xを固定化する抗体として選択する場合、これをELISAプレートのウェル上に被覆し、その後、プレートを好適なブロッキング溶液でブロックして、その後に添加される試薬の非特異的結合を最小限にする。次いで過剰量のAb-Yを、ウェルあたりのAb-Y CD20（GM-CSF）結合部位モル数がELISAプレートの被覆中に使用されるウェルあたりのAb-X CD20（GM-CSF）結合部位モル数よりも少なくとも10倍高くなるようにELISAプレートに添加する。次いでCD20（GM-CSF）を、ウェルあたりに添加されるCD20（GM-CSF）のモル数が、各ウェルを被覆するために使用されるAb-X CD20（GM-CSF）結合部位のモル数よりも少なくとも25倍低くなるように添加する。好適なインキュベーション時間の後、ELISAプレートを洗浄し、CD20（GM-CSF）検出試薬を添加して、被覆された抗CD20（GM-CSF）抗体（この場合Ab-X）によって特異的に結合されたCD20（GM-CSF）分子の量を測定する。アッセイのバックグラウンドシグナルを、被覆抗体（この場合Ab-X）、第2の溶液相の抗体（この場合Ab-Y）、バッファー単独（すなわちCD20（GM-CSF）なし）およびCD20（GM-CSF）検出試薬を有するウェルで得られるシグナルとして定義する。アッセイの陽性対照シグナルは、被覆抗体（この場合Ab-X）、第2の溶液相抗体バッファー単独（すなわち第2の溶液相抗体なし）、CD20（GM-CSF）およびCD20（GM-CSF）検出試薬を有するウェルで得られるシグナルとして定義する。ELISAアッセイは、陽性対照シグナルがバックグラウンドシグナルの少なくとも6倍となるようにして行う必要がある。

20

30

【0066】

被覆抗体として使用する抗体、および第2（競合）抗体として使用する抗体の選択によって生じる人為的な結果（例えばCD20（GM-CSF）に対するAb-XとAb-Yとの有意に異なる親和性）を避けるために、以下の2つのフォーマットで交差ブロッキングアッセイを実施する必要がある：1）フォーマット1はAb-XがELISAプレート上に被覆される抗体であり、Ab-Yが溶液中の競合抗体であるもの；2）フォーマット2はAb-YがELISAプレート上に被覆される抗体であり、Ab-Xが溶液中の競合抗体であるもの。

40

【 図 1 】

MOR103:

可変重鎖ペプチド(CDRを太字と下線で示す):

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSYWMN**WVRQAPGKLEWWS**GIENKYAGGAT**
YYAASVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARGFTDE**WGQGLTVTVSS

可変重鎖DNA:

CAGGTGCAGCTGGTCTGAGTCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGCAGCCTGAGACT
GAGCTGTGCCGCCAGCGGCTTCACCTTCAGCAGCTACTGGATGAACTGGGTGAGGCAGG
CCCTTGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGTCCGGCATCGAGAACAAGTATGCCGGCGGAGCC
ACCTACTACGCCGCCAGCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCAGCCGGGACAACAGCAAGAA
CACCTGTACTGTCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGC
CAGGGGCTTCGGCACCGATTCTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACAGTCAGCTCA

可変軽鎖ペプチド(CDRを太字と下線で示す):

DIELTQPPSVSVAPGQTARISC**SGDSIGKKYAY**WYQQKPGQAPVLVIY**KKRPS**GIPERFSGSNS
GNTATLTISGTQAEDEADYYC**SAWGDKGMV**FGGGTKLTVLGQ

可変軽鎖DNA:

GACATCGAGCTGACCCAGCCCCCAGCGTGTCTGTGGCCCTGGCCAGACCGCCCGGAT
CAGCTGCTCCGGCGACAGCATCGGCAAGAAGTACGCCTACTGGTATCAGCAGAAGCCCG
GCCAGGCCCCCGTGTGTGATCTACAAGAAGCGGCCAGCGGCATCCCCGAGCGGTTTC
AGCGGCAGCAACAGCGGCAACACCGCCACCTGACCATCAGCGGCACCCAGGCCGAGGA
CGAGGCCGACTACTGTCTCCGCTGGGGCGACAAGGGCATGGTGTGTCGGCGGAA
CAAAGTTAACCGTGCTGGGGCAG

【 配 列 表 】

2014520784000001 . app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2012/063207

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. C07K16/28 C07K16/24 A61K39/395
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

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

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, FSTA, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2010/124163 A2 (THERACLONE SCIENCES INC [US]; CHAN-HUI PO-YING [US]; FREY STEVEN [US];) 28 October 2010 (2010-10-28) cited in the application paragraphs [0126] - [0128], [0422]	1-15
X	WO 2007/092939 A2 (MORPHOTEK INC [US]; SASS PHILIP M [US]; NICOLAIDES NICHOLAS E [US]; GR) 16 August 2007 (2007-08-16) cited in the application page 22 - paragraphs 0042-0043, 0068 ----- -/-	1-15

