

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-516966
(P2018-516966A)

(43) 公表日 平成30年6月28日(2018.6.28)

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	4 C 0 8 4
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00 1 2 1	4 H 0 4 5
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 45/06 (2006.01)	A 6 1 K 45/06	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 99 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-564349 (P2017-564349)
 (86) (22) 出願日 平成28年6月9日 (2016.6.9)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年2月8日 (2018.2.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/036608
 (87) 国際公開番号 W02016/201051
 (87) 国際公開日 平成28年12月15日 (2016.12.15)
 (31) 優先権主張番号 62/211, 109
 (32) 優先日 平成27年8月28日 (2015.8.28)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/242, 640
 (32) 優先日 平成27年10月16日 (2015.10.16)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 62/175, 039
 (32) 優先日 平成27年6月12日 (2015.6.12)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 504438727
 マクロジェニクス, インコーポレーテッド
 アメリカ合衆国 20850 メリーランド州、ロックヴィル、メディカル センター ドライブ 9704
 (74) 代理人 100123858
 弁理士 磯田 志郎
 (72) 発明者 ウィギントン ジョン マーク
 アメリカ合衆国 20850 メリーランド州、ロックヴィル、メディカル センター ドライブ 9640
 (72) 発明者 パンディヤ ナイミシュ バラト
 アメリカ合衆国 21029 メリーランド州、クラークスビル、ホーリー クリーク レーン 5107

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 癌の治療のための併用療法

(57) 【要約】

本発明は、HER2/neuに特異的に結合する第1の分子と、免疫チェックポイントに関与する細胞表面受容体(又はそのリガンド)に特異的に結合する第2の分子とを含む、医薬組成物に関する。本発明は特に、上記第2の分子がPD-1に結合する実施形態に関する。本発明はまた、癌及び他の疾患を治療するための、このような医薬組成物の使用にも関する。

【選択図】 図8

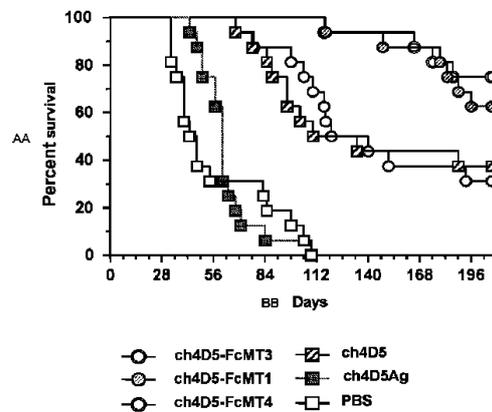


Figure 8

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

癌を治療する方法であって、

前記方法を必要とする被験者に：

(a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号 9、配列番号 11 及び配列番号 13 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖とを備える、変異型キメラ 4D5 抗体；並びに

(b) 免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する、分子

を投与するステップを含む、方法。

10

【請求項 2】

免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する前記分子は、抗 PD - 1 抗体又はその抗原結合断片である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

前記抗 PD - 1 抗体又は抗原結合断片は：

(a) ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体 EH12.2H7、抗体 hPD - 1 mAb 2、抗体 hPD - 1 mAb 7、抗体 hPD - 1 mAb 9、抗体 hPD - 1 mAb 15、若しくは表 1 から選択される抗 PD - 1 抗体との PD - 1 結合に関して競合する；又は

(b) ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体 EH12.2H7、抗体 hPD - 1 mAb 2、抗体 hPD - 1 mAb 7、抗体 hPD - 1 mAb 9、抗体 hPD - 1 mAb 15、若しくは表 1 から選択される抗 PD - 1 抗体の、3 つの重鎖 CDR 及び 3 つの軽鎖 CDR を有する；又は

(c) ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体 EH12.2H7、抗体 hPD - 1 mAb 2、抗体 hPD - 1 mAb 7、抗体 hPD - 1 mAb 9、抗体 hPD - 1 mAb 15、若しくは表 1 から選択される抗 PD - 1 抗体の、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを有する、請求項 2 に記載の方法。

20

【請求項 4】

前記抗 PD - 1 抗体又はその抗原結合断片は、Fc 領域を備える、請求項 2 又は 3 に記載の方法。

30

【請求項 5】

前記抗 PD - 1 抗体又はその抗原結合断片は、前記 Fc 領域に ADC C 活性を低減する少なくとも 1 つの修飾を有する、変異型 Fc 領域を備える、請求項 4 に記載の方法。

【請求項 6】

前記抗 PD - 1 抗体は、ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体 EH12.2H7、抗体 hPD - 1 mAb 2、抗体 hPD - 1 mAb 7、抗体 hPD - 1 mAb 9、抗体 hPD - 1 mAb 15、又は表 1 から選択される抗 PD - 1 抗体の抗原結合断片である、請求項 2 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 7】

前記変異型キメラ 4D5 抗体は、3 週間毎におよそ 6 ~ 18 mg / kg の投薬量で投与され、前記抗 PD - 1 抗体は、3 週間毎におよそ 200 mg の固定投薬量で投与される、請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 8】

前記変異型キメラ 4D5 抗体は、3 週間毎におよそ 6 ~ 18 mg / kg の投薬量で投与され、前記抗 PD - 1 抗体は、3 週間毎におよそ 1 ~ 10 mg / kg の投薬量で投与される、請求項 2 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 9】

前記変異型キメラ 4D5 抗体は、3 週間毎におよそ 6 mg / kg、10 mg / kg、15 mg / kg 及び 18 mg / kg から選択される投薬量で投与される、請求項 7 又は 8 に記載の方法。

50

【請求項 10】

前記抗 P D - 1 抗体は、3 週間毎におよそ 1 m g / k g、2 m g / k g、3 m g / k g 及び 10 m g / k g から選択される投薬量で投与される、請求項 8 又は 9 に記載の方法。

【請求項 11】

前記変異型キメラ 4 D 5 抗体、及び免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する前記分子は、単一の医薬組成物中で、前記被験者に同時に投与される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 12】

前記変異型キメラ 4 D 5 抗体、及び免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する前記分子は、別個の医薬組成物中で、前記被験者に同時に投与され、

10

前記別個の組成物は 24 時間の期間内に投与される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 13】

前記変異型キメラ 4 D 5 抗体、及び免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する前記分子は、別個の医薬組成物中で、前記被験者に順次投与され、

2 番目に投与される前記組成物は、最初に投与される前記組成物の投与の少なくとも 24 時間以上後に投与される、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 14】

前記癌は、H E R 2 / n e u を発現する癌である、請求項 1 ~ 13 のいずれか 1 項に記載の方法。

20

【請求項 15】

前記癌は、H E R 2 / n e u を発現する、乳癌、胃癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌、結腸癌、子宮内膜癌、副腎癌、非小細胞肺癌、頭頸部癌、喉頭癌、肝臓癌、腎臓癌、神経膠芽腫、又は膵臓癌である、請求項 13 に記載の方法。

【請求項 16】

前記治療は、第 3 の治療剤を投与するステップを更に含み、

前記第 3 の治療剤は、抗新生物剤、化学療法剤及び細胞傷害剤からなる群から選択される、請求項 1 ~ 15 のいずれか 1 項に記載の方法。

30

【請求項 17】

前記第 3 の治療剤は、前記変異型キメラ 4 D 5 抗体及び / 又は免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する前記分子と同時に投与される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 18】

前記第 3 の治療剤は、前記変異型キメラ 4 D 5 抗体及び / 又は免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する前記分子とは別個に投与される、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 19】

前記変異型キメラ 4 D 5 抗体はマルゲツキシマブである、請求項 1 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の方法。

40

【請求項 20】

前記抗 P D - 1 抗体はペンブロリズマブである、請求項 2 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 21】

前記抗 P D - 1 抗体はニボルマブである、請求項 2 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

【請求項 22】

前記抗 P D - 1 抗体はピディリズマブである、請求項 2 ~ 19 のいずれか 1 項に記載の方法。

50

【請求項 23】

前記抗PD-1抗体はEH12、2H7である、請求項2～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 24】

前記抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 2である、請求項2～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 25】

前記抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 7である、請求項2～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 26】

前記抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 9である、請求項2～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 27】

前記抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 15である、請求項2～19のいずれか1項に記載の方法。

【請求項 28】

前記抗PD-1抗体は、表1から選択される、請求項2～19のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

米国仮特許出願第62/175,039号(2015年6月12日出願;係属中)、第62/211,109号(2015年8月28日出願;係属中)、及び第62/242,640号(2015年10月16日出願;係属中)に対する優先権を主張するものであり、これらの出願は、参照によりその全体が本出願に援用される。

【0002】

配列表の参照

本出願は、連邦規則法典第37巻第1.821節以下による1つ又は複数の配列表を含み、これらの配列表は、コンピュータ可読媒体(ファイル名:1301_0120PCT_ST25.txt、2016年5月23日作成、サイズ:82,289バイト)において開示されており、上記ファイルは参照によりその全体が本出願に援用される。

【0003】

本発明は、HER2/neuに特異的に結合する第1の分子と、免疫チェックポイントに關与する細胞表面受容体(又はそのリガンド)に特異的に結合する第2の分子とを含む、医薬組成物に關する。本発明は特に、上記第2の分子がPD-1に結合する実施形態に關する。本発明はまた、癌及び他の疾患を治療するための、このような医薬組成物の使用にも關する。

【背景技術】

【0004】

I. HER2/neu及びHER2/neu受容体

細胞成長及び分化プロセスは、チロシンキナーゼ等の特異的受容体を通してその作用を及ぼす成長因子に關与する。チロシンキナーゼ受容体へのリガンドの結合は、細胞増殖及び分化につながる一連のイベントをトリガする(非特許文献1、2)。チロシンキナーゼ受容体は、配列の類似性及び別個の特徴に基づいて、複数のグループに分類できる。1つのこのようなファミリーは、ErbB、即ち上皮性成長因子受容体ファミリーであり、これは、HER-1(erbB-1又はEGFRとしても公知)、HER2/neu(HER-2、erbB-2、c-neu又はp185としても公知)、HER-3(erbB-3としても公知)及びHER-4(erbB-4としても公知)として知られる、複数

10

20

30

40

50

の受容体を含む（例えば、非特許文献 1、3、4、5、6、7、8、9 参照）。

【0005】

Er b B 受容体は、正常な成長プロセス及びヒト腫瘍形成の両方における、細胞増殖、分化、運動性及びアポトーシスを調節する信号の伝播において重要な役割を果たす（非特許文献 10）。例えば er b B 受容体の活性化は、下流の MAPK - Erk 1 / 2 及びホスホイノシチド - 3 - キナーゼ (PI₃K) / AKT 成長及び生存経路に結合され、これを刺激する。癌におけるこれらの経路の脱制御は、疾患の進行及び治療に対する抵抗性に関連していた（非特許文献 11、12、13、14、15）。PI₃K / AKT の活性化は、細胞生存、及び増強された腫瘍攻撃性を促進し、AKT 2 は、HER2 / neu 過剰発現型乳癌において活性化されて過剰発現することが報告されている（非特許文献 16、17、18）。

10

【0006】

受容体の Er b B ファミリーによるシグナリングは、ホモ又はヘテロ受容体の二量体化、複数の細胞質末端の相互チロシンリン酸化、及び細胞内シグナル伝達経路の活性化をトリガする、リガンド結合によって開始される（非特許文献 19）。Er b B 受容体に結合してこれを活性化するリガンドの可用性は、特異的タンパク質の細胞表面外部ドメイン脱落を触媒する亜鉛依存性メタロプロテアーゼの ADAM (a d i s i n t e g r i n a n d m e t a l l o p r o t e a s e) ファミリー等の様々なメタロプロテアーゼによって仲介される（非特許文献 20、21、22 参照）。具体的には、ADAM ファミリーは、APP 及び Notch といった、Er b B 受容体を活性化する役割を果たすリガンドを切断することが示されている（非特許文献 23）。

20

【0007】

HER2 / neu は、Er b B ファミリーの重要なメンバーである。化学処置済みラットの神経芽腫からの ERBB2 形質転換遺伝子の産物として元々同定されていたのは、185 kDa 受容体タンパク質である。HER2 / neu は、複数のヒト癌腫及び哺乳類成長におけるその役割により、幅広く調査されている（非特許文献 24、25、26）。ヒト Her2 / neu 遺伝子及び HER2 / neu タンパク質は非特許文献 3、27 に記載されており、配列は受託番号 X03363 として GenBank で入手可能である。HER2 / neu は、4つのドメイン：リガンドが結合する細胞外ドメイン；親油性膜貫通ドメイン；保存された細胞内チロシンキナーゼドメイン；及びリン酸化可能な複数のチロシン残基を有するカルボキシ末端シグナリングドメインを備える（非特許文献 28）。HER2 / neu 細胞外ドメイン (ECD) の配列は非特許文献 29 に記載されており、Protein Data Bank Record 1S78 (2004) において入手可能である。

30

【0008】

HER2 / neu は成長因子受容体として機能し、多くの場合、乳癌、卵巣癌又は肺癌の癌細胞によって発現される。HER2 / neu は、ヒト乳癌及び卵巣癌の 25 ~ 30% において過剰に発現し、その過剰発現は、影響を受けた患者における攻撃的な臨床的進行及び不良予後に関連する（非特許文献 30、10）。HER2 / neu の過剰発現はまた、胃、子宮内膜、唾液腺、肺、腎臓、結腸、甲状腺、膵臓及び膀胱の癌腫を含む他の癌腫の癌細胞においても観察されている（例えば非特許文献 31、32、33 参照）。

40

【0009】

HER2 / neu の活性化は、乳癌患者のホルモン療法に対する臨床的応答の低減に関連している（非特許文献 34、35）。実際、HER2 / neu 発現は、抗エストロゲン抵抗性を伝達するために十分である（非特許文献 36）。HER2 / neu 及び HER-3 は、前立腺癌患者のホルモン抵抗の発現に関与すると思われる。前立腺癌患者のおよそ 1 / 3 は、精巣及び副腎アンドロゲンの作用を中断させることを目的とするホルモン療法治療を受ける。乳癌と同様、抵抗は不可避である。最新のデータは、HER2 / neu 及び HER-3 から発せられるシグナルが「ホルモン抵抗性 (hormone - refractory)」状態を誘発することを示唆している（非特許文献 37）。

50

【0010】

HER2/neuの複数の切断及びスプライシングされたバージョンが公知である。例えば、一部の消化管癌腫細胞の核周囲細胞質中に存在する切断ECDは、イントロン中においてポリアデニル化シグナルを用いて生成される代替転写物によって産生される（非特許文献27、38）。HER2/neuのECDはまた、培養物中の乳癌細胞からタンパク質分解的に流出でき、これは一部の癌患者の血清中に見られ、転移性乳癌及び全体的な不良予後の血清マーカーとなり得る（非特許文献39、40、38、41）。一部のHER2/neu過剰発現癌細胞では、公知のメタロプロテアーゼ活性化因子、4-アミノフェニル水銀アセテート（APMA）が、ADAM10及びADAM15といったメタロプロテアーゼを活性化して、HER2/neu受容体を2つの部分、即ち：p95として公知である、切断された膜伸介型受容体；及びp105又はECD105として公知である可溶性ECDに切断する（例えば非特許文献42、特許文献1参照）。ECDの喪失により、p95受容体は、成長及び生存シグナルを癌細胞に送達できる、恒常的に活性のチロシンキナーゼとなる（例えば特許文献2参照）。

10

【0011】

HER2/neu過剰発現乳癌細胞において、HER2/neuに特異的な抗体を化学療法剤（例えばシスプラチン、ドキシソルピシン、タキソール）と組み合わせて用いた治療は、化学療法単独での治療より高い細胞傷害応答を誘発することが、研究によって示されている（非特許文献43、44、45）。HER2/neu抗体が化学療法剤に対する応答を増強し得る可能な機序は、HER2/neuタンパク質発現の変調によるもの、又はDNA修復に干渉することによるものである（非特許文献46、47、48、49、50、51）。

20

【0012】

HER-1又はHER2/neuを標的とする多数のモノクローナル抗体及び小分子チロシンキナーゼ阻害剤が開発されている。例えば、マウス抗体「4D5」として公知のマウスモノクローナル抗体は、膜貫通領域の極めて近傍に位置するHER2/neuの富システインIIDメイン中の細胞外エピトープ（アミノ酸529～627）を認識する。マウス4D5及びヒト化4D5を用いた乳癌細胞の治療は、受容体リン酸化アッセイによって測定されるHER2/neu-HER-3複合体のNDF/ヘレグリン活性化を部分的にブロックする（非特許文献52、53、54、55、56、57）。しかしながら、ヒトへのマウス4D5の投与は、患者がヒト抗マウス抗体（HAMA）応答を迅速に発現し、マウス4D5のヒト化形態が発現するため、臨床的に失敗であった。ヒト化4D5抗体の配列及び結晶構造は、特許文献3、非特許文献52、58に記載されている。

30

【0013】

「トラスツズマブ」（Genentech, Inc. がHerceptin（登録商標）として販売）として公知のマウス4D5抗体のヒト化形態が開発されており、乳癌を含む、HER2/neuの過剰発現又は遺伝子増幅を伴う癌の治療のために認可されている（非特許文献59）。トラスツズマブは、ECD及びp95部分へのHER2/neuのインビトロでのAPMA伸介型切断を阻害し、また、HER2/neu流出の可能な阻害を含む異なる複数の機序によってインビトロで作用すると考えられている（非特許文献60、61、62）。しかしながらトラスツズマブ療法は、心毒性、及び一部の患者におけるヒト抗ヒト化抗体（HAAA）応答の発現といった、様々な欠点を有する。

40

【0014】

癌療法に使用するための、抗HER2/neu抗体の新規の改良された形態、例えば親和性又は特異性の増大、HAMA又はHAAA応答の可能性の低減、エフェクタ機能の増強等が見られる操作済みキメラ4D5抗体が、本明細書において提供され、またこれは特許文献4に記載されている。このような操作済み4D5抗体は、低HER2/neu発現因子を含むHER2/neu陽性腫瘍に対して増強されたADCC活性を呈し、これは前臨床試験における上記エフェクタ細胞に関するFcR変異型とは独立していることが示されている（非特許文献63）。更に、第I相試験は、このような抗体が、以前にHER

50

- 2 / n e u 療法に失敗した乳癌及び胃食道癌の患者、並びにトラスツズマブが有効でないと考えられる H E R 2 / n e u 発現型腫瘍の患者において、有望な活性で十分な耐容性を有することを示している（非特許文献 6 4）。よってこのような改善された抗 H E R 2 / n e u 抗体は、腫瘍が低レベルの H E R 2 / n e u を発現する患者、又は他の H E R 2 / n e u 療法に失敗した患者のための、新規の治療選択肢を開拓する。

【 0 0 1 5 】

I I . 細胞仲介性免疫応答

ヒト及び他の哺乳類の免疫系は、感染及び疾患に対して保護を提供する役割を果たす。このような保護は、体液性免疫応答及び細胞仲介性免疫応答の両方によって提供される。体液性免疫応答により、異物標的（抗原）を認識して中和できる抗体及び他の生体分子の産生が得られる。対照的に、細胞仲介性免疫応答は、T細胞によるマクロファージ、ナチュラルキラー（NK）細胞及び抗原特異性細胞毒性Tリンパ球の活性化、並びに抗原の認識に応じた様々なサイトカインの放出を伴う（非特許文献 6 5）。

10

【 0 0 1 6 】

抗原に対して免疫応答を最適に仲介するT細胞の能力は、2つの別個のシグナリング相互作用を必要とする（非特許文献 6 6、6 7）。まず、抗原提示細胞（抗原 - P r e s e n t i n g C e l l : A P C）の表面上に存在する抗原を、抗原特異性ナイーブ C D 4 + T細胞に対して提示する必要がある。このような提示により、提示された抗原に対して特異的となる免疫応答を開始するようにT細胞に指示するT細胞受容体（T - C e l l R e c e p t o r : T C R）を介して、シグナルが送達される。次に、A P C と別個のT細胞表面分子との間の相互作用によって仲介される一連の共刺激及び阻害シグナルが、まずT細胞の活性化及び増殖を、最終的にはT細胞の阻害をトリガする。従って、第1のシグナルは免疫応答に対して特異性を付与し、第2のシグナルは、上記応答の性質、強さ及び持続時間を決定する役割を果たす。

20

【 0 0 1 7 】

免疫系は、共刺激及び共阻害リガンド及び受容体によって厳密に制御される。これらの分子は、T細胞活性化のための第2のシグナルを提供し、また自己に対する免疫を制限しながら感染に対する免疫応答を最大化するための、ポジティブ及びネガティブシグナルの平衡ネットワークを提供する（非特許文献 6 8、6 9）。自己寛容を維持し、免疫応答の期間及び振幅を変調するために重要な阻害経路を、まとめて免疫チェックポイントと呼ぶ。特に重要なのは、抗原提示細胞の B 7 . 1 (C D 8 0) 及び B 7 . 2 (C D 8 6) リガンドと、C D 4 + Tリンパ球の C D 2 8 及び C T L A - 4 受容体との間の結合である（非特許文献 7 0、6 5、7 1）。C D 2 8 に対する B 7 . 1 又は B 7 . 2 の結合は、T細胞活性化を刺激し、C T L A - 4 に対する B 7 . 1 又は B 7 . 2 の結合は、上記活性化を阻害する（非特許文献 6 5、7 1、7 2）。C D 2 8 は、T細胞の表面上に恒常的に発現し（非特許文献 7 3）、その一方で C T L A - 4 の発現は、T細胞活性化に続いて急速に上方制御される（非特許文献 7 4）。C T L A - 4 は高親和性受容体である（非特許文献 7 0）ため、結合はまず（C D 2 8 による）T細胞増殖を開始させ、その後（C T L A - 4 の初期発現によって）T細胞増殖を阻害し、これにより、増殖がもはや必要ない場合にその効果を減衰させる。

30

40

【 0 0 1 8 】

C D 2 8 受容体のリガンドに対する更なる調査により、関連する B 7 分子のセット（「B 7 スーパーファミリー（B 7 S u p e r f a m i l y）」の識別及び特性決定が得られた（非特許文献 7 0、7 2、7 5、7 6、6 7、7 7、7 8、7 9）。現在、上記ファミリーの複数のメンバーが公知である：B 7 . 1 (C D 8 0)、B 7 . 2 (C D 8 6)、誘導性共刺激因子リガンド（I C O S - L）、プログラム死 - 1 リガンド（P D - L 1 ; B 7 - H 1）、プログラム死 - 2 リガンド（P D - L 2 ; B 7 - D C）、B 7 - H 3、B 7 - H 4 及び B 7 - H 6（非特許文献 7 5、8 0）。

【 0 0 1 9 】

I I I . P D - 1

50

プログラム死 - 1 (「PD - 1」) は、免疫応答を幅広く下方制御する T 細胞制御因子の拡張 CD 28 / CTLA 4 ファミリーの、およそ 31 kD の I 型膜タンパク質メンバーである (非特許文献 81、特許文献 5 ~ 13)。

【0020】

PD - 1 は、活性化された T 細胞、B 細胞及び単球上で (非特許文献 82、83)、並びにナチュラルキラー (NK) T 細胞中において低レベルで (非特許文献 84、85)、発現する。

【0021】

PD - 1 の細胞外領域は、CTLA - 4 の同等のドメインに対して 23% の同一性を有する単一免疫グロブリン (Ig) V ドメインで構成される (非特許文献 85)。細胞外 Ig V ドメインには、膜透過性領域及び細胞内テールが続く。細胞内テールは、免疫受容体チロシン系阻害モチーフ及び免疫受容体チロシン系スイッチモチーフ内に位置する 2 つのリン酸化部位を含有し、これは、PD - 1 が TCR シグナルを下方制御することを示唆している (非特許文献 81、86)。

【0022】

PD - 1 は、B7 - H1 及び B7 - DC への結合によって、免疫系の阻害を仲介する (非特許文献 77、特許文献 14 ~ 21)。

【0023】

B7 - H1 及び B7 - DC は、心臓、胎盤、筋肉、胎児の肝臓、脾臓、リンパ節及び胸腺、並びにマウスの肝臓、肺、腎臓、膵臓の島細胞及び小腸といった、ヒト及びマウス組織の表面上で広く発現する (非特許文献 85)。ヒトでは、B7 - H1 タンパク質発現は、ヒト内皮細胞 (非特許文献 87、88、89)、心筋 (非特許文献 90)、合胞体栄養細胞 (非特許文献 91) において見られた。上記分子はまた、いくつかの組織の常在性マクロファージによって、インターフェロン (IFN) - 又は腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor: TNF) - によって活性化されたマクロファージによって (非特許文献 92)、及び腫瘍内において (非特許文献 93) も発現される。

【0024】

B7 - H1 と PD - 1 との間の相互作用は、T 及び B 細胞に対する重大な下方共刺激シグナル (非特許文献 85)、並びに細胞死誘導因子としての機能 (非特許文献 81、94) を提供することが分かっている。より具体的には、低濃度の PD - 1 受容体と B7 - H1 リガンドとの間の相互作用は、抗原特異性 CD 8⁺ T 細胞の増殖を強く阻害する阻害シグナルの伝達をもたらすことが分かっており；高濃度では、PD - 1 との相互作用は T 細胞増殖を阻害しないものの、複数のサイトカインの産生を明らかに低減させる (非特許文献 70)。休止 CD 4 及び CD 8 T 細胞並びに既に活性化された CD 4 及び CD 8 T 細胞の両方、更には臍帯血由来のナイーブ T 細胞による、T 細胞増殖及びサイトカイン産生は、可溶性 B7 - H1 - Fc 融合タンパク質によって阻害されることが分かっている (非特許文献 95、92、96、70)。

【0025】

T 細胞活性化及び増殖における B7 - H1 及び PD - 1 の役割は、これらの生体分子が、炎症及び癌の治療のための治療標的として機能し得ることを示唆している。従って、感染及び腫瘍の治療並びに適応免疫応答の上方調節のための抗 PD - 1 抗体の使用が提案されている (特許文献 22、23、24、6、25、26、27、28、29、30 を参照)。PD - 1 に特異的に結合できる抗体は、非特許文献 82 及び 97 によって報告されている (特許文献 31 ~ 40、29、41 ~ 43、30、44 ~ 48 も参照)。

【0026】

IV. HER2 / neu 発現型癌

HER2 / neu の増幅又は過剰発現は、乳癌のおよそ 25 ~ 30% で発生する (非特許文献 98、99)。過剰発現は、卵巣、胃、及び子宮癌の攻撃的な形態でも発生することが公知である (例えば非特許文献 33、100、101 参照)。上述のように、HER2 / neu の過剰発現は、疾患の再発の増加及び不良予後に強く関連する。しかしながら

10

20

30

40

50

HER2/neuは、トラスツズマブ及びマルゲツキシマブといった、受容体の細胞外ドメインを標的とするモノクローナル抗体、並びにラパチニブといった、HER2標的特異性作用剤の細胞内ドメイン内においてチロシンキナーゼ(TK)活性をブロックできる小分子アデノシン三リン酸(ATP)競合因子を含む、抗HER2/neu薬剤のための重要な標的でもある(非特許文献102、103、104)。

【0027】

HER2/neuを過剰発現する癌の有効な標的化により、無増悪生存(progression-free survival:PFS)及び全生存(overall survival:OS)率が改善されているが、HER2/neu発現型転移性乳癌は、不治の疾患であり続けている。実際、多くの乳癌患者が、トラスツズマブ及びラパチニブといったHER2/neu標的作用剤での治療後に再発しており、これは新規の又は獲得された耐性の存在を示している(非特許文献101、105、106)。更に、低HER2/neu発現もまた、不良予後に関連し得る(非特許文献107)。しかしながら、いずれのHER2/neu標的治療療法も、低レベルのHER2/neuを発現する癌の患者に対して認可されていない。これらの知見は、HER2/neuを発現する癌のための改善された療法を開発する重要性を強調するものである。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0028】

【特許文献1】米国公開特許第2004/0247602号

【特許文献2】米国特許第6,541,214号

【特許文献3】米国特許第6,054,297号

【特許文献4】国際公開第2009/123894号

【特許文献5】米国特許出願公開第2007/0202100号

【特許文献6】米国特許出願公開第2008/0311117号

【特許文献7】米国特許出願公開第2009/00110667号

【特許文献8】米国公開特許第6,808,710号

【特許文献9】米国公開特許第7,101,550号

【特許文献10】米国公開特許第7,488,802号

【特許文献11】米国公開特許第7,635,757号

【特許文献12】米国公開特許第7,722,868号

【特許文献13】国際公開第01/14557号

【特許文献14】米国公開特許第6,803,192号

【特許文献15】米国公開特許第7,794,710号

【特許文献16】米国特許出願公開第2005/0059051号

【特許文献17】米国特許出願公開第2009/0055944号

【特許文献18】米国特許出願公開第2009/0274666号

【特許文献19】米国特許出願公開第2009/0313687号

【特許文献20】国際公開第01/39722号

【特許文献21】国際公開第02/086083号

【特許文献22】米国特許出願公開第2010/0040614号

【特許文献23】米国特許出願公開第2010/0028330号

【特許文献24】米国特許出願公開第2004/0241745号

【特許文献25】米国特許出願公開第2009/0217401号

【特許文献26】米国公開特許第7,521,051号

【特許文献27】米国公開特許第7,563,869号

【特許文献28】米国公開特許第7,595,048号

【特許文献29】国際公開第2004/056875号

【特許文献30】国際公開第2008/083174号

【特許文献31】米国公開特許第8,008,449号

10

20

30

40

50

- 【特許文献 3 2】米国公開特許第 8, 5 5 2, 1 5 4 号
- 【特許文献 3 3】米国公開特許第 2 0 0 7 / 0 1 6 6 2 8 1 号
- 【特許文献 3 4】米国公開特許第 2 0 1 2 / 0 1 1 4 6 4 8 号
- 【特許文献 3 5】米国公開特許第 2 0 1 2 / 0 1 1 4 6 4 9 号
- 【特許文献 3 6】米国公開特許第 2 0 1 3 / 0 0 1 7 1 9 9 号
- 【特許文献 3 7】米国公開特許第 2 0 1 3 / 0 2 3 0 5 1 4 号
- 【特許文献 3 8】米国公開特許第 2 0 1 4 / 0 0 4 4 7 3 8 号
- 【特許文献 3 9】国際公開第 2 0 0 3 / 0 9 9 1 9 6 号
- 【特許文献 4 0】国際公開第 2 0 0 4 / 0 0 4 7 7 1 号
- 【特許文献 4 1】国際公開第 2 0 0 4 / 0 7 2 2 8 6 号 10
- 【特許文献 4 2】国際公開第 2 0 0 6 / 1 2 1 1 6 8 号
- 【特許文献 4 3】国際公開第 2 0 0 7 / 0 0 5 8 7 4 号
- 【特許文献 4 4】国際公開第 2 0 0 9 / 0 1 4 7 0 8 号
- 【特許文献 4 5】国際公開第 2 0 0 9 / 0 7 3 5 3 3 号
- 【特許文献 4 6】国際公開第 2 0 1 2 / 1 3 5 4 0 8 号
- 【特許文献 4 7】国際公開第 2 0 1 2 / 1 4 5 5 4 9 号
- 【特許文献 4 8】国際公開第 2 0 1 3 / 0 1 4 6 6 8 号
- 【非特許文献】
- 【0 0 2 9】
- 【非特許文献 1】Carpenter, G. et al. (1979) "Epidermal Growth Factor," *Annu Rev Biochem.* 48:193-216 20
- 【非特許文献 2】Sachs et al. (1987) "Cell Differentiation And Bypassing Of Genetic Defects In The Suppression Of Malignancy," *Cancer Res.* 47:1981-1986
- 【非特許文献 3】Semba, K. et al. (1985) "A v-erbB-Related Protooncogene, c-erbB-2, Is Distinct From The c-erbB-1/Epidermal Growth Factor-Receptor Gene And Is Amplified In A Human Salivary Gland Adenocarcinoma," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 82:6497-6501
- 【非特許文献 4】Cousens, L. et al. (1985) "Tyrosine Kinase Receptor With Extensive Homology To EGF Receptor Shares Chromosomal Location With neu Oncogene," *Science* 230:1132-1139 30
- 【非特許文献 5】Bargmann, C.I. et al. (1986) "Multiple Independent Activations Of The Neu Oncogene By A Point Mutation Altering The Transmembrane Domain Of p185," *Cell* 45:649-657
- 【非特許文献 6】Kraus, M.H. et al. (1989) "Isolation And Characterization Of ERBB3, A Third Member Of The ERBB/Epidermal Growth Factor Receptor Family: Evidence For Overexpression In A Subset Of Human Mammary Tumors," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:9193-9197
- 【非特許文献 7】Carraway, K.L. et al. (1994) "The erbB3 Gene Product Is A Receptor For Heregulin," *J. Biol. Chem.* 269:14303-14306
- 【非特許文献 8】Plowman, G.D. et al. (1993) "Heregulin Induces Tyrosine Phosphorylation Of HER4/p180erbB4," *Nature* 366: 473-475 40
- 【非特許文献 9】Tzahar, E. et al. (1994) "ErbB-3 and ErbB-4 Function As The Respective Low And High Affinity Receptors Of All neu Differentiation Factor/Heregulin Isoforms," *Biol. Chem.* 269: 25226-25233
- 【非特許文献 1 0】Slamon, D.J. et al. (1989) "Studies Of The HER-2/neu Proto-Oncogene In Human Breast And Ovarian Cancer," *Science* 244:707-712
- 【非特許文献 1 1】Fukazawa, T. et al. (1996) "Tyrosine Phosphorylation Of Cbl Upon Epidermal Growth Factor (EGF) Stimulation And Its Association With EGF Receptor And Downstream Signaling Proteins," *J. Biol. Chem.* 271:14554-14559
- 【非特許文献 1 2】Tzahar, E. et al. (1996) "A Hierarchical Network Of Interrece 50

ptor Interactions Determines Signal Transduction By neu Differentiation Factor/Neuregulin And Epidermal Growth Factor," *Mol. Cell. Biol.* 16:5276-5287

【非特許文献 1 3】Lange, C.A. et al. (1998) "Convergence Of Progesterone And Epidermal Growth Factor Signaling In Breast Cancer. Potentiation Of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways," *J. Biol. Chem.* 273:31308-31316

【非特許文献 1 4】Olayioye, M.A. et al. (1998) "ErbB-1 And ErbB-2 Acquire Distinct Signaling Properties Dependent Upon Their Dimerization Partner," *Mol. Cell. Biol.* 18:5042-5051

【非特許文献 1 5】Hackel, P.O. et al. (1999) "Epidermal Growth Factor Receptors: Critical Mediators Of Multiple Receptor Pathways," *Curr. Opin. Cell Biol.* 11:184-189 10

【非特許文献 1 6】Shak, S. (1999) "Overview Of The Trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 Monoclonal Antibody Clinical Program In HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer," *Semin. Oncol. Suppl* 12:71-77

【非特許文献 1 7】Huang, S.M. et al. (2000) "Modulation Of Radiation Response After Epidermal Growth Factor Receptor Blockade In Squamous Cell Carcinomas: Inhibition Of Damage Repair, Cell Cycle Kinetics, And Tumor Angiogenesis," *Clinical Cancer Res.* 7:2166-2174

【非特許文献 1 8】Bacus, S.S. et al. (2002) "AKT2 Is Frequently Upregulated In HER-2/neu-Positive Breast Cancers And May Contribute To Tumor Aggressiveness By Enhancing Cell Survival," *Oncogene* 21:3532-3540 20

【非特許文献 1 9】Citri, A. et al. (2003) "The Deaf And The Dumb: The Biology Of ErbB-2 And ErbB-3," *Exp. Cell Res.* 284:54-65

【非特許文献 2 0】Chang, C. and Werb, Z. (2001) "The Many Faces Of Metalloproteases: Cell Growth, Invasion, Angiogenesis And Metastasis," *Trends in Cell Biology* 11:S37-S43

【非特許文献 2 1】Moss, M.L. et al. (2002) "Shedding Of Membrane Proteins By ADAM Family Proteases," *Essays in Biochemistry* 38:141-153

【非特許文献 2 2】Seals, D.F. et al. (2003) "The ADAMs Family Of Metalloproteases: Multidomain Proteins With Multiple Functions," *Genes and Development* 17:7-30 30

【非特許文献 2 3】Blobel, C.P. (2005) "ADAMs: Key Components In EGFR Signalling And Development," *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 6:32-43

【非特許文献 2 4】Hynes, N.E. et al. (1994) "The Biology Of erbB-2/neu/HER-2 And Its Role In Cancer," *Biochim. et Biophys. Acta* 1198:165-184

【非特許文献 2 5】Dougall, W.C. et al. (1994) "The neu-Oncogene: Signal Transduction Pathways, Transformation Mechanisms And Evolving Therapies," *Oncogene* 9:2109-2123

【非特許文献 2 6】Lee, K.F. et al. (1995) "Requirement For Neuregulin Receptor erbB2 In Neural And Cardiac Development," *Nature* 378:394-398 40

【非特許文献 2 7】Yamamoto, T. et al. (1986) "Similarity Of Protein Encoded By The Human c-erbB-2 Gene To Epidermal Growth Factor Receptor," *Nature* 319:230-234

【非特許文献 2 8】Plowman, G.D. et al. (1993) "Ligand-Specific Activation Of HER4/p180erbB4, A Fourth Member Of The Epidermal Growth Factor Receptor Family," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:1746-1750

【非特許文献 2 9】Franklin, M.C. et al. (2004) "Insights Into ErbB Signaling From The Structure Of The ErbB2-Pertuzumab Complex," *Cancer Cell.* 5(4):317-328

【非特許文献 3 0】Slamon, D.J. et al. (1987) "Human Breast Cancer: Correlation Of Relapse And Survival With Amplification Of The HER-2/neu Oncogene," *Science* 235:703-708 50

