

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公開特許公報(A)

(11) 特許出願公開番号

特開2021-113202
(P2021-113202A)

(43) 公開日 令和3年8月5日(2021.8.5)

(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 T	4 C 0 7 6
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 Z N A E	4 C 0 8 4
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 9/20 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	

審査請求 有 請求項の数 1 O L (全 123 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2021-66466 (P2021-66466)
 (22) 出願日 令和3年4月9日 (2021.4.9)
 (62) 分割の表示 特願2016-567851 (P2016-567851)
 の分割
 原出願日 平成27年5月15日 (2015.5.15)
 (31) 優先権主張番号 1408673.0
 (32) 優先日 平成26年5月15日 (2014.5.15)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 英国 (GB)

(特許庁注：以下のものは登録商標)
 1. WINDOWS

(71) 出願人 506209743
 バイオインヴェント インターナショナル
 アーベー
 スウェーデン国 ルンド 70 エスー2
 23 ソルヴェガタン 41
 (74) 代理人 110000729
 特許業務法人 ユニアス国際特許事務所
 (72) 発明者 フレンデウス、ビョルン
 スウェーデン国 261 30 ランズク
 ルーナ、バドフスガタン 26
 (72) 発明者 テイジ、イングリッド
 スウェーデン国 224 57 ルンド、
 ラケットガタン 6

最終頁に続く

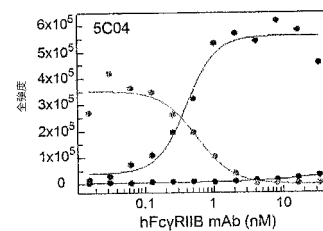
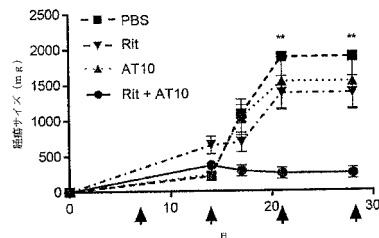
(54) 【発明の名称】 薬物、その使用及び方法

(57) 【要約】 (修正有)

【課題】再発癌及び/または難治性癌に効果的な、抗体分子及び薬剤を含む組成物、ならびに、抗体分子及び薬剤を投与することを含む、再発癌及び/または難治性癌を処置する方法、抗体分子及び薬剤を含むキットを提供する。

【解決手段】(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、Fc RIIbに結合することができるFcドメインを有する、抗体分子を、(ii) Fc RIIbが前記抗体分子の前記Fcドメインに結合することを防止または低減する薬剤と、組み合わせて含む、組成物であって、前記組成物が、対象における再発癌及び/または難治性癌の処置に使用するためのものであり、及び前記対象が、Fc RIIbを発現する標的細胞を有することを特徴とする、前記組成物である。

【選択図】 図1



【特許請求の範囲】**【請求項 1】**

(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、Fc R I I b に結合することができるFcドメインを有する、抗体分子を、

(i i) Fc R I I b が前記抗体分子の前記Fcドメインに結合することを防止または低減する薬剤と、組み合わせて含む、組成物であって、

前記組成物が、対象における再発癌及び/または難治性癌の処置に使用するためのものであり、及び前記対象が、Fc R I I b を発現する標的細胞を有することを特徴とする、前記組成物。

【請求項 2】

(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、Fc R I I b に結合することができるFcドメインを有する、抗体分子を、

(i i) Fc R I I b が前記抗体分子の前記Fcドメインに結合することを防止または低減する薬剤と、組み合わせて含む、組成物の使用であって、

前記使用が、対象における再発癌及び/または難治性癌の処置に使用するための薬物の製造におけるものであり、及び前記対象が、Fc R I I b を発現する標的細胞を有することを特徴とする、組成物の前記使用。

【請求項 3】

対象における再発癌及び/または難治性癌を処置する方法であって、

(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、Fc R I I b に結合することができるFcドメインを有する、抗体分子を、

(i i) Fc R I I b が前記抗体分子の前記Fcドメインに結合することを防止または低減する薬剤と、組み合わせて投与することを含み、

前記対象が、再発癌及び/または難治性癌を有するという基準で選択され、及び前記対象が、Fc R I I b を発現する標的細胞を有することを特徴とする、前記方法。

【請求項 4】

対象における再発癌及び/または難治性癌の処置に使用するためのキットであって、

(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、Fc R I I b に結合することができるFcドメインを有する、抗体分子、

(i i) Fc R I I b が前記抗体分子の前記Fcドメインに結合することを防止または低減する薬剤、

(i i i) リツキシマブ、リツキシマブバイオシミラー、オフアツムマブ、オビヌツズマブ、アレムツズマブ、ガリキシマブ、トシツモマブ、放射活性のあるトシツモマブ、イブリツモマブ、放射活性のあるイブリツモマブ、抗CD40抗体、抗CD19抗体、抗CD37抗体、B細胞癌の処置に使用される治療用抗体、からなる群から選択される1つ以上の物質、を含み、

前記使用が、対象における再発癌及び/または難治性癌の処置のためのものであり、及び前記対象が、Fc R I I b を発現する標的細胞を有することを特徴とする、前記キット。

【請求項 5】

前記再発癌及び/または難治性癌が、抗体治療に抵抗性である、請求項 1 に記載の組成物、または請求項 2 に記載の使用、または請求項 3 に記載の方法、または請求項 4 に記載のキット。

【請求項 6】

前記再発癌及び/または難治性癌が、(i) に定義された前記抗体分子に抵抗性である、請求項 1 もしくは 5 に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 に記載の方法、または請求項 4 もしくは 5 に記載のキット。

【請求項 7】

前記薬剤が、前記標的細胞上に存在するFc R I I b が前記抗体分子の前記Fcドメインに結合することを防止または低減する、請求項 1、5、もしくは 6 のいずれか一項に

10

20

30

40

50

記載の組成物、または請求項 2、5、もしくは 6 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3、5、もしくは 6 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4～6 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 8】

標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する前記抗体分子であって、Fc RIIb に結合することができる Fc ドメインを有する抗体分子が、前記標的細胞に Fc RIIb 依存性様式で内部移行することができる、請求項 1 もしくは 5～7 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5～7 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5～7 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4～7 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 9】

Fc RIIb が前記抗体分子の前記 Fc ドメインに結合することを防止または低減する前記薬剤が、前記標的細胞への前記抗体分子の内部移行をさらに防止または低減する、請求項 1、5～8 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2、5～8 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3、5～8 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4～8 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 10】

前記難治性癌が、前記対象が癌処置を受けて応答していない場合、及び/または、前記対象が癌処置を受けたが前記処置中に前記癌が前記対象において進行した場合に、難治性癌であると見なされる、請求項 1 もしくは 5～9 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5～9 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5～9 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4～9 のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項 11】

前記対象が、前記対象が以前に癌を処置されているが部分寛解以上を達成しない場合に、応答していないと見なされる、請求項 10 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 12】

前記再発癌が、前記対象が以前に癌を処置されており、以前に前記処置に応答しており、及び後に再発した場合に、再発癌であると見なされる、請求項 1 もしくは 5～9 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5～9 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5～9 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4～9 のいずれか一項に記載のキット。

30

【請求項 13】

前記対象が、

(i) 処置後に少なくとも部分寛解を達成し、及び/または前記対象が処置後に少なくとも完全寛解を達成するが、

(ii) 前記癌が前記処置の休止後に前記対象において進行した場合に、前記対象が後に再発したと見なされる、請求項 12 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 14】

前記対象がその後、前記処置の休止の約 1 ヶ月超後に再発している、請求項 13 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

40

【請求項 15】

前記対象がその後、前記処置の休止の約 1 ヶ月超後、または約 2 ヶ月超後、または約 3 ヶ月超後、または約 4 ヶ月超後、または約 5 ヶ月超後、または約 6 ヶ月超後、または約 7 ヶ月超後、または約 8 ヶ月超後、または約 9 ヶ月超後、または約 10 ヶ月超後、または約 11 ヶ月超後、または約 12 ヶ月超後、または約 2 年超後、または約 3 年超後、または約 4 年超後、または約 5 年超後、または約 6 年超後、または約 7 年超後、または約 8 年超後、または約 9 年超後、または約 10 年超後に再発している、請求項 13 または 14 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

50

【請求項 16】

前記対象が、再発癌の特徴を少なくとも1回、または少なくとも2回、または少なくとも3回、または少なくとも4回、または少なくとも5回、または少なくとも6回、または少なくとも7回、または少なくとも8回、または少なくとも9回、または少なくとも10回示す、請求項12～15のいずれか一項に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 17】

前記処置が、抗体治療、例えば、請求項1～9のいずれか一項に記載の(i i)に定義された前記薬剤の非存在下で投与された、請求項1～9のいずれか一項に記載の(i)に定義された前記抗体分子である、請求項10～16のいずれか一項に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

10

【請求項 18】

前記処置が、1つ以上の治療薬を含む、請求項17に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 19】

前記標的細胞が、上昇したレベルのFc R I I b発現を有する、請求項1もしくは5～18のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2もしくは5～18のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5～18のいずれか一項に記載の方法、または請求項4～18のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項 20】

前記標的細胞上の上昇したFc R I I b発現が、対照と比較して決定される、請求項19に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 21】

前記対照が、非難治性癌及び/または非再発癌を有する対照個体の対照細胞を含む、請求項20に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 22】

前記上昇したFc R I I b発現が、前記対照と比較したときに前記対象の前記標的細胞において少なくとも2倍高い、請求項20または21に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

30

【請求項 23】

前記標的細胞が癌細胞である、請求項1もしくは5～22のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2もしくは5～22のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5～22のいずれか一項に記載の方法、または請求項4～22のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 24】

前記標的細胞がB細胞である、請求項1もしくは5～23のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2もしくは5～23のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5～23のいずれか一項に記載の方法、または請求項4～23のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項 25】

前記再発癌、及び/または前記難治性癌、及び/または前記癌細胞、及び/または同じ癌タイプ、及び/または前記癌が、非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マンテル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、小リンパ球性リンパ腫を含む群から選択される、請求項1もしくは5～24のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2もしくは5～24のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5～24のいずれか一項に記載の方法、または請求項4～24のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 26】

前記対象が応答していないこと、及び/または対象における部分寛解、及び/または対象における完全寛解、及び/または癌が対象において進行していることが、

50

- (i) リンパ球数、及び/または
- (i i) 好中球数、及び/または
- (i i i) 血小板数、及び/または
- (i v) ヘモグロビン数、及び/または
- (v) 腫瘍細胞の割合、及び/または
- (v i) 骨髄リンパ球の割合、及び/または
- (v i i) 循環リンパ球の割合、及び/または
- (v i i i) リンパ球上のバイオマーカーの存在及び/もしくは非存在、及び/または
- (i x) 癌進行度分類、及び/または
- (x) 組織学的検査、及び/または
- (x i) 骨髄検査、及び/または
- (x i i) 細胞遺伝学的検査、及び/または
- (x i i i) リンパ節評価、及び/または
- (x i v) 身体的症状、及び/または
- (x v) 脾臓内の癌細胞の低減

10

を含む群から1つ以上を測定することによって決定される、請求項10～25のいずれか一項に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項27】

20

前記薬剤が、ポリペプチド、またはアンチカリン、またはペプチド、または抗体、またはキメラ抗体、または一本鎖抗体、またはアプタマー、または設計アンキリン反復タンパク質(DARPin)、またはFab、もしくはF(ab)₂、もしくはFv、もしくはScFv、もしくはdAb抗体断片、またはIgG2抗体、またはIgG4抗体、またはIgG2及びIgG4のキメラ分子、またはN297Q変異を含む抗体変異体、またはDANA変異抗体、または小分子、または天然物、またはアフィボディ、またはペプチド模倣薬、または核酸、またはペプチド核酸分子、または脂質、または炭水化物、または、アンキリン反復タンパク質、もしくはアルマジロ反復タンパク質、もしくはロイシンリッチタンパク質、もしくはテトラリオペプチド反復タンパク質、もしくは設計アンキリン反復タンパク質(DARPin)を含むモジュールフレームワークに基づくタンパク質を含む、請求項1もしくは5～26のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2もしくは5～26のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5～26のいずれか一項に記載の方法、または請求項4～26のいずれか一項に記載のキット。

30

【請求項28】

(i i)に定義された前記薬剤が、FcRIIbに特異的に結合する1つ以上の抗体分子である、請求項1もしくは5～27のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2もしくは5～27のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5～27のいずれか一項に記載の方法、または請求項4～27のいずれか一項に記載のキット。

【請求項29】

(i i)に定義された前記薬剤が、エフェクター細胞を動員することができるドメインを含まない1つ以上の抗体分子である、請求項1もしくは5～28のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2もしくは5～28のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5～28のいずれか一項に記載の方法、または請求項4～28のいずれか一項に記載のキット。

40

【請求項30】

(i i)に定義された前記薬剤が、モノクローナル抗体分子、及び/またはポリクローナル抗体分子、及び/または二重特異性抗体分子である1つ以上の抗体分子である、請求項28に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項31】

前記薬剤が、以下の相補性決定領域(CDR)：

50

- (i) 配列番号 5 1、及び配列番号 5 2、及び配列番号 5 3、または
- (i 配列番号 5 7、及び配列番号 5 8、及び配列番号 5 9、または
- i)
- (i i 配列番号 6 3、及び配列番号 6 4、及び配列番号 6 5、または
- i)
- (i 配列番号 6 9、及び配列番号 7 0、及び配列番号 7 1、または
- v)
- (v 配列番号 7 5、及び配列番号 7 6、及び配列番号 7 7、または
- (v 配列番号 8 1、及び配列番号 8 2、及び配列番号 8 3、または
- i) 10
- (v i 配列番号 8 7、及び配列番号 8 8、及び配列番号 8 9、または
- i)
- (v i 配列番号 9 3、及び配列番号 9 4、及び配列番号 9 5、または
- i i)
- (i 配列番号 9 9、及び配列番号 1 0 0、及び配列番号 1 0 1、または
- x)
- (x 配列番号 1 0 5、及び配列番号 1 0 6、及び配列番号 1 0 7、または
- (x 配列番号 1 1 1、及び配列番号 1 1 2、及び配列番号 1 1 3、または
- i)
- (x i 配列番号 1 1 7、及び配列番号 1 1 8、及び配列番号 1 1 9、または
- i) 20
- (x i 配列番号 1 2 3、及び配列番号 1 2 4、及び配列番号 1 2 5、または
- i i)
- (x i 配列番号 1 2 9、及び配列番号 1 3 0、及び配列番号 1 3 1、または
- v)
- (x 配列番号 1 3 5、及び配列番号 1 3 6、及び配列番号 1 3 7、または
- v)
- (x v 配列番号 1 4 1、及び配列番号 1 4 2、及び配列番号 1 4 3、または
- i)
- (x v 配列番号 1 4 7、及び配列番号 1 4 8、及び配列番号 1 4 9、または
- i i)
- (x v 配列番号 1 5 3、及び配列番号 1 5 4、及び配列番号 1 5 5、または
- i i) 30
- i)
- (x i 配列番号 1 5 9、及び配列番号 1 6 0、及び配列番号 1 6 1、または
- x)
- (x 配列番号 1 6 5、及び配列番号 1 6 6、及び配列番号 1 6 7、または
- x)
- (x x 配列番号 1 7 1、及び配列番号 1 7 2、及び配列番号 1 7 3、または
- i)
- (x x 配列番号 1 7 7、及び配列番号 1 7 8、及び配列番号 1 7 9、または
- i i)
- (x x 配列番号 1 8 3、及び配列番号 1 8 4、及び配列番号 1 8 5、または
- i i) 40
- i)
- (x x 配列番号 1 8 9、及び配列番号 1 9 0、及び配列番号 1 9 1
- i v)

を有する可変重鎖 (VH) を含む、請求項 1 もしくは 5 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 3 0 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 3 0 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 2】

前記薬剤が、以下のCDR：

- (i) 配列番号54、及び配列番号55、及び配列番号56、または
- (i) 配列番号60、及び配列番号61、及び配列番号62、または
- i)
- (i i) 配列番号66、及び配列番号67、及び配列番号68、または
- i)
- (i) 配列番号72、及び配列番号73、及び配列番号74、または
- v)
- (v) 配列番号78、及び配列番号79、及び配列番号80、または
- (v) 配列番号84、及び配列番号85、及び配列番号86、または
- i) 10
- (v i) 配列番号90、及び配列番号91、及び配列番号92、または
- i)
- (v i) 配列番号96、及び配列番号97、及び配列番号98、または
- i i)
- (i) 配列番号102、及び配列番号103、及び配列番号104、または
- x)
- (x) 配列番号108、及び配列番号109、及び配列番号110、または
- (x) 配列番号114、及び配列番号115、及び配列番号116、または
- i)
- (x i) 配列番号120、及び配列番号121、及び配列番号122、または
- i) 20
- (x i) 配列番号126、及び配列番号127、及び配列番号128、または
- i i)
- (x i) 配列番号132、及び配列番号133、及び配列番号134、または
- v)
- (x) 配列番号138、及び配列番号139、及び配列番号140、または
- v)
- (x v) 配列番号144、及び配列番号145、及び配列番号146、または
- i)
- (x v) 配列番号150、及び配列番号151、及び配列番号152、または
- i i) 30
- (x v) 配列番号156、及び配列番号157、及び配列番号158、または
- i i
- i)
- (x i) 配列番号162、及び配列番号163、及び配列番号164、または
- x)
- (x) 配列番号168、及び配列番号169、及び配列番号170、または
- x)
- (x x) 配列番号174、及び配列番号175、及び配列番号176、または
- i)
- (x x) 配列番号180、及び配列番号181、及び配列番号182、または
- i i) 40
- (x x) 配列番号186、及び配列番号187、及び配列番号188、または
- i i
- i)
- (x x) 配列番号192、及び配列番号193、及び配列番号194
- i v)

を有する可変軽鎖(VL)を含む、請求項1もしくは5~31のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2もしくは5~31のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5~31のいずれか一項に記載の方法、または請求項4~31のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 3】

前記薬剤が、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11、配列番号 12、配列番号 13、配列番号 14、配列番号 15、配列番号 16、配列番号 17、配列番号 18、配列番号 19、配列番号 20、配列番号 21、配列番号 22、配列番号 23、配列番号 24、配列番号 25、及び配列番号 26 からなる群から選択される可変重鎖 (VH) アミノ酸配列を有する、請求項 1 もしくは 5 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 3 2 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 もしくは 5 ~ 3 2 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 4】

前記薬剤が、配列番号 27、配列番号 28、配列番号 29、配列番号 30、配列番号 31、配列番号 32、配列番号 33、配列番号 34、配列番号 35、配列番号 36、配列番号 37、配列番号 38、配列番号 39、配列番号 40、配列番号 41、配列番号 42、配列番号 43、配列番号 44、配列番号 45、配列番号 46、配列番号 47、配列番号 48、配列番号 49、及び配列番号 50 からなる群から選択される可変軽鎖 (VL) アミノ酸配列を有する、請求項 1 もしくは 5 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 3 3 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 3 3 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 5】

前記薬剤が、以下の CDR アミノ酸配列：

10

20

- (i) 配列番号51、及び配列番号52、及び配列番号53、及び配列番号54、
及び配列番号55、及び配列番号56、または
- (i) 配列番号57、及び配列番号58、及び配列番号59、及び配列番号60、
及び配列番号61、及び配列番号62、または
- (i i) 配列番号63、及び配列番号64、及び配列番号65、及び配列番号66、
及び配列番号67、及び配列番号68、または
- (i) 配列番号69、及び配列番号70、及び配列番号71、及び配列番号72、
及び配列番号73、及び配列番号74、または
- (v) 配列番号75、及び配列番号76、及び配列番号77、及び配列番号78、
及び配列番号79、及び配列番号80、または
- (v) 配列番号81、及び配列番号82、及び配列番号83、及び配列番号84、
及び配列番号85、及び配列番号86、または
- (v i) 配列番号87、及び配列番号88、及び配列番号89、及び配列番号90、
及び配列番号91、及び配列番号92、または
- (v i) 配列番号93、及び配列番号94、及び配列番号95、及び配列番号96、
及び配列番号97、及び配列番号98、または
- (i) 配列番号99、及び配列番号100、及び配列番号101、及び配列番号1
02、及び配列番号103、及び配列番号104、または
- (x) 配列番号105、及び配列番号106、及び配列番号107、及び配列番号
108、及び配列番号109、及び配列番号110、または
- (x) 配列番号111、及び配列番号112、及び配列番号113、及び配列番号
114、及び配列番号115、及び配列番号116、または
- (x i) 配列番号117、及び配列番号118、及び配列番号119、及び配列番号
120、及び配列番号121、及び配列番号122、または
- (x i) 配列番号123、及び配列番号124、及び配列番号125、及び配列番号
126、及び配列番号127、及び配列番号128、または
- (x i) 配列番号129、及び配列番号130、及び配列番号131、及び配列番号
132、及び配列番号133、及び配列番号134、または
- (x) 配列番号135、及び配列番号136、及び配列番号137、及び配列番号
138、及び配列番号139、及び配列番号140、または
- (x v) 配列番号141、及び配列番号142、及び配列番号143、及び配列番号
144、及び配列番号145、及び配列番号146、または
- (x v) 配列番号147、及び配列番号148、及び配列番号149、及び配列番号
150、及び配列番号151、及び配列番号152、または
- (x v) 配列番号153、及び配列番号154、及び配列番号155、及び配列番号
156、及び配列番号157、及び配列番号158、または
- (i) 配列番号159、及び配列番号160、及び配列番号161、及び配列番号
162、及び配列番号163、及び配列番号164、または
- (x) 配列番号165、及び配列番号166、及び配列番号167、及び配列番号
168、及び配列番号169、及び配列番号170、または
- (x x) 配列番号171、及び配列番号172、及び配列番号173、及び配列番号
174、及び配列番号175、及び配列番号176、または
- (x x) 配列番号177、及び配列番号178、及び配列番号179、及び配列番号
180、及び配列番号181、及び配列番号182、または
- (x x) 配列番号183、及び配列番号184、及び配列番号185、及び配列番号
186、及び配列番号187、及び配列番号188、または
- (i) 配列番号189、及び配列番号190、及び配列番号191、及び配列番号
192、及び配列番号193、及び配列番号194

を有する、請求項1もしくは5～34のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2も
しくは5～34のいずれか一項に記載の使用、または請求項3もしくは5～34のいずれ

か一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 3 4 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 3 6】

前記薬剤が、以下のアミノ酸配列：

- (i) 配列番号 3、及び配列番号 2 7、または
- (i i) 配列番号 4、及び配列番号 2 8、または
- (i i i) 配列番号 5、及び配列番号 2 9、または
- (i i i i) 配列番号 6、及び配列番号 3 0、または
- (i i i i v) 配列番号 7、及び配列番号 3 1、または
- (i i i i v i) 配列番号 8、及び配列番号 3 2、または
- (i i i i v i i) 配列番号 9、及び配列番号 3 3、または
- (i i i i v i i i) 配列番号 1 0、及び配列番号 3 4、または
- (i i i i v i i i x) 配列番号 1 1、及び配列番号 3 5、または
- (i i i i v i i i x i) 配列番号 1 2、及び配列番号 3 6、または
- (i i i i v i i i x i i) 配列番号 1 3、及び配列番号 3 7、または
- (i i i i v i i i x i i i) 配列番号 1 4、及び配列番号 3 8、または
- (i i i i v i i i x i i i i) 配列番号 1 5、及び配列番号 3 9、または
- (i i i i v i i i x i i i i v) 配列番号 1 6、及び配列番号 4 0、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i) 配列番号 1 7、及び配列番号 4 1、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i) 配列番号 1 8、及び配列番号 4 2、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i i) 配列番号 1 9、及び配列番号 4 3、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i i i) 配列番号 2 0、及び配列番号 4 4、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i i i i) 配列番号 2 1、及び配列番号 4 5、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i i i x) 配列番号 2 2、及び配列番号 4 6、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i i i x i) 配列番号 2 3、及び配列番号 4 7、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i i i x i i) 配列番号 2 4、及び配列番号 4 8、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i i i x i i i) 配列番号 2 5、及び配列番号 4 9、または
- (i i i i v i i i x i i i i v i i i i x i i i i) 配列番号 2 6、及び配列番号 5 0

を有する、請求項 1 もしくは 5 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 3 5 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 3 5 のいずれ

か一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 35 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 37】

前記薬剤が、FcRIIb が前記抗体分子の前記 Fcドメインに結合することを防止または低減するために、請求項 31 ~ 36 に定義された前記薬剤と競合することができる薬剤である、請求項 1 もしくは 5 ~ 30 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 30 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 30 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 30 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 38】

前記薬剤が、FcRIIb シグナル伝達を防止または低減する、請求項 1 もしくは 5 ~ 37 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 37 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 37 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 37 のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項 39】

前記薬剤が、前記標的細胞による前記抗体分子の内部移行を防止または低減する、請求項 1 もしくは 5 ~ 38 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 38 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 38 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 38 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 40】

前記細胞表面抗原が、CD19、CD20、CD40、CD52 を含む群から選択される、請求項 1 もしくは 5 ~ 39 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 39 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 39 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 39 のいずれか一項に記載のキット。

20

【請求項 41】

(i) に定義された前記抗体分子が、CD20 に特異的に結合する、請求項 1 もしくは 5 ~ 40 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 2 もしくは 5 ~ 40 のいずれか一項に記載の使用、または請求項 3 もしくは 5 ~ 40 のいずれか一項に記載の方法、または請求項 4 ~ 40 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 42】

(i) に定義された前記抗体分子が、I型CD20抗体である、請求項 41 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

30

【請求項 43】

(i) に定義された前記抗体分子が、II型CD20抗体である、請求項 41 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 44】

前記I型CD20抗体が、リツキシマブ、またはリツキシマブバイオシミラー、またはオフアツムマブである、請求項 42 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 45】

前記II型CD20抗体が、オビヌツズマブまたはトシツモマブである、請求項 43 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

40

【請求項 46】

(i) に定義された前記抗体分子が、CD52抗体である、請求項 40 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 47】

前記CD52抗体がアレムツズマブである、請求項 46 に記載の組成物、または使用、または方法、またはキット。

【請求項 48】

前記組成物またはキットが、1つ以上の治療薬を含む、請求項 1 もしくは 5 ~ 47 のいずれか一項に記載の組成物、または請求項 4 ~ 47 のいずれか一項に記載のキット。

【請求項 49】

50

前記組成物が1つ以上の治療薬をさらに含む、請求項2または5～47のいずれか一項に記載の使用。

【請求項50】

前記対象が、1つ以上の治療薬をさらに投与される、請求項3または5～47のいずれか一項に記載の方法。

【請求項51】

前記対象が難治性癌もしくは再発癌を有するか、または前記対象が難治性癌及び再発癌を有する、請求項1もしくは5～48のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2、5～47、もしくは49のいずれか一項に記載の使用、または請求項1、5～47、もしくは50のいずれか一項に記載の方法、または請求項1もしくは5～48のいずれか一項に記載のキット。

10

【請求項52】

前記対象が難治性慢性リンパ性白血病もしくは再発慢性リンパ性白血病を有するか、または前記対象が難治性慢性リンパ性白血病及び再発慢性リンパ性白血病を有する、請求項1、5～49、もしくは51のいずれか一項に記載の組成物、または請求項2、5～47、49、もしくは51のいずれか一項に記載の使用、または請求項1、5～47、50、もしくは51のいずれか一項に記載の方法、または請求項1、5～48、もしくは50のいずれか一項に記載のキット。

【請求項53】

明細書、及び/または実施例、及び/または添付の図面を参照して、本特許請求の範囲に実質的に記載及び/または特許請求される、組成物、または使用、または方法、またはキット。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、難治性癌及び/または再発癌の処置に使用するための、抗体分子及び薬剤を含む組成物に関する。本発明は、抗体分子及び薬剤を投与することを含む、難治性癌及び/または再発癌を処置する方法にも関する。該抗体分子及び薬剤を含むキットも記載される。

【0002】

30

治療用抗体は、免疫系を働かせることによる新たな作用機構を明らかにし、癌治療を変容させている。例えば、抗体が治療効果を発揮することができる1つの機構は、抗体分子が結合する細胞を標的とする細胞傷害性細胞（例えばマクロファージ）及び酵素（例えば補体）などの天然エフェクター系を動員することによって、癌及び他の不要な細胞の除去を刺激することによるものである。

【0003】

CD20特異性モノクローナル抗体(mAb)リツキシマブは、癌免疫療法に許可された最初の抗体であり、したがって、濾胞性リンパ腫(FL)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、慢性リンパ性白血病(CLL)、及びマントル細胞リンパ腫(MCL)を含む、CD20を発現するB細胞癌を患う患者に広く投与されている(Lim, S.H., et al., Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. Haematologica 95, 135-143 (2010)にて査読。

40

【0004】

抗体療法は効果的であるが、一部の 경우에는、患者は抗体療法への抵抗性を獲得し、これは処置の無効化及び癌の悪化につながる。他の場合には、癌は癌治療に全く応答しない場合がある。

【0005】

残念ながら、再発癌及び/または難治性癌の効果的な治療用抗体治療は依然として欠如している。ますます多くの抗体療法が数種類の癌の処置のために開発されていることに伴

50

い、これらの療法に対する癌細胞の抵抗性を理解し、そのような抵抗性を克服する薬を開発する必要が生じている。

【0006】

例えば、リツキシマブ応答性リンパ腫において、一部の個体は、第1の処置で抵抗性を示すか、またはリツキシマブ含有併用療法に抵抗性であるようになる。リツキシマブに加えて、リンパ腫は、他の抗体療法、例えば、抗体分子であるオフアツムマブ（これはCD20に結合する）またはアレムツズマブ（これはCD52に結合する）に対する抵抗性も示し得る。

【0007】

こうした背景の下、本発明者らは、驚くべきことに、抗体と、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤とを含む治療が、再発癌及び/または難治性癌を処置するために使用され得ることを特定した。

10

【0008】

これまでに、FcRIIbと治療用抗体リツキシマブとの間の相互作用を抑制すると、抗体のリサイクリングを低減させ、慢性リンパ性白血病及びマントル細胞リンパ腫の処置におけるリツキシマブの有効性を向上させることができると示されている(Lim, S. H., et al. Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. Blood (2011) 及び国際公開第2012/022985号)。

20

【0009】

さらに、治療用抗体の活性は、部分的にFc受容体(FcR)との治療用抗体の相互作用によって左右されることが知られている。具体的には、IgGの治療活性の大部分を説明するのは、FcRの相対的な発現レベル、親和性、及び活性である(Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fc gamma Rs in health and disease. Curr Top Microbiol Immunol 350, 105-125 (2011)、及びNimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fc gamma receptors as regulators of immune responses. Nature reviews 8, 34-47 (2008)にて査読)。

30

【0010】

しかしながら、本発明の発明者らはこの度、驚くべきことに、抗体と、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤とを含む併用療法が、再発癌及び/または難治性癌を処置するために使用され得ることを実証した。したがって、本発明は、再発癌及び/または難治性癌を有する患者のサブグループを治療するための方法及び使用を提供する。

【0011】

換言すると、本発明の発明者らは、対象における癌が応答しない(すなわち抵抗性のある)抗体を、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤と組み合わせて含む併用療法が、抗体に対する癌の抵抗性を低減及び/または克服することによって再発癌及び/または難治性癌を処置するために使用され得ることを実証した。

40

【0012】

第1の態様において、本発明は、

(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、FcRIIbに結合することができるFcドメインを有する、抗体分子を、

(ii) FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤と、組み合わせて含む、組成物であって、

該組成物が、対象における再発癌及び/または難治性癌の処置に使用するためのものであり、及び対象が、FcRIIbを発現する標的細胞を有することを特徴とする、組成

50

物を提供する。

【0013】

第2の態様において、本発明は、

(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、Fc RIIbに結合することができるFcドメインを有する、抗体分子を、

(ii) Fc RIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤と、組み合わせて含む、組成物の使用であって、

該使用が、対象における再発癌及び/または難治性癌の処置に使用するための薬物の製造におけるものであり、及び対象が、Fc RIIbを発現する標的細胞を有することを特徴とする、組成物の使用を提供する。

10

【0014】

第3の態様において、本発明は、対象における再発癌及び/または難治性癌を処置する方法であって、

(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、Fc RIIbに結合することができるFcドメインを有する、抗体分子を、

(ii) Fc RIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤と、組み合わせて投与することを含み、

対象が、再発癌及び/または難治性癌を有するという基準で選択され、及び対象が、Fc RIIbを発現する標的細胞を有することを特徴とする、方法を提供する。

20

【0015】

第4の態様において、本発明は、対象における再発癌及び/または難治性癌の処置に使用するためのキットであって、

(i) 標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、Fc RIIbに結合することができるFcドメインを有する、抗体分子、

(ii) Fc RIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤、

(iii) リツキシマブ、リツキシマブバイオシミラー、オフアツムマブ、オビヌツズマブ、アレムツズマブ、ガリキシマブ、トシツモマブ、放射活性のあるトシツモマブ、イブリツモマブ、放射活性のあるイブリツモマブ、抗CD40抗体、抗CD19抗体、抗CD37抗体、B細胞癌の処置に使用される治療用抗体、からなる群から選択される1つ以上の物質、を含み、

30

該使用が、対象における再発癌及び/または難治性癌の処置のためのものであり、及び対象が、Fc RIIbを発現する標的細胞を有することを特徴とする、キットを提供する。

【0016】

本発明の第4の態様のある好ましい実施形態では、1つ以上の物質は、リツキシマブ(もしくはリツキシマブバイオシミラー)及びオフアツムマブ、またはリツキシマブ(もしくはリツキシマブバイオシミラー)及びオビヌツズマブを含むか、またはそれらからなる。

【0017】

本発明の第4の態様のある代替的な好ましい実施形態では、1つ以上の物質は、アレムツズマブ及び抗CD40抗体、アレムツズマブ及び抗CD19抗体、アレムツズマブ及び抗CD37抗体、またはアレムツズマブ及び抗CD40抗体及び抗CD19抗体及び抗CD37抗体を含むか、またはそれらからなる。

40

【0018】

本発明の第4の態様のある代替的な好ましい実施形態では、1つ以上の物質は、B細胞癌を処置するために使用される治療用抗体、例えばガリキシマブなどを含むか、またはそれらからなる。

【0019】

抗体分子は、免疫学及び分子生物学の当業者に周知である。抗体分子は体液性免疫系の

50

構成要素であり、細菌及びウイルスなどの身体に対する異物を同定及び中和するためにエフェクターB細胞によって生成されるタンパク質である。

【0020】

典型的に、抗体分子は、2本の重鎖及び2本の軽鎖を有する。抗体分子の重鎖は、1つの可変ドメイン及び3つの定常ドメインを備え、抗体分子の軽鎖は、1つの可変ドメイン及び1つの定常ドメインを備える。可変ドメイン（集合的にF_v領域と称される場合がある）は、抗体の標的に結合し、各可変ドメインは、相補性決定領域（CDR）と称される3つのループを備え、これらが標的結合を担う。

【0021】

したがって、ここで「抗体分子」という用語には、モノクローナル抗体、またはポリクローナル抗体、または合成抗体、または組み換え生成抗体、または多特異性抗体、または二重特異性抗体、またはヒト抗体、またはヒト化抗体、またはキメラ抗体、またはラクダ化抗体、または一本鎖F_v（scF_v）、または一本鎖抗体、またはFab断片、またはF（ab'）断片、またはジスルフィド結合F_v（sdF_v）、または細胞内抗体、または抗体重鎖、または抗体軽鎖、または抗体重鎖及び/もしくは軽鎖のホモダイマーまたはヘテロダイマー、または抗原結合性の機能的断片もしくはその誘導体、またはIgG、またはIgG1、またはIgG2、またはIgG3、またはIgG4、またはIgA、またはIgM、またはIgD、またはIgEを含む、全てのタイプ及びクラスの抗体分子ならびにそれらの機能的断片が含まれる。

【0022】

抗体分子は、明確な標的分子に特異的に結合することが知られている。すなわち、抗体分子は、非標的である分子ではなく、その標的に優先的かつ選択的に結合する。

【0023】

タンパク質結合性の査定方法は、生物化学及び免疫学の当業者には既知である。これらの方法が、標的に対する抗体分子の結合性、及び/またはFc受容体に対する抗体のFcドメインの結合性、ならびにこれらの相互作用の相対強度、または特異性、または抑制、または防止、または低減を査定するために使用され得ることは、当業者には理解されるであろう。タンパク質結合性を査定するために使用され得る方法の例は、例えば、イムノアッセイ、BIACore、ウェスタンブロット、ラジオイムノアッセイ（RIA）、及び酵素結合免疫吸着検定法（ELISA）である（Fundamental Immunology Second Edition, Raven Press, New York、ページ332～336（1989）の抗体特異性に関する考察を参照のこと）。

【0024】

したがって、ここで「特異的に結合する抗体分子」には、標的に特異的に結合するが非標的には結合しないか、または標的よりも弱く（例えばより低い親和性で）非標的に結合する抗体分子が含まれる。

【0025】

ここではまた、抗体分子が非標的に結合するよりも少なくとも2倍強く、または少なくとも5倍強く、または少なくとも10倍強く、または少なくとも20倍強く、または少なくとも50倍強く、または少なくとも100倍強く、または少なくとも200倍強く、または少なくとも500倍強く、または少なくともよりも約1000倍強く、標的に特異的に結合するという意味も含まれる。

【0026】

さらにここでは、抗体分子が少なくとも約 $10^{-1} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-2} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-3} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-4} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-5} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-6} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-7} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-8} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-9} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-10} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-11} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-12} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-13} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-14} K_d$ 、または少なくとも約 $10^{-15} K_d$ の K_d で標的に結合する場合に、抗体分子は標的に特

10

20

30

40

50

異的に結合するという意味も含まれる。

【0027】

抗体分子の別の注目すべき部分は、Fcドメイン（ないしは断片結晶化可能ドメイン（*fragment crystallizable domain*）として知られる）であり、これは抗体分子重鎖の各々の定常ドメインのうちの一つを含む。Fcドメインは、抗体分子とFc受容体との間の相互作用を担う。

【0028】

Fc受容体は、しばしば免疫系の細胞の細胞表面上に見出される膜タンパク質である（すなわち、Fc受容体は、標的細胞膜（ないしはプラズマ膜または細胞質膜として知られる）上に見出される）。Fc受容体の役割は、Fcドメインを介して抗体に結合し、抗体を細胞に内部移行させることである。免疫系において、これは、抗体媒介性食作用及び抗体依存性細胞媒介性細胞傷害をもたらす得る。

10

【0029】

本発明に含まれるFc受容体の一例は、FcRIIb（ないしはCD32、CD32B、CD32B1、CD32B2、FcRII、FcRII、またはFcRIIBとして知られる）であり、これは、抗体に対する結合及び抗体のリサイクリングを担う抑制性Fc受容体である。

【0030】

したがって、ここで「FcRIIbに結合することができるFcドメイン」には、本発明の抗体分子のFcドメインがFcRIIbに結合することができること、そして好ましくはその結合が、その抗体分子が別のタンパク質、もしくはペプチド、もしくはポリペプチド、もしくはFc受容体に結合するよりも少なくとも2倍強い、または少なくとも5倍強い、または少なくとも10倍強い、または少なくともよりも約20倍強い、または少なくとも50倍強い、または少なくとも100倍強い、または少なくとも200倍強い、または少なくとも500倍強い、または少なくとも1000倍強いことが含まれる。

20

【0031】

本発明の薬剤は、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減し、これは、細胞への抗体分子の内部移行を防止または低減する。

【0032】

本発明の薬剤を構成し得るもの、そして本発明の薬剤がどのように同定され得るかは、分子生物学の当業者には容易に明らかとなるであろう。例えば、本発明の薬剤は、ウェスタンブロッティングによって検出される、細胞内の免疫受容体チロシン系抑制（ITIM）モチーフにおけるチロシン-293のリン酸化によって示されるように、FcRIIbの刺激またはシグナル伝達を遮断する薬剤についてスクリーニングすることによって同定され得る。例えば、Raji細胞を、リン酸化FcRIIbについて免疫プロットする前に、抗FcRIIb試験薬剤の存在下または非存在下で、細胞表面抗原に対する抗体分子、例えば抗CD20リツキシマブを用いて培養してもよい（国際公開第2012/022985号）。

30

【0033】

参照により本明細書に組み込まれるNeubig et al (2003) *Pharmacol. Rev.* 55, 597-606は、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤を同定するためにスクリーニングされ得る分子の様々なクラスを記載している。

40

【0034】

本発明の薬剤は、小さな有機部分、または小さな無機部分、またはペプチド、またはポリペプチド、またはペプチド模倣薬、または核酸、またはペプチド核酸（PNA）、またはアプタマー、または脂質、または炭水化物、または抗体分子であってもよい。

【0035】

ここで「FcRIIb結合を防止または低減する薬剤」には、薬剤が抗体分子のFcドメインに対するFcRIIbの結合を完全に遮断するか、または抗体分子のFcドメ

50

インに対する Fc R I I b の結合を部分的に遮断することが含まれる。

【0036】

ここで「完全に遮断する」には、Fc R I I b と抗体分子の Fc ドメインとの間に検出可能な結合がないことが含まれる。ここで「部分的に遮断する」には、薬剤の存在下での Fc R I I b と抗体分子の Fc ドメインとの間の検出可能な結合が、薬剤の非存在下での Fc R I I b と抗体分子の Fc ドメインとの間の検出可能な結合よりも低いことが含まれる。

【0037】

薬剤は、立体障害によって、かつ/または抗体分子に結合することによって、かつ/または Fc ドメインに結合することによって、かつ/または Fc R I I b に結合することによって、かつ/または抗体分子に結合し、Fc R I I b との接触を遮断することによって、かつ/または Fc ドメインに結合し、Fc R I I b との接触を遮断することによって、かつ/または Fc R I I b に結合し、Fc ドメインとの接触を遮断することによって、Fc R I I b 結合を防止または低減してもよい。

10

【0038】

ここではまた、薬剤の存在下での結合性が、薬剤の非存在下での抗体分子の Fc ドメインに対する Fc R I I b 結合の約 90% 未満、または約 80% 未満、または約 70% 未満、または約 60% 未満、または約 50% 未満、または約 40% 未満、または約 30% 未満、または約 20% 未満、または約 10% 未満、または約 5% 未満、または約 1% 未満である場合に、薬剤が抗体分子の Fc ドメインに対する Fc R I I b 結合を低減するということも含まれる。

20

【0039】

ここでは、薬剤の存在下での結合性が、薬剤の非存在下での抗体分子の Fc ドメインに対する Fc R I I b 結合よりも少なくとも 2 倍弱い、または少なくとも 5 倍弱い、または少なくとも 10 倍弱い、または少なくとも 20 倍弱い、または少なくとも 50 倍弱い、または少なくとも 100 倍弱い、または少なくとも 200 倍弱い、または少なくとも 500 倍弱い、または少なくとも 1000 倍弱い場合に、薬剤が抗体分子の Fc ドメインに対する Fc R I I b 結合を低減するということがさらに含まれる。

