

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6847037号  
(P6847037)

(45) 発行日 令和3年3月24日 (2021.3.24)

(24) 登録日 令和3年3月4日 (2021.3.4)

(51) Int. Cl.

F I

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 Z N A T

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 37/04 (2006.01)

A 6 1 P 37/04

A 6 1 K 31/519 (2006.01)

A 6 1 K 31/519

請求項の数 23 (全 96 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-525045 (P2017-525045)  
 (86) (22) 出願日 平成27年11月10日 (2015.11.10)  
 (65) 公表番号 特表2017-534648 (P2017-534648A)  
 (43) 公表日 平成29年11月24日 (2017.11.24)  
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2015/076271  
 (87) 国際公開番号 W02016/075176  
 (87) 国際公開日 平成28年5月19日 (2016.5.19)  
 審査請求日 平成30年11月9日 (2018.11.9)  
 (31) 優先権主張番号 62/078,243  
 (32) 優先日 平成26年11月11日 (2014.11.11)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 米国 (US)

(73) 特許権者 506042265  
 メディミュン リミテッド  
 イギリス国 シービー21 6ジーエイチ  
 ケンブリッジシャー, ケンブリッジ, グ  
 ランタ パーク, ミルステイン ビルディ  
 ング  
 (74) 代理人 110002572  
 特許業務法人平木国際特許事務所  
 (72) 発明者 サッシェンメイヤー, クリス  
 アメリカ合衆国 20878 メリーラン  
 ド州, ゲイサーズバーグ, ワン メディミ  
 ユン ウェイ, メディミュン, エルエ  
 ルシー

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗CD73抗体とA2A受容体阻害薬とを含む併用治療薬及びその使用

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

A2A受容体阻害薬と併用して対象における腫瘍成長を阻害するための、抗CD73抗体を含む医薬組成物であって、前記抗CD73抗体が配列番号68のアミノ酸配列を含む軽鎖(VL)と配列番号82のアミノ酸配列を含む重鎖(VH)とを含むIgG1又はその抗原結合断片である、医薬組成物。

【請求項2】

A2A受容体阻害薬と併用して対象における抗腫瘍免疫応答を増加させるための、抗CD73抗体を含む医薬組成物であって、前記抗CD73抗体が配列番号68のアミノ酸配列を含む軽鎖(VL)と配列番号82のアミノ酸配列を含む重鎖(VH)とを含むIgG1又はその抗原結合断片である、医薬組成物。

【請求項3】

A2A受容体阻害薬と併用して対象の腫瘍を治療するための、抗CD73抗体を含む医薬組成物であって、前記抗CD73抗体が配列番号68のアミノ酸配列を含む軽鎖(VL)と配列番号82のアミノ酸配列を含む重鎖(VH)とを含むIgG1又はその抗原結合断片である、医薬組成物。

【請求項4】

抗CD73抗体と併用して対象における腫瘍成長を阻害するための、A2A受容体阻害薬を含む医薬組成物であって、前記抗CD73抗体が配列番号68のアミノ酸配列を含む軽鎖(VL)と配列番号82のアミノ酸配列を含む重鎖(VH)とを含むIgG1又はそ

の抗原結合断片である、医薬組成物。

【請求項 5】

抗 C D 7 3 抗体と併用して対象における抗腫瘍免疫応答を増加させるための、A 2 A 受容体阻害薬を含む医薬組成物であって、前記抗 C D 7 3 抗体が配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 ( V L ) と配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含む重鎖 ( V H ) とを含む I g G 1又はその抗原結合断片である、医薬組成物。

【請求項 6】

抗 C D 7 3 抗体と併用して対象の腫瘍を治療するための、A 2 A 受容体阻害薬を含む医薬組成物であって、前記抗 C D 7 3 抗体が配列番号 6 8 のアミノ酸配列を含む軽鎖 ( V L ) と配列番号 8 2 のアミノ酸配列を含む重鎖 ( V H ) とを含む I g G 1又はその抗原結合断片である、医薬組成物。

10

【請求項 7】

前記 A 2 A 受容体阻害薬が S C H 5 8 2 6 1 である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 8】

前記抗 C D 7 3 抗体と前記アデノシン受容体阻害薬 ( A 2 A R i ) とが同時に使用される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記抗 C D 7 3 抗体が前記アデノシン受容体阻害薬 ( A 2 A R i ) より前に使用される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

20

【請求項 10】

前記アデノシン受容体阻害薬 ( A 2 A R i ) が前記抗 C D 7 3 抗体より前に使用される、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 11】

前記腫瘍が、乳癌、ホルモン媒介性乳癌、トリプルネガティブ乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、肺癌、メラノーマ、非小細胞癌、リンパ腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、及び肉腫である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 12】

A 2 A 受容体阻害薬と併用した抗 C D 7 3 抗体を含む医薬組成物の投与又は抗 C D 7 3 抗体と併用した A 2 A 受容体阻害薬を含む医薬組成物の投与が、前記抗 C D 7 3 抗体又は前記 A 2 A 受容体阻害薬のいずれか一方の単独での投与と比較したときに全生存の増加をもたらす、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

30

【請求項 13】

A 2 A 受容体阻害薬と併用した抗 C D 7 3 抗体を含む医薬組成物の投与又は抗 C D 7 3 抗体と併用した A 2 A 受容体阻害薬を含む医薬組成物の投与が、腫瘍特異的免疫応答を誘導するか又は増加させる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 14】

A 2 A 受容体阻害薬と併用した抗 C D 7 3 抗体を含む医薬組成物の投与又は抗 C D 7 3 抗体と併用した A 2 A 受容体阻害薬を含む医薬組成物の投与が、A M P / C D 7 3 / アデノシン経路の免疫抑制効果を低減する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

40

【請求項 15】

A 2 A 受容体阻害薬と併用した抗 C D 7 3 抗体を含む医薬組成物の投与又は抗 C D 7 3 抗体と併用した A 2 A 受容体阻害薬を含む医薬組成物の投与が、前記抗 C D 7 3 抗体又は前記アデノシン受容体阻害薬 ( A 2 A R i ) のいずれかの単独での使用と比べて転移を低減するか、又は前記腫瘍が転移する傾向を低減する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 16】

A 2 A 受容体阻害薬と併用した抗 C D 7 3 抗体を含む医薬組成物の投与又は抗 C D 7 3 抗体と併用した A 2 A 受容体阻害薬を含む医薬組成物の投与が、前記対象における転移数

50

を低減する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 17】

前記対象がヒト患者である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 18】

前記腫瘍が CD73 過剰発現腫瘍である、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 19】

前記腫瘍が前転移性表現型を有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

【請求項 20】

抗腫瘍活性を増加させるためのキットであって、抗 CD73 抗体と A2A 受容体阻害薬とを含み、前記抗 CD73 抗体が配列番号 68 のアミノ酸配列を含む軽鎖 (VL) と配列番号 82 のアミノ酸配列を含む重鎖 (VH) とを含む IgG1 又はその抗原結合断片である、キット。

【請求項 21】

前記 A2A 受容体阻害薬が SCH58261 である、請求項 20 に記載のキット。

【請求項 22】

有効量の抗 CD73 抗体と A2A 受容体阻害薬とを含む、対象の腫瘍を治療するための医薬製剤であって、前記抗 CD73 抗体が配列番号 68 のアミノ酸配列を含む軽鎖 (VL) と配列番号 82 のアミノ酸配列を含む重鎖 (VH) とを含む IgG1 又はその抗原結合断片である、医薬製剤。

【請求項 23】

前記 A2A 受容体阻害薬が SCH58261 である、請求項 22 に記載の医薬製剤。

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

CD73 又はエクト - 5'ヌクレオチダーゼ (5' - NT) は幾つもの組織に普遍的に発現する。このタンパク質はグリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) 連結を介して細胞膜にアンカリングし、細胞外酵素活性を有し、シグナル伝達において役割を果たす。CD73 の主な機能は、概して細胞非透過性である細胞外ヌクレオチド (例えば 5' - AMP) を、多くの細胞に容易に進入し得るその対応するヌクレオシド (例えばアデノシン) に変換することである。CD73 の AMP 脱リン酸化によるアデノシン産生は多くの組織においてアデノシン受容体会合を調節することが示されており、アデノシンが細胞保護、細胞成長、血管新生及び免疫抑制において機能すると共に、腫瘍発生においても役割を果たすことが示唆される。

【0002】

膀胱癌、白血病、神経膠腫、膠芽腫、メラノーマ、卵巣癌、甲状腺癌、食道癌、前立腺癌、及び乳癌を含めた幾つかの種類の癌において、腫瘍細胞上の CD73 発現が報告されている。CD73 の発現上昇はまた、腫瘍侵襲性、転移、及び患者生存期間の低下とも関連付けられている。CD73 は、アデノシンレベルの増加によって特徴付けられる免疫抑制環境を作り出し、それが癌の発生及び進行を促進する。特に、CD73 発現は、メラノーマ及び乳癌における前転移性表現型と関連付けられている。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0003】

免疫チェックポイント阻害薬は、癌療法として多大な可能性を有している。それにも関わらず、免疫チェックポイント阻害の臨床的有益性はそれほど得られていない。1つの可能性のある説明は、腫瘍が重なりのない免疫抑制機構を用いて免疫エスケープを促進するというものである。従って、腫瘍媒介性免疫抑制を低減するための改良された組成物及び方法が喫緊に必要とされている。

10

20

30

40

50

## 【課題を解決するための手段】

## 【0004】

本発明は、C D 7 3 に特異的に結合する単離結合分子又はその抗原結合断片を提供する。一部の態様において、かかるC D 7 3 結合分子は、例えば抗体又はその抗原結合断片である。詳細な実施形態において、本発明の抗C D 7 3 抗体（例えば、M E D I 9 4 4 7）は、腫瘍媒介性免疫抑制の低減に有用である。

## 【0005】

一態様において、本発明は、概して、対象の腫瘍成長を阻害する方法であって、抗C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片とA 2 A受容体阻害薬とを、それを必要としている対象に投与するステップを含む方法を提供する。

10

## 【0006】

別の態様において、本発明は、対象の抗腫瘍免疫応答を増加させる方法であって、抗C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片とA 2 A受容体阻害薬とを、それを必要としている対象に対象に投与するステップを含む方法を提供する。

## 【0007】

更なる態様において、本発明は、対象の腫瘍を治療する方法であって、抗C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片とA 2 A受容体阻害薬とを、それを必要としている対象に投与するステップを含む方法を提供する。

## 【0008】

提供される本発明の態様のいずれかの1つ又は複数の実施形態において、抗C D 7 3 抗体はM E D I 9 4 4 7 又はその抗原結合断片である。別の実施形態において、抗C D 7 3 抗体はP h e n 0 2 0 3 h I g G 1 又はその抗原結合断片である。更に別の実施形態において、A 2 A受容体阻害薬はS C H 5 8 2 6 1 である。更なる実施形態において、C D 7 3 阻害薬はアデノシン5'-( $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン)ニリン酸(A P C P)である。更に別の実施形態において、抗C D 7 3 抗体はM E D I 9 4 4 7 又はその抗原結合断片であり、且つA 2 A受容体阻害薬はS C H 5 8 2 6 1 である。更なる実施形態において、抗C D 7 3 抗体はP h e n 0 2 0 3 h I g G 1 又はその抗原結合断片であり、且つA 2 A受容体阻害薬はS C H 5 8 2 6 1 である。更に別の実施形態において、抗C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片又はアデノシン受容体阻害薬(A 2 A R i)は同時に投与される。更なる実施形態において、抗C D 7 3 抗体はアデノシン受容体阻害薬(A 2 A R i)より前に投与される。他の実施形態において、アデノシン受容体阻害薬(A 2 A R i)は抗C D 7 3 抗体より前に投与される。他の実施形態において、腫瘍は、乳癌、ホルモン媒介性乳癌、トリプルネガティブ乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、肺癌、メラノーマ、非小細胞癌、リンパ腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、及び肉腫である。別の実施形態において、本方法は、抗C D 7 3 抗体又はA 2 A受容体阻害薬のいずれか一方の単独での投与と比較したときに全生存の増加をもたらす。他の実施形態において、本方法は腫瘍特異的免疫応答を誘導するか又は増加させる。別の実施形態において、本方法はA M P / C D 7 3 / アデノシン経路の免疫抑制効果を低減する。更なる実施形態において、本方法は、抗C D 7 3 抗体又はアデノシン受容体阻害薬(A 2 A R i)のいずれかの単独での投与と比べて転移を低減するか、又は腫瘍が転移する傾向を低減する。更に別の実施形態において、本方法は対象における転移数を低減する。特定の実施形態において、対象はヒト患者である。更に別の実施形態において、腫瘍はC D 7 3 過剰発現腫瘍である。他の実施形態において、癌は前転移性表現型を有する。

20

30

40

## 【0009】

別の態様において、本発明は、抗腫瘍活性を増加させるためのキットを提供し、このキットは、抗C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片とA 2 A受容体阻害薬とを含む。この態様のある実施形態において、抗C D 7 3 抗体はM E D I 9 4 4 7 又はその抗原結合断片である。この態様の別の実施形態において、抗C D 7 3 抗体はP h e n 0 2 0 3 h I g G 1 又はその抗原結合断片である。この態様の更に別の実施形態において、A 2 A受容体阻害薬はS C H 5 8 2 6 1 である。別の実施形態において、抗C D 7 3 抗体はM E D I 9 4 4

50

7又はその抗原結合断片であり、且つA2A受容体阻害薬はSCH58261である。更なる実施形態において、抗CD73抗体はPhen0203 hIgG1又はその抗原結合断片であり、且つA2A受容体阻害薬はSCH58261である。

【0010】

別の態様において、本発明は、有効量の抗CD73抗体又はその抗原結合断片とA2A受容体阻害薬とを含む医薬製剤を提供する。この態様のある実施形態において、抗CD73抗体はMED I 9 4 4 7又はその抗原結合断片である。別の実施形態において、抗CD73抗体はPhen0203 hIgG1又はその抗原結合断片である。更に別の実施形態において、A2A受容体阻害薬はSCH58261である。更なる実施形態において、抗CD73抗体はMED I 9 4 4 7又はその抗原結合断片であり、且つA2A受容体阻害薬はSCH58261である。特定の実施形態において、抗CD73抗体はPhen0203 hIgG1又はその抗原結合断片であり、且つA2A受容体阻害薬はSCH58261である。

【図面の簡単な説明】

【0011】

【図1A】MED I 9 4 4 7 VHドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸翻訳を示し、CDRはKab at付番規則に基づき示している。

【図1B】MED I 9 4 4 7 VLドメインのヌクレオチド配列及びアミノ酸翻訳を示し、CDRはKab at付番規則に基づき示している。

【図1C】MED I 9 4 4 7 VHと最も近縁のヒトVH及びJH生殖系列配列とのアラインメントである。Kab at付番規則に基づくCDRを強調表示し、生殖系列配列と異なる残基に囲みを付す。

【図1D】MED I 9 4 4 7 VLと最も近縁のヒトVL及びJL生殖系列配列とのアラインメントを示す。Kab at付番規則に基づくCDRを強調表示し、生殖系列配列と異なる残基に囲みを付す。

【図2】MDA-MB-231細胞及び4T1細胞への細胞毒性FabZAP試薬の抗体媒介性インターナリゼーションを示す2つのグラフを提供し、ここで、抗体はMED I 9 4 4 7及び対照抗体R347である。

【図3A】抗CD73抗体MED I 9 4 4 7による5'エクトヌクレオチダーゼの阻害を示すグラフである。

【図3B】抗CD73抗体CD370010によるAMP加水分解の阻害を示すグラフである。

【図4】MED I 9 4 4 7がCT26同系腫瘍モデルにおいて腫瘍成長を阻害したことを示すグラフである。マウスCT26腫瘍細胞を雌Balb/Cマウスの右側腹部に皮下移植した。腫瘍を3日間成長させて、MED I 9 4 4 7又はアイソタイプ対照で週2回、2週間にわたって治療した。16日目に腫瘍を回収してフローサイトメトリー分析にかけた。

【図5】MED I 9 4 4 7が腫瘍浸潤性骨髓系由来サプレッサー細胞(MDSC)を阻害したことを示すグラフである。試験16日目に、MED I 9 4 4 7で治療したCT26腫瘍担持マウスを犠牲にし、腫瘍を回収した。腫瘍を単細胞に解離し、CD45及びMDSCマーカーに関して染色し、フローサイトメトリーによって分析した。

【図6】腫瘍容積に対するMED I 9 4 4 7 mIgG1、抗PD-1又は併用の効果を示す6つのスパイダープロットを含む。対照抗体としては、rIgG2a(これは、大腸菌(E.coli)β-ガラクトシダーゼ(β-Gal)に特異的なラットIgG2a対照モノクローナルラット抗体である)、及びアイソタイプ対照マウスのIgG1が含まれる。試験40日目までの各動物群の腫瘍容積を個々の動物についてプロットした。対照群には、40日間の試験期間の終わりまで腫瘍がなかったマウスはいなかった。抗CD73治療単独では、試験終了時に腫瘍がなかった動物は10%であった。抗PD-1治療単独も、試験終了時に腫瘍がなかった動物は10%であった。顕著なことに、抗CD73と抗PD-1との併用治療では、腫瘍がなかったマウスは60%であった。対照群には、試験の終

10

20

30

40

50

わりまで腫瘍がなかったマウスは一匹もいなかった。

【図7】MEDI9447 mIgG1、抗PD-1又は併用が腫瘍容積に及ぼす効果を示すグラフである。

【図8】MEDI9447 mIgG1、抗PD-1又は併用が生存に及ぼす効果を示すグラフである。

【図9】Phen0203 hIgG1抗体がCD4 + CD25 - T細胞増殖のAMP媒介性抑制に及ぼす効果を示すグラフである。

【図10】SCH58261がCD4 + CD25 - T細胞増殖のAMP媒介性抑制に及ぼす効果を示すグラフである。

【図11】抗CD73及びSCH58261が、単独で又は併用で混合白血球反応においてIFN $\gamma$ 上清レベルに及ぼす効果を示すグラフである。

【図12】抗CD73及びSCH58261が、単独で又は併用で混合白血球反応においてTNF $\alpha$ 上清レベルに及ぼす効果を示すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【0012】

本発明は、CD73に特異的に結合する単離結合分子又はその抗原結合断片を提供する。一部の態様において、かかる分子は、CD73に特異的に結合する抗体及びその抗原結合断片である。関連するポリヌクレオチド、ベクター、抗CD73抗体又はその抗原結合断片を含む医薬組成物も提供される。また、本明細書に開示される抗CD73抗体及び抗原結合断片の作製方法並びに使用方法、例えば、診断方法及び対象における癌の治療方法（直接療法、アジュバント療法としての、又は併用療法での）も提供される。本発明はまた、本明細書に開示されるCD73結合分子から得られる抗体-薬物コンジュゲートも提供する。

【0013】

本開示を更に容易に理解し得るように、初めに特定の用語を定義する。追加的な定義は詳細な説明全体を通じて示される。

【0014】

#### I. 定義

本発明を詳細に説明する前に、この発明が特定の組成物又は方法ステップに限定されず、それらは異なってもよいことが理解されるべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるとき、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」及び「その(the)」は、文脈上特に明確に指示されない限り複数の指示対象を含む。用語「1つの(a)」(又は「1つの(an)」)、並びに用語「1つ以上」及び「少なくとも1つ」は、本明細書では同義的に使用することができる。

【0015】

更に、「及び/又は」は、本明細書で使用される場合、2つの指定される特徴又は構成要素の各々の、他方を伴う又は伴わない具体的な開示と解釈されるべきである。従って、用語及び/又はは、本明細書で「A及び/又はB」などの語句で用いられるとき、「A及びB」、「A又はB」、「A」(単独)、及び「B」(単独)を含むことが意図される。同様に、用語「及び/又は」は、「A、B、及び/又はC」などの語句で用いられるとき、以下の態様の各々を包含することが意図される：A、B、及びC；A、B、又はC；A又はC；A又はB；B又はC；A及びC；A及びB；B及びC；A(単独)；B(単独)；及びC(単独)。

【0016】

特に定義されない限り、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本開示が関係する技術分野の当業者が一般に理解するのと同じ意味を有する。例えば、Concise Dictionary of Biomedicine and Molecular Biology, Juo, Pei - Show, 2nd ed., 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 3rd ed., 1999, Academic Press; 及びO

10

20

30

40

50

xford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, Revised, 2000, Oxford University Press が、本開示で使用する用語の多くの一般的な辞書を当業者に提供する。

#### 【0017】

単位、接頭辞、及び記号は、それらの国際単位系 (SI) で認められている形式で示される。数値範囲は、その範囲を定義する数を含む。特に指示されない限り、アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシ方向に記載する。本明細書に提供される見出しは、本明細書を全体として参照することによって有され得る種々の態様の限定ではない。従って、この直後に定義する用語は、本明細書を全体として参照することによって更に十全に定義される。

10

#### 【0018】

本明細書において態様が用語「～を含む (comprising)」を用いて記載される場合は常に、「～からなる (consisting of)」及び/又は「～から本質的になる (consisting essentially of)」の用語で記載される他の点では類似の態様も提供されることが理解される。

#### 【0019】

アミノ酸は、本明細書において、その一般に知られている三文字記号によるか、又は IUPAC - IUB 生化学命名委員会 (Biochemical Nomenclature Commission) が推奨する一文字記号により参照される。ヌクレオチドも同様に、その一般に認められている一文字コードによって参照される。

20

#### 【0020】

用語「CD73 ポリペプチド」は、本明細書で使用されるとき、文献中では 5' - ヌクレオチダーゼ (5' - NT) 又はエクト - 5' - ヌクレオチダーゼとも称される、NT5E 遺伝子によってコードされる CD73 (分化クラスター 73) タンパク質を指す。例えば、Misumi et al. Eur. J. Biochem. 191 (3): 563 - 9 (1990) を参照のこと。ヒト型及びマウス型 CD73 のそれぞれの配列は、UniProt データベースで、それぞれ受託番号 P21589 及び Q61503 に基づき入手可能である。

#### 【0021】

例示的 CD73 ポリペプチドを以下に提供する。

30

> sp | P21589 | 5NTD\_\_ヒト 5' - ヌクレオチダーゼ OS = ヒト (Homo sapiens) GN = NT5E PE = 1 SV = 1

#### 【化 1】

MCPRARAPATLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHSRLEQTSSESSKCVNASRCMGG  
VARLFTKVQQIRRAEPNVLLLDAGDQYQGTIWFVYKGA EVAHFMNALRYDAMALGNHEF  
DNGVEGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDEVVGIVGYTSKE  
TPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKLTNLNVNKIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVV  
GGHSNTFLYTGNNPSKEVPAGKYPFIVTSDDGRKVPVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNV  
ISSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYLDGSSQSCRFRECNM  
GNLICDAMINNNLRHTDEMFVNHVSMCILNGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVLPFGGT  
FDLVQLKGSTLKKAFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVDLSRKPGDRVVKLDVLCTKCR  
VPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDSGDQDINVVSTYISKMKVIYP  
AVEGRIKFSTGSHCHGSFSLIFLSLWAVIFVLYQ

40

#### 【0022】

可溶性形態及び膜結合形態の CD73 が同定されている。Klemens et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. 172 (3): 1371 - 7 (1990) を参照のこと。加えて、幾つかの異なるアイソザイムが同定されている。

50

R o s i e t a l . L i f e S c i . 6 2 ( 2 5 ) : 2 2 5 7 - 6 6 ( 1 9 9 8 )  
 を参照のこと。完全長CD73タンパク質は574アミノ酸を含む。成熟CD73タン  
 パク質はシグナル配列(1~26位)及びプロペプチドのC末端領域(550~574位)  
 の除去後に産生される。加えて、CD73のアイソフォーム2では選択的スプライシング  
 後にアミノ酸404~453が除去される。例えば、変異体C358Y、変異体T376  
 A、及び変異体M379Tなど、天然変異体も知られている。M i s u m i e t a l  
 . , E u r . J . B i o c h e m . 1 9 1 : 5 6 3 - 5 6 9 ( 1 9 9 0 ) ; O t s u k i  
 e t a l . D N A R e s . 1 2 : 1 1 7 - 1 2 6 ( 2 0 0 5 ) ; M u n g a l l  
 e t a l . N a t u r e 4 2 5 : 8 0 5 - 8 1 1 ( 2 0 0 3 ) ; H a n s e n e t  
 a l . G e n e 1 6 7 : 3 0 7 - 3 1 2 ( 1 9 9 5 ) ; K l e m e n s e t a l  
 . B i o c h e m . B i o p h y s . R e s . C o m m u n . 1 7 2 : 1 3 7 1 - 1 3 7  
 7 ( 1 9 9 0 ) ; K n a p p e t a l . S t r u c t u r e 2 0 : 2 1 6 1 - 2 1  
 7 3 ( 2 0 1 2 ) ; 又はS t . H i l a i r e e t a l . N . E n g l . J . M e d  
 . 3 6 4 : 4 3 2 - 4 4 2 ( 2 0 1 1 ) (これらは全て、全体として参照により本明細書  
 に援用される)を参照のこと。

10

#### 【0023】

従って、本明細書に開示されるCD73結合分子は、例えば、癌(例えば、乳癌(ホル  
 モン媒介性乳癌を含む、例えば、I n n e s e t a l . ( 2 0 0 6 ) B r . J . C a  
 n c e r 9 4 : 1 0 5 7 - 1 0 6 5を参照)、トリプルネガティブ乳癌、結腸癌、結腸  
 直腸癌、肺癌、メラノーマ、非小細胞癌、リンパ腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、  
 パーキットリンパ腫、及び肉腫)の治療又は診断に使用することができる。加えて、本明  
 細書に開示されるCD73結合分子を使用した患者由来試料(例えば組織液)中のCD7  
 3レベルの計測を用いることにより、上述の疾患の発生をモニタし、療法の有効性を評価  
 し、特定の療法による治療に患者を選定し、又は医学的判断を下し、例えば、特定の治療  
 を開始し、終了し、中断し、若しくは修正することができる。

20

#### 【0024】

用語「アデノシンA2A受容体(ADORA2A)ポリペプチド」は、本明細書で使用  
 されるとき、NP\_\_000666と少なくとも約85%のアミノ酸配列同一性を有するタ  
 ンパク質又はその断片であって、且つアデノシン結合及びGタンパク質シグナル伝達活性  
 を有するタンパク質又はその断片を指す。ヒト型及びマウス型のアデノシンA2A受容体  
 のそれぞれの配列は、UniProtデータベースにおいて、それぞれ受託番号P292  
 74及びQ60613で利用可能である。

30

#### 【0025】

例示的アデノシンA2A受容体ポリペプチドを以下に提供する。

> sp | P29274 | AA2AR\_\_ヒトアデノシン受容体A2a OS = ヒト(Hom  
 o sapiens) GN = ADORA2A PE = 1 SV = 2

#### 【化2】

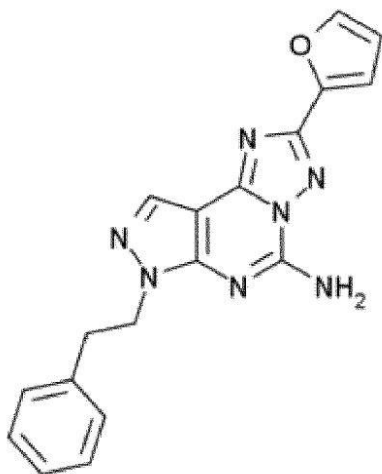
MPIMGSSVYITVELAIAVLAILGNVLVCWAVWLNSNLQNVNTNYFVVSLAAADIAGVLAIPFAITI  
 TGFCACHGCLFIACFVLVLTQSSIFSLAIAIDRYIAIRIPLRYNGLVTGTR  
 AKGHIAICWVLSFAIGLTPMLGWNNCGQPKEGKNHSQGCQGVACLFEDVVPNMNYMVYF  
 NFFACVLVPLLLMLGVYLRIFLAARRQLKQMESQPLGERARSTLQKEVHAAKSLAIIVG  
 LFALCWLPLHIINCFTFFCPDCSHAPLWLMYLAIVLSHTNSVVNPFYAYRIREFRQTFR  
 KIIRSHVLRQQEPFKAAGTSARVLAAHGSDGEQVSLRLNGHPPGVWANGSAPHERRPNG  
 YALGLVSGGSAQESQGNTGLPDVELLSHELKGVCPPEPGLDDPLAQDGAGVS

40

#### 【0026】

「SCH58261」とは、以下の構造式：

## 【化 3】



10

、CAS 160098-96-4を有し、且つアデノシンA<sub>2</sub>A受容体結合及び阻害活性を有する小化合物を意味する。

## 【0027】

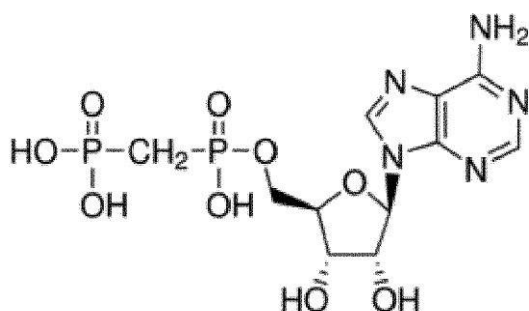
「アデノシンA<sub>2</sub>A受容体阻害薬(A<sub>2</sub>ARi)」とは、アデノシンA<sub>2</sub>A受容体のGタンパク質シグナル伝達活性を阻害する薬剤を意味する。一実施形態において、A<sub>2</sub>A受容体活性の阻害は、混合リンパ球刺激アッセイでTNF $\alpha$ 分泌を計測することによって計測され、ここではTNF $\alpha$ の増加がアデノシンA<sub>2</sub>A受容体活性の阻害を示す。

20

## 【0028】

「アデノシン5'-( $\alpha$ ,  $\beta$ -メチレン)ニリン酸(APCP)」とは、以下の構造式：

## 【化 4】



30

、CAS 3768-14-7を有し、且つCD73酵素阻害活性を有する小化合物を意味する。

## 【0029】

用語「阻害する」、「遮断する」、「抑制する」、及びその文法上の変化形は、本明細書では同義的に使用され、活性の完全な遮断を含め、生物学的活性の任意の統計学的に有意な減少を指す。例えば、「阻害」は、生物学的活性の約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%又は100%の減少を指し得る。従って、例えばCD73の酵素活性に対する効果を記載するために用語「阻害」又は「抑制」が用いられるとき、この用語は、抗CD73抗体又はその抗原結合断片がCD73の5'-ヌクレオチダーゼ活性(アデノシン-リン酸、AMPからアデノシンへの加水分解を異化(catabolizing)する)を、未処理(対照)細胞のCD73媒介性5'-ヌクレオチダーゼ活性と比べて統計学的に有意に減少させる能力を指す。CD73を発現する細胞は天然に存在する細胞若しくは細胞株(例えば癌細胞)であってもよく、又はCD73をコードする核酸を宿主細胞に導入することによって組換え産生されてもよい。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、生体液中の可溶性形態のCD7

40

50

3の5'-ヌクレオチダーゼ活性を統計学的に有意に減少させることができる。一態様において、抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片は、CD73媒介性5'-ヌクレオチダーゼ活性を、例えば以下の実施例に記載する方法及び/又は当該技術分野において公知の方法によって決定するとき少なくとも10%、少なくとも15%、又は少なくとも20%、少なくとも25%、又は少なくとも30%、少なくとも35%、又は少なくとも40%、少なくとも45%、又は少なくとも50%、少なくとも55%、又は少なくとも60%、少なくとも65%、又は少なくとも70%、少なくとも75%、又は少なくとも80%、少なくとも85%、又は少なくとも90%、少なくとも95%、又は約100%阻害する。

#### 【0030】

用語「CD73活性を抑制する」は、本明細書で使用されるとき、抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片が、CD73を発現する細胞又はCD73を含有する試料におけるCD73依存性5'-ヌクレオチダーゼ活性を統計学的に有意に減少させる能力を指す。一部の態様において、CD73活性の抑制は、細胞又は試料を本開示の抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片に接触させたとき、抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片の非存在下（対照条件）で計測したCD73活性と比べて少なくとも10%、又は少なくとも15%、又は少なくとも20%、又は少なくとも25%、又は少なくとも30%、又は少なくとも35%、又は少なくとも40%、又は少なくとも45%、又は少なくとも50%、又は少なくとも55%、又は少なくとも60%、又は少なくとも65%、又は少なくとも70%、又は少なくとも75%、又は少なくとも80%、又は少なくとも85%、又は少なくとも90%、又は少なくとも95%、又は約100%の減少であり得る。

#### 【0031】

本明細書で同義的に使用されたとおりの用語「抗体」又は「免疫グロブリン」は、全抗体及びその任意の抗原結合断片若しくは単鎖を含む。

#### 【0032】

典型的な抗体は、ジスルフィド結合によって相互に接続した少なくとも2本の重(H)鎖及び2本の軽(L)鎖を含む。各重鎖は重鎖可変領域（本明細書ではV<sub>H</sub>又はV<sub>H</sub>と省略する）と重鎖定常領域とを含む。重鎖定常領域は3つのドメイン、CH1、CH2、及びCH3を含む。各軽鎖は軽鎖可変領域（本明細書ではV<sub>L</sub>又はV<sub>L</sub>と省略する）と軽鎖定常領域とを含む。軽鎖定常領域は1つのドメイン、CLを含む。V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>領域は、フレームワーク領域（FW）と呼ばれるより保存された領域が間に入った、相補性決定領域（CDR）と呼ばれる超可変領域に更に細分することができる。各V<sub>H</sub>及びV<sub>L</sub>は、アミノ末端からカルボキシ末端に以下の順番：FW1、CDR1、FW2、CDR2、FW3、CDR3、FW4で並んだ3つのCDRと4つのFWとを含む。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、種々の免疫系細胞（例えばエフェクター細胞）及び古典的補体系の第1成分（C1q）を含めた宿主組織又は因子に対する免疫グロブリンの結合を媒介することができる。本開示の例示的抗体としては、抗CD73抗体（オリジナル及び生殖細胞系列化されたもの）、親和性最適化クローン、ADCC欠損最適化抗体、コンジュゲート抗体（例えばADC）、及び他の最適化抗体（例えば、血清半減期最適化抗体、例えばYTE突然変異、Dall'Aquila et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24(2006)及び米国特許第7,083,784号明細書（本明細書によって全体として参照により援用される）を参照）が挙げられる。

#### 【0033】

用語「生殖細胞系列化」は、抗体の特定の位置にあるアミノ酸が生殖細胞系列のものに復帰突然変異することを意味する。

#### 【0034】

用語「抗体」は、免疫グロブリン分子の可変領域内の少なくとも1つの抗原認識部位を介してタンパク質、ポリペプチド、ペプチド、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、又は

10

20

30

40

50

前述の組み合わせなどの標的を認識し、それに特異的に結合する免疫グロブリン分子を意味する。本明細書で使用されるとき、用語「抗体」は、その抗体が所望の生物学的活性を呈する限りにおいて、インタクトなポリクローナル抗体、インタクトなモノクローナル抗体、抗体断片（F a b、F a b'、F（a b'）<sub>2</sub>、及びF v断片など）、単鎖F v（s c F v）突然変異体、少なくとも2つのインタクトな抗体から作成された二重特異性抗体などの多重特異性抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体の抗原決定部分を含む融合タンパク質、及び抗原認識部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。

#### 【0035】

抗体は、それぞれ $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 、及び $\mu$ と称されるその重鎖定常ドメインのアイデンティティに基づき、5つの主要な免疫グロブリンクラス：I g A、I g D、I g E、I g G、及びI g M、又はそのサブクラス（アイソタイプ）（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1及びI g A 2）のいずれかのものであり得る。異なる免疫グロブリンクラスは異なる周知のサブユニット構造及び三次元配置を有する。抗体は、ネイキッドであってもよく、又は毒素、放射性同位体等の他の分子にコンジュゲートしてA D Cを形成してもよい。

#### 【0036】

「遮断」抗体又は「アンタゴニスト」抗体は、C D 7 3など、それが結合する抗原の生物学的活性を阻害し、又は低下させるものである。特定の態様において、遮断抗体又はアンタゴニスト抗体は抗原の生物学的活性を実質的に又は完全に阻害する。望ましくは、生物学的活性は、少なくとも10%、少なくとも15%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも55%、少なくとも60%、少なくとも65%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、又は更には100%低下する。