235:177-182

- 【非特許文献 3 1】King, C.R. et al. (1985) "Amplification Of A Novel v-erbB-Related Gene In A Human Mammary Carcinoma," *Science* 229:974
- 【非特許文献 3 2】McCann, A. et al. (1990) "c-erbB-2 Oncoprotein Expression In Primary Human Tumors," *Cancer* 65:88-92
- 【非特許文献 3 3】Yonemura, Y. et al. (1991) "Evaluation Of Immunoreactivity For erbB-2 Protein As A Marker Of Poor Short Term Prognosis In Gastric Cancer" *Cancer Research* 51:1034
- 【非特許文献 3 4】Wright, C. et al. (1989) "Expression Of c-erbB-2 Oncoprotein : A Prognostic Indicator In Human Breast Cancer," *Cancer Res.* 49:2087-2090 10
- 【非特許文献 3 5】Kurokawa, H. et al. (2001) "Inhibition Of erbB Receptor (HER) Tyrosine Kinases As A Strategy To Abrogate Antiestrogen Resistance In Human Breast Cancer," *Clin. Cancer Res.* 7:4436s-442s, 4411s-4412s
- 【非特許文献 3 6】Benz, C.C. et al. (1993) "Estrogen-Dependent, Tamoxifen-Resistant Tumorigenic Growth Of MCF-7 Cells Transfected With HER2/neu," *Breast Cancer Res. Treat.* 24:85-95
- 【非特許文献 3 7】Mellinghoff, I.K. et al. (2004) "HER2/neu Kinase-Dependent Modulation Of Androgen Receptor Function Through Effects On DNA Binding And Stability," *Cancer Cell* 6:517-527
- 【非特許文献 3 8】Scott, G.K. et al. (1993) "A Truncated Intracellular HER2/neu Receptor Produced By Alternative RNA Processing Affects Growth Of Human Carcinoma Cells," *Mol. Cell. Biol.* 13:2247-2257 20
- 【非特許文献 3 9】Petch, L.A. et al. (1990) "A Truncated, Secreted Form Of The Epidermal Growth Factor Receptor Is Encoded By An Alternatively Spliced Transcript In Normal Rat Tissue," *Mol. Cell. Biol.* 10:2973-2982
- 【非特許文献 4 0】Leitzel, K. et al. (1992) "Elevated Soluble c-erbB-2 Antigen Levels In The Serum And Effusions Of A Proportion Of Breast Cancer Patients," *J. Clin. Oncol.* 10:1436-1443
- 【非特許文献 4 1】Lee, H. et al. (1998) "Isolation And Characterization Of Four Alternate c-erbB3 Transcripts Expressed In Ovarian Carcinoma-Derived Cell Lines And Normal Human Tissues," *Oncogene* 16:3243-3252 30
- 【非特許文献 4 2】Molina, M.A. et al. (2001) "Trastuzumab (Herceptin), A Humanized anti-Her2 Receptor Monoclonal Antibody, Inhibits Basal And Activated Her2 Ectodomain Cleavage In Breast Cancer Cells," *Cancer Res.* 61:4744-4749
- 【非特許文献 4 3】Hancock, M.C. et al. (1991) "A Monoclonal Antibody Against The c-erbB-2 Protein Enhances The Cytotoxicity Of Cis-Diamminedichloroplatinum Against Human Breast And Ovarian Tumor Cell Lines," *Cancer Res.* 51:4575-4580
- 【非特許文献 4 4】Arteaga, C.L. et al. (1994) "p185c-erbB-2 Signal Enhances Cisplatin-Induced Cytotoxicity In Human Breast Carcinoma Cells: Association Between An Oncogenic Receptor Tyrosine Kinase And Drug-Induced DNA Repair," *Cancer* 54: 3758-3765 40
- 【非特許文献 4 5】Pietras, R.J. et al. (1994) "Antibody to HER-2/neu receptor Blocks DNA Repair After Cisplatin In Human Breast And Ovarian Cancer Cells," *Oncogene* 9:1829-1838
- 【非特許文献 4 6】Stancovski, I. et al. (1991) "Mechanistic Aspects Of The Opposing Effects Of Monoclonal Antibodies To The ERBB2 Receptor On Tumor Growth," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:8691-8695
- 【非特許文献 4 7】Bacus, S.S. et al. (1992) "A Ligand For The erbB-2 Oncogene Product (gp30) Induces Differentiation Of Human Breast Cancer Cells," *Cell Growth & Diff.* 3:401-411 50

- 【非特許文献 4 8】Bacus, S.S. et al. (1993) "Neu Differentiation Factor (Heregulin) Induces Expression Of Intercellular Adhesion Molecule 1: Implications For Mammary Tumors," *Cancer Res.* 53:5251-5261
- 【非特許文献 4 9】Klapper, L.N. et al. (1997) "A Subclass Of Tumor-Inhibitory Monoclonal Antibodies To ErbB-2/HER2 Blocks Crosstalk With Growth Factor Receptors," *Oncogene* 14:2099-2109
- 【非特許文献 5 0】Klapper, L.N. et al. (2000) "Tumor-Inhibitory Antibodies To HER-2/ErbB-2 May Act By Recruiting c-Cbl And Enhancing Ubiquitination Of HER-2," *Cancer Res.* 60:3384-3388
- 【非特許文献 5 1】Arteaga, C.L. et al. (2001) "The Epidermal Growth Factor Receptor: From Mutant Oncogene In Nonhuman Cancers To Therapeutic Target In Human Neoplasia," *J Clinical Oncology* 19(18s):32s-40s 10
- 【非特許文献 5 2】Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An anti-p185HER2 Antibody For Human Cancer Therapy," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289
- 【非特許文献 5 3】Sliwkowski, M.X. et al. (1999) "Nonclinical Studies Addressing The Mechanism Of Action Of Trastuzumab (Herceptin)," *Semin. in Oncol.* 26:60-70
- 【非特許文献 5 4】Ye, D. et al. (1999) "Augmentation Of A Humanized anti-HER2 mAb 4D5 Induced Growth Inhibition By A Human-Mouse Chimeric anti-EGF Receptor mAb C225," *Oncogene* 18:731-738
- 【非特許文献 5 5】Vogel, C.L. et al. (2001) "First-Line Herceptin Monotherapy In Metastatic Breast Cancer," *Oncology* 61(suppl 2):37-42 20
- 【非特許文献 5 6】Vogel, C.L et al. (2002) "Efficacy And Safety Of Trastuzumab As A Single Agent In First-Line Treatment Of HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer," *J. Clin. Oncol.* 20(3):719-726
- 【非特許文献 5 7】Fujimoto-Ouchi, K. et al. (2002) "Antitumor Activity Of Combinations Of anti-HER-2 Antibody Trastuzumab And Oral Fluoropyrimidines Capecitabine/5'-Dfurd In Human Breast Cancer Models," *Cancer Chemother. Pharmacol.* 49:211-216
- 【非特許文献 5 8】Eigenbrot, C. et al. (1993) "X-ray Structures Of The Antigen-Binding Domains From Three Variants Of Humanized anti-p185HER2 Antibody 4D5 And Comparison With Molecular Modeling," *J. Mol. Biol.* 229:969-995 30
- 【非特許文献 5 9】Cobleigh, M.A. et al. (1999) "Multinational Study Of The Efficacy And Safety Of Humanized anti-HER2 Monoclonal Antibody In Women Who Have HER2-Overexpressing Metastatic Breast Cancer That Has Progressed After Chemotherapy For Metastatic Disease," *J. Clin. Oncol.* 17:2639-2648
- 【非特許文献 6 0】Pegram, M.D. et al. (1998) "Phase II Study Of Receptor-Enhanced Chemosensitivity Using Recombinant Humanized anti-p185HER2/neu Monoclonal Antibody Plus Cisplatin In Patients With HER2/neu-Overexpressing Metastatic Breast Cancer Refractory To Chemotherapy Treatment," *J. Clin. Oncology* 16(8):2659-2671
- 【非特許文献 6 1】Baselga, J. et al. (2001) "Mechanism Of Action Of Trastuzumab And Scientific Update," *Seminars in Oncology* 28(5)(suppl. 16):4-11 40
- 【非特許文献 6 2】Baselga, J. et al. (2001) "Mechanism Of Action Of anti-HER2 Monoclonal Antibodies," *Ann. Oncol.* 12 (suppl. 1):S35-S41
- 【非特許文献 6 3】Nordstrom, J.L. et al. (2011) "Anti-tumor Activity And Toxicokinetics Analysis Of MGAH22, An anti-HER2 Monoclonal Antibody With Enhanced Fc Receptor Binding Properties," *Breast Cancer Research* 13(6):R123
- 【非特許文献 6 4】Burriss, H.A.. (2013) "Phase I Study Of margetuximab (MGAH22), An FC-Modified Chimeric Monoclonal Antibody (MAb), in Patients (pts) With Advanced Solid Tumors Expressing The HER2 Oncoprotein," *J. Clin. Oncol. Suppl:* abstr . 3004 50

- 【非特許文献 6 5】Dong, C. et al. (2003) "Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules," *Immunolog. Res.* 28(1):39-48
- 【非特許文献 6 6】Viglietta, V. et al. (2007) "Modulating Co-Stimulation," *Neurotherapeutics* 4:666-675
- 【非特許文献 6 7】Korman, A.J. et al. (2007) "Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy," *Adv. Immunol.* 90:297-339
- 【非特許文献 6 8】Wang, L. et al. (2011) "VISTA, A Novel Mouse Ig Superfamily Ligand That Negatively Regulates T-Cell Responses," *J. Exp. Med.* 10.1084/jem.20100619:1-16
- 【非特許文献 6 9】Lepenies, B. et al. (2008) "The Role Of Negative Costimulators During Parasitic Infections," *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets* 8:279-288
- 【非特許文献 7 0】Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126
- 【非特許文献 7 1】Lindley, P.S. et al. (2009) "The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation," *Immunol. Rev.* 229:307-321
- 【非特許文献 7 2】Greenwald, R.J. et al. (2005) "The B7 Family Revisited," *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548
- 【非特許文献 7 3】Gross, J., et al. (1992) "Identification and Distribution Of The Costimulatory Receptor CD28 In The Mouse," *J. Immunol.* 149:380-388
- 【非特許文献 7 4】Linsley, P. et al. (1996) "Intracellular Trafficking Of CTLA4 and Focal Localization Towards Sites Of TCR Engagement," *Immunity* 4:535-543
- 【非特許文献 7 5】Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7
- 【非特許文献 7 6】Loke, P. et al. (2004) "Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T-Cells." *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214
- 【非特許文献 7 7】Flies, D.B. et al. (2007) "The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity," *J. Immunother.* 30(3):251-260
- 【非特許文献 7 8】Agarwal, A. et al. (2008) "The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance," *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372
- 【非特許文献 7 9】Wang, S. et al. (2004) "Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses," *Microbes Infect.* 6:759-766
- 【非特許文献 8 0】Flajnik, M.F. et al. (2012) "Evolution Of The B7 Family: Co-Evolution Of B7H6 And Nkp30, Identification Of A New B7 Family Member, B7H7, And Of B7's Historical Relationship With The MHC," *Immunogenetics* 64(8):571-90
- 【非特許文献 8 1】Ishida, Y. et al. (1992) "Induced Expression Of PD-1, A Novel Member Of The Immunoglobulin Gene Superfamily, Upon Programmed Cell Death," *EMBO J.* 11:3887-3895
- 【非特許文献 8 2】Agata, Y. et al. (1996) "Expression Of The PD-1 Antigen On The Surface Of Stimulated Mouse T And B Lymphocytes," *Int. Immunol.* 8(5):765-772
- 【非特許文献 8 3】Yamazaki, T. et al. (2002) "Expression Of Programmed Death 1 Ligands By Murine T-Cells And APC," *J. Immunol.* 169:5538-5545
- 【非特許文献 8 4】Nishimura, H. et al. (2000) "Facilitation Of Beta Selection And Modification Of Positive Selection In The Thymus Of PD-1-Deficient Mice," *J. Exp. Med.* 191:891-898
- 【非特許文献 8 5】Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298

【非特許文献 8 6】Blank, C. et al. (2006) "Contribution Of The PD-L1/PD-1 Pathway To T-Cell Exhaustion: An Update On Implications For Chronic Infections And Tumor Evasion Cancer," *Immunol. Immunother.* 56(5):739-745

【非特許文献 8 7】Chen, Y. et al. (2005) "Expression of B7-H1 in Inflammatory Renal Tubular Epithelial Cells," *Nephron. Exp. Nephrol.* 102:e81-e92

【非特許文献 8 8】de Haij, S. et al. (2005) "Renal Tubular Epithelial Cells Modulate T-Cell Responses Via ICOS-L And B7-H1" *Kidney Int.* 68:2091-2102

【非特許文献 8 9】Mazanet, M.M. et al. (2002) "B7-H1 Is Expressed By Human Endothelial Cells And Suppresses T-Cell Cytokine Synthesis," *J. Immunol.* 169:3581-3588

【非特許文献 9 0】Brown, J.A. et al. (2003) "Blockade Of Programmed Death-1 Ligands On Dendritic Cells Enhances T-Cell Activation And Cytokine Production," *J. Immunol.* 170:1257-1266

【非特許文献 9 1】Petroff, M.G. et al. (2002) "B7 Family Molecules: Novel Immunomodulators At The Maternal-Fetal Interface," *Placenta* 23:S95-S101

【非特許文献 9 2】Latchman, Y. et al. (2001) "PD-L2 Is A Second Ligand For PD-1 And Inhibits T-Cell Activation," *Nat. Immunol* 2:261-268

【非特許文献 9 3】Dong, H. (2003) "B7-H1 Pathway And Its Role In The Evasion Of Tumor Immunity," *J. Mol. Med.* 81:281-287

【非特許文献 9 4】Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition," *J. Molec. Med.* 83:193-202

【非特許文献 9 5】Freeman, G.J. et al. (2000) "Engagement Of The PD-1 Immunoinhibitory Receptor By A Novel B7 Family Member Leads To Negative Regulation Of Lymphocyte Activation," *J. Exp. Med.* 192:1-9

【非特許文献 9 6】Carter, L. et al. (2002) "PD-1:PD-L Inhibitory Pathway Affects Both CD4(+) and CD8(+) T-cells And Is Overcome By IL-2," *Eur. J. Immunol.* 32(3):634-643

【非特許文献 9 7】Berger, R. et al. (2008) "Phase I Safety And Pharmacokinetic Study Of CT-011, A Humanized Antibody Interacting With PD-1, In Patients With Advanced Hematologic Malignancies," *Clin. Cancer Res.* 14(10):3044-3051

【非特許文献 9 8】Mitri, Z. et al. (2012). "The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy," *Chemother Res Pract* 2012:742193

【非特許文献 9 9】Burststein, H.J. (2005) "The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers," *N. Engl. J. Med.* 353 (16): 1652-4

【非特許文献 1 0 0】Lanitis, E. (2012) "Primary Human Ovarian Epithelial Cancer Cells Broadly Express HER2 At Immunologically-Detectable Levels," *PloS One* 7(11):e49829

【非特許文献 1 0 1】Tan, M. et al. (2007). "Molecular Mechanisms Of erbB2-Mediated Breast Cancer Chemoresistance," *Adv. Exp. Med. Biol.* 608: 119-29

【非特許文献 1 0 2】Gandhi, M.D. et al. (2014) "Targeted Treatment Of Head And Neck Squamous-Cell Carcinoma: Potential Of Lapatinib," *Onco. Targets Ther.* 7:245-251

【非特許文献 1 0 3】Opdam, F.L. et al. (2012) "Lapatinib For Advanced Or Metastatic Breast Cancer," *Oncologist* 17(4):536-542

【非特許文献 1 0 4】Liao, J. et al. (2010) "Lapatinib: New Opportunities For Management Of Breast Cancer," *Breast Cancer (Dove Med Press)* 2:79-91

【非特許文献 1 0 5】Singh et al. (2014) "HER2-Positive Advanced Breast Cancer: Optimizing Patient Outcomes And Opportunities For Drug Development," *British Journal of Cancer* 111:1888-1898

10

20

30

40

50

【非特許文献 106】Formisano, L. et al. (2014) “Epidermal Growth Factor-Receptor Activation Modulates Src-Dependent Resistance To Lapatinib In Breast Cancer Models,” Breast Cancer Research 16:R45

【非特許文献 107】Gilcrease M.Z. et al. (2009) “Even Low-Level HER2 Expression May Be Associated With Worse Outcome In Node-Positive Breast Cancer,” Am J Surg Pathol. 2009 33(5):759-67

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0030】

よって、過去の進歩にもかかわらず、HER2/neuを発現する癌、特に転移性乳癌、及び低レベルのHER2/neuを発現する癌を治療するための、改善された組成物及び方法に対する需要が存在し続けている。本発明はこのような組成物、並びにHER2/neu陽性乳癌及びHER2/neuを発現する他の癌の治療における上記組成物の使用方法を対象とする。

10

【課題を解決するための手段】

【0031】

本発明は、HER2/neuに特異的に結合する第1の分子と、免疫チェックポイントに参与する細胞表面受容体（又はそのリガンド）に特異的に結合する第2の分子とを含む、医薬組成物に関する。本発明は特に、上記第2の分子がPD-1に結合する実施形態に関する。本発明はまた、癌及び他の疾患を治療するための、このような医薬組成物の使用にも関する。

20

【0032】

詳細には、本発明は、それを必要とする被験者に、HER2/neuに特異的に結合する抗体と、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する分子とを投与するステップを含む、癌を治療する方法を提供する。

【0033】

本発明は特に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体が、配列番号4のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインと、配列番号9、配列番号11及び配列番号13からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインとを備える、「変異型キメラ4D5抗体」である、このような方法の実施形態に関する。

30

【0034】

本発明は特に、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体又はその抗原結合断片である、このような方法の実施形態に関する。

【0035】

本発明は更に、上記抗PD-1抗体又は抗原結合断片が：

(a) ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体EH12.2H7、抗体hPD-1 mAb 2、抗体hPD-1 mAb 7、抗体hPD-1 mAb 9、抗体hPD-1 mAb 15、若しくは表1から選択される別の抗PD-1抗体とのPD-1結合に関して競合する；又は

40

(b) ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体EH12.2H7、抗体hPD-1 mAb 2、抗体hPD-1 mAb 7、抗体hPD-1 mAb 9、抗体hPD-1 mAb 15、若しくは表1から選択される別の抗PD-1抗体の、3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを有する；又は

(c) ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体EH12.2H7、抗体hPD-1 mAb 2、抗体hPD-1 mAb 7、抗体hPD-1 mAb 9、抗体hPD-1 mAb 15、若しくは表1から選択される別の抗PD-1抗体の、重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを有する、このような方法の実施形態に関する。

【0036】

本発明は更に、上記抗PD-1抗体又はその抗原結合断片がFc領域を備える、このよ

50

うな方法の実施形態に関する。本発明は更に、上記Fc領域が、Fc R I I I aに対する変異型Fc領域(CD16A)の親和性を低減する及び/又はADCC活性を低減する、1つ又は複数のアミノ酸修飾を含む、このような方法の実施形態に関する。本発明は更に、上記修飾が：L234A；L235A；又はL234A及びL235Aの置換を含む、このような方法の実施形態に関する。

【0037】

本発明は更に、上記抗PD-1抗体が、ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体EH12.2H7、抗体hPD-1 mAb 2、抗体hPD-1 mAb 7、抗体hPD-1 mAb 9、抗体hPD-1 mAb 15、又は表1から選択される別の抗PD-1抗体である、このような方法の実施形態に関する。本発明は更に、上記抗PD-1抗体の上記抗原結合断片が、ニボルマブ、ペンプロリズマブ、ピディリズマブ、抗体EH12.2H7、抗体hPD-1 mAb 2、抗体hPD-1 mAb 7、抗体hPD-1 mAb 9、抗体hPD-1 mAb 15、又は表1から選択される別の抗PD-1抗体の抗原結合断片である、このような方法の実施形態に関する。

10

【0038】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体(特に変異型キメラ4D5抗体)が、3週間毎におよそ6~18mg/kg体重の投薬量で投与され、また免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子(特に抗PD-1抗体)が、3週間毎におよそ200mgの固定投薬量で投与される、このような方法の実施形態に関する。本発明はまた、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体(特に変異型キメラ4D5抗体)が、3週間毎におよそ6~18mg/kg体重の投薬量で投与され、また免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子(特に抗PD-1抗体)が、3週間毎におよそ1~10mg/kg体重の投薬量で投与される、このような方法の実施形態に関する。本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体(特に変異型キメラ4D5抗体)が、3週間毎におよそ6mg/kg体重、およそ10mg/kg体重、およそ15mg/kg体重又はおよそ18mg/kg体重の投薬量で投与される、このような方法の実施形態に関する。本発明は更に、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子(特に抗PD-1抗体)が、3週間毎におよそ1mg/kg体重、およそ2mg/kg体重、およそ3mg/kg体重又はおよそ10mg/kg体重の投薬量で投与される、このような方法の実施形態に関する。

20

30

【0039】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体(特に変異型キメラ4D5抗体)、及び免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子(特に抗PD-1抗体)が、単一の医薬組成物中で、上記被験者に同時に投与される、このような方法の実施形態に関する。

【0040】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体(特に変異型キメラ4D5抗体)、及び免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子(特に抗PD-1抗体)が、別個の組成物中で、両方の上記組成物が24時間の期間内に投与されるように同時に投与される、このような方法の実施形態に関する。

40

【0041】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体(特に変異型キメラ4D5抗体)、及び免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子(特に抗PD-1抗体)が、別個の医薬組成物中で、上記被験者に順次投与され、特に、2番目に投与される上記組成物は、最初に投与される上記組成物の投与の少なくとも24時間以上後に投与される、このような方法の実施形態に関する。

【0042】

本発明は特に、上記癌がHER2/neu発現型癌である、このような方法の実施形態

50

に関する。本発明は更に、上記癌が、乳癌、胃癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌、結腸癌、子宮内膜癌、副腎癌、非小細胞肺癌、頭頸部癌、喉頭癌、肝臓癌、腎臓癌、神経膠芽腫、又は膵臓癌である、このような方法の実施形態に関する。

【0043】

本発明は更に、第3の治療剤を投与するステップを更に含み、特に上記第3の治療剤が、抗新生物剤、化学療法剤又は細胞傷害剤である、このような方法の実施形態に関する。

【0044】

本発明は更に、上記第3の治療剤が、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体（特に変異型キメラ4D5抗体）及び/若しくは免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体若しくはそのリガンドに特異的に結合する上記分子（特に抗PD-1抗体）と同時に、又はこれらとは別個に、投与される、このような方法の実施形態に関する。

10

【0045】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体ペンプロリズマブである、このような方法の実施形態に関する。

【0046】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体ニボルマブである、このような方法の実施形態に関する。

20

【0047】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体ピディリズマブである、このような方法の実施形態に関する。

【0048】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体EH12.2H7である、このような方法の実施形態に関する。

30

【0049】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体hPD-1 mAb 2である、このような方法の実施形態に関する。

【0050】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体hPD-1 mAb 7である、このような方法の実施形態に関する。

40

【0051】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体hPD-1 mAb 9である、このような方法の実施形態に関する。

【0052】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、抗PD-1抗体hPD-1 mAb 15である、このような方法の実施形態に関する。

50

【 0 0 5 3 】

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する上記抗体がマルゲツキシマブであり、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する上記分子が、表1から選択される抗PD-1抗体である、このような方法の実施形態に関する。

【 0 0 5 4 】

本発明の更なる利点及び特徴は、本発明の好ましい実施形態を例示する以下の「発明を実施するための形態」、図面及び実施例から明らかになるであろう。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 5 5 】

【図1】図1は、「キメラ4D5抗体」の軽鎖可変ドメイン（配列番号4）と、「マウス4D5抗体」の軽鎖可変ドメイン（配列番号3）及び「ヒト化4D5抗体」の軽鎖可変ドメイン（配列番号5）との配列を比較する、配列アラインメントである。

【図2】図2は、野生型（「WT」）Fc領域を有する「キメラ4D5抗体」の重鎖（配列番号7）、第1の変異型Fc領域を有する「変異型キメラ4D5抗体MT1」の重鎖（「MT1」）（配列番号9）、第2の変異型Fc領域を有する「変異型キメラ4D5抗体MT2」の重鎖（「MT2」）（配列番号11）、及び第3の変異型Fc領域を有する「変異型キメラ4D5抗体MT3」の重鎖（「MT3」）（配列番号13）の配列間の比較を示す。これらのCDRの残基は、このような残基の下側に示された黒色のバーで示されている。

【図3】図3（パネルA～C）は、野生型Fc（「ch4D5-野生型Fc」）（パネルA）、4D5（パネルB）及びトラスツズマブ（パネルC）結合を有するキメラ4D5抗体のBIACore（登録商標）分析を示す。

【図4】図4（パネルA-D）は、CD16-158F+（パネルA及びC）又はCD16-158V+（パネルB及びD）SKBR3細胞のインビトロでの増殖に対する、ch4D5-Ag（パネルA及びB）並びにCh4D-FcMT1（パネルB及びD）の効果を示す。

【図5】図5は、非トランスジェニックマウスにおける本発明の様々な抗体の増強された抗腫瘍活性を示す。

【図6】図6は、hCD16Aトランスジェニックマウスにおける本発明の様々な抗体の増強された抗腫瘍活性を示す。

【図7】図7（パネルA～B）は、非トランスジェニックマウスにおける本発明の様々な抗体による細胞成長阻害における、mFcRIV及びhCD16Aの役割を示す。

【図8】図8は、hCD16Aトランスジェニックマウスにおける本発明の様々な抗体の増強された抗腫瘍活性を示す。

【図9】図9（パネルA～M）は、HER2/neuに関する、様々な癌細胞株からの細胞の、代表的な免疫組織化学染色を示す。パネルA～Lは、異なる複数の細胞株、即ちパネルA：MDA-MB-435；パネルB：MDA-MB-231；パネルC：A549；パネルD：OVCA8；パネルE：MCF-7；パネルF：BT-20；パネルG：HT-29；パネルH：ZR75-1；パネルI：JIMT-1；パネルJ：MDA-MB-453；パネルK：BT-474；パネルL：SKBR-3；及びパネルM：mSKOV-3を示す。

【図10】図10（パネルA～B）は、HER2/neu発現レベルが極めて低いか又はゼロである（ダコスコア=0）癌細胞株（パネルAではMDA-MB-435；パネルBではMDA-MB-231）においてADCCを仲介する、本発明のキメラ4D5抗体変異型の能力を試験するために実施された、ADCCアッセイの結果を示す。

【図11】図11（パネルA～E）は、HER2/neu発現レベルが低い（ダコスコア=1+）癌細胞株（パネルAではA549；パネルBではOVCA8；パネルCではMCF-7；パネルDではBT-20；パネルEではHT-29）においてADCCを仲介する、本発明の変異型キメラ4D5抗体の能力を試験するために実施された、ADCC

10

20

30

40

50

アッセイの結果を示す。

【図12】図12（パネルA～B）は、HER2/neu発現レベルが中程度である（ダコスコア＝2＋）癌細胞株（パネルAではZR75-1；パネルBではJIMT-1）においてADCCを仲介する、本発明の変異型キメラ4D5抗体の能力を試験するために実施された、ADCCアッセイの結果を示す。

【図13】図13（パネルA-C）は、HER2/neu発現レベルが高い（ダコスコア＝3＋）癌細胞株（パネルAではMDA-MB-453；パネルBではBT-474；パネルCではSKBR-3；パネルDではmsKOV-3）においてADCCを仲介する、本発明の変異型キメラ4D5抗体の能力を試験するために実施された、ADCCアッセイの結果を示す。

10

【図14】図14は、抗PD-1抗体の、T細胞の増殖を増強する能力を評価するためのプロトコルの図である。

【図15】図15は、アロMLRアッセイの開始時におけるPD-1 mAb 1（5C4；BMS-936558；Bristol-Myers Squibb、ニボルマブ）、PD-1 mAb 2（MK-3475；Merck、ペンブロリズマブ（以前はランブロリズマブ）及びPD-1 mAb 3（EH12.2H7；Dana Farber）の添加が、IgG1アイソタイプ対照抗体に比べて強いT細胞増殖応答を誘起したことを示す。また、PD-1 mAb 4（CT-011；CureTech、ピディリズマブ）、抗CTLA mAb及びLAG-3 mAbを用いて上記増殖応答が得られることも示されている。レスポンド（responder：R）細胞はpan T細胞であり；

20

【発明を実施するための形態】

【0056】

本発明は、HER2/neuに特異的に結合する第1の分子と、免疫チェックポイントに關与する細胞表面受容体（又はそのリガンド）に特異的に結合する第2の分子とを含む、医薬組成物に關する。本発明は特に、上記第2の分子がPD-1に結合する実施形態に關する。本発明はまた、癌及び他の疾患を治療するための、このような医薬組成物の使用にも關する。

【0057】

特に本発明は：

30

（I）HER2/neu過剰発現型細胞のための選択的細胞傷害剤として有用となるよう、HER2/neuに特異的に結合する、第1の抗体（例えば、公知の4D5抗体と比較してグリコシル化が低下し、エフェクタ機能が変化した、HER2/neuに対する変異型キメラ4D5抗体）；及び

（II）PD-1/PD-L1結合に拮抗するか又はこれをブロックすることにより、T細胞へのネガティブなシグナルの送達を防止することによって、T細胞応答を維持するために有用となるよう、PD-1に特異的に結合する、第2の抗体を含む、医薬組成物を提供する。

【0058】

本発明はまた、癌等の疾患の診断、予後及び治療においてこのような組成物を使用する方法を提供する。

40

【0059】

いずれの特定の理論に束縛されるものではないが、強力に標的化された抗HER2/neu抗体を抗PD-1抗体と組み合わせる本発明の方法及び組成物は：癌細胞上のHER2/neuに結合し、これにより、HER2/neu-HER-3複合体のNDF/ヘレグリン活性化を低減/ブロックし、及び/又はHER2/neu陽性腫瘍に対するADCC活性を増強することによって、腫瘍を直接標的化でき；また、例えば消耗した寛容性腫瘍浸潤リンパ球の表面に存在する細胞表面PD-1分子に結合し、これによって、このような細胞表面分子の、その受容体リガンドに結合する能力を弱め、またこれによって免疫系の活性化を促進することにより、内因性抗腫瘍免疫応答を直接増強できる。これらの属

50

性により、このような治療及び組成物は、癌の治療において有用性を得る。

【0060】

これより、図面及び以下の実施例と併せて本発明の原理の説明に役立つ、本発明の現時点での好ましい実施形態に関して、詳細に言及する。これらの実施形態は、当業者が本発明を実施できるようにするために十分に詳細に説明され、また、他の実施形態を利用してもよいこと、並びに本発明の精神及び範囲から逸脱することなく、構造的、生物学的及び化学的変更を行ってよいことを理解されたい。そうでないものとして定義されていない限り、本明細書中で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する分野の当業者が共通して理解する意味と同一の意味を有する。

【0061】

本発明の実践は、そうでないことが示されていない限り、当該技術の範囲内の分子生物学（組み換え技術を含む）、微生物学、細胞生物学、生化学及び免疫学の従来技術を採用する。このような技術は：Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Fourth Edition (Sambrook et al. Eds., 2012) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., Eds., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY; Oligonucleotide Synthesis: Methods and Applications (Methods in Molecular Biology), Immunobiology 7 (Janeway, C.A. et al. 2007) Garland Science, London, UK; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (Shepherd, P. et al. Eds., 2000) Oxford University Press, USA, New York NY; Using Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow, E. et al. Eds., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; and DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, Eighth Edition, DeVita, V. et al. Eds. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.等の文献に十分に説明されている。抗体の操作については、米国仮特許出願第60/781,564号；米国仮特許出願第60/945,523号；米国仮特許出願第61/015,106号；及び米国仮特許出願第61/019,051において；並びに米国公開特許第20040185045号；米国公開特許第20040197347号；米国公開特許第20040197866号；米国公開特許第20050037000号；米国公開特許第20050064514号；米国公開特許第20050215767号；米国公開特許第20060134709号；米国公開特許第20060177439号；米国公開特許第20070004909号；米国公開特許第20070036799号；米国公開特許第20070037216号；米国公開特許第20070077246号；米国公開特許第20070244303号；米国公開特許第20080044429号；米国公開特許第20080050371号；米国公開特許第11/869,410号；米国公開特許第11/952,568号；米国特許第7,112,439号；国際公開第04/063351号；国際公開第06/088494号；国際公開第07/024249号；国際公開第06/113665号；国際公開第07/021841号；国際公開第07/106707号；及び国際公開第2008/140603号において議論されている。

【0062】

V. 定義

本発明は、HER2/neuに特異的に結合する第1の分子と、免疫チェックポイントに關与する細胞表面受容体（又はそのリガンド）に特異的に結合する第2の分子とを含む、医薬組成物に關する。本発明は特に、上記第2の分子がPD-1に結合する実施形態に關する。

【0063】

本明細書中で使用される場合、用語「ADCC」は、抗体依存性細胞傷害性、即ち、FcRを発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えばナチュラルキラー（NK）細胞及びマクロファージ等の単球細胞）が、標的細胞上に結合した抗体を認識し、その後上記標的細胞の溶解を引き起こす、インビトロでの細胞伸介型応答を指す。

【0064】

本明細書において使用される場合、用語「抗体 (antibody)」は、特定のドメイン又は部分又は形態(「エピトープ (epitope) 」)がこのような分子上に存在することにより、ポリペプチド又はタンパク質若しくは非タンパク質分子に特異的に結合できる、免疫グロブリン分子を指す。エピトープ含有分子は免疫原性活性を有してよく、これにより上記エピトープ含有分子は、動物の体内で抗体産生応答を誘発し、このような分子は「抗原 (antigen) 」と呼ばれる。エピトープ含有分子は必ずしも免疫原性でなくてよい。

【0065】

本明細書において使用される場合、用語「抗体 (antibody)」は：モノクローナル抗体；多重特異性抗体；ヒト抗体；ヒト化抗体；合成抗体；キメラ抗体；ポリクローナル抗体；ラクダ化抗体；単鎖 Fvs (scFv)；単鎖抗体；免疫学的に活性の抗体断片(例えば：Fab断片；Fab'断片；F(ab')₂断片；Fv断片；V_L及び/若しくはV_Hドメインを含有する断片、又はある抗原等に特異的に結合するV_Lドメインの相補性決定領域(CDR)(即ちCDR_{L1}、CDR_{L2}及び/若しくはCDR_{L3})若しくはV_Hドメインの相補性決定領域(CDR)(即ちCDR_{H1}、CDR_{H2}及び/若しくはCDR_{H3})の相補性決定領域(CDR)のうちの1つ、2つ若しくは3つを含有する断片等といったエピトープに結合できる、抗体断片)；二重官能性又は多重官能性抗体；ジスルフィド結合二重特異性Fvs(sdFv)；細胞内抗体；及び以上のうちのいずれの、エピトープ結合断片を包含する。特に用語「抗体」は、免疫グロブリン分子、及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性の断片、即ち抗原結合部位を含有する分子を包含することを意図したものである。免疫グロブリン分子は、いずれのタイプ(例えば、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA及びIgY)、クラス(例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及びIgA₂)又はサブクラスのものとなることができる(例えば米国公開特許第20040185045号；米国公開特許第20050037000号；米国公開特許第20050064514号；米国公開特許第20050215767号；米国公開特許第20070004909号；米国公開特許第20070036799号；米国公開特許第20070077246号；及び米国公開特許第20070244303号参照)。この数十年、抗体の治療的潜在能力に対する関心が再び高まっており、抗体は、生命工学由来の薬剤の筆頭となるクラスの1つとなっている(Chan, C.E. et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases," Singapore Med. J. 50(7):663-666)。200を超える抗体系薬剤が使用認可済み、又は開発中である。

【0066】

用語「キメラ抗体 (chimeric antigen)」は、これらが所望の生物活性を示す限りにおいて、重鎖及び/又は軽鎖の一部がある種(例えばマウス)由来のある抗体又は抗体クラス若しくはサブクラスと同一又は相同でありながら、残りの部分が別の種(例えばヒト)の抗体又は抗体クラス若しくはサブクラスと同一又は均質である、抗体を指す。本明細書における関心対象のキメラ抗体は、非ヒト霊長類(例えば旧世界ザル、類人猿等)由来の変域ドメイン抗原結合配列及びヒト定常領域配列を備えた「霊長類化 (primatized)」抗体を含む。

【0067】

本明細書において使用される場合、用語「モノクローナル抗体 (monoclonal antibody)」は、略均質な抗体の集団のうちの1つの抗体を表し、即ち上記集団を構成する個々の抗体は、微量存在し得る自然発生的突然変異を有する抗体の可能性を除いて同一である。また本明細書において使用される場合、用語「ポリクローナル抗体 (polyclonal antibody)」は、不均質な抗体の集団から得られる抗体を指す。用語「モノクローナル (monoclonal)」は、抗体の略均質な集団であるという抗体の特性を示し、いずれの特定の方法によって(例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組み換え発現、遺伝子導入動物等によって)抗体を産生することを要求するものとして解釈してはならない。この用語は、免疫グロブリン全体、及び「抗体」の定義に

10

20

30

40

50

において上述した断片等を含む。モノクローナル抗体の作製方法は当該技術分野において公知である。採用してよい1つの方法は、Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity," Nature 256:495-497の方法又はその修正例である。典型的には、モノクローナル抗体はマウス、ラット又はウサギにおいて発現する。上記抗体は、動物を、所望のエピトープを含有する免疫原性量の細胞、細胞抽出物又はタンパク製剤で免疫化することによって産生される。免疫原は、一次細胞、培養された細胞株、癌細胞、タンパク質、ペプチド、核酸又は組織とすることができるが、これらに限定されない。免疫化に使用してよい細胞は、これらを免疫原として使用するよりもある期間(例えば少なくとも24時間)だけ前に、培養してよい。細胞は単独で、又はRib i等の非変性アジュバントと組み合わせて、免疫原として使用してよい(例えばJennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production," ILAR J. 37(3):119-125参照)。一般に細胞は、免疫原として使用される際、完全な状態、及び好ましくは生存できる状態に維持しなければならない。完全な細胞は、破裂した細胞よりも、免疫性を与えられた動物が抗原をより良好に検出できるようにすることができる。変性又は強いアジュバント、例えばフロイントアジュバントの使用は、細胞を破裂させる場合があり、従って推奨されない。免疫原は、2週間に1回若しくは1週間に1回等、周期的な間隔で複数回投与してよく、又は動物中(例えば組織組み換え中)に生存能力を維持できるように投与してよい。あるいは、所望の病原性エピトープに対する特異性を有する既存のモノクローナル抗体及び他の同等の抗体は、当該技術分野で公知のいずれの手段によって、組み換え配列及び産生できる。一実施形態では、この

ような抗体を配列し、続いてポリヌクレオチド配列を発現又は繁殖のためのベクターにクローン化する。関心対象の抗体をエンコードする配列は、宿主細胞中のベクター中に保持され、続いて上記宿主細胞を、将来使用するために膨張させて冷凍できる。このような抗体のポリヌクレオチド配列は、本発明の単一特異性又は多重特異性(例えば二重特異性、三重特異性及び四重特異性)分子、並びに親和性が最適化された抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体及び/又はイヌ化抗体を生成することによって、抗体の親和性又は他の特徴を改善するための、遺伝子操作のために使用してよい。

10

20

【0068】

用語「ヒト化抗体(humanized antibody)」は、キメラ分子であって、一般に組み換え技術を用いて調製され、非ヒト種からの免疫グロブリンの抗原結合部位と、残りの、ヒト免疫グロブリンの構造及び/又は配列に基づく分子の免疫グロブリン構造とを有する、キメラ分子を指す。抗原結合部位は、定常ドメインに融合した完全な可変ドメイン、又は可変ドメイン内の適切なフレームワーク領域上に移植されたCDRのみを備えてよい。抗原結合部位は野生型であってよく、又は1つ若しくは複数のアミノ酸置換によって修飾されてよい。これにより、ヒト個体の免疫原としての不変領域が削減されるが、外来の可変領域に対する免疫応答の可能性は残る(LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224)。別のアプローチは、ヒト由来不変領域を提供することだけでなく、可変領域を修飾して、ヒト型に可能な限り近くなるように再成形することに焦点を当てている。重鎖及び軽鎖両方の可変領域は、問題となる抗原に

