

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(i) 相補性決定領域 (CDR) - H1 が配列番号 3 で示され、CDR - H2 が配列番号 4 で示され、CDR - H3 が配列番号 5 で示される、CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3、又は配列番号 3、4 若しくは 5 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_H 領域、並びに、CDR - L1 が配列番号 6 で示され、CDR - L2 が配列番号 7 で示され、CDR - L3 が配列番号 8 で示される、CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3、又は配列番号 6、7 若しくは 8 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_L 領域、

(ii) CDR - H1 が配列番号 11 で示され、CDR - H2 が配列番号 12 で示され、CDR - H3 が配列番号 13 で示される、CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3、又は配列番号 11、12 若しくは 13 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_H 領域、並びに、CDR - L1 が配列番号 14 で示され、CDR - L2 が配列番号 15 で示され、CDR - L3 が配列番号 16 で示される、CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3、又は配列番号 14、15 若しくは 16 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_L 領域、

(iii) CDR - H1 が配列番号 19 で示され、CDR - H2 が配列番号 20 で示され、CDR - H3 が配列番号 21 で示される、CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3、又は配列番号 19、20 若しくは 21 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_H 領域、並びに、CDR - L1 が配列番号 22 で示され、CDR - L2 が配列番号 23 で示され、CDR - L3 が配列番号 24 で示される、CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3、又は配列番号 22、23 若しくは 24 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_L 領域、

(iv) CDR - H1 が配列番号 27 で示され、CDR - H2 が配列番号 28 で示され、CDR - H3 が配列番号 29 で示される、CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3、又は配列番号 27、28 若しくは 29 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_H 領域、並びに、CDR - L1 が配列番号 30 で示され、CDR - L2 が配列番号 31 で示され、CDR - L3 が配列番号 32 で示される、CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3、又は配列番号 30、31 若しくは 32 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_L 領域、あるいは

(v) CDR - H1 が配列番号 35 で示され、CDR - H2 が配列番号 36 で示され、CDR - H3 が配列番号 37 で示される、CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3、又は配列番号 35、36 若しくは 37 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_H 領域、並びに、CDR - L1 が配列番号 38 で示され、CDR - L2 が配列番号 39 で示され、CDR - L3 が配列番号 40 で示される、CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3、又は配列番号 38、39 若しくは 40 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V_L 領域

を含み、
p95HER2 に結合する、
抗体又はその抗原結合断片。

【請求項 2】

(i) 前記 V_H 領域が、配列番号 1 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列番号 3 ~ 5 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V_L 領域が、配列番号 2 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列番号 6 ~ 8 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(ii) 前記 V_H 領域が、配列番号 9 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列番号 11 ~ 13 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V_L 領域が、配列番号 10 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列番号 14 ~ 16 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(iii) 前記 V_H 領域が、配列番号 17 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列

番号 19～21 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 18 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 22～24 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(i v) 前記 V H 領域が、配列番号 25 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 27～29 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 26 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 30～32 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、又は

(v) 前記 V H 領域が、配列番号 33 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 35～37 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 34 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 38～40 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 3】

(i) 前記 V H 領域が、配列番号 1 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 2 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

(i i) 前記 V H 領域が、配列番号 9 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 10 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

(i i i) 前記 V H 領域が、配列番号 17 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 18 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

(i v) 前記 V H 領域が、配列番号 25 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 26 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、あるいは

(v) 前記 V H 領域が、配列番号 33 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 34 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 4】

前記抗体が F c ドメインを含む、請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 5】

前記 F c ドメインが、I g G ドメイン、I g E ドメイン、I g M ドメイン、及び I g D ドメイン、I g A ドメイン、又は I g Y ドメインである、請求項 4 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 6】

前記 I g G ドメインが、I g G 1 ドメイン、I g G 2 ドメイン、I g G 3 ドメイン、又は I g G 4 ドメインである、請求項 5 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 7】

前記 I g G 1 ドメインが、配列番号 41 のアミノ酸配列を含む、請求項 6 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 8】

前記 I g G 1 ドメインが、野生型 I g G 1 ドメインと比較して抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 及び／又は補体依存性細胞傷害 (C D C) を改変又は増強する点変異を含む、請求項 6 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 9】

前記点変異が、S 2 4 1 D、A 3 3 2 L、又は I 3 3 4 E である、請求項 8 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 10】

第 1 の抗原結合領域及び第 2 の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、前記第 1 の抗原結合領域が p 9 5 H E R 2 に結合する、二重特異性抗体。

【請求項 11】

相補性決定領域 (C D R) - H 1 が配列番号 19 で示され、C D R - H 2 が配列番号 20 で示され、C D R - H 3 が配列番号 21 で示される、C D R - H 1、C D R - H 2、及

10

20

30

40

50

び C D R - H 3、又は配列番号 19、20 若しくは 21 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む V_H 領域と、

C D R - L 1 が配列番号 22 で示され、C D R - L 2 が配列番号 23 で示され、C D R - L 3 が配列番号 24 で示される、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3、又は配列番号 19、20 若しくは 21 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む V_L 領域と

