

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6884111号  
(P6884111)

(45) 発行日 令和3年6月9日(2021.6.9)

(24) 登録日 令和3年5月13日(2021.5.13)

(51) Int.Cl.

**A61K 39/395 (2006.01)**  
**C12Q 1/686 (2018.01)**  
**C12Q 1/6874 (2018.01)**  
**A61P 35/00 (2006.01)**  
**A61P 11/00 (2006.01)**

F 1

A 6 1 K 39/395 Z N A N  
C 1 2 Q 1/686 Z  
C 1 2 Q 1/6874 Z  
A 6 1 P 35/00  
A 6 1 K 39/395 D

請求項の数 42 (全 94 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-561962 (P2017-561962)  
(86) (22) 出願日 平成28年5月27日 (2016.5.27)  
(65) 公表番号 特表2018-526323 (P2018-526323A)  
(43) 公表日 平成30年9月13日 (2018.9.13)  
(86) 國際出願番号 PCT/US2016/034856  
(87) 國際公開番号 WO2016/196381  
(87) 國際公開日 平成28年12月8日 (2016.12.8)  
審査請求日 令和1年5月27日 (2019.5.27)  
(31) 優先権主張番号 62/168,668  
(32) 優先日 平成27年5月29日 (2015.5.29)  
(33) 優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

前置審査

(73) 特許権者 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 カデル, エドワード  
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, インコーポレイテッド

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】癌におけるPD-L1プロモーターのメチル化

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

有効量の抗PD-L1抗体を含む、対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位  
hg19 chr9:5449887-5449891において及び/またはゲノム座位  
hg19 chr9:5450934-5451072において、中または低レベルの  
メチル化を有すると判定された対象における癌を治療するための、医薬であって、  
メチル化レベルが、バイサルファイト配列決定により、バイサルファイト次世代配列決定  
により、またはメチル化チップアレイにより判定され、

(i) メチル化レベルがバイサルファイト配列決定により判定される場合、中レベル  
のメチル化が約20%~約40%のメチル化であり、低レベルのメチル化が約20%未満  
のメチル化である、

(ii) メチル化レベルがバイサルファイト次世代配列決定により判定される場合、  
中レベルのメチル化が約5%~約60%のメチル化であり、低レベルのメチル化が約5%  
未満のメチル化である、または

(iii) メチル化レベルがメチル化チップアレイにより判定される場合、中レベル  
のメチル化が約0.2~約0.3のベータ値であり、低レベルのメチル化が約0.2未満  
のベータ値である、

医薬。

## 【請求項2】

有効量の抗PD-L1抗体を含む、対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位

10

20

h g 1 9 c h r 9 : 5 4 4 9 8 8 7 - 5 4 4 9 8 9 1において及び／またはゲノム座位  
h g 1 9 c h r 9 : 5 4 5 0 9 3 4 - 5 4 5 1 0 7 2において、中または低レベルのメチル化を有することが見出されている対象における癌を治療するための医薬であって、  
メチル化レベルが、バイサルファイト配列決定により、バイサルファイト次世代配列決定により、またはメチル化チップアレイにより判定され、

( i ) メチル化レベルがバイサルファイト配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 20 % ~ 約 40 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 20 % 未満のメチル化である、

( i i ) メチル化レベルがバイサルファイト次世代配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 5 % ~ 約 60 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 5 % 未満のメチル化である、または

( i i i ) メチル化レベルがメチル化チップアレイにより判定される場合、中レベルのメチル化が約 0 . 2 ~ 約 0 . 3 のベータ値であり、低レベルのメチル化が約 0 . 2 未満のベータ値である、

医薬。

#### 【請求項 3】

有効量の抗 P D - L 1 抗体を含む、癌を治療するための医薬であって、癌を有する対象が、対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 4 9 8 8 7 - 5 4 4 9 8 9 1において及び／またはゲノム座位 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 5 0 9 3 4 - 5 4 5 1 0 7 2において、中または低レベルのメチル化を有することに基づき治療のために選択され、

メチル化レベルが、バイサルファイト配列決定により、バイサルファイト次世代配列決定により、またはメチル化チップアレイにより判定され、

( i ) メチル化レベルがバイサルファイト配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 20 % ~ 約 40 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 20 % 未満のメチル化であり、

( i i ) メチル化レベルがバイサルファイト次世代配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 5 % ~ 約 60 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 5 % 未満のメチル化であり、または

( i i i ) メチル化レベルがメチル化チップアレイにより判定される場合、中レベルのメチル化が約 0 . 2 ~ 約 0 . 3 のベータ値であり、低レベルのメチル化が約 0 . 2 未満のベータ値であり、

医薬が、選択された対象に投与される、

医薬。

#### 【請求項 4】

前記対象が、ゲノム座位 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 4 9 8 8 7 - 5 4 4 9 8 9 1において、またはゲノム座位 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 5 0 9 3 4 - 5 4 5 1 0 7 2において、中または低レベルのメチル化を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬。

#### 【請求項 5】

前記対象が、ゲノム座位 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 4 9 8 8 7 - 5 4 4 9 8 9 1において、及びゲノム座位 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 5 0 9 3 4 - 5 4 5 1 0 7 2において、中または低レベルのメチル化を有する、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の医薬。

#### 【請求項 6】

ゲノム座位 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 4 9 8 8 7 - 5 4 4 9 8 9 1の核酸配列が配列番号 2 2 である、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の医薬。

#### 【請求項 7】

ゲノム座位 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 5 0 9 3 4 - 5 4 5 1 0 7 2の核酸配列が配列番号 2 3 である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の医薬。

#### 【請求項 8】

前記対象からの前記試料が、免疫細胞浸潤の根拠を示す、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項

10

20

30

40

50

に記載の医薬。

**【請求項 9】**

免疫細胞浸潤の根拠が、ウェスタンプロット、ELISA、フローサイトメトリー、qPCR、qRT-PCR、トランスクリプトームプロファイリング、マイクロアレイ分析、または次世代配列決定により検出されるCD8+リンパ球により示される、請求項8に記載の医薬。

**【請求項 10】**

前記癌が、肺癌、乳癌、膀胱癌、または黑色腫である、請求項1～9のいずれか一項に記載の医薬。

**【請求項 11】**

前記癌が肺癌であり、前記肺癌が、非小細胞肺癌、肺扁平上皮癌腫、または肺腺癌腫である、請求項10に記載の医薬。

10

**【請求項 12】**

前記抗PD-L1抗体が、PD-L1のPD-1への結合を阻害する、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

**【請求項 13】**

前記抗PD-L1抗体が、PD-L1のB7-1への結合を阻害する、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

**【請求項 14】**

前記抗PD-L1抗体が、PD-L1の、PD-1及びB7-1の両方への結合を阻害する、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

20

**【請求項 15】**

前記抗PD-L1抗体が、モノクローナル抗体である、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

**【請求項 16】**

前記抗PD-L1抗体が、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、及び(Fab')2断片からなる群から選択される抗体断片である、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

**【請求項 17】**

前記抗PD-L1抗体が、ヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

30

**【請求項 18】**

前記抗PD-L1抗体が、YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105、MED14736、及びMSB0010718Cからなる群から選択される、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

**【請求項 19】**

前記抗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配列を含む重鎖と、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配列を含む軽鎖とを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

40

**【請求項 20】**

前記抗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と、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項1～11のいずれか一項に記載の医薬。

**【請求項 21】**

癌を有する対象が、抗PD-L1抗体を用いた治療に応答する可能性が高いかどうかを予測する方法であって、

対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887-5449891において、及び/またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934-5451072において、メチル化レベルを測定することを含み、

50

試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887 - 5449891 及び / またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934 - 5451072 における、中または低レベルのメチル化が、対象が治療に応答する可能性が高いことを示し、

メチル化レベルが、バイサルファイト配列決定により、バイサルファイト次世代配列決定により、またはメチル化チップアレイにより判定され、

( i ) メチル化レベルがバイサルファイト配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 20 % ~ 約 40 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 20 % 未満のメチル化である、

( i i ) メチル化レベルがバイサルファイト次世代配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 5 % ~ 約 60 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 5 % 未満のメチル化である、または

( i i i ) メチル化レベルがメチル化チップアレイにより判定される場合、中レベルのメチル化は約 0 . 2 ~ 約 0 . 3 のベータ値であり、低レベルのメチル化は約 0 . 2 未満のベータ値である、

方法。

#### 【請求項 2 2】

抗 PD - L1 抗体治療に応答する可能性が高い癌を有する対象を特定する方法であって、

( a ) 対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887 - 5449891 において及び / またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934 - 5451072 において、メチル化を評価することと、

( b ) 試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887 - 5449891 において及び / またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934 - 5451072 において、中または低レベルのメチル化を有する対象を特定することと、を含み、

メチル化レベルが、バイサルファイト配列決定により、バイサルファイト次世代配列決定により、またはメチル化チップアレイにより判定され、

( i ) メチル化レベルがバイサルファイト配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 20 % ~ 約 40 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 20 % 未満のメチル化であり、

( i i ) メチル化レベルがバイサルファイト次世代配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 5 % ~ 約 60 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 5 % 未満のメチル化であり、または

( i i i ) メチル化レベルがメチル化チップアレイにより判定される場合、中レベルのメチル化は約 0 . 2 ~ 約 0 . 3 のベータ値であり、低レベルのメチル化は約 0 . 2 未満のベータ値であり、

試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887 - 5449891 において及び / またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934 - 5451072 において、中または低レベルのメチル化を有する対象が、抗 PD - L1 抗体治療に対して応答する可能性が高い、

方法。

#### 【請求項 2 3】

対象が、ゲノム座位 hg19 chr9:5449887 - 5449891 において及び / またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934 - 5451072 において、中または低レベルのメチル化を有する、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

#### 【請求項 2 4】

対象が、ゲノム座位 hg19 chr9:5449887 - 5449891 において及び / またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934 - 5451072 において、中または低レベルのメチル化を有する、請求項 2 1 または 2 2 に記載の方法。

#### 【請求項 2 5】

ゲノム座位 hg19 chr9:5449887 - 5449891 の核酸配列が配列

10

20

30

40

50

番号 22 である、請求項 21 ~ 24 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 26】

ゲノム座位 hg19 chr9:5450934 - 5451072 の核酸配列が配列番号 23 である、請求項 21 ~ 25 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 27】

対象からの試料が、免疫細胞浸潤の根拠を示す、請求項 21 ~ 26 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 28】

免疫細胞浸潤の根拠が、ウェスタンプロット、ELISA、フローサイトメトリー、qPCR、qRT-PCR、トランスクリプトームプロファイリング、マイクロアレイ分析 10 、または次世代配列決定により検出される CD8+ リンパ球により示される、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 29】

癌が、肺癌、乳癌、膀胱癌、または黑色腫である、請求項 21 ~ 28 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 30】

癌が肺癌であり、肺癌が、非小細胞肺癌、肺扁平上皮癌腫、または肺腺癌腫である、請求項 29 に記載の方法。

【請求項 31】

抗 PD-L1 抗体が、PD-L1 の PD-1 への結合を阻害する、請求項 21 ~ 30 の 20 いずれか一項に記載の方法。

【請求項 32】

抗 PD-L1 抗体が、PD-L1 の B7-1 への結合を阻害する、請求項 21 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 33】

抗 PD-L1 抗体が、PD-L1 の、PD-1 及び B7-1 の両方への結合を阻害する、請求項 21 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

抗 PD-L1 抗体が、モノクローナル抗体である、請求項 21 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。 30

【請求項 35】

抗 PD-L1 抗体が、Fab、Fab'-SH、Fv、scFv、及び (Fab') 2 断片からなる群から選択される抗体断片である、請求項 21 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

抗 PD-L1 抗体が、ヒト化抗体またはヒト抗体である、請求項 21 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

抗 PD-L1 抗体が、YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105、MED14736、及び MSB0010718C からなる群から選択される、請求項 21 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。 40

【請求項 38】

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 配列を含む重鎖と、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 配列を含む軽鎖とを含む、請求項 21 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 39】

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と、配列番号 21 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む、請求項 21 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法。 50

## 【請求項 4 0】

一緒にパッケージ化された、抗 P D - L 1 抗体及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物と、前記抗 P D - L 1 抗体または薬学的組成物が、前記対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887-5449891において及び／またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934-5451072において、中または低レベルのメチル化を有する癌を有する対象の治療に適応することを表示するラベルとを含む、前記対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887-5449891において及び／またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934-5451072において中または低レベルのメチル化を有することが見いだされた癌を有する対象を治療するための製品であって、

10

メチル化レベルが、バイサルファイト配列決定により、バイサルファイト次世代配列決定により、またはメチル化チップアレイにより判定され、

( i ) メチル化レベルがバイサルファイト配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 20 % ~ 約 40 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 20 % 未満のメチル化である、

( ii ) メチル化レベルがバイサルファイト次世代配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 5 % ~ 約 60 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 5 % 未満のメチル化である、または

( iii ) メチル化レベルがメチル化チップアレイにより判定される場合、中レベルのメチル化は約 0 . 2 ~ 約 0 . 3 のベータ値であり、低レベルのメチル化は約 0 . 2 未満のベータ値である、

20

製品。

## 【請求項 4 1】

対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887-5449891において、及び／またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934-5451072において、メチル化レベルを測定するための試薬、及び前記対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887-5449891において及び／またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934-5451072において、中または低メチル化レベルを有するとして対象を分類するための使用説明書を含む、癌を有する対象が、前記対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887-5449891において及び／またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934-5451072において、中または低レベルのメチル化を有するか否かを評価するためのキットであって、

30

メチル化レベルが、バイサルファイト配列決定により、バイサルファイト次世代配列決定により、またはメチル化チップアレイにより判定され、

( i ) メチル化レベルがバイサルファイト配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 20 % ~ 約 40 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 20 % 未満のメチル化である、

( ii ) メチル化レベルがバイサルファイト次世代配列決定により判定される場合、中レベルのメチル化が約 5 % ~ 約 60 % のメチル化であり、低レベルのメチル化が約 5 % 未満のメチル化である、または

40

( iii ) メチル化レベルがメチル化チップアレイにより判定される場合、中レベルのメチル化は約 0 . 2 ~ 約 0 . 3 のベータ値であり、低レベルのメチル化は約 0 . 2 未満のベータ値である、

キット。

## 【請求項 4 2】

抗 P D - L 1 抗体と、前記対象が、前記対象からの癌細胞を含有する試料中のゲノム座位 hg19 chr9:5449887-5449891において及び／またはゲノム座位 hg19 chr9:5450934-5451072において、中または低メチル化レベルを有する場合、前記抗 P D - L 1 抗体を前記対象に投与するための使用説明書

50

とをさらに含む、

請求項 4 1 に記載のキット。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2015年5月29日出願の米国仮出願第62/168,668号の優先権の利益を主張するものであり、この仮出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

10

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、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる：コンピュータ可読形式（CRF）の配列表（ファイル名：146392027040SeqList.txt、記録日：2016年5月27日、サイズ：19KB）。

【0003】

本発明は、患者からの癌細胞を含有する試料中のPD-L1プロモーター領域の上流領域及び/またはPD-L1のイントロン1内の1つ以上のCpG部位においてメチル化レベルを判定することにより、抗PD-L1抗体を用いた治療のために癌患者を層別化する方法に関する。

20

【背景技術】

【0004】

PD-L1は、多くの癌で過剰発現され、多くの場合、予後不良に関連している（Okazaki T et al., Intern. Immun. 2007 19(7) : 813）（Thompson RH et al., Cancer Res 2006, 66(7) : 3381）。興味深いことに、腫瘍浸潤Tリンパ球の大半は、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、PD-1を主に発現し、腫瘍反応性T細胞でのPD-1の上方制御が抗腫瘍免疫応答障害に寄与し得ることを示す（Blood 2009 114(8) : 1537）。これは、T細胞活性化の減衰及び免疫監視の回避をもたらす、PD-1発現T細胞と相互作用するPD-L1発現腫瘍細胞により媒介されるPD-L1シグナル伝達の利用に起因し得る（Sharpe et al., Nat Rev Immunol. 2002; 2: 677）。したがって、PD-L1/PD-1相互作用の阻害が、CD8+T細胞媒介性の腫瘍死滅を増強し得る。

30

【0005】

抗PD-L1抗体及び悪性腫瘍を治療する上でこれらの使用が記載されている（例えば、Philips et al. (2015) Int Immunol 27, 39-461、Herbst et al. (2014) Nature 515, 563-567を参照されたい）。ある特定の患者は、免疫チェックポイント阻害剤に対する一次耐性を有する（例えば、Taube et al. (2012) Sci Transl Med. 4, 127、Sznol et al. (2014) Clin Cancer Res. 19, 1021-34、及びGajewski et al. (2011) Curr Opin Immunol. 23: 286-92を参照されたい）。したがって、抗PD-L1抗体療法に対する癌患者の応答性を予測する必要性が未だにある。

40

【0006】

本明細書で開示される全ての参考文献、公報、及び特許出願は、参照することによりこれらの全体が本明細書に組み込まれる。

【発明の概要】

【0007】

ある特定の実施形態において、本発明は、対象に有効量の抗PD-L1抗体を投与する

50

ことを含む、対象における癌を治療するか、または癌の進行を遅延させる方法を提供し、ここで、治療（または、進行の遅延）は、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において及び／またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低レベルのメチル化を有する対象に基づく。

#### 【0008】

ある特定の実施形態において、本発明は、対象における癌を治療するか、または癌の進行を遅延させる方法を提供するが、但し、対象が、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において及び／またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低レベルのメチル化を有することが見出されていることを条件とし、本方法は、有効量の抗P D - L 1抗体を対象に投与することを含む。

#### 【0009】

ある特定の実施形態において、本発明は、(a)癌を有する対象であって、該対象が、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において及び／またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低レベルのメチル化を有する、対象を選択することと、(b)このように選択された対象に有効量の抗P D - L 1抗体を投与することとを含む、癌を治療するか、または癌の進行を遅延させる方法を提供する。

#### 【0010】

ある特定の実施形態において、本発明は、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において及び／またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、メチル化レベルを測定することを含む、癌を有する対象が、抗P D - L 1抗体を用いた治療に応答する可能性が高いかどうかを予測する方法を提供し、ここで、試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1における、またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位における中または低レベルのメチル化は、治療に応答する可能性が高い対象を示す。

#### 【0011】

ある特定の実施形態において、(a)対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において及び／またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、メチル化レベルを測定することと、(b)有効量の抗P D - L 1抗体を、P D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において、またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低レベルのメチル化を有することが判定されている対象に投与することとを含む、対象における癌を治療する方法が提供される。

#### 【0012】

ある特定の実施形態において、本発明は、(a)対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において及び／またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、メチル化を評価することと、(b)試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において及び／またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低レベルのメチル化を有する対象を特定することとを含む、抗P D - L 1抗体治療に応答する可能性が高い癌を有する対象を特定する方法を提供する。

#### 【0013】

上記の実施形態のいずれかによる（または、それらに適用されるような）いくつかの実施形態において、本方法は、有効量の抗P D - L 1抗体を対象に投与することをさらに含む。上記の実施形態のいずれかによる（または、それらに適用されるような）いくつかの実施形態において、対象は、P D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において、及びP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低レベルのメチル化を有する。上記の実施形態のいずれかによる（または、それらに適用されるよう

10

20

30

40

50

な)いくつかの実施形態において、メチル化レベルは、バイサルファイト次世代配列決定により判定される。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、メチル化レベルは、バイサルファイト次世代配列決定により判定される。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、メチル化レベルは、メチル化チップアレイを使用して判定される。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、対象からの試料は、免疫細胞浸潤の根拠を示す。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、免疫細胞浸潤の根拠は、ウェスタンプロット、ELISA、フローサイトメトリー、qPCR、qRT-PCR、トランスクリプトームプロファイリング、マイクロアレイ分析、または次世代配列決定により検出されるCD8<sup>+</sup>リンパ球により示される。

#### 【0014】

上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される場合、約20%～約40%のメチル化の中レベルのメチル化。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される場合の低レベルのメチル化は、約20%未満のメチル化である。

#### 【0015】

上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される場合、約5%～約60%のメチル化の中レベルのメチル化。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される場合の低レベルのメチル化は、約5%未満のメチル化である。

#### 【0016】

上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイにより判定される場合の中レベルのメチル化は、約0.2～約0.3のベータ値である。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイにより判定される場合の低レベルのメチル化は、約0.2未満のベータ値である。

#### 【0017】

上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、癌は、肺癌、乳癌、膀胱癌、または黒色腫である。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、癌は、肺癌であり、肺癌は、非小細胞肺癌、肺扁平上皮癌腫、または肺腺癌腫である。

#### 【0018】

上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、PD-L1のPD-1への結合を阻害する。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、PD-L1のB7-1への結合を阻害する。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、PD-L1の、PD-1及びB7-1の両方への結合を阻害する。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、モノクローナル抗体である。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、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。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、ヒト化抗体またはヒト抗体である。上記の実施形態のいずれかによる(または、それらに適用されるような)いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105、及びMED14736からなる群から選

10

20

30

40

50

択される。上記の実施形態のいずれかによる（または、それらに適用されるような）いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、配列番号 1 5 の H V R - H 1 配列、配列番号 1 6 の H V R - H 2 配列、及び配列番号 3 の H V R - H 3 配列を含む重鎖と、配列番号 1 7 の H V R - L 1 配列、配列番号 1 8 の H V R - L 2 配列、及び配列番号 1 9 の H V R - L 3 配列を含む軽鎖とを含む。上記の実施形態のいずれかによる（または、それらに適用されるような）いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、配列番号 2 4 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。

#### 【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態において、本発明は、一緒にパッケージ化された、抗 P D - L 1 抗体及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物と、抗 P D - L 1 抗体または薬学的組成物が、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有する癌を有する対象の治療に適応することを表示するラベルとを含む、製品を提供する。10

#### 【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態において、本発明は、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、メチル化レベルを測定するための試薬と、P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低メチル化レベルを有するとして対象を分類するための使用説明書とを含むキットを提供する。上記の実施形態のいずれかによる（または、それらに適用されるような）いくつかの実施形態において、キットまたは製品は、抗 P D - L 1 抗体と、対象が、P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低メチル化レベルを有する場合、抗 P D - L 1 抗体を対象に投与するための使用説明書とをさらに含む。20

#### 【 0 0 2 1 】

本明細書に記載される様々な実施形態の特性のうちの 1 つ、いくつか、または全てを組み合わせて、本発明の他の実施形態を形成することができるることを理解されたい。本発明のこれら及び他の態様は、当業者に明らかであろう。本発明のこれら及び他の実施形態は、以下の発明を実施するための形態によりさらに記載される。30

#### 【 図面の簡単な説明 】

#### 【 0 0 2 2 】

【図 1】91 個の非小細胞肺癌 (N S C L C) 細胞株に関する P D - L 1 発現レベル及び P D - L 1 プロモーターのメチル化ヒートマップを示す。

【図 1 A】91 個の非小細胞肺癌 (N S C L C) 細胞株に関する P D - L 1 発現レベル及び P D - L 1 プロモーターのメチル化ヒートマップを示す。

【図 1 B】91 個の非小細胞肺癌 (N S C L C) 細胞株に関する P D - L 1 発現レベル及び P D - L 1 プロモーターのメチル化ヒートマップを示す。40

【図 1 C】91 個の非小細胞肺癌 (N S C L C) 細胞株に関する P D - L 1 発現レベル及び P D - L 1 プロモーターのメチル化ヒートマップを示す。

【図 1 D】91 個の非小細胞肺癌 (N S C L C) 細胞株に関する P D - L 1 発現レベル及び P D - L 1 プロモーターのメチル化ヒートマップを示す。

【図 1 E】91 個の非小細胞肺癌 (N S C L C) 細胞株に関する P D - L 1 発現レベル及び P D - L 1 プロモーターのメチル化ヒートマップを示す。

【図 2 A】The Cancer Genome Atlas からの肺腺癌腫瘍の集合における、P D - L 1 RNA 発現と P D - L 1 プロモーターメチル化との相関性の分析の結果を示す。

【図 2 B】The Cancer Genome Atlas からの肺扁平上皮癌腫瘍50

の集合における、PD-L1 RNA発現とPD-L1プロモーターメチル化との相関性の分析の結果を示す。

【図2C】The Cancer Genome Atlasからの乳癌腫瘍の集合における、PD-L1 RNA発現とPD-L1プロモーターメチル化との相関性の分析の結果を示す。

【図2D】The Cancer Genome Atlasからの皮膚癌腫瘍の集合における、PD-L1 RNA発現とPD-L1プロモーターメチル化との相関性の分析の結果を示す。

【図3】5つの肺癌細胞株（すなわち、H661、LXFL529、A427、H2073、H322T、及びH1993）におけるPD-L1 RNAの発現に対する、5アザ-dC、TSA、IFNg、または5アザ-dC+TSA+IFNg処理の効果を評価するために行われた実験の結果を示す。10

【図4A】4つの異なる肺癌細胞株（A427、H292、H322T、及びH358）における、PD-L1タンパク質発現及びRNA発現に対するIFNg処理の効果を評価するために行われた実験の結果を示す。

【図4B】A427、H292、H322T、及びH358細胞株内のIFNg/JAK/SSTATシグナル伝達経路に対する30分のIFNg処理及び24時間のIFNg処理の効果を判定するために行われた実験の結果を示す。

【図4C】A427及びH358における、STAT1、STAT3、及びPD-L1発現に対するIFNg処理、ならびに／またはSTAT1及びSTAT3ノックダウンの効果を判定するために行われた実験の結果を示す。20

【図5A】末梢血単核細胞サブセットに対して想定されるCpGメチル化部位のマップ上への、バイサルファイト配列決定データの重ね合わせを示す。

【図5A-1】末梢血単核細胞サブセットに対して想定されるCpGメチル化部位のマップ上への、バイサルファイト配列決定データ。

【図5A-2】末梢血単核細胞サブセットに対して想定されるCpGメチル化部位のマップ上への、バイサルファイト配列決定データ。

【図5A-3】末梢血単核細胞サブセットに対して想定されるCpGメチル化部位のマップ上への、バイサルファイト配列決定データ。

【図5B】PD-L1プロモーター領域内の高、中、または低メチル化レベルを有する、不死化正常肺細胞株、及びNSCLC肺癌細胞株に対して想定されるCpGメチル化部位のマップ上への、バイサルファイト配列決定データの重ね合わせを示す。30

【図5B-1】PD-L1プロモーター領域内の高、中、または低メチル化レベルを有する、不死化正常肺細胞株、及びNSCLC肺癌細胞株に対して想定されるCpGメチル化部位のマップ上への、バイサルファイト配列決定データ。

【図5B-2】PD-L1プロモーター領域内の高、中、または低メチル化レベルを有する、不死化正常肺細胞株、及びNSCLC肺癌細胞株に対して想定されるCpGメチル化部位のマップ上への、バイサルファイト配列決定データ。

【図5B-3】PD-L1プロモーター領域内の高、中、または低メチル化レベルを有する、不死化正常肺細胞株、及びNSCLC肺癌細胞株に対して想定されるCpGメチル化部位のマップ上への、バイサルファイト配列決定データ。40

【図6A】X軸上の平滑化CpG1及びCpG5メチル化（M値）を、Y軸上のPD-L1発現（RNA配列、Log2カウント）と直接比較するNSCLC細胞株のCancer Genome Project（CGP）から作製された点図表プロットを示す。

【図6B】図6AのNSCLC細胞株が分類分けされた3つのメチル化レベルグループ（すなわち、「低」、「中」、及び「高」）の統計的適切性を判定するために行われたANOVA分析の結果を示す。

【図6C】図6AのNSCLC細胞株内のPD-L1 RNA発現に対する5アザ-dC処理の効果の統計的適切性を判定するために行われたANOVA分析の結果を示す。

【図6D】連結型NSCLC細胞株H1993及びH2073における、PD-L1 R50

NA発現に対する5アザ-dC処理の効果を判定するために行われた実験の結果を示す。

【図7A】NSCLC細胞株内のT細胞浸潤と、CpG5(mut7)におけるメチル化と、PD-L1タンパク質レベルとの間の関係の統計的適切性を判定するために行われたANOVA分析の結果を示す。

【図7B】NSCLC細胞株内のT細胞浸潤と、CpG5(mut7)におけるメチル化と、PD-L1転写レベルとの間の関係の統計的適切性を判定するために行われたANOVA分析の結果を示す。

【図8】IgV Integrated Genomics Viewer(Broad Institute)で表示された.bedファイルを提供する。bedファイルは、STAT1及び/またはSTAT3が、A427及びH358細胞株内のPD-L1プロモーター領域に結合するかどうかを判定するために行われたCHIP配列実験の結果を提供する。  
10

【図8A】IgV Integrated Genomics Viewer(Broad Institute)で表示された.bedファイルを提供する。bedファイルは、STAT1及び/またはSTAT3が、A427及びH358細胞株内のPD-L1プロモーター領域に結合するかどうかを判定するために行われたCHIP配列実験の結果を提供する。

【図8B】IgV Integrated Genomics Viewer(Broad Institute)で表示された.bedファイルを提供する。bedファイルは、STAT1及び/またはSTAT3が、A427及びH358細胞株内のPD-L1プロモーター領域に結合するかどうかを判定するために行われたCHIP配列実験の結果を提供する。  
20

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0023】

##### I. 一般的技法

本明細書において記載されるか、または参照される技法及び手順は、当業者により概して十分に理解され、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.、Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel, et al. eds., (2003))、the series Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.): PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames and G.R. Taylor eds. (1995))、Harlow and Lane, eds. (1988) Antibodies, A Laboratory Manual, and Animal Cell Culture (R.I. Freshney, ed. (1987))、Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait, ed., 1984)、Methods in Molecular Biology, Humana Press、Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis, ed., 1998) Academic Press、Animal Cell Culture (R.I. Freshney), ed., 1987)、Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather and P.E. Roberts, 1998) Plenum Press、Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths, and D.G. Newell, eds., 1993-8) J. Wiley and Sons、Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir and C.C. Blackwell, eds.)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (40  
30  
40  
50

J. M. Miller and M. P. Calos, eds., 1987)、PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis et al., eds., 1994)、Current Protocols in Immunology (J. E. Coligan et al., eds., 1991)、Short Protocols in Molecular Biology (Wiley and Sons, 1999)、Immunobiology (C. A. Janeway and P. Travers, 1997)、Antibodies (P. Finch, 1997)、Antibodies: A Practical Approach (D. Catty, ed., IRL Press, 1988-1989)、Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (P. Shepherd and C. Dean, eds., Oxford University Press, 2000)、Using Antibodies: A Laboratory Manual (E. Harlow and D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (M. Zanetti and J. D. Capra, eds., Harwood Academic Publishers, 1995)、及びCancer: Principles and Practice of Oncology (V. T. DeVita et al., eds., J. B. Lippincott Company, 1993)に記載される広く利用されている方法論などの、従来の方法論などを使用して一般的に用いられる。 10

#### 【0024】

##### I I . 定義

本明細書で使用される場合、「治療」という用語は、臨床的病変の経過中に治療されている個体または細胞の自然経過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、疾患進行速度の減速、疾患状態の回復または緩和、及び寛解または予後の改善が含まれる。例えば、個体は、癌性細胞の増殖の低減（もしくは破壊）、疾患に起因する症状の減少、疾患に罹患している者の生活の質の向上、疾患の治療に必要な他の薬剤の用量の減少、及び／または個体の生存期間の延長を含むが、これらに限定されない、癌に関連する1つ以上の症状が軽減または排除された場合、「治療」が成功する。 20

#### 【0025】

本明細書で使用される場合、「based upon（に基づく）」は、（1）本明細書に記載されるような患者の特徴を評価すること、判定すること、または測定すること（及び好ましくは、治療を受けるのに好適な患者を選択すること、及び（2）本明細書に記載されるような治療（複数可）を行うこと、を含む。 30

#### 【0026】

治療目的のための「対象」、「患者」、または「個体」は、ヒト、飼育動物及び家畜、ならびに動物園、競技用、または愛玩動物、例えば、イヌ、ウマ、ネコ、ウシなどを含む、哺乳動物として分類される任意の動物を指す。好ましくは、哺乳動物は、ヒトである。

#### 【0027】

本明細書で使用される場合、「疾患の進行を遅延させる」は、疾患（癌など）の発症を延期し、妨害し、減速し、遅らせ、安定させ、かつ／または延ばすことを意味する。この遅延は、治療されている病歴及び／または個体に応じて異なる期間であり得る。当業者に明らかであるように、十分または著しい遅延は、個体が疾患を発症しないという点で、予防を事実上包含し得る。例えば、転移の発症などの末期癌を遅延させることができる。 40

#### 【0028】

「有効量」とは、特定の障害の測定可能な改善または予防をもたらすために必要な少なくとも最小の量である。本明細書における有効量は、患者の疾患状態、年齢、性別、及び体重、ならびに個体における所望の応答を誘発する抗体の能力などの要因に応じて異なり得る。有効量は、治療上有益な効果が治療の任意の毒性効果または有害効果を上回るものもある。予防的使用の場合、有益なまたは所望の結果には、疾患の生化学的、組織学的 50

、及び／または挙動的症状、その合併症、ならびに疾患の発症中に現れる中間病理学的表現型を含む、疾患のリスクの排除もしくは低減、疾患の重症度の軽減、または疾患の発生の遅延などの結果が含まれる。治療的使用の場合、有益なまたは所望の結果には、疾患に起因する1つ以上の症状の減少、疾患に罹患している者の生活の質の向上、疾患の治療に必要な他の薬剤の用量の減少、別の薬剤の効果の増強（例えば、標的による）、疾患の進行の遅延、及び／または生存期間の延長などの臨床結果が含まれる。癌または腫瘍の場合、有効量の薬物は、癌細胞の数を低減させ、腫瘍サイズを低減させ、癌細胞の末梢器官への浸潤を阻害し（すなわち、ある程度遅らせるか、または望ましくは停止し）、腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度遅らせるか、または望ましくは停止し）、腫瘍成長をある程度阻害し、かつ／または障害に関連する症状のうちの1つ以上をある程度軽減する効果を有し得る。有効量は、1回以上の投与で投与され得る。本発明の目的に關しては、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、予防的または治療的治療を直接または間接的に達成するのに十分な量である。臨床分野において理解されるように、薬物、化合物、または薬学的組成物の有効量は、別の薬物、化合物、また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つ以上の療法剤を投与するという点で考慮され得、単剤は、1つ以上の他の薬剤と併せて、望ましい結果が達成され得るか、または達成される場合、有効量で与えられると見なされ得る。

## 【0029】

「細胞増殖性障害」及び「増殖性障害」という用語は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を指す。一実施形態において、細胞増殖性障害は、癌である。一実施形態において、細胞増殖性障害は、腫瘍である。

## 【0030】

「腫瘍」は、本明細書で使用される場合、悪性か良性かを問わず、全ての腫瘍性細胞の成長及び増殖、ならびに全ての前がん性及びがん性細胞及び組織を指す。「癌」、「癌性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」、及び「腫瘍」という用語は、本明細書で言及される場合、相互排他的ではない。

## 【0031】

「癌」及び「癌性」という用語は、制御されていない細胞成長を典型的に特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指すか、または説明する。癌の例には、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病またはリンパ系悪性腫瘍、扁平上皮癌（例えば、上皮性扁平上皮癌）、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌（g a s t r i c c a n c e r）または胃癌（s t o m a c h c a n c e r）（消化管癌及び消化管間質癌など）、膵臓癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路性の癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌（C R C）、子宮内膜癌または子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌（k i d n e y c a n c e r）または腎臓癌（r e n a l c a n c e r）、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫、多発性骨髄腫及びB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（N H L）、小リンパ球性（S L）N H L、中悪性度／濾胞性N H L、中悪性度／びまん性N H L、高悪性度免疫芽細胞性N H L、高悪性度リンパ芽球性N H L、高悪性度小型非開裂細胞性N H L、巨大病変性N H L、マントル細胞リンパ腫、A I D S関連リンパ腫、及びヴァルデンストレームマクログロブリン血症など）、慢性骨髄芽球性白血病（C L L）、急性リンパ芽球性白血病（A L L）、有毛細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、及び移植後リンパ増殖性障害（P T L D）、ならびに母斑症に関連する異常血管増殖、浮腫（脳腫瘍に関連するものなど）、メイグス症候群、脳癌、ならびに頭頸部癌、軟部組織肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド癌腫、及び中皮腫、膠芽腫、神経芽細胞腫、ならびに関連する転移が含まれるが、これらに限定されない。癌の他の例には、乳癌（乳癌腫など）、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌腫、及び肺の扁平上皮癌腫など）、及び皮膚癌（黒色腫、表在拡大型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端黒子型黒色腫、結節型黒色腫、及び皮膚癌腫など）（それらの癌の転移型を含む）が含まれるが、これらに限定されない。

## 【0032】

10

20

30

40

50

「試料」は、本明細書で使用される場合、例えば、物理的、生化学的、化学的、及び／または生理的特徴に基づいて特性化及び／または特定される、細胞実体及び／または他の分子実体を含有する、目的の対象から得られるか、またはそれに由来する、組成物を指す。例えば、「疾患試料」という用語、及びその変形は、特性化される細胞実体及び／または分子実体を含有することが予想されるか、または含有することが知られている、目的の対象から得られる任意の試料を指す。試料は、核酸（ポリヌクレオチド、例えばゲノムDNA及び／または転写など）及び／またはポリペプチドが単離され得る対象からの癌細胞及び／または腫瘍細胞を含有する生物学的組織または流体の生物学的試料（エクスピボ生物学的試料など）であり得る。かかる試料は典型的には、ヒト対象からのものであるが、他の対象（本明細書の他の場所に記載されるような哺乳動物として分類されるかかる任意の動物）から単離される組織を含む。試料には、生体組織及び解剖試料などの組織の切片、組織学的目的のために採取された凍結切片も含まれ得る。試料には、対象から採取したての試料、またはホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）試料などの保存組織試料が含まれ得る。試料には、患者組織に由来する外植片、ならびに初代及び／または形質転換細胞培養物も含まれる。