応答して変化して結合能力を決定する、4つのフレームワーク領域(FR)が隣接する3つのCDRを内包することが知られており、上記フレームワーク領域は、ある所与の種において相対的に保存され、またCDRのための足場を提供するものと推定される。ある特定の抗原に対して非ヒト抗体を調製する際、非ヒト抗体由来のCDRを、修飾されるヒト抗体内に存在するFRに移植することによって、可変領域を「再成形」又は「ヒト化」できる。様々な抗体に対するこのアプローチの適用は:Sato, K. et al. (1993) "Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth," Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies for Therapy," Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) "Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity," Science 239:1534-1536; Ket

30

40

50

tleborough, C. A. et al. (1991) "Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation," Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) "Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity," Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) "Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) "Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo," Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) "Humanized Antibodies For Antiviral Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) "Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; 及びCo, M.S. et al. (1992) "Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen," J. Immunol. 148:1149-1154によって報告されている。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は全てのCDR配列を保存する(例えば、マウス抗体からの6つのCDR全てを含有するヒト化マウス抗体)。他の実施形態では、ヒト化抗体は、オリジナルの抗体に対してその1つ又は複数のアミノ酸配列が改変された1つ又は複数のCDR(1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つ)を有し、これらは、オリジナルの抗体からの1つ又は複数のCDR「に由来する(derived from)」(即ち、このようなCDRに由来する、このようなCDRのアミノ酸配列の知識に由来する、等)1つ又は複数のCDRとも呼ばれる。抗体の可変ドメインをエンコードするポリヌクレオチド配列は、上記誘導体を生成するため及び上記抗体の親和性又は他の特徴を改善するための遺伝子操作のために使用できる。抗体をヒト化する際の一般原理は、抗体の抗原結合部位の塩基配列を保持しながら、抗体の非ヒト残部をヒト抗体配列と交換するステップを伴う。モノクローナル抗体をヒト化するためには、4つの一般的なステップが存在する。上記ステップは以下の通りである:(1)開始抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインのヌクレオチド及び予測されるアミノ酸配列を決定するステップ;(2)ヒト化抗体又はイヌ化抗体を設計するステップ、即ちヒト化又はイヌ化プロセス中に使用する抗体フレームワーク領域を決定するステップ;(3)実際のヒト化又はイヌ化法/技術;並びに(4)ヒト化抗体のトランスフェクション及び発現。例えば米国特許第4,816,567号;米国特許第5,807,715号;米国特許第5,866,692号;及び米国特許第6,331,415号を参照。

【0069】

天然抗体(IgG抗体等)は、2つの重鎖と複合体化した2つの軽鎖からなる。各軽鎖は、可変ドメイン(VL)及び定常ドメイン(CL)を含有する。各重鎖は、可変ドメイン(VH)、3つの定常ドメイン(CH1、CH2及びCH3)、並びにCH1ドメインとCH2ドメインとの間に位置する「ヒンジ(Hinge)」ドメイン(「H」)を含有する。従って、自然に発生する免疫グロブリン(例えばIgG)の基本構造単位は、通常は約150,000Daの糖タンパク質として発現される、軽鎖及び2つの重鎖を有する三量体である。各鎖のアミノ末端(「N末端(N-terminal)」)部分は、抗原認識に主要な役割を果たす約100~110個の可変ドメインを含む。各鎖のカルボキシ末端(「C末端(C-terminal)」)部分は定常領域を画定し、軽鎖は単一の定常ドメインを有し、重鎖は通常3つの定常ドメイン及び1つのヒンジドメインを有する。従って、IgG分子の軽鎖の構造はn-VL-CL-cであり、IgG重鎖の構造はn-VH-CH1-H-CH2-CH3-cである(ここでn及びcはそれぞれ、ポリペプチドのN末端及びC末端を表す)。ある抗体の、抗原のエピトープに結合する能力は、抗体のVL及びVHドメインの存在並びにそのアミノ酸配列左右される。抗体軽鎖と抗体重鎖との相互作用、特にそのVLドメインとVHドメインとの相互作用は、天然抗体の2つの抗原結合部位のうちの1つを形成する。天然抗体は、1つのエピトープ種のみには結合できる(即ち天然抗体は単一特異性である)が、当該種の複数の複製に結合できる(即ち2価性又は多価性を示す)。IgG分子の可変ドメインは、エピトープと接触した残基を含有する複数の相補性決定領域(CDR)、及びフレームワークセグメント(FR)と呼ばれ

る非CDRセグメントからなり、上記フレームワークセグメントは、一般にCDRループの構造を維持してCDRの位置を決定することにより、このような接触を可能とする（ただし特定のフレームワーク残基も抗原に接触し得る）。従って、 V_L 及び V_H ドメインは、構造 $n - FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4 - c$ を有する。抗体軽鎖の第1、第2及び第3のCDRである（又は第1、第2及び第3のCDRとして機能し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ CDR_L1 ドメイン、 CDR_L2 ドメイン及び CDR_L3 ドメインと呼ばれる。同様に、抗体重鎖の第1、第2及び第3のCDRである（又は第1、第2及び第3のCDRとして機能し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれ CDR_H1 ドメイン、 CDR_H2 ドメイン、及び CDR_H3 ドメインと呼ばれる。よって、 CDR_L1 ドメイン、 CDR_L2 ドメイン、 CDR_L3 ドメイン、 CDR_H1 ドメイン、 CDR_H2 ドメイン、及び CDR_H3 ドメインという用語は、あるタンパク質に組み込まれた場合に、当該タンパク質が、軽鎖及び重鎖若しくはダイアボディ若しくは単鎖結合分子（例えば $scFv$ 、 $BiTe$ 等）を有する抗体であるか、又は別のタイプのタンパク質であるかにかかわらず、当該タンパク質を、特定のエピトープに結合できるようにする、ポリペプチドを対象としている。従って本明細書において使用される場合、用語「抗原結合ドメイン（*antigen binding domain*）」は、抗原結合分子の、このような分子がある抗原のエピトープに特異的に結合する能力の原因となる部分を指す。抗原結合断片は、このような抗体のCDRドメインのうち1個、2個、3個、4個、5個又は6個全てを含有でき、またこのようなエピトープに特異的に結合できる一方で、上記抗体とは異なる、このようなエピトープに対する免疫特異性、親和性又は選択性を呈してよい。しかしながら好ましくは、抗原結合断片は、このような抗体のCDRドメインのうち6個全てを含有する。抗体の抗原結合断片は、単一のポリペプチド鎖であってよく（例えば $scFv$ ）、又はそれぞれアミノ末端及びカルボキシル末端を有する2つ以上のポリペプチド鎖を備えてよい（例えばダイアボディ、 Fab 断片、 Fab_2 断片等）。

10

20

30

40

50

【0070】

本明細書中で使用される場合、用語「ダイアボディ（*diabody*）」は、それぞれが少なくとも1つの V_L 及び1つの V_H ドメイン又はその断片を備える2つ以上のポリペプチド鎖又はタンパク質の複合体を指し、両方のドメインは単一のポリペプチド鎖内に含まれるものの、これらが会合してエピトープ結合部位を形成できるようにするには短すぎる介在リンカーで隔てられており、従って、1つのダイアボディを形成するには少なくとも2つのポリペプチド鎖又はタンパク質が必要となる。特定の実施形態では、「ダイアボディ分子（*diabody molecule*）」は、ある抗体の「 Fc 」又は「ヒンジ Fc 領域」を備える分子を含む。上記複合体中の上記ポリペプチド鎖は、同一であっても異なってもよく、例えば上記ダイアボディ分子は、ホモ多量体又はヘテロ多量体であってよい。特定の態様では、「ダイアボディ分子」は、 V_L 及び V_H ドメインの両方を含有する上記ポリペプチド鎖の二量体又は四量体（例えばホモ二量体ダイアボディ分子、ヘテロ二量体ダイアボディ分子等）を含む。多量体タンパク質を含む個々のポリペプチド鎖は、鎖間ジスルフィド結合によって、上記多量体の少なくとも1つの他のペプチドと共有結合してよい。

【0071】

本明細書中で使用される場合、用語「癌（*cancer*）」は、細胞（この細胞を「癌細胞（*cancer cell*）」と呼ぶ）の異常な制御されない成長に起因する新生物又は腫瘍の存在を特徴とする疾患を指す。本明細書中で使用される場合、用語「癌」は明示的に、白血病及びリンパ腫を含む。いくつかの実施形態では、用語「癌」は、局在状態のままの良性腫瘍の存在を特徴とする疾患を指す。しかしながら好ましい実施形態では、用語「癌」は、隣接する体内構造に侵入した悪性腫瘍の存在を特徴とする疾患を指す。このような腫瘍は更に、離れた部位に拡散する能力を有し得る。いくつかの実施形態では、癌は、特定のがん抗原を発現する癌細胞に関連する。いくつかの態様では、本明細書中で使用される場合、用語「癌」は、 $HER2/neu$ を発現する癌を具体的に指す。従って

本明細書中で使用される場合、用語「HER2/neu発現型癌(HER2/neu-expressing cancer)」は、検出可能なレベルのHER2/neuを発現する癌細胞の存在を特徴とする癌を指す。このようなHER2/neu発現型癌の癌細胞は、高レベルのHER2/neuを発現してもよく、又は低レベルのHER2/neuを発現してもよい。本明細書中で使用される場合、「高レベルのHER2/neu(high level of HER2/neu)」は、HERCEPTEST(登録商標)(Dako Cytomation California Inc.、カルフォルニア州カーピンテリア)分類を用いた場合に2+以上のスコアを示す癌細胞の存在、又は被験者若しくは患者が、例えば蛍光インシチュハイブリダイゼーション(FISH)によって過剰発現HER2/neuとして同定された癌細胞を有することを特徴とする、癌を指す。10

本明細書中で使用される場合、「低レベルのHER2/neu(low level of HER2/neu)」は、HERCEPTEST(登録商標)(Dako Cytomation California Inc.、カルフォルニア州カーピンテリア)分類を用いた場合に2+未満(例えば1+)のスコアを示す癌細胞を特徴とする癌を指す。腫瘍の癌細胞によるHER2発現のレベルを決定するために、様々な診断/予後アッセイが利用可能である。一態様では、HER2過剰発現は、免疫組織化学(IHC)によって、例えばHERCEPTEST(登録商標)(Dako)を用いて、分析できる。従って、腫瘍生検からのパラフィン包埋組織切片をIHCアッセイに供し、HER2タンパク質染色強度基準に適応させることができる。あるいは、又は更に、INFORM(商標)(Ventana(アリゾナ州)が販売)又はPATHVISION(商標)(Vysis(イリノイ州))等のFISHアッセイを、ホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織に対して実行して、上記腫瘍におけるHER2過剰発現の程度を(これが存在する場合に)決定できる。20

【0072】

本明細書中で使用される場合、用語「障害(disorder)」及び「疾患(disease)」は、被験者の状態を指して相互交換可能なものとして使用される。特に用語「自己免疫疾患(autoimmune disease)」は、用語「自己免疫障害(autoimmune disorder)」と相互交換可能なものとして使用されて、被験者自身の細胞、組織及び/又は器官に対する被験者の免疫応答によって引き起こされた細胞、組織及び/又は器官の傷害を特徴とする、被験者の状態を指す。用語「炎症性疾患(inflammatory disease)」は、用語「炎症性傷害(inflammatory disorder)」と相互交換可能なものとして使用されて、炎症、好ましくは慢性炎症を特徴とする被験者の状態を指す。自己免疫障害は、炎症と関連していてもいなくてもよい。更に炎症は、自己免疫障害によって引き起こされたものであってもなくてもよい。よって、特定の障害は、自己免疫障害及び炎症性障害の両方を特徴としてよく、その一方で他の障害は、免疫障害のみ、又は炎症性障害のみであることを特徴としてよい。癌は「増殖性障害(proliferative disorder)」(即ちある程度の異常な細胞増殖と関連する障害)の一例である。30

【0073】

本明細書において使用される場合、医薬組成物の「有効量(effective amount)」は、(例えば乳癌、胃癌若しくは前立腺癌といった癌の文脈における)腫瘍のサイズの縮小、癌細胞の成長の遅滞、転移の発現の遅延、疾患によって発生する症状の低減、疾患に罹患した人々のQOLの向上、疾患を治療するために必要な他の薬物の用量の低減、標的化及び/若しくは細胞内在化等による別の薬物の効果の増強、疾患の進行の遅延、並びに/又は個体の生存期間の延長といった臨床的結果を含むがこれらに限定されない、有益な又は望ましい結果を得るために十分な量である。有効量は、1回又は複数回の投与で投与できる。本発明の目的に関して、薬剤、化合物又は医薬組成物の有効量は、直接的又は間接的に、癌細胞の増殖を低減する(若しくは癌細胞を破壊する)ため、又は癌細胞の腫瘍の発現若しくは成長を低減する及び/若しくは遅延させるために十分な量である。いくつかの実施形態では、薬剤、化合物又は医薬組成物の有効量は、別の薬剤、化40

50

合物又は医薬組成物と併用して達成してもしなくてもよい。従って「有効量」は、1つ又は複数の化学療法剤の投与の文脈で考えることができ、また1つ又は複数の他の作用剤との併用によって望ましい結果が達成され得る又は達成される場合、ある単一の作用剤は有効量で提供されていると考えてよい。個々の必要量は異なるが、各成分の有効量の最適な範囲の決定は当該技術分野の範囲内である。典型的な投薬量に関しては以下で議論する。

【0074】

用語「エフェクタ活性 (e f f e c t o r a c t i v i t y)」は、抗体Fc領域とFc受容体又はリガンドとの相互作用に寄与できる生物学的活性を指す。1つの抗体は、1つ又は複数のエフェクタ機能を有してよい。抗体エフェクタ機能の非限定的な例としては、ADCC、C1q結合、補体存性細胞傷害(CDC)、細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体; BCR)の下方制御、オプソニン化、オプソニン化貪食作用、細胞結合、及びロゼット形成が挙げられる。エフェクタ機能は、抗原結合後に作用するもの、及び抗原結合と独立して作用するものの両方を含む。

10

【0075】

本明細書中で使用される場合、用語「エフェクタ細胞 (e f f e c t o r c e l l)」は、1つ又は複数のFc受容体を発現し、かつ1つ又は複数のエフェクタ機能を仲介する、免疫系の細胞を指す。エフェクタ細胞としては、限定するものではないが、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、肥満細胞、血小板、B細胞、大型顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞が挙げられ、ヒト、マウス、ラット、ウサギ及びサルを含むがこれらに限定されないいずれの有機体由来のものであってよい。

20

【0076】

本明細書において、用語「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記述するために使用される。例示的なFcRは、天然配列ヒトFcRである。FcRは、IgG抗体(受容体、「FcR」)に結合し、かつFcRI(CD64)、FcRII(CD32)、FcRIII(CD16)、及びFcRIVサブクラスを受容体(これらの受容体の対立変異型及び選択的にスプライシングされた形態を含む)を含むものであってよく、例えば少なくとも2つの公知のFcRII受容体、FcRIIA及びFcRIIBが存在する。用語「FcR」はまた、胎児への母体IgGの移動を担う新生児受容体FcRnも含む。

30

【0077】

用語「グリコシル化部位 (g l y c o s y l a t i o n s i t e)」は、哺乳類細胞によってオリゴ糖(即ち一体に結合した2つ以上の単糖を含有する炭化水素)の付着のための箇所として認識される1つ又は複数のアミノ酸残基を指す。オリゴ糖等の炭化水素が付着するアミノ酸残基は通常、アスパラギン(N結合)、セリン(O結合)及びトレオニン(O結合)残基である。N結合グリコシル化は、アスパラギン残基の側鎖へのオリゴ糖部分の付着を指す。O結合グリコシル化は、例えばセリン又はトレオニンといったヒドロキシアミノ酸へのオリゴ糖部分の付着を指す。本発明の分子は、N結合及びO結合グリコシル化部位を含む、1つ又は複数のグリコシル化部位を備えてよい。当該技術分野において公知のN結合又はO結合グリコシル化のためのいずれのグリコシル化部位を、本発明に従って使用してよい。付着のための特定の部位は通常、「グリコシル化部位配列 (g l y c o s y l a t i o n s i t e s e q u e n c e)」と呼ばれるアミノ酸の特徴的な配列を有する。N結合グリコシル化のためのグリコシル化部位配列は: N - X - S又はN - X - Tであり、ここでNはアスパラギンを示し、Xはプロリン以外の慣用のアミノ酸のうちいずれとすることができ、Sはセリンを示し、Tはトレオニンを示す。天然ヒトIgGのFc領域は、297位のアスパラギン(Asn297)において、各CH2ドメインに1つずつ、2つのN結合グリコシル化部位を有する。グリコシル化部位は、本発明が関与する技術分野において公知の方法を用いて、本発明の分子に導入してよい(例えばIN VITRO MUTAGENESIS, RECOMBINANT DNA: A SHORT COURSE, J. D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, New York, 1983, chapter 8, pp. 106-116(その全体は参照によっ

40

50

て本出願に援用される)を参照のこと)。グリコシル化部位を本発明の分子に導入するための例示的な方法は：分子のアミノ酸配列を修飾するか若しくは突然変異させて、所望のN - X - S又はN - X - T配列を得るステップを含んでよい。同様に、既存のグリコシル化部位のアミノ酸配列を修飾して又は突然変異させて、例えば既存のN - X - S又はN - X - T配列を変化させることにより、グリコシル化部位を除去してよい。

【0078】

本明細書中で使用される場合、用語「ヒト抗マウス抗体(「HAMA」)応答(Human Anti-Mouse Antibody(“HAMA”)response)」は、ヒト免疫系がマウス抗体を外來分子として識別し、これに対する炎症応答を開始した場合に発生する、有害な炎症応答を指す。HAMA応答は、毒性のショック又は死を引き起こし得る。キメラ及びヒト化抗体は、投与される抗体の非ヒト部分を減少させることにより、HAMA応答の可能性を低減するが、このような抗体に対するヒト抗ヒト抗体応答(「HAAH応答」)免疫応答の可能性は依然として存在する。

10

【0079】

本明細書中で使用される場合、用語「異種(heterologous)」核酸は、宿主細胞に導入されるDNA、RNA等を指す。上記核酸は、ゲノムDNA、mRNA、cDNA、合成DNA、及びこれらの融合体又は組み合わせを含む、多様なソースのうちのいずれに由来してよい。上記核酸は、宿主若しくはレシピエント細胞と同一の細胞若しくは細胞タイプに由来するポリヌクレオチド、又は異なる細胞タイプに由来する、例えば哺乳類若しくは植物に由来するポリヌクレオチドを含んでよく、また任意に、例えば抗生物質耐性遺伝子、耐熱性遺伝子等のマーカー又は選択的遺伝子を含んでよい。

20

【0080】

本明細書中で使用される場合、用語「免疫調節剤(immunomodulatory agent)」及びその変化形は、宿主の免疫系を変調する作用剤を指す。特定の実施形態では、免疫調節剤は免疫抑制剤である。他の特定の実施形態では、免疫調節剤は免疫刺激剤である。免疫調節剤としては、限定するものではないが、小分子、ペプチド、ポリペプチド、融合タンパク質、抗体、無機分子、模倣剤及び有機分子が挙げられる。

【0081】

本明細書中で使用される場合、ある分子(例えば抗体)が別の分子のある領域と「特異的に(specifically)」結合すると表現されるのは、この分子の代替的な領域又は代替的な分子に対して、より頻繁に、より迅速に、より長期間、及び/又は当該領域に対するより高い親和性で、反応又は会合する場合である。例えば、HER2/neuエピトープに特異的に結合する抗体は、このようなHER2/neuエピトープに、他のHER2/neuエピトープ又は非HER2/neuエピトープに結合するよりも、より高い親和性、結合活性で、より迅速に、及び/又はより長期間、結合する、抗体である。同様に、PD-1のエピトープに特異的に結合する抗体は、このようなエピトープに、他のPD-1エピトープ又は非PD-1エピトープに結合するよりも、より高い親和性、結合活性で、より迅速に、及び/又はより長期間、結合する。この定義を読めば、例えば第1の標的に特異的に結合する抗体(又は部分若しくはエピトープ)が、第2の標的に特異的に又は優先的に結合する場合があります、又はしない場合もあることが理解される。従って「特異的(specific)」結合は、必ずしも排他的結合である必要はない(ただしこれを含み得る)。一般に、文脈によってそうでないことが明らかに示されていない限り、「結合(binding)」に関する言及は、「特異的結合(specific binding)」を意味する。ある抗原のエピトープに特異的に結合する抗体の能力は、例えばイムノアッセイによって決定できる。

30

40

【0082】

本明細書中で使用される場合、用語「核酸分子」は、DNA分子(例えばcDNA又はゲノムDNA)、RNA分子(例えばmRNA)、DNA及びRNA分子の組み合わせ又はハイブリッドDNA/RNA分子、並びにDNA又はRNA分子の類似体を含む。このような類似体は例えば、イノシン又はトリチル化塩基を含むがこれらを用いて生成される

50

。このような類似体はまた、DNA又はRNA分子であって、ヌクレアーゼ耐性又は細胞膜を通過する能力の増大といった上記分子に有益な属性を与える修飾された骨格を備える、DNA又はRNA分子も含むことができる。上記核酸又はヌクレオチド配列は、単鎖、二重鎖とすることができ、単鎖部分及び二重鎖部分の両方を含有してよく、また三重鎖部分を含んでよいが、好ましくは二重鎖DNAである。

【0083】

本明細書中で使用される場合、用語「実質的な配列同一性 (substantial sequence identity)」は、比較を行い、最大の一致に関してアラインメントを行った場合に、少なくとも約80%のアミノ酸残基同一性、好ましくは少なくとも約90%又は少なくとも約95%の同一性を有する、2つ以上の配列又は下位配列 (例えばドメイン) を指す。2つの同様の配列 (例えば抗体可変ドメイン) 間の配列同一性は、T.F. & Waterman, M.S. (1981) "Comparison Of Biosequences," Adv. Appl. Math. 2:482 [局所相同性アルゴリズム]; Needleman, S.B. & Wunsch, C.D. (1970) "A General Method Applicable To The Search For Similarities In The Amino Acid Sequence Of Two Proteins," J. Mol. Biol. 48:443 [相同性アラインメントアルゴリズム]; Pearson, W.R. & Lipman, D.J. (1988) "Improved Tools For Biological Sequence Comparison," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 85:2444 [類似性に関する探索法]; 又はAltschul, S.F. et al., (1990) "Basic Local Alignment Search Tool," J. Mol. Biol. 215:403-10 [BLASTアルゴリズム]のもの等のアルゴリズムによって測定できる。上述のアルゴリズムのうちのいずれを使用する場合、(ウインドウの長さ、ギャップペナルティ等に関して)デフォルトのパラメータを使用する。第1のアミノ酸配列は、配列同一性の程度が、少なくとも約70%同一である、好ましくは少なくとも約80%、又は少なくとも約90%、又は更に少なくとも約95%同一である場合に、第2のアミノ酸配列と「実質的に同様 (substantially similar)」であると表現される。ある核酸配列は:(1)配列同一性の程度が、少なくとも約70%同一である、好ましくは少なくとも約80%、若しくは少なくとも約90%、若しくは更に少なくとも約95%同一である;又は(2)当該核酸配列を含む核酸分子が、第2の配列を含む核酸分子がエンコードするポリペプチドと少なくとも約70%同一である、好ましくは少なくとも約80%、若しくは少なくとも約90%、若しくは更に少なくとも約95%同一であるポリペプチドをエンコードする場合に、第2の配列と「実質的に同様」であると表現される。実質的に同一 (substantially identical) である配列もまた、実質的に同様である。

【0084】

抗体に言及する際、各ドメインに対するアミノ酸の割り当ては、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. (National Institutes of Health, Bethesda, MD., (1991) (「Kabatら」)に従い、上記文献は参照によりその全体が明示的に本出願に援用される。本明細書全体を通して、「Kabatに従った (according to Kabat)」IgG重鎖中の定常残基の番号付与は、Kabatらに記載されているようなヒトIgG1 EU抗体の番号付与を指す。

【0085】

用語「マウス4D5抗体 (Murine 4D5 Antibody)」は、米国特許第5,677,171号にATCC CRL 10463として開示されているマウスIgG1抗体を指す。マウス4D5抗体はHer2/neuに結合し、また配列番号3のアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメイン、及び配列番号47のアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインを有する。用語「ヒト化4D5抗体 (Humanized 4D5 Antibody)」は、Carter, P. et al. (1992) ("Humanization Of An Anti-P185her2 Antibody For Human Cancer Therapy," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289)に開示されているIgG抗体を指す。ヒト化4D5抗体は、Her2/neuに結合することが報告されており、また配列番号5のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域、及び配列番号48のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を有する。

【 0 0 8 6 】

マウス 4 D 5 抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 3) (C D R_L 残基には下線が付されている) :

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS
ASFRYTGVPD RFTGNRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG
 GTKLEIK

である。

【 0 0 8 7 】

マウス 4 D 5 抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 4 7) (C D R_H 残基には下線が付されている) :

QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWIGR
IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED TAVYYCSRWG
GDGFYAMDYW GQGASVTVSS

である。

【 0 0 8 8 】

ヒト化 4 D 5 抗体の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 5) (C D R_L 残基には下線が付されている) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDVN TAVAWYQQKP GKAPKLLIYS
ASFLESGVPS RFSGSRSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ HYTTPPTFGG
 GTKVEIK

である。

【 0 0 8 9 】

ヒト化 4 D 5 抗体の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 4 8) (C D R_H 残基には下線が付されている) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFNIK DTYIHWVRQA PGKGLEWVAR
IYPTNGYTRY ADSVKGRFTI SADTSKNTAY LQMNSLRAED TAVYYCSRWG
GDGFYAMDVW GQGTLVTVSS

である。

【 0 0 9 0 】

用語「キメラ 4 D 5 抗体 (Chimeric 4 D 5 Antibody)」は、ヒト Her 2 / neu に結合し、また配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖、及び野生型 Fc 領域を有する重鎖を有する、Ig G 抗体を指し、キメラ 4 D 5 抗体の重鎖のアミノ酸配列は、配列番号 7 で示される。「変異型キメラ 4 D 5 抗体 (Variant Chimeric 4 D 5 Antibody)」は、Her 2 / neu に結合し、またその 1 つ又は複数のアミノ酸配列がキメラ 4 D 5 抗体のものとは異なる軽鎖及び / 又は重鎖を有する、Ig G 抗体 (例えば、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖、及び配列番号 9、配列番号 1 1 又は配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する重鎖を含む、Ig G 抗体) である。

【 0 0 9 1 】

VI . 結合分子

A . HER 2 / neu に特異的に結合する分子

本発明に包含される HER 2 / neu に特異的に結合する分子は、ヒト HER 2 / neu の連続又は不連続 (例えば配座) エピトープに特異的に結合できる抗 HER 2 / neu 抗体を含む。本発明の方法において使用される HER 2 / neu 抗体は好ましくは、1 つ又は複数の非ヒト種、特にマウス、ロバ、イヌ及び霊長類種 (特にカニクイザル) の HER 2 / neu 分子に結合する能力も示す。

【 0 0 9 2 】

HER 2 / neu に対する抗体を以下に提供する。更なる所望の抗体は、このような抗体のポリペプチド鎖をエンコードする核酸分子を突然変異させた後、HER 2 / neu に特異的に結合する能力を示す発現した抗体を、HER 2 / neu 若しくはその断片を用いて誘発される新規の抗体分泌ハイブリドーマを単離することによって、又は他の手段によ

10

20

30

40

50

って、スクリーニングすることにより、作製できる。ヒトHER2配列は非特許文献27に記載されており、また上記配列は、受託番号X03363としてGenBankで入手可能である。

【0093】

本発明は特に、キメラ4D5抗体の変異型、より詳細には、HER2/neu、好ましくはヒトHER2/neuに特異的に結合し、かつ軽鎖の可変ドメイン中のグリコシル化部位の除去により、マウス4D5抗体に対してグリコシル化が低減した、このようなキメラ4D5抗体の変異型を包含する。特に本発明の好ましいキメラ抗体は、マウス4D5抗体の軽鎖の可変ドメイン中にグリコシル化部位を有さず、マウス4D5抗体の軽鎖中には、65、66及び67位にN-R-S配列を含む。好ましくは、上記抗体は、HER2/neuに対する結合親和性が増強され、より好ましくは、本発明の変異型キメラ4D5抗体は、マウス4D5抗体と比較して、増強されたエフェクタ機能、又は増強されたHER2/neuに対する結合親和性及び増強されたエフェクタ機能の両方を有する。

10

【0094】

ある好ましい実施形態では、キメラ4D5抗体の好ましい変異型は、配列番号2のアミノ酸配列を有する又は含む軽鎖(キメラ4D5軽鎖)を含む。

【0095】

キメラ4D5抗体軽鎖のアミノ酸配列(配列番号2)(CDRL残基には下線が付されている)：

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS
ASFRYTGVPD RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG
GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV
DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG
LSSPVTKSFN RGEC

20

【0096】

好ましい変異型キメラ4D5抗体の軽鎖をエンコードする例示的な核酸分子は、配列番号1：

gacatcgtga tgaccagtc ccacaagttc atgtccacct ctgtgggcga
tagggtcagc atcacctgca aggccagcca ggatgtgaat actgctgtag
cctgggatca gcagaaacca ggacattctc ccaaactgct gatttactcc
gcatccttc ggtaactgg agtccctgat cgcttactg gcagcagatc
tgggacagat ttcacttca ccatcagcag tgtgcaggct gaagacctgg
cagtttatta ctgtcagcaa cattatacta cacctcccac cttcggaggg
ggtaccaagg tggagatcaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat
cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg
gataacgccc tcaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga
cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag
cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag

30

である。

40

【0097】

このような軽鎖アミノ酸配列を有する抗体は、VL領域の65位の修飾、従ってマウス4D5抗体に見られるN結合グリコシル化の欠如を有する。(図1参照；図1は、N65S修飾を有するキメラ4D5抗体(配列番号4)、並びにマウス(配列番号3)及びヒト化(配列番号5)4D5抗体のVL領域アミノ酸配列間の例示的な比較を示す)。別の好ましい実施形態では、本発明の変異型キメラ4D5抗体は、配列番号4のVL領域アミノ酸配列を有する。

【0098】

キメラ4D5 VL領域のアミノ酸配列(配列番号4)(CDRL残基には下線が付され

50

ている) :

DIVMTQSHKF MSTSVGDRVS ITCKASQDVN TAVAWYQQKP GHSPKLLIYS
ASFRYTGVPD RFTGSRSGTD FTFTISSVQA EDLAVYYCQQ HYTTPPTFGG
 GTKVEIK

【 0 0 9 9 】

キメラ 4 D 5 抗体は、野生型 F c 領域 (配列番号 7) を有する重鎖 (「キメラ 4 D 5 重鎖」) を含み、これは配列番号 6 の核酸配列によってエンコードできる。これらの配列を以下に提示する。

【 0 1 0 0 】

野生型 F c 領域を有するキメラ 4 D 5 重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 7) (C D R_H 残基には下線が付されている) :

QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWIGR
IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED TAVYYCSRWG
GDGFYAMDYW GQGASVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTS HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP
 KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTI S KAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV
 LDSDSGFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

10

20

【 0 1 0 1 】

野生型 F c 領域を有するキメラ 4 D 5 重鎖をエンコードする例示的な核酸分子 (配列番号 6) :

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctggtgaagc caggggcctc
 actcaagttg tcctgtacag ctctctggctt caacatcaaa gacacctata
 tccactgggt gaaacagagg cctgaacagg gcctggaatg gat t ggaagg
 atttatccta ccaatggcta tactagatat gacccaaagt tccaggacaa
 ggccactatc acagcagaca catcctcaa cacagcctac ctgcaagtca
 gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga
 ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcagggag cctccgtgac
 cgtgagctcc gccccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctc
 cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag
 gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg tggaaactcag gcgcccctgac
 cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca ggactctact
 ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
 tacatctgca acgtgaaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag
 agttgagccc aaatctgtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgccag
 cacctgaact cctgggggga ccgtcagctt tctcttccc cccaaaacc
 aaggacacc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt
 ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gtccaactgg tacgtggacg
 gcgtggaggf gcataatgcc aagacaaaagc cgcgggagga gcagtacaac
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct
 gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccagccc
 ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag
 gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag
 cctgacctgc ctggtcaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt
 gggagagcaa tgggagccg gagaacaact acaagaccac gccctccgtg
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa
 gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg
 ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa

30

40

50

tga

【 0 1 0 2 】

他の実施形態では、本発明は、変異型 F c 領域、より好ましくは「 F c M T 1 」、 「 F c M T 2 」 又は 「 F c M T 3 」 変異型 F c 領域を含む、変異型キメラ 4 D 5 抗体を採用することを考える。これらの配列を以下に提示する。

【 0 1 0 3 】

F c M T 1 変異型 F c 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖のアミノ酸配列（配列番号 9）（C D R_H 残基には下線が付されている）：

QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWIGR
IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED TAVYYCSRWG
GDGFYAMDYW GQGASVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVFP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLPPPKP
 KDTLMI SRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPPEEQYN
 STLRVVSILT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPLV
 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

10

【 0 1 0 4 】

F c M T 1 変異型 F c 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖をエンコードする例示的な核酸分子（配列番号 8）：

20

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctgggtgaagc caggggcctc
 actcaagttg tcctgtacag ctctctggctt caacatcaaa gacacctata
 tccactgggt gaaacagagg cctgaacagg gcttggaaatg gat tgggaagg
 atttatccta ccaatggcta tactagatat gacccaaagt tccaggacaa
 ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac ctgcaagtca
 gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga
 ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcagggag cctccgtgac
 cgtgagctcc gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct
 cctccaagag cacctctggg ggacacagcgg ccctgggctg cctggtcaag
 gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg tggaaactcag gcgcccctgac
 cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact
 ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag
 agttgagccc aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag
 cacctgaact cctgggggga ccgtcagctt tctcttacc cccaaaaccc
 aaggacacc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtggtggt
 ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg tacgtggacg
 gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac
 agcacgctcc gtgtggtcag catcctcacc gtctctgacc aggactggct
 gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccagccc
 ccatcgagaa aacctcttcc aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag
 gtgtacacc tgccccatc ccgggatgag ctgaccaaga accaggtcag
 cctgacctgc ctggtaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt
 gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctctctgtg
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa
 gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg
 ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
 tga

30

40

【 0 1 0 5 】

F c M T 2 変異型 F c 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖のアミノ酸配列（配

50

列番号 1 1) (C D R_H 残基には下線が付されている) :

QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWIGR
IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED TAVYYCSRWG
GDGFYAMDYW GQGASVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKHTTCP PCPAPELVGG PSVFLLPPKP
 KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPPEEQYN
 STLRVVSILT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDE LTKNQVSLTLC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPLV
 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

10

【 0 1 0 6 】

F c M T 2 変異型 F c 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖をエンコードする例示的な核酸分子 (配列番号 1 0) :

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctgggtgaagc caggggcctc
 actcaagttg tcctgtacag ctctctggctt caacatcaaa gacacctata
 tccactgggt gaaacagagg cctgaacagg gccctggaatg gattggaagg
 atttatccta ccaatggcta tactagatat gacccaaagt tccaggacaa
 ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac ctgcaagtca
 gccgctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga
 ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcagggag cctccgtgac
 cgtgagctcc gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcacctc
 cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag
 gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgctg tggaaactcag gcgcccctgac
 cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca ggactctact
 ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag
 agttgagccc aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc aacggtgccag
 cacctgaact cgtgggggga ccgtcagctt tctcttacc cccaaaacc
 aaggacacc tcatgatctc ccggaccctt gaggtcacat gcgtggtggt
 ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gtccaactgg tacgtggacg
 gcgtggagg gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac
 agcacgctcc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctcgcacc aggactggct
 gaatggcaag gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc
 ccatcgagaa aaccatctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
 gtgtacacc tgcacctcct ccgggatgag ctgaccaaga accaggctcag
 cctgacctgc ctggtcaaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt
 gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctctcgtg
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa
 gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg
 ctctgcacaa ccactacacg cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
 tga

20

30

40

【 0 1 0 7 】

F c M T 3 変異型 F c 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖のアミノ酸配列 (配列番号 1 3) (C D R_H 残基には下線が付されている) :

QVQLQQSGPE LVKPGASLKL SCTASGFNIK DTYIHWVKQR PEQGLEWIGR
IYPTNGYTRY DPKFQDKATI TADTSSNTAY LQVSRLTSED TAVYYCSRWG
GDGFYAMDYW GQGASVTVSS ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK
 DYFPEPVTVS WNSGALTSKV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT
 YICNVNHKPS NTKVDKRVEP KSCDKHTTCP PCPAPELLGG PSVFLLPPKP
 KDTLMISRTP EVTCVVDVVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPPEEQYN

50

STLRVVSFLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ
 VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPPV
 LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW QQGNVFCSSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPGK

【 0 1 0 8 】

F c M T 3 変異型 F c 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖をエンコードする例示的な核酸分子 (配列番号 1 2) :

caggttcagc tgcagcagtc tggccctgag ctgggtgaagc caggggcctc
 actcaagttg tcctgtacag ctctctggctt caacatcaaa gacacctata
 tccactgggt gaaacagagg cctgaacagg gccctggaatg gattggaagg
 atttatccta ccaatggcta tactagatat gacccaaagt tccaggacaa
 ggccactatc acagcagaca catcctccaa cacagcctac ctgcaagtca
 gccgcctgac atctgaggac actgccgtct attactgctc ccggtgggga
 ggggacggct tctatgctat ggactactgg ggtcagggag cctccgtgac
 cgtgagctcc gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct
 cctccaagag cacctctggg ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag
 gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg tggaaactcag gcgcccctgac
 cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca ggactctact
 ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag
 agttgagccc aaatctgtg acaaaaactca cacatgcca ccgtgccag
 cacctgaact cctgggggga ccgtcagctt tcctcttacc cccaaaacc
 aaggacacc tcatgatctc ccggacccct gaggtcacat gcgtgggtgt
 ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttaactgg tacgtggacg
 gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgccggagga gcagtacaac
 agcacgctcc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct
 gaatggcaag gagtacaagt gcaaggctc caacaaagcc ctcccagccc
 ccatcgagaa aacctctcc aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag
 gtgtacacc tgcacctc cgggatgag ctgaccaaga accaggtcag
 cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc gccgtggagt
 gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg
 ctggactccg acggctcctt ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa
 gagcaggtgg cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg
 ctctgcacaa ccactacag cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa
 tga

10

20

30

【 0 1 0 9 】

一実施形態では、本発明は、F c 領域に修飾を有し、かつ配列番号 8 の核酸配列によってエンコードされる、又は配列番号 9 のアミノ酸配列を含む、又は配列番号 10 の核酸配列によってエンコードされる、又は配列番号 11 のアミノ酸配列を含む、又は配列番号 12 の核酸配列によってエンコードされる、又は配列番号 13 のアミノ酸配列を含む、変異型キメラ 4 D 5 抗体の使用を対象とする。