【0040】

ここでは、薬剤の存在下で結合が検出可能でない場合、または結合が検出可能である場合は検出可能な結合が無視できるものである場合に、薬剤が抗体分子の Fc ドメインに対する Fc R I I b 結合を防止ということが含まれる。

30

【0041】

本発明に含まれる抗体分子標的の一例は、抗体分子のエピトープ（ないしはこの文脈では細胞表面エピトープとして知られる）となる細胞表面抗原である。細胞表面抗原及びエピトープは、免疫学または細胞生物学の当業者には容易に理解されるであろう用語である。

【0042】

ここで「細胞表面抗原」には、細胞表面抗原が細胞膜の細胞外側に露出しているが、細胞膜の細胞外側に一過性にのみ露出しているもよいことが含まれる。ここで「一過性に露出する」には、細胞表面抗原が細胞に内部移行されるか、または細胞膜の細胞外側から細胞外空間に放出されてもよいことが含まれる。細胞表面抗原は、プロテアーゼによって媒介され得る開裂によって、細胞膜の細胞外側から放出されてもよい。

40

【0043】

ここではまた、細胞表面抗原は細胞膜に接合し得るが、細胞膜と一過性にのみ結合し得ることも含まれる。ここで「一過性に結合する」には、細胞表面抗原が細胞膜の細胞外側から細胞外空間に放出されてもよいことが含まれる。細胞表面抗原は、プロテアーゼによって媒介され得る開裂によって、細胞膜の細胞外側から放出されてもよい。

【0044】

ここでは、細胞表面抗原が、ペプチド、またはポリペプチド、または炭水化物、または

50

オリゴ糖鎖、または脂質、及び/またはタンパク質、もしくは糖タンパク質、もしくはリポタンパク質上に存在するエピトープであってもよいことがさらに含まれる。

【0045】

本発明により処置される疾患は、再発癌及び/または難治性癌である。

【0046】

再発癌とは、以前に処置されており、その処置の結果として対象が完全または部分的に回復した（すなわち対象は寛解期にあると考えられる）が、処置の休止後に癌が再発または悪化した癌である。別の言い方をすると、再発癌とは、処置が効果的であり対象が完全または部分的に回復した期間の後に、処置に抵抗性であるようになった癌である。

【0047】

癌が、獲得抵抗性に起因する再発癌、または再発癌及び難治性癌であってもよいことは理解されるであろう。ここで「獲得抵抗性」には、癌、及び/または対象、及び/または標的細胞が、1回目に特定の処置が施される前はその処置に対して抵抗性でなかったが、少なくとも1回目にその処置が施された後またはその間（例えば、処置が施された2回目の後、3回目の後、4回目の後、5回目の後、6回目の後、7回目の後、8回目の後、9回目の後、10回目の後、11回目の後、12回目の後）に抵抗性であるようになったことが含まれる。

【0048】

本発明の文脈内では、再発癌が抗体で以前に処置されており、かつその抗体に抵抗性であるようになったことが好ましい。本明細書で考察されるように、本発明は、そのような再発癌を有する患者のサブグループを治療するための手段を提供する（すなわち、本発明は、抗体を用いた処置に抵抗性のある再発癌を有する対象を処置するための手段を提供する）。

【0049】

本発明の文脈内では、再発癌が本明細書に定義される抗体分子で以前に処置されており、かつその抗体分子に抵抗性であるようになったことがさらに好ましい。本明細書で考察されるように、本発明は、そのような再発癌を有する患者のサブグループを治療するための手段を提供する（すなわち、本発明は、本明細書に定義される抗体分子に抵抗性のある再発癌を有する対象を処置するための手段を提供する）。

【0050】

したがって本発明は、癌が抵抗性であるようになったものと同じ抗体分子を使用して、対象における癌を処置するための手段を提供することが理解されるであろう。難治性癌とは、処置されているがその処置に応答していない、かつ/または処置されているが処置中に進行している癌である。別の言い方をすると、難治性癌とは、処置に抵抗性のある癌である。

【0051】

癌が、内因性抵抗性に起因する難治性癌であってもよいことは理解されるであろう。ここで「内因性抵抗性」には、癌、及び/または対象、及び/または標的細胞が、1回目に特定の処置が施されることからその処置に抵抗性であるという意味が含まれる。

【0052】

本発明の文脈内では、難治性癌が抗体で以前に処置されているが、その抗体に抵抗性があったことが好ましい。本明細書で考察されるように、本発明は、そのような難治性癌を有する患者のサブグループを治療するための手段を提供する（すなわち、本発明は、抗体を用いた処置に抵抗性のある難治性癌を有する対象を処置するための手段を提供する）。

【0053】

本発明の文脈内では、難治性癌が本明細書に定義される抗体分子で以前に処置されているが、その抗体分子に抵抗性があったことがさらに好ましい。本明細書で考察されるように、本発明は、そのような難治性癌を有する患者のサブグループを治療するための手段を提供する（すなわち、本発明は、本明細書に定義される抗体分子に抵抗性のある難治性癌を有する対象を処置するための手段を提供する）。

10

20

30

40

50

【0054】

したがって本発明は、癌が抵抗性であるものと同じ抗体分子を使用して、対象における癌を処置するための手段を提供することが理解されるであろう。

【0055】

再発癌及び/または難治性癌は、医薬分野の当業者によって容易に診断されるものであり、本明細書でさらに考察される。

【0056】

本発明者らはこの度、予想外なことに、抗体分子と、抗体分子に対するFcRIIB結合を遮断する薬剤とを用いた処置が、再発癌及び/または難治性癌を治療するために使用され得ることを示した。付随する実施例において実証されるように、本発明の抗体分子及び薬剤は、難治性慢性リンパ性白血病及び/または再発慢性リンパ性白血病の処置に特に効果的である。

10

【0057】

本発明者らは、本発明の抗体分子及び薬剤を用いた処置が機能するのは、FcRIIBがこれらの抗体分子を内部移行させることによって、再発癌及び/または難治性癌の処置における治療用抗体分子の有効性を低減させるからであると考えられる。本発明者らの所見を踏まえて、本発明者らは、このような本発明の抗体分子及び薬剤が、治療用抗体分子によって処置され得、かつ対象の標的細胞がFcRIIBを発現する、あらゆる再発癌及び/または難治性癌の処置に効果的となると考える。

【0058】

いくつかのB細胞癌が、異なるレベルにおいてではあるが、FcRIIBを発現することは理解されている。FcRIIB発現は、慢性リンパ性白血病及びマンツル細胞リンパ腫において最も顕著であり、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫では中程度であり、濾胞性リンパ腫において最も顕著でない。しかしながら、一部の 경우에는、低レベルのFcRIIBを概して発現する癌（例えば濾胞性リンパ腫）を患う対象は、非常に高いレベルのFcRIIB発現を有し得る。異なるタイプのB細胞癌（そして特に上述の癌）におけるFcRIIBの発現レベルは、抗体分子リツキシマブの内部移行の速度と相関する。したがって、FcRIIBの発現及び関連する抗体分子の内部移行は、B細胞癌により共有される共通機構であると考えられている（Lim et al., 2011）。抗体分子のFcRIIB依存性初期化は、本明細書に開示されるFcRIIBに対する抗体によって遮断され得る（実施例、特に図3）。

20

30

【0059】

したがって、本発明の抗体分子及び薬剤は、B細胞癌、そして特に、再発マンツル細胞リンパ腫及び/もしくは難治性マンツル細胞リンパ腫、ならびに/または再発濾胞性リンパ腫及び/もしくは難治性濾胞性リンパ腫、ならびに/または再発びまん性大細胞型B細胞リンパ腫及び/または難治性びまん性大細胞型B細胞リンパ腫の処置に使用され得る。

【0060】

本発明が再発癌及び/または難治性癌を患う対象を処置するためには、対象はFcRIIbを発現する標的細胞を有する必要がある。FcRIIbは細胞表面受容体であり、したがって標的細胞の表面上に存在することは理解されるであろう。FcRIIb、例えば、FcRIIbタンパク質及び/またはFcRIIb mRNAの存在を査定するために、異なる生物学的マーカーが使用され得ることは、当業者には理解されるであろう。

40

【0061】

FcRIIbタンパク質を測定するには、例えば、免疫組織化学的検査、ウェスタンブロッティング、Bradfordタンパク質アッセイ、フローサイトメトリ、及びAT-10抗体を使用した検出といった当該分野で既知の方法があることは、当業者であれば理解するであろう。FcRIIb mRNAを測定するには、例えば、ノーザンブロッティング、RNA配列決定、定量的PCR、及びマイクロアレイハイブリダイゼーションといった当該分野で既知の方法があることは、当業者であれば理解するであろう。

50

【0062】

Fc RIIbの存在を査定するためには、標的細胞内のFc RIIb生物学的マーカーのレベルを、Fc RIIbを発現しない対照細胞内のFc RIIb生物学的マーカーのレベルと比較することが必要となり得ることは、当業者であれば理解するであろう。この対照細胞は、Fc RIIbを発現しない個体からの対照細胞、または個体からのFc RIIbを発現しない対照細胞、または対象からのFc RIIbを発現しない対照細胞、またはFc RIIbを発現しないように遺伝子改変されている細胞であってもよい。

【0063】

ここで「Fc RIIbを発現する標的細胞」には、標的細胞がFc RIIbタンパク質及び/またはFc RIIb mRNAを発現することが含まれる。ここではまた、標的細胞は、Fc RIIbタンパク質及び/またはFc RIIb mRNAが対照細胞よりも標的細胞内で2倍超高い、または5倍超高い、または10倍超高い、または20倍超高い、または50倍超高い、または100倍超高い、または200倍超高い、または500倍超高い、または1000倍超高い場合に、Fc RIIbを発現するものと定義され得るということも含まれる。

10

【0064】

医薬が、例えば医薬が身体に吸収される速度を変更するように異なる添加剤で改質され得、かつ例えば身体への特定の投与経路を可能にするように異なる形態で改質され得ることは、医学の当業者には既知であろう。

20

【0065】

したがってここでは、本発明の組成物、及び/または抗体、及び/または薬剤、及び/または薬物が、賦形剤、及び/または薬学的に許容可能な担体、及び/または薬学的に許容可能な希釈剤、及び/またはアジュバントと組み合わせられ得ることが含まれる。

【0066】

ここではまた、本発明の組成物、及び/または抗体、及び/または薬剤、及び/または薬物が、抗酸化剤、及び/もしくは緩衝液、及び/もしくは静菌薬、及び/もしくは製剤を意図される受容者の血液と等張にする溶質を含有し得る、水性及び/もしくは非水性の滅菌注射溶液、ならびに/または、懸濁化剤及び/もしくは増粘剤を含み得る、水性及び/もしくは非水性の滅菌懸濁液を含む、非経口投与に好適であり得るということも含まれる。本発明の組成物、及び/または抗体、及び/または薬剤、及び/または薬物は、単位用量または複数用量の容器、例えば密閉されたアンプル及びバイアルで提示されてもよく、使用直前に滅菌液体担体、例えば注射用水の添加のみを必要とするフリーズドライ(すなわち凍結乾燥)状態で保管されてもよい。

30

【0067】

即時注射溶液及び懸濁液は、以前に説明されている種類の無菌の粉末、及び/または顆粒、及び/または錠剤から調製され得る。

【0068】

ヒト患者への非経口投与の場合、本発明の組成物、及び/または抗体、及び/または薬剤、及び/または薬物の一日薬用量レベルは、通常、単一または分割用量の投与で成人1人当たり1日につき1pg~10mgである。いかなる事象においても、あらゆる個別の患者に対して最も好適な実際の薬用量は医師が決定し、その量は、特定の患者の年齢、体重、及び応答と共に変動する。上記の薬用量は平均的事例の例である。当然ながら、より高いかまたはより低い薬用量範囲がふさわしい個別の事例が存在し得、そのような事例は本発明の範囲内である。典型的には、本発明の組成物及び/または薬物は、本発明の抗体及び/または薬剤をおよそ2mg/ml~150mg/mlまたはおよそ2mg/ml~200mg/mlの濃度で含有する。ある好ましい実施形態では、本発明の薬物及び/または組成物は、本発明の抗体及び/薬剤を10mg/mlの濃度で含有する。

40

【0069】

概して、ヒトにおいては、本発明の組成物、及び/または抗体、及び/または薬剤、及

50

び／または薬物の経口または非経口投与が好ましい経路であり、最も簡便である。獣医学的用途では、本発明の組成物、及び／または抗体、及び／または薬剤、及び／または薬物は、通常の獣医学診療に従って好適に許容可能な製剤として投与され、特定の動物に最も適切な投薬計画及び投与経路は獣医が決定する。したがって、本発明は、（上記そして以下にさらに記載される）様々な状態を処置するのに効果的な量の本発明の抗体及び／または薬剤を含む薬学的製剤を提供する。好ましくは、本組成物、及び／または抗体、及び／または薬剤、及び／または薬物は、静脈内、筋肉内、皮下からなる群から選択される経路による送達に適合される。

【0070】

本発明は、本発明のポリペプチド結合部分の薬学的に許容可能な酸もしくは塩基付加塩を含む、組成物、及び／または抗体、及び／または薬剤、及び／または薬物も含む。本発明において有用な前述の塩基化合物の薬学的に許容可能な酸付加塩を調製するために使用される酸は、無毒性の酸付加塩、すなわち薬理的に許容可能なアニオンを含有する塩、とりわけ塩酸塩、臭化水素酸塩、ヨウ化水素酸塩、硝酸塩、硫酸塩、重硫酸塩、リン酸塩、酸性リン酸塩、酢酸塩、乳酸塩、クエン酸塩、酸性クエン酸塩、酒石酸塩、酒石酸水素塩、コハク酸塩、マレイン酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、糖酸塩、安息香酸塩、メタンスルホン酸塩、エタンスルホン酸塩、ベンゼンスルホン酸塩、p-トルエンスルホン酸塩、及びパモ酸〔すなわち1,1'-メチレン-ビス-(2-ヒドロキシ-3ナフトエート)〕塩などを形成するものである。薬学的に許容可能な塩基付加塩も、本発明による薬剤の薬学的に許容可能な塩形態を生成するために使用され得る。本質的に酸性である本薬剤の薬学的に許容可能な塩基塩を調製するための試薬として使用され得る化学塩基は、そのような化合物と無毒性の塩基塩を形成するものである。そのような無毒性の塩基塩としては、そのような薬理的に許容可能なカチオン、例えばアルカリ金属カチオン（例えばカリウム及びナトリウム）及びアルカリ土類金属カチオン（例えばカルシウム及びマグネシウム）などから誘導される塩、アンモニウムまたはN-メチルグルカミン-（メグルミン）などの水溶性アミン付加塩、ならびに低級アルカノールアンモニウム及び薬学的に許容可能な有機アミンの他の塩基塩が挙げられるが、これらに限定されない。本発明の薬剤及び／またはポリペプチド結合部分は、保管のために凍結乾燥され、使用前に好適な担体内で再構成されてもよい。任意の好適な凍結乾燥法（例えば、噴霧乾燥、ケーキ乾燥）及び／または再構成技術が用いられ得る。凍結乾燥及び再構成は、様々な度合いの抗体活性損失につながる場合があり（例えば従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも活性損失が大きい傾向がある）、埋め合わせのために使用レベルを上方に調整する必要があり得ることは、当業者には理解されるであろう。一実施形態では、凍結乾燥された（フリーズドライされた）ポリペプチド結合部分は、再水和されたときにその活性（凍結乾燥前）の約20%以下、または約25%以下、または約30%以下、または約35%以下、または約40%以下、または約45%以下、または約50%以下を失う。

【0071】

ここでは、対象は哺乳類または非哺乳類であってもよいことが含まれる。好ましくは、哺乳類の対象はヒトであるか、またはウマ、またはウシ、またはヒツジ、またはブタ、またはラクダ、またはイヌ、またはネコなどの非哺乳類である。最も好ましくは、哺乳類の対象はヒトである。

【0072】

好ましくは、本発明は、再発癌及び／または難治性癌が、抗体治療に抵抗性である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0073】

好ましくは、本発明は、再発癌及び／または難治性癌が、(i)に定義された抗体分子に抵抗性である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0074】

好ましくは、本発明は、薬剤が、標的細胞上に存在するFcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する、組成物、または使用、または方法、ま

10

20

30

40

50

たはキットを提供する。

【0075】

上記に概説されたように、Fc受容体（FcRIIbを含む）は、細胞上に存在する膜タンパク質である。タンパク質が細胞上に存在するかどうかを検出するには、例えば、免疫組織化学的検査、及び検出可能な標識でタグ付けされたタンパク質の可視化といった当該分野で既知の方法があることは、当業者であれば理解するであろう。

【0076】

ここで「標的細胞上に存在するFcRIIb」には、FcRIIbがFcRIIbタンパク質であり、かつ/またはFcRIIbが標的細胞膜上に存在し、かつ/またはFcRIIbが標的細胞膜内に存在することが含まれる。

10

【0077】

好ましくは、本発明は、標的細胞の細胞表面抗原に特異的に結合する抗体分子であって、FcRIIbに結合することができるFcドメインを有する抗体分子が、標的細胞にFcRIIb依存性様式で内部移行することができる、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0078】

上記に概説されたように、Fc受容体（FcRIIbを含む）は、細胞への抗体分子の内部移行を媒介し、これは、抗体分子の破壊につながり得る。FcRIIbが細胞への抗体分子の内部移行を媒介する様式は、細胞生物学の当業者には既知であろう。

【0079】

ここで「標的細胞に内部移行する」には、抗体分子が細胞膜から標的細胞へと取り除かれること、及び/または抗体分子が標的細胞内にリサイクルされること、及び/または抗体分子が標的細胞に内部移行し破壊されること、及び/または抗体分子が標的細胞のエンドソーム内に被包されること、及び/または抗体分子が標的細胞に内部移行し、そのためはや治療上有効ではないこと、及び/または抗体分子が標的細胞によって形質膜陥入されることが含まれる。

20

【0080】

抗体分子がいくつかの異なるプロセスで細胞に内部移行し得ることは理解されるであろう。上で考察されたように、本発明の教示は、抗体分子のFcドメインがFcRIIbに結合することによって抗体分子が内部移行し得るということである。しかしながら、抗体分子が飲作用（細胞外分子が細胞内に受動的に取り込まれることができるプロセス）などの別のプロセスによって内部移行し得ることは理解されるであろう。抗体分子が細胞内に取り込まれ得る他のプロセスは、細胞生物学の当業者には既知であろう。

30

【0081】

ここで「FcRIIb依存性様式」には、FcRIIb活性を必要とする様式で抗体分子が内部移行することが含まれる。

【0082】

好ましくは、本発明は、FcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤が、標的細胞への抗体分子の内部移行をさらに防止または低減する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

40

【0083】

好ましくは、本発明は、難治性癌が、対象が癌処置を受けて応答していない場合、及び/または、対象が癌処置を受けたが処置中に癌が対象において進行した場合に、難治性癌であると見なされる、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0084】

ここで「対象が癌処置を受けている」には、対象が治療薬で以前に処置されているか、または治療薬で現在処置されていることが含まれる。

【0085】

ここでは、対象が治療薬で以前に処置されている場合、その処置が、約1日、または約2日、または約3日、または約4日、または約5日、または約6日、または約1週間超、

50

または約2週間超、または約3週間超、または約1ヶ月超、または約2ヶ月超、または約3ヶ月超、または約4ヶ月超、または約5ヶ月超、または約6ヶ月超、または約7ヶ月超、または約8ヶ月超、または約9ヶ月超、または約10ヶ月超、または約11ヶ月超、または約1年超、または約2年よりも月、または約3年超、または約4年超、または約5年超、または約10年超以前に行われたということも含まれる。

【0086】

ここで「治療薬」には、リツキシマブ、リツキシマブバイオシミラー、オファツムマブ、オビヌツズマブ、アレムツズマブ、オクレリズマブ、ガリキシマブ、トシツモマブ、イブリツモマブ、CD20抗体、CD40抗体、CD19抗体、CD37抗体、CD52抗体、クロラムブシル、シクロホスファミド、多分割シクロホスファミド、フルダラビン、オキサリプラチン、イブルチニブ、ヌクレオシド類似体、アルキル化剤、ベンダムスチン、ボルテゾミブ、レナリドミド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン（アドリアマイシンとしても知られる）、プレドニゾン、イダルピシン、メルファラン、クラドリピン、シタラビン、デキサメタゾン、メトトレキサート、メスナ、ゲムシタピン、テムシロリムス、ミトキサントロン、シスプラチン、サリドマイド、エトポシド、プロカルバジン、フラボピリドール、エンザスタウリン、プレオマイシン、ピンブラスチン、アントラサイクリン、イホスファミド、カルボプラチン、メチルプレドニゾロン、及びダカルバジンからなるリストから選択される1つ以上の治療薬；ならびに/または、フルダラビン及びシクロホスファミド（FC）；シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、リボソームドキシソルピシン、及びプレドニゾン（CHOP）；シクロホスファミド、ピンクリスチン、及びプレドニゾン（COP、CVPとしても知られる）；リツキシマブ、シクロホスファミド、ピンクリスチン、及びプレドニゾン（R-COP、R-CVPとしても知られる）；イダルピシン及びフルダラビン；メルファラン、クロラムブシル、及びプレドニゾン（MCP）；リツキシマブ及びクロラムブシル；リツキシマブ、シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、及びプレドニゾン（R-CHOP）；リツキシマブ、フルダラビン、及びシクロホスファミド（R-FC）；メスナ、イホスファミド、ミトキサントロン、及びエトポシド；メスナ、イホスファミド、ミトキサントロン、エトポシド、及びリツキシマブ；レナリドミド及びリツキシマブ；リツキシマブ及びクラドリピン；リツキシマブ、メルファラン、クロラムブシル、及びプレドニゾン（R-MCP）；シタラビン、シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、及びプレドニゾン；多分割シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、及びデキサメタゾン（Hyper-CVAD）；リツキシマブ、シクロホスファミド、ピンクリスチン、ドキシソルピシン、及びデキサメタゾン（R-Hyper-CVAD）；イホスファミド、カルボプラチン及びエトポシド（ICE）；イホスファミド、カルボプラチン、エトポシド、及びリツキシマブ；ゲムシタピン、デキサメタゾン、及びカルボプラチン；ゲムシタピン、デキサメタゾン、カルボプラチン、及びリツキシマブ；ゲムシタピン及びオキサリプラチン；ゲムシタピン、オキサリプラチン、及びリツキシマブ；メトトレキサート及びシタラビン；ボルテゾミブ及びゲムシタピン；リツキシマブ及びボルテゾミブ；フルダラビン、シクロホスファミド、及びミトキサントロン（FCM）；リツキシマブ、フルダラビン、シクロホスファミド、及びミトキサントロン（R-FCM、FCMRとしても知られる）；リツキシマブ及びフルダラビン；デキサメタゾン及びゲムシタピン；デキサメタゾン、ゲムシタピン、及びシスプラチン；デキサメタゾン、ゲムシタピン、シスプラチン、及びリツキシマブ；デキサメタゾン、フルダラビン、ミトキサントロン、及びデキサメタゾン（RFND）；サリドマイド及びリツキシマブ；プレドニゾン、エトポシド、プロカルバジン、及びシクロホスファミド（PEP-C）；リツキシマブ、サリドマイド、プレドニゾン、エトポシド、プロカルバジン、及びシクロホスファミド；ベンダムスチン及びリツキシマブ（BR）；リツキシマブ、シクロホスファミド、ドキシソルピシン、ピンクリスチン、エトポシド、及びプレドニゾン（R-CHOEP、EPOCH-Rとしても知られる）；アドリアマイシン、プレオマイシン、ピンブラスチン、及びダカルバジン（ABVD）；プレオマイシン、エトポシド、アドリアマイシン、シクロホスファミド、ピンクリスチン、

10

20

30

40

50

プロカルバジン、及びプレドニゾン（BEACOPP）；シクロホスファミド、ビンクリスチン、プロカルバジン、及びプレドニゾン（COPP）；シクロホスファミド、エトポシド、プレドニゾン、及びプロカルバジン（CEPP）；リツキシマブ、シクロホスファミド、エトポシド、プレドニゾン、及びプロカルバジン（RCEPP）；リツキシマブ、シクロホスファミド、リボソームドキシソルピシン、ビンクリスチン、及びプレドニゾン（RCDO P）；リツキシマブ、シクロホスファミド、ミトキサントロン、ビンクリスチン、及びプレドニゾン（RCNOP）；リツキシマブ、シクロホスファミド、エトポシド、ビンクリスチン、及びプレドニゾン；デキサメタゾン、シスプラチン、シタラビン、及びリツキシマブ（DHAP）；エトポシド、メチルプレドニゾロン、シタラビン、シスプラチン、及びリツキシマブ（ESHAP）；ならびに、クロラムブシル、ビンブラスチン、プロカルバジン、及びプレドニゾン（ChlVPP）からなるリストから選択される1つ以上の治療薬の組み合わせが含まれる。

10

【0087】

上記に概説された治療薬に加えて、癌、及び/または再発癌、及び/または難治性癌を処置するために使用され得る治療薬の他のタイプ及び組み合わせは、医学の当業者であれば理解するであろう（それらの例は、Agency for Healthcare Research and Quality Guideline Summary NCC - 9392 September 2012、Agency for Healthcare Research and Quality Guideline Summary NCC - 9278 2012、McKay et al., 2012, British Journal of Haematology: 12046、Halley et al., 2008, Blood, 111: 5446 - 5456、Wang et al., 2013, N. Engl. J. Med., 369 (6): 507 - 516、Byrd et al., N. Engl. J. Med., 369 (1): 32 - 42、及びNCCN Guidelines on Non-Hodgkin's Lymphomas Version 1.2014に見出すことができる）。

20

【0088】

ここで「癌処置を受けて応答していない」には、癌処置を受けた後に対象が癌症状の重症度の低減を示さないこと、及び/または対象が癌症状の数の低減を示さないこと、及び/または対象が改善した癌の予後を有しないこと、及び/または対象が癌の診断マーカーの低減を示さないことが含まれる。

30

【0089】

ここで「癌が対象において進行した」には、癌処置中に対象が癌症状の重症度の上昇を示すこと、及び/または対象が癌症状の数の増加を示すこと、及び/または対象がより悪い癌の予後を有すること、及び/または対象が癌の診断マーカーの増加を示すことが含まれる。

【0090】

ここで「示す」には、対象が癌症状及び/もしくは癌診断マーカーを示すこと、ならびに/または癌症状及び/もしくは癌診断マーカーが測定され得、かつ/もしくは査定され得、かつ/もしくは数量化され得ることが含まれる。

40

【0091】

癌症状及び癌診断マーカーが何であるか、そして癌症状の重症度の低減もしくは上昇、または癌診断マーカーの低減もしくは増加があるかどうかをどのように測定し、かつ/もしくは査定し、かつ/もしくは数量化するか、ならびに癌の予後を形作るためにこれらの癌症状及び/または癌診断マーカーがどのように使用され得るかは、医学の当業者には容易に明らかとなるであろう。

【0092】

癌処置はしばしば一連の処置として施される、すなわち、治療薬は、ある期間にわたって投与される。一連の処置の時間の長さはいくつかの要因に依存し、これには、他の理由の中でもとりわけ、投与されている治療薬のタイプ、処置されている癌のタイプ、処置さ

50

れている癌の重症度、ならびに対象の年齢及び健康が含まれ得る。

【0093】

ここで「処置中」には、対象が一連の処置を現在受けていること、及び/または治療薬を受けていること、及び/または一連の治療薬を受けていることが含まれる。

【0094】

好ましくは、本発明は、対象が、対象が以前に癌を処置されているが部分寛解以上を達成しない場合に、応答していないと見なされる、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0095】

寛解は、対象における癌の低減の査定に関する、癌医学の分野では周知の用語である。部分寛解も、癌医学の分野では周知の用語であり、これは、対象における癌が、特定の癌症状及び/または癌診断マーカーを使用して測定されたとき、その特定の癌症状及び/または癌診断マーカーの処置前のレベルと比較して50%低減している寛解の段階に関する。一部の状況では、対象が部分寛解しているものと分類されるには、癌症状及び/または癌診断マーカーのその低減が特定の長さの時間にわたって維持されなければならない。対象が癌の寛解にあるかどうか、そして対象が寛解のどの段階にあるかは、医学の当業者には明らかとなるであろう。

【0096】

ここで「部分寛解以上を達成しない」には、癌症状または癌診断マーカーが、癌症状の重症度の低減、及び/または癌症状の数の低減、及び/または癌の予後の改善、及び/または癌診断マーカーの低減に基づいて査定され、かつ/もしくは測定され、かつ/もしくは数量化されており、処置前の癌症状または癌診断マーカーと比較して50%未満低減していることが含まれる。

【0097】

ここではまた、対象が部分寛解以上を達成しないかどうかの査定及び/または測定及び/または数量化が、処置の休止後の癌症状及び/もしくは癌診断マーカーと、処置が始まる前の癌症状及び/もしくは癌診断マーカー、ならびに/または処置中の癌症状及び/もしくは癌診断マーカーとの比較に基づくことも含まれる。査定及び/または測定及び/または数量化が、対象が部分寛解以上を達成していないと考えられる前に、少なくとも1回、または少なくとも2回、または少なくとも3回、または少なくとも4回、または少なくとも5回、または少なくとも6回、または少なくとも7回、または少なくとも8回、または少なくとも9回、または少なくとも10回、または少なくとも15回、または少なくとも20回行われ得るということも含まれる。

【0098】

ここでは、処置の休止後の癌症状及び/または癌診断マーカーの低減が、処置が始まる前の癌症状及び/もしくは癌診断マーカー、ならびに/または処置中の癌症状及び/もしくは癌診断マーカーと比較して、約1%未満、または約5%未満、または約10%未満、または約15%未満、または約20%未満、または約25%未満、または約30%未満、または約35%未満、または約40%未満、または約45%未満、または約50%未満である場合に、対象は部分寛解以上を達成しないということがさらに含まれる。

【0099】

好ましくは、本発明は、再発癌が、対象が以前に癌を処置されており、以前に処置に応答しており、及び後に再発した場合に、再発癌であると見なされる、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0100】

ここで「以前に癌を処置されている」には、対象が治療薬で以前に処置されているが、処置が休止していることが含まれる。したがって、ここでは、治療薬を用いた処置の休止が、少なくとも約1日、または少なくとも約2日、または少なくとも約3日、または少なくとも約4日、または少なくとも約5日、または少なくとも約6日、または約1週間超、または約2週間超、または約3週間超、または約1ヶ月超、または約2ヶ月超、または約

10

20

30

40

50

3ヶ月超、または約4ヶ月超、または約5ヶ月超、または約6ヶ月超、または約7ヶ月超、または約8ヶ月超、または約9ヶ月超、または約10ヶ月超、または約11ヶ月超、または約1年超、または約2年超、または約3年超、または約4年超、または約5年超、または約10年超以前に起こった場合、対象が以前に癌の治療をされているということが含まれる。

【0101】

患者が処置に応答しているかどうかは、医学の当業者には明らかとなるであろう。

【0102】

ここで「以前に処置に応答している」には、処置の休止後、癌症状の重症度の査定かつ/もしくは測定かつ/もしくは数量化された低減、及び/または癌症状の数の低減、及び/または癌の予後の改善、及び/または癌診断マーカーの低減があることが含まれる。

10

【0103】

再発は、対象の癌が以前に処置に応答した後に、対象のその癌が悪化することに関する、癌医学の分野では周知の用語である。癌が再発したときは、医学の当業者には明らかとなるであろう。

【0104】

ここで「後に再発した」には、対象が以前に処置に応答した後に、対象が癌症状の重症度の上昇を示すこと、及び/または対象が癌症状の数の増加を示すこと、及び/または対象がより悪い癌の予後を有すること、及び/または対象が癌診断マーカーの増加を示すことが含まれる。

20

【0105】

好ましくは、本発明は、対象が、(i)処置後に少なくとも部分寛解を達成し、及び/または対象が処置後に少なくとも完全寛解を達成するが、(ii)癌が処置の休止後に対象において進行した場合に、対象が後に再発したと見なされる組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0106】

ここで「処置後の完全寛解」には、処置の休止後に検出可能な癌症状及び/または癌診断マーカーがないことが含まれる。

【0107】

ここではまた、一部の 경우에는、処置後の完全寛解は、癌症状及び/または癌診断マーカーが、処置の休止後の少なくとも約1日、または少なくとも約2日、または少なくとも約3日、または少なくとも約4日、または少なくとも約5日、または少なくとも約6日、または約1週間超、または約2週間超、または約3週間超、または約1ヶ月超、または約2ヶ月超、または約3ヶ月超、または約4ヶ月超、または約5ヶ月超、または約6ヶ月超、または約7ヶ月超、または約8ヶ月超、または約9ヶ月超、または約10ヶ月超、または約11ヶ月超、または約1年超、または約2年超、または約3年超、または約4年超、または約5年超、または約10年超、または約20年、または約30年、または約40年、または約50年にわたって検出可能でない場合であるということも含まれる。最も具体的には、一部の 경우에는、処置後の完全寛解は、癌症状及び/または癌診断マーカーが、処置の休止後の約6ヶ月超検出可能でない場合であるということが含まれる。

30

40

【0108】

好ましくは、本発明は、対象がその後、処置の休止の約1ヶ月超後に再発している、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0109】

好ましくは、本発明は、対象がその後、処置の休止の約1ヶ月超後、または約2ヶ月超後、または約3ヶ月超後、または約4ヶ月超後、または約5ヶ月超後、または約6ヶ月超後、または約7ヶ月超後、または約8ヶ月超後、または約9ヶ月超後、または約10ヶ月超後、または約11ヶ月超後、または約12ヶ月超後、または約2年超後、または約3年超後、または約4年超後、または約5年超後、または約6年超後、または約7年超後、または約8年超後、または約9年超後、または約10年超後に再発している、組成物、また

50

は使用、または方法、またはキットを提供する。最も好ましくは、対象がその後、処置の休止の約6ヶ月超後に再発している。

【0110】

好ましくは、本発明は、対象が、再発癌の特徴を少なくとも1回、または少なくとも2回、または少なくとも3回、または少なくとも4回、または少なくとも5回、または少なくとも6回、または少なくとも7回、または少なくとも8回、または少なくとも9回、または少なくとも10回示す、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0111】

ここで「再発癌の特徴を示す」には、対象が以前に癌を処置されており、以前に処置に応答しており、及び後に再発したことが含まれる。

10

【0112】

癌が再発し得るのは、対象においてその癌を処置するために以前に使用されていた処置に対して癌が抵抗性を発達させたためであると考えられている。したがって、再発癌を患う対象は、その対象において癌を処置するために以前に使用された治療薬と異なる治療薬を使用して処置されることが多い。したがって、直前に言及された実施形態では、後に対象が再発癌の特徴を示す度に、対象が、対象を以前に処置したことがある治療薬と異なる治療薬で処置されること、及び/または、対象が、対象を以前に処置したことがある治療薬と同じ治療薬で処置されることが含まれる。

【0113】

好ましくは、本発明は、処置が、抗体治療、例えば、先の実施形態の(i i)に定義された薬剤の非存在下で投与された、先の実施形態の(i)に定義された抗体分子である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

20

【0114】

ここで「非存在下で投与された」には、(i)に定義された抗体分子が、(i i)に定義された薬剤の後及び/または前の期間に投与されたことが含まれる。したがって、ここで「期間」には、(i)に定義された抗体分子が、(i i)に定義された薬剤の1時間超、または2時間超、または3時間超、または6時間超、または12時間超、または18時間超、または24時間超、または2日超、または3日超、または4日超、または5日超、または6日超、または7日超、または2週間超、または3週間超、または4週間超、または5週間超、または6週間超、または7週間超、または8週間超、または3ヶ月超、または4ヶ月超、または5ヶ月超、または6ヶ月超、または7ヶ月超、または8ヶ月超、または9ヶ月超、または10ヶ月超、または11ヶ月超、または12ヶ月超、または1年超、または2年超、または3年超、または4年超、または5年超、または10年超、または20年超前及び/または後に投与されたことが含まれる。

30

【0115】

好ましくは、本発明は、処置が、1つ以上の治療薬を含む、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0116】

好ましくは、本発明は、標的細胞が、上昇したレベルのFc RIIb発現を有する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

40

【0117】

上昇したレベルのFc RIIb発現が何であるか、そして発現がどのように測定され得るかは、分子生物学及び細胞生物学の当業者には既知であろう。例えば、上述のFc RIIb発現の測定方法に加えて、Fc RIIb発現レベルは、腫瘍生検の免疫組織化学的検査によって測定され得る。Fc RIIb発現レベルを決定するための複数の技術及び方法論があることは、当業者であれば理解するであろう。

【0118】

ここで「標的細胞が上昇したレベルのFc RIIb発現を有する」には、以下に記載されるように、標的細胞が上昇したレベルのFc RIIbタンパク質を含むこと、及び

50

／または標的細胞が対照と比較して上昇したレベルのFc R I I b mRNAを含むことが含まれる。

【0119】

好ましくは、本発明は、標的細胞上の上昇したFc R I I b発現が、対照と比較して決定される、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0120】

好適な対照は、正常なレベルのFc R I I b発現を有するものである。正しい対照の選択、及びFc R I I b発現の正常なレベルの定義は、対象、対象内の標的細胞型のタイプ、及び癌のタイプなど、いくつかの可変要因に依存し得る。適切な対照及び正常なレベルのFc R I I b発現が何であるかは、分子生物学または細胞生物学の当業者には明らかとなるであろう。

10

【0121】

ここで「対照」には、対照が対照細胞であること、及び／または対照がFc R I I b発現レベルのデータベースからの情報であることが含まれる。ここではまた、対照細胞が標的細胞と異なる細胞型であること、及び／または標的細胞と同じ細胞型であることも含まれる。ここでは、対照細胞が対照個体からのものであること、ならびにその対照個体が対象及び／または対象以外の個体であり得ることがさらに含まれる。

【0122】

好ましくは、本発明は、対照が、非難治性癌及び／または非再発癌を有する対照個体の対照細胞を含む、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

20

【0123】

ここで「非難治性癌及び／または非再発癌を有する対照個体」には、その対照個体が再発癌及び／または難治性癌ではない癌を有することが含まれる。ここではまた、その対照個体が、治療薬で以前に少なくとも1回処置されていることが含まれる。

【0124】

好ましくは、本発明は、上昇したFc R I I b発現が、対照と比較したときに対象の標的細胞において少なくとも2倍高い、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0125】

ここではまた、上昇したFc R I I b発現が、対照と比較して標的細胞において約10倍高い、または約20倍高い、または約30倍高い、または約40倍高い、または約50倍高い、または約60倍高い、または約70倍高い、または約80倍高い、または約90倍高い、または約100倍高い、または約200倍高い、または約300倍高い、または約400倍高い、または約500倍高い、または約600倍高い、または約700倍高い、または約800倍高い、または約900倍高い、または約1000倍高いことも含まれる。

30

【0126】

好ましくは、本発明は、標的細胞が癌細胞である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0127】

癌細胞は、癌の特徴を示す細胞であり、すなわち、癌細胞は1つ以上の癌診断マーカーを示す。標的細胞が癌細胞であるかどうかは、細胞生物学及び腫瘍学の当業者には明らかとなるであろう。

40

【0128】

好ましくは、本発明は、標的細胞がB細胞である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0129】

B細胞（ないしはBリンパ球として知られる）は、細胞表面上のB細胞受容体の存在によって免疫系の他の細胞から区別される、適応免疫応答の細胞型である。

【0130】

50

ここで「B細胞」には、プラズマB細胞（エフェクターB細胞としても知られる）、及び/またはメモリーB細胞、及び/またはB-1細胞、及び/またはB-2細胞、及び/または辺縁帯B細胞、及び/または濾胞性B細胞、及び/または制御性B細胞、及び/またはナイーブB細胞が含まれる。

【0131】

好ましくは、本発明は、再発癌、及び/または難治性癌、及び/または癌細胞、及び/または同じ癌タイプ、及び/または癌が、非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、小リンパ球性リンパ腫を含む群から選択される、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

10

【0132】

非ホジキンリンパ腫（NHL）は、異なるリンパ腫の一群に対する集合名であり、これにはとりわけ、濾胞性細胞リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、脾性辺縁帯リンパ腫、MALTLリンパ腫、リンパ形質細胞性NHL（ヴァルデンストレームマクログロブリン血症としても知られる）、小リンパ球性リンパ腫、慢性リンパ性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、びまん性混合細胞型リンパ腫（diffused mixed cell lymphoma）、パーキットリンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、及びびまん性混合細胞型リンパ腫（diffuse mixed cell lymphoma）が含まれる。

20

【0133】

上述の癌の各々は周知であり、これらの癌を処置するために使用される治療薬が十分に説明されているように、症状及び癌診断マーカーは十分に説明されている。したがって、症状、癌診断マーカー、ならびに非ホジキンリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、マンツル細胞リンパ腫、慢性リンパ性白血病、及び小リンパ球性リンパ腫を処置するために使用される治療薬は、医学の当業者には既知であろう。

【0134】

好ましくは、本発明は、対象が応答していないこと、及び/または対象における部分寛解、及び/または対象における完全寛解、及び/または癌が対象において進行していることが、

- (i) リンパ球数、及び/または
- (ii) 好中球数、及び/または
- (iii) 血小板数、及び/または
- (iv) ヘモグロビン数、及び/または
- (v) 腫瘍細胞の割合、及び/または
- (vi) 骨髄リンパ球の割合、及び/または
- (vii) 循環リンパ球の割合、及び/または
- (viii) リンパ球上のバイオマーカーの存在及び/もしくは非存在、及び/または
- (ix) 癌進行度分類、及び/または
- (x) 組織学的検査、及び/または
- (xi) 骨髄検査、及び/または
- (xii) 細胞遺伝学的検査、及び/または
- (xiii) リンパ節評価、及び/または
- (xiv) 身体的症状、及び/または
- (xv) 脾臓内の癌細胞の低減

30

40

50

を含む群から1つ以上を測定することによって決定される、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0135】

(i)、(ii)、(iii)、(iv)、(v)、(vi)、(vii)、(viii)、(ix)、(x)、(xi)、(xii)、(xiii)、及び(xv)が「癌診断マーカー」に関し、(xiv)が「癌症状」に関することは理解されるであろう。

【0136】

腫瘍学の分野における数十年の研究及び技術革新によって、癌診断マーカー及び癌症状の測定方法及び査定方法が十分に特徴付けられているように、多数の癌の「癌診断マーカー」及び「癌症状」は十分に特徴付けられている。したがって、腫瘍学の当業者であれば、上記のポイントの各々が特定の癌にどのように関連するかを理解し、特定の癌診断マーカーまたは癌症状の測定もしくは査定に基づいて、対象が処置に应答していないかどうか、または対象が部分寛解にあるかどうか、または対象が完全寛解にあるかどうか、または癌が対象において進行しているかどうかは、当業者には容易に明らかになるであろう(それらの例は、McKay et al., 2012, British Journal of Haematology: 12046、Haliek et al., 2008, Blood, 111: 5446-5456、及びNCCN Guidelines on Non-Hodgkin's Lymphomas Version 1.2014に見出すことができる)。