#### 【0033】

「組織または細胞試料」は、対象または患者の組織から得られる同様の細胞の集合を意味する。組織または細胞試料の供給源は、採取したての、凍結された、及び／または保存された、臓器もしくは組織試料、または生体組織もしくは吸引液；血液または任意の血液組成成分；脳脊髄液、羊膜液、腹腔液、または組織液などの体液；対象の妊娠期間または発育における任意の時期の細胞からの固形組織であり得る。組織試料は、初代もしくは培養細胞、または細胞株でもあり得る。任意に、組織または細胞試料は、疾患組織／臓器から得られる。組織試料は、防腐剤、抗凝固剤、緩衝液、固定剤、栄養素、抗生物質などの、自然界の組織とは自然には混合されない化合物を含有し得る。

#### 【0034】

「細胞傷害性剤」という用語は、本明細書で使用される場合、（例えば、細胞死を引き起こすか、増殖を阻害するか、またはさもなければ細胞機能を妨害する）細胞に有害である任意の薬剤を指す。細胞傷害性剤には、放射性同位体（例えば、 $A_{t\ 2\ 1\ 1}$ 、 $I_{\ 1\ 3\ 1}$ 、 $I_{\ 1\ 2\ 5}$ 、 $Y_{\ 9\ 0}$ 、 $R_{e\ 1\ 8\ 6}$ 、 $R_{e\ 1\ 8\ 8}$ 、 $S_{m\ 1\ 5\ 3}$ 、 $B_{i\ 2\ 1\ 2}$ 、 $P_{\ 3\ 2}$ 、 $P_{b\ 2\ 1\ 2}$ 、及びLuの放射性同位体）、化学療法剤、成長阻害剤、酵素及びそれらの断片、例えば、核酸分解酵素、ならびに毒素、例えば、細菌、真菌、植物、または動物起源の小分子毒素または酵素的に活性な毒素（それらの断片及び／または変異体を含む）が含まれるが、これらに限定されない。例示的な細胞傷害性剤は、抗微小管薬、白金配位錯体、アルキル化剤、抗生物質剤、トポイソメラーゼII阻害剤、代謝拮抗薬、トポイソメラーゼI阻害剤、ホルモン及びホルモン類似体、シグナル伝達経路阻害剤、非受容体チロシンキナーゼ血管新生阻害剤、免疫療法剤、アポトーシス促進剤、LDH-A阻害剤、脂肪酸合成阻害剤、細胞周期シグナル伝達阻害剤、HDAC阻害剤、プロテアソーム阻害剤、ならびに癌代謝阻害剤から選択され得る。一実施形態において、細胞傷害性剤は、タキサンである。一実施形態において、タキサンは、パクリタキセルまたはドセタキセルである。一実施形態において、細胞傷害性剤は、白金剤である。一実施形態において、細胞傷害性剤は、EGFRのアンタゴニストである。一実施形態において、EGFRのアンタゴニストは、N-(3-エチルフェニル)-6,7-ビス(2-メトキシエトキシ)キナゾリン-4-アミン（例えば、エルロチニブ）である。一実施形態において、細胞傷害性剤は、RAF阻害剤である。一実施形態において、RAF阻害剤は、BRAF及び／またはCRAF阻害剤である。一実施形態において、RAF阻害剤は、ベムラフェニブである。一実施形態において、細胞傷害性剤は、PI3K阻害剤である。

#### 【0035】

「化学療法剤」は、癌の治療において有用な化合物を指す。化学療法剤の例には、エルロチニブ（TARCEVA（登録商標）、Genentech/OSI Pharm.）、ボルテゾミブ（VELCADE（登録商標）、Millennium Pharm.）

10

20

30

40

50

、ジスルフィラム、没食子酸エピガロカテキン、サリノスポラミドA、カーフィルゾミブ  
、17 - AAG (ゲルダナマイシン)、ラディシコール、乳酸デヒドロゲナーゼA (LDH - A)、フルベストラント (FASLODEX (登録商標)、AstraZeneca)、スニチブ (sunitalib) (SUTENT (登録商標)、Pfizer / Sugen)、レトロゾール (FEMARA (登録商標)、Novartis)、メシル酸イマチニブ (GLEEVEC (登録商標)、Novartis)、フィナステート (finasteride) (VATALANIB (登録商標)、Novartis)、オキサリプラチン (ELOXATIN (登録商標)、Sanofi)、5 - FU (5 - フルオロウラシル)  
、ロイコボリン、ラパマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商標)、Wyeth)、ラパチニブ (TYKERB (登録商標)、GSK572016、Glaxo Smith Kline)、ロナファミブ (Lonafamib) (SCH 66336) 10  
、ソラフェニブ (NEXAVAR (登録商標)、Bayer Labs)、ゲフィチニブ (IRESSA (登録商標)、AstraZeneca)、AG1478、アルキル化剤、例えばチオテパ及びCYTOXAN (登録商標) シクロホスファミド；アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファン；アジリジン、  
例えばベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (metreotide)、及びウレドーパ (uredopa)；エチレンイミン及びメチラメラミン (methylameline) (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、及びトリメチロメラミンを含む) 20  
；アセトゲニン (特に、プラタシン及びプラタシノン)；カンプトテシン (トポテカン及びイリノテカンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン (calystatin)；CC - 1065 (そのアゾゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成類似体を含む)；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)；副腎皮質ステロイド (プレドニゾン及びプレドニゾロンを含む)；酢酸シプロテロン；5 - 還元酵素フィナステリド及びデュタステリドを含む)；ボリノスタット、ロミデプシン、パノビノスタット、バルプロ酸、モセチノスタットドラスタチン；アルデスロイキン、タルクデュオカルマイシン (合成類似体KW - 2189及びCB1 - TM1を含む)；エロイテロビン (eleutherobin)；パンクラチスタチン (pancratistatin)；サルコジクチイン；スpongiostatin (spongistatin)；ナイトロジエンマスターード、例えばクロラムブシリ、クロマファジン (chlomophazine) 30  
、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、メルファラン、ノベムビシン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターード；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、口ムスチン、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、特にカリケアマイシン 1I 及びカリケアマイシン 1I (Angew Chem. Int'l. Ed. Engl. 1994 33: 183 - 186)；ダイネマイシン (ダイネマイシンAを含む)；ビスホスホネート、例えばクロドロネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団及び関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団)、アクラノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabicin)、カミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイニス (chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン (detorubicin)、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ADRIMYCIN (登録商標) (ドキソルビシン)、モルホリノ - ドキソルビシン、シアノモルホリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ - ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシン)、エピルビシン、エソルビシン (esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシン、例えはマイトイマイシン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 40  
、ジスルフィラム、没食子酸エピガロカテキン、サリノスポラミドA、カーフィルゾミブ  
、17 - AAG (ゲルダナマイシン)、ラディシコール、乳酸デヒドロゲナーゼA (LDH - A)、フルベストラント (FASLODEX (登録商標)、AstraZeneca)、スニチブ (sunitalib) (SUTENT (登録商標)、Pfizer / Sugen)、レトロゾール (FEMARA (登録商標)、Novartis)、メシル酸イマチニブ (GLEEVEC (登録商標)、Novartis)、フィナステート (finasteride) (VATALANIB (登録商標)、Novartis)、オキサリプラチン (ELOXATIN (登録商標)、Sanofi)、5 - FU (5 - フルオロウラシル)  
、ロイコボリン、ラパマイシン (シロリムス、RAPAMUNE (登録商標)、Wyeth)、ラパチニブ (TYKERB (登録商標)、GSK572016、Glaxo Smith Kline)、ロナファミブ (Lonafamib) (SCH 66336) 50  
、ソラフェニブ (NEXAVAR (登録商標)、Bayer Labs)、ゲフィチニブ (IRESSA (登録商標)、AstraZeneca)、AG1478、アルキル化剤、例えばチオテパ及びCYTOXAN (登録商標) シクロホスファミド；アルキルスルホネート、例えばブスルファン、インプロスルファン、及びピポスルファン；アジリジン、  
例えばベンゾドーパ (benzodopa)、カルボコン、メツレドーパ (metreotide)、及びウレドーパ (uredopa)；エチレンイミン及びメチラメラミン (methylameline) (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、及びトリメチロメラミンを含む)；アセトゲニン (特に、プラタシン及びプラタシノン)；カンプトテシン (トポテカン及びイリノテカンを含む)；ブリオスタチン；カリスタチン (calystatin)；CC - 1065 (そのアゾゼレシン、カルゼレシン、及びビゼレシン合成類似体を含む)；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)；副腎皮質ステロイド (プレドニゾン及びプレドニゾロンを含む)；酢酸シプロテロン；5 - 還元酵素フィナステリド及びデュタステリドを含む)；ボリノスタット、ロミデプシン、パノビノスタット、バルプロ酸、モセチノスタットドラスタチン；アルデスロイキン、タルクデュオカルマイシン (合成類似体KW - 2189及びCB1 - TM1を含む)；エロイテロビン (eleutherobin)；パンクラチスタチン (pancratistatin)；サルコジクチイン；スpongiostatin (spongistatin)；ナイトロジエンマスターード、例えばクロラムブシリ、クロマファジン (chlomophazine) 30  
、クロロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩 (mechlorethamine oxide hydrochloride)、メルファラン、ノベムビシン (novembichin)、フェネステリン (phenesterine)、プレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスターード；ニトロソ尿素、例えばカルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、口ムスチン、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、特にカリケアマイシン 1I 及びカリケアマイシン 1I (Angew Chem. Int'l. Ed. Engl. 1994 33: 183 - 186)；ダイネマイシン (ダイネマイシンAを含む)；ビスホスホネート、例えばクロドロネート；エスペラマイシン；ならびにネオカルジノスタチン発色団及び関連する色素タンパク質エンジイン抗生物質発色団)、アクラノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン (authramycin)、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン、カラビシン (carabicin)、カミノマイシン (caminomycin)、カルジノフィリン、クロモマイニス (chromomycinis)、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン (detorubicin)、6 - ジアゾ - 5 - オキソ - L - ノルロイシン、ADRIMYCIN (登録商標) (ドキソルビシン)、モルホリノ - ドキソルビシン、シアノモルホリノ - ドキソルビシン、2 - ピロリノ - ドキソルビシン、及びデオキシドキソルビシン)、エピルビシン、エソルビシン (esorubicin)、イダルビシン、マルセロマイシン、マイトイマイシン、例えはマイトイマイシン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 50

ロマイシン、ケラマイシン (quelamycin)、ロドルビシン (rodorubin)、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、ゾルビシン；代謝拮抗薬、例えばメトレキサート及び5-フルオロウラシル (5-FU)；葉酸類似体、例えばデノブテリン、メトレキサート、ブテロブテリン、トリメトレキサート；ブリン類似体、例えばフルダラビン、6-メルカプトブリン、チアミプリン (thiamiprime)、チオグアニン；ピリミジン類似体、例えばアンシタビン、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、エノシタビン、フロクスウリジン；アンドロゲン、例えばカルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタン、テストラクトン；抗副腎剤 (anti-adrenal)、例えばアミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタン；葉酸補液 (folic acid replenisher)、例えばフロリン酸 (folinic acid)；アセグラトン；アルドホスファミドグリコシド (aldophosphamide glycoside)；アミノレブリン酸；エニルウラシル；アムサクリン；ベストラブシル (bestrabucil)；ビスマントレン；エダトラキサート (edatraxate)；デフォファミン (defofamine)；デメコルチン；ジアジクオン；エルホミチン (elfomithine)；酢酸エリブチニウム；エポチロン；エトグルシド；硝酸ガリウム；ヒドロキシ尿素；レンチナン；ロニダイニン (lonidainine)；マイタンシノイド、例えばマイタンシン及びアンサマイシン；ミトグアゾン；ミトキサントロン；モピダムノール (mopidamnol)；ニトラエリン (nitraerine)；ペントスタチン；フェナメット；ピラルビシン；ロソキサントロン；ボドフィリン酸；2-エチルヒドラジド (2-ethylhydrazide)；プロカルバジン；PSK (登録商標) 多糖類複合体 (JHS Natural Products, Eugene, Oregon)；ラゾキサン；リゾキシン；シゾフラン (sizofuran)；スピロゲルマニウム；テヌアゾン酸；トリアジクオン；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、ロリジンA、及びアンゲイジン)；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン (gacytosine)；アラビノシド (「Ara-C」)；シクロホスファミド；チオテバ；タキソイド、例えば、TAXOL (パクリタキセル、Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、ABRAXANE (登録商標) (クレモホール不含)、パクリタキセルのアルブミン操作ナノ粒子製剤 (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Ill.)、及びTAXOTERE (登録商標) (ドセタキセル (docetaxel)、ドセタキセル (doxetaxel)；Sanofi-Aventis)；クロランムブシル (chlorambucil)；GEMZAR (登録商標) (ゲムシタビン)；6-チオグアニン；メルカプトブリン；メトレキサート；白金類似体、例えばシスプラチン及びカルボプラチン；ビンプラスチン；白金系剤、エトボシド (VP-16)；イホスファミド；カペシタビン；ミトキサントロン；ビンクリスチン；NAVELBINE (登録商標) (ビノレルビン)；ノバントロン；テニポシド；エダトレキサート；ダウノマイシン；アミノブテリン；カペシタビン (XELODA (登録商標))；イバンドロネット；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (DMFO)；レチノイド、例えばレチノイン酸；ならびに上述のもののいずれかの薬学的に許容される塩、酸、及び誘導体が含まれる。

#### 【0036】

この定義には、(i) 抗エストロゲン剤及び選択的エストロゲン受容体調節剤 (SERM) などの、腫瘍に対してホルモン作用を制御または阻害するように作用する抗ホルモン剤 (例えば、タモキシフェン (NOLVADEX (登録商標)、クエン酸タモキシフェン)、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、ヨードキシフェン (iodoxyfene)、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FARESTON (登録商標) (クエン酸トレミファイン (toremifene)))；イバンドロネット；CPT-11；トポイソメラーゼ阻害剤 RFS 2000；ジフルオロメチルオルニチン (DMFO)；レチノイド、例えばレチノイン酸；ならびに上述のもののいずれかの薬学的に許容される塩、酸、及び誘導体が含まれる。

remifine citrate)を含む)、(ii)副腎におけるエストロゲン産生を制御するアロマターゼ酵素を阻害する、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、MEGASE(登録商標)(酢酸メgestrol)、AROMASIN(登録商標)(エキセメスタン、Pfizer)、フォルメスタン(ormestane)、ファドロゾール、RIVISOR(登録商標)(ボロゾール)、FEMARA(登録商標)(レトロゾール、Novartis)、及びARIMIDE X(登録商標)(アナストロゾール、AstraZeneca)など、(iii)抗アンドロゲン剤、例えば、フルタミド、ニルタミド、ビカルタミド、ロイプロリド、及びゴセレリン；ブセレリン、トリプテレリン(tripterelain)、酢酸メドロキシプロゲステロン、ジエチルスチルベストロール、プレマリン、フルオキシメステロン、全てのトランスレチオニン酸(transretionic acid)、フェンレチニド、ならびにトロキサシタビン(1,3-ジオキソランスクレオシドシトシン類似体)、(iv)タンパク質キナーゼ阻害剤、(v)脂質キナーゼ阻害剤、(vi)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するシグナル伝達経路における遺伝子の発現を阻害するもの、例えば、PKC-アルファ、Ralf、及びH-Ras；(vii)リボザイム、例えば、VEGF発現阻害剤(例えば、ANGIOZYME(登録商標))及びHER2発現阻害剤、(viii)ワクチン、例えば、遺伝子療法用ワクチン、例えば、ALLOVECTIN(登録商標)、LEUVECTIN(登録商標)、及びVAXID(登録商標)；PROLEUKIN(登録商標)、rIL-2；トポイソメラーゼ1阻害剤、例えば、LURTOTECAN(登録商標)；ABARELIX(登録商標)rmRH、ならびに(ix)上述のもののいずれかの薬学的に許容される塩、酸、及び誘導体も含まれる。  
10  
20  
20

### 【0037】

化学療法剤には、抗体、例えば、アレムツズマブ(Campath)、ベバシズマブ(AVASTIN(登録商標)、Genentech)、セツキシマブ(ERBITUX(登録商標)、Imclone)、パニツムマブ(VECTIBIX(登録商標)、Amgen)、リツキシマブ(RITUXAN(登録商標)、Genentech/Biogen Idec)、ペルツズマブ(OMNITARG(登録商標)、2C4、Genentech)、トラスツズマブ(HERCEPTIN(登録商標)、Genentech)、トシツモマブ(Bexxar、Corixia)、及び抗体-薬物コンジュゲート、ゲムツズマブオゾガマイシン(MYLOTARG(登録商標)、Wyeth)も含まれる。本発明の化合物との併用で薬剤として治療可能性を有するさらなるヒト化モノクローナル抗体には、アポリズマブ、アセリズマブ(aselizumab)、アトリズマブ、バビネオズマブ、ビバツズマブメルタンシン(bivatuzumab mertansine)、カンツズマブメルタンシン、セデリズマブ(cedelizumab)、セトリズマブペゴール、シドフシツズマブ(cidfusituzumab)、シドツズマブ(cdituzumab)、ダクリズマブ、エクリズマブ、エファリズマブ、エプラツズマブ、エルリズマブ(erlizumab)、フェルビズマブ(felvizumab)、フォントリズマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、ラベツズマブ、リンツズマブ、マツズマブ、メポリズマブ、モタビズマブ、モトビズマブ(motovizumab)、ナタリズマブ、ニモツズマブ(nimotuzumab)、ノロビズマブ(nolovizumab)、ヌマビズマブ(numavizumab)、オクレリズマブ、オマリズマブ、パリビズマブ、パスコリズマブ(pascolizumab)、ペクフシツズマブ(pecfusituzumab)、ペクトツズマブ(pectuzumab)、パキセリズマブ、ラリビズマブ(ralivizumab)、ラニビズマブ、レスリビズマブ(reslivizumab)、レスリズマブ、レシビズマブ(resyvizumab)、ロベリズマブ(rovelizumab)、ルプリズマブ(ruplizumab)、シプロツズマブ(sibrotuzumab)、シプリズマブ、ソンツズマブ(sontuzumab)、タカツズマブテトラキセタン(tacatuzumab tetraxetan)、タドシズマブ(tadocizumab)、  
30  
40  
50

タリズマブ、テフィバズマブ( t e f i b a z u m a b )、トシリズマブ、トラリズマブ( t o r a l i z u m a b )、ツコツズマブセルモロイキン( t u c o t u z u m a b c e l m o l e u k i n )、ツクシツズマブ( t u c u s i t u z u m a b )、ウマビズマブ( u m a v i z u m a b )、ウルトキサズマブ、ウステキヌマブ、ビジリズマブ、及びインターロイキン - 12 p 4 0 タンパク質を認識するように遺伝子修飾された排他的にヒト配列の組換え全長 Ig G<sub>1</sub> 抗体である、抗インターロイキン - 12 ( A B T - 8 7 4 / J 6 9 5 、 Wy e t h R e s e a r c h a n d A b b o t t L a b o r a t o r i e s ) が含まれる。

#### 【 0 0 3 8 】

「成長阻害剤」は、本明細書で使用されるとき、インビトロまたはインビボのいずれかで細胞の成長を阻害する化合物または組成物を指す。一実施形態において、成長阻害剤は、抗体が結合する抗原を発現する細胞の増殖を予防または低減する成長阻害抗体である。別の実施形態において、成長阻害剤は、S期の細胞の割合を著しく低減させるものであり得る。成長阻害剤の例には、G<sub>1</sub>停止及びM期停止を誘導する薬剤などの、細胞周期進行(S期以外の場所で)を遮断する薬剤が含まれる。従来のM期遮断薬には、ビンカ(ビンクリスチン及びビンプラスチン)、タキサン、及び、例えば、ドキソルビシン、エピルビシン、ダウノルビシン、エトポシド、及びブレオマイシンなどのトポイソメラーゼⅠⅡ阻害剤が含まれる。G<sub>1</sub>を停止する薬剤、例えば、タモキシフェン、プレドニゾン、ダカルバジン、メクロレタミン、シスプラチニン、メトトレキサート、5-フルオロウラシル、及びara-CなどのDNAアルキル化剤は、S期停止にも波及する。さらなる情報は、M 10 urakamiらによる Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer、第1章、表題「Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs」(W.B. Saunders, Philadelphia, 1995)、例えば、p. 13で見ることができる。タキサン(パクリタキセル及びドセタキセル)は、両方ともイチイに由来する抗癌薬である。ヨーロッパイチイに由来するドセタキセル(TAXOTERE(登録商標)、Rhône-Poulenc Rorer)は、パクリタキセル(TAXOL(登録商標)、Bristol-Myers Squibb)の半合成類似体である。パクリタキセル及びドセタキセルは、チューブリン二量体由来の微小管の構築を促進し、脱重合を阻止することにより微小管を安定させ、結果的に、細胞内での有糸分裂を阻害する。

#### 【 0 0 3 9 】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広義に使用され、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、少なくとも2つの無傷抗体から形成された多重特異性抗体(例えば、二重特異性抗体)、及び抗体断片を具体的に包含するが、これは、それらが所望の生物活性を呈する場合に限る。

#### 【 0 0 4 0 】

「抗PD-L1抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、PD-L1と、その結合パートナー、例えば、PD-1、B7-1のうちのいずれか1つ以上の相互作用に起因するシグナル伝達を減少、遮断、阻害、抑止、または妨害するアンタゴニスト抗体を指す。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、PD-L1のその結合パートナーへの結合を阻害する抗体である。具体的な態様において、抗PD-L1抗体は、PD-L1の、PD-1及び/またはB7-1への結合を阻害する。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体には、PD-L1とその結合パートナー、例えば、PD-1、B7-1のうちの1つ以上の相互作用に起因するシグナル伝達を減少、遮断、阻害、抑止、または妨害するその抗原結合断片が含まれる。一実施形態において、抗PD-L1抗体は、PD-L1を通したTリンパ球媒介性シグナル伝達上で発現された細胞表面タンパク質によりまたはそれを介して媒介される陰性共刺激シグナルを低減し、機能障害T細胞の機能障害性をより低くする(例えば、抗原認識へのエフェクター応答を増強する)。一実施形態において、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載されるYW243.55.S70 40 50

である。別の実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、本明細書に記載される M D X - 1 1 0 5 である。別の実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、本明細書に記載される M P D L 3 2 8 0 A である。別の実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、本明細書に記載される M E D I 4 7 3 6 である。

#### 【 0 0 4 1 】

「遮断」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、それが結合する抗原の生物活性を阻害または低減するものである。いくつかの実施形態において、遮断抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的にまたは完全に阻害する。本発明の抗 P D - L 1 抗体は、 P D - 1 によるシグナル伝達を遮断する。

#### 【 0 0 4 2 】

本明細書で使用されるとき、「binds（結合する）」、「specifically binds to（に特異的に結合する）」、または「is specific for（に特異である）」という用語は、生物学的分子を含む分子の異種分子集団の存在下で標的の存在を決定する、標的と抗体との間の結合などの測定可能かつ再現可能な相互作用を指す。例えば、標的（エピトープであり得る）に結合するか、またはそれに特異的に結合する抗体は、この標的に、他の標的に結合するよりも高い親和性で、結合力で、より容易に、かつ／またはより長期間結合する抗体である。一実施形態において、抗体が無関係の標的に結合する程度は、例えば、放射免疫アッセイ（ R I A ）により測定される場合、抗体の標的への結合の約 1 0 % 未満である。ある特定の実施形態において、標的に特異的に結合する抗体は、 $1 \mu M$ 、 $1 0 0 nM$ 、 $1 0 nM$ 、 $1 nM$ 、または $0 . 1 nM$  の解離定数（ K d ）を有する。ある特定の実施形態において、抗体は、異なる種由來のタンパク質間で保存されるタンパク質上のエピトープに特異的に結合する。別の実施形態において、特異的結合は、排他的結合を含み得るが、それを必要としない。

#### 【 0 0 4 3 】

「抗体断片」は、無傷抗体の一部分を含み、好ましくはその抗原結合領域を含む。抗体断片の例には、 F a b 、 F a b ' 、 F ( a b ' ) 2 、及び F v 断片、ダイアボディ、直鎖状抗体、一本鎖抗体分子、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体が含まれる。

#### 【 0 0 4 4 】

「全長抗体」、「無傷抗体」、及び「全抗体」という用語は、以下に定義される抗体断片ではない、その実質的に無傷の形態の抗体を指すために本明細書で互換的に使用される。これらの用語は特に、 F c 領域を含有する重鎖を有する抗体を指す。

#### 【 0 0 4 5 】

「単離された」抗体は、その自然環境の構成成分から特定及び分離され、かつ／または回収されたものである。その自然環境の汚染物質成分は、抗体の試験的、診断的、または治療的使用を妨害するであろうで材料であり、酵素、ホルモン、及び他のタンパク質性または非タンパク質性溶質が含まれ得る。いくつかの実施形態において、抗体は、（ 1 ）例えば、ローリー法により決定される場合、 9 5 重量 % 超、いくつかの実施形態において、 9 9 重量 % 超まで、（ 2 ）例えば、スピニングカップシーケンエネーターを使用することにより、 N 末端もしくは内部アミノ酸配列の少なくとも 1 5 個の残基を得るのに十分な程度まで、または（ 3 ）例えば、クマシープルーもしくはシルバー染色を使用して、還元もしくは非還元条件下で S D S - P A G E により均質になるまで精製される。単離抗体には、抗体の自然環境の少なくとも 1 つの構成成分が存在しないため、組換え細胞内でインサイツの抗体が含まれる。しかしながら、通常、単離抗体は、少なくとも 1 つの精製ステップにより調製されるであろう。

#### 【 0 0 4 6 】

「天然抗体」は、通常、 2 つの同一の軽（ L ）鎖及び 2 つの同一の重（ H ）鎖からなる約 1 5 0 , 0 0 0 ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。各軽鎖が 1 つのジスルフィド共有結合により重鎖に連結している一方で、ジスルフィド結合の数は、異なる免疫グロブリンアイソタイプの重鎖間で異なる。各重及び軽鎖は、規則的に離間した鎖内ジスルフィド架橋も有する。各重鎖は、一方の端に可変ドメイン（ V H ）を有し、いくつかの定

10

20

30

40

50

常ドメインが続く。各軽鎖は、一方の端 ( $V_L$ ) に可変ドメインを有し、その他方の端に定常ドメインを有し、軽鎖の定常ドメインは、重鎖の第1の定常ドメインと整列し、軽鎖の可変ドメインは、重鎖の可変ドメインと整列する。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に界面を形成すると考えられている。

#### 【0047】

「可変」という用語は、可変ドメインのある特定の部分の配列が抗体間で大きく異なり、各特定の抗体のその特定の抗原に対する結合及び特異性において使用されるという事実を指す。しかし、可変性は、抗体の可変ドメイン全体にわたって均等に分布していない。これは、軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインの両方において、超可変領域と呼ばれる3つのセグメントに集中している。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。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは各自、主にシート構成を採用し、3つの超可変領域により連結され、シート構造に連結し、ある場合にはその一部を形成するループを形成する4つのFRを含む。各鎖内の超可変領域は、FRにより近接して一緒に保持され、他の鎖の超可変領域とともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。定常ドメインは、抗体の抗原への結合に直接関与していないが、抗体依存性細胞傷害性 (ADCC) における抗体の関与などの様々なエフェクター機能を呈する。

10

20

#### 【0048】

抗体のパパイン消化は、各自が単一の抗原結合部位を有する、「Fab」断片と呼ばれる2つの同一の抗原結合断片、及び「Fc」断片を產生し、その名前は、容易に結晶化するその能力を反映している。ペプシン処理により、2つの抗原結合部位を有し、依然として抗原に架橋することができる  $F(ab')_2$  フラグメントが得られる。

#### 【0049】

「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。この領域は、密接な非共有結合性会合にある1つの重鎖可変ドメイン及び1つの軽鎖可変ドメインの二量体からなる。この構成において、各可変ドメインの3つの超可変領域が相互作用して、 $V_H - V_L$  二量体の表面上に抗原結合部位を画定する。集合的に、6つの超可変領域は、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかし、単一可変ドメイン（または抗原に特異的な超可変領域を3つのみ含むFvの半分）でさえも、抗原を認識してそれに結合する能力を有するが、全結合部位よりも親和性が低い。

30

#### 【0050】

Fab断片は、軽鎖の定常ドメイン及び重鎖の第1の定常ドメイン (CH1) も含有する。Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端での数個の残基の付加の分だけ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）が少なくとも1つの遊離チオール基を持つFab'の本明細書における表記である。 $F(ab')_2$  抗体断片は、元来、間にヒンジシステインを有するFab'断片の対として產生された。抗体断片の他の化学的カッティングも知られている。

40

#### 【0051】

任意の脊椎動物種由來の抗体（免疫グロブリン）の「軽鎖」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つの明らかに異なる種類のうちの1つに割り当てられ得る。

#### 【0052】

抗体は、それらの重鎖の定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、異なるクラスまたはアイソタイプに割り当てられ得る。無傷抗体には5つの主要なクラス、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgMが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、及びIgA2にさ

50

らに分別され得る。抗体の異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\zeta$ 及び $\mu$ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元構成が周知されており、例えば、Abbas et al. Cellular and Mol. Immunology, 4th ed. (W. B. Saunders, Co., 2000) に概して記載される。抗体は、抗体と1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有会合または非共有会合により形成された、より大きな融合分子の一部であり得る。

#### 【0053】

「一本鎖Fv」または「scFv」抗体断片は、抗体の $V_H$ 及び $V_L$ ドメインを含み、ここで、これらのドメインは、単一のポリペプチドに存在している。いくつかの実施形態において、Fvポリペプチドは、 $V_H$ ドメインと $V_L$ ドメインとの間にポリペプチドリンクアをさらに含み、これは、scFvが抗原結合に所望の構造を形成することを可能にする。scFvの概説に関しては、Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269 - 315 (1994) を参照されたい。10

#### 【0054】

「ダイアボディ」という用語は、2つの抗原結合部位を有する小抗体断片を指し、これらの断片は、同じポリペプチド鎖内の軽鎖可変ドメイン( $V_L$ )に接続した重鎖可変ドメイン( $V_H$ )を含む( $V_H - V_L$ )。同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンクアを使用することにより、ドメインは、別の鎖の相補的ドメインと対合させられ、2つの抗原結合部位が作製される。ダイアボディは、例えば、EP 404, 097、WO 93/11161、及び Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993) により完全に記載される。20

#### 【0055】

「モノクローナル抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、実質的に同種の抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、その集団に含まれる個々の抗体は、同一であり、かつ／または同じエピトープに結合するが、モノクローナル抗体の產生中に生じ得る想定される変異体は除外され、かかる変異体は、概して、少量で存在する。異なる決定基(エピトープ)に対して指向される異なる抗体を典型的に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、抗原上の単一の決定基に対して指向される。それらの特異性に加えて、モノクローナル抗体は、他の免疫グロブリンにより汚染されていないという点で有利である。「モノクローナル」という修飾語句は、実質的に同種の抗体集団から得られているような抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の產生を必要とすると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、まず Kohler et al., Nature, 256: 495 (1975) により記載されるハイブリドーマ法により作製され得るか、または組換えDNA法により作製され得る(例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい)。「モノクローナル抗体」は、例えば、Clackson et al., Nature, 352: 624 - 628 (1991)、及び Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991) に記載される技法を使用してファージ抗体ライブリから単離もされ得る。3040

#### 【0056】

本明細書におけるモノクローナル抗体は、重及び／または軽鎖の一部分が、特定の種に由来するか、または特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または同種である一方で、鎖(複数可)の残りが、別の種に由来するか、または別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または同種である「キメラ」抗体(免疫グロブリン)、ならびにかかる抗体の断片を特異的に含むが、これは、それらが所望の生物活性を呈する場合に限る(米国特許第4,816,56650

7号、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 81: 6851 - 6855 (1984)。本明細書における目的のキメラ抗体には、非ヒト靈長類（例えば、ヒヒ、アカゲザル、またはカニクイザルなどの旧世界ザル）に由来する可変ドメイン抗原結合配列、及びヒト定常領域配列を含む「靈長類化」抗体が含まれる（米国特許第5,693,780号）。

#### 【0057】

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に由来する最小配列を含むキメラ抗体である。ほとんどの場合、ヒト化抗体は、レシピエントの超可変領域由来の残基が、所望の特異性、親和性、及び能力を有するマウス、ラット、ウサギ、または非ヒト靈長類などの非ヒト種（供与体抗体）の超可変領域由来の残基により置き換えられるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。いくつかの事例において、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク領域（FR）残基は、対応する非ヒト残基により置き換えられる。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体にも供与体抗体にも見られない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに洗練するために行われる。概して、ヒト化抗体は、上述のFR置換（複数可）を除いて、超可変ループの全てまたは実質的に全てが非ヒト免疫グロブリンの超可変ループに対応し、かつFRの全てまたは実質的に全てがヒト免疫グロブリン配列のFRである、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むであろう。ヒト化抗体は任意に、免疫グロブリンの定常領域、典型的には、ヒト免疫グロブリンの定常領域の少なくとも一部分も含むであろう。さらなる詳細に関しては、Jones et al., Nature 321: 522 - 525 (1986)、Riechmann et al., Nature 332: 323 - 329 (1988)、及びPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593 - 596 (1992)を参照されたい。10

#### 【0058】

「ヒト抗体」は、ヒトにより産生され、かつ／または本明細書で開示されるヒト抗体を作製するための技法のうちのいずれかを使用して作製されている抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有するものである。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除外する。ヒト抗体は、ファージディスプレイライブラリを含む当技術分野で既知の様々な技法を使用して産生され得る。Hoogenboom and Winter, J. Mol. Biol., 227: 381 (1991)、Marks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 (1991)。Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985)、Boerner et al., J. Immunol., 147 (1): 86 - 95 (1991)に記載される方法も、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である。van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368 - 74 (2001)も参照されたい。ヒト抗体は、抗原攻撃に応答してかかる抗体を産生するように修飾されているが、その内因性遺伝子座が無効化されているトランスジェニック動物、例えば、免疫化異種マウスに抗原を投与することにより調製され得る（例えば、XENOMOUSE（商標）技術に関しては、米国特許第6,075,181号及び同第6,150,584号を参照されたい）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術により生成されるヒト抗体に関しては、例えば、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103: 3557 - 3562 (2006)も参照されたい。30

#### 【0059】

いくつかのHVR描写が本明細書で使用され、本明細書に包含される。Kabat相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づき、最も一般的に使用されている（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。Chothiaは、その代わりに、構造的ループの位40

置に言及する (Chothia and Lesk J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987))。AbM HVRは、Kabat HVRとChothia構造的ループとの間の妥協案を示し、Oxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアにより使用される。「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造の分析に基づく。これらHVRの各々の残基は、以下に記載される。

ル ー ブ	Kabat	AbM	Chothia	接觸	
L 1	L 2 4 - L 3	L 2 4 - L 3	L 2 6 - L 3	L 3 0 - L 3	
	4	4	2	6	10
L 2	L 5 0 - L 5	L 5 0 - L 5	L 5 0 - L 5	L 4 6 - L 5	
	6	6	2	5	
L 3	L 8 9 - L 9	L 8 9 - L 9	L 9 1 - L 9	L 8 9 - L 9	
	7	7	6	6	
H 1	H 3 1 - H 3	H 2 6 - H 3	H 2 6 - H 3	H 3 0 - H 3	(Kabat番号付け)
	5 B	5 B	2	5 B	
H 1	H 3 1 - H 3	H 2 6 - H 3	H 2 6 - H 3	H 3 0 - H 3	(Chothia番号付け)
	5	5	2	5	20
H 2	H 5 0 - H 6	H 5 0 - H 5	H 5 3 - H 5	H 4 7 - H 5	
	5	8	5	8	
H 3	H 9 5 - H 1	H 9 5 - H 1	H 9 6 - H 1	H 9 3 - H 1	
	0 2	0 2	0 1	0 1	

#### 【0060】

HVRは、以下の「伸長HVR」を含み得る：VLにおいて、24 - 36または24 - 34 (L1)、46 - 56または50 - 56 (L2)、及び89 - 97または89 - 96 (L3)、ならびに VHにおいて、26 - 35 (H1)、50 - 65もしくは49 - 65 (H2)、及び93 - 102、94 - 102、または95 - 102 (H3)。可変ドメイン残基は、これらの定義の各々に関しては、Kabat et al. (上記参照)に従って番号付けされる。

#### 【0061】

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

#### 【0062】

「ネイキッド抗体」は、細胞傷害性部分などの異種分子または放射標識に複合されない(本明細書に定義される)抗体である。

#### 【0063】

「about (約)」という用語は、本明細書で使用される場合、当業者に容易に知られているそれぞれの値の通常の誤差範囲を指す。本明細書における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体を対象とする実施形態を含む(かつ説明する)。例えば、「約X」を言及する記述は、「X」の記述を含む。