40

【 0 1 1 0 】

一実施形態では、本発明は、V L ドメインに N 6 5 S 修飾を有する免疫グロブリン軽鎖、及び修飾された F c 領域を有する免疫グロブリン重鎖を含む、抗 H E R 2 / n e u 抗体の使用を対象とする。好ましくは、このような抗 H E R 2 / n e u 抗体は、配列番号 2 のアミノ酸配列を有する軽鎖、並びに配列番号 7、配列番号 9、配列番号 11 及び配列番号 13 からなる群から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖を含む、キメラ 4 D 5 抗体又は変異型キメラ 4 D 5 抗体である。いくつかの実施形態では、本発明の抗 H E R 2 / n e u 抗体は更に、いくつかの実施形態では少なくとも配列番号 4 を含む軽鎖可変ドメインに融合した軽鎖定常ドメインを含む。他の実施形態では、上記抗体は修飾されているか、断片であるか、又は修飾された断片である。

50

【0111】

活性化低親和性Fc受容体への結合を増強し、かつ低親和性阻害因子受容体CD32B (FcRIIb)への結合を変化させない、又は最小限しか増大させないように、本発明の様々な実施形態に従ってキメラ4D5抗体を構成した。上記抗体は、以下の野生型及びFc最適化抗体を含む：

- ・ch4D5 - 野生型Fc：これは、配列番号2のアミノ酸配列の軽鎖、及び配列番号7のアミノ酸配列の重鎖を有する。ch4D5 - 野生型Fcは、軽鎖にN65S置換を有し、これは脱グルコシル化軽鎖をもたらす。

- ・ch4D5 - FcMT1：これは、配列番号2のアミノ酸配列の軽鎖、及び配列番号9のアミノ酸配列の重鎖を有する。ch4D5 - FcMT1は、軽鎖にN65S置換を有し、これは脱グルコシル化軽鎖をもたらし、また重鎖にF243L、R292P、Y300L、V305I及びP396L置換を有する（全てKabatに従って番号付与されている）。ch4D5 - FcMT1は、ヒトCD16A (FcRIII-A)への結合が10倍増大し、CD16-158^{Phe}への結合は、CD16-158^{Val}への結合よりも、これに比例して増強されている。

- ・ch4D5 - FcMT2（「マルゲツキシマブ」CAS登録番号：1350624-75-7）：これは、配列番号2のアミノ酸配列の軽鎖、及び配列番号11のアミノ酸配列の重鎖を有する。マルゲツキシマブは、軽鎖にN65S置換を有し、これは脱グルコシル化軽鎖をもたらし、また重鎖にL235V、F243L、R292P、Y300L及びP396L置換を有する（全てKabatに従って番号付与されている）。この抗体は、ch4D5 - FcMT1抗体を更に精製したものであり、同様のCD16A結合特性を有するが、CD32B (FcRIIB)への結合がより好ましく低下している。

- ・ch4D5 - FcMT3：これは、配列番号2のアミノ酸配列の軽鎖、及び配列番号13のアミノ酸配列の重鎖を有する。ch4D5 - FcMT3、軽鎖にN65S置換を有し、これは脱グルコシル化軽鎖をもたらし、また重鎖にF243L、R292P及びY300L置換を有する（全てKabatに従って番号付与されている）。この抗体は、ch4D5 - FcMT1抗体を更に精製したものであり、同様のCD16A結合特性を有するが、CD32B (FcRIIB)への結合がより好ましく低下している。

- ・ch4D5 - N297Q（本明細書では「ch4D5 - Ag」とも呼ばれる）：これは、配列番号2のアミノ酸配列の軽鎖、及びN297Q置換を有する重鎖を有する（Kabatに従って番号付与されている）。

【0112】

ch4D5 - 野生型Fc、並びにFc最適化変異型ch4D5 - FcMT1、ch4D5 - FcMT2及びch4D5 - FcMT3の重鎖配列の比較を、図2に示す。CDRは、関連する残基の下側の黒色のバーで示されている。

【0113】

B・PD-1に特異的に結合する分子

本発明に包含されるPD-1に特異的に結合する分子は、ヒトPD-1の連続又は不連続（例えば配座）部分（エピトープ）に特異的に結合できる抗PD-1抗体を含む。本発明の方法において使用されるPD-1抗体は好ましくは、1つ又は複数の非ヒト種、特にマウス、ロバ、イヌ及び霊長類種のPD-1分子に結合する能力も示す。

PD-1に特異的な抗体は公知である（例えば、米国特許出願第62/198,867号；米国特許第5,952,136号；米国特許第7,488,802号；米国特許第7,521,051号；米国特許第8,008,449号；米国特許第8,088,905号；米国特許第8,354,509号；米国特許第8,552,154号；米国特許第8,779,105号；米国特許第8,900,587号；米国特許第9,084,776号；国際公開第2004/056875号；国際公開第2006/121168号；国際公開第2008/156712号；国際公開第2012/135408号；国際公開第2012/145493号；国際公開第2013/014668号；国際公開第2014/179664号；国際公開第2014/194302号；及び国際公開第2015/112

10

20

30

40

50

800号を参照)。更なる所望の抗体は、PD-1又はそのペプチド断片を用いて誘発される抗体分泌ハイブリドーマを単離することによって作製できる。(20個のアミノ酸残基シグナル配列(下線が付されている)及び268個のアミノ酸残基成熟タンパク質を含む)ヒトPD-1は、アミノ酸配列(配列番号14):

MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVQL
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAI SLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLA V ICSRAARGTI
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL

10

を有する。

【0114】

好ましい抗PD-1抗体は:抗ヒトPD-1モノクローナル抗体「PD-1 mAb 1」(ニボルマブ、CAS登録番号:946414-94-4、5C4、BMS-936558、ONO-4538、MDX-1106としても公知、Bristol-Myers SquibbがOPDIVO(登録商標)として市販);「PD-1 mAb 2」(ペンブロリズマブ(以前はランブロリズマブとして公知)、CAS登録番号:1374853-91-4、MK-3475、SCH-900475としても公知、MerckがKEYTRUDA(登録商標)として市販);「PD-1 mAb 3」(EH12.2H7; Dana Farber);「PD-1 mAb 4」(ピディリズマブ、CAS登録番号:1036730-42-3、CT-011としても公知、CureTech);又は表1で提供される抗PD-1抗体のうちのいずれの、 V_L 及び/又は V_H ドメインを有し、より好ましくは、このような抗PD-1モノクローナル抗体の V_L 領域のCDRのうちの一つ、二つ若しくは三つ全て及び/又は V_H ドメインのCDRのうちの一つ、二つ若しくは三つ全てを有する。本発明の方法及び組成物において有用な独特の結合特性を有する更なる抗PD-1抗体は、最近同定された(米国特許出願第62/198,867号参照)。特に好ましいのは、抗PD-1抗体「PD-1 mAb 5」(hPD-1 mAb 2、MacroGenics);「PD-1 mAb 6」(hPD-1 mAb 7、MacroGenics);「PD-1 mAb 7」(hPD-1 mAb 9、MacroGenics);「PD-1 mAb 8」(hPD-1 mAb 15、MacroGenics)のヒト化 V_H 及び/又は V_L ドメインを有し、より好ましくはこのような抗PD-1モノクローナル抗体の V_L 領域のCDRのうちの一つ、二つ若しくは三つ全て及び/又は V_H ドメインのCDRのうちの一つ、二つ若しくは三つ全てを有する、PD-1結合分子である。このような好ましい抗PD-1抗体は、変異型Fc領域を有する抗体、二重特異性(又は多重特異性)抗体、キメラ又はヒト化抗体、BiTe、ダイアボディ等を含む。

20

30

【0115】

PD-1 mAb 1の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列(配列番号15)(CDR_H 残基には下線が付されている):

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL DCKASGITFS NSGMHWVRQA PGKGLEWVAV
IWYDGSKRYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCATND
DYWGQGTLVTVSS

40

【0116】

PD-1 mAb 1の CDR_H1 (配列番号16) NSGMH

【0117】

PD-1 mAb 1の CDR_H2 (配列番号17) VIWYDGSKRYYADSVKG

【0118】

PD-1 mAb 1の CDR_H3 (配列番号18) NDDY

【0119】

PD-1 mAb 1の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列(配列番号19)(CDR_L

50

残基には下線が付されている) :

EIVLTQSPAT L₁SLSPGERAT L₁SCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD
ASNRATGIPA R₁FSGSGSGTD FTLT₁ISSLEP EDFAVYYCQQ SSNWPRTFGQ
 GTKVEIK

【0120】

PD - 1 mAb 1のCDRL₁ (配列番号20) RASQSVSSYLA

【0121】

PD - 1 mAb 1のCDRL₂ (配列番号21) DASNRAT

【0122】

PD - 1 mAb 1のCDRL₃ (配列番号22) QQSSNWPRT

10

【0123】

PD - 1 mAb 2の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号23) (CDRH₁残基には下線が付されている) :

QVQLVQSGVE VKKPGASVKV SCKASGYTFT NYYMYWVRQA PGQGLEWMGG
I₁NPSNGGTNF NEKFKNRVTL TTDSSTTTAY MELKSLQFDD TAVYYCARRD
YRFDMGFDYW GQGTTVTVSS

【0124】

PD - 1 mAb 2のCDRH₁ (配列番号24) NYMY

【0125】

PD - 1 mAb 2のCDRH₂ (配列番号25) GINPSNGGTNFNEKFKN

20

【0126】

PD - 1 mAb 2のCDRH₃ (配列番号26) RDYRFDMGFDY

【0127】

PD - 1 mAb 2の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号27) (CDRL₁残基には下線が付されている) :

EIVLTQSPAT L₁SLSPGERAT L₁SCRASKGVS TSGYSYLHWY QKPGQAPRL
LIY₁LASYLES GVPARFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY YCQHSRDLPL
TFGGGTKVEIK

【0128】

PD - 1 mAb 2のCDRL₁ (配列番号28) RASKGVSTSGYSYLH

30

【0129】

PD - 1 mAb 2のCDRL₂ (配列番号29) LASYLES

【0130】

PD - 1 mAb 2のCDRL₃ (配列番号30) QHSRDLPLT

【0131】

PD - 1 mAb 3の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号31) (CDRH₁残基には下線が付されている) :

QVQLQQSGAE LAKPGASVQM SCKASGYSFT SSWIHWVKQR PGQGLEWIGY
I₁YPSTGFTEY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARWR
DSSGYHAMDY WGQGT₁SVTVSS

40

【0132】

PD - 1 mAb 3のCDRH₁ (配列番号32) SSWIH

【0133】

PD - 1 mAb 3のCDRH₂ (配列番号33) YIYPSTGFTEYNQKFKD

【0134】

PD - 1 mAb 3のCDRH₃ (配列番号34) RWRDSSGYHAMDY

【0135】

PD - 1 mAb 3の軽可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号35) (CDRL₁残基には下線が付されている) :

DIVLTQSPAS LTVSLGQRAT I₁SCRASQSVS TSGYSYMHWY QKPGQP₁PKL

50

LIKFGSNLES GIPARFSGSG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQHSWEIPY
TFGGGTKLEI K

【 0 1 3 6 】

PD - 1 mA b 3 の C D R_L 1 (配列番号 3 6) RASQSVSTSGYSYMH

【 0 1 3 7 】

PD - 1 mA b 3 の C D R_L 2 (配列番号 3 7) FGSNLES

【 0 1 3 8 】

PD - 1 mA b 3 の C D R_L 3 (配列番号 3 8) QHSWEIPYT

【 0 1 3 9 】

PD - 1 mA b 4 の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 3 9) (C D R_H 10
 残基には下線が付されている) :

QVQLVQSGSE LKKPGASVKI SCKASGYTFT NYGMNWRQA PGQGLQWMGW
INTDSGESTY AEEFKGRFVF SLDTSVNTAY LQITSLTAED TGMFYFCVRVG
YDALDYWGQG TLVTVSS

【 0 1 4 0 】

PD - 1 mA b 4 の C D R_H 1 (配列番号 4 0) NYGMN

【 0 1 4 1 】

PD - 1 mA b 4 の C D R_H 2 (配列番号 4 1) WINTDSGESTYAEEFKG

【 0 1 4 2 】

PD - 1 mA b 4 の C D R_H 3 (配列番号 4 2) VGYDALDY 20

【 0 1 4 3 】

PD - 1 mA b 4 の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 4 3) (C D R_L
 残基には下線が付されている) :

EIVLTQSPSS LSASVGDRVT ITCSARSSVS YMHWFQKPG KAPKLWIYRT
SNLASGVPSR FSGSGSGTSY CLTINSLQPE DFATYYCQQR SSFPLTFGGG
 TKLEIK

【 0 1 4 4 】

PD - 1 mA b 4 の C D R_L 1 (配列番号 4 4) SARSSVSYMH

【 0 1 4 5 】

PD - 1 mA b 4 の C D R_L 2 (配列番号 4 5) RTSNLAS 30

【 0 1 4 6 】

PD - 1 mA b 4 の C D R_L 3 (配列番号 4 6) QQRSSFPLT

【 0 1 4 7 】

PD - 1 mA b 5 の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 5 3) (C D R_H
 残基には下線が付されている) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFVFS SFGMHWVQA PGKGLEWVAY
ISSGMSISY ADTVKGRFTI SRDNAKNTLY LQMNSLRTED TALYYCASLS
DYFDYWGQGT TVTVSS

【 0 1 4 8 】

PD - 1 mA b 5 の C D R_H 1 (配列番号 5 4) SFGMH 40

【 0 1 4 9 】

PD - 1 mA b 5 の C D R_H 2 (配列番号 5 5) YISSGMSISYADTVKG

【 0 1 5 0 】

PD - 1 mA b 5 の C D R_H 3 (配列番号 5 6) LSDYFDY

【 0 1 5 1 】

PD - 1 mA b 5 の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 5 7) (C D R_L
 残基には下線が付されている) :

DVVMTQSPLS LPVTLGQPAS ISCRSSQSLV HSTGNTYLLHW YLQKPGQSPQ
LL IYRVSNRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCSQTTHP
WTFGQGTKLE IK

【 0 1 5 2 】

PD - 1 m A b 5 の C D R_L 1 (配列番号 5 8) RSSQSLVHSTGNTYLH

【 0 1 5 3 】

PD - 1 m A b 5 の C D R_L 2 (配列番号 5 9) RVSNRFS

【 0 1 5 4 】

PD - 1 m A b 5 の C D R_L 3 (配列番号 6 0) SQTTHVPWT

【 0 1 5 5 】

PD - 1 m A b 6 の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 6 1) (C D R_H 残基には下線が付されている) :

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWVRQA PGQGLEWXGV
IHPSDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSS

10

ここでXはI又はAである。

【 0 1 5 6 】

PD - 1 m A b 6 の C D R_H 1 (配列番号 6 2) SYWMN

【 0 1 5 7 】

PD - 1 m A b 6 の C D R_H 2 (配列番号 6 3) VIHPDSETWLDQKFKD

【 0 1 5 8 】

PD - 1 m A b 6 の C D R_H 3 (配列番号 6 4) EHYGTSPFAY

【 0 1 5 9 】

PD - 1 m A b 6 の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 6 5) (C D R_L 残基には下線が付されている) :

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRAX₁ESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
 LIHAASNX₂GS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
 TFGGGTKVEI K

20

ここでX₁はN若しくはSであり、かつX₂はQ若しくはRであるか；又はX₁はNであり、X₂はQであるか；又はX₁はSであり、X₂はQであるか；又はX₁はSであり、X₂はRである。

【 0 1 6 0 】

PD - 1 m A b 6 の C D R_L 1 (配列番号 6 6) RAX₁ESVDNYGMSFMN

30

ここでX₁は上述の通りである。

【 0 1 6 1 】

PD - 1 m A b 6 の C D R_L 2 (配列番号 6 7) AASNX₂GS

ここでX₂は上述の通りである。

【 0 1 6 2 】

PD - 1 m A b 6 の C D R_L 3 (配列番号 6 8) QQSKEVPYT

【 0 1 6 3 】

特定の実施形態では、PD - 1 m A b 6 は：

(a) 配列番号 6 1、ただしXはIである；及び配列番号 6 5、ただしX₁はNであり、X₂はQである；又は

40

(b) 配列番号 6 1、ただしXはIである；及び配列番号 6 5、ただしX₁はSであり、X₂はQである

を含む。

【 0 1 6 4 】

PD - 1 m A b 7 の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 6 9) (C D R_H 残基には下線が付されている) :

EVQLVESGGG LX₁RPGGSLKL SCAASGFTFS SYLVX₂WVRQA PGKGLEWX₃AT
ISGGGGNTYY SDSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSX₄RAED TATYYCARYG
FDGAWFAYWG QGTLVTVSS

ここでX₁はV若しくはAであり、X₂はS若しくはGであり、X₃はV若しくはTであり

50

、 X_4 はL若しくはAであるか； X_1 はVであり、 X_2 はSであり、 X_3 はVであり、 X_4 はLであるか；又は X_1 はAであり、 X_2 はGであり、 X_3 はTであり、 X_4 はAである。

【0165】

PD - 1 mAb 7のCDRH₁ (配列番号70) SYLVX₂

ここで X_2 は上述の通りである。

【0166】

PD - 1 mAb 7のCDRH₂ (配列番号71) TISGGGNTYYSDSVKG

【0167】

PD - 1 mAb 7のCDRH₃ (配列番号72) YGFDGAWFAY

【0168】

PD - 1 mAb 7の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号73) (CDRL_L残基には下線が付されている) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY X₁YLAWYQQKP GKAPKLLIYX₂
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
GTKLEIK

ここで X_1 はN若しくはSであり、 X_2 はN若しくはDであるか； X_1 はSであり、 X_2 はNであるか；又は X_1 はNであり、 X_2 はDである。

【0169】

PD - 1 mAb 7のCDRL₁ (配列番号74) RASENIYX₁YLA

ここで X_1 は上述の通りである。

【0170】

PD - 1 mAb 7のCDRL₂ (配列番号75) X₂AKTLAA

ここで X_2 は上述の通りである。

【0171】

PD - 1 mAb 7のCDRL₃ (配列番号76) QHHYAVPWT

【0172】

特定の実施形態では、PD - 1 mAb 7は :

(a) 配列番号69、ただし X_1 はVであり、 X_2 はSであり、 X_3 はVであり、 X_4 はLである；及び配列番号73、ただし X_1 はSであり、 X_2 はNである；又は

(b) 配列番号69、ただし X_1 はAであり、 X_2 はGであり、 X_3 はTであり、 X_4 はAである；及び配列番号73、ただし X_1 はNであり、 X_2 はDであるを含む。

【0173】

PD - 1 mAb 8の重鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号77) (CDRH_H残基には下線が付されている) :

EVQLVESGGG LVRPGGSLRL SCAASGFTFS SYLISWVRQA PGKGLEWVAA
ISGGGADTTY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TATYYCARRG
TYAMDYWGQG TLVTVSS

【0174】

PD - 1 mAb 8のCDRH₁ (配列番号78) SYLIS

【0175】

PD - 1 mAb 8のCDRH₂ (配列番号79) AISGGGADTTYADSVKG

【0176】

PD - 1 mAb 8のCDRH₃ (配列番号80) RGTYAMDY

【0177】

PD - 1 mAb 8の軽鎖可変ドメインのアミノ酸配列 (配列番号81) (CDRL_L残基には下線が付されている) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASENIY NYLAWYQQKP GKAPKLLIYD
AKTLAAGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYAVPWTFGQ
GTKLEIK

10

20

30

40

50

【 0 1 7 8 】

PD - 1 m A b 8 の C D R_L 1 (配列番号 8 2) RASENIYNYLA

【 0 1 7 9 】

PD - 1 m A b 8 の C D R_L 2 (配列番号 8 3) DAKTLAA

【 0 1 8 0 】

PD - 1 m A b 8 の C D R_L 3 (配列番号 8 4) QHHYAVPWT

【 0 1 8 1 】

【表 1】

表 1 : 追加の抗 PD-1 抗体	
PD-1 抗体	参照
PD1-17; PD1-28; PD1-33; PD1-35; 及び PD1-F2	米国特許第 7,488,802 号 ; 第 7,521,051 号 ; 第 8,088,905 号 ; 及び 国際公開第 2004/056875 号
17D8; 2D3; 4H1; 5C4; 4A11; 7D3; 及び 5F4	米国特許第 8,008,449 号 ; 第 8,779,105 号 ; 第 9,084,776 号 ; 及び 国際公開第 2006/121168 号
hPD-1.08A; hPD-1.09A; 109A; K09A; 409A; h409A11; h409A16; h409A17; コドン最適化 109A; 及びコドン最適化 409A	米国特許第 8,354,509 号 ; 第 8,900,587 号 ; 第 5,952,136 号 ; 及び 国際公開第 2008/156712 号
1E3; 1E8; 及び 1H3	米国公開特許第 2014/0044738 号; 及び 国際公開第 2012/145493 号
9A2; 10B11; 6E9; APE1922; APE1923; APE1924; APE1950; APE1963; 及び APE2058	国際公開第 2014/179664 号
GA1; GA2; GB1; GB6; GH1; A2; C7; H7; SH-A4; SH-A9; RG1H10; RG1H11; RG2H7; RG2H10; RG3E12; RG4A6; RG5D9; RG1H10-H2A-22-1S; RG1H10-H2A-27-2S; RG1H10-3C; RG1H10-16C; RG1H10-17C; RG1H10-19C; RG1H10-21C; 及び RG1H10-23C2	米国公開特許第 2014/0356363 号 ; 及び 国際公開第 2014/194302 号
H1M7789N; H1M7799N; H1M7800N; H2M7780N; H2M7788N; H2M7790N; H2M7791N; H2M7794N; H2M7795N; H2M7796N; H2M7798N; H4H9019P; H4xH9034P2; H4xH9035P2; H4xH9037P2; H4xH9045P2; H4xH9048P2; H4H9057P2; H4H9068P2; H4xH9119P2; H4xH9120P2; H4Xh9128p2; H4Xh9135p2; H4Xh9145p2; H4Xh8992p; H4Xh8999p; 及び H4Xh9008p;	米国公開特許第 2015/0203579 号; 及び 国際公開第 2015/112800 号
PD-1 mAb 1; PD-1 mAb 2; hPD-1 mAb 2; PD-1 mAb 3; PD-1 mAb 4; PD-1 mAb 5; PD-1 mAb 6; PD-1 mAb 7; hPD-1 mAb 7; PD-1 mAb 8; PD-1 mAb 9; hPD-1 mAb 9; PD-1 mAb 10; PD-1 mAb 11; PD-1 mAb 12; PD-1 mAb 13; PD-1 mAb 14; PD-1 mAb 15; 及び hPD-1 mAb 15	米国特許出願第 62/198,867 号

10

20

30

40

【 0 1 8 2 】

特定の実施形態では、本発明の方法及び組成物において有用な PD-1 抗体は、上述の抗体（例えば PD-1 mAb 1、PD-1 mAb 2、PD-1 mAb 3、P 50

D - 1 m A b 4、P D - 1 m A b 5、P D - 1 m A b 6、P D - 1 m A b 7、P D - 1 m A b 8、又は表1の抗P D - 1抗体のうちいずれ)のうちいずれのV L及びV Hドメイン、C Lドメイン、並びに任意にC末端リシン残基を有しないI g G 4 F cドメインを備える。このような抗体は好ましくは、I g G 4 C H 1ドメイン及びヒンジを備え、より好ましくは、S 2 2 8 P置換(番号付与はKabatにおいてと同様にE Uインデックスに従ったものである)を含む安定化I g G 4ヒンジを備える。

【0183】

C Lドメインのアミノ酸配列(配列番号86)は:

RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC

10

である。

【0184】

I g G 4 C H 1ドメイン及び安定化ヒンジのアミノ酸配列(配列番号87)は:

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRVES
KYGPPCPPCP

である。

【0185】

I g G 4 C H 2 - C H 3ドメインのアミノ酸配列(配列番号52)を以下に提示する

20

【0186】

「P D - 1 m A b 6 - I S Q」と呼称される例示的な抗P D - 1抗体は:P D - 1 m A b 6のV Lドメイン(配列番号65)(ただし X_1 はSであり、 X_2 はQである)と、C L(配列番号86)とを有する軽鎖;及びP D - 1 m A b 6のV Hドメイン(配列番号61)(ただし X_1 はIである)と、I g G 4 C H 1ドメインと、安定化I g G 4ヒンジ(配列番号87)と、I g G 4 C H 2 - C H 3ドメイン(配列番号52)とを有する重鎖を含む。

【0187】

P D - 1 m A b 6 - I S Qの完全な軽鎖のアミノ酸配列(配列番号87)を以下に示す(C D R_L残基には下線が付されている):

30

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASESVD NYGMSFMNWF QQKPGQPPKL
LIHAASNQGS GVPSRFSGSG SGTDFTLTIS SLEPEDFAVY FCQQSKEVPY
TFGGGKVEI KRTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV
QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDSTYSL S TLTLKADY EKHKVYACEV
THQGLSSPVT KSFNRGEC

【0188】

P D - 1 m A b 6 - I S Qの完全な重鎖のアミノ酸配列(配列番号88)を以下に示す(C D R_H残基には下線が付されている):

40

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYSFT SYWMNWRQA PGQGLEWIGV
IHPDSETWL DQKFKDRVTI TVDKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCAREH
YGTSPFAYWG QGTLVTVSSA STKGPSVFPL APCSRSTSES TAALGCLVKD
YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFPVAVLQSSG LYSLSVTVV PSSLGKTKY
TCNVDHKPSN TKVDKRVESK YGPPCPPCPA PEFLLGGPSVF LFPPKPKDNL
MISRTPEVTC VVVDVSDQEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP REEQFNSTYR
VVSVLTVLHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPSS IEKTIKAKG QPREPQVYTL
PPSQEEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNGQPENNY KTTTPVLDSD
GSFFLYSRLT VDKSRWQEGN VFSCSVMEHA LHNHYTQKSL SLSLG

【0189】

別の例示的な抗P D - 1抗体は、P D - 1 m A b 1(ニボルマブ)であり、これは

50

：V Lドメイン（配列番号19）と C Lドメイン（例えば配列番号86参照）とを有する軽鎖；並びにV Hドメイン（配列番号15）、I g G 4 C H 1ドメイン及び安定化ヒンジ（例えば配列番号87参照）と、I g G 4 C H 2 - C H 3ドメイン（例えば配列番号54参照）とを有する重鎖を含む、ヒト抗体である。

【0190】

別の例示的な抗PD-1抗体は、PD-1 mAb 2（ペンプロリズマブ）であり、これは：V Lドメイン（配列番号27）と C Lドメイン（例えば配列番号86参照）とを有する軽鎖；並びにV Hドメイン（配列番号23）と、I g G 4 C H 1及び安定化I g G 4ヒンジ（例えば配列番号87参照）と、I g G 4 C H 2 - C H 3ドメイン（例えば配列番号52参照）とを有する重鎖を含む、ヒト抗体である。

10

【0191】

C. 抗体変異型

抗体変異型を調製できるとも考えられる。上記変異型は、そのアミノ酸配列内の所望の位置に、天然アミノ酸配列に対する配列修飾（例えば置換、欠失及び/又は追加）を有してよい。当業者であれば、アミノ酸の変化により、例えばグリコシル化部位の数若しくは位置の変更、又は膜アンカー特性の変更といった、抗体の転写後プロセスが変化し得ることを理解するだろう。ある好ましい実施形態では、上記抗体及び変異型は、Fc領域変異型である。

【0192】

変異型は、天然抗体に比べて同一の又は変化した活性を有し得る。例えば、上記変異型は同一の活性を有するものの、例えば米国特許第5,739,277号に記載されているように、例えば上記抗体をアルブミン又はサルベージ受容体結合エピトープとコンジュゲートすることによって、より安定するよう、又はより長いインビボ半減期を有するような様式で修飾されることが望ましい場合がある。あるいは例えば、抗体が、抗原に対する結合親和性を増大させるものの、天然抗体と同一のエフェクタ機能を有することが望ましい場合があり、又は抗体が、抗原に対する同一の結合親和性を有するものの、エフェクタ機能が低下することが望ましい場合がある。活性は例えば、ELISAアッセイ、表面プラズモン共鳴アッセイ、放射標識タンパク質結合アッセイ（RIA）、又は免疫沈降アッセイといったインビトロアッセイを用いて試験できる。

20

【0193】

機能又は免疫学的アイデンティティの大幅な修飾は：（a）修飾の領域内のポリペプチド骨格の構造を、例えばシート若しくは螺旋構造として；（b）標的部位における上記分子の電荷若しくは疎水性を；又は（c）側鎖のかさを、維持することに対して、機能が大幅に異なる修飾を選択することによって達成できる。例えばCunningham and Wells (1989) Science 244:1081 - 1085に記載されているように、走査アミノ酸分析を採用して、連続する配列に沿った1つ又は複数のアミノ酸を同定することもできる。走査アミノ酸のうち、アラニン、グリシン、セリン及びシステインといった比較的小型の中性アミノ酸が好ましい。この群の中で、アラニンは典型的に好ましい走査アミノ酸である。というのは、これは最も一般的なアミノ酸であり、露出していない部分及び露出している部分の両方に頻繁に見られ、またこれは、炭素を超えた側鎖を排除し、変異型の主要な鎖構造を変化させにくいためである。アラニン置換が十分な量の変異型をもたらさない場合、異性体アミノ酸を使用できる。更に、抗体又はポリペプチドの適切な構成の維持に関与しないいずれのシステイン残基を、一般にはセリンで置換することによって、上記分子の酸化安定性を改善し、異常な架橋を防止できる。しかしながら特定の状況、特に上記抗体がFv断片等の抗体断片である状況において、1つ又は複数のシステイン結合を上記抗体又はポリペプチドに追加することによって、その安定性を改善できる。

30

40

【0194】

C D R残基の単一のアミノ酸改変が、機能的結合の損失につながり得るという事実（Rudikoff, S. etc. (1982) "Single Amino Acid Substitution Altering Antigen-Binding Specificity," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 79(6): 1979-1983）は、代替的な機能性

50

C D R 配列を組織的に識別するための手段を提供する。上述のような変異型 C D R を得るための 1 つの好ましい方法では、上記 C D R をエンコードするポリヌクレオチドを（例えばランダム突然変異誘発によって、又は部位指向性の方法（例えば突然変異した座をエンコードするプライマによるポリメラーゼ鎖伸介型増幅）によって）突然変異誘発して、置換されたアミノ酸残基を有する C D R を産生する。オリジナルの（機能性）C D R 配列中の関連する残基の同一性を、置換された（非機能性）変異型 C D R 配列の同一性と比較することによって、当該置換に関する B L O S U M 6 2 . i i j 置換スコアを識別できる。B L O S U M システムは、信頼できる整列のために配列のデータベースを分析することによって生成されたアミノ酸置換のマトリクスを提供する（Eddy, S.R. (2004) "Where Did The BLOSUM62 Alignment Score Matrix Come From?," Nature Biotech. 22(8): 1035-1036; Henikoff, J.G. (1992) "Amino acid substitution matrices from protein blocks," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 89: 10915-10919; Karlin, S. et al. (1990) "Methods For Assessing The Statistical Significance Of Molecular Sequence Features By Using General Scoring Schemes," Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 87:2264-2268; Altschul, S.F. (1991) "Amino Acid Substitution Matrices From An Information Theoretic Perspective," J. Mol. Biol. 219, 555-565）。現在、最も進化した B L O S U M データベースは、B L O S U M 6 2 データベース（B L O S U M 6 2 . i i j）である。以下の表 2 は、B L O S U M 6 2 . i i j 置換スコアを示す（スコアが高いほど置換が保存的であり、従って置換が機能に影響を与えにくい）。例えば、結果として得られる C D R を含む抗原結合性断片が R O R 1 に結合できない場合、B L O S U M 6 2 . i i j 置換スコアは、十分に保存的でないと考えられ、より高い置換スコアを有する新たな置換候補が選択及び産生される。従って例えば、オリジナルの残基がグルタミン酸（E）であり、非機能性置換残基がヒスチジン（H）であった場合、B L O S U M 6 2 . i i j 置換スコアは 0 となり、（アスパラギン酸、アスパラギン、グルタミン又はリシン等への）より保存的な変化が好ましい。

【 0 1 9 5 】

10

20

【表 2】

表 2 : BLOSUM62.ijj 置換スコア																				
	A	R	N	D	C	Q	E	G	H	I	L	K	M	F	P	S	T	W	Y	V
A	+4	-1	-2	-2	0	-1	-1	0	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	0	-3	-2	0
R	-1	+5	0	-2	-3	+1	0	-2	0	-3	-2	+2	-1	-3	-2	-1	-1	-3	-2	-3
N	-2	0	+6	+1	-3	0	0	0	+1	-3	-3	0	-2	-3	-2	+1	0	-4	-2	-3
D	-2	-2	+1	+6	-3	0	+2	-1	-1	-3	-4	-1	-3	-3	-1	0	-1	-4	-3	-3
C	0	-3	-3	-3	+9	-3	-4	-3	-3	-1	-1	-3	-1	-2	-3	-1	-1	-2	-2	-1
Q	-1	+1	0	0	-3	+5	+2	-2	0	-3	-2	+1	0	-3	-1	0	-1	-2	-1	-2
E	-1	0	0	+2	-4	+2	+5	-2	0	-3	-3	+1	-2	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
G	0	-2	0	-1	-3	-2	-2	+6	-2	-4	-4	-2	-3	-3	-2	0	-2	-2	-3	-3
H	-2	0	+1	-1	-3	0	0	-2	+8	-3	-3	-1	-2	-1	-2	-1	-2	-2	+2	-3
I	-1	-3	-3	-3	-1	-3	-3	-4	-3	+4	+2	-3	+1	0	-3	-2	-1	-3	-1	+3
L	-1	-2	-3	-4	-1	-2	-3	-4	-3	+2	+4	-2	+2	0	-3	-2	-1	-2	-1	+1
K	-1	+2	0	-1	-3	+1	+1	-2	-1	-3	-2	+5	-1	-3	-1	0	-1	-3	-2	-2
M	-1	-1	-2	-3	-1	0	-2	-3	-2	+1	+2	-1	+5	0	-2	-1	-1	-1	-1	+1
F	-2	-3	-3	-3	-2	-3	-3	-3	-1	0	0	-3	0	+6	-4	-2	-2	+1	+3	-1
P	-1	-2	-2	-1	-3	-1	-1	-2	-2	-3	-3	-1	-2	-4	+7	-1	-1	-4	-3	-2
S	+1	-1	+1	0	-1	0	0	0	-1	-2	-2	0	-1	-2	-1	+4	+1	-3	-2	-2
T	0	-1	0	-1	-1	-1	-1	-2	-2	-1	-1	-1	-1	-2	-1	+1	+5	-2	-2	0
W	-3	-3	-4	-4	-2	-2	-3	-2	-2	-3	-2	-3	-1	+1	-4	-3	-2	+11	+2	-3
Y	-2	-2	-2	-3	-2	-1	-2	-3	+2	-1	-1	-2	-1	+3	-3	-2	-2	+2	+7	-1
V	0	-3	-3	-3	-1	-2	-2	-3	-3	+3	+1	-2	+1	-1	-2	-2	0	-3	-1	+4

10

20

30

【 0 1 9 6 】

従って本発明は、改善された C D R を同定するための、誘導又はランダム突然変異誘発の使用を考えるものである。

【 0 1 9 7 】

D・Fc 領域変異型

従来の免疫機能では、抗体 - 抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用は、A D C C、肥満細胞脱顆粒及び食作用等のエフェクタ機能から、リンパ球増殖及び抗体分泌を制御するもの等の免疫調節性信号にまで及ぶ、広範な応答をもたらす。これらの相互作用は全て、抗体又は免疫複合体の Fc 領域の、造血細胞上の特殊化された細胞表面受容体への結合によって開始される。抗体及び免疫複合体によってトリガされる細胞応答の多様性は、3つの Fc 受容体：Fc R I (C D 6 4)、Fc R I I (C D 3 2) 及び Fc R I I I (C D 1 6) の構造不均質性によって得られる。Fc R I (C D 6 4)、Fc R I I A (C D 3 2 A) 及び Fc R I I I (C D 1 6) は活性化（即ち免疫系増強）受容体であり；Fc R I I B (C D 3 2 B) は阻害性（即ち免疫系減衰）受容体。

40

【 0 1 9 8 】

上記 I g G 1 Fc 領域のアミノ酸配列を以下に示す（配列番号 4 9 として；Kabat に従った番号付与）：

```

231          240          250          260          270          280
APELLGGPSV  FLFPPKPKDT  LMISRTPEVT  CVVVDVSHED  PEVKFNWYVD
          290          300          310          320          330

```

50

GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 340 350 360 370 380
 PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 440 447
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

これはKabatによるE Uインデックスに従って番号付与されており、Xはリシン(K)であるか、又は不在である。

【0199】

例示的なヒトIgG2のCH2 - CH3ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号50)
 :

231 240 250 260 270 280
 APPVA-GPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFNWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTF RVVSVLTVVH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPA
 340 350 360 370 380
 PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDISVE
 390 400 410 420 430
 WESNGQPENN YKTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
 440 447
 ALHNHYTQKS LSLSPGX

であり、これはKabatによるE Uインデックスに従って番号付与されており、Xはリシン(K)であるか、又は不在である。

【0200】

例示的なヒトIgG3のCH2 - CH3ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号51)
 :

231 240 250 260 270 280
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
 340 350 360 370 380
 PIEKTISKTK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430
 WESSGQPENN YNTTTPMLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE
 440 447
 ALHNRFTQKS LSLSPGX

であり、これはKabatによるE Uインデックスに従って番号付与されており、Xはリシン(K)であるか、又は不在である。

【0201】

例示的なヒトIgG4のCH2 - CH3ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号52)
 :

231 240 250 260 270 280
 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSEQED PEVQFNWYVD
 290 300 310 320 330
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS
 340 350 360 370 380
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
 390 400 410 420 430
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE

10

20

30

40

50

440 447

ALHNYHTQKS LSLSLGX

であり、これはKabatによるE Uインデックスに従って番号付与されており、Xはリシン(K)であるか、又は不在である。

【0202】

多型は、抗体定常領域内の多数の異なる位置(例えばKabatに記載されているようなE Uインデックスによる番号付与で270位、272位、312位、315位、356位及び358位を含むがこれらに限定されないFc位置)において観察されており、従ってここで提示される配列と従来技術の配列との間にはわずかな差異が存在し得る。ヒト免疫グロブリンの多型形態は、十分に特性決定されている。現在、18個のGmアロタイプが公知である: G1m(1, 2, 3, 17)又はG1m(a, x, f, z)、G2m(23)又はG2m(n)、G3m(5, 6, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 21, 24, 26, 27, 28)又はG3m(b1, c3, b3, b0, b3, b4, s, t, g1, c5, u, v, g5)(Lefranc, G. et al., in *The Human IgG Subclasses: Molecular Analysis Of Structure, Function And Regulation*, (Shakib, F. (ed.) 1990, pp. 43-78, Pergamon, Oxford, ; Lefranc, G. et al., (1979) "Gm, Am And Km Immunoglobulin Allotypes Of Two Populations In Tunisia," *Hum. Genet.* 50:199-211)。特に、本発明の抗体が、いずれの免疫グロブリン遺伝子のいずれのアロタイプ、アイソアロタイプ又はハプロタイプを組み込むことができ、本明細書中で提示される配列のアロタイプ、アイソアロタイプ又はハプロタイプに限定されないと考えられる。更に、発現系によっては、CH3ドメインのC末端アミノ酸残基(上述の配列番号49~52において太字で記載され、下線を付されている)は、翻訳後に除去できる。従ってCH3ドメインのC末端残基(上では太字で記載され、下線を付されている)は、本発明の方法で使用される抗体中の、任意のアミノ酸残基である。

【0203】

Fc領域の修飾は通常、表現型の変化、例えば血清半減期の変化、安定性の変化、細胞酵素に対する感受性の変化又はエフェクタ機能の変化につながる。本発明の抗体をエフェクタ機能に関して修飾して、例えば癌の治療における抗体の有効性を増強することが望ましい場合がある。例えば、作用機序が、標的抗原を担持する細胞の殺滅ではなく遮断又は拮抗作用を伴う抗体の場合といった、特定の場合においては、エフェクタ機能の低減又は削減が望ましい。エフェクタ機能の上昇は、FcRが低いレベルで発現する腫瘍及び外来細胞、例えばFcRIIBのレベルが低い腫瘍特異性B細胞(例えば非ホジキンリンパ腫、CLL及びパーキットリンパ腫)といった、望ましくない細胞を対象とする場合に一般に望ましい。上記実施形態では、エフェクタ機能活性が与えられた又は増強された本発明の分子は、エフェクタ機能活性の効率の増強が望ましい疾患、障害又は感染の治療及び/又は予防のために有用である。

【0204】

特定の実施形態では、本発明の分子は、Fc領域のアミノ酸に対する1つ又は複数の修飾を含み、これは上記Fcドメイン領域、従って本発明の分子の、1つ又は複数のFcR受容体に対する親和性及び結合活性を低下させる。他の実施形態では、本発明の分子は、上記Fc領域、従って本発明の分子の、1つ又は複数のFcR受容体に対する親和性及び結合活性を上昇させる、Fc領域のアミノ酸に対する1つ又は複数の修飾を含む。他の実施形態では、上記分子は変異型Fc領域を含み、ここで上記変異型は、Fc領域を含まない、又は野生型Fc領域を含む分子に対して、ADCC活性の上昇、及び/又はFcRIIAへの結合の増大を与える、又は仲介する。代替実施形態では、上記分子は変異型Fc領域を含み、ここで上記変異型は、Fc領域を含まない、又は野生型Fc領域を含む分子に対して、ADCC活性(若しくは他のエフェクタ機能)の低下、及び/又はFcRIIBへの結合の増大を与える、又は仲介する。

【0205】

いくつかの実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含む分子を包含し、上記変異型

10

20

30

40

50

Fc領域は、野生型Fc領域を含む同等の分子と比べて、いずれのFc Rに対する検出可能な結合を示さない。他の実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含む分子を包含し、上記変異型Fc領域は、単一のFc R、好ましくはFc R I I A、Fc R I I B、又はFc R I I I Aのうちの一つにしか結合しない。

【0206】

本発明の分子は、活性化及び/又は阻害性Fc受容体に対する親和性が変化し得る。一実施形態では、上記抗体又は分子は、野生型Fc領域を有する同等の分子と比べて、Fc R I I Bに対する親和性が上昇し、かつFc R I I I A及び/又はFc R I I Aに対する親和性が低下した、変異型Fc領域を含む。別の実施形態では、本発明の分子は、野生型Fc領域を有する同等の分子と比べて、Fc R I I Bに対する親和性が低下し、かつFc R I I I A及び/又はFc R I I Aに対する親和性が上昇した、変異型Fc領域を含む。更に別の実施形態では、本発明の分子は、野生型Fc領域を有する同等の分子と比べて、Fc R I I Bに対する親和性が低下し、かつFc R I I I A及び/又はFc R I I Aに対する親和性が低下した、変異型Fc領域を含む。また更に別の実施形態では、本発明の分子は、野生型Fc領域を有する同等の分子と比べて、Fc R I I Bに対する親和性が変化せず、かつFc R I I I A及び/又はFc R I I Aに対する親和性が低下(又は上昇)した、変異型Fc領域を含む。

10

【0207】

特定の実施形態では、本発明は、免疫グロブリンが増強されたエフェクタ機能、例えばADCCを有するように、Fc R I I I A及び/又はFc R I I Aに対する親和性が変化した変異型Fc領域を含む、免疫グロブリンを包含する。エフェクタ細胞機能の非限定的な例としては、ADCC、抗体依存性細胞食作用(ADCP)、食作用、オプソニン作用、オプソニン食作用、細胞結合、ロゼット形成、C1q結合、及びCDCが挙げられる。

20

【0208】

特に好ましい実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含むキメラ抗HER2/neu抗体を包含し、上記変異型は、当業者に公知でありかつ本明細書で例示されている方法を用いて測定される、増大したADCC活性及び/又は増大したFc R I I I A(CD16A)への結合をもたらす、又は有する。本発明の方法に従って使用されるADCCアッセイは、NK依存性又はマクロファージ依存性であってよい。

30

【0209】

特に好ましい実施形態では、本発明は、変異型Fc領域を含む、PD-1に特異的に結合する分子を包含し、上記変異型は、当業者に公知である、本明細書で例示されている方法を用いて測定した場合に、低下したADCC活性及び/又はFc R I I I A(CD16A)に対する低下した結合を与える又は有する。本発明の方法に従って使用されるADCCアッセイは、NK依存性又はマクロファージ依存性であってよい。更なる好ましい実施形態では、本発明は変異型Fc領域を含む、PD-1に特異的に結合する分子を包含し、上記変異型は、当業者に公知である、本明細書で例示されている方法を用いて測定した場合に、低下したCDC活性及び/又はC1qに対する低下した結合を与える又は有する。

40

【0210】

ある好ましい実施形態では、親和性又はエフェクタ機能の変化は、野生型Fc領域を含む同等の分子に対して少なくとも2倍、好ましくは少なくとも4倍、少なくとも5倍、少なくとも6倍、少なくとも7倍、少なくとも8倍、少なくとも9倍、少なくとも10倍、少なくとも50倍、又は少なくとも100倍である。本発明の他の実施形態では、変異型Fc領域は、野生型Fc領域を含む分子に対して少なくとも65%、好ましくは少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも100%、少なくとも125%、少なくとも150%、少なくとも175%、少なくとも200%、少なくとも225%、又は少なくとも250%高い親和性で、1つ又は複数のFc Rに特異的に結合する。このような測定は、インビ

50

ボ又はインビトロアッセイとすることができ、好ましい実施形態では、E L I S A又は表面プラズモン共鳴アッセイ等のインビトロアッセイである。

【0211】

様々な実施形態において、上記分子は、変異型Fc領域を含み、上記変異型は、FcR受容体の少なくとも1つの活性を刺激するか、又はFcR受容体の少なくとも1つの活性に拮抗する。好ましい実施形態では、上記分子は、FcRIIBの1つ又は複数の活性、例えば、B細胞受容体-仲介型シグナリング、B細胞の活性化、B細胞増殖、抗体産生、B細胞の細胞内カルシウム流入、細胞周期進行、FcRISグナリングのFcRIIB-仲介型阻害、FcRIIBのリン酸化、SHIP動員、SHIPリン酸化及びShcとの連結、又はFcRIIBシグナル伝達経路中の1つ若しくは複数の下流分子の活性（例えばMAPキナーゼ、JNK、p38若しくはAkt）を刺激する（又はこれに拮抗する）変異体を含む。別の実施形態では、上記分子は、FcRIの1つ又は複数の活性、例えば肥満細胞活性化、カルシウム可動化、脱顆粒、サイトカイン産生又はセロトニン放出を刺激する（又はこれに拮抗する）変異体を含む。

10

【0212】

特定の実施形態では、上記分子は、2つ以上のIgGアイソタイプ（例えばIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4）からのドメイン又は領域を備えるFc領域を含む。上記様々なIgGアイソタイプは、例えばFlesch, B.K. and Neppert, J. (1999) "Functions Of The Fc Receptors For Immunoglobulin G" J. Clin. Lab. Anal. 14: 141-156; Chappel, M.S. et al. (1993) "Identification Of A Secondary Fc Gamma RI Binding Site Within A Genetically Engineered Human IgG Antibody" J. Biol. Chem. 33:25124-25131; Chappel, M.S. et al. (1991) "Identification Of The Fc Gamma Receptor Class I Binding Site In Human IgG Through The Use Of Recombinant IgG1/IgG2 Hybrid And Point-Mutated Antibodies" Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:9036-9040; Briiggemann, M. et al. (1987) "Comparison Of The Effector Functions Of Human Immunoglobulins Using A Matched Set Of Chimeric Antibodies" J. Exp. Med 166: 1351-1361に記載されているような、そのヒンジ及び/又はFc領域のアミノ酸配列の違いにより、血清半減期、補体結合、FcR結合親和性及びエフェクタ機能活性（例えばADCC、CDC等）を含む様々な物理的及び機能的特性を呈する。このタイプの変異型Fc領域を、単独で、又はアミノ酸修飾と組み合わせて使用して、Fc仲介型エフェクタ機能及び/又は結合活性に影響を及ぼすことができる。組み合わせにおいて、アミノ酸修飾及びIgGヒンジ/Fc領域は、同様の機能性（例えばFcRIIAに対する親和性の上昇）を示すことができ、また相加的に、又はより好ましくは相乗的に作用して、野生型Fc領域を含む本発明の分子と比べて、本発明の分子のエフェクタ機能性を修飾できる。他の実施形態では、アミノ酸修飾及びIgGFc領域は反対の機能性（例えばそれぞれFcRIIAに対する親和性の上昇及び低下）を示すことができ、また、同一のアイソタイプの、Fc領域を含まない又は野生型Fc領域を含む本発明の分子と比べて、本発明の分子の特異的機能性を選択的に調節又は低下させるよう作用できる。

20

30

【0213】

好ましい具体的実施形態では、上記分子は、変異型Fc領域を含み、上記変異型Fc領域は、野生型Fc領域に対する少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、これにより、上記変異体Fc領域が、Sondermann, P. et al. (2000) "The 3.2-A Crystal Structure Of The Human IgG1 Fc Fragment-Fc GammaRIII Complex," dAmz 406:267-273に開示されているもののようなFc-FcR相互作用の結晶学的及び構造的分析に基づいて、FcRと直接接触する位置において置換を有しない場合に、上記分子のFcRに対する親和性が変化する。FcRと直接接触するFc領域の位置の例は、アミノ酸残基234-239（ヒンジ領域）、アミノ酸残基265-269（B/Cループ）、アミノ酸残基297-299（C'/Eループ）及びアミノ酸残基327-332（F/Gループ）である。いくつかの実施形態では、本発明の分子は、構造的及び結晶学的分析に基づいてFcRと直接接触しない、例えばFc-FcR結合部位内にない、少なくとも1つの残基の修飾を

40

50

含む、変異型 Fc 領域を含む。

【0214】

変異型 Fc 領域は当該技術分野において公知であり、例えば NK 依存性又はマクロファージ依存性アッセイにおいて機能的にアッセイされるような、Fc 領域（又はその一部）を含む本発明の分子が呈するエフェクタ機能を付与又は改変するために、いずれの公知の Fc 変異体を本発明において使用してよい。例えば、変化したエフェクタ機能として識別される Fc 領域変異体は、抗体操作技術の分野において開示されており、上記分野において開示されているいずれの好適な変異体を、本発明の分子において使用してよい。

【0215】

特定の実施形態では、上記分子は、1つ又は複数の領域において1つ又は複数のアミノ酸修飾を有する変異型 Fc 領域を含み、上記1つ又は複数の修飾は、変異型 Fc 領域の、阻害型 Fc R (Fc R I I B 等) に対する親和性に対する活性化 Fc R (Fc R I I A 又は Fc R I I I A 等) に対する親和性の比率を、(野生型 Fc 領域に対して) 変化させる：

【数1】

$$\text{親和性の比率} = \frac{\text{野生型から変異型への、Fc}\gamma\text{R}_{\text{活性化}}\text{に対する親和性の変化}}{\text{野生型から変異型への、Fc}\gamma\text{R}_{\text{阻害}}\text{に対する親和性の変化}}$$

10

20

【0216】

ある Fc 変異体の親和性の比率が1を超える場合、本発明の方法は、例えば癌又は感染症といった、Fc R が仲介するエフェクタ細胞機能（例えば ADC C）の効率の増強が望まれる疾患、障害、若しくは感染の治療的若しくは予防的処置、又はその症状の寛解を提供するにあたって特定の用途を有する。ある Fc 変異体の親和性の比率が1未満である場合、本発明の方法は、例えば自己免疫障害又は炎症性障害といった、Fc R が仲介するエフェクタ細胞機能の効率の低下が望まれる疾患、若しくは障害の治療的若しくは予防的処置、又はその症状の寛解を提供するにあたって特定の用途を有する。表3は、例示的な単一、二重、三重、四重及び五重突然変異を、その親和性の比率が1を超えるか1未満であるかによって列挙しており、これらの突然変異に関する更なる情報は、抗体操作技術の分野において見ることができる。

30

【0217】

【表 3】

表 3 親和性の比率によって列挙した、例示的な単一及び多重突然変異				
単一	二重	三重	四重	五重
親和性の比率> 1				
F243L	F243L & R292P	F243L, P247L & N421K	L234F、F243L、R292P & Y300L	L235V, F243L, R292P, Y300L & P396L
D270E	F243L & Y300L	F243L, R292P & Y300L	L235I、F243L、R292P & Y300L	L235P, F243L, R292P, Y300L & P396L
R292G	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I	L235Q、F243L、R292P & Y300L	F243L, R292P, V305I, Y300L & P396L
R292P	D270E & P396L	F243L, R292P & P396L	F243L、P247L、D270E & N421K	
	R292P & Y300L	F243L, Y300L & P396L	F243L、R255L、D270E & P396L	
	R292P & V305I	P247L, D270E & N421K	F243L、D270E、G316D & R416G	
	R292P & P396L	R255L, D270E & P396L	F243L、D270E、K392T & P396L	
	Y300L & P396L	D270E、G316D & R416G	F243L、D270E、P396L & Q419H	
	P396L & Q419H	D270E, K392T & P396L	F243L、R292P、Y300L、& P396L	
		D270E, P396L & Q419H	F243L、R292P、V305I & P396L	
		V284M, R292L & K370N	P247L、D270E、Y300L & N421K	
		R292P, Y300L & P396L	R255L、D270E、R292G & P396L	
			R255L、D270E、Y300L & P396L	
			D270E、G316D、P396L & R416G	
親和性の比率< 1				
Y300L	F243L & P396L	F243L, R292P & V305I		
P396L	P247L & N421K			
	R255L & P396L			
	R292P & V305I			
	K392T & P396L			
	P396L & Q419H			

10

20

30

40

【0218】

ある具体的な実施形態では、変異型Fc領域において、235、240、241、243、244、247、262、263、269、298、328、又は330位のうちのいずれにおけるいずれのアミノ酸修飾（例えば置換）、及び好ましくは以下の残基：A240、I240、L241、L243、H244、N298、I328又はV330のう

50

ちの1つ又は複数。異なる具体的な実施形態では、変異型Fc領域において、268、269、270、272、276、278、283、285、286、289、292、293、301、303、305、307、309、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438又は439位のうちのいずれにおけるいずれのアミノ酸修飾（例えば置換）、好ましくは以下の残基：H280、Q280、Y280、G290、S290、T290、Y290、N294、K295、P296、D298、N298、P298、V298、I300又はL300。

【0219】

ある好ましい実施形態では、変化した親和性でFc Rに結合する変異型Fc領域において、255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、309、312、320、322、326、329、330、332、331、333、334、335、337、338、339、340、359、360、373、376、416、419、430、434、435、437、438又は439位のうちのいずれにおけるいずれのアミノ酸修飾（例えば置換）。好ましくは、上記変異型Fc領域は、以下の残基のうちのいずれか1つを有する：A256、N268、Q272、D286、Q286、S286、A290、S290、A298、M301、A312、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、N326、S326、K330、T339、A333、A334、E334、H334、L334、M334、Q334、V334、K335、Q335、A359、A360又はA430。

10

20

【0220】

異なる実施形態では、低下した親和性で（そのFc領域を介して）Fc Rに結合する変異型Fc領域において、252、254、265、268、269、270、278、289、292、293、294、295、296、298、300、301、303、322、324、327、329、333、335、338、340、373、376、382、388、389、414、416、419、434、435、437、438、又は439位のうちのいずれにおけるいずれのアミノ酸修飾（例えば置換）。

30

【0221】

異なる実施形態では、増強された親和性で（そのFc領域を介して）Fc Rに結合する変異型Fc領域において、280、283、285、286、290、294、295、298、300、301、305、307、309、312、315、331、333、334、337、340、360、378、398、又は430位のうちのいずれにおけるいずれのアミノ酸修飾（例えば置換）。異なる実施形態では、増強された親和性でFc R I I Aに結合する変異型Fc領域において、以下の残基のうちのいずれか1つ：A255、A256、A258、A267、A268、N268、A272、Q272、A276、A280、A283、A285、A286、D286、Q286、S286、A290、S290、M301、E320、M320、Q320、R320、E322、A326、D326、E326、S326、K330、A331、Q335、A337又はA430。

40

【0222】

好ましい変異体は、228、230、231、232、233、234、235、239、240、241、243、244、245、247、262、263、264、265、266、271、273、275、281、284、291、296、297、298、299、302、304、305、313、323、325、326、328、330又は332位のうちのいずれにおける1つ又は複数の修飾を含む。

【0223】

特に好ましい変異体は、群A～A Iから選択された1つ又は複数の修飾を含む：

【0224】

50

【表 4】

A	228E、228K、228Y 又は 228G;
B	230A、230E、230Y 又は 230G;
C	231E、231K、231Y、231P 又は 231G;
D	232E、232K、232Y、232G;
E	233D;
F	234I 又は 234F;
G	235D、235Q、235P、235I 又は 235V;
H	239D、239E、239N 又は 239Q;
I	240A、240I、240M 又は 240T;
J	243R、243、243Y、243L、243Q、243W、243H 又は 243I;
K	244H;
L	245A;
M	247G、247V 又は 247L;
N	262A、262E、262I、262T、262E 又は 262F;
O	263A、263I、263M 又は 263T;
P	264F、264E、264R、264I、264A、264T 又は 264W;
Q	265F、265Y、265H、265I、265L、265T、265V、265N 又は 265Q;
R	266A、266I、266M 又は 266T;
S	271D、271E、271N、271Q、271K、271R、271S、271T、271H、271A、271V、 271L、271I、271F、271M、271Y、271W 又は 271G;
T	273I;
U	275L 又は 275W;
V	281D、281K、281Y 又は 281P;
W	284E、284N、284T、284L、284Y 又は 284M;
X	291D、291E、291Q、291T、291H、291I 又は 291G;
Y	299A、299D、299E、299F、299G、299H、299I、299K、299L、299M、299N、 299P、299Q、299R、299S、299V、299W 又は 299Y;
Z	302I;
AA	304D、304N、304T、304H 又は 304L
AB	305I;
AC	313F;
AD	323I;
AE	325A、325D、325E、325G、325H、325I、325L、325K、325R、325S、325F、 325M、325T、325V、325Y、325W 又は 325P;
AF	328D、328Q、328K、328R、328S、328T、328V、328I、328Y、328W、328P、 328G、328A、328E、328F、328H、328M 又は 328N;
AG	330L、330Y、330I 又は 330V;
AH	332A、332D、332E、332H、332N、332Q、332T、332K、332R、332S、332V、 332L、332F、332M、332W、332P、332G 又は 332Y; 及び
AI	336E、336K 又は 336Y

10

20

30

40

【 0 2 2 5 】

更に特に好ましい変異体は、群 1 ~ 1 0 5 から選択された 1 つ又は複数の修飾を含む：

【 0 2 2 6 】

【表 5】

群	変異型	群	変異型
1	A330L / I332E	54	S239D / D265L / N297D / I332E
2	D265F / N297E / I332E	55	S239D / D265T / N297D / I332E
3	D265Y / N297D / I332E	56	S239D / D265V / N297D / I332E
4	D265Y / N297D / T299L / I332E	57	S239D / D265Y / N297D / I332E
5	F241E / F243Q / V262T / V264F	58	S239D / I332D
6	F241E / F243Q / V262T / V264E / I332E	59	S239D / I332E
7	F241E / F243R / V262E / V264R	60	S239D / I332E / A330I
8	F241E / F243R / V262E / V264R / I332E	61	S239D / I332N
9	F241E / F243Y / V262T / V264R	62	S239D / I332Q
10	F241E / F243Y / V262T / V264R / I332E	63	S239D / N297D / I332E
11	F241L / F243L / V262I / V264I	64	S239D / N297D / I332E / A330Y
12	F241L / V262I	65	S239D / N297D / I332E / A330Y / F241S / F243H / V262T / V264T
13	F241R / F243Q / V262T / V264R	66	S239D / N297D / I332E / K326E
14	F241R / F243Q / V262T / V264R / I332E	67	S239D / N297D / I332E / L235D
15	F241W / F243W / V262A / V264A	68	S239D / S298A / I332E
16	F241Y / F243Y / V262T / V264T	69	S239D / V264I / A330L / I332E
17	F241Y / F243Y / V262T / V264T / N297D / I332E	70	S239D / V264I / I332E
18	F243L / V262I / V264W	71	S239D / V264I / S298A / I332E
19	P243L / V264I	72	S239E / D265N
20	L328D / I332E	73	S239E / D265Q
21	L328E / I332E	74	S239E / I332D
22	L328H / I332E	75	S239E / I332E
23	L328I / I332E	76	S239E / I332N
24	L328M / I332E	77	S239E / I332Q
25	L328N / I332E	78	S239E / N297D / I332E
26	L328Q / I332E	79	S239E / V264I / A330Y / I332 E
27	L328T / I332E	80	S239E / V264I / I332 E
28	L328V / I332E	81	S239E / V264I / S298A / A330Y / I332E

10

20

30

40

29	N297D / A330Y / I332E	82	S239N / A330L / I332E
30	N297D / I332E	83	S239N / A330Y / I332E
31	N297D / I332E / S239D / A330L	84	S239N / I332D
32	N297D / S298A / A330Y / I332E	85	S239N / I332E
33	N297D / T299L / I332E	86	S239N / I332N
34	N297D / T299F / I332E / N297D / T299H / I332E	87	S239N / I332Q
35	N297D / T299I / I332E	88	S239N1S298A / I332E
36	N297D / T299L / I332E	89	S239Q / I332D
37	N297D / T299V / I332E	90	S239Q / I332E
38	N297E / I332E	91	S239Q / I332N
39	N297S / I332E	92	S239Q / I332Q
40	P230A / E233D / I332E	93	S239Q / V264I / I332E
41	P244H / P245A / P247V	94	S298A / I332E
42	S239D / A330L / I332E	95	V264E / N297D / I332E
43	S239D / A330Y / I332E	96	V264I / A330L / I332E
44	S239D / A330Y / I332E / K326E	97	V264I / A330Y / I332E
45	S239D / A330Y / I332E / K326T	98	V264I / I332E
46	S239D / A330Y / I332E / L234I	99	V264I / S298A / I332E
47	S239D / A330Y / I332E / L235D	100	Y296D / N297D / I332E
48	S239D / A330Y / I332E / V240I	101	Y296E / N297D / I332E
49	S239D / A330Y / I332E / V264T	102	Y296H / N297D / I332E
50	S239D / A330Y / I332E / V266I	103	Y296N / N297D / I332E
51	S239D / D265F / N297D / I332E	104	Y296Q / N297I / I332E
52	S239D / D265H / N297D / I332E	105	Y296T / N297D / I332E
53	S239D / D265I / N297D / I332E		

10

20

30

【 0 2 2 7 】

一実施形態では、HER2/neuに特異的に結合する分子（例えば抗HER2/neu抗体）、及び/又はPD-1に特異的に結合する分子（例えば抗PD-1抗体）は、Fc領域に少なくとも1つの修飾を有する変異型Fc領域を含む。一実施形態では、HER2/neuに特異的に結合する分子（例えば抗HER2/neu抗体）は、野生型Fc領域を含む同一の抗体に対して、FcRIIAへの結合を増強する、及び/又はADCC活性を増強する少なくとも1つの修飾を有する、変異型Fc領域を含む。特定の実施形態では、上記変異型Fcドメインは、L235V、F243L、R292P、Y300L、V305I、及びP396Lからなる群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで上記番号付与は、Kabatにおいてと同様のEUインデックスの番号付与である。

40

【 0 2 2 8 】

ある具体的実施形態では、変異型Fc領域は以下を含む：

(A) F243L、R292P、Y300L、V305I、及びP396Lからなる群から選択される、少なくとも1つの置換；

(B) (1) F243L及びP396L；

50

(2) F 2 4 3 L 及び R 2 9 2 P ; 並びに

(3) R 2 9 2 P 及び V 3 0 5 I ;

からなる群から選択される、少なくとも2つの置換 ;

(C) (1) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び Y 3 0 0 L ;

(2) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び V 3 0 5 I ;

(3) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P 及び P 3 9 6 L ; 並びに

(4) R 2 9 2 P、V 3 0 5 I 及び P 3 9 6 L ;

からなる群から選択される、少なくとも3つの置換 ;

(D) (1) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L ; 並びに

(2) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、V 3 0 5 I 及び P 3 9 6 L ;

からなる群から選択される、少なくとも4つの置換 ; 又は

(E) (1) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 I 及び P 3 9 6 L ; 並びに

に

(2) L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L 及び P 3 9 6 L

からなる群から選択される、少なくとも5つの置換。

【0229】

別の具体的実施形態では、変異型 F c 領域は、以下の置換を含む :

(A) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、及び Y 3 0 0 L ;

(B) L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、及び P 3 9 6 L ; 又は

(C) F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、V 3 0 5 I、及び P 3 9 6 L。

【0230】

一実施形態では、PD - 1 に特異的に結合する分子 (例えば抗 PD - 1 抗体) は、野生型 F c 領域を含む同一の抗体に対して、F c R I I I A (C D 1 6 A) への結合を増強する、及び / 又は A D C C 活性を増強する少なくとも1つの修飾を有する、変異型 F c 領域を含む。特定の実施形態では、上記変異型 F c 領域は、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、D 2 6 5 A、N 2 9 7 Q 及び N 2 9 7 G からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含み、ここで上記番号付与は、Kabatにおいてと同様の E U インデックスの番号付与である。ある具体的な実施形態では、上記変異型 F c 領域は、L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A の置換を含む。

【0231】

あるいは、(野生型 I g G 1 F c 領域 (配列番号 1) が示す結合に対して)、F c R I I I A (C D 1 6 A) への結合が本質的に低下した (若しくは結合しない) 及び / 又はエフェクタ機能が低下した、F c 領域を利用する。ある具体的な実施形態では、H E R 2 / n e u に特異的に結合する分子 (例えば抗 H E R 2 / n e u 抗体)、及び / 又は P D - 1 に特異的に結合する分子 (例えば抗 P D - 1 抗体) は、I g G 2 F c 領域 (配列番号 5 0) 又は I g G 4 F c 領域 (配列番号 5 2) を含み、任意に C 末端アミノ酸残基を有しない。I g G 4 F c 領域を利用する場合、本発明はまた、鎖交換の発生を低減するために、Kabatに記載されているように E U インデックスによって番号付与された S 2 2 8 P 等の安定化突然変異の導入も包含する (Lu et al., (2008) "The Effect Of A Point Mutation On The Stability Of Igg4 As Monitored By Analytical Ultracentrifugation," J. Pharmaceutical Sciences 97:960-969)。当該技術分野において公知である他の安定化突然変異を、I g G 4 F c 領域に導入してよい (Peters, P et al., (2012) "Engineering an Improved IgG4 Molecule with Reduced Disulfide Bond Heterogeneity and Increased Fab Domain Thermal Stability," J. Biol. Chem. 287:24525-24533 ; 国際公開第2008/145142号)。ある具体的な実施形態では PD - 1 に特異的に結合する分子 (例えば抗 PD - 1 抗体) は、I g G 4 F c 領域及び S 2 2 8 P 突然変異を含む。

【0232】

他の実施形態では、本発明は : Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγR: Current Models," Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function,"

10

20

30

40

50

Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement," J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On Human IgG1 For Fc Gamma R1, Fc Gamma R1I, Fc Gamma R1II, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R," J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) "Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc," J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4," J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. et al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. et al. (1999) "Recombinant human IgG Molecules Lacking Fc gamma Receptor I Binding And Monocyte Triggering Activities," Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions," Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. et al. (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains," J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors," FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo," Transplantation 57:1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11," Mol. Immunol. 29:53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma R1 And Fc Gamma R1I Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG," J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG," Nature 332:563-564; 米国特許第 5, 6 2 4 , 8 2 1 号 ; 5 , 8 8 5 , 5 7 3 号 ; 6 , 1 9 4 , 5 5 1 号 ; 7 , 2 7 6 , 5 8 6 号 ; 7 , 3 1 7 , 0 9 1 号 ; 国際公開第 0 0 / 4 2 0 7 2 号及び国際公開 9 9 / 5 8 5 7 2 号に開示されているもの等の、当該技術分野において公知のいずれの F c 変異体の使用を包含する。いくつかの実施形態では、本発明の分子は更に、1つ又は複数のグリコシル化部位を含み、これにより、1つ又は複数の炭水化物部分が上記分子に共有結合する。好ましくは、1つ若しくは複数のグリコシル化部位及び/又は F c 領域の1つ若しくは複数の修飾を有する本発明の分子は、未修飾抗体に比べて増強された抗体媒介性エフェクタ機能、例えば増強された A D C C 活性を与える、又は有する。いくつかの実施形態では、本発明は更に、2 4 1、2 4 3、2 4 4、2 4 5、2 4 5、2 4 9、2 5 6、2 5 8、2 6 0、2 6 2、2 6 4、2 6 5、2 9 6、2 9 9、及び 3 0 1 位のアミノ酸を含むがこれらに限定されない、F c 領域の炭水化物部分と直接的又は間接的に相互作用することが知られているアミノ酸の1つ又は複数の修飾を含む分子を含む。F c 領域の炭水化物部分と直接的又は間接的に相互作用するアミノ酸は、当該技術分野において公知であり、例えば Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation," Immunol. Lett. 44:111-17を参照されたい。

【 0 2 3 3 】

別の実施形態では、本発明は、好ましくは当該分子の機能性、例えば標的分子又は F c R への結合活性を変化させることなく、1つ又は複数のグリコシル化部位を、当該分子の1つ又は複数の部位に導入することによって修飾された、分子を包含する。グリコシル

化部位は、本発明の分子の可変及び / 又は定常領域に導入してよい。

【 0 2 3 4 】

いくつかの実施形態では、本発明は、グリコシル化部位を追加又は欠失することによって、本発明の分子の炭水化物含量を改変する方法を包含する。抗体（及び抗体ドメイン、例えばFc領域を含む分子）の炭水化物含量を改変する方法は、当該技術分野において公知であり、本発明に包含される。例えば米国特許第6,218,149号；欧州特許第0359096B1号；米国特許出願第2002/0028486号；国際公開第03/035835号；米国公開特許第2003/0115614号；米国特許第6,218,149号；米国特許第6,472,511号（これらの全体は参照によって本出願に援用される）を参照されたい。他の実施形態では、本発明は、当該分子の1つ又は複数の内因性炭水化物部分を欠失することによって、本発明の分子の炭水化物含量を改変する方法を包含する。ある具体的実施形態では、本発明は、297位に隣接する位置を修飾することによって、抗体のFc領域のグリコシル化部位をシフトするステップを包含する。ある具体的実施形態では、本発明は296位を修飾することによって、297位ではなく296位をグリコシル化するステップを包含する。

10

【 0 2 3 5 】

エフェクタ機能は、抗体操作技術の分野で説明されている技法によって、又は他の手段によって、就職できる。例えば、Fc領域に1つ又は複数のシステイン残基を導入することによって、この領域における鎖間ジスルフィド結合を可能とし、その結果として吸収能力が改善され得る、並びに / 又は補体仲介型細胞殺滅及びADCCが増大し得るホモ二量体抗体を生成することにより、修飾できる。Caron, P.C. et al. (1992) "Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies J. Exp. Med. 176: 1191-1195; Shopes, B. (1992) "A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity," J. Immunol. 148(9):2918-2922を参照されたい。抗腫瘍活性が増強されたホモ二量体抗体はまた、Wolff, E.A. et al. (1993) "Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice," Cancer Research 53:2560-2565に記載されているようなヘテロ二機能性クロスリンカーを用いて調製できる。あるいは、二重Fcドメインを有し、それによって補体溶解及びADCC能力が増強され得る抗体を加工できる (Stevenson, G.T. et al. (1989) "A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge " Anti-Cancer Drug Design 3:219-230)。

20

30

【 0 2 3 6 】

E. ポリペプチドコンジュゲート

本発明の分子を、異種ポリペプチド又はその一部と組み換え的に融合するか又は化学的にコンジュゲート（共有結合及び非共有結合コンジュゲートの両方を含む）して、融合タンパク質を形成してよい。好ましくは、本発明の分子（特に抗体）は、異種ポリペプチドの少なくとも10、少なくとも15、少なくとも20、少なくとも25、少なくとも30、少なくとも40、少なくとも50、少なくとも60、少なくとも70、少なくとも80、少なくとも90、又は少なくとも100個のアミノ酸と融合して、所望の融合タンパク質を生成する。この融合は必ずしも直接でなくてよいが、リンカー配列を通して発生してよい。上記分子（例えば抗体及びポリペプチド）は、治療剤とコンジュゲートして、所与の成体応答を修正する、上記治療剤の血清半減期に影響を及ぼす（例えばこれを増大させる）、又は上記治療剤を特定の細胞のサブセットに標的化することができる。上記分子はまた、マーカー配列（例えばヘキサヒスチジンペプチド又は「フラグ (flag)」タグ）と融合して、精製を促進することもできる。このような治療用部分を抗体とコンジュゲートする技法は公知であり、例えばHellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd ed., Robinson et al. (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.)を参照されたい。

40

【 0 2 3 7 】

追加の融合タンパク質を、遺伝子シャッフリング、モチーフシャッフリング、エクソン

50

シャッフリング、及び/又はコドンシャッフリング(まとめて「DNAシャッフリング(DNA shuffling)」と呼ばれる)の技法によって生成できる。DNAシャッフリングは、本発明の分子(例えば親和性が高く分解速度が低い抗体)の活性を変化させるために採用してよい。本発明の分子又はこれがエンコードする核酸は更に、エラープロードンPCRによるランダムな突然変異誘発、ランダムなヌクレオチド挿入、又は他の方法を、組み換え前に受けることによって、更に変化させることができる。本発明の分子をエンコードするポリヌクレオチドの1つ又は複数の部分は、1つ又は複数の異種分子の1つ又は複数の成分、モチーフ、セクション、部分、ドメイン、断片等と組み換えてよい。

【0238】

F. ダイアボディ及びDART(登録商標)ダイアボディ

ダイアボディ及び二重親和性再標的化試薬(特にDART(登録商標)ダイアボディ(MacroGenics, Inc.))もまた、本発明によって提供される。従って本発明は更に、少なくとも2つの共有結合したポリペプチド鎖を含むダイアボディ(特にDART(登録商標)ダイアボディ)分子を包含し、上記ポリペプチド鎖は、少なくとも2つのエピトープ結合部位を形成し、上記エピトープ結合部位のうち的一方はHER2/neuに特異的に結合し、もう一方は、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体(又はそのリガンド)に結合する。好ましくは、このようなダイアボディは、HER2/neu及びPD-1に結合することになる。特に、本発明の抗HER2/neu抗体及び抗PD-1抗体からの抗原結合ドメインを含むダイアボディ及びDARTが包含される。

【0239】

ホモ二量体ダイアボディ及び安定した共有結合ヘテロ二量体非単一特異性ダイアボディの設計及び構成は、例えば米国公開特許第2013-0295121号;米国公開特許第2010-0174053号;及び米国公開特許第2009-0060910号;欧州公開特許第2714079号;欧州公開特許第2601216号;欧州公開特許第2376109号;欧州公開特許第2158221号;及び国際公開第2012/162068号;国際公開第2012/018687号;国際公開第2010/080538号;国際公開第2008/157379号;国際公開第2006/113665号;並びにSloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Re-targeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells," *PLoS Pathog.* 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Hussaini, M. et al. (2015) "Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART(R)) Platform," *Blood* 127(1):122-131; Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates," *Sci. Transl. Med.* 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," *Blood* 117(17):4542-4551; Veri, M.C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcgamma Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," *Arthritis Rheum.* 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion," *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449; Marvin, J.S. et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies," *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658; Olafsen, T. et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Holliger, P. et al. (1993) "'Diabodies': Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 90:6444-6448に記載されている。ダイアボディ分子の各ポリペプチド鎖は、同一の又は異なる抗体からのV_L領域及びV_H領域を含み、これらは、これらのドメインが自己集合に制約がかかるように、共有結合する。上記ポリペプチド鎖のうちの2

10

20

30

40

50

つの相互作用は、2つの $V_L - V_H$ ペアを生成し、これは2つのエピトープ結合部位、即ち2価分子を形成する。上記ドメインは、ペプチドリンカーによって隔てられていてよく、上記ポリペプチド鎖を、各鎖に少なくとも1つのシステイン残基を含むように操作してよく、これにより、鎖間ジスルフィド結合を形成して、上記ダイアボディを安定化できる。

【0240】

好ましい実施形態では、上記ダイアボディの第1のポリペプチド鎖は：

(i) HER2/neuのエピトープに対して特異的な、第1の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン(VL1)の結合領域を含むドメイン(A)；

(ii) PD-1のエピトープに対して特異的な、第2の免疫グロブリンの重鎖可変ドメイン(VH2)の結合領域を含むドメイン(B)；及び

(iii) 任意に、ドメイン(C)

を含む。このようなダイアボディの第2のポリペプチド鎖は：

(i) 上述のようなPD-1のエピトープに対して特異的な、第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン(VL2)の結合領域を含むドメイン(D)；

(ii) 上述のようなHER2/neuのエピトープに対して特異的な、第1の免疫グロブリンの重鎖可変ドメイン(VH1)の結合領域を含むドメイン(E)；及び

(iii) 任意に、ドメイン(F)