【0137】

いくつかの癌診断マーカー(例えば「リンパ球数」、「好中球数」、「血小板数」、「ヘモグロビン数」、「異型細胞の割合」、「骨髄リンパ球の割合」、及び「循環リンパ球の割合」など)の査定は、対象内の細胞及び分子の数量化に依存する。これらの細胞及び分子を数量化するためのアッセイは、当該分野で周知である。

【0138】

ここで「腫瘍細胞」には、新生細胞、ならびに/またはCD19+、CD5+、及びCD23+である新生細胞が含まれる。

【0139】

いくつかのバイオマーカーは、ある特定のタイプの癌を示し得る。例えば、慢性リンパ性白血病細胞は、CD5、CD19、CD20、及びCD23を同時発現する。しかしながら、CD20及びCD79bのレベルは、正常なB細胞と比較した場合により低い。

【0140】

ここで「リンパ球上のバイオマーカーの存在及び/または非存在」には、「存在」という用語が、対照B細胞と比較したときに増加した量のバイオマーカー、または検出可能なバイオマーカーを含むこと、そして、非存在が、対照B細胞と比較したときに低減した量のバイオマーカー、または検出可能なバイオマーカーがないことを含むことが含まれる。ここではまた、対照B細胞が「対照個体」からのものであり得ることも含まれる。ここでは、リンパ球上のバイオマーカーの存在及び/もしくは非存在が、CD5、及び/もしくはCD19、及び/もしくはCD20、及び/もしくはCD23、及び/もしくはサイクリンD1、及び/もしくはBCL2、及び/もしくはFMC6、及び/もしくはCD3、及び/もしくはCD10及び/もしくはBCL6、及び/もしくはCD21、及び/もしくはCD45、及び/もしくはKi-67、及び/もしくはIRF4/MUM1、及び/もしくはMYC、及び/もしくはCD30、及び/もしくはCD138、及び/もしくはEBER-ISH、及び/もしくはALK、及び/もしくはHHV8、及び/もしくは/、及び/もしくはCD79bの存在、ならびに/またはCD20、及び/もしくはCD79b、及び/もしくはCD10、及び/もしくはCD23、及び/もしくはBCL6の非存在を含むことがさらに含まれる。

【0141】

多数の癌の診断、予後、及び進行の臨床的定義は、進行度分類として知られるある特定の分類に依存する。こうした進行度分類システムは、いくつかの異なる癌診断マーカー及

10

20

30

40

50

び癌症状を並べて、癌の診断、及び/または予後、及び/または進行の概要を提供するように働く。進行度分類システムを使用して癌の診断、及び/または予後、及び/または進行をどのように査定するか、そしてそのためにどの癌診断マーカー及び癌症状を使用すべきかは、腫瘍学の当業者には既知であろう。

【0142】

ここで「癌進行度分類」には、ステージ0、ステージI、ステージII、ステージIII、及びステージIVを含むRai分類、ならびに/またはステージA、ステージB、及びステージCを含むBinet分類、ならびに/またはステージI、ステージII、ステージIII、及びステージIVを含むAnn Arbor分類が含まれる。

【0143】

癌が細胞の形態の異常を引き起こし得ることは既知である。これらの異常は、ある特定の癌において再現性よく発生することが多く、これは、こうした形態変化の検査（ないしは組織学的検査として知られる）が、癌の診断または予後に使用され得ることを意味する。細胞の形態を検査するために試料を可視化するための技術、及び可視化のために試料を調製するための技術、例えば、光学顕微鏡法または共焦点顕微鏡法は、当該分野で周知である。

【0144】

ここで「組織学的検査」には、小型の成熟リンパ球の存在、ならびに/または細胞質の縁が狭い小型の成熟リンパ球の存在、認識可能な核小体を欠く密な核を有する小型の成熟リンパ球の存在、ならびに/または細胞質の縁が狭く、かつ認識可能な核小体を欠く密な核を有する小型の成熟リンパ球の存在、ならびに/または異型細胞、及び/もしくは非正円形細胞、及び/もしくは前リンパ球の存在が含まれる。

【0145】

癌は、細胞が細胞死または制御不可能な増殖を回避することにつながり得る、細胞のDNA内の変異の結果であることは周知である。したがって、これらの変異の検査（細胞遺伝学的検査としても知られる）は、癌の診断及び/または予後を査定するための有用な手段となり得る。この一例は、慢性リンパ性白血病の特徴である染色体上の位置13q14.1の欠失である。細胞内の変異を検査するための技術、例えば、蛍光インサイツハイブリダイゼーション法（FISH）は、当該分野で周知である。

【0146】

ここで「細胞遺伝学的検査」には、細胞、具体的には染色体内のDNAの検査が含まれる。細胞遺伝学的検査は、難治性癌及び/または再発癌の存在に関連し得るDNAの変化を同定するために使用され得る。そのようなものとしては、染色体13の長腕における欠失、ならびに/または染色体上の位置13q14.1の欠失、ならびに/または染色体12のトリソミー、ならびに/または染色体12の長腕における欠失、ならびに/または染色体11の長腕における欠失、ならびに/または11qの欠失、ならびに/または染色体6の長腕における欠失、ならびに/または6qの欠失、ならびに/または染色体17の短腕における欠失、ならびに/または17pの欠失、ならびに/またはt(11:14)転座、ならびに/または(q13:q32)転座、ならびに/または抗原遺伝子受容体再構成、ならびに/またはBCL2再構成、ならびに/またはBCL6再構成、ならびに/またはt(14:18)転座、ならびに/またはt(11:14)転座、ならびに/または(q13:q32)転座、ならびに/または(3:v)転座、ならびに/または(8:14)転座、ならびに/または(8:v)転座、ならびに/またはt(11:14)及び(q13:q32)転座を挙げることができる。

【0147】

癌を患う対象が、しばしば癌が身体にかかる負担の結果として、ある特定の身体的症状を示すことは既知である。これらの症状は同じ癌において再度起こることが多く、そのため、疾患の診断、及び/または予後、及び/または進行の特徴となり得る。どの身体的症状がどの癌に関連するか、そしてこれらの身体系の査定が、疾患の診断、及び/または予後、及び/または進行とどのように相関するかは、医学の当業者であれば理解するである

10

20

30

40

50

う。

【0148】

ここで「身体的症状」には、肝腫及び/または脾腫が含まれる。

【0149】

ここで「対象が応答していないこと」には、処置前と処置の休止後とで比較したとき、ならびに/または処置中と処置の休止後とで比較したとき、ならびに/または処置中の対象において、直前の実施形態のポイント(i)、及び/もしくは(ii)、及び/もしくは(iii)、及び/もしくは(iv)、及び/もしくは(v)、及び/もしくは(vi)、及び/もしくは(vii)、及び/もしくは(viii)、及び/もしくは(ix)、及び/もしくは(x)、及び/もしくは(xi)、及び/もしくは(xii)、及び/もしくは(xiii)、及び/もしくは(xiv)、及び/もしくは(xv)の測定ならびに/または査定が未変化であること、あるいは変化が生じた場合にはそれが無視できることが含まれる。

10

【0150】

ここで「対象における部分寛解」には、「リンパ球数」については、処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後にリンパ球数が少なくとも50%減少すること、そして/あるいは「リンパ節評価」については、処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後に1つ以上のリンパ節の大きさが少なくとも50%減少すること、かつ/またはさらなる肥大したリンパ節がないこと、そして/あるいは「身体的症状」については、処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後に(脾腫に関連して)脾臓の大きさが少なくとも50%減少すること、かつ/または処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後に(肝腫に関連して)肝臓の大きさが少なくとも50%減少すること、そして/あるいは「好中球数」については、1500細胞/ μ l以下であること、そして/あるいは「血小板数」については、100,000血小板/ μ l以下であること、そして/あるいは処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後に好中球数の数が少なくとも50%減少すること、そして/あるいは「ヘモグロビン数」については、11g/dL以下であること、かつ/または処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後にヘモグロビンの量が少なくとも50%減少することが含まれる。

20

【0151】

ここで「対象における完全寛解」には、「リンパ球数」については、最大でも4000細胞/ μ lの細胞数であること、そして/または「リンパ節評価」については、リンパ節が最大でも直径1.5cmであること、そして/または「身体的症状」については、検出可能な肝腫がないこと、及び/もしくは検出可能な脾腫がないこと、そして/または「好中球数」については、1500細胞/ μ l以下であること、そして/または「血小板数」については、100,000血小板/ μ l以下であること、そして/または「ヘモグロビン数」については、11g/dL以下であることが含まれる。

30

【0152】

ここで「癌が対象において進行していること」には、「リンパ球数」については、処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後にリンパ球数の数が少なくとも50%増加すること、かつ/または少なくとも5000細胞/ μ l超であること、そして/あるいは「リンパ節評価」については、処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後に少なくとも1.5cmの直径までリンパ節が肥大すること、かつ/またはリンパ節の大きさが少なくとも50%増加すること、そして/あるいは「身体的症状」については、肝腫の出現があること、かつ/または脾腫の出現があること、かつ/または処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後に(脾腫に関連して)脾臓の大きさが少なくとも50%増加すること、かつ/または処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後に(肝腫に関連して)肝臓の大きさが少なくとも50%増加すること、そして/あるいは「ヘモグロビン数」については、ヘモグロビンレベルが20g/L超低下すること、かつ/またはヘモグロビンレベルが100g/L未満に低下すること、「血小板数」については、処置前及び/もしくは処置中と比較して処置の休止後に好中球数の数が少なくとも50%

40

50

減少すること、かつ/または最大でも100,000血小板/ μ lであることが含まれる。

【0153】

好ましくは、本発明は、薬剤が、ポリペプチド、またはアンチカリン、またはペプチド、または抗体、またはキメラ抗体、または単鎖抗体、またはアプタマー、または設計アンキリン反復タンパク質(DARPin)、またはFab、もしくはF(ab)₂、もしくはFv、もしくはScFv、もしくはdAb抗体断片、またはIgG2抗体、またはIgG4抗体、またはIgG2及びIgG4のキメラ分子、またはN297Q変異を含む抗体変異体、またはDNA変異抗体、または小分子、または天然物、またはアフィボディ、またはペプチド模倣薬、または核酸、またはペプチド核酸分子、または脂質、または炭水化物、または、アンキリン反復タンパク質、もしくはアルマジロ反復タンパク質、もしくはロイシンリッチタンパク質、もしくはテトラリオペプチド反復タンパク質、もしくは設計アンキリン反復タンパク質(DARPin)を含むモジュールフレームワークに基づくタンパク質を含む、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

10

【0154】

好ましくは、本発明は、(ii)に定義された薬剤が、FcRIIbに特異的に結合する1つ以上の抗体分子である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0155】

好ましくは、本発明は、(ii)に定義された薬剤が、エフェクター細胞を動員することができるドメインを含まない1つ以上の抗体分子である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

20

【0156】

免疫系は、免疫応答をもたらすこと、助けること、または維持することにおいて各々が異なる役割を有する、いくつかの異なる細胞型を含む。免疫におけるその役割を担うために、免疫系の細胞は、しばしばこの細胞が特定の身体的位置または標的(例えばシグナルを保有する細胞など)に動員されることをもたらす刺激に反応することが多い。免疫系の細胞のクラスの1つはエフェクター細胞であり、その同一性及び役割は、免疫学の当業者には周知であろう。

【0157】

ここで「エフェクター細胞」には、エフェクターT細胞、及び/またはエフェクターB細胞(プラズマ細胞としても知られる)、及び/またはエフェクターメモリーT細胞、及び/またはエフェクターメモリーCD4⁺T細胞、及び/またはエフェクターメモリーCD8⁺T細胞が含まれる。

30

【0158】

ここで「エフェクター細胞を動員することができるドメイン」には、エフェクター細胞を抗体分子の位置に動員する抗体分子上のエピトープ及び/または抗原が含まれる。ここではまた、エフェクター細胞を動員することができるドメインが、抗体分子のFcドメイン、ならびに/または抗体分子のFcドメイン上の抗原及び/もしくはエピトープであり得るということも含まれる。

40

【0159】

好ましくは、本発明は、(ii)に定義された薬剤が、モノクローナル抗体分子、及び/またはポリクローナル抗体分子、及び/または二重特異性抗体分子である1つ以上の抗体分子である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0160】

上記に概説されたように、異なるタイプ及び形態の抗体が本発明に含まれ、免疫学の当業者には既知であろう。治療目的で使用される抗体が、抗体分子の特性を改質するさらなる構成要素でしばしば修飾されることは周知である。

【0161】

したがって、ここでは、本発明の抗体分子(例えば、モノクローナル抗体分子、及び/

50

またはポリクローナル抗体分子、及び/または二重特異性抗体分子)が、検出可能な部分及び/または細胞傷害性部分を含むということが含まれる。

【0162】

ここで「検出可能な部分」には、酵素、放射性原子、蛍光部分、化学発光部分、生物発光部分からなる群からの1つ以上が含まれる。検出可能な部分は、インビトロ、及び/またはインビボ、及び/またはエクスビボで抗体分子が可視化されることを可能にする。

【0163】

ここで「細胞傷害性部分」には、放射性部分、及び/または酵素(ここで酵素はカスペーゼである)、及び/または毒素(ここで毒素は細菌性毒素または毒液である)が含まれ、細胞傷害性部分は、細胞溶解を誘発することができる。

10

【0164】

ここでは、抗体分子が単離形態及び/もしくは精製形態であり得、かつ/またはPEG化されていてもよいことがさらに含まれる。

【0165】

以下の実施形態において、配列番号は以下のクローンで示される配列を指す。

【0166】

上で考察されたように、抗体のCDRは、抗体標的に結合する。本明細書に記載される各CDRに対するアミノ酸の割り当ては、Kabata E A et al. 1991, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" Fifth Edition, NIH Publication No. 91-3242, pp xv-xviiによる定義に従う。

20

【0167】

当業者であれば認識しているように、アミノ酸を各CDRに割り当てるための他の方法も存在する。例えば、International Immunogenetics情報システム(IMGTR)(<http://www.imgt.org/>及びAcademic Press(2001)出版のLefranc and Lefranc "The Immunoglobulin Facts Book")。

【0168】

3つ以下のCDR領域(一部の 경우에는、ほんの単一のCDRまたはその一部のみ)を含む分子が、CDR(複数可)が誘導される抗体の抗原結合活性を保持することができることは理解されている。例えば、Gao et al., 1994, J. Biol. Chem., 269:32389-93には、全VL鎖(3つのCDR全てを含む)がその基質に対して高い親和性を有することが記載されている。

30

【0169】

2つのCDR領域を含む分子は、例えば、Vaughan & Sollazzo 2001, Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening, 4:417-430に記載されている。418ページ(右のコラム、3 Our Strategy for Design)には、フレームワーク領域内に散在するH1及びH2 CDR高頻度可変領域のみを含むミニボディ(minibody)が記載されている。このミニボディは、標的に結合することができるものとして記載されている。Pessi et al., 1993, Nature, 362:367-9及びBianchi et al., 1994, J. Mol. Biol., 236:649-59は、Vaughan & Sollazzoによって参照され、H1及びH2ミニボディならびにその特性をより詳細に記載している。Qiu et al., 2007, Nature Biotechnology, 25:921-9では、2つの結合したCDRからなる分子が抗原に結合することができることが実証されている。Quioco 1993, Nature, 362:293-4は、「ミニボディ」技術の概要を提供する。Ladner 2007, Nature Biotechnology, 25:875-7は、2つのCDRを含む分子は抗原結合活性を保持できると述べている。

40

50

【0170】

単一のCDR領域を含む分子は、例えば、Laune et al., 1997, JBC, 272:30937-44に記載されており、ここでは、あるCDRから誘導されたある範囲のヘキサペプチドが抗原結合活性を示すことが実証され、完全な単一のCDRの合成ペプチドが強い結合活性を示すと記述されている。Monnet et al., 1999, JBC, 274:3789-96では、ある範囲の12アミノ酸長のペプチド及び関連するフレームワーク領域が抗原結合活性を有することが示され、CDR3様ペプチドが単独で抗原に結合できると述べられている。Heap et al., 2005, J. Gen. Virol., 86:1791-1800では、「マイクロ抗体」（単一のCDRを含む分子）が抗原に結合できると報告されており、抗HIV抗体からの環状ペプチドが抗原結合活性及び機能を有すると示されている。Nicaisse et al., 2004, Protein Science, 13:1882-91では、単一のCDRがそのリゾチーム抗原に対する抗原結合活性及び親和性を与えることができると示されている。

10

【0171】

このように、3つ以下のCDRを有する分子は、それらが誘導される抗体の抗原結合特性を保持することができる。

【0172】

好ましくは、本発明は、薬剤が、以下のCDR：

- (i) 配列番号 51、及び配列番号 52、及び配列番号 53、または
- (ii) 配列番号 57、及び配列番号 58、及び配列番号 59、または
- (iii) 配列番号 63、及び配列番号 64、及び配列番号 65、または
- (iv) 配列番号 69、及び配列番号 70、及び配列番号 71、または
- (v) 配列番号 75、及び配列番号 76、及び配列番号 77、または
- (vi) 配列番号 81、及び配列番号 82、及び配列番号 83、または
- (vii) 配列番号 87、及び配列番号 88、及び配列番号 89、または
- (viii) 配列番号 93、及び配列番号 94、及び配列番号 95、または
- (ix) 配列番号 99、及び配列番号 100、及び配列番号 101、または
- (x) 配列番号 105、及び配列番号 106、及び配列番号 107、または
- (xi) 配列番号 111、及び配列番号 112、及び配列番号 113、または
- (xii) 配列番号 117、及び配列番号 118、及び配列番号 119、または
- (xiii) 配列番号 123、及び配列番号 124、及び配列番号 125、または
- (xiv) 配列番号 129、及び配列番号 130、及び配列番号 131、または
- (xv) 配列番号 135、及び配列番号 136、及び配列番号 137、または
- (xvi) 配列番号 141、及び配列番号 142、及び配列番号 143、または
- (xvii) 配列番号 147、及び配列番号 148、及び配列番号 149、または
- (xviii) 配列番号 153、及び配列番号 154、及び配列番号 155、または
- (xix) 配列番号 159、及び配列番号 160、及び配列番号 161、または
- (xx) 配列番号 165、及び配列番号 166、及び配列番号 167、または
- (xxi) 配列番号 171、及び配列番号 172、及び配列番号 173、または
- (xxii) 配列番号 177、及び配列番号 178、及び配列番号 179、または
- (xxiii) 配列番号 183、及び配列番号 184、及び配列番号 185、または
- (xxiv) 配列番号 189、及び配列番号 190、及び配列番号 191

10

20

30

を有する可変重鎖 (VH) を含む、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0173】

好ましくは、本発明は、薬剤が、以下の CDR :

40

- (i) 配列番号54、及び配列番号55、及び配列番号56、または
- (ii) 配列番号60、及び配列番号61、及び配列番号62、または
- (iii) 配列番号66、及び配列番号67、及び配列番号68、または
- (iv) 配列番号72、及び配列番号73、及び配列番号74、または
- (v) 配列番号78、及び配列番号79、及び配列番号80、または
- (vi) 配列番号84、及び配列番号85、及び配列番号86、または
- (vii) 配列番号90、及び配列番号91、及び配列番号92、または
- (viii) 配列番号96、及び配列番号97、及び配列番号98、または 10
- (ix) 配列番号102、及び配列番号103、及び配列番号104、または
- (x) 配列番号108、及び配列番号109、及び配列番号110、または
- (xi) 配列番号114、及び配列番号115、及び配列番号116、または
- (xii) 配列番号120、及び配列番号121、及び配列番号122、または
- (xiii) 配列番号126、及び配列番号127、及び配列番号128、または
- (xiv) 配列番号132、及び配列番号133、及び配列番号134、または
- (xv) 配列番号138、及び配列番号139、及び配列番号140、または 20
- (xvi) 配列番号144、及び配列番号145、及び配列番号146、または
- (xvii) 配列番号150、及び配列番号151、及び配列番号152、または
- (xviii) 配列番号156、及び配列番号157、及び配列番号158、または
- (xix) 配列番号162、及び配列番号163、及び配列番号164、または
- (xx) 配列番号168、及び配列番号169、及び配列番号170、または
- (xxi) 配列番号174、及び配列番号175、及び配列番号176、または 30
- (xxii) 配列番号180、及び配列番号181、及び配列番号182、または
- (xxiii) 配列番号186、及び配列番号187、及び配列番号188、または
- (xxiv) 配列番号192、及び配列番号193、及び配列番号194
- (v)

を有する可変軽鎖 (VL) を含む、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0174】

好ましくは、本発明は、薬剤が、配列番号3、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、及び配列番号26からなる群から選択される可変重鎖 (VH) アミノ酸配列を有する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0175】

好ましくは、本発明は、薬剤が、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41

40

50

、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46、配列番号47、配列番号48、配列番号49、及び配列番号50からなる群から選択される可変軽鎖（VL）アミノ酸配列を有する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0176】

好ましくは、本発明は、薬剤が、以下のCDRアミノ酸配列：

- (i) 配列番号51、及び配列番号52、及び配列番号53、及び配列番号54、
及び配列番号55、及び配列番号56、または
- (ii) 配列番号57、及び配列番号58、及び配列番号59、及び配列番号60、
及び配列番号61、及び配列番号62、または
- (iii) 配列番号63、及び配列番号64、及び配列番号65、及び配列番号66、
及び配列番号67、及び配列番号68、または
- (iv) 配列番号69、及び配列番号70、及び配列番号71、及び配列番号72、
及び配列番号73、及び配列番号74、または
- (v) 配列番号75、及び配列番号76、及び配列番号77、及び配列番号78、
及び配列番号79、及び配列番号80、または
- (vi) 配列番号81、及び配列番号82、及び配列番号83、及び配列番号84、
及び配列番号85、及び配列番号86、または
- (vii) 配列番号87、及び配列番号88、及び配列番号89、及び配列番号90、
及び配列番号91、及び配列番号92、または
- (viii) 配列番号93、及び配列番号94、及び配列番号95、及び配列番号96、
及び配列番号97、及び配列番号98、または
- (ix) 配列番号99、及び配列番号100、及び配列番号101、及び配列番号102、
及び配列番号103、及び配列番号104、または
- (x) 配列番号105、及び配列番号106、及び配列番号107、及び配列番号108、
及び配列番号109、及び配列番号110、または
- (xi) 配列番号111、及び配列番号112、及び配列番号113、及び配列番号114、
及び配列番号115、及び配列番号116、または
- (xii) 配列番号117、及び配列番号118、及び配列番号119、及び配列番号120、
及び配列番号121、及び配列番号122、または
- (xiii) 配列番号123、及び配列番号124、及び配列番号125、及び配列番号126、
及び配列番号127、及び配列番号128、または
- (xiv) 配列番号129、及び配列番号130、及び配列番号131、及び配列番号132、
及び配列番号133、及び配列番号134、または
- (xv) 配列番号135、及び配列番号136、及び配列番号137、及び配列番号138、
及び配列番号139、及び配列番号140、または
- (xvi) 配列番号141、及び配列番号142、及び配列番号143、及び配列番号144、
及び配列番号145、及び配列番号146、または
- (xvii) 配列番号147、及び配列番号148、及び配列番号149、及び配列番号150、
及び配列番号151、及び配列番号152、または
- (xviii) 配列番号153、及び配列番号154、及び配列番号155、及び配列番号156、
及び配列番号157、及び配列番号158、または
- (xix) 配列番号159、及び配列番号160、及び配列番号161、及び配列番号162、
及び配列番号163、及び配列番号164、または
- (xx) 配列番号165、及び配列番号166、及び配列番号167、及び配列番号168、
及び配列番号169、及び配列番号170、または
- (xxi) 配列番号171、及び配列番号172、及び配列番号173、及び配列番号174、
及び配列番号175、及び配列番号176、または
- (xxii) 配列番号177、及び配列番号178、及び配列番号179、及び配列番号180、
及び配列番号181、及び配列番号182、または
- (xxiii) 配列番号183、及び配列番号184、及び配列番号185、及び配列番号186、
及び配列番号187、及び配列番号188、または
- (xxiv) 配列番号189、及び配列番号190、及び配列番号191、及び配列番号192、
及び配列番号193、及び配列番号194

を有する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0177】

好ましくは、本発明は、薬剤が、以下のアミノ酸配列：

- (i) 配列番号 3、及び配列番号 27、または
- (ii) 配列番号 4、及び配列番号 28、または
- (iii) 配列番号 5、及び配列番号 29、または
- (iv) 配列番号 6、及び配列番号 30、または
- (v) 配列番号 7、及び配列番号 31、または
- (vi) 配列番号 8、及び配列番号 32、または
- (vii) 配列番号 9、及び配列番号 33、または
- (viii) 配列番号 10、及び配列番号 34、または
- (ix) 配列番号 11、及び配列番号 35、または
- (x) 配列番号 12、及び配列番号 36、または
- (xi) 配列番号 13、及び配列番号 37、または
- (xii) 配列番号 14、及び配列番号 38、または
- (xiii) 配列番号 15、及び配列番号 39、または
- (xiv) 配列番号 16、及び配列番号 40、または
- (xv) 配列番号 17、及び配列番号 41、または
- (xvi) 配列番号 18、及び配列番号 42、または
- (xvii) 配列番号 19、及び配列番号 43、または
- (xviii) 配列番号 20、及び配列番号 44、または
- (xix) 配列番号 21、及び配列番号 45、または
- (xx) 配列番号 22、及び配列番号 46、または
- (xxi) 配列番号 23、及び配列番号 47、または
- (xxii) 配列番号 24、及び配列番号 48、または
- (xxiii) 配列番号 25、及び配列番号 49、または
- (xxiv) 配列番号 26、及び配列番号 50

10

20

30

40

50

を有する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0178】

本発明の薬剤はまた、配列番号 1 ならびに配列番号 2 の定常領域 (CH) 及び (CL) を含んでもよい。

【0179】

さらなる実施形態では、薬剤は、Fc RIIb が抗体分子の Fc ドメインに結合することを防止または低減するために、本明細書に記載される本発明の薬剤、例えば上記の実施形態に記載されたアミノ酸配列 (例えば配列番号 1 ~ 194) を有する薬剤と競合することができる。

【0180】

ここで、Fc RIIb が抗体分子の Fc ドメインに結合することを防止または低減するために、本明細書に定義される薬剤 (例えば抗原分子など) と「競合することができる」とは、試験される薬剤が、本明細書に定義される薬剤が Fc RIIb に結合すること

を少なくとも部分的に抑制するか、または別様に妨げること、及びFcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減することができることを意味する。

【0181】

例えば、この薬剤は、本明細書に記載される薬剤の結合性を少なくとも約10%、例えば少なくとも約20%、もしくは少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約100%抑制すること、及び/あるいはFcRIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減する薬剤の能力を少なくとも約10%、例えば少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%、少なくとも約80%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、もしくは少なくとも約100%抑制することができる。 10

【0182】

競合的結合性は、当業者に周知の方法、例えば酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)などによって決定され得る。

【0183】

ELISAアッセイは、エピトープ修飾抗体または遮断抗体を評価するために使用され得る。競合する抗体を同定するのに好適なさらなる方法は、参照により本明細書に組み込まれるAntibodies: A Laboratory Manual, Harlow & Laneに開示されている(例えば、ページ567~569、574~576、583、及び590~612(1988, CSHL, NY, ISBN 0-87969-314-2)を参照のこと)。 20

【0184】

本発明の薬剤は、以下の定常領域(CH及びCL)を含んでもよい。

【0185】

IgG1-CH [配列番号1]

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G
P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T
Q K S L S L S P G K 30

【0186】

1-CL [配列番号2]

Q P K A A P S V T L F P P S S E E L Q A N K A T L V C L I S D F Y P G A V T V A
W K A D S S P V K A G V E T T T P S K Q S N N K Y A A S S Y L S L T P E Q W K S
H R S Y S C Q V T H E G S T V E K T V A P T E C S 40

【0187】

本発明の薬剤は、以下のクローンの1つ以上の配列を有してもよい。

抗体クローン: 1A01

1A01-VH [配列番号3]

EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFS DY YMNWIRQTPGKGLEWVS LIGWDGGS
TYYADSVKGRRFTISRDNSENTLYLQMNSLR AEDTAVYYCAR AYSGYELDYWGQGTLVTVSS

1A01-VL [配列番号27]

10

20

30

40

50

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNASIFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : D Y Y M N [配列番号 5 1]

CDRH2 : L I G W D G G S T Y Y A D S V K G [配列番号 5 2]

CDRH3 : A Y S G Y E L D Y [配列番号 5 3]

CDRL1 : S G S S S N I G N N A V N [配列番号 5 4]

CDRL2 : D N N N R P S [配列番号 5 5]

CDRL3 : A A W D D S L N A S I [配列番号 5 6]

【 0 1 8 8 】

抗体クローン : 1 B 0 7

1 B 0 7 - V H [配列番号 4]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAFTRYDGS
NKYYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARENIDAFDVWGQGLTVT
VSS

1 B 0 7 - V L [配列番号 2 8]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYDNQQRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCEAWDDRLFPGPVFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : S Y G M H [配列番号 5 7]

CDRH2 : F T R Y D G S N K Y Y A D S V R G [配列番号 5 8]

CDRH3 : E N I D A F D V [配列番号 5 9]

CDRL1 : S G S S S N I G N N A V N [配列番号 6 0]

CDRL2 : D N Q Q R P S [配列番号 6 1]

CDRL3 : W D D R L F G P V [配列番号 6 2]

【 0 1 8 9 】

抗体クローン : 1 C 0 4

1 C 0 4 - V H [配列番号 5]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISDSGAG
RYYADSVVEGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARTHDSGELLDAFDI
TLVTVSS

1 C 0 4 - V L [配列番号 2 9]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNHVLWYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVWVFGGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : S Y A M S [配列番号 6 3]

CDRH2 : S I S D S G A G R Y Y A D S V E G [配列番号 6 4]

CDRH3 : T H D S G E L L D A F D I [配列番号 6 5]

CDRL1 : S G S S S N I G S N H V L [配列番号 6 6]

CDRL2 : G N S N R P S [配列番号 6 7]

C D R L 3 : A A W D D S L N G W V [配列番号 6 8]

【 0 1 9 0 】

抗体クローン : 1 E 0 5

1 E 0 5 - V H [配列番号 6]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[TYAMN]WVRQVPGKGLEWVA[VISYDGSN]
[KNYVDSVKG]RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARN[FDNSGYAIPDAFDI]WG
QGLTVTVSS

1 E 0 5 - V L [配列番号 3 0]

10

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCT[GSSSNIGAGYDVH]WYQQLPGTAPKLLIY[DNNSRPS]
GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLGGPV[FGGGTKLTVLG]

C D R 領域

C D R H 1 : T Y A M N [配列番号 6 9]

C D R H 2 : V I S Y D G S N K N Y V D S V K G [配列番号 7 0]

C D R H 3 : N F D N S G Y A I P D A F D I [配列番号 7 1]

C D R L 1 : T G S S S N I G A G Y D V H [配列番号 7 2]

C D R L 2 : D N N S R P S [配列番号 7 3]

20

C D R L 3 : A A W D D S L G G P V [配列番号 7 4]

【 0 1 9 1 】

抗体クローン : 2 A 0 9

2 A 0 9 - V H [配列番号 7]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[NAWMS]WVRQAPGKGLEWVA[YISRDAI]
[THYPASVKGR]RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTT[GFDYAGDDAFDI]WGQGT
LTVTVSS

2 A 0 9 - V L [配列番号 3 1]

30

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCS[GSSSNIGSNAVN]WYQQLPGTAPKLLIY[GNSDRPSG]
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGRWW[FGGGTKLTVLG]

C D R 領域

C D R H 1 : N A W M S [配列番号 7 5]

C D R H 2 : Y I S R D A D I T H Y P A S V K G [配列番号 7 6]

C D R H 3 : G F D Y A G D D A F D I [配列番号 7 7]

C D R L 1 : S G S S S N I G S N A V N [配列番号 7 8]

C D R L 2 : G N S D R P S [配列番号 7 9]

40

C D R L 3 : A A W D D S L N G R W V [配列番号 8 0]

【 0 1 9 2 】

抗体クローン : 2 B 0 8

2 B 0 8 - V H [配列番号 8]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS[DYYMS]WVRQAPGKGLEWVA[LIGHDGN]
[KYYLDSLEG]RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR[ATDSGYDLLY]WGQGT
TVSS

2 B 0 8 - V L [配列番号 3 2]

50

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYYDDLLPSGV
PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCTTWDDSLSGVVFSGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : D Y Y M S [配列番号 8 1]

CDRH2 : L I G H D G N N K Y Y L D S L E G [配列番号 8 2]

CDRH3 : A T D S G Y D L L Y [配列番号 8 3]

CDRL1 : S G S S S N I G N N A V N [配列番号 8 4]

CDRL2 : Y D D L L P S [配列番号 8 5]

CDRL3 : T T W D D S L S G V V [配列番号 8 6]

【 0 1 9 3 】

抗体クローン : 2 E 0 8

2 E 0 8 - V H [配列番号 9]

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYYMSWIRQAPGKGLEWVSAIGFSDNT
YYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAGDGSWSFWGQGLTVV
SS

2 E 0 8 - V L [配列番号 3 3]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGNNAVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG
VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLRGVVFSGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : D Y Y M S [配列番号 8 7]

CDRH2 : A I G F S D D N T Y Y A D S V K G [配列番号 8 8]

CDRH3 : G D G S G W S F [配列番号 8 9]

CDRL1 : S G S S S N I G N N A V N [配列番号 9 0]

CDRL2 : D N N K R P S [配列番号 9 1]

CDRL3 : A T W D D S L R G W V [配列番号 9 2]

【 0 1 9 4 】

抗体クローン : 5 C 0 4

5 C 0 4 - V H [配列番号 1 0]

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSNYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN
KYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREWRDAFDIWGQGLTVV
SS

5 C 0 4 - V L [配列番号 3 4]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPS
GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGSWVVFSGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : N Y G M H [配列番号 9 3]

CDRH2 : V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G [配列番号 9 4]

CDRH3 : W R D A F D I [配列番号 9 5]

CDRL1 : T G S S S N I G A G Y D V H [配列番号 9 6]

CDRL2 : S D N Q R P S [配列番号 9 7]

CDRL3 : AAWDDSLSGSWV [配列番号 98]
 【 0195 】

抗体クローン : 5C05

5C05 - VH [配列番号 11]

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFS**TYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGSN**
KYYADSVKGRRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE**ENFADFV**WGQGLTVV
 SS

5C05 - VL [配列番号 35]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS**CTGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLLI**YNSQRPS**
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY**CAAWDDSLNGQVV**FGGGTKLTVLG

10

CDR領域

CDRH1 : TYGMH [配列番号 99]

CDRH2 : VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 100]

CDRH3 : ENFADFV [配列番号 101]

CDRL1 : TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 102]

CDRL2 : SNSQRPS [配列番号 103]

CDRL3 : AAWDDSLNGQVV [配列番号 104]

【 0196 】

抗体クローン : 5D07

5D07 - VH [配列番号 12]

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFS**TYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VIAYDGSK**
KDYADSVKGRRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE**EYRDAFDI**WGQGLTVV
 SS

20

5D07 - VL [配列番号 36]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS**CTGSSSNIGAGYDVH**WYQQLPGTAPKLLI**YGNSNRPS**
 GVPDRFSGSKSGTTASLAISGLRSEDEADYY**CAAWDDSVSGWM**FGGGTKLTVLG

30

CDR領域

CDRH1 : TYGMH [配列番号 105]

CDRH2 : VIAYDGSKKDYADSVKG [配列番号 106]

CDRH3 : EYRDAFDI [配列番号 107]

CDRL1 : TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 108]

CDRL2 : GNSNRPS [配列番号 109]

CDRL3 : AAWDDSVSGWM [配列番号 110]

【 0197 】

抗体クローン : 5E12

5E12 - VH [配列番号 13]

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFS**SYGMH**WVRQAPGKGLEWVA**VISYDGIN**
KDYADSMKGRRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE**ERKDAFDI**WGQGLTVV
 SS

40

5E12 - VL [配列番号 37]

50

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPS
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDSLNGLVFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : SYGMH [配列番号 1 1 1]

CDRH2 : VISYDGINKDYADSMKG [配列番号 1 1 2]

CDRH3 : ERKDAFDI [配列番号 1 1 3]

CDRL1 : TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 1 1 4]

CDRL2 : SNNQRPS [配列番号 1 1 5]

CDRL3 : ATWDDSLNGLV [配列番号 1 1 6]

【 0 1 9 8 】

抗体クローン : 5 G 0 8

5 G 0 8 - V H [配列番号 1 4]

10

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFNHYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN
 RYYADSVKGRFTMSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRWNGMDVWGQGLV
 TVSS

5 G 0 8 - V L [配列番号 3 8]

20

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYANNQRPS
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPWVFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : NYGMH [配列番号 1 1 7]

CDRH2 : VISYDGSNRYYADSVKKG [配列番号 1 1 8]

CDRH3 : DRWNGMDV [配列番号 1 1 9]

CDRL1 : SGSSSNIGAGYDVH [配列番号 1 2 0]

CDRL2 : ANNQRPS [配列番号 1 2 1]

CDRL3 : AAWDDSLNGPWV [配列番号 1 2 2]

【 0 1 9 9 】

抗体クローン : 5 H 0 6

5 H 0 6 - V H [配列番号 1 5]

30

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN
 TAYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDHVSIGAFDIWGQGLTVT
 VSS

5 H 0 6 - V L [配列番号 3 9]

40

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG
 VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCSSYAGSNVVFSGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : SYGMH [配列番号 1 2 3]

CDRH2 : VISYDGS D T A Y A D S V K G [配列番号 1 2 4]

CDRH3 : DHSVIGAFDI [配列番号 1 2 5]

CDRL1 : SGSSSNIGSNTVN [配列番号 1 2 6]

CDRL2 : DNNKRPS [配列番号 1 2 7]

50

CDRL3 : S S Y A G S N N V V [配列番号 1 2 8]
 【 0 2 0 0 】

抗体クローン : 6 A 0 9

6 A 0 9 - V H [配列番号 1 6]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFS[SYGMH]WVRQAPGKGLEWVA[VTSDGN]
 [TKYYANSVKGR]FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR[EDCGGDCFDY]WGQGT
 LVTVSS

6 A 0 9 - V L [配列番号 4 0]

10

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS[CTGSSSNIGAGYDVH]WYQQLPGTAPKLLIY[GNSNRPS]
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA[AWDDSLNEGV]FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1 : S Y G M H [配列番号 1 2 9]

CDRH2 : V T S Y D G N T K Y Y A N S V K G [配列番号 1 3 0]

CDRH3 : E D C G G D C F D Y [配列番号 1 3 1]

CDRL1 : T G S S S N I G A G Y D V H [配列番号 1 3 2]

CDRL2 : G N S N R P S [配列番号 1 3 3]

20

CDRL3 : A A W D D S L N E G V [配列番号 1 3 4]

【 0 2 0 1 】

抗体クローン : 6 B 0 1

6 B 0 1 - V H [配列番号 1 7]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFS[NYGMH]WVRQAPGKGLEWVA[VISYDGSN]
 [KYYADSVKGR]FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR[DQLGEAFD]WGQGT
 LVT
 VSS

6 B 0 1 - V L [配列番号 4 1]

30

QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS[CTGSSSNIGAGYDVH]WYQQLPGTAPKLLIY[DNNKRPS]
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCA[ATWDDSLSGPV]FGGGTKLTVLG

CDR 領域

CDRH1 : N Y G M H [配列番号 1 3 5]

CDRH2 : V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G [配列番号 1 3 6]

CDRH3 : D Q L G E A F D I [配列番号 1 3 7]

CDRL1 : T G S S S N I G A G Y D V H [配列番号 1 3 8]

CDRL2 : D N N K R P S [配列番号 1 3 9]

40

CDRL3 : A T W D D S L S G P V [配列番号 1 4 0]

【 0 2 0 2 】

抗体クローン : 6 C 1 1

6 C 1 1 - V H [配列番号 1 8]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFTFD[DYGMS]WVRQAPGKGLEWVA[ISGSGSS]
 [TYYADSVKGR]FTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAG[GDIDYFDY]WGQGT
 LVT
 SS

6 C 1 1 - V L [配列番号 4 2]

50

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNFGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYENNKRPS
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : D Y G M S [配列番号 1 4 1]

CDRH2 : A I S G S G S S T Y Y A D S V K G [配列番号 1 4 2]

CDRH3 : G D I D Y F D Y [配列番号 1 4 3]

CDRL1 : T G S S S N F G A G Y D V H [配列番号 1 4 4]

CDRL2 : E N N K R P S [配列番号 1 4 5]

CDRL3 : A A W D D S L N G P V [配列番号 1 4 6]

【 0 2 0 3 】

抗体クローン : 6 C 1 2

6 C 1 2 - V H [配列番号 1 9]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN
 KYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARERRDAFDIWGQGLTVV
 SS

6 C 1 2 - V L [配列番号 4 3]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYSDNQRPS
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCATWDS DTPV FGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : S Y G M H [配列番号 1 4 7]

CDRH2 : V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G [配列番号 1 4 8]

CDRH3 : E R R D A F D I [配列番号 1 4 9]

CDRL1 : T G S S S N I G A G Y D V H [配列番号 1 5 0]

CDRL2 : S D N Q R P S [配列番号 1 5 1]

CDRL3 : A T W D S D T P V [配列番号 1 5 2]

【 0 2 0 4 】

抗体クローン : 6 D 0 1

6 D 0 1 - V H [配列番号 2 0]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSN
 KYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARDHSAAGYFDYWGQGL
 VTVSS

6 D 0 1 - V L [配列番号 4 4]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYGNSIRPSGG
 PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCASWDDSLSSPVFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : S Y G M H [配列番号 1 5 3]

CDRH2 : V I S Y D G S N K Y Y A D S V K G [配列番号 1 5 4]

CDRH3 : D H S A A G Y F D Y [配列番号 1 5 5]

CDRL1 : S G S S S N I G S N T V N [配列番号 1 5 6]

CDRL2 : G N S I R P S [配列番号 1 5 7]

CDRL3 : ASWDDSLSSPV [配列番号 158]
 【 0205 】

抗体クローン : 6G03

6G03 - VH [配列番号 21]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGSYGMHWVRQAPGKGLEWVSGISWDSAI
 IDYAGSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDEAAAGAFDIWGQGLVT
 VSS

6G03 - VL [配列番号 45]