#### 【0037】

用語「C D 7 3抗体」、「C D 7 3に結合する抗体」又は「抗C D 7 3」は、C D 7 3と選択的に結合する能力を有する抗体又はその抗原結合断片を指す。一実施形態において、抗C D 7 3抗体は、その分子がC D 7 3の標的化において治療剤又は診断試薬として有用となるように十分な親和性でC D 7 3と結合する。無関係の非C D 7 3タンパク質に対する抗C D 7 3抗体の結合の程度は、例えば、ラジオイムノアッセイ（R I A）、B I A C O R E（商標）（分析物として組換えC D 7 3及びリガンドとして抗体を使用するか、又はその逆）、又は当該技術分野において公知の他の結合アッセイによって計測するときのC D 7 3に対するこの抗体の結合の約10%未満である。特定の態様において、C D 7 3に結合する抗体は、解離定数（ $K_D$ ）が1  $\mu$  M、100 nM、10 nM、1 nM、0.1 nM、10 pM、1 pM、又は0.1 pMである。用語「抗C D 7 3」はまた、例えば、足場に組み込まれた、本明細書に開示される抗体のC D Rを含む分子も広く包含する。従って、語句「C D 7 3に特異的に結合する単離結合分子又はその抗原結合断片」は、抗体及びその抗原結合断片を指すのみならず、例えば、本明細書に開示される抗体のC D Rを組み込む1つ以上の足場（フィブロネクチン又はテネイシン-3由来のフィブロネクチンI I I型ドメインなど）を含む分子も指し得る。

#### 【0038】

一実施形態において、抗C D 7 3抗体は、I g G 1 F cドメインが突然変異L 2 3 4、L 2 3 5 E及びP 3 3 1を含み、可溶性C D 7 3及び細胞表面提示型C D 7 3と結合し、且つC D 7 3酵素活性を阻害するようなI g G 1-T Mフォーマットの抗体を指す。図1 A～図1 DはM E D I 9 4 4 7 V H及びV Lドメインのヌクレオチド及びアミノ酸配列を提供する。

#### 【0039】

用語「抗原結合断片」は、インタクトな抗体の一部分を含む分子を指し、詳細には、インタクトな抗体の抗原決定可変領域を含む分子を指す。当該技術分野において、抗体の抗

10

20

30

40

50

原結合機能が完全長抗体の断片によって果たされ得ることは公知である。抗体断片の例としては、限定はされないが、F a b、F a b'、F ( a b' ) 2、及びF v断片、線状抗体、一本鎖抗体、及び抗体断片で形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【 0 0 4 0 】

「モノクローナル抗体」は、単一の抗原決定基又はエピトープの高度に特異的な認識及び結合に關与する均質な抗体集団を指す。これは、典型的には異なる抗原決定基に対する異なる抗体を含むポリクローナル抗体と対照的である。

【 0 0 4 1 】

用語「モノクローナル抗体」は、インタクトなモノクローナル抗体及び完全長モノクローナル抗体の両方、並びに抗体断片 ( F a b、F a b'、F ( a b' ) 2、F vなど)、単鎖可変断片 ( s c F v )、抗体部分を含む融合タンパク質、及び抗原認識部位を含む任意の他の修飾免疫グロブリン分子を包含する。更に、「モノクローナル抗体」は、限定はされないが、ハイブリドーマ、ファージ選択、組換え発現、及びトランスジェニック動物 (例えば、トランスジェニックマウスにおけるヒト抗体の発現) によることを含めた、任意の方法で作製されたかかる抗体を指す。

【 0 0 4 2 】

用語「ヒト化抗体」は、最小限の非ヒト (例えばマウス) 配列を含むように改変された非ヒト (例えばマウス) 免疫グロブリンに由来する抗体を指す。典型的には、ヒト化抗体は、所望の特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種 (例えば、マウス、ラット、ウサギ、又はハムスター) のC D Rの残基によってC D Rの残基が置き換えられているヒト免疫グロブリンである ( J o n e s e t a l . , 1 9 8 6 , N a t u r e , 3 2 1 : 5 2 2 - 5 2 5 ; R i e c h m a n n e t a l . , 1 9 8 8 , N a t u r e , 3 3 2 : 3 2 3 - 3 2 7 ; V e r h o e y e n e t a l . , 1 9 8 8 , S c i e n c e , 2 3 9 : 1 5 3 4 - 1 5 3 6 ) 。場合によっては、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク ( F W ) アミノ酸残基が、所望の特異性、及び/又は親和性、及び/又は能力を有する非ヒト種由来の抗体の対応する残基で置き換えられる。

【 0 0 4 3 】

ヒト化抗体は、抗体の特異性、親和性、及び/又は能力を洗練して最適化するため、F vフレームワーク領域にあるか、及び/又は置き換えられた非ヒト残基内にある更なる残基の置換によって更に修飾することができる。一般に、ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンに対応するC D R領域の全て又は実質的に全てを含有する少なくとも1つ、典型的には2つ又は3つの可変ドメインの実質的に全てを含むことになり、一方、F R領域の全て又は実質的に全てはヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体はまた、免疫グロブリン定常領域又はドメイン ( F c )、典型的にはヒト免疫グロブリンのその少なくとも一部分も含み得る。ヒト化抗体の作成に用いられる方法の例が、米国特許第5, 225, 539号明細書又は同第5, 639, 641号明細書に記載される。

【 0 0 4 4 】

抗体の「可変領域」は、単独又組み合わせでの抗体軽鎖の可変領域又は抗体重鎖の可変領域を指す。重鎖及び軽鎖の可変領域は、各々、3つのC D R領域によってつながった4つのF W領域からなる。各鎖のC D RはF W領域によって近接して一体に保持されており、他方の鎖のC D Rと共に抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。C D Rの決定には少なくとも2つの技法がある: ( 1 ) 異種間配列多様性に基づく手法 ( 即ち、K a b a t e t a l . S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , ( 5 t h e d . , 1 9 9 1 , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a M d . ) ) ; 及び ( 2 ) 抗原抗体複合体の結晶学的研究に基づく手法 ( A l - l a z i k a n i e t a l . ( 1 9 9 7 ) J . M o l e c . B i o l . 2 7 3 : 9 2 7 - 9 4 8 ) ) 。加えて、当該技術分野では、C D Rの決定にこれらの2つの手法の組み合わせが用いられることもある。

【 0 0 4 5 】

K a b a t 付番方式は、概して、可変ドメインの残基 ( およそ軽鎖の残基1 ~ 1 0 7 及

10

20

30

40

50

び重鎖の残基 1 ~ 113) を参照するとき用いられる (例えば、Kabat et al., Sequences of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。

#### 【0046】

語句「Kabatにあるとおりのアミノ酸位置付番」、「Kabat位置」、及びその文法上の変化形は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) における抗体の編成の重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインに用いられる付番方式を指す。この付番方式を用いると、実際の線状アミノ酸配列は、可変ドメインのFW又はCDRの短縮、又はそれへの挿入に対応するより少ない又は追加的なアミノ酸を含み得る。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後に単一のアミノ酸挿入 (Kabatによる残基52a) を含み、及び重鎖FW残基82の後に挿入された残基 (例えば、Kabatによる残基82a、82b、及び82c等) を含み得る。

#### 【0047】

#### 【表1】

表1

| ループ | Kabat    | AbM                    | Chothia     |
|-----|----------|------------------------|-------------|
| L1  | L24-L34  | L24-L34                | L24-L34     |
| L2  | L50-L56  | L50-L56                | L50-L56     |
| L3  | L89-L97  | L89-L97                | L89-L97     |
| H1  | H31-H35B | H26-H35B<br>(Kabat付番)  | H26-H32..34 |
| H1  | H31-H35  | H26-H35<br>(Chothia付番) | H26-H32     |
| H2  | H50-H65  | H50-H58                | H52-H56     |
| H3  | H95-H102 | H95-H102               | H95-H102    |

#### 【0048】

残基のKabat付番は、所与の抗体について、相同性領域において抗体の配列を「標準」Kabat付番配列とアラインメントすることにより決定し得る。Chothiaは、その代わりに構造ループの位置を参照する (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。Kabat付番規則を用いて付番したときのChothia CDR-H1ループの末端は、ループの長さに応じてH32~H34の間で異なる (これは、Kabat付番スキームがH35A及びH35Bに挿入を置くためである；35Aも35Bも存在しない場合、ループは32で終わり；35Aのみが存在する場合、ループは33で終わり；35A及び35Bの両方が存在する場合、ループは34で終わる)。AbM超可変領域は、Kabat CDRとChothia構造ループとの妥協案に相当し、Oxford Molecular's AbM抗体モデリングソフトウェアによって用いられている。

#### 【0049】

IMGT (ImMunoGeneTics) も、CDRを含めた免疫グロブリン可変領域の付番方式を提供する。例えば、Lefranc, M. P. et al., Dev. Comp. Immunol. 27: 55-77 (2003) (これは本明細書において参照により援用される) を参照のこと。IMGT付番方式は、5,000を超える配列のアラ

インメント、構造データ、及び超可変ループの特徴付けに基づいたもので、あらゆる種の可変領域及びCDR領域の容易な比較を可能にする。IMGT付番スキームによれば、VH-CDR1は26～35位にあり、VH-CDR2は51～57位にあり、VH-CDR3は93～102位にあり、VL-CDR1は27～32位にあり、VL-CDR2は50～52位にあり、及びVL-CDR3は89～97位にある。

#### 【0050】

EUインデックス又はEU付番方式は、配列決定された最初のヒトIgG（EU抗体）の連続付番に基づく。この規則の最も一般的な参考文献はKabatt配列マニュアル（Kabatt et al., 1991）であるため、EUインデックスは時にKabattインデックスと同義として誤って使用される。EUインデックスは挿入及び欠失を提供せず、従って場合によってはIgGサブクラス及び種間でのIgG位置の比較が、特にヒンジ領域で不確かとなり得る。それにも関わらず、この規則は、多数のFc構造機能研究においてFc領域間の直接的な比較を可能にするのに十分となっている。従って、本明細書でFc領域における置換及び挿入に用いる付番スキームは、KabattにあるとおりのEUインデックスである。対照的に、本明細書で可変領域（VH及びVL）に用いる付番スキームは、標準的なKabatt付番である。

#### 【0051】

本明細書全体を通じて用いられるとおり、記載されるVH-CDR配列は古典的Kabatt付番位置に対応し、即ち、Kabatt VH-CDR1は31～35位にあり、VH-CDR2は50～65位にあり、及びVH-CDR3は95～102位にある。VL-CDR1、VL-CDR2及びVL-CDR3も古典的Kabatt付番位置、即ち、24～34位、50～56位及び89～97位に対応する。

#### 【0052】

本明細書で使用されるとき、Fc領域は、最初の定常領域免疫グロブリンドメインを除く抗体の定常領域を含むポリペプチドを含む。従って、Fcとは、IgA、IgD、及びIgGの最後2つの定常領域免疫グロブリンドメイン、及びIgE及びIgMの最後3つの定常領域免疫グロブリンドメイン、並びにこれらのドメインのN末端の可動性ヒンジを指す。IgA及びIgMについては、FcはJ鎖を含み得る。IgGについては、Fcは免疫グロブリンドメインCガンマ2及びCガンマ3（Cy2及びCy3）並びにCガンマ1（Cy1）とCガンマ2（Cy2）との間のヒンジを含む。

#### 【0053】

Fc領域の境界は様々であり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、そのカルボキシル末端に残基C226又はP230を含むように定義される（ここで付番は、Kabatt（Kabatt et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）に規定されるおりのEUインデックスに従う）。Fcとは、独立してこの領域を指し得るか、又は抗体、抗体断片、若しくはFc融合タンパク質に関連してこの領域を指し得る。幾つもの異なるFc位置に、限定はされないが、EUインデックスによって付番するときの270、272、312、315、356、及び358位を含め、多型が観察されており、従って提示される配列と先行技術の配列との間には少しの差異が存在し得る。

#### 【0054】

用語「ヒト抗体」は、ヒトによって産生される抗体、又は当該技術分野において公知の任意の技法（例えば、培養下の細胞における組換え発現、又はトランスジェニック動物における発現）を用いて作製されるヒトによって産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体を意味する。従って、用語のヒト抗体はまた、本来はヒトによって産生される抗体（又はその改変された変異体若しくは誘導体）であるが、非ヒト系で発現する（例えば、化学合成によって作製されるか；微生物、哺乳動物、又は昆虫細胞で組換え発現するか；又は動物対象で発現する）抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体も包含する。従

って、ヒト対象又はヒト細胞（例えば、組換え抗体又はその断片を発現するハイブリドーマ又は細胞株）から得られ、続いて動物、例えばマウスで発現する抗体は、ヒト抗体と見なされる。ヒト抗体のこの定義には、インタクトな又は完全長の抗体、その断片、及び／又は少なくとも1つのヒト重鎖及び／又は軽鎖ポリペプチドを含む抗体、例えば、マウス軽鎖及びヒト重鎖ポリペプチドを含む抗体などが含まれる。

【0055】

用語「キメラ抗体」は、免疫グロブリン分子のアミノ酸配列が2つ以上の動物種に由来する抗体を指す。典型的には、軽鎖及び重鎖の両方の可変領域が、所望の特異性、及び／又は親和性、及び／又は能力を有する哺乳動物の1つの種（例えば、マウス、ラット、ウサギ等）に由来する抗体の可変領域に対応し、一方、定常領域が、別の種（通常はヒト）

10

【0056】

用語「エピトープ」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に開示されるCD73抗体又はCD73結合分子との結合能を有する抗原タンパク質決定基を指す。エピトープは、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、通常、特定の三次元構造特性、並びに特定の電荷特性を有する。抗体又は結合分子のうちのエピトープを認識する部分は、パラトープと呼ばれる。タンパク質抗原のエピトープは、その構造及びパラトープとの相互作用に基づき立体エピトープと線状エピトープとの2つに分類される。立体エピトープは、抗原のアミノ酸配列の不連続なセクションで構成される。これらのエピトープは、抗原の三次元表面特徴及び形状又は三次構造に基づきパラトープと相互作用する。対照的に、線状エピトープは、その一次構造に基づきパラトープと相互作用する。線状エピトープは抗原の連続したアミノ酸配列によって形成される。

20

【0057】

用語「抗体結合部位」は、相補的な抗体が特異的に結合する連続又は不連続な部位（即ち、エピトープ）を含む抗原（例えば、CD73）内の領域を指す。従って、抗体結合部位は、抗原内に、エピトープを越えた、結合親和性及び／又は安定性などの特性を決定し得るか又は抗原酵素活性又は二量化などの特性に影響を与え得る追加的な範囲を含み得る。従って、2つの抗体が抗原内の同じエピトープに結合する場合であっても、抗体分子がエピトープ外のアミノ酸との個別的な分子間接触を確立する場合、かかる抗体は個別的な抗体結合部位に結合すると見なされる。

30

【0058】

「結合親和性」は、概して、分子（例えば抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば抗原）との間の非共有結合性相互作用の総和の強度を指す。特に指示がない限り、本明細書で使用されるとき、「結合親和性」は、結合対（例えば抗体と抗原）のメンバー間の1:1相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、概して解離定数（ $K_D$ ）によって表すことができる。親和性は、本明細書に記載されるものを含め、当該技術分野において公知の一般的な方法によって計測することができる。低親和性抗体は、概して抗原に緩徐に結合し、容易に解離する傾向があり、一方、高親和性抗体は、概して抗原に速やかに結合し、結合したまま長く留まる傾向がある。結合親和性を計測する種々の方法が当該技術分野において公知であり、本開示の目的上、そのいずれを用いることもできる。

40

【0059】

「効力」は、通常、特に指定されない限りnM単位の $IC_{50}$ 値として表現される。 $IC_{50}$ は、抗原結合分子の阻害濃度中央値である。機能アッセイでは、 $IC_{50}$ は、生物学的反応をその最大値の50%低下させる濃度である。リガンド結合試験では、 $IC_{50}$ は、受容体結合を最大特異的結合レベルの50%低下させる濃度である。 $IC_{50}$ は、当該技術分野において公知の任意の手段によって計算することができる。効力の改善は、例えば親抗体（例えば、生殖細胞系列化する前の親抗体又は親和性最適化する前の親抗体）と比べた計測によって決定し得る。

【0060】

50

親抗体と比較したときの本開示の抗体又はポリペプチドの効力の改善倍数は、少なくとも約2倍、少なくとも約4倍、少なくとも約6倍、少なくとも約8倍、少なくとも約10倍、少なくとも約15倍、少なくとも約20倍、少なくとも約25倍、少なくとも約30倍、少なくとも約40倍、少なくとも約50倍、少なくとも約60倍、少なくとも約70倍、少なくとも約80倍、少なくとも約90倍、少なくとも約100倍、少なくとも約110倍、少なくとも約120倍、少なくとも約130倍、少なくとも約140倍、少なくとも約150倍、少なくとも約160倍、少なくとも約170倍、又は少なくとも約180倍又はそれを超えることができる。

#### 【0061】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」又は「ADCC」は、ある種の細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、及びマクロファージ）に存在するFc受容体（FcR）に結合した分泌免疫グロブリンによってそれらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原担持標的細胞に特異的に結合し、続いてその標的細胞を細胞毒で死滅させることが可能になる細胞傷害の一形態を指す。標的細胞の表面に向かう特異的高親和性IgG抗体は細胞傷害性細胞を「武装」し、かかる死滅に不可欠である。標的細胞の溶解は細胞外であって、直接的な細胞間接触が必要であり、補体は関与しない。抗体に加えて、抗原担持標的細胞に特異的に結合する能力を有するFc領域を含む他のタンパク質、具体的にはFc融合タンパク質は、細胞媒介性細胞傷害を達成可能であると考えられる。簡単にするため、Fc融合タンパク質の活性によって生じる細胞媒介性細胞傷害も本明細書ではADCC活性と称する。

#### 【0062】

「単離されている」ポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、又は組成物は、天然には見られない形態のポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、又は組成物である。単離されたポリペプチド、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞又は組成物には、もはやそれらが天然に見られる形態ではなくなる程度まで精製されているものが含まれる。一部の態様において、単離されている抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、又は組成物は、実質的に純粋である。

#### 【0063】

用語「対象」は、限定はされないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯類などを含めた、特定の治療のレシピエントとなる任意の動物（例えば哺乳動物）を指す。典型的には、用語「対象」及び「患者」は、本明細書ではヒト対象を指して同義的に使用される。

#### 【0064】

用語「医薬組成物」は、活性成分（例えば、本明細書に開示される抗CD73結合分子）の生物学的活性が有効となるのを可能にするような形態の調製物であって、その組成物を投与しようとする対象にとって許容できない毒性がある追加的な構成成分を含有しない調製物を指す。かかる組成物は無菌であり得る。

#### 【0065】

本明細書に開示されるとおりの抗CD73結合分子の「有効量」は、具体的に記載される目的の実行に十分な量である。「有効量」は、記載される目的に関して実験的に常法で決定することができる。

#### 【0066】

用語「治療有効量」は、対象又は哺乳動物の疾患又は障害を「治療」するのに有効な、本明細書に開示される抗CD73結合分子又は他の薬物の量を指す。

#### 【0067】

語句「標識」は、本明細書で使用されるとき、本明細書に開示される抗CD73結合分子に直接又は間接的に融合した（例えば遺伝子融合した）又はコンジュゲートした（例えば化学的にコンジュゲートした）、それにより「標識」抗CD73結合分子を生じさせる検出可能な化合物又は組成物を指す。標識は、それ自体が検出可能であってもよく（例えば、放射性同位体標識又は蛍光標識）、又は酵素標識の場合、検出可能な基質化合物又は組成物の化学的改変を触媒することができる。

## 【 0 0 6 8 】

「誘導体化可能基」及び「誘導体化可能官能基」などの用語は同義的に使用され、反応することによって本明細書に開示される抗CD73結合分子（例えばCD73抗体）と別の物質との間での共有結合の形成を可能にする能力を有する官能基を指す。一部の態様において、かかる物質は、治療剤（例えば細胞毒）、検出可能標識、ポリマー（例えばPEG）等である。例示的誘導体化可能基としては、チオール、ヒドロキシル、アミノ、カルボキシ、及びアミド、並びにこれらの修飾形態、例えば活性化形態又は保護形態などが挙げられる。

## 【 0 0 6 9 】

「治療する」又は「治療」又は「治療すること」又は「軽減する」又は「軽減すること」などの用語は、（１）診断された病的状態又は障害を治癒し、減速させ、その症状を和らげ、及び／又はその進行を止める治療手段と、（２）標的とする病的状態又は障害の発症を防ぎ及び／又は遅らせる予防又は防御手段との両方を指す。従って、治療を必要としている者には、既に障害を有する者；障害を起こし易い者；及び障害を予防すべき者が含まれる。特定の態様において、対象は、その患者が例えばある種の癌の完全寛解、部分寛解、又は一時的寛解を示す場合、本開示の方法による癌の「治療」に成功している。

10

## 【 0 0 7 0 】

用語「癌」、「腫瘍」、「癌性」、及び「悪性」は、典型的には調節されない細胞成長によって特徴付けられる哺乳動物の生理的状态を指し、又はそれを記述する。癌の例としては、限定はされないが、リンパ腫、非小細胞肺癌、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、乳癌（ホルモン媒介性乳癌を含む、例えば、Innes et al. (2006) Br. J. Cancer 94:1057-1065を参照）、結腸癌が挙げられる。一部の態様において、用語の癌は、本明細書で使用されるとき、CD73を発現する癌（例えば、結腸癌、乳癌、リンパ腫、非小細胞癌）を具体的に指す。

20

## 【 0 0 7 1 】

本明細書で同義的に使用されるとおりの「ポリヌクレオチド」、又は「核酸」は、任意の長さのヌクレオチドのポリマーを指し、DNA及びRNAを含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチド又は塩基、及び／又はそれらの類似体、又はDNA若しくはRNAポリメラーゼによってポリマーに組み込まれ得る任意の基質であり得る。ポリヌクレオチドは、修飾ヌクレオチド、例えばメチル化ヌクレオチド及びそれらの類似体を含み得る。前出の説明は、RNA及びDNAを含め、本明細書で言及されるあらゆるポリヌクレオチドに適用される。

30

## 【 0 0 7 2 】

用語「ベクター」は、宿主細胞に１つ以上の目的の遺伝子又は配列を送達し、一部の態様では発現させる能力を有する構築物を意味する。ベクターの例としては、限定はされないが、ウイルスベクター、ネイキッドDNA又はRNA発現ベクター、プラスミド、コスミド又はファージベクター、カチオン性縮合剤に関連するDNA又はRNA発現ベクター、リボソームに封入されたDNA又はRNA発現ベクター、及び特定の真核細胞、例えばプロデューサー細胞が挙げられる。

40

## 【 0 0 7 3 】

用語「ポリペプチド」、「ペプチド」、及び「タンパク質」は、本明細書では、任意の長さのアミノ酸のポリマーを指して同義的に使用される。ポリマーは線状又は分枝状であってもよく、それは修飾アミノ酸を含んでもよく、且つそれは非アミノ酸によって分断されていてよい。これらの用語はまた、天然で又は介入によって修飾されている（例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、又は任意の他の操作又は修飾、例えば標識成分とのコンジュゲーションなど）アミノ酸ポリマーも包含する。また、この定義内には、例えば、アミノ酸の１つ以上の類似体（例えば、非天然アミノ酸等を含む）、並びに当該技術分野において公知の他の修飾を含有するポリペプチドも含まれる。本開示のポリペプチドは抗体に基づくため、特定の態様において、ポリペプチドは単鎖又は会合鎖として存在し得ることが理解される。

50

## 【 0 0 7 4 】

「組換え」ポリペプチド又はタンパク質は、組換えDNA技術によって産生されるポリペプチド又はタンパク質を指す。改変された宿主細胞で発現する組換え産生ポリペプチド及びタンパク質は、任意の好適な技術によって分離され、分画され、又は部分的若しくは実質的に精製されている天然又は組換えポリペプチドと同様に、単離されていると見なされる。本明細書に開示されるポリペプチドは、当該技術分野において公知の方法を用いて組換え産生されてもよい。或いは、本明細書に開示されるタンパク質及びペプチドは化学的に合成されてもよい。

## 【 0 0 7 5 】

用語「アミノ酸置換」は、親配列に存在するアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に置き換えることを指す。アミノ酸は、親配列において、例えば化学的ペプチド合成を用いるか、又は当該技術分野において公知の組換え方法で置換することができる。従って、「X位での置換」又は「X位での置換」と言うときは、X位に存在するアミノ酸を代替的なアミノ酸残基で置換することを指す。一部の態様において、置換パターンは、スキーマAXYに従い記述することができ、ここでAは、天然でX位に存在するアミノ酸に対応する一文字コードであり、Yは置換するアミノ酸残基である。他の態様において、置換パターンはスキーマXYに従い記述することができ、ここでYは、天然でX位に存在するアミノ酸を置換するアミノ酸残基に対応する一文字コードである。

## 【 0 0 7 6 】

「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基が、同様の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基ファミリーは当該技術分野において定義されており、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、β分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が含まれる。従って、ポリペプチドのアミノ酸が同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸に置き換えられる場合、この置換は保存的であると見なされる。別の態様では、一続きのアミノ酸を、側鎖ファミリーメンバーの順番及び/又は組成が異なる構造的には同様の一続きによって保存的に置き換えることができる。

## 【 0 0 7 7 】

非保存的置換は、(i)電気陽性側鎖を有する残基（例えば、Arg、His又はLys）が電気陰性残基（例えば、Glu又はAsp）に代えて、又はそれによって置換されているか、(ii)親水性残基（例えば、Ser又はThr）が疎水性残基（例えば、Ala、Leu、Ile、Phe又はVal）に代えて、又はそれによって置換されているか、(iii)システイン又はプロリンが任意の他の残基に代えて、又はそれによって置換されているか、又は(iv)かさ高い疎水性又は芳香族側鎖を有する残基（例えば、Val、His、Ile又はTrp）がより小さい側鎖を有するもの（例えば、Ala、Ser）又は側鎖を有しないもの（例えば、Gly）に代えて、又はそれによって置換されているものを含む。

## 【 0 0 7 8 】

当業者は他の置換を容易に特定することができる。例えば、アミノ酸アラニンについて、置換は、D-アラニン、グリシン、β-アラニン、L-システイン及びD-システインのいずれか1つから選ぶことができる。リジンについて、置換は、D-リジン、アルギニン、D-アルギニン、ホモアルギニン、メチオニン、D-メチオニン、オルニチン、又はD-オルニチンのいずれか1つであってもよい。概して、単離ポリペプチドの特性の変化を引き起こすと予想し得る機能的に重要な領域の置換は、(i)極性残基、例えば、セリン又はスレオニンが疎水性残基、例えば、ロイシン、イソロイシン、フェニルアラニン、又はアラニンに代えて（又はそれによって）置換されるか；(ii)システイン残基が任

10

20

30

40

50

意の他の残基に代えて（又はそれによって）置換されるか；（*i i i*）電気陽性側鎖を有する残基、例えば、リジン、アルギニン又はヒスチジンが電気陰性側鎖を有する残基、例えば、グルタミン酸又はアスパラギン酸に代えて（又はそれによって）置換されるか；又は（*i v*）かさ高い側鎖を有する残基、例えば、フェニルアラニンが、かかる側鎖を有しないもの、例えばグリシンに代えて（又はそれによって）置換されるものである。前述の非保存的置換のうちの1つがタンパク質の機能特性を変化させ得る可能性はまた、タンパク質の機能的に重要な領域に対する置換の位置にも相関する。従って一部の非保存的置換は、生物学的特性に対する効果をほとんど又は全く有しない。

#### 【0079】

用語「アミノ酸挿入」は、親配列に存在する2つのアミノ酸残基の間に新規アミノ酸残基を導入することを指す。アミノ酸は、例えば、化学的ペプチド合成を用いるか、又は当該技術分野において公知の組換え方法で親配列に挿入することができる。従って本明細書で使用されるとき、語句「X位とY位との間への挿入」又は「K a b a t X位とY位との間への挿入」（ここでX及びYはアミノ酸位置に対応する）は（例えば、239位と240位との間へのシステインアミノ酸挿入）、X位とY位との間へのアミノ酸の挿入を指し、また、核酸配列における、X位及びY位のアミノ酸をコードするコドン間への、あるアミノ酸をコードするコドンの挿入も指す。挿入パターンは、スキーマA X i n sに従い記述することができ、ここでAは、挿入されるアミノ酸に対応する一文字コードであり、及びXは挿入の前の位置である。

#### 【0080】

2つのポリペプチド又はポリヌクレオチド配列間の「パーセント配列同一性」という用語は、2つの配列の最適アラインメントのため導入しなければならない付加又は欠失（即ちギャップ）を考慮した、比較ウィンドウにわたって配列が共有される同一のマッチ位置の数を指す。マッチ位置は、標的配列と参照配列との両方で同一のヌクレオチド又はアミノ酸が提供される任意の位置である。ギャップはヌクレオチド又はアミノ酸ではないため、標的配列に提供されるギャップはカウントしない。同様に、カウントするのは標的配列のヌクレオチド又はアミノ酸であり、参照配列のヌクレオチド又はアミノ酸ではないため、参照配列に提供されるギャップもカウントしない。

#### 【0081】

配列同一性のパーセンテージは、両方の配列に同一のアミノ酸残基又は核酸塩基が存在する位置の数を決定してマッチ位置の数を求め、そのマッチ位置の数を比較ウィンドウ内の位置の総数で除し、その結果に100を乗じて配列同一性パーセンテージを求めることにより計算される。2つの配列間の配列の比較及びパーセント配列同一性の決定は、オンライン使用及びダウンロードの両方について容易に利用可能なソフトウェアを用いて達成することができる。好適なソフトウェアプログラムは、様々な供給元から、タンパク質配列及びヌクレオチド配列の両方のアラインメントについて利用可能である。パーセント配列同一性を決定するための1つの好適なプログラムは、米国政府の国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）のBLASTウェブサイト（blast.ncbi.nlm.nih.gov）から入手可能なBLASTプログラムスイートの一部であるbl2seqである。bl2seqは、BLASTN又はBLASTPのいずれかのアルゴリズムを使用して2つの配列間の比較を行う。BLASTNは核酸配列の比較に用いられ、一方、BLASTPはアミノ酸配列の比較に用いられる。他の好適なプログラムは、例えば、EMBOSSバイオインフォマティクスプログラムスイートの一部であって、且つ欧州バイオインフォマティクス研究所（European Bioinformatics Institute: EBI）、www.ebi.ac.uk/Tools/psaからも入手可能なニードル（Needle）、ストレッチャー（Stretcher）、ウォーター（Water）、又はマッチャー（Matcher）である。

#### 【0082】

ポリヌクレオチド又はポリペプチド参照配列と整列する単一ポリヌクレオチド又はポリ

10

20

30

40

50

ペプチド標的配列内の種々の領域は、各々が独自のパーセント配列同一性を有し得る。パーセント配列同一性の値は小数第2位で四捨五入されることが注記される。例えば、80.11、80.12、80.13、及び80.14は80.1に切り捨てられ、一方、80.15、80.16、80.17、80.18、及び80.19は80.2に切り上げられる。また、長さの値は常に整数であることも注記される。

#### 【0083】

特定の態様において、第1のアミノ酸配列の第2の配列アミノ酸に対するパーセンテージ同一性「X」は、 $100 \times (Y/Z)$ （式中、Yは、第1及び第2の配列のアラインメント（目視検査によるか、又は特定の配列アラインメントプログラムによってアラインメントしたとき）において同一のマッチとしてスコア化されるアミノ酸残基の数であり、Zは、第2の配列の残基の総数である）として計算される。第1の配列の長さが第2の配列より長い場合、第1の配列の第2の配列に対するパーセント同一性は第2の配列の第1の配列に対するパーセント同一性より高くなる。

10

#### 【0084】

当業者は、パーセント配列同一性を計算するための配列アラインメントの生成が一次配列データによってのみ駆動される二値の配列間比較に限定されないことを理解するであろう。配列アラインメントは多重配列アラインメントから得ることができる。多重配列アラインメントの生成に好適な1つのプログラムは、[www.clustal.org](http://www.clustal.org)から入手可能なClustalW2である。別の好適なプログラムは、[www.drive5.com/muscle/](http://www.drive5.com/muscle/)から入手可能なMUSCLEである。或いは、ClustalW2及びMUSCLEは、例えばEBIから入手可能である。

20

#### 【0085】

また、配列データを構造データ（例えば、結晶学的タンパク質構造）、機能データ（例えば、突然変異の位置）、又は系統学的データなどの異種ソースのデータと統合することによって配列アラインメントを生成し得ることも理解されるであろう。異種データを統合して多重配列アラインメントを生成する好適なプログラムは、[www.tcoffee.org](http://www.tcoffee.org)で入手可能であるか、又は例えばEBIから入手可能なT-Coffeeである。また、パーセント配列同一性の計算に用いる最終的なアラインメントは自動的に又は手動でキュレーションし得ることも理解されるであろう。

#### 【0086】

30

用語「コンセンサス配列」は、軽鎖（VL）及び重鎖（VH）可変領域に関して本明細書で使用されるとき、VL又はVH鎖内のいずれのアミノ酸残基が抗原結合に害を及ぼすことなく修飾するのに適しているかに関する情報に基づき定義される複合の又は一般化されたVL若しくはVH配列を指す。従って、VL鎖又はVH鎖の「コンセンサス配列」では、特定のアミノ酸位置が、その位置における複数の可能なアミノ酸残基のうちの1つによって占有される。例えば、特定の位置にアルギニン（R）又はセリン（S）が存在する場合、コンセンサス配列内のその特定の位置はアルギニン又はセリン（R又はS）のいずれかであり得る。VH鎖及びVL鎖のコンセンサス配列は、例えば、インビトロ親和性成熟（例えば、縮重コーディングプライマーを使用して特定のCDR内のあらゆるアミノ酸位置をランダム化すること）か、抗体CDR内のアミノ酸残基のスキャンニング突然変異誘発（例えば、アラニンスキャンニング突然変異誘発）か、又は当該技術分野において公知の任意の他の方法と、続いて抗原に対する突然変異体の結合を評価することによる、突然変異したアミノ酸位置が抗原結合に影響を及ぼすかどうかの決定により定義することができる。一部の態様において、突然変異はCDR領域に導入される。他の態様において、突然変異はフレームワーク領域に導入される。他の一部の態様において、突然変異はCDR領域及びフレームワーク領域に導入される。

40

#### 【0087】

#### II. CD73結合分子

本開示は、CD73結合分子、例えば、CD73、例えばヒトCD73に特異的に結合する抗体及びその抗原結合断片を提供する。CD73の完全長アミノ酸（aa）及びヌク

50

レオチド ( n t ) 配列は当該技術分野において公知である ( 例えば、ヒト C D 7 3 について U n i P r o t 受託番号 P 2 1 5 8 9、又はマウス C D 7 3 について U n i P r o t 受託番号 Q 6 1 5 0 3 を参照 )。一部の態様において、抗 C D 7 3 結合分子はヒト抗体 ( 例えば、クローン 1 0 . 3 抗体、クローン 2 C 5 抗体、M E D I 9 4 4 7 ) である。特定の態様において、C D 7 3 結合分子は抗体又はその抗原結合断片である。

【 0 0 8 8 】

一部の態様において、C D 7 3 結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片は、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F d、単鎖 F v 又は s c F v、ジスルフィド連結 F v、V - N A R ドメイン、I g N a r、イントラボディ、I g G C H 2、ミニボディ、F ( a b' )<sub>3</sub>、テトラボディ、トリアボディ、ダイアボディ、シングルドメイン抗体、D V D - I g、F c a b、m A b<sup>2</sup>、( s c F v )<sub>2</sub>、又は s c F v - F c を含む。一部の態様において、抗体は I g G 型抗体、例えば I g G 1 型抗体である。

10

【 0 0 8 9 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体 ( 例えば、M E D I 9 4 4 7、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体 ) 又はその抗原結合断片は、重鎖定常領域又はその断片を含む。一部の具体的な態様において、重鎖定常領域は I g G 定常領域である。I g G 定常領域は、κ 定常領域及び λ 定常領域からなる群から選択される軽鎖定常領域を含むことができる。

【 0 0 9 0 】

特定の態様において、本明細書に開示される抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、親抗体、例えば、C D 7 3 0 0 1 0 抗体又は C D 7 3 0 0 0 2 抗体と比較して修飾されている。一部の態様において、親抗体は C D 7 3 0 0 1 0 である。他の態様において、親抗体は C D 7 3 0 0 0 2 である。他の態様において、親抗体は、C D 7 3 0 0 0 4、C D 7 3 0 0 0 8、C D 7 3 0 0 0 1 1、C D 7 3 0 0 2 1、C D 7 3 0 0 4 2、C D 7 3 0 0 4 6、C D 7 3 0 0 4 7、C D 7 3 0 0 6 8、又は C D 7 3 0 0 6 9 である。修飾には、親抗体、例えば C D 7 3 0 0 1 0 又は C D 7 3 0 0 0 2 と比較したときの C D R 領域及び / 又は F W 領域の突然変異が含まれ得る。

