

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号
特表2024-528217
(P2024-528217A)

(43)公表日 令和6年7月26日(2024.7.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A	4 C 0 8 5
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		4 H 0 4 5
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N	
		A 6 1 K	39/395	E	
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求
				(全138頁)	最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-506704(P2024-506704)	(71)出願人	514099673		
(86)(22)出願日	令和4年8月2日(2022.8.2)		エフ・ホフマン・ラ・ロシュ・アクチュ		
(85)翻訳文提出日	令和6年3月26日(2024.3.26)		ンゲゼルシャフト		
(86)国際出願番号	PCT/EP2022/071661		スイス国 シーエイチー 4 0 7 0 バーゼ		
(87)国際公開番号	WO2023/012147		ル グレンツァッハーシュトラッセ 1 2 4		
(87)国際公開日	令和5年2月9日(2023.2.9)	(74)代理人	110002077		
(31)優先権主張番号	21189372.2		園田・小林弁理士法人		
(32)優先日	令和3年8月3日(2021.8.3)	(72)発明者	ブリンクマン, ウルリヒ		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		ドイツ国 8 2 3 7 7 ペンツベルク,		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA, RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC, 最終頁に続く		ノンネンヴァルト 2, シー／オー ロ		
			シュ ダイアグノスティックス ゲーエム		
			ベーハー		
		(72)発明者	コダツリ ディーク, ラウラ		
			スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴ		
			ァーギシュトラッセ 1 0, シー／オー		
			最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 二重特異性抗体および使用方法

(57)【要約】

本発明は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体に関する。本発明は、これらの分子を生成する方法、その使用方法、その薬学的組成物、ならびにがん、急性および慢性感染症、ならびに移植片対宿主病の治療のための医薬としてのそれらの使用にさらに関する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体。

【請求項 2】

P D 1 に特異的に結合する第 3 の抗原結合ドメインを含む、請求項 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 3】

第 1 の抗原結合ドメイン、第 2 の抗原結合ドメイン、および／または、存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインが F a b 断片である、請求項 1 または 2 に記載の二重特異性抗体。

10

【請求項 4】

第 1 および第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含み、F a b 断片のうちの 1 つ以上が、F c ドメインに融合されており、F c ドメインが、I g G F c ドメイン、特に I g G 1 F c ドメインまたは I g G 4 F c ドメインである、請求項 3 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 5】

第 1 の抗原結合ドメイン、第 2 の抗原結合ドメイン、および存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインがそれぞれ F a b 断片であり、抗体が、第 1 および第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含み、(i) 第 2 の抗原結合ドメインが、その F a b 重鎖の C 末端で、第 1 の抗原結合ドメインの F a b 重鎖の N 末端に融合されており、第 1 の抗原結合ドメインが、その F a b 重鎖の C 末端で、F c ドメインの第 1 のサブユニットの N 末端に融合されているか、または (i i) 第 1 の抗原結合ドメインが、その F a b 重鎖の C 末端で、第 2 の抗原結合ドメインの F a b 重鎖の N 末端に融合されており、第 2 の抗原結合ドメインが、F a b 重鎖の C 末端で、F c ドメインの第 1 のサブユニットの N 末端に融合されており、第 3 の抗原結合ドメインが、存在する場合、その F a b 重鎖の C 末端で、F c ドメインの第 2 のサブユニットの N 末端に融合されている、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 6】

第 1、第 2 および第 3 の抗原結合ドメインがそれぞれ F a b 断片であり、抗体が、第 1 および第 2 のサブユニットから構成される F c ドメインを含み、

30

第 1 の抗原結合ドメインが、その F a b 重鎖の C 末端で、F c ドメインの第 1 のサブユニットの N 末端に融合されており、

第 2 の抗原結合ドメインが、その F a b 重鎖の C 末端で、F c ドメインの第 2 のサブユニットの N 末端に融合されており、

第 3 の抗原結合ドメインが、その F a b 重鎖の N 末端で、F c ドメインの第 1 または第 2 のサブユニットの C 末端に融合されている、請求項 2 から 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体であって、二重特異性抗体は、

40

a) T f R および P D 1 を発現する細胞の表面上の T f R および P D 1 に結合し、二重特異性抗体が前記細胞内に内部移行され、かつ／または

b) 二重特異性抗体が前記細胞の表面に提示された T f R および P D 1 に結合すると、前記細胞の表面から P D 1 が枯渇する、二重特異性抗体。

【請求項 8】

少なくとも 2 つの重鎖と少なくとも 2 つの軽鎖とを含み、

a) 二重特異性抗体の重鎖が、γ 型 (I g G)、特に γ 1 型のものであり、かつ／または

b) 二重特異性抗体の軽鎖が、カッパ (κ) および／もしくはラムダ (λ) サブタイプから選択される、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

50

【請求項 9】

F c ドメインが、

i . F c 受容体への、特に F c γ 受容体への結合を減少させる 1 つ以上のアミノ酸置換、および／または

i i . F c ドメインの第 1 のサブユニットと第 2 のサブユニットとの会合を促進する修飾を含む、請求項 4 から 8 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 10】

V H ドメインが軽鎖の一部であり、V L ドメインが重鎖の一部であるように、F a b 断片のうち 1 つでは、可変ドメイン V L および V H が互いに置き換えられている、請求項 3 から 9 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

【請求項 11】

T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインが、

i . a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 、

b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 、および

c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3

を含む重鎖可変ドメイン (V H) 、ならびに

d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 、

e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 、および

f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3

を含む軽鎖可変ドメイン (V L) 、

または

i i . a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 、

b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 、および

c) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3

を含む重鎖可変ドメイン (V H) 、ならびに

d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 、

e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 、および

f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3

を含む軽鎖可変ドメイン (V L) を含む、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

20

30

【請求項 12】

P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインが、

i . a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 、

b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 、および

c) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3

を含む重鎖可変ドメイン (V H) 、ならびに

d) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 、

e) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 、および

f) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3

を含む軽鎖可変ドメイン (V L)

または

i i . a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 、

b) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 、および

c) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3

を含む重鎖可変ドメイン (V H) 、ならびに

d) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 、

e) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 、および

f) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3

を含む軽鎖可変ドメイン (V L) を含む、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の二

40

50

重特異性抗体。

【請求項 13】

i. T f R に特異的に結合する前記第 1 の抗原結合ドメインが、

a) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V H ドメインおよび配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン、または

b) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V H ドメインおよび配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含み、

かつ

ii. P D 1 に特異的に結合する前記第 2 の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、前記第 3 の抗原結合ドメインが、

a) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H ドメインおよび配列番号 24 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン、または

b) 配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H ドメインおよび配列番号 32 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体

。

【請求項 14】

請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項 15】

がんの予防または治療における使用のための、請求項 1 から 13 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体または請求項 14 に記載の薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体に関する。本発明は、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、および二重特異性抗体またはイムノコンジュゲートを使用する方法にさらに関する。

【背景技術】

【0002】

プログラム死 1 タンパク質 (P D 1 または C D 2 7 9) は、C D 2 8、C T L A-4、I C O S および B T L A も含む細胞表面受容体の C D 2 8 ファミリーの阻害性メンバーであり、P D-L1 および P D-L2 に結合し (Greenwald R. J. et al. Annu Rev Immunol. (2005) 23:515-48; Freeman G. J. et al. J Exp Med. (2000) 192:1027-34; Latchman Y. et al. Nat Immunol. (2001) 2:261-8)、いわゆる P D 1 / P D-L1 軸を形成する。P D 1 は、活性化された B 細胞、T 細胞および骨髄細胞上に発現される (Agata et al, supra; Okazaki et al (2002) Curr. Opin. Immunol. 14:391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170:711-8)。P D 1 遺伝子は、I g 遺伝子スーパーファミリーの一部である、55 k D a の I 型膜貫通タンパク質である (Agata et al. (1996) Int Immunol 8:765-72)。P D 1 は、膜近位免疫受容体チロシン阻害モチーフ (I T I M) および膜遠位チロシンベーススイッチモチーフ (I T S M) を含有する (Thomas, M. L. (1995) J Exp Med 181:1:1953-6; Vivier, E. and Daeron, M. (1997) Immunol Today 18:286-91)。P D 1 は、C T L A-4 と構造的に類似しているが、B 7-1 および B 7-2 の結合に重要な M Y P P P Y モチーフ (配列番号 71) を欠く。P D 1 に対する 2 つのリガンド、P D-L1 (C D 2 7 4) および P D-L2 (C D 2 7 3) が同定されており、これらは、P D 1 に結合すると T 細胞活性化をダウンレギュレートすることが

10

20

30

40

50

示されている (Freeman et al. (2000) J Exp Med 192 : 1027-34; Latchman et al (2001) Nat Immunol 2 : 261-8; Carter et al. (2002) Eur J Immunol 32 : 634-43)。PD-L1およびPD-L2はいずれも、PD1に結合するが、他のCD28ファミリーメンバーには結合しないB7ホモログである。様々なヒトがんでは、PD1、PD-L1に対する1つのリガンドが豊富である (Dong et al (2002) Nat. Med 8 : 787-9)。モノクローナル抗体および小分子薬物によるPD1/PD-L1免疫学的チェックポイントの標的化は、免疫腫瘍学では主要な焦点となっている。

【0003】

PD1は、CD28ファミリーの阻害性メンバーとしてのその役割に加えて、自己免疫性脳脊髄炎、全身性紅斑性狼瘡、移植片対宿主病 (GVHD)、I型糖尿病および関節リウマチに何らかの役割を果たすことが見出されている (Salama et al. (2003) J Exp Med 198 : 71-78; Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) Hum Mol Genet 13 : R143; Nielsen et al. (2004) Lupus 13 : 510)。マウスB細胞腫瘍株では、PD1のITSMは、B細胞受容体によって媒介されるCa²⁺の流動、および下流エフェクター分子のチロシンリン酸化をブロックするのに必須であることが示された (Okazaki et al. (2001) PNAS 98 : 13866-71)。

【0004】

以下を含む様々な特許出願は、抗PD1抗体の産生、ならびに／またはPD-L1結合および／もしくはPD1シグナル伝達に干渉する薬剤 (抗PD1抗体を含む) を用いて免疫応答を増強する方法を開示している：米国特許第2003/0039653号、米国特許第2004/0213795号、米国特許第2006/0110383号、米国特許第2007/0065427号、米国特許第2007/0122378号、米国特許第2012/237522号、国際公開第2004/072286号、国際公開第2006/121168号、国際公開第2006/133396号、国際公開第2007/005874号、国際公開第2008/083174号、国際公開第2008/156712号、国際公開第2009/024531号、国際公開第2009/014708号、国際公開第2009/114335号、国際公開第2010/027828号、国際公開第2010/027423号、国際公開第2010/036959号、国際公開第2010/029435号、国際公開第2010/029434号、国際公開第2010/063011号、国際公開第2010/089411号、国際公開第2011/066342号、国際公開第2011/110604号、国際公開第2011/110621号および国際公開第2012/145493号。

【0005】

トランスフェリン受容体 (TfR) は、鉄-トランスフェリン複合体に結合し、受容体媒介性エンドサイトーシスによってそれを内部移行することによって、細胞内への鉄輸送に関与する膜受容体である。TfRは、その迅速な内部移行および再利用速度のために、細胞内送達の治療手法にとって魅力的な標的である。しかし、in vivoでの送達は、身体全体にわたる膨大なTfR発現のために、ほとんどが非効率的かつ非特異的である。

【0006】

当技術分野で記載されているPD1抗体の効果は、PD1に結合することによってPD-L1とPD1との間の相互作用をブロックすることに依存している。PD1に対する抗PD1抗体の最も親和性の高い抗体結合であっても非共有結合性であり、したがって一過性であるため、公知の抗PD1抗体よりも改善された有効性および長い持続性効果を有する、PD1を標的とする新たな化合物を開発する必要がある。

【発明の概要】

【0007】

一態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1/PD-L1軸の分子に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインを含む新規な二重特異性抗体を提供する。一態様では、PD1/PD-L1軸分子は、PD1、PD-L1およびPD-L2からなる群から選択される。特定の一態様では、PD1/PD-L1軸分子はPD1またはPD-L1である。特定の一態様では、PD1/PD-L1軸分子はPD1である。本発明の抗TfR抗PD1二重特異性抗体は、特に有利な特性、例えば、機能的に最適化された結合親和性、増加した生物活性、特定のT細胞の特異的標的化、および高い標的化効率を有する。

【0008】

別の態様では、二重特異性抗体は、その表面上にTfRおよびPD1を発現および提示する細胞の表面上のTfR受容体およびPD1受容体に結合する。好ましい態様では、TfRおよびPD1への抗体の結合は同時である。細胞表面上のTfRおよびPD1に二重特異性抗体が結合すると、好ましくは、TfRおよびPD1とともに二重特異性抗体によって形成される複合体が上記細胞内に内部移行することによって、TfRおよびPD1を発現する上記細胞の表面からPD1が枯渇する。その結果、好ましくは、TfRおよび結合した二重特異性抗体とともに、細胞表面からPD1が枯渇する。本発明は、本発明の抗PD1抗TfR二重特異性抗体が、細胞表面からPD1を除去することによってPD1とPD-L1との間の相互作用を阻害するという有利な効果を有するという発見に少なくとも部分的に基づいており、これは、PD1の内部移行と、細胞表面からのPD1の枯渇とをもたらさない抗PD1ブロック抗体の単なる結合によって達成可能な阻害よりも効果的であり、および/または持続性がある。

【0009】

一態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。したがって、この二重特異性抗体は、TfRに特異的な1つの抗原結合ドメインと、PD1に特異的な2つの抗原結合ドメインとを有する。第1の標的に対する2つの結合ドメインと、第2の標的に対する1つの結合ドメインとを有するそのような分子は、2+1フォーマットまたは2+1フォーマット抗体とも呼ばれる。一態様では、これらの分子は、異なる立体配座で互いに共有結合的に結合して異なる2+1フォーマット抗体をもたらし得るIgGクラスFab断片、および任意にIgGクラスFc領域に基づく。抗原結合ドメインの異なる立体配座を有する異なる2+1フォーマットの例を図1～図4に示す。さらなる立体配座は当技術分野に記載されている(Brinkmann and Kontermann (2017) MAbs 9(2):182-212; Kontermann and Brinkmann (2015) Drug Discov Today 20(7):838-47; Bacac M et al. (2018) Clin Cancer Res. 24(19):4785-4797; Rius Ruiz et al. (2018) Sci Transl Med 10(461):eaat1445; Seckinger et al. (2017) Cancer Cell. 31(3):396-410; Bacac et al. (2016) Oncoimmunology. 5(8):e1203498; Bacac et al (2016) Clin Cancer Res. 22(13):3286-97; Weber et al. (2018) Cell Rep. 22(1):149-162; Niewoehner et al. (2014) Neuron. 81(1):49-60)。

【0010】

驚くべきことに、そのような抗TfR抗PD1 2+1フォーマット抗体、すなわち、それぞれ抗PD1および抗TfRを標的とする結合ドメインの化学量論が2:1である二重特異性抗体、または換言すれば、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2および第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体

10

20

30

40

50

は、単一特異性二価PD1抗体よりも改善された生物活性を示し、PD1とPD-L1との間の相互作用の良好な阻害をもたらすことが見出された。

【0011】

TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体の一態様では、第1の抗原結合ドメイン、第2の抗原結合ドメイン、および／または存在する場合、第3の抗原結合ドメインはFab断片である。さらなる態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1および第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含む二重特異性抗体に関する。特定の態様では、二重特異性抗体に含まれるFab断片のうちの1つ以上が、Fcドメインに融合されている。別の態様では、Fab断片は、ペプチド性リンカーを介してFcドメインに融合されている。追加の態様では、Fcドメインは、IgG Fcドメイン、特にIgG1 FcドメインまたはIgG4 Fcドメインである。特定の態様では、二重特異性抗体の重鎖は、γ型（IgG）、特にγ1型のものである。別の特定の態様では、二重特異性抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）および／またはラムダ（λ）サブタイプのものである。

10

【0012】

一態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、Fcドメインと、TfRに特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第1のFab断片と、PD1に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第2の、および任意に第3のFab断片とを含む二重特異性抗体を提供する。特定の態様では、二重特異性抗体は、Fcドメインと、TfRに特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第1のFab断片と、PD1に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第2の、および任意に第3のFab断片とを含み、Fab断片は、Fcドメインに融合されている。一態様では、二重特異性抗体は、TfRに特異的に結合する正確に1つの（一価）抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する正確に2つの（一価）抗原結合ドメインとを含む。特に、Fcドメインは、IgG Fcドメイン、さらに具体的にはIgG1 FcドメインまたはIgG4 Fcドメインである。特定の態様では、二重特異性抗体の重鎖は、γ型（IgG）、特にγ1（IgG1）サブタイプのものである。別の特定の態様では、二重特異性抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）および／またはラムダ（λ）サブタイプのものである。一態様では、二重特異性抗体はJ鎖を含まない。別の態様では、二重特異性抗体は、ハイブリッドIgA/IgG抗体配列および／またはハイブリッドIgM/IgG抗体配列を含まない。さらなる態様では、二重特異性抗体は、本質的にモノマー形態であり、すなわち、本発明の複数の二重特異性抗体を含むダイマーまたはマルチマー（例えば、ペンタマー）構造を形成しない。特定の態様では、抗体の少なくとも90%、さらに具体的には少なくとも95%、好ましくは少なくとも98%、さらに好ましくは少なくとも99%がモノマー形態である。

20

30

【0013】

一態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、Fcドメインが、Fc受容体、特にFcγ受容体への結合を減少させる1つ以上のアミノ酸置換を含む、二重特異性抗体に関する。特に、Fcドメインは、アミノ酸変異L234A、L235AおよびP329G（カバットEUインデックスによる番号付け）を有するヒトIgG1サブクラスのものである。

40

【0014】

別の態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、Fcドメインが、Fcドメインの第1のサブユニットと第2のサブユニッ

50

トとの会合を促進する修飾を含む、二重特異性抗体に関する。一態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、ノブ・イントゥー・ホール法 (k n o b s i n t o h o l e s m e t h o d) に従って、F cドメインの第1のサブユニットがノブを含み、F cドメインの第2のサブユニットがホールを含む、二重特異性抗体に関する。特定の態様では、二重特異性抗体は、F cドメインの第1のサブユニットがアミノ酸置換S 3 5 4 CおよびT 3 6 6 W (カバットE Uインデックスによる番号付け) を含み、F cドメインの第2のサブユニットがアミノ酸置換Y 3 4 9 C、T 3 6 6 SおよびY 4 0 7 V (カバットE Uインデックスによる番号付け) を含むものである。

10

【0015】

さらなる態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合ドメイン、第2の抗原結合ドメイン、および存在する場合、第3の抗原結合ドメインがそれぞれF a b断片であり、F a b断片のうちの1つまたは2つでは、

a) 可変ドメインV LおよびV Hが、V Hドメインが軽鎖の一部であり、V Lドメインが重鎖の一部であるように互いに置き換えられているか、または

b) 定常ドメインC LおよびC H 1が、C H 1ドメインが軽鎖の一部であり、C Lドメインが重鎖の一部であるように互いに置き換えられている、二重特異性抗体を提供する。

20

【0016】

好ましい態様では、可変ドメインV LおよびV Hは、V Hドメインが軽鎖の一部であり、V Lドメインが重鎖の一部であるように互いに置き換えられている。特定の態様では、二重特異性抗体は、P D 1に特異的に結合する抗原結合ドメインを含むF a b断片内で、可変ドメインV LおよびV H、または定常ドメインC LおよびC H 1のいずれかが互いに置き換えられているものである。特に好ましい態様では、可変ドメインV LおよびV Hは、P D 1に特異的に結合する抗原結合ドメイン内で互いに置き換えられている。一態様では、二重特異性抗体は、T f Rに特異的に結合する正確に1つの (一価) 抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する正確に2つの (一価) 抗原結合ドメインとを含む。

【0017】

追加の態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合ドメイン、第2の抗原結合ドメイン、および存在する場合、第3の抗原結合ドメインがそれぞれF a b断片であり、定常ドメインC L内のF a b断片のうちの1つまたは2つでは、1 2 4位のアミノ酸が、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) によって独立して置換されており (カバットE Uインデックスによる番号付け)、定常ドメインC H 1では、1 4 7位および2 1 3位のアミノ酸が、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) によって独立して置換されている (カバットE Uインデックスによる番号付け)、二重特異性抗体に関する。特定の態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、定常ドメインC L内の、T f Rに特異的に結合する抗原結合ドメインを含むF a b断片では、1 2 4位のアミノ酸が、リジン (K)、アルギニン (R) またはヒスチジン (H) によって独立して置換されており (カバットE Uインデックスによる番号付け)、定常ドメインC H 1では、1 4 7位および2 1 3位のアミノ酸が、グルタミン酸 (E) またはアスパラギン酸 (D) によって独立して置換されている (カバットE Uインデックスによる番号付け)、二重特異性抗体に関する。

30

40

【0018】

特定の態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異

50

性抗体であって、PD1に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第2のFab断片および、存在する場合、第3のFab断片では、定常ドメインCL内の124位のアミノ酸が、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）によって独立して置換されており（カバットEUIンデックスによる番号付け）、定常ドメインCH1内の147位および213位のアミノ酸が、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）によって独立して置換されている（カバットEUIンデックスによる番号付け）、二重特異性抗体を提供する。

【0019】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

10

a) 第1の抗原に特異的に結合する、抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する、抗体の第2の軽鎖および第2の重鎖とを含む二価抗体であって、第2の軽鎖および第2の重鎖の可変ドメインVLおよびVHが互いに置き換えられており、第2の軽鎖および第2の重鎖の定常ドメインCLおよびCH1が互いに置き換えられている、二価抗体である。

【0020】

a) の抗体の2つのサブユニットは、b) で報告されている修飾を含有せず、a) の重鎖および軽鎖は単離された鎖である。b) の抗体の2つのサブユニットでは、軽鎖内で、可変軽鎖ドメインVLは、上記抗体の可変重鎖ドメインVHによって置き換えられており、定常軽鎖ドメインCLは、上記抗体の定常重鎖ドメインCH1によって置き換えられており、重鎖内で、可変重鎖ドメインVHは、上記抗体の可変軽鎖ドメインVLによって置き換えられており、定常重鎖ドメインCH1は、上記抗体の定常軽鎖ドメインCLによって置き換えられている。

20

【0021】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

a) 第1の抗原に特異的に結合する、抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖と、

b) 第2の抗原に特異的に結合する、抗体の第2の軽鎖および第2の重鎖とを含む二価抗体であって、第2の軽鎖および第2の重鎖の可変ドメインVLおよびVHが互いに置き換えられている、二価抗体である。

30

【0022】

a) の抗体の2つのサブユニットは、b) で報告されている修飾を含有せず、a) の重鎖および軽鎖は単離された鎖である。b) の抗体の2つのサブユニットでは、軽鎖内で、可変軽鎖ドメインVLは、上記抗体の可変重鎖ドメインVHによって置き換えられており、重鎖内で、可変重鎖ドメインVHは、上記抗体の可変軽鎖ドメインVLによって置き換えられている。

【0023】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

a) 第1の抗原に特異的に結合する、抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖と、

40

b) 第2の抗原に特異的に結合する、抗体の第2の軽鎖および第2の重鎖とを含む二価抗体であって、第2の軽鎖および第2の重鎖の定常ドメインCLおよびCH1が互いに置き換えられている、二価抗体である。

【0024】

a) の抗体の2つのサブユニットは、b) で報告されている修飾を含有せず、a) の重鎖および軽鎖は単離された鎖である。b) の抗体の2つのサブユニットでは、定常軽鎖ドメインCLは、上記抗体の定常重鎖ドメインCH1によって軽鎖内で置き換えられており、定常重鎖ドメインCH1は、上記抗体の定常軽鎖ドメインCLによって重鎖内で置き換えられている。

【0025】

50

さらなる一態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメイン、ならびに存在する場合、第3の抗原結合ドメインがそれぞれF a b断片であり、(i) 第2の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、第1の抗原結合ドメインのF a b重鎖のN末端に融合されているか、または(i i) 第1の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、第2の抗原結合ドメインのF a b重鎖のN末端に融合されている、二重特異性抗体を提供する。換言すれば、二重特異性抗体は、互いに融合したF a b断片から構成される。第3の抗原結合ドメインは、存在する場合、二重特異性抗体と、そのF a b重鎖のC末端で他の2つのF a b重鎖のうちの1つの遊離N末端に、またはそのF a b重鎖のN末端で他の2つのF a b重鎖のうちの1つの遊離C末端に融合されている(例示的な立体配座については図4も参照)。一態様では、二重特異性抗体は、T f Rに特異的に結合する正確に1つの(一価)抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する正確に2つの(一価)抗原結合ドメインとを含む。

10

【0026】

一態様では、二重特異性抗体は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2および第3の抗原結合ドメインとを含み、上記二重特異性抗体は、

a) 2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなり、P D 1に特異的に結合する2つの抗原結合ドメインを含む完全長抗体と、

20

b) i) 抗体重鎖可変ドメイン(V H) または

i i) 抗体重鎖可変ドメイン(V H) および抗体定常ドメイン1(C H 1)

からなる第1のポリペプチドであって、

上記第1のポリペプチドが、そのV HドメインのN末端と、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の2つの重鎖の一方のC末端に融合されている、第1のポリペプチドと、

c) i) 抗体軽鎖可変ドメイン(V L) または

i i) 抗体軽鎖可変ドメイン(V L) および抗体軽鎖定常ドメイン(C L)

からなる第2のポリペプチドであって、

上記第2のポリペプチドが、V LドメインまたはC LドメインのN末端と、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の2つの重鎖の他方のC末端に任意に融合されている、第2のポリペプチドとを含む三価抗体であり、

30

第1のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(V H) と、第2のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(V L) とは、T f Rに特異的に結合する抗原結合ドメインを一緒に形成する。

【0027】

別の態様では、二重特異性抗体は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2および第3の抗原結合ドメインとを含み、上記二重特異性抗体は、

a) 2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなり、P D 1に特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン、およびT f Rに特異的に結合する第2の抗原結合ドメインを含む完全長抗体と、

40

b) i) 抗体重鎖可変ドメイン(V H) または

i i) 抗体重鎖可変ドメイン(V H) および抗体定常ドメイン1(C H 1)

からなる第1のポリペプチドであって、

上記第1のポリペプチドが、そのV HドメインのC末端、または存在する場合、その定常ドメイン1(C H 1)のC末端と、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の2つの重鎖の一方のN末端に融合されている、第1のポリペプチドと、

c) i) 抗体軽鎖可変ドメイン(V L) または

i i) 抗体軽鎖可変ドメイン(V L) および抗体軽鎖定常ドメイン(C L)

50

からなる第2のポリペプチドであって、

上記第2のポリペプチドが、V_LドメインのC末端、または存在する場合、C_LドメインのC末端と、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の2つの重鎖の他方のN末端に任意に融合されている、第2のポリペプチドとを含む三価抗体であり、

第1のポリペプチドの抗体重鎖可変ドメイン(V_H)と、第2のポリペプチドの抗体軽鎖可変ドメイン(V_L)とは、PD1に特異的に結合する抗原結合ドメインと一緒に形成する。特定の態様では、第1および任意に第2のポリペプチドは、TfRに特異的に結合する抗原結合ドメインのV_Hドメインを含む重鎖のN末端に融合されている。

【0028】

一態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合ドメイン、第2の抗原結合ドメイン、および存在する場合、第3の抗原結合ドメインがそれぞれFab断片であり、抗体が、第1および第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、

(i) 第2の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のC末端で、第1の抗原結合ドメインのFab重鎖のN末端に融合されており、第1の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のC末端で、Fcドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されているか、または

(ii) 第1の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のC末端で、第2の抗原結合ドメインのFab重鎖のN末端に融合されており、第2の抗原結合ドメインが、Fab重鎖のC末端で、Fcドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されており、

(iii) 第3の抗原結合ドメインが、存在する場合、そのFab重鎖のC末端で、Fcドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されている、二重特異性抗体に関する。一態様では、二重特異性抗体は三価抗体である。別の態様では、二重特異性抗体は、TfRに特異的に結合する正確に1つの(一価)抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する正確に2つの(一価)抗原結合ドメインとを含む。ある特定の態様では、二重特異性抗体はIgGクラスのものである。別の態様では、二重特異性抗体のFab断片および／またはFc領域はIgGクラスのものである。ある特定の態様では、二重特異性抗体はIgG₁アイソタイプのものである。別の態様では、二重特異性抗体のFab断片および／またはFc領域はIgG₁アイソタイプのものである。

【0029】

さらなる態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合ドメイン、第2の抗原結合ドメイン、および存在する場合、第3の抗原結合ドメインがそれぞれFab断片であり、抗体が、第1および第2のサブユニットから構成されるFcドメインを含み、

i) 第1の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のN末端で、Fcドメインの第1もしくは第2のサブユニットのC末端に融合されており、第2の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のC末端で、Fcドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されており、存在する場合、第3の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のC末端で、Fcドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されているか、

または

ii) 第1の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のC末端で、Fcドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されており、第2の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のC末端で、Fcドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、存在する場合、第3の抗原結合ドメインが、そのFab重鎖のN末端で、Fcドメインの第1もしくは第2のサブユニットのC末端に融合されている、二重特異性抗体を提供する。一態様では、二重特異性抗体は三価抗体である。別の態様では、二重特異性抗体は、TfRに特異的に結合する正確に1つの(一価)抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する正確に2つの(一価)抗原結合ドメインとを含む。ある特定の態様では、二重特異性抗体はIgGクラスのものである。追加の態様では、二重特異性抗体のFab断片および／またはF

c 領域は I g G クラスのものである。ある特定の態様では、二重特異性抗体は I g G₁ アイソタイプのものである。さらに別の態様では、二重特異性抗体の F a b 断片および／または F c 領域は I g G₁ アイソタイプのものである。

【0030】

一態様では、二重特異性抗体は、

- a) T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインを含む 1 つの F a b 断片、
- b) P D 1 に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む 2 つの C r o s s F a b 断片であって、C H 1 と C L ドメインとが互いに交換されている C r o s s F a b 断片、
- c) 第 1 の F c 領域重鎖および第 2 の F c 領域重鎖を含む 1 つの F c 領域を含む三価抗体であって、

F a b 断片の C H 1 ドメインの C 末端が、重鎖 F c 領域ポリペプチドの一方の N 末端に接続されており、一方の C r o s s F a b 断片の C H 1 ドメインの C 末端が、他方の重鎖 F c 領域ポリペプチドの N 末端に接続されており、他方の C r o s s F a b 断片の C H 1 ドメインの C 末端が、F a b 断片の V H ドメインの N 末端に、または C r o s s F a b 断片の V H ドメインの N 末端に接続されている、三価抗体である。特定の態様では、接続は、ペプチド性リンカーを介する。別の態様では、二重特異性抗体は、T f R に特異的に結合する正確に 1 つの（一価）抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する正確に 2 つの（一価）抗原結合ドメインとを含む。ある特定の態様では、二重特異性抗体は I g G クラスのものである。追加の態様では、二重特異性抗体の F a b 断片および／または F c 領域は I g G クラスのものである。ある特定の態様では、二重特異性抗体は I g G₁ アイソタイプのものである。さらに別の態様では、二重特異性抗体の F a b 断片および／または F c 領域は I g G₁ アイソタイプのものである。

【0031】

一態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

- a) P D 1 に特異的に結合し、2 つの抗体重鎖および 2 つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、軽鎖内で、可変軽鎖ドメイン V L が、上記抗体の可変重鎖ドメイン V H によって置き換えられており、重鎖断片内で、可変重鎖ドメイン V H が、上記抗体の可変軽鎖ドメイン V L によって置き換えられている完全長抗体と、

- b) T f R に特異的に結合する F a b 断片とを含み、

F a b 断片重鎖の N 末端は、完全長抗体の 2 つの重鎖のうちの 1 つの C 末端に接続されている。別の態様では、二重特異性抗体は、T f R に特異的に結合する正確に 1 つの（一価）抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する正確に 2 つの（一価）抗原結合ドメインとを含む。ある特定の態様では、二重特異性抗体は I g G クラスのものである。追加の態様では、F a b 断片および／または完全長抗体は I g G クラスのものである。ある特定の態様では、二重特異性抗体は I g G₁ アイソタイプのものである。さらに別の態様では、F a b 断片および／または完全長抗体は I g G₁ アイソタイプのものである。

【0032】

さらなる態様では、二重特異性抗体は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含み、

T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインは、

- (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、および (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H)、ならびに

- (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1、(e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2、および (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L)、

または

- (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1、(b) 配列番号 10 のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列を含む C D R-H 2、および (c) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H)、ならびに

(d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1、(e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2、および (f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。

【0033】

一実施形態では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体の、P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインは、

(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1、(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2、および (c) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H)、ならびに

(d) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1、(e) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2、および (f) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L)

または

(a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1、(b) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2、および (c) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H)、ならびに

(d) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1、(e) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2、および (f) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L) を含む。

【0034】

特定の態様では、本発明は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、二重特異性抗体が、T f R および P D 1 に同時に結合し、二重特異性抗体が同時に結合すると、二重特異性抗体と T f R と P D 1 とによって形成された複合体が、細胞内に内部移行され、P D 1 が、細胞表面から枯渇し、二重特異性抗体が、

(a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1、(b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2、および (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H)、および

(d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1、(e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2、および (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L)、

または

(a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1、(b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2、および (c) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H)、および

(d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1、(e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2、および (f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L)

を含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン、

ならびに

(a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1、(b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2、および (c) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H)、および

(d) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1、(e) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2、および (f) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L)

10

20

30

40

50

または

(a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1、(b) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2、および (c) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 を含む重鎖可変ドメイン (V H)、および

(d) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1、(e) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2、および (f) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む軽鎖可変ドメイン (V L)

を含む、P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインを含む、二重特異性抗体を提供する。

【0035】

さらなる態様では、二重特異性抗体は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含み、

T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインは、

配列番号 7 のアミノ酸配列を含む V H ドメインおよび配列番号 8 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン、または

配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V H ドメインおよび配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含み、

P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインは、

配列番号 23 のアミノ酸配列を含む V H ドメインおよび配列番号 24 のアミノ酸配列を含む V L ドメイン、または

配列番号 31 のアミノ酸配列を含む V H ドメインおよび配列番号 32 のアミノ酸配列を含む V L ドメインを含む。

【0036】

さらなる態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、モノクローナル抗体である。

【0037】

特定の態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、ヒト化抗体またはキメラ抗体である。

【0038】

別の態様では、本発明は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、

配列番号 35 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、配列番号 36 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖、ならびに

配列番号 39 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、および配列番号 40 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖、

または

配列番号 37 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、配列番号 38 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖、ならびに

配列番号 39 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、および配列番号 40 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖、

または

配列番号 35 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、配列番号 36 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖、ならびに

配列番号 41 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、および配列番号 42 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖、

または

配列番号 37 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、配列番号 38 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖、ならびに

配列番号 41 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、および配列番号 42 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖を含む二重特異性抗体に関する。

【0039】

別の態様では、本発明は、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 および第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、

配列番号 59 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、配列番号 60 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、配列番号 57 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖、および配列番号 58 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖、

または

配列番号 61 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の重鎖、配列番号 60 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の重鎖、配列番号 57 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 1 の軽鎖、および配列番号 58 の配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第 2 の軽鎖を含む二重特異性抗体に関する。

【0040】

本発明の別の態様によれば、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、本明細書に記載され、当業者に公知の最新の方法によって決定された場合、nM ~ サブ nM の範囲の親和性で TfR および PD1 の両方に結合する抗体である。

【0041】

本発明の別の態様によれば、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、以下の特性のうちの 1 つ以上によって独立して特徴付けられる：抗 PD1 抗 TfR 二重特異性抗体は、

i) TCR シグナル伝達の PD1 / PD-L1 媒介阻害を 1 nM の濃度で 2 倍超だけ、もしくは 100 nM の濃度で 4 倍超だけ低減する（実施例 4 による共培養アッセイでは、ルシフェラーゼレポーター系に動作可能に連結された NFAT 応答エレメントを使用して検出されたように）；および／または

ii) （実施例 6 による内部移行アッセイでは）活性化 T 細胞と接触すると、25 % 超、好ましくは 40 % 超、さらに好ましくは 50 % 超だけ活性化 T 細胞内に内部移行する

iii) （実施例 14 による最小混合リンパ球反応では）同種刺激 T 細胞によるグランザイム B 分泌を増強する。

【0042】

一態様では、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、多重

10

20

30

40

50

特異性抗体である。

【0043】

特定の一態様では、本発明は、配列番号35の第1の重鎖と、配列番号36の第1の軽鎖と、配列番号39の第2の重鎖と、配列番号40の第2の軽鎖とを含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

【0044】

特定の一態様では、本発明は、配列番号37の第1の重鎖と、配列番号38の第1の軽鎖と、配列番号39の第2の重鎖と、配列番号40の第2の軽鎖とを含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

10

【0045】

特定の一態様では、本発明は、配列番号35の第1の重鎖と、配列番号36の第1の軽鎖と、配列番号41の第2の重鎖と、配列番号42の第2の軽鎖とを含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

【0046】

特定の一態様では、本発明は、配列番号37の第1の重鎖と、配列番号38の第1の軽鎖と、配列番号41の第2の重鎖と、配列番号42の第2の軽鎖とを含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

20

【0047】

特定の一態様では、本発明は、配列番号59の第1の重鎖と配列番号60の第2の重鎖と、配列番号57の第1の軽鎖と、配列番号58の第2の軽鎖とを含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

【0048】

特定の一態様では、本発明は、配列番号61の第1の重鎖と配列番号60の第2の重鎖と、配列番号57の第1の軽鎖と、配列番号58の第2の軽鎖とを含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

30

【0049】

別の態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、ならびに細胞傷害性剤を含むイムノコンジュゲートを提供する。特定の態様では、細胞傷害性剤は、シュードモナス外毒素Aまたはアマトキシンである。

【0050】

さらなる一態様では、二重特異性抗体は、

a) TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含み、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長二重特異性抗体、ならびに

40

b) 1~4つのさらなる抗原に特異的に結合する（すなわち、第3および／または第4および／または第5および／または第6の抗原、好ましくは1つのさらなる抗原、すなわち、第3の抗原に特異的に結合する）1、2、3または4つの単鎖Fab断片を含み、

b)の上記単鎖Fab断片が、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の重鎖または軽鎖のC末端またはN末端で、a)の上記完全長抗体に融合されている多重特異性抗体である。追加の態様では、多重特異性抗体は、TfRに特異的に結合する正確に1つの（一価）抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する正確に2つの（一価）抗原結合ドメインとを含む。

【0051】

50

さらなる一態様では、二重特異性抗体は、

a) T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含み、2 つの抗体重鎖および 2 つの抗体軽鎖からなる完全長二重特異性抗体、ならびに

b) ビオチンに特異的に結合する 1、2、3 または 4 つの単鎖 F a b 断片を含み、

b) の上記単鎖 F a b 断片が、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の重鎖または軽鎖の C 末端または N 末端で、a) の上記完全長抗体に融合されている多重特異性抗体である。

【0052】

一態様では、第 3 の抗原に結合する 1 または 2 つの同一の単鎖 F a b 断片は、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の重鎖または軽鎖の C 末端で完全長抗体に融合されている。好ましい態様では、第 3 の抗原はビオチンである。

【0053】

一態様では、第 3 の抗原に結合する 1 または 2 つの同一の単鎖 F a b 断片は、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の重鎖の C 末端で完全長抗体に融合されている。好ましい態様では、第 3 の抗原はビオチンである。

【0054】

一態様では、第 3 の抗原に結合する 1 または 2 つの同一の単鎖 F a b 断片は、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の軽鎖の C 末端で完全長抗体に融合されている。好ましい態様では、第 3 の抗原はビオチンである。

【0055】

一態様では、第 3 の抗原に結合する 2 つの同一の単鎖 F a b 断片は、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の各重鎖または軽鎖の C 末端で完全長抗体に融合されている。好ましい態様では、第 3 の抗原はビオチンである。

【0056】

一態様では、第 3 の抗原に結合する 2 つの同一の単鎖 F a b 断片は、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の各重鎖の C 末端で完全長抗体に融合されている。

【0057】

一態様では、第 3 の抗原に結合する 2 つの同一の単鎖 F a b 断片は、ペプチド性リンカーを介して、上記完全長抗体の各軽鎖の C 末端で完全長抗体に融合されている。

【0058】

特定の一態様では、本発明は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインと、ビオチンに特異的に結合する第 3 の抗原結合ドメインとを含む三重特異性抗体を提供する。特定の一態様では、本発明は、配列番号 47 の第 1 の重鎖、および配列番号 48 の第 1 の軽鎖、配列番号 49 の第 2 の重鎖、および配列番号 50 の第 2 の軽鎖を含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインと、ビオチンに特異的に結合する第 3 の抗原結合ドメインとを含む三重特異性抗体を提供する。別の態様では、ビオチンに特異的に結合する、三重特異性抗体の第 3 の抗原結合ドメインは、ビオチンにコンジュゲートされたペイロードを三重特異性抗体に結合させるために使用される。特定の態様では、ペイロードは、細胞傷害性剤、好ましくはシュードモナス外毒素 A またはアマトキシンである。

【0059】

一態様では、本発明は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体をコードする単離された核酸を提供する。本発明はまた、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含むイムノコンジュゲートをコードする単離された核酸を提供する。さらなる態様では、本発明は、上記核酸を含む宿主細胞を提供する。

【0060】

別の態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、または上記二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲートを産生する方法であって、抗体の発現に適した条件下で、上記二重特異性抗体または上記イムノコンジュゲートをコードする核酸を含む宿主細胞を培養する工程を含む方法に関する。特定の態様では、方法は、宿主細胞から抗体を回収することをさらに含む。さらなる態様では、本発明はまた、そのような方法によって産生される二重特異性抗体に関する。

【0061】

一態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、または上記二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、ならびに薬学的に許容される担体を含む薬学的組成物を提供する。追加の態様では、本発明は、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメイン、ならびにP D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメイン、または上記二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、薬学的に許容される担体、ならびに追加の治療剤を含む薬学的組成物に関する。

【0062】

別の態様では、本発明は、医薬として使用するための、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物を提供する。

【0063】

- i) 免疫応答の調節、例えば、T細胞活性の回復、
- ii) 免疫応答もしくは機能の刺激、
- iii) がんの予防もしくは治療、
- iv) がんの進行の遅延、
- v) がんに罹患している患者の生存期間の延長、
- vi) 急性感染症、
- vii) 慢性および急性のウイルス感染症、ならびに／または
- viii) P D 1発現およびP D 1媒介免疫調節に依存する他の状態

に使用するための、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物も本発明に包含される。

【0064】

細胞傷害性ペイロードを有するイムノコンジュゲートまたは三重特異性抗体も、以下に有用である

- i) 移植片対宿主病の治療、および／または
- ii) 自己免疫疾患の予防もしくは治療。

【0065】

別の態様では、本発明は、がんの予防もしくは治療における使用のための、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物を提供し、二重特異性抗体は、がん免疫療法に使用するための化学療法剤、照射および／または他の薬剤と組み合わせて投与される。

【0066】

さらに、個体における腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、腫瘍細胞の成長を阻害するために、T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物の有効量

を個体に投与することを含む方法が提供される。

【0067】

特定の態様では、本発明は、以下の治療のための医薬の製造における、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物に関する

- i. がん、
- ii. 感染症または
- iii. 移植片対宿主病。

【0068】

さらに、本発明は、以下のための医薬の製造における、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物の使用を開示する

- i) 免疫応答の調節、例えば、T細胞活性の回復
- ii) 免疫応答もしくは機能の刺激
- iii) がんの進行の遅延、および／または
- iv) 生存期間の延長、もしくはがんに罹患している患者。

【0069】

一態様では、本発明は、移植片対宿主病を有する個体を治療する方法であって、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物の有効量を個体に投与することを含む方法を提供する。追加の態様では、移植片対宿主病を有する個体を治療する方法であって、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物の有効量を個体に投与することを含み、追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む方法が提供される。追加の治療剤は、化学療法剤、チェックポイント阻害剤、照射、ならびに／またはがん免疫療法に使用するのための他の薬剤、例えば、免疫サイトカイン、IL-2およびそのバリエーション、IL-7、IL-12、PD1-IL2v、共刺激分子、例えば、FAP-4-1BBL/OX40/CD40、TLRアゴニスト、抗体薬物コンジュゲート(ADC)、ならびに免疫療法のための、および腫瘍の「cold-to-hot」変換のための潜在的な「プライマー」として使用され得る細胞傷害性融合タンパク質からなる群から好ましくは選択される。

【0070】

さらに、個体におけるPD1機能を阻害する方法であって、PD1機能を阻害するために、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲート、または二重特異性抗体を含む薬学的組成物の有効量を個体に投与することを含む方法が提供される。個体は、好ましくは哺乳動物であり、特にヒトである。

【図面の簡単な説明】

【0071】

【図1】抗PD1および抗TfRに特異的な結合ドメインの化学量論が1+1である、本発明の二重特異性抗体の例示的な構成の概略図。2つの異なる結合ドメインは、それらのパターンによって区別される。各構成について、ヘテロ二量体化を促進する電荷バリエーション(++または--によって示される)の2つの可能な配向が示されており、1つは電荷がFab(上段)にあり、もう1つはCrossFab(下段)にある。(A、F)「1+1 Cross Mab VH-VL」分子の図。(B、G) Cross Fab成分とF

10

20

30

40

50

a b成分との順序が異なる「1アーム1+1 IgG Cross Mab VH-VL」分子の図。(C、H)「1アーム1+1 IgG Cross Mab VH-VL」分子の図。(D、I)「Fab-Cross Fab VH-VL」融合分子の図。(E、J)「Cross Fab-Fab VH-VL」融合分子の図。黒点：ヘテロ二量体化を促進する、Fcドメイン内の任意の修飾。++、--：CH1ドメインおよびCLドメインに導入されていてもよい反対の電荷のアミノ酸。Cross Fab分子は、VH領域およびVL領域の交換を含むものとして示されているが、電荷修飾がCH1ドメインおよびCLドメインに導入されない態様では、CH1ドメインおよびCLドメインの交換を代替的に含み得る。

【図2】抗PD1および抗TfRに特異的な結合ドメインの化学量論が2+1である、本発明の二重特異性抗体の例示的な構成の概略図(1つの結合ドメインが、1つのFabの重鎖のN末端に結合している(「TCBフォーマット」))。異なる結合ドメインは、それらのパターンによって区別される。2回存在する結合ドメインは、抗PD1結合ドメインである。1回存在する結合ドメインは、TfR結合ドメインである。Cross Mabの各構成について、ヘテロ二量体化を促進する電荷バリエーション(++または--によって示される)の2つの可能な配向が示されており、1つは電荷がFab(上段)にあり、もう1つはCross Fab(下段)にある。(A、E)「2+1 IgG Cross Mab VH-VL」分子の図。(B、F)2つのCross Fabと、そのCH1ドメインのC末端を介してCross Fabのうちの1つのVLドメインのN末端に融合されている1つのFabとを有する「2+1 IgG Cross Mab VH-VL」分子の図。(C、G)2つのCross Fabならびに順序が異なるCross Fab成分およびFab成分(「反転型」)を有する「2+1 IgG Cross Mab VH-VL」分子の図。(D、H)「2+1 IgG Cross Mab」分子(「反転型」)の図。黒点：ヘテロ二量体化を促進する、Fcドメイン内の任意の修飾。++、--：CH1ドメインおよびCLドメインに導入されていてもよい反対の電荷のアミノ酸。Cross Fab分子は、VH領域およびVL領域の交換を含むものとして示されているが、電荷修飾がCH1ドメインおよびCLドメインに導入されない態様では、CH1ドメインおよびCLドメインの交換を代替的に含み得る。