を含む。

【0241】

ダイアボディドメイン(A)及び(B)は、互いに連結してエピトープ結合部位を形成しない。同様に、ダイアボディドメイン(D)及び(E)は、互いに連結してエピトープ結合部位を形成しない。その代わりに、ダイアボディドメイン(A)及び(E)が連結して、HER2/neuエピトープに結合する結合部位を形成し、ダイアボディドメイン(B)及び(D)が連結して、PD-1エピトープに結合する結合部位を形成する。

【0242】

第1及び第2のポリペプチド鎖の可変ドメインは互いに反転してよく、これにより、ダイアボディの第1のポリペプチド鎖は：

(i) PD-1のエピトープに対して特異的な、第2の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン(VL2)の結合領域を含むドメイン(A)；

(ii) HER2/neuのエピトープに対して特異的な、第1の免疫グロブリンの重鎖可変ドメイン(VH1)の結合領域を含むドメイン(B)；及び

(iii) 任意に、ドメイン(C)；

を含み、またこのようなダイアボディの第2のポリペプチド鎖は：

(i) HER2/neuのエピトープに対して特異的な、第1の免疫グロブリンの軽鎖可変ドメイン(VL1)の結合領域を含むドメイン(D)；

(ii) PD-1のエピトープに対して特異的な、第2の免疫グロブリンの重鎖可変ドメイン(VH2)の結合領域を含むドメイン(E)；及び

(iii) 任意に、ドメイン(F)。

を含む。

【0243】

この反転構成では、ダイアボディドメイン(A)及び(E)が連結して、PD-1エピトープに結合する結合部位を形成し、ダイアボディドメイン(B)及び(D)が連結して、HER2/neuエピトープに結合する結合部位を形成する。

【0244】

ドメイン(C)及び(F)が存在する場合、これらは互いに共有結合している。ドメイン(C)及び(F)は、第1及び第2のポリペプチド鎖の相互作用を促進する、ヘテロ二量体促進ドメインを含んでよい。ダイアボディの産生において有用なヘテロ二量体化ドメインは例えば、国際公開第2012/162068号；国際公開第2012/018687号；国際公開第2010/080538号；国際公開第2008/157379号；及び国際公開第2006/113665号に記載されており、これらの文献はそれぞれ参照

10

20

30

40

50

により本出願に援用される。ドメイン(C)及び(F)は、Fcドメイン又はその一部分(例えばCH2ドメイン若しくはCH3ドメイン)であってよい。Fcドメイン又はその一部分は、IgA、IgD、IgG、IgE及びIgMを含むがこれらに限定されない、いずれの免疫グロブリンアイソタイプ又はアロタイプに由来するものであってよい。好ましい実施形態では、Fcドメイン(又はその一部分)は、IgGに由来する。特定の実施形態では、IgGアイソタイプはIgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4又はそのアロタイプである。一実施形態では、ダイアボディ分子はFcドメインを含み、このFcドメインは、いずれの免疫グロブリンアイソタイプから独立して選択されたCH2ドメイン及びCH3ドメインを含む(即ち、IgGに由来するCH2ドメイン及びIgEに由来するCH3ドメイン、又はIgG1に由来するCH2ドメイン及びIgG2に由来するCH3ドメイン等を含むFcドメイン)。上記Fcドメインは、本発明のダイアボディ分子を含むポリペプチド鎖に、上記ポリペプチド鎖の他のドメイン又は部分に対していずれの位置において組み込むことができる(例えば上記Fcドメイン又はその一部分は、鎖のポリペプチドのVL及びVHドメインに対するC末端であってよく、又はVL及びVHドメイン両方に対するN末端であってよく、又は一方のドメインに対するN末端及び他方のドメインに対するC末端(即ちポリペプチド鎖の2つのドメインの間)等であってよい)。

10

20

30

40

50

【0245】

ダイアボディ分子のポリペプチド鎖のFcドメインは、優先的に二量体化し、これは免疫グロブリン様特性、例えばFc-Fc R相互作用を呈するダイアボディ分子の形成につながる。ダイアボディを構成するFcドメインは、例えばそれぞれがVHドメイン、VLドメイン及びFcドメインを含む2つのポリペプチド鎖からなる、二量体であってよい。上記ポリペプチド鎖の二量体化により、非修飾2価抗体の構造とは異なっているにも関わらず、Fcドメインを含む2価ダイアボディが得られる。このようなダイアボディ分子は、野生型免疫グロブリンに対して変化した表現型、例えば変化した血清半減期、結合特性等を呈することになる。他の実施形態では、Fcドメインを構成するダイアボディ分子は四量体であってよい。このような四量体は、2つの「比較的重い」ポリペプチド鎖、即ちVL、VH及びFcドメインを含むポリペプチド鎖と、2つの「比較的軽い」ポリペプチド鎖、即ちVL及びVHを含むポリペプチド鎖とを含む。上記比較的軽い鎖及び比較的重い鎖は、相互作用して単量体を形成し、上記単量体は、それ自体の、ペアになっていないドメインを介して相互作用して、Ig様分子を形成する。このようなIg様ダイアボディは4価である。

【0246】

上述のような四重特異性ダイアボディ分子の形成は、4つの異なるポリペプチド鎖の相互作用を必要とする。このような相互作用は潜在的に発生し得る鎖の誤ったペアリングの様々な変形例により、単一細胞組み換え産生系内で効率的に達成するのが困難である。誤ったペアリングの蓋然性を低減する1つの解決策は、「ノブ・イントゥ・ホール」タイプの突然変異を所望のポリペプチド鎖ペアに組み込むことである。このような突然変異は、ホモ二量体化を抑えてヘテロ二量体化を促進する。例えばFc-Fc間相互作用に関して、CH2又はCH3ドメインにアミノ酸置換(好ましくは「ノブ(knob)」を形成する嵩高な側鎖基、例えばトリプトファンを含むアミノ酸による置換)を導入して、立体障害により、同様に突然変異させたドメインとの相互作用を防止し、上記変化させたドメインを、相補的な又は適応した突然変異(例えばグリシンによる置換)を施されたドメイン、即ち「ホール(hole)」とペアにすることができる。このような一連の変化は、上記ダイアボディ分子を構成するポリペプチドのいずれのペアに施すことができ、また更に、上記ペアのポリペプチド鎖のいずれの部分に施すことができる。ホモ二量体化を抑えてヘテロ二量体化を促進するためのタンパク質加工の方法は、特に免疫グロブリン様分子の加工に関して当該技術分野で公知であり、本明細書に包含される(例えばRidgway et al. (1996) " 'Knobs-Into-Holes' Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization," Protein Engr. 9:617-621; Atwell et al. (1997) " Stable

Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” J. Mol. Biol. 270: 26-35;及びXie et al. (2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis,” J. Immunol. Methods 296:95-101を参照（これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に援用される）。

【0247】

本発明はまた、変異型Fcドメイン又は変異型ヒンジFcドメイン（又はその一部分）を含むダイアボディ分子も包含し、上記変異型Fcドメインは、同等の野生型Fcドメイン又はヒンジFcドメイン（又はその一部分）に対する少なくとも1つのアミノ酸修飾（例えば置換、挿入、欠失）を含む。変異型Fc又は変異型ヒンジFcドメイン（又はその一部分）を含む分子（例えば抗体）は通常、野生型Fcドメイン又はヒンジFcドメイン又はその一部分を含む分子に対して変化した表現型を有する。この変異型表現型は、変化した血清半減期、変化した安定性、細胞酵素に対する変化した感受性、又はNK依存性若しくはマクロファージ依存性アッセイで測定されるような変化したエフェクタ機能として表現され得る。変化したエフェクタ機能として表されるFcドメイン修飾については、既に開示している。

10

【0248】

本発明はまた、ヒンジドメインを含む分子も包含する。このヒンジドメインは、IgA、IgD、IgG、IgE及びIgMを含むいずれの免疫グロブリンアイソタイプ又はアロタイプに由来するものであってよい。好ましい実施形態では、ヒンジドメインはIgGに由来し、上記IgGアイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3若しくはIgG4又はこれらのアロタイプである。Fcドメインと共にダイアボディ分子を構成するポリペプチド鎖に上記ヒンジドメインを組み込むことによって、上記ダイアボディ分子がヒンジFcドメインを含むようにしてよい。特定の実施形態では、上記ヒンジドメイン及びFcドメインは、当該技術分野において公知の、本明細書において例示されているいずれの免疫グロブリンアイソタイプから独立して選択される。他の実施形態では、上記ヒンジドメイン及びFcドメインは、ポリペプチド鎖の少なくとも1つの他のドメイン、例えばVLドメインによって分離される。ヒンジドメイン、又は任意にヒンジFcドメインを、本発明のポリペプチド鎖に、上記ポリペプチド鎖の他のドメイン又は部分に対していずれの位置において組み込んでよい。特定の実施形態では、本発明のポリペプチド鎖はヒンジドメインを含み、上記ヒンジドメインはポリペプチド鎖のC末端にあり、上記ポリペプチド鎖はFcドメインを含まない。更に他の実施形態では、本発明のポリペプチド鎖はヒンジFcドメインを含み、上記ヒンジFcドメインはポリペプチド鎖のC末端にある。更なる実施形態では、本発明のポリペプチド鎖はヒンジFcドメインを含み、上記ヒンジFcドメインはポリペプチド鎖のN末端にある。

20

30

【0249】

特定の作用機序によって束縛されることを意図するものではないが、本発明のダイアボディ分子は、当該技術分野において公知の治療用抗体に対して増強された治療有効性を示し、これは部分的には、ダイアボディの、特定の抗原を発現する標的細胞に特異的に結合する能力によるものであり、例えば上記ダイアボディの、ダイアボディ-エピトープ相互作用の改善された結合活性によって標的細胞上により長く留まることができる能力によるものである。従って本発明のダイアボディは、標的細胞集団中で標的抗原が低レベルで発現される部分集団における、癌等の疾患又は障害の治療、予防又は管理において特定の有用性を有する。

40

【0250】

上記ダイアボディ分子は、デノボタンパク質合成、及び結合タンパク質をエンコードする核酸の組み換え発現を含む、様々な方法を用いて産生できる。所望の核酸配列は、組み換え方法（例えば所望のポリヌクレオチドの、早期に調製された変異型のPCR突然変異誘発）によって、又は固相DNA合成によって産生できる。好ましくは、組み換え発現方法を使用する。遺伝子コードの縮重により、多様な核酸配列がそれぞれ免疫グロブリンア

50

ミノ酸配列をエンコードし、本発明は、本明細書中二記載の結合タンパク質をエンコードする全ての核酸を含む。

【0251】

G. 抗体の産生

本発明の好ましい実施形態の抗体は、多様な方法のうちのいずれで産生又は取得できる。例えばこのような抗体は、血漿から、合成によって、組み換えによって、又は遺伝子導入によって、細胞（例えばハイブリドーマ培養物）を介して等の方法で得ることができる。合成タンパク質の産生は例えば、Dawson, P.E. et al. (2000) "Synthesis Of Native Proteins By Chemical Ligation," *Annu. Rev Biochem.* 69:923-960; Wilken, J. et al. (1998) "Chemical Protein Synthesis," *Curr. Opin. Biotechnol.* 9(4):412-426; and Kochendoerfer, G.G. et al. (1999) "Chemical Protein Synthesis," *Curr. Opin. Chem. Biol.* 3(6):665-671に記載されている。

10

【0252】

抗体は、まず宿主動物から作製された抗体を単離し、遺伝子配列を取得し、上記遺伝子配列を使用して宿主細胞（例えばCHO細胞）内で抗体を組み換え発現させることによって作製できる。関心対象のポリヌクレオチドを含有するベクターは：電気穿孔；塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、DEAE-デキストラン又は他の物質を使用したトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；及び感染（例えばベクターがワクシニアウイルス等の感染性因子である場合）を含む多数の適切な手段のうちのいずれによって、宿主細胞に導入できる。ベクター又はポリヌクレオチドの導入の選択は、宿主細胞の特徴に左右される場合が多い。

20

【0253】

関心対象の抗体、ポリペプチド、又はタンパク質をエンコードする遺伝子を単離する目的で、異種DNAを過剰発現できるいずれの宿主細胞を使用できる。好適な哺乳類宿主細胞の非限定的な例としては、COS、HeLa及びCHO細胞が挙げられるが、これらに限定されない。好ましくは、宿主細胞は、対応する関心対象の内因性抗体又はタンパク質（これらが宿主細胞中に存在する場合）より5倍高い、より好ましくは10倍高い、更に好ましくは20倍高いレベルのcDNAを発現する。HER2/neu又はPD-1への特異的結合に関する宿主細胞のスクリーニングは好ましくは、イムノアッセイ又はFACSによって実行される。細胞（例えばハイブリドーマ）培養物による抗体の産生は、例えばLaffly, E. et al. (2005) "Monoclonal And Recombinant Antibodies, 30 Years After...", *Hum. Antibodies.* 14(1-2):33-55; Aldington, S. et al. (2007) "Scale-Up Of Monoclonal Antibody Purification Processes," *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 848(1):64-78; S.S. Farid (2006) *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 848(1):8-18; Birch, J.R. et al. (2006) "Antibody Production," *Adv. Drug Deliv. Rev.* 58(5-6):671-685; Even, M.S. et al. (2006) "Serum-Free Hybridoma Culture: Ethical, Scientific And Safety Considerations," *Trends Biotechnol.* 24(3):105-108; Graumann, K. et al. (2006) "Manufacturing Of Recombinant Therapeutic Proteins In Microbial Systems," *Biotechnol. J.* 1(2):164-86; 米国特許第7,112,439号；並びに米国公開特許第20070037216号及び米国公開特許第20040197866号に記載されている。

30

40

【0254】

採用できる別の方法は、植物（例えばタバコ）又はトランスジェニックミルク中で抗体配列を発現させることである。植物又はミルク中で抗体を組み換え発現させるための好適な方法は、開示されている（例えばPeeters, K. et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," *Vaccine* 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," *Int. Rev. Immunol* 13:65-93; and Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," *J. Immunol Methods* 231 : 147-157を参照）。

【0255】

50

例えばヒト化、最適化、単鎖等の抗体の誘導体を作製するための好適な方法は、当該技術分野において公知である。例えばその抗原に対する親和性が増大した抗体の誘導体は、ファージディスプレイ法によって産生できる。親和性成熟とも呼ばれるこの技術は、突然変異誘発、又は同種抗原を用いたCDRウォーキング及び再選択を採用して、初期又は親抗体と比較した場合に抗原に対して高い親和性で結合する抗体を同定する（例えばGlaser, S.M. et al. (1992) "Antibody Engineering By Codon-Based Mutagenesis In A Filamentous Phage Vector System," J. Immunology 149:3903; Wu, H. et al. (1998) "Stepwise in vitro Affinity Maturation Of Vitaxin, An AlphaV Beta3-mAb," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 95:6037-6042; Yelton, D.E. et al. (1995) "Affinity Maturation Of The BR96 Anti-Carcinoma Antibody By Codon-Based Mutagenesis," J. Immunology 155:1994-2004; Schier, R et al. (1996) "Isolation Of Picomolar Affinity anti-c-erbB-2 Single-Chain Fv By Molecular Evolution Of The Complementarity Determining Regions In The Center Of The Antibody Binding Site," J. Mol. Biol. 263:551-567を参照）。

10

【0256】

内因性免疫グロブリン重鎖及び軽鎖遺伝子を発現できないものの、ヒト重鎖及び軽鎖遺伝子を発現できる、トランスジェニックマウスを用いて、完全な (fully) ヒト抗体 (完全な (completely) ヒト抗体とも呼ばれる) を産生できる。ヒト抗体を産生するためのこの技術の概観は、例えばLonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Int. Rev. Immunol. 13:65-93; 及び米国特許第5,633,425号に記載されている。完全なヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリ (Hoogenboom, H.R. et al. (1991) "By-Passing Immunisation. Human Antibodies From Synthetic Repertoires Of Germline V_H Gene Segments Rearranged In Vitro," J. Mol. Biol. 227:381 and Marks, J.D. et al. (1991) "By-Passing Immunization. Human Antibodies From V-Gene Libraries Displayed On Phage," J. Mol. Biol. 222:581に記載) 又は「誘導選択 (guided selection)」 (例えばJespers, L.S. et al. (1994) "Guiding The Selection Of Human Antibodies From Phage Display Repertoires To A Single Epitope Of An Antigen," Biotechnology 12:899-903に記載) を含む、当該技術分野において公知の他の技法を用いて産生できる。より望ましい (例えば完全なヒト抗体) 又はよりロバストな免疫応答を生成するために設計されたトランスジェニック動物も、ヒト化又はヒト抗体の生成に使用してよい。このような技術の例は、Xenomouse (商標) (Abgenix, Inc.、カリフォルニア州フレモント)、並びにHuMAb-Mouse (登録商標) 及びTC Mouse (商標) (共にMedarex, Inc.、ニュージャージー州プリンストン) である。

20

30

【0257】

本発明は、本明細書に記載の抗体 (即ち抗HER2/neu抗体及び抗PD-1抗体) に対する修飾 (このような分子の特性に有意な影響を及ぼさない、機能的に同等の抗体及び融合ポリペプチド、並びに活性が増強した又は低下した変異型を含む) を含む。ポリペプチドの修飾は、当該技術分野において慣用的に実践されており、本明細書で詳細に説明する必要はない。修飾されたポリペプチドの例としては、アミノ酸残基の保存的置換を有するポリペプチド、機能的活性を大きく劣化するように変化させない1つ若しくは複数の欠失若しくは追加、又は化学的類似体の使用が挙げられる。互いを保存的に置換できるアミノ酸残基としては：グリシン/アラニン；セリン/トレオニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；リジン/アルギニン；及びフェニルアラニン/チロシンが挙げられるが、これらに限定されない。これらのポリペプチドとしては、グリコシル化及び非グリコシル化ポリペプチド、並びに例えば異なる複数の糖によるグリコシル化、アセチル化及びリン酸化といった、その他の変換後修飾を有するポリペプチドも挙げられる。好ましくは、アミノ酸置換は保存的であり、即ち置換されたアミノ酸は、オリジナルのアミノ酸と同様の化学的特性を有する。このような保存的置換は当該技術分野において公知であり、その例は上述されている。アミノ酸

40

50

修飾は、1つ又は複数のアミノ酸を変化させるか又は修飾することから、可変領域等の領域の完全な再設計にまで及んでよい。可変領域の変化は、結合親和性及び/又は特異性を変化させる。他の修飾方法としては、酵素的手段、酸化的置換及びキレート化を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において公知の連結技術の使用が挙げられる。修飾は例えば、イムノアッセイのための標識の付与、例えばラジオイムノアッセイのための放射性部分の付与等のために使用できる。修飾されたポリペプチドは、当該技術分野において確立された手順を用いて作製され、また当該技術分野において公知の標準的なアッセイを用いてスクリーニングできる。

【0258】

H. 結合分子の特性決定

抗体等の結合分子は、多様な方法で特性決定してよい。特に抗体を、抗原、例えばHER2/neu、PD-1に特異的に結合する能力に関して、又はFc-FcR相互作用、即ちFcRに対するFc領域(若しくはその一部分)の特異的結合を呈する能力のために、上記分子がFc領域(若しくはその一部分)を含む場所に関して、アッセイしてよい。

【0259】

特異的結合、交差反応性及びFc-FcR相互作用を分析するために使用できるイムノアッセイとしては、限定するものではないが、ウエスタンブロット、放射線イムノアッセイELISA(酵素結合免疫溶媒アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル拡散沈降素反応、免疫クロマトグラフィアッセイ、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体固定アッセイ、免疫放射線測定アッセイ、蛍光イムノアッセイ、及びタンパク質Aイムノアッセイ等の技法を用いた競合性及び非競合性アッセイ系が挙げられる(例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. et al., Eds., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NYを参照)。

【0260】

標的抗原に対する結合親和性は典型的には、BIACore競合性アッセイ、飽和アッセイ、又はELISA若しくはRIAといったイムノアッセイ等の、標準的な抗体-抗原アッセイによって測定又は決定される。当業者に公知の技法のうちのいずれを用いた蛍光活性化細胞分類(Fluorescence activated cell sorting: FACS)を、本発明の分子を特性決定するための免疫学又は機能ベースのアッセイのために使用してよい。表面プラズモン共鳴ベースのアッセイを用いて、抗原結合ドメイン又はFc-FcR結合の動力学的パラメータを特性決定してよい。

【0261】

Fc領域(若しくはその一部分)を含む、及び/又はFcRに対して特異的なエピソード結合ドメインを含む分子の、FcRへの結合の特性決定は、抗体操作技術の分野において説明されている方法に従って実施してよい。エフェクタ細胞の機能に関するアッセイは公知であり、例えばPerussia, B. et al. (2000) "Assays for antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) And Reverse ADCC (Redirected Cytotoxicity) In Human Natural Killer Cells," Methods Mol. Biol. 121:179-192; Lehmann, A.K. et al. (2000) "Phagocytosis: Measurement By Flow Cytometry," J. Immunol. Methods 243(1-2):229-242; Baggiolini, M. et al. (1998) "Cellular Models For The Detection And Evaluation Of Drugs That Modulate Human Phagocyte Activity," Experientia 44(10):841-848; Brown, E.J. (1994) "In Vitro Assays Of Phagocytic Function Of Human Peripheral Blood Leukocytes: Receptor Modulation And Signal Transduction," Methods Cell Biol. 45:147-164;及びMunn, D.H. et al. (1990) "Phagocytosis Of Tumor Cells By Human Monocytes Cultured In Recombinant Macrophage Colony-Stimulating Factor," J. Exp. Med. 172:231-237に記載されている。

【0262】

VII. 治療の方法

HER2/neu特異的に結合する分子、及び免疫チェックポイントの調節に關与する

細胞表面受容体（特にPD-1）（又はそのリガンド）に特異的に結合する分子を、癌又は他の疾患を有する個体において、治療目的で使用してよい。一実施形態では、このような結合特異性を有する1つ又は複数の分子は、同時に投与される。本明細書中で使用される場合、このような「同時（concurrent）」投与は、以下を指すことを意図している：

（A）HER2/neuに特異的に結合する分子、及び免疫チェックポイントの調節に關与する細胞表面受容体（特にPD-1）（若しくはそのリガンド）に特異的に結合する分子の両方を含有する、単一の医薬組成物の投与。このような分子は、同一の分子（例えばダイアボディ）であってよく、若しくは別個（例えば抗HER2/neu抗体若しくはその抗原結合断片、及び抗PD-1-抗体若しくはその抗原結合断片）であってよい；又は

10

（B）2つ以上の医薬組成物の個別投与であって、上記医薬組成物のうちの1つの組成物は、HER2/neuに特異的に結合する分子を含有し、上記医薬組成物のうちの別の1つの組成物は、免疫チェックポイントの調節に關与する細胞表面受容体（特にPD-1）（若しくはそのリガンド）に特異的に結合する分子を含有し、上記組成物は24時間の期間内に投与される、個別投与。

【0263】

第2の実施形態では、2つの別個の分子が採用され、これらの分子は「順次」投与される（例えば抗HER2/neu抗体を投与した後で抗PD-1抗体が提供されるか、又はその逆）。このような順次投与では、最も好ましくは、第2の投与される組成物は、第1の投与される組成物の投与後、少なくとも24時間以上後に投与される。

20

【0264】

ある療法を提供すること、即ち「治療、治療すること（treating）」は、：症状の緩和、寛解、減少；又は傷害、病理若しくは状態を患者にとってより許容可能なものとする；変性若しくは衰弱の速度の低下；変性の最終地点における衰弱の緩和；又は患者の身体的若しくは精神的健康の改善といった、いずれの主観的又は客観的パラメータを含む、傷害、病理又は状態の治療又は改善の成功のいずれの指標を示す。症状の治療又は改善は、身体的試験、神経精神医学的試験、及び/又は精神医学的評価の結果を含む、主観的又は客観的パラメータに基づくものであってよい。

【0265】

30

好ましい治療の被験者は、疾患及び他の病理学的状態となった、動物、最も好ましくはヒト又は他の霊長類等の哺乳類、及びイヌ、ネコ等の飼育動物を含む。「患者（patient）」は、被験者、好ましくは哺乳類（ヒトを含む）を指す。

【0266】

一実施形態では、HER2/neuを発現する様々な組織の癌細胞、並びに特に乳癌、膠芽腫、子宮頸癌、転移性結腸直腸癌、胃癌、肝細胞癌、白血病、肺癌、転移性黒色腫、血管新生性膵臓癌及び転移性前立腺癌といった癌細胞を対象とする免疫療法のために、モノクローナル抗HER2/neu抗体及びモノクローナル抗PD-1抗体を使用できる。このような免疫療法は例えば、癌細胞における細胞分裂の低減、転移の発現（例えば発生及び拡散）の遅延、並びに/又は癌細胞に対する免疫系の活性の促進を含む。

40

【0267】

上記分子は、生理学的（例えばインビボ）条件において結合を促進する濃度で投与されることが理解される。上記分子（例えば抗体又はダイアボディ）は、個体自身の免疫応答を増強する又は指向する追加の作用剤、例えばADCCを強化する作用剤等と共に投与してよい。

【0268】

更に別の実施形態では、このような分子（例えば抗体又はダイアボディ）のうちの1つ又は複数は：放射性分子；毒素（例えばカリケアマイシン）；化学療法剤分子；化学療法剤化合物を含み、これらの化合物を、上記抗体が認識する抗原を含有する癌細胞に対して標的化することによって、癌細胞又は罹患細胞を除去するために、このような治療を必要

50

とする個体に投与されるリポソーム又は他の小胞と、複合化又は連結させてよい。いずれの特定の理論に限定されるものではないが、上記抗体（例えば抗HER2/neu抗体）は、HER2/neuを表面に担持する細胞によって内在化され、これにより上記細胞に複合化された部分を送達して治療的効果を誘起し、また、免疫チェックポイントの調節に関わる細胞表面受容体（又はそのリガンド）（特にPD-1）に特異的に結合する分子が、免疫系の活性化を促進する。

【0269】

更に別の実施形態では、このような分子（例えば抗体又はダイアボディ）は、転移の発現の遅延、抑制又は防止のための、腫瘍の外科的除去時の補助療法として使用できる。上記分子は、腫瘍のサイズを低減することによって手術を可能とする若しくは簡略化するため、手術中に組織をなるべく保護するため、及び/又は結果として発生するいずれの外面的破壊を低減するために、手術前に投与することもできる。

10

【0270】

本発明の抗HER2/neu抗体は、FcRが仲介するエフェクタ細胞機能（例えばADCC）が望まれる疾患又は障害（例えば癌）の治療及び/又は予防に特に有用である。例えば本発明の抗HER2/neu抗体は、免疫エフェクタ細胞（例えばNK細胞）上の細胞表面抗原及びFcRに結合してよく、上記細胞に対するエフェクタ機能（例えばADCC、CDC、食作用、オプソニン化等）を刺激する。いくつかの実施形態では、本発明の抗HER2/neu抗体は、癌の治療に特に好適である。標準的なモノクローナル抗体療法の有効性は、被験者のFcRの多形性に依存する。Cartron, G. et al. (2002) "Therapeutic Activity Of Humanized Anti-CD20 Monoclonal Antibody And Polymorphism In IgG Fc Receptor FcγRIIIa Gene," Blood 99:754-758; Weng, W.K. et al. (2003) "Two Immunoglobulin G Fragment C Receptor Polymorphisms Independently Predict Response To Rituximab In Patients With Follicular Lymphoma," J Clin Oncol. 21(21):3940-3947. これらの受容体は、上記エフェクタ細胞の表面で発現し、ADCCを仲介する。高親和性対立遺伝子は、ADCCを仲介するエフェクタ細胞の能力を改善する。特に本発明の抗HER2/neu抗体は、エフェクタ細胞上のFcRに対する親和性が（野生型Fc領域に対して）増強された変異型Fc領域を含み、従って、患者のFcRの多形性にかかわらず、患者に対してより良好な免疫療法試薬を提供する。

20

【0271】

VIII. 治療可能な障害

本発明の様々な実施形態によって治療できる例示的な障害としては、限定するものではないが、増殖性の障害、特に癌（より特定すると、HER2/neu発現型癌）が挙げられる。様々な実施形態において、本発明は、HER2/neuに特異的に結合する分子、及び免疫チェックポイントの調節に関与する細胞表面受容体（特にPD-1）（又はそのリガンド）に特異的に結合する分子を、被験者に治療的有効量で投与するステップを含む、被験者の疾患又は障害の治療、予防又は管理のための方法及び組成物を包含する。例えば、本発明の分子は、原発腫瘍及び癌細胞の転移の、予防、阻害、成長の低減又は退行のために特に有用である。特定の作用機序によって束縛されることを意図するものではないが、本発明の分子は、癌細胞に対するエフェクタ機能を仲介でき、癌細胞に対する免疫系の活性化を促進でき、癌細胞上の細胞表面抗原及び/又は受容体を架橋させることができ、アポトーシス、又は負の成長調節シグナリング、又はこれらの組み合わせを増強でき、これにより腫瘍の除去及び/又は腫瘍の縮小を得ることができる。

30

40

【0272】

FcRIIBに対する親和性が低下し、かつFcRIIA及び/又はFcRIIAに対する親和性が増大した抗体により、FcR結合時の活性化応答を増強でき、従って癌の治療及び/又は予防に関する治療有効性を増強できる。本明細書の方法によって治療できる癌の非限定的な例としては、急性骨髄性リンパ腫、副腎癌、腺癌、基底細胞癌、膀胱癌、骨癌、骨及び結合組織肉腫、脳腫瘍、乳癌、気管支癌、子宮頸癌、絨毛癌、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、食道癌、眼

50

癌、卵管癌、胆嚢癌、胃腸癌、神経膠腫、毛状細胞白血病、肝細胞癌、ホジキン病、肝内胆管癌、関節癌、カポジ肉腫、腎臓癌、喉頭癌、肝臓癌、白血病、肺癌、リンパ芽球性白血病、リンパ腫、悪性中皮腫、髄膜腫、黒色腫、中皮腫、中耳癌、多発性骨髄腫、骨髄腫、粘液肉腫、鼻腔癌、鼻咽頭癌、神経芽細胞腫、非ホジキンリンパ腫、非小細胞肺癌、鼻癌、口腔癌、卵巣癌、膵臓癌、陰茎癌、腹膜癌、咽頭癌、下垂体癌、前立腺癌、直腸癌、腎臓癌、唾液腺癌、皮膚癌、軟部肉腫、扁平上皮癌、胃癌、精巣癌、甲状腺癌、尿癌、子宮癌、膣癌、小胞癌、外陰部癌並びにウィルムス腫瘍が挙げられる。

【0273】

いくつかの実施形態では、上記癌は、リンパ腫、白血病、骨髄腫、リンパ性悪性腫瘍、脾臓癌及びリンパ節の癌といった、造血性癌又は血液関連癌である。ある好ましい実施形態では、上記癌は：（例えばパーキットリンパ腫、びまん性大細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、粘膜関連リンパ系組織B細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫及びT細胞リンパ腫といったB細胞リンパ腫を含む）高、中又は低悪性度リンパ腫、並びに（B細胞白血病（CD5+Bリンパ球）、慢性骨髄性白血病、急性リンパ芽球性白血病等のリンパ性白血病、骨髄異形成、急性骨髄性白血病等の骨髄性白血病、及び二次性白血病といった慢性リンパ球性白血病を含む）白血病といった、B細胞関連癌；形質細胞悪性腫瘍等の多発性骨髄腫；並びに他の血液学的及び/又はB細胞若しくはT細胞関連癌である。他の例示的な癌は、好塩基球、好酸球、好中球及び単球、樹状細胞、血小板、赤血球、並びにナチュラルキラー細胞といった多形核白血球を含む、更なる造血細胞の癌である。

【0274】

いくつかの実施形態では、上記癌は、HER2/neuを発現する癌である。いくつかの実施形態では、上記癌は、HER2/neuを発現する、乳癌、胃癌、前立腺癌、子宮癌、卵巣癌、結腸癌、子宮内膜癌、副腎癌、非小細胞肺癌、頭頸部癌、喉頭癌、肝臓癌、腎臓癌、グリア芽細胞腫又は膵臓癌である。

【0275】

IX. 医薬組成物

医薬組成物の「活性成分（active ingredient）」としての投与のために、本発明の分子（例えば抗体又はダイアボディ）の様々な処方を用いてよい。いくつかの実施形態では、このような分子はそのまま投与してよい。本発明の組成物は、1つ又は複数の薬理的活性作用剤に加えて、薬理的に効果的な物質の投与を促進する、又は作用部位への送達のために薬学的に使用できる調剤への活性化化合物の加工を促進する、当該技術分野において公知の、比較的不活性の物質である賦形剤及び助剤を含む、薬学的に許容可能な好適なキャリアを含有してよい。例えば賦形剤は、形状若しくは濃度を与えることができ、又は希釈剤として作用できる。好適な賦形剤としては、安定化剤、湿潤及び乳化剤、モル浸透圧濃度を変化させるための塩、カプセル化剤、緩衝液及び皮膚浸透エンハンサーが挙げられるが、これらに限定されない。上記組成物は、いくつかの非限定的な選択肢を挙げると、例えば錠剤、丸薬、粉体、ロゼンジ、個包装剤、オブラート薬包、エリキシル剤、懸濁液、エマルジョン、溶液、シロップ、（固体としての又は液体媒体中の）エアロゾル、例えば最大10重量%の活性化化合物を含有する軟膏、軟質及び硬質ゼラチンカプセル、坐薬、滅菌注射用溶液、並びに滅菌包装済み粉体といった、いずれの好適な形態とすることができる。このような組成物は、いずれの公知の方法によって、例えば活性成分を1つ若しくは複数の担体又は1つ若しくは複数の賦形剤と、滅菌条件下で混合することによって、調製してよい。

【0276】

非経口投与のための好適な処方、例えば水溶性形態、例えば水溶性塩である活性化化合物の水溶液を含む。更に、油性注射懸濁液のために適切な、活性化化合物の懸濁液も投与してよい。好適な親油性溶媒又は担体は、脂肪油、例えばゴマ油、又は合成脂肪酸エステル、例えばオレイン酸エチル若しくはトリグリセリドを含む。水性注射懸濁液は、懸濁液の粘度を上昇させる物質を含有してよく、また例えばカルボキシメチルセルロースナトリウム及び

ノ又はデキストランを含んでよい。任意に、上記懸濁液は安定化剤も含有してよい。細胞内への送達のために作用剤をカプセル化するために、リポソームも使用できる。

【0277】

本発明による全身投与のための薬学的処方、経腸、非経口又は局所投与のために処方してよい。実際には、これら3つのタイプの処方全てを同時に使用して、活性成分の全身投与を達成してよい。非経口及び経口薬剤送達のための賦形剤及び処方は、Remington: The Science And Practice Of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishing (2005)に記載されている。経口投与のための好適な処方は、硬質若しくは軟質ゼラチンカプセル、丸薬、コーティング錠剤を含む錠剤、エリキシル、懸濁液、シロップ又は吸入剤及びこれらの徐放形態を含む。一般にこれらの作用剤は、(例えば腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内等の)注射による投与のために処方されるが、他の投与形態(例えば経口、粘膜等)も使用できる。従って本発明の分子(例えば抗HER2/neu抗体、抗PD-1抗体)は好ましくは、生理食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液等の、薬学的に許容可能な担体と組み合わせられる。

10

【0278】

上記医薬組成物はまた、当該技術分野において公知の処置によって、患者への投与後に、その活性成分の迅速な放出、徐放、又は遅延放出を提供できるように処方することもできる。本発明の組成物の物理的及び化学的特徴は、投与の態様、及び治療対象の特定の疾患又は障害に応じて、当該技術に従って修正又は最適化してよい。上記組成物は、単位剤形で、密閉コンテナとして、又は使用説明書及び/若しくは複数の単位剤形を含んでよいキットの一部として提供してよい。

20

【0279】

特定の実施形態では、例えば抗体又は融合タンパク質を発現できるリポソーム、微粒子マイクロカプセル、組み換え細胞内へのカプセル化; 受容体仲介性エンドサイトーシス(例えばWu G.Y. and Wu C.H. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照); レトロウイルス又は他のベクターの一部としての核酸の構築等によって、上記治療剤を組成物に組み込むことができる。別の特定の実施形態では、気密性コンテナ内の滅菌凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として供給され、例えば水又は食塩水を用いて、被験体への投与に適切な濃度へと再構成できる。

30

【0280】

好ましくは、上記治療剤は、少なくとも5mg、より好ましくは少なくとも10mg、少なくとも15mg、少なくとも25mg、少なくとも35mg、少なくとも45mg、少なくとも50mg又は少なくとも75mgの単位剤形で、気密性コンテナ内の乾燥滅菌凍結乾燥粉末として供給される。凍結乾燥された粉末は、その元々のコンテナ内において2~8で保管するべきであり、またこの分子は、再構成後12時間以内、好ましくは6時間以内、5時間以内、3時間以内又は1時間以内に非経口投与するべきである。ある代替実施形態では、上記治療剤は、上記治療剤の量及び濃度を示す気密性コンテナ内に、液体形態で供給される。好ましくは、上記液体形態は、上記分子の少なくとも1mg/ml、より好ましくは少なくとも2.5mg/ml、少なくとも5mg/ml、少なくとも8mg/ml、少なくとも10mg/ml、少なくとも15mg/ml、少なくとも25mg/ml、少なくとも50mg/ml、少なくとも100mg/ml、少なくとも150mg/ml、少なくとも200mg/mlで、気密性コンテナ内で供給される。

40

【0281】

2つ以上の治療剤を投与する場合、作用剤は、同一処方にまとめて処方してよく、又は別個の組成物へと処方してよい。従っていくつかの実施形態では、HER2/neuに特異的に結合する分子、及び免疫チェックポイントの調節に關与する細胞表面受容体(特にPD-1)(又はそのリガンド)に特異的に結合する分子は、同一の医薬組成物中にまとめて処方される。代替実施形態では、これらの分子は別個の医薬組成物中に処方される。

【0282】

50

X. キット

上記組成物は、キットに含まれていてよい。このキットは、非限定的な態様において、治療剤を含む医薬組成物、投与のための説明書、及び/又は他の構成要素を含むことができる。好ましい実施形態では、上記キットは、投与の準備ができた状態の組成物を含むことができる。上記キットのコンテナは、ある構成要素を入れることができる、瓶、ディスペンサ、梱包、コンパートメント又は他のタイプのコンテナを含むことができる。上記コンテナは、その表面上に印を含むことができる。上記印は例えば、単語、句、頭字語、写真又はシンボルとすることができる。上記コンテナは、所定量の構成要素（例えば本発明の組成物）を分注できる。上記組成物は、スプレー、エアロゾル、又は液体形態若しくは半固体形態で分注できる。上記コンテナは、スプレー、ポンプ、又は圧搾機構を有することができる。特定の態様では、上記キットは、本発明の組成物を投与するためのシリンジを含むことができる。