#### 【0064】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a (1つの)」、「or (または)」、及び「the (その)」は、文脈が別途明確に指示しない限り、複数の指示対象を含む。本明細書に記載される本発明の態様及び変形は、態様及び変形「consisting (からなる)」及び/または「consisting essentially of (から本質的になる)」を含むことが理解される。

**【 0 0 6 5 】**

本発明を詳細に記載する前に、本発明が特定の組成物または生物学的系に限定されず、言うまでもなく多様であり得ることを理解されたい。本明細書で使用される専門用語が特定の実施形態を説明することのみを目的としており、限定することを意図されていないことも理解されたい。

**【 0 0 6 6 】****I I I . 方法**

いくつかの実施形態において、対象に有効量の抗 P D - L 1 抗体を投与することを含む、対象における癌を治療するか、または癌の進行を遅延させる方法が提供され、ここで、治療は、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有する対象に基づく。10

**【 0 0 6 7 】**

いくつかの実施形態において、対象における癌を治療するか、または癌の進行を遅延させる方法が提供されるが、但し、対象が、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有することが見出されていることを条件とし、本方法は、有効量の抗 P D - L 1 抗体を対象に投与することを含む。20

**【 0 0 6 8 】**

いくつかの実施形態において、( a ) 癌を有する対象であって、該対象が、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有する、対象を選択することと、( b ) このように選択された対象(ステップ( a )で選択された)に有効量の抗 P D - L 1 抗体を投与することとを含む、癌を治療するか、または癌の進行を遅延させる方法が提供される。20

**【 0 0 6 9 】**

いくつかの実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、メチル化レベルを測定することを含む、癌を有する対象が、抗 P D - L 1 抗体を用いた治療に応答する可能性が高いかどうかを予測する方法が提供され、ここで、試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 における、または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位における、中または低レベルのメチル化が、対象が治療に応答する可能性が高いことを示す。30

**【 0 0 7 0 】**

いくつかの実施形態において、( a ) 対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、メチル化レベルを測定することと、( b ) 有効量の抗 P D - L 1 抗体を、P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において、または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有することが判定されている対象に投与することとを含む、対象における癌を治療する方法が提供される。40

**【 0 0 7 1 】**

いくつかの実施形態において、( a ) 対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、メチル化レベルを測定することと、( b ) 有効量の抗 P D - L 1 抗体を、ステップ( a )で測定された場合、P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において、または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有することが判定されている対象に投与することとを含む、対象における癌を治療する方法が提供される。50

**【 0 0 7 2 】**

いくつかの実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、メチル化レベルを測定することと、対象が、 P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において、または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有する場合、有効量の抗 P D - L 1 抗体を対象に投与することとを含む、対象における癌を治療する方法が提供される。

**【 0 0 7 3 】**

いくつかの実施形態において、( a ) 対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、メチル化レベルを評価するかまたは測定することと、( b ) 対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において、または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有する対象を特定することとを含む、抗 P D - L 1 抗体治療に応答する可能性が高い癌を有する対象を特定する方法が提供される。いくつかの実施形態において、本方法は、有効量の抗 P D - L 1 抗体を対象に投与することをさらに含む。

**【 0 0 7 4 】**

ある特定の実施形態において、本明細書で提供される方法は、 P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において、及び P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、メチル化レベルを評価することを含む。

**【 0 0 7 5 】**

P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 のゲノム座位（本明細書で M u t 2 とも称される）は、 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 4 9 8 8 7 - 5 4 4 9 8 9 1 である。 P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位のゲノム座位（本明細書で C p G 5 または M u t 7 とも称される）は、 h g 1 9 c h r 9 : 5 4 5 0 9 3 4 - 5 4 5 1 0 7 2 である。これらの座位の配列は、 U C S C G e n o m e B r o w s e r ( genome . u c s c . e d u / ) などの公開オンラインゲノムデータベースで得ることができる。

**【 0 0 7 6 】**

C p G 1 の核酸配列は、 G C T C G ( 配列番号 2 2 ) である。

**【 0 0 7 7 】**

C p G 5 の核酸配列は、 C A C G G G T C C A A G T C C A C C G C C A G C T G C T T G C T A G T A A C A T G A C T T G T G T A A G T T A T C C C A G C T G C A G C A T C T A A G T A A G T C T C T T C C T G C G C T A A G C A G G T C C A G G A T C C C T G A A C G G A A T T T A T T T G C T C T G T C C A T T ( 配列番号 2 3 ) である。

**【 0 0 7 8 】**

h g 1 9 c h r 9 : 5 4 4 9 8 8 7 - 5 4 5 1 0 7 2 の配列は、以下に提供される ( C p G 1 及び C p G 5 は、下線部分である)。

GCTCGGGATGGGAAGTCTTTAATGACAAAGCAAATGAAGTTCATTAT  
 GTCGAGGAACCTTGAGGAAGTCACAGAACATCCACGATTAAAAATATATT  
 CCTATTATAACACCCATACACACACACACACACCTACTTCTAGAATAAAA  
 ACCAAAGCCATATGGGTCTGCTGACTTTATATGTTAGAGTTAT  
 ATCAAGTTATGTCAAGATGTTAGTCACCTGAAGAGGGCTTTATCAGAA  
 AGGGGGACGCCTTCTGATAAAGGTTAAGGGTAACCTAACGCTCTTACC  
 CCTCTGAAGGTAAAATCAAGGTGCGITCAGATGTTGGCTTGTGAAATT  
 TCTTTTTTATTAATAACATACTAAATGTGGATTGCTTTAATCTTCGAA  
 ACTCTTCCCAGGTGAAAATCTCATTTACAAGAAAATGGACTGACATGTT  
 CACTTCTGTTCATTTCTATACACAGCTTATTCTAGGACACCAACAC  
 TAGATACCTAAACTGAAAGCTTCCGCCATTACCCGAAGGTAGGAAAG  
 TCCAACGCCCGCAAACCTGGATTGCTGCCTGGCAGAGGTGGCGGGA  
 CCCCGCCTCCGGGCCTGGCGAACGCTGAGCAGCTGGCGCGTCCCGCG  
 GCCCCAGTTCTGCGCAGCTTCCGAGGGCTCCGACCAGCCGCGCTCTGT  
 CCGCCTGCAGGTAGGGAGCGTTGCTCCGCGGGTGCCACGGCCCAGT  
 ATCTCTGGCTAGCTCGCTGGGACTTTAGGACGGAGGGTCTCTACACCCT  
 TTCTTGGATGGAGAGAGGAGAAGGGAAAGGAAACGCGATGGCTAGGG  
 GGCAGTAGAGCCAATTACCTGTTGGGTTAATAAGAACAGGCAATGCATC  
 TGGCCTCCTCCAGGCCGATTCAAGTTGCTCTAAATAATTATACC  
 TCTAAAAATAAAAGATAGGTAGTATAGGATAGGTAGTCATTCTTATGC  
 GACTGTGTGTTAGAATATAGCTCTGATGCTAGGCTGGAGGTCTGGACAC  
GGGTCCAAGTCCACCGCCAGCTGCTGCTAGTAACATGACTTGTGTAAGT  
TATCCCAGCTGCAGCATCTAAGTAAGTCTCTCCTGCGCTAACAGGAGGTCC  
AGGATCCCTGAACGGAATTATTTGCTCTGTCCATT (配列番号 30)

## 【 0 0 7 9 】

## メチル化レベルを判定する方法

P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 における及び / または P D - L 1 のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位におけるメチル化度は、多様な方法を使用して測定され得る。ある特定の実施形態において、P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 における、または P D - L 1 のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位におけるメチル化度は、バイサルファイト D N A 配列決定により判定される。バイサルファイトを用いた D N A の処理は、シトシン（「C」）残基をウラシル（「U」）に変換するが、5 - メチルシトシン残基には影響を及ぼさない。したがって、バイサルファイト処理は、個体のシトシン残基のメチル化状態に応じる D N A 配列に特異的な変化を導入し、それにより、D N A のセグメントのメチル化状態についての单一 - ヌクレオチド分解情報を得る。この情報を回復するために、様々な分析が変化配列において行われ得る。次いで、いくつかの実施形態において、目的のバイサルファイト修飾配列（P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び / または P D - L 1 のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位など）は、2 セットのストランド特異的プライマーを有する P C R により増幅されて、各ストランドの 1 つず

10

20

30

40

50

つからなる1対の断片を得、ここで、チミン及び5'-メチルシトシン残基のみがシトシンとして増幅される場合、全てのウラシル及びチミン残基が増幅される。PCR産生物は、直接配列決定され得るか、またはクローニング及び配列決定されて、単一のDNA分子のメチル化マップを提供し得る(例えば、Frommer, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 89: 1827-1831, 1992を参照されたい)。

#### 【0080】

いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される場合の低レベルのメチル化は、CpG1における約20%未満のメチル化である(19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、または約1%未満の値間の任意の範囲を含む、これらのメチル化のうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される場合の低レベルのメチル化は、PD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位における約20%未満のメチル化である(19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、または約1%未満の値間の任意の範囲を含む、これらのメチル化のうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される場合の低レベルのメチル化は、CpG1における約20%未満のメチル化(19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、または約1%未満の値間の任意の範囲を含む、これらのメチル化のうちのいずれか1つなど)、及びPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位における約20%未満のメチル化である(19%、18%、17%、16%、15%、14%、13%、12%、11%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、または約1%未満の値間の任意の範囲を含む、これらのメチル化のうちのいずれか1つなど)。

#### 【0081】

いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される場合の中レベルのメチル化は、CpG1における約20%～約40%のメチル化である(20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、または40%の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される場合の中レベルのメチル化は、PD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位における約20%～約40%のメチル化である(20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、または40%の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される場合の中レベルのメチル化は、CpG1における約20%～約40%のメチル化(20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、または40%の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)、及びPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位における約20%～約40%のメチル化である(20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%、30%、31%、32%、33%、34%、35%、36%、37%、38%、39%、または40%の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。

#### 【0082】

いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される高レベルのメチル化は、CpG1における約40%超～約100%のメチル化である(40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の値間の任意の範囲を含む、これらのメチル化のうちのいず

10

20

30

40

50

れか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される高レベルのメチル化は、P D - L 1 遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位における約40%超~約100%のメチル化である(40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の値間の任意の範囲を含む、これらのメチル化のうちのいずれか1つなど)いくつかの実施形態において、バイサルファイト配列決定により判定される高レベルのメチル化は、C p G 1における約40%超~約100%のメチル化(40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の値間の任意の範囲を含む、これらのメチル化のうちのいずれか1つなど)、及びP D - L 1 遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位における約40%超~約100%のメチル化である(40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、または100%の値間の任意の範囲を含む、これらのメチル化のうちのいずれか1つなど)。

#### 【0083】

ある特定の実施形態において、P D - L 1 プロモーター領域内のC p G 1における及び/またはP D - L 1 のイントロン1内の1つ以上のC p G部位におけるメチル化度は、バイサルファイト次世代配列決定(B S - N G S)により判定され、ここで、バイサルファイトで処理されるD N Aは、I L L U M I N A(登録商標)H I S E Q(商標)配列決定系などの高処理次世代配列決定系を使用して分析される。バイサルファイト次世代配列決定に関する追加の詳細に関しては、例えば、Farlik et al.(2015)Cell Reports doi:10.1016/j.celrep.2015.02.001、Tiedemann et al.(2014)Cell Reports doi:10.1016/j.celrep.2014.10.013、Fernandez et al.(2015)Genome Research. doi:10.1101/gr.169011.113、Lim et al.(2014)PLOS Genetics. doi:10.1371/journal.pgen.1004792を参照されたい。

#### 【0084】

いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される場合の低レベルのメチル化は、C p G 1における約5%未満のメチル化である(約4%、約3%、約2%、約1%、または約1%未満のメチル化など、これらの値間の任意の範囲を含む)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される場合の低レベルのメチル化は、P D - L 1 遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位における約5%未満のメチル化である(約4%、約3%、約2%、約1%、または約1%未満のメチル化など、これらの値間の任意の範囲を含む)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される場合の低レベルのメチル化は、C p G 1における約5%未満のメチル化(約4%、約3%、約2%、約1%、または約1%未満のメチル化など、これらの値間の任意の範囲を含む)、及びP D - L 1 遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位における約5%未満のメチル化である(約4%、約3%、約2%、約1%、または約1%未満のメチル化など、これらの値間の任意の範囲を含む)。

#### 【0085】

いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される場合の中レベルのメチル化は、C p G 1における約5%~約60%のメチル化である(5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、または約60%未満のメチル化の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される場合の中レベルのメチル化は、P D - L 1 遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位における約5%~約60%のメチル化である(5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、または約60%未満のメチル化

の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される場合の中レベルのメチル化は、CpG1における約5%～約60%のメチル化(約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%、約55%、または約60%未満のメチル化など、これらの値間の任意の範囲を含む)、及びPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位における約5%～約60%のメチル化である(5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、または約60%未満のメチル化の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。

## 【0086】

10

いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される高レベルのメチル化は、CpG1における約60%～約100%のメチル化である(60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、約99%超、または約100%のメチル化の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される高レベルのメチル化は、PD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位における約60%～約100%のメチル化である(60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%超、または約100%のメチル化の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、バイサルファイト次世代配列決定により判定される高レベルのメチル化は、CpG1における約60%～約100%のメチル化(かかる約60%、約60%超、約65%、約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%、約99%、約99%超、または約100%のメチル化の値間の任意の範囲を含む)、及びPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位における約60%～約100%のメチル化である(60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%超、または約100%のメチル化の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。

## 【0087】

20

ある特定の実施形態において、PD-L1プロモーター領域内のCpG1における及び/またはPD-L1のイントロン1内の1つ以上のCpG部位におけるメチル化度は、ILLUMINA(登録商標)のINFINIUM(登録商標)HumanMethylat ion 450 Bead Chipアレイなどのメチル化チップアレイを使用して判定される。簡潔に言うと、バイサルファイトを用いた処理後に、ゲノムDNAは、全ゲノム增幅され(WGA)、酵素的に断片化され、精製され、ヒトメチル化450 Bead Chipsに附加され、これは、99%のRefSeq遺伝子を包含する485,512個のプローブを含有する。プローブは、ショア領域及びmRNAプロモーター、ならびに非CpG部位の3091個のプローブにおいて、追加の包含を以って19,755個の特有のCpGアイランドを査定する。交雑の間、バイサルファイトで処理されたWGA-DNA分子は、個別のビーズの種類に連結する遺伝子座特異的FNAオリゴマーにアニールする。2つのビーズの種類は、各CpG遺伝子座に対応し、すなわち、一方はメチル化('C')に、及び他方は非メチル化('T')状態に対応する。対立遺伝子特異的プライマーのアニール後に、DNP及びビオチンで標識化されたddNTPを使用する单一塩基伸長法が続く。同じCpG遺伝子座に対する両方のビーズの種類は、CpG遺伝子座内の査定された'C'の前に塩基により判定された同じ種類に標識化されたヌクレオチドを組み込み、したがって、同色のチャンネル内で検出されるであろう。伸長後、アレイは、蛍光染色、かつスキャンされ、非メチル化及びメチル化のビーズの種類により産生されるシグナルの強度が測定される。各試料中の各遺伝子座に関して、DNAメチル化値を記録するためにソフトウェアが使用され、「ベータ値」として記載される。DNAメチル化ベータ値は、0～1の継続可変値であり、これは、メチル化ビーズの種類の強度の、組み合わされた遺伝子座の強度に対する比を示す。INFINIUM(登録商標)HumanMethylat ion 450 Bead Chipアレイ及びアッセイプラットフォームのさらなる詳

30

40

50

述は、例えば、Morris et al. (2015) Methods 72, 3-8、Sandoval et al. (2011) Epigenetics 6, 692-702、de Ruijter et al. (2015) Laboratory Investigation doi: 10.1038/labinvest.2015.53、Lehne et al. (2015) Genome Biology 16, 37-49に記載され、他の場所にも記載される。

#### 【0088】

いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の低レベルのメチル化は、CpG 1に関して約0～約0.2未満のベータ値である (0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、及び0.19の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の低レベルのメチル化は、PD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位に関して約0～約0.2未満のベータ値である (0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、及び0.19の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の低レベルのメチル化は、CpG 1に関して約0～約0.2未満ほどのベータ値 (0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、及び0.19の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)、及びPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位に関して約0～約0.2未満のベータ値である (0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05、0.06、0.07、0.08、0.09、0.1、0.11、0.12、0.13、0.14、0.15、0.16、0.17、0.18、及び0.19の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。

#### 【0089】

いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の中レベルのメチル化は、CpG 1に関して約0.2～約0.3のベータ値である (0.2、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、または0.29の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の中レベルのメチル化は、PD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位に関して約0.2～約0.3のベータ値である (0.2、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、または0.29の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の中レベルのメチル化は、CpG 1に関して約0.2～約0.3のベータ値 (0.2、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、0.28、または0.29の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)、及びPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位に関して約0.2～約0.3のベータ値である (0.2、0.21、0.22、0.23、0.24、0.25、0.26、0.27、

0.28、または0.29の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。

#### 【0090】

いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の高レベルのメチル化は、CpG1に関して約0.3超～約1.0のベータ値である (0.3超、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、または1.0の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の高レベルのメチル化は、PD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位に関して約0.3超～約1.0のベータ値である (0.3超、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、または1.0の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。いくつかの実施形態において、メチル化チップアレイ (INFINIUM (登録商標) HumanMethylation450 Bead Chipアレイなど) を使用して判定される場合の高レベルのメチル化は、CpG1に関して約0.3超～約1.0のベータ値 (0.3超、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、または1.0の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)、及びPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位に関して約0.3超～約1.0のベータ値である (0.3超、0.35、0.4、0.45、0.5、0.55、0.6、0.65、0.7、0.75、0.8、0.85、0.9、0.95、または1.0の値間の任意の範囲を含む、これらのうちのいずれか1つなど)。

#### 【0091】

いくつかの実施形態において、対象からの試料は、核酸 (ポリヌクレオチド、例えばゲノムDNA及び/または転写など) 及び/またはポリペプチドが単離され得る対象からの癌細胞及び/または腫瘍細胞を含有する生物学的組織または流体の生物学的試料 (エクスピボ生物学的試料など) である。いくつかの実施形態において、試料は、組織学目的のために採取されたものなどの組織の凍結切片を含む。いくつかの実施形態において、試料は、生体組織から採取される。いくつかの実施形態において、試料は、解剖から採取される。いくつかの実施形態において、試料は、凍結組織試料である。いくつかの実施形態において、試料は、対象から得られた採取したての試料である。いくつかの実施形態において、試料は、保存組織試料である。いくつかの実施形態において、試料は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 試料である。いくつかの実施形態において、試料は、対象からの組織に由来する外植片、または初代及び/もしくは形質転換細胞培養物である。

#### 【0092】

本明細書に記載される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料は、免疫細胞浸潤の根拠をさらに示す。ある特定の実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料中のCD16<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>、CD68<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>、またはCD8<sup>+</sup>リンパ球のうちのいずれか1つ以上の存在は、免疫細胞浸潤を示し、ある特定の実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料中のCD8<sup>+</sup>リンパ球の存在は、免疫細胞浸潤を示す。ある特定の実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料中のCD16<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>、CD68<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>、またはCD8<sup>+</sup>リンパ球のうちの1つ以上の存在が、当業者により周知されており、広く使用される免疫組織化学的 (IHC) アッセイを使用して検出される。かかる方法には、例えば、ウェスタンプロット、ELISA、及びフローサイトメトリーが含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料中のCD16<sup>+</sup>

、CD4<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>、CD56<sup>+</sup>、CD45<sup>+</sup>、CD68<sup>+</sup>、CD20<sup>+</sup>、CD163<sup>+</sup>、またはCD8<sup>+</sup>リンパ球のうちの1つ以上の存在は、定量PCR(qPCR)、qRT-PCR、トランスクリプトームプロファイリング(RNA配列など)、マイクロアレイ分析、次世代配列決定などが含まれるが、これらに限定されない遺伝子発現分析技法を使用して検出される。かかるサービスは、例えば、FLUIDIGM(登録商標)、NANO STRING TECHNOLOGIES(登録商標)などにより提供される。

#### 【0093】

ある特定の実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料は、PD-L1プロモーター領域内のCpG1及び/またはPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位において、中レベルのメチル化を有し、免疫細胞浸潤の根拠を有さない場合、対象は抗PD-L1抗体で治療されない。ある特定の実施形態において、対象からの癌細胞を含有する試料は、PD-L1プロモーター領域内のCpG1及び/またはPD-L1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のCpG部位において、中レベルのメチル化を有し、免疫細胞浸潤の根拠を有する場合、対象は抗PD-L1抗体で治療される。

#### 【0094】

##### 癌

本明細書に記載される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、癌は、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、またはリンパ系悪性腫瘍である。本明細書に記載される方法のいずれかのいくつかの実施形態において、癌は、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、白血病、またはリンパ系悪性腫瘍である。いくつかの実施形態において、癌は、扁平上皮癌(例えば、上皮性扁平上皮癌)、腹膜の癌、肝細胞癌、胃癌(gastric cancer)または胃癌(stomach cancer)(消化管癌及び消化管間質癌など)、肺腺癌、膠芽腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、尿路性の癌、肝細胞癌、結腸癌、直腸癌、結腸直腸癌(CRC)、子宮内膜癌または子宮癌腫、唾液腺癌腫、腎臓癌(kidney cancer)または腎臓癌(renal cancer)、前立腺癌、外陰部癌、甲状腺癌、肝癌腫、肛門癌腫、陰茎癌腫、多発性骨髄腫及び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、高悪性度免疫芽細胞性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小型非開裂細胞性NHL、巨大病変性NHL、マントル細胞リンパ腫、AIDS関連リンパ腫、及びヴァルデンストレームマクログロブリン血症など)、慢性骨髄芽球性白血病(CLL)、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、有毛細胞性白血病、慢性骨髄芽球性白血病、及び移植後リンパ増殖性障害(PTLD)、ならびに母斑症に関連する異常血管増殖、浮腫(脳腫瘍に関連するものなど)、メイグス症候群、脳癌、ならびに頭頸部癌、軟部組織肉腫、カポジ肉腫、カルチノイド癌腫、及び中皮腫、膠芽腫、神經芽細胞腫、ならびに関連する転移である。

#### 【0095】

ある特定の実施形態において、本発明の方法による治療を受け入れられる癌には、乳癌、肺癌、及び皮膚癌(それらの癌の転移型を含む)が含まれる。ある特定の実施形態において、乳癌は、乳癌腫である。いくつかの実施形態において、肺癌は、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌腫、または肺の扁平上皮癌腫である。ある特定の実施形態において、皮膚癌は、黒色腫、表在拡大型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端黒子型黒色腫、結節型黒色腫、皮膚癌腫、または膀胱癌である。

#### 【0096】

##### 抗PD-L1抗体

PD-L1(「プログラム死-リガンド1」としても既知である、PDCD1L1、PDCD1LG1、B7-H1、B7-H、及びCD274)は、活性化T細胞、B細胞、及び骨髄系細胞上で見られる受容体であるPD-1に結合する40kDa種1の膜貫通型タンパク質である。PD-L1とPD-1との係合は、IL-2産生及びT細胞増殖のTCR媒介性活性化を阻害するシグナルを送達する。PD-L1/PD-1経路は、主要な機序として結び付き、それにより、腫瘍が免疫系による排除を回避する(Lipscomb 50

E J , et al . Cancer Immunol Res 2013 ; 1 ( 1 ) : 54 - 63 )。理論に束縛されるわけではないが、抗 P D - L 1 抗体による P D - L 1 の阻害は、T 細胞の活性化を可能にし得、したがって、それらが癌細胞及び腫瘍細胞を効果的に検出し、攻撃する能力を復元する。

#### 【 0 0 9 7 】

本明細書で提供される方法のいずれか 1 つのある特定の実施形態において、抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）は、 P D - L 1 のその結合パートナーへの結合を阻害する。具体的な態様において、 P D - L 1 結合パートナーは、 P D - 1 及び / または B 7 - 1 である。ある特定の実施形態において、抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）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 、 M E D I 4 7 3 6 、及び M S B 0 0 1 0 7 1 8 C からなる群から選択される。 B M S - 9 3 6 5 5 9 としても既知である M D X - 1 1 0 5 は、 W O 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 に記載される抗 P D - L 1 抗体である。抗体 Y W 2 4 3 . 5 5 . S 7 0 （配列番号 2 0 及び 2 1 にそれぞれ示される重及び軽鎖可変領域配列）は、 W O 2 0 1 0 / 0 7 7 6 3 4 A 1 に記載される抗 P D - L 1 抗体である。 M E D I 4 7 3 6 は、 W O 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9 及び U S 2 0 1 3 / 0 3 4 5 5 9 に記載される抗 P D - L 1 抗体である。  
10

#### 【 0 0 9 8 】

本明細書で提供される方法に有用な抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）の例、及びそれらを作製するための方法は、 P C T 特許出願 W O 2 0 1 0 / 0 7 7 6 3 4 A 1 及び U S 8 , 2 1 7 , 1 4 9 に記載され、これらは、参考することにより本明細書に組み込まれる。  
20

#### 【 0 0 9 9 】

いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）は、 P D - L 1 と P D - 1 との間、及び / または P D - L 1 と B 7 - 1 との間の結合を阻害することができる。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 F a b 、 F a b ' - S H 、 F v 、 s c F v 、及び ( F a b ' ) 2 断片からなる群から選択される抗体断片である。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、ヒト化抗体である。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、ヒト抗体である。  
30

#### 【 0 1 0 0 】

いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域と、配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域とを含む。  
30

#### 【 0 1 0 1 】

一実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 H V R - H 1 、 H V R - H 2 、及び H V R - H 3 配列を含む重鎖可変領域ポリペプチドを含有し、  
30

( a ) H V R - H 1 配列は、 G F T F S X <sub>1</sub> S W I H (配列番号 1 ) であ  
り、

( b ) H V R - H 2 配列は、 A W I X <sub>2</sub> P Y G G S X <sub>3</sub> Y Y (配列番号 2 ) であ  
り、 A D S V K G  
40

( c ) H V R - H 3 配列は、 R H W P G G F D Y (配列番号 3 ) であ  
り、

さらに、 X <sub>1</sub> は D または G であり、 X <sub>2</sub> は S または L であり、 X <sub>3</sub> は T または S である。

#### 【 0 1 0 2 】

1 つの具体的な態様において、 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。別の態様において、ポリペプチドは、次の式に従う H V R 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：( H C - F R 1 ) - ( H V R - H 1 ) - ( H C - F R 2 ) - ( H V R - H 2 ) - ( H C - F R 3 ) - ( H V R - H 3 ) - ( H C - F R 4 )。さらに別の態様において、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  
50

する。さらなる態様において、フレームワーク配列は、V H 下位群 I I I コンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、フレームワーク配列のうちの少なくとも 1 つは、以下のものである。

H C - F R 1 は、E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L (配列番号 4) である。  
R L S C A A S

H C - F R 2 は、W V R Q A P G K G L E W V (配列番号 5) である。

H C - F R 3 は、R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N  
S L R A E D T A V Y Y C A R (配列番号 6) である。

H C - F R 4 は、W G Q G T L V T V S A (配列番号 7) である。 10

#### 【 0 1 0 3 】

なおもさらなる態様において、重鎖ポリペプチドは、H V R - L 1、H V R - L 2、及び H V R - L 3 を含む可変領域軽鎖とさらに組み合わされ、

( a ) H V R - L 1 配列は、R A S Q X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub> T X<sub>7</sub> (配列番号 8) であり、  
X<sub>8</sub> A

( b ) H V R - L 2 配列は、S A S X<sub>9</sub> L X<sub>10</sub> S (配列番号 9) であり、

( c ) H V R - L 3 配列は、Q Q X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> X<sub>13</sub> X<sub>14</sub> (配列番号 10) であり、  
P X<sub>15</sub> T 20

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

#### 【 0 1 0 4 】

なおもさらなる態様において、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。なおもさらなる態様において、軽鎖は、次の式に従う H V R 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：(L C - F R 1) - (H V R - L 1) - (L C - F R 2) - (H V R - L 2) - (L C - F R 3) - (H V R - L 3) - (L C - F R 4)。なおもさらなる態様において、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。なおもさらなる態様において、フレームワーク配列は、V L カッパ I コンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、フレームワーク配列のうちの少なくとも 1 つは、以下のものである。 30

L C - F R 1 は、D I Q M T Q S P S S L S A S V G D (配列番号 11) である。  
R V T I T C

L C - F R 2 は、W Y Q Q K P G K A P K L L I Y (配列番号 12) である。 40

L C - F R 3 は、G V P S R F S G S G S G T D F T L (配列番号 13) である。

T I S S L Q P E D F A T Y Y C

L C - F R 4 は、F G Q G T K V E I K R (配列番号 14) である。

#### 【 0 1 0 5 】

別の実施形態において、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む単離された抗 P D - L 1 抗体または抗原結合断片が提供され、

#### 【 0 1 0 6 】

重鎖は含み、H V R - H 1、H V R - H 2、及び H V R - H 3、さらに、

- ( i ) H V R - H 1 配列は、 G F T F S X<sub>1</sub> S W I H (配列番号 1) であり、  
 ( i i ) H V R - H 2 配列は、 A W I X<sub>2</sub> P Y G G S X<sub>3</sub> Y (配列番号 2) であり、  
 Y A D S V K G  
 ( i i i ) H V R - H 3 配列は、 R H W P G G F D Y、及び (配列番号 3) であり、

**【 0 1 0 7 】**

軽鎖は含み、 H V R - L 1、 H V R - L 2、及び H V R - L 3、さらに、

- ( i ) H V R - L 1 配列は、 R A S Q X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub> T X<sub>7</sub> X<sub>8</sub> (配列番号 8) であり、  
 A  
 ( i i ) H V R - L 2 配列は、 S A S X<sub>9</sub> L X<sub>10</sub> S、及び (配列番号 9) であり、  
 ( i i i ) H V R - L 3 配列は、 Q Q X<sub>11</sub> X<sub>12</sub> X<sub>13</sub> X<sub>14</sub> (配列番号 10) である。  
 P X<sub>15</sub> T、

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

**【 0 1 0 8 】**

具体的な態様において、 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。別の態様において、 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。さらに別の態様において、 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。

**【 0 1 0 9 】**

さらなる態様において、重鎖可変領域は、 ( H C - F R 1 ) - ( H V R - H 1 ) - ( H C - F R 2 ) - ( H V R - H 2 ) - ( H C - F R 3 ) - ( H V R - H 3 ) - ( H C - F R 4 ) のような H V R 間に並置された 1 つ以上のフレームワーク配列を含み、軽鎖可変領域は、 ( L C - F R 1 ) - ( H V R - L 1 ) - ( L C - F R 2 ) - ( H V R - L 2 ) - ( L C - F R 3 ) - ( H V R - L 3 ) - ( L C - F R 4 ) のような H V R 間に並置された 1 つ以上のフレームワーク配列を含む。なおもさらなる態様において、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。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、 K a b a t 下位群 I、 I I、または I I I 配列に由来する。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、 V H 下位群 I I I コンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列のうちの 1 つ以上は、以下のものである。

- H C - F R 1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C (配列番号 4)  
 A A S  
 H C - F R 2 W V R Q A P G K G L E W V V (配列番号 5)  
 H C - F R 3 R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A (配列番号 6)  
 E D T A V Y Y C A R  
 H C - F R 4 W G Q G T L V T V S A (配列番号 7)

**【 0 1 1 0 】**

なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、 K a b a t カッパ I、 I I

10

20

30

40

50

、 I I 、または I V 下位群配列に由来する。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、 V L カッパ I コンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列のうちの 1 つ以上は、以下のものである。

L C - F R 1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T (配列番号 1 1 )

C

L C - F R 2 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y (配列番号 1 2 )

L C - F R 3 G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L (配列番号 1 3 )

Q P E D F A T Y Y C

L C - F R 4 F G Q G T K V E I K R (配列番号 1 4 )

10

#### 【 0 1 1 1 】

なおもさらに具体的な態様において、抗体は、ヒトまたはマウス定常領域をさらに含む。なおもさらなる態様において、ヒト定常領域は、 I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 2 、 I g G 3 、 I g G 4 からなる群から選択される。なおもさらに具体的な態様において、ヒト定常領域は、 I g G 1 である。なおもさらなる態様において、マウス定常領域は、 I g G 1 、 I g G 2 A 、 I g G 2 B 、 I g G 3 からなる群から選択される。なおもさらなる態様において、 I g G 2 A の場合、マウス定常領域。なおもさらに具体的な態様において、抗体は、低減したかまたは最小のエフェクター機能を有する。なおもさらに具体的な態様において、最小のエフェクター機能は、「エフェクターなし F c 突然変異」またはアグリコシル化に起因する。なおもさらなる実施形態において、エフェクターなし F c 突然変異は、定常領域内の N 2 9 7 A または D 2 6 5 A / N 2 9 7 A 置換である。

20

#### 【 0 1 1 2 】

さらに別の実施形態において、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む抗 P D - L 1 抗体が提供され、

#### 【 0 1 1 3 】

重鎖はさらに含み、 G F T F S D S W I H (配列番号 1 5 ) 、 A W I S P Y G G S T Y Y A D S V K G (配列番号 1 6 ) 、及び R H W P G G F D Y (配列番号 3 ) に対して、それぞれ、少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する H V R - H 1 、 H V R - H 2 、及び H V R - H 3 配列、または

#### 【 0 1 1 4 】

30

軽鎖は、 R A S Q D V S T A V A (配列番号 1 7 ) 、 S A S F L Y S (配列番号 1 8 ) 、及び Q Q Y L Y H P A T (配列番号 1 9 ) に対して、それぞれ、少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する H V R - L 1 、 H V R - L 2 、及び H V R - L 3 配列をさらに含む。

#### 【 0 1 1 5 】

具体的な態様において、配列同一性は、 8 6 % 、 8 7 % 、 8 8 % 、 8 9 % 、 9 0 % 、 9 1 % 、 9 2 % 、 9 3 % 、 9 4 % 、 9 5 % 、 9 6 % 、 9 7 % 、 9 8 % 、 9 9 % 、または 1 0 0 % である。別の態様において、重鎖可変領域は、 ( H C - F R 1 ) - ( H V R - H 1 ) - ( H C - F R 2 ) - ( H V R - H 2 ) - ( H C - F R 3 ) - ( H V R - H 3 ) - ( H C - F R 4 ) のような H V R 間に並置された 1 つ以上のフレームワーク配列を含み、軽鎖可変領域は、 ( L C - F R 1 ) - ( H V R - L 1 ) - ( L C - F R 2 ) - ( H V R - L 2 ) - ( L C - F R 3 ) - ( H V R - L 3 ) - ( L C - F R 4 ) のような H V R 間に並置された 1 つ以上のフレームワーク配列を含む。さらに別の態様において、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。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、 K a b a t 下位群 I 、 I I 、または I I I 配列に由来する。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、 V H 下位群 I I I コンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列のうちの 1 つ以上は、以下のものである。

40

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCA (配列番号4)  
 AS

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (配列番号5)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAE (配列番号6)  
 DTAVYYCAR

HC-FR4 WGQGTLVTVSA (配列番号7)

## 【0116】

なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、KabatカッパI、II、III、またはIV下位群配列に由来する。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、VLカッパIコンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列のうちの1つ以上は、以下のものである。

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT (配列番号11)  
 C

LC-FR2 WYQQKPGKAPKL利Y (配列番号12)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSgtDFTLTISSL (配列番号13)  
 QPEDFATYYC

LC-FR4 FGQGTKVIEIKR (配列番号14) 20

## 【0117】

なおもさらに具体的な態様において、抗体は、ヒトまたはマウス定常領域をさらに含む。なおもさらなる態様において、ヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。なおもさらに具体的な態様において、ヒト定常領域は、IgG1である。なおもさらなる態様において、マウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3からなる群から選択される。なおもさらなる態様において、IgG2Aの場合、マウス定常領域。なおもさらに具体的な態様において、抗体は、低減したかまたは最小のエフェクター機能を有する。なおもさらに具体的な態様において、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」またはアグリコシル化に起因する。なおもさらなる実施形態において、エフェクターなしFc突然変異は、定常領域内のN297AまたはD265A/N297A置換である。

## 【0118】

なおもさらなる実施形態において、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む単離抗PD-L1抗体が提供され、

(a) 重鎖配列は、重鎖配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWIS PYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA (配列番号20) に対して少なくとも85%の配列同一性を有するか、または

(b) 軽鎖配列は、軽鎖配列：DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTTKVEIKR (配列番号21) に対して少なくとも85%の配列同一性を有する。

## 【0119】

具体的な態様において、配列同一性は、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%である。別の態様において、重鎖可変領域は、(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)のようなHVR間に並置された1つ以上のフレームワーク配列を含み、軽鎖可

10

30

40

50

変領域は、(L C - F R 1) - (H V R - L 1) - (L C - F R 2) - (H V R - L 2) - (L C - F R 3) - (H V R - L 3) - (L C - F R 4) のような H V R 間に並置された 1 つ以上のフレームワーク配列を含む。さらに別の態様において、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。さらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、K a b a t 下位群 I、I I、または I I I 配列に由来する。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、V H 下位群 I I I コンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列のうちの 1 つ以上は、以下のものである。