を含む、請求項 10 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 12】

前記 V_H 領域が、配列番号 17 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列番号 19 ~ 21 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V_L 領域が、配列番号 18 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列番号 22 ~ 24 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、請求項 10 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 13】

前記第 2 の抗原結合領域が、免疫チェックポイント分子、又は免疫刺激分子に結合する、請求項 10 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 14】

配列番号 46 若しくは 47 のアミノ酸配列、又はそれに対して 90% の同一性及びその結合特異性を有する配列を有する重鎖配列を含む、請求項 10 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 15】

配列番号 18 のアミノ酸配列を有する軽鎖を更に含む、請求項 14 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 16】

F c ドメインを含む、請求項 10 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 17】

前記 F c ドメインが、I g G ドメイン、I g E ドメイン、I g M ドメイン、及び I g D ドメイン、I g A ドメイン、又は I g Y ドメインである、請求項 16 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 18】

前記 F c ドメインが、I g G ドメインである、請求項 16 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 19】

前記 I g G ドメインが、I g G 1 ドメイン、I g G 2 ドメイン、I g G 3 ドメイン、又は I g G 4 ドメインである、請求項 18 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 20】

前記 F c ドメインの C 末端に s c F v が連結されている、請求項 16 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 21】

F a b ドメインと前記 s c F v ドメインとの間にリンカーを含む、請求項 20 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 22】

前記 F c ドメインの N 末端に F a b 断片が連結されている、請求項 21 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 23】

前記 F a b が p 9 5 H E R 2 結合部位を含み、前記 s c F v が C D 1 3 7 結合部位を含む、請求項 22 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 24】

治療剤と、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 10 ~ 23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、を含む、抗体-薬物コンジュゲート。

【請求項 25】

前記治療剤が、リンカーを介して、前記抗体、抗原結合断片、又は二重特異性抗体に共

10

20

30

40

50

有結合している、請求項 24 に記載の抗体薬物コンジュゲート。

【請求項 26】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗原結合断片、請求項 10～23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、又は請求項 24～25 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲートと、少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 27】

前記薬学的に許容される担体が、前記抗体、抗原結合断片、二重特異性抗体、又は抗体－薬物コンジュゲートのアミノ酸配列の C 末端にコンジュゲートされている、請求項 26 に記載の薬学的組成物。

10

【請求項 28】

対象に、治療有効量の請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗原結合断片、請求項 10～23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、又は請求項 24～25 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲートを投与し、それによってがんを治療することを含む、対象においてがんを治療する方法。

【請求項 28】

前記がんが、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、黒色腫、リンパ腫、乳がん、頭頸部がん、腎細胞がん（RCC）、卵巣がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮がん、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、胃がん、結腸がん、直腸がん、口腔がん、咽頭がん、膵臓がん、甲状腺がん、皮膚がん、脳がん、骨がん、造血器がん、又は白血病から選択される、請求項 28 に記載の方法。

20

【請求項 30】

配列番号 1～42 又は 46～47 で示される、単離されたアミノ酸配列。

【請求項 31】

請求項 1～9 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 10～23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードする、単離された核酸配列。

【請求項 32】

配列番号 1～42 又は 46～47 のうちのいずれか 1 つをコードする、単離された核酸。

【請求項 33】

(i) 相補性決定領域（CDR）－H1 が配列番号 51 で示され、CDR－H2 が配列番号 52 で示され、CDR－H3 が配列番号 53 で示される、CDR－H1、CDR－H2、及び CDR－H3、又は配列番号 51、52 若しくは 53 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VH 領域、並びに、CDR－L1 が配列番号 54 で示され、CDR－L2 が配列番号 55 で示され、CDR－L3 が配列番号 56 で示される、CDR－L1、CDR－L2、及び CDR－L3、又は配列番号 55、56 若しくは 57 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VL 領域、

30

(ii) CDR－H1 が配列番号 59 で示され、CDR－H2 が配列番号 60 で示され、CDR－H3 が配列番号 61 で示される、CDR－H1、CDR－H2、及び CDR－H3、又は配列番号 59、60 若しくは 61 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VH 領域、並びに、CDR－L1 が配列番号 62 で示され、CDR－L2 が配列番号 63 で示され、CDR－L3 が配列番号 64 で示される、CDR－L1、CDR－L2、及び CDR－L3、又は配列番号 62、63 若しくは 64 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VL 領域、

40

(iii) CDR－H1 が配列番号 67 で示され、CDR－H2 が配列番号 68 で示され、CDR－H3 が配列番号 69 で示される、CDR－H1、CDR－H2、及び CDR－H3、又は配列番号 67、68 若しくは 69 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VH 領域、並びに、CDR－L1 が配列番号 70 で示され、CDR－L2 が配列番号 71 で示され、CDR－L3 が配列番号 72 で示される、CDR

50

－L 1、CDR－L 2、及びCDR－L 3、又は配列番号70、71若しくは72に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VL領域、