10

【0283】

キット内に2つ以上の構成要素が存在する場合、これらはまとめて梱包されていてよく、又は上記キットは一般に、上記追加の構成要素を別個に入れることができる第2の、第3の、又は更なる追加のコンテナを内包することになる。本発明のキットはまた、市販のために嚴重に封止された状態で上記構成要素を格納するコンテナを含むことができる。このようなコンテナは、所望の瓶、ディスペンサ又は梱包がその中に保持される、射出成形又は吹込成形されたプラスチックコンテナを含んでよい。キットは、キットの構成要素を使用するための、及びキットに含まれていない他のいずれの組成物、化合物、作用剤、活性成分又は物品の使用のための、説明書も含むことができる。説明書は、実装可能なパリエーションを含んでよい。説明書は、例えば製品又は組成物を適用、使用及び保守するための説明を含むことができる。

20

【0284】

XI. 投与及び投薬量

本発明の組成物のために、多様な投与経路が利用可能である。選択される特定の態様は、当然のことながら：選択される特定の治療剤；この投与が疾患の予防、診断又は治療のいずれのためのものであるか；治療対象である医学的障害の重篤度；及び治療有効性のために必要な投薬量に左右される。本発明の方法は、医学的に許容可能であり、かつ臨床的に許容できない悪影響を引き起こすことなく、効果的なレベルの活性化化合物を生成する、いずれの投与態様を用いて実施してよく、このような投与態様としては、限定するものではないが、経口投与、頬内投与、舌下投与、吸入投与、粘膜投与、直腸投与、鼻腔内投与、局所投与、点眼投与、眼球周囲投与、眼球内投与、経皮投与、皮下投与、動脈内投与、静脈内投与、筋内投与、非経口投与、又は点滴投与法が挙げられる。ある特定の実施形態では、本発明の医薬組成物を、治療が必要な領域に局所的に投与することが望ましい場合があり、これは例えば、限定するものではないが、局所的注入によって、注射によって又はインプラントを用いて達成してよく、上記インプラントは、シラスティック膜等の膜又は繊維を含む、多孔性、非多孔性又はゼラチン質材料である。好ましくは、本発明の分子を投与する際、上記分子を吸収しない材料を使用するよう注意する必要がある。

30

【0285】

本明細書中で使用される場合、用語「治療有効量 (therapeutically effective amount)」は、有意な患者の利益、即ち慢性状態の治癒若しくは改善、症状の軽減、このような状態の治癒速度の増大、又は治療対象の若しくはその周囲の組織における物質のレベルの検出可能な変化を示すために十分な、医薬組成物又は方法の各活性構成要素の合計量を意味する。単独で投与される個々の活性成分に対してこの用語が適用される場合、この用語は、上記成分のみを指す。組み合わせに対して適用される場合、この用語は、治療的効果をもたらす複数の活性成分の合計量を指し、これらの活性成分が組み合わせで投与されるか、順次投与されるか、又は同時に投与されるかにはかわらない。

40

【0286】

50

本発明の処方採用される正確な用量は、投与経路及び状態の重篤度に左右され、専門家の判断及び各患者の状況に従って決定しなければならず、標準的な臨床技術によって決定できる。効果的な用量（即ち、障害に関連する1つ又は複数の症状の治療、予防又は寛解に効果的となるために十分な用量）は、インビトロ又は動物モデル試験系から得られる用量-応答曲線から外挿法によって推定できる。従って、特定の投薬レジメン、即ち用量、タイミング及び繰り返し数は、特定の個体及びその個体の治療歴、並びに投与経路に左右される。本発明の分子の投与の投薬量及び頻度は、例えば脂質付加等によって上記分子の摂取及び/又は組織浸透を増強することにより、低減又は変化させてよい。

【0287】

ある好ましい実施形態では、本発明の治療剤は、連続的な注入又は休止期間が長くない頻繁な投与による、規則的投薬レジメンで投与される。このような規則的投与は、休止期間がない一定の間隔での投薬を伴うことができる。典型的には、治療剤、特に細胞傷害剤は、比較的低用量で使用される。このような投薬レジメンは、長期間に亘って比較的低用量で毎日投与するものを包含し、これは、有毒な副作用を最小化でき、また休止期間を排除できる。特定の実施形態では、上記治療剤は、約24時間から約2日、約1週間、約2週間、約3週間、約1か月、約2か月、約3か月、約4か月、約5か月、約6か月までの範囲の、長期間の低用量又は連続注入によって送達される。このような投薬レジメンのスケジュール決定は、腫瘍専門医が最適化できる。

【0288】

好ましくは、本発明の分子は、1回又は複数回の用量を含む治療レジメンを用いて投与され、この治療レジメンは、2日、3日、4日、5日、6日又は7日に亘って投与される。特定の実施形態では、治療レジメンは、有効量のこのような分子の用量を断続的に投与する（例えば、予上記分子の用量を、所定の週の1日目、2日目、3日目及び4日目に投与し、その週の他の日には投与しない）ことを含む。特に、同一週の5日目、6日目及び7日目におけるこのような分子の投与も包含される。典型的には、1、2、3、4、5つ又はそれを超える治療のコースが存在する。各コースは、同一のレジメン又は異なるレジメンであってよい。

【0289】

別の実施形態では、投与される用量は、上記分子の1日の予防的又は治療的有效量に到達するまで、1つ又は複数のレジメンの最初の1/4、最初の半分又は最初の2/3若しくは3/4に亘って（例えば4コース治療の第1、第2又は第3のレジメンに亘って）漸増する。

【0290】

患者に投与されるこのような分子の投薬量は、単一作用剤療法としての使用に関して計算してよい。あるいは上記分子は、他の治療組成物と組み合わせて使用してよく、患者に投与される投薬量は、上記分子を単一作用剤療法として使用する場合より低くなる。患者に投与されるこのような分子（又はこのような分子の組み合わせ）の投薬量は典型的には、少なくとも約1.0 mg/kg体重、少なくとも約3 mg/kg体重、少なくとも約5 mg/kg体重、少なくとも約10 mg/kg体重、又は少なくとも約20 mg/kg体重である。本発明が包含する抗体に関して、患者に投与される投薬量は典型的には、1.0 mg/kg ~ 100 mg/kg（患者の体重）である。好ましくは、患者に投与される投薬量は、1.0 mg/kg体重 ~ 20 mg/kg体重、1.0 mg/kg体重 ~ 10 mg/kg体重、1.0 mg/kg体重 ~ 5 mg/kg体重、2.0 mg/kg体重 ~ 20 mg/kg体重、又は5 mg/kg体重 ~ 20 mg/kg（患者の体重）である。一実施形態では、患者に投与される投薬量は、6 mg/kg体重 ~ 18 mg/kg体重である。別の実施形態では、患者に投与される投薬量は、6 mg/kg体重、10 mg/kg体重、15 mg/kg体重又は18 mg/kg体重である。ベースラインにある患者の体重に基づいて、計算した用量を投与する。ベースライン又は確立された平坦域体重からの体重の有意な（10%）変化がある場合、用量の再計算を促す必要がある。

【0291】

あるいは、体重にかかわらず、固定投薬量のこのような分子（又はこのような分子の組み合わせ）を患者に投与する。本発明が包含する抗体に関して、患者に投与される固定投薬量は典型的には、50mg～500mgである。好ましくは、患者に投与される固定投薬量は、50mg～300mg、100mg～300mg又は100mg～200mgである。一実施形態では、患者に投与される固定投薬量は、200mgである。

【0292】

半減期等の経験的考慮事項は一般に、投薬量の決定に寄与する。ヒト化抗体又は完全ヒト抗体等のヒト免疫系に適合する抗体を用いて、抗体の半減期を延長し、抗体が宿主の免疫系に攻撃されるのを防止できる。投与の頻度は、治療過程全体に亘って決定及び調整してよく、癌細胞の数の減少、癌細胞の減少の維持、癌細胞の増殖の低下、又は転移の発現の遅延に基づく。あるいは、抗HER2/neu抗体の持続連続放出処方も適切であり得る。持続放出を達成するための様々な処方及びデバイスは、当該技術分野において公知である。

10

【0293】

XII. 併用療法

本発明は更に、HER2/neuに特異的に結合する分子と、免疫チェックポイントの調節に関与する細胞表面受容体（特にPD-1）（又はそのリガンド）に特異的に結合する分子とを、現行の標準的な及び実験的な化学療法、ホルモン療法、生物学的療法、免疫療法、放射線療法又は手術を含むがこれらに限定されない、癌、自己免疫疾患、炎症又は感染性疾患の治療又は予防のための当業者に公知の他の療法との更なる組み合わせで、投与することを包含する。いくつかの実施形態では、本発明の分子（例えば本発明の抗HER2/neu及び抗PD-1抗体）は、治療有効量又は予防有効量の、癌、特にHER2/neu発現型癌の治療及び/又は予防のための当業者に公知の1つ又は複数の治療剤との組み合わせで投与される。

20

【0294】

本明細書中で使用される場合、用語「組み合わせ、併用（combination）」は、2つ以上の治療剤の使用を指す。用語「組み合わせ、併用」の使用は、複数の治療剤が障害を有する被験者に投与される順序を制限するものではなく、またこれらの作用剤が全く同一の時点で投与されることを意味するものではなく、本発明の抗体又はポリペプチドが他の作用剤と共に作用することによって、これらを他の方法で投与した場合よりも多大な利益を提供できるように、本発明の抗体又はポリペプチド及び上記他の作用剤を、ある順序で、ある時間間隔内に、哺乳類に投与することを意味するものである。例えば各治療剤（例えば化学療法、放射線療法、ホルモン療法又は生物学的療法）は、同時に、又は異なる時点においていずれの順序で順次、投与できるものの、同時に投与しない場合には、上記治療剤は、所望の治療的又は予防的効果を提供できるよう、時間的に十分に近接して投与するべきである。各治療剤は、いずれの適切な形態で、またいずれの好適な経路で、例えば1つを経口経路、そして1つを非経口経路で、別個に投与できる。

30

【0295】

様々な実施形態では、第1の治療剤は、障害を有する被験者への第2の（又は後続の）治療剤の投与の、前（例えば、5分前、15分前、30分前、45分前、1時間前、2時間前、4時間前、6時間前、12時間前、24時間前、48時間前、72時間前、96時間前、1週間前、2週間前、3週間前、4週間前、5週間前、6週間前、8週間前若しくは12週間前）、同時、又は後（例えば、5分後、15分後、30分後、45分後、1時間後、2時間後、4時間後、6時間後、12時間後、24時間後、48時間後、72時間後、96時間後、1週間後、2週間後、3週間後、4週間後、5週間後、6週間後、8週間後若しくは12週間後）に、投与できる。好ましい実施形態では、2つ以上の作用剤を、患者の同一の訪問時に、又は12時間以下の間隔で、24時間以下の間隔で、若しくは48時間以内の間隔で、投与する。

40

【0296】

上述のように、本発明に従って、それぞ必要とするレシピエントである被験者に、HE

50

R2/neuに特異的に結合する分子と、免疫チェックポイントを調節する細胞表面受容体又はそのリガンドに特異的に結合する分子との組み合わせを提供するために、様々な投薬及び投与経路を採用してよいが、このような治療における使用のために、特定の組み合わせ、投薬及び投与経路が特に好ましい。本発明の変異型キメラ4D5抗体（例えばマルゲツキシマブ）を、本発明の抗PD-1抗体（例えばペンプロリズマブ）と組み合わせて、上述のような投薬及び投与経路で使うことが、特に好ましい。

【0297】

ある用量の変異型キメラ4D5抗体と、ある用量の抗PD-1抗体の投薬との組み合わせを、1回又は複数回投与してよく（このような組み合わせ治療レジメンの各投与を、本明細書では「サイクル(cycle)」と呼ぶ）、各投与は、患者の体重1kgあたり6~18mg、好ましくは6mg、10mg、15mg又は18mgの変異型キメラ4D5抗体と、患者の体重1kgあたり1~10mg、好ましくは1mg、2mg、3mg若しくは10mgの抗PD-1抗体、又は200mgの固定用量の抗PD-1抗体との投与を含む。最も好ましくは、サイクルは、3週間(±3日)毎に、疾患又は管理できない毒性の寛解が観察されるまで行われる。

10

【0298】

特に好ましい実施形態では、変異型キメラ4D5抗体（例えば、マルゲツキシマブ）及び抗PD-1抗体（例えば、ペンプロリズマブ）は、少なくとも1か月以上、少なくとも3か月以上、又は少なくとも6か月以上、又は少なくとも12か月以上の期間に亘って、約3週間(±3日)毎に、IV点滴によって被験者に投与される。少なくとも6か月以上、又は少なくとも12か月以上、又は疾患若しくは管理できない毒性の寛解が観察されるまでの治療期間が特に好ましい。このようなIV投与では、変異型キメラ4D5抗体及び抗PD-1抗体は、共に、又は順次投与してよい。特に好ましい実施形態では、変異型キメラ4D5抗体及び抗PD-1抗体は、24時間以内の間隔でIV点滴によって被験者に順次投与される。このような順次投与では、変異型キメラ4D5抗体は、抗PD-1抗体の投与の前又は後に投与してよい。

20

【0299】

変異型キメラ4D5抗体及び抗PD-1抗体の組み合わせの複数の用量を被験者に提供することが特に好ましい。従って治療レジメンは、1サイクル、少なくとも2サイクル以上、少なくとも3サイクル以上、少なくとも4サイクル以上、少なくとも5サイクル以上、又は少なくとも6サイクル以上を含んでよい。このようなサイクルそれぞれにおける各抗体の投薬量は、1回前に投与された投薬量と同一であってよく、又は異なっていてよい。よって例えば、療法は、「第1の(first)」(又は「多い」)用量の変異型キメラ4D5抗体と、それに続く、比較的少ない「第2の(second)」用量の変異型キメラ4D5抗体との投与を含んでよい。

30

【0300】

いくつかの実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ6、10、15又は18mg/kgの第1の用量で投与され、それに続いて第2の比較的少ない用量で投与され、この第2の用量は、第1の用量の投与後約3週間(±3日)である。例えば、変異型キメラ4D5抗体の上記第1の用量がおよそ18mg/kg体重である場合、上記第2の用量は、体重未満(例えばおよそ3mg/kg体重、およそ6mg/kg体重、およそ8mg/kg体重、およそ10mg/kg体重又はおよそ15mg/kg体重)である。いくつかの実施形態では、追加の後続の用量の変異型キメラ4D5抗体が投与され、この後続の用量は、第2の用量又は1つ前の後続の用量の投与後約3週間(±3日)で投与される。いくつかの実施形態では、上記後続の用量は、上記第2の比較的少ない用量と同一の濃度で投与される。好ましい実施形態では、同一用量の変異型キメラ4D5抗体を、治療の全過程に亘って投与する。

40

【0301】

上記抗体をIVプッシュ又はボラスとして投与するのではなく、このような投与をIV点滴によって行うことが好ましい。従って上記抗体は好ましくは、好適な希釈剤、例え

50

ば0.9%塩化ナトリウムを内包する点滴バッグ内へと希釈される。急性輸液反応又はアレルギー反応が発生し得るため、このような急性輸液反応の予防のための事前薬物処理が推奨され、また抗体投与中にアナフィラキシーに関する警戒を怠ってはならない。IV点滴を、30分～24時間の期間に亘って被験者に投与するのが特に好ましい。特定の実施形態では、被験者が有害な急性輸液反応の兆候又は症状を示さない場合、IV点滴は好ましくは、30～180分若しくは30～120分若しくは30～90分の期間に亘って、又は60分の期間に亘って、又はそれ未満の期間に亘って、送達される。

【0302】

従って、好ましい癌の治療方法が提供され、この方法は、それを必要とする被験者に、およそ6～18mg/kg体重の投薬量の変異型キメラ4D5抗体、及びおよそ200mgの固定投薬量の抗PD-1抗体を投与するステップを含み、各上記抗体は、3週間(±3日)毎に投与される。一実施形態では、上記変異型キメラ4D5抗体は、およそ6、10、15又は18mg/kg体重の投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ6mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、200mgの固定投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ10mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、200mgの固定投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ15mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、200mgの固定投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ18mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、およそ200mgの固定投薬量で投与される。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体及び抗PD-1抗体は、24時間の期間内にIV点滴で投与される。上述の実施形態のうちいずれにおいて、上記癌は、HER2/neu発現型癌である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はペンプロリズマブである。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はニボルマブである。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はピディリズマブである。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はEH12.2H7である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 2である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 7である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 9である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体は、表1で提供された抗体から選択される。

【0303】

従って、好ましい癌の治療方法が提供され、この方法は、それを必要とする被験者に、およそ6～18mg/kg体重の投薬量の変異型キメラ4D5抗体、及びおよそ1～10mg/kgの投薬量の抗PD-1抗体を投与するステップを含み、各上記抗体は、3週間(±3日)毎に投与される。一実施形態では、上記変異型キメラ4D5抗体は、およそ6、10、15又は18mg/kg体重の投薬量で投与される。更なる実施形態では、抗PD-1抗体は、およそ1、2、3又は10mg/kg体重の投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ6mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、およそ1mg/kgの投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ6mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、2mg/kgの投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ6mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、およそ10mg/kg体重の投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、お

よそ10mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、およそ1mg/kg体重の投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ10mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、およそ2mg/kg体重の投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ10mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、およそ10mg/kg体重の投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ15mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、1mg/kgの投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ16mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、2mg/kgの投薬量で投与される。更なる実施形態では、変異型キメラ4D5抗体は、およそ15mg/kg体重の投薬量で投与され、抗PD-1抗体は、およそ10mg/kg体重の投薬量で投与される。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体及び抗PD-1抗体は、24時間の期間内にIV点滴で投与される。上述の実施形態のうちいずれにおいて、上記癌は、HER2/neu発現型癌である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はペンブロリズマブである。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はニボルマブである。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり抗PD-1抗体はピディリズマブである。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はEH12.2H7である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 2である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 7である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 9である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体はhPD-1 mAb 15である。上述の実施形態のうちいずれにおいて、変異型キメラ4D5抗体はマルゲツキシマブであり、抗PD-1抗体は、表1で提供された抗体から選択される。

10

20

30

40

50

【0304】

特定の実施形態では、上記治療剤は、被験者に周期的に投与される。このような周期的療法は、ある期間に亘る第1の作用剤の投与、これに続くある期間に亘る第2の作用剤及び/又は第3の作用剤の投与、及びこの順次投与の繰り返しを伴う。周期的療法は、上記療法の1つ若しくは複数に対する耐性の発達を低減でき、上記療法のうち1つの副作用を回避若しくは低減でき、及び/又は治療の有効性を改善できる。例示的サイクルは、1週間に約1回、10日毎に約1回、2週間毎に約1回、及び3週間毎に約1回である。各サイクルは、少なくとも1週間の休止期間、少なくとも2週間の休止期間、少なくとも3週間の休止期間を含むことができる。投与されるサイクルの数は、約1~約12サイクル、より典型的には約2~約10サイクル、より典型的には約2~約8サイクルである。

【0305】

細胞増殖性障害の治療に関するある実施形態では、本発明の分子(例えば抗HER2/neu抗体、抗PD-1抗体)は、限定するものではないが、アルキル化剤(例えばメクロレタミン若しくはシスプラチン)、血管新生阻害剤、アントラサイクリン(例えばダウノルピシン/ダウノマイシン若しくはドキソルピシン)、抗生剤(例えばダクチノマイシン、プレオマイシン若しくはアントラマイシン)、抗体(例えば、ベバシズマブ(Genentech, Inc.がAVASTIN(登録商標)として販売)等の抗VEGF抗体、パニツムマブ(Amgen, Inc.がVECTIBIX(商標)として販売)等の抗EGFR抗体、若しくはナタリズマブ(Biogen Idec and Elan Pharmaceuticals, Inc.がTYSABRI(登録商標)として販売)等の抗インテグリン抗体)、代謝拮抗剤(例えばメトトレキサート若しくは5-フルオロウラシル)、有糸分裂阻害剤(例えばピンクリスチン若しくはバクリタキセル)、細

胞傷害剤（例えば細胞分裂阻害剤若しくは殺細胞剤）、ホルモン療法剤（例えば選択的エストロゲン受容体調節剤（例えばタモキシフェン若しくはラロキシフェン）、アロマターゼ阻害剤、ルテイン化ホルモン放出性ホルモン類似体、プロゲステロン作用剤、副腎皮質ステロイド、エストロゲン、アンドロゲン、抗エストロゲン剤、アンドロゲン受容体ブロック剤、5 α -レダクターゼ阻害剤、副腎ホルモン生成阻害剤等）、マトリックスメタプロテアーゼ阻害剤、放射性元素（例えば エミッタ、 エミッタ等）、又は他のいずれの化学療法剤といった、別の治療剤と、コンジュゲートするか、又は更に組み合わせて投与する。

【0306】

好適な血管新生阻害剤の非限定的な例としては：ABT-627；アンジオスタチン（プラスミノゲン断片）；アンジオザイム；抗血管新生アンチトロンピンIII；Bay 12-9566；ベネフィン；ベバシズマブ；BMS-275291；ビスホスホネート；軟骨由来阻害剤（CDI）；CAI；CD59補体断片；CEP-7055；Col 3；コンプレタスタチンA-4；エンドスタチン（コラーゲンXVII断片）；ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤（FTI）；フィブロネクチン断片；gro-beta；ハロフジノン；ヘパリナーゼ；ヘパリンヘキササッカライド断片；HMV833；ヒト絨毛性ゴナドトロピン（hCG）；IM-862；インターフェロン / / ；インターフェロン誘導性タンパク質（IP-10）；インターロイキン-12；クリングル5（プラスミノゲン断片）；マリマスタット；メタロプロテイナーゼ阻害剤（TIMP）；2-メトキシエストラジオール；MMI 270（CGS 27023A）；MoAb 20 IMC-1C11；ネオバスタット；NM-3；パンゼム；PI-88；胎盤リポヌクレアーゼ阻害剤；プラスミノゲン活性化因子阻害剤；血小板因子r-4（PF4）；プリノマスタット；プロラクチン16kDa断片；プロリフェリン関連タンパク質（PRP）；PTK 787/ZK 222594；レチノイド；ソリマスタット；スクアラミン；SS3304；SU5416；SU6668；SU11248；テトラヒドロコルチゾール-S；テトラチオモリブデート；サリドマイド；トロンボスポンジン-1（TSP-1）；TNP-470；トランスフォーミング成長因子（TGF-）；バスクロスタチン；パソスタチン（カルレティキュリン断片）；ZD6126；及びZD6474が挙げられる。

【0307】

細胞増殖性障害の治療のための追加の抗体の非限定的な例としては、17-1A、v₃、AFP、CD3、CD18、CD20、CD22、CD33、CD44、CD52、CEA、CTLA-4、DNA関連タンパク質、EGF受容体、Ep-CAM、GD2-ガングリオシド、gp IIB/Ib / IIA/a、gp72、HLA-DR 10、HLA-DR抗原、IgE、ガングリオシドGD3、MUC-1、nuC242、PEM抗原、SK-1抗原、腫瘍抗原CA125、腫瘍抗原MUC1、VEGF、及びVEGF-受容体に対する抗体が挙げられる。

【実施例】

【0308】

ここまで本発明を概説してきたが、以下の実施例を参照することにより、本発明は更に容易に理解されるだろう。これらの実施例は例示として提供されており、そうでないことが明記されていない限り本発明を制限することを意図したものではない。

【0309】

実施例1

BIAcore親和性決定

溶出され精製された抗体の結合の動学的パラメータを、BIAcoreアッセイ（BIAcore（登録商標）機器1000、BIAcore Inc.、ニュージャージー州ピスカータウェイ）及び関連ソフトウェアを用いて分析した。HER-2は、（NHS/EDCの混合物によるカルボキシメチル基の修飾による）アミン連結化学作用により、センサチップ表面の4つのフローセルのうちの1つ（フローセル2）上に不動化され、こ

10

20

30

40

50

れにより、約1000応答単位 (response unit: RU) の受容体が上記表面上に不動化される。これに続き、未反応の活性エステルを、1 MのEt-NH₂の注入によって「終端させ (capped off)」た。好適な表面が調製された後、ch4D5-FcWT (野生型Fc)、ch4D5及びトラスツズマブ (対照) を、180秒に亘り、70 mL / 分の流量で、上記表面に亘って、6.25 ~ 200 nMの濃度で注入した。

【0310】

全てのデータセットの回収後、得られた結合曲線を全体的にフィッティングし、BIAcore, Inc. から入手可能なBIAevaluation Software Handbookに記載されているように、製造元が供給するコンピュータアルゴリズムを用いて、速度定数及び見かけの平衡結合定数を算出した。図3は、SPR分析の結果のグラフであり、算出された定数は図4に提示される。

10

【0311】

【表6】

表4：BIAcore データから算出された動学的及び平衡定数			
分析物	Ka1 (1/モル*s)	Kd1 (1/s)	K _D (nm)
ch4D5-野生型 Fc	1.7 x 10 ⁵	~3.2 x 10 ⁻⁷ (推定)	--
ch4D5	1.1 x 10 ⁵	~6.3 x 10 ⁻⁶ (推定)	--
トラスツズマブ	1.6 x 10 ⁵	1.3 x 10 ⁻⁴	0.8

20

【0312】

実施例2

アポトーシス

様々な細胞株を、ch4D5及びch4D5-FcMT1と共に一晩インキュベートした。アポトーシスを、FACS分析によってアッセイし、その結果を表5に示す。

【0313】

【表 7】

表 5				
細胞株	実験 1		実験 2	
	ch4D5	ch4D5 FcMT1	ch4D5	ch4D5 FcMT1
SKBR3	35%	30%	15%	10%
JIMT	10%	10%	12-30%	10-30%
BT474	0	0	0	0
MCF-7	0	0	0	0
MDA MB 435	0	0	0	0
MDA MB 468	10%	10%	5%	0
MDA MB 361	0	0	12%	10%
MDA MB 453	20%	20%	20%	20%
MDA MB 231	0	0	0	0
ZR-75-1	0	0	0	0
A549	0	0	0	0
SKOV3	0	0	0	0
HT-29	0	0	0	0
OVCAR-3	10%	14%	5%	19%
OVCAR-8	0	0	0	0
BT-20	12%	10%	20%	15%

【 0 3 1 4 】

実施例 3

増殖

DNA への [³H]チミジン ([³H]TdR) 組み込みを、SKBR3 細胞増殖の生化学的指標として用いて、本発明の様々なキメラ 4D5 抗体の効果を比較した。ch4D5-Ag、ch4D5 及び Ch4D-FcMT1 の、CD16-158F+ 及び CD16-158V+ 細胞に対する影響を研究し、対照と比較した。結果を図 4 に示す。

【 0 3 1 5 】

実施例 4

マウス (乳癌モデル) における抗腫瘍活性

様々な抗体の抗腫瘍活性を、非トランスジェニック及びトランスジェニック (hCD16A) マウスを用いて、乳癌モデルで研究した。50 体の Balb/c RAG2-/- 非トランスジェニックマウスに、JMT-1 乳癌細胞を、0 日目に皮下 (s.c.) 注射した。マウスを 10 体ずつの 5 つのグループに分け、ch4D5-N297Q、ch4D5-野生型Fc、ch4D5-FcMT1、ch4D5-FcMT2、又は PBS (陰性対照) を用いて 8 週間に亘って腹腔内 (IP) 治療した。キャリパーを用いて腫瘍の発達を 1 週間に 2 回監視し、腫瘍の重量を、以下の式：腫瘍重量 = (長さ × 幅²) / 2 によって推定した。結果を図 5 に示す。23 体の Balb/c RAG2-/- mCD16-/- hCD16A+ トランスジェニックマウスに、JMT-1 乳癌細胞を、0 日目に s.c. 注射した。マウスを 3 つのグループに分け、ch4D5-野生型Fc (n = 8)、ch4D5-FcMT1 (n = 8)、又は PBS (陰性対照; n = 7) を用いて 8 週間に亘って腹腔内 (IP) 治療した。キャリパーを用いて腫瘍の発達を 1 週間に 2 回監視し、腫瘍の重量を、以下の式：腫瘍重量 = (長さ × 幅²) / 2 によって推定した。結果を図 6 に示

す。

【0316】

実施例5

マウス（卵巣癌モデル）における抗腫瘍活性

様々な抗体の抗腫瘍活性を、非トランスジェニック及びトランスジェニック（hCD16A）マウスを用いて、卵巣癌モデルで研究した。MacroGenics繁殖コロニーからの22体のR3-/-N/N非トランスジェニックマウスに、SKOV-3卵巣癌細胞を、0日目にs.c.注射した。マウスを4つのグループに分け、ch4D5-N297Q（n=5）、ch4D5-野生型Fc（n=6）、ch4D5-FcMT1（n=6）、又はPBS（陰性対照；n=5）を用いて8週間に亘って腹腔内（IP）治療した。キャリパーを用いて腫瘍の発達を1週間に2回監視し、腫瘍の重量を、以下の式：腫瘍重量 = (長さ × 幅²) / 2 によって推定した。このような治療の、生存に対する影響を、図7、パネルAに示す。MacroGenics繁殖コロニーからの32体のR3-/-N/N hCD16A+トランスジェニックマウスに、SKOV-3卵巣癌細胞を、0日目にs.c.注射した。マウスを4つのグループに分け、ch4D5-N297Q（n=8）、ch4D5-野生型Fc（n=8）、ch4D5-FcMT1（n=8）、又はPBS（陰性対照；n=8）を用いて8週間に亘って腹腔内（IP）治療した。キャリパーを用いて腫瘍の発達を1週間に2回監視し、腫瘍の重量を、以下の式：腫瘍重量 = (長さ × 幅²) / 2 によって推定した。このような治療の、生存に対する影響を、図7、パネルBに示す。MacroGenics繁殖コロニーからの96体のmCD16-/-huCD16A FoxN1-/- (nu/nu)トランスジェニックマウスに、SKOV-3卵巣癌細胞を、0日目にs.c.注射した。マウスを16体ずつの6つのグループに分け、ch4D5-FcMT3、ch4D5-FcMT1、ch4D5-FcMT4、ch4D5、ch4D5Ag又はPBS（陰性対照）を用いて8週間に亘って腹腔内（IP）治療した。キャリパーを用いて腫瘍の発達を1週間に2回監視し、腫瘍の重量を、以下の式：腫瘍重量 = (長さ × 幅²) / 2 によって推定した。このような治療の、生存に対する影響を、図8に示す。

10

20

【0317】

実施例6

様々な癌細胞株におけるADCCアッセイ

図9は、HER2/neuに関する、様々な癌細胞株の代表的な免疫組織化学染色を示す。細胞株を、DAKO Hercept Test（商標）（DakoCytomation、デンマーク、グロストループ）として販売されているHER2/neu試験キットで特定されるような、そのHER2/neu染色強度に従って、ランク付けした：HER2/neu染色なし（ダコスコア0）；弱いHER2/neu染色（ダコスコア1+）；中程度のHER2/neu染色（ダコスコア2+）；及び強いHER2/neu染色（ダコスコア3+）。パネルA～Mは、表6に示すような様々な細胞株を示す。

30

【0318】

【表 8】

表 6 : 図 9 の様々な細胞株の DAKO 染色				
パネル	細胞株	説明	部位/細胞	スコア
A	MDA-MB-435	乳癌	4.7×10^3	0
B	MDA-MB-231	乳腺癌	1.6×10^4	0
C	A549	肺腺癌	3.4×10^4	1+
D	OVCAR-8	卵巣癌	4.4×10^4	1+
E	MCF-7	乳腺癌	4.5×10^4	1+
F	BT-20	腺管癌	6.9×10^4	1+
G	HT-29	結腸癌/結腸直腸癌	9.4×10^4	1+
H	ZR75-1	腺管癌	1.4×10^5	2+
I	JIMT-1	乳癌	2.0×10^5	2+
J	MDA-MB-453	乳癌	2.8×10^5	3+
K	BT-474	腺管癌	2.0×10^6	3+
L	SKBR-3	乳癌	3.0×10^6	3+
M	mSKOV-3	卵巣癌	4.0×10^6	3+

10

20

【 0 3 1 9 】

ch4D5 - FcMT1、ch4D5 - FcMT2、ch4D5 - FcMT3、ch4D5 - FcWT (野生型Fc)、ch4D5 N297Q及びトラスツズマブ(対照として)を含む、Fc変異型ドメインを有するch4D5抗体を含むいくつかのch4D5抗体を、癌細胞株においてADCCを仲介する能力に関して試験した。確実なアッセイからのデータ(SR 20%MR、AICC 50%MR)を表7で報告するが、ここでEC₅₀推定値は、モデルが最大溶解>20%に適合している場合のみ確実なものであると見做した。EC₅₀と最大溶解パラメータとの比較は、Fc最適化抗体に関して得られた最良のフィット値が、Fc野生型ch4D5抗体に関して得られたものと統計的に異なっているかどうかを、二乗和F検定によって問うことによって実施した。データを、図10~13に示すS字状の用量-応答モデルにもフィットさせた。

30

【 0 3 2 0 】

【表 9】

表 7 : 様々な細胞株における ADCC アッセイ						
細胞株	抗体	EC50 (ng/mL)	p	最大溶 解 (%)	p	図 (パネル)
MDA-MB-435	ch4D5-FcMT1	ND	-	5	NS	10 (A)
	ch4D5-FcMT2	ND	-	13	NS	
	ch4D5-FcMT3	ND	-	7	NS	
	ch4D5-FcWT	ND	-	7	-	
	トラスツズマブ	ND	-	7	NS	
MDA-MB-231	ch4D5-FcMT1	4	NS	27	NS	10 (B)
	ch4D5-FcMT2	12	NS	29	NS	
	ch4D5-FcMT3	?	?	24	NS	
	ch4D5-FcWT	9	-	27	-	
	トラスツズマブ	7	NS	22	NS	
A549	ch4D5-FcMT1	14	-	34	<0.01	11 (A)
	ch4D5-FcMT2	21	-	24	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	> 100	-	23	<0.01	
	ch4D5-FcWT	ND	-	6	-	
	トラスツズマブ	ND	-	5	NS	
OVCAR-8	ch4D5-FcMT1	14	<0.01	43	<0.01	11 (B)
	ch4D5-FcMT2	21	<0.05	40	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	26	NS	36	<0.01	
	ch4D5-FcWT	57	-	16	-	
	トラスツズマブ	37	NS	13	NS	
MCF-7	ch4D5-FcMT1	4	<0.05	55	<0.01	11 (C)
	ch4D5-FcMT2	9	NS	51	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	8	NS	48	<0.01	
	ch4D5-FcWT	23	NS	32	-	
	トラスツズマブ	9	-	21	NS	
BT-20	ch4D5-FcMT1	42	<0.01	66	<0.01	11 (D)
	ch4D5-FcMT2	78	<0.01	62	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	67	<0.01	55	<0.01	
	ch4D5-FcWT	>100	-	33	-	
	トラスツズマブ	>100	NS	25	NS	

10

20

30

40

表7：様々な細胞株における ADCC アッセイ						
細胞株	抗体	EC50 (ng/mL)	p	最大溶 解 (%)	p	図 (パネル)
HT-29	ch4D5-FcMT1	0.4	-	43	<0.01	11 (E)
	ch4D5-FcMT2	0.5	-	44	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	1	-	38	<0.01	
	ch4D5-FcWT	ND	-	13	-	
ZR75-1	ch4D5-FcMT1	14	<0.01	78	<0.01	12 (A)
	ch4D5-FcMT2	20	NS	67	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	26	<0.01	63	<0.01	
	ch4D5-FcWT	38	-	38	-	
	トラスツズマブ	ND	-	23	<0.01	
JIMT-1	ch4D5-FcMT1	8	NS	73	<0.01	12 (B)
	ch4D5-FcMT2	7	<0.05	70	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	10	NS	65	<0.01	
	ch4D5-FcWT	22	-	43	-	
	トラスツズマブ	10	NS	34	NS	
MDA-MB-453	ch4D5-FcMT1	3	<0.05	59	<0.01	13 (A)
	ch4D5-FcMT2	4	<0.05	58	<0.01	
	ch4D5-FcMT3	6	NS	57	<0.01	
	ch4D5-FcWT	11	-	45	-	
	トラスツズマブ	3	<0.05	31	<0.01	
BT-474	ch4D5-FcMT1	3	<0.01	73	<0.01	13 (B)
	ch4D5-FcMT2	3	<0.05	58	NS	
	ch4D5-FcMT3	4	<0.05	71	NS	
	ch4D5-FcWT	11	-	64	-	
	トラスツズマブ	7	NS	60	NS	
SKBR-3	ch4D5-FcMT1	0.4	<0.01	64	NS	13 (C)
	ch4D5-FcMT3	0.8	<0.01	61	NS	
	ch4D5-FcWT	6	-	62	-	
mSKOV-3	ch4D5-FcMT1	1.2	NS	71	<0.01	13 (D)
	ch4D5-FcMT2	7	<0.05	43	<0.05	
	ch4D5-FcMT3	0.9	<0.05	56	NS	
	ch4D5-FcWT	3	-	58	-	

10

20

30

40

【 0 3 2 1 】

実施例7 T細胞増殖時の共刺激又はチェックポイント標的に対するモノクローナル抗体の活性

アロ-M L Rアッセイにおいて、T細胞を、H L Aミスマッチ (Latchman, Y.E. et al . (2004) " PD-L1-Deficient Mice Show That PD-L1 On T-Cells, Antigen-Presenting C

50

ells, And Host Tissues Negatively Regulates T-Cells.” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(29):10691-10696; Wang, W. et al. (2008) “PD-L1/PD-1 Signal Deficiency Promotes Allogeneic Immune Responses And Accelerates Heart Allograft Rejection,” Transplantation 86(6):836-44) 又は分裂促進 / 薬理的刺激に应答して増殖するよう誘導する。共刺激分子を標的とするアゴニスト抗体は、T細胞シグナリングの再強化、及びT細胞エフェクタ機能を促進する転写因子の安定化によって、増殖応答を誘導することが知られている (Melerio, I. et al. (2013) “Agonist Antibodies to TNFR Molecules That Costimulate T and NK Cells,” Clin. Cancer Res. 19(5):1044-1053)。同様に、T細胞応答を下方調節する重要なチェックポイント分子 (チェックポイント阻害因子) を標的とするアンタゴニスト抗体は、T細胞シグナリング及びエフェクタ機能の維持、並びにそれによる抗腫瘍免疫の改善によって、増殖応答を誘導できる (Capece, D. et al. (2012) “Targeting Costimulatory Molecules to Improve Antitumor Immunity,” J. Biomed. Biotech. 2012:926321)。同種抗原に应答しての増殖における、共刺激又はチェックポイント標的に対するモノクローナル抗体の影響は、以下の³H-チミジンの取り込みによる続く短期混合リンパ球 (アロ-MLR) 反応において容易に測定できる。チェックポイント阻害剤に対して抗体が増殖を増強する能力を扱うために、抗PD-1又は抗LAG-3 mAbを産生し、精製し、アロ-MLRアッセイの開始時に、20、10、5、2.5及び1.25 µg/mlの量で外因的に添加した (図14)。5~6日目の終わりに、96ウェルプレートに³H-チミジンを送り込み、18時間培養して増殖を測定した。ヒトPD-1、LAG-3及びCTLA-4に対するいくつかのベンチマーク抗体を、アロ抗原刺激に应答してのT細胞増殖を増強する能力において評価した。図15に示すように、アロMLRアッセイの開始時におけるPD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558)、PD-1 mAb 2 (MK-3475; Merck、ランプロリズマブ) 及びPD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber) の添加は、IgG1アイソタイプ対照抗体、又はレスポダ及びステイミュレータを含有する対照ウェルに比べて強いT細胞増殖応答を誘起した。照射した刺激細胞のみを含有するウェルは、増殖を示さなかった。用量依存性増殖応答が観察されたものの、PD-1 mAb 4 (CT-011; CureTech、BAT-1) は、PD-1 mAb 1 (5C4; BMS-936558)、PD-1 mAb 2 (MK-3475; Merck、ランプロリズマブ) 又はPD-1 mAb 3 (EH12.2H7; Dana Farber) に比べて最小の増殖を示した。LAG-3 mAb 1 (25F7; BMS-986016、Medarex/BMS) についてもわずかな用量依存性増殖応答が観察され、これを同様にYervoy (登録商標) イピリムマブ、抗CTLA-4 mAb (Bristol Myers-Squibb) と比較した。