10

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGNTDRPS
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGPVVFGGGTKLTVLG

CDR領域

CDRH1 : SYGMH [配列番号 159]

CDRH2 : GISWDSAIIDYAGSVKG [配列番号 160]

CDRH3 : DEAAAGAFDI [配列番号 161]

CDRL1 : TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 162]

CDRL2 : GNTDRPS [配列番号 163]

20

CDRL3 : AAWDDSLSGPVV [配列番号 164]

【 0206 】

抗体クローン : 6G08

6G08 - VH [配列番号 22]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTLSSYGISWVRQAPGKGLEWVSGISGSGGN
 TYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASSVGAYANDAFDIWGQGT
 LTVSS

6G08 - VL [配列番号 46]

30

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYGDTNRPS
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVVFGGGTKLTVLG

CDR領域

CDRH1 : SYGIS [配列番号 165]

CDRH2 : GISGSGGNTYYADSVKG [配列番号 166]

CDRH3 : SVGAYANDAFDI [配列番号 167]

CDRL1 : TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 168]

CDRL2 : GDTNRPS [配列番号 169]

40

CDRL3 : AAWDDSLNGPV [配列番号 170]

【 0207 】

抗体クローン : 6G11

6G11 - VH [配列番号 23]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWMAVISYDGS
 NKYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARELYDAFDIWGQGLTVT
 SS

6G11 - VL [配列番号 47]

50

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQQLPGTAPKLLIYADDHRPS
 GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQASWDDSQRAVIFGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : SYGMH [配列番号 171]

CDRH2 : VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 172]

CDRH3 : ELYDAFDI [配列番号 173]

CDRL1 : TGSSSNIGAGYDVH [配列番号 174]

CDRL2 : ADDHRPS [配列番号 175]

CDRL3 : ASWDDSQRAVI [配列番号 176]

【 0208 】

抗体クローン : 6H08

6H08 - VH [配列番号 24]

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFN^{NYGMH}WVRQAPGKGLEWVA^{VISYDGSN}
^{KYYADSVKGR}RFTISKDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE^{EYKDAFDI}WGQGT^{LVTVS}
 S

6H08 - VL [配列番号 48]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY^{DNNKRPSGV}
 PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC^{QAWGTGIRV}FGGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : NYGMH [配列番号 177]

CDRH2 : VISYDGSNKYYAD SVKG [配列番号 178]

CDRH3 : EYKDAFDI [配列番号 179]

CDRL1 : TGSSSNIGSNTVN [配列番号 180]

CDRL2 : DNNKRPS [配列番号 181]

CDRL3 : QAWGTGIRV [配列番号 182]

【 0209 】

抗体クローン : 7C07

7C07 - VH [配列番号 25]

EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGFTFS^{SYGMH}WVRQAPGKGLEWVA^{VISYDGSN}
^{KYYADSVKGR}RFTISRDNSQNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARE^{FGYILDY}WGQGT^{LVTV}
 SS

7C07 - VL [配列番号 49]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIY^{RDYERPSGV}
 PDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC^{MAWDDSLSGVVF}GGGTKLTVLG

C D R 領域

CDRH1 : SYGMH [配列番号 183]

CDRH2 : VISYDGSNKYYADSVKG [配列番号 184]

CDRH3 : EFGYIILDY [配列番号 185]

CDRL1 : SGSSSNIGSNTVN [配列番号 186]

CDRL2 : RDYERPS [配列番号 187]

10

20

30

40

50

C D R L 3 : M A W D D S L S G V V [配列番号 1 8 8]

【 0 2 1 0 】

抗体クローン : 4 B 0 2

4 B 0 2 - V H [配列番号 2 6]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNHGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGTN

KYYADSVRGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARETWDAFDVWGQGLVT

VSS

4 B 0 2 - V L [配列番号 5 0]

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNNANWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSG

VPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCQAWDSSTVVFGGGTKLTVLG

10

C D R 領域

C D R H 1 : N H G M H [配列番号 1 8 9]

C D R H 2 : V I S Y D G T N K Y Y A D S V R G [配列番号 1 9 0]

C D R H 3 : E T W D A F D V [配列番号 1 9 1]

C D R L 1 : S G S S S N I G S N N A N [配列番号 1 9 2]

C D R L 2 : D N N K R P S [配列番号 1 9 3]

C D R L 3 : Q A W D S S T V V [配列番号 1 9 4]

20

【 0 2 1 1 】

好ましくは、本発明は、薬剤が、Fc RIIbが抗体分子のFcドメインに結合することを防止または低減するために、先の実施形態に定義された薬剤と競合することができる薬剤である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【 0 2 1 2 】

好ましくは、本発明は、薬剤が、Fc RIIbシグナル伝達を防止または低減する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【 0 2 1 3 】

Fc受容体は、細胞シグナル伝達によって細胞挙動を調節することができる。Fc RIIbシグナル伝達によってどの下流細胞シグナル伝達調節因子が活性化及び/または非活性化されるか、そしてこれらの細胞シグナル伝達調節因子の活性化及び/または非活性化が細胞にどのような作用を及ぼすかは、細胞生物学の当業者には既知であろう。

30

【 0 2 1 4 】

ここで「薬剤がFc RIIbシグナル伝達を防止または低減する」には、Fc RIIbがFcドメインに結合しているときにFc RIIbシグナル伝達が防止もしくは低減されること、及び/またはFc RIIbがFcドメインに結合していないときにFc RIIbシグナル伝達が防止もしくは低減されることが含まれる。

【 0 2 1 5 】

好ましくは、本発明は、薬剤が、標的細胞による抗体分子の内部移行を防止または低減する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

40

【 0 2 1 6 】

好ましくは、本発明は、細胞表面抗原が、CD19、またはその一部分、CD20、またはその一部分、CD40、またはその一部分、CD52、またはその一部分、Thy-1(すなわちCD90、表面抗原分類90(Biofactors, 2009 May-Jun; 35(3): 258-65))、またはその一部分、Ly-6(すなわちリンパ球抗原6(Mol Biol Rep, 2009 Apr; 36(4): 697-703))、またはその一部分、CD59(すなわち補体制御タンパク質(Mol Immunol, 2007 Jan; 44(1-3): 73-81))、またはその一部分、Fas(すなわちFS7結合細胞表面抗原、CD95、APO-1、またはTNFRSF6(A

50

dv Exp Med Biol. 2009; 647: 64-93)、またはその一部分、EGFR (すなわち上皮細胞成長因子受容体 (F E B S J. 2010 Jan; 277(2): 301-8)、またはその一部分、Her2 (すなわちヒト上皮細胞成長因子受容体2 (Clin Breast Cancer. 2008 Oct; 8(5): 392-401)、またはその一部分、CXCR4 (すなわちケモカイン受容体4 (Biochim Biophys Acta. 2007 Apr; 1768(4): 952-63)、またはその一部分、HLA分子 (すなわちヒト白血球抗原分子 (Korean J Lab Med. 2010 Jun; 30(3): 203)、またはその一部分、GM1 (すなわちガングリオシド、モノシアロテトラヘキソシルガングリオシド (J Lipid Res. 2010 Sep; 51(9): 2731-8)、またはその一部分、CD22 (すなわちCheson (2008) NEJM 359(6): 613-26)、またはその一部分、CD23 (Cheson, 2008)、またはその一部分、CD80 (Cheson, 2008)、またはその一部分、CD74 (Cheson, 2008)、またはその一部分、DRD (Cheson, 2008)、またはその一部分からなる群から選択される、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

10

【0217】

好ましくは、本発明は、(i)に定義された抗体分子が、CD20に特異的に結合する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0218】

好ましくは、本発明は、(i)に定義された抗体分子が、I型CD20抗体である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

20

【0219】

好ましくは、本発明は、(i)に定義された抗体分子が、II型CD20抗体である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0220】

CD20抗体分子には2つのタイプがあり、これらは、異なる分類に分かれるものとして発明者らにより2003年に初めて定義され (Cragg et al., 2003. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. Blood 101: 1045-1052、及びChan, et al., 2003. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. Cancer Res 63: 5480-5489)、後にI型及びII型抗体分子として2004年に定義された (Cragg and Glennie 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. Blood 103: 2738-2743)。初めに、これの根拠は、抗CD20 mAbが、リンパ腫異種移植片を根絶するその能力に基づいて、2つの明確に異なる試薬の種類に分かれることであった (I型 (例えばリツキシマブ及び1F5) は補体を用い、II型 (例えばB1) は補体を用いない)。両方の型の抗体分子が生存期間の優れた延長をもたらしたが、CVFの投与による補体価の消耗は、リツキシマブ及び1F5の効力をかなり減退させたが、B1の活性には作用を及ぼさなかった。これらの結果は、異なるCD20抗体分子が異なるインビボのエフェクター機構を動作させることを明らかに示した。さらに、これらの結果は、リツキシマブ及び1F5が、CD20を標的細胞膜内の脂質ラフトに転座させること (これはB1型抗体分子にはなし得ないことである) の結果として補体を効率的に活性化させることができることを示した過去の研究と完全に一致する (Cragg et al., 2003. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correla

30

40

50

tes with segregation into lipid rafts. Blood 101:1045-1052)。補体に結合し、CD20が脂質ラフト内に移動することを誘発する抗体分子の能力と、優れた相関関係がある(Cragg et al., 2003. Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. Blood 101:1045-1052、及びCragg, and Glennie 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. Blood 103:2738-2743)。したがって、I型及びII型の本質は、CD20を脂質ラフト内に移動させるそれらの能力によって定義され得る。これは、以下に示されるように決定され得る。II型抗体分子がより強力な同型接着及び直接細胞死を誘起することができることも相関関係があるが、これらを単独で使用して、I型またはII型抗体分子を定義することはできない(Tx-100ラフトアッセイとは異なる；以下を参照のこと)。

【0221】

したがって、様々な抗CD20抗体分子は、CD20をプラズマ膜内に再分配するそれらの能力、及び様々なエフェクターアッセイにおけるそれらの活性によって、I型(例えばリツキシマブ1つのオフアツムマブ)またはII型(例えばトシツモマブ(B1)、GA101、及び11B8)として分類される(Weng and Levy 2009. Genetic polymorphism of the inhibitory IgG Fc receptor FcγRIIb is not associated with clinical outcome in patients with follicular lymphoma treated with rituximab. Leuk Lymphoma 50:723-727、Chan et al., 2003. CD20-induced lymphoma cell death is independent of both caspases and its redistribution into triton X-100 insoluble membrane rafts. Cancer Res 63:5480-5489、及びCragg and Glennie 2004. Antibody specificity controls in vivo effector mechanisms of anti-CD20 reagents. Blood 103:2738-2743)。I型(例えばリツキシマブ、オフアツムマブ)抗CD20抗体分子は、CD20が大きな界面活性剤抵抗性マイクロドメイン(ラフト)内に再分布することを誘発するが、II型(トシツモマブ様)抗CD20モノクローナル抗体はそれを誘発しない(Beer et al., 2010. Seminars in Haematology 47(2):pp107-114)。

【0222】

上で考察されたように、抗CD20抗体分子は、それらがCD20を脂質ラフト内に再分配するかどうかによって、I型またはII型と指定され得る。これは、Tx-100不溶性アッセイによって、またはショ糖密度勾配分離及びウェスタンブロッティングによって行われる。両方法は、Cragg et al Blood 2003に次のように記載されている。

【0223】

1. Triton X-100不溶性によるラフト結合抗原の査定

ラフトマイクロドメイン内の抗原の存在の急速な査定として、低温におけるTriton X-100不溶性に基づくフローサイトメトリ法を用いた。手短に述べると、細胞をRPMI/1% BSAで洗浄し、 2.5×10^6 / mlで再懸濁させた。次いで、細胞を、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ のFITC抱合mAbと共に37 で15分間インキュベートし、冷PBS/1% BSA/20mMアジ化ナトリウムで洗浄し、次いでこの試料を半分に分割した。1つの半割部を氷上に維持して100%表面抗原レベルの計算を可能にし、他方

を氷上で15分間0.5%のTriton X-100で処置して、不溶性ラフト画分内に残存する抗原の割合を決定した。次いで、細胞を、アッセイの残部全体にわたって4に維持し、PBS/BSA/アジ化物で1回洗浄し、再懸濁させ、上に詳述したようにフローサイトメトリによって査定した。間接検出法を使用して同様の結果を得た。標的抗原のラフト結合の恒常的レベルを決定するために、細胞をまず、氷上で15分間0.5%のTriton X-100で処置し、FITC標識mAbの結合の前にPBS/BSA/アジ化物で洗浄した。さらなる架橋によってより多くの抗原がTriton X-100不溶性画分内に移動し得るかどうかを査定するために、細胞を前述同様にFITC-mAbと共にインキュベートし、洗浄し、次いで4つに分割した。これらの試料のうちの2つを、ヤギ抗マウスIgG(Fab')₂断片と共に氷上で15分間インキュベートした。洗浄後、架橋試料のうちの1つ及び非架橋試料のうちの1つをTriton X-100中で溶解させ、フローサイトメトリ前に、上に詳述したように洗浄した。

10

20

30

40

50

【0224】

2. ショ糖密度勾配分離及びウェスタンブロットティング - 脂質ラフト画分の調製及びウェスタンブロットティング

モノクローナルAb(1 μ g/10⁶細胞)を37^oで細胞に添加した。20分間のインキュベーション後、細胞をペレット化し、MES緩衝生理食塩水(25mM MES、pH6.5、150mM NaCl、1mMフッ化フェニルメチルスルホニル、5 μ g/mlアプロチニン、5 μ g/mlロイペプチン、10mM EDTA)中1.0%の氷冷Triton X-100中で溶解させた。次いで、ショ糖密度勾配遠心分離によって脂質ラフト画分を調製した。手短に述べると、ライセートを溶解緩衝液中で等体積の80%ショ糖と混合し、非連続的な5~30%のショ糖密度勾配をかけ、次いで200,000 \times gで16時間遠心分離した。画分(0.5ml)を収集し、ウェスタンブロットティングにより分析した。各画分の15mlのアリコートに2 \times ローディングバッファー中で1:1に希釈し、5分間95^oに加熱し、15%のSDS-PAGEゲル上で分離させ、その後PVD膜上に移し、一次抗体(例えばマウス抗CD20、CD20を検出するためのクローン7D1、またはラフト画分を同定するための抗Lynウサギポリ血清(polysera)(Serotec、英国))、続いてHRP抱合二次抗体(Amersham Biosciences UK Ltd)と共にインキュベートした。ECL+plus(Amersham Biosciences UK Ltd)を使用してプロットを可視化した。

【0225】

抗CD20抗体分子は、CD20の大ループ内のAxPモチーフを必要とし得る(オフアツムマブ及び他のGenmab抗体はそれを必要としない)。しかしながら、(Niederfellner, Getal, 2011, Blood 118, 358-367)は、II型抗体分子が、I型と比較してわずかに異なるCD20ループの領域に結合することを示す。

【0226】

好ましくは、本発明は、I型CD20抗体が、リツキシマブ、またはリツキシマブバイオシミラー、またはオフアツムマブである、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0227】

好ましくは、本発明は、II型CD20抗体が、オビヌツズマブまたはトシツモマブである、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0228】

好ましくは、本発明は、(i)に定義された抗体分子が、CD52抗体である、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0229】

好ましくは、本発明は、CD52抗体がアレムツズマブである、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0230】

好ましくは、本発明は、組成物またはキットが、1つ以上の治療薬を含む、組成物またはキットを提供する。

【0231】

好ましくは、本発明は、組成物が1つ以上の治療薬をさらに含む、使用を提供する。

【0232】

好ましくは、本発明は、対象が、1つ以上の治療薬をさらに投与される、方法を提供する。

【0233】

好ましくは、本発明は、対象が難治性癌もしくは再発癌を有するか、または対象が難治性癌及び再発癌を有する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

10

【0234】

好ましくは、本発明は、対象が難治性慢性リンパ性白血病もしくは再発慢性リンパ性白血病を有するか、または対象が難治性慢性リンパ性白血病及び再発慢性リンパ性白血病を有する、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0235】

好ましくは、本発明は、明細書、及び/または実施例、及び/または添付の図面を参照して、本特許請求の範囲に実質的に記載及び/または特許請求される、組成物、または使用、または方法、またはキットを提供する。

【0236】

明白な先行公開文献に関する本明細書中の列挙または考察は、必ずしもその文献が技術水準の一部であるという承認、または共通の一般知識であるという承認として解釈されるべきではない。

20

【0237】

これより、以下の図を参照して、本発明のある特定の態様を具現する好ましい非限定的な実施例を記載する。

【0238】

図1. hFc RII BとhFc RII Aとを区別することができるmAbの作製及び特徴付け。(A) scFvクローンを、hFc RII Bまたは及びhFc RII Aへの特異的結合についてスクリーニングした。黄色のドットは、全長IgGへの変換のために選ばれたhFc RII Bに特異的なクローンを表す。(B) hFc RII B mAbの結合性分析。hFc RII B mAbを、hFc RII Bトランスフェクト細胞(赤色の線)またはhFc RII Aトランスフェクト細胞(青色の線)への結合性について査定した。同じmAbを、IC上の存在下でのhFc RII Bトランスフェクト細胞への結合性(3 nM、緑色の線)について査定し、このmAbが、hFc RII B発現細胞に結合するICと競合(competitively)することができることが示された。この図は、1つの代表的なhFc RII Bクローンからのデータを示す。(C) フローサイトメトリによって決定されたPBMC集団上の作製されたmAbの結合プロフィール。hFc RII A特異性mAbは、単球及び好中球に対する強い結合性を示し、一方で、hFc RII B特異性mAbは、同様に単球及び好中球に結合し、そのためhFc RII A及びBに対しておそらく二重特異性である6A09を除いて、B細胞に主に結合した。(D) B細胞に対するmAbの用量依存性結合。mAbは0.1、1、または10 µg/mlで添加し、染色の強度はフローサイトメトリによって決定した。(E) hFc RII B mAbの親和性。選択されたhFc RII B特異性mAb(7C07、5C04、5C05)を、様々な濃度のhFc RII B融合タンパク質に対するそれらの結合性について、表面プラズモン共鳴法によって査定した(0(赤色)、0.16(緑色)、0.8(青色)、4(桃色)、20(青緑色)、及び100(茶色)nM)。センソグラム(sensogram)は、各mAbに対する典型的な結合応答を示す。KD値は、1:1結合モデルから計算した(表2参照)。

30

40

【0239】

50

図1 (2/2) . hFc RII mAb (AT10) の治療効果、及び hFc RII B と hFc RII A とを区別することができる特異性 mAb の作製。(上) Daudi 細胞を異種移植(皮下(s.c.))した SCID マウス(5/群)を、矢印で示されるように(腹腔内(i.p.))処置した。平均腫瘍重量を \pm SEM でプロットし、独立 t 検定を使用して分析した; p 値は、リツキシマブ(Rit) 単独対 Rit + AT10 処置群を比較する (** p 0.005)。代表的なデータ (n=2)。(下) hFc RII B トランスフェクト細胞(赤色の線)または hFc RII A トランスフェクト細胞(青色の線)に結合する hFc RII B mAb、及び hFc RII B トランスフェクト細胞(緑色の線)に結合する IC の mAb 依存性抑制。図7及び8ならびに表6も参照されたい。

10

【0240】

図2 . hFc RII B mAb は、標的細胞の表面上での Fc RII B とのリツキシマブ(Rit) の結合を遮断することができる。(A) hFc RII B ITIM のリン酸化を誘起する hFc RII B 特異性 mAb の能力。Raji 細胞を、37 で30分間、N297Q hFc RII B 特異性 mAb (10 μ g/ml) で処置し、その後溶解させ、免疫プロットングにより hFc RII B (pFc RII B) のリン酸化状態を査定した。hIgG1 アイソタイプ対照(iso ctrl) 及び Rit を、それぞれ陰性対照及び陽性対照として使用した。チューブリンをローディング対照としてプローブした。(B) Rit によって誘発される hFc RII B ITIM のリン酸化を遮断する hFc RII B 特異性 mAb の能力。10 μ g/ml の Rit を37 で30分間添加する前に、Raji 細胞を10分間 N297Q hFc RII B mAb (10 μ g/ml) で前処置した。処置した細胞を溶解させ、上記のように免疫プロットングによって pFc RII B 及び チューブリンについて査定した。少なくとも3つの独立した実験の代表的なプロットが示されている。(C) Rit によって誘発される内部移行を遮断する hFc RII B 特異性 mAb の能力。ベクター対照(ctrl) または hFc RII B トランスフェクト Ramos 細胞を、指示された時間点に対して37 で、hFc RII B mAb の野生型(WT) または N297Q 変異体(10 μ g/ml) 及び AF488 標識 Rit (5 μ g/ml) で処置した。消光アッセイを使用して Rit の内部移行を決定し、表面 CD20 発現の%として表す。AF488 標識 トシツモマブは CD20 の結合後に著しく内部移行しないため、これを陰性対照として使用した²。3つの独立した実験の平均 \pm SD が示されている。(D) Rit 内部移行を遮断する mAb のパネルの能力(Cに示される)は、それらの相対階級的親和性と相関した ($R^2 = 0.78$)。 (E) Rit 内部移行を遮断する mAb のパネルの能力(Cに示される)は、Image J 濃度測定ソフトウェアによって査定されたとき、hFc RII B の Rit 誘発性リン酸化を遮断するそれらの能力(B)と相関した ($R^2 = 0.79$)。

20

30

【0241】

図3 . hFc RII B mAb 6G11 は、インビトロで強力な細胞傷害活性を有し、標的 CLL 細胞の表面上での hFc RII B との Rit の結合を遮断することができる。(A) ある範囲の凍結組織上で査定した hFc RII B mAb 7C07 及び 6G11 の IHC 分析。6G11 は、ヒト脾臓内の細胞に対して非常に特異的な結合性を示し、非リンパ球性細胞への背景染色は事実上存在せず、カニクイザルまたはマウスの脾臓組織の染色はほとんどまたは全くなく、一方で、7C07 は、予想通りリンパ球への結合性を示しただけでなく、ヒト組織及びカニクイザル組織の両方の内膜への結合性も示した。(B~E) 初代患者 CLL 細胞での ADCC (B)、PCD (C)、及び ADCP (D) を測定するアッセイにおける 6G11 の細胞傷害能力。CLL 細胞を 6G11 (10 μ g/ml) でオプソニン化し、Rit (10 μ g/ml) を各アッセイで陽性対照として添加した。各ドットは、1人の CLL 患者からの3通りの試料の平均を表す。(E) 高親和性または低親和性の hFc RII A 対立遺伝子変異体(それぞれ 158F 及び V) を保有するエフェクター細胞を使用した ADCC アッセイ。6G11 は、両方の場合で、Rit と比較して ADCC を誘発するのにより強力であった。この図は、3つの異なる

40

50

CLLドナーを使用した3つの独立した実験からの平均 \pm SDを示す。(F) CLL細胞の表面からのRit内部移行を損なう6G11の能力。6つのCLL試料を、37で最大6時間、野生型(左パネル)またはN297Q(右パネル)mAb、アイソタイプ対照または6G11(10~20 μ g/ml)及びAF488標識Rit(5 μ g/ml)で処置した。Ritの内部移行を上記のように査定し、表面CD20発現の%を提示した。(G) CLL細胞の表面に残存する6G11の能力。6つのCLL試料を野生型またはN297Q 6G11(10 μ g/ml)で最大6時間処置し、抗hFcRIIB α -PEを用いた染色により、hFcRIIB表面発現を間接的に数量化した。値は、0時点において氷上で行った染色に正規化し、表面hFcRIIB発現%として表した。データは箱ひげ図として表され、p値は示されるように群を比較する(*p<0.05)。(H及びI) 6G11を用いたADCPの増補。CFSE標識CLL細胞を、N297Qアイソタイプ対照または6G11と組み合わせたRitで、培養液中で3時間オプソニン化し、洗浄し、5:1比でMDMに添加した。共培養後、-CD206-APC染色を使用してMDMを同定し、結果をフローサイトメトリによって分析した。代表的なドットプロットが(H)に示され、貪食されたCFSE⁺ CLL細胞を有するMDMの割合として計算された二重陽性事象の%が(I)に示される。(J) 6G11を用いたADCCの増補。CLL細胞を、N297Qアイソタイプ対照または6G11と組み合わせたRitで3時間オプソニン化し、次いでNK細胞と共培養した。各ドットは、1つの初代CLL試料からの3通りの平均を表す。データを対応t検定(B、C、D、E、I、及びJ)t検定によって分析した; p値は示されるように群を比較する(*p<0.05、**p<0.005、***p<0.0001)。

10

20

【0242】

図4. hFcRIIB mAb 6G11はインビボで活性であり、B細胞のCD20 mAb枯渴を増強する。(A及びB) インビボでhFcRIIB α 標的細胞を欠失させる6G11の能力。それぞれ高レベルまたは低レベルのCFSEで標識された、hFcRIIB α x mFcRII β 標的及びmFcRII β 非標的C57BL/6脾細胞を、野生型またはKO C57BL/6マウスに養子移入(静脈内(i.v.))した。24時間後、指示された野生型またはN297Q 6G11 mAbをマウスに受けさせ(静脈内)、16時間後、循環細胞(A)または脾細胞(B)を分析して、残存する標的対非標的比を決定した。データを正規化して、1.0の対照(NT)標的:非標的比が与えられた。各ドットは個別のマウスからの結果を表し、平均比は水平線(\pm SEM)によって示される。データは、少なくとも2つの独立した実験から組み合わせられている。(C~E) インビボで標的細胞を欠失させるRitの能力を増補する6G11の能力。(C) 上記のように、それぞれ高レベルまたは低レベルのCFSEで標識された、hCD20 α x hFcRIIB α x mFcRII β 標的、及びmFcRII β 非標的C57BL/6脾細胞を、野生型C57BL/6受容マウスに注入(静脈内)した。24時間後、指示されたmAbを単独または組み合わせでマウスに受けさせ(5~10 μ g、静脈内)、16時間後、脾臓を分析して、上記のように標的対非標的比を決定し正規化した。データは、少なくとも3つの独立した実験から組み合わせられている。(D) 上記のように、CFSE⁺ hCD20 α x hFcRIIB α x mFcRII β 標的、及びmFcRII β 非標的C57BL/6脾細胞を、hFcRIIB α x mFcRII β C57BL/6受容マウスに注入(静脈内)した。1日目及び2日目に野生型6G11(500 μ g、静脈内/腹腔内)、続いて2日目にRit(5~50 μ g、静脈内)をマウスに受けさせ、16時間後、脾臓を分析して、上記のように標的対非標的比を決定し正規化した。データは、少なくとも3つの独立した実験から組み合わせられている。(E) hCD20 α x hFcRIIB α x mFcRII β C57BL/6マウスに、Ritもしくは6G11(500 μ g)、または250 μ gの各mAbの組み合わせのいずれかを、0日目に静脈内で受けさせ、示されるように、循環B細胞の数を経時的に査定した。棒グラフは、処置前レベルに正規化された、少なくとも2つの独立した実験からの最大12マウス/群における

30

40

50

循環B細胞%の平均±SEMを示す。二元配置分散分析(ANOVA)統計検定を行って、処置群を比較した；p値は、示されるように群を比較する(**p 0.01、***p 0.001)。(F~G)インビボで標的細胞を欠失させるGA101_{g1y}の能力を増補する6G11の能力。CFSE⁺ve hCD20⁺/x hFc RIIB⁺/x mFc RIIB⁻/標的、及びmFc RIIB⁻/非標的C57BL/6脾細胞を、野生型受容マウスに注入(静脈内)し、その後1日目にGA101_{g1y}もしくは6G11単独または組み合わせで処置し(0.2μg、静脈内)、16時間後、脾臓を分析して、標的対非標的比を決定し、上に詳述したように表した。データは、3つの独立した実験から組み合わされている。(G)CFSE⁺ve hCD20⁺/x hFc RIIB⁺/x mFc RIIB⁻/標的、及びmFc RIIB⁻/非標的C57BL/6脾細胞を、hFc RIIB⁺/x mFc RIIB⁻/受容マウスに注入(静脈内)し、その後、1日目及び2日目に野生型アイソタイプ対照または6G11のいずれか(500μg、腹腔内)、続いて2日目にGA101_{g1y}(1μg、静脈内)で処置し、16時間後、脾臓を分析して、標的対非標的比を決定し、上に詳述したように表した。一元配置分散分析統計検定を行って、処置群をNT/アイソタイプ対照またはCD20 mAb/6G11単独処置群と比較した(A~D及びF~G)；p値は、示されるように群を比較する(*p 0.05、**p 0.01、***p 0.001)。

【0243】

図4(2/2)．hFc RIIB mAb 6G11はインビボで活性であり、B細胞のCD20 mAb枯渇を増強する。hCD20⁺/x hFc RIIB⁺/x mFc RIIB⁻/マウスに、Rit±野生型もしくはN297Q 6G11(20mg/kg)、または10mg/kgの各mAbの組み合わせのいずれかを、0日目に受けさせ、循環B細胞の数を経時的に査定した。(上)処置前及びmAb注入後2日目を示す循環性B細胞を分析する代表的なドットプロット。四分部分の右上枠内の数は、処置前レベルと比較したB細胞の%を示す。(下)左のグラフは、Rit±野生型6G11を有する循環B細胞の枯渇を示し、右上のグラフは、Rit±野生型またはN297Q 6G11を有する循環B細胞の枯渇を示し、右下のグラフは、Rit(m2a、4mg/kg)±6G11(mIgG1、20mg/kg)を有する循環B細胞の枯渇を示す。処置前レベルに正規化された、処置後の循環B細胞%の平均+SDが示されている；最大12マウス/群が、少なくとも2つの独立した実験から組み合わされている。二元配置分散分析を行った。図15も参照されたい。

【0244】

図5．hFc RIIB mAb 6G11は、インビボで患者CLL細胞のRit枯渇を増強する。(A~B)初代患者CLL細胞は、NOD/SCIDマウスに生着し、ヒトにおいて観察されるものと同様の明確な増殖性クラスターを脾臓内に形成する。6~10×10⁷個の初代患者CLL細胞の静脈内接種の前に、マウスに照射した。注入4~5日後、脾臓を採取し、切片を調製し、(A)hCD19(赤色)もしくはKi67(緑色)の存在について染色し、免疫蛍光法により査定したか、または(B)hCD20及びKi67について染色し、IHCにより査定した。(C)ヒトCLL細胞を注入されたマウスにおける、Rit、6G11、またはその組み合わせの抗腫瘍活性。上記のようにNOD/SCIDマウスに初代ヒトCLL細胞を接種し、接種4~5日後、1~10mg/kgのhCD20 mAb、hFc RIIB mAb、または両方のいずれかでマウスを処置した。2~3日後にマウスに第2の注入を受けさせ、最後の処置の2~3日後に屠殺し、脾臓内に残存するヒトCLL細胞の%を列挙し、アイソタイプ対照mAbでの処置後に存在した割合に正規化した。10体の異なる患者からのCLL試料をこのように査定した。各ドットは1匹のマウスを表す。(D及びE)完全レスポナー、すなわち脾臓内でCLL細胞が検出されなかったマウス(D)、及び客観的レスポナー、すなわちCLL細胞が75%低減したマウス(E)の割合を、上記(C)に提示されたデータから計算した。(F~G)インビボ処置に対する屈折性患者CLL細胞の応答。難治性と以前に指定された患者からのCLL細胞(n=4、表4参照)を、(C~E)にあるように接種し、

10

20

30

40

50

処置し、査定した。(F)ドットが個別のマウスを表す生データを示し、(G)はRit
難治性患者における客観的レスポナーの出現頻度を示す。一元配置分散分析を行って、
処置群を比較した；p値は、示されるように群を比較する(*p 0.05、**p 0
.01、***p 0.001)。

【0245】

図5(2/2). hFc RIIB mAb 6G11は、インビボで正常及び悪性の
標的細胞の治療的なmAb枯渇を増強する。(A~B)初代患者CLL細胞を移植したN
OD/SCIDマウスの脾臓を、免疫蛍光法(A)またはIHC(B)によって査定した
；対照は一次mAbなし。(C)ヒトCLL細胞を異種移植したマウス(n=11患者)
を、1~10mg/kgのhCD20 mAb(Rit)、hFc RIIB mAb(10
6G11)、または両方で処置し、脾臓内に残存するCLL細胞の%を列挙し、アイソタ
イプ対照での処置後の割合に正規化した。(D)難治性と以前に指定された患者からのC
LL細胞を異種移植したマウス(n=4)を、(C)にあるように処置し、査定した。(
E)CFSE⁺hCD20⁺/x hFc RIIB⁺/x mFc RIIB⁻/ (標
的)、及びmFc RIIB⁻/ (非標的)脾細胞を、野生型マウスに注入(静脈内)し
、GA101_{gly}もしくは6G11単独または組み合わせ(0.008mg/kg)で
処置し、前述同様に脾臓内の欠失について査定した。データは、2~3つの独立した実験
から組み合わせられている。(F)CFSE⁺hCD20⁺/x hFc RIIB⁺/
x mFc RIIB⁻/ (標的)、及びmFc RIIB⁻/ (非標的)脾細胞を、hF
c RIIB⁺/x mFc RIIB⁻/受容マウスに注入し、野生型アイソタイプ対 20
照または6G11のいずれか(20mg/kg)、続いてGA101_{gly}(0.04m
g/kg)で処置し、(E)にあるように分析した。(G)CLL細胞を移植したマウス
(n=4)を、GA101(0.2mg/kg)、6G11(1mg/kg)、または両
方で処置し、(C)にあるように査定した。(H)CLL細胞を移植したマウス(n=3
)を、アレムツズマブ(Alem、1mg/kg)、6G11(1mg/kg)、または
両方で処置し、(C)にあるように査定した。(C~D及びG~H)円グラフは、表1に
定義される、mAb療法後のNR(黒色)、OR(青色)、及びCR(緑色)の初代患者
CLL保有マウスの数を表す。(C~H)各ドットは個別のマウスを表し、平均比は水平
線によって表されている。(E及びF)一元配置分散分析を使用して分析されたデータ、
ならびに(C~D及びG~H)並べ替え統計検定。図16及び17、ならびに表8及び4 30
も参照されたい。

【0246】

図6. hFc RIIB mAb 6G11は、前臨床インビボ系及びインビトロ系で
耐容され、毒性の結果をもたらさない。(A~D)単回投与後の6G11のインビボの有
効性及び半減期(図17A)。同齡かつ同性のhFc RIIB⁺/x mFc RIIB⁻/
マウス(6~7マウス/群)に、指示された濃度の野生型6G11 mAbを注入
した(静脈内または腹腔内)。(A)循環性B細胞の%を、フローサイトメトリによって
最大7日目まで経時的に査定した。(B)7日目にマウスを屠殺し、脾臓内のB細胞の数
(脾臓リンパ球の%として表される)をフローサイトメトリによって数量化した。7日の
期間にわたる(C)血清6G11 mAb濃度及び(D)MAHA力価を、材料及び方法 40
の節に記載されるように、MSDによって査定した(平均+SEM)。(E~F)複数投
与後の6G11のインビボの有効性及び半減期。同齡かつ同性のhFc RIIB Tg
x mFc RIIB⁻/マウス(6マウス/群)またはmFc RIIB⁻/マウス(3
マウス/群)に、0日目に10mg/kgの野生型6G11 mAbを静脈内注入し、続
いて3日目、7日目、及び10日目に同用量を腹腔内注入した。10日後(24日目)に
マウスを屠殺し、器官を毒性について査定した(図17C)。(E)血液を経時的に試料
採取し、循環B細胞をフローサイトメトリによって数量化した(平均+SD)。(F)6
G11 mAbに対するMAHA力価を、(D)にあるように査定した(平均+SEM)
。(G)高密度の前培養ヒトPBMCを使用したインビトロのサイトカイン応答。ヒトP
BMCを、48時間にわたるPBS(NT)または10µg/mlのアイソタイプ対照も 50

しくは6G11の野生型もしくはN297Q変異体の添加の前に、 $1 \times 10^7 / \text{ml}$ で48時間にわたって前培養した。上清を採取し、IFN- γ 、IL-6、IL-10、及びTNF- α の濃度をMSDによって査定した。CD3 mAb (OKT3)を、最適濃度及び準最適濃度(それぞれ1及び0.02 $\mu\text{g} / \text{ml}$)で陽性対照として使用した。データは、3体の独立した健康なドナーからのPBMCを使用した3つの独立した実験の代表である(平均 \pm SEM)。

【0247】

図6(2/2)．hFc RII B mAb 6G11は良好に耐容され、毒性の結果をもたらさない。hFc RII B + 血液B細胞(左のグラフ)、単球(中央のグラフ)、または好中球(右のグラフ)の枯渇における、Rit野生型またはN297Q 6G11の効力を査定するためのインビトロの全血枯渇アッセイ。平均値が示され(水平線)、各ドットは個別のドナーを表す。図14、18、及び19、ならびに表7も参照されたい。

10

【0248】

図7．hFc RII mAb (AT10)は、インビボのRitによる悪性B細胞のクリアランスを増強する。1:1比でMatrigel中に混合した(A) 5×10^6 個のDauidi細胞または(B) Raji細胞を、SCIDマウス(最大5マウス/群)の側腹部に注入(皮下)した。その後、腫瘍保有マウスに、X軸上に示されるように(矢印)7日目から始めて週1回の基準で最大4回、指示されたmAbを注入(腹腔内)した。腫瘍成長を経時的に監視し、以下の等式: [重量 = (長さ \times 幅²) / 2] を使用して推定した。平均腫瘍体積を測定値 \pm SEでプロットした。2つの独立した実験からの代表的なデータが示されている。(C) 2.5×10^6 個のRaji細胞を、SCIDマウス(6マウス/群)に注入(静脈内)した。上記のように、その後、腫瘍保有マウスに、7日目から始めて週1回の基準で最大4回、指示されたmAbを注入(腹腔内)した。マウスを経時的に監視し、末期腫瘍発達の徴候が顕れた直後に屠殺した。データは、独立t検定を使用して分析した; p値は、示されるように群を比較する(*p 0.05、**p 0.005)。

20

【0249】

図8．作製されたクローンは、hFc RII Bに対して非常に特異的である。(A) 相同性の高いhFc RII bタンパク質(下)と比較したhFc RII Aアミノ酸(aa)配列(上)のアライメント。差異は赤色で強調され、IgG結合部位が示されている。(B~D) hFc RII B特異性mAbをPBMCと共にインキュベートし、次いで、CD14⁺ve単球(B)、CD19⁺ve B細胞(C)、またはCD3⁺ve T細胞(D)に対する結合性について、フローサイトメトリによって査定した。血液中のCD19⁺ve B細胞(C)に対する高度かつ用量依存性の結合が、2B08及び2E08を除く全てのクローンについて観察され、一方で、CD14⁺ve単球(B)に対する結合にはその逆が当てはまった。クローン6A09は、単球及びB細胞の両方に対する交差反応性を示した。(D) mAbのいずれもCD3⁺ve T細胞を染色しなかった。

30

【0250】

図9．hFc RII B mAbの野生型及びN297Q変異体の両方が同じように、標的細胞の表面からのRit内部移行を遮断することができる。(A~B)それぞれ、単離されたヒト扁桃B細胞(A)及び初代末梢血単球(B)上のhFc RII B ITIMのリン酸化(pFc RII B)を誘起する、野生型及び/またはN297Q(NQ) hFc RII B特異性mAb(クローン6G11及び6G08)の能力。チューブリン、GAPDH、及びhFc RII Bを、示されるようにローディング対照として使用し、代表的なプロットを示した。(C) hFc RII BトランスフェクトRamos細胞を、指示された時間点に対して37°Cで、選択されたhFc RII B mAb(選択された拮抗薬及び作動薬を表す)の野生型もしくはN297Q変異体(10 $\mu\text{g} / \text{ml}$)、またはアイソタイプ対照(iso ctrl)及びAF488標識Rit(Rit、5 $\mu\text{g} / \text{ml}$)で処置した。消光アッセイを使用してRitの内部移行を決定し、表面CD

40

50

20 発現の割合として表した。AF488 標識トシツモマブはCD20 の結合後に著しく内部移行しないため、これを陰性対照として使用した²²。3つの独立した実験の平均 + SD が示されている。

【0251】

図10. インビトロの hFc RIIB mAb の ADCC 活性。(A) hFc RIIB mAb で前オプソニン化した Raji 細胞を、健康なドナーの末梢血から精製した NK 細胞と共培養し、ADCC 活性を、材料及び方法の節に記載されるように査定した。この図は、4つの独立した実験の平均 + SD を示す。(B) A の結果に基づいて、7つの hFc RIIB 特異性 mAb を、ある範囲の濃度に関するそれらの ADCC 活性についてさらに試験した。Rit (Rit) を陽性対照として含めた。全ての hFc RIIB mAb が Rit よりも好ましく機能することが示され、7C07 及び 6G11 が、より低い濃度においても最も良好に機能する mAb であった。2つの代表的な実験のうちの1つが示され、データ点は、3通りの試料からの平均 + SD を表す。

10

【0252】

図11. 野生型または N297Q hFc RIIB mAb で染色されたヒト組織の IHC。7C07 または 6G11 の野生型もしくは N297Q 変異体を、様々な組織から採取した新鮮な凍結切片に添加した。過酸化水素ブロックを用いない Tyramide Signal Amplification (TSA, PerkinElmer) 増幅を使用して、組織反応性を検出した。(A) ヒト脾臓の 7C07 染色。7C07 は、類洞及び血管を非特異的に染色することが示された。(B) 6G11 の野生型または N297Q 変異体を、ヒト脾臓切片に添加し、上に詳述したように結合性について査定した。両方のフォーマットが、この組織内の小リンパ球細胞を同じように染色することが示された。(C) 6G11 (1 µg/ml) の染色、続いて、切片上に示される、様々なヒト組織の凍結保存された断面上の TSA 検出。反応性は観察されなかった。

20

【0253】

図12. グリコシル化 N297Q 6G11 変異体は、内因性 Fc 依存性エフェクター活性を欠き、インビトロで ADCC を誘発することができない。初代ヒト CLL 細胞を、野生型もしくは N297Q パージョンの 6G11、または野生型 hIgG1 アイソタイプ対照 (10 µg/ml) でオプソニン化し、次いで NK92 細胞と共培養し、ADCC 活性を、材料及び方法の節に記載されるように査定した。野生型 6G11 とは異なり、N297Q 6G11 mAb は、アイソタイプ対照オプソニン化標的細胞と比較可能な ADCC 有効性によって示されるような内因性 Fc 媒介性エフェクター機能を有しなかった。各ドットは1体の CLL 患者を示す；****p 0.0001 (対応のある学生t検定によって査定した場合)。