H C - F R 1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A (配列番号 4)  
A S

10

H C - F R 2 W V R Q A P G K G L E W V (配列番号 5)

H C - F R 3 R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E  
D T A V Y Y C A R (配列番号 6)

H C - F R 4 W G Q G T L V T V S A (配列番号 7)

#### 【 0 1 2 0 】

なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、K a b a t カッパ I、I I、I I、または I V 下位群配列に由来する。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、V L カッパ I コンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列のうちの 1 つ以上は、以下のものである。

20

L C - F R 1 D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C (配列番号 1 1)

L C - F R 2 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y (配列番号 1 2)

L C - F R 3 G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q  
P E D F A T Y Y C (配列番号 1 3)

L C - F R 4 F G Q G T K V E I K R (配列番号 1 4)

#### 【 0 1 2 1 】

なおもさらに具体的な態様において、抗体は、ヒトまたはマウス定常領域をさらに含む。なおもさらなる態様において、ヒト定常領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 2、I g G 3、I g G 4 からなる群から選択される。なおもさらに具体的な態様において、ヒト定常領域は、I g G 1 である。なおもさらなる態様において、マウス定常領域は、I g G 1、I g G 2 A、I g G 2 B、I g G 3 からなる群から選択される。なおもさらなる態様において、I g G 2 A の場合、マウス定常領域。なおもさらに具体的な態様において、抗体は、低減したかまたは最小のエフェクター機能を有する。なおもさらに具体的な態様において、最小のエフェクター機能は、原核細胞内での產生に起因する。なおもさらに具体的な態様において、最小のエフェクター機能は、「エフェクターなし F c 突然変異」またはアグリコシル化に起因する。なおもさらなる実施形態において、エフェクターなし F c 突然変異は、定常領域内の N 2 9 7 A または D 2 6 5 A / N 2 9 7 A 置換である。

30

#### 【 0 1 2 2 】

別のさらなる実施形態において、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む単離抗 P D - L 1 抗体が提供され、

40

( a ) 重鎖配列は、重鎖配列：E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G  
F T F S D S W I H W V R Q A P G K G L E W V A W I S P Y G G S T Y Y A D S V K G  
R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R R H W P G G F D  
Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 2 4) に対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有するか、または

( b ) 軽鎖配列は、軽鎖配列：D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S  
Q D V S T A V A W Y Q Q K P G K A P K L L I Y S A S F L Y S G V P S R F S G S G  
S G T D F T L T I S S L Q P E 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 2 1) に対して少なくとも 8 5 % の配列同一性を有する。

50

## 【0123】

なおもさらなる実施形態において、重鎖及び軽鎖可変領域配列を含む単離抗PDL1抗体が提供され、

(a) 重鎖配列は、重鎖配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGF  
TFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWI SPYGGSTYYADSVK  
GRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWP  
DYWGQGTLVTVSSASTK (配列番号28) に対して少なくとも85%の配列同一性を有するか、または

(b) 軽鎖配列は、軽鎖配列：DIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRAS  
QDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF LYSGVPSRFSGS  
GS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQG  
IKR (配列番号29) に対して少なくとも85%の配列同一性を有する。

## 【0124】

具体的な態様において、配列同一性は、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%である。別の態様において、重鎖可変領域は、(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)のようなHVR間に並置された1つ以上のフレームワーク配列を含み、軽鎖可変領域は、(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)のようなHVR間に並置された1つ以上のフレームワーク配列を含む。さらに別の態様において、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。さらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、Kabat下位群I、II、またはIII配列に由来する。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、VH下位群IIICコンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列のうちの1つ以上は、以下のものである。

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSC (配列番号4)  
AAS

HC-FR2 WVRQAPGKGLEWV (配列番号5)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRA  
EDTAVYYCAR

HC-FR4 WGQGTLVTVSS (配列番号25)

## 【0125】

なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、KabatカッパI、II、III、またはIV下位群配列に由来する。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、VLカッパIコンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列のうちの1つ以上は、以下のものである。

LC-FR1 DIQMTQSPSSL SASVGDRVTITC (配列番号11)  
LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (配列番号12)

LC-FR3 GVPNSRFSGSGSGTDFTLTISLQ (配列番号13)  
PEDFATYYC

LC-FR4 FGQGTTKVEIKR (配列番号14)

## 【0126】

なおもさらに具体的な態様において、抗体は、ヒトまたはマウス定常領域をさらに含む。なおもさらなる態様において、ヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。なおもさらに具体的な態様において、ヒト定常領域は、IgG1である。なおもさらなる態様において、マウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3からなる群から選択される。なおもさらなる態様に

10

20

30

40

50

おいて、IgG2Aの場合、マウス定常領域。なおもさらに具体的な態様において、抗体は、低減したかまたは最小のエフェクター機能を有する。なおもさらに具体的な態様において、最小のエフェクター機能は、原核細胞内での產生に起因する。なおもさらに具体的な態様において、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」またはアグリコシル化に起因する。なおもさらなる実施形態において、エフェクターなしFc突然変異は、定常領域内のN297AまたはD265A/N297A置換である。

#### 【0127】

さらに別の実施形態において、抗PD-1抗体は、MPDL3280A(CAS登録番号：1422185-06-5)である。なおもさらなる実施形態において、配列番号24の重鎖可変領域のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び/または配列番号25の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む単離抗PD-1抗体が提供される。なおもさらなる実施形態において、重鎖及び/または軽鎖配列を含む単離抗PDL-1抗体が提供され、

(a) 重鎖配列は、重鎖配列：EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKG  
RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF  
YWGQGTTLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCL  
VKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP  
AVLQSSGLYSLS  
VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT  
CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD  
VSHEDEP  
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQYASTYRVVSV  
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP  
APIEKTISKAKGQPRE  
PQVYTLP  
PPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS  
SDIAVEWE  
SNG  
Q  
OPENNYKTT  
PPVLD  
SDGSFFLYSKLT  
VDKSRWQQGNVFSC  
SVMHEALHNHYTQKSL  
LSPG(配列番号26)に対して、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%、もしくは100%の配列同一性を有するか、または

#### 【0128】

(b) 軽鎖配列は、軽鎖配列：DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRA  
SQDVSTA  
V  
AWYQQKPGKAPKLLI  
Y  
SASFLYSGVPSRFSGSG  
GSGTDFTLTISSLQ  
P  
EDFATYYCQQYLYHPATFGQG  
TKVE  
IKRTVAAPS  
V  
F  
PPS  
D  
EQ  
L  
K  
SGT  
A  
SV  
V  
C  
L  
L  
NNF  
Y  
P  
REAK  
V  
Q  
W  
K  
V  
D  
N  
A  
L  
Q  
S  
G  
N  
S  
Q  
E  
S  
V  
T  
E  
Q  
D  
S  
K  
D  
S  
T  
Y  
S  
L  
S  
S  
T  
L  
T  
L  
S  
K  
A  
D  
YE  
K  
H  
K  
V  
Y  
A  
C  
E  
V  
T  
H  
Q  
G  
L  
S  
S  
P  
V  
T  
K  
S  
F  
N  
R  
G  
E  
C(配列番号27)に対して、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%、もしくは100%の配列同一性を有する。

#### 【0129】

いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体の軽鎖または重鎖可変領域配列をコードする単離核酸が提供され、

(a) 重鎖はさらに含み、GFTFSDSWIH(配列番号15)、AWISPYGG  
STYYADSVKG(配列番号16)、及びRHWP  
PGGF  
DY(配列番号3)に対して、それぞれ、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、ならびに

(b) 軽鎖は、RASQDVSTA  
V  
A(配列番号17)、SASFLYS(配列番号18)、及びQQYLYHPAT(配列番号19)に対して、それぞれ、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。

#### 【0130】

10

20

30

40

50

具体的な態様において、配列同一性は、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%である。態様において、重鎖可変領域は、(H C - F R 1) - (H V R - H 1) - (H C - F R 2) - (H V R - H 2) - (H C - F R 3) - (H V R - H 3) - (H C - F R 4)のようなH V R間に並置された1つ以上のフレームワーク配列を含み、軽鎖可変領域は、(L C - F R 1) - (H V R - L 1) - (L C - F R 2) - (H V R - L 2) - (L C - F R 3) - (H V R - L 3) - (L C - F R 4)のようなH V R間に並置された1つ以上のフレームワーク配列を含む。さらに別の態様において、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。さらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、K a b a t下位群I、II、またはIII配列に由来する。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列は、V H下位群IIIコンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、重鎖フレームワーク配列のうちの1つ以上は、以下のものである。

H C - F R 1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C	(配列番号4)
	A A S	
H C - F R 2	W V R Q A P G K G L E W V	(配列番号5)
H C - F R 3	R F T I S A D T S K N T A Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R	(配列番号6)
H C - F R 4	W G Q G T L V T V S A	(配列番号7)

## 【0131】

なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、K a b a tカッパI、II、III、またはIV下位群配列に由来する。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列は、V LカッパIコンセンサスフレームワークである。なおもさらなる態様において、軽鎖フレームワーク配列のうちの1つ以上は、以下のものである。

L C - F R 1	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C	(配列番号11)
L C - F R 2	W Y Q Q K P G K A P K L L I Y	(配列番号12)
L C - F R 3	G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C	(配列番号13)
L C - F R 4	F G Q G T K V E I K R	(配列番号14)

## 【0132】

なおもさらに具体的な態様において、本明細書に記載される抗P D - L 1抗体は、ヒトまたはマウス定常領域をさらに含む。なおもさらなる態様において、ヒト定常領域は、IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4からなる群から選択される。なおもさらに具体的な態様において、ヒト定常領域は、IgG1である。なおもさらなる態様において、マウス定常領域は、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3からなる群から選択される。なおもさらなる態様において、IgG2Aの場合、マウス定常領域。なおもさらに具体的な態様において、抗体は、低減したかまたは最小のエフェクター機能を有する。なおもさらに具体的な態様において、最小のエフェクター機能は、原核細胞内での產生に起因する。なおもさらに具体的な態様において、最小のエフェクター機能は、「エフェクターなしF c突然変異」またはアグリコシル化に起因する。なおもさらなる態様において、エフェクターなしF c突然変異は、定常領域内のN 2 9 7 AまたはD 2 6 5 A / N 2 9 7 A置換である。

## 【0133】

なおもさらなる態様において、本明細書に記載される抗体のいずれかをコードする核酸が本明細書で提供される。いくつかの実施形態において、核酸は、本明細書に記載される抗P D - L 1抗体のいずれかをコードする核酸の発現に好適なベクターをさらに含む。なおもさらに具体的な態様において、ベクターは、核酸の発現に好適な宿主細胞をさらに含む。なおもさらに具体的な態様において、宿主細胞は、真核細胞または原核細胞である。

なおもさらに具体的な態様において、真核細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（C H O）などの哺乳動物細胞である。

#### 【0134】

抗体またはその抗原結合断片は、例えば、かかる抗体または断片を産生するのに好適な条件下で、発現に好適な形態にある前述の抗P D - L 1 抗体または抗原結合断片のうちのいずれかをコードする核酸を含有する宿主細胞を培養することと、抗体または断片を回復することと、を含む方法により、当技術分野で既知の方法を使用して作製され得る。

#### 【0135】

##### I V . 抗体の調製

本明細書で提供される方法、キット、及び製品は、P D - L 1 に結合する抗体を使用するか、または組み込む。かかる抗体を生成及び産生するための例示的な技法は、以下に記載される。

#### 【0136】

##### 抗原調製

P D - L 1 (細胞外ドメインなど)の可溶形態、または任意に他の分子に複合されるそれらの断片は、抗P D - L 1 抗体を生成するための及び／または抗P D - L 1 抗体を選別するための免疫原として使用され得る。あるいは、P D - L 1 を発現する細胞が、免疫原として、または選別するために使用され得る。かかる細胞は、天然源(例えば、癌細胞株)に由来し得るか、または膜貫通分子を発現するように組換え技法により形質転換されている細胞であり得る。抗P D - L 1 抗体を調製及び／または選別するのに有用なP D - L 1 の他の形態が、当業者には明らかであろう。

#### 【0137】

##### ポリクローナル抗体

ポリクローナル抗体は好ましくは、関連抗原及びアジュバントの複数の皮下(s c)または腹腔内(i p)注入により、動物において生じる。二機能性または誘導化剤、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複合)、N - ヒドロキシスクシンイミド(リジン残基を介する)、グルタールアルデヒド、コハク酸無水物、S O C 1<sub>2</sub>、またはR<sup>1</sup> N = C = N R(式中、R及びR<sup>1</sup>は異なるアルキル基である)を使用して、関連抗原を、免疫す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、またはダイズトリプシン阻害剤と複合することが有用であり得る。

#### 【0138】

動物は、例えば、100 μgまたは5 μgのタンパク質またはコンジュゲート(それぞれ、ウサギまたはマウスの場合)を、3体積のフロイントの完全なアジュバントと組み合わせ、複数の部位で溶液を皮内注入することにより、抗原、免疫原性コンジュゲート、または誘導体に対して免疫される。1ヶ月後、動物は、複数の部位での皮下注入により完全フロイントアジュバント中のペプチドまたはコンジュゲートの元の量の1/5～1/10で追加免疫される。7～14日後、動物から採血し、血清を抗体力価に関してアッセイする。動物は、力値がプラトーに到達するまで追加免疫される。いくつかの実施形態において、動物は、同じ抗原のコンジュゲートで追加免疫されるが、異なるタンパク質に複合され、かつ／または異なる架橋試薬により複合される。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でも作製され得る。さらに、ミョウバンなどの凝集剤が、免疫応答を増強するために好適に使用される。

#### 【0139】

##### モノクローナル抗体

モノクローナル抗体は、実質的に同種の抗体の集団から得られ、すなわち、その集団に含まれる個々の抗体は、同一であり、かつ／または同じエピトープに結合するが、モノクローナル抗体の產生中に生じる想定される変異体は除外され、かかる変異体は、概して、少量で存在する。したがって「モノクローナル」という修飾語は、個別のまたはポリクローナル抗体の混合物ではないような抗体の特徴を示す。

10

20

30

40

50

**【0140】**

例えば、モノクローナル抗体は、まずKohler et al., Nature, 256: 495 (1975)により記載されるハイブリドーマ法を使用して作製され得るか、または組換えDNA法により作製され得る（米国特許第4,816,567号）。

**【0141】**

ハイブリドーマ法において、マウス、またはハムスターなどの他の適切な宿主動物が、本明細書に記載されるように免疫化されて、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であろう抗体を産生するか、または産生することができるリンパ球が誘発される。あるいは、リンパ球は、インビトロで免疫化され得る。次いで、リンパ球は、ポリエチレングリコールなどの好適な融合剤を使用して骨髄腫細胞で融合されて、ハイブリドーマ細胞を形成する（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986)）。

**【0142】**

このように調製されたハイブリドーマ細胞は、播種され、非融合の親骨髄腫細胞の成長または生存を阻害する1つ以上の物質を好ましくは含有する好適な培養培地で成長する。例えば、親骨髄腫細胞が、酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスクレオマー（HGPRTまたはHprt）を欠く場合、ハイブリドーマのための培養培地は典型的には、ヒポキサンチン、アミノブテリン、及びチミジン（HAT培地）を含み、これらの物質は、HGPRT欠損細胞の成長を阻止する。

10

20

**【0143】**

いくつかの実施形態において、骨髄腫細胞は、効率的に融合し、選択された抗体産生細胞による安定した高レベルの抗体産生を支援し、HAT培地などの培地に感受性を示すものである。いくつかの実施形態において、とりわけ、骨髄腫細胞株は、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USAから入手可能なMOPC-21及びMPC-11マウス腫瘍、ならびにAmerican Type Culture Collection, Rockville, Maryland USAから入手可能なSP-2またはX63-Ag8-653細胞に由来するものなどのマウス骨髄腫株である。ヒト骨髄腫及びマウス・ヒトヘテロ骨髄腫細胞株も、ヒトモノクローナル抗体の産生に関して記載されている（Kozbor, J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51 - 63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)）。

30

**【0144】**

ハイブリドーマ細胞が成長する培養培地は、抗原に対して指向されたモノクローナル抗体の産生に関してアッセイされる。いくつかの実施形態において、ハイブリドーマ細胞により産生されたモノクローナル抗体の結合特異性は、免疫沈降によるか、または放射免疫アッセイ（RIA）もしくは酵素連結免疫吸収アッセイ（ELISA）などのインビトロ結合アッセイにより判定される。

40

**【0145】**

モノクローナル抗体の結合親和性は、例えば、Munson et al., Anal. Biochem., 107: 220 (1980)のスキヤチャード分析により判定され得る。

**【0146】**

所望の特異性、親和性、及び／または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞が特定された後、クローンは、限界希釈手順によりサブクローン化され、標準の方法により成長され得る（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp. 59 - 103 (Academic Press, 1986)）。この目的に好適な培養培地には、例えば、D-MEMまたは

50

RPMI - 1640 培地が含まれる。加えて、ハイブリドーマ細胞は、動物における腹水腫瘍としてインビボで成長し得る。

#### 【0147】

サブクローニにより分泌されるモノクローナル抗体は、例えば、タンパク質 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、または親和性クロマトグラフィーなどの従来の免疫グロブリン精製手順により、培養培地、腹水、または血清から好適に分離される。

#### 【0148】

モノクローナル抗体をコードするDNAは、従来の手順を使用して（例えば、マウス抗体の重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できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）容易に単離及び配列決定される。いくつかの実施形態において、ハイブリドーマ細胞は、かかるDNAの供給源としての機能を果たす。単離されると、DNAは発現ベクター内に配置され得、これは次いで、宿主細胞、例えばE. coli細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、あるいは免疫グロブリンタンパク質を産生しない骨髄腫細胞などにトランスフェクトされて、組換え宿主細胞内のモノクローナル抗体の合成体が得られる。抗体をコードするDNAの細菌における組換え発現に関する概説論文には、Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 - 262 (1993)、及びPluckthun, Immunol. Revs., 130: 151 - 188 (1992)が含まれる。

10

20

#### 【0149】

##### ライプラリ由来抗体

抗体または抗体断片は、McCafferty et al., Nature, 348: 552 - 554 (1990)に記載される技法を使用して生成された抗体ファージライプラリから単離され得る。Clackson et al., Nature, 352: 624 - 628 (1991)、及びMarks et al., J. Mol. Biol., 222: 581 - 597 (1991)は、それぞれ、ファージライプラリを使用したマウス及びヒト抗体の単離を記載する。続報は、鎖シャッフリングによる高親和性（nM範囲）ヒト抗体の産生（Marks et al., Bio/Technology, 10: 779 - 783 (1992)）、ならびに非常に大きなファージライプラリを構築するための方策としてのコンビナトリアル感染及びインビボ組換えを記載する（Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res., 21: 2265 - 2266 (1993)）。したがって、これらの技法は、モノクローナル抗体を単離するための従来のモノクローナル抗体ハイブリドーマ技法の実行可能な代替案である。

30

#### 【0150】

DNAは、例えば、同種マウス配列の代わりにヒト重及び軽鎖定常ドメインのコード配列の代わりに置換することによるか（米国特許第4,816,567号、Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81: 6851 (1984)）、または非免疫グロブリンポリペプチドのコード配列の全てもしくは一部を免疫グロブリンコード配列に共有結合することにより修飾され得る。

40

#### 【0151】

典型的には、かかる非免疫グロブリンポリペプチドは、抗体の定常ドメインの代わりに置換されるか、またはそれらが、抗体の1つの抗原結合部位の可変ドメインの代わりに置換されて、抗原に対して特異性を有する1つの抗原結合部位、及び異なる抗原に対して特異性を有する別の抗原結合部位を含むキメラ二価抗体を作製する。

#### 【0152】

本発明の抗体は、所望の活性（複数可）を有する抗体に関してコンビナトリアルライプラリを選別することにより単離され得る。例えば、実施例3に記載される方法などの、ファージディスプレイライプラリを生成し、かつ所望の結合特徴を有する抗体に関してかかるライプラリを選別するための多様な方法が当技術分野で知られている。追加の方法が、

50

例えば、Hoogenboom et al. in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) で概説されており、例えば、McCafferty et al., *Nature* 348:552-554、Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)、Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222:581-597 (1992)、Marks and Bradbury, in *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2):299-310 (2004)、Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5):1073-1093 (2004)、Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)、及びLee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2):119-132 (2004) にさらに記載される。  
10

#### 【0153】

ある特定のファージディスプレイ方法において、VH及びVL遺伝子のレパートリーがポリメラーゼ鎖反応 (PCR) により別個にクローニングされ、ファージライブラリ内で無作為に組換えられ、次いで、Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994) に記載されるような抗原結合ファージに関して選別され得る。ファージは典型的には、抗体断片を一本鎖 Fv (scFv) 断片または Fab 断片のいずれかとして表示する。免疫化源由来のライブラリは、ハイブリドーマの構築を必要とすることなく、免疫原に高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al., EMB O J, 12:725-734 (1993) に記載されるように、ナイープレパートリーがクローニング (例えば、ヒトから) されて、いずれの免疫化もなしに広範囲の非自己抗原及び自己抗原に対する抗体の単一源を提供し得る。最後に、Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381-388 (1992) により記載されるように、ナイープライブラリはまた、幹細胞由来の配列されていない V - 遺伝子セグメントをクローニングすることにより、及びランダム配列を含有する PCR プライマーを使用することにより合成作製されて、高可変 CDR3 領域をコードし、かつ再配列されたインビトロを達成し得る。ヒト抗体ファージライブラリを記載する特許公報には、例えば、米国特許第 5,750,373 号、及び米国特許公開第 2005/0079574 号、同第 2005/0119455 号、同第 2005/0266000 号、同第 2007/0117126 号、同第 2007/0160598 号、同第 2007/0237764 号、同第 2007/0292936 号、及び同第 2009/0002360 号が含まれる。  
20  
30

#### 【0154】

ヒト抗体ライブラリから単離された抗体または抗体断片は、本明細書においてヒト抗体またはヒト抗体断片と見なされる。

#### 【0155】

##### キメラ及びヒト化抗体

ある特定の実施形態では、本明細書に提供される抗体は、キメラ抗体である。ある特定のキメラ抗体が、例えば、米国特許第 4,816,567、及びMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984) に記載される。一例において、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、または非ヒト靈長類、例えば、サルに由来する可変領域) 及びヒト定常領域を含む。さらなる例において、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスから変化した「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。  
40

#### 【0156】

ある特定の実施形態において、キメラ抗体は、ヒト化抗体である。典型的には、非ヒト

50

抗体は、ヒトに対する免疫原性を低減する一方で、親非ヒト抗体の特異性及び親和性は保持するようにヒト化される。概して、ヒト化抗体は、HVR、例えば、CDR（または、それらの部分）が非ヒト抗体に由来し、FR（または、それらの部分）がヒト抗体配列に由来する1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部も含むであろう。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、例えば、抗体特異性または親和性を復元または改善するように、非ヒト抗体（例えば、HVR残基が由来する抗体）由来の対応する残基で置換される。

#### 【0157】

非ヒト抗体をヒト化するための方法は、当技術分野で記載されている。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、非ヒトである源からそれに導入される1つ以上のアミノ酸残基を有する。これらの非ヒトアミノ酸残基は、多くの場合、典型的には「移入」可変ドメインから得られる「移入」残基と称される。ヒト化は本質的に、Winter及び共同研究者らの方法に従い（Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986)、Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988)、Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988)）、超可変領域配列をヒト抗体の対応する配列の代わりに置換することにより行われ得る。したがって、かかる「ヒト化」抗体は、無傷のヒト可変ドメインより実質的により少ない部分が、非ヒト種由来の対応する配列により置換されているキメラ抗体である（米国特許第4,816,567）。実際に、ヒト化抗体は典型的には、いくつかの超可変領域残基、かつ場合によってはいくつかのFR残基が、齧歯類抗体中の類似部位からの残基により置換されているヒト抗体である。10

#### 【0158】

ヒト化抗体を作製するのに使用されるヒト可変ドメインの選択は、軽ドメイン及び重ドメインの両方とも、抗原性を低減するのに非常に重要である。いわゆる「最適合」方法によると、齧歯類抗体の可変ドメインの配列は、既知のヒト可変ドメイン配列の全ライブラリに対して選別される。次いで、齧歯類のものに最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク領域（FR）として受け入れられる（Sims et al., J. Immunol., 151: 2296 (1993)、Chothia et al., J. Mol. Biol., 196: 901 (1987)）。別の方法は、軽または重鎖可変領域の特定の下位群の全てのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定のフレームワーク領域を使用する。同じフレームワークが、いくつかの異なるヒト化抗体のために使用され得る（Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 89: 4285 (1992)、Presta et al., J. Immunol., 151: 2623 (1993)）。

#### 【0159】

抗体が、抗原に対する高親和性及び他の好ましい生物学的特性を保持してヒト化されることがさらに重要である。この目標を達成するために、本方法のいくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、親及びヒト化配列の三次元モデルを使用した、親配列及び様々な概念上のヒト化産生物の分析プロセスにより調製される。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に、利用可能であり、当業者にはよく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の推定される三次元立体配座構造を例示及び表示するコンピュータプログラムが利用可能である。これらのディスプレイの精査は、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性の高い役割の分析、すなわち、候補免疫グロブリンがその抗原に結合する能力に影響する残基の分析を可能にする。このように、標的抗原（複数可）に対する増加した親和性などの所望の抗体特徴が達成されるように、FR残基をレシピエント及び移入配列から選択し、組み合わされ得る。概して、超可変領域残基は、抗原結合への影響に直接的に、かつ最も実質的に関与している。40

#### 【0160】

上記のCDR配列は概して、ヒト軽鎖カッパ下位群I（V<sub>L</sub>6I）の実質的にヒトコンセンサスなFR残基、及びヒト重鎖下位群III（V<sub>H</sub>III）の実質的にヒトコンセン

10

20

30

40

50

サスなF R 残基などの、ヒト可変軽及びヒト可変重フレームワーク配列内に存在する。WO 2004 / 056312 ( Lowman et al . ) も参照されたい。

#### 【 0161 】

いくつかの実施形態において、可変重領域は、ヒト Ig G 鎮定常領域に結合し得、ここで、天然配列及び変異体定常領域を含む領域は、例えば、Ig G 1 または Ig G 3 であり得る。

#### 【 0162 】

いくつかの実施形態において、本明細書における抗体は、アミノ酸置換が、重鎖残基の EU 番号付けを使用した 298 、 333 、及び 334 位、好ましくは S298A 、 E333A 、及び K333A にあるものなどの、 ADCDC 活性を改善する Fc 領域内に少なくとも 1 つのアミノ酸置換をさらに含み得る。米国特許第 6,737,056 B1 号、 Presenta も参照されたい。これらの抗体のうちのいずれかは、 FcRn 結合または血清半減期、例えば、 N434W などの重鎖位置 434 での置換を改善する Fc 領域内に少なくとも 1 つの置換を含み得る。米国特許第 6,737,056 B1 号、 Presenta も参照されたい。これらの抗体のうちのいずれかは、例えば、少なくとも 326 位、好ましくは K326A または K326W での置換を含む、 CDC 活性を増加させる Fc 領域内に少なくとも 1 つのアミノ酸置換をさらに含み得る。米国特許第 6,528,624 B1 ( Idusogie et al . ) 号も参照されたい。

#### 【 0163 】

##### ヒト抗体

ヒト化の代替物として、ヒト抗体が生成され得る。例えば、免疫化すると内因性免疫グロブリン産生の不在下でヒト抗体の完全レパートリーを產生することができるトランスジェニック動物（例えば、マウス）を產生することが現在では可能である。例えば、キメラ及び生殖系列突然変異マウスにおける抗体重鎖結合領域 (JH) 遺伝子のホモ接合欠失が、内因性抗体産生の完全な阻害をもたらすことが記載されている。かかる生殖系突然変異マウス内にヒト生殖系免疫グロブリン遺伝子アレイを移動させると、抗原攻撃に際してヒト抗体の產生をもたらす。例えば、 Jakobovits et al . , Proc. Natl. Acad. Sci. USA , 90 : 2551 ( 1993 ) 、 Jakobovits et al . , Nature , 362 : 255 - 258 ( 1993 ) 、 Bruggermann et al . , Year in Immuno . , 7 : 33 ( 1993 ) 、ならびに米国特許第 5,591,669 号、同第 5,589,369 号、及び同第 5,545,807 号を参照されたい。

#### 【 0164 】

あるいは、ファージディスプレイ技術 ( McCafferty et al . , Nature 348 : 552 - 553 ( 1990 ) ) は、未免疫供与体の免疫グロブリン可変 (V) ドメイン遺伝子レパートリーから、ヒト抗体及び抗体断片をインビトロで產生するために使用され得る。この技法によると、抗体 V ドメイン遺伝子は、 M13 または fd などの糸状バクテリオファージの主要または非主要なコートタンパク質遺伝子にインフレームでクローン化され、ファージ粒子の表面上に機能的抗体断片として表示される。糸状粒子はファージゲノムの一本ストランド DNA コピーを含有することに因り、抗体の機能的特性に基づく選択は、結果として、それらの特性を呈する抗体をコードする遺伝子の選択にもなる。したがって、ファージは、 B 細胞の特性のいくつかを模倣する。ファージディスプレイは、多様な形式で行われ得、それらの概説に関しては、例えば、 Johnson , Kevin S. and Chiswell , David J. , Current Opinion in Structural Biology 3 : 564 - 571 ( 1993 ) を参照されたい。 V - 遺伝子セグメントのいくつかの源は、ファージディスプレイのために使用され得る。 Clackson et al . , Nature , 352 : 624 - 628 ( 1991 ) は、免疫化マウスの脾臓に由来する V 遺伝子の小さなランダムコンビナトリアルライブラリから、抗オキサゾロン抗体の多種多様なアレイを単離した。未免疫のヒト供与体由来の V 遺伝子のレパートリーは、構築され得、多種多様な抗原 ( 自

10

20

30

40

50

己抗原を含む)に対する抗体は、Marks et al., J. Mol. Biol. 222: 581 - 597 (1991)、またはGriffith et al., EMBO J. 12: 725 - 734 (1993)により記載される技法に本質的に従って単離され得る。米国特許第5,565,332号及び同第5,573,905号も参照されたい。

#### 【0165】

また、ヒト抗体は、インビトロ活性化B細胞により生成され得る(米国特許第5,567,610号及び同第5,229,275号を参照されたい)。

#### 【0166】

##### 抗体断片

10

抗体断片を産生するための様々な技法が開発されている。従来、これらの断片は、無傷抗体のタンパク質分解消化により得られていた(例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24: 107 - 117 (1992)、及びBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)を参照されたい)。しかし、これらの断片は、現在、組換え宿主細胞により直接産生され得る。例えば、抗体断片は、上記で考査される抗体ファージライブリから単離され得る。あるいは、Fab' - SH断片は、E. coliから直接回収され、化学的にカップリングして、F(ab')<sub>2</sub>断片を形成し得る(Carter et al., Bio/Technology 10: 163 - 167 (1992))。別の手法によると、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。抗体断片を産生するための他の技法が、当業者に明らかであろう。他の実施形態において、最適な抗体は、一本鎖Fv断片(scFv)である。WO 93/16185、米国特許第5,571,894号、及び米国特許第5,587,458号を参照されたい。抗体断片は、例えば、米国特許第5,641,870号に記載されるような「線状抗体」でもあり得る。かかる線状抗体断片は、单一特異性または二重特異性であり得る。

20

#### 【0167】

##### 多重特異性抗体

30

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、これらのエピトープは、通常、異なる抗原由来である。かかる分子が通常2つの異なるエピトープ(すなわち、二重特異性抗体、BsAb)のみに結合する一方で、三重特異性抗体などの追加の特異性を有する抗体は、本明細書で使用されるとき、この表現により包含される。二重特異性抗体は、全長抗体または抗体断片として調製され得る(例えば、F(ab')<sub>2</sub>二重特異性抗体)。

#### 【0168】

二重特異性抗体を作製するための方法は、当技術分野で知られている。全長二重特異性抗体の従来の产生は、2つの免疫グロブリン重鎖・軽鎖対の共発現に基づき、これらの2つの鎖は、異なる特異性を有する(Millstein et al., Nature, 305: 537 - 539 (1983))。免疫グロブリン重及び軽鎖のランダム分類により、これらのハイブリドーマ(クアドローマ)は、10個の異なる抗体分子の混合物を產生する可能性があり、これらのうちの1つのみが正しい二重特異性構造を有する。通常は親和性クロマトグラフィーステップにより行われる正しい分子の精製は、やや煩雑であり、生成物収率は低い。同様の手順が、WO 93/08829、及びTraunecker et al., EMBO J., 10: 3655 - 3659 (1991)で開示される。

40

#### 【0169】

当技術分野で既知の二重特異性抗体を作製するための1つの手法は、「ノブイントゥホール(knobs - into - holes)」または「プロチューバンスイントゥキャビティ(protruberance - into - cavity)」手法である(例えば、米国特許第5,731,168号を参照されたい)。この手法において、2つの免疫グロブ

50

リンポリペプチド（例えば、重鎖ポリペプチド）は各々、界面を含む。一方の免疫グロブリンポリペプチドの界面は、他方の免疫グロブリンポリペプチドの対応する界面と相互作用し、それにより、2つの免疫グロブリンポリペプチドが会合を可能にする。これらの界面は、一方の免疫グロブリンポリペプチドの界面に位置する「ノブ」または「プロチエバランス」（これらの用語は、本明細書で互換的に使用され得る）は、他方の免疫グロブリンポリペプチドの界面に位置する「ホール」または「キャビティ」（これらの用語は、本明細書で同義に使用され得る）に対応するように操作され得る。いくつかの実施形態において、ホールは、ノブと同一または同様のサイズのものであり、2つの界面が相互作用するときに、一方の界面のノブが他方の界面の対応するホール内に位置付け可能になるよう 10 に好適に位置付けられる。理論に束縛されることを望むものではないが、これは、ヘテロ多量体を安定させ、かつ他の種、例えば、ホモ多量体よりもヘテロ多量体の形成を好むと考えられる。いくつかの実施形態において、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、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作製するために使用され得る。

#### 【0170】

いくつかの実施形態において、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り構築され得る。いくつかの実施形態において、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り構築され得る。ノブまたはホールは、元の界面内に存在し得るか、または合成的に導入され得る。例えば、ノブまたはホールは、界面をコードする核酸配列を改変させて、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ことにより合成的に導入され得る。核酸配列を改変するための方法には、当技術分野で周知の標準の分子生物学技法が含まれ得る。様々なアミノ酸残基の側鎖体積は、以下の表に示される。いくつかの実施形態において、元の残基は、小さい側鎖体積（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、トレオニン、またはバリン）を有し、ノブを形成するための移入残基は、自然発生するアミノ酸であり、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を含み得る。いくつかの実施形態において、元の残基は、大きい側鎖体積（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）を有し、ホールを形成するための移入残基は、自然発生するアミノ酸であり、アラニン、セリン、トレオニン、及びバリンを含み得る。 20 30

表1 アミノ酸残基の特性

アミノ酸	一文字略語	質量 <sup>a</sup> (ダルトン)	体積 <sup>b</sup> (Å <sup>3</sup> )	利用可能な 表面範囲 <sup>c</sup> (Å <sup>2</sup> )
アラニン (A l a)	A	71.08	88.6	115
アルギニン (A r g)	R	156.20	173.4	225
アスパラギン (A s n)	N	114.11	117.7	160
アスパラギン酸 (A s p)	D	115.09	111.1	150
システイン (C y s)	C	103.14	108.5	135
グルタミン (G l n)	Q	128.14	143.9	180
グルタミン酸 (G l u)	E	129.12	138.4	190
グリシン (G l y)	G	57.06	60.1	75
ヒスチジン (H i s)	H	137.15	153.2	195
イソロイシン (I l e)	I	113.17	166.7	175
ロイシン (L e u)	L	113.17	166.7	170
リジン (L y s)	K	128.18	168.6	200
メチオニン (M e t)	M	131.21	162.9	185
フェニルアラニン (P h e)	F	147.18	189.9	210
プロリン (P r o)	P	97.12	122.7	145
セリン (S e r)	S	87.08	89.0	115
トレオニン (T h r)	T	101.11	116.1	140
トリプトファン (T r p)	W	186.21	227.8	255
チロシン (T y r)	Y	163.18	193.6	230
バリン (V a l)	V	99.14	140.0	155

<sup>a</sup> アミノ酸の分子量は、水の分子量を差し引いたものである。Hand book of Chemistry and Physics, 43<sup>rd</sup> ed. Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961の値。

<sup>b</sup> A. Azamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24: 107-123, 1972の値。

<sup>c</sup> C. Chothia, J. Mol. Biol. 105: 1-14, 1975の値。利用可能な表面範囲は、この参考文献の図6~20に定義されている。

#### 【0171】

いくつかの実施形態において、ノブまたはホールを形成するための元の残基は、ヘテロ多量体の三次元構造に基づいて特定される。当技術分野で既知の三次元構造を得るためにの技法には、X線結晶学及びNMRが含まれ得る。いくつかの実施形態において、界面は、免疫グロブリン定常ドメインのCH3ドメインである。これらの実施形態において、ヒト IgG<sub>1</sub> のCH3 / CH3界面は、4つの逆平行ストランド上に位置する各ドメイン上に16個の残基を伴う。理論に束縛されることを望むものではないが、突然変異残基は好ましくは、ノブがパートナーCH3ドメイン内の補償ホールよりむしろ周囲の溶媒により収容され得る危険性を最小限に抑えるように、2つの中央逆平行ストランド上に位置する。いくつかの実施形態において、2つの免疫グロブリンポリペプチド内の対応するノブ及びホールを形成する突然変異は、以下の表に提供される1つ以上の対に対応する。