10

20

30

40

50

【0322】

実施例8 マルゲツキシマブ及びペンプロリズマブの用量段階的増加研究

用量段階的増加研究を実施して、およそ200mgの固定用量のペンプロリズマブと組み合わせ投与される、用量が段階的に増加するマルゲツキシマブの、最大耐用量 (MTD) 又は (MTDが画定されない場合は) 最大投与用量 (MAD) を決定する。その後コホート拡大段階を続けて、上記用量段階的増加研究で確立したマルゲツキシマブとの組み合わせの安全性及び初期有効性を更に画定した。マルゲツキシマブ及びペンプロリズマブの両方を、3週間毎に投与する。これら両方の作用剤を同日中に投与し、ペンプロリズマブをまず投与した後、マルゲツキシマブを投与した。療法の各サイクルは3週間と画定され、マルゲツキシマブ及びペンプロリズマブを1日目に与える。腫瘍の評価を、研究中に、好ましくは治療のサイクルが2回終了するたびに (即ち6週間毎 [サイクル2、4、6等の終了時] に) 実施してよい。

【0323】

コホート患者において、200mgのペンプロリズマブと組み合わせた2つの順次段階的に増加する用量、即ちおよそ10mg/kg体重及びおよそ15mg/kg体重のマルゲツキシマブを評価してよい。MTDが第1の用量コホートにおいて過剰であることが決

定された場合、200 mg のペンブロリズマブと組み合わせたより低い用量（例えば 6 mg / kg）のマルゲツキシマブを評価するための、用量を段階的に減少させたコホートを利用してよい。より高い用量（例えば 18 mg / kg）のマルゲツキシマブを、研究の段階的增加部分中に調査してよい。

【0324】

コホート拡大段階のために、複数の患者が登録され、上記患者は、200 mg のペンブロリズマブと組み合わせた上記研究の用量段階的增加段階から確立された MTD（又は MAD）のマルゲツキシマブを受容することになる。

【0325】

本明細書において言及されている全ての公刊物及び特許は、個々の公刊物又は特許出願それぞれの全体が参照により本明細書に援用されていることが具体的かつ独立に指示されている場合と同程度に、参照により本明細書に援用されている。本発明をその具体的実施形態に関して説明したが、更なる修正形態が可能であり、本出願は、本発明が属する分野の公知の方法又は慣例の範囲内であるような、及びこれまでに挙げた必須の特徴に適用できるような、本開示からの逸脱を含む、本発明の原理に概ね従う本発明のいずれの変形、使用又は改変を包含することを意図していることを理解されたい。

10

【配列表フリーテキスト】

【0326】

配列表の数字見出し < 223 > の記載は以下のとおりである。

配列番号 1：好ましい変異型キメラ 4 D 5 抗体の軽鎖をエンコードするポリヌクレオチド

20

配列番号 2：好ましい変異型キメラ 4 D 5 抗体の軽鎖

配列番号 3：マウス 4 D 5 抗体の軽鎖可変ドメイン

配列番号 4：キメラ 4 D 5 VL 領域

配列番号 5：ヒト化 4 D 5 抗体の軽鎖可変ドメイン

配列番号 6：野生型 Fc 領域を有するキメラ 4 D 5 重鎖をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号 7：野生型 Fc 領域を有するキメラ 4 D 5 重鎖

配列番号 8：FcMT1 変異型 Fc 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖をエンコードするポリヌクレオチド

30

配列番号 9：FcMT1 変異型 Fc 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖

配列番号 10：FcMT2 変異型 Fc 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号 11：FcMT2 変異型 Fc 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖

配列番号 12：FcMT3 変異型 Fc 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号 13：FcMT3 変異型 Fc 領域を有する変異型キメラ 4 D 5 抗体の重鎖

配列番号 14：ヒト PD - 1

配列番号 15：PD - 1 mAb 1 の重鎖可変ドメイン

配列番号 16：PD - 1 mAb 1 の CDRH1

40

配列番号 17：PD - 1 mAb 1 の CDRH2

配列番号 18：PD - 1 mAb 1 の CDRH3

配列番号 19：PD - 1 mAb 1 の軽鎖可変ドメイン

配列番号 20：PD - 1 mAb 1 の CDR L1

配列番号 21：PD - 1 mAb 1 の CDR L2

配列番号 22：PD - 1 mAb 1 の CDR L3

配列番号 23：PD - 1 mAb 2 の重鎖可変ドメイン

配列番号 24：PD - 1 mAb 2 の重鎖可変ドメインの CDR 1

配列番号 25：PD - 1 mAb 2 の重鎖可変ドメインの CDR 2

配列番号 26：PD - 1 mAb 2 の重鎖可変ドメインの CDR 3

50

配列番号 27	: PD - 1	m A b	2の軽鎖可変ドメイン	
配列番号 28	: PD - 1	m A b	2の軽鎖可変ドメインのCDR1	
配列番号 29	: PD - 1	m A b	2の軽鎖可変ドメインのCDR2	
配列番号 30	: PD - 1	m A b	2の軽鎖可変ドメインのCDR3	
配列番号 31	: PD - 1	m A b	3の重鎖可変ドメイン	
配列番号 32	: PD - 1	m A b	3の重鎖可変ドメインのCDR1	
配列番号 33	: PD - 1	m A b	3の重鎖可変ドメインのCDR2	
配列番号 34	: PD - 1	m A b	3の重鎖可変ドメインのCDR3	
配列番号 35	: PD - 1	m A b	3の軽鎖可変ドメイン	
配列番号 36	: PD - 1	m A b	3の軽鎖可変ドメインのCDR1	10
配列番号 37	: PD - 1	m A b	3の軽鎖可変ドメインのCDR2	
配列番号 38	: PD - 1	m A b	3の軽鎖可変ドメインのCDR3	
配列番号 39	: PD - 1	m A b	4の重鎖可変ドメイン	
配列番号 40	: PD - 1	m A b	4の重鎖可変ドメインのCDR1	
配列番号 41	: PD - 1	m A b	4の重鎖可変ドメインのCDR2	
配列番号 42	: PD - 1	m A b	4の重鎖可変ドメインのCDR3	
配列番号 43	: PD - 1	m A b	4の軽鎖可変ドメイン	
配列番号 44	: PD - 1	m A b	4の軽鎖可変ドメインのCDR1	
配列番号 45	: PD - 1	m A b	4の軽鎖可変ドメインのCDR2	
配列番号 46	: PD - 1	m A b	4の軽鎖可変ドメインのCDR3	20
配列番号 47	: マウス 4 D 5 抗体の重鎖可変ドメイン			
配列番号 48	: ヒト化 4 D 5 抗体の重鎖可変ドメイン			
配列番号 49	: I g G 1 F c 領域 ; X はリジン (K) 又は不在である			
配列番号 50	: 例示的なヒト I g G 2 の C H 2 - C H 3 ドメイン ; X はリジン (K) 又は不在である			
配列番号 51	: 例示的なヒト I g G 3 の C H 2 - C H 3 ドメイン ; X はリジン (K) 又は不在である			
配列番号 52	: 例示的なヒト I g G 4 の C H 2 - C H 3 ドメイン ; X はリジン (K) 又は不在である			
配列番号 53	: PD - 1	m A b	5の重鎖可変ドメイン	30
配列番号 54	: PD - 1	m A b	5の重鎖可変ドメインのCDR1	
配列番号 55	: PD - 1	m A b	5の重鎖可変ドメインのCDR2	
配列番号 56	: PD - 1	m A b	5の重鎖可変ドメインのCDR3	
配列番号 57	: PD - 1	m A b	5の軽鎖可変ドメイン	
配列番号 58	: PD - 1	m A b	5の軽鎖可変ドメインのCDR1	
配列番号 59	: PD - 1	m A b	5の軽鎖可変ドメインのCDR2	
配列番号 60	: PD - 1	m A b	5の軽鎖可変ドメインのCDR3	
配列番号 61	: PD - 1	m A b	6の重鎖可変ドメイン	
配列番号 62	: PD - 1	m A b	6の重鎖可変ドメインのCDR1	
配列番号 63	: PD - 1	m A b	6の重鎖可変ドメインのCDR2	40
配列番号 64	: PD - 1	m A b	6の重鎖可変ドメインのCDR3	
配列番号 65	: PD - 1	m A b	6の軽鎖可変ドメイン ; X1 は N 若しくは S であり、かつ X2 は Q 若しくは R であるか ; 又は X1 は N であり、X2 は Q であるか ; 又は X1 は S であり、X2 は Q であるか ; 又は X1 は S であり、X2 は R である	
配列番号 66	: PD - 1	m A b	6の軽鎖可変ドメインのCDR1 ; X1 は N 若しくは S であり、かつ X2 は Q 若しくは R であるか ; 又は X1 は N であり、X2 は Q であるか ; 又は X1 は S であり、X2 は Q であるか ; 又は X1 は S であり、X2 は R である	
配列番号 67	: PD - 1	m A b	6の軽鎖可変ドメインのCDR2 ; X1 は N 若しくは S であり、かつ X2 は Q 若しくは R であるか ; 又は X1 は N であり、X2 は Q であるか ; 又は X1 は S であり、X2 は Q であるか ; 又は X1 は S であり、X2 は R である	50

配列番号 68 : PD - 1 mAb 6 の軽鎖可変ドメインの CDR3 ; X1 は N 若しくは S であり、かつ X2 は Q 若しくは R であるか ; 又は X1 は N であり、X2 は Q であるか ; 又は X1 は S であり、X2 は Q であるか ; 又は X1 は S であり、X2 は R である

配列番号 69 : PD - 1 mAb 7 の重鎖可変ドメイン ; X1 は V 若しくは A であり、X2 は S 若しくは G であり、X3 は V 若しくは T であり、X4 は L 若しくは A であるか ; X1 は V であり、X2 は S であり、X3 は V であり、X4 は L であるか ; 又は X1 は A であり、X2 は G であり、X3 は T であり、X4 は A である

配列番号 70 : PD - 1 mAb 7 の重鎖可変ドメインの CDR1 ; X1 は V 若しくは A であり、X2 は S 若しくは G であり、X3 は V 若しくは T であり、X4 は L 若しくは A であるか ; X1 は V であり、X2 は S であり、X3 は V であり、X4 は L であるか ; 又は X1 は A であり、X2 は G であり、X3 は T であり、X4 は A である

配列番号 71 : PD - 1 mAb 7 の重鎖可変ドメインの CDR2 ; X1 は V 若しくは A であり、X2 は S 若しくは G であり、X3 は V 若しくは T であり、X4 は L 若しくは A であるか ; X1 は V であり、X2 は S であり、X3 は V であり、X4 は L であるか ; 又は X1 は A であり、X2 は G であり、X3 は T であり、X4 は A である

配列番号 72 : PD - 1 mAb 7 の重鎖可変ドメインの CDR3 ; X1 は V 若しくは A であり、X2 は S 若しくは G であり、X3 は V 若しくは T であり、X4 は L 若しくは A であるか ; X1 は V であり、X2 は S であり、X3 は V であり、X4 は L であるか ; 又は X1 は A であり、X2 は G であり、X3 は T であり、X4 は A である

配列番号 73 : PD - 1 mAb 7 の軽鎖可変ドメイン ; X1 は N 若しくは S であり、X2 は N 若しくは D であるか ; X1 は S であり、X2 は N であるか ; 又は X1 は N であり、X2 は D である

配列番号 74 : PD - 1 mAb 7 の CDR L1 ; X1 は N 若しくは S であり、X2 は N 若しくは D であるか ; X1 は S であり、X2 は N であるか ; 又は X1 は N であり、X2 は D である

配列番号 75 : PD - 1 mAb 7 の CDR L2 ; X1 は N 若しくは S であり、X2 は N 若しくは D であるか ; X1 は S であり、X2 は N であるか ; 又は X1 は N であり、X2 は D である

配列番号 76 : PD - 1 mAb 7 の CDR L3

配列番号 77 : PD - 1 mAb 8 の重鎖可変ドメイン

配列番号 78 : PD - 1 mAb 8 の CDR H1

配列番号 79 : PD - 1 mAb 8 の CDR H2

配列番号 80 : PD - 1 mAb 8 の CDR H3

配列番号 81 : PD - 1 mAb 8 の軽鎖可変ドメイン

配列番号 82 : PD - 1 mAb 8 の CDR L1

配列番号 83 : PD - 1 mAb 8 の CDR L2

配列番号 84 : PD - 1 mAb 8 の CDR L3

配列番号 85 : CL ドメイン

配列番号 86 : IgG4 CH1 ドメイン及び安定化ヒンジ

配列番号 87 : PD - 1 mAb 6 - ISQ の完全な重鎖

10

20

30

40

【 図 1 】

	10	20	30	
マウス	DIVMTQSHKF	MSTSVGDRVS	ITCKASQDVN	
キメラ	DIVMTQSHKF	MSTSVGDRVS	ITCKASQDVN	
ヒト化	DIQMTQSPSS	LSASVGDRVT	ITCRASQDVN	
	40	50	60	
マウス	TAVAWYQQKP	GHSPKLLIYS	ASFRYTGVPD	
キメラ	TAVAWYQQKP	GHSPKLLIYS	ASFRYTGVPD	
ヒト化	TAVAWYQQKP	GKAPKLLIYS	ASFLESGVPS	
	70	80	90	
マウス	RFTGNRSQTD	FTFTISSVQA	EDLAVYYCQQ	
キメラ	RFTGSRSGTD	FTFTISSVQA	EDLAVYYCQQ	
ヒト化	RFSGSRSGTD	FTLTISSLQP	EDFATYYCQQ	
	100	109		
マウス	HYTTPPTFGG	GTKLEIKRA	配列番号：3	
キメラ	HYTTPPTFGG	GTKVEIKRT	配列番号：4	
ヒト化	HYTTPPTFGQ	GTKVEIKRT	配列番号：5	

【 図 2 】

MT1	QVQLQQSGFPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY	60
MT2	QVQLQQSGFPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY	60
MT3	QVQLQQSGFPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY	60
WT	QVQLQQSGFPELVKPGASLKLSCTASGFNIKDTYIHWVKQRPEQGLEWIGRIYPTNGYTRY	60
MT1	DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRRLTSEDVAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTVSS	120
MT2	DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRRLTSEDVAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTVSS	120
MT3	DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRRLTSEDVAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTVSS	120
WT	DPKFQDKATITADTSSNTAYLQVSRRLTSEDVAVYCSRWGGDGFYAMDYWGQASVTVSS	120
MT1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	180
MT2	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	180
MT3	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	180
WT	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS	180
MT1	GLYSLSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG	240
MT2	GLYSLSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG	240
MT3	GLYSLSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG	240
WT	GLYSLSVVTVFSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGG	240
MT1	PSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	300
MT2	PSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	300
MT3	PSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	300
WT	PSVFLPPPKKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN	300
MT1	STLRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE	360
MT2	STLRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE	360
MT3	STLRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE	360
WT	STLRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDE	360
MT1	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	420
MT2	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	420
MT3	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	420
WT	LTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW	420
MT1	QQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	450
MT2	QQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	450
MT3	QQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	450
WT	QQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	450

Figure 2

Figure 1

【 図 3 】

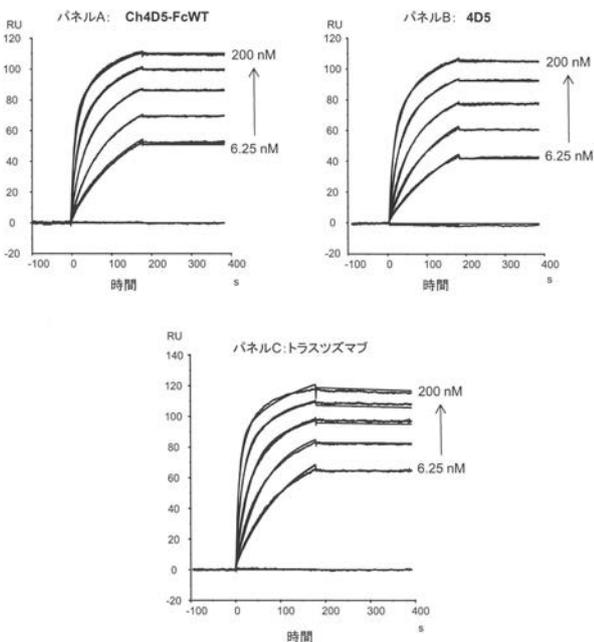


Figure 3

【 図 4 】

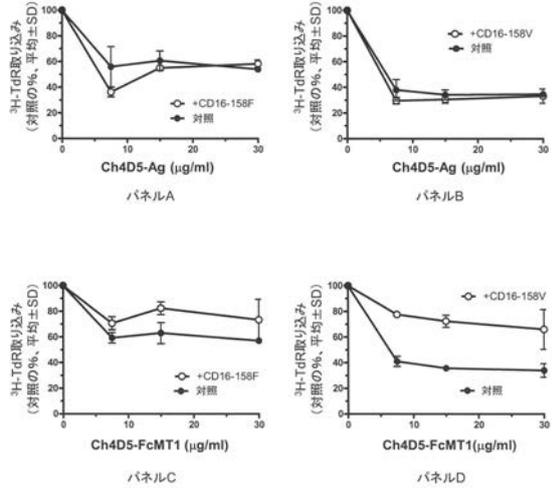


Figure 4

【 図 5 】

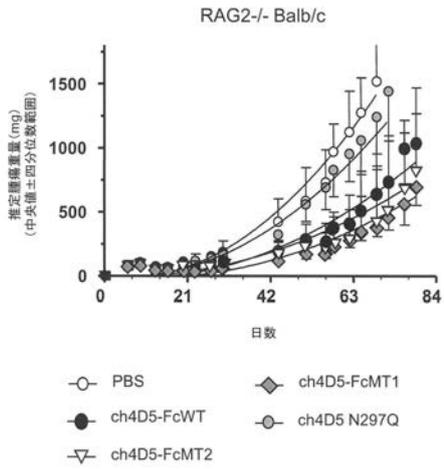


Figure 5

【 図 6 】

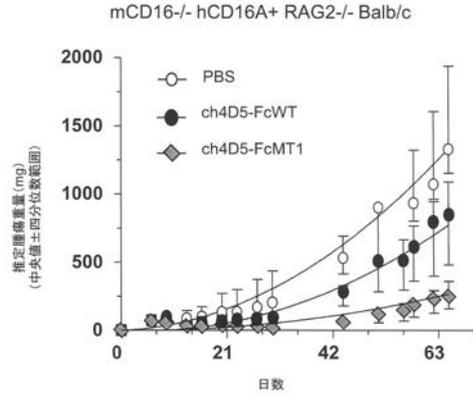


Figure 6

【 図 7 】

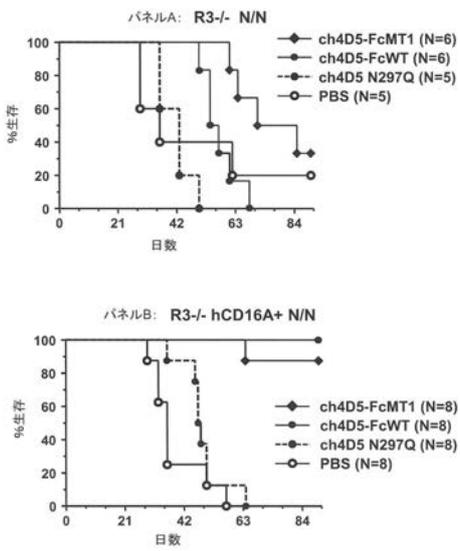


Figure 7

【 図 8 】

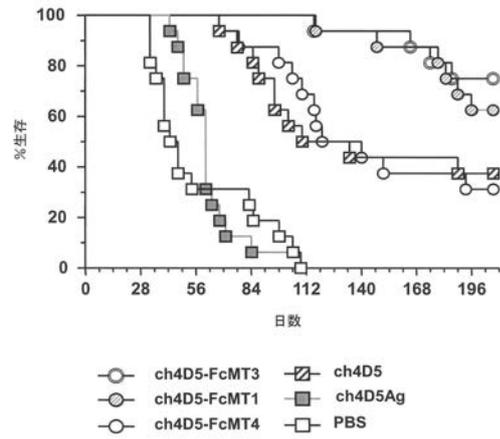


Figure 8

【 図 9 】

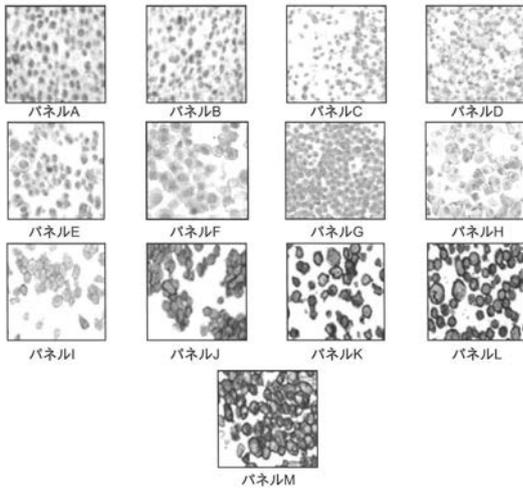


Figure 9

【 図 1 0 】

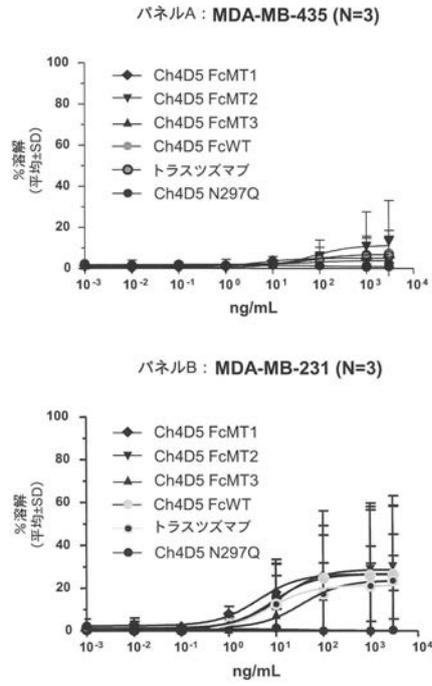


Figure 10

【 図 1 1 】

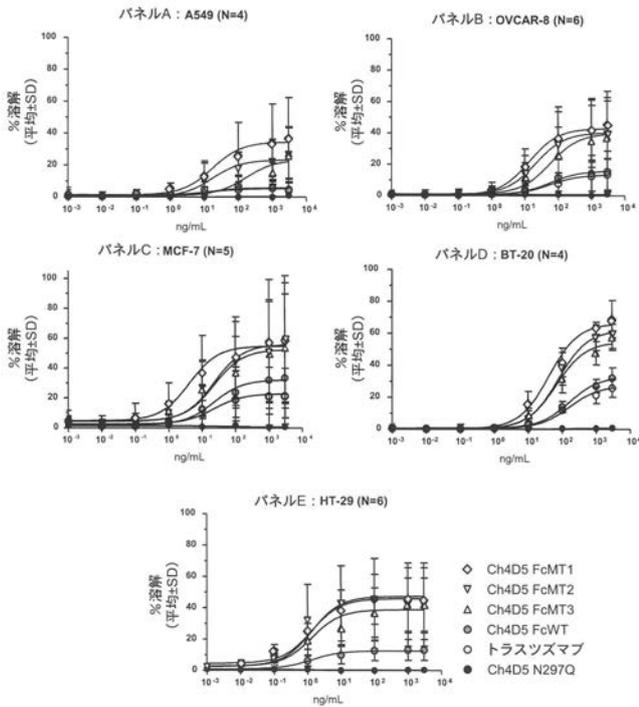


FIG. 11

【 図 1 2 】

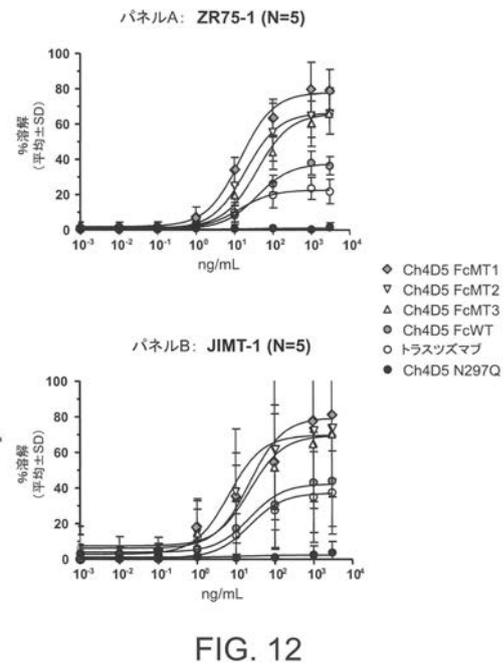


FIG. 12

【 図 1 3 】

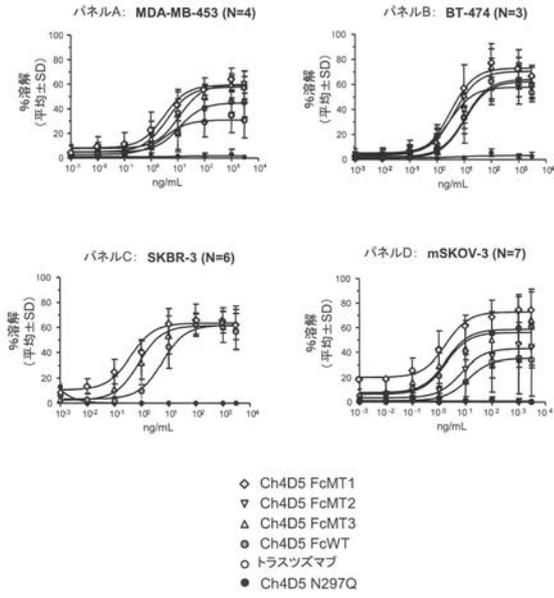


FIG. 13

【 図 1 4 】

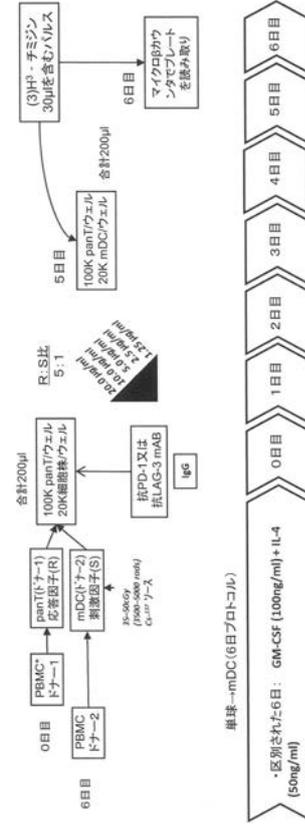


FIG. 14

【 図 1 5 】

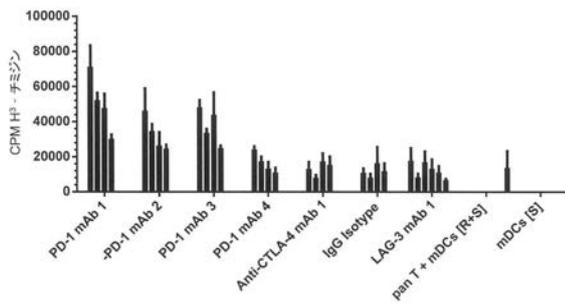


FIG. 15

【配列表】

2018516966000001.app

【手続補正書】

【提出日】平成30年4月3日(2018.4.3)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0326

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0326】

配列表の数字見出し<223>の記載は以下のとおりである。

配列番号1：好ましい変異型キメラ4D5抗体の軽鎖をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号2：好ましい変異型キメラ4D5抗体の軽鎖

配列番号3：マウス4D5抗体の軽鎖可変ドメイン

配列番号4：キメラ4D5VL領域

配列番号5：ヒト化4D5抗体の軽鎖可変ドメイン

配列番号6：野生型Fc領域を有するキメラ4D5重鎖をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号7：野生型Fc領域を有するキメラ4D5重鎖

配列番号8：FcMT1変異型Fc領域を有する変異型キメラ4D5抗体の重鎖をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号9：FcMT1変異型Fc領域を有する変異型キメラ4D5抗体の重鎖

配列番号10：FcMT2変異型Fc領域を有する変異型キメラ4D5抗体の重鎖をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号11：FcMT2変異型Fc領域を有する変異型キメラ4D5抗体の重鎖

配列番号12：FcMT3変異型Fc領域を有する変異型キメラ4D5抗体をエンコードするポリヌクレオチド

配列番号13：FcMT3変異型Fc領域を有する変異型キメラ4D5抗体の重鎖

配列番号14：ヒトPD-1

配列番号15：PD-1 mAb 1の重鎖可変ドメイン

配列番号16：PD-1 mAb 1のCDRH1

配列番号17：PD-1 mAb 1のCDRH2

配列番号18：PD-1 mAb 1のCDRH3

配列番号19：PD-1 mAb 1の軽鎖可変ドメイン

配列番号20：PD-1 mAb 1のCDRL1

配列番号21：PD-1 mAb 1のCDRL2

配列番号22：PD-1 mAb 1のCDRL3

配列番号23：PD-1 mAb 2の重鎖可変ドメイン

配列番号24：PD-1 mAb 2の重鎖可変ドメインのCDR1

配列番号25：PD-1 mAb 2の重鎖可変ドメインのCDR2

配列番号26：PD-1 mAb 2の重鎖可変ドメインのCDR3

配列番号27：PD-1 mAb 2の軽鎖可変ドメイン

配列番号28：PD-1 mAb 2の軽鎖可変ドメインのCDR1

配列番号29：PD-1 mAb 2の軽鎖可変ドメインのCDR2

配列番号30：PD-1 mAb 2の軽鎖可変ドメインのCDR3

配列番号31：PD-1 mAb 3の重鎖可変ドメイン

配列番号32：PD-1 mAb 3の重鎖可変ドメインのCDR1

配列番号33：PD-1 mAb 3の重鎖可変ドメインのCDR2

配列番号34：PD-1 mAb 3の重鎖可変ドメインのCDR3

- 配列番号 35 : P D - 1 m A b 3 の軽鎖可変ドメイン
- 配列番号 36 : P D - 1 m A b 3 の軽鎖可変ドメインの C D R 1
- 配列番号 37 : P D - 1 m A b 3 の軽鎖可変ドメインの C D R 2
- 配列番号 38 : P D - 1 m A b 3 の軽鎖可変ドメインの C D R 3
- 配列番号 39 : P D - 1 m A b 4 の重鎖可変ドメイン
- 配列番号 40 : P D - 1 m A b 4 の重鎖可変ドメインの C D R 1
- 配列番号 41 : P D - 1 m A b 4 の重鎖可変ドメインの C D R 2
- 配列番号 42 : P D - 1 m A b 4 の重鎖可変ドメインの C D R 3
- 配列番号 43 : P D - 1 m A b 4 の軽鎖可変ドメイン
- 配列番号 44 : P D - 1 m A b 4 の軽鎖可変ドメインの C D R 1
- 配列番号 45 : P D - 1 m A b 4 の軽鎖可変ドメインの C D R 2
- 配列番号 46 : P D - 1 m A b 4 の軽鎖可変ドメインの C D R 3
- 配列番号 47 : マウス 4 D 5 抗体の重鎖可変ドメイン
- 配列番号 48 : ヒト化 4 D 5 抗体の重鎖可変ドメイン
- 配列番号 49 : I g G 1 F c 領域 ; X はリジン (K) 又は不在である
- 配列番号 50 : 例示的なヒト I g G 2 の C H 2 - C H 3 ドメイン ; X はリジン (K) 又は不在である
- 配列番号 51 : 例示的なヒト I g G 3 の C H 2 - C H 3 ドメイン ; X はリジン (K) 又は不在である
- 配列番号 52 : 例示的なヒト I g G 4 の C H 2 - C H 3 ドメイン ; X はリジン (K) 又は不在である
- 配列番号 53 : P D - 1 m A b 5 の重鎖可変ドメイン
- 配列番号 54 : P D - 1 m A b 5 の重鎖可変ドメインの C D R 1
- 配列番号 55 : P D - 1 m A b 5 の重鎖可変ドメインの C D R 2
- 配列番号 56 : P D - 1 m A b 5 の重鎖可変ドメインの C D R 3
- 配列番号 57 : P D - 1 m A b 5 の軽鎖可変ドメイン
- 配列番号 58 : P D - 1 m A b 5 の軽鎖可変ドメインの C D R 1
- 配列番号 59 : P D - 1 m A b 5 の軽鎖可変ドメインの C D R 2
- 配列番号 60 : P D - 1 m A b 5 の軽鎖可変ドメインの C D R 3
- 配列番号 61 : P D - 1 m A b 6 の重鎖可変ドメイン ; X a a はイソロイシン (I) 又はアラニン (A) である
- 配列番号 62 : P D - 1 m A b 6 の重鎖可変ドメインの C D R 1
- 配列番号 63 : P D - 1 m A b 6 の重鎖可変ドメインの C D R 2
- 配列番号 64 : P D - 1 m A b 6 の重鎖可変ドメインの C D R 3
- 配列番号 65 : P D - 1 m A b 6 の軽鎖可変ドメイン ; 26 位の X a a はアスパラギン (N) 又はセリン (S) であり ; 58 位の X a a はグルタミン (Q) 又はアルギニン (R) である
- 配列番号 66 : P D - 1 m A b 6 の軽鎖可変ドメインの C D R 1 ; X a a はアスパラギン (N) 又はセリン (S) である
- 配列番号 67 : P D - 1 m A b 6 の軽鎖可変ドメインの C D R 2 ; X a a はグルタミン (Q) 又はアルギニン (R) である
- 配列番号 68 : P D - 1 m A b 6 の軽鎖可変ドメインの C D R 3
- 配列番号 69 : P D - 1 m A b 7 の重鎖可変ドメイン ; X 1 は V 若しくは A であり、X 2 は S 若しくは G であり、X 3 は V 若しくは T であり、X 4 は L 若しくは A であるか ; X 1 は V であり、X 2 は S であり、X 3 は V であり、X 4 は L であるか ; 又は X 1 は A であり、X 2 は G であり、X 3 は T であり、X 4 は A である
- 配列番号 70 : P D - 1 m A b 7 の重鎖可変ドメインの C D R 1 ; X a a はセリン (S) 又はグリシン (G) である
- 配列番号 71 : P D - 1 m A b 7 の重鎖可変ドメインの C D R 2
- 配列番号 72 : P D - 1 m A b 7 の重鎖可変ドメインの C D R 3

配列番号 73 : P D - 1 m A b 7 の軽鎖可変ドメイン ; X 1 は N 若しくは S であり、X 2 は N 若しくは D であるか ; X 1 は S であり、X 2 は N であるか ; 又は X 1 は N であり、X 2 は D である

配列番号 74 : P D - 1 m A b 7 の C D R L 1 ; X a a は アスパラギン (N) 又はセリン (S) である

配列番号 75 : P D - 1 m A b 7 の C D R L 2 ; X a a は アスパラギン (N) 又はアスパラギン酸 (D) である

配列番号 76 : P D - 1 m A b 7 の C D R L 3

配列番号 77 : P D - 1 m A b 8 の重鎖可変ドメイン

配列番号 78 : P D - 1 m A b 8 の C D R H 1

配列番号 79 : P D - 1 m A b 8 の C D R H 2

配列番号 80 : P D - 1 m A b 8 の C D R H 3

配列番号 81 : P D - 1 m A b 8 の軽鎖可変ドメイン

配列番号 82 : P D - 1 m A b 8 の C D R L 1

配列番号 83 : P D - 1 m A b 8 の C D R L 2

配列番号 84 : P D - 1 m A b 8 の C D R L 3

配列番号 85 : C L ドメイン

配列番号 86 : I g G 4 C H 1 ドメイン及び安定化ヒンジ

配列番号 87 : P D - 1 m A b 6 - I S Q の完全な重鎖

【 手続補正 2 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 変更

【 補正の内容 】

【 配列表 】

2018516966000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US2016/036608
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(B) - A61K 9/00; A61K 39/00; A61K 39/395 (2016.01) CPC - A61K 39/395; A61K 39/3955; A61K 2039/545 (2016.08) According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC - A61K 9/00; A61K 39/00; A61K 39/395 CPC - A61K 39/395; A61K 39/3955; A61K 2039/545 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC - 424/130.1; 424/174.1; 530/389.1 (keyword delimited) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Patbase, Google Patents, PubMed, Google Search terms used: 4D5 PD-1 antibody Fc immune checkpoint inhibitor cancer administer combination		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ---	US 2011/0097323 A1 (JOHNSON et al) 28 April 2011 (28.04.2011) entire document	1
Y		2-5
Y	WO 2014/055648 A1 (BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY) 10 April 2014 (10.04.2014) entire document	2-5
Y	WO 2015/036394 A1 (MEDIMMUNE LIMITED) 19 March 2015 (19.03.2015) entire document	4, 5
A	US 2008/0102069 A1 (FRIESS et al) 01 May 2008 (01.05.2008) entire document	1-5
A	WO 2011/159877 A2 (THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC. et al) 22 December 2011 (22.12.2011) entire document	1-5
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 18 August 2016		Date of mailing of the international search report 24 OCT 2016
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Blaine R. Copenheaver PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/036608

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

SEQ ID NOs: 4, 9, 11, and 13 were searched.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/036608

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

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

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.: 6-28
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

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

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I		テーマコード (参考)	
C 1 2 N 15/11 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	D	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 1 2 N	15/11	Z N A Z	
	C 0 7 K	16/28		

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

(72) 発明者 レヒライダー ロバート ヨセフ
 アメリカ合衆国 20814 メリーランド州, ベセスダ, ノース ブルック レーン 116

(72) 発明者 ケーニヒ スコット
 アメリカ合衆国 20852 メリーランド州, ロックヴィル, ラルストン ロード 10901

(72) 発明者 ボンビニ エツィオ
 アメリカ合衆国 20854 メリーランド州, ポトマック, パウダー ホーン ドライブ 11136

F ターム(参考) 4C084 AA19 AA23 MA02 MA66 NA05 ZB072 ZB261 ZB262 ZC751
 4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB42 CC21 CC23 EE03 GG01
 4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA50 DA75 DA76 EA20 FA74