30

【0254】

図13. hFc RIIB は、初代ヒト CLL 細胞上で CD20 よりも mAb 誘発性内部移行に抵抗性である。6つの CLL 試料を、前述同様の内部移行の査定前に、37 °C で2または6時間、5 µg/ml の AF488 標識 Rit (灰色の棒) または AF488 標識野生型 6G11 (白色の棒) のいずれかで処置した；表面 CD20 または hFc RIIB 発現の% が表されている。(B) 6つの CLL 試料を野生型または N297Q AT10 (10 µg/ml) で1~6時間処置し、抗 hF(ab')₂-PE を用いた染色により、hFc RIIB 表面発現を間接的に数量化した。値は、0時点において氷上で行った染色に正規化し、表面 hFc RIIB 発現% として表した。データは箱ひげ図として表され、Wilcoxon 検定を行って、処置群を比較した；p 値は、示されるように群を比較する (*p 0.05)。

40

【0255】

図14. hFc RIIB マウスの作製及び特徴付け。(A) 全長 hFc RIIB 2 を Raji 細胞から増幅し、重複する PCR によって同じ細胞から単離された天然 hFc RIIB プロモーターと連結させて、指示されたコンストラクトを作製した。(B) hFc RIIB Tg の発現を、陽性及び陰性のマウス株における PCR 増幅によって査

50

定した。(C)マウスを作製し、戻し交配し、CD19-PE及びhFcRII(AT10)-FITC mAbを用いた染色によって循環血液の表現型を決定し、フローサイトメトリによって査定した。(D)発現賦活性(activatory)及び抑制性のmFcRIIならびに/またはhFcRIIB受容体を、インハウスで作製した特異的なmAbを使用して、指示されたマウス系統から作製したBMDM上で精査した(Tuttrら、準備中の論文)。データは、ヒト導入遺伝子の存在下における、賦活性及び抑制性mFcRのプロファイルの代償性変化の欠如を示す。(E)mFcRIIまたはhFcRIIBの発現を、それぞれ、指示された野生型またはhFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/マウスの脾臓からのCD19^{-ve}CD11b⁺veNK1.1^{-ve}Ly6G⁺ve好中球上で査定した。3つの独立した実験の代表的なドットプロットが示されている。予想通り、hFcRIIBではなくmFcRIIが好中球上で発現されている。(F)野生型またはhFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/マウス脾臓からの凍結切片を免疫蛍光法によって分析し、hFcRIIB Tgの発現を査定し、指示されたマーカー(それぞれAT130-2及びAT10 mAb、赤色)、B細胞(B220、上のパネル(緑色))及びマクロファージ(F4/80、下のパネル(緑色))を使用して、内在性mFcRII受容体と比較した。

10

【0256】

図14(4/5) . hFcRIIB Tgマウスの作製及び特徴付け、ならびに6G11 mAbのPK、PD、MABEL、及びCRS誘発特性の査定。図14に関連する。(D)マウス白血球サブセットの免疫表現型を決定するためのゲーティングストラテジー(Rose et al, 2012)。(E)mFcRIIまたはhFcRIIBの発現を、それぞれ、指示された野生型またはhFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/マウスならびにヒト血液の循環(血液)細胞及び脾臓B細胞、単球/マクロファージ、及び好中球上で査定した。少なくとも3つの独立した実験の代表的なドットプロットが示されている。

20

【0257】

図14(5/5) . hFcRIIB Tgマウスの作製及び特徴付け、ならびに6G11 mAbのPK、PD、MABEL、及びCRS誘発特性の査定。図14に関連する。(F)示されるように、hFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/マウスの循環(血液)及び脾臓の白血球サブセット、ならびに健康なヒト白血球、ならびにCLL患者及びB細胞株上のhFcRIIB発現の査定が示されている。平均±SDが示され、各ドットは単一のドナー/試料を表す。(中央のパネル)野生型またはhFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/マウス脾臓からの凍結切片を免疫蛍光法によって分析し、hFcRIIB Tgの発現を査定し、指示されたマーカー(それぞれAT130-2及びAT10 mAb、赤色)、B細胞(B220、上のパネル(緑色))及びマクロファージ(F4/80、下のパネル(緑色))を使用して、内在性mFcRIIと比較した。(下のパネル)hFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/マウス肝臓内のCD31⁺内皮細胞上のhFcRIIB発現の査定。

30

【0258】

図15 . hFcRII mAb AT10はインビボで活性であり、B細胞のRit枯渴を増強する。(A)それぞれ高レベルまたは低レベルのCFSEで標識された、hFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/標的及びmFcRII⁻/非標的C57BL/6脾細胞を、野生型またはKO C57BL/6受容マウスに養子移入(静脈内)した。24時間後、指示されたhFcRII mAb AT10の野生型またはF(ab)₂断片をマウスに受けさせ(静脈内、mIgG1)、16時間後、脾細胞を分析して、残存する標的対非標的比を決定した。データを正規化して、1.0の対照(NT)標的:非標的比が与えられた。各ドットは個別のマウスからの結果を表し、平均比は水平線によって示される。データは、少なくとも2つの独立した実験の4~6マウス/群から組み合わされている。(B)それぞれ高レベルまたは低レベルのCFSEで標識された、hCD20⁺/x hFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/標的及びmFcRII

40

50

I^{-/-}非標的C57BL/6脾細胞を、野生型C57BL/6受容マウスに注入（静脈内）した。24時間後、指示されたmAbを単独または組み合わせでマウスに受けさせ（10 μ g、静脈内）、16時間後、脾臓を分析して、上記のように標的対非標的比を決定した。データは、少なくとも3つの独立した実験から組み合わせられている。（C及びD）Rit及びAT10を単独または組み合わせで使用したB細胞の全身枯渇。hCD20⁺/-xhFc RIIIB⁺/-xmFc RII^{-/-}C57BL/6マウスに、500 μ gのRit（Rit、hIgG1）、AT10（mIgG1）、または250 μ gの各mAbの組み合わせのいずれかを、0日目に受けさせ（静脈内）、循環B細胞の数をフローサイトメトリによって経時的に査定した。（C）処置前及びmAb注入後2日目を示す循環性B細胞を分析する代表的なフローサイトメトリドットプロット。（D）棒グラフは、mAb注入後の指示された日における循環B細胞数の平均 \pm SEM；処置前の循環血液B細胞に正規化された、2つの独立した実験からの6マウス/群（循環B細胞%として表される）を示す。一元配置分散分析（B）及び二元配置分散分析（D）統計検定を行って、処置群を比較した；p値は、示されるように群を比較する（*p 0.05、**p 0.01、及び***p 0.001）。

10

【0259】

図16．CLL細胞は、間質細胞との相互作用によりRit依存性枯渇から保護される。

（A）6~10 \times 10⁷個の初代患者CLL細胞を、同時に静脈内及び腹腔内に免疫不全NOD/SCIDマウスに移植した。注入4~5日後、マウスを、10mg/kgで1回もしくは2回用量のRit（Rit）またはアイソタイプ対照で処置した。2日後、マウスを屠殺し、脾臓及び腹膜内に残存するCLL細胞の数をフローサイトメトリによって査定し、その後、アイソタイプ対照を受けた試料に正規化した。このデータは、腹膜内のCLL細胞はmAbの単回投薬で効率的に欠失した（破線の棒）が、脾臓からのRit誘発性枯渇（塗りつぶされた棒）はRitの2回投薬後でも不完全であったことを示す。この図は、3~5マウス/群の平均+SEMを示す。データは、t検定によって分析した；p値は、示されるように群を比較する（**p 0.01、****p 0.001）。

20

【0260】

（B）ヒトCLL細胞を異種移植されたマウスにおける、Rit、6G11、またはその組み合わせの抗腫瘍活性。マウスを、1~10mg/kgのhCD20 mAb（Rit）、hFc RIIIB mAb（6G11）、または両方のいずれかで処置し、脾臓内に残存するCLL細胞の%を列挙し、アイソタイプ対照での処置後の割合に正規化した。独立した各実験からの平均値が示され、各患者は色分けされている（n=11患者）。

30

【0261】

（C）難治性と以前に指定された患者からのCLL細胞（n=4、表S4参照）を、（B）にあるように異種移植し、処置し、査定した。データは、対応のある一元配置分散分析検定を使用して分析した。

【0262】

図17．hFc RIIIB mAb 6G11は、インピボでマンツル細胞リンパ腫（MCL）細胞のRit枯渇を増強する。（A）NOD/SCIDマウスに、10 \times 10⁶個のJeko-1 MCL細胞を接種（皮下）し、腫瘍が4 \times 4mmに達したとき、6G11、Rit（Rit）、または両方の組み合わせの組み合わせで処置した。マウスを経時的に監視し、末期腫瘍発達の徴候が顕れた直後に屠殺した。データは、独立t検定を使用して分析した（*p 0.05及び***p 0.001）。（B）NOD/SCIDマウスに照射し、次いで6~7 \times 10⁶個の初代ヒトMCL細胞を接種した。接種4~5日後、マウスを、1mg/kgのRit（Rit）、6G11、または両方のいずれかで処置した。2~3日後にマウスに第2の注入を受けさせ、2~3日後に屠殺し、脾臓内に残存するヒトMCL細胞の%を列挙した。このデータは、両方のmAb、特にその組み合わせの、初代ヒトMCL細胞を欠失させる能力を明らかに示す。一元配置分散分析検定を行って、処置群を比較した；p値は、示されるように群を比較する（*p 0.05、*

40

50

* * p 0 . 0 0 1) 。

【 0 2 6 3 】

(C 及び D) インビボで標的細胞を欠失させる I I 型 h C D 2 0 m A b G A 1 0 1 g l y の能力を増補する 6 G 1 1 の能力。(C) C F S E + h C D 2 0 + / - x h F c R I I B + / - x m F c R I I - / - (標的)、及び m F c R I I - / - (非標的) 脾細胞を、野生型マウスに養子移入 (静脈内) し、 G A 1 0 1 g l y もしくは 6 G 1 1 単独または組み合わせ (0 . 0 0 8 m g / k g) で処置し、前述同様に血液を査定した。データは、2 ~ 3 つの独立した実験から組み合わされている。(D) C F S E + h C D 2 0 + / - x h F c R I I B + / - x m F c R I I - / - (標的)、及び m F c R I I - / - (非標的) 脾細胞を、h F c R I I B + / - x m F c R I I - / - 受容マウスに養子移入 (静脈内) し、アイソタイプ対照または 6 G 1 1 のいずれか (2 0 m g / k g)、続いて G A 1 0 1 g l y (0 . 0 4 m g / k g) で処置し、前述同様に血液を分析した。各ドットは個別のマウスからの結果を表し、平均比は水平線によって示される。(B 、 C 、 F 、 及び G) データは、一元配置分散分析検定を使用して分析した (* p 0 . 0 5 、 * * p 0 . 0 1 、 * * * p 0 . 0 0 1 、 及び * * * * p 0 . 0 0 0 1) 。

10

【 0 2 6 4 】

図 1 8 . インビボの 6 G 1 1 の P K 、 P D 、 及び M A B E L 特性の査定。(A 及び B) 模式図 (A) に起訴されるように、同齢かつ同性の h F c R I I B + / - x m F c R I I - / - マウス (6 ~ 7 マウス / 群) に、1 ~ 1 0 0 m g / k g の野生型 6 G 1 1 m A b を注入 (静脈内または腹腔内) し、試料採取した。実験の 7 日目にマウスを屠殺し、器官を毒性の徴候について査定した。(B) マウスの体重を、m A b 注入後最大 7 日目 (1 6 8 時間) まで経時的に査定した (0 日目の体重の 1 0 0 % に正規化し、次いで各群について平均 + S E M として表した) 。(C 及び D) 模式図 (C) に示されるように、同齢かつ同性の h F c R I I B T g x m F c R I I - / - マウス (6 マウス / 群) または m F c R I I - / - マウス (3 マウス / 群) に、0 日目に 1 0 m g / k g の野生型 6 G 1 1 を注入 (静脈内) し、続いて 3 日目、7 日目、及び 1 0 日目に同用量の m A b を腹腔内注入した。実験の 2 4 日目にマウスを屠殺し、器官を毒性の徴候について査定した。(D) マウスの体重を実験全体にわたって測定し、(B) に詳述されるように査定した。

20

【 0 2 6 5 】

(下のパネル) h F c R I I B + / - x m F c R I I - / - マウス (4 マウス / 群 、 平均 + S D) における、野生型 6 G 1 1 (2 0 m g / k g) による循環単球及び好中球の枯渇の査定。

30

【 0 2 6 6 】

図 1 9 . インビトロの全血及び希釈血液 (2 0 % v / v) サイトカイン放出アッセイ。3 人の健康な献血者からの (A) 新鮮な血液、または (B) (血清非含有 C T L 培地内で) 5 倍に希釈したヘパリン処置血液を、3 7 ° C で 2 4 時間、1 0 μ g / m l の指示された m A b で処置し、その後、後続の分析のために上清を採取した。サイトカイン (I L - 1 、 I L - 2 、 I L - 6 、 I L - 8 、 T N F - α 、 及び I F N - γ) を、M S D によって数量化した。各ドットは、個別のドナーを示す (n = 3) 。

40

【 実施例 】

【 0 2 6 7 】

実施例 1 : 実験データ

概要

治療用抗体は、免疫系を動かせることによる新たな作用機構を明らかにし、癌治療を変容させている。残念ながら、治癒は稀にしか起こらず、患者は内因性または獲得抵抗性のいずれかを示す。ここで、免疫細胞の脱感作及び抗体薬に対する腫瘍細胞の抵抗性に関わる受容体であるヒト (h) F c R I I B を標的とし、それを遮断する治療可能性を実証する。F c R I I B 遮断抗体は、C D 2 0 特異性抗体リツキシマブの内部移行を防止し、それにより、インビトロかつインビボで、細胞表面到達性及び免疫エフェクター細胞媒介性の抗腫瘍活性を最大にした。完全に同系の h F c R I I B T g マウスモデルにお

50

いて、hFc RII B mAbは、リツキシマブB細胞枯渇を増強した。抵抗性易発性間質区画からのヒト慢性リンパ球性白血病（CLL）腫瘍細胞の枯渇を査定するマウスモデルでは、リツキシマブの同時投与は、再発/難治性患者からのCLL細胞を用いた実験を含め、客観的応答及び完全応答を向上させた。有力候補であるhFc RII B特異性抗体、6G11は、良好なオンターゲットの免疫反応性、好ましい薬物動態を有し、リツキシマブとの組み合わせにおける相加/相乗活性にインビボで有害作用を及ぼさないことが示された。これらのデータは、B細胞リンパ増殖性障害の免疫療法のための、このhFc RII B特異性mAbのさらなる臨床開発を支持する。

【0268】

導入

一般に生物学的療法、具体的にはモノクローナル抗体（mAb）は、拡大を続ける治療薬のクラスである¹。これらは癌治療に改革をもたらし、いくつかの悪性腫瘍については従来の化学療法と並ぶ標準治療となっている。10年以上にわたり、治療用mAbの活性の大部分は、Fc受容体（FcR）とのそれらの相互作用によって左右されることが知られている。具体的には、IgGの治療活性の大部分を説明するのは、FcRの相対的な発現レベル、親和性、及び活性である（²、³にて査読）。抗体薬に対する内因性または獲得抵抗性の根底にある機構についてはそれほど知られていない。CD47などの「貪食拒否（don't-eat-me）」シグナルは抗体媒介性エフェクター細胞の抗癌活性を制限することが示されているが⁴、それらの臨床的重要性の根拠は依然として初期段階にある。ますます多くの抗体療法が数種類の癌の処置のために開発されていることに伴い、これらの療法に対する癌細胞の抵抗性を理解し、それらを克服する薬を開発する必要が生じている。

【0269】

前臨床⁵～⁸及び臨床的有効性⁹～¹¹に関して、いくつかの抗癌mAbは抗体依存性の免疫細胞媒介性抗腫瘍機構の働きに依存するため、これらの共通抗体エフェクター機構に対する抵抗性機構を理解し、防止することが特に必要である。

【0270】

ヒト（h）CD20特異性mAbリツキシマブは、癌免疫療法に許可された最初のものであり、したがって、濾胞性リンパ腫（FL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBCL）、慢性リンパ球性白血病（CLL）、及びマンツル細胞リンパ腫（MCL）を含む、CD20を発現するB細胞癌を患う患者に広く投与されている（¹²にて査読）。興味深いことに、リツキシマブはFL及びDLBCLにおいて有効であり、総合的な生存を向上させるが、CLL及びMCLでは中程度の応答しか見られない。さらに、リツキシマブ応答性リンパ腫においてさえも、一部の個体は、第1の処置で抵抗性を示すが、またはリツキシマブ含有併用療法に抵抗性であるようになるため、これは、mAb抵抗性機構を研究するための理想的なシステムとなる。

【0271】

近年の研究は、抑制性Fc受容体IIB（FcRIIB/CD32B）が、標的B細胞からのリツキシマブ内部移行を促進することを実証した³²、³³。B細胞上で発現される主要なIgG結合性免疫受容体として、FcRIIBは、B細胞表面からリツキシマブを「吸い込む」ことにより働き、全てのmAb依存性免疫細胞の抗癌機構を効果的に弱めるようである（¹³、及び準備中の論文）。対照的に、近年許可されたオビヌツズマブ（GA101）などのいわゆるII型抗CD20 mAbは、それらにCD20を脂質ラフト内に再分配する能力がないことにおそらく起因して、このプロセスに対してさほど感応性がない（Cragg et al., 2003、Lim et al., 2011）。FcRIIB媒介性リツキシマブ内部移行は、臨床応答と相関し、CLL>MCL>FL及びDLBCLの順に従った³²、³³。Ab抵抗性におけるFcRIIBの役割と一致して、リツキシマブ免疫化学療法で処置されたMCL患者の遡及的分析は、FcRIIB陽性腫瘍生検と比較してFcRIIB陰性腫瘍生検を有する患者の中でより優れた生存を示した¹³。同様に、リツキシマブ単独療法を受ける高レベルのFcR

10

20

30

40

50

II Bを有するを発現するFL患者では、乏しい応答が観察された(14、及び提出された論文)。

【0272】

以下の実施例は、リツキシマブ内部移行を遮断することができる、hFc RII Bに対する抗体の開発を記載し、それらのインビトロ及びインビボの治療可能性を精査する。ヒト細胞型特異性かつ組織特異性様式でhCD20及びhFc RII Bを同時発現するトランスジェニック(Tg)マウスを作製し、概念実証研究においてPK/PD及び毒性的パラメータを査定するために使用した。次いで、単独またはリツキシマブもしくは他のCD20 mAbと組み合わせで使用したhFc RII b mAbが抵抗性を防止または克服する際の作用を、これら及び他のユニークなマウスモデル(ここでは、ヒトCLL細胞(患者の表現型、すなわちリツキシマブ応答性または再発/難治性を維持する)が、ヒト間質細胞を含む関連する抵抗性易発性組織区画においてインビボで研究され得る)において査定した。

10

【0273】

材料及び方法

動物及び細胞

ヒト(h)CD20 Tg、鎖^{-/-}、及びマウス(m)Fc RII B^{-/-}マウスは以前に説明されており(Beers et al., 2008)、遺伝子型はPCR及び/またはフローサイトメトリによって確認されている。内務省の指針に従って、現地の施設でマウスを繁殖させ飼養した。動物実験は現地の倫理委員会の承認を得、内務省認可PPL30/1269及びM90-11の下で行った。ヒト(h)CD20 Tg、鎖^{-/-}、及びFc RII B^{-/-}マウスは以前に説明されており¹⁵、遺伝子型はPCR及び/またはフローサイトメトリによって確認されている。10~12週齢の雌のBALB/c及びC57BL/6マウスが、Harlan UK Limited(英国オックスフォードシャー州ブラックソーン)から供給され、現地の動物施設で飼養された。CB-17 SCIDマウスをCharles Riverから購入し、次いで現地の動物施設で繁殖させ飼養した。初代腫瘍細胞を用いた異種移植研究(以下を参照のこと)のために、6~8週齢の雌NOD SCIDマウスがTaconic(デンマーク国ボンホルト(Bomholt))から供給され、現地の施設で飼養された。

20

【0274】

臨床試料

臨床試料の使用のための倫理的許可は、Southampton and South West Hampshire Research Ethics CommitteeからのSouthampton University Hospitals NHS Trust、またはEthics Committee of Skane University Hospitalによって得た。ヘルシンキ宣言に従って、インフォームドコンセントが提供された。試料は、Human Tissue Authorityに認可されたUniversity of SouthamptonのCancer Science Unit Tissue Bankから譲渡されたか、またはSkane University Hospital(ルンド)の血液学部門及び腫瘍学部門によって得た。CLL及びMCL試料を、単離されている単一細胞懸濁液として査定し、Ficoll精製し、後続の分析のために凍結保存するか、または異種移植研究において新鮮な状態で使用した。

30

40

【0275】

細胞培養

細胞培養を、補充RPMI(2mMのグルタミン、1mMのピルビン酸塩、100IU/mlのペニシリン及びストレプトマイシン、ならびに10%のFCS[Myoclon e]を含有するRPMI)(GIBCO BRL、スコットランド国ペイズリー)中で行った。マウス脾臓B細胞を、MACS B細胞単離キット(Miltenyi Biotec、英国)を使用したネガティブセレクションによって精製し、同じ培地内で培養した

50

。細胞株をE C A C Cから得、抗生物質非含有の補充R P M I培地内に維持した。正常なヒト末梢B細胞を、M A C S B細胞単離キット(M i l t e n y i B i o t e c、英国)を使用したネガティブセレクションによって精製した。

【0276】

単球由来マクロファージ(M D M)及び骨髄由来マクロファージ(B M D M)の作製

国立血液サービス、Southampton General Hospital(英国サウサンプトン)、またはハルムスタッドの病院もしくはSkane University Hospital(スウェーデン)内の血液センターのいずれかから得た末梢血から、ヒトM D Mを分化した。手短に述べると、接着性C D 1 4 + 単球を、以前に説明されているように、ペニシリン(100 U / m L)、ストレプトマイシン(100 μ g / m L)、10%のF C S、及び25 ~ 100 n g / m Lの低エンドトキシン組み換えヒトマクロファージコロニー刺激因子(M - C S F ; R & D S y s t e m s (米国)、またはインハウスで作製)を含有するR P M I内で培養した¹⁶。培地の半分を、採取まで2日毎に新鮮なM - C S Fと交換した。冷P B Sと一緒に短いインキュベーション後、培養7 ~ 10日目にM D Mを採取した。

10

【0277】

B M D Mは、以前に報告されているように、マウスの大腿骨及び脛骨の骨髄から単離した細胞から作製した¹⁷。手短に述べると、10%のF C S、2 m Mのグルタミン、ならびに1 m Mのピルビン酸塩、ペニシリン、及びストレプトマイシン(各々100 μ g / m lで)、ならびに20%のL 9 2 9細胞馴化培地(M - C S Fを含有する)で富化したR P M I 1 6 4 0 (L i f e T e c h n o l o g i e s I n v i t r o g e n、英国ペイズリー)中で、骨髄細胞を培養した。細胞は、37、5% C O₂で使用前に10 ~ 14日間培養した。C D 1 1 b及びF 4 / 8 0発現について、形態学的検査及び/またはフローサイトメトリによってマクロファージ分化を日常的に確認した。

20

【0278】

抗体及び試薬

m A bは、典型的に、ハイブリドーマまたは安定にトランスフェクトされたC H O - k 1細胞の培養上清から生成した。I g Gは、タンパク質A上で精製し、電気泳動(B e c k m a n E Pシステム、B e c k m a n)によって純度を査定し、凝集がないことをH P L Cによって確認した。F (a b ')₂断片は、以前に説明されているように生成した¹⁸。h F c R I I m A b A T 1 0は、以前に説明された¹⁹。リツキシマブは、Southampton General Hospitalの腫瘍学薬局から寄贈されたか、またはルンド(スウェーデン)の大学病院薬局から購入した。リン酸化h F c R I I Bに対する抗体(クローンE P 9 2 6 Y)(O r i g e n e、米国)、及びチューブリン(C e l l S i g n a l i n g、米国)を、免疫プロットングに使用した。A F 6 4 7標識I g G 1、抗C D 3 - P E、抗C D 1 9 - p e r C p - C y 5 . 5、及び抗C D 5 6 - A F 4 8 8 (B D B i o s c i e n c e s)を使用して、P B M Cを標識した。P B M C免疫表現型決定のために、Z e n o n標識キット(M o l e c u l a r P r o b e s)を使用してP Eで標識されたF c R I I B m A bを、抗C D 3 - F I T C、抗C D 1 9 - P e r C P - C y 5 . 5、及び抗C D 5 6 - A P Cと併せて使用した。

30

40

【0279】

フローサイトメトリ

蛍光抱合m A bは、B D B i o s c i e n c e s、e B i o s c i e n c e s、A b D S e r o t e cから購入したか、またはインハウスで作製した。フローサイトメトリは以前に説明されているとおりであり²⁰、試料はF A C S C a n、F A C S C a l i b u r、またはF A C S C a n t o I I上で査定し、データはC e l l Q u e s t P r oまたはF A C S D i v a(全てB D B i o s c i e n c e s)で分析した。

【0280】

h F c R I I B m A bの作製

h F c R I I B m A bは、n - C o D e R(登録商標) s c F vファージディスプレイ

50

レイブラリをスクリーニングすることにより同定した。hFc RII B及びhFc RII Aの細胞外ドメインを、それぞれ標的及び非標的として使用するためにmIgG3-Fc(hFc RII A/B-Fc)に融合させ、一過性にトランスフェクトされたHEK293細胞内で生成し、続いてタンパク質A上で精製した。3回の連続選択を行った。事前選択は、選択1の前に行い、また、Streptavidin Dynabeads上に乗せた、コーティングされたマウスIgG3及びビオチン化hFc RII A-Fcに対して行った。結合ファージをトリプシン消化によって溶出し、標準的手順を使用してプレート上で増幅させた²¹。選択1の増幅されたファージを、エッチングしたポリスチレンボール(Poly Sciences、米国)にコーティングされたhFc RII Bに対する選択のために使用した。選択2のための事前選択は、コーティングされた余剰のストレプトアビジンに対して行った。選択3は、例えば、異なる濃度のビオチン化hFc RII Bを使用して、限界希釈選択として行った。hFc RII Aを全ての選択において競合相手として使用した。選択3からのファージミドをscFv生成フォーマットに変換し、後続のスクリーニングアッセイに使用し、可溶性または細胞結合抗原への特異的結合ならびに免疫複合体結合の抑制を査定した。hFc RIIに対する3つの異なる市販の抗体(MCA1075XZ(AbD Serotec)、MAB1330(R&D Systems)、AF1330(R&D Systems))を、組み換え及び細胞表面結合Fc RII Bの評価に使用した。フローサイトメトリ及び蛍光マイクロアレイ技術(FMAT)による細胞表面結合Fc RII Bの評価のために、マウス抗hFc RII-APC(BD Pharmingen)も使用した。全ての実験において、対応するアイソタイプ対照を陰性対照として含めた。細胞結合抗原の評価のために、FuGENE(Roche)を使用して、CHO-k1細胞に、Fc RII A-pIROまたはFc RII B-pIROのいずれかをpIRESpuroと一緒に同時トランスフェクトした。10µg/mlのPyromycin(InvivoGen)を、トランスフェクト細胞の選択のために使用した。限界希釈法によって得た個別のクローンを、次いでhFc RII抗体(BD Biosciences)、及び対応するアイソタイプ対照で染色し、続いてフローサイトメトリ及びFMAT分析により発現が最も高いクローンを選択し、これらをさらなる実験に使用した。scFvの一次スクリーニングのために、Fc RII A及びFc RII BをトランスフェクトしたCHO-k1細胞をFMATプレートに播種した。大腸菌(E.coli)発現scFv、続いて脱グリコシルマウス抗HIS抗体(R&D Systems)及び脱グリコシル抗マウスCy5(GE Healthcare)を添加した。8200検出システム(Applied Biosystems)を使用して染色細胞を検出した。一次スクリーニングからの陽性クローンを、Fc RII A及びFc RII Bトランスフェクト細胞に対する結合性についてもう1回再発現及び再試験した。Fc RII AまたはFc RII Bに特異的に結合し、かつIC結合を抑制したScFvクローンを、標準的手順を使用してCDRH1、H2、及びH3にわたって配列決定して、ユニークなクローンを同定した。大腸菌における10mlの発現調製物からのリゾシーム(Lysosyme)(Sigma)を用いた周辺質調製後、ユニークなクローンをNi-NTAスピンカラム(GE Healthcare)上で精製した。合計で17個のユニークなクローンを野生型及びN297Q hIgG1変異体に変換した。VH及びVLをPCR増幅し、それぞれ、抗体の重鎖及び軽鎖の定常領域を含む発現ベクターに挿入した。その後、懸濁液中での成長に適合されたHEK293EBNA細胞(Life Technologies)にPEIを使用してトランスフェクトし、次いで細胞懸濁液を攪拌しながら37°Cで4時間インキュベートさせ、その後、供給溶液(UltraPepSoy、Sheffield Bio-Science)で希釈し、トランスフェクション6日後に採取した。採取した培養培地を滅菌濾過し、AKTA Purifierシステムに接続されたMabSelect(GE Healthcare)が充填されたカラムに適用した。このカラムをローディングバッファーで洗浄し、低pH緩衝液で溶出させた。溶出した抗体を滅菌濾過し、Spectra/Por透析膜4(Spectrum Laboratories Inc)を使用して、適切

10

20

30

40

50

な製剤緩衝液に透析した。透析後、この材料を滅菌濾過し、4℃で保管した。次いで、精製されたIgGを、トランスフェクトCHO-k1細胞ならびにFcγRIIBを天然に発現する細胞株及びPBMCに対する結合性について査定した。

【0281】

免疫複合体(IC)結合の遮断

FITCに特異的なhIgG1をFITC-BSA-ビオチンまたはFITC-BSAとモル比10:1で混合することによって、ICを形成した。この混合物を、使用前に室温で1時間プレインキュベートした。FcγRIIA及びFcγRIIBに特異的に結合した大腸菌発現ScFvクローンの上清(10μl)を、FcγRIIA及びFcγRIIBを発現するCHO-k1細胞に添加し、1時間放置して結合させた。ICを3nMで添加した。Strep-Alexa-Fluor(AF)-647(Life Technologies、英国)を使用し、続いてフローサイトメトリによって結合したICを検出し、遮断をAF674シグナルの損失として数量化した。

10

【0282】

抗体依存性細胞食作用(ADCP)及び細胞性細胞傷害性(ADCC)

食作用アッセイ(ADCP)を、大部分は以前に詳述されているように行った^{2,3}。マクロファージへの成熟化後、これらの細胞を、氷冷PBSまたはAccutase(Sigma)もしくはトリプシン/EDTA(Life Technologies、英国)のいずれかを使用して採取し、96ウェルプレート内に5×10⁴細胞/ウェルで再度播種し、37℃で2~4時間または一晩インキュベートした。その後、CLL細胞を、37℃で15分間、5μMのカルボキシフルオセインサクシニミジルエステル(CFSE、Molecular Probes)で標識した。洗浄後、CLL細胞を、10μg/mlのオプソニン化mAb(複数可)と共に30分間インキュベートし、その後、5:1の比でマクロファージ培養物に添加した。1時間後、擦過を使用して細胞を収集し、氷上で15分間、APC標識CD206(BD Biosciences)またはhFcγRIImAb(3G8、インハウス)で染色して、MDMを区別した。収集されるマクロファージを最低5000個として、細胞を採取し、フローサイトメトリによって分析した。二重陽性で染色された細胞の割合を、食作用可能性の尺度として決定した。食作用の確認を、共焦点顕微鏡法によって日常的に行った^{2,3}。

20

【0283】

ADCCアッセイは、健康な献血者の末梢血からMACS単離された初代CD56⁺VE⁺NK細胞(Miltenyi Biotec、ドイツ)、またはGFPと一緒にCD16-158V対立遺伝子を発現するように安定にトランスフェクトされたNK-92細胞株(Conkwest(カリフォルニア州サンディエゴ)から購入)のいずれかを使用して、2つの方法で行った^{2,4}。初代NK細胞エフェクターを使用したアッセイでは、標的細胞を、NK細胞との混合前に、1~10μg/mlのmAbと共に30分間プレインキュベートした。これらの細胞を、20:1のエフェクター:標的細胞比で、10mMのHEPES緩衝液、1mMのピルビン酸ナトリウム、及び10%のFBS(全てGibco)を含有するRPMI 1640+GlutaMAX培地(Life Technologies)中で、3~4時間インキュベートした。製造業者の指示に従ってCellaTOXキット(Cell Technology Inc)を使用して溶解を測定し、生じた生物発光をVictor²VLミノメーターで読み取った。NK細胞株を使用したとき、NK細胞を1:1~5:1余剰の標的と共に4時間インキュベートし、溶解はフローサイトメトリによって決定した。手短に述べると、インキュベーションの終わりで、細胞懸濁液を9nMのSYTOX赤色死細胞染料(Life Technologies)と共に20分間暗所でインキュベートし、次いでこれらの細胞をフローサイトメトリによってアッセイした。

30

40

【0284】

内部移行の抑制がADCP及びADCCにどのように影響するかを精査するために、抗体内部移行の時間を取れるように、CLL細胞を、エフェクターとの共培養の前に、リッ

50

キシマブ単独または6G11のアイソタイプ対照もしくはN297Q変異した変異体との組み合わせと共に3~4時間インキュベートした。

【0285】

内部移行アッセイ及びAF488標識

mAbを、製造業者の指示(Life Technologies、英国)に従ってAF488で標識した。内部移行を決定するために、以前に詳述されているように消光アッセイを行った^{2,3}。手短に述べると、細胞試料(2~4×10⁵細胞/ウェル)を所与の時間にわたってAF488標識mAb(5μg/ml)と共にインキュベートし、洗浄し、再懸濁させ、4で30分間、抗AF488消光抗体(Life Technologies、英国)の存在下または非存在下でインキュベートした。次いで試料をフローサイトメトリによって査定した。結果は表面接触可能mAbの%として表され、これは内部移行されたmAbの量に反比例する。

10

【0286】

ウェスタンブロットティング

ウェスタンブロットティングを、以前に説明されているように行った^{2,6}。手短に述べると、2.5~5×10⁶個の細胞を処置し、洗浄し、プロテアーゼとホスファターゼ阻害薬とのカクテルを含有するOnyx緩衝液中で溶解させた。次いで試料をSDS PAGEによって分離させ、タンパク質をPVDF膜上に直ちに移した。膜を5%の脱脂粉乳でブロッキングし、適切に希釈した一次抗体と共にインキュベートし、洗浄し、次いで西洋ワサビペルオキシダーゼ抱合抗ウサギまたは抗マウスIgG(Sigma Aldrich、英国)と共にインキュベートした。バンドは、増強化学発光(ECL、GE Healthcare、英国)を用いたインキュベーション及び感光性フィルム(Hyperfilm ECL、GE Healthcare、英国)への露出によって可視化した。製造業者の指示のとおりImage Jソフトウェアを使用して、濃度測定を行った。

20

【0287】

インビボの免疫療法

養子移入アッセイ：以前に詳述されているように(Beers et al., 2010b)、約2×10⁷脾細胞/mlを、それぞれ5μM及び0.5μMのCFSEで標的または非標的として染色し、洗浄し、1:1比で混合し、受容マウスに静脈内注入した(約5×10⁶細胞/マウス)。次いで、1日目及び/または2日目に、マウスに静脈内及び/または腹腔内注入し、1日後に処分して、フローサイトメトリを使用して血液及び脾臓の白血球を検査した。

30

【0288】

養子移入：養子移入アッセイは、大部分は以前に詳述されているように行った^{2,7}。手短に述べると、関連するC57BL/6マウスからの約2×10⁷脾細胞/mlを、室温で10分間、それぞれ5μM及び0.5μMのCFSEで標的(T)または非標的(NT)として染色し、洗浄し、1:1のNT:T比で混合し、-1日目に受容マウスに静脈内(i.v.)注入した(約5×10⁶脾細胞/マウス)。次いで、0日目に、マウスにmAbを静脈内注入し、1日後に処分して、それらの血液及び脾細胞をNT及びT細胞について検査した。一部の養子実験では、次いで受容マウスに、0日目及び1日目にmAbを(静脈内経路及び/または腹腔内経路を介して)注入し、1日後に処分して、それらの血液及び脾細胞をNT及びT細胞について検査した。フローサイトメトリを使用して、B細胞集団を、FSC-H及びSSC-HパラメータならびにCD19陽性によって同定した。

40

【0289】

B細胞欠失：全身B細胞枯渇アッセイでは、異なる遺伝子型のマウスに、単一用量のhCD20、hFcRII、または両方のmAbを静脈内で与え(250~500μg)、次いで血液または器官中に残存するB細胞の割合を、前述同様にフローサイトメトリまたは免疫組織化学的検査(IHC)によって経時的に査定した^{2,7}。

【0290】

50

初代ヒト異種移植モデル：CLLまたは白血病相におけるMCL患者から血液試料を収集し、収集の24時間以内に異種移植研究のために使用した。手短に述べると、Ficoll Paque PLUSを使用してPBMCを単離させ、十分な洗浄後、これらの細胞を、 $3 \sim 5 \times 10^8$ 細胞/mlで滅菌PBS中に再懸濁させた。 $6 \sim 10 \times 10^7$ 細胞/マウスに対応する200 μ lの細胞懸濁液を静脈内注入する1~5時間前に、マウスに1 Gyを照射した。細胞注入後4~5日目に、マウスを、1~10 mg/kgのhCD20 mAb、hFc RII mAb、または両方のいずれかで処置した。2~3日後にマウスに第2の注入を受けさせ、2~3日後に屠殺した。脾臓を分離し、2つに分割し、1つの半割部をOCT中に入れ、他方を単一細胞懸濁液にした。その後、赤血球を、細胞表面染色mAbと共に氷上で30分間インキュベーションする前に、溶解緩衝液(Gibco)を使用して溶解させた。ヒト細胞を、hCD5及びhCD19染色(BD Biosciences)によって、hCD45陽性細胞及び白血病細胞として同定及び数量化した。

10

【0291】

インビボの白血球枯渇

hFc RII B⁺ / - x mFc RII - / - C57BL/6マウスに20 mg/kgのアイソタイプ対照または野生型6G11のいずれかを注入(静脈内)した後、マウス末梢血白血球の全身枯渇をフローサイトメトリによって経時的に査定した。白血球サブセットレベルを投薬前レベルに正規化し、%として表した。

20

【0292】

インビボPD、PK、及び免疫原性

6G11(PK)及びMAHAの血清濃度を、ECLイムノアッセイを使用して決定した。ビオチン化抗6G11ポリクローナルヤギ血清及びStreptavidin-Sulfo Tag(Meso Scale Diagnostics、米国)を使用して、マウス血清中の6G11 mAbを検出した。6G11について作成された既知の標準曲線との比較によって、血清中のmAbレベルの数量化を行った。6G11 PKパラメータ(Cmax、Tmax、AUC、CL(F)、Vz(F)、Vss、及びt1/2)を、ソフトウェアアプリケーションPhoenix(商標)WinNonlin v.6.2(Pharsight Corp、米国カリフォルニア州)を使用し、ノンコンパートメントモデルを用いて評価した。Cmax及びTmaxは、血清濃度-時間プロファイルから直接得た。

30

【0293】

定性的及び半定量的ECLイムノアッセイを使用して、マウス血清中で6G11を対象とするMAHAの存在を検出した。ビオチン及びSulfo-Tag標識6G11を含むアッセイ緩衝液中で、試料を希釈した。インキュベーション後、事前ブロッキングされているストレプトアビジンプレートに試料を移した。MSDに基づく技術を使用してシグナルを査定し、発光シグナルは試料中に存在する抗6G11のレベルに比例した。親和性精製したヤギ抗6G11血清を、陽性対照試料の調製に用いた。

【0294】

インビボの薬物動力(PD)、薬物動態(PK)、予想される生物学的効果の最小レベル(minimum anticipated biological effect level)(MABEL)、及び免疫原性研究

40

単一用量PD、PK、及びMABEL：同齡かつ同性のhFc RII B⁺ / - x mFc RII - / - マウスに、1、10、または100 mg/kgの単一用量の野生型6G11を注入し、静脈内及び腹腔内の投与経路の両方を10 mg/kg用量において検査した(図17A)。一連の血液試料を、注入直後から終了の最大168時間前に採取した。苦痛、体重減少、毒性、または病態のあらゆる徴候について、動物を期間全体にわたって検査した。hFc RII B⁺ / - B細胞の枯渇(PD)及び他のパラメータ(例えば、6G11 PK及びマウス抗ヒト抗体[MAHA])を、次のように精査した。

【0295】

50

反復投与免疫原性：図17Cに示されるように、同齡かつ同性のhFcRIIB⁺/x mFcRII^{-/-}マウス及びmFcRII^{-/-}対照マウスに、10日の期間にわたって10mg/kgの野生型6G11を複数回注射した（最初の静脈内投与、続いて3用量を腹腔内に送達した）。投薬前の血液試料を、フローサイトメトリによって循環性B細胞（CD19⁺VE及びB220⁺VE）について分析した。上記のように、動物を期間全体にわたって、かつ14日後に検査した。6G11（PK）及びMAHAの血清濃度を次のように決定した。

【0296】

6G11 PK分析：ECLイムノアッセイを使用して、マウス血清中の6G11濃度を決定した。ヒツジ抗hIgG（The Binding Site）またはヤギ抗h（AbD Serotec）（リツキシマブの存在下における）を96ウェルMSDプレート上にコーティングし、次いで0.45%の魚ゼラチンを使用してブロッキングした。その後、結合していない材料を洗い流しながら、ビオチン化抗6G11ポリクローナルヤギ血清及びStreptavidin-Sulfo Tag（Meso Scale Diagnostics、MSD）の添加によって6G11 mAbを検出した。トリポリアミンを含有するRead緩衝液T（MSD）を添加し、電圧を印加すると、6G11に関連したsTagは化学発光シグナルを生成した。6G11について作成された既知の標準曲線との比較によって、血清中のmAbレベルの数量化を行った。

10

【0297】

6G11 PKを、ソフトウェアアプリケーションPhoenix（商標）WinNonlin v.6.2（Pharsight Corp、米国カリフォルニア州マウンテンビュー）を使用し、ノンコンパートメントモデルを用いて評価した。Cmax、Tmax、AUC、CL（F）、Vz（F）、Vss、及びt1/2を含むPKパラメータ推定値を決定した。Cmax及びTmaxは、血清濃度-時間プロファイルから直接得た（表3）。

20

【0298】

インビトロの全血枯渇アッセイ

新鮮なヘパリン処置したヒト血液をCTL培地（Cell Technology Limited、ドイツ）内で5倍に希釈し、20µg/mlのRit及び/または野生型もしくはN297Q 6G11のいずれかと共に96ウェルプレート内に播種したか、あるいは無処置（NT）で24時間放置し、その後、細胞を採取し、フローサイトメトリのために抗ヒトCD3-PerCP-Cy5.5/FITC、CD19-PE、CD14-APC、及びCD66b-FITC mAbで染色して、それぞれ、T細胞、B細胞、単球、及び好中球を同定した。CD3⁺細胞に対する白血球サブセットの比を計算した。