【図3】抗PD1および抗TfRに特異的な結合ドメインの化学量論が2+1である、本発明の二重特異性抗体の例示的な構成の概略図(1つの結合ドメインが、1つのFc重鎖のC末端に結合している(「BBBフォーマット」))。異なる結合ドメインは、この模式図では、それらのパターンによって区別される。2回存在する結合ドメインは、抗PD1結合ドメインである。1回存在する結合ドメインは、TfR結合ドメインである。各構成について、ヘテロ二量体化を促進する電荷バリエーション(++または--によって示される)の2つの可能な配向が示されており、1つは電荷がFab(上段)にあり、もう1つはCross Fab(下段)にある。(A、E)「(Cross Fab)₂-Fc-Fab」分子の図。(B、F)「(Fab)₂-Fc-Cross Fab」分子の図。(C、G)「(Fab+Cross Fab)-Fc-Fab」分子の図。(D、H)「(Fab+Cross Fab)-Fc-Cross Fab」分子の図。黒点：ヘテロ二量体化を促進する、Fcドメイン内の任意の修飾。++、--：CH1ドメインおよびCLドメインに導入されていてもよい反対の電荷のアミノ酸。Cross Fab分子は、VH領域およびVL領域の交換を含むものとして示されているが、電荷修飾がCH1ドメインおよびCLドメインに導入されない態様では、CH1ドメインおよびCLドメインの交換を代替的に含み得る。

【図4】抗PD1および抗TfRに特異的な結合ドメインの化学量論が2+1である、本発明の二重特異性抗体の例示的な構成の概略図(3つのFab分子は、示されるようにペプチドリッカーを介して互いに共有結合的に結合されている)。異なる結合ドメインは、それらのパターンによって区別される。2回存在する結合ドメインは、抗PD1結合ドメインである。1回存在する結合ドメインは、TfR結合ドメインである。融合分子の各構成について、ヘテロ二量体化を促進する電荷バリエーション(++または--によって示され

10

20

30

40

50

る)の2つの可能な配向が示されており、1つは電荷がFab(上段)にあり、もう1つはCrossFab(下段)にある。(A、E)「(Fab)₂-Crossfab」分子の図。(B、F)「CrossFab-(Fab)₂」分子の図。(C、G)「(CrossFab)₂-Fab」の図。(D、H)「Fab-(CrossFab)₂」分子の図。++、--:CH1ドメインおよびCLドメインに導入されていてもよい反対の電荷のアミノ酸。CrossFab分子は、VH領域およびVL領域の交換を含むものとして示されているが、電荷修飾がCH1ドメインおよびCLドメインに導入されない態様では、CH1ドメインおよびCLドメインの交換を代替的に含み得る。

【図5A】TfRおよびPD1に対する結合ドメインを有する二重特異性1+1 CrossMabの概略図。

【図5B】活性免疫細胞へのペイロード送達のために、ビオチンに特異的に結合する第3の結合ドメインを有する二重特異性CrossMabの概略図。

【図6】実施例で使用した2+1抗体(血液脳関門シャトル(BBB)フォーマット)の概略図。電荷修飾(すなわち、PD1バインダーではVH/VL交換、TfRバインダーでは電荷修飾:EE=147E、213E;RK=123R、124K)を有する「2+1 IgG CrossMab VH-VL、反転型」として、試験した2+1フォーマット抗体分子8156および8158を産生した。(B~E)抗体を構築するための成分:抗PD1クロスオーバーFabドメインの軽鎖(A)、CLに電荷修飾を有する抗TfR Fabドメインの軽鎖(B)、Fc領域にホールとPG LALA変異とを有し、抗TfR Fab分子の重鎖のN末端がFc領域にC末端結合している抗PD1クロスオーバーの重鎖(H)、抗PD1クロスオーバーFabを有し、Fc領域にノブとPG LALA変異とを有する重鎖(K)。対照分子8158については、TfR結合アームの軽鎖および重鎖の可変抗体領域を非結合配列(「Nada」)によって置き換えた。

【図7】実施例で使用した2+1抗体(T細胞二重特異性抗体(TCB)フォーマット)の概略図。電荷修飾(すなわち、PD1バインダーではVH/VL交換、TfRバインダーでは電荷修飾:EE=147E、213E;RK=123R、124K)を有する「2+1 (CrossFab)₂-Fc-Fab VH-VL」として、試験した抗体分子8157および8159を産生した。(B~E)。抗体を構築するための成分:抗PD1クロスオーバーFab分子の軽鎖(A)、CLに電荷修飾を有する抗TfR Fab分子の軽鎖(B)、Fc領域にホールとPG LALA変異とを有し、抗PD1クロスオーバーFab分子の重鎖のC末端が抗PD1 FabのN末端に結合している抗TfR分子の重鎖(H)、Fc領域にノブとPG LALA変異とを有する抗PD1クロスオーバーの重鎖(K)。対照分子8159については、TfR結合アームの軽鎖および重鎖の可変抗体領域を非結合配列(「Nada」)によって置き換えた。

【図8A】共培養アッセイにおけるPD1/PD-L1シグナル伝達のブロック。PD1発現Jurkat-PD1-NFAT細胞を抗体とともに37℃で30分間ブレインキュベートし、培地を用いて1回洗浄し、次いで、アクチベーター細胞(一晚接着させたPD-L1発現CHO-K1細胞)に5時間かけて加えた。Bio-Glo(商標)Luciferase Assay Substrateを加えた後の発光シグナルによって、PD1シグナル伝達によるTCR活性化の阻害を測定した(3回の独立した実験の代表)。

【図8B】共培養アッセイにおけるPD1/PD-L1シグナル伝達のブロック。抗体を加えた後のアッセイ中の細胞生存度。共培養アッセイにおける細胞生存度は、適用された濃度で任意の抗体を加えることによって影響を受けなかった。

【図9】三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCrossMab分子(1129)および抗PD1抗Nada抗ビオチン対照分子(9904)のSPR曲線。

【図10A】三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCrossMabのアビディティ増強結合はPD1発現に依存する。フローサイトメトリーによって分析した、PD1形質導入NFAT-bla Jurkat細胞上のTfRおよびPD1の発現レベル。

【図10B】三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCrossMabのアビディティ増強結合はPD1発現に依存する。PD1形質導入NFAT-bla Jurkat細胞の

10

20

30

40

50

表面に結合したPE標識抗体の定量 ($n = 3 \pm$ 平均値の標準誤差 (SEM))。

【図10C】三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCrossMabのアビディティ増強結合はPD1発現に依存する。bio-Cy5によって検出された、PD1形質導入NFAT-bla Jurkat細胞へのCrossMabの結合 (3つの独立した実験の代表)。三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCrossMab 1129および対照を、その表面上に異なるレベルのPD1を発現するJurkat細胞 (野生型WT、PD1低、PD1高) とともにインキュベートした。抗体をビオチン化Cy5を使用して検出し、APC中央値を測定するフローサイトメトリーによって検出した。それらの細胞表面上に高レベルのPD1を発現した細胞の方が結合が強かった。

【図11A】活性化T細胞による抗PD1抗TfR CrossMabの内部移行。抗PD1抗TfR二重特異性抗体8012、8013、8017および8018は、TfR Nada対照抗体 (8015、8016) と同様の内部移行を示す。PD1結合ドメインのみを有するがTfR結合ドメインを有しない抗体は、内部移行を示さない (PD1-0103-0312、8014、8019)。

【図11B】活性化T細胞による抗PD1抗TfR CrossMabの内部移行。抗PD1抗TfR二重特異性抗体8012、8013、8017および8018は、TfR Nada対照抗体 (8015、8016) と同様の内部移行を示す。PD1結合ドメインのみを有するがTfR結合ドメインを有しない抗体は、内部移行を示さない (PD1-0103-0312、8014、8019)。

【図12】mEGFP-PD1形質導入Jurkat細胞におけるmEGFP-PD1およびBio-Cy5ペイロードの内部移行および共局在化。mEGFP-PD1 Jurkatを、Bio-Cy5と複合体化した10nMの抗TfR/抗PD1/抗ビオチン三重特異性CrossMabまたは対照抗体と3時間インキュベートした。共焦点顕微鏡法によって、GFP-PD1およびBio-Cy5の局在化を評価した。

【図13】形質導入Jurkat細胞へのmEGFP-PD1の内部移行。mEGFP-PD1形質導入Jurkat細胞を、10nMのペンブロリズマブ (二価抗PD1抗体)、抗TfR/抗PD1二重特異性抗体または抗CD33非結合対照抗体と60分間インキュベートした。共焦点顕微鏡法によって、mEGFP-PD1の局在化を評価した。

【図14A】Jurkat細胞における形質導入されたmEGFP-PD1の抗体媒介性の減少および回復。mEGFP-PD1形質導入Jurkat細胞を10nMの三重特異性抗体または対照分子を用いて処理し、1、3、24および48時間後にそれらのGFP蛍光中央値について評価した。

【図14B】Jurkat細胞における形質導入されたmEGFP-PD1の抗体媒介性の減少および回復。細胞を10nMの三重特異性抗体を用いて24時間処理して、最大GFP-PD1ダウンレギュレーションを達成し、GFPシグナルを24時間にわたってモニタリングした。

【図15A】ビオチン化シュードモナス外毒素PE25のアビディティ増強送達。Cell Titer-Glo (登録商標) アッセイによって測定した、bio-PE25または毒素単独対照と複合体化した三重特異性抗体を用いて48時間処理したPD1形質導入NFAT-bla Jurkat細胞の生存度。

【図15B】ビオチン化シュードモナス外毒素PE25のアビディティ増強送達。bio-PE25を有しない対照抗体を用いて48時間処理した後のPD1形質導入NFAT-bla Jurkat細胞の生存度。

【図16A】活性化ヒトT細胞におけるアビディティ増強結合および内部移行。ビオチン化Cy5によって検出した、活性化T細胞に対する三重特異性抗体 (抗CD3/CD28) の結合。約8000分子/細胞に対してPD1を定量し、約200000分子/細胞に対してTfRを定量した。三重特異性抗体は、ビオチン化Cy5によって、対照抗体が活性化T細胞にほとんど結合を示さない濃度で検出された。

【図16B】活性化ヒトT細胞におけるアビディティ増強結合および内部移行。ドナー2例から得られたビオチン化Cy5データに対する細胞表面上の抗IgGの相対蛍光 ($t =$

10

20

30

40

50

1 時間対 $t = 0$ 時間) $\pm$ 標準偏差。0 および 1 時間の時点での IgG の染色後を通して、内部移行は抗 T f R 含有抗体では観察されたが、N a d a / 抗 P D 1 抗体では観察されなかった。

【図 1 7 A】移植片対宿主病 (G v H D) のモデルにおける T 細胞上の P D 1 および T f R の共発現、ならびに宿主浸潤 T 細胞のアビディティ増強殺傷。ヒト P B M C を移植されたマウスは、通常 G v H D を発症し、やがて死亡する。

【図 1 7 B】移植片対宿主病 (G v H D) のモデルにおける T 細胞上の P D 1 および T f R の共発現、ならびに宿主浸潤 T 細胞のアビディティ増強殺傷。マウス脾臓由来の細胞をフローサイトメトリーによって分析し、単一のヒト C D 3 細胞についてゲーティングした。T f R および P D 1 の発現について、浸潤したヒト C D 4 陽性細胞およびヒト C D 8 陽性細胞を分析した。マウス脾臓細胞内で検出されたヒト T 細胞 (C D 4 および C D 8 T 細胞を含む) の 70% 超が、T f R および P D 1 について二重陽性であった。

【図 1 7 C】移植片対宿主病 (G v H D) のモデルにおける T 細胞上の P D 1 および T f R の共発現、ならびに宿主浸潤 T 細胞のアビディティ増強殺傷。P E 2 5 と複合体化した抗 P D 1 / T f R 抗体を用いた脾臓細胞の処理は、この細胞プール内のヒト T 細胞の数を減少させる用量の 10 ~ 1000 倍の減少を示した。

【図 1 8 A】実施例で使用した、P D 1 への二価結合を伴う二重特異性抗 T f R / 抗 P D 1 抗体の様々な 2 + 1 フォーマット、および様々な対照コンストラクトの比較図。左から右に、それらは、(A) 分子 8 1 5 7、8 1 5 6、(B) P D 1 - 0 1 0 3 - 0 3 1 2、8 1 5 9 および 8 1 5 8 に対応する。「N」は、抗 N a d a 結合ドメインを示す。第 1 の 2 + 1 フォーマット (抗 P D 1 結合ドメインとヒンジ領域との間の抗 T f R 結合ドメイン; 「T C B フォーマット」; 左側) は、IgG 構成の通常の F a b アームとして 1 つの P D 1 結合実体と、ノブ・イントゥー・ホールヘテロ二量体の他方の側のヒンジに先行する T f R 結合 C r o s s F a b の上部 (すなわち、N 末端) にある第 2 の P D 1 結合 F a b アームとを含有する。第 2 の 2 + 1 フォーマット (F c ドメインの C H 3 に c 末端融合された抗 T f R 結合ドメイン; 「B B B フォーマット」; 右側) は、P D 1 結合アームとして IgG の通常の F a b アームを含有し、T f R 結合 F a b は、非対称 (ノブ・イントゥー・ホール) C H 3 ドメインの C 末端に C r o s s F a b フォーマットとして結合している。

【図 1 8 B】実施例で使用した、P D 1 への二価結合を伴う二重特異性抗 T f R / 抗 P D 1 抗体の様々な 2 + 1 フォーマット、および様々な対照コンストラクトの比較図。左から右に、それらは、(A) 分子 8 1 5 7、8 1 5 6、(B) P D 1 - 0 1 0 3 - 0 3 1 2、8 1 5 9 および 8 1 5 8 に対応する。「N」は、抗 N a d a 結合ドメインを示す。左側には、「古典的な」二価のブロッキング抗 P D 1 抗体 (抗 P D 1 - I g G) が示されている。抗 P D 1 抗体に対する T f R 結合および内部移行の影響を比較するために、T f R を非抗原結合 F a b 断片に置き換えた 2 つの対照 (抗 P D 1 結合ドメインとヒンジ領域との間の抗 N a d a 結合ドメイン、および F c ドメインの C H 3 に c 末端融合された抗 N a d a 結合ドメイン) を構築した。

【図 1 9】抗 P D 1 抗体および 2 つの P D 1 N a d a 対照抗体と比較した、二価様式で P D 1 に結合し、一価様式で T f R に結合する 2 つの二重特異性抗体、8 1 5 6 および 8 1 5 7 (異なる 2 + 1 フォーマット) の内部移行。二価様式で P D 1 に結合するが、T f R バインダーを含有しない対照分子 (抗 P D 1、8 1 5 8、8 1 5 9) は、かなり低い内部移行を示したが、二価様式で P D 1 に結合し、一価様式で T f R に結合する 2 つの 2 + 1 二重特異性抗体フォーマット (8 1 5 7、8 1 5 6) は、著しく増加した内部移行率を示した。

【図 2 0 A】同種異系成熟樹状細胞と共培養したヒト C D 4 T 細胞による細胞傷害性グランザイム B 放出に対する試験した抗体の効果 (混合リンパ球反応)。抗 P D 1 抗 T f R 二重特異性抗体 8 0 1 2 および 8 0 1 3 によって達成される E C ₅₀ 値は、二価 P D 1 - 0 1 0 3 - 0 3 1 2 バインダーによって達成される E C ₅₀ 値と同等である。一価抗 P D 1 コンストラクト P D 1 - 0 1 0 3 - 0 3 1 2 / N a d a (8 0 1 4) およびペンブロリ

10

20

30

40

50

ズマブ／N a d a（8019）は、中程度のグランザイムB分泌をもたらしたに過ぎず、バインダーN a d a／51A165（8015）およびN a d a／1026（8016）による一価T f R結合は、グランザイムB分泌を全く誘導しなかった。

【図20B】同種異系成熟樹状細胞と共培養したヒトCD4 T細胞による細胞傷害性グランザイムB放出に対する試験した抗体の効果（混合リンパ球反応）。抗PD1抗T f r二重特異性抗体8012および8013によって達成されるEC₅₀値は、二価PD1-0103-0312バインダーによって達成されるEC₅₀値と同等である。一価抗PD1コンストラクトPD1-0103-0312／N a d a（8014）およびペンブロリズマブ／N a d a（8019）は、中程度のグランザイムB分泌をもたらしたに過ぎず、バインダーN a d a／51A165（8015）およびN a d a／1026（8016）による一価T f R結合は、グランザイムB分泌を全く誘導しなかった。

10

【図21】同種異系成熟樹状細胞と共培養したヒトCD4 T細胞による細胞傷害性グランザイムB放出に対する試験した抗体の効果（混合リンパ球反応）。TCBおよびBBBフォーマット（8156および8157）は、二価の親抗PD1抗体よりも低いEC₅₀値を示したほか、それぞれの対照（8158および8159）と比較して、グランザイムB分泌の増加、したがって、これらのフォーマットによって誘導されるT細胞エフェクター機能の増加をもたらした。

【図22A】同種異系成熟樹状細胞と共培養したヒトCD4 T細胞による細胞傷害性グランザイムB放出に対する試験した抗体の効果（混合リンパ球反応）。一価抗PD1抗T f r二重特異性抗体8012および8013によって達成されたEC₅₀値は、二価PD1-0103-0312バインダーによって達成されたEC₅₀値と同等であった。一方、一価抗PD1コンストラクトPD1-0103-0312／N a d a（8014）は、中程度のグランザイムB分泌をもたらしたに過ぎなかった。

20

【図22B】同種異系成熟樹状細胞と共培養したヒトCD4 T細胞による細胞傷害性グランザイムB放出に対する試験した抗体の効果（混合リンパ球反応）。一価抗PD1抗T f r二重特異性抗体8017および8018によって達成されたEC₅₀値は、ペンブロリズマブによって達成されたEC₅₀値と同等であった。一方、一価抗PD1コンストラクトペンブロリズマブ／N a d a（8019）は、中程度のグランザイムB分泌をもたらしたに過ぎなかった。

【図22C】同種異系成熟樹状細胞と共培養したヒトCD4 T細胞による細胞傷害性グランザイムB放出に対する試験した抗体の効果（混合リンパ球反応）。二価抗PD1抗T f r二重特異性抗体8157（TCBフォーマット）および8156（BBBフォーマット）によって達成されたEC₅₀値は、ペンブロリズマブまたは二価PD1-0103-0312バインダーを用いて達成されたEC₅₀値よりも低かった。一方、二価抗PD1コンストラクトPD1-0103-0312／N a d a TCBフォーマット（8159）およびBBBフォーマット（8158）は、中程度のグランザイムB分泌をもたらしたに過ぎなかった。

30

【図23】マウスT f Rをその細胞表面に発現するBA／F3細胞株（RNCBアクセッションID：CL003201）を使用して、抗PD1抗T f Rマウス化分子の内部移行を試験した。T f R結合ドメイン6768（mT f R-001／h u P D 1-478 TCBフォーマット）および6794（mT f R-001／N a d a TCBフォーマット）を含有する両分子は、3時間後に約70%の良好な内部移行率を示したが、h u P D 1／N a d a（P1AG6769）は内部移行を示さない。

40

【図24】抗PD1抗T f Rマウス化分子のPD1／PD-L1媒介シグナル伝達のブロックを共培養アッセイで試験した。抗PD1抗体PD1-0103-0312のような分子6768（mT f R-001／h u P D 1-478、TCBフォーマット）および6769（N a d a／h u P D 1-478、TCBフォーマット）は、二価抗PD1結合ドメインを含有する。これらの分子はいずれも、PD1-PD-L1シグナル伝達経路のブロックに関して同等の機能性を示した。抗PD1抗原結合ドメインを含有しない対照分子6794（mT f R-001／N a d a、TCBフォーマット）は、いかなるブロッキング機

50

能性も示さなかった。

【発明を実施するための形態】

【0072】

一態様では、本発明は、本発明の選択された抗TfR抗PD1二重特異性抗体が、TfRおよびPD1に結合し、それらの表面上にTfRおよびPD1を発現および提示する細胞内に内部移行する能力を有するという発見に部分的に基づく。

【0073】

さらなる態様では、本発明は、抗TfR抗PD1 2+1フォーマット抗体、すなわち、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2および第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体が、単一特異性二価PD1抗体よりも改善された生物活性を示し、PD1とPD-L1との間の相互作用の良好な阻害をもたらすという発見に部分的に基づく。一態様では、これらの分子は、互いに共有結合的に結合されたIgGクラスFab断片と任意にIgGクラスFc領域とを含み、本明細書に記載の異なる立体配座の2+1フォーマット抗体をもたらす。

【0074】

PD1およびTfRを発現する細胞を本発明の抗TfR抗PD1二重特異性抗体と接触させると、これらの細胞、特にT細胞の表面からPD1が枯渇し、ひいては、これらの細胞の表面上のPD1受容体へのPD-L1の結合が妨げられることが見出された。抗TfR抗PD1二重特異性抗体は、PD1/PD-L1媒介T細胞受容体シグナル伝達を阻害し、例えば、免疫調節サイトカイン（例えば、インターフェロンガンマおよびグランザイムBの放出/分泌）を増加させる。細胞表面からのPD-L1の枯渇によって達成される阻害は、抗PD1ブロッキング抗体の一過性の結合によって達成され得る阻害よりも効果的および/または恒久的である。本発明の抗体を使用することによって増加され得る他の免疫調節サイトカインは、例えば、腫瘍壊死因子アルファ（TNFアルファ）分泌およびIL-12である。本明細書で使用される場合、インターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）、腫瘍壊死因子アルファ（TNFアルファ）、IL-12などの用語は、ヒトサイトカインを指す。

【0075】

I. 定義

本明細書の目的のための「アクセプターヒトフレームワーク」は、以下に定義されるヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークに由来する軽鎖可変ドメイン（VL）フレームワークまたは重鎖可変ドメイン（VH）フレームワークのアミノ酸配列を含むフレームワークである。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含み得るか、またはアミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの態様では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下または2以下である。いくつかの態様では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

【0076】

「親和性」は、分子の単一の結合ドメイン（例えば、抗体）とその結合パートナー（例えば、抗原）との間の非共有結合相互作用の合計の強さを指す。別途指示がない限り、本明細書で使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体および抗原）間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。そのパートナーYに対する分子Xの親和性は、一般に、解離定数（ K_D ）によって表され得る。親和性は、本明細書に記載されるものを含め、当技術分野で公知の一般的な方法によって測定され得る。結合親和性を測定するための具体的な実例となる例示的な方法を以下に記載する。

【0077】

「親和性成熟」抗体とは、改変を有しない親抗体と比較して、1つ以上の相補性決定領域（CDR）に1つ以上の改変を有し、そのような改変によって抗原に対する抗体の親和

10

20

30

40

50

性が改善される抗体を指す。

【0078】

用語「抗TfR抗体」および「TfRに特異的に結合する抗体または抗原結合ドメイン」は、抗体または抗原結合ドメインがTfRを標的とする際の診断剤および／または治療剤として有用であるように、十分な親和性でTfRに結合することができる抗体または抗原結合ドメインを指す。一態様では、無関係な非TfRタンパク質に対する、TfRに特異的に結合する抗TfR抗体または抗体または抗原結合ドメインの結合の程度は、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）によって測定された場合、TfRへの抗TfR抗体または抗原結合ドメインの結合の約10%未満である。ある特定の態様では、TfRに結合する抗原結合ドメインを含む抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ または $\leq 0.001 \text{ nM}$ （例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）の解離定数（ K_D ）を有する。抗体または抗原結合ドメインは、抗体が $1 \mu\text{M}$ 以下の K_D を有する場合、TfRに「特異的に結合する」と言われる。ある特定の態様では、抗TfR抗体は、異なる種由来のTfR間で保存されている、TfRのエピトープに結合する。

10

【0079】

用語「抗PD1抗体」および「PD1に特異的に結合する抗体または抗原結合ドメイン」は、抗体または抗原結合ドメインがPD1を標的とする際の診断剤および／または治療剤として有用であるように、十分な親和性でPD1に結合することができる抗体または抗原結合ドメインを指す。一態様では、無関係な非PD1タンパク質に対する、PD1に特異的に結合する抗体または抗原結合ドメインの結合の程度は、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）によって測定された場合、PD1への抗体または抗原結合ドメインの結合の約10%未満である。ある特定の態様では、PD1に結合する抗体または抗原結合ドメインは、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ または $\leq 0.001 \text{ nM}$ （例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）の解離定数（ K_D ）を有する。抗体または抗原結合ドメインは、抗体が $1 \mu\text{M}$ 以下の K_D を有する場合、PD1に「特異的に結合する」と言われる。ある特定の態様では、PD1に特異的に結合する抗PD1抗体または抗体または抗原結合ドメインは、異なる種由来のPD1間で保存されている、PD1のエピトープに結合する。本明細書における用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、限定するものではないが、それらが所望の抗原結合活性を示す限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体、（例えば、二重特異性抗体）および抗体断片を含む様々な抗体構造を包含する。以下を含む様々な特許出願は、抗PD1抗体の産生、ならびに／またはPD-L1結合および／もしくはPD1シグナル伝達に干渉する薬剤（抗PD1抗体を含む）を用いて免疫応答を増強する方法を開示している：米国特許第2003/0039653号、米国特許第2004/0213795号、米国特許第2006/0110383号、米国特許第2007/0065427号、米国特許第2007/0122378号、米国特許第2012/237522号、国際公開第2004/072286号、国際公開第2006/121168号、国際公開第2006/133396号、国際公開第2007/005874号、国際公開第2008/083174号、国際公開第2008/156712号、国際公開第2009/024531号、国際公開第2009/014708号、国際公開第2009/114335号、国際公開第2010/027828号、国際公開第2010/027423号、国際公開第2010/036959号、国際公開第2010/029435号、国際公開第2010/029434号、国際公開第2010/063011号、国際公開第2010/089411号、国際公開第2011/066342号、国際公開第2011/110604号、国際公開第2011/110621号および国際公開第2012/145493号。

20

30

40

【0080】

「ブロッキング」抗体または「アンタゴニスト」抗体は、これらが結合する抗原の生物活性を阻害するかまたは低下させる抗体である。いくつかの実施形態では、ブロッキング

50

抗体またはアンタゴニスト抗体は、抗原の生物活性を実質的にまたは完全に阻害する。例えば、本発明の二重特異性抗体は、抗原刺激に対する機能不全状態から、T細胞による機能応答（例えば、増殖、サイトカイン産生、標的細胞死）を回復するように、PD1およびPD-L1によるシグナル伝達をブロックする。

【0081】

本明細書で使用される用語「単一特異性」抗体は、同じ抗原の同じエピトープにそれぞれ結合する1つ以上の結合ドメインを有する抗体を意味する。用語「二重特異性」は、抗体が、例えば、異なる抗原に、または同じ抗原上の異なるエピトープに結合している抗体重鎖可変ドメイン（VH）と抗体軽鎖可変ドメイン（VL）との対によってそれぞれ形成された2つの結合ドメインを介して、少なくとも2つの別個の抗原決定基に特異的に結合することができることを意味する。本明細書では、このような二重特異性抗体は、1+1フォーマットまたは1+1フォーマット抗体とも呼ばれる。他の二重特異性抗体フォーマットは、本明細書では、2+1フォーマットもしくは2+1フォーマット抗体（第1の抗原またはエピトープに対する2つの結合ドメインと第2の抗原またはエピトープに対する1つの結合ドメインとを含む）または2+2フォーマットもしくは2+2フォーマット抗体（第1の抗原またはエピトープに対する2つの結合ドメインと第2の抗原またはエピトープに対する2つの結合ドメインとを含む）と呼ばれる。

10

【0082】

用語「TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体」、「TfRおよびPD1に特異的に結合する二重特異性抗体」、「TfRおよびPD1に特異的な二重特異性抗原結合分子」および「抗TfR抗PD1二重特異性抗体」は、本明細書では区別なく使用され、抗体がTfRおよびPD1を標的とする際の診断剤および／または治療剤として有用であるように、十分な親和性でTfRおよびPD1に結合することができる二重特異性抗体を指す。

20

【0083】

本出願で使用される用語「価数」は、抗原結合分子内の特定数の結合ドメインの存在を示す。したがって、用語「二価」、「四価」および「六価」は、抗原結合分子内のそれぞれ2つの結合ドメイン、4つの結合ドメインおよび6つの結合ドメインの存在を示す。本発明による二重特異性抗体は、少なくとも「二価」であり、「三価」または「多価」（例えば、「四価」または「六価」）であってよい。特定の態様では、本発明の抗体は、2つ以上の結合ドメインを有し、二重特異性である。すなわち、2つよりも多い結合ドメインが存在する場合であっても（すなわち、抗体は三価または多価である）、抗体は二重特異性であってよい。特に、本発明は、特異的に結合する各抗原に対して1つまたは2つの結合ドメインを有する二重特異性二価抗体および三価抗体に関する。

30

【0084】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」および「全抗体」は、天然抗体構造に実質的に類似した構造を有する抗体を指すために、本明細書では区別なく使用される。「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgGクラス抗体は、約150,000Da（ダルトン）のヘテロ四量体糖タンパク質であり、ジスルフィド結合した2つの軽鎖と2つの重鎖とから構成される。本明細書に開示される抗体、抗体断片および抗体様分子を形成する個々のポリペプチド鎖は、本明細書では、「サブユニット」、例えば、Fab断片のサブユニット、またはFcドメインのサブユニットと呼ばれることもある。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）、続いて、重鎖定常領域とも呼ばれる3つの定常ドメイン（CH1、CH2およびCH3）を有する。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）、続いて、軽鎖定常領域とも呼ばれる軽鎖定常ドメイン（CL）を有する。抗体の重鎖は、 α （IgA）、 δ （IgD）、 ϵ （IgE）、 γ （IgG）または μ （IgM）と呼ばれる5つのタイプのうちの1つに割り当てられてもよく、そのうちの

40

50

いくつかは、 $\gamma 1$ (IgG1)、 $\gamma 2$ (IgG2)、 $\gamma 3$ (IgG3)、 $\gamma 4$ (IgG4)、 $\alpha 1$ (IgA1) および $\alpha 2$ (IgA2) などのサブタイプにさらに分類されてもよい。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ (κ) およびラムダ (λ) と呼ばれる2つのタイプのうちの1つに割り当てられてもよい。

【0085】

「抗体断片」は、インタクトな抗体が結合する抗原に結合するインタクトな抗体の一部を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体断片の例には、限定するものではないが、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv および scFab）；単ドメイン抗体（dAb）；ならびに抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられる。特定の抗体断片の概説については、Holliger and Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005) を参照されたい。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthun, in *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994) を参照されたい。また、国際公開第93/16185号ならびに米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号も参照されたい。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、in vivoでの半減期が長くなったFab断片およびF(ab')₂断片の説明については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。ダイアボディは、二価または二重特異性であり得る2つの抗原結合ドメインを有する抗体断片であり、例えば、欧州特許第404,097号；国際公開1993/01161号；Hudson et al., *Nat Med* 9, 129-134 (2003)；およびHollinger et al., *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 6444-6448 (1993) を参照されたい。トリアボディおよびテトラボディもHudson et al., *Nat Med* 9, 129-134 (2003) に記載されている。単ドメイン抗体は、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部または軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む抗体断片である。ある特定の実施形態では、単ドメイン抗体は、ヒト単ドメイン抗体である (Domantis, Inc., Waltham, MA；例えば、米国特許第6,248,516号を参照)。加えて、抗体断片は、VHドメインに特徴的な（すなわち、VLドメインとともに構築することが可能な）またはVLドメインに特徴的な（すなわち、機能的抗原結合ドメインにVHドメインとともに構築することが可能な）単鎖ポリペプチドを含み、それによって、完全長抗体の抗原結合特性を提供する。抗体断片は、限定するものではないが、本明細書に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク質分解による消化、および組換え宿主細胞（例えば、大腸菌 (*E. coli*) またはファージ）による産生を含め、様々な技術によって作製され得る。

【0086】

インタクトな抗体のパパイン消化により、2つの同一の抗原結合断片が生じ、これは、それぞれ重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインと、さらに軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン (CH1) とを含有する「Fab」断片と呼ばれる。したがって、本明細書で使用される場合、用語「Fab断片」は、軽鎖のVLドメインおよび定常ドメイン (CL) を含む軽鎖断片と、重鎖のVHドメインおよび第1の定常ドメイン (CH1) とを含む抗体断片を指し、VH内に3つのCDR、およびVL内に3つのCDRを含む。用語「Fab」、「Fab断片」、「Fab分子」および「Fabドメイン」は、重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインと軽鎖の定常ドメインおよび重鎖の第1の定常ドメイン (CH1) とを含有する抗体断片を指すために本明細書では区別なく使用される。

【0087】

Fab'断片は、抗体ヒンジ領域由来の1つ以上のシステインを含む、重鎖CH1ドメインのカルボキシ末端でのいくつかの残基の付加により、Fab断片とは異なる。Fab

’-S Hは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を担持するF a b’断片である。ペプシン処理によって、2つの抗原結合部位（2つのF a b断片）と、F c領域の一部とを有するF（a b’）2断片が得られる。

【0088】

用語「Cross F a b」または「Cross-F a b断片」または「x F a b断片」または「クロスオーバーF a b断片」は、重鎖および軽鎖の可変領域または定常領域のいずれかが交換されたF a b断片を指す。これらのF a b断片バリエーションに関して、および以下の段落で説明されるF a b断片に関して、用語「断片」、「分子」および「ドメイン」も本明細書では区別なく使用される。クロスオーバーF a b断片の2つの異なる鎖組成が可能であり、本発明の二重特異性抗体に含まれる：一方で、F a b重鎖およびF a b軽鎖の可変領域が交換され、すなわち、クロスオーバーF a b断片は、軽鎖可変領域（V L）および重鎖定常領域（C H 1）から構成されるペプチド鎖と、重鎖可変領域（V H）および軽鎖定常領域（C L）から構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーF a b断片は、Cross F a b（V L V H）とも呼ばれる。一方、F a b重鎖およびF a b軽鎖の定常領域が交換されている場合、クロスオーバーF a b断片は、重鎖可変領域（V H）および軽鎖定常領域（C L）から構成されるペプチド鎖と、軽鎖可変領域（V L）および重鎖定常領域（C H 1）から構成されるペプチド鎖とを含む。このクロスオーバーF a b断片は、Cross F a b（C L C H 1）とも呼ばれる。本明細書にさらに記載されるように、異なるF a b分子の重鎖および軽鎖の誤対合をさらに減少させ、ひいては、望ましい（二重特異性）抗体の純度および収率を増加させるために、反対の電荷を有する荷電アミノ酸が、第1の抗原（T f R）に結合するF a b分子または第2の抗原（P D 1）に結合するF a b分子のC H 1ドメインおよびC Lドメイン内の特定のアミノ酸位置に導入されてもよい。電荷修飾は、（二重特異性）抗体に含まれる従来のF a b分子（例えば、図1 A～E、図2 A～D、図3 A～D、図4 A～Dに示されているような）、または（二重特異性）抗体に含まれるV H/V LクロスオーバーF a b分子（例えば、図1 F～J、図2 E～H、図3 E～H、図4 E～Hに示されているような）のいずれかに対して行われる（両方に対してではない）。

【0089】

「単鎖F a b断片」または「s c F a b」は、抗体重鎖可変ドメイン（V H）、抗体定常ドメイン1（C H 1）、抗体軽鎖可変ドメイン（V L）、抗体軽鎖定常ドメイン（C L）およびリンカーからなるポリペプチドであり、上記抗体ドメインおよび上記リンカーは、N末端からC末端へ方向に、以下の順序：a）V H-C H 1-リンカー-V L-C L、b）V L-C L-リンカー-V H-C H 1、（c）V L-C L-リンカー-V H-C H 1、またはd）V L-C H 1-リンカー-V H-C Lのうちの1つを有し、上記リンカーは、少なくとも30アミノ酸、好ましくは32～50アミノ酸のポリペプチドである。上記単鎖F a b断片は、C LドメインとC H 1ドメインとの間の天然ジスルフィド結合によって安定化されている。加えて、これらの単鎖F a b分子は、システイン残基の挿入（例えば、カバット番号付けによれば、可変重鎖の44位および可変軽鎖の100位）による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、さらに安定化されるであろう。

【0090】

「クロスオーバー単鎖F a b断片」または「x-s c F a b」は、抗体重鎖可変ドメイン（V H）、抗体定常ドメイン1（C H 1）、抗体軽鎖可変ドメイン（V L）、抗体軽鎖定常ドメイン（C L）およびリンカーからなるポリペプチドであり、上記抗体ドメインおよび上記リンカーは、N末端からC末端へ方向に、以下の順序：a）V H-C L-リンカー-V L-C H 1、およびb）V L-C H 1-リンカー-V H-C Lのうちの1つを有し、V HとV Lとは、ある抗原に特異的に結合する抗原結合ドメインと一緒に形成し、上記リンカーは、少なくとも30アミノ酸のポリペプチドである。加えて、これらのx-s c F a b分子は、システイン残基の挿入（例えば、カバット番号付けによれば、可変重鎖の44位および可変軽鎖の100位）による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、さらに安定化されるであろう。

【0091】

「単鎖可変断片（s c F v）」は、10～約25アミノ酸の短いリンカーペプチドを用いて接続された、抗体の重鎖（VH）および軽鎖（VL）の可変領域の融合タンパク質である。リンカーは、通常、柔軟性のためにグリシンが豊富であり、溶解度のためにセリンまたはスレオニンが豊富であり、VHのN末端と、VLのC末端とが接続されていてもよく、または逆に接続されていてもよい。このタンパク質は、定常領域の除去、およびリンカーの誘導にもかかわらず、元の抗体の特異性を保持する。s c F v抗体は、例えば、Houston, J. S., *Methods in Enzymol.* 203 (1991) 46-96に記載されている。加えて、抗体断片は、VHドメインに特徴的な（すなわち、VLドメインとともに構築することが可能な）またはVLドメインに特徴的な（すなわち、機能的抗原結合ドメインにVHドメインとともに構築することが可能な）単鎖ポリペプチドを含み、それによって、完全長抗体の抗原結合特性を提供する。

10

【0092】

「足場抗原結合タンパク質」は当技術分野で公知であり、例えば、フィブロネクチンおよび設計されたアンキリンリピートタンパク質（DARPin）が抗原結合ドメインの代替的な足場として使用されており、例えば、Gebauer and Skerra, *Engineered protein scaffolds as next-generation antibody therapeutics. Curr Opin Chem Biol* 13:245-255 (2009) および Stumpp et al., *Darpins: A new generation of protein therapeutics. Drug Discovery Today* 13:695-701 (2008)を参照されたい。本発明の一態様では、足場抗原結合タンパク質は、CTLA-4（エビボディ）、リポカリン（アンチカリン）、プロテインA由来分子、例えば、プロテインAのZドメイン（アフィボディ）、Aドメイン（アビマー／マキシボディ）、血清トランスフェリン（トランスボディ）；設計されたアンキリンリピートタンパク質（DARPin）、抗体軽鎖または重鎖の可変ドメイン（単ドメイン抗体、sdAb）、抗体重鎖の可変ドメイン（ナノボディ、aVH）、VNAR断片、フィブロネクチン（アドネクチン）、C型レクチンドメイン（テトラネクチン）；新規抗原受容体ベクターラクターゼの可変ドメイン（VNAR断片）、ヒトガンマークリスタリンまたはユビキチン（アフィリン分子）；ヒトプロテアーゼ阻害剤のクニッツ型ドメイン、ミクロボディ、例えば、ノッチンファミリー由来のタンパク質、ペプチドアプタマーおよびフィブロネクチン（アドネクチン）からなる群から選択される。

20

30

【0093】

用語「キメラ」抗体は、重鎖および／または軽鎖の一部が特定の供給源または種に由来し、重鎖および／または軽鎖の残りの部分が異なる供給源または種に由来する抗体を指す。

【0094】

抗体の「クラス」は、その重鎖によって保有される定常ドメインまたは定常領域のタイプを指す。抗体には5つの主要なクラス：IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMがあり、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、例えば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁およびIgA₂にさらに分類され得る。ある特定の態様では、抗体はIgGクラスのものである。IgGクラス抗体およびIgG様抗体分子は、一般に、大量に製造および精製することが容易であり、従来のIgG₁の薬理的特性と同様の薬理的特性を有することが多い。ある特定の態様では、抗体はIgG₁アイソタイプのものである。ある特定の態様では、抗体は、Fc領域エフェクター機能を低下させるためのP329G、L234AおよびL235A変異を有するIgG₁アイソタイプのものである。他の態様では、抗体はIgG₂アイソタイプのものである。ある特定の態様では、抗体は、IgG₄抗体の安定性を改善するためにヒンジ領域にS228P変異を有するIgG₄アイソタイプのものである。様々なクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれα、δ、ε、γおよびμと呼ばれる。抗体の軽鎖は、その

40

50

定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カップ（ κ ）およびラムダ（ λ ）と呼ばれる2つのタイプのうちの1つに割り当てられてもよい。

【0095】

本出願で使用される用語「ヒト起源由来の定常領域」または「ヒト定常領域」は、サブクラスIgG1、IgG2、IgG3もしくはIgG4のヒト抗体の定常重鎖領域、および／または定常軽鎖カップ領域もしくはラムダ領域を示す。そのような定常領域は当技術分野で公知であり、例えば、Kabat, E. A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)に記載されている（例えば、Johnson, G., and Wu, T. T., Nucleic Acids Res. 28 (2000) 214-218; Kabat, E. A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72 (1975) 2785-2788も参照）。本明細書で別途指定されない限り、定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242に記載されるように、EU番号付けシステム（カバットのEUインデックスとも呼ばれる）に従う。

10

20

【0096】

本明細書で使用される用語「枯渇」は、細胞を本発明の抗体と接触させた場合に、受容体分子を発現する細胞の表面に提示される受容体分子の数の顕著な減少を指す。枯渇は、本発明の抗体と接触しなかった対照細胞の表面上に存在する受容体分子の数と対比した細胞表面上の受容体分子の比として表される。受容体分子が細胞表面から枯渇した細胞は、未処理対照細胞と比較して、細胞の表面に提示される受容体分子の数が、好ましくは10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%または90%を超えて減少し、さらに好ましくは95%、98%または99%パーセントを超えて減少する。これらの範囲は、本明細書に記載され当業者に公知の最新の方法によって決定され得る。

【0097】

「エフェクター機能」は、抗体アイソタイプによって異なる、抗体のFc領域に起因する生物活性を指す。抗体エフェクター機能の例には、C1q結合および補体依存性細胞傷害(CDC); Fc受容体結合; 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC); 食作用; 細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）のダウンレギュレーション; ならびにB細胞活性化が挙げられる。

30

【0098】

薬剤、例えば、薬学的組成物の「有効量」は、所望の治療結果または予防的結果を達成するために必要な投与量で、かつ期間にわたって有効な量を指す。

【0099】

本明細書の用語「Fc領域」は、定常領域の少なくとも一部を含有するIgGクラス免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。該用語は、天然配列Fc領域および変異Fc領域を含む。一態様では、ヒトIgG重鎖Fc領域は、Cys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで及ぶ。ただし、宿主細胞によって産生される抗体は、重鎖のC末端から1つ以上の、特に1つまたは2つのアミノ酸の翻訳後切断を受けることがある。したがって、完全長重鎖をコードする特定の核酸分子の発現によって宿主細胞によって産生される抗体は、完全長重鎖を含み得るか、または完全長重鎖の切断されたバリエーションを含み得る。これは、重鎖の最後の2つのC末端アミノ酸がグリシン(G446)およびリジン(K447、EU番号付けシステム)である場合に当てはまり得る。したがって、Fc領域のC末端リジン(Lys447)またはC末端グリシン(Gly446)およびリジン(Lys447)は、存在しても存在しなくてもよ

40

50

い。Fc領域を含む重鎖のアミノ酸配列は、別途指示がない限り、本明細書ではC末端のグリシンーリジンジペプチドを伴わず示される。一態様では、本発明による抗体に含まれる、本明細書で指定されたFc領域を含む重鎖は、追加のC末端グリシンーリジンジペプチド（G446およびK447、EU番号付けシステム）を含む。一態様では、本発明による抗体に含まれる、本明細書で指定されたFc領域を含む重鎖は、追加のC末端グリシン残基（G446、EUインデックスによる番号付け）を含む。本明細書で別途指定されない限り、Fc領域または定常領域内のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991に記載されるように、EU番号付けシステム（EUインデックスとも呼ばれる）に従う。

10

【0100】

「フレームワーク」または「FR」は、相補性決定領域（CDR）以外の可変ドメイン残基を指す。可変ドメインのFRは、4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3およびFR4から一般になる。したがって、CDR配列およびFR配列は、VH（またはVL）では、以下の配列で一般に現れる：FR1-CDR-H1（CDR-L1）-FR2-CDR-H2（CDR-L2）-FR3-CDR-H3（CDR-L3）-FR4。

【0101】

カバット番号付けシステムによれば、本明細書で使用される場合、フレームワークおよびCDR領域は、可変ドメインの以下の領域に位置する：

20

	FR1	CDR-1	FR2	CDR2	FR3	CDR3	FR4
V _H	1-30	31-35b*	36-49	50-65	66-94	95-102	103-113
V _L	1-23	24-34	35-49	50-56	57-88	89-97	98-107

*CDR-H1には、本明細書では「35c」位、「35d」位および「35e」位と呼ばれる、35b位と36位との間に追加のアミノ酸が存在し得る。

30

【0102】

用語「完全長抗体」、「インタクトな抗体」および「全抗体」は、天然抗体構造に実質的に類似した構造を有するか、または本明細書で定義されるFc領域を含有する重鎖を有する抗体を指すために、本明細書では区別なく使用される。

【0103】

用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」および「宿主細胞培養物」は、区別なく使用され、外因性核酸が導入された細胞の子孫を含め、そのような細胞を指す。宿主細胞には、「形質転換体」および「形質転換細胞」が含まれ、これらには、初代形質転換細胞と、継代の数に関係なく、それに由来する子孫とが含まれる。子孫は、核酸含有量が親細胞と完全に同一でなくてもよく、変異を含有してもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニングまたは選択されたのと同じ機能または生物活性を有する変異体子孫が本明細書に含まれる。

40

【0104】

「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生されるか、またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を利用する非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を有する抗体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に除外する。

【0105】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」は、ヒト免疫グロブリンVLフレームワーク配列またはVHフレームワーク配列の選択において最も一般的に存在するアミノ酸残基を表す