10

20

30

40

表2：対応するノブ及びホール形成突然変異の例示的な組

第1の免疫グロブリンのCH3	第2の免疫グロブリンのCH3
T 3 6 6 Y	Y 4 0 7 T
T 3 6 6 W	Y 4 0 7 A
F 4 0 5 A	T 3 9 4 W
Y 4 0 7 T	T 3 6 6 Y
T 3 6 6 Y : F 4 0 5 A	T 3 9 4 W : Y 4 0 7 T
T 3 6 6 W : F 4 0 5 W	T 3 9 4 S : Y 4 0 7 A
F 4 0 5 W : Y 4 0 7 A	T 3 6 6 W : T 3 9 4 S
F 4 0 5 W	T 3 9 4 S

10

## 【0172】

突然変異は、元の残基、続いて、Kabat番号付けシステムを使用した位置、その後、移入残基により表示されている（全ての残基は、一文字のアミノ酸コードで示されている）。複数の突然変異は、コロンで区切られている。

## 【0173】

いくつかの実施形態において、免疫グロブリンポリペプチドは、上の表2に列挙される1つ以上のアミノ酸置換を含むCH3ドメインを含む。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、表2の左側の欄に列挙される1つ以上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と、表2の右側の欄に列挙される1つ以上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とを含む。

20

## 【0174】

上記で考察されるようにDNAを突然変異させた後、1つ以上の対応するノブ形成突然変異また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、当技術分野で既知の標準の組換え技法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5,731,168号、同第5,807,706号、同第5,821,333号、同第7,642,228号、同第7,695,936号、同第8,216,805号、米国公開第2013/0089553号、及びSpies et al., *Nature Biotechnology* 31:753-758, 2013を参照されたい。修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、E. coliなどの原核宿主細胞、またはCHO細胞などの真核宿主細胞を使用して産生され得る。対応するノブ及びホールを持つ免疫グロブリンポリペプチドは、共培養物中で、宿主細胞で発現され、ヘテロ多量体として一緒に精製され得るか、または単一培養物中で発現され、別個に精製され、インビトロで構築され得る。いくつかの実施形態において、細菌宿主細胞の2つの菌株（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）は、当技術分野で既知の標準の細菌培養技法を使用して共培養される。いくつかの実施形態において、2つの菌株は、例えば、培養物中で等しい発現レベルを達成するように、特定の比率で混合され得る。いくつかの実施形態において、2つの菌株は、50:50、60:40、または70:30の比率で混合され得る。ポリペプチドが発現した後、細胞が一緒に溶解され得、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量の測定を可能にする当技術分野で既知の標準の技法には、サイズ排除クロマトグラフィーが含まれ得る。いくつかの実施形態において、各修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、標準の組換え技法を使用して別個に発現され、それらはインビトロで一緒に構築され得る。構築は、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、それらを等しい質量で一緒に混合及びインキュベートし、ジスルフィドを還元し（例えば、ジチオスレイトールで処理することにより）、濃縮し、かつポリペプチドを再酸化することにより達成され得る。形成された二重特異性抗体は、カチオン交換クロマトグラフィーを含む標準の技法を使用して精製され得、サ

30

40

50

イズ排除クロマトグラフィーを含む標準の技法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関しては、Spieess et al., Nat Biotechnol 31: 753-8, 2013を参照されたい。いくつかの実施形態において、修飾された免疫グロブリンポリペプチドは、CHO細胞で別個に発現され、上述の方法を使用してインピトロで構築され得る。

#### 【0175】

異なる手法によると、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメイン（抗体・抗原の組み合わせ部位）が、免疫グロブリン定常ドメイン配列に融合される。融合は好ましくは、ヒンジ、CH2、及びCH3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。融合のうちの少なくとも1つに存在する、軽鎖結合に必要な部位を含有する第1の重鎖定常領域（CH1）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、所望の場合、免疫グロブリン軽鎖融合物をコードするDNAは、別個の発現ベクターに挿入され、好適な宿主生物に共トランスフェクトされる。これは、構築時に使用される不均等な比率の3つのポリペプチド鎖が最適収率を提供するとき、実施形態において、3つのポリペプチド断片の相互割合を調整する上で優れた柔軟性を提供する。しかし、等しい比率での少なくとも2つのポリペプチド鎖の発現が高収率をもたらすとき、またはそれらの比率が特に重要でないとき、2つまたは3つ全てのポリペプチド鎖のコード配列を1つの発現ベクターに挿入することが可能である。

#### 【0176】

この手法の一実施形態において、二重特異性抗体は、一方のアームにある第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と、他方のアームにある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）とからなる。二重特異性分子の半分のみでの免疫グロブリン軽鎖の存在が容易な分離方法を提供するため、この非対称構造が、望ましくない免疫グロブリン鎖の組み合わせからの所望の二重特異性化合物の分離を容易にすることが見出された。この手法は、WO 94/04690で開示されている。二重特異性抗体の生成のさらなる詳細に関しては、例えば、Suresh et al., Methods in Enzymology, 121: 210 (1986)を参照されたい。

#### 【0177】

WO 96/27011に記載される別の手法によると、1対の抗体分子間の界面は、組換え細胞培養物から回収されるヘテロ二量体の割合を最大にするように操作され得る。1つの界面は、抗体定常ドメインのCH3ドメインの少なくとも一部を含む。この方法において、第1の抗体分子の界面由来の1つ以上の小さいアミノ酸側鎖は、より大きい側鎖（例えば、チロシンまたはトリプトファン）で置き換えられる。大きい側鎖（複数可）と同一または同様のサイズの補償「キャビティ」は、大きいアミノ酸側鎖をより小さいアミノ酸側鎖（例えば、アラニンまたはトレオニン）で置き換えることにより第2の抗体分子の界面上に作製される。これは、ホモ二量体などの他の望ましくない最終産物よりもヘテロ二量体の収率を増加させるための機構を提供する。

#### 【0178】

二重特異性抗体は、架橋または「ヘテロコンジュゲート」抗体を含む。例えば、ヘテロコンジュゲート中の抗体の1つはアビジンにカップリングし、他のものはビオチンにカップリングし得る。かかる抗体は、例えば、免疫系細胞の標的を望ましくない細胞に絞るために（米国特許第4,676,980号）、及びHIV感染の治療のために提唱されている（WO 91/00360、WO 92/200373、及びEP 03089）。ヘテロコンジュゲート抗体は、任意の簡便な架橋方法を使用して作製され得る。好適な架橋剤が、当技術分野で周知されており、いくつかの架橋技法と併せて米国特許第4,676,980号で開示される。

#### 【0179】

抗体断片から二重特異性抗体を生成するための技法も文献に記載されている。例えば、二重特異性抗体は、化学連結を使用して調製され得る。Brennan et al.,

10

20

30

40

50

Science, 229: 81 (1985) は、無傷抗体がタンパク質分解的に切断されて、 $F(ab') 断片を生成する手順を記載する。これらの断片は、ジチオール錯化剤である亜ヒ酸ナトリウムの存在下で還元されて、隣接するジチオールを安定させ、分子間ジスルフィド形成を阻止する。次いで、生成された  $Fab'$  断片は、チオニトロベンゾエート (TNB) 誘導体に変換される。 $Fab' - TNB$  誘導体のうちの 1 つが、メルカプトエチルアミンでの還元により  $Fab' - \text{チオール}$  に再変換され、等モル量の他の  $Fab' - TNB$  誘導体と混合されて、二重特異性抗体が形成される。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。$

## 【0180】

近年の進歩により、化学的にカップリングされて二重特異性抗体を形成し得る  $Fab' - SH$  断片を *E. coli* から直接回収することが容易になった。Shalaby et al., J. Exp. Med., 175: 217 - 225 (1992) は、完全ヒト化二重特異性抗体  $F(ab')_2$  分子の産生を記載する。各  $Fab'$  断片は、*E. coli* から別個に分泌され、インビトロでの指向性化学的カップリングにかけられて、二重特異性抗体が形成された。

## 【0181】

組換え細胞培養物から直接的に二重特異性抗体断片を作製及び単離するための様々な技法も記載されている。例えば、二重特異性抗体は、ロイシンジッパーを使用して產生されている。Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5): 1547 - 1553 (1992)。Foss 及び Jun タンパク質由来のロイシンジッパーペプチドが、遺伝子融合により 2 つの異なる抗体の  $Fab'$  部分に連結した。抗体ホモ二量体がヒンジ領域で還元されてモノマーが形成され、次いで、再酸化されて、抗体ヘテロ二量体が形成された。この方法は、抗体ホモ二量体の產生のためにも利用され得る。Holinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 6444 - 6448 (1993) により記載される「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替機序を提供している。断片は、同じ鎖上の 2 つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーにより軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) に接続した重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) を含む。したがって、1 つの断片の  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインは、別の断片の相補的  $V_L$  及び  $V_H$  ドメインと対合させられ、それにより、2 つの抗原結合部位が形成される。一本鎖  $Fv$  ( $sFv$ ) 二量体の使用により二重特異性抗体断片を作製するための方策も報告されている。Gruber et al., J. Immunol., 152: 5368 (1994) を参照されたい。

## 【0182】

二重特異性抗体断片を作製するための別の技法は、「二重特異性 T 細胞エンゲージャー」または BiTE (登録商標) 手法である (例えば、WO 2004/106381、WO 2005/061547、WO 2007/042261、及び WO 2008/119567 を参照されたい)。この手法は、单一のポリペプチド上に配列された 2 つの抗体可変ドメインを利用する。例えば、单一のポリペプチド鎖は、可変重鎖 ( $V_H$ ) 及び可変軽鎖 ( $V_L$ ) ドメインを各々有する 2 つの一本鎖  $Fv$  ( $sFv$ ) 断片を含み、これらのドメインは、2 つのドメイン間の分子内会合を可能にする十分な長さのポリペプチドリンカーにより分離される。この单一のポリペプチドは、2 つの  $sFv$  断片間のポリペプチドスペーサー配列をさらに含む。各  $sFv$  は、異なるエピトープを認識し、2 つの異なる細胞の種類の細胞が、各  $sFv$  がその同族のエピトープと係合するときに近接するかまたは係留されるように、これらのエピトープは、異なる細胞の種類に対して特異的であり得る。この手法の 1 つの特定の実施形態は、免疫細胞により発現される細胞表面抗原を認識する  $sFv$ 、例えば、T 細胞上の CD3 ポリペプチドを含み、これは、悪性または腫瘍細胞などの標的細胞により発現される細胞表面抗原を認識する別の  $sFv$  に連結する。

## 【0183】

それが单一のポリペプチドであるため、二重特異性 T 細胞エンゲージャーは、当技術分野で既知の任意の原核または真核細胞発現系、例えば、CHO 細胞株を使用して発現され

10

20

30

40

50

得る。しかし、具体的な精製技法（例えば、E P 1 6 9 1 8 3 3 を参照されたい）が、モノマー二重特異性T細胞エンゲージャーを、モノマーの意図される活性以外の生物活性を有し得る他の多量体種から分離するために必要であり得る。1つの例示的な精製スキームにおいて、分泌ポリペプチドを含有する溶液はまず、金属親和性クロマトグラフィーにかけられ、ポリペプチドは、イミダゾール濃度の勾配を用いて溶出される。この溶出物は、アニ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用いて使用して溶出される。最後に、この溶出物は、サイズ排除クロマトグラフィーにかけられ、多量体種からモノマーが分離される。

## 【0184】

H o l l i n g e r e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 10 , 9 0 : 6 4 4 4 - 6 4 4 8 ( 1 9 9 3 ) により記載される「ダイアボディ」技術は、二重特異性抗体断片を作製するための代替機序を提供している。断片は、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーにより軽鎖可変ドメイン ( $V_L$ ) に接続した重鎖可変ドメイン ( $V_H$ ) を含む。したがって、1つの断片の  $V_H$  及び  $V_L$  ドメインは、別の断片の相補的  $V_L$  及び  $V_H$  ドメインと対合させられ、それにより、2つの抗原結合部位が形成される。一本鎖 F v ( s F v ) 二量体の使用により二重特異性抗体断片を作製するための別の方策も報告されている。G r u b e r e t a l . , J . I m m u n o l . , 1 5 2 : 5 3 6 8 ( 1 9 9 4 ) を参照されたい。

## 【0185】

二価を超え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。T u t t e t a l . J . I m m u n o l . 1 4 7 : 6 0 ( 1 9 9 1 )。

## 【0186】

複合、あるいは修飾された抗体

本明細書における方法で使用される抗体または製品に含まれる抗体は、細胞傷害性剤に任意に複合される。例えば、抗体は、W O 2 0 0 4 / 0 3 2 8 2 8 に記載されるような薬物に複合され得る。

## 【0187】

かかる抗体細胞傷害性剤コンジュゲートの生成において有用な化学療法剤が上述されている。

## 【0188】

抗体と、カリケアマイシン、メイタンシン（米国特許第5,208,020号）、トリコテン（t r i c h o t h e n e）、及びC C 1 0 6 5などの1つ以上の小分子毒素とのコンジュゲートも、本明細書で企図される。本発明の一実施形態において、抗体は、1つ以上のメイタンシン分子（例えば、抗体1分子あたり約1～約10のメイタンシン分子）に複合される。メイタンシンは、例えば、M a y - S S - M e に変換され得、これは、M a y - S H 3 に還元され、修飾された抗体と反応して（C h a r i e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 5 2 : 1 2 7 - 1 3 1 ( 1 9 9 2 ) ）マイタンシノイド抗体コンジュゲートが生成され得る。

## 【0189】

あるいは、抗体は、1つ以上のカリケアマイシン分子に複合される。抗生物質のカリケアマイシン族は、ピコモル以下の濃度で二本ストランドD N Aの切断を產生することができる。 $\text{I}_1$ 、 $\text{I}_2$ 、 $\text{I}_3$ 、N - アセチル -  $\text{I}_1$ 、P S A G、及び $\text{I}_1$ が含まれるが、これらに限定されないカリケアマイシンの構造的類似体が使用され得る（H i n m a n e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 5 3 : 3 3 3 6 - 3 3 4 2 ( 1 9 9 3 )、及びL o d e e t a l . C a n c e r R e s e a r c h 5 8 : 2 9 2 5 - 2 9 2 8 ( 1 9 9 8 )）。

## 【0190】

使用され得る酵素的に活性な毒素及びそれらの断片には、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（P s e u d o m o n a s a e r u g i n o s a 由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファ - サルシン、A l e u r i t

10

20

30

40

50

*es for d i i タンパク質、ジアンシンタンパク質、Phytolaca americanaタンパク質(PAPI、PAPII、及びPAP-S)、momordica charantia阻害剤、クルシン、クロチン、sapaponaria officinalis阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシン、及びトリコテセンが含まれる。例えば、1993年10月28日に公開されたWO93/21232を参照されたい。*

**【0191】**

本発明は、核酸分解活性(例えば、リボヌクレアーゼ、またはDNAエンドヌクレアーゼ、例えばデオキシリボヌクレアーゼ、DNase)を有する化合物と複合された抗体をさらに企図する。  
10

**【0192】**

多様な放射性同位体は、放射性複合抗体の產生のために利用可能である。例には、At<sup>211</sup>、I<sup>131</sup>、I<sup>125</sup>、Y<sup>90</sup>、Re<sup>186</sup>、Re<sup>188</sup>、Sm<sup>153</sup>、Bi<sup>212</sup>、P<sup>32</sup>、及びLuの放射性同位体が含まれる。

**【0193】**

抗体と細胞傷害性剤とのコンジュゲートは、N-サクシニミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオン酸塩(SPD P)、サクシニミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボン酸塩、イミノチオラン(ITT)、イミドエステルの二官能性誘導体(アジトイミド酸ジメチルHCLなど)、活性エステル(スペリン酸ジサクシニミジルなど)、アルデヒド(グルタレルデヒド(glutareldehyde)など)、ビス-アジド化合物(ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサンジアミンなど)、ビス-ジアゾニウム誘導体(ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミンなど)、ジイソシアネート(トリエン(tolyene)2,6-ジイソシアネートなど)、及びビス-活性フッ素化合物(1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼンなど)などの多様な二機能性タンパク質カップリング剤を使用して作製され得る。例えば、リシン免疫毒素は、Vitetta et al. Science 238:1098(1987)に記載されるように調製され得る。炭素-14-標識化1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミンペンタ酢酸(MX-DTPA)は、放射性ヌクレオチドを抗体に複合するための例示的なキレート剤である。WO94/11026を参照されたい。リンカーは、細胞内で細胞傷害性薬物の放出を容易にする「切断可能なリンカー」であり得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィドリンカー(Chari et al. Cancer Research 52:127-131(1992))が使用され得る。  
20

**【0194】**

あるいは、抗体及び細胞傷害性剤を含む融合タンパク質は、例えば、組換え技法またはペプチド合成により作製され得る。

**【0195】**

さらに別の実施形態において、抗体は、抗体受容体コンジュゲートが患者に投与される腫瘍事前標的化において利用するために「受容体」(かかるストレプトアビジン)に複合され得、続いて、非結合コンジュゲートが、除去剤を使用して血液循環から除去され、次いで、細胞傷害性剤(例えば、放射性ヌクレオチド)に複合される「リガンド」(例えば、アビジン)が投与される。  
40

**【0196】**

本発明の抗体は、前駆薬物(例えば、ペプチジル化学療法剤、WO81/01145を参照されたい)を活性抗癌薬物に変換する前駆薬物活性化酵素とも複合され得る。例えば、WO88/07378及び米国特許第4,975,278号を参照されたい。

**【0197】**

かかるコンジュゲートの酵素構成成分には、前駆薬物において、それをより活性な細胞傷害性形態に変換するような方法で作用することができる任意の酵素が含まれる。

**【0198】**

本発明の方法で有用である酵素には、リン酸塩含有前駆薬物を遊離薬物に変換するのに有用なアルカリホスファターゼ；硫酸塩含有前駆薬物を遊離薬物に変換するのに有用なアリールスルファターゼ；無毒性5-フルオロシトシンを抗癌薬物、5-フルオロウラシルに変換するのに有用なシトシンデアミナーゼ；ペプチド含有前駆薬物を遊離薬物に変換するのに有用なセラチアプロテアーゼ、サーモリシン、サブチリシン、カルボキシペプチダーゼ、及びカテプシン（例えば、カテプシンB及びL）などのプロテアーゼ；D-アミノ酸置換基を含有する前駆薬物を変換するのに有用なD-アラニルカルボキシペプチダーゼ；グリコシリ化前駆薬物を遊離薬物に変換するのに有用な-D-ガラクトシダーゼ及びノイラミニダーゼなどの炭水化物切断酵素、-ラクタムで誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用な-L-ラクタマーゼ、ならびにアミン窒素において、フェノキシアセチル基またはフェニルアセチル基でそれぞれ誘導体化された薬物を遊離薬物に変換するのに有用なペニシリンVアミダーゼまたはペニシリンGアミダーゼなどのペニシリンアミダーゼが含まれるが、これらに限定されない。あるいは、「アブザイム」としても当技術分野で既知の酵素活性を有する抗体が、本発明の前駆薬物を遊離活性薬物に変換するために使用され得る（例えば、Masssey, Nature, 328: 457-458 (1987)を参照されたい）。抗体アブザイムコンジュゲートは、本明細書に記載されるように、アブザイムを腫瘍細胞集団に送達するために調製され得る。

## 【0199】

本発明の酵素は、上記で考察されるヘテロ二機能性架橋試薬の使用などの、当技術分野で周知の技法により抗体に共有結合され得る。あるいは、本発明の酵素の少なくとも機能的に活性な部分に連結する本発明の抗体の抗原結合領域を少なくとも含む融合タンパク質は、当技術分野で周知の組換えDNA技法を使用して構築され得る（例えば、Neuberg et al., Nature, 312: 604-608 (1984)を参照されたい）。

## 【0200】

抗体の他の変形が本明細書で企図される。例えば、抗体は、多様な非タンパク質性ポリマー、例えば、ポリエチレンジリコール（PEG）、ポリエチレンジリコール、ポリオキシアルキレン、またはポリエチレンジリコール及びポリエチレンジリコールのコポリマーのうちの1つに連結し得る。いくつかの実施形態において、Fab'などの抗体断片は、1つ以上のPEG分子に連結する。

## 【0201】

本明細書で開示される抗体は、リポソームとしても製剤化され得る。抗体を含有するリポソームは、Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985)、Hwang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980)、米国特許第4,485,045号及び同第4,544,545号、ならびに1997年10月23日に公開されたWO97/38731に記載されるような、当技術分野で既知の方法により調製される。循環時間が向上したリポソームが、米国特許第5,013,556号で開示される。

## 【0202】

特に有用なリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン（PEG-PE）を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法により生成され得る。リポソームは、所定の細孔サイズのフィルターを通して押し出されて、所望の直径を有するリポソームが得られる。本発明の抗体のFab'断片は、ジスルフィド互換反応を介して、Martin et al. J. Biol. Chem. 257: 286-288 (1982)に記載されるようなリポソームに複合され得る。化学療法剤は任意に、リポソーム内に含有される。Gabizon et al. J. National Cancer Inst. 81 (19) 1484 (1989)を参照されたい。

## 【0203】

抗体変異体

10

20

30

40

50

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／または他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、適切なヌクレオチド変化を抗体核酸に導入することにより、またはペプチド合成により調製される。かかる修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、及び／またはそれへの挿入、及び／またはその置換が含まれる。欠失、挿入、及び置換の任意の組み合わせは、最終構築物に到達するためになされるが、但し、最終構築物が所望の特徴を有することを条件とする。アミノ酸変化は、抗体の翻訳後処理も改変し得、例えば、グリコシル化部位の数または位置を変化することができる。

#### 【0204】

突然変異生成の好ましい位置である抗体のある特定の残基または領域の特定に有用な方法は、Cunningham and Wells Science, 244: 1081-1085 (1989)により記載されるような「アラニンスキャニング突然変異生成」と呼ばれる。ここで、残基または標的残基群が特定され（例えば、arg、asp、his、lys、及びgluなどの荷電残基）、中性または負に荷電されたアミノ酸（最も好ましくはアラニンまたはポリアラニン）により置き換えられて、アミノ酸と抗原との相互作用に影響を及ぼす。次いで、置換に対する機能的感受性を実証するアミノ酸位置は、さらなるまたは他の変異体を置換部位に、またはその代わりに導入することにより洗練される。したがって、アミノ酸配列変異を導入するための部位が予め決定されている一方で、変異自体の性質は予め決定される必要はない。例えば、所与の部位での突然変異の性能を分析するために、alasキャニングまたはランダム突然変異生成が標的コドンまたは領域で実行され、発現された抗体変異体が所望の活性に関して選別される。

10

#### 【0205】

アミノ酸配列挿入には、長さが1残基から100以上の残基の範囲を含有するポリペプチドの範囲であるアミノ末端及び／またはカルボキシル末端の融合、ならびに単一また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、または細胞傷害性ポリペプチドに融合した抗体が含まれる。抗体分子の他の挿入変異体には、抗体の血清半減期を増加させる酵素またはポリペプチドの抗体のN-またはC末端への融合が含まれる。

20

#### 【0206】

別の種類の変異体は、アミノ酸置換変異体である。これらの変異体は、異なる残基により置き換えられた抗体分子内に少なくとも1つのアミノ酸残基を有する。抗体、抗体の置換突然変異生成のために最も重要な部位には、超可変領域が含まれるが、FR改変も企図される。保存的置換は、表3内の見出し「好ましい置換」の下に示される。かかる置換が生物活性の変化をもたらす場合、表3内の「例示的な置換」で表示されるより実質的な変化が導入され、産生物が選別され得る。

30

表3：保存的アミノ酸置換

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
A l a (A)	V a l、L e u、I l e	V a l
A r g (R)	L y s、G l n、A s n	L y s
A s n (N)	G l n、H i s、A s p、L y s、A r g	G l n
A s p (D)	G l u、A s n	G l u
C y s (C)	S e r、A l a	S e r
G l n (Q)	A s n、G l u	A s n
G l u (E)	A s p、G l n	A s p
G l y (G)	A l a	A l a
H i s (H)	A s n、G l n、L y s、A r g	A r g
I l e (I)	L e u、V a l、M e t、A l a、P h e、ノルロイシン	L e u
L e u (L)	ノルロイシン、I l e、V a l、M e t、A l a、P h e	I l e
L y s (K)	A r g、G l n、A s n	A r g
M e t (M)	L e u、P h e、I l e	L e u
P h e (F)	T r p、L e u、V a l、I l e、A l a、T y r	T y r
P r o (P)	A l a	A l a
S e r (S)	T h r	T h r
T h r (T)	V a l、S e r	S e r
T r p (W)	T y r、P h e	T y r
T y r (Y)	T r p、P h e、T h r、S e r	P h e
V a l (V)	I l e、L e u、M e t、P h e、A l a、ノルロイシン	L e u

## 【0207】

抗体の生物学的特性の実質的な修飾は、置換を選択することにより達成され、これらは、(a)置換領域におけるポリペプチド骨格の構造、例えば、シートもしくは螺旋立体配座、(b)標的部位における分子の荷電もしくは疎水性、または(c)側鎖のバルクの維持に対するそれらの影響が著しく異なる。アミノ酸は、それらの側鎖の特性の類似性に従って群分けされ得る(A. L. Lehninger, in Biochemistry, second ed., pp. 73-75, Worth Publishers, New York (1975))。

(1) 非極性: A l a (A)、V a l (V)、L e u (L)、I l e (I)、P r o (P)、P h e (F)、T r p (W)、M e t (M)

(2) 非荷電極性: G l y (G)、S e r (S)、T h r (T)、C y s (C)、T y r (Y)、A s n (N)、G l n (Q)

(3) 酸性: A s p (D)、G l u (E)

(4) 塩基性: L y s (K)、A r g (R)、H i s (H)

## 【0208】

あるいは、自然発生する残基は、共通の側鎖特性に基づいて群分けされ得る。

(1) 疎水性: ノルロイシン、M e t、A l a、V a l、L e u、I l e

(2) 中性親水性: C y s、S e r、T h r、A s n、G l n

(3) 酸性: A s p、G l u

(4) 塩基性: H i s、L y s、A r g

(5) 鎮配向に影響を及ぼす残基: G l y、P r o

10

20

30

40

50

(6) 芳香族 : T r p 、 T y r 、 P h e

【0209】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの 1 つのメンバーと別のクラスのメンバーとの交換を伴う。

【0210】

抗体の適切な立体配座の維持に関与しない任意のシステイン残基も概してセリンで置換されて、分子の酸化的安定性が改善され、異常な架橋が阻止され得る。逆に、システイン結合（複数可）は抗体に付加されて、その安定性を改善することができる（特に、抗体が Fv 断片などの抗体断片である場合）。

【0211】

特に好ましい種類の置換変異体は、親抗体の 1 つ以上の超可変領域残基を置換することに關与する。概して、さらなる開発のために選択されて得られた変異体（複数可）は、それらが生成される親抗体に対して改善された生物学的特性を有するであろう。かかる置換変異体を生成するための簡便な方法は、ファージディスプレイを使用した親和性成熟である。簡潔に言うと、いくつかの超可変領域部位（例えば、6 ~ 7 つの部位）が突然変異されて、各部位に全ての想定されるアミノ置換が生成される。このように生成された抗体変異体は、各粒子内にパッケージングされた M13 の遺伝子 I II 産物への融合物として糸状ファージ粒子からの一価様式で表示される。次いで、ファージディスプレイされた変異体は、本明細書で開示されるようなそれらの生物活性（例えば、結合親和性）に関して選別される。修飾のための候補超可変領域部位を特定するために、アラニンスキャニング突然変異生成が行われ、抗原結合に著しく寄与する超可変領域残基が特定され得る。あるいは、または加えて、抗原 - 抗体複合体の結晶構造を分析して、抗体と抗原との間の接触点を特定することが有益であり得る。かかる接触残基及び隣接残基は、本明細書に詳述される技法に従う置換の候補である。かかる変異体が生成されると、変異体のパネルが本明細書に記載されるように選別され、1 つ以上の関連アッセイで優れた特性を有する抗体がさらなる開発のために選択され得る。

【0212】

抗体の別の種類のアミノ酸変異体は、抗体の元のグリコシル化パターンを改変する。かかる改変には、抗体に見られる 1 つ以上の炭水化物部分の欠失、及び / または抗体に存在しない 1 つ以上のグリコシル化部位の付加が含まれる。

【0213】

ポリペプチドのグリコシル化は典型的には、N 連結型または O 連結型のいずれかである。N 連結は、炭水化物部分の、アスパラギン残基の側鎖への結合を指す。トリペプチド配列であるアスパラギン - X - セリン及びアスパラギン - X - レオニン（式中、X は、プロリン以外の任意のアミノ酸である）は、炭水化物部分の、アスパラギン側鎖への酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチド内のこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在は、潜在的なグリコシル化部位を作製する。O 連結グリコシル化は、糖類である N - アセイルガラクトサミン (acetyl galactosamine) 、ガラクトース、またはキシロースのうちの 1 つの、ヒドロキシアミノ酸、最も一般的にはセリンまたはトレオニンへの結合を指すが、5 - ヒドロキシプロリンまたは 5 - ヒドロキシリジンも使用され得る。

【0214】

グリコシル化部位の、抗体への付加は、(N 連結グリコシル化部位のための) 上述のトリペプチド配列のうちの 1 つ以上を含有するようにアミノ酸配列を改変することにより簡便に達成される。改変は、(O 連結グリコシル化部位のための) 元の抗体の配列への 1 つ以上のセリンまたはトレオニン残基の付加、またはそれによる置換によっても行われ得る。

【0215】

抗体が Fc 領域を含む場合、それに結合した炭水化物は改変され得る。例えば、抗体の Fc 領域に結合するフコースを欠く成熟炭水化物構造を有する抗体が、米国特許出願第 U

10

20

30

40

50

S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 A 1 ( P r e s t a , L . ) 号に記載され、 C D 2 0 抗体組成物に関しては同第 U S 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1 A 1 ( K y o w a H a k k o K o g y o C o . , L t d ) 号も参照されたい。抗体の F c 領域に結合する炭水化物中で二等分の N - アセチルグルコサミン ( G l c N A c ) を有する抗体が W O 0 3 / 0 1 1 8 7 8 , J e a n - M a i r e t e t a l . 、及び米国特許第 6 , 6 0 2 , 6 8 4 ( U m a n a e t a l . ) 号で参照される。抗体の F c 領域に結合するオリゴ糖中で少なくとも 1 つのガラクトース残基を有する抗体が、 W O 9 7 / 3 0 0 8 7 ( P a t e l e t a l . ) で報告され、それらの F c 領域に結合する改変された炭水化物を有する抗体に関しては W O 9 8 / 5 8 9 6 4 ( R a j u , S . ) 及び W O 9 9 / 2 2 7 6 4 ( R a j u , S . ) も参照されたい。

10

#### 【 0 2 1 6 】

いくつかの実施形態において、本明細書におけるグリコシリ化変異体は、 F c 領域を含み、ここで、炭水化物構造は、フコースを欠く F c 領域に結合する。かかる変異体は、改善された A D C C 機能を有する。任意に、 F c 領域は、 A D C C をさらに改善する 1 つ以上のアミノ酸置換、例えば、 F c 領域の 2 9 8 、 3 3 3 、及び / または 3 3 4 位 ( 残基の E u 番号付け ) での置換をそこでさらに含む。「脱フコシル化」または「フコース欠損」抗体に関する公報の例には、米国特許出願第 U S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 A 1 号、 P r e s t a , L 、 W O 0 0 / 6 1 7 3 9 A 1 、 W O 0 1 / 2 9 2 4 6 A 1 、 U S 2 0 0 3 / 0 1 1 5 6 1 4 A 1 、 U S 2 0 0 2 / 0 1 6 4 3 2 8 A 1 、 U S 2 0 0 4 / 0 0 9 3 6 2 1 A 1 、 U S 2 0 0 4 / 0 1 3 2 1 4 0 A 1 、 U S 2 0 0 4 / 0 1 1 0 7 0 4 A 1 、 U S 2 0 0 4 / 0 1 1 0 2 8 2 A 1 、 U S 2 0 0 4 / 0 1 0 9 8 6 5 A 1 、 W O 0 3 / 0 8 5 1 1 9 A 1 、 W O 0 3 / 0 8 4 5 7 0 A 1 、 W O 2 0 0 5 / 0 3 5 7 7 8 、 W O 2 0 0 5 / 0 3 5 5 8 6 ( フコシル化の R N A 阻害 ( R N A i ) を記載する ) 、 O k a z a k i e t a l . J . M o l . B i o l . 3 3 6 : 1 2 3 9 - 1 2 4 9 ( 2 0 0 4 ) 、 Y a m a n e - O h n u k i e t a l . B i o t e c h . B i o e n g . 8 7 : 6 1 4 ( 2 0 0 4 ) が含まれる。脱フコシル化抗体を産生する細胞株の例には、タンパク質フコシル化が欠損した L e c 1 3 C H O 細胞 ( R i p k a e t a l . A r c h . B i o c h e m . B i o p h y s . 2 4 9 : 5 3 3 - 5 4 5 ( 1 9 8 6 ) ) 、米国特許出願第 U S 2 0 0 3 / 0 1 5 7 1 0 8 A 1 号、 P r e s t a , L 、及び W O 2 0 0 4 / 0 5 6 3 1 2 A 1 , A d a m s e t a l . , 特に実施例 1 1 ) 、及びアルファ - 1 , 6 - フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、 F U T 8 、ノックアウト C H O 細胞などのノックアウト細胞株が含まれる ( Y a m a n e - O h n u k i e t a l . B i o t e c h . B i o e n g . 8 7 : 6 1 4 ( 2 0 0 4 ) ) 。

20

#### 【 0 2 1 7 】

抗体のアミノ酸配列変異体をコードする核酸分子は、当技術分野で既知の多様な方法により調製される。これらの方には、天然源からの単離 ( 自然発生するアミノ酸配列変異体の場合 ) またはオリゴヌクレオチド媒介性 ( または、部位指向された ) 突然変異生成による調製、 P C R 突然変異生成、及び事前に調製された変異体または非変異体版の抗体のカセット突然変異生成が含まれるが、これらに限定されない。

30

#### 【 0 2 1 8 】

例えば、抗体の抗原依存性細胞媒介細胞傷害性 ( A D C C ) 及び / または補体依存性細胞傷害性 ( C D C ) を増強するために、エフェクター機能に関して本発明の抗体を修飾することが望ましい場合がある。これは、 1 つ以上のアミノ酸置換を抗体の F c 領域内に導入することにより達成され得る。あるいはまたは加えて、システイン残基 ( 複数可 ) は、 F c 領域内に導入され得、それにより、この領域における鎖間ジスルフィド結合形成を可能にする。このように生成されたホモ二量体抗体は、改善された内部移行能力、ならびに / または増加した補体媒介性細胞殺滅及び抗体依存性細胞傷害性 ( A D C C ) を有し得る。 C a r o n e t a l . , J . E x p M e d . 1 7 6 : 1 1 9 1 - 1 1 9 5 ( 1 9 9 2 ) 、及び S h o p e s , B . J . I m m u n o l . 1 4 8 : 2 9 1 8 - 2 9 2 2 ( 1 9 9 2 ) を参照されたい。増強された抗腫瘍活性を有するホモ二量体抗体も、 W o l f f

40

50

et al. Cancer Research 53 : 2560 - 2565 (1993) に記載されるようなヘテロ二機能性架橋剤を使用して調製され得る。あるいは、二重Fc領域を有する抗体が操作され得、それにより、増強された補体溶解及びADCC能力を有し得る。Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3 : 219 - 230 (1989) を参照されたい。

#### 【0219】

WO00/42072 (Presta, L.) は、ヒトエフェクター細胞の存在下で改善されたADCC機能を有する抗体を記載し、ここで、抗体は、それらのFc領域内にアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、改善されたADCCを有する抗体は、Fc領域の298、333、及び/または334位での置換を含む。いくつかの実施形態において、改変されたFc領域は、これらの位置の1つ、2つ、3つにおいて置換を含むか、またはそれらからなるヒトIgG1のFc領域である。

#### 【0220】

改変されたC1q結合及び/または補体依存性細胞傷害性(CDC)を有する抗体が、WO99/51642、米国特許第6,194,551B1号、米国特許第6,242,195B1号、米国特許第6,528,624B1号、及び米国特許第6,538,124 (Idusogie et al.) 号に記載される。抗体は、それらのFc領域のアミノ酸位置270、322、326、327、329、313、333、及び/または334のうちの1つ以上でのアミノ酸置換を含む。

#### 【0221】

抗体の血清半減期を増加させるために、例えば、米国特許第5,739,277号に記載されるようなサルベージ受容体結合エピトープが抗体(特に、抗体断片)中に組み込まれ得る。本明細書で使用される場合、用語「サルベージ受容体結合エピトープ」は、IgG分子のインビボ血清半減期を増加させる原因となる、IgG分子(例えば、IgG<sub>1</sub>、IgG<sub>2</sub>、IgG<sub>3</sub>、またはIgG<sub>4</sub>)のFc領域のエピトープを指す。Fc領域内に置換及び増加した血清半減期を有する抗体も、WO00/42072 (Presta, L.) に記載される。