20

【 0 0 9 1 】

語句「C D 7 3 0 0 0 2 抗体」は、配列番号 1 のアミノ酸配列を含む 2 つの V L ドメインと配列番号 2 のアミノ酸配列を含む 2 つの V H ドメインとを含む I g G 1 を指す。

30

【 0 0 9 2 】

語句「C D 7 3 0 0 0 4 抗体」は、配列番号 1 0 4 のアミノ酸配列を含む 2 つの V L ドメインと配列番号 1 0 3 のアミノ酸配列を含む 2 つの V H ドメインとを含む I g G 1 を指す。

【 0 0 9 3 】

語句「C D 7 3 0 0 0 8 抗体」は、配列番号 1 0 6 のアミノ酸配列を含む 2 つの V L ドメインと配列番号 1 0 7 のアミノ酸配列を含む 2 つの V H ドメインとを含む I g G 1 を指す。

【 0 0 9 4 】

語句「C D 7 3 0 0 1 0 抗体」は、配列番号 3 のアミノ酸配列を含む 2 つの V L ドメインと配列番号 4 のアミノ酸配列を含む 2 つの V H ドメインとを含む I g G 1 を指す。

40

【 0 0 9 5 】

語句「C D 7 3 0 0 1 1 抗体」は、配列番号 5 のアミノ酸配列を含む 2 つの V L ドメインと配列番号 6 のアミノ酸配列を含む 2 つの V H ドメインとを含む I g G 1 を指す。

【 0 0 9 6 】

語句「C D 7 3 0 0 2 1 抗体」は、配列番号 7 のアミノ酸配列を含む 2 つの V L ドメインと配列番号 8 のアミノ酸配列を含む 2 つの V H ドメインとを含む I g G 1 を指す。

【 0 0 9 7 】

語句「C D 7 3 0 0 4 2 抗体」は、配列番号 9 のアミノ酸配列を含む 2 つの V L ドメインと配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含む 2 つの V H ドメインとを含む I g G 1 を指す。

50

## 【0098】

語句「CD730046抗体」は、配列番号11のアミノ酸配列を含む2つのVLドメインと配列番号12のアミノ酸配列を含む2つのVHドメインとを含むIgG1を指す。

## 【0099】

語句「CD730047抗体」は、配列番号13のアミノ酸配列を含む2つのVLドメインと配列番号14のアミノ酸配列を含む2つのVHドメインとを含むIgG1を指す。

## 【0100】

語句「CD730068抗体」は、配列番号108のアミノ酸配列を含む2つのVLドメインと配列番号107のアミノ酸配列を含む2つのVHドメインとを含むIgG1を指す。

10

## 【0101】

語句「CD730069抗体」は、配列番号110のアミノ酸配列を含む2つのVLドメインと配列番号109のアミノ酸配列を含む2つのVHドメインとを含むIgG1を指す。

## 【0102】

(i) CD730010由来抗CD73抗体

特定の態様において、本開示の抗CD73抗体は、限定はされないが：

1) コンセンサス配列SGSLSNIGRN $X_1$ VN(式中、 $X_1$ はアミノ酸残基プロリン(P)、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)を表す)を含む軽鎖CDR1、及び/又は

20

2) コンセンサス配列L $X_2$ N $X_3$ R $X_4$  $X_5$ (式中、 $X_2$ はアミノ酸残基アスパラギン(N)又はアスパラギン酸(D)を表し、 $X_3$ はアミノ酸残基グルタミン(Q)又はロイシン(L)を表し、 $X_4$ はアミノ酸残基ロイシン(L)又はプロリン(P)を表し、及び $X_5$ はアミノ酸残基グリシン(G)又はセリン(S)を表す)を含む軽鎖CDR2、及び/又は

3) コンセンサス配列ATWDD $SX_6$  $X_7$ GW $X_8$ (式中、 $X_6$ はアミノ酸残基ロイシン(L)又はヒスチジン(H)を表し、 $X_7$ はアミノ酸残基リジン(K)、プロリン(P)、イソロイシン(I)又はアスパラギン(N)を表し、及び $X_8$ はアミノ酸残基ロイシン(L)又はスレオニン(T)を表す)を含む軽鎖CDR3

を含めた、CD730010抗体の軽鎖のCDR1及び/又はCDR2及び/又はCDR3に対する修飾を含む。

30

## 【0103】

特定の態様において、本開示の抗CD73抗体は、限定はされないが：

1) コンセンサス配列SYA $X_9$ S(式中、 $X_9$ はアミノ酸残基メチオニン(M)又はチロシン(Y)を表す)を含む重鎖CDR1、及び/又は

2) コンセンサス配列 $X_{10}$ I $X_{11}$ GS $X_{12}$ G $X_{13}$ TY $YADS$ VKG(式中、 $X_{10}$ はアミノ酸残基ロイシン(L)又はアラニン(A)を表し、 $X_{11}$ はアミノ酸残基トリプトファン(W)又はセリン(S)を表し、 $X_{12}$ はアミノ酸残基トリプトファン(W)又はグリシン(G)を表し、及び $X_{13}$ はアミノ酸残基セリン(S)又はアルギニン(R)を表す)を含む重鎖CDR2、及び/又は

40

3) コンセンサス配列LGY $X_{14}$  $X_{15}$  $X_{16}$ D $X_{17}$ (式中、 $X_{14}$ はアミノ酸残基グリシン(G)又はセリン(S)を表し、 $X_{15}$ はアミノ酸残基アルギニン(R)又はスレオニン(T)を表し、 $X_{16}$ はアミノ酸残基バリン(V)又はイソロイシン(I)を表し、及び $X_{17}$ はアミノ酸残基チロシン(Y)、リジン(K)、メチオニン(M)、ロイシン(L)又はグルタミン酸(E)を表す)を含む重鎖CDR3

を含めた、CD730010抗体の重鎖のCDR1及び/又はCDR2及び/又はCDR3に対する修飾を含む。

## 【0104】

一態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、コンセンサスアミノ酸配列：

50

[FW<sub>1</sub>]SGSLSNIGRNX<sub>1</sub>VN[FW<sub>2</sub>]LX<sub>2</sub>NX<sub>3</sub>RX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>[FW<sub>3</sub>]  
ATWDDSX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>GWX<sub>8</sub>[FW<sub>4</sub>]

(式中、[FW<sub>1</sub>]、[FW<sub>2</sub>]、[FW<sub>3</sub>]及び[FW<sub>4</sub>]は、それぞれVLフレームワーク領域1(配列番号25又は26)、VLフレームワーク領域2(配列番号27又は28)、VLフレームワーク領域3(配列番号29)及びVLフレームワーク領域4(配列番号30)のアミノ酸残基を表し、ここで、

X<sub>1</sub>はアミノ酸残基プロリン(P)、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)を表し、

X<sub>2</sub>はアミノ酸残基アスパラギン(N)又はアスパラギン酸(D)を表し、

X<sub>3</sub>はアミノ酸残基グルタミン(Q)又はロイシン(L)を表し、

X<sub>4</sub>はアミノ酸残基ロイシン(L)又はプロリン(P)を表し、

X<sub>5</sub>はアミノ酸残基グリシン(G)又はセリン(S)を表し、

X<sub>6</sub>はアミノ酸残基ロイシン(L)又はヒスチジン(H)を表し、

X<sub>7</sub>はアミノ酸残基リジン(K)、プロリン(P)、イソロイシン(I)又はアスパラギン(N)を表し、及び

X<sub>8</sub>はアミノ酸残基ロイシン(L)又はスレオニン(T)を表す)を含むVL領域を含む。

#### 【0105】

一態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、コンセンサスアミノ酸配列

[FW<sub>5</sub>]SYAX<sub>9</sub>S[FW<sub>6</sub>]X<sub>10</sub>IX<sub>11</sub>GSX<sub>12</sub>GX<sub>13</sub>TTYADSVK  
G[FW<sub>7</sub>]LGYX<sub>14</sub>X<sub>15</sub>X<sub>16</sub>DX<sub>17</sub>[FW<sub>8</sub>]

(式中、[FW<sub>5</sub>]、[FW<sub>6</sub>]、[FW<sub>7</sub>]及び[FW<sub>8</sub>]は、それぞれVHフレームワーク領域1(配列番号31)、VHフレームワーク領域2(配列番号32)、VHフレームワーク領域3(配列番号33)及びVHフレームワーク領域4(配列番号34)のアミノ酸残基を表し、ここで、

X<sub>9</sub>はアミノ酸残基メチオニン(M)又はチロシン(Y)を表し、

X<sub>10</sub>はアミノ酸残基ロイシン(L)又はアラニン(A)を表し、

X<sub>11</sub>はアミノ酸残基トリプトファン(W)又はセリン(S)を表し、

X<sub>12</sub>はアミノ酸残基トリプトファン(W)又はグリシン(G)を表し、

X<sub>13</sub>はアミノ酸残基セリン(S)又はアルギニン(R)を表し、

X<sub>14</sub>はアミノ酸残基グリシン(G)又はセリン(S)を表し、

X<sub>15</sub>はアミノ酸残基アルギニン(R)又はスレオニン(T)を表し、

X<sub>16</sub>はアミノ酸残基バリン(V)又はイソロイシン(I)を表し

X<sub>17</sub>はアミノ酸残基チロシン(Y)、リジン(K)、メチオニン(M)、ロイシン(L)又はグルタミン酸(E)を表す)を含むVH領域を含む。

#### 【0106】

一態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、コンセンサスアミノ酸配列

[FW<sub>1</sub>]SGSLSNIGRNX<sub>1</sub>VN[FW<sub>2</sub>]LX<sub>2</sub>NX<sub>3</sub>RX<sub>4</sub>X<sub>5</sub>[FW<sub>3</sub>]  
ATWDDSX<sub>6</sub>X<sub>7</sub>GWX<sub>8</sub>[FW<sub>4</sub>]

(式中、[FW<sub>1</sub>]、[FW<sub>2</sub>]、[FW<sub>3</sub>]及び[FW<sub>4</sub>]は、それぞれVLフレームワーク領域1(配列番号25又は26)、VLフレームワーク領域2(配列番号27又は28)、VLフレームワーク領域3(配列番号29)及びVLフレームワーク領域4(配列番号30)のアミノ酸残基を表し、ここで、

X<sub>1</sub>はアミノ酸残基プロリン(P)、グルタミン酸(E)又はアスパラギン酸(D)を表し、

X<sub>2</sub>はアミノ酸残基アスパラギン(N)又はアスパラギン酸(D)を表し、

X<sub>3</sub>はアミノ酸残基グルタミン(Q)又はロイシン(L)を表し、

X<sub>4</sub>はアミノ酸残基ロイシン(L)又はプロリン(P)を表し、

X<sub>5</sub> はアミノ酸残基グリシン (G) 又はセリン (S) を表し、  
 X<sub>6</sub> はアミノ酸残基ロイシン (L) 又はヒスチジン (H) を表し、  
 X<sub>7</sub> はアミノ酸残基リジン (K)、プロリン (P)、イソロイシン (I) 又はアスパラギン (N) を表し、及び

X<sub>8</sub> はアミノ酸残基ロイシン (L) 又はスレオニン (T) を表す) を含む V L 領域を含み、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、コンセンサスアミノ酸配列：

[ F W<sub>5</sub> ] S Y A X<sub>9</sub> S [ F W<sub>6</sub> ] X<sub>10</sub> I X<sub>11</sub> G S X<sub>12</sub> G X<sub>13</sub> T Y Y A D S V K  
 G [ F W<sub>7</sub> ] L G Y X<sub>14</sub> X<sub>15</sub> X<sub>16</sub> D X<sub>17</sub> [ F W<sub>8</sub> ]

(式中、[ F W<sub>5</sub> ]、[ F W<sub>6</sub> ]、[ F W<sub>7</sub> ] 及び [ F W<sub>8</sub> ] は、それぞれ V H フレームワーク領域 1 (配列番号 3 1)、V H フレームワーク領域 2 (配列番号 3 2)、V H フレームワーク領域 3 (配列番号 3 3) 及び V H フレームワーク領域 4 (配列番号 3 4) のアミノ酸残基を表し、ここで、

X<sub>9</sub> はアミノ酸残基メチオニン (M) 又はチロシン (Y) を表し、

X<sub>10</sub> はアミノ酸残基ロイシン (L) 又はアラニン (A) を表し、

X<sub>11</sub> はアミノ酸残基トリプトファン (W) 又はセリン (S) を表し、

X<sub>12</sub> はアミノ酸残基トリプトファン (W) 又はグリシン (G) を表し、

X<sub>13</sub> はアミノ酸残基セリン (S) 又はアルギニン (R) を表し、

X<sub>14</sub> はアミノ酸残基グリシン (G) 又はセリン (S) を表し、

X<sub>15</sub> はアミノ酸残基アルギニン (R) 又はスレオニン (T) を表し、

X<sub>16</sub> はアミノ酸残基バリン (V) 又はイソロイシン (I) を表し

X<sub>17</sub> はアミノ酸残基チロシン (Y)、リジン (K)、メチオニン (M)、ロイシン (L) 又はグルタミン酸 (E) を表す) を含む V H 領域を更に含む。

#### 【 0 1 0 7 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 6、4 7、及び 4 8 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 1 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 6、4 7、及び 4 8 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 1 を含む。

#### 【 0 1 0 8 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 9、5 0、5 1、及び 5 2 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 2 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 9、5 0、5 1 及び 5 2 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 2 を含む。

#### 【 0 1 0 9 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 5 3、5 4、5 5、及び 5 6 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 3 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 5 3、5 4、5 5、及び 5 6 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 3 を含む。

#### 【 0 1 1 0 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 5 及び 3 6 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 1 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 5 及び 3 6 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 1 を含む。

#### 【 0 1 1 1 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7、3 8、3 9、及び 4 0 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 2 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7、3 8、3 9、及び 4 0 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 2 を含む。

#### 【 0 1 1 2 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 1、4 2、4 3、4 4、及び 4 5 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 3 を含む。一

10

20

30

40

50

部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 1、4 2、4 3、4 4、及び 4 5 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 3 を含む。

【 0 1 1 3 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 4 6、4 7、及び 4 8 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 1 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 4 6、4 7、及び 4 8 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 1 を含む。

【 0 1 1 4 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 4 9、5 0、5 1、及び 5 2 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 2 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 4 9、5 0、5 1、及び 5 2 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 2 を含む。

10

【 0 1 1 5 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 5 3、5 4、5 5、及び 5 6 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 3 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 5 3、5 4、5 5、及び 5 6 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 3 を含む。

20

【 0 1 1 6 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 5 及び 3 6 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 1 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 5 及び 3 6 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 1 を含む。

【 0 1 1 7 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 7、3 8、3 9、及び 4 0 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 2 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 7、3 8、3 9、及び 4 0 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 2 を含む。

30

【 0 1 1 8 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 4 1、4 2、4 3、4 4、及び 4 5 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 3 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 4 1、4 2、4 3、4 4、及び 4 5 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 3 を含む。

【 0 1 1 9 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 6、4 7 及び 4 8 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 1 と；配列番号 4 9、5 0、5 1、及び 5 2 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 2 と；配列番号 5 3、5 4、5 5、及び 5 6 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 3 とを含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 4 6、4 7 及び 4 8 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 1 と；配列番号 4 9、5 0、5 1、及び 5 2 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 2 と；配列番号 5 3、5 4、5 5、及び 5 6 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 3 とを含む。

40

【 0 1 2 0 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 5 及び 3 6 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 1 と；配列番号 3 7、3 8、3 9、

50

及び 40 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 2 と；配列番号 41、42、43、44、及び 45 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 3 とを含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 35 及び 36 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 1 ；配列番号 37、38、39、及び 40 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 2 ；配列番号 41、42、43、44、及び 45 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 3 を含む。

#### 【0121】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 46、47 及び 48 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 1 と；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 49、50、51、及び 52 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 2 と；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 53、54、55、及び 56 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 3 とを含む。

10

#### 【0122】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 46、47 及び 48 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 1 と；1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 49、50、51、及び 52 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 2 と；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 53、54、55、及び 56 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 3 とを含む。

20

#### 【0123】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 35 及び 36 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 1 と；1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 37、38、39、及び 40 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 2 と；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 41、42、43、44、及び 45 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 3 とを含む。

#### 【0124】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 35 及び 36 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 1 ；1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 37、38、39、及び 40 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 2 ；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 41、42、43、44、及び 45 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 3 を含む。

30

#### 【0125】

特定の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、重鎖及び / 又は軽鎖の C D R 1、及び / 又は C D R 2、及び / 又は C D R 3 に対する修飾を含み、且つ重鎖及び / 又は軽鎖の F W 1、及び / 又は F W 2、及び / 又は F W 3、及び / 又は F W 4 に対する修飾を更に含む。

#### 【0126】

一部の態様において、F W<sub>1</sub> は配列番号 25 又は 26 を含み、F W<sub>2</sub> は配列番号 27 又は 28 を含み、F W<sub>3</sub> は配列番号 29 を含み、F W<sub>4</sub> は配列番号 30 を含み、F W<sub>5</sub> は配列番号 31 を含み、F W<sub>6</sub> は配列番号 32 を含み、F W<sub>7</sub> は配列番号 33 を含み、及び F W<sub>8</sub> は配列番号 34 を含む。

40

#### 【0127】

一部の態様において、F W<sub>1</sub> は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 25 又は 26 を含み；F W<sub>2</sub> は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 27 又は 28 を含み；F W<sub>3</sub> は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 29 を含み；F W<sub>4</sub> は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 30 を含み；F W<sub>5</sub> は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 31 を含み；F

50

W<sub>6</sub> は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号32を含み；FW<sub>7</sub> は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号33を含み；及びFW<sub>8</sub> は配列番号34を含む。

#### 【0128】

特定の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、同一であるか、又は1つ以上のCDRにおける1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換を除いて同一であるVL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2、及びVH-CDR3アミノ酸配列を含むVL及びVHを含み、ここにかかるVL-CDR1、VL-CRD2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2、及びVH-CDR3は、それぞれ、

配列番号46、49、53、35、37、及び41、又は  
配列番号47、49、53、35、37及び41、又は  
配列番号47、49、54、36、37及び42、又は  
配列番号46、50、54、36、38及び43、又は  
配列番号46、51、55、36、39及び44、又は  
配列番号48、52、54、36、40及び44、又は  
配列番号46、49、56、35、37及び41、又は  
配列番号46、49、53、35、37及び45、又は  
配列番号47、49、56、36、37及び45、又は  
配列番号46、50、56、36、38及び45、又は  
配列番号46、51、56、36、39及び45、又は  
配列番号48、52、56、36、40及び45、又は  
配列番号46、49、56、35、37及び45である。

#### 【0129】

特定の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は抗体VL及び抗体VHを含み、VLは、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、及び配列番号70からなる群から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%同一のアミノ酸配列を含む。

#### 【0130】

他の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は抗体VL及び抗体VHを含み、VHは、配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83及び配列番号84からなる群から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%同一のアミノ酸配列を含む。

#### 【0131】

他の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60、配列番号61、配列番号62、配列番号63、配列番号64、配列番号65、配列番号66、配列番号67、配列番号68、配列番号69、及び配列番号70からなる群から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%同一の配列を含むVLを含み、且つ配列番号71、配列番号72、配列番号73、配列番号74、配列番号75、配列番号76、配列番号77、配列番号78、配列番号79、配列番号80、配列番号81、配列番号82、配列番号83及び配列番号84からなる群から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%同一の配列を含むVHを更に含む。

#### 【0132】

10

20

30

40

50

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、配列番号68の配列を含むVLと配列番号82の配列を含むVHとを含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、配列番号68の配列からなるVLと配列番号82の配列からなるVHとを含む。

#### 【0133】

「クローン10.3抗体」(「73 combo3」又は「MEDI9447」とも称される)は、配列番号68のCD730010由来軽鎖(VL)(それぞれ配列番号46、51及び56の配列を有する3つのCDR、CDR1、CDR2、及びCDR3を含む)を2つ、及び配列番号82のCD730010由来重鎖(VH)(それぞれ配列番号36、39、及び45の配列を有する3つのCDR、CDR1、CDR2、及びCDR3を含む)を2つ含むIgG1である。

10

#### 【0134】

特定の態様において、本明細書に開示される抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、配列番号82の10.3重鎖VHと配列番号68の10.3軽鎖VLとを含む10.3抗体と実質的に同じか又はそれより良好な親和性でCD73と結合する。

#### 【0135】

##### (ii) CD730002由来抗CD73抗体

特定の態様において、本開示の抗CD73抗体は、限定はされないが：

- 1) 配列SGDKVGDKYASを含む軽鎖CDR1、及び/又は
  - 2) コンセンサス配列EDX<sub>18</sub>KX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>S(式中、X<sub>18</sub>はアミノ酸残基セリン(S)又はスレオニン(T)を表し、X<sub>19</sub>はアミノ酸残基アルギニン(R)又はチロシン(Y)を表し、及びX<sub>20</sub>はアミノ酸残基ヒスチジン(H)、プロリン(P)又はロイシン(L)を表す)を含む軽鎖CDR2、及び/又は
  - 3) 配列QAWDTSFWVを含む軽鎖CDR3
- を含めた、CD730002抗体の軽鎖のCDR1及び/又はCDR2及び/又はCDR3に対する修飾を含む。

20

#### 【0136】

特定の態様において、本開示の抗CD73抗体は、限定はされないが：

- 1) 配列SX<sub>21</sub>AX<sub>22</sub>S(式中、X<sub>21</sub>はアミノ酸残基チロシン(Y)又はバリリン(V)を表し、及びX<sub>22</sub>はアミノ酸残基メチオニン(M)又はアルギニン(R)を表す)を含む重鎖CDR1、及び/又は
  - 2) 配列AISGSGGSX<sub>23</sub>YYX<sub>24</sub>DSVKX<sub>25</sub>(式中、X<sub>23</sub>はアミノ酸残基スレオニン(T)又はプロリン(P)を表し；X<sub>24</sub>はアミノ酸残基アラニン(A)又はG(グリシン)を表し；及びX<sub>25</sub>はアミノ酸残基グリシン(G)又はアルギニン(R)を表す)を含む重鎖CDR2、及び/又は
  - 3) 配列DKGYWYWMを含む重鎖CDR3
- を含めた、CD730002の重鎖のCDR1及び/又はCDR2及び/又はCDR3に対する修飾を含む。

30

#### 【0137】

一態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、コンセンサスアミノ酸配列：

40

[FW<sub>9</sub>]SGDKVGDKYAS[FW<sub>10</sub>]EDX<sub>18</sub>KX<sub>19</sub>X<sub>20</sub>S[FW<sub>11</sub>]  
[QAWDTSFWV][FW<sub>12</sub>]

(式中、[FW<sub>9</sub>]、[FW<sub>10</sub>]、[FW<sub>11</sub>]及び[FW<sub>12</sub>]は、それぞれVLフレームワーク領域1(配列番号90又は91)、VLフレームワーク領域2(配列番号92)、VLフレームワーク領域3(配列番号93、94又は122)及びVLフレームワーク領域4(配列番号30)のアミノ酸残基を表し；ここで、X<sub>18</sub>はアミノ酸残基プロリン(P)又はロイシン(L)を表し；X<sub>19</sub>はアミノ酸残基アルギニン(R)又はチロシン(Y)を表し；及びX<sub>20</sub>はアミノ酸残基ヒスチジン(H)、プロリン(P)又はロイシン(L)を表す)を含むVL領域を含む。

50

## 【 0 1 3 8 】

一態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、コンセンサスアミノ酸配列：

[ F W <sub>1 3</sub> ] S X <sub>2 1</sub> A X <sub>2 2</sub> S [ F W <sub>1 4</sub> ] A I S G S G G S X <sub>2 3</sub> Y Y X <sub>2 4</sub> D  
S V K X <sub>2 5</sub> [ F W <sub>1 5</sub> ] D K G Y Y W Y M [ F W <sub>1 6</sub> ]

(式中、[ F W <sub>1 3</sub> ]、[ F W <sub>1 4</sub> ]、[ F W <sub>1 5</sub> ]及び[ F W <sub>1 6</sub> ]は、それぞれVHフレームワーク領域1(配列番号31)、VHフレームワーク領域2(配列番号32)、VHフレームワーク領域3(配列番号33)及びVHフレームワーク領域4(配列番号89)のアミノ酸残基を表し；ここで、X <sub>2 1</sub>はアミノ酸残基チロシン(Y)又はバリン(V)を表し；X <sub>2 2</sub>はアミノ酸残基メチオニン(M)又はアルギニン(R)を表し；X <sub>2 3</sub>はアミノ酸残基スレオニン(T)又はプロリン(P)を表し；X <sub>2 4</sub>はアミノ酸残基アラニン(A)又はG(グリシン)を表し；及びX <sub>2 5</sub>はアミノ酸残基グリシン(G)又はアルギニン(R)を表す)を含むVH領域を含む。

10

## 【 0 1 3 9 】

一態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、コンセンサスアミノ酸配列：

[ F W <sub>9</sub> ] S G D K V G D K Y A S [ F W <sub>1 0</sub> ] E D X <sub>1 8</sub> K X <sub>1 9</sub> X <sub>2 0</sub> S [ F W <sub>1 1</sub> ]  
Q A W D T S F W V [ F W <sub>1 2</sub> ]

(式中、[ F W <sub>9</sub> ]、[ F W <sub>1 0</sub> ]、[ F W <sub>1 1</sub> ]及び[ F W <sub>1 2</sub> ]は、それぞれVLフレームワーク領域1(配列番号90又は91)、VLフレームワーク領域2(配列番号92)、VLフレームワーク領域3(配列番号93、94又は122)及びVLフレームワーク領域4(配列番号30)のアミノ酸残基を表し；ここで、X <sub>1 8</sub>はアミノ酸残基プロリン(P)又はロイシン(L)を表し；X <sub>1 9</sub>はアミノ酸残基アルギニン(R)又はチロシン(Y)を表し；及びX <sub>2 0</sub>はアミノ酸残基ヒスチジン(H)、プロリン(P)又はロイシン(L)を表す)を含むVL領域を含み、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、コンセンサスアミノ酸配列：

20

[ F W <sub>1 3</sub> ] S X <sub>2 1</sub> A X <sub>2 2</sub> S [ F W <sub>1 4</sub> ] A I S G S G G S X <sub>2 3</sub> Y Y X <sub>2 4</sub> D  
S V K X <sub>2 5</sub> [ F W <sub>1 5</sub> ] D K G Y Y W Y M [ F W <sub>1 6</sub> ]

(式中、[ F W <sub>1 3</sub> ]、[ F W <sub>1 4</sub> ]、[ F W <sub>1 5</sub> ]及び[ F W <sub>1 6</sub> ]は、それぞれVHフレームワーク領域1(配列番号31)、VHフレームワーク領域2(配列番号32)、VHフレームワーク領域3(配列番号33)及びVHフレームワーク領域4(配列番号89)のアミノ酸残基を表し；ここで、X <sub>2 1</sub>はアミノ酸残基チロシン(Y)又はバリン(V)を表し；X <sub>2 2</sub>はアミノ酸残基メチオニン(M)又はアルギニン(R)を表し；X <sub>2 3</sub>はアミノ酸残基スレオニン(T)又はプロリン(P)を表し；X <sub>2 4</sub>はアミノ酸残基アラニン(A)又はG(グリシン)を表し；及びX <sub>2 5</sub>はアミノ酸残基グリシン(G)又はアルギニン(R)を表す)を含むVH領域を更に含む。

30

## 【 0 1 4 0 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号97からなる配列からなるVL - C D R 1を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号97からなる配列を含むVL - C D R 1を含む。

40

## 【 0 1 4 1 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号98、99、127、128、及び129からなる群から選択される配列からなるVL - C D R 2を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号98、99、127、128及び129からなる群から選択される配列を含むVL - C D R 2を含む。

## 【 0 1 4 2 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号100からなる配列からなるVL - C D R 3を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号100からなる配列を含むVL - C D R 3を含む。

50

## 【 0 1 4 3 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 5、1 2 3 及び 1 2 4 からなる群から選択される配列の配列からなる V H - C D R 1 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 5、1 2 3 及び 1 2 4 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 1 を含む。

## 【 0 1 4 4 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7、9 5、1 2 5 及び 1 2 6 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 2 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 7、9 5、1 2 5、及び 1 2 6 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 2 を含む。

10

## 【 0 1 4 5 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 9 6 からなる配列からなる V H - C D R 3 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 9 6 からなる配列を含む V H - C D R 3 を含む。

## 【 0 1 4 6 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 7 からなる配列からなる V L - C D R 1 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 7 からなる配列を含む V L - C D R 1 を含む。

## 【 0 1 4 7 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 8、9 9、1 2 7、1 2 8、及び 1 2 9 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 2 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 8、9 9、1 2 7、1 2 8、及び 1 2 9 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 2 を含む。

20

## 【 0 1 4 8 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 1 0 0 からなる配列からなる V L - C D R 3 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 1 0 0 からなる配列を含む V L - C D R 3 を含む。

30

## 【 0 1 4 9 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 5、1 2 3 及び 1 2 4 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 1 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 5、1 2 3 及び 1 2 4 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 1 を含む。

## 【 0 1 5 0 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 7、9 5、1 2 5 及び 1 2 6 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 2 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 7、9 5、1 2 5 及び 1 2 6 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 2 を含む。

40

## 【 0 1 5 1 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 6 からなる配列からなる V H - C D R 3 を含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 6 からなる配列を含む V H - C D R 3 を含む。

## 【 0 1 5 2 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 9 7 からなる

50

配列からなる V L - C D R 1 と；配列番号 9 8、9 9、1 2 7、1 2 8、及び 1 2 9 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 2 と；配列番号 1 0 0 からなる配列からなる V L - C D R 3 とを含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 9 7 からなる配列を含む V L - C D R 1 と；配列番号 9 8、9 9、1 2 7、1 2 8、及び 1 2 9 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 2 と；配列番号 1 0 0 からなる配列を含む V L - C D R 3 とを含む。

#### 【 0 1 5 3 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 5、1 2 3、及び 1 2 4 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 1 と；配列番号 3 7、9 5、1 2 5、及び 1 2 6 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 2 と；配列番号 9 6 からなる配列からなる V H - C D R 3 とを含む。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 3 5、1 2 3、及び 1 2 4 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 1 ；配列番号 3 7、9 5、1 2 5、及び 1 2 6 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 2 ；配列番号 9 6 からなる配列を含む V H - C D R 3 を含む。

10

#### 【 0 1 5 4 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 7 からなる配列からなる V L - C D R 1 と；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 8、9 9、1 2 7、1 2 8、及び 1 2 9 からなる群から選択される配列からなる V L - C D R 2 と；1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 1 0 0 からなる配列からなる V L - C D R 3 とを含む。

20

#### 【 0 1 5 5 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 7 からなる配列を含む V L - C D R 1 と；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 8、9 9、1 2 7、1 2 8、及び 1 2 9 からなる群から選択される配列を含む V L - C D R 2 と；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 1 0 0 からなる配列を含む V L - C D R 3 とを含む。

#### 【 0 1 5 6 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 5、1 2 3、及び 1 2 4 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 1 と；1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 7、9 5、1 2 5、及び 1 2 6 からなる群から選択される配列からなる V H - C D R 2 と；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 6 からなる配列からなる V H - C D R 3 とを含む。

30

#### 【 0 1 5 7 】

一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 5、1 2 3、及び 1 2 4 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 1 ；1、2、3、又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 3 7、9 5、1 2 5、及び 1 2 6 からなる群から選択される配列を含む V H - C D R 2 ；1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換を除いて配列番号 9 6 からなる配列を含む V H - C D R 3 を含む。

40

#### 【 0 1 5 8 】

特定の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、重鎖及び / 又は軽鎖の C D R 1、及び / 又は C D R 2、及び / 又は C D R 3 に対する修飾を含み、且つ重鎖及び / 又は軽鎖の F W 1、及び / 又は F W 2、及び / 又は F W 3、及び / 又は F W 4 に対する修飾を更に含む。

#### 【 0 1 5 9 】

一部の態様において、F W<sub>9</sub> は配列番号 9 0 又は 9 1 を含み、F W<sub>10</sub> は配列番号 9 2 を含み、F W<sub>11</sub> は配列番号 9 3、9 4、又は 1 2 2 を含み、F W<sub>12</sub> は配列番号 3 0 を含み、F W<sub>13</sub> は配列番号 3 1 を含み、F W<sub>14</sub> は配列番号 3 2 を含み、F W<sub>15</sub> は配列

50

番号 33 を含み、及び  $FW_{16}$  は配列番号 89 を含む。

【0160】

一部の態様において、 $FW_9$  は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号 90 又は 91 を含み、 $FW_{10}$  は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号 92 を含み、 $FW_{11}$  は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号 93、94、又は122 を含み、 $FW_{12}$  は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号 30 を含み、 $FW_{13}$  は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号 31 を含み、 $FW_{14}$  は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号 32 を含み、 $FW_{15}$  は、1、2、3 又は4個のアミノ酸置換を除いて配列番号 33 を含み、及び  $FW_{16}$  は配列番号 89 を含む。

10

【0161】

特定の態様において、抗 CD733 抗体又はその抗原結合断片は、同一であるか、又は1つ以上の CDR における1、2、3、若しくは4個のアミノ酸置換を除いて同一である VL - CDR1、VL - CRD2、VL - CDR3、VH - CDR1、VH - CDR2、及び VH - CDR3 アミノ酸配列を含む VL 及び VH を含み、ここでかかる VL - CDR1、VL - CRD2、VL - CDR3、VH - CDR1、VH - CDR2、及び VH - CDR3 は、それぞれ、

配列番号 97、98、100、35、37、及び 96、又は  
配列番号 97、99、100、35、95 及び 96、又は  
配列番号 97、98、100、35、37、及び 96、又は  
配列番号 97、99、100、123、37、及び 96、又は  
配列番号 97、99、100、124、37、及び 96、又は  
配列番号 97、99、100、35、125、及び 96、又は  
配列番号 97、99、100、35、126、及び 96、又は  
配列番号 97、99、100、35、95、及び 96、又は  
配列番号 97、127、100、35、95、及び 96、又は  
配列番号 97、128、100、35、95、及び 96、又は  
配列番号 97、129、100、35、95、及び 96、又は  
配列番号 97、99、100、35、95、及び 96 である。

20

【0162】

特定の態様において、抗 CD73 抗体又はその抗原結合断片は抗体 VL 及び抗体 VH を含み、VL は、配列番号 86、88、112、118、119、120、及び 121 からなる群から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、又は約 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

30

【0163】

他の態様において、抗 CD73 抗体又はその抗原結合断片は抗体 VL 及び抗体 VH を含み、VH は、配列番号 85、87、111、113、114、115、116、及び 117 からなる群から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、又は約 100% 同一のアミノ酸配列を含む。

40

【0164】

他の態様において、抗 CD73 抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 86、88、112、118、119、120、及び 121 からなる群から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、又は約 100% 同一の配列を含む VL を含み；且つ配列番号 85、87、111、113、114、115、116、及び 117 からなる群から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約 80%、約 85%、約 90%、約 95%、約 96%、約 97%、約 98%、約 99%、又は約 100% 同一の配列を含む VH を更に含む。

【0165】

50

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、配列番号88の配列を含むVLと；配列番号87の配列を含むVHとを含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、配列番号87の配列からなるVLと、配列番号87の配列からなるVHとを含む。

#### 【0166】

「クローン2C5抗体」は、配列番号88のCD730002由来軽鎖(VL)(それぞれ配列番号97、99、及び100の配列を有する3つのCDR、CDR1、CDR2、及びCDR3を含む)を2つ、及び配列番号87のCD7300002由来重鎖(VH)(それぞれ配列番号35、95、及び96の配列を有する3つのCDR、CDR1、CDR2、及びCDR3を含む)を含むIgG1である。

10

#### 【0167】

特定の態様において、本明細書に開示される抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、配列番号87の2C5重鎖VHと配列番号88の2C5軽鎖VLとを含む2C5抗体と実質的に同じか又はそれより良好な親和性でCD73と結合する。

#### 【0168】

(iii) CD730002又はCD730010以外の親抗体を有する抗CD73抗体  
他の態様において、本明細書に開示される抗CD73抗体又は抗原結合断片の親抗体は、CD730004(即ち、配列番号104のVLと配列番号103のVHとを含む抗CD73抗体)、CD730008(即ち、配列番号106のVLと配列番号107のVHとを含む抗CD73抗体)、CD7300011(即ち、配列番号5のVLと配列番号6のVHとを含む抗CD73抗体)、CD730021(即ち、配列番号7のVLと配列番号8のVHとを含む抗CD73抗体)、CD730042(即ち、配列番号9のVLと配列番号10のVHとを含む抗CD73抗体)、CD730046(即ち、配列番号11のVLと配列番号12のVHとを含む抗CD73抗体)、CD730047(即ち、配列番号13のVLと配列番号14のVHとを含む抗CD73抗体)、CD730068(即ち、配列番号108のVLと配列番号107のVHとを含む抗CD73抗体)、又はCD730069(即ち、配列番号110のVLと配列番号109のVHとを含む抗CD73抗体)である。親抗体に対する修飾には、親抗体、例えばCD730004と比較したときのCDR領域及び/又はFW領域の突然変異が含まれ得る。