30

【0299】

【表 3】

用量群		t 1 / 2 (日)	V _z (mL / k g)	V _{ss} (mL / k g)	CL (mL / 日 / k g)	AUC (日 * μ g / mL)	C _{max} (μ g / m L)	T _{max} (時 間)
10 mg / kg (静脈 内) N = 6	幾何平均		88. 8	82. 5	48. 5	206	201 000	0. 16 6
	標準偏差	0.6 07	14. 2	15. 1	36. 2	106	558 00	
	CV (%)		16. 0	18. 3	74. 6	51. 3	27. 8	
	調和平均	1.0 8						
	CV (%)	56. 0						
10 mg / kg (腹腔 内) N = 4	幾何平均		107		29. 0	344	117 000	3. 83
	標準偏差	0.6 5	7.5 2		6.1 0	72. 0	133 00	2. 50
	CV (%)		7.0 4		21. 0	20. 9	11. 4	6 5. 2
	調和平均	2.4 9						
	CV (%)	26. 0						
100 mg / kg (静 脈内) N = 6	幾何平均		53. 7	54. 6	12. 2	777 0	235 000 0	0. 22 4
	標準偏差	0.9 25	16. 0	16. 2	1.1 2	638	402 000	0. 34 0
	CV (%)		29. 7	29. 6	9.1 6	8.2 1	17. 2	15 2
	調和平均	3.0 9						
	CV (%)	29. 9						

10

20

30

40

【0300】

免疫原性アッセイ (MAHA) : 定性的及び半定量的 ECL イムノアッセイを使用して、マウス血清中で野生型 hIgG1 6G11 を対象とする MAHA の存在を検出した。ビオチン及び Sulfo - Tag 標識 6G11 を含むアッセイ緩衝液中で、試料を希釈した。インキュベーション後、事前ブロッキングされているストレプトアビジンプレートに試料を移した。トリポリアミンを含有する Read 緩衝液 T (MSD) を添加し、MSD に基づく技術を使用してシグナルを査定し、発光シグナルは試料中に存在する抗 6G11 のレベルに比例した。親和性精製したヤギ抗 6G11 血清を、陽性対照試料の調製に用いた。

50

【0301】

インビトロのサイトカイン放出アッセイ

Lymphoprep (Axis-Shield、ノルウェー国オスロ)の密度遠心分離法によって、PBMCを精製した。高密度(1.5 ml/ウェル)の24ウェルプレート内の血清非含有CTL培地(Cell Technology Limited、ドイツ)中で48時間、高密度培養^{2 8}(1×10^7 / ml)で細胞をプレインキュベートした。細胞をその後洗浄し、血清非含有CTL培地(1×10^6 / ml)内に再懸濁させ、0.02もしくは $1 \mu\text{g} / \text{ml}$ のOKT3で事前コーティングされた96ウェルプレートに播種した(100 μl / ウェル)か、または未処置(NT)で放置した。hFc RII B mAb (クローン6G11)またはアイソタイプを適合させた対照mAb (hIgG1)の野生型及びN297Q変異体を $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の濃度で添加し、細胞をさらに48時間インキュベートした。サイトカイン(IL-6、-10、IFN-、及びTNF-)を、製造業者の指示に従ってMSD V-Plexアッセイ(Meso Scale Discovery、米国ロックビル)によって処置したPBMC上清中で数量化した。

10

【0302】

免疫組織化学的検査(IHC)

ヒト及び他の動物組織のIHC染色を次のように行った。様々な供給源から器官を採取し、凍結させ、次いで、6G11及び7C07クローンでの免疫染色の前に切開した。過酸化水素ブロックを用いないTyramide Signal Amplification (TSA、PerkinElmer)増幅を使用して、組織反応性を検出した。いかなる非hFc RII B特異性結合をも同定するために、抗原陰性組織を含めた。

20

【0303】

統計分析

インビトロで実験群間の差異を比較するために、両側(two-tailed)t検定分析を行った。インビボで実験群間の生存の差異を査定するために、カプランマイヤー曲線を生成し、ログランク検定によって分析した。2つより多くの群を含むインビボ実験では、二元配置分散分析または一元配置分散分析を使用した。インビボでの客観的応答または完全応答の差異については、カイ二乗検定を使用した。統計分析は、GraphPad Prismソフトウェア(Windowsではバージョン5)を使用して行った。

30

【0304】

hFc RII B及びhCD20を発現するトランスジェニックマウスの作製

hFc RII B 2 導入遺伝子を、異なるエクソン及びイントロンの接合部を標的とするプライマーを使用した重複PCR反応によって、RajiゲノムDNA及びcDNAから構築した。この発現カセットは、hFc RII Bプロモーター^{2 2}エクソン1/2、イントロン2~3、及びエクソン3~7(2.4 kb)を含み、NotI部位及びXbaI部位を介してpcDNA3(Invitrogen)にまずクローン化され、ベクターのBGH poly A配列に連結された。このコンストラクト(poly A配列を含む)は3517 bpの長さであり、NotI部位及びSmaI部位を介してベクターpBC-SK(Stratagene)にさらにサブクローニングされた。コンストラクトの機能発現は、AT10-FITCを使用したフローサイトメトリによって、一過性にトランスフェクトされたIIA1.6細胞内で確認した。ベクター配列を欠く精製された発現カセットを、FVB/N接合体の雄性前核内に微量注入した。Tgマウスを、PCR(耳先から抽出されたゲノムDNAからのcDNA断片のエクソン3~7の増幅)、またはAT10-FITCを使用した末梢血のフローサイトメトリのいずれかによってスクリーニングした。得られたTg陽性ファウンダーを、10超の世代のC57BL/6またはBALB/cマウスに戻し交配した。対応するマウス受容体を欠くhFc RII B Tgマウスを、マウスFc RII B^{-/-}マウスと交雑させることにより生成した。得られたマウスを、次いでhCD20 Tgマウスと交雑させて、hCD20 x hFc RII B^{+/-} x mFc RII B^{-/-} 後代を作製した。

40

50

【0305】

表面プラズモン共鳴法

BIAcore T100分析機 (GE Healthcare、英国) を使用して、他で説明されているように hFc RIIB mAb の結合親和性を決定した²⁵。製造業者の指示に従って標準的なアミンカップリングを使用し、mAb を CM5 センサーチップ (GE Healthcare、英国) 上に固定化した。可溶性 hFc RIIB (0.16 ~ 100 nM; R&D Systems、英国) を 5 分間注入し、解離を 10 分間監視した。対照フローセルに対する背景結合を監視し、自動的に減算した。K_D 値は、BIAcore T100 評価ソフトウェアを使用し、1:1 結合モデルから計算した。

【0306】

インビボの免疫療法

皮下細胞株異種移植腫瘍モデル: SCID マウス (3 ~ 6 マウス / 群) に、成長因子を低減させた Matrigel Matrix (BD Biosciences、英国) 内の 5×10^6 個の Daudi 細胞または Raji 細胞を、0 日目に皮下注入し、その後、週に 1 回、7 日目、14 日目、21 日目、及び 28 日目に治療用 mAb で処置した。NOD.SCID マウスに、 10×10^6 個の Jeko-1 細胞を 0 日目に皮下注入した。腫瘍成長を監視し、腫瘍が 4×4 mm に達したとき、マウスをランダム化し、週に 2 回 10 mg / kg の治療用 mAb で処置した。キャリパーを使用して腫瘍成長を経時的に監視し、以下の等式を使用して腫瘍サイズを推定した:

$$[\text{重量} = (\text{長さ} \times \text{幅}^2) / 2]$$

【0307】

静脈内細胞株異種移植モデル: SCID マウス (6 / 群) に、 2.5×10^6 個の Raji 細胞 (BD Biosciences、英国) を、0 日目に静脈内注入し、その後、週に 1 回で最大 4 回、7 日目、14 日目、21 日目、及び 28 日目に治療用 mAb で処置した。麻痺のあらゆる徴候についてマウスを検査することによって、腫瘍成長を定期的に監視した。

【0308】

インビトロのサイトカイン放出アッセイ

新鮮な血液、または (血清非含有 CTL 培地内で) 5 倍に希釈したヘパリン処置血液を、96 ウェルプレート (U 底) 内で培養し、37 °C で 24 時間、 $10 \mu\text{g} / \text{ml}$ の mAb で処置し、その後、後続の分析のために上清を採取した。サイトカイン (IL-1、-2、-4、-6、-10、IFN- γ 、及び TNF- α) を、製造業者の指示に従って MSD V-Plex アッセイ (Meso Scale Discovery、米国ロックビル) によって、処置した全血または希釈血液の上清中で数量化した。

【0309】

蛍光顕微法

切開のための組織を、ドライアイスの土台上のイソペンタン中に置かれた OCT 培地 (RALamb、Thermo Shandon) 内で凍結させた。 $10 \mu\text{m}$ の凍結切片をアセトン中で固定し、5% の正常なヤギ血清でブロッキングし、hFc RIIB / CD32 に対する mAb (クローン AT10、インハウスで作製)、mFc RIIB / CD32 (クローン AT130-2、インハウスで作製²⁹) B 細胞 (ラット抗マウス CD45R / B220; BD Pharmingen、英国)、濾胞性樹状細胞 (ラット抗マウス FDC; BD Pharmingen、英国)、及びマクロファージ (ラット抗マウス F4 / 80; AbD Serotec、英国)、続いて DyLight 594 抱合ヤギ抗 hIgG (Abcam、英国ケンブリッジ)、及び AF488 抱合ヤギ抗ラット IgG (Life Technologies、英国) と共にインキュベートした。切片を Vectashield (Vector Laboratories、英国) 内に載置し、Plan Achromat 10x0.25 対物レンズを使用し、Cell B ソフトウェア下で動作する CC12 カラーカメラを備えた CKX41 倒立顕微鏡反射蛍光システム (全て Olympus、英国) を使用して、画像を収集した。RGB 画像ファイル (TIFF

10

20

30

40

50

)をAdobe Photoshop (CS6)に移し、赤/緑の画像オーバーレイをコントラスト拡張して、グレースケール全体を使用した。

【0310】

好中球染色プロトコル

血液試料または脾臓を、同齡かつ同性のC57BL/6マウス、mFc RII-/-マウス、及びmFc RII-/- x hFc RIIb+/ -マウスから採取した。脾臓を、100µmの細胞ストレーナー(BD)を通過させることによって均質化させ、次いで完全RPMI内で洗浄し、5mlのPBS中に再懸濁させ、1管当たり200µlの細胞懸濁液をフローサイトメトリに使用した。10µg/mlの抗マウスFc RII(AT130-2 F(ab')₂-FITC)、抗ヒトFc RII(AT10 F(ab')₂-FITC)、または無関係の対照(3G8 F(ab')₂-FITC)(全てインハウスで生成及び標識した)、加えて以下:抗マウスCD19(1D3-PE、インハウス)、抗マウスNK1.1(PK136-AlexaFluor 647)、抗マウスCD11b(M1/70-Pacific Blue)、抗マウスCD11c(N418-PE-Cy7)、抗マウスLy-6-G(1A8-APC-Cy7)、抗マウスLy-6C(HK1.4-PerCP-Cy5.5;別段の記載がない限り全てBioLegend)で、試料を染色した。細胞を4で30分間染色し、次いで1mlの赤血球溶解緩衝液を添加し(ABD Serotec、英国)、細胞を遠心分離し、次いで1回洗浄し、FACS Cantoで分析した。デブリ及びCD11c^{high}細胞を除外し、好中球はCD19⁻CD11b⁺NK1.1⁻Ly-6G⁺であった。

【0311】

結果

hFc RII BのFc結合ドメインに特異的なmAbの作製及び特徴付け。

I型CD20 mAbであるリツキシマブに対する抵抗性は、一部のリンパ腫患者では、部分的には腫瘍からのその内部移行によって説明され得ること、また、標的B細胞表面上の抑制性Fc RII B/CD32Bの発現がこのプロセスを促進することが、近年報告されている¹³、²³。この仮説と一致して、AT10とリツキシマブとのインビボの同時投与は、hCD20及びhFc RII Bが腫瘍上で同時発現される2つの異なるリンパ腫異種移植モデルにおいて相加/相乗的な抗腫瘍応答をもたらした(図7)。

【0312】

hFc RII Bの細胞外ドメインは、重要な賦活性Fc RであるhFc RII Aの細胞外ドメインと約98%相同性である(図8A)。これら2つの受容体は対立する機能を媒介するため、治療用抗体がhFc RII Bに対して高度に特異性であることが非常に重要である。AT10は、hFc RII AとhFc RII Bとの両方に同様の親和性で結合するため、この基準を満たさない¹⁹。さらに、これはマウス起源(IgG1)であり、その翻訳可能性は限定される。ヒトにおける治療可能性を有するhFc RII B特異性抗体を作製するために、本発明者ら専有のヒト抗体ファージディスプレイライブラリn-CoDeR(登録商標)を使用し³⁰、hFc RII Bへの結合に関して、またhFc RII Aへの結合に対してパニングして(またはその逆も同様である)、単一特異性試薬を作製した(図1)。結果として生じたmAbを、Fc RII Bに選択的に結合するそれらの能力(図1A)、及びhFc RII AではなくhFc RII Bに対する免疫複合体(IC)結合を遮断するそれらの能力(図1B)について査定した。個別のヒトPBMCサブセット(好中球、単球、B細胞、T細胞、及びNK細胞)、単離したB細胞(図1C及びD、図8B~D)、悪性ヒトB細胞株、またはTgマウス(hFc RII B⁺/ - x mFc RII⁻/ -、データは示されていない)からの脾細胞への結合に関するスクリーニングは、hFc RII BまたはhFc RII Aのいずれかに対する抗体の高い特異性を実証した。これらのmAbのhFc RII Bに対する相対的親和性をELISAによって決定し(表1)、サブセットを表面プラズモン共鳴法によって査定し、hFc RII Bへの結合に関して $2 \times 10^{-6} \sim 2 \times 10^{-8}$ Mの範囲内のKDが示された(図1E及び表2)。上記の所見に基づいて、14個の高度に特異的なh

FcRIIB mAbを同定し、検証した。各mAbに関する優秀な特異性は同定されていないが、これらは全てIC結合を遮断し、FcRIIAと交差反応せず、FcRIIAとBとで異なる高濃度の残基が発生するIgG結合溝周囲にこれらが結合することが強く示される(図7及び8)。

【0313】

【表1】hFcγRIIA及びhFcγRIIB mAbのEC50データ

クローン名称	EC50 FcγRIIA ^{+v} eCHO	EC50 FcγRIIB ^{+v} eCHO	EC50 FcγRIIA	EC50 FcγRIIB
アイソタイプ 対照	nb	nb	nb	nb
1A0 1	0.4	nm	0.2	
1B0 7	0.3	nb	0.3	
1C0 4	0.3	nb	1.5	
1E0 5	0.5	nb	0.7	
2A0 9	0.6	nb	0.6	
2B0 8	0.6	nm	2.0	
2E0 8	0.3	nm	1.3	
5C0 4	nm	0.4		0.8
5C0 5	nb	1.7		2.7
5D0 7	nm	0.4		0.6
5E1 2	nb	1.0		3.4
5G0 8	nb	0.7		0.7
5H0 6	nm	0.4		0.6
6A0 9	nm	1.4		3.7
6B0 1	nm	0.5		1.4
6C1 1	nb	0.5		2.3
6C1 2	nb	0.3		1.0
6D0	nm	0.3		0.9

10

20

30

40

1				
6G03	nb	0.4		0.9
6G08	nb	0.6		1.7
7C07	nm	0.3		0.3
4B02	nb	0.6		1.0
6G11	nm	0.3		0.4
6H08	nb	1.4		3.6

10

【0314】

【表2】 選択されたhFcγRIIB mAbクローンに関するBiacoreの親和性及び結合力データ

FcγRIIBクローン	K_A (1/MS)	K_D (1/s)	K_D (M)
7C07	9.13×10^5	0.01851	2.39×10^{-8}
6G11	6.9×10^6	0.1819	2.64×10^{-8}
5C04	3.24×10^5	0.04808	1.42×10^{-7}
6G08	4.72×10^5	0.3365	7.13×10^{-7}
5C05	801.6	0.001769	5.45×10^{-7}

20

30

【0315】

拮抗性hFcγRIIB mAbはリツキシマブの内部移行を遮断する

リツキシマブと一緒のhFcγRIIB⁺ B細胞のインキュベーションは、hFcγRIIBを介する抑制性シグナル伝達を誘発し、hFcγRIIB細胞質ITIMモチーフのリン酸化に関連する³¹⁻³³。本発明者らは、この受容体の免疫抑制機能に基づいて、CD20内部移行及びhFcγRIIB活性化/リン酸化の遮断の両方を防止することができるmAbが、治療学的関心の対象となるであろうと推測した。したがって、14個のhFcγRIIB特異性mAbを、非ホジキンリンパ腫Raji B細胞内のFcγRIIBリン酸化を制御するそれらの能力についてスクリーニングした。可変ドメイン依存性様式で抗体媒介性作用を査定するために、定常Fcドメインを介してFcγRに結合することができないN297Q変異を定常領域内に保有する抗体変異体を設計した(以下を参照のこと)³⁴。hFcγRIIB mAbを用いたRaji細胞の短期処置(30分間)は、2つの異なる応答、すなわち、hFcγRIIB ITIMの高レベルのリン酸化を誘発したmAb(例えば、クローン5C04及び6G08)、ならびに、クローン6G11及び7C07といった、作用をほとんどまたは全く及ぼさなかったmAbをもたらした(図2A)。同様の観察が、初代CLL細胞、扁桃、及び単球で見られた(図9B及び9C、データは示されていない)。これらのデータは、hFcγRIIBを活性化させることなくこの受容体に対する免疫複合体の結合を遮断することができるhFcγRIIB mAbが、成功裏に作製されたことを実証する。

40

【0316】

50

次に、hFc RII B mAbがhFc RII Bとリツキシマブとの間の相互作用を遮断し、かつ結果として生じるリツキシマブの内部移行を防止することができるかどうかを精査した。6G08などの一部のmAbは作動性のままであり、受容体のリン酸化を刺激した。対照的に、ここで拮抗性と称される2つのmAb(6G11及び7C07)は、AT10によく似て、Raji細胞及び初代CLL細胞上にリツキシマブが結合した後誘発されるFc RII Bのリン酸化をほぼ完全に防止することができた(図2B、データは示されていない)^{3 2}。フローサイトメトリ消光アッセイ^{2 3}を使用して、同じmAbがhFc RII BトランスフェクトRamos細胞の表面からのリツキシマブの内部移行を効率的に遮断することができたと決定した(図2C)。注目すべきことに、これらのmAbの存在下における内部移行の欠如は、II型mAb、トシツモマブ、及びhFc RII Bを欠くRamos細胞で見られるものと同様であった(図2C)。野生型及びN297Q変異体の両方がこのアッセイにおいて同等の活性を有し、抗体可変ドメイン(Fv)依存性作用(図9)が示され、拮抗性作用が野生型hIgG1フォーマット内で保持されたことが実証された。後続の分析は、リツキシマブ内部移行を遮断するmAbパネルの能力が、hFc RII Bに対するそれらの相対的親和性に直接関連することを明らかにし($R^2 = 0.78$)(図2D)、これは、リツキシマブ刺激後のhFc RII Bのリン酸化を遮断するそれらの相対階級的な能力と相関した($R^2 = 0.79$)(図2E)。このように、高親和性拮抗性hFc RII B mAbは、標的細胞表面からのリツキシマブのhFc RII B媒介性除去を防止した。

10

20

30

40

50

【0317】

拮抗性hFc RII B mAbは、Fc:Fc R依存性細胞傷害を誘発し、リツキシマブの内部移行を遮断し、それにより強力なインビトロの抗腫瘍活性を誘起する

一部のmAbの拮抗性作用が、賦活性Fc R発現免疫細胞と生産的に結合する野生型hIgG1フォーマット内で保持されたという所見は、これらのmAbが内因性Fc:Fc R依存性抗腫瘍活性を有し得ることを示唆した。したがって、そのような作用について本発明者らのhFc RII B mAbをスクリーニングした。初代NK細胞と一緒にオプソニン化標的Raji細胞のインキュベーションは、拮抗性mAb 7C07及び6G11が、リツキシマブ自体から誘起されるものよりも高い、最も高い細胞傷害活性も有したことを実証した(図10A及びB)。これら2つのクローンが、リツキシマブ内部移行の遮断及びADCCの誘起において最も高い親和性、最も強力な活性を有したことを証明したので、次に、Fc Rを発現することが知られるヒト及び動物組織のパネルに対するそれらの結合性を査定した。クローン7C07及び6G11の両方が、ヒト脾臓及び扁桃内のリンパ球を特異的に染色した(図3A、データは示されていない)。7C07と6G11のいずれも、カニクイザル、ラット、ウサギ、またはマウスにおけるリンパ球と反応せず、これらのmAbが他の種におけるFc RII Bと交差反応性でないことが示された(図3A、データは示されていない)。しかしながら、6G11ではなくクローン7C07は、ヒト及び他の種からの脾臓の類洞及びリンパ節組織を同様に染色し、望まれない交差反応性が示された(図3A及び図11A)。野生型及びN297Q mAbは同等に染色することが示され(図11B)、他のヒト組織上でさらなる予期しない交差反応性は観察されなかった(図11C)。この反応性プロファイルに基づいて、クローン6G11を本発明者らの有力臨床候補として選択した。

【0318】

初代患者CLL試料の広範なパネルを使用して、6G11の内因性細胞傷害活性をADCC、PCD、及びADCPアッセイにおいてさらに調査した。リツキシマブで観察されたレベルよりも著しく高いレベルの実質的な活性が、各アッセイにおいて実証された(図3B~D)。さらに、hFc RII I Aの高親和性変異体または低親和性変異体のいずれか(それぞれ158 VまたはF)を発現するNK細胞エフェクターを用いたアッセイにおいて、6G11は、細胞死の誘発においてリツキシマブと比較してより有効であった(図3E)。

【0319】

その後、CLL細胞の表面からのリツキシマブの内部移行を防止する6G11の能力を検査した。6G11（それ自体は内因性Fc依存性エフェクター活性を欠く；図12）の野生型及びN297Q変異体の両方が、リツキシマブの内部移行を著しく防止することができた（図3F）。興味深いことに、CD20とは異なり、また以前に報告されているように¹⁷、野生型またはN297Q hIgG1 mAbのいずれか（6G11またはAT10）によるCLL細胞の表面上のhFc RIIbの結合は、直接的または間接的に査定されたときに、高レベルのhFc RIIb内部移行をもたらさなかった（図3Gならびに図13A及びB）。

【0320】

6G11がリツキシマブの内部移行を防止することによってその細胞傷害活性を増進することもできるかどうかに取り組むために、リツキシマブを含む初代CLL細胞と6G11のN297Q変異体とを共インキュベート（co-incubate）し、MDM ADCP及びNK細胞ADCCを査定した。際立ったことに、N297Q 6G11は、リツキシマブ単独と比較して、リツキシマブオプソニン化CLL細胞を貪食するMDMの能力を実質的に促進することが示された（図3H及びI）。活性の同様の上昇が、NK細胞を用いたADCCアッセイで見られた（図3J）。NK細胞はFc RIIbを発現せず、hFc RIIb mAbにより誘起されるあらゆる増補が、リツキシマブ内部移行の抑制に起因する標的細胞に対する作用から生じることを裏付ける。これらのデータは、B細胞標的の表面上のhFc RIIbの遮断が、mAb:Ag:hFc RIIb複合体の内部移行を抑制し、エフェクター細胞による欠失の標的となるそれらの能力を増補することを裏付ける。

10

20

【0321】

まとめてみると、これらの観察は、6G11が、内因性細胞傷害活性と、細胞表面からのその除去の防止によるリツキシマブ活性の増強との二重機構によって抗腫瘍活性を誘起することができることを示唆した。

【0322】

6G11は、免疫適格性のhCD20⁺ hFc RIIb⁺ Tgマウスにおいて内因性B細胞枯渇活性を有し、リツキシマブを用いた枯渇を増強する

上で考察されたように、hFc RIIbは、標的B細胞上（ここでそれは、細胞表面からのリツキシマブの望ましくない除去を媒介する）、及びマクロファージなどの重要な免疫エフェクター細胞上（ここでそれは、抗癌抗体応答を弱めるように機能する）の両方で発現される^{5-7, 35}。hFc RIIbを全身的に標的とすることが関連性のあるhFc RIIb発現細胞型に及ぼす影響を理解するために、hFc RIIbプロモーターの制御下でhFc RIIb遺伝子を発現するマウスを作製した（図14A及びB）。TgマウスにおけるhFc RIIbの発現及び分配は、mFc RIIとは異なり、好中球上ではなくBリンパ球、BMDC、及び単球上で強力に発現される、ヒト組織におけるものに酷似する（図14C~F、示されていない）。さらに、同等の発現がmFc RII^{-/-}背景内で維持され、内在性マウス抑制性Fc Rからの合併症の非存在下でhFc RIIbの作用を研究することが可能であった。重要なことに、6G11の拮抗性活性がこれらのマウスにおいて保持された（図14（5/5））。加えて、内皮細胞上のhFc RIIb発現は、野生型マウスにおける発現よりも低く、ヒトにおける発現により類似した（図14（5/5））。

30

40

【0323】

インビボの6G11処置の安全性を確認するため、hFc RIIb^{+/+} x mFc RII^{-/-}マウスのコホートを1、10、または100mg/kgの6G11で処置する用量漸増研究を行った（図18）。処置されたマウスのいずれも、急性作用、苦痛、または体重減少などの有害事象を被らなかった（図18）。7日目の組織検査は、器官（腎臓、脳、脾臓、肝臓、肺）内のいかなる全毒性も示さなかった。hFc RIIb⁺ B細胞の実質的枯渇が、10及び100mg/kg群において同等の活性と共に、1mg/kg超の用量において血液（図6A）及び脾臓（図6B）の両方で観察された。6G11は

50

、マウスの血清中で容易に検出されるが本質的に免疫原性である完全ヒトmAbであり、そのため、その半減期及びマウス抗ヒト抗体(MAHA)応答の根拠を同時に査定した。1mg/kg超の用量において、PKプロファイルに影響する標的媒介性クリアランスが克服され、10及び100mg/kg群における標的結合の作用はほとんどまたは全くなかった(図6C)。しかしながら、7日以内に、急速なmAbクリアランスをもたらす著しいMAHAが観察された(図6D)。著しいMAHAの出現前の時間点に基づいて、mAb半減期は、10及び100mg/kg用量については2~4日間の領域内であると推定する(図6C、D、及び表7)。

【0324】

6G11が臨床的に送達され得る方法をより良好に模倣するために、反復投薬研究も行った。24日の期間全体にわたって4回それを投与し(図18)、前述同様にマウスを検査した。循環B細胞の枯渇がhFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/において観察されたが、複数用量(10mg/kg)の6G11を注入したmFcRII⁻/対照群では観察されなかった(図6E)。同様に、マウスは体重減少(図18)または有害事象を被らず、全毒性の徴候は観察されなかった(データは示されていない)。前述同様に、実質的なMAHA応答がhFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/マウスにおいて1週間以内に観察され、血清からの6G11の急速な枯渇に寄与した(図6F)。対照的に、MAHAはmFcRII⁻/対照群では検出されず、異種mAb及び表面抗原への共依存がMAHA誘発に必要とされることが示された(図6F)。

【0325】

B細胞以外のhFcRIIB⁺細胞が6G11処置後に検出され得るかどうかを調査するために、ヒト血液を用いた全血枯渇アッセイ(図6(2/2))及びhFcRIIB⁺Tgマウスを用いたインビボ実験(図S4N)を行った。単球または好中球ではなくB細胞が、N297Q 6G11ではなく野生型6G11 IgG1によって欠失された。単球及び好中球の枯渇の同様の欠如が、リツキシマブとの組み合わせで見られた(図6(2/2))。次に、高密度培養(Romer et al., 2011)によって刺激に感応性にされたヒト末梢血単核細胞(PBMC)に対する6G11の潜在的影響を査定するための、かつCRSを誘起するものとして以前に強調されたいくつかのmAb特異性(CD3、CD28、またはCD52)の付加後に実質的なレベルのIFN-、TNF-、及び/またはIL-8を検出することができる、近年開発されたインビトロのサイトカイン放出症候群(CRS)アッセイ(CRA)(Hussain et al., 2015)を使用した。48時間にわたる野生型またはN297Q 6G11の適用は、500倍低い用量のCD3 mAbを用いた場合とは異なり、実質的なサイトカイン放出をもたらさなかった(図6)。全血または希釈血液CRAを使用して同様の結果を得た(図19)。

【0326】

集合的に、これらのデータは、有害作用を示さず、治療上関連性のある6G11 mAbに関するPKプロファイルを示し、有効性研究を支持した。

【0327】

6G11は、免疫適格性マウスにおいて内因性活性を有し、リツキシマブを用いた枯渇を増強する

標的hFcRIIB単独またはリツキシマブとの組み合わせの枯渇可能性を、hIgG1 6G11及びmIgG1 AT10の両方を使用して査定した。まず、CFSE⁺ hFcRIIB⁺/x mFcRII⁻/脾細胞野生型受容者に注入し、その結果、6G11(図4A及びB)またはAT10(図15A)で処置した短期養子移入アッセイ^{2,3}では、移植細胞は、血液循環及び脾臓から効率的に枯渇されたことが観察された。興味深いことに、1µgと低いmAbの投与は、約50%のB細胞枯渇を誘起するのに十分であった。F(ab')₂断片及びN297Q変異体で活性が失われ、またhFcRIIB⁺標的が賦活性FcRを欠く鎖マウスにおいて欠失しなかったため、枯渇は全面的にFc:賦活性FcR相互作用に依存した(図4A及びBならびに

10

20

30

40

50

図15A)。これらのデータは、以前に示されているように、拮抗性hFcRIIB mAbが、免疫エフェクター細胞上の賦活性FcRとの相互作用に依存して、標的細胞をインビボで欠失させることができることを裏付ける³⁶。

【0328】

本発明者らの分析をリツキシマブを用いた併用療法に広げるため、交雑によりhCD20⁺/hFcRIIB⁺マウスを作製した。リツキシマブと6G11(またはAT10)との組み合わせは、標的を野生型受容者に移植する短期アッセイにおけるいずれのmAb単独と比較しても、hCD20⁺/hFcRIIB⁺マウスよりも高い枯渴をもたらした(それぞれ図4C及び図15B)。同様に、養子移入hCD20⁺/hFcRIIB⁺マウス(エフェクター細胞上でもhFcRIIBを発現する)においてリツキシマブを6G11と組み合わせることによってより著しく枯渴された(図4D)。

10

【0329】

次に、この組み合わせが循環性B細胞に及ぼす作用を、hCD20⁺/hFcRIIB⁺マウスモデルにおいて精査した。前述同様に、この組み合わせは、単独療法と比較して著しく高い循環B細胞の枯渴をもたらした(図4Eならびに図15C及びD)、hFcRIIBが標的及びエフェクター細胞の両方で発現される完全に同系のシステムにおいて、この能力を初めて実証した。リツキシマブと野生型hIgG1-6G11(またはAT10)とを組み合わせることの作用は、2倍高い用量で単独で適用された個別のmAbについて観察された応答から判断して、相加活性に関して予想されたものよりも高かった(それぞれ図4(2/2)及び15)。

20

【0330】

6G11の内因性(B細胞枯渴)作用と外因性(リツキシマブ後押し)作用とのどちらがこの活性に関してより重要であったかを査定するために、N297Q-6G11をhCD20⁺/hFcRIIB⁺マウスにおいて使用し、N297Q-6G11単独は欠失において不活性であるが、B細胞のリツキシマブ欠失を著しく後押しすることを示す(図4(2/2))。同様の結果がmIgG1-6G11で見られた。AT10(図15)で予想かつ観察されたように、mIgG1-6G11は、hCD20⁺/hFcRIIB⁺マウスにおいて乏しい単剤枯渴活性を示したが(Hamaguchi et al., 2006)、N297Q-hIgG1-6G11と同様に、マウスIgG2aバージョンのリツキシマブを、B細胞を枯渴させるその能力において著しく後押しした(図15)。さらに、そのマウスFcRのために、それはMAHAによって能動的に清掃されず、併用療法のより長期の査定が容易になる。これらのデータは、リツキシマブのインビボの枯渴活性を増進するためにhFcRIIB機能を拮抗することの長期の有益作用を示す。

30

【0331】

まとめると、これらの研究は、内部移行の防止によるリツキシマブ抗腫瘍活性の増強と関連した内因性抗腫瘍機能を伴う、6G11のインビボの二重作用機構を裏付けた。

40

【0332】

6G11は、インビボでB細胞のII型hCD20 mAb媒介性枯渴を増進する。6G11がII型hCD20 mAb(これは、I型CD20 mAbと同じ程度まで内部移行せず^{13, 23, 33}、CLLにおける使用に近年認可された)との組み合わせにおいても効果的であったかどうかを精査するために、養子移入モデルにおける実験を行った。リツキシマブについては、GA101_{gly}(グリコシル化オビヌツズマブ)及び6G11単独療法の両方が、脾性及び循環性の標的CFSE⁺ hCD20⁺/hFcRIIB⁺ B細胞の中程度の枯渴をもたらしたが、一方で、併用療法は、野生型及びhFcRIIB⁺マウスにおける脾性及び循環性の標的細胞の両方の枯渴を著しく増進した(図4F及びG、データは示されていない)。これらのデータは、6G11が、直接B細胞を標的とする他の

50

m A b と組み合わせても効果的であることを示唆する。

【 0 3 3 3 】

6 G 1 1 は、インビボの初代 C L L 細胞のリツキシマブ媒介性枯渴を後押しし、客観的及び完全な抗腫瘍応答を向上させる

リツキシマブは、いくつかの B 細胞悪性腫瘍の処置を改善するために成功裏に用いられてきたが、C L L の制御における活性は限定されている。血液中の初期の末梢性枯渴にもかかわらず、二次リンパ組織及びいわゆる増殖中心からの効果的な腫瘍減量はそれほど成功しない。したがって、C L L 細胞に対する 6 G 1 1 の抗腫瘍活性をより良好に査定するために、初代ヒト C L L 細胞が二次リンパ器官（脾臓及び骨髄）に帰巢し、支持性のヒト T 細胞と並んでクラスター状に増殖し、それによりヒト疾患における状況を綿密に模倣する、動物モデルを開発した（図 5 A 及び B）。このモデルにおいて、リツキシマブは腹腔内に存在する C L L 細胞を枯渴させるのに効果的であるが、脾臓内に存在する増殖中心内の C L L 細胞を枯渴させるのには完全に効果的ではない（図 1 6）。

10

【 0 3 3 4 】

初代 C L L 細胞を移植したマウスをリツキシマブまたは 6 G 1 1 単独のいずれかで処置したとき、アイソタイプ対照 m A b で処置した動物と比較して、腫瘍体積の著しい低減が脾臓内で見られた（図 5 C）。リツキシマブと 6 G 1 1 との組み合わせでの処置は、さらにより高い枯渴速度をもたらした（図 5 C）。さらに、これらのデータを応答速度の基準に従って査定したとき、コンビナトリアル療法後の部分的レスポナー及び完全レスポナーの数は、アイソタイプ対照処置マウスまたは単独療法よりも著しく高かった（それぞれ図 5 D 及び 5 E）。

20

【 0 3 3 5 】

さらに、併用療法後の客観的レスポナー（O R、脾臓内の C L L 細胞の 7 5 % 超の低減として定義される）及び完全レスポナー（C R、脾臓内の C L L 細胞が 0 . 1 % 未満として定義される）の数は、アイソタイプ対照処置マウスまたは単独療法よりも著しく高かった（図 5 及び 5（2 / 2）、ならびに表 5）。これらのデータは、インビボの初代 C L L 細胞に対するリツキシマブ / 6 G 1 1 併用療法の上昇した有効性を実証する。

【 0 3 3 6 】

次いで、リツキシマブ、オフアツムマブ（h C D 2 0 m A b）、及び / またはアレムツズマブ（h C D 5 2 m A b）不応性患者から単離した C L L 細胞を移植したマウスを処置する、6 G 1 1 の能力を検査した（表 4）。この異種移植マウスは、単独療法としての 6 G 1 1 もしくはリツキシマブ、または組み合わせた 2 つの m A b のいずれかで処置した。予想通り、リツキシマブ単独での処置は非効率であり（図 5 及び 5（2 / 2）ならびに表 8）、マウスの 9 5 % 超が O R をもたらせなかった。対照的に、6 G 1 1 単独は、著しい C L L 細胞の枯渴を示したが、O R を向上させなかった（図 5 及び 5（2 / 2）ならびに表 5）。しかしながら、注目すべきことに、リツキシマブと 6 G 1 1 との同時投与は、2 5 % 超の O R（表 5）と共に強力な枯渴（図 5 及び 5（2 / 2）、ならびに表 8）をもたらした。これらのデータは、6 G 1 1 が、レスポナー患者におけるリツキシマブの活性を後押しすることに加えて、処置不応性 C L L 細胞に対して活性であり得ることを示唆する。

30

40

【 0 3 3 7 】

リツキシマブ及び 6 G 1 1 を用いた併用療法はインビボの難治性 C L L 細胞を克服するその後、リツキシマブの存在下または非存在下で、リツキシマブ及び / またはアレムツズマブ（h C D 5 2 m A b）不応性患者から単離した C L L 細胞を移植したマウスを処置する、6 G 1 1 の能力を検査した（表 4）。予想通り、リツキシマブ単独での細胞の枯渴は不十分であったが、これは 6 G 1 1 の存在下で著しく向上した（図 5 F）。さらに、併用療法を受けたより多くの難治性 C L L 細胞移植マウスが、この組み合わせとの部分的応答を達成した（図 5 G）。これらのデータは、6 G 1 1 がリツキシマブ感応性患者群及び不応性患者群の両方でリツキシマブの有効性を後押しすることができるという奨励を提供する。

50

【 0 3 3 8 】

【表4】リツキシマブ不応性と臨床的に定義された患者の患者情報、以前の処置、及び応答に関する情報。これはインビゴモデルにおける相対的応答と比較したものであり、アイソタイプ対照処置マウスの脾臓内のCLL細胞の数は100%+SDに設定されている。

以前の処置	追加情報	インビゴ処置に対する相対的応答 (%)				
		対照	R i t	6 G 1 1	R i t + 6 G 1 1	
1年目：FC×2－応答なし 3年目：FC+アレムツズマブ×3、続いてBR－応答なし 5年目：DHAP×1－応答なし 6～7年目：照射法	－女性 －44歳 －試料採取の7年前に診断 －試料採取時のWBC 234	100 ±15	92± 21	78 ±1 8	73±1 4	10
2年目：FCR×3で初期応答を示し、7ヶ月以内に進行 3年目：BR－処置中に進行 3年目：オフアツムマブ－応答なし 3年目：罹患	－女性 －71歳 －試料採取の3年前に診断 －13q及びモノソミー12 －試料採取時のWBC 50 －BRとオフアツムマブ処置との間に試料取得	100 ±21	100 ±28	98 ±3 1	79±1 8	20
1～2年目：クロラムブシル (K l o r a m b u c i l) 3年目：F+アレムツズマブ－応答あり、しかし約1年以内に進行。 5年目：FCR×2－応答あり、しかし約1年以内に進行 7年目：BR×4－応答あり、しかし7ヶ月以内に進行 8年目：BR－部分的応答 9年目：罹患	－女性 －66歳 －試料採取の8年前に診断 －FISH正常 (13q、11q、17p、+12) －試料採取時のWBC 359 (2013年9月) －8年目の最後のBR処置前に試料取得	100 ±36	74± 35	52 ±1 6	31±1 0	30
2年目：ステロイドパルス+アレムツズマブ－部分的だが短い寛解 3年目：オフアツムマブ－弱い初期応答 3ヶ月以内に進行 4年目：罹患	－男性 －70歳 －試料採取の3年前に診断 －50% Chr 12トリソミー －試料採取時のWBC 77 －オフアツムマブ処置後の進行中の試料	100 ±38	88± 56	73 ±4 9	55±2 6	40

【0339】

リツキシマブ及び6G11を用いた併用療法は初代MCL細胞に対してインビボの活性を有する

他の型の悪性B細胞を標的とする6G11の能力を評価するために、Jeko MCL細胞または新鮮に単離した初代MCL細胞(それぞれ図17A及びB)を移植した免疫不全マウスモデルを使用した。マウスにJeko MCL細胞を移植したとき、6G11またはリツキシマブのいずれかを用いた単独療法は長期生存をもたらさなかったが、一方で、この組み合わせは、マウスの約30%を100日まで治癒するのに効果的であった。同様に、初代CLL細胞と同じく、初代MCL細胞は併用療法に好ましく応答した(図17B)。

10

【0340】

6G11は良好に耐受され、インビボで治療上関連性のある薬物動態を有し、インビトロでサイトカイン急増をもたらさない

次に、6G11 mAb処置の安全性を確認するため、hFc RII B⁺/x mFc RII⁻/マウスのコホートを1、10、または100mg/kgの6G11の単回注射で処置する用量漸増研究を行い、静脈内及び腹腔内の投与経路の両方を10mg/kg用量において検査した(図18A)。処置されたマウスのいずれも、急性作用、苦痛、または体重減少などの有害事象を被らなかった(図17B)。7日目の組織検査は、器官(腎臓、脳、脾臓、肝臓、肺)内のいかなる全毒性も示さなかった(データは示されていない)。hFc RII B⁺/B細胞の枯渇が、10及び100mg/kg群において同等の活性と共に、1mg/kg超の用量において血液(図6A)及び脾臓(図6B)の両方で観察され、有効性が示された。6G11は、マウスの血清中で容易に検出されるが本質的に免疫原性である完全ヒトmAbであり、そのため、その半減期及びマウス抗ヒト抗体(MAHA)応答の根拠を同時に査定した(図6C及びD)。これらのデータは、1mg/kg超の用量において、PKプロファイルに影響する標的媒介性クリアランスが克服され、10及び100mg/kg群に見られる標的結合の作用はほとんどまたは全くなかったことを示す。しかしながら、7日以内に、mAbの急速なクリアランスをもたらす著しいMAHAが観察された(10mg/kgの静脈内群において4日目から7日目に4桁増加、図6D)。投与後の著しいMAHA出現前の最初の4日に基づいて、抗体の半減期は、10及び100mg/kg用量については2~4日間の領域内であると推定する(図6C及びDならびに表3)。