50

フレームワークである。一般に、ヒト免疫グロブリンVL配列またはヒト免疫グロブリンVH配列の選択は、可変ドメイン配列のサブグループに由来する。一般に、配列のサブグループは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3にあるようなサブグループである。一態様では、VLについて、サブグループは、上記のKabat et al.にあるようなサブグループカップIである。一態様では、VHについて、サブグループは、上記のKabat et al.にあるようなサブグループIIIである。

【0106】

「ヒト化」抗体は、非ヒトCDR由来のアミノ酸残基と、ヒトFR由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。ある特定の態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全部を含み、CDRの全部または実質的に全部が非ヒト抗体のCDRに対応し、FRの全部または実質的に全部がヒト抗体のFRに対応する。ヒト化抗体は、任意に、ヒト抗体由来の抗体定常領域の少なくとも一部を含み得る。抗体、例えば、非ヒト抗体の「ヒト化形態」は、ヒト化を受けた抗体を指す。

【0107】

本明細書で使用される用語「超可変領域」または「HVR」は、配列が超可変であり、抗原結合特異性を決定する抗体可変ドメインの各領域、例えば、「相補性決定領域」（「CDR」）を指す。

【0108】

一般に、抗体は、6つのCDR、すなわち、VHに3つ（CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3）、およびVLに3つ（CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3）を含む。本明細書における例示的なCDRには、以下が含まれる：

(a) アミノ酸残基26~32（L1）、50~52（L2）、91~96（L3）、26~32（H1）、53~55（H2）および96~101（H3）に存在する超可変ループ（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917（1987））；

(b) アミノ酸残基24~34（L1）、50~56（L2）、89~97（L3）、31~35b（H1）、50~65（H2）および95~102（H3）に存在するCDR（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD（1991））；ならびに

(c) アミノ酸残基27c~36（L1）、46~55（L2）、89~96（L3）、30~35b（H1）、47~58（H2）および93~101（H3）に存在する抗原接触（MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745（1996））。

10

20

30

40

50

表 1. C D R の定義¹

CDR	Kabat	Chothia	AbM ²
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	24-34
V _L CDR2	50-56	50-52	50-56
V _L CDR3	89-97	91-96	89-97

¹ 表1の全CDR定義の番号付けは、Kabat et al. によって記載された番号付け規則に従う(上記を参照)。

² 表1で使用される、「b」が小文字の「AbM」は、Oxford Molecularの「AbM」抗体モデル化ソフトウェアによって定義されるCDRを指す。

【0109】

別途指示がない限り、C D R は、上記の K a b a t e t a l. に従って決定される。当業者であれば、C D R の表記はまた、上記の C h o t h i a、上記の M c C a l l u m、または任意の他の科学的に認められた命名システムに従って決定され得ることを理解するであろう。

【0110】

用語「細胞表面受容体」、「膜受容体」および「膜貫通型受容体」は、本明細書では区別なく使用される。細胞表面受容体は、細胞と細胞外空間との間の伝達を可能にする特殊な内在性膜タンパク質である。それらは、細胞の原形質膜に埋め込まれ、サイトカイン、増殖因子、細胞接着分子、ホルモン、神経伝達物質、栄養素などの細胞外分子に結合することによって、および内部シグナル伝達経路への一連の分子スイッチを介して細胞内で応答を誘発することによって、細胞シグナル伝達およびシグナルトランスダクションにおいて作用する。P D 1 および T f R は、そのような細胞表面受容体の例である。

【0111】

「イムノコンジュゲート」は、限定するものではないが、細胞傷害性剤を含む1つ以上の異種分子にコンジュゲートされた抗体である。

【0112】

「個体」または「対象」は哺乳動物である。哺乳動物には、限定するものではないが、家畜動物(例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌおよびウマ)、霊長類(例えば、ヒトおよび非ヒト霊長類、例えば、サル)、ウサギおよびげっ歯類(例えば、マウスおよびラット)が含まれる。ある特定の態様では、個体または対象はヒトである。

【0113】

本明細書で使用される用語「内部移行」または「受容体内部移行」は、エンドサイトーシスとも呼ばれる生物学的プロセス、すなわち、細胞が分子(タンパク質など)を貪食することによってそれらを吸収し、細胞の外側から内側への分子の輸送をもたらすプロセスを指す。内部移行された分子は、細胞内区画、例えば、液胞、エンドソーム、リソソーム、小胞体、ゴルジ体内、またはサイトゾル内に配置され得る。「内部移行された」または「内部移行している」抗体は、例えば、トランスフェリン受容体などの内部移行細胞表面受容体に結合することによって、標的細胞の外側から内側に輸送され得る抗体を指す。

【0114】

「単離された」抗体は、その天然環境の成分から分離された抗体である。いくつかの態様では、抗体は、例えば、電気泳動(例えば、S D S - P A G E、等電点電気泳動法(I E F)、キャピラリー電気泳動)またはクロマトグラフィー(例えば、イオン交換または逆相H P L C)法によって決定された場合、95%または99%よりも高い純度まで精製される。抗体の純度を評価する方法の概説については、例えば、F l a t m a n e t

10

20

30

40

50

al., J. Chromatogr. B 848: 79-87 (2007) を参照されたい。

【0115】

用語「リンカーペプチド」、「ペプチドリンカー」または「ペプチド性リンカー」は、区別なく使用され、好ましくは10～約25アミノ酸の短～中長ポリペプチドを指す。リンカーペプチドは、通常、柔軟性のためにグリシンが豊富であり、溶解度のためにセリンまたはスレオニンが豊富である。「リンカーペプチド」、「ペプチドリンカー」または「ペプチド性リンカー」は、2つのポリペプチド配列を接続または連結する、例えば、2つのポリペプチドドメインを連結する合成アミノ酸配列を指す。本明細書で使用される場合、用語「合成」は、天然に存在しないアミノ酸配列を指す。本発明のリンカーペプチドは、ペプチド結合を介して2つのアミノ酸配列を接続する。典型的には、リンカーペプチドは、生物学的に活性な部分を線状配列の第2の部分に接続する。ポリペプチドに関連して、「線状配列」または「配列」は、配列内で互いに隣接する残基がポリペプチドの一次構造内で近接する、アミノ末端からカルボキシル末端方向のポリペプチド内のアミノ酸の順序である。本明細書で使用される場合、用語「連結された」、「接続された」、「共有結合的に結合された」、「融合された」または「融合」は、区別なく使用される。一態様では、リンカーは、主にまたは完全にGlyおよびSerからなる。さらなる態様では、リンカーは、配列番号108または配列番号109の配列を有する。

10

【0116】

用語「核酸分子」または「ポリヌクレオチド」は、ヌクレオチドのポリマーを含む任意の化合物および／または物質を含む。各ヌクレオチドは、塩基、具体的には、プリン塩基またはピリミジン塩基（すなわち、シトシン（C）、グアニン（G）、アデニン（A）、チミン（T）またはウラシル（U））、糖（すなわち、デオキシリボースまたはリボース）、およびホスフェート基から構成される。多くの場合、核酸分子は、塩基の配列によって記載され、それにより、上記塩基は、核酸分子の一次構造（線状構造）を表す。塩基の配列は、典型的には、5'から3'に向かって表される。本明細書では、核酸分子という用語は、例えば、相補DNA（cDNA）およびゲノムDNAを含むデオキシリボ核酸（DNA）、リボ核酸（RNA）、特にメッセンジャーRNA（mRNA）、DNAまたはRNAの合成型、ならびにこれらの分子のうちの2つ以上を含む混合ポリマーを包含する。核酸分子は、線状でも環状でもよい。加えて、核酸分子という用語は、センス鎖およびアンチセンス鎖の両方、ならびに一本鎖形態および二本鎖形態を含む。さらに、本明細書に記載の核酸分子は、天然ヌクレオチド、または天然に存在しないヌクレオチドを含有することができる。天然に存在しないヌクレオチドの例には、誘導体化された糖類もしくはホスフェート骨格連結を有する修飾ヌクレオチド塩基、または化学的に修飾された残基が挙げられる。核酸分子は、例えば、宿主または患者では、in vitroおよび／またはin vivoで本発明の抗体の直接的な発現のためのベクターとして好適なDNA分子およびRNA分子も包含する。そのようなDNA（例えば、cDNA）ベクターまたはRNA（例えば、mRNA）ベクターは、非修飾であり得るか、または修飾されていてもよい。例えば、mRNAは、in vivoで抗体を生成するために対象にmRNAを注入することができるように、RNAベクターの安定性、および／またはコードされた分子の発現を増強するように化学的に修飾され得る（例えば、Stadler et al., Nature Medicine 2017, published online 12 June 2017, doi: 10.1038/nm.4356または欧州特許第2 101 823号を参照）。

20

30

40

【0117】

「単離された」核酸は、その天然環境の成分から分離された核酸分子である。単離された核酸には、核酸分子を通常含有する細胞内に含有される核酸分子が含まれるが、核酸分子は、染色体外に、または天然の染色体位置とは異なる染色体位置に存在する。

【0118】

「抗TfR抗体または抗PD1抗体をコードする単離された核酸」は、抗TfR抗体ま

50

たは抗PD1抗体の重鎖および軽鎖（またはそれらの断片）をコードする1つ以上の核酸分子を指し、単一のベクターまたは別個のベクター内のそのような核酸分子を含み、そのような核酸分子は、宿主細胞内の1つ以上の位置に存在する。

【0119】

本明細書で使用される用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られた抗体を指し、すなわち、例えば、天然に存在する変異を含有するか、またはモノクローナル抗体調製物の産生中に生じる可能性のあるバリエーション抗体（例えば、そのようなバリエーションは一般に微量で存在する）を除いて、集団を構成する個々の抗体は同一であり、および／または同じエпитープに結合する。異なる決定基（エпитープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物の各モノクローナル抗体は、抗原上の単一の決定基を対象とする。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体の特徴を示し、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものとして解釈されるべきではない。例えば、本発明によるモノクローナル抗体は、限定するものではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、およびヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含有するトランスジェニック動物を利用する方法を含む様々な手法によって作製され得、このような方法、およびモノクローナル抗体を作製するための他の例示的な方法は、本明細書に記載される。

10

【0120】

「ネイキッド抗体」は、異種部分（例えば、細胞傷害性部分）または放射標識にコンジュゲートされていない抗体を指す。ネイキッド抗体は、薬学的組成物中に存在してもよい。

20

【0121】

「天然抗体」は、様々な構造を有する天然に存在する免疫グロブリン分子を指す。例えば、天然IgG抗体は、ジスルフィド結合されている2つの同一の軽鎖および2つの同一の重鎖から構成される、約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変領域とも呼ばれる可変ドメイン（VH）、続いて、3つの定常重鎖ドメイン（CH1、CH2およびCH3）を有する。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変領域とも呼ばれる可変ドメイン（VL）、続いて、定常軽鎖（CL）ドメインを有する。

30

【0122】

用語「添付文書」は、治療用製品の市販パッケージに通例含まれる説明書であって、そのような治療用製品の使用に関する適応症、用法、用量、投与、併用療法、禁忌および／または警告に関する情報を含有する説明書を指すために使用される。

【0123】

本明細書で使用される場合、用語「ペイロード」は、標的（例えば、標的細胞）に作用し、エキソソームおよび／またはプロデューサー細胞に導入され得る任意の天然に存在するまたは人工的に合成された薬学的に活性な分子であり得る治療剤を指す。それには、ヌクレオチド、核酸、アミノ酸、ポリペプチド、脂質、炭水化物、ウイルスおよびウイルス粒子ならびに小分子などの治療剤が含まれる。

40

【0124】

参照ポリペプチド配列に対する「アミノ酸配列同一性パーセント（％）」は、配列をアライメントし、最大の配列同一性パーセントを達成するために必要であればギャップを導入した後の、アライメントのためにいかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮しない場合の、参照ポリペプチド配列内のアミノ酸残基と同一である候補配列内のアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを決定するためのアライメントは、当分野の技術の範囲内にある様々な方法で、例えば、BLAST、BLAST-2、Clustal W、Megalign（DNASTAR）ソフトウェアまたはFASTAプログラムパッケージなどの公的に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用し

50

て達成され得る。当業者であれば、比較される配列の完全長にわたる最大のアライメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含め、配列をアライメントするための適切なパラメータを決定することができる。あるいは、同一性パーセントの値は、配列比較コンピュータプログラムALIGN-2を使用して生成され得る。ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、Genentech, Inc.によって作成されており、ソースコードは、米国著作権局（Washington D.C., 20559）のユーザードキュメンテーションにファイルされており、米国著作権登録番号TXU510087の下に登録されており、国際公開第2001/007611号に記載されている。

【0125】

別途指示がない限り、本明細書における目的のために、アミノ酸配列同一性パーセントの値は、FASTAパッケージバージョン36.3.8cのggsearchプログラム、またはその後のBLOSUM50比較行列を用いて生成される。FASTAプログラムパッケージは、W. R. Pearson and D. J. Lipman (1988), "Improved Tools for Biological Sequence Analysis", PNAS 85:2444-2448; W. R. Pearson (1996) "Effective protein sequence comparison" Meth. Enzymol. 266:227-258; および Pearson et. al. (1997) Genomics 46:24-36によって作成され、www.fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/fasta_down.shtmlまたはwww.ebi.ac.uk/Tools/sss/fastaから公的に入手可能である。あるいは、ggsearch(global protein:protein)プログラムおよびデフォルトオプション(BLOSUM50; オープン:-10; ext:-2; Ktup=2)を使用して、fasta.bioch.virginia.edu/fasta_www2/index.cgiでアクセス可能な公開サーバを使用して配列を比較して、ローカルではなくグローバルなアライメントを確実に行うことができる。アミノ酸同一性パーセントは、出力アライメントヘッダに与えられる。

【0126】

用語「薬学的組成物」または「薬学的製剤」は、それに含有される活性成分の生物活性が有効になるような形態であり、薬学的組成物を投与され得る対象に対して許容できないほど毒性である追加の成分を含有しない調製物を指す。

【0127】

「薬学的に許容される担体」は、対象にとって非毒性である、薬学的組成物または製剤中の活性成分以外の成分を指す。薬学的に許容される担体には、限定するものではないが、バッファー、添加物、安定剤または防腐剤が含まれる。

【0128】

本明細書で使用される用語「TfR」または「トランスフェリン受容体」は、別途指示がない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物供給源由来の任意の天然のTfRまたはトランスフェリン受容体を指す。該用語は、「完全長」の未処理TfR、および細胞内でのプロセッシングから生じる任意の形態のTfRを包含する。該用語はまた、TfRの天然に存在するバリエーション、例えば、スプライスバリエーションまたは対立遺伝子バリエーションも包含する。例示的なヒトTfRのアミノ酸配列を表10の配列番号66に示す。

【0129】

本明細書で使用される用語「PD1」または「プログラム細胞死タンパク質1」は、別途指示がない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む任意の脊椎動物供給源由来の任意の天然のPD1またはプログラム細胞死タンパク質1を指す。該用語は、「完全長」の未処理PD1、および細胞内でのプロセッシングから生じる任意の形態のPD1を包含する。該用語はまた、PD1の天然に存在するバリエーション、例えば、スプライスバリエーションまたは対立遺伝子バリエーションも包

含する。例示的なヒトPD1のアミノ酸配列を表10の配列番号65に示す。

【0130】

本明細書で使用される場合、「治療 (treatment)」(および「治療する (treat)」) または「治療すること (treating)」などのその文法上の変化形) は、治療される個体の疾患の自然な経過を変化させる試みに対する臨床的介入を指し、予防のためにまたは臨床病理学の過程で行われ得る。治療の望ましい効果には、限定するものではないが、疾患の発生または再発を予防すること、症状の緩和、疾患の直接的または間接的な病理学的帰結の縮小、転移を予防すること、疾患の進行速度を遅らせること、病状の改善または緩和、および寛解、または予後の改善が含まれる。いくつかの態様では、本発明の抗体は、疾患の発症を遅延させるために、または疾患の進行を遅らせるために使用される。

10

【0131】

用語「がん」および「がん性」は、調節されていない細胞成長を典型的に特徴とする、哺乳動物における生理的状态を指すか、または説明する。がんの態様には、固形腫瘍がんおよび非固形腫瘍がんが含まれる。がんの例には、限定するものではないが、癌、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫および白血病またはリンパ系腫瘍が挙げられる。このようながんのさらに具体的な例には、限定するものではないが、膀胱がん (例えば、尿路上皮癌 (UC)、例えば、転移性 UC (mUC) ; 筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) および筋層非浸潤性膀胱癌 (NMIBC)) ; 腎臓がんまたは腎がん (例えば、腎細胞癌 (RCC))、肺がん、例えば、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌 ; 尿路のがん、乳がん (例えば、HER2+乳がんおよびトリプルネガティブ乳がん (TNBC))、(これはエストロゲン受容体 (ER-)、プロゲステロン受容体 (PR-) および HER2 (HER2-) 陰性である) ; 前立腺がん、例えば、去勢抵抗性前立腺がん (CRPC) ; 腹膜のがん ; 肝細胞がん ; 胃がん、または胃のがん、例えば、胃腸がんおよび消化管間質がん ; 膵臓がん (例えば、膵管腺癌 (PDAC)) ; 膠芽細胞腫 ; 子宮頸がん ; 卵巣がん ; 肝臓がん (例えば、肝細胞癌 (HCC)) ; 肝がん ; 結腸がん ; 直腸がん ; 結腸直腸がん ; 子宮内膜癌または子宮癌 ; 唾液腺癌 ; 前立腺がん ; 外陰部がん ; 甲状腺がん ; 肝臓癌 ; 肛門癌 ; 陰茎癌 ; 黒色腫、例えば、表在拡大黒色腫、悪性黒子黒色腫、末端部黒子黒色腫および結節性黒色腫 ; 多発性骨髄腫および B 細胞リンパ腫 (低悪性度 / 濾胞性非ホジキンリンパ腫 (NHL) ; 小リンパ球性 (SL) NHL ; 中悪性度 / 濾胞性 NHL ; 中悪性度びまん性 NHL ; 高悪性度免疫芽細胞性 NHL ; 高悪性度リンパ芽球性 NHL ; 高悪性度小型非開裂性細胞性 NHL ; 巨大病変 NHL ; マントル細胞リンパ腫 ; AIDS 関連リンパ腫 ; およびヴァルデンストレームマクログロブリン血症を含む) ; 慢性リンパ性白血病 (CLL) ; 急性リンパ芽球性白血病 (ALL) ; 急性骨髄性白血病 (AML) ; 毛様細胞性白血病 ; 慢性骨髄芽球性白血病 (CML) ; 移植後リンパ増殖性疾患 (PTLD) ; および骨髄異形成症候群 (MDS) 、ならびにファコマトーシスと関連する異常血管増殖、浮腫 (脳腫瘍に関連するものなど) 、メイグス症候群、脳がん、頭頸部がん、および関連する転移が挙げられる。

20

30

【0132】

本明細書で使用される「腫瘍」は、悪性または良性にかかわらず、あらゆる腫瘍性細胞の成長および増殖、ならびにあらゆる前がん性およびがん性の細胞および組織を指す。用語「がん」、「がん性」、「細胞増殖性疾患」、「増殖性疾患」および「腫瘍」は、本明細書で言及される場合、相互排他的ではない。

40

【0133】

用語「細胞増殖性疾患」および「増殖性疾患」は、ある程度の異常な細胞増殖に関連する障害を指す。一実施形態では、細胞増殖性疾患はがんである。別の実施形態では、細胞増殖性疾患は腫瘍である。

【0134】

用語「B 細胞増殖性疾患」または「B 細胞悪性腫瘍」は、ある程度の異常な B 細胞増殖に関連し、例えば、リンパ腫、白血病、骨髄腫および骨髄異形成症候群を含む障害を指す

50

。一実施形態では、B細胞増殖性疾患は、非ホジキンリンパ腫（NHL）などのリンパ腫であり、例えば、DLBCL（例えば、再発性または難治性のDLBCL）、FL（例えば、再発性または難治性のFLまたは形質転換FL）またはMCLを含む。別の実施形態では、B細胞増殖性疾患は、慢性リンパ性白血病（CLL）などの白血病である。さらに別の実施形態では、B細胞増殖性疾患は中枢神経系リンパ腫（CNSL）である。

【0135】

膀胱がん

用語「膀胱がん」は、限定するものではないが、例えば、局所進行性または転移性であり得る尿路上皮癌（UC）を含む。本明細書に記載される方法は、局所進行性および／または転移性であるがんを含め、様々なステージのがんの治療に適している。がんの病期分類では、局所進行性は、局所領域から付近の組織および／またはリンパ節に広がったがんとして一般に定義される。ローマ数字の病期分類システムでは、局所進行性は、通常、ステージIIまたはIIIに分類される。転移性であるがんは、がんが全身の離れた組織および器官に広がるステージ（ステージIV）である。

【0136】

用語「上部尿路UC」は、腎盂または尿管のUCを指す。上部尿路UCは上部尿路転移性UCであり得る。UCの症例の少数（例えば、約5～10%）が上部尿路UCである。

【0137】

用語「下部尿路UC」は、膀胱または尿道のUCを指す。下部尿路UCは下部尿路転移性UCであり得る。UCの症例の大部分（例えば、約90～95%）が下部尿路UCである。

【0138】

本明細書で使用される場合、用語「手術不能」および「切除不能」は、外科的切除が不可能であるかまたは安全に行うことができないがん（例えば、膀胱がん（例えば、局所進行性UCまたは転移性UCを含むUC））を指すために区別なく使用される。いくつかの実施形態では、膀胱がん（例えば、局所進行性UCまたは転移性UCを含むUC）は、骨盤側壁もしくは隣接する内臓の浸潤（臨床病期T4b）または巨大な結節性転移（N2～N3）のために手術不能である。

【0139】

用語「白金系化学療法による治療に適格である」は、対象が、主治医の判断で、または当技術分野で公知の白金系化学療法の適格性に関する標準化された基準に従って、白金系化学療法による治療に適格であることを意味する。例えば、Galsky et al. Lancet Oncol. 12 (3): 211-4, 2011に記載の基準が、対象がシスプラチンに基づく化学療法に適格であるかどうかを決定するために使用され得る。Galsky et al. は、以下のうちの少なくとも1つを満たす患者はシスプラチンに基づく化学療法に適さないと考えられる、転移性UC（mUC）を有する患者のコンセンサス定義を記載している：（i）世界保健協会（WHO）もしくは米国東海岸がん臨床試験グループ（ECOG）のパフォーマンスステータス2、またはカルノフスキー・パフォーマンス・ステータス60～70%；（ii）クレアチニークリアランス（計算値または測定値）が1mL/s未満；（iii）国立がん研究所（NCI）有害事象共通用語規準（CTCAE）v4.0グレード≥2聴力損失；（iv）CTCAE v. 4.0グレード≥2末梢神経障害；および／またはニューヨーク心臓病学会（NYHA）クラスIII心不全。一例では、以下のうちの1つ以上を有する場合、患者はシスプラチンに基づく化学療法に適さないと考えられる：腎機能障害（例えば、糸球体濾過量（GFR）>30であるが<60mL/分）；GFRは、直接測定（すなわち、クレアチニークリアランスもしくはエチルジアミンテトラアセート）によって、もしくは利用可能でない場合、血清／血漿クレアチニンからの計算（Cockcroft-Gault式）によって評価され得る；聴力損失（例えば、国立がん研究所（NCI）有害事象共通用語規準（CTCAE）v4.0グレード≥2、2つの連続周波数で25デシベルの聴力損失）；末梢神経障害（例えば、NCI CTCAE v4.0グレード≥2末梢神経障害（すなわち、刺痛

10

20

30

40

50

を含む感覚変化または知覚異常)) ; および / または E C O G パフォーマンスステータス評価 (O k e n e t a l . A m . J . C l i n . O n c o l . 5 : 6 4 9 - 6 5 5 , 1 9 8 2 を参照) (例えば、E C O G パフォーマンスステータスが 2) 。いくつかの実施形態では、以下のうちの 1 つを有する対象がカルボプラチンに基づく化学療法に適格であり得る : 腎機能障害 (例えば、糸球体濾過量 (G F R) > 3 0 であるが < 6 0 m L / 分) ; G F R は、直接測定 (すなわち、クレアチニンクリアランスもしくはエチルジアミンテトラアセテート) によって、もしくは利用可能でない場合、血清 / 血漿クレアチニンからの計算 (C o c k c r o f t - G a u l t 式) によって評価され得る ; 聴力損失 (例えば、2 つの連続周波数で 2 5 デシベルの C T C A E v 4 . 0 グレード $\geq$ 2 聴力損失) ; 末梢神経障害 (例えば、N C I C T C A E v 4 . 0 グレード $\geq$ 2 末梢神経障害 (すなわち、刺痛を含む感覚変化または知覚異常)) ; および / または E C O G パフォーマンスステータス評価 (例えば、E C O G パフォーマンスステータスが 2) 。

10

【 0 1 4 0 】

化学療法剤には、分子の不可欠な部分として白金を含有する有機化合物を含む「白金系」化学療法剤も含まれる。典型的には、白金系化学療法剤は、白金の配位錯体である。白金系化学療法剤は、当技術分野では「プラチン」と呼ばれることもある。白金系化学療法剤の例には、限定するものではないが、シスプラチン、カルボプラチン、オキサリプラチン、ネダプラチン、トリプラチンテトラニトレート、フェナントリプラチン、ピコプラチン、リボプラチンおよびサトラプラチンが挙げられる。白金系化学療法剤 (例えば、シスプラチンまたはカルボプラチン) は、1 つ以上の追加の化学療法剤、例えば、ヌクレオシドアナログ (例えば、ゲムシタビン) と組み合わせて投与され得る。

20

【 0 1 4 1 】

本明細書で使用される「白金系化学療法」は、白金系化学療法剤を含む化学療法レジメンを指す。例えば、白金系化学療法は、例えば、ヌクレオシドアナログ (例えば、ゲムシタビン) などの 1 つ以上の追加の化学療法剤と組み合わせて、白金系化学療法剤 (例えば、シスプラチンまたはカルボプラチン) を含み得る。

【 0 1 4 2 】

本明細書で使用される場合、「ヌクレオシドアナログ」は、核酸アナログと糖とを含むヌクレオシドを指す。ヌクレオシドアナログは、代謝拮抗剤として機能し得る。例示的なヌクレオシドアナログには、限定するものではないが、ゲムシタビン、シタラビン、フルダラビンおよびクラドリビンが含まれる。

30

【 0 1 4 3 】

乳がん

用語「乳がん」は、限定するものではないが、H E R 2 + 乳がん、ならびにがん細胞がエストロゲン受容体 (E R -) 、プロゲステロン受容体 (P R -) 、および H E R 2 (H E R 2 -) に関して陰性である乳がんの形態であり、かつ局所進行性、切除不能、および / または転移性 (例えば、転移性トリプルネガティブ乳がん (m T N B C)) であり得るトリプルネガティブ乳がん (T N B C) を含む。

【 0 1 4 4 】

本明細書で使用される場合、用語「早期 T N B C 」および「e T N B C 」は、ステージ I ~ ステージ I I I の T N B C を含む早期 T N B C を指す。早期 T N B C は、あらゆる新規早期乳がん診断の 1 0 % ~ 2 0 % を占め、ネオアジュバントであるアントラサイクリンおよびタキサン療法による治療後の 3 年無事象生存率は 7 4 % ~ 7 6 % である。

40

【 0 1 4 5 】

本明細書で使用される場合、「病理学的完全寛解」または「p C R 」は、乳房およびリンパ節の両方から浸潤性腫瘍が消失したことを指す。p C R という用語は、非浸潤性乳管がんと関係なく乳房および腋窩リンパ節に浸潤がんがないこと (すなわち、y p T 0 / i s y p N 0) ; 乳房および腋窩リンパ節に浸潤がんおよび上皮内がんがないこと (すなわち、y p T 0 y p N 0) ; ならびに非浸潤性乳管がんまたはリンパ節転移と関係なく乳房に浸潤がんがないこと (すなわち、y p T 0 / i s) を含む。特定の態様では、p C

50

Rは、非浸潤性乳管がん（すなわち、ypT0 / i s ypN0）に関係なく、乳房および腋窩リンパ節に浸潤がんがないことを指す。

【0146】

本明細書で使用される「タキサン」は、チューブリンに結合し、微小管集合および安定化を促進し、ならびに／または微小管解重合を防止し得る薬剤（例えば、ジテルペン）である。例示的なタキサンには、限定するものではないが、パクリタキセル（すなわち、TAXOL（登録商標）、CAS#33069-62-4）、ドセタキセル（すなわち、TAXOTERE（登録商標）、CAS#114977-28-5）、ラロタキセル、カバジタキセル、ミラタキセル、テセタキセル、および／またはオラタキセルが挙げられる。本明細書に含まれるタキサンには、タキソイド10デアセチルバッカチンIIIおよび／またはその誘導体も含まれる。いくつかの実施形態では、タキサンは、アルブミンコーティングされたナノ粒子（例えば、ナノ-アルブミン結合（nab）-パクリタキセル、すなわち、ABRAXANE（登録商標）および／またはnab-ドセタキセル、ABE-008）である。いくつかの実施形態では、タキサンは、nab-パクリタキセル（ABRAXANE（登録商標））である。いくつかの実施形態では、タキサンは、CREMAPHOR（登録商標）（例えば、TAXOL（登録商標））および／またはTWEEN（登録商標）、例えば、ポリソルベート80（例えば、TAXOTERE（登録商標））に配合される。いくつかの実施形態では、タキサンは、リポソームに封入されたタキサンである。いくつかの実施形態では、タキサンは、タキサンのプロドラッグ形態および／またはコンジュゲート形態（例えば、パクリタキセル、パクリタキセルポリグルメクス、および／または炭酸リノレイル-パクリタキセルに共有結合的にコンジュゲートされたDHA）である。いくつかの実施形態では、パクリタキセルは、実質的に界面活性剤を用いず（例えば、例えば、TOCOSOL（登録商標）パクリタキセルのように、CREMAPHOR（登録商標）および／またはTWEEN（登録商標）の非存在下で）で製剤化される。

10

20

【0147】

本明細書で使用される「アントラサイクリン」は、細胞傷害活性を示す抗生物質化合物のクラスを指す。アントラサイクリンは、DNAインターカレーション、トポイソメラーゼII媒介毒性、活性酸素種の生成、および／またはDNA付加物形成を介して細胞傷害性を引き起こし得る。例示的なアントラサイクリンには、限定するものではないが、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノルビシン、ミトキサントロンおよびバルルビシンが含まれる。いくつかの態様では、アントラサイクリンは、ドキソルビシンまたはエピルビシンである。いくつかの具体的な態様では、アントラサイクリンはドキソルビシンである。他の具体的な態様では、アントラサイクリンはエピルビシンである。

30

【0148】

本明細書で使用される「アルキル化剤」は、アルキル基をヌクレオチド、例えば、DNAに結合させる化学療法剤のクラスを指す。典型的には、アルキル基は、DNAのグアニン塩基に結合している。例示的なアルキル化剤には、限定するものではないが、ナイトロジェンマスタード誘導体（例えば、シクロホスファミド、クロラムブシル、ウラムスチン、メルファランまたはベンダムスチン）、ニトロソウレア（例えば、カルムスチン、ロムスチンまたはストレプトゾシン）、アルキルスルホネート（例えば、ブスルファン）、トリアジン（例えば、ダカルバジンまたはテモゾロミド、およびエチレンイミン（例えば、アルトレタミンまたはチオテパ）が含まれる。

40

【0149】

腎臓がん

いくつかの実施形態では、がんは腎臓がんである。特定の実施形態では、腎臓がんは、腎細胞癌（RCC）（例えば、以前に治療されていないRCCを含む進行性RCCまたは転移性RCC（mRCC））である。いくつかの実施形態では、腎臓がんは、肉腫様腎臓がん（例えば、肉腫様RCC（例えば、肉腫様進行性またはmRCC））である。

【0150】

50

用語「肉腫様」は、例えば、組織学によって評価されるように、肉腫様形態を特徴とするがん（例えば、腎臓がん（例えば、RCC））を指す。肉腫様腎臓がん（例えば、肉腫様RCC）は、悪性な性質および予後不良に関連している。いくつかの実施形態では、肉腫様腎臓がんは、非定型の紡錘形の細胞を含むか、もしくはそれからなり、および／または任意の肉腫の形態に類似している。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるEl Mouallem et al. Urol. Oncol. 36:265-271, 2018を参照されたい。肉腫様RCCは、淡明細胞型RCC、嫌色素性RCC、集合管癌、腎髄質癌、フマル酸ヒドラターゼ（FH）欠損RCCおよびコハク酸デヒドロゲナーゼ（SDH）欠損RCCを含む、RCCの任意のサブタイプで発生する可能性がある。肉腫様RCCの発生率はサブタイプによって異なるが、通常、淡明細胞型RCC（約5〜8%）および嫌色素性RCC（約8〜10%）では高くなる。肉腫様成分の組織学は可変であり得、線維肉腫様パターン、多形未分化肉腫様パターンまたは他の異種肉腫様パターン（例えば、骨肉腫様パターン、軟骨肉腫様パターンまたは横紋筋肉腫様パターン）を含み得る。壊死は、典型的には、大多数（約90%）の症例に存在する。いくつかの実施形態では、個体の腎臓がんが肉腫様として分類されるための最小量または割合の肉腫様分化は存在しない。肉腫様RCCは、実施例1に記載されているように評価され得る。他の実施形態では、肉腫様RCCは、2012 International Society of Urological Pathology (ISUP) Vancouver コンセンサス（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるSrigley et al. Am. J. Surg. Pathol. 37:1469-89, 2013を参照）によって記載されるように特徴付けられ得る。

10

20

【0151】

用語「Memorial Sloan Kettering Cancer Center (MSKCC) リスクスコア」は、腎臓がん（例えば、RCC、例えば、mRCC）患者の生存に関連する一連の予後因子に基づくスコアリングシステムを指す。例えば、参照によりその全体が本明細書に組み込まれるMotzer et al. J. Clin. Oncol. 17(8):2530-2540, 1999およびMotzer et al. J. Clin. Oncol. 20(1):289-296, 2002を参照されたい。いくつかの実施形態では、MSKCCリスクスコアは、実施例1に記載されているように、以下の因子に基づいて計算され得る：(i) 腎摘出術から治療（例えば、全身性治療）までの時間が1年未満、腎摘出術の欠如、もしくは転移性疾患の最初の診断、(ii) 正常下限（LLN）未満のヘモグロビンレベル（場合によっては、ヘモグロビンの正常範囲は、男性では13.5〜17.5 g/dL、女性では12〜15.5 g/dLである）、(iii) 10 mg/dLを超える補正血清カルシウムレベル（場合によっては、該補正血清カルシウムレベルは、血清カルシウムレベル（mg/dL）+ 0.8（4-血清アルブミン（g/dL））である）、(iv) 正常上限（ULN）の1.5倍を超える血清乳酸デヒドロゲナーゼ（LDH）レベル（場合によっては、該ULNは140 U/Lである）、および／または(v) カルノフスキー・パフォーマンス・ステータス（KPS）スコアが80未満。いくつかの実施形態では、個体が前述の特性を有しない場合、個体は好ましいMSKCCリスクスコアを有する。いくつかの実施形態では、個体が前述の特性のうちの1つまたは2つを有する場合、個体は中程度のMSKCCリスクスコアを有する。いくつかの実施形態では、個体が前述の特性のうちの3つ以上を有する場合、個体は不良なMSKCCリスクスコアを有する。いくつかの実施形態では、個体のMSKCCリスクスコアは、個体が抗がん治療、例えば、VEGFアンタゴニスト（例えば、ベバシズマブなどの抗VEGF抗体）およびPD-L1軸結合アンタゴニスト（例えば、アテゾリズマブなどの抗PD-L1抗体）を含む抗がん治療から利益を享受し得るかどうかを同定するために使用され得る。

30

40

【0152】

本明細書で使用される場合、「無悪化率」または「DFR」は、患者が、ある時間、例えば、治療の開始から、MDアンダーソン症状評価票（MDASI）支障尺度のベースラ

50

インを超えて、患者の最初の2ポイント以上の増加までの時間の長さにおいて、臨床的に意味のある悪化を経験する確率を指す。

【0153】

「MDアンダーソン症状評価票 (MDASI) 支障尺度」は、がんおよびその治療に関連する複数の症状の重症度および影響を評価する、患者報告の転帰測定スコアリングシステムを指す (例えば、Mendoza et al. Clin. Breast Cancer 13:325-334, 2013; Jones et al. Clin. Genitourin. Cancer 12:41-49, 2014; および Shi et al. Pain 158:1108-1112, 2017 を参照)。MDASI 支障尺度では、患者は、過去24時間の間に、症状が生活の様々な面でどの程度の支障をきたしたかを評価する。各支障項目 (仕事、一般的な活動、歩行、他者との関係、生活の楽しみ、および気分) は、0~10の尺度で評価され、0は「支障なかった」を表し、10は「完全に支障になった」を表す。

10

【0154】

肝臓がん

本明細書で使用される場合、用語「切除不能」は、外科的切除が不可能であるかまたは安全に行うことができないがん (例えば、肝臓がん (例えば、局所進行性もしくは転移性および／または切除不能HCCを含むHCC)) を指す。例えば、肝臓がんに関して、用語「切除不能」は、例えば、腫瘍が大きすぎて安全に除去することができない、腫瘍が除去を困難にする肝臓の部分に位置する (例えば、大きな血管の近くなど)、いくつかの腫瘍がある、もしくはがんが肝臓全体および／もしくは肝臓の外側に広がっている、ならびに／または対象が切除を不可能にする根本的な健康問題 (例えば、肝硬変) を有するために、部分的肝切除によって、がんを安全に除去することができないことを示す。

20

【0155】

本明細書で使用される場合、「X線無進行期間 (time to radiographic progression) (TTRP)」は、最初の事象 (例えば、臨床試験への無作為化、または治療レジメンの最初の用量の投与) と放射線医学によって評価される客観的進行との間の時間の長さを指す。いくつかの実施形態では、X線無進行は、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 基準、例えば、RECIST v1.1またはmRECIST (例えば、HCC mRECIST) に従って定義される。

30

【0156】

用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗原に対する抗体の結合に関与する抗体重鎖または軽鎖のドメインを指す。天然抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン (それぞれVHおよびVL) は、類似の構造を一般に有し、各ドメインは、4つの保存されたフレームワーク領域 (FR) および3つの相補性決定領域 (CDR) を含む。 (例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W. H. Freeman and Co., page 91 (2007) を参照。)。抗原結合特異性を付与するためには、単一のVHドメインまたはVLドメインで十分であり得る。さらに、特定の抗原に結合する抗体を、その抗原に結合する抗体由来のVHドメインまたはVLドメインを使用して単離して、それぞれ相補的なVLドメインまたはVHドメインのライブラリーをスクリーニングしてもよい。例えば、Portolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993); Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991) を参照されたい。

40

【0157】

本明細書で使用される用語「ベクター」は、連結している別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。該用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、および導入された宿主細胞のゲノムに組み込まれたベクターを含む。特定のベクターは、それらが機能的に連結されている核酸の発現を導くことができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」と呼ばれる。

50

【0158】

I I . 組成物および方法

一態様では、本発明は、一方で T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、他方で P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを単一の二重特異性抗体内で組み合わせることにより、T f R および P D 1 をその表面上に発現および／または提示する細胞と接触させた場合に、二重特異性抗体の内部移行がもたらされるという発見に部分的に基づく。そのような細胞は、例えば、活性化 T 細胞であり得る。さらなる態様では、本発明は、抗 T f R 抗 P D 1 2 + 1 フォーマット抗体、すなわち、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 および第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体が、単一特異性二価 P D 1 抗体よりも改善された生物活性を示し、P D 1 と P D - L 1 との間の相互作用のさらに良好な阻害をもたらすという発見に部分的に基づく。一態様では、これらの分子は、互いに共有結合的に結合されて本明細書に開示される 2 + 1 フォーマット抗体をもたらす I g G クラス F a b 断片、および任意に I g G クラス F c 領域も含む。理論に拘束されることを望むものではないが、本発明者らは、これらの抗体が T 細胞の表面から P D 1 を枯渇させ、したがって、P D 1 に対する抗 P D 1 ブロッキング抗体の単なる結合によって達成され得るよりも、腫瘍細胞の表面に位置する P D 1 リガンド (P D - L 1) への P D 1 の結合を恒久的に妨害すると考える。したがって、本発明の抗体は、P D 1 / P D - L 1 媒介シグナル伝達に対して、当技術分野で公知の抗 P D 1 抗体よりも強力な阻害効果をもたらす。本明細書に記載の抗体の有用性は、それらの抗体が細胞表面上の 2 つの受容体 T f R および P D 1 と複合体を形成し、それにより、上記複合体の全体を細胞内に内部移行する能力に関連していると考えられる。

10

20

【0159】

本発明による抗体はまた、ペイロードを抗体に直接コンジュゲートすることによって、または抗体に結合する追加の抗原結合ドメインを結合させることによって、ペイロードを T 細胞に特異的に輸送するために使用され得、その後、抗体は、ペイロードに特異的に結合することができる。ある特定の態様では、P D 1 および T f R に結合する二重特異性抗体が提供される。本発明の抗体は、例えば、がん治療のための T 細胞への小分子または R N A などの薬剤の送達に有用である。

【0160】

別の態様では、本発明は、抗 P D 1 および抗 T f R を標的とする結合ドメインの化学量論が 2 + 1 である二重特異性抗 T f R 抗 P D 1 抗体、すなわち、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 および第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体が、抗 P D 1 および抗 T f R を標的とする結合ドメインの化学量論が 1 + 1 である単一特異性抗 P D 1 抗体または二重特異性抗 T f R 抗 P D 1 抗体、すなわち、T f R に特異的に結合する 1 つの抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合するただ 1 つの抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体と比較して、P D 1 の内部移行の増加をもたらすという発見に部分的に基づく。本発明の抗体は、例えば、個体における腫瘍細胞の成長を阻害するために、または腫瘍の診断もしくは治療のために有用である。本発明の抗体は、当技術分野で公知の抗 P D 1 抗体が使用されているあらゆる種類の医療処置に使用され得る。

30

40

【0161】

A . T f R および P D 1 に結合する例示的な二重特異性抗体

一態様では、本発明は、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。一態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む単離された二重特異性抗体が提供される。一態様では、本発明は、T f R および P D 1 に特異的に結合する抗体を提供する。ある特定の態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインと

50

を含む二重特異性抗体は、細胞表面からのPD1の枯渇を引き起こし、細胞内へのPD1の内部移行を引き起こす。細胞は、好ましくはT細胞、さらに好ましくは活性化T細胞である。細胞内へのPD1の内部移行は、そのリガンドへのPD1の結合、好ましくはPD-L1への結合を阻害する。好ましくは、細胞内へのPD1の内部移行によるPD1とそのリガンドとの間の結合のこの阻害は、PD1への抗原結合ドメインの単なる結合によって達成されるブロックよりも長い持続性効果を有する。TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、好ましくは、

i. TfRおよびPD1に同時に結合し、

ii. TfRおよびPD1に同時に結合することによって、二重特異性抗体、TfRおよびPD1によって形成される複合体の細胞内への内部移行と、細胞表面からのPD1の枯渇とをもたらす、PD-L1がPD1にアクセスすることを防止し、ならびに／または

iii. PD1に結合し、細胞表面からのPD1枯渇を達成することによって、PD1-PD-L1相互作用をブロックし、および／もしくはPD1シグナル伝達を防止し、好ましくは、従来の抗PD1抗体よりもPD1/PD-L1媒介シグナル伝達のさらに効果的および／もしくは恒久的な阻害をもたらすことができる。

【0162】

一態様では、二重特異性抗体に含まれるFab断片、および任意にIgGクラスFc領域も互いに共有結合的に結合され、異なる立体配座の2+1フォーマット抗体をもたらす。さらなる態様では、二重特異性抗体は、本質的にモノマー形態であり、すなわち、本発明の複数の二重特異性抗体を含むダイマーまたはマルチマー（例えば、ペンタマー）構造を形成しない。特定の態様では、抗体の少なくとも90%、さらに具体的には少なくとも95%、好ましくは少なくとも98%、さらに好ましくは少なくとも99%がモノマー形態である。

【0163】

一態様では、本発明は、

A) a. (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2; (c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3; (d) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (e) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (f) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、もしくは6つ全部のCDR、または

b. (a) 配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H2; (c) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3; (d) 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (e) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (f) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、もしくは6つ全部のCDR

を含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、

B) a. (a) 配列番号17のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号18のアミノ酸配列を含むCDR-H2; (c) 配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR-H3; (d) 配列番号20のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (e) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (f) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4つ、少なくとも5つ、もしくは6つ全部のCDR、または

b. (a) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR-H2; (c) 配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H3; (d) 配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (e) 配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (f) 配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、少なくとも3つ、少なくとも4

10

20

30

40

50

つ、少なくとも5つ、もしくは6つ全部のCDR

を含む、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

【0164】

一態様では、本発明は、

A) a. (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2; および (c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVH CDR配列、または

b. (a) 配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H2; および (c) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVH CDR配列

10

を含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、

B) a. (a) 配列番号17のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号18のアミノ酸配列を含むCDR-H2; および (c) 配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVH CDR配列、または

b. (a) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR-H2; および (c) 配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVH CDR配列

20

を含む、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

【0165】

一態様では、二重特異性抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3と、配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含む。一態様では、二重特異性抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3と、配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含む。

【0166】

30

一態様では、二重特異性抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3と、配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含む。一態様では、二重特異性抗体は、配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3と、配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H3とを含む。

【0167】

別の態様では、二重特異性抗体は、

A) a. 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3、および配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3、または

b. 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3、および配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3

40

を含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、

B) a. 配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR-H3、および配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR-L3、または

b. 配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H3、および配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L3

を含む、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む。

【0168】

さらなる態様では、抗体は、

A) a. 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3、配列番号6のアミノ酸配列を

50

含む C D R - L 3、および配列番号 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、
または

b. 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3、配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3、および配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2
を含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン
ならびに

B) a. 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3、配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3、および配列番号 18 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2、
または

b. 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3、配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3、および配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2
を含む、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインを含む。

10

【0169】

さらなる態様では、抗体は、

A) a. 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1；配列番号 2 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2；および配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3、
または

b. 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1；配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2；および配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3
を含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメイン
ならびに

20

B) a. 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1；配列番号 18 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2；および配列番号 19 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3、
または

b. 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1；配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2；および配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3
を含む、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインを含む。

【0170】

30

別の態様では、本発明は、

A) a. (a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1；(b) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2；および (c) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、もしくは 3 つ全部の V L C D R 配列、または

b. (a) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1；(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2；および (c) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、もしくは 3 つ全部の V L C D R 配列

を含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、

40

B) a. (a) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1；(b) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2；および (c) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、もしくは 3 つ全部の V L C D R 配列、または

b. (a) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1；(b) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2；および (c) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3 から選択される少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、もしくは 3 つ全部の V L C D R 配列

を含む、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

50

【0171】

一態様では、二重特異性抗体は、

A) a. (a) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (b) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3、または

b. (a) 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (b) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (c) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3