20

#### 【0169】

特定の態様において、抗CD73抗体は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069の軽鎖のCDR1及び/又はCDR2及び/又はCDR3に対する修飾を含む。

30

#### 【0170】

特定の態様において、抗CD73抗体は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069の重鎖のCDR1及び/又はCDR2及び/又はCDR3に対する修飾を含む。

#### 【0171】

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR1を含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR2を含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR3を含む。

40

50

## 【 0 1 7 2 】

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR1を含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR2を含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR3を含む。

10

## 【 0 1 7 3 】

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR1を含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR2を含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR3を含む。

20

## 【 0 1 7 4 】

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR1を含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3、又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR2を含む。一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR3を含む。

30

## 【 0 1 7 5 】

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR1と；CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR2と；CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR3とを含む。

40

## 【 0 1 7 6 】

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-C

50

DR1と；CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR2と；CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR3とを含む。

【0177】

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR1と；1、2、3又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR2と；1、2、3又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL-CDR3とを含む。

10

【0178】

一部の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、1、2、3又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR1と；1、2、3又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR2と；1、2、3又は4個のアミノ酸置換を除いて、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH-CDR3とを含む。

20

【0179】

特定の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来の重鎖及び/又は軽鎖のCDR1、及び/又はCDR2、及び/又はCDR3に対する修飾を含み、且つCD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来の重鎖及び/又は軽鎖のFW1、及び/又はFW2、及び/又はFW3、及び/又はFW4に対する修飾を更に含む。

30

【0180】

特定の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、同一であるか、又は1つ以上のCDRにおける1、2、3、若しくは4個のアミノ酸置換を除いて同一であるVL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2、及びVH-CDR3アミノ酸配列を含むVL及びVHを含み、ここにかかるVL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3、VH-CDR1、VH-CDR2、及びVH-CDR3は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来である。

40

【0181】

特定の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は抗体VL及び抗体VHを含み、VLは、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL配列から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約8

50

0%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0182】

他の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は抗体VL及び抗体VHを含み、VHは、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH配列から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%同一のアミノ酸配列を含む。

【0183】

他の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVL配列から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%同一の配列を含むVLを含み、且つCD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069由来のVH配列から選択される参照アミノ酸配列と少なくとも約80%、約85%、約90%、約95%、約96%、約97%、約98%、約99%、又は約100%同一の配列を含むVHを更に含む。

【0184】

特定の態様において、本明細書に開示される抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、CD730004、CD730008、CD7300011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069抗体と実質的に同じか又はそれより良好な親和性でCD73と結合する。

【0185】

(iv) 混合適合 (mixed and matched) 抗CD73抗体

本明細書に開示される抗CD73結合分子（例えば、CD730002、CD730004、CD730008、CD730010、CD730011、CD730021、CD730042、CD730046、CD730047、CD730068、又はCD730069）のVH及びVL配列又はかかる配列の変異体（例えば、クローン10 GL9、クローン10 P32E、クローン10 C1、クローン10 C2、クローン10 D3、クローン10 G10、クローン10 HPT、クローン10 GRVE、クローン10 combo1、クローン10 combo2、クローン10 combo3、クローン10 combo5、又はクローンcombo6）のVH及びVLは、他の抗CD73結合分子を作成するため「混合適合」することができる。

【0186】

特定の態様において、10.3抗体及び2C5抗体のVH配列が混合適合される。別の態様において、10.03抗体及び2C5抗体のVL配列を混合適合することができる。それに加えて又は代えて、本明細書に開示されるクローン10 (CD730010) 変異体のVL及び/又はVH配列を混合適合することができる。それに加えて又は代えて、本明細書に開示されるクローン2 (CD730002) 変異体のVL及び/又はVH配列を混合適合することができる。それに加えて又は代えて、本明細書に開示されるクローン10 (CD730010) 及びクローン2 (CD730002) 変異体のVL及び/又はVH配列を混合適合することができる。

【0187】

一部の態様において、VL及び/又はVHの混合適合は、同じエピトープピンに分類される抗体に由来する配列間で行うことができる（実施例2を参照）。本明細書で使用されるとき、用語「エピトープピン」は、同じエピトープ又は重複エピトープに結合するか、又は同じエピトープ又は重複エピトープとの結合に関して互いに競合する抗体又はその抗

10

20

30

40

50

原結合断片のグループ化を指す。例えば、CD730003、CD730010、CD730021、CD730042、CD730046、及びCD730047（これらの抗体は全てが「エピトープピンB」に属する）由来の配列を混合適合することができる。他の態様において、VL及び/又はVHの混合適合は、異なるエピトープピンに分類される抗CD73抗体に由来する配列間で行うことができる。従って、「エピトープピンB」に属する抗体の配列を、「エピトープピンA」（CD730002、CD730004、CD730008、及びCD730011）又は「エピトープピンC」（CD730068及びCD730069）の抗CD73抗体の配列と混合適合することができる。

#### 【0188】

##### （v）突然変異抗CD73抗体

特定の態様において、本明細書に開示される抗CD73抗体（例えば、MED19447、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、ヒトFcRnとの結合を改善し、且つ抗CD73抗体又はその抗原結合断片の半減期を改善する突然変異を含む。一部の態様において、かかる突然変異は、IgG1の定常ドメインに導入された、252位のメチオニン（M）からチロシン（Y）への突然変異、254位のセリン（S）からスレオニン（T）への突然変異、及び256位のスレオニン（T）からグルタミン酸（E）への突然変異（Kabat（Kabat, et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Public Health Service, National Institutes of Health, Washington, D.C.）にあるとおりのEUインデックスに従い付番する）である。米国特許第7,658,921号明細書（これは参照により本明細書に援用される）を参照のこと。「YTE突然変異体」と称されるこの種の突然変異体IgGは、野生型バージョンの同じ抗体と比較したとき約4倍の半減期の増加を呈することが示されている（Dall'Acqua et al., J. Biol. Chem. 281:23514-24 (2006)）。一部の態様において、IgG定常ドメインを含む抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、251～257、285～290、308～314、385～389、及び428～436位（KabatにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）のアミノ酸残基の1個以上のアミノ酸置換を含み、ここにかかる突然変異は抗CD73抗体又はその抗原結合断片の血清半減期を増加させる。

#### 【0189】

一部の態様において、YTE突然変異体は、IgG定常ドメインの434位（KabatにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）に、トリプトファン（W）、メチオニン（M）、チロシン（Y）、及びセリン（S）からなる群から選択されるアミノ酸による置換を更に含む。他の態様において、YTE突然変異体は、IgG定常ドメインの434位（KabatにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）に、トリプトファン（W）、メチオニン（M）、チロシン（Y）、及びセリン（S）からなる群から選択されるアミノ酸による置換と、IgG定常ドメインの428位（KabatにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）に、スレオニン（T）、ロイシン（L）、フェニルアラニン（F）、及びセリン（S）からなる群から選択されるアミノ酸による置換とを更に含む。

#### 【0190】

更に他の態様において、YTE突然変異体は、IgG定常ドメインの434位（KabatにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）に、チロシン（Y）による置換と、IgG定常ドメインの257位（KabatにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）に、ロイシン（L）による置換とを更に含む。一部の態様において、YTE突然変異体は、IgG定常ドメインの434位（KabatにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）に、セリン（S）による置換と、IgG定常ドメインの428位（KabatにあるとおりのEUインデックスに従い付番する）に、ロイシン（L）による置換とを更に含む。

## 【 0 1 9 1 】

ある具体的な態様において、本明細書に開示される抗 C D 7 3 抗体（例えば、M E D I 9 4 4 7、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）又はその抗原結合断片は、I g G 1 定常ドメインの 2 5 2 位のメチオニン（M）からチロシン（Y）への突然変異、2 5 4 位のセリン（S）からスレオニン（T）への突然変異、及び 2 5 6 位のスレオニン（T）からグルタミン酸（E）への突然変異（K a b a t にあるとおりの E U インデックスに従い付番する）を含む I g G 1 定常ドメインを含む。

## 【 0 1 9 2 】

特定の態様において、本明細書に開示される抗 C D 7 3 抗体（例えば、M E D I 9 4 4 7、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）又はその抗原結合断片は、

（a）2 5 2 位のアミノ酸の、チロシン（Y）、フェニルアラニン（F）、トリプトファン（W）、又はスレオニン（T）による置換、

（b）2 5 4 位のアミノ酸の、スレオニン（T）による置換、

（c）2 5 6 位のアミノ酸の、セリン（S）、アルギニン（R）、グルタミン（Q）、グルタミン酸（E）、アスパラギン酸（D）、又はスレオニン（T）による置換、

（d）2 5 7 位のアミノ酸の、ロイシン（L）による置換、

（e）3 0 9 位のアミノ酸の、プロリン（P）による置換、

（f）3 1 1 位のアミノ酸の、セリン（S）による置換、

（g）4 2 8 位のアミノ酸の、スレオニン（T）、ロイシン（L）、フェニルアラニン（F）、又はセリン（S）による置換、

（h）4 3 3 位のアミノ酸の、アルギニン（R）、セリン（S）、イソロイシン（I）、プロリン（P）、又はグルタミン（Q）による置換、

（i）4 3 4 位のアミノ酸の、トリプトファン（W）、メチオニン（M）、セリン（S）、ヒスチジン（H）、フェニルアラニン（F）、又はチロシンによる置換、及び

（j）前記置換の 2 つ以上の組み合わせ

（位置は K a b a t にあるとおりの E U インデックスに従い付番する）からなる群から選択される少なくとも 1 つの I g G 定常ドメインアミノ酸置換を含み、ここで修飾 I g G は、野生型 I g G 定常ドメインを有する I g G の血清半減期と比較して血清半減期が増加している。

## 【 0 1 9 3 】

一部の態様において、本明細書に開示される抗 C D 7 3 抗体（例えば、M E D I 9 4 4 7、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）又はその抗原結合断片の V H 及び / 又は V L アミノ酸配列は、上記の V H 及び V L 配列と 8 5 %、9 0 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 % 又は 9 9 % の類似性であり、且つ 1、2、3、4、5 個又はそれを超える保存的置換を含む。それぞれ配列番号 7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 7、1 1 1、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、又は 1 1 7 の V H 領域、及び / 又は配列番号 5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、8 6、8 8、1 1 2、1 1 8、1 1 9、1 2 0、又は 1 2 1 の V L 領域と高い（即ち、8 0 % 以上の）配列類似性又は配列同一性を有する V H 及び V L 領域を有する C D 7 3 抗体は、配列番号 5 7、5 8、5 9、6 0、6 1、6 2、6 3、6 4、6 5、6 6、6 7、6 8、6 9、7 0、7 1、7 2、7 3、7 4、7 5、7 6、7 7、7 8、7 9、8 0、8 1、8 2、8 3、8 4、8 5、8 6、8 7、8 8、1 1 1、1 1 2、1 1 3、1 1 4、1 1 5、1 1 6、1 1 7、1 1 8、1 1 9、1 2 0、又は 1 2 1 をコードする核酸分子を突然変異誘発し（例えば、部位特異的又は P C R 媒介性突然変異誘発）、続いて本明細書に記載される機能アッセイを用いて、コードされた改変抗体を保持機能に関して試験することによって得ることができる。

## 【 0 1 9 4 】

一部の態様において、本明細書に開示される抗 C D 7 3 抗体の F c ドメイン又は本明細書に開示される抗体の C D 7 3 結合断片を含む融合タンパク質の F c ドメインは、例えば A D C C による細胞傷害を低減するため、F c 受容体に対する結合性が低減されている。

一部の態様において、抗体又はFc融合タンパク質のFcドメインは、例えばADCCによる細胞傷害を増加させるため、Fc受容体に対する結合性が増加されている。一部の態様において、抗体又はFc融合タンパク質のFcドメインは、Kabatatに規定されるとおりのEUインデックスによって付番するとき234、235、236、237、238、239、240、241、243、244、245、247、251、252、254、255、256、262、263、264、265、266、267、269、279、280、284、292、296、297、298、299、305、313、316、325、326、327、328、329、330、331、332、333、334、339、341、343、370、373、378、392、416、419、421、440、及び443からなる群から選択される1つ以上の位置に天然に存在しないADCC低減アミノ酸残基を含む。抗体のADCC活性を低減することが可能な多数の特異的突然変異が当該技術分野において公知であり、例えば、234F、235E、235F、235Q（又は235Y）、239A、332Q、331S及びこれらの組み合わせが挙げられる。例えば、国際公開第8807089号パンフレット、同第9958572号パンフレット、同第9951642号パンフレット、同第2012175751号パンフレット、同第2011149999号パンフレット、同第2011066501号パンフレット、同第2000042072号パンフレット、同第2011120134号パンフレット（これらは全体として参照により本明細書に援用される）に記載される突然変異を参照のこと。ADCCエフェクター機能が低下した抗体にはまた、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、及び329のうちの1つ以上の置換を有するものも含まれる（例えば、米国特許第6,737,056号明細書を参照）。かかるFc突然変異体にはまた、残基265及び297のアラニンへの置換を有するFc突然変異体を含め、アミノ酸位置265、269、270、297及び327の2つ以上に置換を有するFc突然変異体も含まれる（例えば、米国特許第7,332,581号明細書を参照）。任意選択で、ADCC及びCDCの両方を低減する突然変異が組み込まれてもよい。一部の態様では、ADCC及び/又はCDCを低減し又は消失させる突然変異を含む本明細書に開示される抗CD73抗体又はその抗原結合断片を使用して、抗体薬物コンジュゲート(ADC)を作成することができる。

#### 【0195】

一態様において、本開示は抗CD73抗体を提供し、この抗体は、IgG1、IgG2又はIgG3であり、Kabatatに規定されるとおりのEUインデックスによって付番するとき234、235、及び331からなる群から選択される1つ以上の位置に少なくとも1つの修飾を含む。更に別の具体的な態様において、Fc領域は、IgG1、IgG2又はIgG3 Fc領域であり、天然に存在しないアミノ酸は、Kabatatに規定されるとおりのEUインデックスによって付番するとき234F、235E、235F、235Q（又は235Y）、239A、332Q、331S、332Qからなる群から選択される。

#### 【0196】

別の態様において、本開示は抗CD73抗体を提供し、この抗体はIgG4であり、Kabatatに規定されるとおりのEUインデックスによって付番するとき228及び235からなる群から選択される1つ以上の位置に少なくとも1つの修飾を含む。更に別の具体的な態様において、Fc領域はIgG4 Fc領域であり、天然に存在しないアミノ酸は、Kabatatに規定されるとおりのEUインデックスによって付番するとき228P、235E及び235Yからなる群から選択される。具体的な態様において、本開示は抗CD73抗体を提供し、この抗体は、IgG1、IgG2、又はIgG3であり、位置(i)234F、235E、及び331S；(ii)234F、235F、及び331S；(iii)234F、235Q、及び322Qに修飾を含む。別の具体的な態様において、本開示は抗CD73抗体を提供し、この抗体はIgG4であり、修飾228P及び235Eを含む。

#### 【0197】

### III. エピトープ競合 CD73 結合分子

別の態様において、本開示は、本明細書に記載される様々な抗 CD73 抗体が結合するのと同じエピトープに結合する CD73 結合分子、例えば、MED19447、クローン 10.3 抗体と同じエピトープ、又はクローン 2C5 抗体と同じエピトープに結合する分子を提供する。

#### 【0198】

かかる抗体は、標準的な CD73 結合アッセイ（例えば、フローサイトメトリーアッセイ、表面プラズモン共鳴、又は溶液アッセイ）において、本明細書に開示される抗 CD73 抗体、例えば、CD730010 抗体、CD730002 抗体、CD730004 抗体、及びその抗原結合断片と交差競合する（例えば、統計学的に有意な方法でその結合を競合的に阻害する）その能力に基づき同定することができる。

10

#### 【0199】

従って、一態様において、本開示は、CD73 との結合に関して別の抗 CD73 抗体又はその抗原結合断片、例えば、CD730010 抗体、CD730002 抗体、CD730004 抗体、その変異体（例えば、MED19447、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）、又はその抗原結合断片と競合する抗 CD73 抗体及びその抗原結合断片、例えばヒトモノクローナル抗体を提供する。被験抗体が例えば CD730010 抗体（又はクローン 10.3 抗体又はその抗原結合断片）、又は CD730002 抗体（又はクローン 2C5 抗体又はその抗原結合断片）の結合を阻害する能力は、その被験抗体が CD73 との結合に関してその抗体と競合し得ることを実証する；かかる抗体は、非限定的

20

#### 【0200】

### IV. 抗 CD73 抗体の機能的特性

抗原に対する抗体の親和性又はアビディティは、当該技術分野において周知の任意の好適な方法、例えば、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、又はラジオイムノアッセイ（RIA）、又は反応速度（例えば、BIACORE（商標）分析）を用いて実験的に決定することができる。直接結合アッセイ並びに競合的結合アッセイフォーマットは、容易に用いることができる。（例えば、Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions," In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, N. Y. (1984); Kuby, Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, N. Y. (1992); 及び本明細書に記載される方法を参照のこと。特定の抗体抗原相互作用の親和性計測値は、異なる条件下（例えば、塩濃度、pH、温度）で計測した場合に異なり得る。従って、親和性及び他の抗原結合パラメータ（例えば、 $K_D$  又は  $K_d$ 、 $K_{on}$ 、 $K_{off}$ ）の計測は、抗体及び抗原の標準化した溶液、及び当該技術分野において公知のとおり及び本明細書に記載される緩衝液など、標準化した緩衝液で行われる。

30

40

#### 【0201】

また、当該技術分野において、表面プラズモン共鳴分析（例えば、BIACORE（商標））を用いて計測した親和性が、反応物のうちのいずれの 1 つがチップに結合するかに応じて異なり得ることも公知である。この点で、親和性は、標的抗体（例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）をチップ上に固定化したフォーマット（「IgG ダウン」フォーマットと称される）を用いるか、又は標的タンパク質（例えば CD73）をチップ上に固定化したフォーマット（例えば「CD73 ダウン」フォーマットと称される）を用いて計測することができる。

50

## 【 0 2 0 2 】

本開示の一態様において、抗CD73抗体（例えば、MEDI9447、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、 $10^{-6}$  M未満、又は $10^{-7}$  M未満、又は $10^{-8}$  M未満、又は $10^{-9}$  M未満、又は $10^{-10}$  M未満、又は $10^{-11}$  M未満、又は $10^{-12}$  M未満、又は $10^{-13}$  M未満の解離定数又は $k_d$  ( $k_{off} / k_{on}$ ) でCD73及び/又はその抗原断片に特異的に結合する。

## 【 0 2 0 3 】

別の態様において、抗CD73抗体（例えば、MEDI9447、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、 $1 \times 10^{-3} s^{-1}$  未満、又は $2 \times 10^{-3} s^{-1}$  未満の $K_{off}$  でCD73及び/又はその抗原断片に結合する。他の態様において、抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、 $10^{-3} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-3} s^{-1}$  未満、 $10^{-4} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-4} s^{-1}$  未満、 $10^{-5} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-5} s^{-1}$  未満、 $10^{-6} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-6} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-7} s^{-1}$  未満、 $10^{-8} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-8} s^{-1}$  未満、 $10^{-9} s^{-1}$  未満、 $5 \times 10^{-9} s^{-1}$  未満、又は $10^{-10} s^{-1}$  未満の $K_{off}$  でCD73及びその抗原断片に結合する。

10

## 【 0 2 0 4 】

別の態様において、抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、少なくとも $10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^5 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^6 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、少なくとも $5 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ 、又は少なくとも $10^8 M^{-1} s^{-1}$ 、又は少なくとも $10^9 M^{-1} s^{-1}$ の会合速度定数又は $k_{on}$ 速度でCD73及び/又はその抗原断片に結合する。

20

## 【 0 2 0 5 】

一部の態様において、抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーによって計測したとき少なくとも約60 pM、少なくとも約70 pM、少なくとも約80 pM、少なくとも約90 pM、少なくとも約100 pM、少なくとも約110 pM、少なくとも約120 pM、少なくとも約130 pM、少なくとも約140 pM、少なくとも約150 pM、少なくとも約160 pM、又は少なくとも約170 pMの $K_D$ でMB-MDA-231細胞の表面上のCD73に結合する。具体的な一態様において、抗CD73抗体はクローン10.3抗体であり、フローサイトメトリーによって計測したとき約150 pMの $K_D$ でMB-MDA-231細胞の表面上のCD73に結合する。別の具体的な態様において、抗CD73抗体はクローン2C5抗体であり、フローサイトメトリーによって計測したとき約80 pMの $K_D$ でMB-MDA-231細胞の表面上のCD73に結合する。

30

## 【 0 2 0 6 】

一部の態様において、抗CD73抗体（例えば、MEDI9447、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーによって計測したとき少なくとも約40 pM、少なくとも約50 pM、少なくとも約60 pM、少なくとも約70 pM、少なくとも約80 pM、少なくとも約90 pM、少なくとも約100 pM、少なくとも約120 pM、又は少なくとも約130 pMの $K_D$ でマウス3T1細胞の表面上のCD73に結合する。具体的な一態様において、抗CD73抗体はクローン10.3抗体であり、フローサイトメトリーによって計測したとき約110 pMの $K_D$ でマウス3T1細胞の表面上のCD73に結合する。別の具体的な態様において、抗CD73抗体はクローン2C5抗体であり、フローサイトメトリーによって計測したとき約55 pMの $K_D$ でマウス3T1細胞の表面上のCD73に結合する。

40

## 【 0 2 0 7 】

一部の態様において、抗CD73抗体（例えば、MEDI9447、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、フローサイトメトリーによって計測したとき少なくとも約40 pM、少なくとも約50 pM、少なくとも約60 pM、少

50

なくとも約 70 pM、少なくとも約 80 pM、少なくとも約 90 pM、又は少なくとも約 100 pM の  $K_D$  でカニクイザル MK-1 細胞の表面上の CD73 に結合する。具体的な一態様において、抗 CD73 抗体はクローン 10.3 抗体であり、フローサイトメトリーによって計測したとき約 80 pM の  $K_D$  でカニクイザル MK-1 細胞の表面上の CD73 に結合する。別の具体的な態様において、抗 CD73 抗体はクローン 2C5 抗体であり、フローサイトメトリーによって計測したとき約 60 pM の  $K_D$  でカニクイザル MK-1 細胞の表面上の CD73 に結合する。

#### 【0208】

一部の態様において、抗 CD73 抗体（例えば、MEDI9447、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）又はその抗原結合断片は、表面プラズモン共鳴（PROTEON（登録商標））によって計測したとき少なくとも約 3 pM、少なくとも約 4 pM、少なくとも約 5 pM、少なくとも約 6 pM、少なくとも約 7 pM、少なくとも約 8 pM、少なくとも約 9 pM、又は少なくとも約 10 pM の  $K_D$  でヒト CD73 に結合する。具体的な一態様において、抗 CD73 抗体はクローン 10.3 抗体であり、表面プラズモン共鳴（PROTEON（登録商標））によって計測したとき約 4 pM の  $K_D$  でヒト CD73 に結合する。別の具体的な態様において、抗 CD73 抗体はクローン 2C5 抗体であり、表面プラズモン共鳴（PROTEON（登録商標））によって計測したとき約 9 pM の  $K_D$  でヒト CD73 に結合する。

#### 【0209】

一部の態様において、本明細書に開示される抗 CD73 抗体（例えば、MEDI9447、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）又はその抗原結合断片は、表面プラズモン共鳴（PROTEON（登録商標））によって計測したとき少なくとも約 1 pM、少なくとも約 2 pM、少なくとも約 3 pM、少なくとも約 4 pM、少なくとも約 5 pM、少なくとも約 6 pM、少なくとも約 7 pM、少なくとも約 8 pM、少なくとも約 9 pM、少なくとも約 10 pM、少なくとも約 11 pM、少なくとも約 12 pM、少なくとも約 13 pM、少なくとも約 14 pM、少なくとも約 15 pM、少なくとも約 16 pM、少なくとも約 17 pM、少なくとも約 18 pM、少なくとも約 19 pM、少なくとも約 20 pM、少なくとも約 21 pM、少なくとも約 22 pM、少なくとも約 23 pM、少なくとも約 24 pM、又は少なくとも約 25 pM の  $K_D$  でマウス CD73 に結合する。具体的な一態様において、抗 CD73 抗体はクローン 10.3 抗体であり、表面プラズモン共鳴（PROTEON（登録商標））によって計測したとき約 1 pM の  $K_D$  でマウス CD73 に結合する。別の具体的な態様において、抗 CD73 抗体はクローン 2C5 抗体であり、表面プラズモン共鳴（PROTEON（登録商標））によって計測したとき約 22 pM の  $K_D$  でマウス CD73 に結合する。

#### 【0210】

一部の態様において、抗 CD73 抗体（例えば、MEDI9447、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）又はその抗原結合断片は、表面プラズモン共鳴（PROTEON（登録商標））によって計測したとき少なくとも約 3 pM、少なくとも約 4 pM、少なくとも約 5 pM、少なくとも約 6 pM、少なくとも約 7 pM、少なくとも約 8 pM、少なくとも約 9 pM、又は少なくとも約 10 pM の  $K_D$  でカニクイザル CD73 に結合する。具体的な一態様において、抗 CD73 抗体はクローン 10.3 抗体であり、SPR（Proton）によって計測したとき約 7 pM の  $K_D$  でカニクイザル CD73 に結合する。別の具体的な態様において、抗 CD73 抗体はクローン 2C5 抗体であり、表面プラズモン共鳴（PROTEON（登録商標））によって計測したとき約 9 pM の  $K_D$  でカニクイザル CD73 に結合する。

#### 【0211】

一部の態様において、抗 CD73 抗体（例えば、MEDI9447、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）又はその抗原結合断片は、溶液結合によって計測したとき少なくとも約 40 pM、少なくとも約 50 pM、少なくとも約 60 pM、少なくとも約 70 pM、少なくとも約 80 pM、少なくとも約 90 pM、少なくとも約 100 pM、又は

10

20

30

40

50

少なくとも約  $110 \text{ pM}$  の  $K_D$  でヒト CD73 に結合する。具体的な一態様において、抗 CD73 抗体はクローン 10.3 抗体であり、溶液結合によって計測したとき約  $80 \text{ pM}$  の  $K_D$  でヒト CD73 に結合する。別の具体的な態様において、抗 CD73 抗体はクローン 2C5 抗体であり、溶液結合によって計測したとき約  $80 \text{ pM}$  の  $K_D$  でヒト CD73 に結合する。

#### 【0212】

一部の態様において、抗 CD73 抗体（例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）又はその抗原結合断片は、溶液結合によって計測したとき少なくとも約  $100 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $200 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $300 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $400 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $500 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $600 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $700 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $800 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $900 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $1000 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $1100 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $1200 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $1300 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $1400 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $1500 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $1600 \text{ pM}$ 、少なくとも約、又は少なくとも約  $1700 \text{ pM}$  の  $K_D$  でマウス CD73 に結合する。具体的な一態様において、抗 CD73 抗体はクローン 10.3 抗体であり、溶液結合によって計測したとき約  $130 \text{ pM}$  の  $K_D$  でマウス CD73 に結合する。別の具体的な態様において、抗 CD73 抗体はクローン 2C5 抗体であり、溶液結合によって計測したとき約  $1500 \text{ pM}$  の  $K_D$  でマウス CD73 に結合する。

#### 【0213】

一部の態様において、抗 CD73 抗体（例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）又はその抗原結合断片は、溶液結合によって計測したとき少なくとも約  $60 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $70 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $80 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $90 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $100 \text{ pM}$ 、少なくとも約  $110 \text{ pM}$ 、又は少なくとも約  $120 \text{ pM}$  の  $K_D$  でカニクイザル CD73 に結合する。具体的な一態様において、抗 CD73 抗体はクローン 10.3 抗体であり、溶液結合によって計測したとき約  $90 \text{ pM}$  の  $K_D$  でカニクイザル CD73 に結合する。別の具体的な態様において、抗 CD73 抗体はクローン 2C5 抗体であり、溶液結合によって計測したとき約  $100 \text{ pM}$  の  $K_D$  でカニクイザル CD73 に結合する。詳細な態様において、MED19447 は、約  $1 \times 10^{-12}$ 、 $5 \times 10^{-12}$ 、 $10 \times 10^{-12}$ 、 $100 \times 10^{-12}$ 、又は  $150 \times 10^{-12}$  の  $K_D$  で CD73 に結合する。

#### 【0214】

一部の態様において、本明細書に開示される CD73 結合分子、例えば、抗 CD73 抗体（例えば、MED19447、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）又はその抗原結合断片は、T 細胞分裂の AMP 媒介抑制を軽減することができる。他の態様において、本明細書に開示される CD73 結合分子、例えば、抗 CD73 抗体（例えば、MED19447、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）又はその抗原結合断片は、 $T_{reg}$  による ATP 誘導性  $T_{eff}$  抑制をレスキューすることができる。

#### 【0215】

一部の態様において、本明細書に開示される CD73 結合分子、例えば、抗 CD73 抗体又はその抗原結合断片（例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）は、同系腫瘍成長を有意に阻害することができる。一態様において、腫瘍は CT26 マウス同系 CRC 腫瘍である。一部の態様において、CD73 結合分子、例えば、本明細書に開示される抗 CD73 抗体又はその抗原結合断片（例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）は、腫瘍成長を有意に阻害することができ、ここで腫瘍は抗 PD1 療法に不応性である。

#### 【0216】

一部の態様において、本明細書に開示される CD73 結合分子、例えば、抗 CD73 抗体又はその抗原結合断片（例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体）は、細胞との結合後にインターナライズされることができる。一部の態様において、CD73 結合分子は抗体薬物コンジュゲート (ADC) である。

#### 【0217】

# V．抗CD73抗体及び抗原結合断片の調製

モノクローナル抗CD73抗体（例えば、MEDI9447、クローン10．3抗体又はクローン2C5抗体）及びその抗原結合断片は、Kohler and Milstein (1975) Nature 256: 495によって記載されるものなどのハイブリドーマ法を用いて調製することができる。ハイブリドーマ法の使用では、マウス、ハムスター、又は他の適切な宿主動物を上記に記載したとおり免疫し、免疫抗原に特異的に結合し得る抗体のリンパ球による産生を誘発する。リンパ球はまた、インビトロで免疫することもできる。免疫後、リンパ球を単離し、例えばポリエチレングリコールを使用して好適な骨髄腫細胞株と融合することによりハイブリドーマ細胞を形成し、次にそこから未融合のリンパ球及び骨髄腫細胞を選択によって除くことができる。次に、免疫沈降、免疫ブロット法によるか、又はインビトロ結合アッセイ（例えばラジオイムノアッセイ（RIA）；酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA））によって決定するとき選択の抗原を特異的に対象とするモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを、標準方法を用いたインビトロ培養か（Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, Academic Press, 1986）、又は動物の腹水腫瘍としてインビボで増殖させることができる。次に、上記にポリクローナル抗体について説明されるとおり、モノクローナル抗体を培養培地又は腹水から精製することができる。

## 【0218】

或いは、抗CD73モノクローナル抗体（例えば、MEDI9447、クローン10．3抗体又はクローン2C5抗体）及びその抗原結合断片はまた、例えば米国特許第4,816,567号明細書に記載されるとおり組換えDNA方法を用いて作製することもできる。成熟B細胞又はハイブリドーマ細胞から、その抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子の特異的に増幅するオリゴヌクレオチドプライマーを使用したRT-PCRによるなどして、モノクローナル抗体をコードするポリヌクレオチドを単離し、従来の手順を用いてその配列を決定する。次に、重鎖及び軽鎖をコードする単離ポリヌクレオチドを好適な発現ベクターにクローニングし、本来免疫グロブリンタンパク質を産生しない大腸菌（E. coli）細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、又は骨髄腫細胞などの宿主細胞にその発現ベクターをトランスフェクトすると、宿主細胞によってモノクローナル抗体が生成される。また、記載されるとおり、所望の種のCDRを発現するファージディスプレイライブラリから、所望の種の組換え抗CD73モノクローナル抗体又はその抗原結合断片を単離することもできる（McCafferty et al., 1990, Nature, 348: 552-554; Clarkson et al., 1991, Nature, 352: 624-628; 及びMarks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581-597）。

## 【0219】

抗CD73抗体（例えば、クローン10．3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチドは、組換えDNA技術を用いた何らかの種々の方法で更に修飾することができ、それにより代替的な抗体を作成し得る。一部の態様では、例えばマウスモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の定常ドメインが、（1）例えばヒト抗体のそれらの領域に置換されてキメラ抗体が作成されるか、又は（2）非免疫グロブリンポリペプチドに置換されて融合抗体が作成され得る。一部の態様では、定常領域がトランクートされるか、又は除去されて、モノクローナル抗体の所望の抗体断片が作成される。可変領域の部位特異的又は高密度突然変異誘発を用いてモノクローナル抗体の特異性、親和性等を最適化することができる。

## 【0220】

特定の態様において、抗CD73抗体（例えば、クローン10．3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片はヒト抗体又はその抗原結合断片である。ヒト抗体は、当該技術分野において公知の様々な技法を用いて直接調製することができる。インビトロで免疫されるか、又は標的抗原に対する抗体を産生する免疫された個体から単離された固

10

20

30

40

50

定化ヒトBリンパ球を作成することができる(例えば、Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boemer et al., 1991, J. Immunol., 147(1): 86-95; 及び米国特許第5,750,373号明細書を参照)。

#### 【0221】

また、例えば、Vaughan et al., 1996, Nat. Biotech., 14: 309-314、Sheets et al., 1998, Proc. Nat'l Acad. Sci., 95: 6157-6162、Hoogenboom and Winter, 1991, J. Mol. Biol., 227: 381、及びMarks et al., 1991, J. Mol. Biol., 222: 581に記載されるとおり、抗CD73ヒト抗体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)又はその抗原結合断片はファージライブラリから選択することもでき、ここで、そのファージライブラリはヒト抗体を発現する)。抗体ファージライブラリを作成及び使用する技術は、米国特許第5,969,108号明細書、同第6,172,197号明細書、同第5,885,793号明細書、同第6,521,404号明細書; 同第6,544,731号明細書; 同第6,555,313号明細書; 同第6,582,915号明細書; 同第6,593,081号明細書; 同第6,300,064号明細書; 同第6,653,068号明細書; 同第6,706,484号明細書; 及び同第7,264,963号明細書; 及びRothe et al., 2007, J. Mol. Bio., doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.018(これらの各々は、全体として参照により援用される)にも記載されている。

#### 【0222】

親和性成熟戦略及びチェインシャッフリング戦略(Marks et al., 1992, Bio/Technology 10: 779-783、全体として参照により援用される)が当該技術分野において公知であり、高親和性ヒト抗体又はその抗原結合断片の作成に用いることができる。

#### 【0223】

一部の態様において、抗CD73モノクローナル抗体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)はヒト化抗体であってもよい。非ヒト又はヒト抗体の改変、ヒト化又はリサーフェシング方法も用いることができ、当該技術分野において周知である。ヒト化抗体、リサーフェシング抗体、又は同様の改変抗体は、非ヒト、例えば、限定はされないが、マウス、ラット、ウサギ、非ヒト霊長類又は他の哺乳動物である供給源由来の1つ以上のアミノ酸残基を有し得る。これらの非ヒトアミノ酸残基は、しばしば「インポート」残基と称される残基によって置き換えられ、インポート残基は、典型的には既知のヒト配列の「インポート」可変、定常又は他のドメインから取られる。かかるインポートされた配列を用いて、免疫原性を低減し、又は結合性、親和性、on速度、off速度、アビディティ、特異性、半減期、若しくは当該技術分野において公知のとおり任意の他の好適な特性を低減し、増強し、若しくは変更することができる。一般に、CD73結合への影響としては、CDR残基が直接的且つ最も実質的に関与する。従って、非ヒト又はヒトCDR配列の一部又は全てを維持する一方で、可変領域及び定常領域の非ヒト配列はヒト又は他のアミノ酸に置き換えることができる。