20

30

【0341】

6G11が臨床的に送達され得る方法をより良好に模倣するために、反復投薬研究も行い、10日の期間にわたってそれを投与し(初期静脈内投与、続いて3用量を腹腔内に送達した;図17C)、苦痛、体重減少、毒性、または病態のあらゆる徴候について、動物を期間全体にわたって、また14日後(mAb受容から合計24日)に検査した。前述同様に、循環B細胞の枯渇がhFc RII B⁺/x mFc RII⁻/において観察されたが、複数(10mg/kg)用量の6G11を注入したmFc RII⁻/対照群では観察されなかった(図6E)。同様に、マウスは体重減少を被らず(図17B)、有害事象を被った様子はなく、全毒性の徴候は観察されなかった(図17D、データは示されていない)。前述同様に、実質的なMAHA応答がhFc RII B⁺/x mFc RII⁻/マウスにおいて1週間以内に観察され、血清からの6G11の急速な枯渇に寄与した(図6F)。興味深いことに、MAHAはmFc RII⁻/対照群では検出されず、表面抗原の存在がMAHA誘発に必要とされることが示された(図6F)。

40

【0342】

最後に、近年開発されたインビトロのサイトカイン放出症候群(CRS)アッセイを使用して、高密度培養^{2,8}によって刺激に感応性にされたヒトPBMCに対する6G11の潜在的影響を査定した。このアッセイ系は、CRSを誘起するものとして以前に強調されたいくつかのmAb特異性(CD3、CD28、またはCD52)の付加後に実質的なレベルのIFN- γ 、TNF- α 、及び/またはIL-8を検出することができる(図6F)

50

及び準備中の論文)。このアッセイにおいて48時間にわたる野生型またはN297Q 6G11の適用は、500倍低い用量のCD3 mAbを用いた場合とは異なり、実質的なサイトカイン放出をもたらさなかった(図6G)。全血サイトカインアッセイを使用して同様の結果が得られ(図18)、これらはまとめて、ヒトにおける精査に先立って6G11の良好な安全性プロファイルを示す。

【0343】

6G11は、インビボで臨床的関連性のある他の抗体の治療活性を増進する

近年の観察は、Fc RIIIB依存性内部移行が、リツキシマブ以外のいくつかの臨床的関連性のある抗体に対する抵抗性の根底にあり得ることを示す(Vaughan et al., 2014)、(Pallasch et al., 2014)。したがって、6G11を、近年認可されたhCD20 mAbであるオビヌツズマブ(GA101)、及び臨床的に十分に検証されているhCD52特異性mAbであるアレムツズマブと組み合わせることを検査した。hCD20に対するオビヌツズマブの特異性により、同系のマウスモデルにおける作用を研究することが可能となった。GA101及び6G11単独療法の方が、脾細胞及び循環B細胞の中程度の枯渇をもたらしたが、一方で、この組み合わせは、野生型(図5(2/2)及びhFc RIIIB⁺/x mFc RII⁻/マウスにおける枯渇を著しく増進した(図6F及びS6G)。6G11をGA101と組み合わせると、CLL患者異種移植マウスモデルにおける脾臓腫瘍細胞の枯渇が著しく向上した(図5(2/2)ならびに表5及び8)。hCD52に対するアレムツズマブの特異性は同系のhCD20モデルにおける研究の妨げとなったが、CLLマウスモデルにおいて6G11とアレムツズマブとを組み合わせると治療活性が著しく向上し、併用処置マウスの90%超がCRを顕した(図5(2/2)ならびに表5及び8)。

10

20

【0344】

これらのデータは、6G11が複数の標的に対するmAb薬抵抗性を克服し得ることの根拠を提供する。

【表5】初代CLL患者異種移植におけるmAb b処置に対する応答

治療用mAb (試験料)	処置				アインタイプ対照の% (n/N)				6G11 (hFcγRIIB) の% (n/N)				治療用mAb+6G11の% (n/N)			
	NR	OR	CR	CR	NR	OR	CR	CR	NR	OR	CR	CR	NR	OR	CR	CR
リツキシマブ (全体集団 (all-comers))	94 (61/65)	4.5 (3/65)	1.5 (1/65)	58 (37/64)	30 ^a (19/64)	12 ^b (8/64)	52 (35/67)	33 ^c (22/67)	15 ^d (10/67)	26 (17/66)	42 ^{e,f} (28/66)	32 ^{g,h} (21/66)				
リツキシマブ (難治性)	100 (21/21)	0	0	95.5 (21/22)	4.5 (1/22)	0	95.5 (21/22)	4.5 (1/22)	0	74 (14/19)	26 (5/19)	0				
GA101 (全体集団)	100 (20/20)	0	0	30 (6/20)	70 ^a (14/20)	0	50 (10/20)	50 ^b (10/20)	0	20 (4/20)	75 (15/20)	5 (1/20)				
GA101 (抵抗性)	80 (4/5)	20 (1/5)	0	80 (4/5)	20 (1/5)	0	100 (5/5)	0	0	40 (2/5)	60 (3/5)	0				
アレムツズマブ (全体集団)	100 (15/15)	0	0	0	47 ^b (7/15)	53 ^c (8/15)	7 (1/14)	93 ^d (13/14)	0	0	7 (1/15)	93 ^{e,f} (14/15)				

全体集団：事前の抵抗性の徴候がない初代CLL試験、抵抗性：リツキシマブ抵抗性を事前に示した初代CLL試験、NR：非レスポonder (CLL細胞枯渇なし)、OR：客観的レスポonder (CLL細胞の $\geq 75\%$ の低減)、CR：完全レスポonder ($\leq 0.1\%$ のCLL細胞)。

^a p ≤ 0.001 対アインタイプ対照。
^b p ≤ 0.05 対アインタイプ対照。
^c p ≤ 0.01 対アインタイプ対照。
^d p ≤ 0.001 対治療用mAb。
^e p ≤ 0.05 対治療用mAb。
^f p ≤ 0.01 対治療用mAb。

10

20

30

40

【表6】 図1に関連する。ELISA及び/またはSPRによって査定されたhFcγR

クローン 名称	EC50 FcγRI IA+CH O	EC50 FcγR IIB+C HO	EC50 Fcγ RIIA	EC50 Fcγ RIIB	K_A (1 /MS)	K_D (1 /s)	K_D (M)
アイ ソタ イブ 対照	nb ^a	Nb	nb	nb			
1A 01	0.4	Nm	0.2				
1B 07	0.3	Nb	0.3				
1C 04	0.3	Nb	1.5				
1E 05	0.5	Nb	0.7				
2A 09	0.6	Nb	0.6				
2B 08	0.6	Nm	2.0				
2E 08	0.3	Nm	1.3				
5C 04	nm ^b	0.4		0.8	3.24×10^5	0.04 808	1.42×10^{-7}
5C 05	nb	1.7		2.7	80 1.6	0.00 1769	5.45×10^{-7}
5D 07	nm	0.4		0.6			
5E 12	nb	1.0		3.4			
5G 08	nb	0.7		0.7	4.72×10^5	0.33 65	7.13×10^{-7}
5H 06	nm	0.4		0.6			
6A 09	nm	1.4		3.7			
6B 01	nm	0.5		1.4			
6C 11	nb	0.5		2.3			
6C 12	nb	0.3		1.0			

IIA及びhFcγRIIB mAbの親和性測定値。

10

20

30

40

6D 01	nm	0.3		0.9			
6G 03	nb	0.4		0.9			
6G 08	nb	0.6		1.7			
7C 07	nm	0.3		0.3	9.13×10^5	0.01851	2.39×10^{-8}
4B 02	nb	0.6		1.0			
6G 11	nm	0.3		0.4	6.9×10^6	0.1819	2.64×10^{-8}
6H 08	nb	1.4		3.6			

^a nb : 結合なし。

^b nm : 測定せず。

【表7】 図14に関連する。hFcγRIIB^{+/-}×mFcγRII^{-/-}マウスにおける野生型6G11 mAbの薬物動態 (PK) パラメータ推定値。

用量群		t _{1/2} (日) ^a	V _z (ml/k g) ^b	V _s (ml/k g) ^c	CL (ml/k g) ^d	AUC (日*μg/ml) ^e	C _{max} (μg/ml) ^f	T _{max} (時間) ^g
10mg/kg (静脈内) n=6	幾何平均		88.8	82.5	48.5	206	201000	0.166
	標準偏差	0.607	14.2	15.1	36.2	106	55800	
	CV (%)		16.0	18.3	74.6	51.3	27.8	
	調和平均	1.08						
	CV (%)	56.0						
10mg/kg (腹腔内) n=4	幾何平均		107		29.0	344	117000	3.83
	標準偏差	0.65	7.52		6.10	72.0	13300	2.50
	CV (%)		7.04		21.0	20.9	11.4	65.2
	調和平均	2.49						
	CV (%)	26.0						
100mg/kg (静脈内) n=6	幾何平均		53.7	54.6	12.2	7770	2350000	0.224
	標準偏差	0.925	16.0	16.2	1.12	638	402000	0.340
	CV (%)		29.7	29.6	9.16	8.21	17.2	152
	調和平均	3.09						
	CV (%)	29.9						

10

20

30

40

- ^a mAb 半減期。
- ^b 終末期に関連する分布容積。
- ^c 定常状態における分布容積（定常状態、すなわち、ある特定の数の投与の終わりに得られる平衡状態）。
- ^d クリアランス；単位時間毎に清掃される（すなわち、もはや関係する薬のいずれも含有していない）血漿量。
- ^e 曲線下面積；定限時の間隔に対する薬の血漿中濃度の積分に対応する。
- ^f 投与後の薬のピーク血漿中濃度。
- ^g C_{max} に達するのにかかる時間。

【表8】 図5及び5（2/2）に関連する。インビゴ患者由来異種移植モデルにおける異なるmAb処置の比較のために並べ替え統計検定を使用して分析した詳細なp値。

全体集団CLL患者異種移植

	アインソタイプ 対照	Rit	6G1 1	Rit +6G 11	Alem	Alem +6G1 1	GA1 01	GA1 01+ 6G1 1
アインソタイプ 対照	NA	10^{-9}	10^{-9}	10^{-9}	1.8×10^{-5}	1.8×10^{-5}	2.5×10^{-7}	2.2×10^{-8}
Rit	10^{-9}	NA	0.23	2.6×10^{-8}	NA	NA	NA	NA
6G11	10^{-9}	0.23	NA	2.4×10^{-6}	3.7×10^{-5}	3.5×10^{-5}	0.15	1.8×10^{-5}
Alem	1.8×10^{-5}	NA	3.7×10^{-5}	NA	NA	2.9×10^{-4}	NA	NA
GA101	2.5×10^{-7}	NA	0.15	NA	NA	NA	NA	0.0095

リツキシマブ不応性CLL患者異種移植

	アインソタイプ 対照	Rit	6G1 1	Rit+ 6G11
アインソタイプ 対照	NA	0.10	0.040	8.7×10^{-6}
Rit	0.10	NA	0.28	0.0025
6G11	0.040	0.28	NA	0.01

MCL患者異種移植

	アインソタイプ 対照	Rit	6G1 1	Rit+6 G11
アインソタイプ 対照	NA	8.6×10^{-4}	8.6×10^{-4}	8.6×10^{-4}
Rit	8.6×10^{-4}	NA	0.57	0.033
6G11	8.6×10^{-4}	0.57	NA	0.12

NA：該当なし。

【0345】

考察

10

20

30

40

50

癌細胞は高度に増殖性であり、本質的にゲノム不安定であり、高い変異の傾向を有する。これらの様相は、遺伝学的に異なる処置抵抗性のクローンが出現し、処置の失敗につながる、選択された従来の抗癌薬の下での細胞進化に最適な環境を提供する。この能力は、DNA損傷化学療法^{3 8}、ならびに明確に異なるシグナル伝達経路を標的とする小分子阻害薬、例えばイマチニブ、エルロチニブ、及びイブルチニブなど^{3 9 - 4 3}に対して発達する抵抗性機構において明らかに明白である。そのような機構は、標的受容体の変異または下流シグナル伝達タンパク質の代償性変化を伴う^{4 4}。その他は、薬物排出ポンプの上方制御により達成される多剤抵抗性機構を伴う(^{4 5}にて査読)。従来型及び標的小分子阻害薬の失敗は、これらの様相の抵抗性を克服するための手段、そしてまた免疫系を働かせる療法を含む代替的療法の探索につながっている。

10

【0346】

モノクローナル抗体(mAb)は、今日までこの手法のうち最も成功している典型であり、血液疾患におけるAbが当該分野を先導している。B細胞癌は、抗体療法に関して臨床学的に最も研究されているタイプの癌を代表する。1997年のリツキシマブの認可以来、また第2世代(オファツムマブ)及び第3世代(オビヌツズマブ)のhCD20 mAbの近年の認可に伴い、これらの薬剤は、B細胞癌を処置するための医療設備における重要な主力薬となっている。しかしながら、mAb免疫療法も内因性抵抗性及び獲得抵抗性の両方に影響されやすいことは明らかである。腫瘍がその生存及び成長を支持するために間質細胞及び骨髄系細胞を破壊することによって腫瘍周囲の微小環境に影響を及ぼすことは、今や十分に証明されている^{4 6}。mAb療法に関連する抵抗性のうち少なくとも2つの機構は、抑制性FcRIIBによって誘起される(^{4 7}にて査読)。Clynes⁵によって示されたエフェクター細胞に対する抑制性作用に加えて、リツキシマブ及び他のI型hCD20 mAbが、B細胞表面上に架橋する双極性抗体によってhFcRIIBに結合し、mAb:CD20:FcRIIB複合体の内部移行をもたらし^{1 3、2 3、4 8}、それによって、重要なFc依存性エフェクター機能を働かせるその能力を限定することが近年示されている(^{2 3}、及びTipton et al.未公開)。ここで、本実施例は、これらの抵抗性機構の両方を遮断することができ、したがって他の治療用mAbの最大の可能性を引き出し、インビボの抗体療法に対する抵抗性の克服を助けることができる、完全ヒトhFcRIIB mAbの作製を記載する。

20

【0347】

際立ったことに、hFcRIIB mAbの同時投与は、リツキシマブ応答患者からのCLL細胞を移植したマウスの客観的応答及び完全応答を向上させただけでなく、重要なことに、これらはまた、リツキシマブまたはhCD52標的mAbであるアレムツズマブに抵抗性である再発/難治性患者からのCLL細胞のmAb処置抵抗性表現型を克服した。

30

【0348】

選択された微小環境内でのhCD52 mAb療法への抵抗性における腫瘍細胞FcRIIBの役割が近年提唱された(Pallasch et al., 2014)。hFcRIIBは、より感受性の脾臓区画と比較してアレムツズマブ抵抗性骨髄白血病B細胞内で上方制御されたことが見出され、これらにおけるhFcRIIBのshRNA媒介性ノックダウンは、さもなければ抵抗性の組織におけるhCD52 mAb療法を改善させた。これらの所見は、本発明者らのCLLモデルでなされた観察と一致する。感受性の腹膜区画内にあるCLL細胞がhCD20 mAbによって容易に枯渇された一方で、抵抗性微小環境における枯渇は腫瘍FcRIIBの遮断を必要とした。抵抗性組織区画内のmAb活性低下の根底にある高いFcRIIB発現と一致して、FcRIIB遮断は、本発明者らのCLLモデルにおけるアレムツズマブ及びII型hCD20 mAbも増進した。II型hCD20 mAbが高レベルのFcRIIBの存在下でのみ効率的に内部移行することは、以前に示されている(Vaughan et al., 2014)。集合的に、これらの観察は、FcRIIB媒介性抵抗性が、いくつかの異なる臨床的に認可された抗体に関連することを実証し、hFcRIIB mAbとの組み合わせ

40

50

せに関する広範な治療可能性を示す。

【0349】

I型CD20 mAbは、II型よりも大幅に高い標的腫瘍細胞に内部移行する傾向を示すことが以前に示されており¹³、²³、³³、後者は高レベルのFc RII Bの存在下でのみ効率的に内部移行した³³。したがって、II型CD20抗体のB細胞枯渇活性はインビボの6G11との同時処置(cotreatment)によって同様に向上するようであるという、ここでのこの所見は興味深い。Hemann及び共同研究者は、選択された微小環境内のhCD52 mAb療法への抵抗性における腫瘍細胞Fc RII Bの役割を近年示した⁴⁹。Fc RII Bは、より感受性の脾臓区画と比較してアレムツズマブ抵抗性骨髄内で上方制御されることが見出され、白血病細胞内のFc RII BのsiRNA媒介性ノックダウンは、さもなければ抵抗性の組織におけるhCD52 mAb治療効果を改善させた。これらの所見は、本発明者らのCLLモデルでなされた観察と一致する。感受性の脾臓区画内にある孤立性CLL細胞がhCD20 mAb処置によって容易に枯渇された一方で、抵抗性微小環境におけるクラスター化した増殖性CLL細胞の枯渇は腫瘍Fc RII Bの遮断を必要とした。重要なことに、これらの観察(本明細書及び³³)は、Fc RII B媒介性抵抗性が、いくつかの異なる臨床的に認可された抗体及び検証された標的に関連することを実証し、hFc RII B mAbとの組み合わせに関する広範な治療可能性を示す。

10

【0350】

抗体療法への抵抗性は、いくつかのタイプの癌において観察される。B細胞癌の中でも、CLL及びMCLは、FL及びDLBCLと比較して、hCD20 mAbを含む投薬計画ではさほど十分に処置されず、前者における内因性抵抗性機構が示される。さらに、FL及びDLBCLを患う個別の患者は、hCD20 mAb療法に対して本質的な抵抗性を示し、抗体含有免疫療法に初めは応答性である全てのB細胞癌患者のうちの一部は、抵抗性を発達させ、もはや処置から利益を得ない。以前の観察(³²、¹⁴、及び未公開のデータ)は、Fc RII B媒介性の抗体内部移行が、これらの異なるB細胞癌及び個体における抵抗性の根底にある共通機構であり得ることを示す。本明細書において、Fc RII B媒介性の抗体内部移行は異なるB細胞癌に共通する治療上関連性のある抵抗性機構であるという観察と一致して、hFc RII B mAbとの同時投与が、インビボでCLL及びMCL両方の腫瘍細胞に対するリツキシマブの抗腫瘍活性を後押しするという所見を提示する。

20

30

【0351】

本実施例は、hFc RII B mAbが内因性の抗腫瘍活性を有することをさらに実証する。Veriらは、hFc RII B特異性mAbを以前に開発したが、インビボの癌標的に対するそれらの活性を検査しなかった⁵⁰。Rankinらはその後、悪性ヒトB細胞上のhFc RII Bを標的とすることが単独療法として有効であり得ることを示した。しかしながら、この研究³⁶は、免疫不全異種移植系を使用し、ここでは、マウス受容体とのAb交差反応性の欠如のために、非常に重要な免疫エフェクター細胞上ではなく、腫瘍上でのみ標的抗原が発現され、hFc RII B mAbの正味の作用の查定の妨げとなった。現行の研究では、2つの異なるmAbクローン(1つはファージディスプレイからの完全ヒト由来、そして1つは従来ハイブリドーマ技術によるマウス由来)を使用し、標的B細胞及びエフェクターの両方でhFc RII Bが発現される免疫適格性の同系マウスモデルにおいて、拮抗性hFc RII B抗体が内因性抗腫瘍活性を有することを実証する。重要なことに、hCD20及びhFc RII Bの両方を発現する二重Tgマウスを使用して、両方の標的が、免疫適格性の宿主において、ヒトにおけるものに類似した細胞特異性かつ組織特異性様式で発現されるとき、hFc RII B媒介性内部移行のmAbによる遮断が、リツキシマブの治療活性を後押しすることを、本発明者らはさらに実証する。興味深いことに、この設定において拮抗性hFc RII B mAbとCD20 mAb(リツキシマブまたはオビヌツズマブ)とを同時投与することには、特に顕著かつ明らかな相乗作用があった。同様の免疫適格性モデルにおけるhFc RII

40

50

Bの遺伝子欠失後に観察されているのと同様に、増進した活性は、エフェクター細胞内のhFc RII Bの免疫抑制機能のmAbによる遮断から生じたと推測しそうになる^{6、7}。それにも関わらず、また、Fc RII B媒介性抑制の解除及びリツキシマブ内部移行の防止（直接標的とするのではなく）が、hFc RII B mAbによるリツキシマブ治療活性の後押しの主要な機構であることと一致して、B細胞欠失は（おそらくアイソタイプの差異に起因して）6G11単独と比較してAT10では効率が低かったが、AT10とリツキシマブとの組み合わせは、リツキシマブ活性の増補において同じように効果的であったことを、本発明者らは見出した。なお、CLLは、より高い用量が必要とされるが、リツキシマブ^{5 1}及び他のI型抗CD20 mAb^{5 2、5 3}で準最適に処置されることが長年理解されている。本発明者らのこれまでのデータ^{1 3}と連関して、本発明者らの新たな結果は、hFc RII B mAbを用いた併用療法が、抵抗性を防止する方法であり得るだけでなく、おそらく、これらの場合に必要とされるhCD20 mAbの用量を低下させる方法でもあり得ることを示す。 10

【0352】

このように、少なくとも3つの明確に異なる機構が、6G11の総合的なインビボ治療活性、内因性細胞傷害性、治療用mAbの内部移行の防止、及び免疫細胞内のFc RII B抑制性シグナル伝達の中和に寄与し得る。いくつかの観察は、受容体内部移行の遮断及び抑制性シグナル伝達が、薬抵抗性の克服に最も重要であることを示唆する。第1に、拮抗性hFc RII B及びhCD20 mAbをマウスに同時投与したとき、hFc RII Bが標的及びエフェクター細胞の両方で発現された、顕著かつ明らかに相乗的な作用があった。第2に、B細胞欠失がAT10単独では不十分であった一方で、AT10とリツキシマブとの組み合わせはリツキシマブ活性の増補において効果的であったことを、本発明者らは見出した。最も決定的なことに、N297Q hIgG1 6G11（これは、賦活性Fc Rに結合する能力を欠き、かつ直接的な細胞傷害性能力を有しない）に関する本発明者らのデータは、Fc RII B活性の遮断がこの手法の有効性の背後にある重要な機構であることを裏付ける。これは、Fc RII Bに対する機能遮断mAbが、Fc RII Bの遺伝子欠失後に観察される増進した抗癌mAb応答を再現することができるという根拠を提供する（Clynes et al., 2000）。しかしながら、ここで本発明者らは、活性に関する免疫エフェクター細胞と対比した標的上の拮抗性Fc RII B機能の相対的な重要性を直接的に調査していない；これらの研究は、本発明者らの進行中の試みの基礎を形成する。 20 30

【0353】

なお、CLLは、より高い用量が必要とされるが、リツキシマブ（O'Brien et al., 2001）及びオフアツムマブ（Coiffier et al., 2008、Coiffier et al., 2006）で準最適に処置されることが長年理解されている。本発明者らのこれまでのデータと連関して、本発明者らの現行の結果は、hFc RII B mAbを用いた併用療法が、抵抗性を防止する方法であり得るだけでなく、おそらく、用量を低下させる方法、またはhCD20 mAb療法の持続期間を短縮する方法でもあり得ることを示す。

【0354】

著しい活性を得ることに加えて、治療用mAbはまた、耐容可能であり、かつ治療上関連性のある薬物動態（PK）を有さなければならない。hFc RII Bに対する6G11の非常に高い特異性は、その98%相同性のヒトhFc RII Aへの結合の欠如、及び毒性学研究に一般的に使用される動物種との無視できる交差反応性と共に、ヒトと同様のレベルかつ細胞型及び組織でヒトhFc RII Bを発現するTgマウスにおける安全性パラメータ及びPK/PDを精査することを、本発明者らに促した。これらの研究は、6G11が良好に耐容され、動物が苦痛、体重減少、毒性、または病態の徴候を示さなかったことを示した。用量滴定実験は、10mg/kg以上の用量がインビボでhFc RII Bを飽和させるのに十分であり、同等のB細胞枯渇をもたらし、受容体の長期遮断または除去を維持することができたことを実証した。対照的に、1mg/kgの用量は準最 40 50

適であり、急速に清掃され、脾臓B細胞を認識可能なほどに欠失させなかった。受容体飽和を超える用量では、6G11の終末相半減期は、2～4日目にマウスにおいて推定された。非ヒト霊長類種との交差反応性の欠如は種間スケールリングを妨げたが、これらの数値は、ヒトにおいて約数週間の半減期を有するhIgG1 mAbに典型的な、治療上関連性のあるPKプロファイルを示す。

【0355】

興味深いことに、ヒト血液及びhFc RII B Tgマウスのインビボの両方で、6G11処置は、B細胞の特異的欠失をもたらした。両系における単球がhFc RII Bを発現するが、それらは実質的に欠失されなかった。現行の根拠は、マクロファージ及び/または単球が、mAb療法を担う重要なエフェクター細胞である(Beers et al., 2010)、(Biburger et al., 2011、Gul et al., 2014)ことを示唆し、したがって、本発明者らのデータは、重要なエフェクターがhFc RII B mAbによって欠失されないことを示す。

10

【0356】

本発明者らは、抗マウスFc RII特異性mAb²⁵の同等のパネルをこれまでに調査し、それらが、主に宿主の非腫瘍細胞によってインビボでそれらが急速に消費されることに起因して、限定された治療的利益しか有しないことを観察した¹⁷。重要なことに、少なくともインビトロでは、同様の速度の内部移行がヒト標的細胞上で見られ、先の研究と合致する³⁶。ここで本発明者らは、これらの観察を広げ、初代ヒトCLL試料でも同じことが見られたこと、そしてマウス発現hFc RII B Tgでは急速かつ大規模なmAb消費が観察されなかったことを実証した。これらのデータは、マウス及びヒトの抑制性Fc RII(B)が、それらの内部移行の能力に関して異なる特性を有し、抗原シンク(antigenic sink)として機能するという本発明者らの先の仮定を裏付け、6G11などのhFc RII B mAbがヒトにおいて効果的に働くことを示唆する。

20

【0357】

集合的に、本実施例は、hFc RII B mAbがmAb薬に対する腫瘍細胞の内因性抵抗性及び獲得抵抗性を克服し、再発/難治性CLL細胞を克服するというインビボの概念実証研究を論証する。本発明者らのデータは、Fc RII B発現B細胞癌の治療のためのhFc RII B mAbの臨床開発を支持する。

30

【0358】

これらのデータは、Fc RII B発現B細胞癌の治療のためのhFc RII B mAbの臨床開発を支持する。さらに、CD20 mAbの他の疾患への普及と類似して、例えば、標的PCが高レベルのFc RII Bを発現する全身性軽鎖アミロイドーシス(Zhou et al., 2008)、及びB細胞の活性化がFc RII Bの闘争性によって低減し得るリウマチ性関節炎(Baerenwaldt et al., 2011、Mauri and Jury, 2010)における操作にFc RII B発現標的が適し得る自己免疫といった、他の治療状況におけるそれらの有用性を示唆する根拠が存在する。

40

【0359】

参考文献

1. Reichert, J. M. & Dhimoleda, E. The future of antibodies as cancer drugs. *Drug Discov Today* 17, 954 - 963 (2012)。
2. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors in health and disease. *Curr Top Microbiol Immunol* 350, 105 - 125 (2011)。
3. Nimmerjahn, F. & Ravetch, J. V. Fcγ receptors as regulators of immune responses. *Nature reviews* 8, 34 - 47 (2008)。

50

4. Chao, M. P., et al. Anti-CD47 antibody synergizes with rituximab to promote phagocytosis and eradicate non-Hodgkin lymphoma. *Cell* 142, 699-713 (2010).
5. Clynes, R. A., Towers, T. L., Presta, L. G. & Ravetch, J. V. Inhibitory Fc receptors modulate in vivo cytotoxicity against tumor targets. *Nature medicine* 6, 443-446 (2000).
6. Minard-Colin, V., et al. Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage FcγRI, FcγRIII, and FcγRIV. *Blood* 112, 1205-1213 (2008).
7. Hamaguchi, Y., Xiu, Y., Komura, K., Nimmerjahn, F. & Tedder, T. F. Antibody isotype-specific engagement of Fcγ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *The Journal of experimental medicine* 203, 743-753 (2006).
8. Beers, S. A., et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 115, 5191-5201 (2010).
9. Dyer, M. J., Hale, G., Hayhoe, F. G. & Waldman, H. Effects of CAMPATH-1 antibodies in vivo in patients with lymphoid malignancies: influence of antibody isotype. *Blood* 73, 1431-1439 (1989).
10. Weng, W. K. & Levy, R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol* 21, 3940-3947 (2003).
11. Cartron, G., et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor FcγRIIIa gene. *Blood* 99, 754-758 (2002).
12. Lim, S. H., et al. Anti-CD20 monoclonal antibodies: historical and future perspectives. *Haematologica* 95, 135-143 (2010).
13. Lim, S. H., et al. Fcγ receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* (2011).
14. Lee, C. A.-K., Margaret; Cogliatti, Sergio; Crowe, Susanne; Cragg, Mark S; Schmitz, Shu-Fang H; Ghielmini, Michele and Peter W Johnson. Expression of Inhibitory Fc Receptor (FcγRIIB) Is a Marker of Poor Response t

- o Rituximab Monotherapy in Follicular Lymphoma (FL). ASH abstract 50396 (2012).
15. Beers, S. A., et al. Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody outperforms type I (rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation. *Blood* 112, 4170-4177 (2008).
16. Roghanian, A., et al. Filament-associated TSGA10 protein is expressed in professional antigen presenting cells and interacts with vimentin. *Cellular immunology* 265, 120-126 (2010). 10
17. Williams, E. L., et al. Immunotherapy Targeting Inhibitory Fcγ Receptor IIB (CD32b) in the Mouse Is Limited by Monoclonal Antibody Consumption and Receptor Internalization. *J Immunol* 191, 4130-4140 (2013).
18. Glennie, M. J., McBride, H. M., Worth, A. T. & Stevenson, G. T. Preparation and performance of bispecific F(ab'γ)2 antibody containing thioether-linked Fab'γ fragments. *J Immunol* 139, 2367-2375 (1987). 20
19. Greenman, J., et al. Characterization of a new monoclonal anti-Fcγ RII antibody, AT10, and its incorporation into a bispecific F(ab')2 derivative for recruitment of cytotoxic effectors. *Mol Immunol* 28, 1243-1254 (1991).
20. Tutt, A. L., et al. Monoclonal antibody therapy of B cell lymphoma: signaling activity on tumor cells appears more important than recruitment of effectors. *J Immunol* 161, 3176-3185 (1998). 30
21. Olsson, N., et al. Proteomic analysis and discovery using affinity proteomics and mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics* 10, M110 003962 (2011).
22. Nishimura, T., et al. Characterization of the human Fcγ RII B gene promoter: human zinc-finger proteins (ZNF140 and ZNF91) that bind to different regions function as transcription repressors. *Int Immunol* 13, 1075-1084 (2001). 40
23. Beers, S. A., et al. Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 115, 5191-5201 (2010).
24. Binyamin, L., et al. Blocking NK cell inhibitory self-recognition promotes antib 50

- ody - dependent cellular cytotoxicity in a model of anti-lymphoma therapy. *J Immunol* 180, 6392 - 6401 (2008)。
25. Williams, E. L., et al. Development and characterisation of monoclonal antibodies specific for the murine inhibitory FcγRIIB (CD32B). *European journal of immunology* (2012)。
26. Walshe, C. A., et al. Induction of cytosolic calcium flux by CD20 is dependent upon B Cell antigen receptor signaling. *The Journal of biological chemistry* 283, 16971 - 16984 (2008)。
27. Beers, S. A., Chan, C. H., French, R. R., Cragg, M. S. & Glennie, M. J. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin Hematol* 47, 107 - 114 (2010)。
28. Romer, P. S., et al. Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118, 6772 - 6782 (2011)。
29. Williams, E. L., et al. Development and characterisation of monoclonal antibodies specific for the murine inhibitory FcγRIIB (CD32B). *European journal of immunology* 42, 2109 - 2120 (2012)。
30. Hallborn, J. & Carlsson, R. Automated screening procedure for high-throughput generation of antibody fragments. *Biotechniques Suppl*, 30 - 37 (2002)。
31. Cragg MS, A. A., O'Brien L, Tutt A, Chan HTC, Anderson VA, Glennie MJ. Opposing properties of CD20 mAb. in *Leukocyte Typing VII* 95 - 97 (Oxford University Press, Oxford, 2002)。
32. Lim, S. H., et al. FcγRIIB on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* 118, 2530 - 2540 (2011)。
33. Vaughan, A. T., et al. Inhibitory FcγRIIB (CD32b) becomes activated by therapeutic mAb in both cis and trans and drives internalization according to antibody specificity. *Blood* 123, 669 - 677 (2014)。
34. Tao, M. H. & Morrison, S. L. Studies of aglycosylated chimeric mouse-human IgG. Role of carbohydrate in the structure and effector functions mediated by the human IgG constant region. *J Immunol* 143, 2595 - 26

01(1989)。

35. Montalvao, F., et al. The mechanism of anti-CD20-mediated B cell depletion revealed by intravital imaging. *The Journal of clinical investigation* (2013)。

36. Rankin, C.T., et al. CD32B, the human inhibitory Fc-gamma receptor IIB, as a target for monoclonal antibody therapy of B-cell lymphoma. *Blood* 108, 2384-2391 (2006)。

37. Hu, C.Y., et al. Treatment with CD20-specific antibody prevents and reverses autoimmune diabetes in mice. *The Journal of clinical investigation* 117, 3857-3867 (2007)。

38. Rossi, D., et al. Clinical impact of small TP53 mutated subclones in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* (2014)。

39. Zhang, J., Yang, P.L. & Gray, N.S. Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors. *Nat Rev Cancer* 9, 28-39 (2009)。

40. Pao, W., et al. Acquired resistance of lung adenocarcinomas to gefitinib or erlotinib is associated with a second mutation in the EGFR kinase domain. *PLoS Med* 2, e73 (2005)。

41. Yun, C.H., et al. The T790M mutation in EGFR kinase causes drug resistance by increasing the affinity for ATP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 2070-2075 (2008)。

42. Shah, N.P., et al. Multiple BCR-ABL kinase domain mutations confer polyclonal resistance to the tyrosine kinase inhibitor imatinib (STI571) in chronic phase and blast crisis chronic myeloid leukemia. *Cancer Cell* 2, 117-125 (2002)。

43. Corbin, A.S., Buchdunger, E., Pascal, F. & Druker, B.J. Analysis of the structural basis of specificity of inhibition of the Abl kinase by STI571. *The Journal of biological chemistry* 277, 32214-32219 (2002)。

44. Engelman, J.A., et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science (New York, N.Y)* 316, 1039-1043 (2007)。

45. Cragg, M.S., Harris, C., Strasser, A. & Scott, C.L. Unleashing the power of inhibitors of oncogenic kinases through BH3 mimetics. *Nat Rev Cancer* 9, 321-326 (2009)。

10

20

30

40

50

46. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646-674 (2011).
47. Williams, E. L., et al. Overcoming resistance to therapeutic antibodies by targeting Fc Receptors. *Resistance to Immunotherapeutic Antibodies in Cancer: Strategies to Overcome Resistance*. Pubs. Springer In Press (2013).
48. Vaughan, A. T., et al. Inhibitory Fc RIIb (CD32b) becomes activated by therapeutic mAb in both cis and trans and drives internalization according to antibody specificity. *Blood* (2013). 10
49. Pallasch, C. P., et al. Sensitizing protective tumor microenvironments to antibody-mediated therapy. *Cell* 156, 590-602 (2014).
50. Veri, M. C., et al. Monoclonal antibodies capable of discriminating the human inhibitory Fcγ-receptor IIB (CD32B) from the activating Fcγ-receptor IIA (CD32A): biochemical, biological and functional characterization. *Immunology* 121, 392-404 (2007). 20
51. O'Brien, S. M., et al. Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19, 2165-2170 (2001).
52. Coiffier, B., et al. Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood* 111, 1094-1100 (2008). 30
53. Coiffier, B., et al. Significant Correlation between Survival Endpoints and Exposure to Ofatumumab (HuMax-CD20) in Chronic Lymphocytic Leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts* 108, 2842 - (2006).
54. Shawn Rose, Alexander Misharin, Harris Perlman, 2012, A novel Ly6c/Ly6G-based strategy to analyse the mouse splenic myeloid compartment, *Cytometry Part A* 81(4): 343-50 40
55. Beers, S. A., French, R. R., Chan, H. T., Lim, S. H., Jarrett, T. C., Vidal, R. M., Wijayawera, S. S., Dixon, S. V., Kim, H., Cox, K. L., et al. (2010). Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20 antibodies: implications for antibody selection. *Blood* 115, 519 50

1 - 5 2 0 1。

56. Biburger, M., Aschermann, S., Schwab, I., Lux, A., Albert, H., Danzer, H., Woigk, M., Dudziak, D., and Nimmerjahn, F. (2011). Monocyte subsets responsible for immunoglobulin G-dependent effector functions in vivo. *Immunity* 35, 932 - 944.

57. Coiffier, B., Lepage, S., Pedersen, L.M., Gadeberg, O., Fredriksen, H., van Oers, M.H., Wooldridge, J., Kloczko, J., Holowiecki, J., Hellmann, A., et al. (2008). Safety and efficacy of ofatumumab, a fully human monoclonal anti-CD20 antibody, in patients with relapsed or refractory B-cell chronic lymphocytic leukemia: a phase 1-2 study. *Blood* 111, 1094 - 1100.

58. Coiffier, B., Tilly, H., Pedersen, L.M., Plesner, T., Frederiksen, H., van Oers, M.H.J., Wooldridge, J., Kloczko, J.S., Holowiecki, J., Hellmann, A., et al. (2006). Significant correlation between survival endpoints and exposure to Ofatumumab (HuMax-CD20) in Chronic Lymphocytic Leukemia. *ASH Annual Meeting Abstracts* 108, 2842 - .

59. Cragg, M.S., Morgan, S.M., Chan, H.T., Morgan, B.P., Filatov, A.V., Johnson, P.W., French, R.R., and Glennie, M.J. (2003). Complement-mediated lysis by anti-CD20 mAb correlates with segregation into lipid rafts. *Blood* 101, 1045 - 1052.

60. Gul, N., Babes, L., Siegmund, K., Korthouwer, R., Bogels, M., Braster, R., Vidarsson, G., Ten Hagen, T.L., Kubes, P., and van Egmond, M. (2014). Macrophages eliminate circulating tumor cells after monoclonal antibody therapy. *The Journal of clinical investigation* 124, 812 - 823.

61. Hamaguchi, Y., Xiu, Y., Komura, K., Nimmerjahn, F., and Tedder, T.F. (2006). Antibody isotype-specific engagement of Fcγ receptors regulates B lymphocyte depletion during CD20 immunotherapy. *The Journal of experimental medicine* 203, 743 - 753.

62. Hussain, K., Hargreaves, C.E., Roghanian, A., Oldham, R.J., Chan, H.T., Mockridge, C.I., Chowdhury, F., Frendeus, B., Harper, K.S., Strefford, J.C., et al. (2015). Upregulation of FcγRIIb on monocytes is necessary to promote the superagonist activity of TGN1412. *Blood* 125, 102 - 110.

10

20

30

40

50

63. Lim, S. H., Vaughan, A. T., Ashton-Key, M., Williams, E. L., Dixon, S. V., Chan, H. T., Beers, S. A., French, R. R., Cox, K. L., Davies, A. J., et al. (2011). Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy. *Blood* 118, 2530 - 2540.

64. O'Brien, S. M., Kantarjian, H., Thomas, D. A., Giles, F. J., Freireich, E. J., Cortes, J., Lerner, S., and Keating, M. J. (2001). Rituximab dose-escalation trial in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 19, 2165 - 2170

10

65. Pallasch, C. P., Leskov, I., Braun, C. J., Vorholt, D., Drake, A., Soto-Feliciano, Y. M., Bent, E. H., Schwamb, J., Iliopoulou, B., Kutsch, N., et al. (2014). Sensitizing protective tumor microenvironments to antibody-mediated therapy. *Cell* 156, 590 - 602.

66. Romer, P. S., Berr, S., Avota, E., Na, S. Y., Battaglia, M., ten Berge, I., Einsele, H., and Hunig, T. (2011). Preculture of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412. *Blood* 118, 6772 - 6782.

20

67. Vaughan, A. T., Iriyama, C., Beers, S. A., Chan, C. H., Lim, S. H., Williams, E. L., Shah, V., Roghanian, A., Frendeus, B., Glennie, M. J., and Cragg, M. S. (2014). Inhibitory Fc gamma RIIb (CD32b) becomes activated by therapeutic mAb in both cis and trans and drives internalization according to antibody specificity. *Blood* 123, 669 - 677.