を含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、

B) a. (a) 配列番号20のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (b) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (c) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR-L3、または

b. (a) 配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (b) 配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (c) 配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L3

を含む、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む。

【0172】

別の態様では、本発明の二重特異性抗体は、

A) a. (i) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および (iii) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVH CDR配列を含むVHドメイン、ならびに (i) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および (c) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVL CDR配列を含むVLドメイン

または

b. (i) 配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および (iii) 配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVH CDR配列を含むVHドメイン、ならびに (i) 配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および (c) 配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVL CDR配列を含むVLドメイン

を含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、

B) a. (i) 配列番号17のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号18のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および (iii) 配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVH CDR配列を含むVHドメイン、ならびに (i) 配列番号20のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および (c) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVL CDR配列を含むVLドメイン

または

b. (i) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR-H1、(ii) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および (iii) 配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVH CDR配列を含むVHドメイン、ならびに (i) 配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-L1、(ii) 配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および (c) 配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L3から選択される少なくとも1つ、少なくとも2つ、もしくは3つ全部のVL CDR配列を含むVLドメイン

10

20

30

40

50

を含む、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む。

【0173】

別の態様では、本発明は、

A) (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ; (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む第 1 の抗原結合ドメインと、

B) (a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ; (d) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (e) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (f) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

10

【0174】

別の態様では、本発明は、

C) (a) 配列番号 1 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 2 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 3 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ; (d) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (e) 配列番号 5 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (f) 配列番号 6 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む第 1 の抗原結合ドメインと、

20

D) (a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ; (d) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (e) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (f) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

【0175】

別の態様では、本発明は、

E) (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ; (d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む第 1 の抗原結合ドメインと、

30

F) (a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ; (d) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (e) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (f) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

40

【0176】

別の態様では、本発明は、

G) (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3 ; (d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R-L 1 ; (e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R-L 2 ; および (f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R-L 3 を含む第 1 の抗原結合ドメインと、

H) (a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む C D R-H 1 ; (b) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R-H 2 ; (c) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R-H 3

50

；（d）配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-L1；（e）配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および（f）配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L3を含む第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を提供する。

【0177】

本明細書に提供される態様のいずれかでは、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体がヒト化される。一態様では、抗TfR抗PD1二重特異性抗体は、アクセプターヒトフレームワーク、例えば、ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワークをさらに含む。ヒト免疫グロブリンフレームワークまたはヒトコンセンサスフレームワーク「に由来する」アクセプターヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含み得るか、またはアミノ酸配列変化を含有し得る。いくつかの実施形態では、アミノ酸変化の数は、10以下、9以下、8以下、7以下、6以下、5以下、4以下、3以下または2以下である。いくつかの実施形態では、VLアクセプターヒトフレームワークは、VLヒト免疫グロブリンフレームワーク配列またはヒトコンセンサスフレームワーク配列と配列が同一である。

10

【0178】

別の態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号7のVHのCDR配列のうちの1つ以上と、配列番号23のVHのCDR配列のうちの1つ以上とを含む。別の実施形態では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号8のVLのCDR配列のうちの1つ以上と、配列番号24のVLのCDR配列のうちの1つ以上とを含む。別の実施形態では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号7のVHのCDR配列、および配列番号8のVLのCDR配列、および配列番号23のVHのCDR配列、および配列番号24のVLのCDR配列を含む。

20

【0179】

別の態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号7のVHのCDR配列のうちの1つ以上と、配列番号31のVHのCDR配列のうちの1つ以上とを含む。別の実施形態では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号8のVLのCDR配列のうちの1つ以上と、配列番号32のVLのCDR配列のうちの1つ以上とを含む。別の実施形態では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号7のVHのCDR配列、および配列番号8のVLのCDR配列、および配列番号31のVHのCDR配列、および配列番号32のVLのCDR配列を含む。

30

40

【0180】

別の態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号15のVHのCDR配列のうちの1つ以上と、配列番号23のVHのCDR配列のうちの1つ以上とを含む。別の実施形態では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号16のVLのCDR配列のうちの1つ以上と、配列番号24のVLのCDR配列のうちの1つ以上とを含む。別の実施形態では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号15のVHのCDR配列

50

、および配列番号 16 の V L の C D R 配列、および配列番号 23 の V H の C D R 配列、および配列番号 24 の V L の C D R 配列を含む。

【0181】

別の態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号 15 の V H の C D R 配列のうちの 1 つ以上と、配列番号 31 の V H の C D R 配列のうちの 1 つ以上とを含む。別の実施形態では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号 16 の V L の C D R 配列のうちの 1 つ以上と、配列番号 32 の V L の C D R 配列のうちの 1 つ以上とを含む。別の実施形態では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号 15 の V H の C D R 配列、および配列番号 16 の V L の C D R 配列、および配列番号 31 の V H の C D R 配列、および配列番号 32 の V L の C D R 配列を含む。

10

【0182】

さらなる態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号 7 の V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 8 の V L ドメインの C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 23 の V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 24 の V L ドメインの C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 アミノ酸配列を含む。

20

【0183】

さらなる態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号 7 の V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 8 の V L ドメインの C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 31 の V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 32 の V L ドメインの C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 アミノ酸配列を含む。

30

【0184】

さらなる態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号 15 の V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 16 の V L ドメインの C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 23 の V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 24 の V L ドメインの C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 アミノ酸配列を含む。

【0185】

さらなる態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、配列番号 15 の V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 16 の V L ドメインの C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 31 の V H ドメインの C D R - H 1、C D R - H 2 および C D R - H 3 アミノ酸配列、ならびに配列番号 32 の V L ドメインの C D R - L 1、C D R - L 2 および C D R - L 3 アミノ酸配列を含む。

40

【0186】

一態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号 7 の V H ドメインの重鎖 C D R アミノ酸配列のうちの 1 つ以上、および配列番号

50

7のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号23のVHドメインの重鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つ以上、および配列番号23のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークとを含む。

【0187】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1抗体に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号7のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号7のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号23のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号23のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークとを含む。

【0188】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号7のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号7のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号23のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号23のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性のフレームワークとを含む。別の態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号7のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号23のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも98%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号7のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号23のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも98%の配列同一性のフレームワークとを含む。

【0189】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号7のVHドメインの重鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つ以上、および配列番号7のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号31のVHドメインの重鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つ以上、および配列番号31のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークとを含む。

【0190】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1抗体に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号7のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号7のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号31のVHドメインの3

つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号31のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークとを含む。一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号7のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号7のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号31のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号31のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性のフレームワークとを含む。別の態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号7のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号7のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも98%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号31のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号31のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも98%の配列同一性のフレームワークとを含む。

10

【0191】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号15のVHドメインの重鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つ以上、および配列番号15のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号23のVHドメインの重鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つ以上、および配列番号23のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークとを含む。

20

【0192】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1抗体に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号15のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号15のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号23のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号23のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークとを含む。一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号15のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号15のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号23のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号23のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性のフレームワークとを含む。別の態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号15のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号15のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも98%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号23のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号23のV

30

40

50

Hドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも98%の配列同一性のフレームワークとを含む。

【0193】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号15のVHドメインの重鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つ以上、および配列番号15のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号31のVHドメインの重鎖CDRアミノ酸配列のうちの1つ以上、および配列番号31のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークとを含む。

10

【0194】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号15のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号15のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号31のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号31のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%の配列同一性のフレームワークとを含む。一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号15のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号15のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号31のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号31のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性のフレームワークとを含む。別の態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、a) 配列番号15のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号15のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも98%の配列同一性のフレームワークと、b) 配列番号31のVHドメインの3つの重鎖CDRアミノ酸配列、および配列番号31のVHドメインのフレームワークアミノ酸配列に対して少なくとも98%の配列同一性のフレームワークとを含む。

20

30

【0195】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

40

A) (a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2; (c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3; (d) 配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1; (e) 配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2; および (f) 配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3、ならびに配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVHドメインおよび配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVLドメインを含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、

B) (a) 配列番号17のアミノ酸配列を含むCDR-H1; (b) 配列番号18のア

50

ミノ酸配列を含むCDR-H2；(c)配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR-H3；(d)配列番号20のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(e)配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(f)配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR-L3、ならびに配列番号23のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVHドメインおよび配列番号24のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVLドメインを含む、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第3の抗原結合ドメインとを含む。

【0196】

10

一態様では、第1のVHドメインは、配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、第2のVHドメインは、配列番号23のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。一態様では、第1のVLドメインは、配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、第2のVLドメインは、配列番号24のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。

【0197】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

A) (a)配列番号1のアミノ酸配列を含むCDR-H1；(b)配列番号2のアミノ酸配列を含むCDR-H2；(c)配列番号3のアミノ酸配列を含むCDR-H3；(d)配列番号4のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(e)配列番号5のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(f)配列番号6のアミノ酸配列を含むCDR-L3、ならびに配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVHドメインおよび配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVLドメインを含む、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、

20

B) (a)配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR-H1；(b)配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR-H2；(c)配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H3；(d)配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(e)配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(f)配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L3、ならびに配列番号31のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVHドメインおよび配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%または100%の配列同一性を有するVLドメインを含む、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第3の抗原結合ドメインとを含む。

30

【0198】

一態様では、第1のVHドメインは、配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、第2のVHドメインは、配列番号31のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。一態様では、第1のVLドメインは、配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有し、第2のVLドメインは、配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有する。

40

【0199】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

A) (a)配列番号9のアミノ酸配列を含むCDR-H1；(b)配列番号10のアミノ酸配列を含むCDR-H2；(c)配列番号11のアミノ酸配列を含むCDR-H3；(d)配列番号12のアミノ酸配列を含むCDR-L1；(e)配列番号13のアミノ酸配列を含むCDR-L2；および(f)配列番号14のアミノ酸配列を含むCDR-L3

50

、ならびに配列番号 15 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する V H ドメインおよび配列番号 16 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する V L ドメインを含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、

B) (a) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 ; (b) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 ; (c) 配列番号 19 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 ; (d) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 ; (e) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 ; および (f) 配列番号 22 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3、ならびに配列番号 23 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する V H ドメインおよび配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する V L ドメインを含む、P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインとを含む。

10

【0200】

一態様では、第 1 の V H ドメインは、配列番号 15 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有し、第 2 の V H ドメインは、配列番号 23 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する。一態様では、第 1 の V L ドメインは、配列番号 16 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有し、第 2 の V L ドメインは、配列番号 24 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する。

20

【0201】

一態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

A) (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 ; (b) 配列番号 10 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 ; (c) 配列番号 11 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 ; (d) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 ; (e) 配列番号 13 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 ; および (f) 配列番号 14 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3、ならびに配列番号 15 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する V H ドメインおよび配列番号 16 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する V L ドメインを含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、

30

B) (a) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む C D R - H 1 ; (b) 配列番号 26 のアミノ酸配列を含む C D R - H 2 ; (c) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む C D R - H 3 ; (d) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む C D R - L 1 ; (e) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む C D R - L 2 ; および (f) 配列番号 30 のアミノ酸配列を含む C D R - L 3、ならびに配列番号 31 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する V H ドメインおよび配列番号 32 のアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する V L ドメインを含む、P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインとを含む。

40

【0202】

一態様では、第 1 の V H ドメインは、配列番号 15 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有し、第 2 の V H ドメインは、配列番号 31 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する。一態様では、第 1 の V L ドメインは、配列番号 16 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有し、第 2 の V L ドメ

50

ンは、配列番号 32 のアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する。

【0203】

別の態様では、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

A) 配列番号 7 および配列番号 15 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する第 1 の重鎖可変ドメイン (VH) 配列と、

B) 配列番号 23 および配列番号 31 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する第 2 の重鎖可変ドメイン (VH) 配列とを含む。

10

【0204】

一態様では、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

A) 配列番号 7 および配列番号 15 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン (VH) 配列と、

B) 配列番号 23 および配列番号 31 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する重鎖可変ドメイン (VH) 配列とを含む。

【0205】

ある特定の態様では、少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 % または 99 % の同一性を有する VH 配列は、参照配列と比較して置換 (例えば、保存的置換)、挿入または欠失を含有するが、その配列を含む、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、TfR および / または PD1 に結合する能力を保持する。ある特定の態様では、配列番号 7、配列番号 15、配列番号 23 および / または配列番号 31 では、合計 1 ~ 10 個のアミノ酸が置換、挿入および / または欠失されている。ある特定の態様では、置換、挿入または欠失は、CDR の外側の領域 (すなわち、FR) 内で起こる。任意に、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、その配列の翻訳後修飾を含む、配列番号 7 および配列番号 15 からなる群から選択される第 1 の重鎖可変ドメイン (VH) 配列と、配列番号 23 および配列番号 31 からなる群から選択される第 2 の重鎖可変ドメイン (VH) 配列とを含む。

20

30

【0206】

別の態様では、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

A) 配列番号 8 および配列番号 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する第 1 の軽鎖可変ドメイン (VL) 配列と、

B) 配列番号 24 および配列番号 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 % または 100 % の配列同一性を有する第 2 の軽鎖可変ドメイン (VL) 配列とを含む。

40

【0207】

一態様では、TfR に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、PD1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

A) 配列番号 8 および配列番号 16 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (VL) 配列と、

B) 配列番号 24 および配列番号 32 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 95 % の配列同一性を有する軽鎖可変ドメイン (VL) 配列とを含む。

【0208】

50

ある特定の態様では、少なくとも 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% または 99% の同一性を有する V L 配列は、参照配列と比較して置換（例えば、保存的置換）、挿入または欠失を含有するが、その配列を含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、T f R および／または P D 1 に結合する能力を保持する。ある特定の態様では、配列番号 8、配列番号 16、配列番号 24 および／または配列番号 32 では、合計 1 ～ 10 個のアミノ酸が置換、挿入および／または欠失されている。ある特定の態様では、置換、挿入または欠失は、C D R の外側の領域（すなわち、F R）内で起こる。任意に、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体、その配列の翻訳後修飾を含む、配列番号 8 および配列番号 16 からなる群から選択される第 1 の軽鎖可変ドメイン（V L）配列、ならびに配列番号 24 および配列番号 32 からなる群から選択される第 2 の軽鎖可変ドメイン（V L）配列。

10

【0209】

別の態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、上に提供された態様のいずれかにあるような V H 配列と、上に提供された態様のいずれかにあるような V L 配列とを含む二重特異性抗体が提供される。一態様では、二重特異性抗体は、

20

それらの配列の翻訳後修飾をそれぞれ含む、

- A) a. 配列番号 7 および配列番号 8、または
- b. 配列番号 13 および配列番号 14

における V H 配列および V L 配列を含む、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、

- B) a. 配列番号 23 および配列番号 24、または
- b. 配列番号 31 および配列番号 32

における V H 配列および V L 配列を含む、P D 1 に特異的に結合する第 2 の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第 3 の抗原結合ドメインとを含む。

【0210】

本発明のさらなる態様では、上記の態様のいずれかによる、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体またはヒト抗体を含むモノクローナル抗体である。一態様では、T f R に特異的に結合する第 1 の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第 2 の、および任意に第 3 の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、少なくとも 1 つの抗体断片、例えば、F v、F a b、F a b'、s c F v、ダイアボディ、または F (a b')₂ 断片を含む。

30

【0211】

別の態様では、抗体は、完全長抗体、例えば、本明細書で定義されるインタクトな I g G 1 抗体または他の抗体クラスもしくはアイソタイプである。ある特定の態様では、抗体は I g G クラスのものである。別の態様では、抗体の F a b 断片および／または F c 領域は I g G クラスのものである。ある特定の態様では、抗体は I g G₁ アイソタイプのものである。別の態様では、抗体の F a b 断片および／または F c 領域は I g G₁ アイソタイプのものである。

40

【0212】

さらなる態様では、本明細書に記載される抗体は、I g G₁ アイソタイプ／サブクラスのものであり、配列番号 69 もしくは配列番号 70 の定常重鎖ドメイン、または配列番号 35、配列番号 37、配列番号 39 もしくは配列番号 41 の重鎖アミノ酸配列の定常部分を含む。一態様では、さらに、C 末端グリシン (G l y 446) が存在する。一態様では、さらに、C 末端グリシン (G l y 446) および C 末端リジン (L y s 447) が存在する。

50

【0213】

別の態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、配列番号35の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号36の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列番号39の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号40の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む二重特異性抗体に関する。

【0214】

別の態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、配列番号37の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号38の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列番号39の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号40の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む二重特異性抗体に関する。

【0215】

別の態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、配列番号35の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号36の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列番号41の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号42の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む二重特異性抗体に関する。

【0216】

別の態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、配列番号37の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号38の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列番号41の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号42の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む二重特異性抗体に関する。

【0217】

別の態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2および第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、

配列番号59の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖（鎖H）と、配列番号60の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖（鎖K）と、配列番号57の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖（鎖A）と、配列番号58の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖（鎖B）とを含む二重特異性抗体に関する。

【0218】

さらなる態様では、本発明は、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2および第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、

配列番号61の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖（鎖H）と、配列番号60の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖（鎖K）と、配列番号57の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖（鎖A）と、配列番号58

10

20

30

40

50

の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖（鎖B）とを含む二重特異性抗体に関する。

【0219】

さらなる態様では、上記の態様のいずれかによる、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、以下のセクション1～8に記載されるように、特徴のいずれかを単独でまたは組み合わせて組み込み得る。

【0220】

1. 抗体親和性

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ または $\leq 0.001 \text{ nM}$ （例えば、 10^{-8} M 以下、例えば、 $10^{-8} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ 、例えば、 $10^{-9} \text{ M} \sim 10^{-13} \text{ M}$ ）の解離定数（ K_D ）を有する。

【0221】

一態様では、 K_D は、BIA CORE（登録商標）表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。例えば、BIA CORE（登録商標）-2000またはBIA CORE（登録商標）-3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を使用するアッセイは、約10反応単位（RU）で固定化されている抗原CM5チップを用いて25℃で行われる。一態様では、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIA CORE, Inc.）は、供給業者の指示に従って、N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノプロピル）-カルボジイミド塩酸塩（EDC）、およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて活性化される。抗原を、10 mMの酢酸ナトリウム（pH 4.8）で $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ （約 $0.2 \mu\text{M}$ ）に希釈した後、 $5 \mu\text{L}/\text{分}$ の流量で注入して、約10反応単位（RU）の結合タンパク質を得る。抗原の注入後、1 Mのエタノールアミンを注入して、未反応基をブロックする。動力学測定のために、Fabの二倍段階希釈物（ $0.78 \text{ nM} \sim 500 \text{ nM}$ ）を、0.05%ポリソルベート20（Tween-20（商標））界面活性剤（PBST）を含むPBS中に25℃で約 $25 \mu\text{L}/\text{分}$ の流量で注入する。会合センサーグラムと解離センサーグラムとを同時に適合させることによって、単純な一対一Langmuir結合モデル（BIA CORE（登録商標）Evaluation Softwareバージョン3.2）を使用して、会合速度（ k_{on} ）および解離速度（ k_{off} ）を計算する。比 k_{off}/k_{on} として平衡解離定数（ K_D ）を計算する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881（1999）を参照されたい。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによる会合速度が $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ を超える場合、会合速度は、流動停止を備えた分光光度計（Aviv Instruments）、または攪拌キュベットを備えた8000シリーズSLM-AMINCO（商標）分光光度計（Thermo Spectronic）などの分光計で測定された場合、漸増濃度の抗原の存在下で、25℃で、PBS中20 nMの抗抗原抗体（Fab型）（pH 7.2）の蛍光放出強度（励起=295 nm、放出=340 nm、16 nm帯域通過）の増加または減少を測定する蛍光消光技術を使用して決定され得る。

【0222】

別の方法では、 K_D は、放射標識抗原結合アッセイ（RIA）によって測定される。一態様では、RIAは、目的の抗体およびその抗原のFabバージョンを用いて行われる。例えば、抗原に対するFabの溶液結合親和性は、非標識抗原の滴定系列の存在下で、Fabを最小濃度の（ 10^{-5} I ）標識抗原と平衡化し、次いで、抗Fab抗体でコートされたプレートを用いて、結合した抗原を捕捉することによって測定される（例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293: 865-881（1999）を参照）。アッセイの条件を確立するために、MICROTITER（登録商標）マルチウェルプレート（Thermo Scientific）を、50 mMの炭酸ナトリウム（pH 9.6）中の $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ の捕捉用抗Fab抗体（Cappel Labs）によって一

晩コーティングし、その後、PBS中の2% (w/v) ウシ血清アルブミンを用いて2～5時間にわたって室温(約23℃)でブロックする。非吸着性プレート(Nunc 番号# 269620)内で、100 pMまたは26 pM [^{125}I] - 抗原を、目的のFabの段階希釈物と混合する(例えば、Presta et al., Cancer Res. 57: 4593-4599 (1997)における抗VEGF抗体、Fab-12の評価と一致する)。次いで、目的のFabを一晩インキュベートする。ただし、インキュベーションは、平衡状態に達したことを確認するためにさらに長時間(例えば、約65時間)にわたって継続してもよい。その後、この混合物を捕捉プレートに移し、室温でインキュベートする(例えば、1時間)。次いで、溶液を除去し、PBS中の0.1%のポリソルベート20(TWEEN-20(登録商標))を用いてプレートを8回洗浄する。プレートが乾燥したら、150 μL /ウェルの閃光物質(MICROSCINT-20(商標); Packard)を加え、プレートをTOPCOUNT(商標)ガンマ計測器(Packard)を用いて10分間計測する。20%以下の最大結合をもたらす各Fabの濃度が、競合結合アッセイに使用するために選択される。

10

【0223】

2. 抗体断片

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体は抗体断片である。

【0224】

一態様では、抗体断片は、Fab、Fab'、Fab'-SH、またはF(ab)₂断片、特にFab断片である。インタクトな抗体のパパイン消化により、2つの同一の抗原結合断片が生じ、これは、VH内の3つのCDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3)、およびVL内の3つのCDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)を含め、それぞれ重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメイン(それぞれVHおよびVL)と、さらに軽鎖の定常ドメイン(CL)および重鎖の第1の定常ドメイン(CH1)とを含有する「Fab」断片と呼ばれる。したがって、用語「Fab断片」は、VLドメインおよびCLドメインを含む軽鎖と、VHドメインおよびCH1ドメインを含む重鎖断片とを含む抗体断片を指す。「Fab'断片」は、抗体ヒンジ領域からの1つ以上のシステインを含む、CH1ドメインのカルボキシ末端における残基の付加によりFab断片と異なる。Fab'-SHは、定常ドメインのシステイン残基が遊離チオール基を有するFab断片である。ペプシン処理により、2つの抗原結合ドメイン(2つのFab断片)と、Fc領域の一部とを有するF(ab')₂断片が得られる。サルベージ受容体結合エピトープ残基を含み、in vivoでの半減期が長くなったFab断片およびF(ab')₂断片の説明については、米国特許第5,869,046号を参照されたい。一態様では、Fab断片はIgGクラスのものである。

20

30

【0225】

一態様では、抗体断片は、ダイアボディ、トリアボディまたはテトラボディである。「ダイアボディ」は、二価または二重特異性であり得る2つの抗原結合ドメインを有する抗体断片である。例えば、欧州特許第404,097号; 国際公開第1993/01161号; Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003); およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 90: 6444-6448 (1993)を参照されたい。トリアボディおよびテトラボディはまた、Hudson et al., Nat. Med. 9: 129-134 (2003)にも記載されている。

40

【0226】

さらなる態様では、抗体断片は単鎖Fab断片である。「単鎖Fab断片」または「scFab」は、抗体重鎖可変ドメイン(VH)、抗体重鎖定常ドメイン1(CH1)、抗体軽鎖可変ドメイン(VL)、抗体軽鎖定常ドメイン(CL)およびリンカーからなるポリペプチドであり、上記抗体ドメインおよび上記リンカーは、N末端からC末端方向に、以下の順序、すなわち、a) VH-CH1-リンカー-VL-CL、b) VL-CL-リンカー-VH-CH1、c) VH-CL-リンカー-VL-CH1またはd) VL-CH

50

1-リンカー-VH-CLのうちの1つを有する。特に、上記リンカーは、少なくとも30個のアミノ酸、好ましくは32~50個のアミノ酸のポリペプチドである。上記単鎖Fab断片は、CLドメインとCH1ドメインとの間の天然ジスルフィド結合によって安定化されている。加えて、これらの単鎖Fab断片は、システイン残基の挿入（例えば、カバット番号付けによれば、可変重鎖の44位および可変軽鎖の100位）による鎖間ジスルフィド結合の生成によって、さらに安定化されるであろう。

【0227】

別の態様では、抗体断片は単鎖可変断片（scFv）である。「単鎖可変断片」または「scFv」は、ペプチド性リンカーによって接続された、抗体の重鎖（VH）および軽鎖（VL）の可変ドメインの融合タンパク質である。特に、リンカーは、10~25個のアミノ酸の短いポリペプチドであり、通常、柔軟性のためにグリシンが、かつ溶解度のためにセリンまたはスレオニンが豊富であり、VHのN末端をVLのC末端と、またはこの逆のいずれかで、接続させることができる。このタンパク質は、定常領域の除去、およびリンカーの誘導にもかかわらず、元の抗体の特異性を保持する。scFv断片の概説については、例えば、Pluckthun, in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenberg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315 (1994)を参照されたい。また、国際公開第93/16185号ならびに米国特許第5,571,894号および米国特許第5,587,458号も参照されたい。

【0228】

別の態様では、抗体断片は単一ドメイン抗体である。「単一ドメイン抗体」は、抗体の重鎖可変ドメインの全部もしくは一部、または軽鎖可変ドメインの全部もしくは一部を含む抗体断片である。ある特定の態様では、単一ドメイン抗体はヒト単一ドメイン抗体である（Domantis, Inc., Waltham, MA; 例えば、米国特許第6,248,516 B1号を参照）。

【0229】

抗体断片は、限定するものではないが、本明細書に記載されるように、インタクトな抗体のタンパク質分解による消化、および組換え宿主細胞（例えば、大腸菌）による組換え産生を含め、様々な技術によって作製され得る。

【0230】

3. キメラ抗体およびヒト化抗体

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体はキメラ抗体である。特定のキメラ抗体が、例えば、米国特許第4,816,567号、およびMorrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記載されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、またはサルなどの非ヒト霊長類に由来する可変領域）とヒト定常領域を含む。さらなる例では、キメラ抗体は、クラスまたはサブクラスが親抗体のクラスまたはサブクラスから変化させられた「クラススイッチ」抗体である。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【0231】

ある特定の態様では、キメラ抗体はヒト化抗体である。典型的には、非ヒト抗体は、親の非ヒト抗体の特異性と親和性を保持しながら、ヒトに対する免疫原性を低下させるためにヒト化される。一般に、ヒト化抗体は、CDR（またはその一部）が非ヒト抗体に由来し、FR（またはその一部）がヒト抗体配列に由来する1つ以上の可変ドメインを含む。ヒト化抗体は、任意に、ヒト定常領域の少なくとも一部も含む。いくつかの態様では、ヒト化抗体のいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性または親和性を回復させるかまたは改善するために、非ヒト抗体（例えば、CDR残基が由来する抗体）からの対応する残基によって置換される。

【0232】

ヒト化抗体およびその作製方法は、例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) に概説されており、例えば、Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); Queen et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989); 米国特許第5,821,337号、米国特許第7,527,791号、米国特許第6,982,321号および米国特許第7,087,409号; Kashmiri et al., Methods 36:25-34 (2005) (特異性決定領域 (SDR) グラフティングを記載); Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991) (「リサーフェイシング」を記載); Dall'Acqua et al., Methods 36:43-60 (2005) (「FRシャッフリング」を記載); ならびに Osbourn et al., Methods 36:61-68 (2005) および Klimka et al., Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000) (FRシャッフリングに対する「誘導選択」手法を記載) にさらに記載されている。

【0233】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域には、限定するものではないが、「ベストフィット」法を使用して選択されるフレームワーク領域 (例えば、Sims et al. J. Immunol. 151:2296 (1993) を参照); 軽鎖可変領域または重鎖可変領域の特定のサブグループのヒト抗体のコンセンサス配列に由来するフレームワーク領域 (例えば、Carter et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); および Presta et al. J. Immunol., 151:2623 (1993) を参照); ヒト成熟 (体細胞変異) フレームワーク領域またはヒト生殖系列フレームワーク領域 (例えば、Almagro and Fransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008) を参照); および FRライブラリーのスクリーニングに由来するフレームワーク領域 (例えば、Baca et al., J. Biol. Chem. 272:10678-10684 (1997) および Rosok et al., J. Biol. Chem. 271:22611-22618 (1996) を参照) が含まれる。

【0234】

4. ヒト抗体

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体はヒト抗体である。ヒト抗体は、当技術分野で公知の様々な技術を使用して産生され得る。ヒト抗体は、一般に、van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5:368-74 (2001) および Lonberg, Curr. Opin. Immunol. 20:450-459 (2008) に記載されている。

【0235】

ヒト抗体は、抗原曝露に応答して、インタクトなヒト抗体、またはヒト可変領域を有するインタクトな抗体を産生するように修飾されたトランスジェニック動物に免疫原を投与することによって調製され得る。そのような動物は、内因性免疫グロブリン遺伝子座を置き換えるか、または染色体外に存在するかもしれない動物の染色体にランダムに組み込まれたヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を典型的に含有する。そのようなトランスジェニックマウスでは、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、一般に不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得るための方法の概説については、Lonberg, Nat. Biotech. 23:1117-1125 (2005) を参照されたい。また、例えば、XENOMOUSE (商標) 技術を記載している米国特許第6,075,181号および米国特許第6,150,584号; HuMab (登録商標) 技術を記載している米国特許第5,770,429号; K-M MOUSE (登録商標) 技術を記載している米国特許第7,041,870号、ならびに VelociMouse (登録商標) 技術を記載している米国特許出願公開第2007/0061900号も参照されたい。そのような動物により生成されたインタクトな抗体由来のヒト可変領域は、例えば、異

なるヒト定常領域と組み合わせることによって、さらに修飾され得る。

【0236】

ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法によっても作製することができる。ヒトモノクローナル抗体を産生するためのヒト骨髓腫細胞株およびマウスーヒト異種骨髓腫細胞株が記載されている。(例えば、Kozbor J. Immunol., 133:3001 (1984); Brodeur et al., Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); および Boerner et al., J. Immunol., 147:86 (1991) を参照。) ヒトB細胞ハイブリドーマ技術を介して生成されたヒト抗体もまた、Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006) に記載されている。追加の方法には、例えば、米国特許第7, 189, 826号(ハイブリドーマ細胞株からのモノクローナルヒトIgM抗体の産生を記載) および Ni, Xiandai Mianyixue, 26(4):265-268 (2006) (ヒトーヒトハイブリドーマを記載) に記載されるものが含まれる。ヒトハイブリドーマ技術(トリオーマ技術)も、Vollmers and Brandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005) および Vollmers and Brandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005) に記載されている。

10

20

【0237】

ヒト抗体はまた、ヒト由来のファージディスプレイライブラリーから選択される可変ドメイン配列を単離することによって生成され得る。次いで、そのような可変ドメイン配列を所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択するための技術を以下に記載する。

【0238】

5. ライブラリー由来の抗体

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体は、ライブラリーから得られる。本発明の抗体は、単数または複数の所望の活性を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングすることによって単離され得る。コンビナトリアルライブラリーをスクリーニングする方法は、例えば、Lerner et al. in Nature Reviews 16:498-508 (2016) に概説されている。例えば、ファージディスプレイライブラリーを作成し、所望の結合特性を有する抗体のそのようなライブラリーをスクリーニングするための様々な方法が、当技術分野で知られている。このような方法は、例えば、Frenzel et al. in mAbs 8:1177-1194 (2016); Bazan et al. in Human Vaccines and Immunotherapeutics 8:1817-1828 (2012) および Zhao et al. in Critical Reviews in Biotechnology 36:276-289 (2016) ならびに Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) および Marks and Bradbury in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003) に概説されている。

30

40

【0239】

特定のファージディスプレイ法では、Winter et al. in Annual Review of Immunology 12:433-455 (1994) に記載されているように、VH遺伝子およびVL遺伝子のレパートリーをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によって別個にクローニングし、ファージライブラリーにおいてランダムに組

50

み換え、次いでこれを抗原結合ファージについてスクリーニングすることができる。ファージは、単鎖Fv (scFv) 断片として、またはFab断片として、抗体断片を典型的に提示する。免疫化された供給源由来のライブラリーは、ハイブリドーマを構築する必要性を伴うことなく免疫原に対する高親和性抗体を提供する。あるいは、Griffiths et al. in EMBO Journal 12:725-734 (1993) によって記載されるように、ナイーブなレパートリーをクローニングして（例えば、ヒトから）、免疫化することなく、非自己およびさらには自己抗原の広範囲に対する単一の抗体源を得ることができる。さらに、ナイーブなライブラリーはまた、Hoogenboom and Winter in Journal of Molecular Biology 227:381-388 (1992) によって記載されるように、再整列していないV遺伝子セグメントを幹細胞からクローニングすること、およびランダム配列を含むPCRプライマーを使用して、高度に可変性のCDR3領域をコードし、in vitroでの再整列を達成することによって、合成的に作製され得る。ヒト抗体ファージライブラリーを記載する特許公開には、例えば、米国特許第5,750,373号；米国特許第7,985,840号；米国特許第7,785,903号および米国特許第8,679,490号ならびに米国特許公開第2005/0079574号、米国特許公開第2007/0117126号、米国特許公開第2007/0237764号および米国特許公開第2007/0292936号が含まれる。

10

【0240】

単数または複数の所望の活性を有する抗体についてコンビナトリアルライブラリーをスクリーニングするための当技術分野で公知の方法のさらなる例には、リボソームおよびmRNAディスプレイ、ならびに細菌、哺乳動物細胞、昆虫細胞または酵母細胞における抗体ディスプレイおよび選択のための方法が挙げられる。酵母表面ディスプレイのための方法は、例えば、Scholler et al. in Methods in Molecular Biology 503:135-56 (2012) およびCherf et al. in Methods in Molecular biology 1319:155-175 (2015) ならびにZhao et al. in Methods in Molecular Biology 889:73-84 (2012) に概説されている。リボソームディスプレイのための方法は、例えば、He et al. in Nucleic Acids Research 25:5132-5134 (1997) およびHanes et al. in PNAS 94:4937-4942 (1997) に記載されている。

20

30

【0241】

ヒト抗体ライブラリーから単離された抗体または抗体断片は、本明細書ではヒト抗体またはヒト抗体断片と考えられる。

【0242】

6. 多重特異性抗体

いくつかの態様では、本明細書に提供される二重特異性抗体は、多重特異性抗体、例えば、三重特異性抗体または四重特異性抗体である。「多重特異性抗体」は、少なくとも2つの異なる部位、すなわち、異なる抗原上の異なるエピトープ、または同じ抗原上の異なるエピトープに対して結合特異性を有するモノクローナル抗体である。ある特定の態様では、多重特異性抗体は、3つ以上の結合特異性を有する。ある特定の態様では、結合特異性のうちの1つはTfRに対するものであり、結合特異性のうちの1つはPD1に対するものであり、第3の特異性は任意の他の抗原に対するものである。ある特定の態様では、二重特異性抗体は、TfRおよび／またはPD1の2つ（またはそれ以上）の異なるエピトープに結合し得る。多重特異性（例えば、二重特異性）抗体を使用して、細胞傷害性剤または細胞をPD1および／またはTfRを発現する細胞に局在化してもよい。多重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片として調製され得る。

40

【0243】

多重特異性抗体を作製するための技術には、限定するものではないが、異なる特異性を

50

有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖対の組換え共発現 (Milstein and Cuello, Nature 305:537 (1983) を参照)、および「ノブ・イン・ホール」操作 (例えば、米国特許第5,731,168号、および Atwell et al., J. Mol. Biol. 270:26 (1997) を参照) が含まれる。多重特異性抗体は、抗体Fc-ヘテロ二量体分子 (例えば、国際公開第2009/089004号を参照) を作製するための静電気操縦 (electrostatic steering) 効果を操作すること、2つ以上の抗体または断片を架橋すること (例えば、米国特許第4,676,980号、および Brennan et al., Science, 229:81 (1985) を参照)、ロイシンジッパーを使用して二重特異性抗体を産生すること (例えば、Kostelny et al., J. Immunol., 148 (5):1547-1553 (1992)、および国際公開第2011/034605号を参照)、軽鎖のミスペアリングの問題を回避するために共通の軽鎖技術を使用すること (例えば、国際公開第98/50431号を参照)、二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術を使用すること (例えば、Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) を参照)、および単鎖Fv (sFv) ダイマーを使用すること (例えば、Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) を参照)、および例えば、Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991) に記載されているように、三重特異性抗体を調製することによって作製されてもよい。

10

20

30

40

50

【0244】

例えば、「オクトパス抗体」を含め、3つ以上の抗原結合ドメインを有する操作抗体、またはDVD-Igもまた本明細書に含まれる (例えば、国際公開第2001/77342号および国際公開第2008/024715号を参照)。3つ以上の抗原結合ドメインを有する多重特異性抗体の他の例は、国際公開第2010/115589号、国際公開第2010/112193号、国際公開第2010/136172号、国際公開第2010/145792号および国際公開第2013/026831号に見出すことができる。二重特異性抗体またはその抗原結合断片はまた、TfRに結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1および別の異なる抗原、またはTfRおよび/もしくはPD1の2つの異なるエピトープに結合する第2の抗原結合ドメインとを含む「二重作用性Fab」または「DAF」を含む (例えば、米国特許第2008/0069820号および国際公開第2015/095539号を参照)。

【0245】

多重特異性抗体はまた、同じ抗原特異性の1つ以上の結合アームにドメインクロスオーバーを有する非対称の形態で、すなわち、VH/VLドメイン (例えば、国際公開第2009/080252号および国際公開第2015/150447号を参照)、CH1/CLドメイン (例えば、国際公開第2009/080253号を参照) または完全なFabアーム (例えば、国際公開第2009/080251号、国際公開第2016/016299号を参照、また、Schaefer et al., PNAS, 108 (2011) 1187-1191、および Klein et al., Mabs 8 (2016) 1010-20も参照) を交換することによって提供され得る。一態様では、多重特異性抗体は、cross-Fab断片を含む。用語「cross-Fab断片」または「xFab断片」または「クロスオーバーFab断片」は、重鎖および軽鎖の可変領域または定常領域のいずれかが交換されたFab断片を指す。cross-Fab断片は、軽鎖可変領域 (VL) および重鎖定常領域1 (CH1) から構成されるポリペプチド鎖と、重鎖可変領域 (VH) および軽鎖定常領域 (CL) から構成されるポリペプチド鎖とを含む。非対称Fabアームは、荷電または非荷電アミノ酸変異をドメイン接触面に導入して正しいFabペアリングを導くことによって操作することもできる。例えば、国際公開第2016/172485号を参照されたい。

【0246】

多重特異性抗体に対する様々なさらなる分子フォーマットが当技術分野で公知であり、

本明細書に含まれる（例えば、Spiess et al., Mol Immunol 67 (2015) 95-106を参照）。

【0247】

この目的のために有用であり得る二重特異性抗体フォーマットの例には、限定するものではないが、2つのscFv分子が可撓性リンカーによって融合された、いわゆる「BiTE」（二重特異性T細胞エンゲージャー）分子（例えば、国際公開第2004/106381号、国際公開第2005/061547号、国際公開第2007/042261号および国際公開第2008/119567号、Nagorsen and Bauerle, Exp Cell Res 317, 1255-1260 (2011)を参照）；ダイアボディ（Holliger et al., Prot. Eng. 9, 299-305 (1996)）およびその誘導体、例えば、タンデム型ダイアボディ（「TandAb」；Kipriyanov et al., J Mol Biol 293, 41-56 (1999)）；ダイアボディフォーマットに基づくが、さらに安定化させるためのC末端ジスルフィド架橋を特徴とする「DART」（二重親和性再標的化）分子（Johnson et al., J Mol Biol 399, 436-449 (2010)）、ならびに全ハイブリッドマウス／ラットIgG分子であるいわゆるトリオマブ（triomab）（Seimetz et al., Cancer Treat. Rev. 36, 458-467 (2010)に概説されている）が挙げられる。本明細書に含まれる特定のT細胞二重特異性抗体フォーマットは、国際公開第2013/026833号、国際公開第2013/026839号、国際公開第2016/020309号；Bacac et al., Oncoimmunology 5 (8) (2016) e1203498に記載されている。

10

20

【0248】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

a) TfRに特異的に結合する完全長抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖と、

b) PD1に特異的に結合する完全長抗体の第2の（修飾された）軽鎖および第2の（修飾された）重鎖であって、可変ドメインVLおよびVHが互いに置き換えられており、ならびに／または定常ドメインCLおよびCH1が互いに置き換えられている、第2の（修飾された）軽鎖および第2の（修飾された）重鎖とを含み、

30

c) 1つまたは2つのさらなる抗原（すなわち、第3および／または第4の抗原）に特異的に結合する1～4つの抗原結合ドメインが、a) および／またはb) の軽鎖または重鎖のC末端またはN末端にペプチド性リンカーを介して融合されている、三重特異性抗体または四重特異性抗体である。

【0249】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、

a) PD1に特異的に結合する完全長抗体の第1の軽鎖および第1の重鎖と、

b) TfRに特異的に結合する完全長抗体の第2の（修飾された）軽鎖および第2の（修飾された）重鎖であって、可変ドメインVLおよびVHが互いに置き換えられており、ならびに／または定常ドメインCLおよびCH1が互いに置き換えられている、第2の（修飾された）軽鎖および第2の（修飾された）重鎖とを含み、

40

c) 1つまたは2つのさらなる抗原（すなわち、第3および／または第4の抗原）に特異的に結合する1～4つの抗原結合ドメインが、a) および／またはb) の軽鎖または重鎖のC末端またはN末端にペプチド性リンカーを介して融合されている、三重特異性抗体または四重特異性抗体である。

【0250】

a) の抗体は、b) で報告されている修飾を含有せず、a) の重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【0251】

50

一態様では、三重特異性抗体または四重特異性抗体は、c) では、1つまたは2つのさらなる抗原に特異的に結合する1つまたは2つの抗原結合ドメインを含む。

【0252】

一態様では、抗原結合ドメインは、F a b断片、s c F v断片およびs c F a b断片の群から選択される。一態様では、抗原結合ドメインはF a b断片である。一態様では、抗原結合ドメインはs c F v断片である。一態様では、抗原結合ドメインはs c F a b断片である。

【0253】

一態様では、抗原結合ドメインは、a) および／またはb) の重鎖のC末端に融合されている。

【0254】

一態様では、三重特異性抗体または四重特異性抗体は、c) では、1つのさらなる抗原に特異的に結合する1つまたは2つの抗原結合ドメインを含む。

【0255】

一態様では、三重特異性抗体または四重特異性抗体は、c) では、第3の抗原に特異的に結合する2つの同一の抗原結合ドメインを含む。好ましい一実施形態では、そのような2つの同一の抗原結合ドメインは、同じペプチド性リンカーを介して、a) およびb) の重鎖のC末端にともに融合されている。好ましい一実施形態では、2つの同一の抗原結合ドメインは、F a b断片、s c F v断片またはs c F a b断片のいずれかである。

【0256】

一態様では、三重特異性抗体または四重特異性抗体は、c) では、第3および第4の抗原に特異的に結合する2つの抗原結合ドメインを含む。一実施形態では、上記2つの抗原結合ドメインは、同じペプチド接続部を介して、a) およびb) の重鎖のC末端にともに融合されている。好ましい一実施形態では、上記2つの抗原結合ドメインは、F a b断片、s c F v断片またはs c F a b断片のいずれかである。

【0257】

一態様では、二重特異性抗体は、

a) 第1の抗原に特異的に結合する(2つのF a b断片を含む)、抗体の2つの軽鎖および2つの重鎖、

b) 第2の抗原に特異的に結合する、抗体の2つの追加のF a b断片であって、ペプチド性リンカーを介してa) の重鎖のC末端またはN末端のいずれかにともに融合されている2つの追加のF a b断片を含む二重特異性四価抗体であり、

ここで、F a b断片では、以下の修飾が行われた

(i) a) の両F a b断片では、もしくはb) の両F a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hは、互いに置き換えられており、ならびに／もしくは定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられているか、または

(i i) a) の両F a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hは、互いに置き換えられており、定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられており、b) の両F a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hは、互いに置き換えられているか、もしくは定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられているか、または

(i i i) a) の両F a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hは、互いに置き換えられているか、もしくは定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられており、b) の両F a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hは、互いに置き換えられており、定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられているか、または

(i v) a) の両F a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hは、互いに置き換えられており、b) の両F a b断片では、定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられているか、または

(v) a) の両F a b断片では、定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられており、b) の両F a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hは、互いに置き換えられている。

10

20

30

40

50

【0258】

一態様では、上記追加のF a b断片は、ペプチド性リンカーを介して、a)の重鎖のC末端に、またはa)の重鎖のN末端のいずれかにともに融合されている。

【0259】

一態様では、上記追加のF a b断片は、ペプチド性リンカーを介して、a)の重鎖のC末端のいずれかにともに融合されている。

【0260】

一態様では、上記追加のF a b断片は、ペプチド接続部を介して、a)の重鎖のN末端にともに融合されている。

【0261】

一態様では、F a b断片では、以下の修飾が行われる：a)の両F a b断片では、またはb)の両F a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hは、互いに置き換えられており、かつ／または定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられている。

【0262】

一態様では、二重特異性抗体は、

a)第1の抗原に特異的に結合し、第1のV H-C H 1ドメイン対を含む第1の抗体の（修飾された）重鎖であって、上記重鎖のC末端に、上記第1の抗体の第2のV H-C H 1ドメイン対のN末端がペプチド性リンカーを介して融合されている第1の抗体の（修飾された）重鎖と、

b) a)の上記第1の抗体の2つの軽鎖と、

c)第2の抗原に特異的に結合し、第1のV H-C Lドメイン対を含む第2の抗体の（修飾された）重鎖であって、上記重鎖のC末端に、上記第2の抗体の第2のV H-C Lドメイン対のN末端がペプチド性リンカーを介して融合されている第2の抗体の（修飾された）重鎖と、

d) C L-C H 1ドメイン対をそれぞれ含む、c)の上記第2の抗体の2つの（修飾された）軽鎖とを含む四価抗体である。

【0263】

一態様では、二重特異性抗体は、

a)第1の抗原に特異的に結合する第1の完全長抗体の重鎖および軽鎖と、

b)第2の抗原に特異的に結合する第2の完全長抗体の重鎖および軽鎖であって、重鎖のN末端がペプチド性リンカーを介して軽鎖のC末端に接続されている第2の完全長抗体の重鎖および軽鎖とを含む。

【0264】

a)の抗体は、b)で報告されている修飾を含有せず、重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【0265】

一態様では、二重特異性抗体は、

a)第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体と、

b) V H 2ドメインおよびV L 2ドメインを含む、第2の抗原に特異的に結合するF v断片であって、両ドメインがジスルフィド架橋を介して互いに接続されているF v断片とを含み、

V H 2ドメインまたはV L 2ドメインのいずれか一方のみが、ペプチド性リンカーを介して、第1の抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖または軽鎖に融合されている。