#### 【0224】

抗体はまた、任意選択で、CD73抗原に対する高親和性及び他の有利な生物学的特性を保持しつつ改変されたヒト化抗体、リサーフェシング抗体、改変抗体又はヒト抗体であってもよい。この目標を達成するため、任意選択で、ヒト化(又はヒト)又は改変抗CD73抗体及びリサーフェシング抗体を、親配列、改変配列、及びヒト化配列の三次元モデルを使用した親配列及び様々な概念的ヒト化産物及び改変産物の分析プロセスによって調製することができる。三次元免疫グロブリンモデルは一般に利用可能であり、当業者は熟知している。選択した候補免疫グロブリン配列の推定上の三次元立体構造を図解及び表示

するコンピュータプログラムが利用可能である。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の見込まれる役割の分析、即ち、候補免疫グロブリンがCD73などのその抗原に結合する能力に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、コンセンサス配列及びインポート配列からフレームワーク(FW)残基を選択して組み合わせることにより、標的抗原に対する親和性の増加など、所望の抗体特性を実現することができる。

#### 【0225】

抗CD73抗体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)又はその抗原結合断片のヒト化、リサーフェシング又は改変は、限定はされないが、Jones et al., Nature 321:522(1986); Riechmann et al., Nature 332:323(1988); Verhoeyen et al., Science 239:1534(1988); Sims et al., J. Immunol. 151:2296(1993); Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901(1987); Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:4285(1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623(1993)、米国特許第5,639,641号明細書、同第5,723,323号明細書;同第5,976,862号明細書;同第5,824,514号明細書;同第5,817,483号明細書;同第5,814,476号明細書;同第5,763,192号明細書;同第5,723,323号明細書;同第5,766,886号明細書;同第5,714,352号明細書;同第6,204,023号明細書;同第6,180,370号明細書;同第5,693,762号明細書;同第5,530,101号明細書;同第5,585,089号明細書;同第5,225,539号明細書;同第4,816,567号明細書;同第7,557,189号明細書;同第7,538,195号明細書;及び同第7,342,110号明細書;PCT/米国特許出願第98/16280号明細書;PCT/米国特許出願96/18978号明細書;PCT/米国特許出願91/09630号明細書;PCT/米国特許出願91/05939号明細書;PCT/米国特許出願94/01234号明細書;PCT/英国特許出願89/01334号明細書;PCT/英国特許出願91/01134号明細書;PCT/英国特許出願92/01755号明細書;国際公開第90/14443号パンフレット;国際公開第90/14424号パンフレット;国際公開第90/14430号パンフレット;及び欧州特許第229246号明細書(これらの各々は、そこに引用される文献を含め、全体として参照により本明細書に援用される)に記載されるものなど、任意の公知の方法を用いて実施することができる。

#### 【0226】

抗CD73ヒト化抗体及びその抗原結合断片はまた、免疫時に内因性免疫グロブリンを産生することなくヒト抗体の完全レパートリーを産生する能力を有するヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有するトランスジェニックマウスにおいても作製することができる。この手法は、米国特許第5,545,807号明細書;同第5,545,806号明細書;同第5,569,825号明細書;同第5,625,126号明細書;同第5,633,425号明細書;及び同第5,661,016号明細書に記載されている。

#### 【0227】

特定の態様において、抗CD73抗体断片(例えば、クローン10.3抗体由来又はクローン2C5抗体由来の断片)が提供される。抗体断片の作製については、様々な技法が公知である。従来、これらの断片は、インタクトな抗体のタンパク質分解による消化によって得られている(例えば、Morimoto et al., 1993, Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117; Brennan et al., 1985, Science, 229:81)。特定の態様において、抗CD73抗体断片は組換えで作製される。Fab、Fv、及びscFv抗体断片は、いずれも大腸菌(E. coli)又は他の宿主細胞で発現させて、そこから分泌させることができ、このようにしてこれらの断片を大量に作

製することが可能である。かかる抗CD73抗体断片はまた、上記で考察した抗体ファージライブラリから単離することもできる。抗CD73抗体断片はまた、米国特許第5,641,870号明細書に記載されるとおりの線状抗体であってもよい。抗体断片の他の作製技法、例えば化学合成が、当業者には明らかであろう。

#### 【0228】

本開示によれば、CD73に特異的な一本鎖抗体の作製技法を適合させることができる（例えば、米国特許第4,946,778号明細書を参照）。加えて、CD73に対して所望の特異性を有するモノクローナルFab断片、又はその誘導体、断片、類似体若しくは相同体の迅速且つ有効な同定を可能にするFab発現ライブラリの構築方法を適合させることができる（例えば、Huse et al., Science 246:1275-1281 (1999)を参照）。抗体断片は、限定はされないが：（a）抗体分子のペプシン消化によって作製されるF(ab')<sub>2</sub>断片；（b）F(ab')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋の還元によって生成されるFab断片、（c）抗体分子をパパイン及び還元剤で処理することによって生成されるFab断片、及び（d）Fv断片を含め、当該技術分野における技法によって作製することができる。

10

#### 【0229】

本明細書に開示される抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、その血清半減期が増加するように修飾することができる。これは、例えば、抗体又は抗体断片の適切な領域の突然変異によって抗体又は抗体断片にサルベージ受容体結合エピトープを組み込むことによるか、又は後に抗体又は抗体断片にいずれかの末端若しくは中央で（例えば、DNA又はペプチド合成によって）融合するペプチドタグにそのエピトープを組み込むことによるか、又はYTE突然変異によって達成し得る。抗体又はその抗原結合断片の血清半減期を増加させる他の方法、例えば、PEGなどの異種分子とのコンジュゲーションが、当該技術分野において公知である。

20

#### 【0230】

ヘテロコンジュゲート抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）及びその抗原結合断片も本開示の範囲内にある。ヘテロコンジュゲート抗体は、2つの共有結合的につながった抗体で構成される。かかる抗体は、例えば、免疫細胞を望ましくない細胞に標的化させることが提案されている（例えば、米国特許第4,676,980号明細書を参照）。ヘテロコンジュゲート抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）及びその抗原結合断片は、架橋剤が関わる方法を含めた、合成タンパク質化学における公知の方法を用いてインビトロで調製し得ることが企図される。例えば、ジスルフィド交換反応を用いるか、又はチオエーテル結合を形成することにより、免疫毒素を構築することができる。この目的に好適な試薬の例としては、イミノチオレート及びメチル-4-メルカプトブチルイミデートが挙げられる。

30

#### 【0231】

本開示の目的上、修飾抗CD73抗体又はその抗原結合断片は、抗体又はポリペプチドとCD73との会合を提供する任意のタイプの可変領域を含み得ることが理解されなければならない。この点で、可変領域は、所望の腫瘍関連抗原に対して体液性応答を開始して免疫グロブリンを生成するように誘導することのできる任意のタイプの哺乳動物を含み得るか、又はそれに由来し得る。従って、修飾抗CD73抗体又はその抗原結合断片の可変領域は、例えば、ヒト、マウス、非ヒト霊長類（例えば、カニクイザル、マカク等）又はルピナス起源のものであり得る。一部の態様では、修飾抗CD73抗体又はその抗原結合断片の可変領域及び定常領域の両方がヒトである。他の態様では、適合抗体（通常非ヒト供給源に由来する）の可変領域が、分子の結合特性が向上し又は免疫原性が低下するように改変され又は特異的に調整される。この点で、可変領域はヒト化されるか、又は他に移入アミノ酸配列を含めることによって変更されてもよい。

40

#### 【0232】

特定の態様では、抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片の重鎖及び軽鎖の両方の可変ドメインが、1つ以上のCDR

50

の少なくとも部分的な置換、及び必要であれば、部分的フレームワーク領域置換及び配列変化によって変更される。CDRは、フレームワーク領域が由来する抗体と同じクラス又は更にはサブクラスの抗体に由来し得るが、CDRが異なるクラスの抗体、特定の態様では異なる種の抗体に由来することが想定される。ある可変ドメインの抗原結合能を別の可変ドメインに移すために、全てのCDRをドナー可変領域の完全なCDRに置き換える必要はない。むしろ、抗原結合部位の活性の維持に必要な残基を移しさえすれば十分である。米国特許第5,585,089号明細書、同第5,693,761号明細書及び同第5,693,762号明細書に記載される説明を所与とすれば、免疫原性が低下した機能性抗体を得ることは、ルーチンの実験を実施することによるか、又は手探り試験によって、十分に当業者の能力の範囲内にある。

10

#### 【0233】

可変領域の変更にも関わらず、当業者は、修飾抗CD73抗体（例えば、修飾クローン10.3抗体又は修飾クローン2C5抗体）又はその抗原結合断片に、定常領域ドメインの1つ以上の少なくとも一部が欠失しているか、又は他に変更されている抗体（例えば、完全長抗体又はその免疫応答性断片）が含まれてもよく、天然の又は変更されていない定常領域を含むほぼ同じ免疫原性の抗体と比較したときに腫瘍局在の増加又は血清半減期の低下などの所望の生化学的特性がもたらされるようにし得ることを理解するであろう。一部の態様において、修飾抗体の定常領域はヒト定常領域を含み得る。本明細書に開示されるこの抗CD73分子と適合性がある定常領域の修飾は、1つ以上のドメインにおける1つ以上のアミノ酸の付加、欠失又は置換を含む。即ち、本明細書に開示される修飾抗体は、3つの重鎖定常ドメイン（CH1、CH2又はCH3）のうちの1つ以上及び/又は軽鎖定常ドメイン（CL）に対する変更又は修飾を含み得る。一部の態様では、1つ以上のドメインが部分的又は完全に欠失している修飾定常領域が企図される。一部の態様において、修飾抗体は、CH2ドメイン全体が取り除かれたドメイン欠失コンストラクト又は変異体（ΔCH2コンストラクト）を含み得る。一部の態様において、削除された定常領域ドメインは、典型的には欠けている定常領域によって付与される分子可動性の一部を提供する短いアミノ酸スペーサー（例えば、10残基）に置き換えられ得る。

20

#### 【0234】

その構成に加えて、当該技術分野では、定常領域が幾つかのエフェクター機能を媒介することが知られている。例えば、補体のC1成分が抗体に結合すると、補体系が活性化される。補体の活性化は細胞病原体のオプソニン化及び溶解に重要である。補体の活性化はまた炎症反応も刺激し、また、自己免疫性の過敏にも関与し得る。更に、抗体はFc領域を介して細胞に結合し、ここでは抗体Fc領域上のFc受容体部位が細胞上のFc受容体（FcR）に結合する。IgG（γ受容体）、IgE（η受容体）、IgA（α受容体）及びIgM（μ受容体）を含め、異なる抗体クラスに特異的なFc受容体が幾つもある。抗体が細胞表面上のFc受容体に結合すると、抗体被覆粒子の貪食及び破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体被覆標的細胞の溶解（抗体依存性細胞媒介性細胞傷害、又はADCCと呼ばれる）、炎症性メディエーターの放出、胎盤通過及び免疫グロブリン産生の制御を含めた幾つもの重要且つ多様な生物学的反応が惹起される。

30

#### 【0235】

特定の態様において、抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片は、変更されたエフェクター機能を提供し、従って投与される抗体又はその抗原結合断片の生物学的プロファイルが影響を受ける。例えば、定常領域ドメインを（点突然変異又は他の手段によって）欠失又は不活性化させると、循環中の修飾抗体のFc受容体結合が低下し、それにより腫瘍局在が増加し得る。他の場合、定常領域を修飾すると、本開示と一致して、補体結合が調節され、従ってコンジュゲートした細胞毒の血清半減期及び非特異的な会合が低下し得る。定常領域の更に他の修飾を用いると、抗原特異性又は抗体可動性の増加による局在化の増進を可能にするジスルフィド結合又はオリゴ糖部分を除去することができる。同様に、本開示における定常領域に対する修飾は、十分に当業者の範囲内にある周知の生化学的又は分子工学的技法を用いて容易に

40

50

作製することができる。

【 0 2 3 6 】

特定の態様において、抗体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）又はその抗原結合断片である本明細書に開示される C D 7 3 結合分子は、1 つ以上のエフェクター機能を有しない。例えば、一部の態様において、抗体又はその抗原結合断片は抗体依存性細胞傷害（A D C C）活性及び／又は補体依存性細胞傷害（C D C）活性を有しない。特定の態様において、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は F c 受容体及び／又は補体因子に結合しない。特定の態様において、抗体又はその抗原結合断片はエフェクター機能を有しない。

【 0 2 3 7 】

特定の態様において、抗 C D 7 3 修飾抗体又はその抗原結合断片は、それぞれの修飾抗体又はその断片の C H 3 ドメインがヒンジ領域に直接融合するように改変し得ることが注記されるであろう。他のコンストラクトでは、ヒンジ領域と修飾 C H 2 及び／又は C H 3 ドメインとの間にペプチドスペーサーを提供することが望ましい場合もある。例えば、適合性コンストラクトを発現させることができ、ここでは C H 2 ドメインが欠失しており、且つ残りの C H 3 ドメイン（修飾又は非修飾）が 5 ~ 2 0 アミノ酸のスペーサーでヒンジ領域に結合している。かかるスペーサーを加えると、例えば、定常ドメインの調節エレメントが空いて利用可能なままであること、又はヒンジ領域が可動なままであることが確実に得る。しかしながら、ある場合には、アミノ酸スペーサーが免疫原性で、且つコンストラクトに対する望ましくない免疫応答を誘導することが判明し得ることに留意しなければならない。従って、特定の態様では、修飾抗体の所望の生化学的品質を維持するため、コンストラクトに加えられる任意のスペーサーは比較的免疫原性が低い、又は更には完全に省かれてもよい。

【 0 2 3 8 】

定常領域ドメイン全体の欠失に加えて、本開示の抗 C D 7 3 抗体及びその抗原結合断片は、数個の、又は更には単一のアミノ酸の部分的欠失又は置換によって提供され得ることが理解されるであろう。例えば、C H 2 ドメインの選択範囲における単一アミノ酸の突然変異が、F c 結合を実質的に低下させて、それにより腫瘍局在を増加させるには十分であり得る。同様に、調節しようとするエフェクター機能（例えば、補体 C 1 Q 結合）を制御する 1 つ以上の定常領域ドメインの一部を単純に欠失させることが望ましい場合もある。定常領域のかかる部分欠失により、その定常領域ドメインに関連する他の望ましい機能はインタクトなまま残しておきながら、抗体又はその抗原結合断片の選択された特性（例えば、血清半減期）を向上させることができる。更に、上記で示唆したとおり、開示される抗 C D 7 3 抗体及びその抗原結合断片の定常領域は、得られるコンストラクトのプロファイルを強化する 1 つ以上のアミノ酸の突然変異又は置換によって修飾することができる。この点で、修飾抗体又はその抗原結合断片の構成及び免疫原性プロファイルを実質的に維持しながら、保存された結合部位によって提供される活性（例えば、F c 結合）を破壊することが可能である。特定の態様は、エフェクター機能の低下若しくは増加などの望ましい特性を増強し、又はより多くの細胞毒又は炭水化物結合を提供するため、定常領域に対する 1 つ以上のアミノ酸の付加を含み得る。かかる態様では、選択された定常領域ドメインに由来する特定の配列を挿入又は複製することが望ましい場合もある。

【 0 2 3 9 】

本開示はまた、本明細書に示されるキメラ、ヒト化及びヒト抗 C D 7 3 抗体、又はその抗原結合断片と実質的に相同な変異体及び均等物も提供する。これらは、例えば、保存的置換突然変異、即ち 1 つ以上のアミノ酸の、同様のアミノ酸による置換を含み得る。例えば、保存的置換は、アミノ酸を同じ一般クラス内の別のアミノ酸で置換すること、例えば、ある酸性アミノ酸を別の酸性アミノ酸で置換すること、ある塩基性アミノ酸を別の塩基性アミノ酸で置換すること、又はある中性アミノ酸を別の中性アミノ酸によって置換することを指す。保存的アミノ酸置換によって意味されるものは、当該技術分野において周知である。

## 【 0 2 4 0 】

抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片は、通常はそのタンパク質の一部でない追加的な化学的部分を含むように更に修飾することができる。それらの誘導体化部分は、タンパク質の溶解度、生物学的半減期又は吸収を向上させることができる。これらの部分はまた、タンパク質の任意の望ましい副作用などを低減し又は消失させることもできる。それらの部分についての概要は、Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th ed., Mack Publishing Co., Easton, PA (2000) を参照することができる。

## 【 0 2 4 1 】

V I . C D 7 3 結合分子をコードするポリヌクレオチド

10

特定の態様において、本開示は、C D 7 3 に特異的に結合するポリペプチド又はその抗原結合断片をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを包含する。例えば、本開示は、抗 C D 7 3 抗体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）をコードするか、又はかかる抗体の抗原結合断片をコードする核酸配列を含むポリヌクレオチドを提供する。本開示のポリヌクレオチドは R N A の形態であっても、又は D N A の形態であってもよい。D N A には、c D N A、ゲノム D N A、及び合成 D N A が含まれ；且つ二本鎖又は一本鎖であってもよく、及び一本鎖の場合、コード鎖又は非コード鎖（アンチセンス鎖）であってもよい。

## 【 0 2 4 2 】

特定の態様において、ポリヌクレオチドは単離されている。特定の態様において、ポリヌクレオチドは実質的に純粋である。特定の態様において、ポリヌクレオチドは、例えば宿主細胞からのポリペプチドの発現及び分泌を助けるポリヌクレオチド（例えば、細胞からのポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列）に同じリーディングフレーム内で融合した成熟ポリペプチドのコード配列を含む。リーダー配列を有するポリペプチドはプレタンパク質であり、成熟形態のポリペプチドを形成するため宿主細胞によって切断されるリーダー配列を有することができる。ポリヌクレオチドはまた、成熟タンパク質 + 追加的な 5 ' アミノ酸残基である C D 7 3 結合プロタンパク質もコードすることができる。

20

## 【 0 2 4 3 】

特定の態様において、ポリヌクレオチドは、例えばコードされたポリペプチドの精製を可能にするマーカー配列に同じリーディングフレーム内で融合した成熟 C D 7 3 結合ポリペプチド、例えば抗 C D 7 3 抗体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）又はその抗原結合断片のコード配列を含む。例えば、マーカー配列は、細菌宿主の場合に p Q E - 9 ベクターによって供給されるヘキサヒスチジンタグであってもよく、それによりマーカーに融合した成熟ポリペプチドの精製が提供され、又はマーカー配列は、哺乳類宿主（例えば、C O S - 7 細胞）を使用するときは、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するヘマグルチニン（H A）タグであってもよい。

30

## 【 0 2 4 4 】

本開示はまた、例えば、本明細書に開示される C D 7 3 結合分子（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）の C D 7 3 結合断片、類似体、及び誘導体をコードする記載のポリヌクレオチドの変異体も提供する。

40

## 【 0 2 4 5 】

ポリヌクレオチド変異体は、コード領域、非コード領域、又は両方に変更を含み得る。一部の態様において、ポリヌクレオチド変異体は、サイレント置換、付加、又は欠失を生じるものの、コードされるポリペプチドの特性又は活性は変えない変更を含む。一部の態様において、ヌクレオチド変異体は、遺伝子コードの縮重に起因するサイレント置換によって作製される。ポリヌクレオチド変異体は、種々の理由で、例えば、特定の宿主用にコドン発現を最適化するため（ヒト m R N A のコドンを実験室（E . c o l i）などの細菌宿主が選好するものに变化させるため）作製され得る。本明細書に記載されるポリヌクレオチドを含むベクター及び細胞も提供される。

50

## 【 0 2 4 6 】

一部の態様において、C D 7 3 結合分子、例えば抗 C D 7 3 抗体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）又はその抗原結合断片をコードする D N A 配列は、オリゴヌクレオチド合成機を使用した化学合成によって構築することができる。かかるオリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列、及び目的の組換えポリペプチドが産生される宿主細胞において有利なコドンの選択に基づき設計することができる。標準方法を適用して、目的の単離ポリペプチドをコードする単離ポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を使用して逆翻訳遺伝子を構築することができる。更に、特定の単離ポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有する D N A オリゴマーを合成することができる。例えば、所望のポリペプチドの一部をコードする幾つかの小さいオリゴヌクレオチドを合成し、次にライゲートすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、典型的には相補的アセンブリのための 5 ' 又は 3 ' オーバーハングを含有する。

10

## 【 0 2 4 7 】

アセンブル後（合成、部位特異的突然変異誘発又は別の方法による）、目的とする特定の単離ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は発現ベクターに挿入され、所望の宿主におけるそのタンパク質の発現に適切な発現制御配列に作動可能に連結される。適切なアセンブリは、ヌクレオチドシーケンシング、制限マッピング、及び好適な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現によって確認することができる。当該技術分野において周知のとおり、宿主におけるトランスフェクトした遺伝子の高い発現レベルを達成するためには、その遺伝子を、選択の発現宿主で機能する転写及び翻訳発現制御配列に作動可能に連結しなければならない。

20

## 【 0 2 4 8 】

特定の態様では、組換え発現ベクターを使用して、抗 C D 7 3 抗体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）又はその抗原結合断片をコードする D N A を増幅し、発現させる。組換え発現ベクターは、哺乳類、微生物、ウイルス又は昆虫遺伝子に由来する好適な転写又は翻訳調節エレメントに作動可能に連結された、抗 C D 7 3 抗体及び / 又はその抗原結合断片のポリペプチド鎖をコードする合成又は c D N A 由来の D N A 断片を有する複製可能な D N A コンストラクトである。

## 【 0 2 4 9 】

30

転写単位は、概して、以下に更に詳細に記載するとおり、（ 1 ）遺伝子発現において調節的役割を有する 1 つ又は複数の遺伝エレメント、例えば転写プロモーター又はエンハンサーと、（ 2 ） m R N A に転写され且つタンパク質に翻訳される構造又はコード配列と、（ 3 ）適切な転写及び翻訳開始及び終結配列との集合を含む。かかる調節エレメントは、転写を制御するためオペレーター配列を含み得る。一般に複製起点によって付与される宿主における複製能、及び形質転換体の認識を促進する選択遺伝子が、更に組み込まれ得る。D N A 領域は、それらが機能上互いに関係しているとき、作動可能に連結している。例えば、シグナルペプチド（分泌リーダー）の D N A は、それがポリペプチドの分泌に關与する前駆体として発現する場合、そのポリペプチドの D N A に作動可能に連結している；プロモーターは、それが配列の転写を制御する場合、コード配列に作動可能に連結している；又はリボソーム結合部位は、それが翻訳を可能にするような位置にある場合、コード配列に作動可能に連結している。酵母発現系での使用が意図される構造エレメントは、宿主細胞による翻訳タンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。或いは、組換えタンパク質がリーダー配列又は輸送配列なしに発現する場合、それは N 末端メチオニン残基を含み得る。この残基は、任意選択で、後に発現した組換えタンパク質から切断されて、最終産物を提供し得る。

40

## 【 0 2 5 0 】

発現制御配列及び発現ベクターの選択は、宿主の選択に依存することになる。幅広い種類の発現宿主 / ベクターの組み合わせを用いることができる。真核生物宿主に有用な発現ベクターとしては、例えば、S V 4 0、ウシパピローマウイルス、アデノウイルス及びサ

50

イトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主に有用な発現ベクターとしては、pCR 1、pBR322、pMB9及びそれらの誘導体を含めた大腸菌(E. coli)由来のプラスミドなどの公知の細菌プラスミド、M13及び繊維状一本鎖DNAファージなどのより広い宿主域のプラスミドが挙げられる。

#### 【0251】

CD73結合分子、例えば抗CD73抗体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)又はその抗原結合断片の発現に好適な宿主細胞には、適切なプロモーターの制御下にある原核生物、酵母、昆虫又は高等真核生物細胞が含まれる。原核生物には、グラム陰性又はグラム陽性生物、例えば大腸菌(E. coli)又は桿菌が含まれる。高等真核生物細胞には、以下に記載するとおりの哺乳類起源の樹立細胞株が含まれる。無細胞翻訳系も用いることができる。細菌、真菌、酵母、及び哺乳類細胞宿主での使用に適切なクローニング及び発現ベクターは、Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985)(この関連する開示は本明細書によって参照により援用される)によって記載されている。抗体作製を含めたタンパク質作製方法に関する更なる情報については、例えば、米国特許出願公開第2008/0187954号明細書、米国特許第6,413,746号明細書、及び同第6,660,501号明細書、並びに国際特許公開国際公開第04009823号明細書(これらの各々は本明細書によって全体として参照により本明細書に援用される)を参照することができる。

10

#### 【0252】

種々の哺乳類又は昆虫細胞培養系も、組換えCD73結合分子、例えば抗CD73抗体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)又はその抗原結合断片の発現に有利に用いることができる。哺乳類細胞における組換えタンパク質の発現を実施してもよく、なぜならかかるタンパク質は概して正しく折り畳まれ、適切に修飾され、且つ完全に機能性であるためである。

20

#### 【0253】

好適な哺乳類宿主細胞株の例としては、HEK-293及びHEK-293T、Gluzman(Cell 23:175, 1981)によって記載されるサル腎細胞のCOS-7株、及び他の細胞株、例えば、L細胞、C127、3T3、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)、NSO、HeLa及びBHK細胞株が挙げられる。哺乳類発現ベクターは、非転写エレメント、例えば、複製起点、発現させる遺伝子に連結した好適なプロモーター及びエンハンサー、及び他の5'又は3'フランキング非転写配列、及び5'又は3'非翻訳配列、例えば、必須リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライス供与・受容部位、及び転写終結配列などを含み得る。昆虫細胞における異種タンパク質産生のバキュロウイルス系が、Luckow and Summers, Biotechnology 6:47(1988)によってレビューされている。

30

#### 【0254】

形質転換宿主によって産生されるCD73結合分子、例えば抗CD73抗体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)又はその抗原結合断片は、任意の好適な方法によって精製することができる。かかる標準方法には、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー及びサイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心、溶解度差、又は任意の他の標準的なタンパク質精製技法によるものが含まれる。ヘキサヒスチジン、マルトース結合ドメイン、インフルエンザコート配列及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼなどのアフィニティータグをタンパク質に付加すると、適切なアフィニティークラムに通過させることによる容易な精製が可能となり得る。単離されたタンパク質はまた、タンパク質分解、核磁気共鳴及びX線結晶学などの技法を用いて物理的に特徴付けることもできる。

40

#### 【0255】

例えば、組換えタンパク質を培養培地中に分泌する系からの上清を、初めに市販のタンパク質濃縮フィルタ、例えばAmicon(登録商標)又はMillipore Pel

50

licon (登録商標) 限外ろ過ユニットを使用して濃縮し得る。この濃縮ステップの後、濃縮物を好適な精製マトリックスに適用し得る。或いは、陰イオン交換樹脂、例えば、ペンダントジエチルアミノエチル (DEAE) 基を有するマトリックス又は基質を用いてもよい。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース又はタンパク質精製において一般的に用いられる他のタイプであってもよい。或いは、陽イオン交換ステップが用いられてもよい。好適な陽イオン交換体としては、スルホプロピル基又はカルボキシメチル基を含む種々の不溶性マトリックスが挙げられる。最後に、疎水性 RP-HPLC 媒体、例えばペンダントメチル基又は他の脂肪族基を有するシリカゲルを用いる 1 つ以上の逆相高速液体クロマトグラフィー (RP-HPLC) ステップを用いて、CD73 結合分子 (例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体) を更に精製することができる。均一な組換えタンパク質を提供するため、前述の精製ステップの一部又は全てを様々に組み合わせて用いることもできる。

10

#### 【0256】

細菌培養で産生された組換え CD73 結合タンパク質、例えば抗 CD73 抗体 (例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体) 又はその抗原結合断片は、例えば、細胞ペレットからの初期抽出と、続く 1 つ以上の濃縮、塩析、水性イオン交換又はサイズ排除クロマトグラフィーステップによって単離することができる。最終精製ステップには、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いることができる。組換えタンパク質の発現に用いられる微生物細胞は、凍結融解サイクル処理、音波処理、機械的破壊、又は細胞溶解剤の使用を含めた、任意の好都合な方法によって破壊することができる。

20

#### 【0257】

抗体及び他のタンパク質を精製するための当該技術分野において公知の方法としてはまた、例えば、米国特許出願公開第 2008/0312425 号明細書、同第 2008/0177048 号明細書、及び同第 2009/0187005 号明細書 (これらの各々は、本明細書によって全体として参照により本明細書に援用される) に記載されるものも挙げられる。

#### 【0258】

特定の態様では、CD73 結合分子は、抗体でないポリペプチドである。タンパク質標的に高親和性で結合する非抗体ポリペプチドを同定及び作製する種々の方法が当該技術分野において公知である。例えば、Skerra, Curr. Opin. Biotechnol., 18:295-304 (2007)、Hosse et al., Protein Science, 15:14-27 (2006)、Gill et al., Curr. Opin. Biotechnol., 17:653-658 (2006)、Nygren, FEBS J., 275:2668-76 (2008)、及び Skerra, FEBS J., 275:2677-83 (2008) (これらの各々は、全体として参照により本明細書に援用される) を参照のこと。特定の態様では、ファージディスプレイ技術を用いて CD73 結合ポリペプチドを同定/作製することができる。特定の態様では、ポリペプチドは、プロテイン A、リボカリン、フィブロネクチンドメイン (例えば、テネシシン-3 Fn III ドメインなどのフィブロネクチンドメイン)、アンキリンコンセンサスリピートドメイン、及びチオレドキシンからなる群から選択されるタイプのタンパク質スキフォールドを含む。

30

40

#### 【0259】

#### VI. 治療用抗 CD73 抗体を用いた治療方法

本開示は、抗 CD73 結合分子、例えば、抗体、例えばその抗原結合断片、変異体、及び誘導体 (例えば、クローン 10.3 抗体又はクローン 2C5 抗体) を使用することにより、CD73 発現又は CD73 発現細胞に関連する疾患、例えば癌を有する患者を治療することに関する方法を提供する。一部の具体的な態様において、かかる癌は、肺癌、乳癌、結腸癌、及びリンパ腫である。

#### 【0260】

「CD73 発現細胞」とは、CD73 を発現する細胞を意味する。CD73 は、グリコ

50

シルホスファチジルイノシトールアンカリングを介する膜結合型であってもよく、また可溶性タンパク質として存在してもよい。細胞及び他の好適な試料中のCD73発現を検出する方法は当該技術分野において周知されており、限定はされないが、免疫組織化学、フローサイトメトリー、ウエスタンブロット、ELISAなどが挙げられる。

#### 【0261】

以下の考察では、本開示のCD73結合分子（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）による様々な疾患及び障害の診断方法及び治療を参照するが、本明細書に記載される方法はまた、任意の他の抗CD73抗体、及び本明細書に開示される抗CD73抗体の所望の特性を保持している、例えば、CD73に特異的に結合してその5'-ヌクレオチダーゼ活性を中和する能力を有するこれらの抗CD73抗体の抗原結合断片、変異体、及び誘導体（例えば、融合タンパク質又はコンジュゲート）にも適用可能である。一部の態様において、CD73結合分子は、ヒトADCCを媒介しないヒト又はヒト化抗体であるか、又はADCCを媒介しないように改変された抗CD73抗体である。

#### 【0262】

一部の態様において、CD73結合分子は、CD730010抗体又はその抗原結合断片、クローン10.3抗体又はその抗原結合断片、CD730002抗体又はその抗原結合断片、クローン2C5抗体又はその抗原結合断片、又はCD73004抗体又はその抗原結合断片である。他の態様において、CD73結合分子はクローン10.3突然変異抗体である。一部の態様において、CD73結合分子はクローン10.3モノクローナル抗体である。一部の態様において、CD73結合分子は、血清半減期が延長するように改変されたクローン10.3モノクローナル抗体である。他の態様において、CD73結合分子はクローン10.3YTE突然変異抗体である。他の態様において、CD73結合分子はクローン2C5突然変異抗体である。一部の態様において、CD73結合分子はクローン2C5モノクローナル抗体である。一部の態様において、CD73結合分子は、血清半減期が延長するように改変されたクローン2C5モノクローナル抗体である。他の態様において、CD73結合分子はクローン2C5YTE突然変異抗体である。

#### 【0263】

一態様において、治療は、対象又は患者への本開示の抗CD73結合分子、例えば、抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の適用又は投与、又は対象又は患者由来の単離組織又は細胞株への抗CD73結合分子の適用又は投与を含み、ここで対象又は患者は、疾患、疾患の症状、又は疾患に対する素因を有する。別の態様において、治療はまた、疾患、疾患の症状、又は疾患に対する素因を有する対象又は患者に対する本開示の抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を含む医薬組成物の適用又は投与、又は対象又は患者由来の単離組織又は細胞株に対する抗CD73結合分子を含む医薬組成物の適用又は投与を含むことも意図される。

#### 【0264】

本開示の抗CD73結合分子、例えば、抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、様々な癌の治療に有用である。一態様において、本開示は、医薬として使用するための、詳細には、癌（例えば、結腸癌、メラノーマ、乳癌、リンパ腫、又は非小細胞癌）の治療又は予防において使用するための抗CD73結合分子、例えば、抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を提供する。一部の態様において、癌は前転移性表現型を示す。一部の態様において、癌は転移性癌である。一部の態様において、本明細書に開示される抗CD73結合分子は、適応抗腫瘍活性を惹起し、及び/又は転移を阻害することができる。一部の詳細な態様において、本明細書に開示される抗CD73結合分子は乳癌における転移を阻害することができる。

#### 【0265】

本開示の方法では、本明細書の他の部分で定義するとおりの少なくとも1つの抗CD73結合分子、例えば、抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又

はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を使用して、癌に対する好ましい治療応答が促進される。癌治療に対する「好ましい治療応答」という用語は、これらの抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の活性に関連した疾患の改善、及び/又は疾患に関連する症状の改善を指す。従って、例えば、疾患の改善は、完全寛解として特徴付けることができる。「完全寛解」は、任意の過去の試験結果を標準化して臨床的に検出可能な疾患がないことが意図される。或いは、疾患の改善は、部分寛解として分類することができる。「好ましい治療応答」は、本明細書に開示される抗CD73結合分子の投与によって得られる癌の進行及び/又は持続時間の低減又は阻害、癌の重症度の低減又は改善、及び/又はその1つ以上の症状の改善を包含する。

#### 【0266】

10

具体的な態様において、かかる用語は、本明細書に開示される抗CD73結合分子の投与後の1、2又は3つ又はそれを超える結果を指す：(1)癌細胞集団の安定化、減少又は消失；(2)癌成長の安定化又は減少；(3)癌の形成障害；(4)原発性、局所的及び/又は転移性癌の根絶、除去、又は制御；(5)死亡率の低下；(6)無病、無再発、無進行、及び/又は全生存期間又は比率の増加；(7)奏効率、応答の持続性、又は応答性又は寛解期の患者の数の増加；(8)入院率の低下、(9)入院期間の低下、(10)癌のサイズが保たれ、増加しないか、又はその増加が10%未満、好ましくは5%未満、好ましくは4%未満、好ましくは2%未満である、及び(12)寛解期の患者の数の増加。

#### 【0267】

20

臨床応答は、磁気共鳴画像(MRI)スキャン、X線イメージング、コンピュータ断層撮影(CT)スキャン、フローサイトメトリー又は蛍光活性化セルソーター(FACS)分析、組織学、肉眼的病理学、及び血液化学、例えば、限定はされないが、ELISA、RIA、クロマトグラフィーなどによって検出可能な変化など、スクリーニング技術を用いて評価することができる。これらの好ましい治療応答に加えて、抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体による療法を受けている対象は、疾患に関連する症状の改善において有益な効果を得ることができる。

#### 【0268】

本明細書に開示される抗CD73結合分子、例えば、抗体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体は、任意の既知の癌療法、例えば、癌、例えば、結腸癌、肺癌(例えば、非小細胞癌)、リンパ腫、乳癌の治療に有用であることが分かっているか、又はそれに使用されてきた若しくは現在使用されているところである任意の薬剤又は薬剤の組み合わせと併用することができる。具体的な態様において、本明細書に開示されるCD73結合分子、例えば、抗体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)又はその抗原結合断片は、例えば、PD-1(プログラム死1タンパク質)を標的化する抗体又は抗体断片と併用して投与することができる。一部の態様において、抗PD-1抗体はペンブロリズマブ(KEYTRUDA(登録商標)、旧ランブロリズマブ、別名MK-3475)又はその抗原結合断片である。一部の態様において、抗PD-1抗体は、ニボルマブ(BMS-936558、MDX-1106、ONO-4538、OPDIVA(登録商標))又はその抗原結合断片である。一部の態様において、抗PD-1抗体はMEDI4736又はその抗原結合断片である。

30

40

#### 【0269】

一部の態様において、本明細書に開示されるCD73結合分子(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)は、抗PD-1抗体と併用して投与することができる。一部の態様において、抗PD-1抗体と併用した本明細書に開示されるCD73結合分子(例えば、MEDI9447、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)を含む併用治療の投与は、未治療の対象又は単剤療法(例えば、抗CD73抗体を伴わない抗PD-1抗体)で治療した対象と比較して生存を約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、又は約100%増加させること