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

☒ 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

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 2012

Date of mailing of the international search report

07/12/2012

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

Sirim, Pinar

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/063207

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	SAKAGAMI TAKURO ET AL: "Patient-derived Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating Factor Autoantibodies Reproduce Pulmonary Alveolar Proteinosis in Nonhuman Primates", AMERICAN JOURNAL OF RESPIRATORY AND CRITICAL CARE MEDICINE, vol. 182, no. 1, July 2010 (2010-07), pages 49-61, XP002663317, cited in the application the whole document	1-15
A	----- WO 94/11026 A2 (IDEC PHARMA CORP [US]) 26 May 1994 (1994-05-26) the whole document	1-15
A	----- WO 2007/064911 A1 (BIOGEN IDEC INC [US]; DUNN ROBERT JOSEPH [US]; MERTSCHING ELISABETH [U]) 7 June 2007 (2007-06-07) cited in the application the whole document -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/063207

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)		Publication date
WO 2010124163	A2	28-10-2010	CA	2759506 A1	28-10-2010
			CN	102459340 A	16-05-2012
			SG	175305 A1	28-11-2011
			US	2010291075 A1	18-11-2010
			WO	2010124163 A2	28-10-2010

WO 2007092939	A2	16-08-2007	AU	2007213716 A1	16-08-2007
			CA	2641169 A1	16-08-2007
			EP	1981909 A2	22-10-2008
			JP	2009526082 A	16-07-2009
			KR	20080099314 A	12-11-2008
			US	2008292641 A1	27-11-2008
			US	2010272730 A1	28-10-2010
WO	2007092939 A2	16-08-2007			

WO 9411026	A2	26-05-1994	AT	139900 T	15-07-1996
			AT	196606 T	15-10-2000
			AU	688743 B2	19-03-1998
			BG	62386 B1	29-10-1999
			BG	99701 A	29-02-1996
			CA	2149329 A1	26-05-1994
			DE	69303494 D1	08-08-1996
			DE	69303494 T2	16-01-1997
			DE	69329503 D1	02-11-2000
			DE	69329503 T2	03-05-2001
			DE	122004000036 I1	07-07-2005
			DK	0669836 T3	14-10-1996
			DK	0752248 T3	13-11-2000
			EP	0669836 A1	06-09-1995
			EP	0752248 A1	08-01-1997
			EP	1005870 A2	07-06-2000
			ES	2091684 T3	01-11-1996
			ES	2152483 T3	01-02-2001
			FI	952327 A	10-07-1995
			GR	3020731 T3	30-11-1996
			GR	3035119 T3	30-03-2001
			JP	3095175 B2	03-10-2000
			JP	4091235 B2	28-05-2008
			JP	4203080 B2	24-12-2008
			JP	H08503468 A	16-04-1996
			JP	2001010974 A	16-01-2001
			JP	2006262907 A	05-10-2006
			LU	91089 I2	16-09-2004
			LV	11732 B	20-10-1997
			MD	1367 B2	31-12-1999
			NL	300156 I1	01-09-2004
			NO	326271 B1	27-10-2008
			NO	329146 B1	30-08-2010
			NO	951903 A	13-07-1995
			NO	2006011 I1	02-10-2006
			NZ	258392 A	22-09-1997
			PL	309002 A1	18-09-1995
			PT	752248 E	31-01-2001
			RO	118524 B1	30-06-2003
			RU	2139731 C1	20-10-1999
			US	5776456 A	07-07-1998
			US	5843439 A	01-12-1998
			US	6399061 B1	04-06-2002

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/063207

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		US 6682734 B1	27-01-2004
		US 2002197255 A1	26-12-2002
		US 2003021781 A1	30-01-2003
		US 2003095963 A1	22-05-2003
		US 2005186205 A1	25-08-2005
		WO 9411026 A2	26-05-1994

WO 2007064911 A1	07-06-2007	US 2007136826 A1	14-06-2007
		WO 2007064911 A1	07-06-2007

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 1/04 (2006.01)		A 6 1 P 1/04	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)		A 6 1 P 29/00 1 0 1	
A 6 1 P 17/06 (2006.01)		A 6 1 P 9/10	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)		A 6 1 P 17/06	
A 6 1 P 13/12 (2006.01)		A 6 1 P 37/02	
A 6 1 P 37/06 (2006.01)		A 6 1 P 13/12	
A 6 1 P 11/06 (2006.01)		A 6 1 P 37/06	
A 6 1 P 3/10 (2006.01)		A 6 1 P 11/06	
A 6 1 P 25/04 (2006.01)		A 6 1 P 3/10	
A 6 1 P 27/02 (2006.01)		A 6 1 P 25/04	
C 0 7 K 16/24 (2006.01)		A 6 1 P 27/02	
		C 0 7 K 16/24 Z N A	

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,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,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,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,IS,JP,KE,KG,KM,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,ZA

(74)代理人 100125508

弁理士 藤井 愛

(74)代理人 100171505

弁理士 内藤 由美

(72)発明者 シュタイドル, シュテファン

ドイツ連邦共和国 8 1 2 4 1 ミュンヘン, エーベンベックシュトラッセ 2 5

Fターム(参考) 4C085 AA14 CC23 DD62 EE03

4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74