#### 【0222】

3つ以上(好ましくは4つ)の機能的抗原結合部位を有する操作抗体も、企図される(米国出願第US2002/0004587 A1号、Miller et al.)。

#### 【0223】

本発明の抗体は、当技術分野で既知であり、かつ容易に利用可能である追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾され得る。ある特定の実施形態において、抗体の誘導体化に好適な部分は、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、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コポリマー、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/無水マレイン酸コポリマー、ポリアミノ酸(ホモポリマーまたはランダムコポリマーのいずれか)、及びデキストランまたはポリ(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ホモポリマー、プロリプロピレンオキシド/エチレンオキシドコポリマー、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、ならびにそれらの混合物が含まれるが、これらに限定されない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に因り、製造時に有利であり得る。ポリマーは、任意の分子量のものであり得、分岐状または非分岐状であり得る。抗体に結合したポリマーの数は異なり得、1つを超えるポリマーが結合している場合、それらは、同じ分子または異なる分子であり得る。概して、誘導体化のために使用されるポリマーの数及び/または種類は、改善された抗体の特定の特性または機能、抗体の誘導体が所定の条件下で療法において使用されるかどうかなどを含むが、これらに限定されない検討事項に基づいて決定され得る。

#### 【0224】

10

20

30

40

50

### 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產生され得る。抗抗原抗体の組換え產生に関して、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)または発現のために複製可能なベクターに挿入される。抗体をコードするDNAは、容易に単離され得、従来の手順を使用して(例えば、抗体の重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できるオリゴヌクレオチドプローブを使用して)配列決定され得る。多くのベクターが利用可能である。ベクター構成成分には概して、以下のシグナル配列、複製起点、1つ以上のマーカー遺伝子、エンハンサー要素、プロモーター、及び転写終結配列のうちの1つ以上が含まれるが、これらに限定されない。

【0225】

10

### シグナル配列構成成分

本発明の抗体は、直接のみならず、異種ポリペプチドとの融合ポリペプチドとしても組換え的に產生され得、これは好ましくは、成熟タンパク質またはポリペプチドのN末端に特異的切断部位を有するシグナル配列または他のポリペプチドである。選択される異種シグナル配列は好ましくは、宿主細胞により認識及び処理される(例えば、シグナルペプチダーゼにより切断される)ものである。天然抗体シグナル配列を認識も処理もしない原核宿主細胞に関して、シグナル配列は、例えば、アルカリ性ホスファターゼ、ペニシリナーゼ、*lpp*、または熱安定性エンテロトキシンIリーダーの群から選択される原核シグナル配列により置換される。酵母分泌に関して、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、因子リーダー(*Saccharomyces*及び*Kluyveromyces*-因子リーダーを含む)、または酸性ホスファターゼリーダー、*C. albicans*グルコアミラーゼリーダー、またはWO90/13646に記載されるシグナルにより置換され得る。哺乳動物細胞発現において、哺乳動物シグナル配列、なら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。

【0226】

20

### 複製起点

発現及びクローニングベクターの両方は、1つ以上の選択された宿主細胞においてベクターの複製を可能にする核酸配列を含有する。概して、クローニングベクターにおいて、この配列は、宿主染色体DNAとは無関係にベクターの複製を可能にするものであり、これらには、複製起点または自己複製配列が含まれる。かかる配列は、多様な細菌、酵母、及びウイルスに関して周知されている。プラスミドpBR322由來の複製起点が大半のグラム陰性細菌に好適であり、2μプラスミド起点が酵母に好適であり、様々なウイルス起点(SV40、ポリオーマ、アデノウイルス、VSV、またはBPV)が哺乳動物細胞におけるクローニングベクターに有用である。一般に、複製起点構成成分は、哺乳動物発現ベクターに必要とされない(SV40起点は、初期プロモーターを含有することに因り、典型的に使用され得る。

30

【0227】

### 選択遺伝子構成成分

発現及びクローニングベクターは、選択遺伝子、別名、選択可能なマーカーを含有し得る。典型的な選択遺伝子は、(a)抗生物質もしくは他の毒素、例えば、アンピシリン、ネオマイシン、メトトレキサート、もしくはテトラサイクリンへの耐性を与えるか、(b)栄養要求性欠損を補完するか、または(c)複合培地から入手不可能な必須の栄養素、例えば、*Bacillus*のためのD-アラニンラセマーゼをコードする遺伝子を供給するタンパク質をコードする。

40

【0228】

選択スキームの一例は、宿主細胞の成長を停止する薬物を利用する。異種遺伝子を用いた形質転換に成功した細胞は、薬物耐性を与え、したがって選択レジメンで生き残るタンパク質を產生する。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。

【0229】

50

哺乳動物細胞に好適な選択可能なマーカーの別の例は、D H F R、グルタミンシンテターゼ ( G S )、チミジンキナーゼ、メタロチオネイン - I 及び - I I 、好ましくは、靈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の抗体コード核酸を取り込むための細胞構成成分の特定を可能にするものである。

#### 【 0 2 3 0 】

例えは、D H F R 遺伝子で形質転換された細胞は、D H F R の競合アンタゴニストであるメトトレキサート ( M t x ) を含有する培養培地中で形質転換体を培養することにより特定される。これらの条件下で、D H F R 遺伝子は、任意の他の共形質転換された核酸とともに増幅される。内因性 D H F R 活性が欠損したチャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞株 ( 例えは、A T C C C R L - 9 0 9 6 ) が使用され得る。

10

#### 【 0 2 3 1 】

あるいは、G S 遺伝子で形質転換された細胞は、G S 阻害剤である L - メチオニンスルホキシミン ( M s x ) を含有する培養培地中で形質転換体を培養することにより特定される。これらの条件下で、G S 遺伝子は、任意の他の共形質転換された核酸とともに増幅される。G S 選択 / 増幅系が、上述のD H F R 選択 / 増幅系と組み合わせて使用され得る。

#### 【 0 2 3 2 】

あるいは、目的の抗体をコードするD N A 配列、野生型D H F R 遺伝子、及び例えは、アミノグリコシド3' - ホスホトランスフェラーゼ ( A P H ) などの別の選択可能なマーカーで形質転換または共形質転換された宿主細胞 ( 特に、内因性D H F R を含有する野生型宿主 ) は、アミノグリコシド抗生物質、例えは、カナマイシン、ネオマイシン、またはG 4 1 8 などの選択可能なマーカー用の選択剤を含有する培地中の細胞成長により選択され得る。米国特許第4,965,199号を参照されたい。

20

#### 【 0 2 3 3 】

酵母での使用に好適な選択遺伝子は、酵母プラスミドY R p 7 中に存在するt r p 1 遺伝子である ( S t i n c h c o m b e t a l . , N a t u r e , 2 8 2 : 3 9 ( 1 9 7 9 ) )。t r p 1 遺伝子は、トリプトファン、例えは、A T C C 番号4 4 0 7 6 またはP E P 4 - 1 で成長する能力を欠く酵母の突然変異菌株のための選択マーカーを提供する。J o n e s , G e n e t i c s , 8 5 : 1 2 ( 1 9 7 7 )。次いで、酵母宿主細胞ゲノム中でのt r p 1 病変の存在は、トリプトファンの不在下での成長による形質転換の検出に有効な環境を提供する。同様に、L e u 2 が欠損した酵母菌株 ( A T C C 2 0 , 6 2 2 または3 8 , 6 2 6 ) は、L e u 2 遺伝子を持つ既知のプラスミドにより補完される。

30

#### 【 0 2 3 4 】

加えて、1.6 μmの環状プラスミドp K D 1 由来のベクターが、K l u y v e r o m y c e s 酵母の形質転換に使用され得る。あるいは、組換え仔牛キモシンの大規模産生のための発現系としてK . l a c t i s が報告された。V a n d e n B e r g , B i o / T e c h n o l o g y , 8 : 1 3 5 ( 1 9 9 0 )。K l u y v e r o m y c e s の工業用菌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した多コピー発現ベクターも開示されている。F l e e r e t a l . , B i o / T e c h n o l o g y , 9 : 9 6 8 - 9 7 5 ( 1 9 9 1 ) .

40

#### 【 0 2 3 5 】

##### プロモーター構成成分

発現及びクローニングベクターは概して、宿主生物により認識され、かつ抗体をコードする核酸に作動可能に連結するプロモーターを含有する。原核宿主との使用に好適なプロモーターには、p h o A プロモーター、 - ラクタマーゼ及びラクトースプロモーター系、アルカリ性ホスファターゼプロモーター、トリプトファン ( t r p ) プロモーター系、ならびにt a c プロモーターなどのハイブリッドプロモーターが含まれる。しかし、他の既知の細菌プロモーターも好適である。細菌系で使用するためのプロモーターは、抗体をコードするD N A に作動可能に連結するシャイン・ダルガノ ( S . D . ) 配列も含有するであろう。

#### 【 0 2 3 6 】

50

真核生物のプロモーター配列が既知である。実質的に全ての真核遺伝子が、転写が始まる部位からおよそ25～30塩基上流に位置するATに富んだ領域を有する。多くの遺伝子の転写開始から70～80塩基上流に見られる別の配列は、Nが任意のヌクレオチドであり得るCNCATA領域である。大半の真核遺伝子の3'末端は、コード配列の3'末端へのポリA尾部の付加のためのシグナルであり得るATAAA配列である。これらの配列の全てが、真核発現ベクターに好適に挿入される。

#### 【0237】

酵母宿主との使用に好適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または他の解糖酵素のプロモーター、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が含まれる。

#### 【0238】

成長条件により制御された転写のさらなる利点を有する誘導可能な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、イソシトクロムC、酸性ホスファターゼ、窒素代謝に関連する分解酵素、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、ならびにマルトース及びガラクトース利用の原因となる酵素のプロモーター領域である。酵母発現での使用に好適なベクター及びプロモーターは、EP73, 657にさらに記載される。酵母エンハンサーも酵母プロモーターとともに有利に使用される。

#### 【0239】

哺乳動物宿主細胞中のベクターからの抗体転写は、例えば、ポリオーマウイルス、鶏痘ウイルス、アデノウイルス(アデノウイルス2など)、ウシ乳頭腫ウイルス、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)などのウイルスのゲノムから、また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も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得られるプロモーターにより制御され得るが、但し、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。

#### 【0240】

SV40ウイルスの初期及び後期プロモーターは、SV40ウイルス複製起点も含有するSV40制限断片として簡便に得られる。ヒトサイトメガロウイルスの最初期プロモーターは、HindIII-E制限断片として簡便に得られる。ウシ乳頭腫ウイルスをベクターとして使用して哺乳動物宿主におけるDNAを発現させるための系は、米国特許第4,419,446号で開示される。この系の変化形は、米国特許第4,601,978号に記載される。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内のヒト-インターフェロンcDNAの発現に関しては、Reyes et al., Nature 297: 598-601(1982)も参照されたい。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。

#### 【0241】

##### エンハンサー要素構成成分

より高次の真核生物による本発明の抗体をコードするDNAの転写は、多くの場合、エンハンサー配列をベクターに挿入することにより増加する。哺乳動物遺伝子(グロビン、エラスターゼ、アルブミン、-フェトプロテイン、及びインスリン)由来の多くのエンハンサー配列が現在知られている。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が使用されるであろう。例には、複製起点の後半側のSV40エンハンサー(bp 100～270)、サイトメガロウイルス初期プロモーターエンハンサー、複製起点の後半側のポリオーマエンハンサー、及びアデノウイルスエンハンサーが含まれる。真核プロモーターの活性化のための増強要素に関しては、Yaniv, Nature 297: 17-18(1982)も参照されたい。エンハンサーは、抗体コード配列の5'位または

10

20

30

40

50

3' 位でベクターにスプライスされ得るが、好ましくは、プロモーターから 5' 部位に位置する。

#### 【0242】

##### 転写終結構成成分

真核宿主細胞（酵母、真菌、昆虫、植物、動物、ヒト、または他の多細胞生物由来の有核細胞）で使用される発現ベクターは、転写終結及びmRNAの安定化に必要な配列も含有するであろう。かかる配列は一般的に、真核またはウイルスDNAまたはcDNAの5' 非翻訳領域、時折、3' 非翻訳領域から入手可能である。これらの領域は、抗体をコードするmRNAの非翻訳部分内のポリアデニル化断片として転写されたヌクレオチドセグメントを含有する。1つの有用な転写終結構成成分は、ウシ成長ホルモンポリアデニル化領域である。WO94/11026及びそれらで開示される発現ベクターを参照されたい。  
10

#### 【0243】

##### 宿主細胞の選択及び形質転換

本明細書におけるベクター内のDNAのクローニングまたは発現に好適な宿主細胞は、上述の原核生物、酵母、または高等真核生物の細胞である。この目的に好適な原核生物には、グラム陰性またはグラム陽性の生物などの真正細菌、例えば、EscherichiaなどのEnterobacteriaceae、例えば、E. coli、Enterobacter、Erwinia、Klebsiella、Proteus、Salmonella、例えば、Salmonella typhimurium、Serratia、例えば、Serratia marcescans、及びShigella、ならびにB. subtilis及びB. licheniformisなどのBacilli（例えば、1989年4月12日に公開されたDD266,710で開示されるB. licheniformis 41P）、P. aeruginosaなどのPseudomonas、ならびにStreptomycesが含まれる。1つの好ましいE. coliクローニング宿主は、E. coli 294 (ATCC 31,446) であるが、E. coli B、E. coli X1776 (ATCC 31,537)、及びE. coli W3110 (ATCC 27,325)などの他の菌株も好適である。これらの例は、限定するものではなく、例示するものである。  
20

#### 【0244】

全長抗体、抗体融合タンパク質、及び抗体断片は、特に、グリコシリ化及びFcエフェクター機能が必要とされないとき、例えば、治療抗体が、単独で腫瘍細胞破壊における効果を示す細胞傷害性剤（例えば、毒素）に複合されるとき、細菌内で産生され得る。全長抗体は、血液循環におけるより優れた半減期を有する。E. coliでの産生がより迅速であり、より費用効率が高い。細菌内の抗体断片及びポリペプチドの発現に関して、例えば、米国特許第5,648,237 (Carter et al.)号、米国特許第5,789,199 (Joly et al.)号、米国特許第5,840,523 (Simmons et al.)号を参考されたく、これらは、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。Charlton, Methods in Molecular Biology, Vol. 248 (B. K. C. Loo, ed., Humana Press, Totowa, N. J., 2003), pp. 245-254も参考されたく、これは、E. coli内の抗体断片の発現を記載する。発現後、抗体は、可溶性画分中のE. coli細胞ペーストから単離され得、例えば、アイソタイプに応じてタンパク質AまたはGカラムにより精製され得る。最終精製は、例えば、CHO細胞で発現された抗体を精製するためのプロセスと同様に行われ得る。  
40

#### 【0245】

原核生物に加えて、糸状真菌または酵母などの真核微生物が、抗体コードベクターに好適なクローニングまたは発現宿主である。Saccharomyces cerevisiae、または一般的なパン酵母が、下等真核生物宿主微生物の中で最も一般的に使用されているものである。しかし、Schizosaccharomyces pombe；  
50

例えば、*K. lactis*、*K. fragilis*(ATCC 12,424)、*K. bulgaricus*(ATCC 16,045)、*K. wickeramii*(ATCC 24,178)、*K. waltii*(ATCC 56,500)、*K. drosophilae*(ATCC 36,906)、*K. thermotolerans*、及び*K. marxianus*などの*Kluyveromyces*宿主；*yarrowiae*(EP 402,226)；*Pichia pastoris*(EP 183,070)；*Candida*；*Trichoderma reesiae*(EP 244,234)；*Neurospora crassa*；*Schwanniomyces occidentalis*などの*Schwanniomyces*；さらに、糸状真菌、例えば、*Neurospora*、*Penicillium*、*Tolypocladium*、ならびに*A. nidulan*s及び*A. niger*などの*Aspergillus*宿主などの、いくつかの他の属、種、及び菌株が、一般的に利用可能であり、本明細書において有用である。治療的タンパク質の产生のための酵母及び糸状菌の使用を考察している概説に関しては、例えば、*Gerngross, Nat. Biotech.* 22 : 1409 - 1414 (2004)を参照されたい。  
10

#### 【0246】

グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的または完全ヒトグリコシル化パターンを有する抗体の产生をもたらす、ある特定の真菌及び酵母菌株が選択され得る。例えば、*Liet al.*, *Nat. Biotech.* 24 : 210 - 215 (2006)(*Pichia pastoris*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 et al.*(上記参照)を参照されたい。  
20

#### 【0247】

グリコシル化抗体の発現に好適な宿主細胞は、多細胞生物(無脊椎動物及び脊椎動物)にも由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物及び昆虫細胞が含まれる。多数のバキュロウイルス菌株及び変異体、ならびに*Spodoptera frugiperda*(イモムシ)、*Aedes aegypti*(蚊)、*Aedes albopictus*(蚊)、*Drosophila melanogaster*(ショウジョウバエ)、及び*Bombyx mori*などの宿主由来の対応する許容昆虫宿主細胞が特定されている。トランスフェクションのための多様なウイルス菌株、例えば、*Autographa californica NPV*のL-1変異体及び*Bombyx mori NPV*のBm-5菌株が公的に利用可能であり、かかるウイルスは、特に*Spodoptera frugiperda*細胞のトランスフェクションのために、本発明による本明細書におけるウイルスとして使用され得る。  
30

#### 【0248】

綿、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(*Leninaceae*)、ムラサキウマゴヤシ(*M. truncatula*)、及びタバコの植物細胞培養物も宿主として利用され得る。例えば、米国特許第5,959,177号、同第6,040,498号、同第6,420,548号、同第7,125,978号、及び同第6,417,429号(トランスジェニック植物における抗体の产生のためのPLANT IBODIES(商標)技術を記載している)を参照されたい。  
40

#### 【0249】

脊椎動物細胞は、宿主として使用され得、培養物中の脊椎動物細胞の繁殖(組織培養物)は、日常的な手順になっている。有用な哺乳動物宿主細胞株の例は、SV40により形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7、ATCC CRL 1651)、ヒト胚腎臓株(293細胞または懸濁培養物中の成長のためにサブクローニングされた293細胞、*Graham et al.*, *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、AT  
50

C C C C L 2 )、イヌ腎臓細胞 ( M D C K 、 A T C C C C L 3 4 )、バッファローラット肝細胞 ( B R L 3 A 、 A T C C C R L 1 4 4 2 )、ヒト肺細胞 ( W 1 3 8 、 A T C C C C L 7 5 )、ヒト肝細胞 ( H e p G 2 、 H B 8 0 6 5 )、マウス乳房腫瘍 ( M M T 0 6 0 5 6 2 、 A T C C C C L 5 1 )、T R I 細胞 ( M a t h e r et al . , A n n a l s N . Y . A c a d . S c i . 3 8 3 : 4 4 - 6 8 ( 1 9 8 2 ) )、M R C 5 細胞、F S 4 細胞、及びヒト肝臓癌株 ( H e p G 2 ) である。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、D H F R - C H O 細胞を含むチャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞 ( U r l a u b et al . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 7 7 : 4 2 1 6 ( 1 9 8 0 ) )、ならびに N S 0 及び S p 2 / 0 などの骨髄腫細胞株が含まれる。抗体産生に好適な特定の哺乳動物宿主細胞株の概説に関しては、  
10 例えば、Y a z a k i and W u , M e t h o d s i n M o l e c u l a r B i o l o g y , V o l . 2 4 8 ( B . K . C . L o , ed . , H u m a n a P r e s s , T o t o w a , N . J . , 2 0 0 3 ) , p p . 2 5 5 - 2 6 8 を参照されたい。

#### 【 0 2 5 0 】

宿主細胞は、抗体産生のために上述の発現またはクローニングベクターで形質転換され、プロモーターの誘導、形質転換対の選択、または所望の配列をコードする遺伝子の増幅に適切なものとして修飾された従来の栄養素培地中で培養される。

#### 【 0 2 5 1 】

##### 宿主細胞の培養

本発明の抗体を産生するために使用される宿主細胞は、多様な培地中で培養され得る。  
20 H a m ' s F 1 0 ( S i g m a ) 、最小必須培地 ( ( M E M ) 、 ( S i g m a ) 、 R P M I - 1 6 4 0 ( S i g m a ) 、及びダルベッコ修飾イーグル培地 ( ( D M E M ) 、 S i g m a ) などの市販される培地は、宿主細胞を培養するのに好適である。加えて、H a m et al . , M e t h . E n z . 5 8 : 4 4 ( 1 9 7 9 ) 、 B a r n e s et al . , A n a l . B i o c h e m . 1 0 2 : 2 5 5 ( 1 9 8 0 ) 、米国特許第 4 , 7 6 7 , 7 0 4 号、同第 4 , 6 5 7 , 8 6 6 号、同第 4 , 9 2 7 , 7 6 2 号、同第 4 , 5 6 0 , 6 5 5 号、もしくは同第 5 , 1 2 2 , 4 6 9 号、W O 9 0 / 0 3 4 3 0 、W O 8 7 / 0 0 1 9 5 、または米国特許再発行第 3 0 , 9 8 5 号に記載される培地のいずれも、宿主細胞のための培養培地として使用され得る。これらの培地のいずれにも、必要に応じて、ホルモン及び/または他の成長因子 ( インスリン、トランスフェリン、または上皮成長因子など) 、塩 ( 塩化ナトリウム、カルシウム、マグネシウム、及びリン酸塩など) 、緩衝液 ( H E P E S など) 、ヌクレオチド ( アデノシン及びチミジンなど) 、抗生物質 ( G E N T A M Y C I N ( 商標 ) 薬物など) 、微量元素 ( マイクロモルの範囲の最終濃度で通常存在する無機化合物と定義される) 、ならびにグルコースまたは同等のエネルギー源が補充され得る。任意の他の必要な補充物も、当業者には既知であろう適切な濃度で含まれ得る。温度、p H などの培養条件は、発現のために選択された宿主細胞とともにこれまでに使用されているものであり、当業者には明らかであろう。  
30

#### 【 0 2 5 2 】

##### 抗体の精製

組換え技法を使用するとき、抗体は、細胞内、細胞膜周辺腔内で産生されてもよいし、または培地に直接分泌されてもよい。抗体が細胞内で産生される場合、第 1 のステップとして、微粒子残屑 ( 宿主細胞または溶解断片のいずれか ) が、例えば、遠心分離または限外濾過により除去される。C a r t e r et al . , B i o / T e c h n o l o g y 1 0 : 1 6 3 - 1 6 7 ( 1 9 9 2 ) は、E . c o l i の細胞膜周辺腔に分泌される抗体を単離するための手順を記載する。簡潔に言うと、細胞ペーストが、酢酸ナトリウム ( p H 3 . 5 ) 、E D T A 、及びフッ化フェニルメチルスルホニル ( P M S F ) の存在下で、約 3 0 分にわたって融解される。細胞残屑は、遠心分離により除去され得る。抗体が培地に分泌される場合、かかる発現系の上清は概して、市販のタンパク質濃縮フィルター、例えば、A m i c o n または M i l l i p o r e P e l l i c o n 限外濾過ユニットを使用して、まず濃縮される。P M S F などのプロテアーゼ阻害剤は、タンパク質分解を阻害  
40  
50

するために前述のステップのうちのいずれかに含まれ得、抗生物質は、外来性汚染物質の成長を阻止するために含まれ得る。

#### 【0253】

細胞から調製された抗体組成物は、例えば、ヒドロキシ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、及び親和性クロマトグラフィーを使用して精製され得、親和性クロマトグラフィーが典型的に好ましい精製ステップのうちの1つである。親和性リガンドとしてのタンパク質Aの好適性は、抗体体内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応じる。タンパク質Aは、ヒト1、2、または4重鎖に基づく抗体を精製するために使用され得る(Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。タンパク質Gは、全てのマウスアイソタイプ及びヒト3に対して推奨される(Guss et al., EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。親和性リガンドが結合する基質は、ほとんどの場合アガロースであるが、他の基質も利用可能である。制御細孔ガラスまたはポリ(スチレンジビニル)ベンゼンなどの機械的に安定した基質は、アガロースで達成され得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.)が精製に有用である。イオン交換カラム上での分画、エタノール沈降、逆相HPLC、シリカ上でのクロマトグラフィー、アニオンまたはカチオン交換樹脂(ポリアスパラギン酸カラムなど)上でのヘパリンSEPHAROSE(商標)クロマトグラフィー上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降などのタンパク質精製のための他の技法も、回収される抗体に応じて利用可能である。10

#### 【0254】

概して、研究、試験、及び臨床で使用するための抗体を調製するための様々な方法論が当技術分野で十分に確立されており、上述の方法論と一致しており、かつ/または当業者により目的の特定の抗体に適切であると見なされる。

#### 【0255】

##### 生物学的に活性な抗体の選択

上述のように産生された抗体は、治療的観点から有益な特性を有する抗体を選択するか、または抗体の生物活性を保持する製剤及び条件を選択するために、1つ以上の「生物活性」アッセイにかけられ得る。抗体は、それが産生される抗原に結合するその能力について試験され得る。例えば、当技術分野で既知の方法(例えば、ELISA、ウエスタンプロットなど)が使用され得る。30

#### 【0256】

例えば、抗PDL1抗体の場合、抗体の抗原結合特性は、PDL1に結合する能力を検出するアッセイで評価され得る。いくつかの実施形態において、抗体の結合は、例えば、飽和結合、ELISA、及び/または競合アッセイ(例えば、RIA's)により判定され得る。抗体は、例えば、治療薬としてのその有効性を評価するために、他の生物活性アッセイにもかけられ得る。かかるアッセイは、当技術分野で既知であり、抗体の標的抗原及び意図される使用に応じる。例えば、抗体によるPD-L1遮断の生物学的效果は、CD8+T細胞、リンパ球性脈絡膜炎ウイルス(LCMV)マウスモデル、及び/または例えば、米国特許第8,217,149号に記載されるような同系腫瘍モデルにおいて評価され得る。40

#### 【0257】

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、例示的な抗PDL1抗体の、PDL1への結合を遮断するもの)に関して選別するために、Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane(1988)に記載されるものなどの通常の交差遮断アッセイが行われ得る。あるいは、例えば、Champe et al., J. Biol. Chem. 270: 1388-1394(1)50

995)に記載されるようなエピトープマッピングが、抗体が目的のエピトープに結合するかどうかを判定するために行われ得る。

#### 【0258】

##### V. 薬学的製剤

本発明に従って使用される抗体の治療製剤は、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、所望の純度を有する抗体を、任意の薬学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) と混合することにより、保管用に調製される。許容可能な担体、賦形剤、または安定化剤は、用いられる投与量及び濃度でレシピエントに対して無毒であり、これらには、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝液；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチルアルコールまたはベンジルアルコール；メチルパラベンまたはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；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-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；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、もしくはリジンなどのアミノ酸；グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む单糖類、二糖類、及び他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖類；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；ならびに/またはTween (商標)、Pluronics (商標)、もしくはポリエチレングリコール (PEG)などの非イオン性界面活性剤が含まれる。  
10

#### 【0259】

皮下投与のために適合された凍結乾燥製剤は、米国特許第6,267,958 (Andya et al.)号に記載される。かかる凍結乾燥製剤は、好適な希釈剤により高タンパク質濃度に再構成されてもよく、この再構成された製剤は、本明細書で治療される哺乳動物に皮下投与され得る。

#### 【0260】

抗体（複数可）の結晶化形態も企図される。例えば、US2002/0136719A1 (Shenoy et al.) を参照されたい。  
30

#### 【0261】

本明細書における製剤は、治療されている特定の適応症に必要な、1つを超える活性化合物、いくつかの実施形態において、互いに有害な影響を及ぼさない相補的な活性を有するものも含有し得る。例えば、細胞傷害性剤；化学療法剤；免疫抑制剤；サイトカイン；サイトカインアンタゴニストもしくは抗体；成長因子；ホルモン；インテグリン；インテグリンアンタゴニストもしくは抗体（例えば、Genentechから市販されるエファリズマブ/RAPTAIVAなどのLFA-1抗体、またはナタリズマブ/TYSABRI（登録商標）Biogen Idec/Elan Pharmaceuticals, Inc. から入手可能）などのアルファ4インテグリン抗体）；IFN-ベータ-1a (REBIF (登録商標) 及びAVONEX (登録商標)) もしくはIFN-ベータ-1b (BETASERON (登録商標))などのインターフェロンクラスの薬物；オリゴペプチド、かかる酢酸グラチラマー(COPAXONE (登録商標))；ミトキサントロン( NOVANTRONE (登録商標))、メトトレキサート、シクロホスファミド、クロラムブシル、もしくはアザチオプリンなどの細胞傷害性剤；静注用免疫グロブリン（ガンマグロブリン）；リンパ球減損薬物（例えば、ミトキサントロン、シクロホスファミド、Camptath、抗CD4、またはクラドリビン）；非リンパ球減損免疫抑制薬物（例えば、ミコフェノール酸モフェチル(MMF) またはシクロスボリン）；「スタチン」クラスのコレステロール低下薬物；エストラジオール；テストステロン；ホルモン補充療法；二次MSもしくはMSに関する症状（例えば、痙攣、失禁、痛み、疲労）を治療する薬物；  
40  
50

T N F 阻害剤；疾患修飾性抗リウマチ薬物（D M A R D）；非ステロイド性抗炎症薬物（N S A I D）；コルチコステロイド（例えば、メチルプレドニゾロン、プレドニゾン、デキサメタゾン、またはグルココルチコイド）；レボチロキシン；シクロスボリンA；ソマタスタチン（s o m a t a s t a t i n）類似体；サイトカインアンタゴニスト；抗代謝剤；免疫抑制剤；インテグリンアンタゴニストもしくは抗体（例えば、エファリズマブなどのL F A - 1 抗体またはナタリズマブなどのアルファ4インテグリン抗体）；または別のB細胞表面アンタゴニスト／抗体などを、製剤の形態でさらに提供することが望ましい場合もある。かかる他の薬剤の種類及び有効量は、例えば、製剤中に存在する抗体の量、治療されている多発性硬化症の種類、及び患者の臨床的パラメータに応じる。これらは概して、それまでに使用されたのと同じ投与量及び投与経路か、またはそれまでに用いられた投与量の約1～99%で使用される。

#### 【0262】

活性成分はまた、例えばコアセルベーション技法または界面重合により調製されたマイクロカプセル、例えはそれぞれヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチン-マイクロカプセル及びポリ-（メチルメタチレート）マイクロカプセル中に、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロ乳濁液、ナノ粒子、及びナノカプセル）中に、またはマクロ乳濁液中に取り込まれ得る。かかる技法は、R e m i n g t o n ' s P h a r m a c e u t i c a l S c i e n c e s 1 6 t h e d i t i o n , O s o l , A . E d . ( 1 9 8 0 ) で開示される。

#### 【0263】

徐放性調製物が調製され得る。徐放性調製物の好適な例には、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリックスが含まれ、これらのマトリックスは、成形物品、例えば、フィルム、またはマイクロカプセルの形態である。徐放性マトリックスの例には、ポリエステル、ヒドロゲル（例えは、ポリ（2-ヒドロキシエチル-メタクリレート）、またはポリ（ビニルアルコール）、ポリラクチド（米国特許第3,773,919号）、L-グルタミン酸とエチル-L-グルタミン酸塩とのコポリマー、非分解性エチレン酢酸ビニル、L U P R O N D E P O T（商標）などの分解性の乳酸-グリコール酸コポリマー（乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注入可能なミクロスフェア）、及びポリ-D-（-）-3-ヒドロキシ酪酸が含まれる。

#### 【0264】

インピボ投与のために使用される製剤は、滅菌されていなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過により容易に達成される。

#### 【0265】

##### V I . 投与

いくつかの実施形態において、抗P D - L 1 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、または鼻腔内投与される。有効量の抗P D - L 1 抗体が、疾患の予防または治療のために投与され得る。抗P D - L 1 抗体の適切な投与量は、治療される疾患の種類、抗P D - L 1 抗体の種類、疾患の重症度及び経過、個体の臨床的条件、個体の臨床歴及び治療への応答、ならびに担当医の裁量に基づいて判定され得る。

#### 【0266】

一般的な提案として、ヒトに投与される治療有効量の抗体は、1回以上の投与にかかわらず、患者の体重の約0.01～約50mg/kgの範囲であり得る。いくつかの実施形態において、使用される抗体は、例えは、約0.01～約45mg/kg、約0.01～約40mg/kg、約0.01～約35mg/kg、約0.01～約30mg/kg、約0.01～約25mg/kg、約0.01～約20mg/kg、約0.01～約15mg/kg、約0.01～約10mg/kg、約0.01～約5mg/kg、または約0.01～約1mg/kgであり、毎日投与される。いくつかの実施形態において、抗体は、15mg/kgで投与される。しかし、他の投与量レジメンも有用であり得る。一実施形態において、本明細書に記載される抗P D L 1 抗体は、21日周期の1日目に、約100m

10

20

30

40

50

g、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、約1200mg、約1300mg、または約1400mgの用量でヒトに投与される。この用量は、注入などの、単回用量または複数回の用量（例えば、2または3回用量）で投与され得る。併用治療において投与される抗体の用量は、単剤治療と比較して低減され得る。この療法の進展は、従来の技法により容易に監視される。

#### 【0267】

いくつかの実施形態において、本方法は、追加の療法をさらに含み得る。追加の療法は、放射線療法、手術（例えば、腫瘍摘出手術及び乳房切除）、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、骨髄移植術、ナノ療法、モノクローナル抗体療法、または前述の組み合わせであり得る。追加の療法は、アジュvant療法またはネオアジュvant療法の形態であり得る。いくつかの実施形態において、追加の療法は、小分子酵素阻害剤または抗転移薬の投与である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、副作用制限剤（例えば、治療の副作用の発生及び／または重症度を軽減するよう意図された薬剤、例えば、制吐剤など）の投与である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、放射線療法である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、手術である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、放射線療法と手術との組み合わせである。いくつかの実施形態において、追加の療法は、ガンマ照射である。いくつかの実施形態において、追加の療法は、PI3K/AKT/mTOR経路を標的とする療法、HS P90阻害剤、チューブリン阻害剤、アポトーシス阻害剤、及び／または化学予防剤である。追加の療法は、本明細書に記載される化学療法剤のうちの1つ以上であり得る。10

#### 【0268】

##### 併用療法

ある特定の実施形態において、抗PD-L1抗体は、別の抗癌剤または癌療法と併せて投与される。「In conjunction with（と併せて）」は、別の治療法に加えた1つの治療法の施行を指す。したがって、「と併せて」は、個体への他の治療法の投与前、投与中（例えば、それとともに、またはそれと同時に）、または投与後の1つの治療法の投与を指す。20

#### 【0269】

いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、化学療法または化学療法剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、放射線療法または放射線療法剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、標的療法または標的療法剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、免疫療法または免疫療法剤、例えば、モノクローナル抗体と併せて投与され得る。30

#### 【0270】

理論に束縛されることを望むものではないが、活性化共刺激分子を促進することによるか、または陰性共刺激分子を阻害することによる増強T細胞刺激が、腫瘍細胞死を促進し得、それにより、癌を治療するか、または癌の進行を遅延させると考えられる。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、活性化共刺激分子に対して指向されるアゴニストと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、活性化共刺激分子には、CD40、CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM、またはCD127が含まれ得る。いくつかの実施形態において、活性化共刺激分子に対して指向されるアゴニストは、CD40、CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM、またはCD127に結合するアゴニスト抗体である。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、阻害性共刺激分子に対して指向されるアンタゴニストと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、阻害性共刺激分子には、CTLA-4（CD152としても既知である）、PD-1、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7-H3、B7-H4、IDO、TIGIT、MICHA/B、またはアルギナーゼが含まれ得る。いくつかの実施形態において、阻害性共刺激分4050

子に対して指向されるアンタゴニストは、CTLA-4、PD-1、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7-H3、B7-H4、IDO、TIGIT、MICHA/B、またはアルギナーゼに結合するアンタゴニスト抗体である。

#### 【0271】

いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、CTLA-4(CD152としても既知である)に対して指向されるアンタゴニスト、例えば、遮断抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、イピリムマブ(MDX-010、MDX-101、またはYervoy(登録商標)としても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、トレメリムマブ(チシリムマブまたはCP-675、206としても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、B7-H3(CD276としても既知である)に対して指向されるアンタゴニスト、例えば、遮断抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、MGA271と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、TGFベータに対して指向されるアンタゴニスト、例えば、メテリムマブ(metelimumab)(CAT-192としても既知である)、フレソリムマブ(fresolimumab)(GC1008としても既知である)、またはLY2157299と併せて投与され得る。  
10

#### 【0272】

いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、キメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞(例えば、細胞傷害性T細胞またはCTL)の養子移動を含む治療と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、優性陰性TGFベータ受容体、例えば、優性陰性TGFベータII種の受容体を含むT細胞の養子移動を含む治療と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、HERCREEMプロトコルを含む治療と併せて投与され得る(例えば、Clinical Trials.gov Identifier NCT00889954を参照されたい)。  
20

#### 【0273】

いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、CD137(TNFRSF9、4-1BB、またはILAとしても既知である)に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、ウレルマブ(urelumab)(BMS-663513としても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、CD40に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、CP-870893と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、OX40(CD134としても既知である)に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、抗OX40抗体(例えば、AgonOX)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、CD27に対して指向されるアゴニスト、例えば、活性化抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、CDX-1127と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、インドールアミン-2,3-ジオキシゲナーゼ(IDO)に対して指向されるアンタゴニストと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、IDOアンタゴニストとともにあるのは、1-メチル-D-トリプトファン(1-D-MTとしても既知である)である。  
30  
40