【0266】

二重特異性抗体では、a)の重鎖および軽鎖は、単離された鎖である。

【0267】

一態様では、V H 2ドメインまたはV L 2ドメインのうち他方は、ペプチドリinkerを介して、第1の抗原に特異的に結合する完全長抗体の重鎖または軽鎖に融合されていない。

10

20

30

40

50

【0268】

いくつかの態様では、第1の軽鎖は、V LドメインとC Lドメインとを含み、第1の重鎖は、V Hドメインと、C H1ドメインと、ヒンジ領域と、C H2ドメインと、C H3ドメインとを含む。

【0269】

一態様では、二重特異性抗体は、

- a) 第1の抗原に特異的に結合する2つのF a b断片、
- b) C H1ドメインとC Lドメインとが互いに交換されている、第2の抗原に特異的に結合する1つのC r o s s F a b断片、
- c) 第1のF c領域重鎖および第2のF c領域重鎖を含む1つのF c領域を含む三価抗体であって、

10

2つのF a b断片のC H1ドメインのC末端が、重鎖F c領域ポリペプチドのN末端に接続されており、C r o s s F a b断片のV HドメインのN末端が、F a b断片のうちの1つのV HドメインのC末端に接続されている、三価抗体である。

【0270】

一態様では、二重特異性抗体は、

- a) 第1の抗原に特異的に結合する1つのF a b断片、
- b) C H1ドメインとC Lドメインとが互いに交換されている、第2の抗原に特異的に結合する2つのC r o s s F a b断片、
- c) 第1のF c領域重鎖および第2のF c領域重鎖を含む1つのF c領域を含む三価抗体であって、

20

F a b断片のC H1ドメインのC末端が、重鎖F c領域ポリペプチドのうちの1つのN末端に接続されており、2つのC r o s s F a b断片のうちの1つのC LドメインのC末端が、他方の重鎖F c領域ポリペプチドのN末端に接続されており、2つのC r o s s F a b断片のうちの他方のC H1ドメインのC末端が、F a b断片のV HドメインのN末端に、またはC r o s s F a b断片のV HドメインのN末端に接続されている、三価抗体である。

【0271】

一態様では、二重特異性抗体は、

- a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる二価完全長抗体と、
- b) 重鎖断片および軽鎖断片を含むV H2ドメインおよびV L2ドメインを含む、第2の抗原に特異的に結合するF a b断片であって、軽鎖断片内で、可変軽鎖ドメインV L2が、上記抗体の可変重鎖ドメインV H2によって置き換えられており、重鎖断片内で、可変重鎖ドメインV H2が、上記抗体の可変軽鎖ドメインV L2によって置き換えられているF a b断片とを含み、

30

重鎖F a b断片は、完全長抗体の重鎖のうちの1つのC H1ドメインと完全長抗体のそれぞれのF c領域との間に挿入され、軽鎖F a b断片のN末端は、重鎖F a b断片が挿入された完全長抗体の重鎖と対になっている、完全長抗体の軽鎖のC末端にコンジュゲートしている。

40

【0272】

一態様では、二重特異性抗体は、

- a) 第1の抗原に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる二価完全長抗体と、
- b) 重鎖断片および軽鎖断片を含むV H2ドメインおよびV L2ドメインを含む、第2の抗原に特異的に結合するF a b断片であって、軽鎖断片内で、可変軽鎖ドメインV L2が、上記抗体の可変重鎖ドメインV H2によって置き換えられており、重鎖断片内で、可変重鎖ドメインV H2が、上記抗体の可変軽鎖ドメインV L2によって置き換えられているF a b断片とを含み、F a b断片の重鎖断片のC末端は、完全長抗体の重鎖のうちの1つのN末端にコンジュゲートしており、F a b断片の軽鎖断片のC末端は、F a b断片の

50

重鎖断片がコンジュゲートしている、完全長抗体の重鎖と対になっている、完全長抗体の軽鎖のN末端にコンジュゲートしている。

【0273】

特定の一態様では、

- a) T f Rに特異的に結合する1つのF a b断片、
- b) C H 1ドメインとC Lドメインとが互いに交換されている、P D 1に特異的に結合する2つのC r o s s F a b断片、
- c) 第1のF c領域重鎖および第2のF c領域重鎖を含む1つのF c領域を含む三価抗体である二重特異性抗体が提供され、

F a b断片のC H 1ドメインのC末端は、重鎖F c領域ポリペプチドのうちの1つのN末端に接続されており、第1のC r o s s F a b断片のC H 1ドメインのC末端は、他方の重鎖F c領域ポリペプチドのN末端に接続されており、第2のC r o s s F a b断片のC H 1ドメインのC末端は、F a b断片のV HドメインのN末端に、またはC r o s s F a b断片のV LドメインのN末端に接続されている。追加の態様では、F cドメインは、I g G F cドメイン、特にI g G 1 F cドメインまたはI g G 4 F cドメインである。特定の態様では、二重特異性抗体の重鎖は、 γ 型 (I g G)、特に $\gamma 1$ 型のものである。別の特定の態様では、二重特異性抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ (κ) および／またはラムダ (λ) サブタイプのものである。

10

【0274】

特定の一態様では、

- a) V LドメインとV Hドメインとが互いに交換されている、P D 1に特異的に結合する2つのC r o s s F a b断片、
- b) T f Rに特異的に結合する1つのF a b断片、
- c) 第1のF c領域重鎖および第2のF c領域重鎖を含む1つのF c領域を含む三価抗体である二重特異性抗体が提供され、

第1のC r o s s F a b断片のC H 1ドメインのC末端は、重鎖F c領域ポリペプチドのうちの1つのN末端に接続されており、F a b断片のC H 1ドメインのC末端は、他方の重鎖F c領域ポリペプチドのN末端に接続されており、第2のC r o s s F a b断片のC H 1ドメインのC末端は、C r o s s F a b断片のV LドメインのN末端に、またはF a b断片のV HドメインのN末端に接続されている。追加の態様では、F cドメインは、I g G F cドメイン、特にI g G 1 F cドメインまたはI g G 4 F cドメインである。特定の態様では、二重特異性抗体の重鎖は、 γ 型 (I g G)、特に $\gamma 1$ 型のものである。別の特定の態様では、二重特異性抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ (κ) および／またはラムダ (λ) サブタイプのものである。

20

30

【0275】

一態様では、

- a) P D 1に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体であって、軽鎖内で、可変軽鎖ドメインV Lが、上記抗体の可変重鎖ドメインV Hによって置き換えられており、重鎖断片内で、可変重鎖ドメインV Hが、上記抗体の可変軽鎖ドメインV Lによって置き換えられている完全長抗体と、

- b) T f Rに特異的に結合するF a b断片とを含む三価抗体である二重特異性抗体が提供され、

40

重鎖F a b断片のN末端は、完全長抗体の2つの重鎖のうちの1つのC末端にコンジュゲートしている。追加の態様では、抗体および／またはF a b断片は、I g Gクラス、特にI g G 1またはI g G 4アイソタイプのものである。特定の態様では、二重特異性抗体の重鎖は、 γ 型 (I g G)、特に $\gamma 1$ 型のものである。別の特定の態様では、二重特異性抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ (κ) および／またはラムダ (λ) サブタイプのものである。

【0276】

一態様では、

50

a) P D 1 に特異的に結合し、2つの抗体重鎖および2つの抗体軽鎖からなる完全長抗体と、

b) C H 1 ドメインとC L ドメインとが互いに交換されている、T f R に特異的に結合するC r o s s F a b 断片とを含む三価抗体である二重特異性抗体が提供され、

重鎖C r o s s F a b 断片のN末端は、完全長抗体の2つの重鎖のうちの1つのC末端にコンジュゲートしている。

【0277】

7. 抗体バリエーション

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体のアミノ酸配列バリエーションが企図される。例えば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を変化させることが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列バリエーションは、抗体をコードするヌクレオチド配列に適切な修飾を導入することによって、またはペプチド合成によって調製されてもよい。そのような修飾には、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基からの欠失、および／または抗体のアミノ酸配列内の残基への挿入、および／または抗体のアミノ酸配列内の残基の置換が含まれる。欠失、挿入および置換の任意の組合せは、最終的なコンストラクトが、所望の特色、例えば、抗原結合を有する限り、最終的なコンストラクトに到達するように行うことができる。

【0278】

a) 置換バリエーション、挿入バリエーションおよび欠失バリエーション

ある特定の態様では、1つ以上のアミノ酸置換を有する抗体バリエーションが提供される。置換突然変異誘発のための目的の部位には、C D R およびF R が含まれる。保存的置換は、「好ましい置換」の見出しの下に表1に示されている。さらに実質的な変化は、「例示的な置換」という見出しの下に表2に提供され、アミノ酸側鎖クラスを参照して以下にさらに記載される通りである。アミノ酸置換を目的の抗体に導入し、その産物を所望の活性、例えば、抗原結合の保持／改善、免疫原性の低下、またはA D C C もしくはC D C の改善についてスクリーニングしてもよい。

10

20

30

40

50

表 2

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala(A)	Val;Leu;Ile	Val
Arg(R)	Lys;Gln;Asn	Lys
Asn(N)	Gln;His;Asp、Lys;Arg	Gln
Asp(D)	Glu;Asn	Glu
Cys(C)	Ser;Ala	Ser
Gln(Q)	Asn;Glu	Asn
Glu(E)	Asp;Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His(H)	Asn;Gln;Lys;Arg	Arg
Ile(I)	Leu;Val;Met;Ala;Phe;ノルロイシン	Leu
Leu(L)	ノルロイシン;Ile;Val;Met;Ala;Phe	Ile
Lys(K)	Arg;Gln;Asn	Arg
Met(M)	Leu;Phe;Ile	Leu
Phe(F)	Trp;Leu;Val;Ile;Ala;Tyr	Tyr
Pro(P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr(T)	Val;Ser	Ser
Trp(W)	Tyr;Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp;Phe;Thr;Ser	Phe
Val(V)	Ile;Leu;Met;Phe;Ala;ノルロイシン	Leu

10

20

30

40

50

【0279】

アミノ酸は、一般的な側鎖特性に従って分類され得る：

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg；
- (5) 鎖配向に影響を及ぼす残基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0280】

非保存的置換は、これらのクラスのうちの1つのメンバーを別のクラスのメンバーと交換することを伴う。

【0281】

ある種の置換バリエーションは、親抗体（例えば、ヒト化抗体またはヒト抗体）の1つ以上の超可変領域残基を置換することを伴う。一般に、さらなる試験のために選択される得られたバリエーションは、親抗体と比較して特定の生物学的特性（例えば、親和性の増加、免疫原性の低下）の修飾（例えば、改善）を有し、および／または親抗体の実質的に保持された特定の生物学的特性を有するであろう。例示的な置換バリエーションは、親和性成熟抗体であり、親和性成熟抗体は、例えば、本明細書に記載されるものなどのファージディスプレイに基づく親和性成熟技術を使用して簡便に生成され得る。要約すると、1つ以上。CDR残基が変異され、バリエーション抗体がファージ上に提示され、特定の生物活性（例えば、結合親和性）についてスクリーニングされる。

【0282】

例えば、抗体親和性を改善するために、CDRに対して変更（例えば、置換）が行われ得る。そのような変更は、CDR「ホットスポット」、すなわち、体細胞成熟プロセス中に高頻度で変異を受けるコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)を参照）、および／または抗原と接触する残基に対して行われ得、得られたバリエーションVHまたはVLは、結合親和性について試験される。二次ライブラリーを構築し、それから再選択することによる親和性成熟が、例えば、Hoogenboom et al. in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, (2001).)に記載されている。親和性成熟のいくつかの態様では、多様な方法（例えば、エラープライムPCR、鎖シャッフリング、またはオリゴヌクレオチド指定突然変異）のいずれかによって、成熟のために選択される可変遺伝子に多様性が導入される。次いで、二次ライブラリーが作製される。次いで、このライブラリーをスクリーニングして、所望の親和性を有する任意の抗体バリエーションを同定する。多様性を導入するための別の方法は、いくつかのCDR残基（例えば、一度に4～6残基）をランダム化するCDR指向性手法を伴う。抗原結合に関与するCDR残基は、例えば、アラニンスキャニング突然変異誘発またはモデル化を使用して特異的に同定され得る。特にCDR-H3およびCDR-L3が標的とされることが多い。

10

【0283】

ある特定の態様では、置換、挿入または欠失は、そのような変更が、抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、1つ以上のCDR内で生じてよい。例えば、結合親和性を実質的に低下させない保存的変更（例えば、本明細書に提供されるような保存的置換）が、CDRに対して行われてもよい。そのような変更は、例えば、CDR内の抗原接触残基の外側であってよい。上に提供された特定のバリエーションVH配列およびバリエーションVL配列では、各CDRは、変更されていないか、または1つ、2つもしくは3つ以下のアミノ酸置換を含有する。

20

【0284】

突然変異誘発の標的となり得る、抗体の残基または領域を同定するための有用な方法は、Cunningham and Wells (1989) Science, 244:1081-1085に記載されているように「アラニンスキャニング突然変異誘発」と呼ばれる。この方法では、残基または標的残基群（例えば、arg、asp、his、lysおよびgluなどの荷電残基）を同定し、中性の、または負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニンまたはポリアラニン）によって置き換えて、抗体と抗原との相互作用が影響を受けるかどうかを決定する。さらなる置換が、初期置換に対して機能的感受性を示すアミノ酸位置に導入されてもよい。代替的に、または追加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造を使用して、抗体と抗原との間の接触点を同定してもよい。そのような接触残基および隣接残基は、置換の候補として標的とされ得るか、または排除され得る。バリエーションは、所望の特性を含有するかどうかを決定するためにスクリーニングされ得る。

30

【0285】

アミノ酸配列挿入には、1残基から100以上の残基を含有するポリペプチドまでの長さの範囲のアミノ末端および／またはカルボキシル末端融合、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入が含まれる。末端挿入の例には、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入バリエーションには、酵素（例えば、ADEPT（抗体指向性酵素プロドラッグ療法）のための）または抗体の血清半減期を増加させるポリペプチドに対する抗体のN末端またはC末端への融合が含まれる。

40

【0286】

b) グリコシル化バリエーション

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体を変化させて、抗体がグリコシル化される程度を増加または低下させる。抗体へのグリコシル化部位の付加または欠失は、1つ

50

以上のグリコシル化部位が作り出されるか、または除去されるようにアミノ酸配列を変化させることによって簡便に達成され得る。

【0287】

抗体がFc領域を含む場合、それに結合したオリゴ糖を変化させてもよい。哺乳動物細胞によって産生された天然抗体は、N結合によってFc領域のCH2ドメインのAsn297に一般に結合された分枝状の二分岐オリゴ糖を典型的に含む。例えば、Wright et al., TIBTECH 15:26-32 (1997)を参照されたい。オリゴ糖には、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトースおよびシアル酸、ならびに二分岐オリゴ糖構造の「幹」のGlcNAcに結合したフコースが含まれ得る。いくつかの態様では、本発明の抗体におけるオリゴ糖の修飾は、特定の改善された特性を有する抗体バリエーションを作成するために行われ得る。

10

【0288】

一態様では、非フコシル化オリゴ糖、すなわち、Fc領域に（直接的または間接的に）結合したフコースを欠くオリゴ糖構造を有する抗体バリエーションが提供される。このような非フコシル化オリゴ糖（「アフコシル化された」オリゴ糖とも呼ばれる）は、特に、二分岐オリゴ糖構造の幹の第1のGlcNAcに結合したフコース残基を欠くN-結合型オリゴ糖である。一態様では、天然抗体または親抗体と比較して、Fc領域内の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加した抗体バリエーションが提供される。例えば、非フコシル化オリゴ糖の割合は、少なくとも約20%、少なくとも約40%、少なくとも約60%、少なくとも約80%、またはさらには約100%（すなわち、フコシル化オリゴ糖が存在しない）であり得る。非フコシル化オリゴ糖の割合は、例えば、国際公開第2006/082515号に記載されているように、MALDI-TOF質量分析によって測定された場合、Asn297に結合した全オリゴ糖の合計（例えば、複合体、ハイブリッドおよび高マンノース構造）と比較した、フコース残基を欠くオリゴ糖の（平均）量である。Asn297とは、Fc領域内の約297位（EU番号付けのFc領域残基）に位置するアスパラギン残基を指すが、Asn297は、抗体のわずかな配列差異に起因して、297位から上流または下流に±3アミノ酸、すなわち294位から300位の間に位置する場合もある。Fc領域内の非フコシル化オリゴ糖の割合が増加したそのような抗体は、改善されたFcγRIIIa受容体結合および／または改善されたエフェクター機能、特に改善されたADCC機能を有し得る。例えば、米国特許第2003/0157108号、米国特許第2004/0093621号を参照されたい。

20

30

【0289】

フコシル化が低減した抗体を産生することができる細胞株の例には、タンパク質フコシル化が欠損したLec13 CHO細胞 (Ripka et al., Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)；米国特許第2003/0157108号；および国際公開第2004/056312号、特に実施例11)、およびノックアウト細胞株、例えば、アルファ-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8、ノックアウトCHO細胞（例えば、Yamane-Ohnuki et al., Biotech. Bioeng. 87:614-622 (2004)；Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)；および国際公開第2003/085107号）、またはGDP-フコース合成もしくは輸送体タンパク質の活性が低減もしくは消失した細胞（例えば、米国特許第2004259150号、米国特許第2005031613号、米国特許第2004132140号、米国特許第2004110282号を参照）が挙げられる。

40

【0290】

さらなる態様では、抗体バリエーションには、例えば、抗体のFc領域に結合した二分岐オリゴ糖がGlcNAcによって二分されている二分されたオリゴ糖が提供される。そのような抗体バリエーションは、上記のように、低減されたフコシル化および／または改善されたADCC機能を有し得る。そのような抗体バリエーションの例は、例えば、Umana et al., Nat Biotechnol 17, 176-180 (1999)；Ferr

50

ara et al., *Biotechn Bioeng* 93, 851-861 (2006); 国際公開第99/54342号; 国際公開第2004/065540号、国際公開第2003/011878号に記載されている。

【0291】

Fc領域に結合したオリゴ糖内に少なくとも1つのガラクトース残基を有する抗体バリエーションも提供される。そのような抗体バリエーションは、改善されたCDC機能を有し得る。そのような抗体バリエーションは、例えば、国際公開第1997/30087号、国際公開第1998/58964号および国際公開第1999/22764号に記載されている。

【0292】

c) Fc領域バリエーション

ある特定の態様では、1つ以上のアミノ酸修飾が、本明細書に提供される抗体のFc領域に導入され、それによって、Fc領域バリエーションが生成され得る。Fc領域バリエーションは、1つ以上のアミノ酸位置にアミノ酸修飾（例えば、置換）を含むヒトFc領域配列（例えば、ヒトIgG₁ Fc領域、ヒトIgG₂ Fc領域、ヒトIgG₃ Fc領域またはヒトIgG₄ Fc領域）を含み得る。

【0293】

ある特定の態様では、本発明は、*in vivo*での抗体の半減期が重要であるが、特定のエフェクター機能（補体依存性細胞傷害（CDC）および抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）など）が不必要または有害である用途に対して望ましい候補にする、すべてではないがいくつかのエフェクター機能を有する抗体バリエーションを企図する。*in vitro*および／または*in vivo*細胞傷害性アッセイを行って、CDCおよび／またはADCC活性の低下／枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体（FcR）結合アッセイを行って、抗体がFcγR結合を欠くが（そのため、ADCC活性を欠く可能性が高い）、FcRn結合能力を保持することを確認することができる。ADCCを媒介するための主要な細胞であるNK細胞は、FcγRIIIのみを発現するのに対して、単球は、FcγRI、FcγRIIおよびFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFcR発現は、Ravetch and Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)の464頁の表3に要約されている。目的の分子のADCC活性を評価するための*in vitro*アッセイの非限定的な例は、米国特許第5,500,362号（例えば、Hellstrom, I. et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)を参照）およびHellstrom, I. et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (Bruggemann, M. et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987)を参照）に記載されている。あるいは、非放射性アッセイ方法を使用してもよい（例えば、フローサイトメトリーのためのACTI（商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Cell Technology, Inc. Mountain View, CA; およびCytotox 96（登録商標）非放射性細胞傷害性アッセイ（Promega, Madison, WI）を参照。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞には、末梢血単核細胞（PBMC）およびナチュラルキラー（NK）細胞が含まれる。代替的に、または追加的に、目的の分子のADCC活性は、*in vivo*で、例えば、Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998)に開示されているような動物モデルを対象に評価され得る。抗体がC1qに結合することができず、ひいてはCDC活性を欠くことを確認するために、C1q結合アッセイを行ってもよい。例えば、国際公開第2006/029879号および国際公開第2005/100402号のC1qおよびC3c結合ELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい（例えば、Gazzano-Santoro et al., *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M. S. et al., *Blood* 101:1045-1052 (2003); およびCragg, M. S. and M. J. Glennie, *Blood*

10

20

30

40

50

103:2738-2743 (2004) を参照)。FcRn 結合および *in vivo* クリアランス／半減期の決定も、当技術分野で公知の方法を使用して行うことができる（例えば、Petkova, S. B. et al., *Int'l. Immunol.* 18 (12):1759-1769 (2006)；国際公開第2013/120929号を参照）。

【0294】

エフェクター機能が低下した抗体には、Fc 領域残基238、265、269、270、297、327および329のうちの1つ以上の置換を含むものが含まれる（米国特許第6,737,056号）。そのようなFc変異体には、アミノ酸位置265、269、270、297および327のうちの2つ以上に置換を有するFc変異体（アラニンへの残基265および297の置換を有するいわゆる「DANA」Fc変異体（米国特許第7,332,581号）を含む）が含まれる。

【0295】

FcR に対する結合が改善または減少した特定の抗体バリエーションが記載されている。（例えば、米国特許第6,737,056号、国際公開第2004/056312号、および Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9 (2):6591-6604 (2001) を参照。）

【0296】

ある特定の態様では、抗体バリエーションは、ADCCを改善する1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc 領域の298、333および／または334位（残基のEU番号付け）での置換を有するFc領域を含む。

【0297】

ある特定の態様では、抗体バリエーションは、FcγR 結合を減少させる1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc 領域の234および235位（残基のEU番号付け）を有するFc領域を含む。一態様では、置換は、L234AおよびL235A（LALA）である。ある特定の態様では、抗体バリエーションは、ヒトIgG₁ Fc 領域に由来するFc領域に、D265Aおよび／またはP329Gをさらに含む。一態様では、置換は、ヒトIgG₁ Fc 領域に由来するFc領域内のL234A、L235AおよびP329G（LALA-PG）である。（例えば、国際公開第2012/130831号を参照）。別の態様では、置換は、ヒトIgG₁ Fc 領域に由来するFc領域内のL234A、L235AおよびD265A（LALA-DA）である。

【0298】

いくつかの態様では、例えば、米国特許第6,194,551号、国際公開第99/51642号、および Idusogie et al., *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000) に記載されているように、C1q 結合および／または補体依存性細胞傷害（CDC）の変化（すなわち、改善または減少のいずれか）をもたらす変更がFc領域に対して行われる。

【0299】

半減期が増加し、胎児への母体IgGの移行を担う新生児型Fc受容体（FcRn）への結合が改善された抗体（Guyer et al., *J. Immunol.* 117:587 (1976) および Kim et al., *J. Immunol.* 24:249 (1994)）は、米国特許第2005/0014934号（Hinton et al.）に記載されている。それらの抗体は、FcRn へのFc領域の結合を改善する1つ以上の置換をFc領域内に有するFc領域を含む。そのようなFcバリエーションには、Fc領域残基：238、252、254、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424または434のうちの1つ以上に置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものが含まれる（例えば、米国特許第7,371,826号；Dall'Aquila, W. F., et al., *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 23514-23524 を参照）。

【0300】

マウスFc-マウスFcRn相互作用にとって重要なFc領域残基は、部位特異的突然変異誘発によって同定されている（例えば、Dall'Acqua, W. F., et al. J. Immunol. 169 (2002) 5171-5180を参照）。残基I253、H310、H433、N434およびH435（残基のEU番号付け）が相互作用に関与する（Medesan, C., et al., Eur. J. Immunol. 26 (1996) 2533; Firan, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993; Kim, J. K., et al., Eur. J. Immunol. 24 (1994) 542）。残基I253、H310およびH435が、ヒトFcとマウスFcRnの相互作用に重要であることが見出された（Kim, J. K., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2819）。ヒトFc-ヒトFcRn複合体の試験では、残基I253、S254、H435およびY436が相互作用に重要であることが示されている（Firán, M., et al., Int. Immunol. 13 (2001) 993; Shields, R. L., et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604）。Yeung, Y. A., et al. (J. Immunol. 182 (2009) 7667-7671) では、残基248~259、および301~317、および376~382、および424~437の様々な変異体が報告され、調査されている。

10

【0301】

ある特定の態様では、抗体バリエーションは、FcRn結合を減少させる1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の253位および／または310位および／または435位（残基のEU番号付け）に置換を有するFc領域を含む。ある特定の態様では、抗体バリエーションは、253、310および435位にアミノ酸置換を有するFc領域を含む。一態様では、置換は、ヒトIgG1 Fc領域に由来するFc領域内のI253A、H310AおよびH435Aである。例えば、Grevys, A., et al., J. Immunol. 194 (2015) 5497-5508を参照されたい。

20

【0302】

ある特定の態様では、抗体バリエーションは、FcRn結合を減少させる1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の310位および／または433位および／または436位（残基のEU番号付け）に置換を有するFc領域を含む。ある特定の態様では、抗体バリエーションは、310位、433位および436位にアミノ酸置換を有するFc領域を含む。一態様では、置換は、ヒトIgG1 Fc領域に由来するFc領域内のH310A、H433AおよびY436Aである。（例えば、国際公開第2014/177460号を参照）。

30

【0303】

ある特定の態様では、抗体バリエーションは、FcRn結合を増加させる1つ以上のアミノ酸置換、例えば、Fc領域の252位および／または254位および／または256位（残基のEU番号付け）に置換を有するFc領域を含む。ある特定の態様では、抗体バリエーションは、252、254および256位にアミノ酸置換を有するFc領域を含む。一態様では、置換は、ヒトIgG1 Fc領域に由来するFc領域内のM252Y、S254TおよびT256Eである。Fc領域バリエーションの他の例に関しては、Duncan & Winter, Nature 322: 738-40 (1988); 米国特許第5,648,260号; 米国特許第5,624,821号; および国際公開第94/29351号も参照されたい。

40

【0304】

本明細書に報告されるような抗体の重鎖のC末端は、アミノ酸残基PGKで終わる完全なC末端であり得る。重鎖のC末端は、C末端アミノ酸残基のうちの1つまたは2つが除去された、短縮されたC末端であり得る。好ましい一態様では、重鎖のC末端は、短縮されたC末端で終わるPGである。本明細書に報告される全態様のうちの一態様では、本明細書で指定されるC末端CH3ドメインを含む重鎖を含む抗体は、C末端グリシン-リジ

50

ンジペプチドを含む（G 4 4 6 および K 4 4 7、アミノ酸位置の E U インデックス番号付け）。本明細書に報告される全態様のうちの一態様では、本明細書で指定される C 末端 C H 3 ドメインを含む重鎖を含む抗体は、C 末端グリシン残基を含む（G 4 4 6、アミノ酸位置の E U インデックス番号付け）。

【0305】

d) システイン操作抗体バリエーション

ある特定の態様では、システイン操作抗体、例えば、抗体の1つ以上の残基がシステイン残基によって置換されている T H I O M A B（商標）抗体を作成することが望ましい場合がある。特定の態様では、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位で生じる。これらの残基をシステインによって置換することにより、反応性チオール基は、それによって抗体のアクセス可能な部位に配置され、本明細書にさらに記載されるように、抗体を薬物部分またはリンカー薬物部分などの他の部分にコンジュゲートしてイムノコンジュゲートを作成するために使用され得る。システイン操作抗体は、例えば、米国特許第 7, 5 2 1, 5 4 1 号、第 8, 3 0, 9 3 0 号、第 7, 8 5 5, 2 7 5 号、第 9, 0 0 0, 1 3 0 号または国際公開第 2 0 1 6 0 4 0 8 5 6 号に記載されているように生成され得る。

【0306】

e) 抗体誘導体

ある特定の態様では、本明細書に提供される抗体は、当技術分野で公知であり、かつ容易に入手可能な追加の非タンパク質性部分を含有するようにさらに修飾され得る。抗体の誘導体化に適した部分には、限定するものではないが、水溶性ポリマーが含まれる。水溶性ポリマーの非限定的な例には、限定するものではないが、ポリエチレングリコール（P E G）、エチレングリコール／プロピレングリコールの共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリー 1, 3 - ジオキソラン、ポリー 1, 3, 6 - トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸（ホモポリマーまたはランダム共重合体のいずれか）、およびデキストランまたはポリ（*n*-ビニルピロリドン）ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコールホモポリマー、ポリプロピレンオキシド／エチレンオキシド共重合体、ポリオキシエチル化ポリオール（例えば、グリセロール）、ポリビニルアルコール、ならびにこれらの混合物が挙げられる。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中でのその安定性に起因して、製造時に有利であり得る。該ポリマーは、任意の分子量であってよく、分枝状であっても、分枝状でなくてもよい。抗体に結合するポリマーの数は変化してもよく、複数のポリマーが結合している場合、それらは同じ分子でも異なる分子でもよい。一般に、誘導体化のために使用されるポリマーの数および／またはタイプは、限定するものではないが、改善される抗体の特定の特性または機能、抗体誘導体が規定の条件下で治療に使用されるかどうかなどを含む考慮事項に基づいて決定され得る。

【0307】

8. イムノコンジュゲート

本発明はまた、本明細書では、細胞傷害性剤、化学療法剤、薬物、増殖阻害剤、毒素（例えば、タンパク質毒素、細菌、真菌、植物もしくは動物起源の酵素活性毒素、またはその断片）または放射性同位体などの1つ以上の治療剤にコンジュゲートされた（化学的に結合された）、T f R に特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1 に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を含むイムノコンジュゲートを提供する。

【0308】

一態様では、イムノコンジュゲートは、上記の治療剤のうちの1つ以上に抗体がコンジュゲートしている抗体-薬物コンジュゲート（A D C）である。抗体は、リンカーを使用して、治療剤のうちの1つ以上に典型的にコンジュゲートしている。治療剤および薬物およびリンカーの例を含め、A D C 技術の概説が、P h a r m a c o l R e v i e w 6 8 : 3 - 1 9（2016）に記載されている。

【0309】

別の態様では、イムノコンジュゲートは、限定するものではないが、ジフテリアA鎖、ジフテリア毒素の非結合活性断片、外毒素A鎖（緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）由来）、リシンA鎖、アブリンA鎖、モデシンA鎖、アルファーサルシン、シナアブラギリ（*Aleurites fordii*）タンパク質、ジアンチンタンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（*Phytolacca americana*）タンパク質（PAPI、PAPIIおよびPAP-S）、ツルレイシ（*Momordica charantia*）阻害剤、クルシン、クロチン、サボンソウ（*Saponaaria officinalis*）阻害剤、ゲロニン、ミトゲリン、レストリクトシン、フェノマイシン、エノマイシンおよびトリコテセンを含む酵素活性毒素またはその断片にコンジュゲートされた、本明細書に記載の抗体を含む。

10

【0310】

別の態様では、イムノコンジュゲートは、放射性原子にコンジュゲートされて放射性コンジュゲートを形成する、本明細書に記載の抗体を含む。放射性コンジュゲートの生成には、様々な放射性同位体が利用可能である。例には、 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 、およびLuの放射性同位体が挙げられる。放射性コンジュゲートは、検出のために使用される場合、シンチグラフ検査用の放射性原子、例えば、 Tc^{99m} もしくは、 I^{123} 、または核磁気共鳴（NMR）イメージング（磁気共鳴イメージング、*mri*としても知られる）のためのスピン標識、ここでも、例えば、ヨウ素-123、ヨウ素-131、インジウム-111、フッ素-19、炭素-13、窒素-15、酸素-17、ガドリニウム、マンガンまたは鉄を含み得る。

20

【0311】

抗体と細胞傷害性剤とのコンジュゲートは、様々な二官能性タンパク質カップリング剤、例えば、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオ)プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル-4-(N-マレイミドメチル)シクロヘキサン-1-カルボキシレート（SMCC）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（ジメチルアジピミデートHClなど）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジルなど）、アルデヒド（グルタルアルデヒドなど）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサジアミンなど）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミンなど）、ジイソシアネート（トルエン2, 6-ジイソシアネートなど）、およびビス活性フッ素化合物（1, 5-ジフルオロ-2, 4-ジニトロベンゼンなど）を使用して作製され得る。例えば、リシンイムノトキシンは、Vittetta et al., Science 238: 1098 (1987)に記載されているように調製することができる。炭素14標識1-イソチオシアナトベンジル-3-メチルジエチレントリアミン五酢酸（MX-DTPA）は、抗体への放射性ヌクレオチドのコンジュゲーションのための例示的なキレート剤である。国際公開第94/11026号を参照されたい。リンカーは、細胞内で細胞傷害性薬物の放出を促進する「開裂性リンカー」であってよい。例えば、酸不安定リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、光不安定リンカー、ジメチルリンカーまたはジスルフィド含有リンカー（Chari et al., Cancer Res. 52: 127-131 (1992)；米国特許第5, 208, 020号）を使用してもよい。

30

40

【0312】

本明細書のイムノコンジュゲートまたはADCは、限定するものではないが、市販の（例えば、Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL, U.S.A製）BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、スルホ-EMCS、スルホ-GMBS、スルホ-KMUS、スルホ-MBS、スルホ-SIAB、スルホ-SMCC、およびスルホ-SMPB、ならびにSVSB（スクシンイミジル-（4-ビニルスルホン）ベンゾエート）を含む架橋試薬を用いて調製されたそのようなコンジュゲートを明確に企図するが、これらに限定されない。

50

【0313】

B. 組換え方法および組成物

抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号に記載されているように、組換え方法および組成物を使用して産生され得る。これらの方法のために、抗体をコードする1つ以上の単離された核酸が提供される。

【0314】

天然抗体または天然抗体断片の場合、2つの核酸が必要とされ、1つは、軽鎖またはその断片用であり、もう1つは、重鎖またはその断片用である。そのような核酸は、抗体のVLを含むアミノ酸配列および／またはVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の軽鎖および／または重鎖）をコードする。これらの核酸は、同じ発現ベクター上にあっても、異なる発現ベクター上にあってもよい。

【0315】

ヘテロ二量体重鎖を有する二重特異性抗体の場合、4つの核酸が必要とされ、1つは第1の軽鎖用、1つは第1のヘテロモノマーFc領域ポリペプチドを含む第1の重鎖用、1つは第2の軽鎖用、1つは第2のヘテロモノマーFc領域ポリペプチドを含む第2の重鎖用である。4つの核酸は、1つ以上の核酸分子または発現ベクターに含まれ得る。このような核酸は、第1のVLを含むアミノ酸配列、および／または第1のヘテロモノマーFc領域を含む第1のVHを含むアミノ酸配列、および／または第2のVLを含むアミノ酸配列、および／または抗体の第2のヘテロモノマーFc領域を含む第2のVHを含むアミノ酸配列（例えば、抗体の第1および／もしくは第2の軽鎖ならびに／または第1および／もしくは第2の重鎖）をコードする。これらの核酸は、同じ発現ベクター上にあっても、異なる発現ベクター上にあってもよく、通常、これらの核酸は、2つまたは3つの発現ベクター上に位置し、すなわち、1つのベクターがこれらの核酸のうちの複数を含むことができる。これらの二重特異性抗体の例は、CrossMabである（例えば、Schaefer, W. et al., PNAS, 108 (2011) 11187-1191を参照）。例えば、EUIンデックス番号付けによれば、ヘテロモノマー重鎖のうちの1つは、いわゆる「ノブ変異」（T366W、および任意にS354CまたはY349Cのうち1つ）を含み、他方は、いわゆる「ホール変異」（T366S、L368AおよびY407V、ならびに任意にY349CまたはS354C）を含む（例えば、Carter, P. et al., Immunotechnol. 2 (1996) 73を参照）。

【0316】

一態様では、本明細書に報告される方法で使用する抗体をコードする単離された核酸が提供される。

【0317】

一態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を作製する方法が提供され、方法は、抗体の発現に適した条件下で、上に提供された抗体をコードする核酸を含む宿主細胞を培養すること、および任意に、抗体を宿主細胞（または宿主細胞培地）から回収することを含む。

【0318】

TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体の組換え産生のために、例えば、上記のような抗体をコードする核酸が単離され、宿主細胞内のさらなるクローニングおよび／または発現のために1つ以上のベクターに挿入される。そのような核酸は、従来の手順を使用して（例えば、抗体の重鎖および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）容易に単離および配列決定され得るか、または組換え方法によって産生され得るか、または化学合成によって得られ得る。

【0319】

抗体をコードするベクターのクローニングまたは発現のための好適な宿主細胞には、本

10

20

30

40

50

明細書に記載の原核細胞または真核細胞が含まれる。例えば、特にグリコシル化およびFcエフェクター機能が必要とされていない場合、抗体は細菌内で産生されてもよい。細菌内の抗体断片およびポリペプチドの発現については、例えば、米国特許第5,648,237号、米国特許第5,789,199号および米国特許第5,840,523号を参照されたい。(大腸菌内の抗体断片の発現を記載しているCharlton, K. A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B. K. C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254も参照。)発現後、抗体は、可溶型画分中の細菌細胞ペーストから単離されてもよく、さらに精製され得る。

【0320】

原核生物に加えて、グリコシル化経路が「ヒト化」されており、部分的または完全なヒトのグリコシル化パターンを有する抗体の産生をもたらす真菌株および酵母株を含む糸状菌または酵母などの有用真核微生物も、抗体をコードするベクターのための好適なクローニング宿主または発現宿主である。Gerngross, T. U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; および Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215. を参照されたい。

【0321】

(グリコシル化) 抗体の発現に適した宿主細胞は、多細胞生物(無脊椎動物および脊椎動物)にも由来する。無脊椎動物細胞の例には、植物細胞および昆虫細胞が挙げられる。数多くのバキュロウイルス株が同定されており、これらは、特にヨトウガ(*Spodoptera frugiperda*)細胞のトランスフェクションのために、昆虫細胞と組み合わせて使用され得る。

【0322】

植物細胞培養物も、宿主として利用することができる。例えば、米国特許第5,959,177号、米国特許第6,040,498号、米国特許第6,420,548号、米国特許第7,125,978号および米国特許第6,417,429号(トランスジェニック植物内で抗体を産生するためのPLANTIBODIES(商標)技術を記載している)を参照されたい。

【0323】

脊椎動物細胞も、宿主として使用され得る。例えば、懸濁液中で増殖するように適合されている哺乳動物細胞株が有用であり得る。有用な哺乳動物宿主細胞株の他の例には、SV40によって形質転換されたサル腎臓CV1株(COS-7); ヒト胎児由来腎臓株(例えば、Graham, F. L. et al., *J. Gen. Virol.* 36 (1977) 59-74に記載されているような293細胞または293T細胞); ベビーハムスター腎臓細胞(BHK); マウスセルトリ細胞(例えば、Mather, J. P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252に記載されているようなTM4細胞); サル腎臓細胞(CV1); アフリカミドリザル腎臓細胞(VERO-76); ヒト子宮頸癌細胞(HELA); イヌ腎臓細胞(MDCK; バッファローラット肝臓細胞(BRL 3A); ヒト肺細胞(W138); ヒト肝臓細胞(Hep G2); マウス乳房腫瘍(MMT 060562); TRI細胞(例えば、Mather, J. P. et al., *Annals N. Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68に記載されているような); MRC 5細胞; およびFS4細胞がある。他の有用な哺乳動物宿主細胞株には、DHFR-CHO細胞(Urlaub, G. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220)を含むチャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞、ならびに骨髓腫細胞株、例えば、Y0、NS0およびSp2/0が含まれる。抗体産生に適した特定の哺乳動物宿主細胞株の概説については、例えば、Yazaki, P. and Wu, A. M., *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B. K. C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0324】

一態様では、宿主細胞は、真核細胞、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞またはリンパ系細胞（例えば、Y0、NS0、Sp20細胞）である。

【0325】

C. アッセイ

本明細書に提供される、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体は、当技術分野で公知の様々なアッセイによって、それらの物理的／化学的特性および／または生物活性について同定、スクリーニングまたは特徴付けされ得る。

【0326】

1. 結合アッセイおよび他のアッセイ

一態様では、本発明の抗体は、例えば、ELISA、ウエスタンブロットなどのような公知の方法によって、その抗原結合活性について試験される。

【0327】

別の態様では、競合アッセイを使用して、TfRへの結合についてマウス抗ヒトトランスフェリン受容体抗体128.1（可変領域配列については、国際公開第93／01819号ならびに配列番号64および65を参照）と競合する抗体を同定してもよい。ある特定の態様では、そのような競合抗体は、マウス抗ヒトトランスフェリン受容体抗体128.1によって結合される同じエピトープ（例えば、線状エピトープまたは立体配座エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法が、Morris（1996）“Epitope Mapping Protocols”，in Methods in Molecular Biology vol. 66（Humana Press，Totowa，NJ）に提供されている。

【0328】

例示的な競合アッセイでは、固定化されたTfRが、TfRに結合する第1の標識化抗体（例えば、マウス抗ヒトトランスフェリン受容体抗体128.1）と、TfRへの結合について第1の抗体と競合する能力について試験されている第2の非標識化抗体とを含む溶液中でインキュベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在し得る。対照として、固定化されたTfRは、第1の標識化抗体を含むが第2の非標識化抗体は含まない溶液中でインキュベートされる。TfRへの第1の抗体の結合を許容する条件下でインキュベーションした後、過剰の未結合抗体が除去され、固定化されたTfRに関連する標識の量が測定される。固定化されたTfRに関連する標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、第2の抗体がTfRへの結合について第1の抗体と競合していることを示している。Harlow and Lane（1988）Antibodies：A Laboratory Manual ch. 14（Cold Spring Harbor Laboratory，Cold Spring Harbor，NY）を参照されたい。

【0329】

別の態様では、競合アッセイを使用して、PD1への結合について、例えば、ニボルマブまたはペンブロリズマブと競合する抗体を同定してもよい。ある特定の態様では、そのような競合抗体は、例えば、ニボルマブまたはペンブロリズマブによって結合される同じエピトープ（例えば、線状エピトープまたは立体配座エピトープ）に結合する。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的な方法が、Morris（1996）“Epitope Mapping Protocols”，in Methods in Molecular Biology vol. 66（Humana Press，Totowa，NJ）に提供されている。

【0330】

例示的な競合アッセイでは、固定化されたPD1が、PD1に結合する第1の標識化抗体（例えば、ニボルマブまたはペンブロリズマブ）と、PD1への結合について第1の抗体と競合する能力について試験されている第2の非標識化抗体とを含む溶液中でインキュ

10

20

30

40

50

ベートされる。第2の抗体は、ハイブリドーマ上清中に存在し得る。対照として、固定化されたPD1は、第1の標識化抗体を含むが第2の非標識化抗体は含まない溶液中でインキュベートされる。PD1への第1の抗体の結合を許容する条件下でインキュベーションした後、過剰の未結合抗体が除去され、固定化されたPD1に関連する標識の量が測定される。固定化されたPD1に関連する標識の量が、対照試料と比較して試験試料中で実質的に減少している場合、それは、第2の抗体がPD1への結合について第1の抗体と競合していることを示している。Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch. 14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY)を参照されたい。

10

【0331】

別の態様では、二重特異性抗TfR抗PD1抗体のアビディティ増強結合の評価を可能にするJurkat細胞アッセイが提供される。そのために、PD1を様々なレベルで発現するNFAT-bla Jurkat細胞が、レンチウイルスによってPD1発現コンストラクトをそれらに形質導入することによって生成される。Jurkat細胞は、二重特異性抗体と接触させられ、標識される。結合がPD1発現レベルに依存するかどうかを評価するために、フローサイトメトリーが使用される。このアッセイは、実施例5にさらに詳細に記載される。

【0332】

2. 活性アッセイ

一態様では、生物活性を有する、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体を同定するためのアッセイが提供される。生物活性には、例えば、様々な免疫細胞、特にT細胞の活性化および／もしくは増殖を増強する能力、IFN γ もしくはTNF- α などの免疫調節サイトカインの分泌、PD1経路のブロック、または腫瘍細胞の殺傷が含まれ得る。in vivoおよび／またはin vitroでそのような生物活性を有する抗体も提供される。

20

【0333】

ある特定の態様では、本発明の抗体は、そのような生物活性について試験される。一態様では、1つの個体（ドナーX）由来のリンパ球から、別の個体（ドナーY）由来のリンパ球までの活性化を測定する免疫細胞アッセイが提供される。混合リンパ球反応（MLR）は、リンパ球エフェクター細胞に対するPD1経路をブロックする効果を示すことができる。アッセイ中のT細胞を、本発明の二重特異性抗体の存在下または非存在下での細胞傷害性グランザイムB放出によって測定される活性化について試験した。このアッセイは、実施例13にさらに詳細に記載される。

30

【0334】

別の態様では、PD-L1発現CHO-K1細胞とPD1発現Jurkat-PD1-NFAT細胞との間のTCRシグナル伝達のPD1/PD-L1媒介阻害のブロックを測定するPD1/PD-L1ブロック共培養アッセイが提供される。PD1シグナル伝達によるTCR活性化の阻害は、レポーター遺伝子の発現の検出によって測定される。このアッセイは、実施例4にさらに詳細に記載される。

40

【0335】

別の態様では、細胞内への二重特異性抗TfR抗PD1抗体の内部移行を決定することを可能にする、活性化T細胞に基づく内部移行アッセイが提供される。そのために、CD3およびCD28活性化CD4⁺T細胞を4℃で抗体に最初に曝露し、その後、37℃でインキュベートして内部移行を可能にし、続いて、細胞を染色および固定する。対照として、各試料の半分を直ちに洗浄し、抗体への4℃曝露後に染色および固定する（4℃での内部移行は無視できる）。次いで、二重特異性抗TfR抗PD1抗体に特異的に結合する蛍光標識抗体を使用して、両条件（4℃および37℃）の細胞を染色する。フローサイトメトリーを使用して蛍光を検出する。次いで、細胞と対照細胞との間で、幾何平均蛍光強

50

度（GMFI）、および蛍光標識CD4⁺T細胞の頻度を比較する。以下の式を用いて、内部移行の割合を計算する：

$$\text{内部移行}\% = 100 - \left(\left(\text{GMFI}_{\text{蛍光性CD4}^+\text{T細胞}_{37^\circ\text{C}}} \div \text{GMFI}_{\text{蛍光性CD4}^+\text{T細胞}_{4^\circ\text{C}}} \right) * 100 \right)$$

【0336】

このアッセイは、実施例6にさらに詳細に記載される。

【0337】

D. 診断および検出のための方法および組成物

ある特定の態様では、本明細書に提供される、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体のいずれかが、生物学的試料中のTfRまたはPD1の存在を検出するために有用である。本明細書で使用される用語「検出する」は、定量的または定性的な検出を包含する。ある特定の態様では、生物学的試料は、免疫細胞浸潤物もしくはT細胞浸潤物などの細胞もしくは組織、または腫瘍組織を含む。