50

ができる。一部の態様において、抗PD-1抗体と併用した本明細書に開示されるCD73結合分子（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）を含む併用治療の投与は、未治療の対象又は単剤療法（例えば、抗CD73抗体を伴わない抗PD-1抗体）で治療した対象と比較して生存を約2倍、約3倍、約4倍、約5倍、約6倍、約7倍、約8倍、約9倍、又は約10倍増加させる。

#### 【0270】

併用療法が、別の治療剤（例えば、抗PD1）の投与と併用した抗CD73結合分子の投与を含む場合、本明細書に開示される方法は、別個の製剤又は単一の医薬製剤、及びいずれかの順序の連続投与を用いた共投与を包含する。一部の態様において、本明細書に記載される抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）は他の薬物と併用して投与され、ここで抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体と治療剤とは、いずれかの順序で逐次的に投与するか、又は同時に（即ち、同時に又は同じタイムフレーム内で）投与することができる。

10

#### 【0271】

併用療法は「相乗作用」を提供することができ、「相乗的」である、即ち、活性成分を併せて使用したときに達成される効果が、それらの化合物を個別に使用して得られる効果の総和より高いことが判明し得る。相乗効果は、活性成分が（1）共製剤化されて投与されるか、又は組み合わせた単位投薬量製剤で同時に送達されるとき；（2）別個の製剤として交互に又は並行して送達されるとき；又は（3）他の何らかのレジメンによるとき、達成され得る。交互投与療法で送達される場合、相乗効果は、化合物が例えば別個のシリンジでの異なる注射によって逐次的に投与又は送達されるときに達成され得る。一般に、交互投与療法に際して、各活性成分の有効な投薬量は逐次的に、即ち連続的に投与され、一方併用療法では、2つ以上の活性成分の有効な投薬量は一緒に投与される。

20

#### 【0272】

更なる態様は、臨床試験手順の一部としての組織中タンパク質レベルの診断的モニタリングに対する抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）の使用であり、それにより例えば、所与の治療レジメンの有効性が決定される。例えば、抗体を検出可能物質とカップリングすることにより、検出を促進し得る。

#### 【0273】

検出可能物質の例としては、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、及び放射性物質が挙げられる。好適な酵素の例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ、又はアセチルコリンエステラーゼが挙げられ；好適な補欠分子族複合体の例としては、ストレプトアビジン/ビオチン及びアビジン/ビオチンが挙げられ；好適な蛍光物質の例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル又はフィコエリトリンが挙げられ；発光物質の例としては、ルミノールが挙げられ；生物発光物質の例としては、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、及びエクオリンが挙げられ；及び好適な放射性物質の例としては、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、又は $^3\text{H}$ が挙げられる。

30

40

#### 【0274】

### VII. 医薬組成物及び投与方法

抗CD73結合分子、例えば、抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）を調製し、それを必要としている対象に投与する方法は当業者に周知であり、又は当業者によって容易に決定される。抗CD73結合分子、例えば、抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体の投与経路は、例えば、経口、非経口、吸入によるか又は局所であり得る。本明細書で使用されるとおりの用語の非経口には、例えば、静脈内、動脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、直腸、又は腔内投与が含まれる。しかしながら、本明細書の教示と適合する他の方法では、本開示の抗CD73結合分子、例えば、抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは

50

誘導体を有害細胞集団の部位に直接送達して、それにより治療剤に対する罹患組織の曝露を増加させることができる。

【0275】

本明細書で考察するとおり、本開示の抗CD73結合分子、例えば、抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）は、ある種の癌など、CD73発現細胞が媒介する疾患のインビボ治療に薬学的に有効な量で投与することができる。

【0276】

本開示で使用される医薬組成物は、例えば、水、イオン交換体、タンパク質、緩衝物質、及び塩を含め、薬学的に許容可能な担体を含み得る。保存剤及び他の添加剤も存在し得る。担体は溶媒又は分散媒であってもよい。本明細書に開示される治療法における使用に好適な製剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 16th ed. (1980)に記載されている。

【0277】

いずれの場合にも、所要量の活性化合物を（例えば、抗CD73抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体、例えばクローン10.3抗体又はクローン2C5抗体を、単独で、又は他の活性薬剤との併用で）適切な溶媒中に配合し、続いて滅菌ろ過することにより、滅菌注射用溶液を調製することができる。更に、このような調製物を包装し、キットの形態で販売することができる。かかる製品は、関連する組成物が、疾患又は障害に罹患しているか又はそれに罹り易い対象の治療に有用であることを示すラベル又は添付文書を有し得る。

【0278】

非経口製剤は単回ボラス投与、注入又は負荷ボラス投与であってもよく、その後に維持投与が続く。これらの組成物は、特定の一定の間隔又は変動的な間隔で、例えば、1日1回、又は「必要に応じて」投与され得る。

【0279】

本組成物は、単回投与、複数回投与として、又は注入における定められた期間にわたって投与され得る。投薬量レジメンも最適な所望の反応（例えば、治療的又は予防的反応）が得られるように調整され得る。

【0280】

CD73発現細胞が媒介する疾患、例えば、結腸癌を含めたある種の癌などの治療に対する本開示の組成物の治療有効用量は、投与手段、標的部位、患者の生理学的状態、患者がヒトか、それとも動物か、投与されている他の薬物療法、及び処置が予防的か、それとも治療的かを含め、多くの異なる要因に応じて変わる。通常、患者はヒトであるが、トランスジェニック哺乳動物を含めた非ヒト哺乳動物も治療し得る。治療投薬量は、当業者に公知のルーチンを用いて、安全性及び有効性が最適となるように滴定することができる。

【0281】

少なくとも1つの抗CD73結合分子、例えば、抗体又はその結合断片、変異体、又は誘導体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）は、本開示の開示を所与とすれば、当業者によって過度の実験を行うことなく容易に決定される。投与方法、及び少なくとも1つの抗CD73結合分子、例えば、抗体、その抗原結合断片、変異体又は誘導体のそれぞれの量に影響を及ぼす要因としては、限定はされないが、疾患の重症度、病歴、並びに治療を受ける個体の年齢、身長、体重、健康、及び理学的状態が挙げられる。同様に、抗CD73結合分子、例えば、抗体、又はその断片、変異体、若しくは誘導体の投与量は、投与方法、及び対象がこの薬剤の単回投与を受けるか、それとも複数回投与を受けるかに依存することになる。

【0282】

本開示はまた、例えば、結腸癌を含めたある種の癌の治療用医薬の製造における、抗C

10

20

30

40

50

D 7 3 結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）の使用も提供する。

【 0 2 8 3 】

本開示はまた、ある種の癌を治療するための対象の治療用医薬の製造における、抗 C D 7 3 結合分子、例えば、抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）の使用も提供する。特定の態様において、この医薬は、少なくとも 1 つの他の療法で前治療されている対象において使用される。

【 0 2 8 4 】

「前治療された」又は「前治療」とは、対象が抗 C D 7 3 結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）を含む医薬を投与される前に、1 つ以上の他の療法を受けている（例えば、少なくとも 1 つの他の抗癌療法で治療されている）ことが意図される。対象が先行する 1 つ又は複数の療法による前治療に対するレスポンスであった必要はない。従って、抗 C D 7 3 結合分子、例えば、抗体又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体を含む医薬を投与される対象は、先行の療法、又は前治療が複数の療法を含んだ場合に先行の療法のうちの 1 つ以上による前治療に応答した可能性もあり、又は応答しなかった可能性もある。

【 0 2 8 5 】

本開示はまた、抗 C D 7 3 結合分子、例えば、抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）と少なくとも 1 つの他の療法との共投与も提供する。抗 C D 7 3 抗体と少なくとも 1 つの他の療法とは、単一の組成物と一緒に共投与することができ、又は別個の組成物で同時に若しくは重なり合う時間に一緒に共投与することができる。一部の態様において、抗 C D 7 3 抗体は、例えば、P D - 1（プログラム死 1 タンパク質）を標的化する抗体と共投与することができる。本開示はまた、癌を治療するための対象の治療用医薬の製造における、抗 C D 7 3 結合分子、例えば、抗体、又はその抗原結合断片、変異体、若しくは誘導体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）の使用も提供し、ここで抗 C D 7 3 結合分子は、対象が少なくとも 1 つの他の療法で治療される前に投与される。

【 0 2 8 6 】

V I I I . 診断

本開示は、特定の種類の癌など、C D 7 3 発現細胞が媒介する疾患の診断において有用な診断方法を更に提供し、これは、個体からの組織若しくは他の細胞又は体液中の C D 7 3 タンパク質の発現レベルを計測すること、及び計測した発現レベルを正常組織又は体液中の標準 C D 7 3 発現レベルと比較することを含み、ここで標準と比較した発現レベルの増加が、障害の指標となる。

【 0 2 8 7 】

本明細書に開示される抗 C D 7 3 抗体並びにその抗原結合断片、変異体、及び誘導体（例えば、クローン 1 0 . 3 抗体又はクローン 2 C 5 抗体）は、当業者に公知の古典的な免疫組織学的方法を用いた生物学的試料中の C D 7 3 タンパク質レベルのアッセイに使用することができる（例えば、J a l k a n e n , e t a l . , J . C e l l . B i o l . 1 0 1 : 9 7 6 - 9 8 5 ( 1 9 8 5 ) ; J a l k a n e n e t a l . , J . C e l l B i o l . 1 0 5 : 3 0 8 7 - 3 0 9 6 ( 1 9 8 7 ) を参照）。C D 7 3 タンパク質発現の検出に有用な他の抗体ベースの方法としては、酵素結合免疫吸着アッセイ（E L I S A）、免疫沈降、又はウエスタンブロッティングなどのイムノアッセイが挙げられる。好適なアッセイは、本明細書の他の部分に更に詳細に記載される。

【 0 2 8 8 】

「C D 7 3 ポリペプチドの発現レベルをアッセイする」とは、第 1 の生物学的試料中の C D 7 3 ポリペプチドのレベルを直接（例えば、絶対タンパク質レベルを決定又は推定することによる）、又は相対的に（例えば、第 2 の生物学的試料中の疾患関連ポリペプチド

10

20

30

40

50

レベルと比較することによる)、定性的又は定量的に計測又は推定することが意図される。第1の生物学的試料中のCD73ポリペプチド発現レベルを計測又は推定して標準CD73ポリペプチドレベルと比較することができ、この標準は、障害を有しない個体から得た第2の生物学的試料から取られるか、又は障害を有しない個体集団のレベルを平均することにより決定される。当該技術分野では理解されるであろうとおり、一度「標準」CD73ポリペプチドレベルが分かれば、それを比較の標準として繰り返し使用することができる。

#### 【0289】

「生物学的試料」とは、潜在的にCD73を発現する個体、細胞株、組織培養物、又は他の細胞供給源から得られる任意の生物学的試料が意図される。哺乳動物から組織生検及び体液を得る方法は、当該技術分野において周知である。

#### 【0290】

##### IX. CD73結合分子を含むキット

本開示はまた、本明細書に記載される方法の実施に使用し得る、本明細書に記載されるCD73結合分子、例えば、抗CD73抗体又はその抗原結合断片、本明細書に開示される分子の変異体、又は誘導体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)のうちの少なくとも1つを含むキットも提供する。特定の態様において、キットは、1つ以上の容器に少なくとも1つの精製抗CD73抗体又はその抗原結合断片を含む。一部の態様において、キットは、全ての対照、アッセイの実施についての指図、並びに結果の分析及び発表に必要な任意のソフトウェアを含め、検出アッセイの実施に必要及び/又は十分な全ての構成要素を含む。当業者は、開示されるCD73結合分子、例えば、本開示の抗CD73抗体又はその抗原結合断片(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)を、当該技術分野において周知の確立されたキットフォーマットの1つに容易に組み込み得ることを容易に認識するであろう。

#### 【0291】

##### X. イムノアッセイ

本明細書に開示される抗CD73結合分子、例えば、抗CD73抗体又はその抗原結合断片、本明細書に開示される分子の変異体、又は誘導体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)は、当該技術分野において公知の任意の方法によって免疫特異的結合に関してアッセイすることができる。使用することのできるイムノアッセイとしては、限定はされないが、いくつか例を挙げれば、ウエスタンブロット、ラジオイムノアッセイ、ELISA(酵素結合免疫吸着アッセイ)、「サンドイッチ」イムノアッセイ、免疫沈降アッセイ、沈降反応、ゲル内拡散沈降反応、免疫拡散アッセイ、凝集アッセイ、補体結合アッセイ、イムノラジオメトリックアッセイ、蛍光イムノアッセイ、プロテインAイムノアッセイなどの技法を用いる競合及び非競合アッセイシステムが挙げられる。かかるアッセイは常法であり、当該技術分野において周知である(例えば、Ausubel et al., eds, (1994) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, Inc., NY) Vol. 1 (参照により全体として本明細書に援用される)を参照)。

#### 【0292】

CD73結合分子、例えば、抗CD73抗体又はその抗原結合断片、及びそれらの変異体又は誘導体(例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体)は、免疫蛍光法、免疫電子顕微鏡法又は非免疫学的アッセイのように、CD73又はその保存された変異体若しくはペプチド断片のインサイチュー検出に組織学的に用いることができる。インサイチュー検出は、患者から組織標本を採取し、且つ好ましくは標識CD73結合分子(例えば、及び抗体又は断片)を生物学的試料の上に重ねることによって適用して、標識CD73結合分子、例えば、抗CD73抗体又はその抗原結合断片、その変異体、又は誘導体をその標本に適用することによって達成し得る。かかる手順を用いることにより、CD73、又は保存された変異体若しくはペプチド断片の存在のみならず、被験組織におけるその分布も決定することが可能である。本開示を用いることにより、当業者は、かかるイン

サイチュー検出を実現するため、多種多様な組織学的方法の任意のもの（染色手順など）を変更し得ることを容易に理解するであろう。

【0293】

CD73結合分子、例えば、抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片、その変異体、又は誘導体の所与のロットの結合活性は、周知の方法により決定することができる。当業者は、ルーチンの実験を用いて各決定に有効且つ最適なアッセイ条件を決定することができるであろう。

【0294】

単離CD73結合分子、例えば、抗CD73抗体（例えば、クローン10.3抗体又はクローン2C5抗体）又はその抗原結合断片、その変異体、又は改変/突然変異誘導体の結合特性の決定に好適な方法及び試薬は、当該技術分野において公知であり、及び/又は市販されている。かかる反応速度論的分析用に設計された機器及びソフトウェアは市販されている（例えば、BIACore、BIAevaluationソフトウェア、GE Healthcare; KinExaソフトウェア、Sapidyne Instruments）。

【0295】

本開示の実施には、特に指示されない限り、細胞生物学、細胞培養、分子生物学、トランスジェニック生物学、微生物学、組換えDNA、及び免疫学の従来技術が用いられ、それらは当該技術分野の技術の範囲内にある。かかる技法は、文献に十全に説明されている。例えば、Sambrook et al., ed. (1989) Molecular Cloning A Laboratory Manual (2nd ed.; Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook et al., ed. (1992) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (Cold Springs Harbor Laboratory, NY); D.N. Glover ed., (1985) DNA Cloning, Volumes I and II; Gait, ed. (1984) Oligonucleotide Synthesis; Mullis et al. 米国特許第4,683,195号明細書; Hames and Higgins, eds. (1984) Nucleic Acid Hybridization; Hames and Higgins, eds. (1984) Transcription And Translation; Freshney (1987) Culture Of Animal Cells (Alan R. Liss, Inc.); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press) (1986); Perbal (1984) A Practical Guide To Molecular Cloning; the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.); Miller and Calos eds. (1987) Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells, (Cold Spring Harbor Laboratory); Wu et al., eds., Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155; Mayer and Walker, eds. (1987) Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Academic Press, London); Weir and Blackwell, eds., (1986) Handbook Of Experimental Immunology, Volumes I-IV; Manipulating the Mouse Embryo, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1986); 及び Ausubel et al. (1989) Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, Baltimore, Md.) を参照のこと。

【0296】

10

20

30

40

50

抗体工学の一般原理は、Borrebaeck, ed. (1995) Antibody Engineering (2nd ed.; Oxford Univ. Press) に記載される。タンパク質工学の一般原理は、Rickwood et al., eds. (1995) Protein Engineering, A Practical Approach (IRL Press at Oxford Univ. Press, Oxford, Eng.) に記載される。抗体及び抗体 - ハプテン結合の一般原理は、Nisnonoff (1984) Molecular Immunology (2nd ed.; Sinauer Associates, Sunderland, Mass.); 及び Steward (1984) Antibodies, Their Structure and Function (Chapman and Hall, New York, N. Y.) に記載される。加えて、当該技術分野において公知の、具体的には記載されない免疫学の標準方法が、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Stites et al., eds. (1994) Basic and Clinical Immunology (8th ed.; Appleton & Lange, Norwalk, Conn.) 及び Mishell and Shiigi (eds) (1980) Selected Methods in Cellular Immunology (W. H. Freeman and Co., NY) にあるとおり、一般に用いられる。

【0297】

免疫学の一般原理について記載する標準的な参考文献としては、Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York; Klein (1982) J. Immunology: The Science of Self-Nonself Discrimination (John Wiley & Sons, NY); Kennett et al., eds. (1980) Monoclonal Antibodies, Hybridoma: A New Dimension in Biological Analyses (Plenum Press, NY); Campbell (1984) "Monoclonal Antibody Technology" in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, ed. Burden et al., (Elsevier, Amsterdam); Goldsby et al., eds. (2000) Kubly Immunology (4th ed.; H. Freeman & Co.); Roitt et al. (2001) Immunology (6th ed.; London: Mosby); Abbas et al. (2005) Cellular and Molecular Immunology (5th ed.; Elsevier Health Sciences Division); Kontermann and Dubel (2001) Antibody Engineering (Springer Verlag); Sambrook and Russell (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Lewin (2003) Genes VII (Prentice Hall 2003); Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach and Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press) が挙げられる。

【0298】

上記に引用する参考文献の全て、並びに本明細書に引用する全ての参考文献は、全体として参照により本明細書に援用される。

本発明は、例えば以下の実施形態を包含する：

[実施形態1] 対象における腫瘍成長を阻害するための、抗CD73抗体又はその抗原結合断片とA2A受容体阻害薬との使用。

10

20

30

40

50

〔実施形態 2〕抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片と A 2 A 受容体阻害薬との使用であって、それを必要としている対象における抗腫瘍免疫応答を増加させるための使用。

〔実施形態 3〕対象の腫瘍を治療するための、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片と A 2 A 受容体阻害薬との使用。

〔実施形態 4〕前記抗 C D 7 3 抗体が M E D I 9 4 4 7 又はその抗原結合断片である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 5〕前記抗 C D 7 3 抗体が P h e n 0 2 0 3 h I g G 1 又はその抗原結合断片である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 6〕前記 A 2 A 受容体阻害薬が S C H 5 8 2 6 1 である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 7〕前記抗 C D 7 3 抗体が M E D I 9 4 4 7 又はその抗原結合断片であり、且つ前記 A 2 A 受容体阻害薬が S C H 5 8 2 6 1 である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 8〕前記抗 C D 7 3 抗体が P h e n 0 2 0 3 h I g G 1 又はその抗原結合断片であり、且つ前記 A 2 A 受容体阻害薬が S C H 5 8 2 6 1 である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 9〕前記抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片と前記アデノシン受容体阻害薬 ( A 2 A R i ) とが同時に使用される、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 10〕前記抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片が前記アデノシン受容体阻害薬 ( A 2 A R i ) より前に使用される、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 11〕前記アデノシン受容体阻害薬 ( A 2 A R i ) が前記抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片より前に使用される、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 12〕前記腫瘍が、乳癌、ホルモン媒介性乳癌、トリプルネガティブ乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、肺癌、メラノーマ、非小細胞癌、リンパ腫、ホジキン及び非ホジキンリンパ腫、バーキットリンパ腫、及び肉腫である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 13〕前記抗 C D 7 3 抗体又は前記 A 2 A 受容体阻害薬のいずれか一方の単独での投与と比較したときに全生存の増加をもたらす、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 14〕腫瘍特異的免疫応答を誘導するか又は増加させる、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 15〕A M P / C D 7 3 / アデノシン経路の免疫抑制効果を低減する、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 16〕前記抗 C D 7 3 抗体又は前記アデノシン受容体阻害薬 ( A 2 A R i ) のいずれかの単独での使用と比べて転移を低減するか、又は前記腫瘍が転移する傾向を低減する、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 17〕前記対象における転移数を低減する、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 18〕前記対象がヒト患者である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 19〕前記腫瘍が C D 7 3 過剰発現腫瘍である、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 20〕前記癌が前転移性表現型を有する、実施形態 1 ~ 3 のいずれかに記載の使用。

〔実施形態 21〕抗腫瘍活性を増加させるためのキットであって、抗 C D 7 3 抗体又はその抗原結合断片と A 2 A 受容体阻害薬とを含むキット。

〔実施形態 22〕前記抗 C D 7 3 抗体が M E D I 9 4 4 7 又はその抗原結合断片である、実施形態 21 に記載のキット。

〔実施形態 23〕前記抗 C D 7 3 抗体が P h e n 0 2 0 3 h I g G 1 又はその抗原結合断片である、実施形態 21 に記載のキット。

〔実施形態 24〕前記 A 2 A 受容体阻害薬が S C H 5 8 2 6 1 である、実施形態 21 に記

10

20

30

40

50

載のキット。

〔実施形態 25〕前記抗 CD73 抗体が MEDI9447 又はその抗原結合断片であり、且つ前記 A2A 受容体阻害薬が SCH58261 である、実施形態 21 に記載のキット。

〔実施形態 26〕前記抗 CD73 抗体が Phen0203 hIgG1 又はその抗原結合断片であり、且つ前記 A2A 受容体阻害薬が SCH58261 である、実施形態 21 に記載のキット。

〔実施形態 27〕有効量の抗 CD73 抗体又はその抗原結合断片と A2A 受容体阻害薬とを含む医薬製剤。

〔実施形態 28〕前記抗 CD73 抗体が MEDI9447 又はその抗原結合断片である、実施形態 27 に記載の医薬製剤。

〔実施形態 29〕前記抗 CD73 抗体が Phen0203 hIgG1 又はその抗原結合断片である、実施形態 27 に記載の医薬製剤。

〔実施形態 30〕前記 A2A 受容体阻害薬が SCH58261 である、実施形態 27 に記載の医薬製剤。

〔実施形態 31〕前記抗 CD73 抗体が MEDI9447 又はその抗原結合断片であり、且つ前記 A2A 受容体阻害薬が SCH58261 である、実施形態 27 に記載の医薬製剤。

〔実施形態 32〕前記抗 CD73 抗体が Phen0203 hIgG1 又はその抗原結合断片であり、且つ前記 A2A 受容体阻害薬が SCH58261 である、実施形態 27 に記載の医薬製剤。

【0299】

以下の例は、限定としてではなく、例示として提供される。

【実施例】

【0300】

本開示の態様は、以下の非限定的な例を参照することによって更に定義され得る。これらの例は、本開示の特定の抗体の調製及び本開示の抗体の使用方法を詳細に記載するものである。当業者には、本開示の範囲から逸脱することなく材料及び方法の両方に対して多くの変更を行い得ることが明らかであろう。

【0301】

エクト - 5' - ヌクレオチダーゼ (NT5E) としても知られる CD73 (分化クラスター 73) は、腫瘍細胞並びに正常な間質細胞、例えば内皮細胞及びある種の白血球に見られる膜貫通受容体である。CD73 はアデノシンリン酸からアデノシン及び有機リン酸に触媒する。アデノシン受容体の細胞外部分の結合により、サイクリック AMP を通じてシグナルが送られ、T 細胞受容体活性化が阻害される (Linden and Cekic, 2012 によってレビューされている)。CD73 は、調節性 B 及び T リンパ球の阻害機能の媒介 (Saze et al, 2013)、並びに内皮完全性の維持 (Jalkanen and Salmi, 2008 によってレビューされている) において役割を果たすと考えられている。

【0302】

正常な生物学におけるその役割に加えて、CD73 及びアデノシンは腫瘍生物学に影響を与える。腫瘍微小環境中の細胞外アデノシンの存在は、免疫抑制性の「ハロー」として記載されている (Antoniolli et al, 2013)。アデノシンのこの役割と一致して、アデノシン受容体が欠損したノックアウトマウスは、正常マウスと比べてより容易に腫瘍を拒絶することが示されている (Ohta et al, 2006)。腫瘍中の細胞外アデノシンの主な供給源は CD73 であると考えられている (Augusto et al, 2013)。この仮説並びに A2A 欠損マウスを用いた研究と一致して、CD73 が欠損したノックアウトマウスでは抗腫瘍免疫が増加しており (Stagg et al, 2011)、正常マウスと比較したとき発癌の低下を示す (Stagg et al, 2012)。具体的には、細胞外アデノシンは、特に調節性 T 細胞及び骨髄系由来サプレッサー細胞 (MDSC) の両方の免疫抑制効果を媒介すると考えられている (A

10

20

30

40

50

ntonio *et al*, 2013)によってレビューされている)。小分子又は抗体によるCD73の分子障害が腫瘍形成、成長、及び転移を阻害し得ることを示す他の研究(Young *et al*, 2014)によってレビューされている)を併せて考えると、腫瘍がCD73を使用してアデノシンを生成し、それにより抗腫瘍免疫を抑制することが仮定される。従って、CD73に選択的に結合してそのエクトヌクレオチダーゼ活性を阻害する抗CD73抗体は、抗腫瘍免疫応答の増強に有用である可能性が高い。

#### 【0303】

##### 実施例1：抗CD73抗体の単離及び同定

ヒトscFvファージディスプレイライブラリをビオチン化CD73細胞外ドメイン(ECD)でパニングして、ヒト、カニクイザル、及びマウスCD73に結合する抗体を単離した。本質的にLloyd *et al*, PEDS 22:159-68(2009)に以前記載されたとおり哺乳類細胞からインハウスで作製したビオチン化ヒト及びマウスCD73細胞外ドメイン(ECD)に対する一連の反復的な交互選択サイクルで、ヒトscFvファージディスプレイライブラリからCD73特異的scFv抗体を単離した。選択アウトプットのラウンド2及び3からのScFv遺伝子を、バッチで細菌性scFv-Fc又はFab発現ベクターに変換した。可溶性scFv-Fc又はFabを有する細菌培養上清を、ヒト、マウス、及びカニクイザルCD73 ECDとのそれらの結合性に関してELISA又は均一時間分解蛍光(HTRF)によってスクリーニングした。交差反応性を示す上位のヒットを選択し、DNAシーケンシングに供し、全免疫グロブリンG1三重突然変異体抗体フォーマット(「IgG-TM」、突然変異L234F、L235E及びP331Sを組み込むIgG1 Fc配列)に変換した。IgG1 TM抗体を哺乳類細胞で発現させて、アフィニティークロマトグラフィーによって精製し、結合及び機能アッセイでのそれらの特性に基づきランク付けした。

#### 【0304】

リード抗体、CD730010は、ヒト、マウス、及びカニクイザルCD73発現細胞に特異的に結合すること(フローサイトメトリーによる)と、組換え可溶性CD73 ECD及び細胞上に提示された天然CD73の活性を阻害することが示された。ヒトCD73に対するCD730010の結合親和性を増強するため、CD730010の親和性成熟を開始した。

#### 【0305】

親和性最適化の前に、親和性を損なうことなくCD730010のできるだけ多くのフレームワーク残基を最も近縁のヒト生殖系列配列(IMGTレパートリーに基づく)に復帰させることを試みた(実施例8を参照)。これは、ヒトにおける最終的な抗体薬の潜在的な免疫原性を最小限に抑えるために行った。VLドメインの全てのフレームワーク残基及びVHドメインの1つを除いた全てのフレームワーク残基を、ヒト生殖細胞系列IGLV1-44、IGLJ3、IGHV3-23、及びIGHJ2のアミノ配列に一致するように復帰させることができた。CD730010のVHドメインの94位(Kabat付番; Kabat, 1991)にあるリジンは、親和性の損失なしに復帰させることができなかった。

#### 【0306】

## 【表 2】

表 10: 親抗 CD730010 抗体及び生殖細胞系列化アミノ酸を有する抗体変異体の親和性

| 抗体変異体         | VL 位置のアミノ酸 |   |    |    |    | VH 位置のアミノ酸 | EC50 [nM] |
|---------------|------------|---|----|----|----|------------|-----------|
|               | 1          | 2 | 11 | 37 | 39 | 94         |           |
| CD730010      | L          | P | V  | K  | V  | R          | 69        |
| CD730010 GL9  | Q          | S | A  | Q  | L  | R          | 64        |
| CD730010 GL10 | L          | P | V  | K  | V  | K          | 205       |
| CD730010 GL18 | Q          | S | A  | Q  | L  | K          | 132       |

10

## 【0307】

生殖細胞系列化した CD730010 抗体の親和性及び効力を、CDR 変異体のライブラリを作成し且つそれらの変異体を CD73 との結合性の向上に関して試験することによって増強した（実施例 9 を参照）。親和性の向上が最良であった幾つかの突然変異を組み合わせ、候補薬物 MEDI9447 を作成した。MEDI9447 のヌクレオチド及び推定アミノ酸配列を図 1A ~ 図 1D に示す。

## 【0308】

## 実施例 2: 抗 CD73 抗体のエピトープマッピング

20

抗 CD73 抗体がヒト CD73 ECD との結合に関して互いに競合する能力を、本質的に記載されるとおり (Abdiche YN et al., Anal Biochem 386: 172-80 (2009)、Octet 機器で評価した。CD73 ECD タンパク質及び第 1 の抗 CD73 抗体をプレインキュベートし、ストレプトアビジンセンサに捕捉されたビオチン化第 2 抗 CD73 抗体に添加した。第 1 の抗 CD73 抗体が CD73 ECD と第 2 の抗 CD73 抗体との結合を遮断した場合、両方の抗体を同じ又は重複するエピトープマッピングに入れた。両方の抗体が CD73 ECD に同時に結合し得た場合、それらを重複しないエピトープマッピングに入れた。抗 CD73 抗体のペアワイズ試験から、それらが 3 つの重複しないエピトープマッピングに属することが実証された（表 2）。

## 【0309】

30

## 【表 3】

表 2: 抗 CD73 抗体のエピトープマッピング

| エピトープマッピング | 抗体                                                         |
|------------|------------------------------------------------------------|
| A          | CD730002, CD730004, CD730008, CD730011                     |
| B          | CD730003, CD730010, CD730021, CD730042, CD730046, CD730047 |
| C          | CD730068, CD730069                                         |

## 【0310】

## 実施例 3: CD73 に対する抗 CD73 抗体の結合

40

抗 CD73 抗体の結合親和性及び特異性を表面プラズモン共鳴 (SPR) 及びフローサイトメトリーによって決定した。

## 【0311】

Protein XPR36 機器を使用して、ヒト、マウス、及びカニクイザル CD73 ECD に対する MEDI9447 の結合を特徴付けた。抗ヒト Fc 抗体を使用して MEDI9447 の親和性捕捉を行った。CD73 ECD は移動相にあった。MEDI9447 に対する CD73 の会合及び解離はラングミュアの 1:1 モデルで正確に記述することができた。表 3 に示す結果は、これらの 3 つの種の CD73 ECD に対する MEDI9447 の親和性が同程度であり、低ピコモル範囲にあることを実証している。

## 【0312】

50

## 【表 4】

表 3: 表面プラズモン共鳴によって測定した CD73 ECD に対する MEDI9447 の親和性

| 分析物             | $k_a$ ( $M^{-1}s^{-1}$ ) | $k_d$ ( $s^{-1}$ )    | $K_D$ (M)             |
|-----------------|--------------------------|-----------------------|-----------------------|
| ヒト CD73 ECD     | $2.57 \times 10^6$       | $1.06 \times 10^{-5}$ | $4.1 \times 10^{-12}$ |
| マウス CD73 ECD    | $2.41 \times 10^6$       | $2.32 \times 10^{-6}$ | $0.9 \times 10^{-12}$ |
| カニクイザル CD73 ECD | $2.71 \times 10^6$       | $1.76 \times 10^{-5}$ | $6.5 \times 10^{-12}$ |

$k_a$  会合速度定数;  $k_d$  解離速度定数;  $K_D$  解離定数

10

## 【0313】

ヒト、マウス、及びカニクイザル細胞株上に発現した天然 CD73 に対する MEDI9447 の結合をフローサイトメトリーによって特徴付けた。細胞を様々な濃度の MEDI9447 とインキュベートし、フルオロフォア標識抗ヒト Fc 抗体で抗体結合をモニタした。MEDI9447 濃度の関数としての蛍光強度中央値のプロットをワンサイト結合等温線モデルを使用して非線形フィッティングして、平衡解離定数を計算した。フローサイトメトリーによる分析から、ヒト、マウス、及びカニクイザル CD73 に対する MEDI9447 の同程度の親和性での結合が確認され(表 4)、但し  $K_D$  値は SPR によって決定される  $K_D$  値よりも 13 ~ 126 倍高く、これは恐らくは、組換え CD73 と天然 CD73 との間のコンホメーションの違いによるものと思われる。

20

## 【0314】

## 【表 5】

表 4: フローサイトメトリーによって測定した天然 CD73 に対する MEDI9447 の親和性

| 分析物               | $K_D$ (M)             |
|-------------------|-----------------------|
| MDA-MB-231 細胞(ヒト) | $154 \times 10^{-12}$ |
| 4T1 細胞(マウス)       | $113 \times 10^{-12}$ |
| MK-1 細胞(カニクイザル)   | $84 \times 10^{-12}$  |

30

## 【0315】

ヒト CD73 に対する MEDI9447 の特異性をフローサイトメトリーによって決定するため、細胞株を作成した。胸水に由来するヒト乳癌細胞である MDA-MB-231 細胞にヒト CD73 低分子ヘアピン RNA (shRNA) をトランスフェクトして CD73 の細胞表面発現をノックダウンした。パーキットリンパ腫細胞に由来する T 細胞株である ジャーカット細胞に、ヒト CD73 mRNA を発現するプラスミドをトランスフェクトして、CD73 の細胞表面発現をノックインした。ジャーカット細胞は内因性 CD73 をほとんど発現しない。

40

## 【0316】

高 CD73 発現細胞株 (MDA-MB-231) と低発現細胞株 (MDA-MB-231、CD73-shRNA) とに結合する MEDI9447 の比により、ヒト CD73 に対する MEDI9447 の特異性を決定した。ヒト CD73 に対する MEDI9447 の特異性はまた、高 CD73 発現細胞株 (ジャーカット-CD73 ノックイン) と低発現細胞株 ジャーカットとの比によっても決定した。

## 【0317】

マウス CD73 (mCD73) に対する MEDI9447 の特異性をフローサイトメトリーにより、マウス細胞株 4T1 (高 mCD73 発現) をノックダウン細胞株 (4T1 mCD73-shRNA) と比較して決定した。加えて、マウス CD73 ノックインを有

50

するジャーカット細胞に対するMEDI9447の特異性を野生型ジャーカット細胞（マウスCD73なし）と比較した。

【0318】

【表6】

表5: ヒト及びマウスCD73に対するMEDI9447の特異性

| MEDI9447の特異性 | 細胞株関係                               | 平均蛍光強度比(MFIR) |
|--------------|-------------------------------------|---------------|
| ヒト           | MDA-MB-231 / MDA-MB-231(CD73-shRNA) | 3.5           |
| ヒト           | ジャーカット(CD73 ノックイン) / ジャーカット         | 7.9           |
| マウス          | 4T1 / 4T1(mCD73 -shRNA)             | 3.9           |
| マウス          | ジャーカット(mCD73 ノックイン) / ジャーカット        | 57.1          |

10

【0319】

実施例4：抗CD73抗体MEDI9447によるCD73のインターナリゼーション

CD73の抗体媒介性インターナリゼーション又はシェディングをフローサイトメトリーによって評価した。MDA-MB-231細胞を成長培地中100nM MEDI9447又は陰性対照抗体R347の存在下で37℃で0～4時間インキュベートした。細胞を洗浄し、氷冷PBSに再懸濁した。10nM DyLight488標識検出抗体を添加することにより、細胞表面上のCD73の存在を検出した。細胞を15分間インキュベートし、洗浄し、フローサイトメトリーによって分析した。検出抗体は、MEDI9447エピトープと異なるCD73のエピトープに結合し、両方の抗体とも、妨げなしにCD73に同時に結合する。CD73の細胞表面発現は、MEDI9447と共に4時間インキュベートした後その元の値の73%に低下したことから、CD73の27%はMEDI9447結合時にインターナライズされるか、又はシェディングされるかのいずれかであったことが示唆される（エラー！参照元が見つかりません。）。