#### 【0274】

いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、抗体-薬物コンジュゲートと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗体-薬物コンジュゲートは、メルタンシン(mertansine)またはモノメチルオリスタチンE(MMAE)を含む。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、抗Napib抗体-MMAEコンジュゲート(DNIB0600AまたはRG7599としても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD-L1抗体は、トラスツズマブエムタン  
50

シン (T - DM 1、アドトラスツズマブエムタンシン、またはK A D C Y L A (登録商標)、Genentechとしても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、DMUC5754Aと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、エンドセリンB受容体 (EDNBR) を標的とする抗体 - 薬物コンジュゲート、例えば、MMAEと複合されたEDNBRに対して指向される抗体と併せて投与され得る。

#### 【0275】

いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、血管生成阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、VEGF、例えば、VEGF - Aに対して指向される抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、ベバシズマブ (AVASTIN (登録商標)、Genentechとしても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、アンギオポエチン2 (Ang 2としても既知である)に対して指向される抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、MED13617と併せて投与され得る。

10

#### 【0276】

いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、抗悪性腫瘍剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、CSF - 1R (M-CSFRまたはCD115としても既知である)を標的とする薬剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、抗CSF - 1R (IMC - CS4としても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、インターフェロン、例えば、インターフェロンアルファまたはインターフェロンガンマと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、ロフェロン - A (組換えインターフェロンアルファ - 2aとしても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、GM - CSF (組換えヒト顆粒球マクロファージコロニー刺激因子、rhuh GM - CSF、サルグラモスチム、またはLeukine (登録商標)としても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、IL - 2 (アルデスロイキンまたはProleukin (登録商標)としても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、IL - 12と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、CD20を標的とする抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、CD20を標的とする抗体は、オビヌツズマブ (GA101またはGazyva (登録商標)としても既知である)またはリツキシマブである。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、GITRを標的とする抗体と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、GITRを標的とする抗体は、TRX518である。

20

#### 【0277】

いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、癌ワクチンと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、癌ワクチンは、ペプチド癌ワクチンであり、いくつかの実施形態において、個別化ペプチドワクチンである。いくつかの実施形態において、ペプチド癌ワクチンは、多価長ペプチド、多ペプチド、ペプチドカクテル、ハイブリッドペプチド、またはペプチドパルス樹状細胞ワクチンである (例えば、Yamada et al., Cancer Sci, 104:14 - 21, 2013を参照されたい)。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、アジュvantと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、TLRアゴニスト、例えば、Poly - ICLC (Hiltonol (登録商標)としても既知である)、LPS、MPL、またはCpG ODNを含む治療と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、腫瘍壊死因子 (TNF) アルファと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、IL - 1と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、HMGB1と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗PD - L1抗体は、IL - 10アンタゴニストと併せて投与され得る。

30

40

50

いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 I L - 4 アンタゴニストと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 I L - 1 3 アンタゴニストと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 H V E M アンタゴニストと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 I C O S アゴニストと併せて、例えば、 I C O S - L 、または I C O S に対して指向されるアゴニスト抗体の投与により投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 C X 3 C L 1 を標的とする治療と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 C X C L 9 を標的とする治療と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 C X C L 1 0 を標的とする治療と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 C C L 5 を標的とする治療と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 L F A - 1 または I C A M 1 アゴニストと併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、セレクチニアゴニストと併せて投与され得る。  
10

#### 【 0 2 7 8 】

いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、標的療法と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 B - R a f の阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、ベムラフェニブ( Z e 1 b o r a f (登録商標) としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、ダプラフェニブ( T a f i n l a r (登録商標) としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、エルロチニブ( T a r c e v a (登録商標) としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 M E K 1 ( M A P 2 K 1 としても既知である )または M E K 2 ( M A P 2 K 2 としても既知である )などの M E K の阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、コビメチニブ( G D C - 0 9 7 3 または X L - 5 1 8 としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、トラメチニブ( M e k i n i s t (登録商標) としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 K - R a s の阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 c - M e t の阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、オナルツズマブ( o n a r t u z u m a b ) ( M e t M A b としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 A 1 k の阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 A F 8 0 2 ( C H 5 4 2 4 8 0 2 またはアレクチニブ としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、ホスファチジルイノシトール 3 - キナーゼ( P I 3 K )の阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 B K M 1 2 0 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、イデラリシブ( G S - 1 1 0 1 または C A L - 1 0 1 としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、ペリフォシン( K R X - 0 4 0 1 としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 A k t の阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 M K 2 2 0 6 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 G S K 6 9 0 6 9 3 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 G D C - 0 9 4 1 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、 m T O R の阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、シロリムス( ラパマイシン としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、テムシロリムス( C C I - 7 7 9 または T o r i s e l (登録商標) としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は、エベロリムス( R A D 0 0 1 としても既知である )と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体は  
20  
30  
40  
50

、リダフォロリムス（A P - 2 3 5 7 3、M K - 8 6 6 9、またはデフォロリムスとしても既知である）と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、O S I - 0 2 7 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、A Z D 8 0 5 5 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、I N K 1 2 8 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、二重P I 3 K / m T O R阻害剤と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、X L 7 6 5 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、G D C - 0 9 8 0 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、B E Z 2 3 5 (N V P - B E Z 2 3 5 としても既知である)と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、B G T 2 2 6 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、G S K 2 1 2 6 4 5 8 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、P F - 0 4 6 9 1 5 0 2 と併せて投与され得る。いくつかの実施形態において、抗P D - L 1抗体は、P F - 0 5 2 1 2 3 8 4 (P K I - 5 8 7 としても既知である)と併せて投与され得る。

#### 【0279】

##### V I I . キット及び製品

本発明は、本明細書に記載される方法による癌の治療に有用な材料を含有するキット及び製品をさらに提供する。

#### 【0280】

いくつかの実施形態において、本発明は、一緒にパッケージ化された、抗P D - L 1抗体（または、その抗原結合断片）及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物と、抗P D - L 1抗体（または、その抗原結合断片）または薬学的組成物が、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において、またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低メチル化レベルを有する、癌を有する対象の治療に適応することを表示するラベルとを含む、製造のを提供する。いくつかの実施形態において、本製品は、抗P D - L 1抗体（または、その抗原結合断片）または薬学的組成物を、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において、またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低メチル化レベルを有する癌を有する対象に投与するための使用説明書をさらに含む。

#### 【0281】

いくつかの実施形態において、本発明は、一緒にパッケージ化された、抗P D - L 1抗体（または、その抗原結合断片）及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物と、抗P D - L 1抗体（または、その抗原結合断片）または薬学的組成物の投与が、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において、またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低レベルのメチル化を有する患者に基づくことを表示するラベルとを含む、製造のを提供する。いくつかの実施形態において、本製品は、抗P D - L 1抗体（または、その抗原結合断片）または薬学的組成物を、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において、またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低メチル化レベルを有する癌を有する対象に投与するための使用説明書をさらに含む。

#### 【0282】

いくつかの実施形態において、本発明は、一緒にパッケージ化された、抗P D - L 1抗体（または、その抗原結合断片）及び薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物と、抗P D - L 1抗体（または、その抗原結合断片）または薬学的組成物が選択された患者に投与されることを表示するラベルとを含む、製造のを提供し、ここで、対象は、対象からの癌細胞を含有する試料中のP D - L 1プロモーター領域内のC p G 1において、またはP D - L 1遺伝子のイントロン1内の1つ以上のC p G部位において、中または低レベルの

10

20

30

40

50

メチル化を有することが見出されている。いくつかの実施形態において、本製品は、抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）または薬学的組成物を、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において、または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低メチル化レベルを有する癌を有する対象に投与するための使用説明書をさらに含む。

#### 【 0 2 8 3 】

いくつかの実施形態において、本発明は、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、メチル化レベルを測定するための試薬と、 P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低メチル化レベルを有するとして対象を分類するための使用説明書とを含むキットを提供する。ある特定の実施形態において、キットは、抗 P D - L 1 抗体と、対象が、 P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において及び／または P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低メチル化レベルを有する場合、抗 P D - L 1 抗体を対象に投与するための使用説明書とをさらに含む。

#### 【 0 2 8 4 】

本明細書に記載されるキットまたは製品のいずれかのいくつかの実施形態において、対象は、対象からの癌細胞を含有する試料中の P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 において、及び P D - L 1 遺伝子のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位において、中または低レベルのメチル化を有することが見出されている。

#### 【 0 2 8 5 】

本明細書に記載されるキットまたは製品のいずれかのいくつかの実施形態において、ラベルは、 P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 における、または P D - L 1 のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位におけるメチル化度が、バイサルファイト D N A 配列決定により判定されることを表示し、本明細書に記載されるキットまたは製品のいずれかのいくつかの実施形態において、ラベルは、 P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 における、または P D - L 1 のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位におけるメチル化度が、バイサルファイト次世代配列決定により判定されることを表示する。本明細書に記載されるキットまたは製品のいずれかのいくつかの実施形態において、ラベルは、 P D - L 1 プロモーター領域内の C p G 1 における、または P D - L 1 のイントロン 1 内の 1 つ以上の C p G 部位におけるメチル化度が、メチル化チップアレイ（ I N F I N I U M （登録商標） H u m a n M e t h y l a t i o n 4 5 0 B e a d C h i p アレイなど）を使用して判定されることを表示する。

#### 【 0 2 8 6 】

いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるキットまたは製品は、対象からの癌細胞を含有する試料中の免疫細胞浸潤を検出するための試薬を含む。

#### 【 0 2 8 7 】

いくつかの実施形態において、試薬には、以下の抗 C D 1 6 抗体、抗 C D 4 抗体、抗 C D 3 抗体、抗 C D 5 6 抗体、抗 C D 4 5 抗体、抗 C D 6 8 抗体、抗 C D 2 0 抗体、抗 C D 1 6 3 抗体、または抗 C D 8 抗体のうちの 1 つ以上が含まれる。いくつかの実施形態において、試薬は、抗 C D 8 抗体である。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるキットまたは製品は、対象からの癌細胞を含有する試料中の免疫細胞浸潤を検出するために、免疫組織化学的アッセイ（ウェスタンプロット、 E L I S A 、またはフローサイトメトリーが含まれるが、これらに限定されない）を行うための使用説明書をさらに含む。いくつかの実施形態において、本明細書で提供されるキットまたは製品は、定量 P C R ( q P C R ) 、 q R T - P C R 、トランスクリプトームプロファイリング ( R N A 配列など) 、マイクロアレイ分析、世代配列決定などが含まれるが、これらに限定されない遺伝子発現分析アッセイを行うための使用説明書をさらに含む。

#### 【 0 2 8 8 】

10

20

30

40

50

本明細書で提供されるキットまたは製品のいずれかのいくつかの実施形態において、癌は、乳癌、肺癌、または皮膚癌（それらの癌の転移型を含む）である。ある特定の実施形態において、乳癌は、乳癌腫である。いくつかの実施形態において、肺癌は、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌腫、または肺の扁平上皮癌腫である。ある特定の実施形態において、皮膚癌は、黒色腫、表在拡大型黒色腫、悪性黒子型黒色腫、末端黒子型黒色腫、結節型黒色腫、または皮膚癌腫である。

#### 【0289】

本キットまたは本製品のいずれかのいくつかの実施形態において、キットまたは製品中に含まれる抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）は、本明細書に記載される抗 P D - L 1 アニチ体である。本キットまたは本製品のいずれかのいくつかの実施形態において、抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）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。本明細書で提供される製品中に含まれ得るか、または本明細書で提供される製品もしくはキット中に含まれ得る他の例示的な抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）は、W O 2 0 1 0 / 0 7 7 6 3 4、W O 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4、W O 2 0 1 1 / 0 6 6 3 8 9、及びU S 2 0 1 3 / 0 3 4 5 5 9 に記載され、それらの各々は、参照することによりその全体が本明細書に組み込まれる。10

#### 【0290】

典型的には、本キットまたは本製品は、容器と、容器上のまたは容器に関連するラベルまたは添付文書と、を含む。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジなどが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの多様な材料から形成され得る。容器は、抗 P D - L 1 抗体（または、その抗原結合断片）、または癌を治療するのに有効な薬学的組成物を保持または収容し、滅菌アクセスポート（例えば、容器は、皮下注射針により穿刺可能なストッパーを有する静脈用溶液袋またはバイアルであり得る）を有し得る。本組成物中の少なくとも 1 つの活性薬剤は、抗 P D - L 1 抗体である。20

#### 【0291】

ラベルまたは添付文書は、提供されている抗体及び任意の他の薬物の投薬量及び間隔についての具体的な指示により、本組成物が癌に罹患している患者において癌を治療するために使用されることを示す。本製品は、注入用静菌水（B W F I）、リン酸塩緩衝塩水、リンガー溶液、及びデキストロース溶液などの薬学的に許容される希釈緩衝液を含む第 2 の容器をさらに含み得る。本製品は、他の緩衝液、希釈剤、フィルター、針、及びシリンジを含む、商業的観点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。30

#### 【0292】

任意に、本明細書における製品は、治療のための抗体以外の薬剤を含む容器と、患者をかかる薬剤で治療するまでの使用説明書とをさらに含み、かかる薬剤は、例えば、化学療法剤（本明細書の他の場所に記載される化学療法剤など）、細胞傷害性剤（本明細書の他の場所に記載される細胞傷害性剤など）などである。

#### 【0293】

本発明のさらなる詳細が、以下の非限定的な実施例により例示されている。本明細書における全ての引用の開示内容は、参照することにより本明細書に明確に組み込まれる。40

#### 【実施例】

#### 【0294】

実施例は、単に本発明の例示となるように意図されており、したがって、決して本発明を限定するものと考えられるべきではなく、また、上記で考査される本発明の態様及び実施形態を記載及び詳述する。先の実施例及び詳細な記載は、限定するものではなく、例示として提供されている。

#### 【0295】

#### 実施例 1：材料及び方法

以下の実施例 2 において、以下の材料及び方法を使用した。

#### 【0296】

50

### 細胞株及び培養条件

American Type Cell Culture (ATCC) またはアカデミックソースから NSCLC 細胞株を入手し、10% のウシ胎児血清 (FBS) 及び 2 mM の L - ゲルタミンで補充された RPMI 1640 培地内で培養した。細胞を、PBS 洗浄、及び Accutase 剥離培地 (Sigma) を用いたインキュベーション後に、分割及び / または実験分析のために剥離した。細胞を、0.1 mM のトリコスタチン A (「TSA」、Sigma) 及び / または 1 ng / mL のインターフェロンガンマ (IFN) で 24 時間、及び 1 mM の 5 - アザシチジン - dC (5 - アザ - dC, Sigma) で、qd の 3 日間 (すなわち、毎日) または q2d の 6 日間 (すなわち、隔日) で処理した。

### 【0297】

10

### 腫瘍試料

The MT Group, Cureline, Inc, Cambridge Bio Source, TriStar Technology Group LLC、または ClinPath Advisors の IRB 承認業者の収集物から NSCLC 患者の保存腫瘍標本を入手した。

### 【0298】

#### DNA / RNA 分析

All Prep DNA / RNA ミニキット (Qiagen) を使用して同じ溶解液からの RNA 及び DNA 抽出のための細胞を溶解するために、緩衝液 RLT Plus (Qiagen) を使用した。Asuragen, Inc の GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 アレイ (Affymetrix) でのマイクロアレイ、及び TaqMan Gene Expression アッセイ (Life Technologies) を使用した qPCR により、RNA 発現を分析した。Genomics Suite (Partek)、Spotfire (TIBCO)、JMP (SAS)、及び IPA (Ingenuity) を使用してデータを分析した。INFINIUM (登録商標) Human Methylation 450 BeadChip ( Illumina ) で DNA を分析した。DNA を、Zymo DNA Gold メチル化キット (Zymo Research) を使用してバイサルファイト修飾し、CD274 プロモーター領域を標的とするバイサルファイト特異的配列決定プライマーで増幅した。PCR 産生物を TA サブクローニ化し、標準の方法 (ABI) を使用して配列決定した。BIQ 分析装置ソフトウェア (C. Bock) を使用して、ABI 配列ファイルを分析した。

20

### 【0299】

#### タンパク質分析

タンパク質溶解液を、細胞抽出緩衝液 (Life Technologies) を使用して生成し、Sigma FAST プロテアーゼ阻害剤タブレット (Sigma)、ならびにホスファターゼ阻害剤カクテル 1 及び 2 (Sigma) で補充した。溶解液を 4° で 10 分間、20,000 × g で遠心分離し、次いで、ウェスタンプロット (WB) による分析のために上清を除去した。試料を、NuPage Novex LDS 及び SRA 緩衝液 (Life Technologies) で処理し、SeeBlue Plus 2 分子量標準物質 (Life Technologies) とともにビストリスゲル (Life Technologies) 上に投入した。ゲルを、iBlot システム (Life Technologies) を使用してニトロセルロース膜に移動させ、次いで、室温で 1 時間、Odyssey 遮断緩衝液 (LI-COR) で遮断した。ゲルを、ヒト PD-L1 (内部)、- アクチン (Sigma) に対する抗体で染色し、p / t STAT1、p - STAT3 - Y705、p - STAT3 - S727、及び t - STAT3 (全て Cell Signaling) を、Odyssey 遮断緩衝液 + 0.01% の Tween-20 中で希釈した。初代抗体は、Odyssey 遮断緩衝液 + 0.01% の Tween-20 + 0.001% の SDS 中で LI-COR から検出された二次抗体であり、それらを Odyssey CLX システム (LI-COR) で分析した。

40

### 【0300】

50

FACS分析に関して、細胞を剥離し、次いで、FBS染色緩衝液(BD Biosciences)中で2回洗浄した。次いで、細胞を、PE-複合抗ヒトPD-L1またはアイソタイプコントロール(BD Biosciences)のいずれかで染色し、次いで、洗浄して、FACSCanto II分析装置(BD Biosciences)上で分析した。

#### 【0301】

免疫組織化学(IHC)分析を、Herbst et al.(2014)Nature 515, 563-574に記載されるように行った。

#### 【0302】

##### クロマチン免疫沈降(ChIP、Active Motif)

10

NSCLC細胞株は適切な集密度に成長し、処理した細胞を1%のホルムアルデヒドで15分間固定し、0.125Mのグリシンで抑制した。溶解緩衝液の付加及びDounceホモジナイザーでの分裂により、クロマチンを単離した。溶解液を超音波処理し、DNAを300~500bpの平均長さにせん断した。クロマチンの分割量を、RNase、プロテイナーゼK、及び解架橋のための熱で処理することにより、ゲノムDNA( Input)を調製した。処理後、エタノール沈降を行った。ゲノムDNAのペレットを再懸濁し、得られたDNAをNanoDrop分光光度計上で定量化した。元のクロマチン体積への外挿は、クロマチンの総収量の定量化を可能にした。

#### 【0303】

クロマチンの分割量(30μg)を、タンパク質Aアガロースビーズ(Invitrogen)で事前に清浄した。目的のゲノムDNA領域を、STAT1(Santa Cruz、cat#sc-345)及びSTAT3(Santa Cruz、sc-482)に対して4μgの抗体を使用して単離した。複合体を洗浄し、SDS緩衝液でビーズから溶出し、RNase及びプロテイナーゼK処理にかけた。65℃で一晩、インキュベーションにより架橋を戻し、フェノール-クロロホルム抽出及びエタノール沈降によりクロマチン免疫沈降(ChIP)DNAを精製した。

20

#### 【0304】

ChIPの豊富さの質を、候補STAT1及びSTAT3コントロール部位に対するプライマーを使用してqPCRによりアッセイした。qPCRの反応を、SYBR Green Supermix(Bio-Rad)を使用して3セット行った。得られたシグナルを、入力DNAを使用して各プライマー対に対してqPCRを行うことによりプライマー効率について正常化した。

30

#### 【0305】

##### ChIP配列決定(Illumina、Active Motif)

Illumina配列決定ライプラリを、末端研磨、dA-付加、及びアダプターライゲーションの標準の連続酵素ステップによりChIP及びInput DNAから調製した。最終のPCR増幅ステップ後、得られたDNAライプラリを、HiSeq 2500またはNextSeq 500上で定量し、配列決定した。配列(50ntのリード、単一末端、または75ntのリード、単一末端)を、BWAアルゴリズムを使用してヒトゲノム(hg19)に整列させた。整列させた配列を各々、それらの3'末端においてシリコで、200bpの長さ、すなわち、サイズ選択されたライプラリ内の平均ゲノム断片長さに伸長し、ゲノムに沿って32ntのBINに割り当てた。得られたヒストグラム(ゲノム「シグナルマップ」)をbigWigファイル内に保存した。ピーク位置を、p値のカットオフ=1×10<sup>-7</sup>を示すMACSアルゴリズム(v1.4.2.)を使用して判定した。シグナルマップ及びピーク位置を、Active Motif専有分析プログラムへの入力データとして使用し、これは、試料比較、ピークメトリクス、ピーク位置、及び遺伝子アノテーションについての詳細な情報を含むエクセル表を作成する。

40

#### 【0306】

バイオラルファイト次世代配列決定(バイオラルファイトNGS、Active Motif)

50

また、C h I P配列により分析したN S C L C細胞株を、P D - L 1プロモーターのメチル化状態に関してバイサルファイト次世代配列決定(N G S)を介して分析した。標的領域(プラスストランド)に対するP C Rプライマーを、M e t h P r i m e rソフトウェア(world-wide-web.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi)で考案した。バイサルファイト変換ゲノムD N Aから標的領域を増幅するために、プライマーを使用した。6つの試料の各々に関して、およそ等量の9つのP C R産生物を利用し、コンカテマー化し(concatenated)、150~300個の塩基対の平均断片長さに超音波処理し、標準物質に加工し、I l l u m i n a配列決定ライプラリのバーコードをつけた。I l l u m i n a配列決定ライプラリを、N e x t S e q 500で配列決定した。配列決定リードを、ビスマルク整列プログラム(v 0.7.7)(world-wide-web.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/bismark/)を使用して分析した。参照配列としてヒトchr6及びchr9(hg19構築)を使用した。ビスマルク整列レポートを、ファイル「2674Genentech\_bismark\_reports.xlsx」に纏める。510万~740万のリードを試料毎に分析した。  
10

#### 【0307】

##### 実施例2：P D - L 1のメチル化及び発現の分析

R N A及びD N Aを91個のN S C L C細胞株から抽出し、P D - L 1発現レベル(R N A配列、L o g 2カウント)及びプロモーターメチル化(I N F I N I U M(登録商標)アレイ)に関して試験した。5つのC p G部位(すなわち、C p G 1~C p G 5)のうちの2つは、P D - L 1 R N A発現と逆相関である異なるメチル化パターンを示した。図1を参照されたい。図1の最も左にC p G部位として示される第1のC p G部位、すなわち、C p G 1は、T S Sの予測されたP D - L 1プロモーター部位上流で見られた。図1の最も右にC p G部位として示される第2のC p G部位、すなわち、C p G 5は、インtron 1内に位置した。C p G 1~5の平均ベータ値の各々のヒートマップを、C D 274転写N M\_014143内のそれらの位置に対してプロットし、それらに伴う発現ヒートマップを遺伝子座9p24.1におけるP D - L 1プロモーターマップの右に配置した。図1は、試験した各細胞株に関する、P D - L 1プロモーター領域発現及びメチル化ヒートマップを示す。ヒートマップのP D - L 1 R N A発現を高(赤)から低(緑)に分類した。高いP D - L 1発現を有する細胞株が低メチル化(青)であることが見出された。  
20  
30

#### 【0308】

The Cancer Genome Atlas(T C G A 3.0)の腫瘍データを分析して、P D - L 1発現(R N A配列、L o g 2カウント)対D N Aメチル化(I N F I N I U M(登録商標)アレイ、C p G 1 & C p G 5の平均m値)の間の会合においてさらに調査した。4つの収集物の腫瘍には、肺腺癌腫(L U A D)、肺扁平上皮癌腫(L U S C)、乳癌(B R C A)、及び皮膚癌腫(S K C M)が含まれた。R N A発現とメチル化との間の逆相関は、これらの患者の腫瘍分析においても見られた:L U A D = -0.33、L U S C = -0.38、B R C A = -0.4、及びS K C M = -0.25。腫瘍試料をさらに下位群に分けて、各腫瘍における免疫浸潤の量によりP D - L 1発現をさらに解析するために、C D 8 A発現(R N A配列、中央値カットオフ)により色付けした。より高いC D 8 A発現を有する腫瘍は、より高いP D - L 1発現及びより低いP D - L 1プロモーターメチル化も有する傾向にあった。図2A(肺腺癌腫)、2B(肺扁平上皮癌腫)、2C(乳癌)、及び2D(皮膚癌腫)を参照されたい。  
40

#### 【0309】

P D - L 1発現レベル及びプロモーターメチル化に関して試験したN S C L C細胞株の中から選択した数(図1を参照されたい)を分析して、P D - L 1プロモーターメチル化とP D - L 1発現インピトロとの間の関係をさらに調査した。さらなる分析のために選択された細胞株を、C p G 1及びC p G 5における平均メチル化レベルに基づいて選択した  
50

。細胞株 H 6 6 1、L X F L 5 2 9、及び A 4 2 7 を、C p G 1 及び C p G 5 において高平均メチル化レベルを有するとして分類し、細胞株 H 2 0 7 3 及び H 3 2 2 T を、C p G 1 及び C p G 5 において中平均メチル化レベルを有するとして分類し、細胞株 H 1 9 9 3 を、C p G 1 及び C p G 5 において低平均メチル化レベルを有するとして分類した。

#### 【 0 3 1 0 】

細胞株の各々の細胞を 5 つの条件のうちの 1 つに曝露した：(1) 处理なし、(2) 1 mM の 5 - アザシチジン - d C (5 - アザ - d C、DNA 脱メチル化剤) による処理、(3) 0.1 mM のトリコスタチン A (TSA、クラス I 及びクラス II の哺乳動物ヒストン脱アセチル化酵素) による処理、(4) 1 ng / mL のインターフェロンガンマ (IFNg) による処理、または(5) 5 - アザ - d C、TSA、及び IFNg の組み合わせによる処理。次いで、qRT - PCR により PD - L1 RNA 発現を測定した。図 3 に示されるように、PD - L1 RNA 発現は、3 日の 5 - アザ - d C 処理の後、H 6 6 1、L X F L 5 2 9、A 4 2 7、及び H 3 2 2 T において増加した。H 3 2 2 T だけが、TSA 処理後に PD - L1 RNA 発現の増加を実証した。5 - アザ - d C、TSA、及び IFNg の組み合わせによる処理が、H 1 9 9 3 (すなわち、C p G 1 及び C p G 5 において低平均メチル化レベルを有する細胞株) 以外の全ての株において PD - L1 発現を結果的に増加させた。H 1 9 9 3 は、高レベルのベースライン PD - L1 発現を既に実証した。

#### 【 0 3 1 1 】

4 つの細胞株、すなわち、A 4 2 7 (C p G 1 及び C p G 5 が高レベルのメチル化を有する)、H 3 2 2 T (C p G 1 及び C p G 5 が中レベルのメチル化を有し、PD - L1 発現が IFNg での処理により誘導可能である、H 2 9 2 (C p G 1 及び C p G 5 が低レベルのメチル化を有する)、及び H 3 5 8 (C p G 1 及び C p G 5 が低レベルのメチル化を有する) を実験で使用するために選択して、IFNg の存在下及び不在下における、PD - L1 RNA とタンパク質発現との関係をさらに調査した。IFNg を用いて刺激したとき、A 4 2 7、H 3 2 2 T、H 2 9 2、及び H 3 5 8 は、それらの元の基礎発現とは無関係に PD - L1 RNA 誘導の増加を示した。図 4 A を参照されたい。IFNg の不在下で低レベルで PD - L1 RNA を発現する A 4 2 7 及び H 2 9 2 は、A 4 2 7 の RNA レベルが低い (0.012 2 - DCt における) ままである一方で、H 2 9 2 が増加した RNA レベル (0.102 2 - DCt における) を示す、IFNg 刺激への可変応答を示した。PD - L1 RNA 発現における最も大きな変化が H 3 2 2 T 株において観察され、0.018 から 1.356 2 - DCt へ増加した。高レベルのベースライン PD - L1 発現、ならびに C p G 1 及び C p G 5 において低メチル化レベルを既に示した H 3 5 8 細胞株は、刺激後にその RNA 発現に対して著しい変化を示さなかった。

#### 【 0 3 1 2 】

PD - L1 タンパク質発現は、ベースライン及びその後の IFNg 刺激の両方において、このサブセットの細胞株内の RNA 発現と非厳密に相關する。A 4 2 7 は依然として、20 の正常化蛍光強度中央値 (nMFI) を有する FACS によるバックグラウンドを超える発現をほとんど示さなかった。H 3 2 2 T も、低レベルの PD - L1 発現 (107 の nMFI) を示した。図 4 A を参照されたい。H 2 9 2 は、1580 の nMFI を有する著しくより高いタンパク質発現を示し、H 3 5 8 は、最も高いベースライン発現 (4204 の nMFI) を実証した。全ての 4 つの細胞株は、IFNg 処理後に増加した表面 PD - L1 タンパク質レベルを示した。A 4 2 7 細胞株において、PD - L1 タンパク質発現は、低いままであった。H 2 9 2 及び H 3 5 8 細胞株において、PD - L1 タンパク質発現は、3 ~ 4 倍増加し、H 3 2 2 T において、PD - L1 タンパク質発現は、ベースラインレベルと比較すると 48 倍を超えて増加した。比較的、IFNg 処理後の A 4 2 7 における PD - L1 タンパク質レベルは、H 3 2 2 T で見られる処理前のレベルに増加した。その後の H 3 2 2 T における IFNg 処理は、PD - L1 タンパク質発現が高度に誘導可能であることを示した。上記で考察されるように、H 3 2 2 T における PD - L1 タンパク質のベースラインレベルは、低かった。対照的に、IFNg 処理後の H 3 2 2 T にお

ける P D - L 1 タンパク質レベルは、 I F N g 处理後の H 2 9 2 及び H 3 5 8 における P D - L 1 タンパク質レベルと比較可能であった。

#### 【 0 3 1 3 】

次に、 I F N g / J A K / S T A T シグナル伝達経路が、 A 4 2 7 、 H 3 2 2 T 、 H 2 9 2 、及び H 3 5 8 における P D - L 1 転写及びタンパク質レベルの I F N g 媒介性誘導において役割を果たすかどうかを判定するために、ウェスタンプロットを行った。簡潔に言うと、 A 4 2 7 、 H 3 2 2 T 、 H 2 9 2 、及び H 3 5 8 の細胞に対して、( a ) 处理なし、( b ) 30 分間の I F N g による処理、または( c ) 24 時間の I F N g による処理、のいずれかを行った。次いで、細胞をタンパク質溶解液に加工し、ゲル上に流し、プロットし、以下の抗体を用いて調べた：( 1 ) 抗ホスホ - S T A T 1 、( 2 ) 抗トータル - S T A T 1 、( 3 ) 抗ホスホ - S T A T 3 - Y 7 0 5 、( 4 ) 抗ホスホ - S T A T 3 - S 7 2 7 、( 5 ) 抗トータル - S T A T 3 、及び( 6 ) - アクチン( ローディングコントロール)。全ての 4 つの細胞株は、 I F N g 刺激後に力強い p - S T A T 1 活性化を示し、基礎 p - S T A T 1 は、 H 3 5 8 だけで観察された。図 4 B を参照されたい。 S T A T 3 に関する初期の活性化部位である、 p - S T A T 3 - Y 7 0 5 は、 H 2 9 2 ( 30 分の I F N g 処理後) 及び H 3 5 8 において構成的に活性化したが、 H 3 5 8 においては、 I F N g 刺激後の 24 時間以内に消滅した。 S T A T 3 は、 S 7 2 7 での m T O R 及び M A P K 経路によりさらに活性化した。 J A K / S T A T シグナル伝達経路の活性化は、 24 時間以内に H 3 5 8 細胞を除いて全ての細胞株において観察され、これは、初期時点及び後期時点の両方で、刺激前後における p - S T A T 3 - S 7 2 7 活性化を示さなかった。これらの結果は、 J A K / S T A T 経路( S T A T 1 経路を含む)が、試験した全ての 4 つの細胞株において活性であることを示す。  
10

#### 【 0 3 1 4 】

次に、 s i R N A を使用して、 A 4 2 7 及び H 3 5 8 における P D - L 1 プロモーター メチル化と I F N g / J A K / S T A T 経路との間の関係を調査した。上述されるように、 C p G 1 及び C p G 5 は、 A 4 2 7 において低レベルのメチル化を有し、 A 4 2 7 は、ベースラインにおいて、及び I F N g 刺激後に、低い P D - L 1 タンパク質発現を示したか、 P D - L 1 タンパク質発現を示さなかった。対照的に、 C p G 1 及び C p G 5 は、 H 3 5 8 において低レベルのメチル化を有し、 H 3 5 8 は、 I F N g 刺激後に増加した、ベースラインにおいて高い P D - L 1 タンパク質発現を示した。どの S T A T がメチル化という点で P D - L 1 発現にとって最も重大であるかを判定するために、各細胞株の細胞を、( 1 ) s i R N A 無し、( 2 ) スクランブルコントロール、( 3 ) s i S T A T 1 、( 4 ) s i S T A T 3 、( 5 ) I F N g 、または( 6 ) s i S T A T 1 、 s i S T A T 3 、及び I F N g とともに投薬した。  
30

#### 【 0 3 1 5 】

A 4 2 7 は、 I F N g を用いた刺激後の活性化 S T A T 1 及び S T A T 3 の強力な誘導にかかわらず、処理に関係なく P D - L 1 発現を示さなかった。図 4 C を参照されたい。非メチル化 H 3 5 8 細胞は、 I F N g 刺激でさらに誘導された基礎構成的な P D - L 1 発現を示した。 s i S T A T 3 は、 P D - L 1 基礎発現をさらに低減した。 s i S T A T 1 及び s i S T A T 3 の両方は、ベースラインに近接した P D - L 1 発現をノックダウンした一方で、 I F N g と両方の s i R N A との組み合わせは、 s i R N A 干渉を用いた同時刺激にかかわらず、 P D - L 1 発現をほとんど示さなかった。これらの結果は、 P D - L 1 プロモーターのメチル化が、 I F N g / J A K / S T A T 1 または I F N g / J A K / S T A T 3 の活性化にかかわらず、 P D - L 1 発現を遮断したことを示す。これらの結果は、 S T A T 1 及び S T A T 3 の両方が、 I F N g で刺激された P D - L 1 発現のために必要とされ、 S T A T 3 は、 P D - L 1 基礎発現にも部分的に必要とされるであろうことも示す。  
40

#### 【 0 3 1 6 】

次に、バイサルファイト配列決定データを、 3 つ全ての P D - L 1 プロモーターメチル化分類( すなわち、高、中、及び低メチル化レベル)を示す、末梢血単核細胞( P B M C  
50

) サブセット、不死化正常肺細胞株、及び NSCLC 肺株に対して想定される CpG メチル化部位のマップ上に重ね合わせた。図 5 A 及び 5 B において、Mut2 / CpG1 及び Mut7 / CpG5 を赤色で囲んだ。患者の腫瘍において免疫浸潤として見られ得るであろう、様々な PBMC サブセットにおけるメチル化はほとんど見られないか、全く見られない。図 5 A を参照されたい。正常肺細胞株も、これらの部位においてメチル化を示さなかつた。図 5 A 及び 5 B を参照されたい。高レベルで PD-L1 を発現した細胞株 H358 及び H1993 は、CpG1 及び 5 においてメチル化を示さなかつた。図 5 B を参照されたい。低いが、誘導可能であるベースライン PD-L1 発現を示した細胞株 H322T 及び H2073 は、両方の CpG 部位において部分的なメチル化を実証した。図 5 B を参考されたい。低いベースライン PD-L1 発現を有すると示された A427 は、CpG1 及び CpG5 において高レベルのメチル化を呈した。PBMC サブセット及び正常肝細胞株内の CpG1 及び CpG5 において、メチル化はほとんど見られないか、全く見られないため、患者の全腫瘍試料中で検出される PD-L1 プロモーター領域におけるメチル化は、したがつて、試料中の腫瘍細胞から優位に発生し、任意の他の細胞サブセットからは発生しないはずである。

### 【 0317 】

X 軸上の平滑化 CpG1 及び CpG5 のメチル化 (M 値) を、Y 軸上の PD-L1 発現 (RNA 配列、Log2 カウント) と直接比較する点図表プロットを作製するために、Cancer Genome Project (CGP) からの NSCLC 細胞株を使用した。図 6 A に示されるように、データは、-0.7 の Pearson の相関性を有し、高度に逆相関する関係を有する。これらの細胞株内の PD-L1 ベースライン発現は、プロモーターメチル化のレベルにより非常に影響を受ける。次いで、図 6 A において分析された CGP 細胞株を、3 つのメチル化グループに分類分けした：(1) 低 (すなわち、CpG1 及び CpG5 の両方において、低メチル化からメチル化無し)、(2) 中間 (すなわち、CpG1 または CpG5 部位のメチル化)、または (3) 高 (CpG1 及び CpG5 の両方のメチル化)。これらのグループを X 軸上にプロットし、RNA 配列による基礎 PD-L1 発現を Y 上にプロットし、各グループの発現中央値を示した。ANOVA 分析は、PD-L1 発現に際し、各グループに関して高い統計的適切性を示した。グループ (1) (すなわち、低) は、最も高い PD-L1 発現中央値を有し、グループ (2) (すなわち、中間) 及びグループ (3) (すなわち、高) のメチル化グループは、より低い PD-L1 発現中央値を示した。図 6 B を参照されたい。これらのデータは、基礎 PD-L1 発現が、CpG1 または CpG5 のいずれかにおけるプロモーターのメチル化レベルに反比例して制御されるが、メチル化される CpG 部位の数にも反比例して制御されることを示す。