【0338】

一態様では、診断または検出の方法に使用するための、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体が提供される。さらなる態様では、生物学的試料中の、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体の存在を検出する方法が提供される。ある特定の態様では、方法は、TfRおよび／またはPD1への、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1抗体に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体の結合を許容する条件下で、生物学的試料と、本明細書に記載される、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1抗体に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体とを接触させること、ならびにTfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、TfRおよび／またはPD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体の間で複合体が形成されるかどうかを検出することを含む。このような方法は、*in vitro*法または*in vivo*法であってよい。

【0339】

ある特定の態様では、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインを含む標識された二重特異性抗体が提供される。標識には、限定するものではないが、直接検出される標識または部分（蛍光性、発色団、高電子密度、化学発光および放射性標識など）、および例えば、酵素反応または分子相互作用によって間接的に検出される酵素またはリガンドなどの部分が含まれる。例示的な標識には、限定するものではないが、放射性同位体³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³Hおよび¹³¹I、フルオロフォア、例えば、希土類キレートまたはフルオレセインおよびその誘導体、ローダミンおよびその誘導体、ダンシル、ウンベリフェロン、ルセリフェラーゼ、例えば、ホタルルシフェラーゼおよび細菌ルシフェラーゼ（米国特許第4,737,456号）、ルシフェリン、2,3-ジヒドロフタラジンジオン類、ホースラディッシュペルオキシダーゼ（HRP）、アルカリホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、グルコアミラーゼ、リゾチーム、糖類オキシダーゼ、例えば、グルコースオキシダーゼ、ガラクトースオキシダーゼ、およびグルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ、色素前駆体、例えば、HRP、ラクトペルオキシダーゼまたはミクロペルオキシダーゼ、ビオチン／アビジン、スピン標識、バクテリオファージ標識、安定したフリーラジカルなどを酸化するために過酸化水素を使用する酵素とカップリングされた複素環式オキシダーゼ、例えば、ウリカーゼおよびキサンチンオキシダーゼが含まれる。

【0340】

E. 薬学的組成物

さらなる態様では、例えば、以下の治療方法のいずれかに使用するための、本明細書に提供される抗体のいずれかを含む薬学的組成物が提供される。一態様では、薬学的組成物は、本明細書に提供される抗体のいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む。別の態様では、薬学的組成物は、例えば、以下に記載されるように、本明細書に提供される抗体のいずれかと、少なくとも1つの追加の治療剤とを含む。

【0341】

本明細書に記載される、TfRに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、PD1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体の薬学的組成物は、所望の純度を有するそのような抗体を、凍結乾燥組成物または水溶液の形態で、1つ以上の任意の薬学的に許容される担体 (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)) と混合することによって調製される。薬学的に許容される担体は、一般に、使用される投与量および濃度でレシピエントに対して非毒性であり、限定するものではないが、バッファー、例えば、ヒスチジン、ホスフェート、シトレート、アセテートおよび他の有機酸；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；防腐剤（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド；ヘキサメトニウムクロライド；ベンザルコニウムクロライド；ベンゼトニウムクロライド；フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール；アルキルパラベン、例えば、メチルまたはプロピルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；およびm-クレゾールなど）；低分子量（約10残基未満）のポリペプチド；タンパク質、例えば、血清アルブミン、ゼラチンもしくは免疫グロブリン；親水性ポリマー、例えば、ポリビニルピロリドン；アミノ酸、例えば、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニンもしくはリジン；単糖類、二糖類、およびグルコース、マンノースもしくはデキストリンを含む他の炭水化物；キレート剤、例えば、EDTA；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロースもしくはソルビトール；塩形成対イオン、例えば、ナトリウム；金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）；ならびに／または非イオン性界面活性剤、例えば、ポリエチレングリコール（PEG）を含む。本明細書の例示的な薬学的に許容される担体には、間質性 (interstitial) 薬物分散剤、例えば、可溶型中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質 (sHASEGP)、例えば、rHuPH20 (HYLENEX (登録商標)、Halozyme, Inc.) などのヒト可溶型PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質がさらに含まれる。rHuPH20を含む、特定の例示的なsHASEGPおよび使用方法は、米国特許公開第2005/0260186号および米国特許公開第2006/0104968号に記載されている。一態様では、sHASEGPは、1つ以上の追加のグリコサミノグリカナーゼ、例えば、コンドロイチナーゼと組み合わせられる。

【0342】

例示的な凍結乾燥された抗体組成物は、米国特許第6,267,958号に記載されている。水性抗体組成物には、米国特許第6,171,586号および国際公開第2006/044908号に記載されるものが含まれ、後者の組成物はヒスチジン-アセテートバッファーを含む。

【0343】

本明細書の薬学的組成物はまた、治療される特定の適応症に必要な複数の活性成分、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない相補的活性を有するものを含有し得る。ある特定の態様では、追加の治療剤は、免疫調節剤、細胞増殖抑制剤、細胞接着の阻害剤、細胞傷害性剤、細胞アポトーシスの活性化因子、またはアポトーシス誘導因子に対する細胞の感受性を増加させる薬剤である。好ましい態様では、追加の治療剤は、抗がん剤、例えば、微小管破壊剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNAインターカレーター、アルキル化剤、ホルモン療法、キナーゼ阻害剤、受容体アンタゴニスト、腫瘍細胞アポトーシスの活性化因子、または抗血管新生剤である。そのような活性成分は、意図された目的に有効な量で組み合わせられて好適に存在する。活性成分はまた、例えば、コアセルベーション技

10

20

30

40

50

術によって、もしくは界面重合によって調製されたマイクロカプセル、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースもしくはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ（メチルメタクリレート）マイクロカプセル、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子およびナノカプセル）、またはマイクロエマルジョンに封入され得る。そのような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0344】

徐放性用の薬学的組成物が調製され得る。徐放性調製物の好適な例には、抗体を含有する固体疎水性ポリマーの半透性マトリクスが含まれ、これらのマトリクスは、成形物品、例えば、フィルムまたはマイクロカプセルの形態である。

【0345】

*in vivo*での投与に使用される薬学的組成物は、一般に滅菌されている。無菌状態は、例えば、滅菌濾過膜を通した濾過によって容易に達成され得る。

【0346】

F. 治療方法および投与経路

本明細書に提供される抗TfR抗PD1二重特異性抗体のいずれかは、治療方法に使用され得る。

【0347】

一態様では、医薬として使用するための抗TfR抗PD1二重特異性抗体が提供される。さらなる態様では、がんの治療における使用のための抗TfR抗PD1二重特異性抗体が提供される。ある特定の態様では、治療方法に使用するための抗TfR抗PD1二重特異性抗体が提供される。ある特定の態様では、本発明は、有効量の抗TfR抗PD1二重特異性抗体を個体に投与することを含む、がんを有する個体を治療する方法に使用するための抗TfR抗PD1二重特異性抗体を提供する。他の態様では、本発明は、有効量の抗TfR抗PD1二重特異性抗体を個体に投与することを含む、感染性疾患、好ましくは、慢性または急性感染症、例えば、慢性または急性ウイルス感染症を有する個体を治療する方法に使用するための抗TfR抗PD1二重特異性抗体を提供する。さらに別の態様では、本発明は、有効量の抗TfR抗PD1二重特異性抗体を個体に投与することを含む、アルツハイマー病などの神経変性疾患を有する個体を治療する方法に使用するための抗TfR抗PD1二重特異性抗体を提供する。そのような一態様では、方法は、例えば、以下に記載されるように、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの追加の治療剤）を個体に投与することをさらに含む。さらなる態様では、本発明は、免疫賦活剤として使用するための、またはインターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）もしくは腫瘍壊死因子アルファ（TNFアルファ）分泌を刺激するための抗TfR抗PD1二重特異性抗体を提供する。ある特定の実施形態では、本発明は、免疫刺激のための、またはインターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）もしくは腫瘍壊死因子アルファ（TNFアルファ）分泌を刺激するための有効量の抗TfR抗PD1二重特異性抗体を個体に投与することを含む、個体における免疫刺激方法、またはインターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）もしくは腫瘍壊死因子アルファ（TNFアルファ）分泌を刺激する方法に使用するための抗TfR抗PD1二重特異性抗体を提供する。上記の態様のいずれかによる「個体」は、好ましくはヒトである。

【0348】

さらなる態様では、本発明は、医薬の製造または調製における抗TfR抗PD1二重特異性抗体の使用を提供する。一態様では、医薬は、がんの治療のためのものである。さらなる態様では、医薬は、がんを有する個体に有効量の医薬を投与することを含む、がんを治療する方法に使用するためのものである。そのような一態様では、方法は、例えば、以下に記載されるように、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む。さらなる態様では、医薬は、がん細胞の細胞媒介性溶解を誘導するためのものである。さらなる態様では、医薬は、がん細胞内でアポトーシスを誘導するための／ま

10

20

30

40

50

たはがん細胞増殖を阻害するための有効量の医薬を個体に投与することを含む、個体においてがん細胞の細胞媒介性溶解を誘導する方法に使用するものである。上記の態様のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

【0349】

さらなる態様では、本発明は、がんを治療するための方法を提供する。一態様では、方法は、そのようながんを有する個体に、有効量の抗TfR抗PD1二重特異性抗体を投与することを含む。そのような一態様では、方法は、以下に記載されるように、有効量の少なくとも1つの追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む。

【0350】

上記の態様のいずれかによる「個体」は、ヒトであり得る。

10

【0351】

さらなる態様では、本発明は、個体における免疫刺激のための方法、またはインターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）もしくは腫瘍壊死因子アルファ（TNFアルファ）分泌を刺激する方法を提供する。一態様では、方法は、免疫刺激のために、またはインターフェロンガンマ（IFN-ガンマ）もしくは腫瘍壊死因子アルファ（TNFアルファ）分泌を刺激するために有効量の抗TfR抗PD1二重特異性抗体を個体に投与することを含む。一態様では、「個体」はヒトである。

【0352】

さらなる態様では、本発明は、例えば、上記の治療方法のいずれかに使用するための、本明細書に提供される抗TfR抗PD1二重特異性抗体のうちのいずれかを含む薬学的組成物を提供する。一態様では、薬学的組成物は、本明細書に提供される抗TfR抗PD1二重特異性抗体のいずれかと、薬学的に許容される担体とを含む。別の態様では、薬学的組成物は、例えば、以下に記載されるように、本明細書に提供される抗TfR抗PD1二重特異性抗体のいずれかと、少なくとも1つの追加の治療剤とを含む。

20

【0353】

本発明の抗体は、単独で投与され得るか、または併用療法に使用され得る。例えば、併用療法は、本発明の抗体を投与すること、および少なくとも1つの追加の治療剤（例えば、1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、または6つの追加の治療剤）を投与することを含む。ある特定の態様では、併用療法は、本発明の抗体を投与すること、および少なくとも1つの追加の治療剤、例えば、免疫調節剤、細胞増殖抑制剤、細胞接着の阻害剤、細胞傷害性剤、細胞アポトーシスの活性化因子、またはアポトーシス誘導因子に対する細胞の感受性を増加させる薬剤を投与することを含む。好ましい態様では、追加の治療剤は、抗がん剤、例えば、微小管破壊剤、代謝拮抗剤、トポイソメラーゼ阻害剤、DNAインターカレーター、アルキル化剤、ホルモン療法、キナーゼ阻害剤、受容体アンタゴニスト、腫瘍細胞アポトーシスの活性化因子、または抗血管新生剤である。

30

【0354】

上述されたそのような併用療法は、併用投与（2つ以上の治療剤が、同じまたは別個の薬学的組成物に含まれる場合）および別個の投与を包含し、この場合、本発明の抗体の投与は、単数または複数の追加の治療剤の投与前、投与と同時および／または投与後に行われ得る。一態様では、抗TfR抗PD1二重特異性抗体の投与と追加の治療剤の投与とは、互いの約1ヶ月以内、または約1、2もしくは3週間以内、または約1、2、3、4、5もしくは6日以内に行われる。一態様では、抗体および追加の治療剤は、治療の1日目に患者に投与される。本発明の抗体は、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

40

【0355】

本発明の抗体（および任意の追加の治療剤）は、非経口、肺内および鼻腔内、ならびに局所治療のために所望であれば病巣内投与を含む任意の好適な手段によって投与され得る。非経口点滴には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内または皮下投与が含まれる。投薬は、投与が短時間であるか慢性的であるかに部分的に応じて、任意の好適な経路、例えば、注射、例えば、静脈内注射または皮下注射によるものであり得る。本明細書では、限定す

50

るものではないが、単回投与、または様々な時点にわたる複数回投与、ボーラス投与、およびパルス点滴を含む様々な投薬スケジュールが企図される。

【0356】

本発明の抗体は、医学行動規範と一致した様式で製剤化され、投薬され、投与されるであろう。これに関連して考慮すべき要因には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤の送達部位、投与方法、投与スケジュール、および医療施術者に公知の他の要因が含まれる。抗体は、必ずしもそうである必要はないが、任意に、問題の障害を予防または治療するために現在使用されている1つ以上の薬剤とともに処方される。このような他の薬剤の有効量は、薬学的組成物中に存在する抗体の量、障害または治療の種類、および上述した他の要因に依存する。このような他の薬剤の有効量は、本明細書に記載されているのと同じ投与量で、かつ投与経路によって、または本明細書に記載の投与量の約1～99%で、または適切であると経験的に／臨床的に決定された任意の投与量で、かつ任意の経路によって一般に使用される。

10

【0357】

疾患の予防または治療について、本発明の抗体の適切な投与量は（単独で、または1つ以上の他の追加の治療剤と組み合わせて使用される場合）、治療される疾患の種類、抗体の種類、疾患の重症度および経過、抗体が予防目的または治療目的で投与されるかどうか、以前の療法、患者の病歴および抗体への応答、ならびに主治医の裁量に依存する。抗体は、好適には、患者に一度にまたは一連の治療にわたって投与される。疾患の種類および重症度に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $15\text{mg}/\text{kg}$ （例えば、 $0.1\text{mg}/\text{kg}$ ～ $10\text{mg}/\text{kg}$ ）の抗体を、例えば、1回以上の別個の投与によるか、または連続的注入によるかにかかわらず、患者に投与するための初期候補投与量とすることができる。1つの典型的な1日投与量は、上記の要因に応じて、約 $1\mu\text{g}/\text{kg}$ ～ $100\text{mg}/\text{kg}$ またはそれ以上の範囲であり得る。数日間またはそれ以上にわたる反復投与の場合、治療は、状態に応じて、病徴の所望の抑制が生じるまで一般に持続される。抗体の1つの例示的な投与量は、約 $0.05\text{mg}/\text{kg}$ ～約 $10\text{mg}/\text{kg}$ の範囲である。したがって、約 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $2.0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $4.0\text{mg}/\text{kg}$ または $10\text{mg}/\text{kg}$ （またはこれらの任意の組合せ）の1つ以上の用量が、患者に投与され得る。そのような用量は、断続的に、例えば、毎週または3週間ごとに（例えば、患者が約2～約20回、または例えば、約6回の用量の抗体を投与されるように）投与され得る。初回高負荷用量、続いて、1回以上のそれよりも低い用量を投与してもよい。例示的な投薬レジメンは、約 $4\text{mg}/\text{kg}$ の初回負荷用量、続いて、約 $2\text{mg}/\text{kg}$ の抗体の毎週の維持量を投与することを含む。ただし、他の投与レジメンが有用であってよい。この治療法の進行は、従来の技術およびアッセイによって容易にモニタリングされる。

20

30

【0358】

G. 製造品

本発明の別の態様では、上記の障害の治療、予防および／または診断に有用な材料を含む製造品が提供される。製造品は、容器と、容器上のまたは容器に関連付けられたラベルまたは添付文書とを備える。好適な容器には、例えば、ボトル、バイアル、シリンジ、IV溶液バッグなどが含まれる。容器は、ガラスまたはプラスチックなどの様々な材料から形成されてもよい。容器は、組成物をそれ自体で、または状態を治療、予防および／もしくは診断するのに有効な別の組成物と組み合わせて保持し、滅菌アクセスポートを有してもよい（例えば、容器は、皮下注射針によって穿刺可能なストッパーを有する静脈内溶液バッグまたはバイアルであってよい）。組成物中の少なくとも1つの活性剤は、本発明の抗体である。ラベルまたは添付文書は、組成物が、選択された状態を治療するために使用されることを示す。さらに、製造品は、（a）本発明の抗体を含む組成物を収容する第1の容器と、（b）さらなる細胞傷害性剤または他の治療剤を含む組成物を収容する第2の容器とを備え得る。本発明のこの態様における製造品は、組成物が特定の状態を治療するために使用され得ることを示す添付文書をさらに備えてもよい。代替的に、または追加的に、製造品は、薬学的に許容されるバッファー、例えば、静菌性の注射用水（BWF

40

50

I)、リン酸緩衝化生理食塩水、リンゲル液、およびデキストロース溶液を含む第2の(または第3の)容器をさらに備えてもよい。製造品は、他のバッファー、希釈剤、フィルター、針およびシリンジを含め、商業的観点および使用者の観点から望ましい他の材料をさらに含んでもよい。

【0359】

以下に、本発明の特定の実施形態を列挙する：

1. T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体。

2. 細胞の表面に提示されたT f RおよびP D 1に結合し、細胞内に内部移行される、実施形態1の二重特異性抗体。

3. 細胞が、T f RおよびP D 1を発現し、それらをその表面に提示する、実施形態2の二重特異性抗体。

4. 細胞の表面に提示されたT f RおよびP D 1に二重特異性抗体が結合すると、細胞の表面からP D 1が枯渇する、実施形態2または3の二重特異性抗体。

5. 第3の抗原結合ドメインを含み、第3の抗原結合ドメインが、P D 1に特異的に結合する、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

6. 第1の抗原結合ドメイン、第2の抗原結合ドメイン、および／または、存在する場合、第3の抗原結合ドメインが、F a b断片、好ましくはI g G由来F a b断片である、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

7. 第1および第2の抗原結合ドメインがそれぞれF a b断片であり、(i)第2の抗原結合ドメインが、F a b重鎖のC末端で、第1の抗原結合ドメインのF a b重鎖のN末端に融合されているか、または(ii)第1の抗原結合ドメインが、F a b重鎖のC末端で、第2の抗原結合ドメインのF a b重鎖のN末端に融合されている、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

8. 第1および第2のサブユニットから構成されるF cドメイン、好ましくはI g G由来F cドメインを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

9. F a b断片のうちの1つ以上が、F cドメインに融合されている、実施形態8の二重特異性抗体。

10. F a b断片のうちの1つ以上が、ペプチド性リンカーを介してF cドメインに融合されている、実施形態7から9のいずれか1つの二重特異性抗体。

11. T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合ドメイン、第2の抗原結合ドメイン、および存在する場合、第3の抗原結合ドメインがそれぞれF a b断片であり、抗体が、第1および第2のサブユニットから構成されるF cドメインを含み、(i)第2の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、第1の抗原結合ドメインのF a b重鎖のN末端に融合されており、第1の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、F cドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されているか、または(ii)第1の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、第2の抗原結合ドメインのF a b重鎖のN末端に融合されており、第2の抗原結合ドメインが、F a b重鎖のC末端で、F cドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されており、第3の抗原結合ドメインが、存在する場合、そのF a b重鎖のC末端で、F cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されている、二重特異性抗体。

12. T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2および第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1、第2および第3の抗原結合ドメインがそれぞれF a b断片であり、抗体が、第1および第2のサブユニットから構成されるF cドメインを含み、

第1の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、F cドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されており、

第2の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、F cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、

10

20

30

40

50

第3の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のN末端で、F cドメインの第1または第2のサブユニットのC末端に融合されている、二重特異性抗体。

13. F cドメインが、I g G F cドメイン、特にI g G 1 F cドメインまたはI g G 4 F cドメインである、実施形態8から12のいずれか1つの二重特異性抗体。

14. 少なくとも2つの重鎖を含み、二重特異性抗体の重鎖がγ型（I g G）、特にγ1型のものである、実施形態1から13のいずれか1つの二重特異性抗体。

15. 二重特異性抗体が、少なくとも2つの軽鎖を含み、二重特異性抗体の軽鎖が、カッパ（κ）および／またはラムダ（λ）サブタイプから選択される、実施形態1から14のいずれか1つの二重特異性抗体。

16. F cドメインが、F c受容体への、特にF c γ受容体への結合を減少させる1つ以上のアミノ酸置換を含む、実施形態8から15のいずれか1つの二重特異性抗体。

17. F cドメインが、アミノ酸変異L 234 A、L 235 AおよびP 329 G（カバットE Uインデックスによる番号付け）を有するヒトI g G 1サブクラスのものである、実施形態8から16のいずれか1つの二重特異性抗体。

18. F cドメインが、F cドメインの第1のサブユニットと第2のサブユニットとの会合を促進する修飾を含む、実施形態8から17のいずれか1つの二重特異性抗体。

19. ノブ・イントゥー・ホール法に従って、F cドメインの第1のサブユニットがノブを含み、F cドメインの第2のサブユニットがホールを含む、実施形態8から18のいずれか1つの二重特異性抗体。

20. F cドメインの第1のサブユニットがアミノ酸置換S 354 CおよびT 366 W（カバットE Uインデックスによる番号付け）を含み、F cドメインの第2のサブユニットがアミノ酸置換Y 349 C、T 366 SおよびY 407 V（カバットE Uインデックスによる番号付け）を含む、実施形態8から19のいずれか1つの二重特異性抗体。

21. V Hドメインが軽鎖の一部であり、V Lドメインが重鎖の一部であるように、F a b断片のうちの1つでは、可変ドメインV LおよびV Hが互いに置き換えられている、実施形態6から20のいずれか1つの二重特異性抗体。

22. V Hドメインが軽鎖の一部であり、V Lドメインが重鎖の一部であるように、P D 1に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第2のF a b断片および／または、存在する場合、第3のF a b断片では、可変ドメインV LおよびV Hが互いに置き換えられている、実施形態6から21のいずれか1つの二重特異性抗体。

23. 定常ドメインC L内のF a b断片のうちの1つでは、124位のアミノ酸が、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）によって独立して置換されており（カバットE Uインデックスによる番号付け）、定常ドメインC H 1では、147位および213位のアミノ酸が、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）によって独立して置換されている（カバットE Uインデックスによる番号付け）、実施形態6から22のいずれか1つの二重特異性抗体。

24. T f R定常ドメインC Lに特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第1のF a b断片では、124位のアミノ酸が、リジン（K）、アルギニン（R）またはヒスチジン（H）によって独立して置換されており（カバットE Uインデックスによる番号付け）、定常ドメインC H 1では、147位および213位のアミノ酸が、グルタミン酸（E）またはアスパラギン酸（D）によって独立して置換されている（カバットE Uインデックスによる番号付け）、実施形態6から23のいずれか1つの二重特異性抗体。

25. J鎖を含まない、実施形態1から24のいずれか1つの二重特異性抗体。

26. ハイブリッドI g A／I g G抗体配列および／またはハイブリッドI g M／I g G抗体配列を含まない、実施形態1から25のいずれか1つの二重特異性抗体。

27. モノマーである、実施形態1から26のいずれか1つの二重特異性抗体。

28. T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、二重特異性抗体が、F cドメインと、T f Rに特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第1のF a b断片と、P D 1に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第2のF a b断片お

10

20

30

40

50

よび、存在する場合、第3のF a b断片とを含み、F a b断片が、F cドメインに融合されている、二重特異性抗体。

29. T f Rに特異的に結合する正確に1つの(一価)抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する正確に2つの(一価)抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、二重特異性抗体が、F cドメインと、T f Rに特異的に結合する抗原結合ドメインを含むF a b断片と、P D 1に特異的に結合する1つの抗原結合ドメインをそれぞれ含む2つのF a b断片とを含み、3つのF a b断片のうちの少なくとも2つが、F cドメインに融合されており、3つのF a b断片のうちの1つが、他のF a b断片のうちの1つに任意に融合されている、二重特異性抗体。

30. T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合ドメイン、第2の抗原結合ドメイン、および存在する場合、第3の抗原結合ドメインがそれぞれF a b断片であり、抗体が、第1および第2のサブユニットから構成されるF cドメインを含み、

(i) 第2の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、第1の抗原結合ドメインのF a b重鎖のN末端に融合されており、第1の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、F cドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されているか、または

(i i) 第1の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、第2の抗原結合ドメインのF a b重鎖のN末端に融合されており、第2の抗原結合ドメインが、F a b重鎖のC末端で、F cドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されており、存在する場合、第3の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、F cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されている、二重特異性抗体。

31. T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインと、P D 1に特異的に結合する第2の、および任意に第3の抗原結合ドメインとを含む二重特異性抗体であって、第1、第2および第3の抗原結合ドメインがそれぞれF a b断片であり、抗体が、第1および第2のサブユニットから構成されるF cドメインを含み、

第1の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、F cドメインの第1のサブユニットのN末端に融合されており、

第2の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のC末端で、F cドメインの第2のサブユニットのN末端に融合されており、

第3の抗原結合ドメインが、そのF a b重鎖のN末端で、F cドメインの第1または第2のサブユニットのC末端に融合されている、二重特異性抗体。

32. T f Rに特異的に結合する第1の抗原結合ドメインが、

- i. a) 配列番号1のアミノ酸配列を含むC D R-H 1、
- b) 配列番号2のアミノ酸配列を含むC D R-H 2、および
- c) 配列番号3のアミノ酸配列を含むC D R-H 3

を含む重鎖可変ドメイン(V H)、ならびに

- d) 配列番号4のアミノ酸配列を含むC D R-L 1、
- e) 配列番号5のアミノ酸配列を含むC D R-L 2、および
- f) 配列番号6のアミノ酸配列を含むC D R-L 3

を含む軽鎖可変ドメイン(V L)、または

- i i. a) 配列番号9のアミノ酸配列を含むC D R-H 1、
- b) 配列番号10のアミノ酸配列を含むC D R-H 2、および
- c) 配列番号11のアミノ酸配列を含むC D R-H 3

を含む重鎖可変ドメイン(V H)、ならびに

- d) 配列番号12のアミノ酸配列を含むC D R-L 1、
- e) 配列番号13のアミノ酸配列を含むC D R-L 2、および
- f) 配列番号14のアミノ酸配列を含むC D R-L 3

を含む軽鎖可変ドメイン(V L)を含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

33. PD1に特異的に結合する第2の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、第3の抗原結合ドメインが、

- i. a) 配列番号17のアミノ酸配列を含むCDR-H1、
- b) 配列番号18のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および
- c) 配列番号19のアミノ酸配列を含むCDR-H3

を含む重鎖可変ドメイン(VH)、ならびに

- d) 配列番号20のアミノ酸配列を含むCDR-L1、
- e) 配列番号21のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および
- f) 配列番号22のアミノ酸配列を含むCDR-L3

を含む軽鎖可変ドメイン(VL)または

- ii. a) 配列番号25のアミノ酸配列を含むCDR-H1、
- b) 配列番号26のアミノ酸配列を含むCDR-H2、および
- c) 配列番号27のアミノ酸配列を含むCDR-H3

を含む重鎖可変ドメイン(VH)、ならびに

- d) 配列番号28のアミノ酸配列を含むCDR-L1、
- e) 配列番号29のアミノ酸配列を含むCDR-L2、および
- f) 配列番号30のアミノ酸配列を含むCDR-L3

を含む軽鎖可変ドメイン(VL)を含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

34. i. Tfrに特異的に結合する上記第1の抗原結合ドメインが、

a) 配列番号7のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVHドメインおよび配列番号8のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVLドメイン、または

b) 配列番号15のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVHドメインおよび配列番号16のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVLドメインを含み、

かつ

ii. PD1に特異的に結合する上記第2の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、上記第3の抗原結合ドメインが、

a) 配列番号23のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVHドメインおよび配列番号24のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVLドメイン、または

b) 配列番号31のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVHドメインおよび配列番号32のアミノ酸配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するVLドメインを含む、

先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

35. i. Tfrに特異的に結合する上記第1の抗原結合ドメインが、

a) 配列番号7のアミノ酸配列を含むVHドメインおよび配列番号8のアミノ酸配列を含むVLドメイン、または

b) 配列番号15のアミノ酸配列を含むVHドメインおよび配列番号16のアミノ酸配列を含むVLドメインを含み、

かつ

ii. PD1に特異的に結合する上記第2の抗原結合ドメインおよび／または、存在する場合、上記第3の抗原結合ドメインが、

a) 配列番号23のアミノ酸配列を含むVHドメインおよび配列番号24のアミノ酸配列を含むVLドメイン、または

b) 配列番号31のアミノ酸配列を含むVHドメインおよび配列番号32のアミノ酸配列を含むVLドメインを含む、

先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

36. モノクローナル抗体である、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

10

20

30

40

50

37. ヒト化抗体またはキメラ抗体である、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

38. 配列番号35の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号36の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、

配列番号39の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列40に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

39. 配列番号37の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号38の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、

配列番号39の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列40に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

40. 配列番号35の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号36の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、

配列番号41の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列42に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

41. 配列番号37の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号38の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、

配列番号41の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列42に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

42. 配列番号59の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号60の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号57の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列58に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

43. 配列番号61の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の重鎖と、配列番号60の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の重鎖と、配列番号57の配列に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第1の軽鎖と、配列58に対して少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む第2の軽鎖とを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

44. nM~サブnMの範囲の親和性でTfRおよびPD1の両方に結合する、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

45. 多重特異性抗体である、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

46. 配列番号37の第1の重鎖、および配列番号38の第1の軽鎖、配列番号39の第2の重鎖、および配列番号40の第2の軽鎖を含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

47. 配列番号35の第1の重鎖、および配列番号36の第1の軽鎖、配列番号39の第2の重鎖、および配列番号40の第2の軽鎖を含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

48. 配列番号35の第1の重鎖、および配列番号36の第1の軽鎖、配列番号41の第2の重鎖、および配列番号42の第2の軽鎖を含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

10

20

30

40

50

49. 配列番号37の第1の重鎖、および配列番号38の第1の軽鎖、配列番号41の第2の重鎖、および配列番号42の第2の軽鎖を含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

50. 配列番号59の第1の重鎖と配列番号60の第2の重鎖と、配列番号57の第1の軽鎖と、配列番号58の第2の軽鎖とを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

51. 配列番号61の第1の重鎖と配列番号60の第2の重鎖と、配列番号57の第1の軽鎖と、配列番号58の第2の軽鎖とを含む、先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体。

52. 先行する実施形態のうちの1つの二重特異性抗体と細胞傷害性剤とを含むイムノコンジュゲート。

53. 細胞傷害性剤が、シュドモナス外毒素Aまたはアマトキシンである、実施形態52によるイムノコンジュゲート。

54. 第3の標的に特異的に結合するさらなる結合ドメインが、二重特異性抗体のC末端に融合されている、実施形態1から51のいずれか1つの二重特異性抗体を含む三重特異性抗体。

55. 実施形態1から51のいずれかの二重特異性抗体、または実施形態52もしくは53のイムノコンジュゲート、または実施形態48の三重特異性抗体をコードする単離された核酸。

56. 実施形態55の核酸を含む宿主細胞。

57. 実施形態1から51のいずれかの二重特異性抗体、または実施形態52もしくは53のイムノコンジュゲート、または実施形態54の三重特異性抗体を産生する方法であって、抗体の発現に適した条件下で、実施形態56の宿主細胞を培養することを含む方法。

58. 宿主細胞から抗体を回収することをさらに含む、実施形態57の方法。

59. 実施形態57または58の方法によって産生される二重特異性抗体。

60. 実施形態1から51のいずれかの二重特異性抗体または実施形態52もしくは53のイムノコンジュゲートまたは実施形態54の三重特異性抗体と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

61. 追加の治療剤をさらに含む、実施形態60の薬学的組成物。

62. 医薬として使用するための、実施形態1から51もしくは59のいずれか1つの二重特異性抗体、または実施形態52もしくは53のイムノコンジュゲート、または実施形態54の三重特異性抗体、または実施形態60もしくは61のいずれか1つの薬学的組成物。

63. 移植片対宿主病を治療するのに使用するための、実施形態1から51もしくは59のいずれか1つの二重特異性抗体、または実施形態52もしくは53のイムノコンジュゲート、または実施形態54の三重特異性抗体、または実施形態60もしくは61のいずれか1つの薬学的組成物。

64. i. 免疫応答の調節、例えば、T細胞活性の回復、

ii. 免疫応答または機能の刺激、

iii. 感染症の治療、

iv. がんの治療、

v. がんの進行の遅延、

vi. がん罹患している患者の生存期間の延長

に使用するための、実施形態1から51もしくは59のいずれか1つの二重特異性抗体、または実施形態52もしくは53のイムノコンジュゲート、または実施形態54の三重特異性抗体、または実施形態60もしくは61のいずれか1つの薬学的組成物。

65. がんの予防または治療における使用のための、実施形態1から51もしくは59のいずれか1つの二重特異性抗体、または実施形態52もしくは53のイムノコンジュゲート、または実施形態54の三重特異性抗体、または実施形態60もしくは61のいずれ

10

20

30

40

50

か 1 つの薬学的組成物。

66. 二重特異性抗体が、化学療法剤、照射、および／またはがん免疫療法に使用するための他の薬剤と組み合わせて投与される、がんの予防または治療における使用のための、実施形態 1 から 51 もしくは 59 のいずれか 1 つの二重特異性抗体、または実施形態 52 もしくは 53 のイムノコンジュゲート、または実施形態 54 の三重特異性抗体、または実施形態 60 もしくは 61 のいずれか 1 つの薬学的組成物。

67. 個体における腫瘍細胞の成長を阻害する方法であって、実施形態 1 から 51 もしくは 59 のいずれか 1 つの二重特異性抗体、または実施形態 52 もしくは 53 のイムノコンジュゲート、または実施形態 54 の三重特異性抗体、または実施形態 60 もしくは 61 のいずれか 1 つの薬学的組成物の有効量を個体に投与して、腫瘍細胞の成長を阻害することを含む方法。

10

68. i. 移植片対宿主病、

ii. 感染症または

iii. がん

の治療のための医薬の製造における、実施形態 1 から 51 もしくは 59 のいずれか 1 つの二重特異性抗体、または実施形態 52 もしくは 53 のイムノコンジュゲート、または実施形態 54 の三重特異性抗体、または実施形態 60 もしくは 61 のいずれか 1 つの薬学的組成物の使用。

69. i. 免疫応答の調節、例えば、T 細胞活性の回復

ii. 免疫応答もしくは機能の刺激

20

iii. がんの進行の遅延、および／または

iv. 生存期間の延長、もしくはがんに罹患している患者

のための医薬の製造における、実施形態 1 から 51 もしくは 59 のいずれか 1 つの二重特異性抗体、または実施形態 52 もしくは 53 のイムノコンジュゲート、または実施形態 54 の三重特異性抗体、または実施形態 60 もしくは 61 のいずれか 1 つの薬学的組成物の使用。

70. 移植片対宿主病を有する個体を治療する方法であって、実施形態 1 から 51 もしくは 59 のいずれか 1 つの二重特異性抗体、または実施形態 52 もしくは 53 のイムノコンジュゲート、または実施形態 54 の三重特異性抗体、または実施形態 60 もしくは 61 のいずれか 1 つの薬学的組成物の有効量を個体に投与することを含む方法。

30

71. 追加の治療剤を個体に投与することをさらに含む、実施形態 67 または 70 の方法。

72. 追加の治療剤が、化学療法剤、照射、および／またはがん免疫療法に使用するための他の薬剤からなる群から選択される、実施形態 71 の方法。

73. 個体における PD1 機能を阻害する方法であって、実施形態 1 から 51 もしくは 59 のいずれか 1 つの二重特異性抗体、または実施形態 52 もしくは 53 のイムノコンジュゲート、または実施形態 54 の三重特異性抗体、または実施形態 60 もしくは 61 のいずれか 1 つの薬学的組成物の有効量を個体に投与して、PD1 機能を阻害することを含む方法。

40

【0360】

アミノ酸配列の説明

表 3. 抗 T f R 抗原結合部分 (可変領域および超可変領域 (CDR))

配列 番号	1	CDR-H1	1026	SYAMS
配列 番号	2	CDR-H2	1026	YIWSGGSTDYASWAKS
配列 番号	3	CDR-H3	1026	RYGTSYPDYGDASGFDP
配列 番号	4	CDR-L1	1026	RASQSISSYLA
配列 番号	5	CDR-L2	1026	RASTLAS
配列 番号	6	CDR-L3	1026	QQNYASSNVDNT
配列 番号	7	重鎖可変ドメイン VH	1026	QSMQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSS YAMSWIRQHHPGKGLEWIGYIWSGGSTDYASW AKSRVTISKSTTTVSLKLSSVTAADTAVYYC ARRYGTSYPDYGDASGFDPWGQGTTLVTVSS
配列 番号	8	軽鎖可変ドメイン VL	1026	AIQLTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQSI SYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGVPS RFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQ NYASSNVDNTFGGGTKVEIK
配列 番号	9	CDR-H1	51A165	SYVMH
配列 番号	10	CDR-H2	51A165	YVNPYNDDTKYNEKFRG
配列 番号	11	CDR-H3	51A165	SYYYYSMDN
配列 番号	12	CDR-L1	51A165	SASSSIRYMH
配列 番号	13	CDR-L2	51A165	DTSELAS
配列 番号	14	CDR-L3	51A165	HQRSSYPFT
配列 番号	15	重鎖可変ドメイン VH	51A165	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFT SYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPYNDDTKY NEKFRGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSED SAVYYCARSSYYYSMDNWGQGTSTVTSS
配列 番号	16	軽鎖可変ドメイン VL	51A165	QIVLTQSPAISASPGEKVTVTCS SASSSIR YMHYQQKPGTSPKRWIYDTSELASGVPAR FSGSGSGTSYSLTINSMEAEDAATYYCHQR SSYPFTFGGGTKLEIK

10

20

30

40

50

表 4. 抗 PD 1 抗原結合部分 (可変領域および超可変領域 (CDR))

配列番号	17	CDR-H1	PD1-0103-0312	SYTMS
配列番号	18	CDR-H2	PD1-0103-0312	TISGGGRDIYYPDSVKG
配列番号	19	CDR-H3	PD1-0103-0312	LTGRVYFALDS
配列番号	20	CDR-L1	PD1-0103-0312	KASESVDTSDNSFIH
配列番号	21	CDR-L2	PD1-0103-0312	RSSTLES
配列番号	22	CDR-L3	PD1-0103-0312	QQNYDVPWT
配列番号	23	重鎖可変ドメイン VH	PD1-0103-0312	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFS SYTMSWVRQAPGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKG RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVLL TGRVYFALDS WGQGTLVTVSS
配列番号	24	軽鎖可変ドメイン VL	PD1-0103-0312	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCK KASESVDTS DN SI FIHWYQQKPGQSPKLLIY RSSTLES GVPDFRSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC QQNYDVPWT FGGQGTKVEIK
配列番号	25	CDR-H1	ペンブロリズマブ	NYYMY
配列番号	26	CDR-H2	ペンブロリズマブ	GINPSNGGTNFNEKFKN
配列番号	27	CDR-H3	ペンブロリズマブ	RDYRFDMGFDY
配列番号	28	CDR-L1	ペンブロリズマブ	RASKGVSTSGYSYLH
配列番号	29	CDR-L2	ペンブロリズマブ	LASYLES
配列番号	30	CDR-L3	ペンブロリズマブ	QHSRDLPLT
配列番号	31	重鎖可変ドメイン VH	ペンブロリズマブ	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFT NYYMYWVRQAPGGGLEWMGGINPSNGGTNFNEKFKN RVTLTDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARR DYRFDMGFDY WGQGTTVTVSS
配列番号	32	軽鎖可変ドメイン VL	ペンブロリズマブ	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKGVSTSGYSYL HWYQQKPGQAPRLLIY LASYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFAVYYC QHSRDLPLT FGGQGTKVEIK

表 5. 非結合対照 (「Nada」)

配列番号	33	重鎖可変ドメイン VH	Nada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS GFSIAGTA IHWVRQAPGKGLEWVAS ISPGGGSTAYADSVKGR RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR SGSGASAMDY WGQGTLVTVSS
配列番号	34	軽鎖可変ドメイン VL	Nada	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCR ASQDVSGVA WYQQKPGKAPKLLIG SASGLYSGVPSR FSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSASGGSTFGGQGTKVEIK

10

20

30

40

50

表 6 . 本明細書に記載される抗 T f R 二重特異性抗体のために使用された単一特異性非修飾抗 T f R 抗体／抗原結合部分の表記

抗体	標的	VH(配列番号)	VL(配列番号)
1026	TfR	7	8
51A165	TfR	15	16
PD1-0103-0312	PD1	23	24
ペンブロリズマブ	PD1	31	32

表 7 A . C r o s s M a b として、修飾された V H / V L を有する例示的な二重特異性抗体の表記 (国際公開第 2 0 1 6 / 0 1 6 2 9 9 号を参照)

二重特異性 抗 TfR/ 抗 PD1 抗体	可変領域の名称	VH(配列 番号)	VL(配列 番号)	VH(配列 番号)	VL(配列 番号)
8012	PD1-0103- 0312/51A165	23	24	15	16
8013	PD1-0103-0312/1026	23	24	7	8
8014	PD1-0103-0312/Nada	23	24	33	34
8015	Nada/51A165	33	34	15	16
8016	Nada/1026	33	34	7	8
8017	ペンブロリズマブ/1026	31	32	7	8
8018	ペンブロリズマブ/51A165	31	32	15	16
8019	ペンブロリズマブ/Nada	31	32	33	34

表 7 B : 例示的な 2 + 1 フォーマット抗体 (ヒト化分子およびマウス代理分子) に使用される V H / V L 領域の表記

二重特異性 抗 TfR/ 抗 PD1 抗体	フォーマット	可変領域の名称	VH(配列 番号)	VL(配列 番号)	VH(配列 番号)	VL(配列 番号)
8156	BBB	PD1-0103- 0312/TfR(51A165)	23	24	15	16
8157	TCB	PD1-0103- 0312/TfR(51A165)	23	24	15	16
8158	BBB	PD1-0103-0312/Nada	33	34	15	16
8159	TCB	PD1-0103-0312/Nada	33	34	15	16
6768	TCB	huPD1-478/mTfR-001	86	87	78	79
6769	TCB	huPD1-478/Nada	86	87	94	95
6794	TCB	Nada/mTfR-001	94	95	78	79
6757	BBB	huPD1-478/mTfR-001	86	87	78	79
6761	BBB	huPD1-478/Nada	86	87	94	95
6793	BBB	Nada/mTfR-001	94	95	78	79

10

20

30

40

50

表 8. 例示的な二重特異性抗体（1 + 1 フォーマット；下線および太字の超可変領域）に使用される完全長の重鎖および軽鎖

配列番号	35	HC_Hole_EE_charge_TfR_(1026)	QSMQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSS SYAMS WIRQHPGK GLEWIG YIWSGGSTDYASWAKS RVTISKSTTTVSLKLSSVTAAD TAVYYC CARRYGTSYPDYGDASGFDP WGQGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSG VHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTL MISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
配列番号	36	LC_RK_charge_TfR_(1026)	AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLA WYQQKPGKA PKLLIY RASTLAS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYY CQONYASSNV DNTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号	37	HC_Hole_EE_charge_TfR_(51A165)	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS GTYFTSYVMH WVKQKPG QGLEWIG YVNPYNDDTKYNEKFRG KATLTSDKSSSTAYMELSS LTSEDSAVYYC CARRYGTSYPDYGDASGFDP WGQGTTLTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTIS KAKGQPREPQVCTLPISRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHEALHNHYTQKSLSLSP
配列番号	38	LC_RK_charge_TfR_(51A165)	QIVLTQSPAISASPGKVTVTCT SASSIRYM HWYQQKPGTSP KRWIY DTSELAS GVPARFSGSGSGTSYSLTINSMEAEDAATYY CQRSSYPFT FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTY LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号	39	HC_cross_Knob_PD1-0103-0312_VL	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCK KASESVDTSDNSFIH WYQQK PGQSPKLLIY RSSTLES GVDPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDV AVYYC CQONYDVPWT FGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS CDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCVMHEAL HNHYTQKSLSLSP
配列番号	40	LC_cross_PD1-0103-0312_VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSF SYTMS WVRQAPG KGLEWVA TISGGGRDIYYPDSYKGR FTISRDNKNTLYLQMNSL RAEDTAVYYCVL LTGRVYFALDS WGQGTTLTVSSASVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
配列番号	41	HC_cross_Knob_PD1_Pembro_VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC RASKGVSTSGYSYLH WYQQK PGQAPRLLIY LASYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELEDF AVYYC QHSRDLPLT FGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKS

10

20

30

40

50

			TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
配列番号	42	LC_cross_PD1_Pembro_VH	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSCKASGYTFT NYYMYWVRQAPG QGLEWM GGINPSNGGTNFNEKFKN RVLTITDSSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCAR RDYRFDMGFDY WGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号	43	HC_cross_Knob_Nada_VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGSGVAWYQQKPGKAPKLLIGSASGLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYTCQQSASGGSTFGQGTKEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
配列番号	44	LC_cross_Nada_VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSIAGTAIHWRQAPGKGLEWVASISPGGGSTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRSGGSGASAMDYWGQGTITVTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号	45	HC_Hole_EE_charge_Nada	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSIAGTAIHWRQAPGKGLEWVASISPGGGSTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRSGGSGASAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
配列番号	46	LC_RK_charge_Nada	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGSGVAWYQQKPGKAPKLLIGSASGLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYTCQQSASGGSTFGQGTKEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVCLLNFPYFREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSLTITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号	47	HC_Knob_TfR(51A165)IgG1/抗ビオチン	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS GYTFTSYVMHW VKKPGQGLEWIG YVNPYNDDTKYNEKFRG KATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR SYYYYSMDN WGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA

10

20

30

40

50

			KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLSWYQQKPKGKVPKLLIYSAKT LADGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHFWSIIY TFGCGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGA EVKKPGSSSVKVSCKSSGFNNKDTFFQWVRQAPGQCLEWMGRI DPANGFTKYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVY YCARWDITYGAAWFAYWGQGT LVT VSS
配列 番号	48	LC_TfR(51A1 65)	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTVTCSASSSIRYMHWYQQKPGTSP KRWIYDTSELASGVPARFSGSGSGTSYSLTINSMEAEDAATYY CHQRSSYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSY SLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列 番号	49	HC_cross_Ho le_Pembro IgG1/ 抗ピ オチン	QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPG QGLEWMGGINPSNQGTFNEKFKNRVTLTTDSSTTTAYMELKS LQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYWGQGT TTVTSSASVAAPS VFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDSYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC DKHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT ISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQG NVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSDIQMT QSPSSLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLSWYQQKPKGKVPKLLIY SAKTLADGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHFWS SIIYTFGCGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQ SGAEVKKPGSSSVKVSCKSSGFNNKDTFFQWVRQAPGQCLEWM GRIDPANGFTKYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED T AVYYCARWDITYGAAWFAYWGQGT LVT VSS
配列 番号	50	LC_cross_Pe mbro	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQK PGQAPRLLIYLA SYLES GVPARFSGSGSGTDFTLTISLLEPEDF AVYYCQH SRDLPLTFGGGKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQS SGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS C
配列 番号	51	HC_Knob_Na da_IgG1/ 抗 ピオチン	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSIAGTAIHWRQAPGK GLEWVASISPGGGSTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRSGSGSGASAMDYWGQGT LVT VSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV DKKVEPKSCDKHTCTPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQY NSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSDIQMTQSPS SLSASVGDRVTITCRASGNIHNYLSWYQQKPKGKVPKLLIYSAKT LADGVPSRFRSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHFWSIIY TFGCGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGA EVKKPGSSSVKVSCKSSGFNNKDTFFQWVRQAPGQCLEWMGRI DPANGFTKYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSED TAVY YCARWDITYGAAWFAYWGQGT LVT VSS
配列	52	LC_Nada	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGSGVAWYQQKPGK

10

20

30

40

50

番号			APKLLIGSASGLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSASGGSTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列 番号	53	HC_Cross_Ho le_Nada IgG1/ 抗ビオ チン	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSIAGTAIHVVRQAPGK GLEWVASISPGGGSTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSL RAEDTAVYYCSRSGGSGASAMDYWGQGTLLTVTVSSASVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCPAPEAAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT SKAKGQPREPQVCTLPSSRDELTKNQVSLSCAVKGFPYSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGN VFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSDIQMTQ SPSSLSASVGDRTITCRASGNIHNYLSWYQQKPGKVPKLLIYS AKTLADGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHFWS SIYTFGCGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQS GAEVKPKGSSVKVSKSSGFNNKDTFFQWVRQAPGQCLEWMG RIDPANGFTKYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARWDTYGAAWFAYWGQGTLLTVSS
配列 番号	54	LC_cross_Na da	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVGSGVAWYQQKPGK APKLLIGSASGLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQPEDFATY YCQQSASGGSTFGQGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC
配列 番号	55	HC_抗 CD33 抗ビオチン	EVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTITDSNIHWVRQAPGQ SLEWIGYIYPYNGGTDYNQKFKNRATLTVDNPTNTAYMELSSL RSEDTAFYYCVNGNPWLAYWGQGTLLTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT EVTCTVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSLS ASVGDRTITCRASGNIHNYLSWYQQKPGKVPKLLIYSAKTLAD GVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDVATYYCQHFWSYIYTFG CGTKLEIKRGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVK KPGSSVKVSKSSGFNNKDTFFQWVRQAPGQCLEWMGRIDPA NGFTKYAQKFQGRVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA RWDTYGAAWFAYWGQGTLLTVSS
配列 番号	56	LC_抗 CD33	DIQLTQSPSTLSASVGDRTITCRASESLDNYGIRFLTWFGQKP GKAPKLLMYAASNQSGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDFF ATYYCQQTKEVPWSFGQGTKVEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

10

20

30

40

50

表9. 2: 1 抗体フォーマット (TCBフォーマットおよびBBBフォーマット; 下線および太字の超可変領域) に使用される完全長の重鎖および軽鎖

配列番号	57	LC_cross_PD1-0103-0312_VH	EVQLLES GGGLVQPGGSLRL SCAASGFSFS SYTMS WVRQ APGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGT LTV SSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY P REAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKA DYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号	58	LC_RK_charge_TfR_(51A165)	QIVLTQSPA IMSAS PG EKVT VTCSASSSIRYMH WY QQKPG TSPKRWIYDTSELASGVPARFSGSGSGTSYSLTINSMEAE DAATYYC HQRSSYPFT FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DRKLKSGTASVVCLLNNFY P REAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFNRGEC
配列番号	59	HC_Cross_Hol e PD1-0103-0312_VL BBB フォーマット_TfR_(51A165)	DIVMTQSPD SLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIH WY QQKPGQSPKLLIYRSSTLES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGGGTKVEIKSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLP PSRDEL T KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLQ QSGPELVKPGASV KMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPYND DTKYNEKFRGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYC ARSYYYYSMDN WGQGT SVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKS TSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDE KVEPKSCD
配列番号	60	HC_Cross_Kno b PD1-0103-0312_VL	DIVMTQSPD SLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIH WY QQKPGQSPKLLIYRSSTLES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGGGTKVEIKSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDEL T KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV L DSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFC SVMHEALHNHYT QKSLSLSP
配列番号	61	HC_Cross_Hol e PD1-0103-0312_VL_TCB フォーマット-TfR(51A165)	DIVMTQSPD SLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIH WY QQKPGQSPKLLIYRSSTLES GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGGGTKVEIKSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLQ QSGP ELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEW I GYVNPYNDDTKYNEKFRGKATLTSDKSSSTAYMELSSLT SEDSAVYYCARSYYYYYSMDN WGQGT SVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVN

10

20

30

40

			HKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK NQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQ KSLSLSP
配 列 番 号	62	LC_RK_charge _Nada	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>RASQDVGSQVA</u> WYQQK PGKAPKLLIG <u>SASGLYS</u> GVPSRFSGRSGTDFTLTISLQ PEDFATYYC <u>QQSASGGST</u> FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDRKLSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
配 列 番 号	63	HC_Cross_Hol e_PD1-0103- 0312_VL_BBB フオーマット _Nada	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWY QQKPGQSPKLLIY <u>RSSTLES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYC <u>QQNYDVPWT</u> FGQGTKVEIKSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSL RLSCAASGFSIAGTAIHWVRQAPGKGLEWVASISPGGGST AYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RSGGSGASAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKV DEKVEPKSCD
配 列 番 号	64	HC_Cross_Hol e_PD1-0103- 0312_VL_TCB フオーマット _Nada	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWY QQKPGQSPKLLIY <u>RSSTLES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYC <u>QQNYDVPWT</u> FGQGTKVEIKSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFSIAGTAIHWVRQAPGKGLEWV ASISPGGGSTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRSGGSGASAMDYWGQGLTVTVSSASTKGP SVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNV NHHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTK KNQVLSLCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD SDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYT QKSLSLSP
配 列 番 号	96	huPD1-478 crossmab LC	EVILVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFSFSS <u>SYTMS</u> WVRQ TPEKRLDWVA <u>TISGGGRDIYPDSVKGR</u> FTISRDNKNTL YLEMSSLMS EDTALYYCVLL <u>LTGRVYFALDS</u> WGQGTSTV SSASDAAPTVISIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDIN VKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKSTYSMSSTLTLT KD EYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

10

20

30

40

50

配列 番号	97	huPD1-478 crossmab HC	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSDNSFIHWY QQRPGQSPKLLIYRSSTLES ~~G~~ VPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDVATYYCQQNYDVPWTFGGGKLEIKSSAKTTPP SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKP KDVLTITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTA QTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA FGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTC MITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIMDTDGSYFVY SDLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPG K
配列 番号	98	mTfR-001 LC	DIQMTQSPASLSASLEEIVTITCQASQDIGNWLAWYQQKP GKSPQLLIYGATSLADGVPSRFSGSRSGTQFSLKISRQV EDIGIYYCLQAYNTPWTFGGGKVEIKRADAAPTVSIFPPS SRKLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLN SWTDQDSKDYMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKT STSPIVKSFNRENC
配列 番号	99	huPD1-478 crossmab TCB フォーマットを有 する mTfR-001 HC	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSDNSFIHWY QQRPGQSPKLLIYRSSTLES ~~G~~ VPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDVATYYCQQNYDVPWTFGGGKLEIKSSAKTTPP SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDDKIVPRDCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGNSLTLCVASGFTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAM IYYDSSKMNYADTVKGRFTISRDNKNTLYLEMNSLRSED TAMYYCAVPTSHYVVDVWGQGVSVTVSSAKTTPPSVYPL APGSAAQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLT ITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT KPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFG APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTC MITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPG KGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLTLCVASG FTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIIYYDSSKMNYADTVK GRFTISRDNKNTLYLEMNSLRSED TAMYYCAVPTSHYVVDVWGQGVSVTVSSAKTTPPSVYPL APGSAAQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDEKIVPRDC
配列 番号	100	mTfR-001 Fab BBB フォーマッ トを有する huPD1-478 crossmab HC	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSDNSFIHWY QQRPGQSPKLLIYRSSTLES ~~G~~ VPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDVATYYCQQNYDVPWTFGGGKLEIKSSAKTTPP SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKP KDVLTITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTA QTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAA FGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKQMAKDKVSLTC MITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVY SKLNVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPG KGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLTLCVASG FTFSNYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIIYYDSSKMNYADTVK GRFTISRDNKNTLYLEMNSLRSED TAMYYCAVPTSHYVVDVWGQGVSVTVSSAKTTPPSVYPL APGSAAQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGV HTFPAVLQSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDEKIVPRDC
配列 番号	101	Nada LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVGSGVAWYQQK PGKAPKLLIGSASGLYS ~~G~~ VPARFSGSRSGTDFLTISLQ PEDFATYYCQQSASGGSTFGGKVEIKRADAAPTVSIFP

10

20

30

40

50

			PSSRKLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKKIDGSERQNGV LNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATH KTSTSPIVKSFNRECE
配列 番号	102	huPD1-478 crossmab TCB フォーマットを有 する Nada HC	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSDNSFIHWY QQRPGQSPKLLIYRSSTLES ~~G~~ VPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDVATYYCQQNYDVPWTFGGGKLEIKSSAKTTPP SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDDKIVPRDCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFSIAGTAIHWVRQAPGKGLEWVASI SPGGGSTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAED TAVYYCSRSGGSGASAMDYWGQGTTLTVSSAKTTPPSV YPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSL SGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV PASSTKVDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKD VLTITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQ KPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLT CMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIPKTDG SYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEK SLSHSPGK
配列 番号	103	Nada CrossFab BBB フォーマットを有 する huPD1- 478 HC	KIVLTQSPASLPVSLGQRATISCRASESVDTSDNSFIHWY QQRPGQSPKLLIYRSSTLES ~~G~~ VPARFSGSGSRTDFTLTID PVEADDVATYYCQQNYDVPWTFGGGKLEIKSSAKTTPP SVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGS LSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV AHPASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPK PKDVLTITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEV HTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCR VNSAAGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAK DKVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI PKTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHN HHTEKSLSHSPGKGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGFSIAGTAIHWVRQAPGKGLEWVASI SPGGGSTAYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRA EDTAVYYCSRSGGSGASAMDYWGQGTTLTVSSAKTTP PSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNS GSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTC NV AHPASSTKVDEKIVPRDC
配列 番号	104	Nada crossmab LC	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSIAGTAIHWVRQ APGKGLEWVASISPPGGGSTAYADSVKGRFTISADTSKNTA YLQMNSLRAEDTAVYYCSRSGGSGASAMDYWGQGTTLV TSSASDAAPTYSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKD INVKKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDYMSSTLTTLTK DEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRECE
配列 番号	105	Nada crossmab HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVGSGVAWYQQK PGKAPKLLIGSASGLYSGVPSRFSGSRSGTDFTLTISLQ PEDFATYYCQQSASGGSTFGGQTKVEIKSSAKTTPPSVY PLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNV AHP ASSTKVDDKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV LTITLTPKVTCTVVAISKDDPEVQFSWFVDDDEVHTAQ TKPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSA AFGAPIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKV SLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYDNTQPIPKTD GSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTEK SLSHSPGK

10

20

30

40

50

配列 番号	106	Nada crossmab TCB フォーマットを有 する mTfR-001 HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQDVGSGVA WYQQK PGKAPKLLIG SASGLYS GVPSRFSGSRSGDFTLTISLQ PEDFATYYC QQSASGGST FGQGTKVEIKSSAKTTPPSVY PLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHP ASSTKVDKKIVPRDCGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQP GNSLTLSCLVASGFTFS NYGMHWIRQAPKKGLEWIAMIIYD SSKMNYADTVKGR FTISRDN SKNTLYLEMNSLRSED TAMYYCAV PTSHYVVDV WGQGVSVTVSSAKTTPPSVYPLAPG SAAQTNSMVTLGCLVEGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTF PAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTK VDEKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLT PKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTTPREEQI NSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAGAPIEKTI SKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTCMITNFFPED ITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYFVYSKLVQKS NWEAGNTFTCSVLHEGLHHHTEKSLSHSPGK
配列 番号	107	mTfR-001 Fab BBB フォーマッ トを有する Nada crossmab HC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITC RASQDVGSGVA WYQQK PGKAPKLLIG SASGLYS GVPSRFSGSRSGDFTLTISLQ PEDFATYYC QQSASGGST FGQGTKVEIKSSAKTTPPSVY PLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHP ASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDV LTITLTPKVTCVVVAISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQT TPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAG APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKKQMAKDKVSLTC MITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMKTDGSYF VYSKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHHHTEKSLSHSP GKGGGGSEVQLVESGGGLVQPGNSLTLSCLVASGFTFS NY GMHWIRQAPKKGLEWIAMIIYDSSKMNYADTVKGR FTISR DSKNTLYLEMNSLRSEDAMYYCAV PTSHYVVDV WGQ GVSMTVSSAKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVE GYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSV TVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDEKIVPRDC

10

20

30

40

50

表 10. 野生型 T f R および P D 1 の例示的な配列

配列 番号	65	例示的なヒト PD1 配列	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNT SESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAPEDRSQPGQDCRFRVT QLPNGRDFHMSVVRARRNDSTYLCGAISLAPKAQIKESL RAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVGGL LGSLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVP VFSVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSG MGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
配列 番号	66	例示的なヒト TfR 配列	MMDQARSASFNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMK LAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIG FMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAAR RLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYVPREAGSQ KDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDS AQNS VIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYS KAATVTGKLVHANFGT KKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGVLI YMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQ FPPSRSSGLPNIPVQTISR AAEKLFGNMEGDCPSDWKTD STCRMVTSESKNVKLT VSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDH YVVVGAQRDAWGPGA AKSGVGTALLLKL AQMFSDMVLK DGFQPSRSIIFASWSAGDFGSGATEWLEGYLSSLHLKAF TYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTG QFLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCE DTDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIK LTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQ WLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTD RFVMKKLNDRVM RVEYHFLSPYVSPKESPF RHVFWGSGSHTLPALLENLKL R KQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDIDN EF

10

20

30

40

50

表 1 1. 例示的な定常重鎖領域および定常軽鎖領域

配列番号	67	例示的なヒトカッパ軽鎖定常領域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号	68	例示的なヒトラムダ軽鎖定常領域	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号	69	IgG1 由来の例示的なヒト重鎖定常領域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
配列番号	70	変異 L234A、L235A および P329G を有する、IgG1 由来の例示的なヒト重鎖定常領域 (Fc ガンマ受容体サイレンシング)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSP

10

20

I I I .

【実施例】

【0361】

以下は、本発明の方法および組成物の実施例である。上に提供された一般的な説明を前提として、他の様々な実施形態が実施され得ることが理解される。

30

【0362】

Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989 に記載されているように、標準的な方法を使用して DNA を操作した。分子生物学的試薬を製造者の指示書に従って使用した。全種類の細胞培養および細胞アッセイに、10% FBS および 2.5mM L-グルタミンを補充した RPMI 培地を使用した。形質導入 Jurkat 細胞用の培地には、50 μg/mL の Zeocin と、1.5 μg/mL の Puromycin とをさらに含有させた。以下の二重特異性抗体および多重特異性抗体を生成するために、Regula et al. (2018) Protein Engineering, Design and Selection, 31 (7-8) : 289-299 に記載されているように、CH3/CH3 接触面でノブ・イントゥー・ホール技術と組み合わせて、VH/VL が一方の抗体アームで交換され、他方の抗体アームの CH1/CL 接触面が電荷修飾によって修飾されてヘテロ二量体化を促進する、国際公開第 2016/016299 号に記載されている CrossMab 技術を使用した。

40

【0363】

PD1-0103-0312 の生成および完全長抗体配列は、例えば、国際公開第 2017/55443 号に記載されている。ペンブロリズマブの生成および完全長配列は、例

50

えば、国際公開第2008/156712号に記載されている。

【0364】

実施例1：TfRおよびPD1に結合する二重特異性抗原結合分子の製造

ノブ・イントゥー・ホール変異Y349C、T366S、L368A、Y407V（ホール）およびS354C、T366W（ノブ）を使用して、TfR（通常のFab）およびPD1（cross-Fab）を標的とするいくつかの二重特異性CrossMabを操作した（図5A；表8と組み合わせて表12に示す完全長配列）。PD1結合ドメインを含むアームには、以下でPD1-0103-0312と呼ばれる、国際公開第2017/55443号に記載されている抗PD1抗体の可変領域アミノ酸配列（重鎖可変ドメイン配列番号23および軽鎖可変ドメイン配列番号24）、またはがんの治療のために承認され、例えば、国際公開第2008/156712号に記載されている二価抗PD1抗体である抗PD1抗体ペンブロリズマブの可変領域アミノ酸配列（重鎖可変ドメイン配列番号31および軽鎖可変ドメイン配列番号32）のいずれかを含有させた。TfR結合ドメインを含むアームには、以下で1026と呼ばれる、国際公開第2016/207240号に記載されている抗TfR抗体の可変領域アミノ酸配列（重鎖可変ドメイン配列番号7および軽鎖可変ドメイン配列番号8）、または以下で51A165と呼ばれる、未公開の抗TfR抗体の可変領域アミノ酸配列（重鎖可変ドメイン配列番号15および軽鎖可変ドメイン配列番号16）のいずれかを含有させた。LALA PG変異を使用して、免疫エフェクター機能を無効にした（L234A、L235AおよびP329G；Schlot hauer et al. (2016) Protein Engineering, Design & Selection, vol. 29 no. 10, pp. 457-466）。表12. 二重特異性および三重特異性TfR/PD1 CrossMab配列（1+1フォーマット）

別名	可変領域の名称(VH/VL)	HC(配列番号)	LC(配列番号)	HC cross(配列番号)	LC cross(配列番号)
8012	PD1-0103-0312/51A165	37	38	39	40
8013	PD1-0103-0312/1026	35	36	39	40
8014	PD1-0103-0312/Nada	45	46	39	40
8015	Nada/51A165	37	38	43	44
8016	Nada/1026	35	36	43	44
8017	ペンブロリズマブ/1026	35	36	41	42
8018	ペンブロリズマブ/51A165	37	38	41	42
8019	ペンブロリズマブ/Nada	45	46	41	42
1129	TfR/ペンブロリズマブ/抗ビオチン(「三重特異性 CrossMab」)	47	48	49	50
9903	TfR/Nada/抗ビオチン	47	48	53	54
9904	Nada/ペンブロリズマブ/抗ビオチン	51	52	49	50
0784	抗CD33/抗CD33/抗ビオチン	55	56	55	56

【0365】

抗体のDNA配列を社内ツールを用いて最適化し、GeneArtまたはTwist Bioscienceに注文した。表12に示すアミノ酸配列をコードするDNA断片を確立された発現ベクターにクローニングし、これをPEIpro（登録商標）（Polyp l u s）を使用してHEK293懸濁細胞にトランスフェクトし、8%CO₂の加湿インキュベーター内、37℃で培養した。6～7日後に3500gでの遠心分離によって上清を回収し、0.22μmフィルターユニット（Thermo Fisher Scientific）に通して上清を濾過した。プロテインAおよびサイズ排除クロマトグラフ

ィーによって、細胞上清から抗体を精製した。Caliper LabChipsおよび質量分析によって、抗体の抗体分子量を検証した。

【0366】

実施例2：ビオチン化細胞傷害性剤にペイロードとして結合することができる三重特異性CrossMabの構築

ペイロードの送達のために実施例1に記載の二重特異性CrossMab 8018のC末端に第3の結合実体としての抗ビオチンscFVを融合することによって、TfR（通常のFab）、PD1（cross-Fab）およびビオチンを標的とする、別名1129を有する三重特異性CrossMABを操作した。抗ビオチンscFvは、Q44CおよびQ100Cにシステイン結合を含有し、(G4S)₄リンカーを介してCrossMabのC末端に融合させた。実施例1に記載されるように、HEK293細胞内で三重特異性CrossMab 1129（配列については、表8と組み合わせて表12を参照）を組換え産生した。抗体1129の概略図を図5Bに示す。

10

【0367】

対照分子として、TfR結合アーム（表12の抗体9904）またはPD1結合アーム（表12の抗体9903）のいずれかの軽鎖および重鎖の可変抗体領域内の結合配列が非結合配列（以下では用語「Nada」で表す）によって置き換えられた抗体を操作した。PD1にもTfRにも結合しない実体によって両アームが置き換えられた二重非結合対照として、C末端に結合した抗ビオチンscFvを有する抗CD33抗体を使用した（「抗CD33抗CD33抗ビオチン」；表12の抗体0784）。Biacore SPRによって、実施例2の三重特異性CrossMAB分子の結合親和性が、1つのNadafabを有する対応する対照分子と同等であることを確認した（実施例4の表14を参照）。

20

【0368】

実施例3：二価様式でPD1に結合し、一価様式でTfRに結合する（2+1フォーマット）2つの異なるCrossMab二重特異性抗体の構築

図6および図7に示すように、二価様式でPD1を標的とし、一価様式でTfRを標的とする2つのCrossMAB（抗体8156および8157、表13に示す配列）を操作した。

【0369】

第1の標的に結合する1つの結合ドメインと第2の標的に結合する2つの結合ドメインを含む複合抗体フォーマットは、本明細書では2+1フォーマットと呼ばれる。PD1に2回およびTfRに1回結合する複合抗体フォーマットを、一過性発現によって2つの異なる2+1フォーマットで生成し、実施例1および2に記載したのと同じ方法を適用して精製した。これらの分子の組成は、図6および図7に概略的に示されている。完全長配列を表9と組み合わせて表12に示す。

30

【0370】

第1の2+1フォーマットは、IgGのアームとして2つのPD1結合CrossFab（VHおよびVLが互いに置き換えられたFab）を含み、TfR結合Fabは、そのVHのN末端を介して非対称（ノブ・イントゥー・ホール）CH3ドメインのC末端に結合している（抗体8156、図6）。このフォーマットは、本明細書ではBBBフォーマットとも呼ばれる。

40

【0371】

第2の2+1フォーマットは、IgG構成のCrossFabアームとしての1つのPD1結合実体、およびFabアームとしての1つのTfR結合実体、ならびにノブ・イントゥー・ホールFcヘテロ二量体（抗体8157、図7）の他方の側のヒンジに先行するTfR結合Fabの上部にある（すなわち、N末端に結合している）第2のPD1結合CrossFabアームを含む。このフォーマットは、本明細書ではTCBフォーマットとも呼ばれる。

【0372】

50

ノブ・イントゥー・ホール変異 Y 3 4 9 C、T 3 6 6 S、L 3 6 8 A、Y 4 0 7 V（ホール）および S 3 5 4 C、T 3 6 6 W（ノブ）を使用して、両フォーマットの F c ドメインを操作した。L A L A P G 変異を使用して、免疫エフェクター機能を無効にした（L 2 3 4 A、L 2 3 5 A および P 3 2 9 G；Schlothauer et al.、上記）。

【0373】

2つの複合抗体フォーマットの各々は、図6および図7に概略的に示され、鎖A、B、H（「ホール」変異を有する重鎖）およびK（「ノブ」変異を有する重鎖）として表記される4つの異なるアミノ酸鎖によって形成される。これらのアミノ酸鎖の個々のアミノ酸配列は、配列番号57、配列番号58、配列番号59、配列番号60および配列番号61として列挙されている。

【0374】

対照分子は、対照分子ではTfR結合ドメインの可変領域が非結合配列（Nada'と呼ばれる）に交換されたことを除いて、同じフォーマットおよび組成で生成した（抗体8158および8159、表13に示す配列）。これらの分子の個々のアミノ酸配列は、配列番号57、配列番号60、配列番号62、配列番号63および配列番号64として列挙されている。

【0375】

実施例1に記載されるように、二重特異性CrossMab 8156、8157、8158および8159をHEK293細胞内で組換え産生した。

表13. 二重特異性抗TfR抗PD1 CrossMAb配列（2+1フォーマット）

別名	可変領域の名称(VH/VL)	鎖 A(配列番号)	鎖 B(配列番号)	鎖 H(配列番号)	鎖 K(配列番号)
8156	PD1-0103-0312/TfR(51A165)BBBフォーマット	57	58	59	60
8157	PD1-0103-0312/TfR(51A165)TCBフォーマット	57	58	61	60
8158	PD1-0103-0312/Nada BBB フォーマット	57	62	63	60
8159	PD1-0103-0312/Nada TCB フォーマット	57	62	64	60

【0376】

実施例4：三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCrossMab分子のPD1/PD-L1媒介シグナル伝達および結合親和性のブロック

ブロッキング抗体ペンブロリズマブと同様に、三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCrossMab 1129は、共培養アッセイでは、TCRシグナル伝達のPD1/PD-L1媒介阻害をブロックした。PD1/PD-L1ブロックバイオアッセイ（Promega）では、エフェクター細胞は、ヒトPD1を発現するJurkat T細胞、およびNFAT応答エレメント（NFAT-RE）によって駆動されるルシフェラーゼ Reporter系であった。NFAT-RE活性化は、TCR活性化時に誘導される。ヒトPD1（エフェクター細胞）とPD-L1（標的細胞）との間の相互作用は、TCR下流シグナルを妨害し、NFAT-RE活性化を妨げる。PD1またはPD-L1のいずれかがプロ

ックされると、阻害性シグナルが除去され、N F A T - R E が活性化され、発光読出しがもたらされる。

【0377】

設定のために、5,000個のPD-L1発現CHO-K1細胞を96ウェルプレートに一晩かけて播種した。50,000個のPD1発現Jurkat-PD1-NFAT細胞を抗体とともに37℃で30分間プレインキュベートし、培地を用いて1回洗浄し、次いで、アクチベーター細胞に5時間かけて加えた。Bio-Glo (商標) Luciferase Assay Substrateを加えた後の発光シグナルによって、PD1シグナル伝達によるTCR活性化の阻害を測定した。抗TfR抗PD1抗ビオチン抗体1129 (「 α TfR/ α PD1」) は、抗Nada抗PD1抗ビオチン対照抗体9904 (「Nada/ α PD1」) と比較して、PD1の有意に増加した阻害 (10 nMで2倍を超える増加) を示したが、同じFab濃度に設定したこの5時間で高濃度でさらに高いブロックを示したペンプロリズマブほど高くはなかった (図8A)。

10

【0378】

抗Nada抗PD1抗ビオチン対照抗体と比較して、抗TfR抗PD1抗ビオチン抗体を使用したPD1の阻害の増加は、標的結合の差によるものではなかったことも、Biacore SPRによって測定された同等の K_D 値、 k_a 値および k_d 値によって裏付けられる (図9および表14)。両分子は、3つ全部のパラメータに関して極めて同様に機能し、PD1阻害の差がTfRバインダーの存在または非存在に起因するはずであることを示唆している。

20

【0379】

Biacore SPRの場合、捕捉系の約16,000個の共鳴単位 (RU) (20 μ g/mlの抗PGLALA Ab (mAb<PG LALA>M-17.24-IgG、社内で製造) を、GE Healthcareによって供給されたアミンカップリングキットを使用して、pH5.0で、CM5チップ (GE Healthcare BR-1005-30) にカップリングさせた。試料および系バッファーは、PBS-T (0.05% Tween 20を含む10mMリン酸緩衝生理食塩水) pH7.4であった。フローセルを25℃に設定し、試料ブロックを12℃に設定し、ランニングバッファーを用いて2回プライミングした。5nM溶液を10 μ l/分の流量で30秒間注入することによって、適切な抗体を捕捉した。

30

【0380】

1:3希釈中400nMから開始して0.5nMまで、30 μ l/分の流量で150秒間にわたって、溶液中に様々な濃度のPD1を注入することによって、会合を測定した。解離段階を最大750秒間モニタリングし、試料溶液からランニングバッファーに切り替えることによって開始させた。30 μ l/分の流量で10mM NaOHを用いて40秒間洗浄することによって、表面を再生した。抗PGLALA Ab表面から得られた応答を差し引くことによって、バルク屈折率差を補正した。ブランク注入も差し引いた (= 二重参照)。見かけの K_D および他の速度論的パラメータの計算には、Langmuir 1:1モデルを使用した。得られた K_D 値、 k_a 値および k_d 値を表14に示す。

40

表14. PD1のBiacore SPRアッセイにおけるオフレート

別名	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	t_k (s)
1129(α TfR/ α PD1)	$2.0 \cdot 10^6$	$1.0 \cdot 10^{-2}$	$5.2 \cdot 10^{-9}$	68
9904(Nada/ α PD1)	$1.9 \cdot 10^6$	$9.0 \cdot 10^{-3}$	$4.8 \cdot 10^{-9}$	77

【0381】

共培養アッセイにおける細胞生存度は、適用された濃度で任意の抗体を加えることによって影響を受けなかった (図8B)。

【0382】

50

実施例 5：三重特異性抗 PD1 抗 Tfr 抗ビオチン Cross Mab のアビディティ増強結合は PD1 発現に依存する

三重特異性抗 PD1 抗 Tfr 抗ビオチン Cross Mab 1129 のアビディティ増強結合を Jurkat 細胞アッセイによって評価した。Lenti-X HTX Packaging System (Clontech Laboratories) を使用して、レンチウイルスによって PD1 を NFAT-bla Jurkat 細胞 (Thermo Fisher Scientific) に形質導入した。ヒト PD1 を低レベルおよび高レベルで発現する単一クローンを生成した (低い発現レベルは、約 3,000 個の結合した抗 PD1 抗体／細胞に相当し、高い発現レベルは約 20,000 個の結合した抗 PD1 抗体／細胞に相当した)。対照として、形質導入されていない野生型 Jurkat 細胞を使用した。

10

【0383】

PE 標識抗体 PE 抗ヒト PD1 (Clone NAT105) および PE 抗ヒト Tfr (Clone CY1G4) (BioLegend) とフローサイトメトリー (BD, Canto II) とを使用して、PD1 および Tfr の発現を測定した。無関係な抗原に結合する PE 標識マウス IgG1 をアイソタイプ対照 (Iso) として使用した。低いおよび高い表面発現で PD1 を形質導入された NFAT-bla Jurkat 細胞株は、Tfr の同様の発現を示した (図 10A および図 10B)。

【0384】

Jurkat 細胞への三重特異性抗 PD1 抗 Tfr 抗ビオチン Cross Mab 1129 の結合が PD1 発現レベルに依存するかどうかを評価するために、野生型、PD1 低 Jurkat 細胞および PD1 高 Jurkat 細胞のそれぞれ 250,000 個の細胞を 96 ウェルプレートに播種し、抗体 1129 または対照抗体 9903 もしくは 9904 とともに氷上で 2 時間インキュベートした。ビオチン化 Cy5 (bio-Cy5、自社製) を 200 nM で 10 分間かけて加えた後、氷冷 PBS 中で 2 回洗浄した。フローサイトメトリーによって、フルオロフォア結合について細胞を分析した。抗体 1129 は、細胞表面上に高レベルの PD1 を発現した Jurkat 細胞上では (ビオチン化 Cy5 によって) 高い程度まで検出された (図 10C、左上)。この効果は、細胞表面上に低レベルの PD1 を発現し、抗体 1129 の結合が少ない細胞によって証明されるように、細胞表面上の PD1 発現と相関した。対照的に、1 つの NADA ドメインを有する対照抗体 9904 および 9903 は、試験した最高濃度であっても、細胞表面への結合をほとんど示さなかった (図 10C、右上および左下)。

20

30

【0385】

実施例 6：抗 PD1 抗 Tfr 二重特異性抗体は活性化 T 細胞によって内部移行される

トランスフェリン受容体を介して誘導される内部移行の機構は、T 細胞表面から PD1 受容体を除去するために、抗 PD1 抗 Tfr 二重特異性抗体にとって重要である。したがって、3 日間ポリクローナル活性化した (polyclonally activated) CD4+T 細胞に二重特異性抗 Tfr 抗 PD1 抗体 8012、8013 もしくは 8014、または対照抗体 8015、8016、8017、8018 もしくは 8019 (配列については表 12 を参照) が結合した際に、フローサイトメトリーによって、PD1 受容体内部移行を評価した。

40

【0386】

CD4+T 細胞を 4℃ で 30 分間様々な分子に曝露した後、抗 LALAPG PE コンジュゲート抗体によって染色し、続いて、固定するか、または 37℃ でさらに 3 時間インキュベートして分子の内部移行を可能にした。4℃ での内部移行は無視できるため、4℃ でインキュベートした CD4+T 細胞を参照として使用する。

【0387】

そのために、健常ドナー由来の CD4+T 細胞を濃縮し (Miltenyi Biotec、130-045-101)、CD3 (1 μg/ml プレート結合) および CD28 (1 mg/μl 可溶型) の存在下で 3 日間ポリクローナル活性化した。細胞を、表 12 に

50

示す分子 8012～8019 とともに 4℃ で 30 分間インキュベートし、洗浄し、2つの群に分けた。1つの群は、固定 (BD Cell fix) の前に、二次抗 LALAPG PE コンジュゲート抗体によって直ちに染色する。第2の群を培地に再懸濁し、37℃ で 3 時間インキュベートした後、抗 LALAPG-PE 染色および固定を行った。細胞を LSRT Fortessa (BD Biosciences) で取得し、分析を Flowjo (Treestar) を用いて行った。

【0388】

次いで、幾何平均蛍光強度 (GMFI) と PE⁺CD4⁺T 細胞の頻度とを2つの群間で比較し、以下の式を用いて内部移行の割合を計算する：

$$\text{内部移行 \%} = 100 - \left(\left(\text{GMFI}_{\text{PE} + \text{CD}4 + \text{T 細胞 } 37^\circ\text{C}} \div \text{GMFI}_{\text{PE} + \text{CD}4 + \text{T 細胞 } 4^\circ\text{C}} \right) * 100 \right) \quad 10$$

【0389】

対応する対照と比較して、抗 PD1 抗 Tfr 二重特異性抗体 8012 (PD1-0103-0312 / Tfr (51A165)) および 8018 (Pembro / Tfr (51A165)) (図 11A) および 8013 (PD1-0103-0312 / Tfr (1026)) および 8017 (Pembro / Tfr (1026)) (図 11B) を示す図 11A および図 11B は、二価抗 PD1 抗体 (PD1-0103-0312) も対応する一価対照抗 PD1 / 抗 Nada 抗体 (8014 および 8019) も内部移行されていないことを実証したのに対して、PD1-0103-0312 由来二重特異性抗体 8012 および 8013 ならびにペンブロリズマブ由来二重特異性抗体 8017 および 8018 は、PD1 結合ドメインを有しない一価 Tfr コンストラクト 8015 および 8016 と同様に、内部移行を示す。

【0390】

実施例 7：ペイロードが結合した三重特異性抗 Tfr 抗 PD1 抗 ビオチン Cross Mab は Jurkat 細胞内に内部移行する

細胞に対する三重特異性 Cross Mab の局在化を評価するために、Lenti-X HTX Packaging System (Clontech Laboratories) を使用して、レンチウイルスによって、NFAT-bla Jurkat 細胞 (Thermo Fisher Scientific) にモノマー増強 (mE) GFP- (G4S)₂-PD1 融合タンパク質を形質導入した。生細胞イメージングのために、10% FCS を含有するフェノールレッド不含 RPMI 培地中、50,000 細胞 / ウェルの密度で、mEGFP-PD1 発現 Jurkat 細胞を 8 ウェルチャンバースライド (Lab-Tek (商標)、Thermo Fisher) に播種した。

【0391】

膜染色のために、生細胞を製造者の指示書 (PKH26 GL-1KT, Sigma Aldrich) に従って PKH26 とともにプレインキュベートした。要約すると、1×10⁶ 個の細胞をペレット化し、200 μl の希釈剤に再懸濁し、0.4 μl の PKH26 色素を含有する 200 μl の希釈剤と混合した。2～3 分後、200 μl の FCS を加えることによって標識反応を停止させ、細胞を再びペレット化し、フェノールレッド不含 RPMI 培地に再懸濁した。抗体の内部移行を追跡するために、10 nM の三重特異性抗 Tfr 抗 PD1 抗 ビオチン抗体 1129、対照抗体 9903 (Tfr / Nada / 抗 ビオチン)、9904 (Nada / ペンブロリズマブ / 抗 ビオチン) および 0784 (抗 CD33-抗 Bio) を、PBS 中 37℃ で 30 分間かけて、50 nM ビオチン化 Cy5 (Bio-Cy5) と複合体化した。複合体を細胞に加え、3 時間内部移行させた。

【0392】

PD1-GFP および抗体の内部移行の後、63× / 1.2 NA 水浸対物レンズ (Leica) を使用して Leica SP8 レーザー走査共焦点顕微鏡を用いて蛍光顕微鏡検査を行った。段上部インキュベーションチャンバー (Okotouch, Okolab) を使用して、温度、CO₂ レベルおよび湿度を 37℃ および 5% CO₂ に維持した。7 倍ズームと 2 倍の線平均 (384 px × 384 px、画素サイズ：69 nm) とを用いて

10

20

30

40

50

、600Hzで連続走査を行った（双方向走査）。ステップサイズ350nmでZスタックを取得した。488nm、561nmおよび633nmで励起するために白色光レーザーを使用した。HyD検出器を使用して、495～560nm（GFP）および643～715nm（Cy5）で蛍光放出を検出した。Leica LAS AFソフトウェアの3Dビューアを用いて画像を処理した。

【0393】

mEGFP-PD1形質導入Jurkat細胞および共焦点顕微鏡法を使用すると、三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMAb（「αTfR／αPD1」）がビオチン化Cy5を細胞内に送達することを示すことができた。さらに、ペイロードはPD1とともにベシクルに共局在化した。2つのNada（「Nada／αPD1」および「αTfR／Nada」）および抗CD33（「αCD33」）対照分子については、極めて限られた量のビオチン化Cy5またはPD1のみが細胞内に見出された（図12）。

10

【0394】

実施例8：形質導入Jurkat細胞と三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMAbとの接触後のベシクルmEGFP-PD1蓄積

ベシクルmEGFP-PD1蓄積がPD1およびTfRの同時結合に依存するかどうかを試験するために、三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMAb（「αTfR／αPD1」）をペンプロリズマブと比較した。三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMAbとは対照的に、PD1は、ペンプロリズマブによる処理後に細胞表面に残る（図13）。

20

【0395】

mEGFP-PD1を形質導入したJurkat細胞のフローサイトメトリーによって、三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMAbによるPD1内部移行をさらに確認した。mEGFPシグナルは、三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMAb（「αTfR／αPD1」）を加えた後24時間かけて40%に低下し、抗体を溶液中に放置した場合、少なくとも最大48時間このレベルのままであった（図14A）。一価Nada／抗PD1 CrossMAb（「Nada／αPD1」）は、24時間後にPD1レベルを約80%に低下させたが、二価ペンプロリズマブは、48時間後にわずか85%までのゆっくりとした低下を示した。興味深いことに、この形質導入Jurkat細胞株上のmEGFP-PD1シグナルは、三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMAb抗体がさらに24時間以内に約80%まで除去されるといつでもかなり迅速に回復した（図14B）。

30

【0396】

実施例9：切断型シュードモナス外毒素（PE25）のアビディティ増強送達

このプラットフォームを使用した細胞内送達を確認するために、細胞傷害性を明らかにするためにエンドソーム／リソソーム送達を必要とする切断型シュードモナス外毒素PE25を使用した。国際公開第2015101589号に切断型シュードモナス外毒素誘導体について以前に記載された方法によって、PE25を大腸菌内で産生し、精製した。次いで、EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit（Thermo Scientific）の指示書に従って、20倍過剰のSulfo-NH-S-LC-Biotinを使用して、切断型シュードモナス外毒素をビオチン化した。ウエスタンブロットによって毒素のビオチン化の成功を検証した。ビオチン化PE25を、三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMAb 1129または対照抗体9903もしくは9904とPBS中で10分間かけて複合体化し、野生型、PD1低Jurkat細胞およびPD1高Jurkat細胞と48時間インキュベートした後、Cell Titer Glo生存性発光アッセイ（Promega）によって細胞生存性を評価した。

40

【0397】

予測されるように、ビオチン化PE25自体は、適用された濃度では毒性ではない（図15A）。抗PD1／Nada抗体9904（「αPD1／Nada+bio PE25

50

」)を介して送達された場合、細胞生存度は漸増濃度に伴って低下し、この効果は高PD1発現ではさらに顕著である。ただし、顕著な細胞傷害性を達成するためには100nMの抗体が必要とされる。TfRの迅速な内部移行性質に起因して、Nada/抗TfR抗体(「Nada/αTfR+bio PE25」)は毒素を送達し、細胞生存度を用量依存的に低下させた。この効果は、三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCross Mab(「αPD1/αTfR+bio PE25」)についても見る事ができたが、Nada/抗TfR抗体とは対照的に、三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCross Mabは、抗体を10nM未満の濃度で加えた場合、抗TfR/Nadaの最大100分の1の濃度で高PD1発現Jurkat細胞の細胞生存度を低下させた。ビオチン化PE25を用いない場合、いずれの抗体も、48時間のアッセイ時間枠にわたって、適用された濃度でいかなる毒性も示さなかった(図15B)。

10

【0398】

実施例10：活性化ヒトT細胞における三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCross Mabのアビディティ増強結合および内部移行

初代ヒトT細胞との相互作用について、抗体をさらに評価した。T細胞の単離のために、製造者の推奨に従ってFicoll(登録商標)Paque Plus(GE Healthcare)と、Leucosep(商標)遠心管(Greiner Bio-one)とを使用して、健康なヒトドナー由来の新鮮な血液を処理した。プレートに結合した抗CD3および可溶型抗CD28を用いてヒトPBMC(末梢血単核細胞)を活性化し、これにより、T細胞表面上に約200,000分子のTfRおよび約8,000分子のPD1の発現がもたらされた。

20

【0399】

三重特異性抗PD1抗TfR抗ビオチンCross Mab 1129(「αTfR/αPD1」)は、ビオチン化Cy5(Cy5色素はAPC(アロフィトシアニン(allophycocyanin))とスペクトル的に等価であるため、フローサイトメーターのAPCチャネルを使用してCy5を検出することができる)によって、対照抗体9903(「αTfR/Nada」)および9904(「Nada/αPD1」)が活性化T細胞への結合をほとんど示さない濃度で検出された(図16A)。0時間および1時間の時点でAF488標識二次抗体を使用して細胞表面上のIgGを染色した後を通して、2つの抗TfR含有抗体1129(「αTfR/αPD1」)および(程度は低い)9903(「αTfR/Nada」)では有意な内部移行が観察されたが、Nada/抗PD1抗体9904(「Nada/αPD1」)では観察されなかった(図16B)。

30

【0400】

実施例11：移植片対宿主病における活性化T細胞のアビディティ媒介殺傷

治療用途として移植片対宿主病(GvHD)を調査した。高度に活性化された宿主T細胞の短期間の根絶は、移植片対宿主病(GvHD)に顕著な影響を及ぼし得る。PBMCを20日間かけて移植し、通常はやがてGvHDで死亡する腫瘍担持マウス由来の脾臓T細胞を評価した(図17A)。この目的のために、ヒトリンパ球分離管(human Pancoll, PAN-Biotech, Aidenbach, Germany)を製造者の指示書に従って使用して、健康なボランティアドナー由来のヒトPBMCを単離した。NSGマウス(NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ; JAXストック#005557)をJackson Laboratoriesに注文した。腫瘍担持マウスに、100μLのPBS中の10⁷個のヒトPBMCを尾静脈を介して静脈内接種した。20日後、脾臓を解剖し、70μmの抑制剤によって細胞を分離した。細胞をCD3、CD4、CD8、PD1およびTfRについて染色し、フローサイトメトリーによって分析して、浸潤したヒトT細胞上のTfRおよびPD1の発現を評価した。

40

【0401】

マウス脾臓細胞内で検出されたヒトT細胞(CD4およびCD8 T細胞を含む)の70%超が、TfR(ここでは「CD71」と表記する)およびPD1について二重陽性で

50

あった（図 17 B）。

【0402】

PE25と複合体化した三重特異性抗TfR抗PD1抗ビオチンCrossMab（「aPD1／αTfR+PE」）を用いたこれらの脾臓細胞の処理は、この細胞プール内のヒトT細胞の数を減少させるのに必要な用量の10～1000倍の減少を示した（図17C）。

【0403】

実施例12：二価様式でPD1に結合し、一価様式でTfRに結合する（2+1フォーマット）二重特異性抗体の増強された内部移行

がん治療に現在適用されているPD1結合抗体は、典型的には二価分子であり、すなわち、PD1に対する2つの結合ドメインを有する。TfR結合二重特異性抗体を、PD1の二価結合を可能にするフォーマットで試験して、それらが増強された内部移行と、それによる増強された力価とを付与するかどうかを調べた。ここで試験した抗体は、実施例3に記載されるように生成した。

【0404】

試験分子の組成は、図18Aに概略的に示されている。第1の2+1フォーマットは、IgG構成のCrossFabアームとしての1つのPD1結合実体と、ノブ・イントゥー・ホールFcヘテロ二量体（抗体8157）の第2のサブユニットのヒンジに融合されたTfR結合Fabの上部にある（すなわち、N末端に結合している）第2のPD1結合CrossFabアームとを有する。第2の2+1フォーマットは、IgGのアームとして2つのPD1結合CrossFabアームを有し、TfR結合Fabは、非対称（ノブ・イントゥー・ホール）CH3ドメイン（抗体8156）の「ホール」サブユニットのC末端に結合している。対照分子は、それらではTfRバインダーの可変領域が「Nada」と呼ばれる非結合配列に交換されたことを除いて、同じフォーマットおよび組成で生成した（図18B）。さらなる対照は、別のバインダー（図18B、左側）を加えない親二価PD1結合IgG（PD1-0103-0312）であった。

【0405】

二価様式でPD1に結合し、一価様式でTfRに結合する二重特異性抗体を内部移行アッセイに使用した。実験装置は実施例6と同じであった。結果を図19に示す。二価様式でPD1に結合するがTfRバインダーを担持しない3つの対照分子はいずれも、それらのフォーマットにかかわらず、かなり低い内部移行を示した。対照的に、二価様式でPD1に結合し、一価様式でTfRに結合する二重特異性抗体フォーマットは、著しく増加した内部移行率を示した。

【0406】

図19の試験した全コンストラクトは、同じ親二価抗PD1抗体に基づく。親抗PD1抗体PD1-0103-0312およびNada配列含有分子（8159および8158）は、内部移行に対する増加した傾向を示さなかった。一方、抗体8156および8157は、3時間後に強い内部移行の程度を示した。

【0407】

実施例13：親二価抗PD1抗体と比較して一価様式（1+1フォーマット）でPD1およびTfRに結合する二重特異性CrossMabの等しいT細胞エフェクター機能

最小混合リンパ球反応（mMLR）を使用して、同種異系環境における抗TfR抗PD1二重特異性抗体の効果、特に様々な分子に曝露した際の同種特異的T細胞の細胞傷害性に対する効果を評価した。この設定は、同種異系単球由来の成熟樹状細胞（mDC）と5日間共培養した、新たに単離されたCD4+T細胞からなった。

【0408】

mDCの生成は、単球からの未成熟樹状細胞形成を誘導するために、磁気ビーズ（Miltenyi Biotec、130-050-201）を介した単球の単離、続いて、GM-CSF（50ng/ml）およびIL4（100ng/ml）を含有する培地中での5日間の培養を必要とした。TNF-α、IL-1βおよびIL-6（それぞれ50n

10

20

30

40

50

g / m l) をさらに2日間かけて加えて、D C 成熟を誘導した。

【0409】

m M L R の1日目に、非血縁ドナー由来のC D 4 T 細胞を、製造者の指示書 (M i l t e n y i B i o t e c 、 1 3 0 - 0 4 5 - 1 0 1) に従ってC D 4 ビーズによる陽性選択によって精製し、5 μ M のカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル (C F S E) を用いて標識した後、同種異系m D C と共培養した。次いで、C D 4 T 細胞およびm D C を、ウェル当たり10⁵個のC D 4 T 細胞および2 $\times$ 10⁴個の同種異系m D C とともに5 : 1 の比で96ウェルプレートに播種した。二価抗P D 1 抗体P D 1 - 0 1 0 3 . 0 3 1 2 、二重特異性抗T f r 抗P D 1 抗体8 0 1 2 、8 0 1 3 および8 0 1 4 、ならびに対照抗体8 0 1 5 、8 0 1 6 、8 0 1 7 、8 0 1 8 および8 0 1 9 の7 段階希釈系列を加え、最高濃度は10 μ g / m l 、最低濃度は10 p g / m l であった。

10

【0410】

5 日間の共培養後、上清の半分を除去し、ゴルジ輸送阻害剤、G o l g i P l u g (B r e f e l d i n A) およびG o l g i S t o p (M o n e s i n) を含有する新鮮な培地と交換し、続いて、37℃でさらに5時間インキュベートして、細胞質へのサイトカイン蓄積を可能にした。次いで、細胞を洗浄し、抗ヒトC D 4 (B V 6 0 5 、 B i o L e g e n d) およびL i v e / D e a d f i x a b l e d y e A q u a (I n v i t r o g e n) によって染色した後、F i x / P e r m B u f f e r (B D B i o S c i e n c e) を用いて固定 / 透過処理した。最後に、グランザイムB (A l e x a F l u o r 6 4 7 、 B D B i o S c i e n c e) の細胞内染色を行った。G r a p h P a d P r i s m 8 . 4 . 2 ソフトウェア内の曲線下面積分析による用量応答 (刺激) 分析 : l o g (アゴニスト) 対応答 (3 つのパラメータ) およびA U C に基づいて、E C ₅₀ の値を計算する。

20

【0411】

混合リンパ球反応の結果は、グランザイムB 産生としてT 細胞エフェクター機能を示した (図20A および図20B) 。バインダーN a d a / 5 1 A 1 6 5 (8 0 1 5) およびN a d a / 1 0 2 6 (8 0 1 6) による一価T f R 結合はグランザイムB 分泌を誘導しなかったのに対して、一価抗P D 1 コンストラクトP D 1 - 0 1 0 3 - 0 3 1 2 / N a d a (8 0 1 4) およびペンプロリズマブ / N a d a (8 0 1 9) は中程度のグランザイムB 分泌をもたらしたが、二価P D 1 - 0 1 0 3 - 0 3 1 2 によって達成されるE C ₅₀ 値には達しなかった。

30

【0412】

P D 1 - 0 1 0 3 - 0 3 1 2 / T f R 二重特異性抗体 (8 0 1 2 、8 0 1 3) およびペンプロリズマブ / T f R 二重特異性抗体 (8 0 1 7 、8 0 1 8) はP D 1 に一価でのみ結合しているが、グランザイムB の分泌を引き起こす際の二価抗P D 1 ブロッキング抗体P D 1 - 0 1 0 3 - 0 3 1 2 と力価に関して同じ範囲にあり、同等のエフェクターT 細胞機能性をもたらした (図20A および図20B) 。表15 および表16 は、対応する対照分子と比較した活性 (E C ₅₀ 値によって測定される) の改善を示す (対照分子と対比した倍率変化として表される) 。表15 および表16 から分かるように、1 つの二重特異性抗体における1 つのP D 1 結合実体と1 つのT f R 結合実体との組合せは、対応する一価対照 (抗P D 1 抗N a d a) と比較して、抗体活性を約100 ~ 5000 倍改善した。

40

表 1 5 .