20

【0320】

30

【表7】

表6: 被験抗体とのインキュベーション後にMDA-MB-231細胞の細胞表面上に留まる

CD73の割合

| 時間[h] | R347 | MEDI9447 |
|-------|------|----------|
| 0     | 100% | 100%     |
| 0.25  | 107% | 90%      |
| 0.5   | 104% | 90%      |
| 1     | 102% | 87%      |
| 2     | 104% | 80%      |
| 4     | 102% | 73%      |

40

【0321】

細胞株MDA-MB-231（ヒト乳癌）及び4T1（マウス乳癌）へのMEDI9447のインターナリゼーションを、FabZAPアッセイ（Advanced Targeting Systems、San Diego CA）として商業的に販売されているヒト抗体インターナリゼーションキットを使用して評価した。MEDI9447又は陰性対照抗体R347の段階希釈物を40nM FabZAP試薬（細胞毒性タンパク質サポリンにコンジュゲートしたポリクローナル抗ヒトIgG抗体のFab断片）とブレインキュベートし、次に細胞株に添加した。培養下で3日後、CellTiter-Gloア

50

ッセイ (Promega、Madison WI) として商業的に販売されている発光細胞生存度アッセイを用いて細胞増殖を計測した。このアッセイを用いて  $EC_{50}$  値及び最大毒性を計算した。FabZAP 試薬は、そのままでは細胞にインターナライズすることができない。これは被験抗体 (例えば、MEDI9447) に結合し、被験抗体のインターナライゼーション時に限り細胞毒性となる。MEDI9447 は FabZAP のインターナライゼーションを生じさせ、細胞増殖を用量依存的に阻害した。

【0322】

【表8】

表7: MDA-MB-231 細胞及び 4T1 細胞への細胞毒性 FabZAP 試薬の抗体媒介性インターナライゼーション

|          | MDA-MB-231     |      | 4T1            |      |
|----------|----------------|------|----------------|------|
|          | $EC_{50}$ [pM] | 最大毒性 | $EC_{50}$ [pM] | 最大毒性 |
| MEDI9447 | 3.5            | 97%  | 18.5           | 97%  |

【0323】

被験抗体及び FabZAP 試薬の段階希釈物で処理した MDA-MB-231 細胞及び 4T1 細胞の細胞増殖を CellTiter-Glo アッセイによって計測した (図2)。CellTiter-Glo アッセイにおける陰性対照抗体 R347 からのシグナルを MEDI9447 のシグナルからサブトラクトし、非線形回帰分析を使用して用量反応曲線をフィッティングすることにより  $EC_{50}$  値及び最大毒性を計算した。

【0324】

実施例5: 抗CD73抗体MEDI9447による5'エクトヌクレオチダーゼ活性の阻害

この試験では、ヒト非小細胞癌細胞株NCI-H322を使用してCD73の触媒によるAMP加水分解を計測するインビトロアッセイでMEDI9447の機能活性を決定した。MEDI9447の製剤は、そのストック溶液を無血清RPMI培地に1 $\mu$ Mの終濃度となるように希釈することによって調製した。R347の製剤は、そのストック溶液をRPMIに1 $\mu$ Mの終濃度となるように希釈することによって調製した。

【0325】

NCI-H322細胞を1500rpmで5分間遠心した。上清を除去し、無血清RPMI培地を補充した。ViCell (Beckman、Coulter) 細胞計数器を使用して細胞懸濁液をカウントした。96ウェルプレートに細胞を1ウェルにつき100 $\mu$ L当たり10,000細胞の細胞密度でプレーティングした。50 $\mu$ Lの4倍濃縮AMP (200 $\mu$ M) を添加した。次にプレートを37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした。プレートを遠心し、50 $\mu$ Lの培養上清をウェル間で96ウェル不透明丸底プレートに移した。次に2 $\times$ ATPを添加した。CellTiterGlo (登録商標) (Promega) を製造者の指示に従い添加した。5'エクトヌクレオチダーゼの細胞酵素阻害をマルチラベルリーダー、Perkin-Elmer Envisionワークステーションで計測した。試料はPrismソフトウェアを使用して分析した。

【0326】

MEDI9447は、ヒトインビトロ系でアデノシンリン酸 (AMP) の脱リン酸化を特異的に阻害した。表面発現CD73の細胞ベースのアッセイでは、アデノシンリン酸からアデノシンへの変換がMEDI9447によって用量依存的に減少したが、無関係のアイソタイプ対照抗体によっては減少しなかった (図3)。図3に示す結果は、96ウェル非組織培養処理プレート (Falcon 3788) に100 $\mu$ Lの添加剤不含RPMI培地中ウェル当たり10,000細胞でプレーティングしたCD73発現NSCLC細胞を使用して得られた。抗体はAMP (200 $\mu$ Mの終濃度) と共にデュプリケートで添加し、プレートは37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>で24時間インキュベートした。次にプレートを

1500rpmで3分間遠心した。新鮮な96ウェルプレート(Costar #3605)に上清を回収し、ATPを100μMの終濃度となるように添加した。CellTiter-Glo(登録商標)試薬(Promega)を1:1で添加し、Envisionルミネセンスプレートリーダー(Perkin Elmer)を使用してATPレベルを計測することにより細胞CD73酵素AMPホスホリラーゼ活性を決定した。ATP及びAMPのみを含有する緩衝液を陰性対照として使用した。アッセイを繰り返した。図3に示す結果は、他のヒト癌細胞株を使用した2つの同様の実験の代表的なものである。

#### 【0327】

これらの結果は、MEDI9447が癌細胞によるアデノシンの産生を阻害したことを示している。アデノシンは、腫瘍微小環境内で腫瘍の免疫抑制効果を媒介する。

10

#### 【0328】

#### 実施例6：MEDI9447による腫瘍浸潤性骨髓系由来サプレッサー細胞の減少

0.1mLのPBS中に懸濁した $5 \times 10^5$ 細胞を4~6週齢雌マウスの右側腹部に皮下(SC)注射することにより、マウス結腸癌に由来するCT26細胞を樹立した。マウスをMEDI9447又は対照抗体で治療した。

#### 【0329】

この試験では、各群10匹のマウスを使用した。動物を群に無作為に割り付けた。群1の動物は治療せず、群2にはアイソタイプ対照を投与した。群3にはMEDI9447を投与した。被験物質は、3日目に開始して週2回、腹腔内投与した。16日目、各群5匹の動物を剖検し、腫瘍を摘出した。

20

#### 【0330】

群番号及び用量レベルを表8に提供する。

#### 【0331】

#### 【表9】

表8: 群番号及び用量レベル

| 群 | 動物<br>(雌)<br>の数 | 治療       | 投与日 | 用量レベル (mg/kg) <sup>a</sup> | ROA |
|---|-----------------|----------|-----|----------------------------|-----|
| 1 | 5               | 未治療      | N/A | N/A                        | N/A |
| 2 | 5               | アイソタイプ   | 週2回 | 20 mg/kg                   | IP  |
| 3 | 5               | MEDI9447 | 週2回 | 10 mg/kg                   | IP  |

30

N/A = 非該当; ROA = 投与経路

#### 【0332】

腫瘍はノギスで1、7、9、12、14、及び16日目に計測し、腫瘍容積は以下のとおり計算した：

(1) (腫瘍容積長さ(mm) × (腫瘍容積幅)<sup>2</sup>(mm)) / 2。

40

MEDI9447の抗癌効果は、以下のとおり計算したパーセント腫瘍成長阻害率として表した：

(2) (MEDI9447の平均腫瘍容積 / R347-TMの平均腫瘍容積) × 100。

#### 【0333】

フローサイトメトリー用の腫瘍を摘出した。試験16日目にCT26腫瘍担持マウスから腫瘍を解剖した。腫瘍を細片に切断し、コラゲナーゼで消化させた。30分間インキュベートした後、消化された試料を70ミクロンフィルタに通過させた。解離した細胞を4

で1000rpmで5分間ペレット化し、蛍光活性化細胞選別(FACS)緩衝液に再懸濁した。Vi-Cellでデフォルト設定を用いて細胞をカウントした。ウェル当たり $1 \times 10^6$ 細胞をプレーティングした。細胞を抗CD45(全ての白血球を検出するため

50

）、抗GR1（MDS Cを検出するため）及び抗Ly6g（顆粒球系MDS C）で染色した。LSRIIFローサイトメーターでデータを収集した。存在する場合、MDS C分析から得られた有意なp値を図4に記述統計値（即ち、平均値及び標準偏差）の隣に提供する。

【0334】

MEDI9447はマウスCT26同系Balb/C腫瘍モデルにおいて腫瘍成長を阻害した（図4）。

【0335】

MEDI9447はマウスCT26同系Balb/C腫瘍モデルにおける腫瘍浸潤性MDS Cの割合を低下させた（図5）。

10

【0336】

MEDI9447はCT26マウス同系腫瘍の成長を阻害した。加えて、MEDI9447による治療後、同系CT26結腸癌腫瘍の骨髓系由来サプレッサー細胞が減少した。腫瘍内MDS Cは腫瘍微小環境に対して免疫抑制効果を有し、腫瘍成長の増強を可能にする。MEDI9447による治療後に腫瘍内MDS Cの減少が観察されたことは、MEDI9447による治療が腫瘍免疫抑制を低減する機構を実証している。

【0337】

実施例7：MEDI9447 mIgG1と抗PD-1抗体との併用は腫瘍成長を低減し、生存を増加させる

HBS S中に懸濁した0.1mlの $5 \times 10^6$ 個のCT26細胞/mlを8～10週齢の動物の右側腹部に皮下（SC）注射することにより、同系腫瘍を樹立した。腫瘍をノギスで計測し、以下の式を用いて腫瘍容積（TV）を計算した：

20

$$(1) TV = (L \times W^2) / 2$$

（式中、Lは腫瘍長さ（ミリメートル単位）であり、Wは腫瘍幅（ミリメートル単位）である）。

【0338】

マウスを体重に基づく群に無作為化した。動物の取り替えはなかった。この試験では60匹の雌Balb/cマウスを使用した。

【0339】

動物を6群に無作為に割り付けた。動物にはMEDI9447（mIgG1）を投与した。被験物質は3日目に開始して週2回、腹腔内（IP）注射によって投与した。群番号及び用量レベルを表9に提供する。

30

【0340】

## 【表 10】

表 9: 群番号及び用量レベル

| 群 | 動物<br>(雌)の<br>数 | 治療                  | 投与<br>スケジュール<br>(週 2 回) | 用量レベル (mg/kg) <sup>a</sup> | ROA |
|---|-----------------|---------------------|-------------------------|----------------------------|-----|
| 1 | 10              | 未治療                 | NA                      | NA                         | NA  |
| 2 | 10              | アイソタイプ<br>mIgG1     | 4 用量                    | 10                         | ip  |
| 3 | 10              | アイソタイプ<br>rIgG2a    | 4 用量                    | 10                         | ip  |
| 4 | 10              | MEDI9447<br>mIgG1   | 4 用量                    | 10                         | ip  |
| 6 | 10              | 抗 PD1               | 4 用量                    | 0.5                        | ip  |
| 7 | 10              | 抗 PD1 +<br>MEDI9447 | 4 用量                    | 0.5 + 10                   | ip  |

F = 雌; IV = 静脈内; M = 雄; ROA = 投与経路

<sup>a</sup> 投与量: 10 mL/kg.

## 【0341】

(a) インビボ腫瘍阻害試験の結果

CT26 マウス結腸癌を同系 Balb/c マウスに移植し、抗 CD73 (MEDI9447 mIgG1; 10 mg/kg)、抗 PD1 (0.5 mg/kg) 又は併用 (10 mg/kg の抗 CD73 及び 0.5 mg/kg の抗 PD1) で治療した。併用治療は抗 CD73 単独と比較したとき腫瘍成長を有意に阻害した ( $p = 0.015$ 、ANOVA)。試験 40 日目までの各動物群の腫瘍容積を個々の動物についてプロットした。対照群には、40 日間の試験期間の終わりまで腫瘍がなかったマウスはいなかった (図 6 を参照)。抗 CD73 治療単独では、試験終了時に腫瘍がなかった動物は 10% であった。抗 PD1 治療単独も、試験終了時に腫瘍がなかった動物は 10% であった。顕著なことに、抗 CD73 と抗 PD1 との併用治療では、腫瘍がなかったマウスは 60% であった。対照群には、試験の終わりまで腫瘍がなかったマウスは一匹もいなかった。抗 CD73 (MEDI9447 mIgG1)、抗 PD1 又は抗 CD73 と抗 PD1 との併用で治療したマウスの CT26 腫瘍を計測した。マウスは試験 40 日目まで計測し、腫瘍が 2000 mm<sup>3</sup> に達したところで人道的に犠牲死させた。抗 CD73 と抗 PD1 との併用治療は、抗 CD73 又は抗 PD1 治療単独と比較したとき、一緒になって統計学的に有意な生存の増加をもたらした (それぞれ  $p$  値 = 0.005 及び  $p = 0.038$ 、ログランク検定) (図 7)。生存期間中央値は、この併用についての 40 日目における「未定」と比較して 25 日及び 33 日 (それぞれ抗 CD73 及び抗 PD1) から増加した。

## 【0342】

10

20

30

## 【表 11】

表 9: 試験 40 日目の結果

| 治療             | 腫瘍のないマウス (%) | 生存率 (%) |
|----------------|--------------|---------|
| 未治療            | 0            | 0       |
| アイソタイプ mIgG1   | 0            | 0       |
| アイソタイプ rIgG2a  | 0            | 0       |
| 抗 CD73         | 10           | 10      |
| 抗 PD1          | 10           | 20      |
| 抗 CD73 + 抗 PD1 | 60           | 70      |

10

## 【0343】

要約すれば、抗 CD73 抗体、MEDI9447 mIgG1 は、マウス同系 CT26 結腸癌モデルにおいて抗 PD-1 抗体と比較したとき抗腫瘍活性の増強を示した。加えて、抗 CD73 と抗 PD1 との併用治療では、腫瘍がなかったマウスは 60% であった。抗 CD73 と抗 PD1 との併用治療はまた、抗 CD73 又は抗 PD1 単独治療と比較したとき、一緒になって統計学的に有意な生存の増加ももたらした。

## 【0344】

20

実施例 8：抗 CD730010 抗体及び抗体変異体

CD730002 及び CD730010 の VH 及び VL アミノ酸配列を、IMGT / V-QUEST (<http://www.imgt.org>) を使用して既知のヒト生殖系列配列とアラインメントし、配列類似性によって最も近縁の生殖系列配列を同定した。CD730010 VH ドメインについては、これらはIGHV3-23 及びIGHJ2 であった。CD730010 VL ドメインについては、これらはIGLV1-44 及びIGLJ3 であった。CDR 領域外の 6 つの非生殖細胞系列残基を同定した：VH の R94、及び VL の L1、P2、V11、K37、及び V39 (Kabatt 付番)。CD730010 IgG1-TM 発現ベクターのヌクレオチドを標準的な分子生物学的技術によって復帰突然変異させて、従って得られた発現ベクターはこれらの位置で生殖細胞系列アミノ酸をコードした (VH の K94、及び VL の Q1、S2、A11、Q37、及び L39)。CD730010 IgG1-TM タンパク質変異体を発現させて、精製し、CD73 発現 MD-MB-231 細胞との結合に関してフローサイトメトリーによって試験した。VL の 5 つ全ての非生殖細胞系列アミノ酸は、結合を損なうことなくそれらの生殖細胞系列残基に変えることができた。しかしながら、VH の R94 は結合に重要であり、それを K に変えると結合が損なわれる。CD730010 GL9 のヌクレオチド配列を親和性最適化抗体変異体の作成の鋳型として使用した。

30

## 【0345】

CD730002 について、最も近縁の生殖系列遺伝子は、VH ドメインについてIGHV3-23 及びIGHJ3、並びに VL ドメインについてIGLV3-1 及びIGLJ3 であった。CDR 領域外の 4 つの非生殖細胞系列残基を同定した：VH の R94、及び VL の T20、R57、L81 及び F87 (Kabatt 付番)。CD730002 IgG1-TM 発現ベクターのヌクレオチドを標準的な分子生物学的技術によって復帰突然変異させて、従って得られた発現ベクターはこれらの位置で生殖細胞系列アミノ酸をコードした (VH の K94、及び VL の S20、G57、M81、及び Y87)。この CD730002 IgG1-TM タンパク質変異体を発現させて、精製し、組換えヒト及びマウス CD73 との結合に関してフローサイトメトリーによって試験した。VL の 4 つ全ての非生殖細胞系列アミノ酸は、結合を損なうことなくそれらの生殖細胞系列残基に変えることができた。しかしながら、VH の R94 は結合に重要であり、それを K に変えると結合が損なわれる。変異体 CD730002 SGMY (生殖細胞系列化されていない V、完

40

50

全に生殖細胞系列化されたV L )を親和性最適化抗体変異体の作成の鋳型として使用した。

【0346】

実施例9：抗CD73抗体CD730010GL9の親和性最適化

単一のアミノ酸突然変異を有する変異CDR配列を含むFabライブラリをスクリーニングすることにより、CD730010GL9 IgG1-TMを増強した。6つのCDR内の61個の位置の各々を、個々に19個のアミノ酸（システインを除く全ての天然アミノ酸）にランダム化し、理論上1159個のユニークなクローンの多様性（各位置につき19個のアミノ酸×61個の位置）を有するライブラリを作成した。このライブラリの4224個のクローンから細菌Fab断片を作製し、ヒト及びマウスCD73タンパク質との結合に関して捕捉ELISAによってスクリーニングした（アッセイ2）。親CD730010 GL9 IgG1-TMと比較して結合シグナルが増加した180個のクローンを選択し、VH又はVLドメインの突然変異をDNAシーケンシングによって同定した。細菌上清中のFab濃度を標準化し、ヒト及びマウスCD73タンパク質に対する標準化した上清の結合をダイレクトELISAによって判定した（アッセイ1）。表11には、選択された有益な単一アミノ酸置換及び組換えCD73タンパク質との結合に対するそれらの効果を掲載する。

【0347】

## 【表 12】

表 11: 親和性が向上した CD730010 GL9 の単一アミノ酸変異体

| CDR | アミノ酸<br>変化 | ELISA シグナル、親抗体に対する<br>改善倍数 |        |
|-----|------------|----------------------------|--------|
|     |            | huCD73                     | muCD73 |
| L1  | P32E       | 27.7                       | 6.7    |
| L1  | P32D       | 11.7                       | 6.5    |
| H3  | Y102K      | 9.9                        | 7.4    |
| L2  | N51D       | 8.9                        | 4.5    |
| H2  | G54N       | 8.9                        | 7.1    |
| H2  | S52W       | 8.9                        | 4.4    |
| H3  | Y102M      | 7.9                        | 6.3    |
| H3  | Y102L      | 7.3                        | 5.8    |
| L2  | S56G       | 7.1                        | 5.6    |
| L2  | N51A       | 6.7                        | 2.5    |
| H3  | Y102A      | 6.6                        | 5.0    |
| L1  | P32G       | 6.1                        | 5.8    |
| L1  | P32A       | 6.0                        | 5.5    |
| L2  | Q53L       | 6.0                        | 3.8    |
| L2  | Q53Y       | 5.8                        | 2.3    |
| L2  | P55L       | 5.7                        | 4.3    |
| H2  | S56R       | 5.6                        | 4.9    |
| L2  | N51Q       | 4.2                        | 2.3    |
| H2  | G54W       | 4.2                        | 3.7    |
| H2  | A50L       | 4.2                        | 3.0    |
| L2  | Q53F       | 4.1                        | 2.7    |
| H1  | M34Y       | 3.9                        | 2.9    |
| L2  | P55I       | 3.7                        | 3.2    |
| H3  | Y102Q      | 3.6                        | 3.0    |
| L2  | Q53W       | 3.1                        | 2.7    |
| L2  | Q53H       | 2.4                        | 1.9    |
| L2  | L50F       | 2.2                        | 1.4    |
| H1  | S35H       | 1.8                        | 1.1    |
| H1  | M34I       | 1.5                        | 1.1    |

## 【0348】

抗CD73抗体の親和性を更に向上させるため、親CD730010 GL9と比較したとき結合が向上した幾つかの単一アミノ酸変化を組み合わせるコンビナトリアルFabライブラリを作成した(アッセイ4)。大腸菌(E. coli)においてこのコンビナトリアルライブラリの4224個のクローンのFab断片を作製し、ヒト及びマウスCD73タンパク質との結合に関して捕捉ELISAによってスクリーニングした。各スクリーニングアッセイからの上位20個のクローンを更なる特徴付けに選択した。上清中のFab濃度を標準化し、標準化した上清の段階希釈物をヒト及びマウスCD73との結合に関して捕捉ELISA及びダイレクトELISAによって試験した。クローンC1、C2、D3及びG10は、ヒト及びマウスCD73に対する強力な結合を示し、更なる特徴付けに選択した。

## 【0349】

CD730010 GL9の抗原結合も親和性ベースのファージ選択を用いて増強した。リードCD730010 GL9配列に由来する大規模scFvライブラリを、記載されるとおりの標準的な分子生物学的技術を用いた可変重鎖(VH)相補性決定領域3(C

10

20

30

40

50

CDR3)又は可変軽鎖(VL)CDR3のオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発によって作成した(Finch et al., JMB 411, 791-807(2011))。これらのライブラリを、ビオチン化ヒト及びマウスCD73細胞外ドメインタンパク質による一連の反復的な交互選択サイクルでパニングした。選択アウトプットのラウンド3からのScFv遺伝子を細菌IgG発現ベクターにバッチ変換した。可溶性IgGを含有する細菌培養上清を、ヒト及びマウスCD73とのそれらの結合に関してスクリーニングした。親CD730010 GL9と比較してCD73との結合が有意に向上したIgG変異体をDNAシーケンシングに供した。2つの変異体、GRVE及びHPTを、更なる特徴付けに選択した。

【0350】

10

更なる親和性の向上を生じさせるため、コンビナトリアルFabライブラリ及び親和性ベースのファージ選択から同定された有益な突然変異を組み合わせ、変異体73comb01~73comb06を作成した。

【0351】

実施例10：抗CD73抗体CD730002SGMYの親和性最適化

CD730010GL9について記載したとおり、単一アミノ酸突然変異を有する変異CDR配列を含むFabライブラリをスクリーニングすることによってCD730002SGMY IgG1-TMを増強した。組換えCD73に対する結合シグナルの増加をもたらしたVHドメインの5つのアミノ酸突然変異及びVLドメインの4つのアミノ酸突然変異が同定された。表12には、有益な単一アミノ酸置換及び組換えCD73との結合に対するそれらの効果を掲載する。

20

【0352】

【表13】

表12: 親和性が向上したCD730002SGMYの単一アミノ酸変異体

| CDR | アミノ酸変化 | FACSシグナル、親抗体に対する改善倍数 |
|-----|--------|----------------------|
|     |        | MDA-MB-231細胞         |
| H1  | Y32V   | 1.2                  |
| H1  | M34R   | 1.1                  |
| H2  | T57P   | 1.5                  |
| H2  | A60G   | 1.3                  |
| H2  | G65R   | 1.3                  |
| L2  | T52S   | 1.5                  |
| L2  | R54Y   | 1.2                  |
| L2  | P55L   | 1.9                  |
| L2  | P55H   | 1.5                  |

30

【0353】

抗CD73抗体CD730002SGMYの親和性を更に向上させるため、VHドメインに1つの有益なアミノ酸変化を有し、且つVLドメインに1つの有益なアミノ酸変化を有するIgG変異体を調製した。293F細胞の一過性トランスフェクションによって抗体変異体を調製し、MDA-MB-231細胞との結合に関してフローサイトメトリーによってスクリーニングした。クローン2C5は親CD730002SGMYよりも3倍低いEC50値を有した。

40

【0354】

実施例11：増強抗CD73抗体の親和性

ヒト、マウス、及びカニクイザルCD73に対する増強抗CD73抗体(IgG1-TMフォーマット)の親和性をフローサイトメトリー及び表面プラズモン共鳴(SPR)によって決定した(表13)。増強抗体は、これらの3つの種由来の細胞性及び組換えCD73に対してpM親和性を有した。

【0355】

50

## 【表 14】

表 13: ヒト、マウス、及びカニクイザル CD73 に対する抗 CD73 抗体の親和性

|                         | KD [pM]         |           |               |               |          |             |
|-------------------------|-----------------|-----------|---------------|---------------|----------|-------------|
|                         | フローサイトメトリー      |           |               | SPR (Proteon) |          |             |
|                         | MB-MDA-231 (ヒト) | 4T1 (マウス) | MK-1 (カニクイザル) | ヒト CD73       | マウス CD73 | カニクイザル CD73 |
| CD730010                | 8000            | 6100      | ND            | 3580          | 2470     | 1920        |
| CD730010GL9             | 8949            | 16365     | 16460         | 1640          | ND       | ND          |
| P32E                    | 178             | 145       | 110           | 63            | 35       | 27          |
| C1                      | 179             | 95        | 160           | 29            | 6        | 12          |
| C2                      | 158             | 67        | 105           | 23            |          |             |
| G10                     | 354             | 259       | 258           | 9             |          |             |
| HPT                     | 739             | 5812      | 1138          | 548           |          |             |
| GRVE                    | 125             | 88        | 101           | 29            |          |             |
| 73combo1 (C1+GRVE+HPT)  | 157             | 150       | 90            | 7             | 2        | 8           |
| 73combo2 (C2+GRVE+HPT)  | 166             | 64        | 74            | 5             |          |             |
| 73combo3(D3+GRVE+HPT)   | 154             | 113       | 84            | 4             | 1        | 7           |
| 73combo5 (G10+GRVE+HPT) | 169             | 205       | 78            | 7             |          |             |
| 73combo6(GRVE+HPT)      | 166             | 82        | 107           | 15            |          |             |
| CD730002                | 52              | 50        | 52            | 7             | 40       | 15          |
| CD730002 2C5            | 84              | 55        | 63            | 9             | 22       | 9           |

## 【0356】

実施例 12: 抗ヒト CD73 抗体、Phen0203 hIgG1 は、インビトロで CD4 + CD25 - T 細胞増殖の AMP 媒介性抑制を濃度依存的に阻害した。

抗 CD73 抗体 (Phen0203) がインビトロで AMP 媒介性 T 細胞抑制を軽減する能力を決定する試験を行った。このインビトロ試験では、抗ヒト CD73 抗体 (Phen0203 hIgG1) が CD73 によるアデノシンリン酸からアデノシン及び有機リン酸への触媒作用及び続く T 細胞機能への影響を阻害する能力を調べた。Phen0203 hIgG1 は、インビトロで CD73 の細胞性の及び生化学的な酵素活性を阻害する能力を含め、MEDI9447 と同様の機能特性を有する。

## 【0357】

Phen0203 hIgG1 抗体は、重鎖定常領域に改変を有しないヒト IgG1 mAb である。MEDI9447 と同様に、この抗体も、ヒト CD73 に選択的に結合して、ヒト CD73 のエクトヌクレオチダーゼ活性による免疫抑制性アデノシンの産生を阻害する。しかしながら、Phen0203 はマウス CD73 に対する交差反応性を欠いている。

## 【0358】

AMP 媒介性 T 細胞抑制に関するアッセイでは、白血球コーン (leukocyte cone) の内容物から CD25 + 細胞が枯渇した初代ヒト CD4 + T 細胞を単離し、エフェクター細胞として使用した; 各コーンは別々に処理した。簡潔に言えば、白血球コーンの内容物を PBS に希釈し、次に Ficoll - Paque Plus (GE Healthcare, Chalfont St Giles, UK) に層状に重ね、ブレーキをオフにして 400 × g で 40 分間遠心した。次に界面から末梢血単核細胞 (PBMC) を単離し、200 × g で 10 分間遠心することにより PBS で洗浄した。上清を廃棄し、細胞を PBS 中に懸濁した。生細胞を決定し、次に 350 × g で 5 分間ペレット化して、 $5 \times 10^7$  / mL の濃度で Robosep 緩衝液 (Stem Cell, Grenoble, France) に懸濁した。EasySep ヒト CD4 + T 細胞エンリッチメン

トキット (Stem Cell、Grenoble、France) 及び RoboSep (Stem Cell、Grenoble、France) を使用したネガティブ選択により、PBMC から  $CD4^+$  T 細胞を単離した。精製した  $CD4^+$  T 細胞をベレット化し、 $1.5 \times 10^7 / mL$  で Robosep 緩衝液中に再懸濁した。Dynabeads  $CD25$  (Dynabeads Regulatory  $CD4^+ CD25^+$  T 細胞キットの一構成要素; Life Technologies、Paisley、UK) を  $1.5 \times 10^7$  細胞当たり  $200 \mu L$  で添加し、連続的に混合しながら 4 で 25 分間インキュベートした。次に細胞を DynaMag-15 磁石 (Life Technologies、Paisley、UK) 内に 1 分間置き、 $CD4^+ CD25^-$  エフェクター細胞を含有する上清を新しいチューブに移した。

10

#### 【0359】

CellTrace CFSE 細胞増殖キット (Life Technologies、Paisley、UK) を使用して、単離したエフェクター細胞を 0.1% BSA 含有 PBS 中  $1 \times 10^6$  細胞/mL の細胞密度で 37 で 15 分のインキュベーション時間として CFSE プローブ ( $3 \mu M$ ) によって標識した。細胞を温 X-Vivo 15 培地で 2 回洗浄し、同じ培地中に  $5 \times 10^5$  細胞/mL で懸濁した。 $1 \times 10^6$  細胞当たり  $25 \mu L$  の抗  $CD3$  及び抗  $CD28$  被覆マイクロビーズ (Dynabeads ヒト T-アクチベーター  $CD3/CD28$ ; Life Technologies、Paisley、UK) 及び  $60 IU/mL$  の rhIL-2 を添加することにより、標識したエフェクター細胞を 37 で 1 時間活性化させた。その後、活性化した  $CD4^+ CD25^-$  細胞 ( $100 \mu L$  中約 50,000) を滅菌丸底 96 ウェルプレートに添加した。X-Vivo 15 培地 (Lonza、Slough、UK) 中に以下の試薬の段階希釈を実施した: 被験物質 Phen0203 hIgG1; R347 対照抗体; 陽性対照としての APC P; 及び SCH58261、アデノシン受容体 A2A に対する選択的アンタゴニスト。Phen0203 hIgG1 は既製製剤 (MedImmune、Gaithersburg、MD) として受領し、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に希釈した。R347 は既製製剤 (MedImmune、Gaithersburg、MD) として受領し、PBS に希釈した。

20

#### 【0360】

プレート内の細胞に  $50 \mu L$  の希釈試薬を添加し、続いて  $400 \mu M$  又は  $800 \mu M$  の AMP (Sigma-Aldrich、Gillingham、UK) を含有する  $50 \mu L$  の X-Vivo 15 (Lonza、Slough、UK) を添加した。以下の対照ウェルも含まれた: 活性化 CFSE 標識  $CD4^+ CD25^-$  細胞、AMP 無し (活性化対照); CFSE 標識  $CD4^+ CD25^-$  細胞、AMP 有り、但し被験/対照物質無し (未処理対照); 及び活性化していない (静止対照) CFSE 標識  $CD4^+ CD25^-$  細胞、AMP 無し。このアッセイの細胞を  $100 \times g$  で 2 分間遠心することにより穏やかにベレット化し、37、5%  $CO_2$  の加湿組織培養インキュベーターに 72 時間入れた。

30

#### 【0361】

72 時間のインキュベーション後、 $380 g$  で 4 分間遠心することにより細胞をベレット化し、 $100 \mu L$  の FACS 緩衝液 (eBioscience、Hatfield、UK) で 1 回洗浄し、最後に、BD FACS Canto II (BD Biosciences、Oxford、UK) でのフローサイトメトリー分析のため、3.7% のホルムアルデヒドを含有する  $100 \mu L$  の PBS 中に懸濁した。AMP ウェルのない静止 CFSE  $CD4^+ CD25^-$  細胞を使用して、細胞分裂を起こした細胞 (分裂細胞) を同定した。

40

#### 【0362】

$CD73$  は、一部の  $CD4^+$  T 細胞上に発現することが分かった。細胞外 AMP の存在下では、 $CD73^+$  T 細胞は、 $CD73$  による AMP からアデノシンへの代謝と、それに続くアデノシン受容体の活性化及び次の T 細胞機能の調節に関わるパラクリン/オートクリン経路を可能にする潜在的能力を有する。この  $CD73$  /アデノシン経路を、TC

50

Rシグナル伝達及びr h I L - 2によって活性化した精製C D 4 + C D 2 5 - 初代ヒトT細胞を使用してインビトロでモデル化した。1 0 0又は2 0 0 μ Mの細胞外A M Pの存在下でT細胞増殖は抑制された。

#### 【0363】

抗C D 7 3抗体(P h e n 0 2 0 3 h I g G 1)がA M P媒介性T細胞抑制を阻害するインビトロでの能力を評価した。A M Pの存在下でP h e n 0 2 0 3 h I g G 1を添加すると、T細胞増殖が濃度依存的に増加した(図9)。対照的に、R 3 4 7アイソタイプ対照抗体は効果を有しなかった。理論によって拘束されることは意図しないが、これは、C D 7 3に対する抗C D 7 3抗体の結合が、アデノシンの生成及び続くアデノシン受容体シグナル伝達によるT細胞機能に対する阻害効果を遮断し又は低下させることが可能であったことを示唆している。

10

#### 【0364】

A P C P及びS C H 5 8 2 6 1は、それぞれC D 7 3(H a u s l e r e t a l . , C a n c e r I m m u n o l I m m u n o t h e r . 2 0 1 1 6 0 ( 1 0 ) : 1 4 0 5 - 1 8)及びアデノシン受容体A 2 A(M a r c o l i e t a l . , N e u r o p h a r m a c o l o g y 2 0 0 3 4 5 ( 2 ) : 2 0 1 - 1 0)の既知の小分子阻害薬である。これらの分子の添加によってもA M Pの存在下でのT細胞増殖の増加がもたらされた(図9及び図10)。理論によって拘束されることは意図しないが、これは、このインビトロ初代ヒト細胞アッセイ系でのT細胞抑制の媒介におけるC D 7 3、アデノシン及びアデノシン受容体A 2 Aシグナル伝達の役割を示唆している。

20

#### 【0365】

抗ヒトC D 7 3抗体のP h e n 0 2 0 3 h I g G 1は、インビトロでC D 4 + C D 2 5 - T細胞増殖のA M P媒介性抑制を濃度依存的に阻害する能力を有した。このデータは、A M P / C D 7 3 / アデノシン経路の免疫抑制効果を標的化する抗C D 7 3抗体手法の科学的論拠を提供する。

#### 【0366】

実施例13：抗C D 7 3抗体とアデノシン受容体阻害薬との併用はT N F - α分泌に対して相乗効果を有した

諸研究によれば、抗C D 7 3抗体を用いたC D 7 3及びそのアデノシン産生の分子阻害が腫瘍形成、成長、及び転移を阻害し得ることが示されている。アデノシン受容体A 2 Aは、免疫細胞の負の調節において役割を果たすことが仮定される。従って、抗C D 7 3抗体、M E D I 9 4 4 7 ( m I g G 1 ) の抗腫瘍効果は、それをアデノシン受容体阻害薬(A 2 A R i)と併用して投与することにより増加し得ることを調べた。

30

#### 【0367】

抗C D 7 3モノクローナル抗体単独及びアデノシン受容体阻害薬(A 2 A R i)との併用でのヒト混合白血球培養において免疫活性化サイトカインI F N γ及びT N F αの放出を評価した。上清中のI F N γ及びT N F αのレベルをE L I S Aによって検出した。ヒト末梢血リンパ球を混合白血球反応で72時間セットアップし、抗C D 7 3単独、A 2 A R阻害薬単独又は両方の薬剤で刺激した。8ドナーのペアワイズの組み合わせからの末梢血単核細胞を、1 μ M 抗C D 7 3抗体M E D I 9 4 4 7及び1 μ M A 2 A R i S C H 5 8 2 6 1の単独又は併用の存在下で72時間インキュベートした。インキュベーション後、上清中のインターフェロンγ(I F N γ)及び腫瘍壊死因子α(T N F α)レベルをM e s o s c a l e E L I S Aプレートを使用して計測した。各化合物とのインキュベーション後に観察されたI F N γ及びT N F αレベルを、陰性対照としてのアイソタイプ対照抗体とのインキュベーションからのレベルを使用して、デュプリケートの対照に対する倍数値としてプロットした。

40

#### 【0368】

抗C D 7 3抗体M E D I 9 4 4 7 ( m I g G 1 ) 及びアデノシン受容体阻害薬(A 2 A R i)は、上清中に種々のレベルのI F N γ及びT N F αが検出されたとおり(図11及び図12)、ヒト細胞においてこれらのサイトカインを様々な程度に誘導する能力を有し