30

【0360】

実施例2 - 例示的な薬学的製剤

本発明の組成物、及び/または抗体、及び/または薬剤、及び/または薬物は単独で投与されることが可能であるが、1つ以上の許容可能な担体と一緒に薬学的製剤としてそれを提示することが好ましい。この担体（複数可）は、本発明の組成物、及び/または抗体、及び/または薬剤、及び/または薬物と適合性があり、その受容者に有害でないという

40

【0361】

以下の実施例は、活性成分が本発明の抗体分子及び/または薬剤である、本発明による薬物及び薬学的組成物を例示する。

実施例A：錠剤

活性成分	100mg
ラクトース	200mg
デンプン	50mg
ポリビニルピロリドン	5mg
ステアリン酸マグネシウム	4mg
	359mg

【0362】

湿式造粒法、続いて圧縮によって、前述の成分から錠剤を調製する。

実施例 B：点眼液

10

活性成分	0.5g
塩化ナトリウム、分析グレード	0.9g
チオメルサール	0.001g
100ml になるまで精製水	
7.5までpHを調整	

実施例 C：錠剤製剤

ポビドン溶液を用いた成分の湿式造粒、続いてステアリン酸マグネシウムの添加、及び圧縮によって、以下の製剤 A 及び B を調製する。

製剤 A

20

	mg/錠剤	mg/錠剤
(a) 活性成分	250	250
(b) ラクトース B. P.	210	26
(c) ポビドン B. P.	15	9
(d) デンプングリコール酸ナトリウム	20	12
(e) ステアリン酸マグネシウム	5	3
	—	
	500	300

30

製剤 B

	mg/錠剤	mg/錠剤
(a) 活性成分	250	250
(b) ラクトース	150	—
(c) Avicel PH 101 (登録商標)	60	26
(d) ポビドン B. P.	15	9
(e) デンプングリコール酸ナトリウム	20	12
(f) ステアリン酸マグネシウム	5	3
	—	
	500	300

40

製剤 C

	mg /錠剤
活性成分	100
ラクトース	200
デンプン	50
ポビドン	5
ステアリン酸マグネシウム	4
	359

【0363】

10

混加した成分の直接圧縮によって、以下の製剤、D及びEを調製する。製剤E中に使用されるラクトースは、方向圧縮タイプのものである。

製剤D

	mg /カプセル
活性成分	250
アルファ化デンプンNF15	150
	400

製剤E

20

	mg /カプセル
活性成分	250
ラクトース	150
Avicel (登録商標)	100
	500

【0364】

製剤F (徐放製剤)

ポビドン溶液を用いた成分(以下)の湿式造粒、続いてステアリン酸マグネシウムの添加、及び圧縮によって、この製剤を調製する。 30

	mg /錠剤
(a) 活性成分	500
(b) ヒドロキシプロピルメチルセルロース (Methocel K4M Premium) (登録商標)	112
(c) ラクトースB. P.	53
(d) ポビドンB. P. C.	28
(e) ステアリン酸マグネシウム	7

40

700

薬物放出は約6～8時間の期間にわたって起こり、12時間後に完了した。

実施例D：カプセル製剤

製剤A

上記の実施例Cにおける製剤Dの成分を混加し、2部の硬ゼラチンカプセルに充填することによって、カプセル製剤を調製する。製剤B(以下参照)は、同様の様式で調製される。

製剤B

	mg / カプセル
(a) 活性成分	250
(b) ラクトース B. P.	143
(c) デンプングリコール酸ナトリウム	25
(d) ステアリン酸マグネシウム	2
	420

製剤 C

10

	mg / カプセル
(a) 活性成分	250
(b) マクロゴール 4000 B P	350
	600

【0365】

マクロゴール 4000 B P を溶融させ、この溶融物中に活性成分を分散させ、この溶融物を 2 部の硬ゼラチンカプセルに充填することによって、カプセルを調製する。

20

製剤 D

	mg / カプセル
活性成分	250
レシチン	100
ラッカセイ油	100
	450

【0366】

活性成分をレシチン及びラッカセイ油中に分散させ、この分散液を弾性の軟ゼラチンカプセルに充填することによって、カプセルを調製する。

30

【0367】

製剤 E (徐放カプセル)

押出機を使用して成分 a、b、及び c を押し出し、続いて押出物の球形化及び乾燥によって、以下の徐放カプセル製剤を調製する。次いで、乾燥したペレットを放出制御膜 (d) でコーティングし、2 部の硬ゼラチンカプセルに充填する。

	mg / カプセル
(a) 活性成分	250
(b) 微結晶セルロース	125
(c) ラクトース B P	125
(d) エチルセルロース	13
	513

40

実施例 E : 注射製剤

活性成分 0.200 g

10 ml まで無菌の発熱物質非含有リン酸緩衝液 (pH 7.0) を添加

活性成分をリン酸緩衝液 (35 ~ 40) の大部分に溶解させ、次いでメスアップし、滅菌マイクロプローブフィルタを通して無菌の 10 ml 琥珀色ガラスバイアル (1 型) 内

50

に濾過し、無菌の栓及びオーバーシールで密閉する。

実施例 F：筋肉内注入

活性成分	0.20 g
ベンジルアルコール	0.10 g
Glucofuro1 75 (登録商標)	1.45 g
3.00 ml になるまで注射用水	
適量	

【0368】

10

活性成分をグリコフロール中に溶解させる。次いでベンジルアルコールを添加し溶解させ、3 ml になるまで水を添加する。次いでこの混合物を滅菌マイクロプロブフィルタで濾過し、無菌の 3 ml ガラスバイアル (1 型) 内に密閉する。

実施例 G：シロップ懸濁液

活性成分	0.2500 g
ソルビトール溶液	1.5000 g
グリセロール	2.0000 g
分散性セルロース	0.0750 g
安息香酸ナトリウム	0.0050 g
香料、モモ 17.42.3169	0.0125 ml
5.0000 ml になるまで精製水	
適量	

20

【0369】

安息香酸ナトリウムを精製水の一部に溶解させ、ソルビトール溶液を添加する。活性成分を添加し、分散させる。グリセロール中に、増粘剤 (分散性セルロース) を分散させる。2 つの分散液を混合し、必要量になるまで精製水でメスアップする。必要に応じて、懸濁液の追加剪断によってさらなる増粘を得る。

実施例 H：坐薬

	mg / 坐薬
活性成分 (63 μ m) *	250
固形脂、BP (Witepsol H15-Dynamit Nobel)	1770
	2020

30

【0370】

* 活性成分は、粒子の少なくとも 90% が直径 63 μ m 以下である粉末として使用する。

40

【0371】

Witepsol H15 の 1/5 を、蒸気ジャケット付きパン内で最大 45 で溶融させる。活性成分を 200 μ m の篩にかけ、滑らかな分散液が得られるまで切削ヘッドを装着した Silver son を使用して混合しながら、溶融した基剤に添加する。この混合物を 45 に維持しながら、残りの Witepsol H15 を懸濁液に添加し、攪拌して、均質なミックスを確保する。この懸濁液全体を 250 μ m のステンレス鋼スクリーンに通し、連続的に攪拌しながら、40 に冷ます。38 ~ 40 の温度で、この混合物 2.02 g を、好適なプラスチック成形型に充填する。この坐薬を室温に冷ます。

【0372】

実施例 I：ペッサリー

50

	mg/ペッサリー
活性成分	250
無水デキストロース	380
ジャガイモデンプン	363
ステアリン酸マグネシウム	7

1000

【0373】

上記の成分を直接混合し、得られる混合物の直接圧縮によってペッサリーを調製する。

10

【図面の簡単な説明】

【0374】

【図1】hFc RII BとhFc RII Aとを区別することができるmAbの作製及び特徴付け。

【図2】hFc RII B mAbは、標的細胞の表面上でのFc RII Bとのリツキシマブ(Rit)の結合を遮断することができる。

【図3】hFc RII B mAb 6G11は、インビトロで強力な細胞傷害活性を有し、標的CLL細胞の表面上でのhFc RII BとのRitの結合を遮断することができる。

【図4】hFc RII B mAb 6G11はインビボで活性であり、B細胞のCD20 mAb枯渇を増強する。

20

【図5】hFc RII B mAb 6G11は、インビボで患者CLL細胞のRit枯渇を増強する。

【図6】hFc RII B mAb 6G11は、前臨床インビボ系及びインビトロ系で耐容され、毒性の結果をもたらさない。

【図7】hFc RII mAb(AT10)は、インビボのRitによる悪性B細胞のクリアランスを増強する。

【図8】作製されたクローンは、hFc RII Bに対して非常に特異的である。

【図9】hFc RII B mAbの野生型及びN297Q変異体の両方が同じように、標的細胞の表面からのRit内部移行を遮断することができる。

30

【図10】インビトロのhFc RII B mAbのADCC活性。

【図11】野生型またはN297Q hFc RII B mAbで染色されたヒト組織のIHC。

【図12】グリコシル化N297Q 6G11変異体は、内因性Fc依存性エフェクター活性を欠き、インビトロでADCCを誘発することができない。

【図13】hFc RII Bは、初代ヒトCLL細胞上でCD20よりもmAb誘発性内部移行に抵抗性である。

【図14】hFc RII Bマウスの作製及び特徴付け。

【図15】hFc RII mAb AT10はインビボで活性であり、B細胞のRit枯渇を増強する。

40

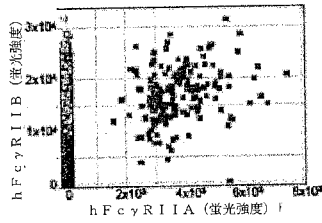
【図16】CLL細胞は、間質細胞との相互作用によりRit依存性枯渇から保護される。

【図17】hFc RII B mAb 6G11は、インビボでマントル細胞リンパ腫(MCL)細胞のRit枯渇を増強する。

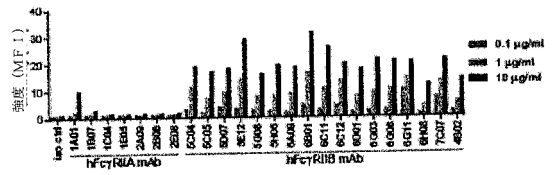
【図18】インビボの6G11のPK、PD、及びMABEL特性の査定。

【図19】インビトロの全血及び希釈血液(20% v/v)サイトカイン放出アッセイ。

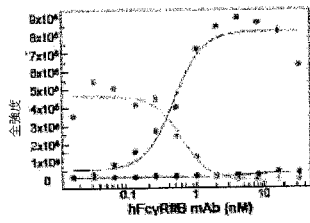
【 図 1 a 】



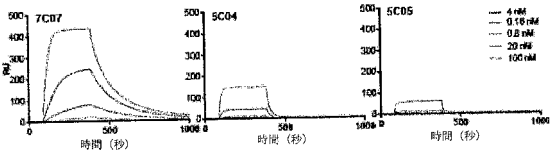
【 図 1 d 】



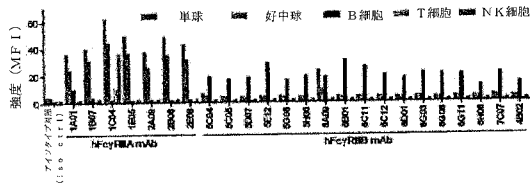
【 図 1 b 】



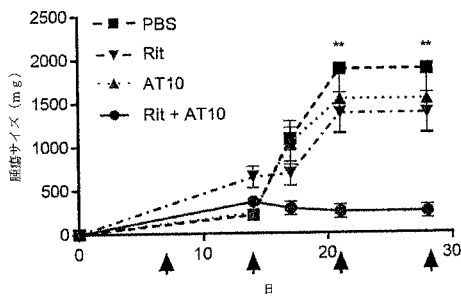
【 図 1 e 】



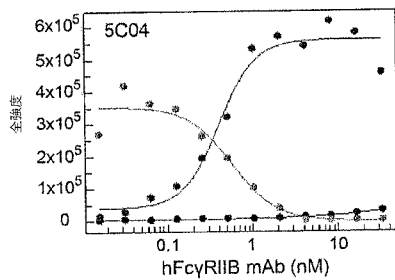
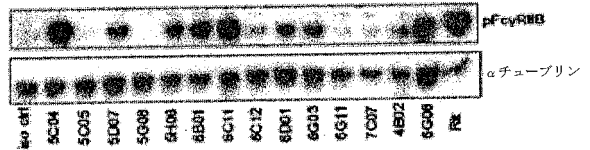
【 図 1 c 】



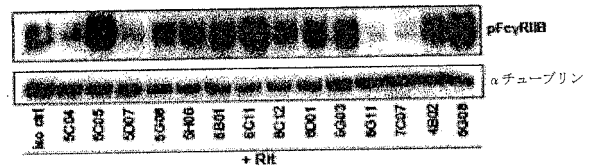
【 図 1 】



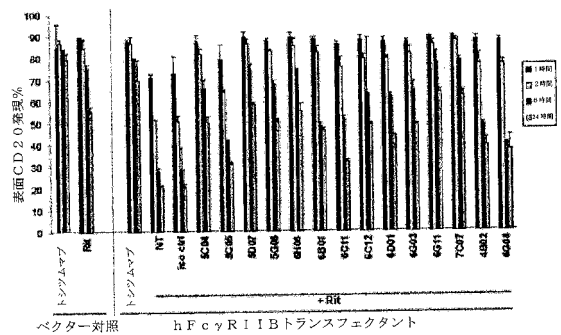
【 図 2 a 】



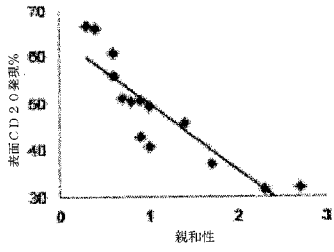
【 図 2 b 】



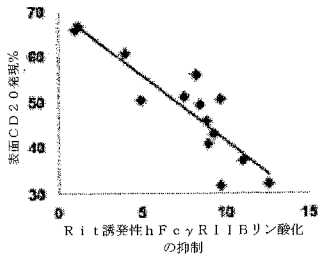
【 図 2 c 】



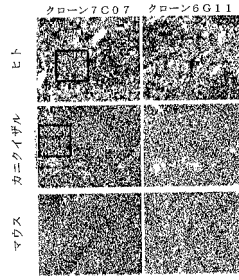
【 図 2 d 】



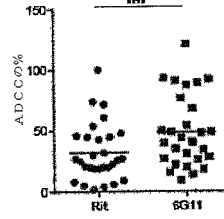
【 図 2 e 】



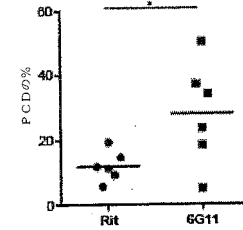
【 図 3 a 】



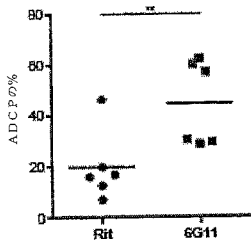
【 図 3 b 】



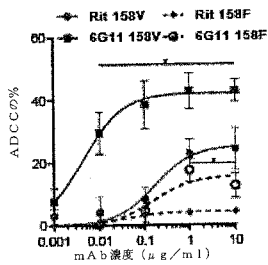
【 図 3 c 】



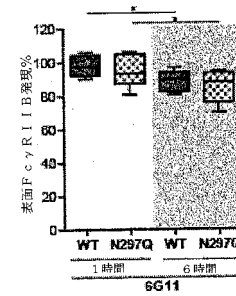
【 図 3 d 】



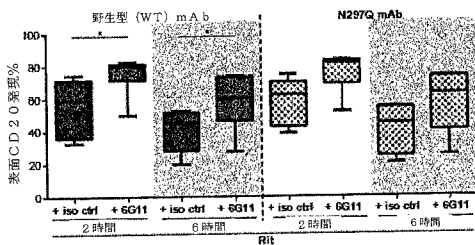
【 図 3 e 】



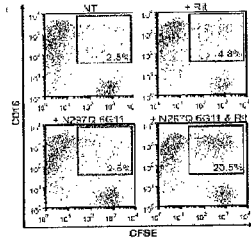
【 図 3 g 】



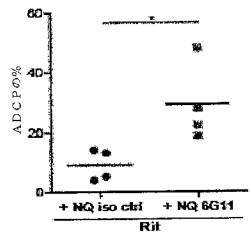
【 図 3 f 】



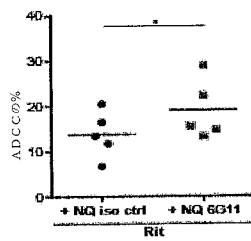
【 図 3 h 】



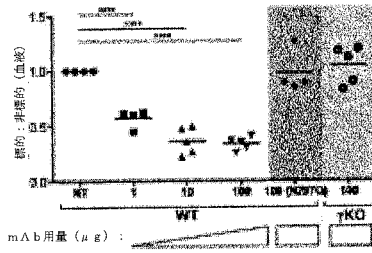
【 図 3 i 】



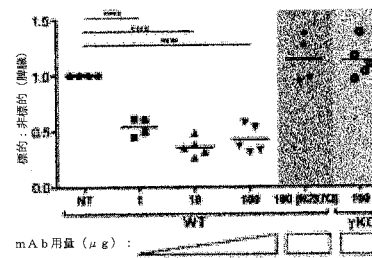
【 図 3 j 】



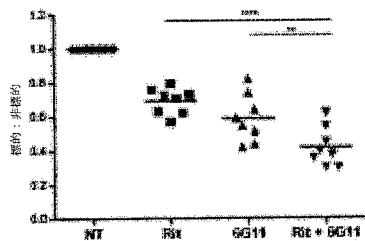
【 図 4 a 】



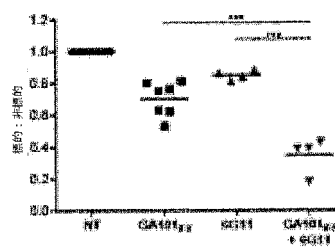
【 図 4 b 】



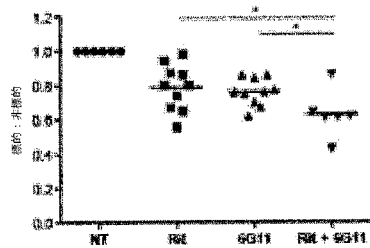
【 図 4 c 】



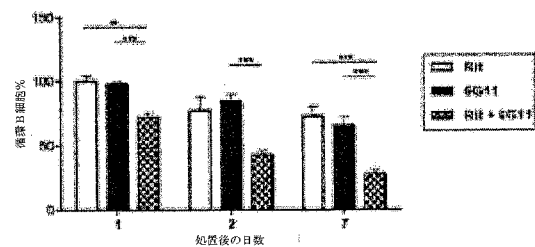
【 図 4 f 】



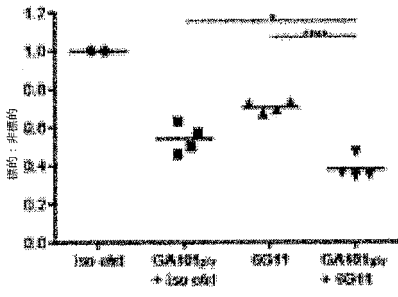
【 図 4 d 】



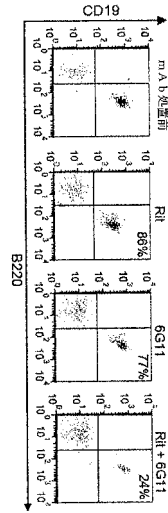
【 図 4 e 】



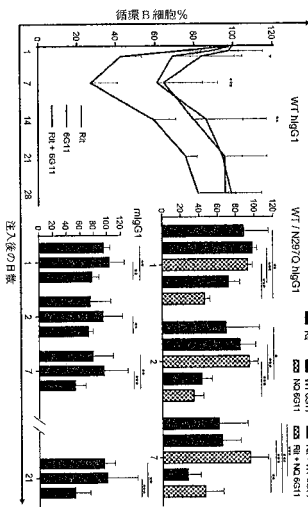
【 図 4 g 】



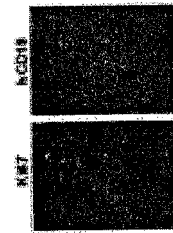
【 図 4 E 】



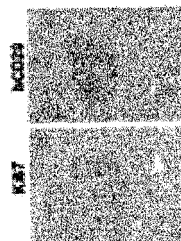
【 図 4 F 】



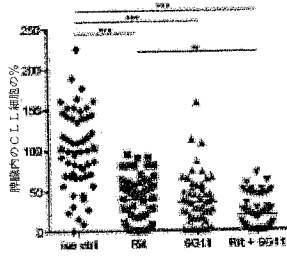
【 図 5 a 】



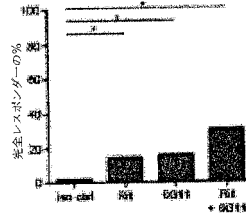
【 図 5 b 】



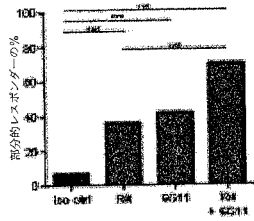
【 図 5 c 】



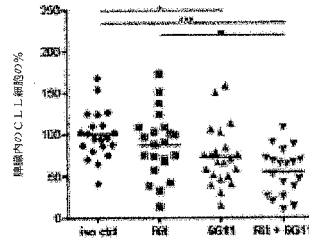
【 図 5 e 】



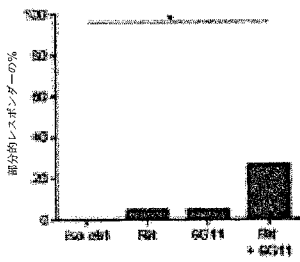
【 図 5 d 】



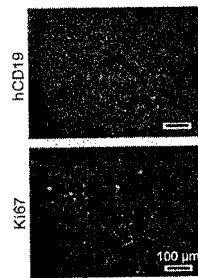
【 図 5 f 】



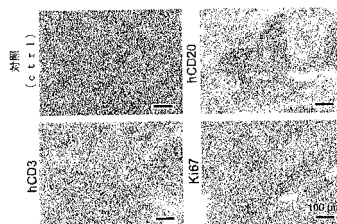
【 図 5 g 】



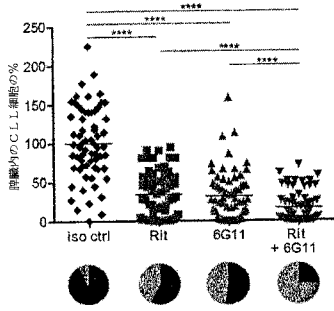
【 図 5 A 】



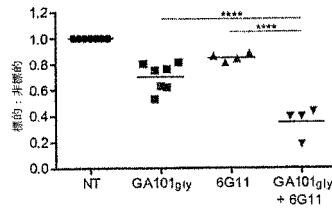
【 図 5 B 】



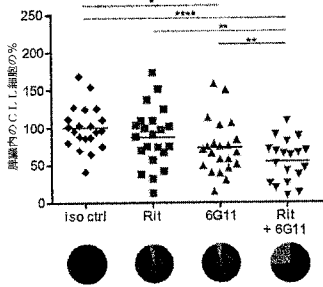
【 図 5 C 】



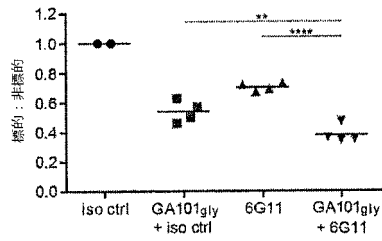
【 図 5 E 】



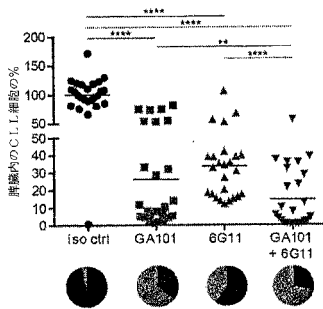
【 図 5 D 】



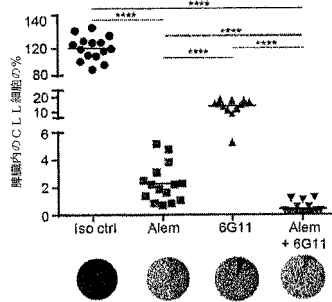
【 図 5 F 】



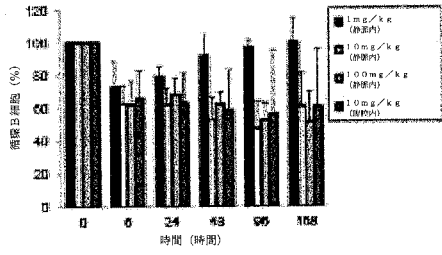
【 図 5 G 】



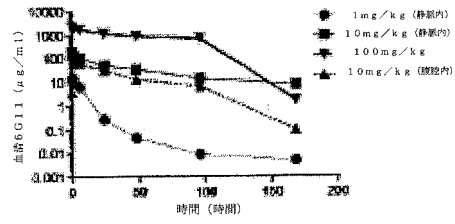
【 図 5 H 】



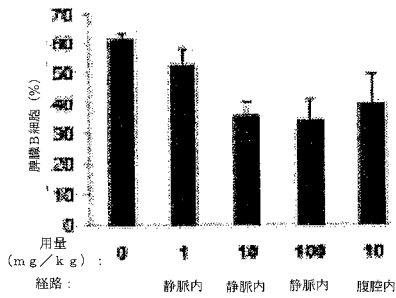
【 図 6 a 】



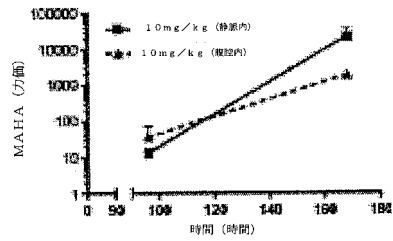
【 図 6 c 】



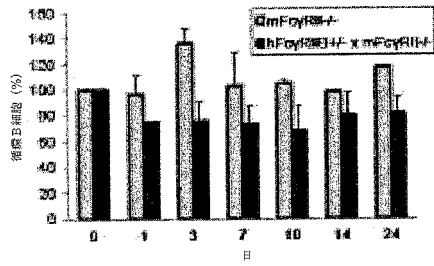
【 図 6 b 】



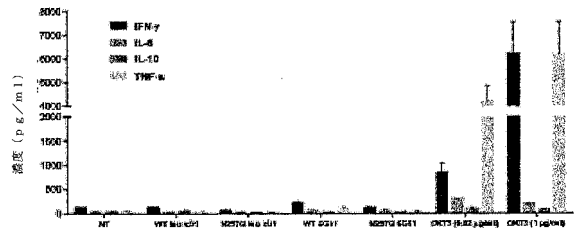
【 図 6 d 】



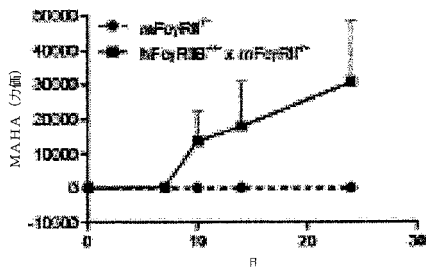
【 図 6 e 】



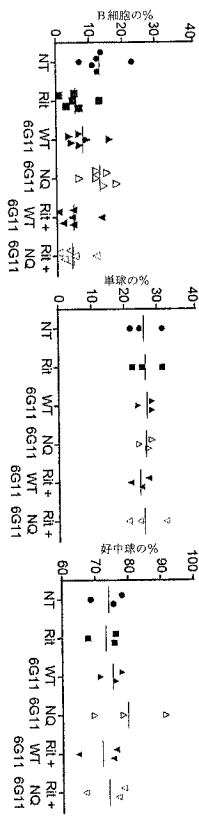
【 図 6 g 】



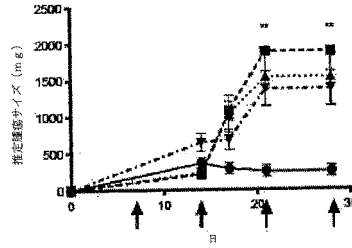
【 図 6 f 】



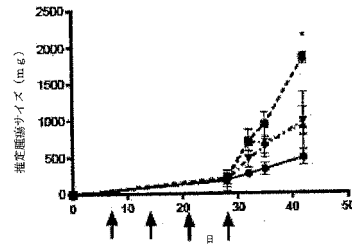
【 図 6 】



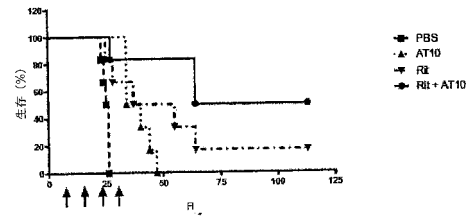
【 図 7 a 】



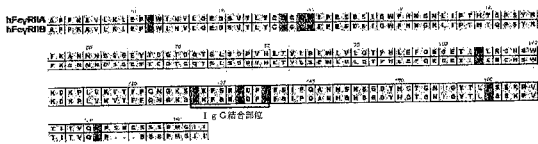
【 図 7 b 】



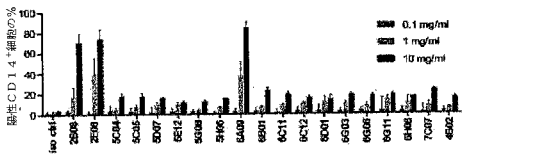
【 図 7 c 】



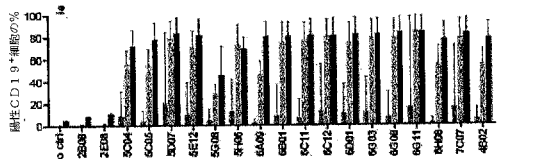
【 図 8 a 】



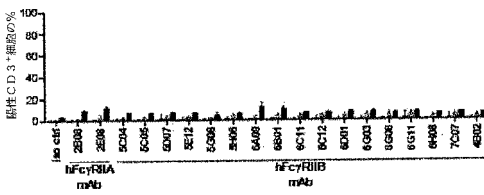
【 図 8 b 】



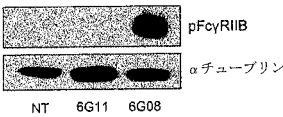
【 図 8 c 】



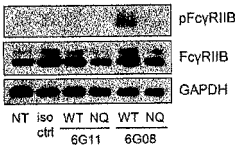
【 図 8 d 】



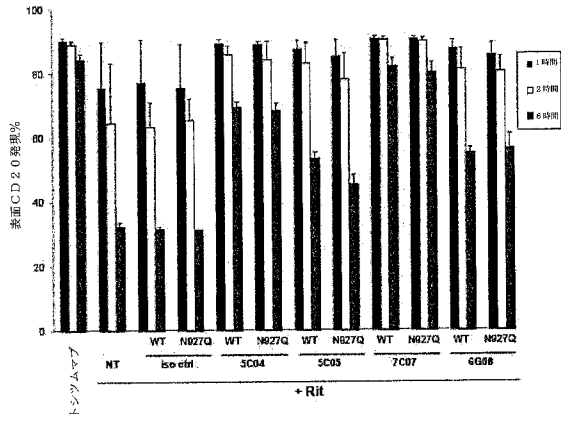
【 図 9 A 】



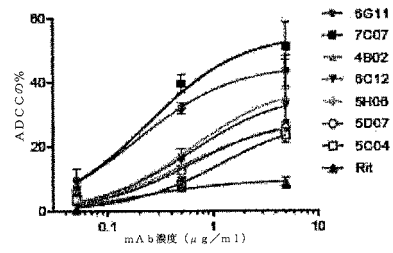
【 図 9 B 】



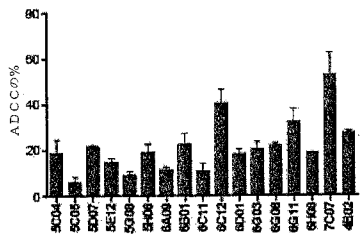
【 図 9 C 】



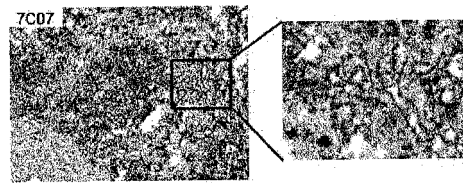
【 図 10 b 】



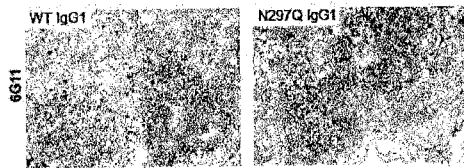
【 図 10 a 】



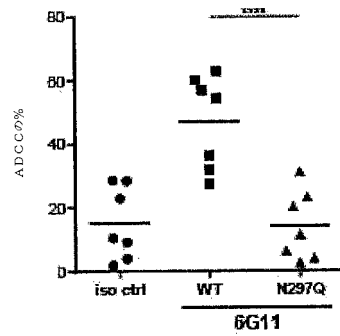
【 図 11 a 】



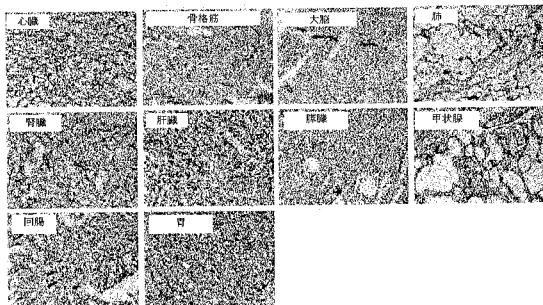
【 図 11 b 】



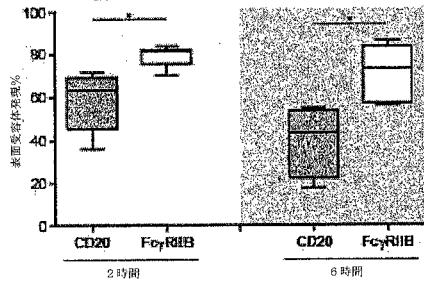
【 図 12 】



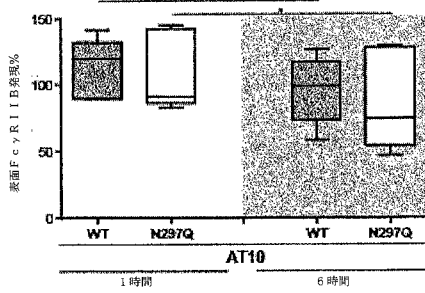
【 図 11 c 】



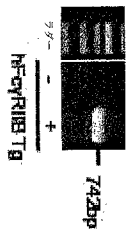
【 図 1 3 a 】



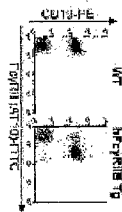
【 図 1 3 b 】



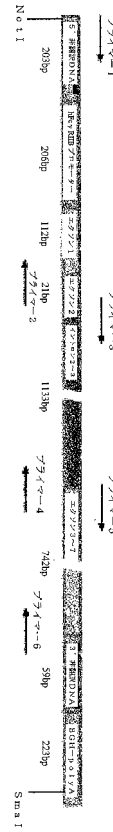
【 図 1 4 b 】



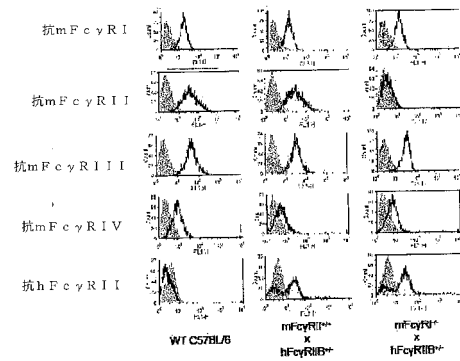
【 図 1 4 c 】



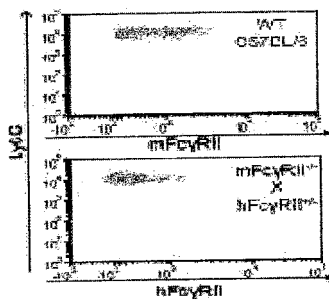
【 図 1 4 a 】



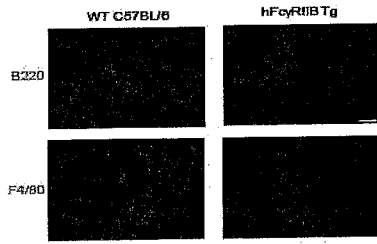
【 図 1 4 d 】



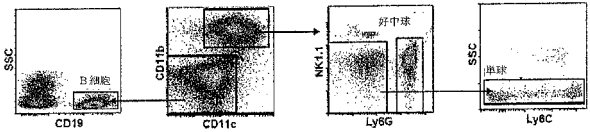
【 図 1 4 e 】



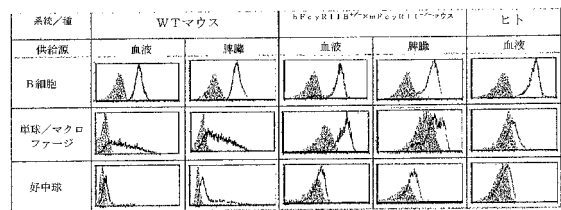
【 図 1 4 f 】



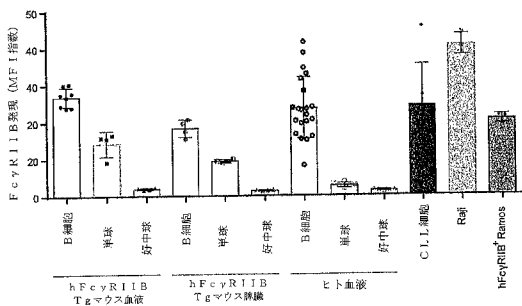
【 図 1 4 D 】



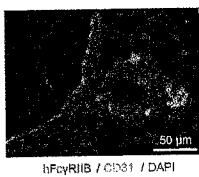
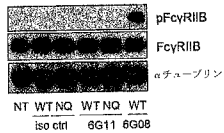
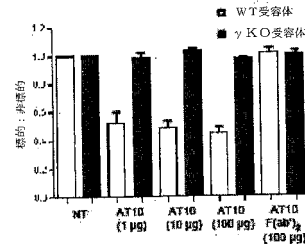
【 図 1 4 E 】



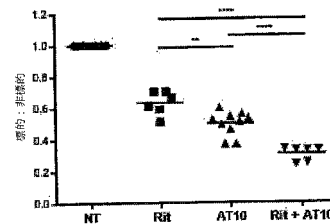
【 図 1 4 F 】



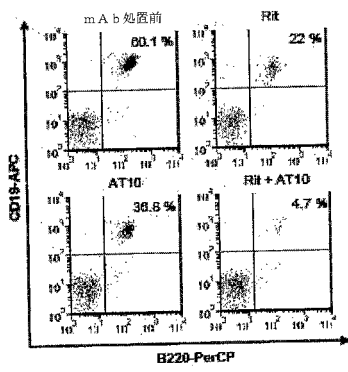
【 図 1 5 a 】



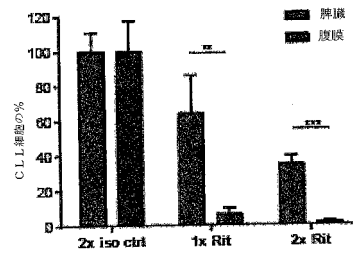
【 図 1 5 b 】



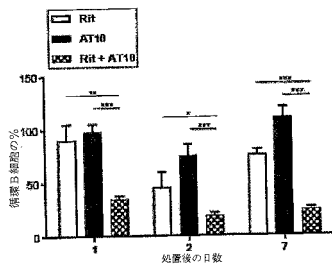
【 図 1 5 c 】



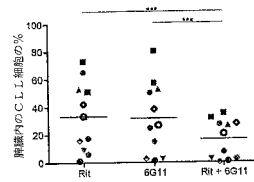
【 図 1 6 A 】



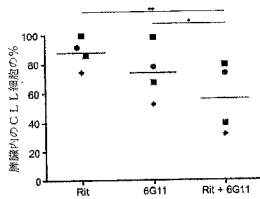
【 図 1 5 d 】



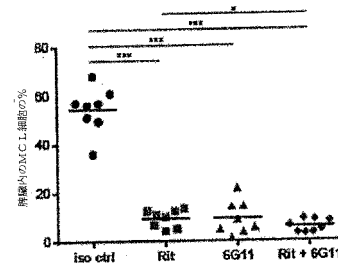
【 図 1 6 B 】



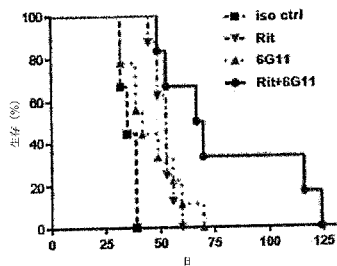
【 図 1 6 C 】



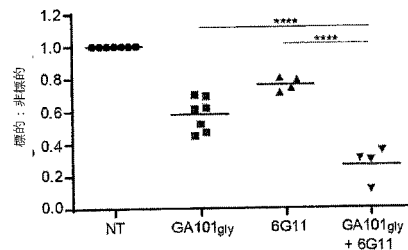
【 図 1 7 b 】



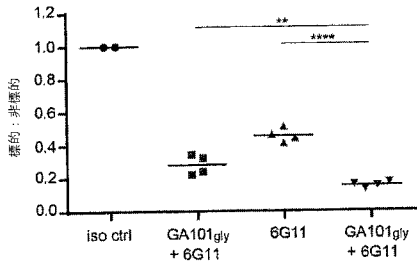
【 図 1 7 a 】



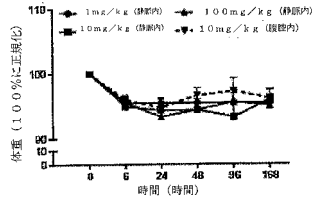
【 図 1 7 C 】



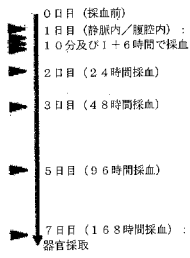
【 図 1 7 D 】



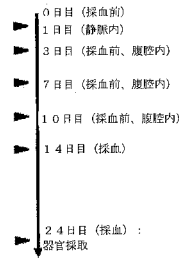
【 図 1 8 b 】



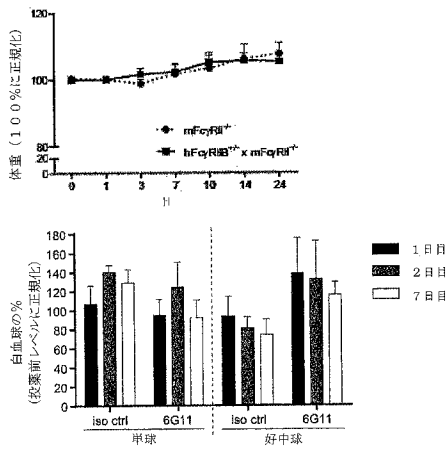
【 図 1 8 a 】



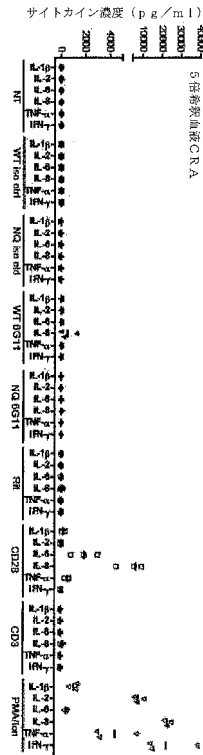
【 図 1 8 c 】



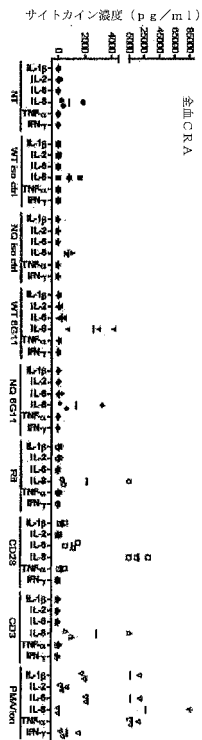
【 図 1 8 d 】



【 図 1 9 a 】



【図 19 b】



【配列表】

202111320200001.app

【手続補正書】

【提出日】令和3年5月7日(2021.5.7)

【手続補正 1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

明細書に記載の発明。

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			F I			テーマコード(参考)
A 6 1 K	9/08	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		D
A 6 1 K	9/48	(2006.01)	A 6 1 K	39/395		N
A 6 1 K	9/02	(2006.01)	A 6 1 K	9/20		
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	A 6 1 K	9/08		
			A 6 1 K	9/48		
			A 6 1 K	9/02		
			C 1 2 N	15/13		

(72)発明者 モーテンソン、リンダ
スウェーデン国 2 3 7 9 1 ビャーレッド、フェリ リリビーヴェーク 8

(72)発明者 クラッグ、マーク
イギリス国 サウサンプトン エスオー16 6ワイディー、ユニヴァーシティ オブ サウサン
プトン、ファカルティ オブ メディシン、キャンサー サイエンシズ ユニット、アンティボ
ディ アンド ヴァクシン グループ

(72)発明者 ログハニアン、アリ
イギリス国 サウサンプトン エスオー16 6ワイディー、ユニヴァーシティ オブ サウサン
プトン、ファカルティ オブ メディシン、キャンサー サイエンシズ ユニット、アンティボ
ディ アンド ヴァクシン グループ

F ターム(参考) 4C076 AA01 AA36 DD23 DD37 DD41 DD65 DD67 EE16 EE23 EE31
EE32 EE38 EE51
4C084 AA19 MA02 NA05 ZB26 ZB27
4C085 AA13 AA14 AA16 EE01 EE03