対照と対比した倍数活性改善 (Fold activity improvement)		
試験分子	(二価)PD1-IgG 対照分子	対照と対比した倍数活性
8012	PD1-0103-312	3.82
8013		0.47
8017		1.92
8018		5.97

10

表 1 6 .

対照と対比した倍数活性改善 (Fold activity improvement)		
試験分子	(一価)抗 PD1/抗 Nada 対照分子	対照と対比した倍数活性
8012	8014	1557.76
8013		191.09
8017	8019	1514.78
8018		4724.19

20

【 0 4 1 3 】

実施例 1 4 : 二価抗 PD1 抗体と比較した、TCB および BBB フォーマット二重特異性 2 + 1 抗体フォーマットによって誘導される増強された T 細胞エフェクター機能

実験装置は実施例 1 3 と同じであり、PD1-0103-0312 および抗体 8156 ~ 8159 の 6 段階希釈系列を用い、最高濃度は 10 μ g / ml、最低濃度は 100 pg / ml であった。

【 0 4 1 4 】

TCB および BBB フォーマット (8156 および 8157) によって処理した際の混合リンパ球反応の結果は、二価の親抗 PD1 抗体の約 7 分の 1 の EC₅₀ 値を示したほか、それぞれの対照 (8158 および 18159) と比較して低下した EC₅₀ 値を示し、グランザイム B 分泌の増加、したがって、これらのフォーマットによって誘導される T 細胞エフェクター機能の増加をもたらした (図 21)。表 1 7 および表 1 8 は、対応する対照分子と比較した活性の改善 (測定した EC₅₀ 値に基づく) を示す。

30

表 1 7 .

対照と対比した倍数活性改善		
試験分子	(二価)PD1-IgG 対照分子	対照と対比した倍数活性
8156	PD1-0103-0312	7.83
8157		6.60

40

表 1 8 .

対照と対比した倍数活性改善		
試験分子	(二価)抗 PD1/抗 Nada 対照分子	対照と対比した倍数活性
8156	8158	4.44
8157	8159	16.33

50

【0415】

表17および表18から分かるように、単一の2+1フォーマット二重特異性抗体における2つのPD1結合実体と1つのTfR結合実体との組合せは、二価の親抗PD1抗体と比較して約7～8倍、および対応する2+1対照（抗PD1：抗Nada=2：1）と比較して約4、5～16倍だけ抗体活性を改善した。

【0416】

実施例15：2+1および1+1フォーマット二重特異性抗体によって誘導されたT細胞エフェクター機能の比較

観察された結果間の直接的な比較を可能にするために、PD1-0103-0312、ペンブロリズマブならびに抗体8012～8014、8017～8019、および8156～8159の6段階希釈系列を用いて、実施例13からの実験装置を1回の実験で繰り返し、最高濃度は10μg/ml、最低濃度は100pg/mlであった。

【0417】

混合リンパ球反応の結果は、T細胞エフェクター機能の代理としてグランザイムB産生を示す。可読性を良くするために、結果は、3つの異なる図に分割されているが、1つの実験から得られた（図22A～C）。一価1+1フォーマット（8012、8013、8017、8018）による処理後、T細胞によるグランザイムB分泌は、それぞれの二価抗PD1抗体PD1-0103-0312（図22A）およびペンブロリズマブ（図22B）によって達成されるものと同等の範囲にある。

【0418】

T細胞を2+1フォーマット（8156、8158）によって処理した場合、グランザイムB分泌は、ペンブロリズマブおよびPD1-103-0312によって引き起こされる分泌と比較して増加し、これらのフォーマットによって誘導されるさらに増強されたT細胞エフェクター機能が示された（図22C）。2つのPD-1結合ドメインおよび1つのNada結合ドメインを有する2つの対照分子8158および8159は、二価PD1バインダーPD1-0103-0312およびペンブロリズマブと同等のグランザイムB分泌を示した。

表19.

試験分子	EC50(pM)
PD1-0103-0312	109.7
ペンブロリズマブ	175.1
8012	34.01
8013	387.5
8014	13115
8017	120.6
8018	139.4
8019	n.d.
8156	25.8
8157	12.01
8158	110.8
8159	117.3

【0419】

全試験分子のEC50値を示す表19から分かるように、分子8157は、PD1-0

103-0312またはそれぞれの対照分子8159の約9～10倍強力であることが見出されたが、分子8156は、T細胞エフェクター機能の増強に関して、2つの対照分子PD1-0103-0312および8158の4倍の力価を達成することに成功した。8156および8157も、ペンブロリズマブの数倍強力であった。

【0420】

実施例16：マウス化抗PD1-TfRコンストラクトおよび対照の内部移行

*in vivo*実験のために、マウス化された代理抗PD1抗TfR二重特異性抗体および対照分子を生成する（配列については、表20を参照）。

表20：マウス結腸直腸同系モデルのための代理分子

別名	可変領域の名称(VH/VL)	鎖 A(配列番号)	鎖 B(配列番号)	鎖 M(配列番号)	鎖 P(配列番号)
6768	mTfR-001/huPD1-478 TCB フォーマット	96	98	97	99
6769	Nada/huPD1-478 TCB フォーマット	96	101	97	102
6794	mTfR-001/Nada TCB フォーマット	104	98	105	106
6757	mTfR-001/huPD1-478 BBB フォーマット	96	98	97	100
6761	Nada/huPD1-478 BBB フォーマット	96	101	97	103
6793	mTfR-001/Nada BBB フォーマット	98	104	105	107

【0421】

*in vivo*実験の前に、細胞に基づくアッセイで、分子6768および6794が細胞内に内部移行する能力を試験した。実験装置は、本質的に実施例6に記載される通りであった。分子6769をネガティブコントロールとした。マウス化分子はマウスTfRに結合するため、ここでは、マウスTfRを発現するBA/F3細胞株（RNCBアクセッション番号：CL003201）によって活性化ヒトCD4細胞を置換した。

【0422】

検出のために、AlexaFluor647コンジュゲート抗DAPG抗体を使用した。次いで、幾何平均蛍光強度（GMFI）、およびAF647+BA/F3細胞の頻度を、それぞれの分子とともに4℃で30分間インキュベートした直後に染色および固定した群と、37℃でさらに3時間インキュベートした群との間で比較し、以下の式を用いて内部移行の割合を計算した：

$$\text{内部移行\%} = 100 - \left(\left(\text{GMFI}_{\text{AF647+BA/F3細胞}_{37^{\circ}\text{C}}} \div \text{GMFI}_{\text{AF647+BA/F3細胞}_{4^{\circ}\text{C}}} \right) * 100 \right)$$

【0423】

図23に示すように、生物学的機能性に関して、6768（mTfR-001/huPD1-478 TCBフォーマット）および6794（mTfR-001/Nada TCBフォーマット）を含有する両分子は、3時間後に約70%の良好な内部移行率を示し

たが、6769 (huPD1 / Nada) は内部移行を示さず、代わりに細胞表面に蓄積したと述べるができる。

【0424】

実施例17：マウス化PD1-TfR分子がPD1/PDL1媒介シグナル伝達をブロックする能力

マウス化分子6768および6769 (表20を参照) がPD1/PDL1媒介シグナル伝達をブロックする能力を試験した。分子6794をネガティブコントロールとして使用し、抗PD1抗体0103-0312をポジティブコントロールとして使用した。マウス化コンストラクト6768および6769は抗ヒトPD1抗原結合ドメインを含有するため、実施例4に記載されるのと同じ実験装置を使用して、PD1-PDL1シグナル伝達経路ブロックに関するそれらの機能性を決定した。

10

【0425】

図24に見られるように、抗PD1抗原結合ドメインを含有しない対照分子6794 (mTfR-001 / Nada、TCBフォーマット) は、PD1/PDL1媒介シグナル伝達のブロックを示さなかった。分子6768 (mTfR-001 / huPD1-478、TCBフォーマット) および6769 (Nada / huPD1-478、TCBフォーマット) は、抗PD1抗体PD1-0103-0312のような二価抗PD1結合ドメインを含有し、PD1-PDL1経路のブロックに関して同等の機能性を示した。

【0426】

実施例18：マウス皮下結腸直腸同系モデルの確立

20

皮下結腸直腸同系モデルを使用して、CRO Antineo (Lyon, France) で、C57BL/6JマウスにおけるmuPD1およびmuPD-1-NADAと比較して、muPD1-TfR 2+1フォーマット化合物のin vivo有効性を評価する。試験に使用するマウス化代理分子の配列を表20に示す。この皮下モデルの読出しは、腫瘍増殖阻害である。要約すると、6~8週齢の雌C57BL/6Jマウスに、皮下注射された 5×10^5 個のMC38細胞を接種する。ガイドラインに従って継続的な健康モニタリングを用いて、特定の病原体がない条件下でマウスを維持する。

【0427】

マウスを様々な処置群に無作為化し、皮下モデルではノギスによって測定した場合に腫瘍が平均 100 mm^3 の体積に達した際に治療を開始する。処置はいずれも静脈内投与し、 $1 \text{ mg/kg} \sim 10 \text{ mg/kg}$ の範囲の用量のmuPD1-TfR、muPD1、およびmuPD-1-NADAを調査する。腫瘍体積をノギスを使用して測定し、以下の式を用いて計算する：

30

腫瘍体積 = 長さ × 幅 × 深さ × $4/3\pi$

【0428】

腫瘍増殖阻害を読出しとして使用し、多重比較の群平均の有意差を試験するために、Dunnettの方法とともに標準的な分散分析 (一方向ANOVA) を使用する。分析には、JMP統計ソフトウェアプログラムを使用する。

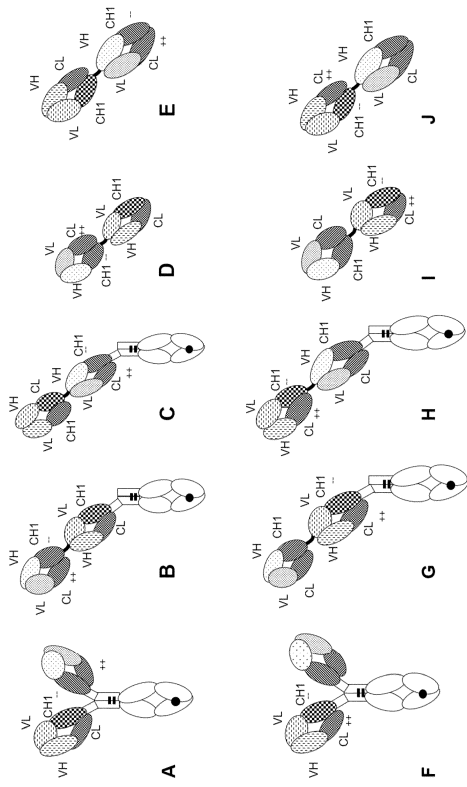
【0429】

先述の発明は、理解を明瞭にする目的で説明および例示によりある程度詳細に記載されたが、それら記載および例示は本発明の範囲を限定するものではない。本明細書に引用されるすべての特許および科学文献の開示は、その全体が参照により明示的に援用される。

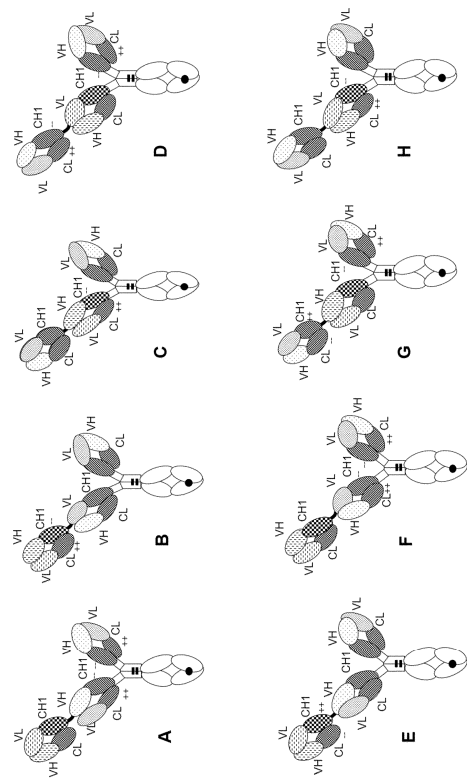
40

【図面】

【図 1】



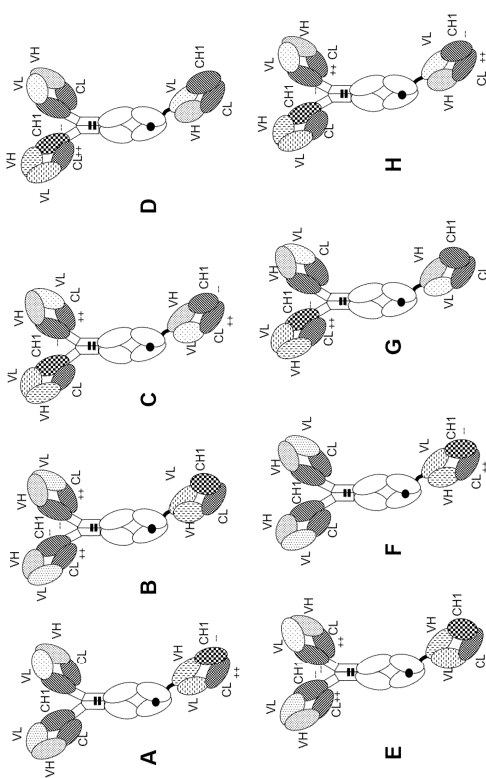
【図 2】



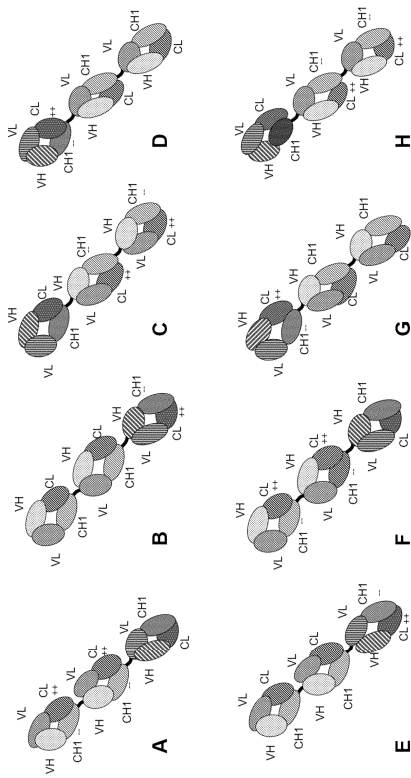
10

20

【図 3】



【図 4】

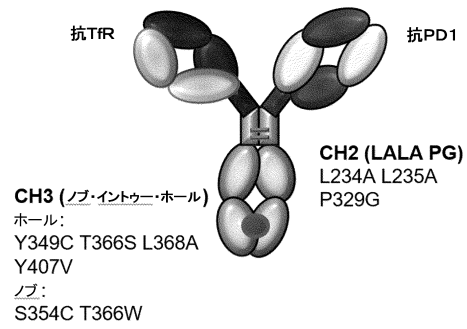


30

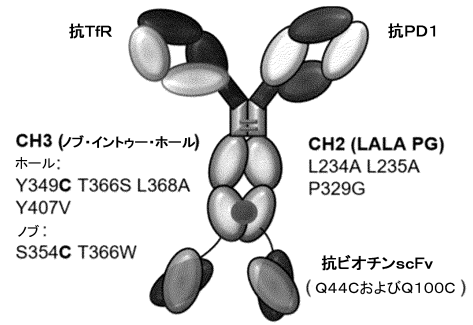
40

50

【図 5 A】

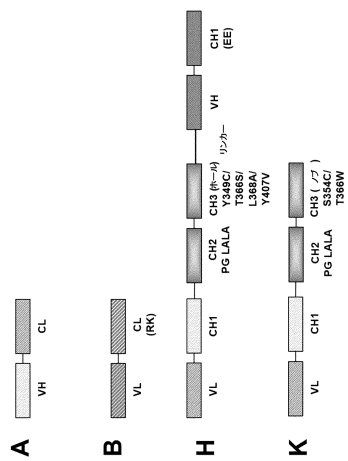


【図 5 B】

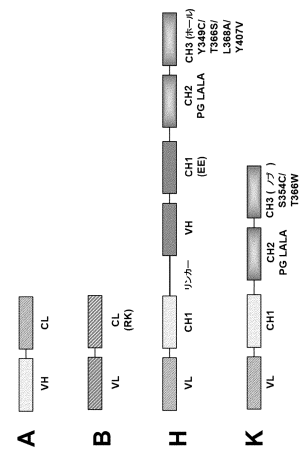


10

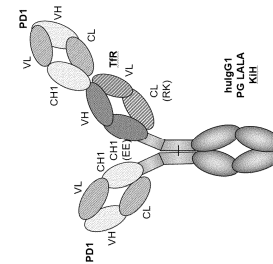
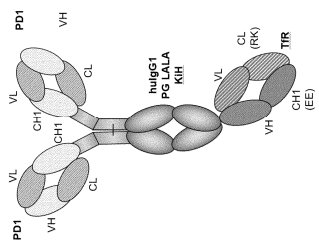
【図 6】



【図 7】



20

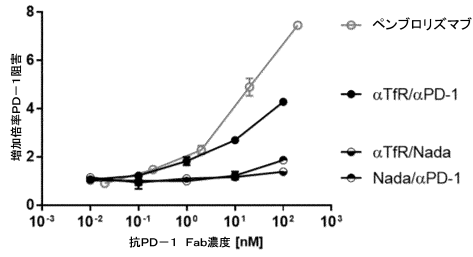


30

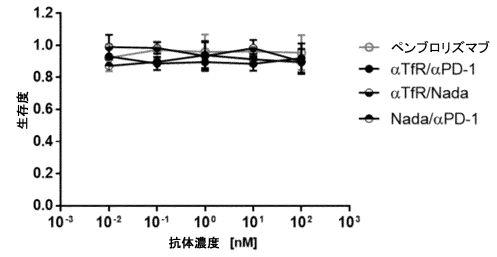
40

50

【図 8 A】

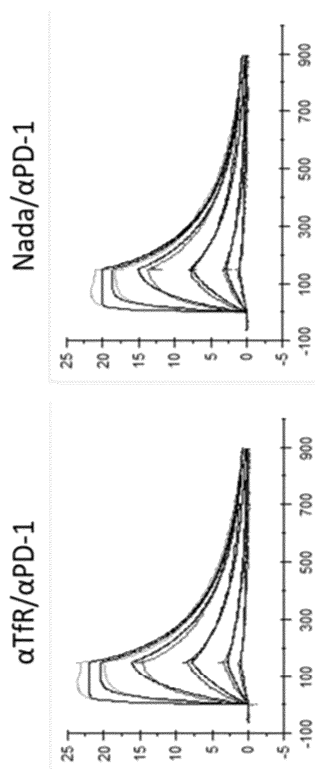


【図 8 B】

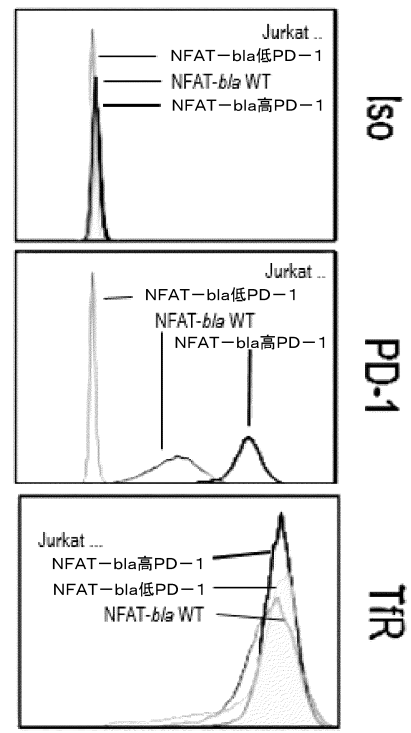


10

【図 9】



【図 10 A】



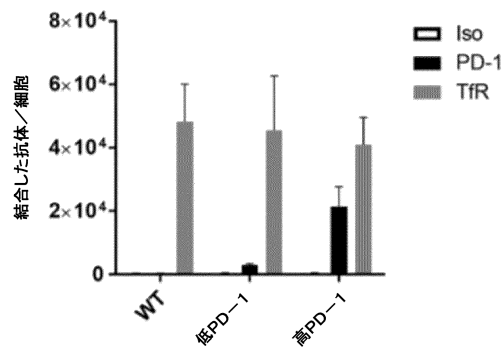
20

30

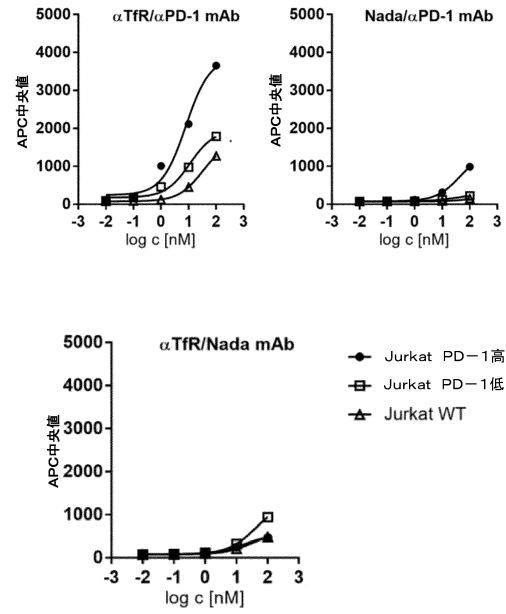
40

50

【図 1 0 B】

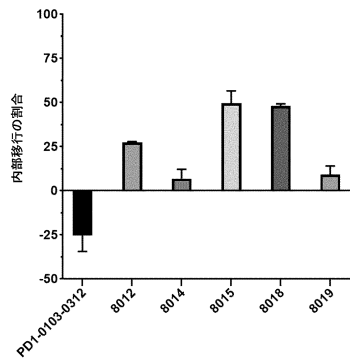


【図 1 0 C】

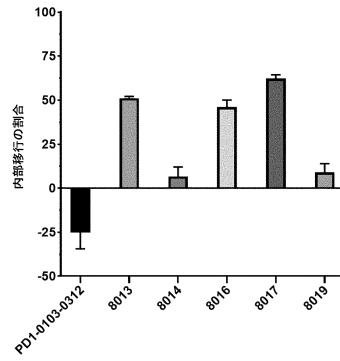


10

【図 1 1 A】



【図 1 1 B】



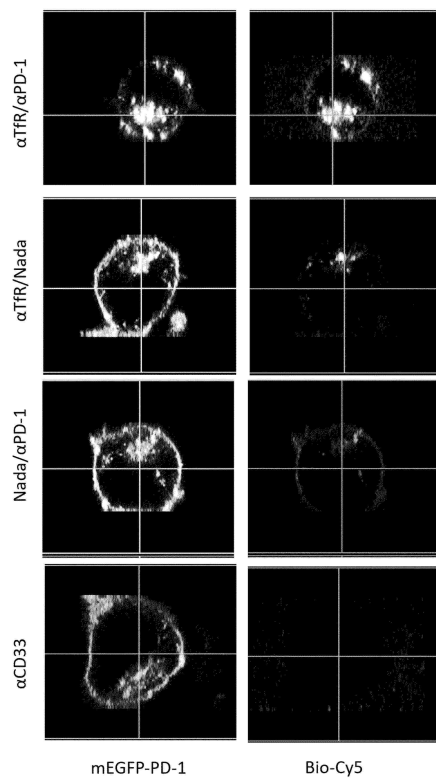
20

30

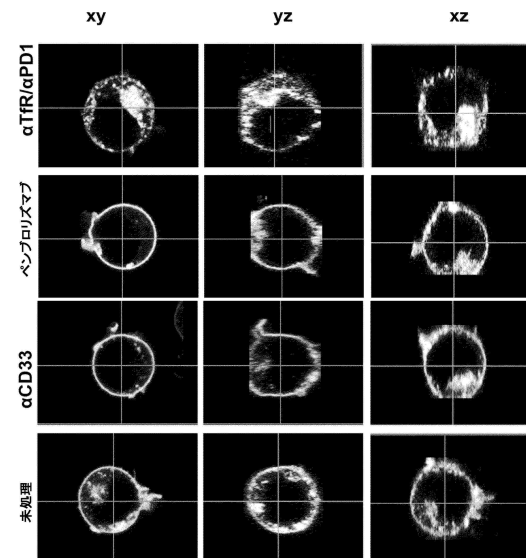
40

50

【図 1 2】



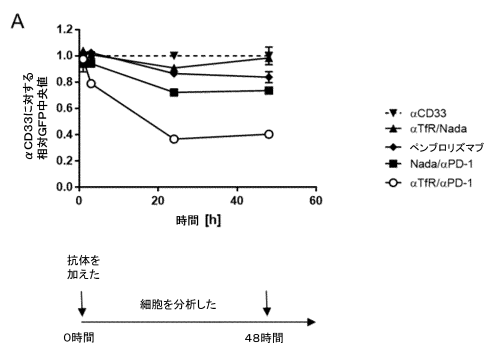
【図 1 3】



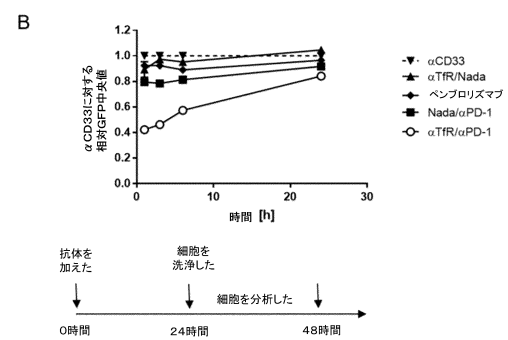
10

20

【図 1 4 A】



【図 1 4 B】

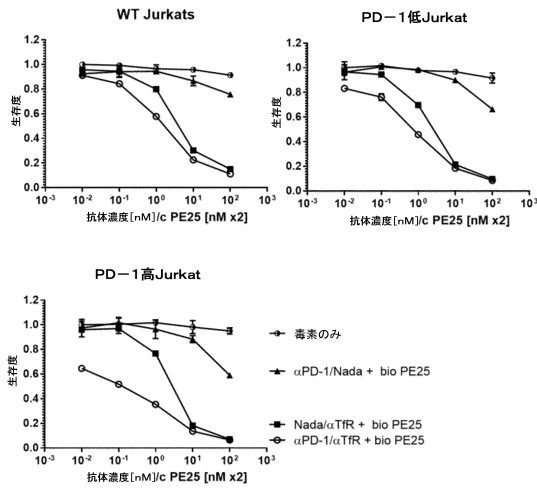


30

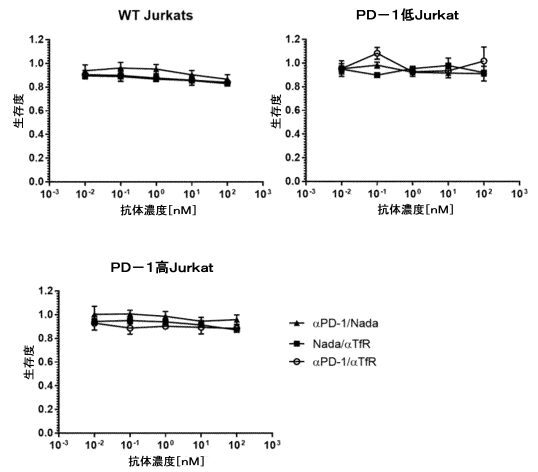
40

50

【図 15 A】

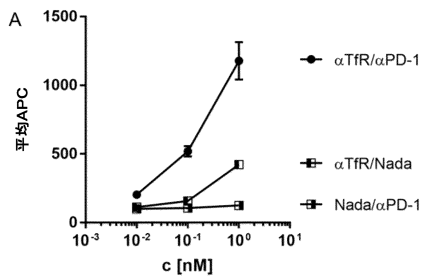


【図 15 B】

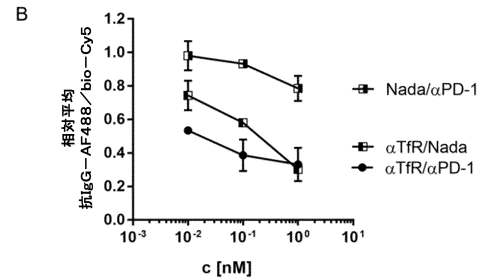


10

【図 16 A】



【図 16 B】



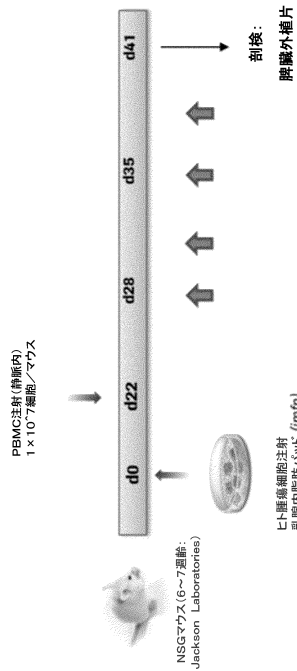
20

30

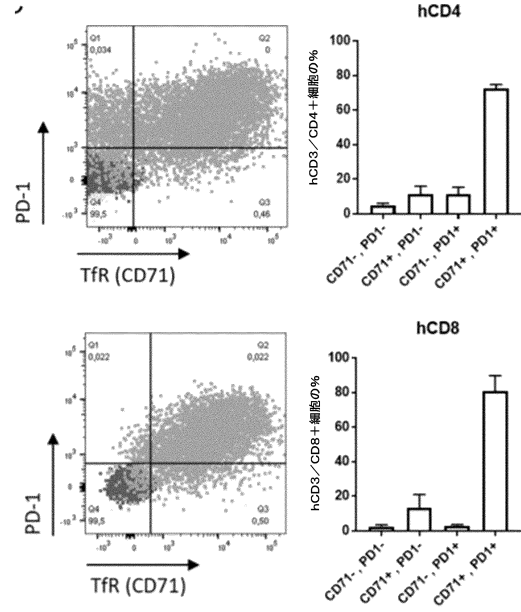
40

50

【図 17 A】



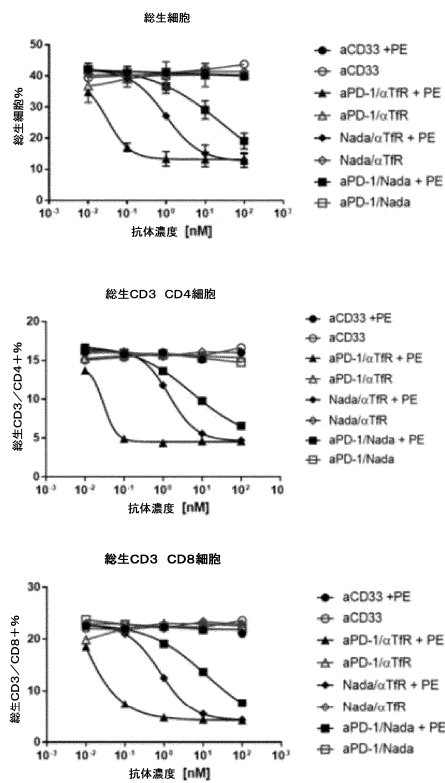
【図 17 B】



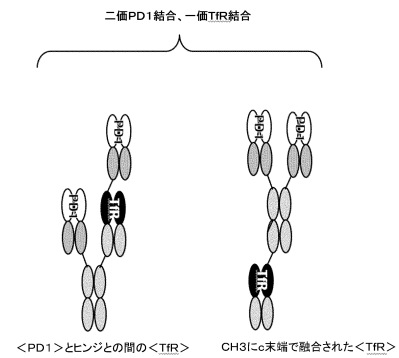
10

20

【図 17 C】



【図 18 A】

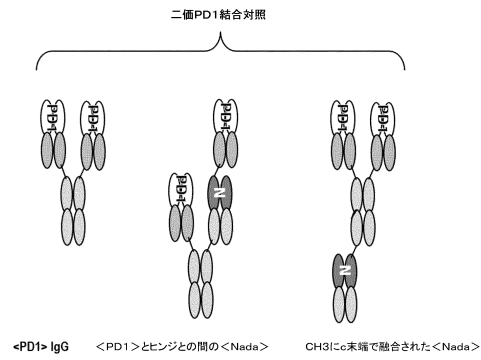


30

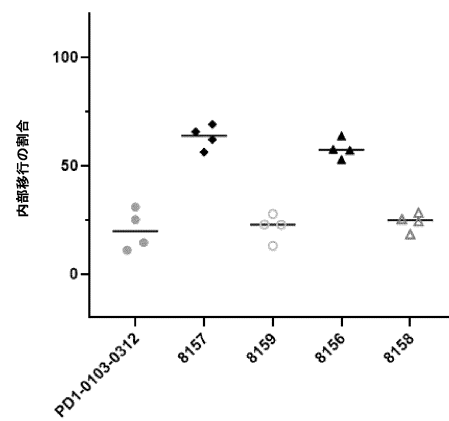
40

50

【図 18 B】

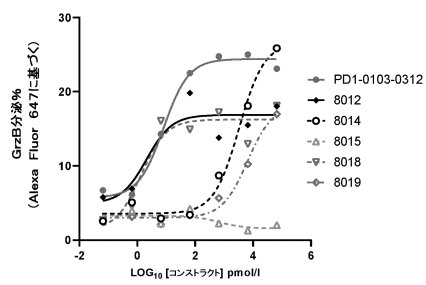


【図 19】

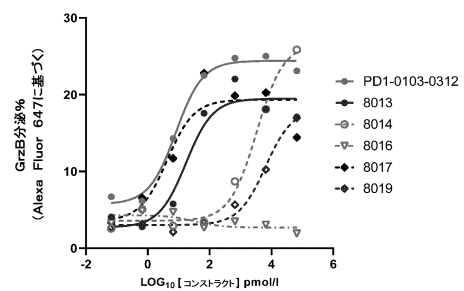


10

【図 20 A】



【図 20 B】



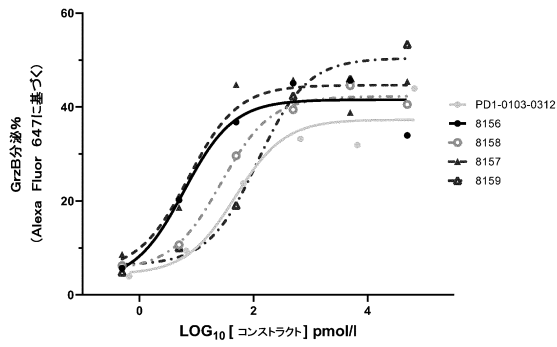
20

30

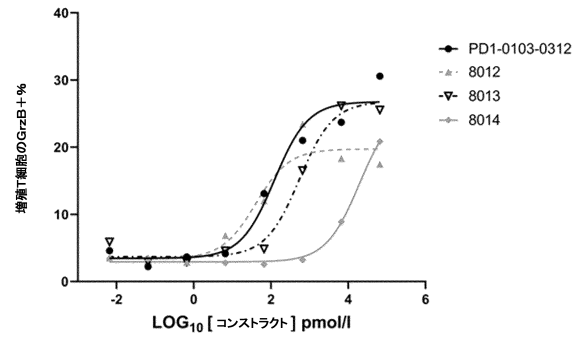
40

50

【図 2 1】

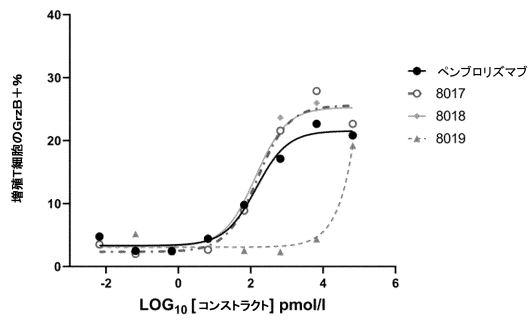


【図 2 2 A】

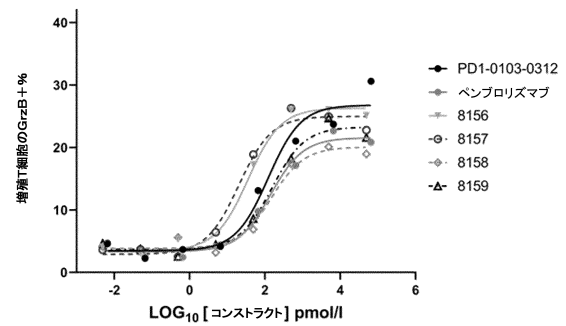


10

【図 2 2 B】

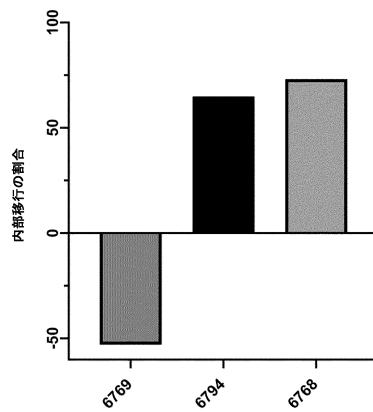


【図 2 2 C】

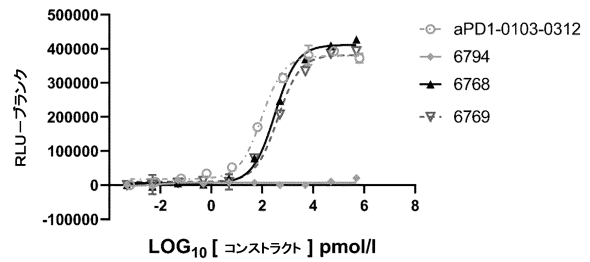


20

【図 2 3】



【図 2 4】



30

40

【配列表】

[2024528217000001.xml](#)

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2022/071661

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. ☒ forming part of the international application as filed.
- b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
- ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/071661

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. **C07K16/28 C07K16/44 A61K39/395 A61P37/06**
ADD.

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K A61P

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

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

EPO-Internal, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 3 824 903 A1 (IGM BIOSCIENCES INC [US]) 26 May 2021 (2021-05-26) [0116], [0159], [0168] -----	1-15
X	US 2020/354457 A1 (CODARRI DEAK LAURA [CH] ET AL) 12 November 2020 (2020-11-12) [0184], [0300], [0308] -----	1-15
X	WO 2016/179257 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS INC [US]) 10 November 2016 (2016-11-10) throughout; [0029], [000462], [000469], [000476] -----	1-15
X	WO 2020/104496 A1 (INST NAT SANTE RECH MED [FR] ET AL.) 28 May 2020 (2020-05-28) throughout; pgs. 21, 22, 36, claims 3, 4 -----	1-15
Y	throughout; pgs. 21, 22, 36, claims 3, 4 -----	1-15
	----- -/--	

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

☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 November 2022

Date of mailing of the international search report

25/11/2022

Name and mailing address of the ISA/
European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Wimmer, Georg

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/EP2022/071661

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	YIN WEIMIN ET AL: "BBB-penetrating codelivery liposomes treat brain metastasis of non-small cell lung cancer with EGFR T790M mutation", THERANOSTICS, vol. 10, no. 14, 1 January 2020 (2020-01-01), pages 6122-6135, XP055879486, AU ISSN: 1838-7640, DOI: 10.7150/thno.42234 the whole document -----	1-15
A	CAVACO MARCO ET AL: "Antibodies for the Treatment of Brain Metastases, a Dream or a Reality?", PHARMACEUTICS, vol. 12, no. 1, 13 January 2020 (2020-01-13), page 62, XP055879483, CH ISSN: 1999-4923, DOI: 10.3390/pharmaceutics12010062 sect. 2.3, 3.1; Tables 1, 2 -----	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2022/071661

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 3824903	A1	26-05-2021	AU 2016329197 A1	12-04-2018
			AU 2021200348 A1	18-03-2021
			CA 2999284 A1	06-04-2017
			CN 108463245 A	28-08-2018
			EP 3355913 A1	08-08-2018
			EP 3824903 A1	26-05-2021
			HK 1252791 A1	06-06-2019
			JP 7065766 B2	12-05-2022
			JP 2018535932 A	06-12-2018
			JP 2022105085 A	12-07-2022
			US 2018265596 A1	20-09-2018
			US 2020255546 A1	13-08-2020
			WO 2017059380 A1	06-04-2017

US 2020354457	A1	12-11-2020	CN 111655730 A	11-09-2020
			EP 3746480 A1	09-12-2020
			JP 2021511793 A	13-05-2021
			US 2020354457 A1	12-11-2020
			WO 2019149716 A1	08-08-2019

WO 2016179257	A2	10-11-2016	AU 2016258628 A1	30-11-2017
			AU 2021257886 A1	18-11-2021
			BR 112017023862 A2	17-07-2018
			CA 2984945 A1	10-11-2016
			CA 3176004 A1	10-11-2016
			CN 108026170 A	11-05-2018
			CN 114507283 A	17-05-2022
			DK 3292149 T3	28-02-2022
			EA 201792413 A1	29-06-2018
			EP 3292149 A2	14-03-2018
			EP 4029880 A1	20-07-2022
			ES 2910407 T3	12-05-2022
			HK 1250035 A1	23-11-2018
			HR P20220172 T1	24-06-2022
			HU E057720 T2	28-06-2022
			JP 2018520991 A	02-08-2018
			JP 2022120070 A	17-08-2022
			KR 20180011127 A	31-01-2018
			LT 3292149 T	10-03-2022
			PL 3292149 T3	21-03-2022
			PT 3292149 T	04-04-2022
			RS 62956 B1	31-03-2022
			SG 10201913762Q A	30-03-2020
			SI 3292149 T1	29-04-2022
			TW 201704265 A	01-02-2017
			TW 202146456 A	16-12-2021
			US 2016355599 A1	08-12-2016
			US 2019202927 A1	04-07-2019
			US 2022306759 A1	29-09-2022
			WO 2016179257 A2	10-11-2016

WO 2020104496	A1	28-05-2020	EP 3883964 A1	29-09-2021
			WO 2020104496 A1	28-05-2020

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 39/395
C 0 7 K 16/28

テーマコード (参考)

D

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

ロシュ グリクアート アーゲー

(72)発明者

クライン, クリスティアン

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

(72)発明者

インドルコーファー, アネット ステファニー

ドイツ国 8 2 3 7 7 ベンツベルク, ノンネンヴァルト 2, シー／オー ロシュ ダイアグノス
ティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者

シュミット, ダニエラ

ドイツ国 8 2 3 7 7 ベンツベルク, ノンネンヴァルト 2, シー／オー ロシュ ダイアグノス
ティックス ゲーエムベーハー

(72)発明者

ウェーバー, パトリック アレクサンダー アーロン

スイス国 8 9 5 2 シュリーレン, ヴァーギシュトラーセ 1 0, シー／オー ロシュ グリクア
ート アーゲー

F ターム (参考)

4C085 AA13 AA14 BB01 BB11 BB36 BB41 BB42 EE01 GG02 GG04
4H045 AA11 BA10 CA40 DA76 EA20 FA74 GA21