50

た。抗CD73抗体、MEDI9447 (mIgG1) は、アデノシン受容体阻害薬 (A2ARi) と併用したとき、試験した全てのドナーペアでインビトロヒト混合リンパ球刺激アッセイにおいてTNF $\alpha$ レベルの増強を実証した (図12)。実際、MEDI9447とSCH58261との併用の投与は、全てのドナーペアでヒト混合リンパ球刺激アッセイにおけるTNF $\alpha$ 分泌に対して相乗効果を示した。

【0369】

#### 実施例15：使用した方法及びアッセイ

前出の実施例は、以下のアッセイ及び方法を用いて実施した。

【0370】

#### アッセイ1：ダイレクトELISA

384ウェルELISAプレートを約1.5 ng / ウェルの組換えCD73タンパク質でコーティングし、1% BSA / 0.1% Tween 20 / PBSでブロックし、抗体試料と室温で90分間インキュベートした。これに続いて、ヤギ抗Ig $\lambda$ -西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートと室温で30分間インキュベートした。テトラメチルベンジジン (TMB) 基質でHRP活性を検出し、1M HClで反応を停止させた。プレートを450 nmで読み取った。

【0371】

#### アッセイ2：捕捉ELISA

384ウェルELISAプレートを約3 ng / ウェルのヒツジ抗ヒトFd抗体でコーティングし (Fabフォーマットの抗体をスクリーニングするため)、1% BSA / 0.1% Tween 20 / PBSでブロックし、試料と室温で90分間インキュベートした。次にビオチン化CD73タンパク質を室温で1時間添加した。これに続いて、ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートと室温で30分間インキュベートした。テトラメチルベンジジン (TMB) 基質でHRP活性を検出し、1M HClで反応を停止させた。プレートを450 nmで読み取った。

【0372】

約50 ng / ウェルのビオチン化組換えCD73を使用して、単一アミノ酸突然変異を有するクローンをスクリーニングした。コンビナトリアルライブラリからのクローンのスクリーニングには、10 ng / ウェルのビオチン化組換えCD73を使用した。

【0373】

#### アッセイ3：フローサイトメトリー結合アッセイ

フローサイトメトリー実験は全て4で行い、試薬はPBS / 1% FBS緩衝液中に調製した。10,000細胞を50  $\mu$ L容積中の被験抗体と4時間インキュベートした。細胞を2回洗浄し、50  $\mu$ Lヤギ抗ヒトIgGFc-AlexaFluor647コンジュゲートにおいて15分間インキュベートした。細胞を洗浄し、Dapiを補足した緩衝液中に再懸濁し、フローサイトメーターで分析した。Dapi強染色によって同定される死細胞は分析から除外した。KD値の決定には、被験抗体濃度の関数としての蛍光強度中央値のプロットを、ワンサイト結合等温線モデルを使用して非線形フィッティングした。

【0374】

#### アッセイ4：単一のアミノ酸変化を有する抗体ライブラリの作成

Quick Change Lightning多重部位特異的突然変異誘発キット (Agilent) 及びプライマーを使用して、CD730010又はCD730002のCDRコドンの部位特異的突然変異誘発を実施した。野生型コドンに置き換えたプライマーで各コドンに突然変異誘発した。突然変異誘発したVH及びVL遺伝子を細菌発現用のFabベクターにクローニングした。大腸菌 (E. coli) 株BL21 (DE3) を抗体ライブラリで形質転換し、個々のコロニーをピッキングし、Magic Media (Invitrogen) において室温で24時間培養して細菌Fab断片を作製した。細菌上清を調製し、それを使用してELISA結合アッセイで抗体ライブラリをスクリーニングした。

【0375】

アッセイ5：コンビナトリアルなアミノ酸変化を有する抗体ライブラリの作成

C D 7 3 0 0 1 0 G L 9 V H 及び V L 遺伝子を細菌 F a b 発現用のベクターにクローニングした。Q u i k C h a n g e L i g h t n i n g 多重部位特異的突然変異誘発キット ( A g i l e n t ) 又はオーバーラップ P C R のいずれか及び縮重プライマーを使用して、C D 7 3 0 0 1 0 G L 9 の C D R コドンの部位特異的突然変異誘発を実施した。縮重プライマーは、同じ位置に選択のアミノ酸変化並びに親アミノ酸をコードするように設計した。大腸菌 ( E . c o l i ) 株 B L 2 1 ( D E 3 ) を F a b ライブラリで形質転換し、個々のコロニーを M a g i c M e d i a ( I n v i t r o g e n ) において室温で 2 4 時間培養して細菌 F a b 断片を作製した。細菌上清を使用して、E L I S A 結合アッセイで抗体ライブラリをスクリーニングした。

10

【 0 3 7 6 】

アッセイ6：F a b Z A P アッセイ

9 6 ウェルプレートにおいて R P M I / 1 0 % F B S 中で 1 , 0 0 0 細胞 / ウェルを培養した。5 n M で開始した抗 C D 7 3 抗体の段階希釈物を F a b Z A P 試薬 ( A d v a n c e d T a r g e t i n g S y s t e m s , S a n D i e g o C A ) と混合し、細胞に加えた。3 7 ° で 3 日間インキュベートした後、C e l l T i t e r - G l o アッセイ ( P r o m e g a , M a d i s o n W I ) を用いて細胞増殖を計測した。

【 0 3 7 7 】

具体的な態様の前出の説明は、本発明の一般的性質を十分に完全に明らかにするものであり、従って第三者が、当該技術分野の範囲内の知識を適用することにより、本発明の一般的概念から逸脱することなく、過度の実験を行うことなしにかかる具体的な態様を容易に改良し及び / 又はそれを様々な適用に適合させることができる。従って、かかる適合形態及び改良形態は、本明細書に提供される教示及び指針に基づけば、開示される態様の均等物の意味及び範囲内にあることが意図される。本明細書における用語法又は表現法は、限定ではなく、説明を目的とするものであり、従って本明細書の用語法又は表現法は当業者によって教示及び指針を踏まえて解釈されるべきであることが理解されなければならない。

20

【 0 3 7 8 】

配列表

## 【化 5】

&gt;配列番号1 CD730002 VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPERFSGSNS  
GNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFWVFGGGTKLTVL

&gt;配列番号2 CD730002 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVSS

&gt;配列番号3 CD730010 VL

LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISCSGSLNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

10

&gt;配列番号4 CD730010 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLTVSS

&gt;配列番号5 CD730011 VL

NFMLTQPHSVSESPGKTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQQRPGSSPMAVIYKDNQRSSGVPDRFSGS  
IDSSSNSASLTISGLKPEDEADYYCQSYDASNYYVFGTGTKVTVL

&gt;配列番号6 CD730011 VH

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRGHGLYFDLWGQGTITVTVSS

20

&gt;配列番号7 CD730021 VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGRPNIGGNTVNWYQQLPGAAPKLLIYSNSQRPSGVPDRFSGS  
KYGTSASLAISGLQSDDEADYYCGTWDDSLNGPVFGRGTKLTVL

&gt;配列番号8 CD730021 VH

QVQLQESGPGLVRPSETLSLTCTVSGGSISSSSYYWAWVRQSPGKGLEWIGNIYYRGSTYYNPSL  
KSRVTMSVDMSKHQFSLKLSSLNAADTAVYYCASLYSGTYVFDYWGRGTLTVSS

&gt;配列番号9 CD730042 VL

QSVLTQPASVSGSPGQSITISCAGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMIEGSKRPSGVSNNRFS  
GSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYCSSYTTRSTRVFGGGTKLTVL

30

&gt;配列番号10 CD730042 VH

GVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADS  
VKGRFTISRDDSKNALYLQMNSLRAEDTAVYYCSTLSGSYGYFDYWGRGTLTVSS

&gt;配列番号11 CD730046 VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSNIGSNTVSWYQHLPGTAPQLLIYTNNHRPSGVPDRFSGSK  
SGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGYVFGTGTKVTVL

&gt;配列番号12 CD730046 VH

QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADS  
VKGRFTISRDN SKNSLFLQMNSLRDDDTATYYCARGHLLRIGDIFYSLDVWGQGTITVTVSS

&gt;配列番号13 CD730047 VL

QSVLTQPPSASGAPGQRVTISCSGSSNIGSNTVNWYQRLPGAAPQLLIYNNDQRPSGIPDRFSGSK  
SGTSGSLVISGLQSEDEADYYCAAWDDSLSGNVFGTGTKVTVL

40

## 【化 6】

&gt;配列番号 14 CD730047 VH

EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSIKYYADS  
VKGRFAISRDNANKNTLYLQMNSLRREDTAMYYCASGLTGVAGALGVWGRGTLTVSS

&gt;配列番号 15 CD730058 VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDRLRNEFVSWYQQRPGQSPVVVIYQDIYRPSGIPDRFSGSKSG  
NTATLTISGPQTVDEADYYCQAWDSNTVVFGGGTKLTVL

&gt;配列番号 16 CD730058 VH

QLQLQESGSLVKPSQTLSLICAVSGGSITSGGNAWNWIRQSPGAGLEWIGYIFSNGATYYNPSLE  
SRVTISADTSKNQFSLTTSVTAADTAVYYCARGDFWTGKGVFDPWGQGLTVTVSS

10

&gt;配列番号 17 10.3AA\_HC

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRITYYADSV  
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPL  
APSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLG  
TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT  
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
VSNKALPASIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
NNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

&gt;配列番号 18 10.3Nt\_HC

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGTTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG  
GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTAGAACATACTACGCAGACT  
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG  
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGCCCGTGTATTACTGTGCGAGATTAGGGTATGGGCGGG  
TGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGTGCCTCGACCAAGGGCCCATC  
CGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCC  
TGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAAGTCAAGGCGCTGACCAGCG  
GCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA  
CCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGC  
AACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACACATgcCCacCG  
TGCCCAGCACCTGAATTCGAGGGGGGAacCGTCAGTCTTCTCTTCCCCCAAAACCCaaGgACA  
CCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGAC  
CCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGC  
CGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCGTCTCTGCACCAG  
GACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCTCCAT  
CGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTcTACACCCTGCCCC  
CATCCCGGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTACAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTAT  
CCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGACCA  
CGCCTCCCGTGTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCTCTATAGCAAGCTCACCGTGGACAAGA  
GCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCAC  
TACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAA

20

30

&gt;配列番号 19 10.3AA\_LC

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVDPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQA  
NKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSY  
SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

40

## 【化 7】

&gt;配列番号 20 10.3Nt-LC

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC  
TTGTTCTGGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTAACTGGTATCAGCAGCTCCCAG  
GGACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTCCCTGACCGA  
TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGAT  
GAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGGTGGACGTTTCGGCGGAGG  
GACCAAGCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCGGCGCCCTCGGTCACTCTGTTCGCCCT  
CCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCACACTGGTGTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCG  
GGAGCCGTGACAGTGGCCTGGAAGGCAGATAGCAGCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCA  
CCACACCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCC  
TGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGCCAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTG  
GAGAAGACAGTGGCCCCCTACAGAATGTTCA

10

&gt;配列番号 21 10.3AA\_VH

EVQLLESGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGRITYYADSV  
KGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS

&gt;配列番号 22 10.3Nt\_VH

GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTC  
CTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTAGCAGCTATGCCTATAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGG  
GAAGGGGCTGGAGTGGGTCTCAGCTATTAGTGGTAGTGGTGGTAGAACATACTACGCAGACT  
CCGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCAGAGACAATCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATG  
AACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCGAGATTAGGGTATGGGCGGG  
TGGACGAGTGGGGCAGGGGAACCCTGGTCACCGTCTCGAGT

20

&gt;配列番号 23 10.3AA\_VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRSLGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTCLTVL

&gt;配列番号 24 10.3Nt-VL

CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGCAGAGGGTCACCATCTC  
TTGTTCTGGAAGCCTCTCCAACATCGGAAGGAATCCTGTAACTGGTATCAGCAGCTCCCAG  
GGACGGCCCCCAAACCTCCTCATCTATCTTGATAATCTACGGCTAAGTGGGGTCCCTGACCGA  
TTCTCTGGCTCCAAGTCTGGAACCTCAGCCTCCCTGGCCATCAGTGGGCTCCAGTCTGAGGAT  
GAGGCTGATTATTACTGTGCAACATGGGATGACAGCCACCCCGGGTGGACGTTTCGGCGGAGG  
GACCAAGCTGACCGTCCTA

30

&gt;配列番号 25 CD7300010 親 FW1-VL

LPVLTQPPSVSGTPGQRVTISC

&gt;配列番号 26 CD7300010 GL FW1-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRVTISC

&gt;配列番号 27 CD7300010 親 FW2-VL

WYKQVPGTAPKLLIY

&gt;配列番号 28 CD7300010 GL FW2-VL

WYQQLPGTAPKLLIY

40

&gt;配列番号 29 CD7300010 親/GL FW3-VL

GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEADYYC

## 【化 8】

>配列番号 30 CD7300010 親 /GL FW4-VL (また CD370002 及び 2C5)  
FGGGTKLTVL

>配列番号 31 CD7300010 親 /GL FW1-VH (また CD370002 及び 2C5)  
EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS

>配列番号 32 CD7300010 親 /GL FW2-VH (また CD370002 及び 2C5)  
WVRQAPGKGLEWVS

>配列番号 33 CD7300010 親 /GL FW3-VH (また CD370002 及び 2C5)  
RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR

10

>配列番号 34 CD7300010 親 /GL FW4-VH  
WGRGTLVTVSS

>配列番号 35 CD7300010 CDR1-VH (また CD370002 及び 2C5)  
SYAMS

>配列番号 36 10.3 CDR1-VH  
SYAYS

>配列番号 37 CDR2-VH (また CD370002)  
AISGSGGSTYYADSVKG

20

>配列番号 38 CDR2-VH  
LIWGSGGSTYYADSVKG

>配列番号 39 CDR2-VH  
AISGSGGRYYADSVKG

>配列番号 40 CDR2-VH  
AISGSGGRYYADSVKG

>配列番号 41 CDR3-VH  
LGYSTIDY

30

>配列番号 42 CDR3-VH  
LGYSTIDK

>配列番号 43 CDR3-VH  
LGYSTIDM

>配列番号 44 CDR3-VH  
LGYSTIDL

>配列番号 45 CDR3-VH  
LGYGRVDE

40

>配列番号 46 CDR1-VL  
SGSLSNIGRNPVN

>配列番号 47 CDR1-VL  
SGSLSNIGRNEVN

## 【化 9】

>配列番号 48 CDR1-VL  
SGSLSNIGRNDVN

>配列番号 49 CDR2-VL  
LNNQRPS

>配列番号 50 CDR2-VL  
LDNLR LG

>配列番号 51 CDR2-VL  
LDNLR LS

10

>配列番号 52 CDR2-VL  
LNNQR LG

>配列番号 53 CDR3-VL  
ATWDDSLNGWL

>配列番号 54 CDR3-VL  
ATWDDSLKGWL

>配列番号 55 CDR3-VL  
ATWDDSLIGWL

20

>配列番号 56 CDR3-VL  
ATWDDSHPGWT

>配列番号 57 CD730010-VL  
LPVLTQPPSVSGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYKQVPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>配列番号 58 CD730010GL9-VL  
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

30

>配列番号 59 P32E-VL  
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

>配列番号 60 C1-VL  
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

>配列番号 61 C2-VL  
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLR LGGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

40

>配列番号 62 D3-VL  
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLR LSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLIGWLFGGGTKLTVL

## 【化 1 0】

&gt;配列番号 63 G10-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRLGGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLKGWLFGGGTKLTVL

&gt;配列番号 64 HPT-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

&gt;配列番号 65 GRVE-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSLNGWLFGGGTKLTVL

10

&gt;配列番号 66 73combo1 (C1+GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNEVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

&gt;配列番号 67 73combo2 (C2+GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLGGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

&gt;配列番号 68 73combo3(D3+GRVE+HPT)-VL [10.3]

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLDNLRLSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

20

&gt;配列番号 69 73combo5 (G10+GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNDVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRLGGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

&gt;配列番号 70 73combo6(GRVE+HPT)-VL

QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSLSNIGRNPVNWYQQLPGTAPKLLIYLNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCATWDDSHPGWTFGGGTKLTVL

&gt;配列番号 71 CD730010-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS

30

&gt;配列番号 72 CD730010GL9-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS

&gt;配列番号 73 P32E-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLVTVSS

&gt;配列番号 74 C1-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDKWGRGTLVTVSS

40

&gt;配列番号 75 C2-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTYYADS  
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDMWGRGTLVTVSS

## 【化 1 1】

&gt;配列番号 76 D3-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGR TYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDLWGRGTLTVSS

&gt;配列番号 77 G10-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSAISGSWGR TYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDLWGRGTLTVSS

&gt;配列番号 78 HPT-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYSTIDYWGRGTLTVSS

10

&gt;配列番号 79 GRVE-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS

&gt;配列番号 80 73combo1 (C1+GRVE+HPT)-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS

&gt;配列番号 81 73combo2 (C2+GRVE+HPT)-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSLIWGSWGSTYYADS  
VKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS

20

&gt;配列番号 82 73combo3(D3+GRVE+HPT)-VH [10.3]

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGR TYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS

&gt;配列番号 83 73combo5 (G10+GRVE+HPT)-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAYS WVRQAPGKGLEWVSAISGSWGR TYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS

&gt;配列番号 84 73combo6(GRVE+HPT)-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGRVDEWGRGTLTVSS

30

&gt;配列番号 85 CD730002VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVSS

&gt;配列番号 86 CD730002VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTATITCSGDKVGD KYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSRIPERFSGSNS  
GNTATLTISGTQALDEADYFCQAWDTSFWVF GGGTKLTVL

&gt;配列番号 87 2C5VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMS WVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KRRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYWYMDVWGQGTMTVSS

40

&gt;配列番号 88 2C5VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGD KYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPERFSGSNS  
GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVF GGGTKLTVL

## 【化 1 2】

>配列番号 89 CD730002 親 /2C5 FW4-VH  
WGQGTMTVTVSS

>配列番号 90 CD730002 親 FW1-VL  
QSVLTQPPSVSVSPGQTATITC

>配列番号 91 CD7300002 2C5 FW1-VL  
QSVLTQPPSVSVSPGQTASITC

>配列番号 92 CD730002 親 /2C5 FW2-VL  
WYQKPGQSPVLVIY

10

>配列番号 93 CD730002 親 FW3-VL  
RIPERFSGSNSGNTATLTISGTQALDEADYFC

>配列番号 94 CD730002/2C5 FW3-VL  
GIPERFSGSNSGNTATLTISGTQAMDEADYYC

>配列番号 95 CD730002/2C5 CDR2-VH  
AISGSGGSTYYADSVKR

>配列番号 96 CD730002 親 /2C5 CDR3-VH  
DKGYWYMDV

20

>配列番号 97 CD730002 親 /2C5 CDR1-VL  
SGDKVGDKYAS

>配列番号 98 CD730002 親 CDR2-VL  
EDTKRPS

>配列番号 99 CD730002 2C5 CDR2-VL  
EDTKRLS

>配列番号 100 CD730002 親 /2C5 CDR3-VL  
QAWDTSEFWV

30

>配列番号 101 Phen0203-VH  
EVQLVQSGGGVVPGRSLRLSCAASGFRFSDFAMHWVRQAPGKGLEWVAGISYDGGNKYYAD  
SVKGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDHGYSGLYGHLDYWGRGTLTVSS

>配列番号 102 Phen0203-VL  
QSVVTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGS  
KSGTSASLAISGLQSEDEADYYCAAWDDSLNGRVFGTGTKLTVL

>配列番号 103 CD730004-VH  
EVQLLESAGGLVQPGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDNSTNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDRPNYYGASGSYYKQGGDHWGQGTMTV  
SS

40

>配列番号 104 CD730004-VL  
NFMLTQPHSVSESPGQTVTISCTRSSGSIASKYVQWYQKRPSSPTTVIYEDTQRPSGVPDRFSGSI  
DISSNSASLTISGLRTEDEADYYCQSYDSTNWWFGGGTVL

## 【化 1 3】

&gt;配列番号 105 CD730008-VH

EVQLLETGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGNYGNLDHWGKGLTVTVSS

&gt;配列番号 106 CD730008-VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGD KYASWYQQKPGQSPVLVIYQDRKRPSGIPERFSGSNS  
GNTATLTISGTQPMDEADYYCQAWDSSHWVFGGGTKLTVL

&gt;配列番号 107 CD730068-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYIMGWVRQAPGKGLEWVSSISSSGGATIYADSVK  
GRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDMAVYYCAKDHLGGHGMDVWGQGTITVTVSS

10

&gt;配列番号 108 CD730068-VL

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDISNYLAWFQQKPGKAPKSLIFAASSLES GVPSKFSGSGS  
GTDFTLTISSLQPEDSATYYCQYNSYPLTFGGG TKVEIK

&gt;配列番号 109 CD730069-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSEYQMGWVRQAPGKGLEWVS YIRSSGGQTIYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARRTYSSGWHIDYWGQGLTVTVSS

&gt;配列番号 110 CD730069-VL

DIQMTQSPDLSASVGDRTITCRASQSI SRYLNWYQQKPGKAPKLLIYGASSLQSGVPSRFSGSG  
SGTDFSLTISSLQLEDFATYYCQSYRTPLTFGGG TKVEIQ

20

&gt;配列番号 111 クローン 2 SGMY-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYYWYMDVWGQGTMTVTVSS

&gt;配列番号 112 クローン 2 SGMY-VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGD KYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRPSGIPERFSGSNS  
GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFVVFGGG TKLTVL

&gt;配列番号 113 CDRH1 Y32V-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSVAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYYWYMDVWGQGTMTVTVSS

&gt;配列番号 114 CDRH1 M34R-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYARSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYYWYMDVWGQGTMTVTVSS

30

&gt;配列番号 115 CDRH2 T57P-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSPYYADSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYYWYMDVWGQGTMTVTVSS

&gt;配列番号 116 CDRH2 A60G -VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYGDSV  
KGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYYWYMDVWGQGTMTVTVSS

&gt;配列番号 117 CDRH2 G65R-VH

EVQLLES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSV  
KRRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDKGYYWYMDVWGQGTMTVTVSS

40

## 【化 1 4】

>配列番号118 CDRL2 T52S-VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDSKRPSGIPERFSGSNS  
GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLL

>配列番号119 CDRL2 R54Y-VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKYPSGIPERFSGSNS  
GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLVL

>配列番号120 CDRL2 P55H-VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRHSGIPERFSGSNSG  
NTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLVL

10

>配列番号121 CDRL2 P55L-VL

QSVLTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKVGDKYASWYQQKPGQSPVLVIYEDTKRLSGIPERFSGSNR  
GNTATLTISGTQAMDEADYYCQAWDTSFWVFGGGTKLTVLVL

>配列番号122 2SGMY FW3-VL

GIPERFSGSNRGNTATLTISGTQAMDEADYYC

>配列番号123 CDRH1 Y32V CDR1-VH

SVAMS

>配列番号124 CDRH1 M34R CDR1-VH

SYARS

20

>配列番号125 CDRH2 T57P CDR2-VH

AISGSGGSPYYADSVKG

>配列番号126 CDRH2 A60G CDR2-VH

AISGSGGSTYYGDSVKG

>配列番号127 CDRL2 T52S CDR2-VL

EDSKRPS

>配列番号128 CDRL2 R54H CDR2-VL

EDTKYPS

30

>配列番号129 CDRL2 P55H CDR2-VL

EDTKRLS

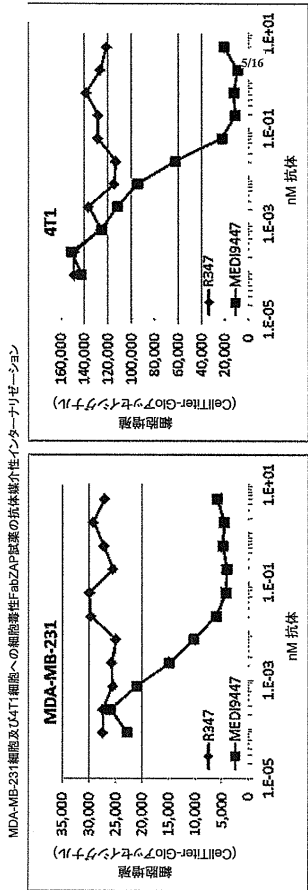
【 図 1 B 】

[illegible]

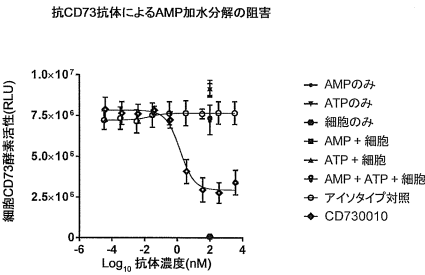
【 図 1 D 】

|                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                               |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|
| Kabat位置:<br>IGLV14401/IGLJ3701<br>MED8447 VL | <div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> </div> |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|                                              | 1                                                                                                                                                                                                                                                                                             | 2  | 3  | 4  | 5  | 6  | 7  | 8  | 9  | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20  |
| Kabat位置:<br>IGLV14401/IGLJ3701<br>MED8447 VL | <div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> </div>              |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|                                              | 21                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 30 | 31 | 32 | 33 | 34 | 35 | 36 | 37 | 38 | 39 | 40  |
| Kabat位置:<br>IGLV14401/IGLJ3701<br>MED8447 VL | <div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> </div>              |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|                                              | 41                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 42 | 43 | 44 | 45 | 46 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 | 54 | 55 | 56 | 57 | 58 | 59 | 60  |
| Kabat位置:<br>IGLV14401/IGLJ3701<br>MED8447 VL | <div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> </div>              |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|                                              | 61                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 62 | 63 | 64 | 65 | 66 | 67 | 68 | 69 | 70 | 71 | 72 | 73 | 74 | 75 | 76 | 77 | 78 | 79 | 80  |
| Kabat位置:<br>IGLV14401/IGLJ3701<br>MED8447 VL | <div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> <div>+</div> </div>              |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |    |     |
|                                              | 81                                                                                                                                                                                                                                                                                            | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 87 | 88 | 89 | 90 | 91 | 92 | 93 | 94 | 95 | 96 | 97 | 98 | 99 | 100 |

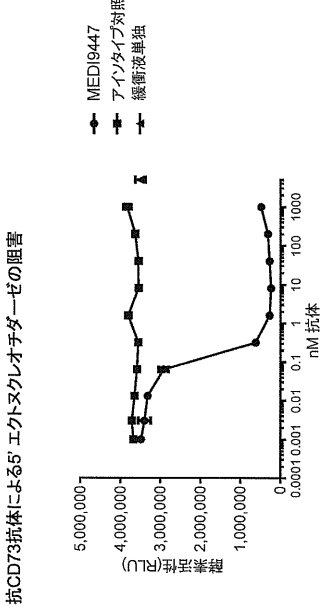
【図 2】



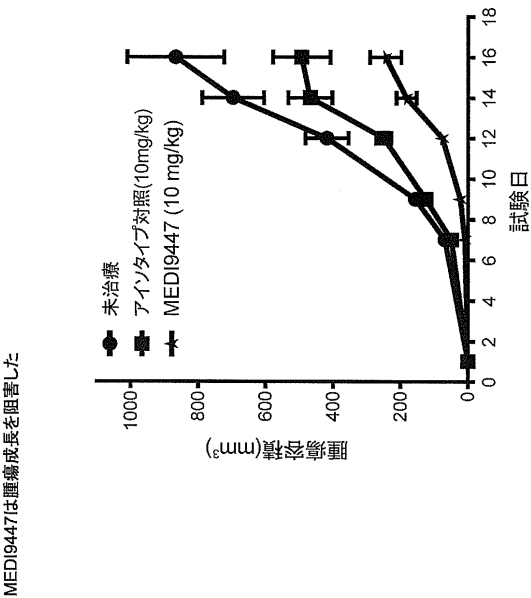
【図 3 B】



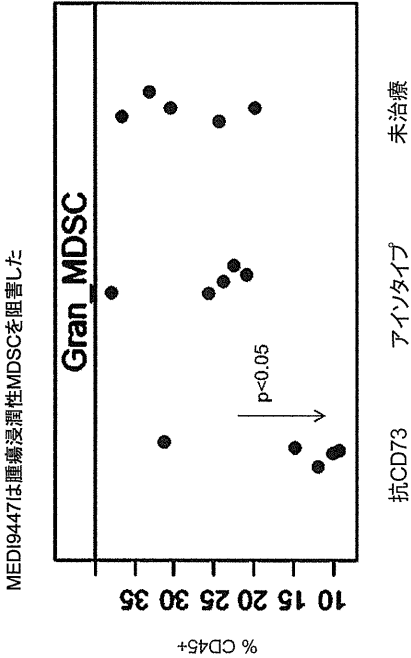
【図 3 A】



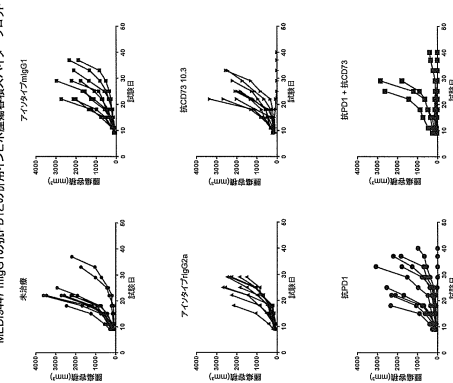
【図 4】



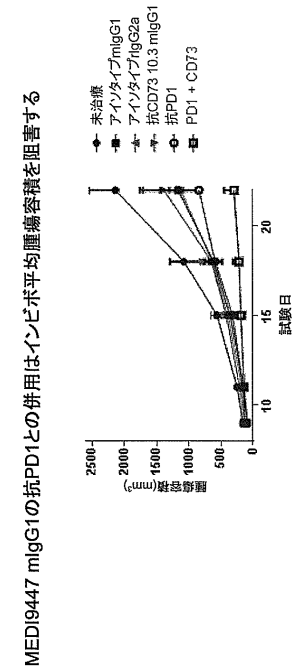
【 図 5 】



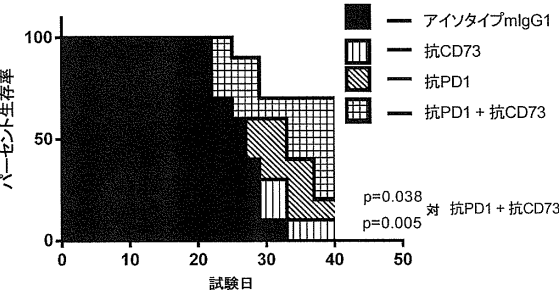
【 図 6 】



【 図 7 】

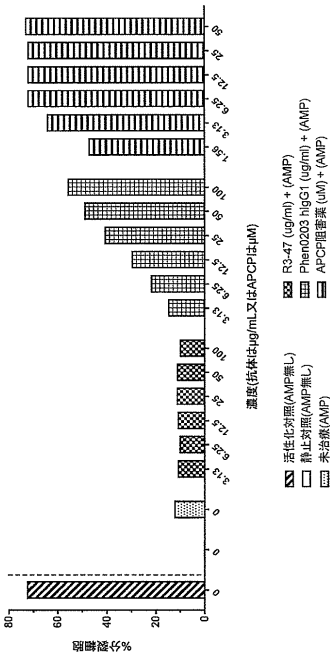


【 図 8 】



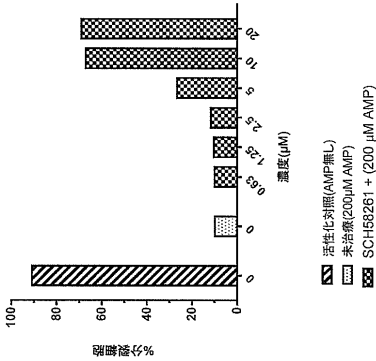
【 図 9 】

Phen0203 hlgG1抗体がCD4<sup>+</sup> Cd25<sup>+</sup> T細胞増殖のAMP媒介抑制に及ぼす効果



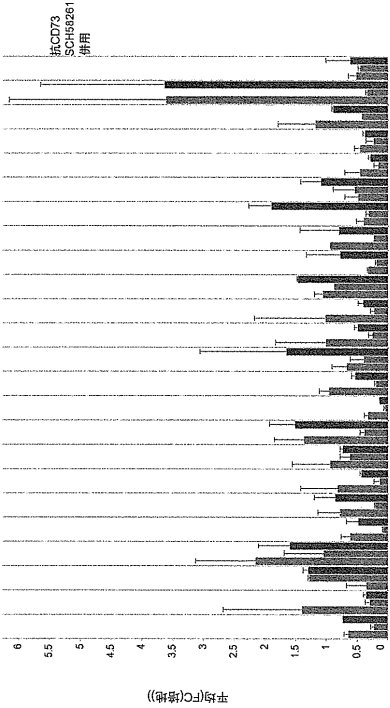
【 図 10 】

SCH58261がCD4<sup>+</sup> Cd25<sup>+</sup> T細胞増殖のAMP媒介抑制に及ぼす効果



【 図 11 】

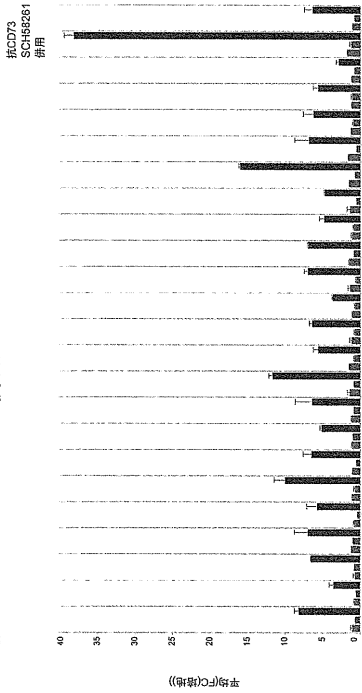
抗CD73とA2ARiとの併用 - IFN $\gamma$



- 72時間MLRで抗CD73とA2ARi SCH58261と併用した。
- バーは、「倍増のみ」が原則に対して正規化した値の、上滑中でELISAによって検出されたIFN $\gamma$ レベルを表す。
- 3本のバーの各値が異なるバーズを表す。

【 図 12 】

抗CD73とA2ARiとの併用 - TNF $\alpha$



- 72時間MLRで抗CD73とA2ARi SCH58261と併用した。
- バーは、「倍増のみ」が原則に対して正規化した値の、上滑中でELISAによって検出されたTNF $\alpha$ レベルを表す。
- 3本のバーの各値が異なるバーズを表す。

【配列表】

0006847037000001.app

## フロントページの続き

|               |           |               |
|---------------|-----------|---------------|
| (51)Int.Cl.   |           | F I           |
| A 6 1 P 35/04 | (2006.01) | A 6 1 P 35/04 |
| C 0 7 K 16/28 | (2006.01) | C 0 7 K 16/28 |
| C 1 2 N 15/13 | (2006.01) | C 1 2 N 15/13 |

(72)発明者 プーン, エドモンド  
イギリス国 ケンブリッジ ケンブリッジシャー グランタ パーク, ミルステイン ビルディン  
グ メディミュン リミテッド

(72)発明者 サルト, エリン  
アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミュン ウェ  
イ, メディミュン, エルエルシー

(72)発明者 ヘイ, カール  
アメリカ合衆国 2 0 8 7 8 メリーランド州, ゲイサースバーグ, ワン メディミュン ウェ  
イ, メディミュン, エルエルシー

審査官 菊池 美香

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 8 / 1 4 7 4 8 2 ( W O , A 1 )  
特表 2 0 1 8 - 5 0 1 1 9 7 ( J P , A )  
AM J TRANSL RES, 2 0 1 4 年 1 月 1 5 日, VOL:6, NR:2, PAGE(S):129 - 139  
Cancer Res, 2 0 1 0 年, Vol.70, No.6, pp.2245-2255  
Cancer Immunology Res, 2 0 1 4 年 7 月, Vol.2, No.7, pp.598-605  
PROCEEDINGS NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES, 2 0 1 0 年 1 月 4 日, VOL:107, NR:4, PAGE(S):1547 - 1552

(58)調査した分野(Int.Cl., D B 名)

A 6 1 K 4 5 / 0 0  
A 6 1 K 3 1 / 5 1 9  
A 6 1 K 3 9 / 3 9 5  
A 6 1 P 3 5 / 0 0  
A 6 1 P 3 5 / 0 4  
A 6 1 P 3 7 / 0 4  
C 0 7 K 1 6 / 2 8  
C 1 2 N 1 5 / 1 3  
J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 ( J D r e a m I I I )  
C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T N )