### 【 0318 】

次いで、より大きな数の細胞株のデータセット内の PD-L1 発現に対して大域脱メチル化が有するであろう効果の順番で、CPG NSCLC 細胞株パネル内の細胞株を 5 - アザ - dC により処理した。PD-L1 発現が著しく誘導された。グループ (3) (すなわち、高) の細胞株のみが、メチル化が抑制された PD-L1 発現の著しい誘導を示した。図 6 C を参照されたい。加えて、このパネル内の 2 つの細胞株、H1993 (低) 及び H2073 (中間) は、1 人の患者からの 2 つの別個の試料から生じていることで知られている。H1993 は、5 - アザ - dC 処理後に PD-L1 発現の著しい変化を示さなかつた一方で、H2073 は、PD-L1 プロモーターの脱メチル化後に著しい PD-L1 発現誘導を示した。図 6 D を参照されたい。これらの結果は、CpG1 及び CpG5 における非類似のパターンのメチル化を有する異なる細胞株が同じ患者に源を発するため、PD-L1 のメチル化が PD-L1 発現に影響を及ぼす駆動因子であり得ることを実証する。

### 【 0319 】

適応免疫は、免疫浸潤が、IFNg 及び活性化 T 細胞からの他の因子の放出により、腫瘍内の PD-L1 などの免疫チェックポイントタンパク質を活性化及び上方制御し得るブ

10

20

30

40

50

ロセスである。上述の実験の結果は、このP D - L 1活性化が、C p G 1及び/またはC p G 5において高レベルのメチル化を有する細胞株内で遮断されること提示する。活性化T細胞浸潤(C D 8 A遺伝子発現、F l u i d i g m)及びC p G 5における腫瘍細胞P D - L 1プロモーターメチル化(mut 7とも称される)を検出するために、ヒトN S C L C腫瘍試料の集合を分析した。図7A及び7Bに示されるように、低いC p G 5 / mut 7メチル化を有する高度に浸潤された腫瘍試料のみが、I H C(タンパク質、図7A)及びq R T - P C R(R N A、図7Bを参照されたい)の両方により高いP D - L 1腫瘍細胞発現を示した。低浸潤腫瘍もしくは未浸潤腫瘍、または高いC p G 5メチル化を有する腫瘍の全てが、低いP D - L 1タンパク質発現及びR N A発現を示した。活性化T細胞の浸潤による腫瘍細胞P D - L 1の上方制御は、これらのN S C L C患者の腫瘍試料中のC p G 5におけるプロモーターメチル化により依然として遮断される。  
10

### 【0320】

次に、C p G 1及びC p G 5におけるC p Gメチル化が、S T A T 1及び/またはS T A T 3の、P D - L 1プロモーター領域(C p G 1)及びイントロン1(C p G 5)への結合を物理的に遮断し得るかどうかを判定するために、実験を行った。P D - L 1プロモーター内のC p G 1に近接する2つの既知のS T A T結合モチーフが存在する。上述のA 4 2 7(すなわち、メチル化)及びH 3 5 8(すなわち、非メチル化)細胞株は、ほぼ集密まで成長し、次いで、上述のようにコントロール緩衝液またはI F N のいずれかで刺激された。翌朝、細胞を2つの分割量に分割し、1つ目を、バイサルファイト配列決定で使用して、2つ目を、S T A T 1及びS T A T 3結合を評価するためにC h I P配列で使用した。バイサルファイト配列決定は、両方の細胞株のメチル化状態を確認し、異なる結合パターンが、M A C Sピークコーリングによる著しいピークの分析により示されるように、2つの細胞株間で観察された。  
20

### 【0321】

C h I P配列実験の結果は、I g V I n t e g r a t e d G e n o m i c s V i e w e r(B r o a d I n s t i t u t e)で表示されたb e dファイルとして、図8に示される。図8において、上のb e dファイルは、P D - L 1プロモーター領域及びイントロン1内で見られるC p G'sの配位を含む。C p G 1及びC p G 5は、標識化される。第2のb e dファイルは、P D - L 1プロモーター領域内の既知のS T A T結合モチーフの配位を含む。第3のb e dファイルは、H g 1 9配列及びP D - L 1 / C D 2 7 4の遺伝子構造を含む。第4~第11のb e dファイル(番号1~8)は、M A C Sの著しい結合ファイルであり、N S C L C細胞株A 4 2 7及びH 3 5 8において、S T A T 1及びS T A T 3を用いた我々のC h I P配列実験より下流で生成される。  
30

### 【0322】

メチル化したA 4 2 7の細胞株は、I F N 刺激がある場合でも、またはない場合でもS T A Tタンパク質のいずれの結合も示さなかった。表4を参照されたい。かかる結果は、A 4 2 7におけるC p G 1、かつ場合によってはC p G 5のメチル化は、P D - L 1プロモーター内のC p G 1に近接する、S T A T 1及びS T A T 3の、S T A T結合モチーフへの結合を完全に遮断することを示す。無刺激のH 3 5 8は、S T A T 1による結合を示さなかつたが、S T A T 1は、I F N 刺激後に、P D - L 1プロモーターに結合することが示された。表4を参照されたい。H 3 5 8細胞株は、刺激に関係なくS T A T 3により結合された。表4を参照されたい。先に示されたように、H 3 5 8は、非常に高い基礎レベルのP D - L 1 R N A発現を既に有し、これらの結果は、S T A T 3の転写因子が、この細胞株内の高レベルの基礎P D - L 1発現の駆動体であるかもしれないことを提示する。  
40

表4：P D - L 1 プロモーター内のC p G 1 に近接するS T A T 1 及び  
S T A T 3 の結合

試料#	細胞株	P D - L 1 プロモーターにおけるメチル化	刺激	c h I P	結合
1	A 4 2 7	高	コントロール	S T A T 1	無
2	A 4 2 7	高	I F N $\gamma$	S T A T 1	無
3	A 4 2 7	高	コントロール	S T A T 3	無
4	A 4 2 7	高	I F N $\gamma$	S T A T 3	無
5	H 3 5 8	低	コントロール	S T A T 1	無
6	H 3 5 8	低	I F N $\gamma$	S T A T 1	有
7	H 3 5 8	低	コントロール	S T A T 3	有
8	H 3 5 8	低	I F N $\gamma$	S T A T 3	有

【0323】

前述の実施例は、例示目的のためのみに提供されており、決して、本発明の範囲を限定するようには意図されていない。本明細書に示されて説明される修正に加えて、本発明の様々な修正は、前述の説明から当業者に明らかになり、それらは添付の特許請求の範囲内のものである。

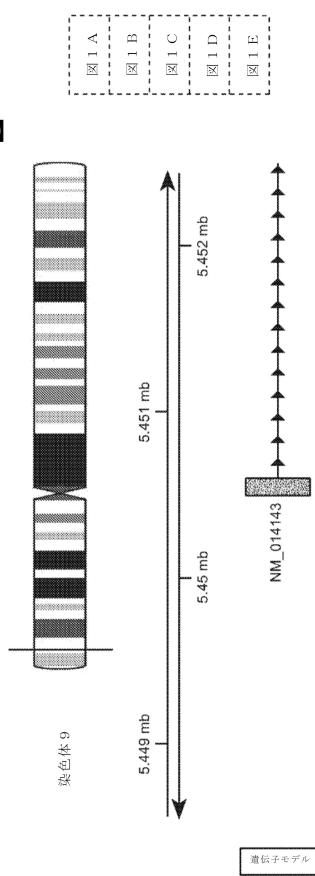
10

20

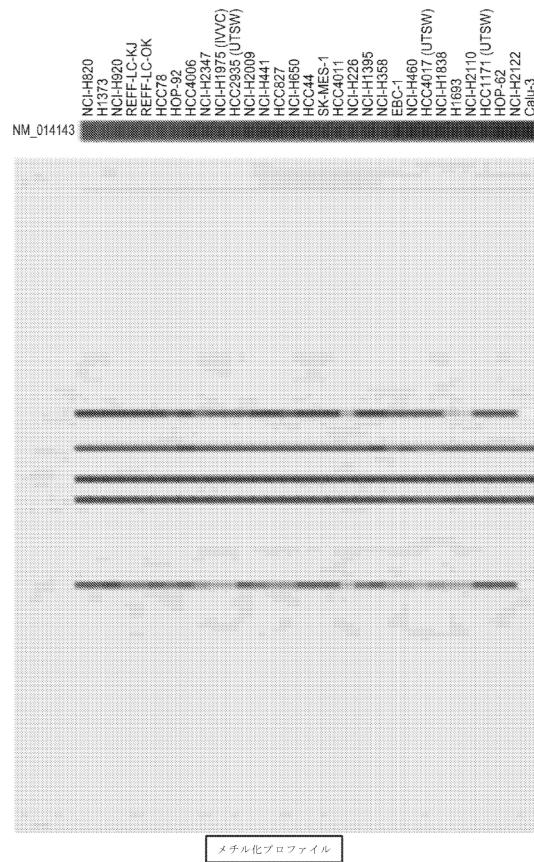
30

【図1】

【図1 A】



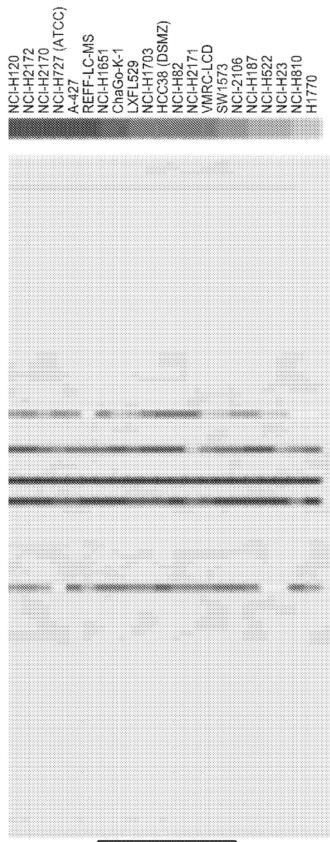
【図1 B】



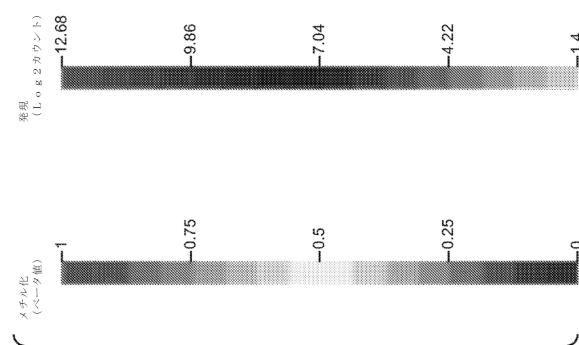
【図1 C】



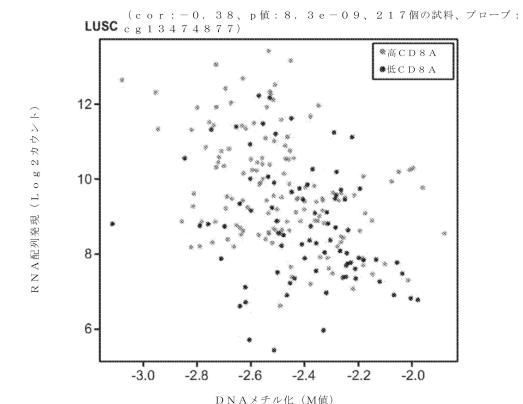
【図1 D】



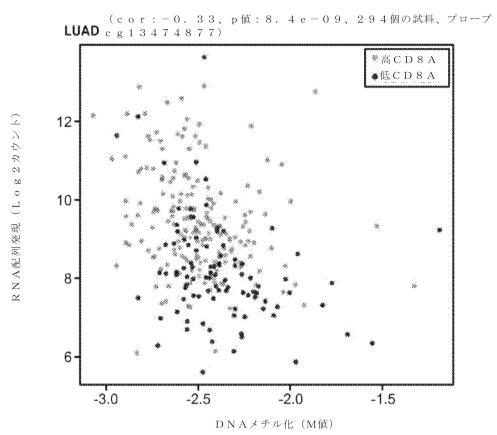
【図1E】



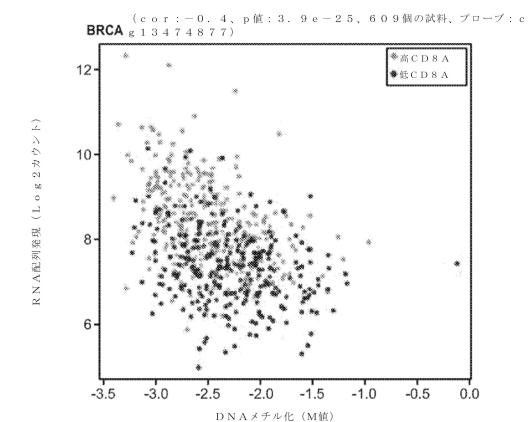
【図2B】



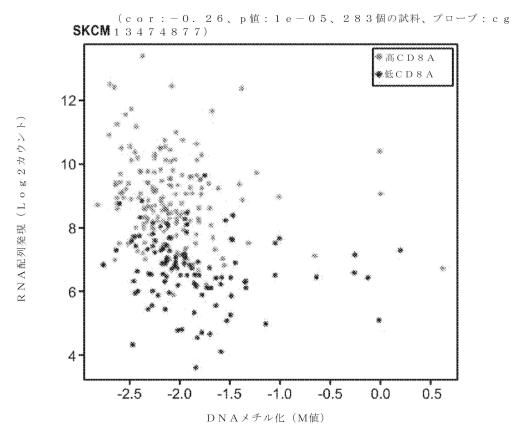
【図2A】



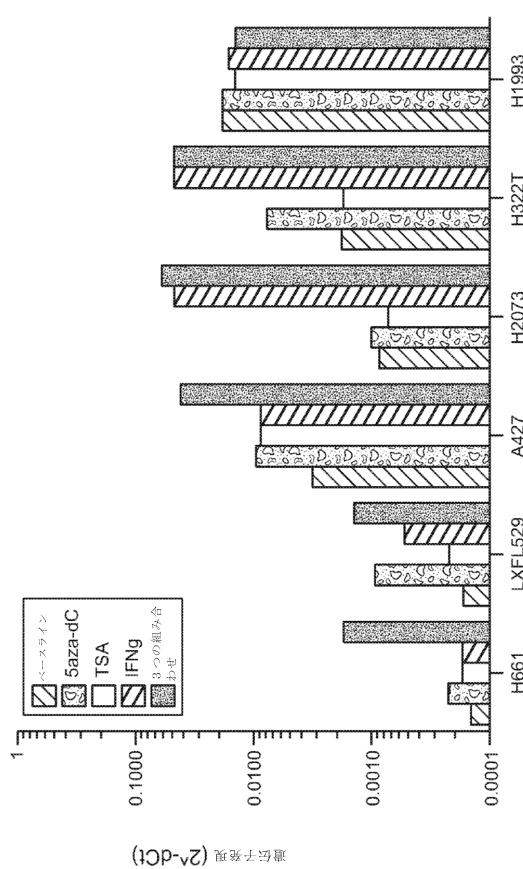
【図2C】



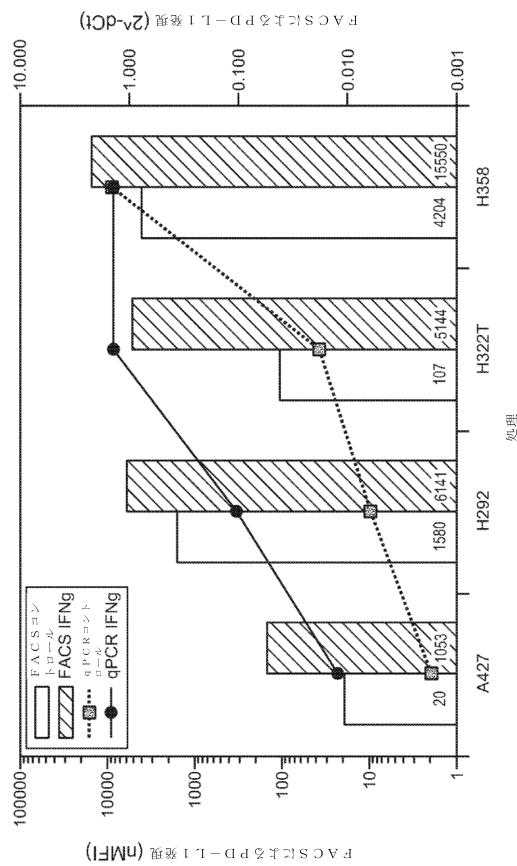
【図2D】



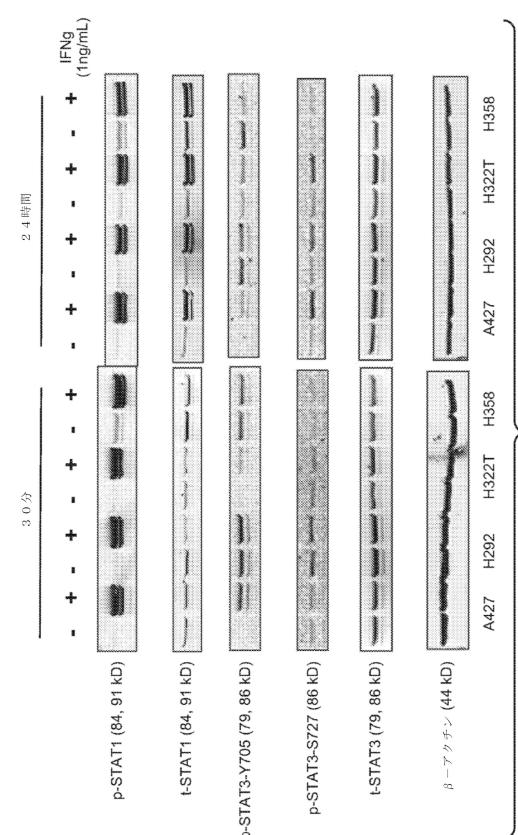
【図3】



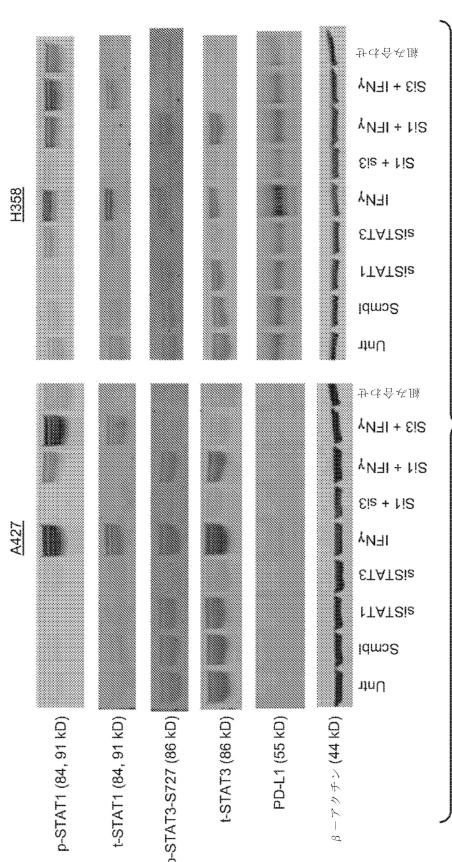
【図4 A】



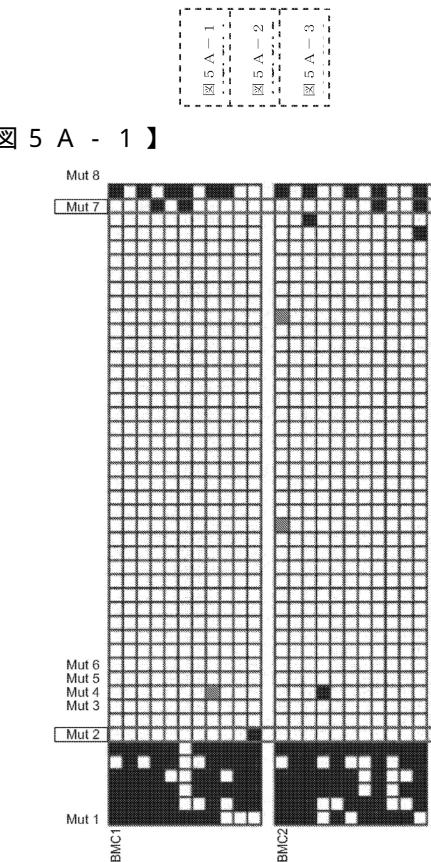
【図4 B】



【図4 C】

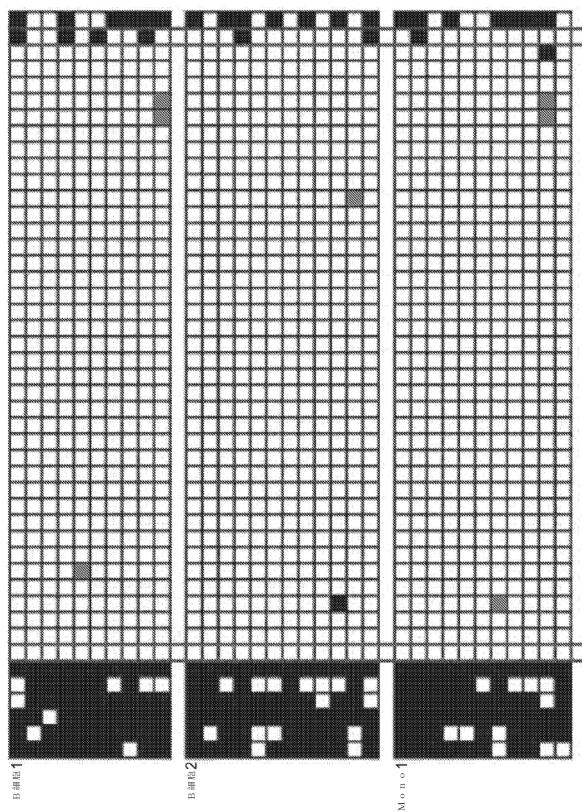


【図5 A】

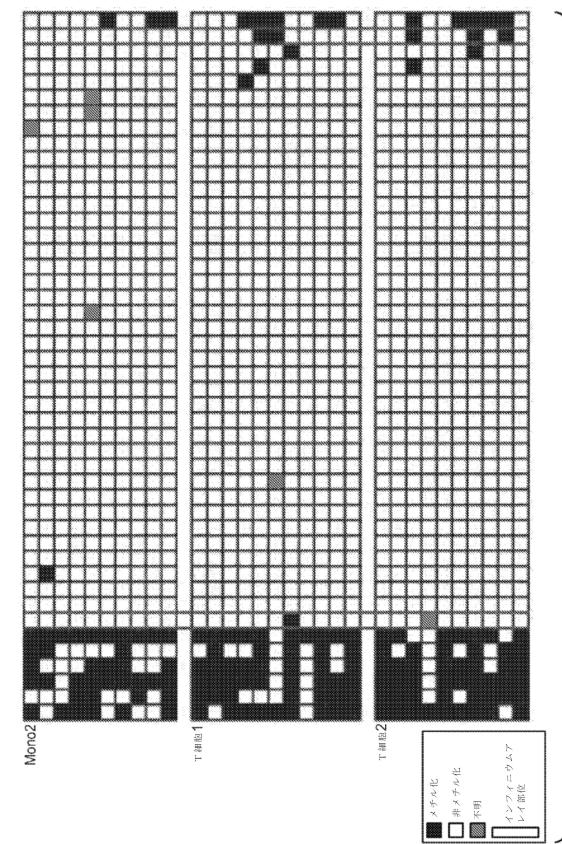


【図5 A-1】

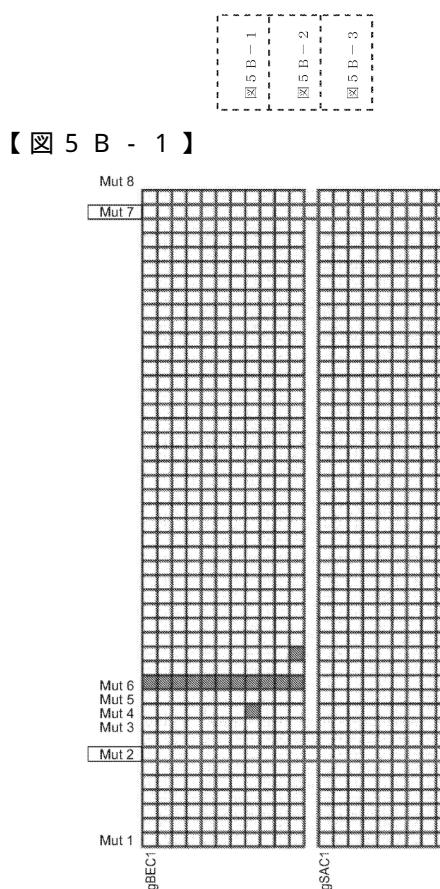
【図 5 A - 2】



【図 5 A - 3】

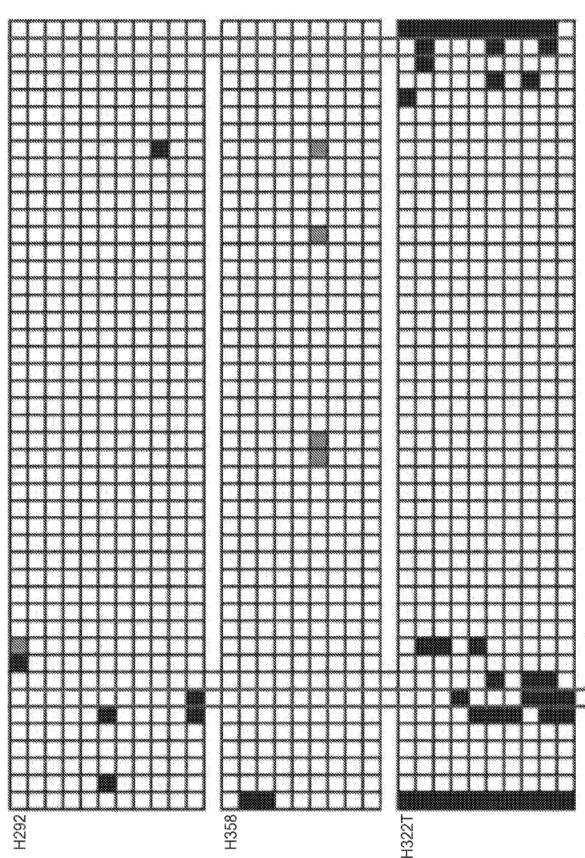


【図 5 B】

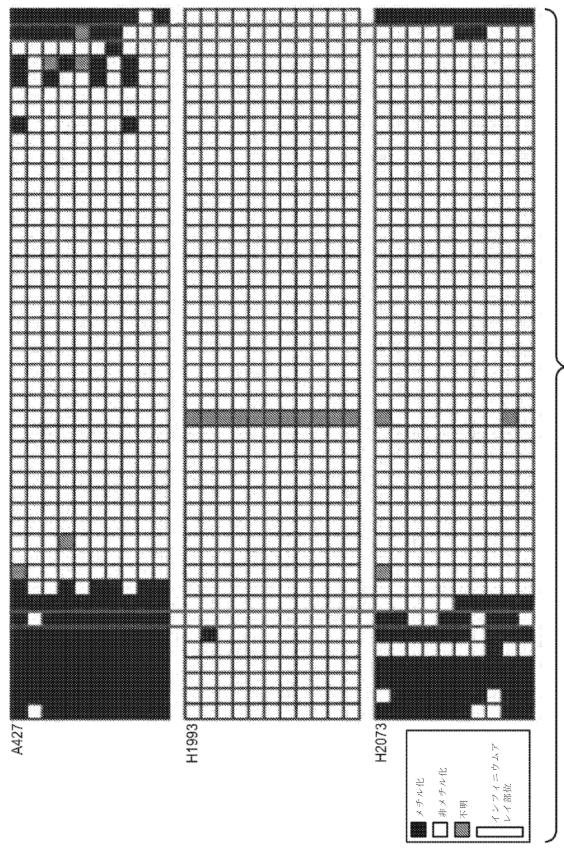


【図 5 B - 1】

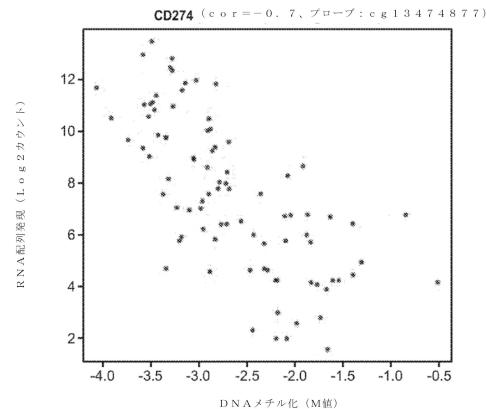
【図 5 B - 2】



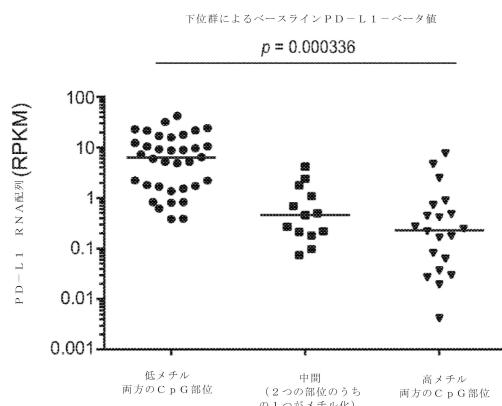
【図 5 B - 3】



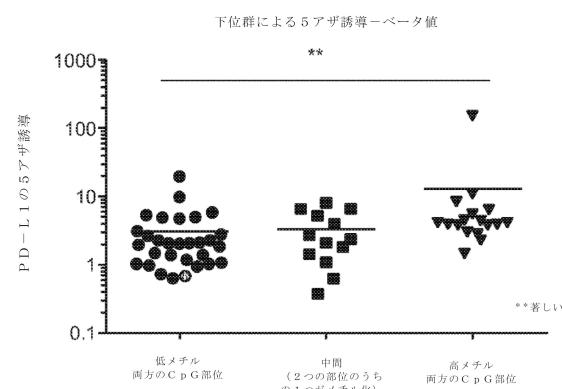
【図 6 A】



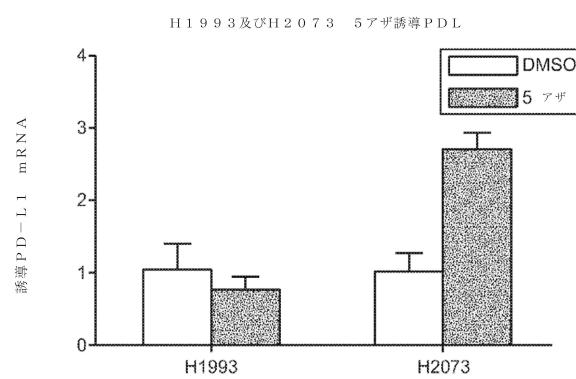
【図 6 B】



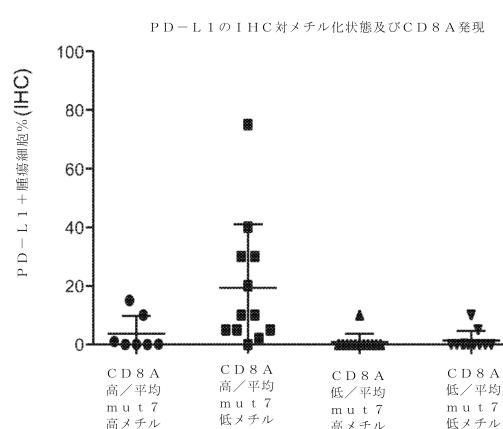
【図 6 C】



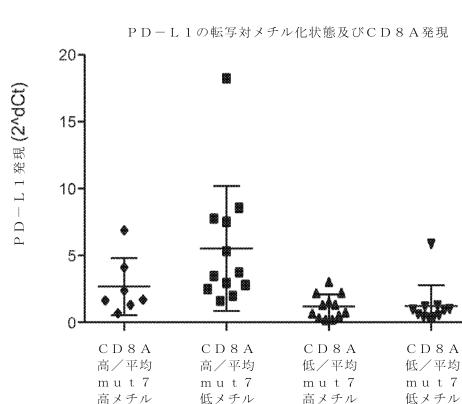
【図 6 D】



【図 7 A】

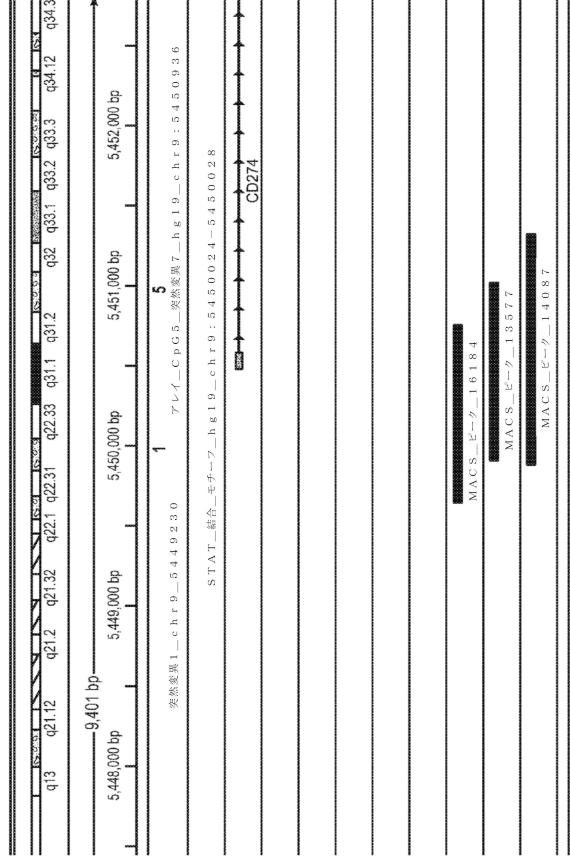


【図 7 B】

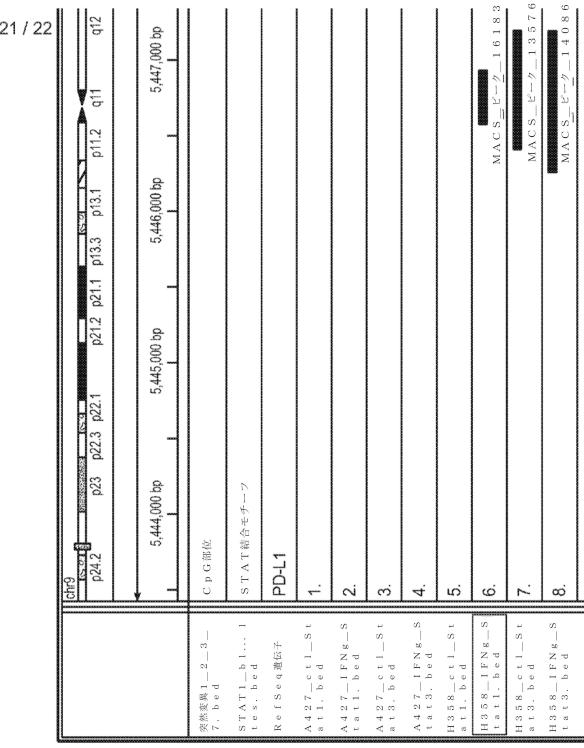


【図8】

【図8B】



【図8A】



【配列表】

0006884111000001.app

## フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I
A 6 1 P 15/00 (2006.01)	A 6 1 P 11/00
A 6 1 P 13/10 (2006.01)	A 6 1 P 15/00
A 6 1 P 17/00 (2006.01)	A 6 1 P 13/10
G 0 1 N 33/50 (2006.01)	A 6 1 P 17/00
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	G 0 1 N 33/50 P C 0 7 K 16/18

(72)発明者 コワネット , マルチン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , 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 , インコーポレイテッド

(72)発明者 ウォルター , キンバリー

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94080 , 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 , インコーポレイテッド

審査官 吉田 知美

(56)参考文献 国際公開第2014/151006 (WO , A1)

国際公開第2015/035112 (WO , A1)

WRANGLE J , ALTERATIONS OF IMMUNE RESPONSE OF NON-SMALL CELL LUNG CANCER WITH AZACYTIDINE , ONCOTARGET , 米国 , 2013年11月 , VOL:4, NR:11 , PAGE(S):2067 - 2079 , U R L , <http://dx.doi.org/10.18632/oncotarget.1542>

ROY S HERBST , PREDICTIVE CORRELATES OF RESPONSE TO THE ANTI-PD-L1 ANTIBODY MPDL3280A IN CANCER PATIENTS , NATURE , 英国 , 2014年11月26日 , VOL:515, NR:7528 , PAGE(S):563 - 567 , U R L , <http://dx.doi.org/10.1038/nature14011>

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

A 6 1 K 39 / 00 - 39 / 44

C 1 2 Q 1 / 6 8 6

C 1 2 Q 1 / 6 8 7 4

A 6 1 P 35 / 00

C 0 7 K 16 / 18

CAplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPI / STN