(iv) CDR－H 1が配列番号75で示され、CDR－H 2が配列番号76で示され、CDR－H 3が配列番号77で示される、CDR－H 1、CDR－H 2、及びCDR－H 3、又は配列番号75、76若しくは77に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VH領域、並びに、CDR－L 1が配列番号78で示され、CDR－L 2が配列番号79で示され、CDR－L 3が配列番号80で示される、CDR－L 1、CDR－L 2、及びCDR－L 3、又は配列番号78、79若しくは80に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VL領域、

(v) CDR－H 1が配列番号67で示され、CDR－H 2が配列番号68で示され、CDR－H 3が配列番号69で示される、CDR－H 1、CDR－H 2、及びCDR－H 3、又は配列番号67、68若しくは69に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VH領域、並びに、CDR－L 1が配列番号70で示され、CDR－L 2が配列番号82で示され、CDR－L 3が配列番号72で示される、CDR－L 1、CDR－L 2、及びCDR－L 3、又は配列番号70、82若しくは72に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VL領域、

(vi) CDR－H 1が配列番号67で示され、CDR－H 2が配列番号68で示され、CDR－H 3が配列番号69で示される、CDR－H 1、CDR－H 2、及びCDR－H 3、又は配列番号67、68若しくは69に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VH領域、並びに、CDR－L 1が配列番号70で示され、CDR－L 2が配列番号84で示され、CDR－L 3が配列番号72で示される、CDR－L 1、CDR－L 2、及びCDR－L 3、又は配列番号70、84若しくは72に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VL領域、あるいは

(vii) CDR－H 1が配列番号67で示され、CDR－H 2が配列番号68で示され、CDR－H 3が配列番号69で示される、CDR－H 1、CDR－H 2、及びCDR－H 3、又は配列番号67、68若しくは69に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VH領域、並びに、CDR－L 1が配列番号70で示され、CDR－L 2が配列番号86で示され、CDR－L 3が配列番号72で示される、CDR－L 1、CDR－L 2、及びCDR－L 3、又は配列番号70、86若しくは72に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、VL領域

を含み、

CD73に結合する、
抗体又はその抗原結合断片。

【請求項34】

(i) 前記VH領域が、配列番号49に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号51～53の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記VL領域が、配列番号50に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号54～56の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(ii) 前記VH領域が、配列番号57に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号59～61の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記VL領域が、配列番号58に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号62～64の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(iii) 前記VH領域が、配列番号65に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号67～69の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記VL領域が、配列番号66に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号70～72の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(iv) 前記VH領域が、配列番号73に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号75～77の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記VL領域が、配列番号74に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号78～80の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(v) 前記 V H 領域が、配列番号 65 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 67 ~ 69 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 81 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 70、82 及び 72 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(v i) 前記 V H 領域が、配列番号 65 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 67 ~ 69 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 83 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 70、84 及び 72 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、又は

(v i i) 前記 V H 領域が、配列番号 65 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 67 ~ 69 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 85 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 70、86 及び 72 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

請求項 33 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 35】

(i) 前記 V H 領域が、配列番号 49 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 50 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

(i i) 前記 V H 領域が、配列番号 57 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 58 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

(i i i) 前記 V H 領域が、配列番号 65 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 66 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

(i v) 前記 V H 領域が、配列番号 73 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 74 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

(v) 前記 V H 領域が、配列番号 65 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 81 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

(v i) 前記 V H 領域が、配列番号 65 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 83 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、あるいは

(v i i) 前記 V H 領域が、配列番号 65 で示され、前記 V L 領域が、配列番号 85 で示されるか又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列である、

請求項 33 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 36】

前記抗体が F c ドメインを含む、請求項 33 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 37】

前記 F c ドメインが、I g G ドメイン、I g E ドメイン、I g M ドメイン、及び I g D ドメイン、I g A ドメイン、又は I g Y ドメインである、請求項 36 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 38】

前記 I g G ドメインが、I g G 1 ドメイン、I g G 2 ドメイン、I g G 3 ドメイン、又は I g G 4 ドメインである、請求項 37 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 39】

前記 I g G 1 ドメインが、配列番号 87 のアミノ酸配列を含む、請求項 38 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 40】

前記 I g G 1 が、野生型 I g G 1 と比較して抗体依存性細胞傷害 (A D C C) 及び／又は補体依存性細胞傷害 (C D C) を改変又は増強する点変異を含む、請求項 38 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 41】

前記点変異が、K 297 A、又は K 322 A である、請求項 40 に記載の抗体又は抗原結合断片。

【請求項 42】

10

20

30

40

50

第 1 の抗原結合領域及び第 2 の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、前記第 1 の抗原結合領域が C D 7 3 に結合する、二重特異性抗体。

【請求項 4 3】

(i) 相補性決定領域 (C D R) - H 1 が配列番号 6 7 で示され、C D R - H 2 が配列番号 6 8 で示され、C D R - H 3 が配列番号 6 9 で示される、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3、又は配列番号 6 7、6 8 若しくは 6 9 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V H 領域、並びに、C D R - L 1 が配列番号 7 0 で示され、C D R - L 2 が配列番号 7 1 で示され、C D R - L 3 が配列番号 7 2 で示される、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3、又は配列番号 7 0、7 1 若しくは 7 2 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V L 領域、

10

(i i) 相補性決定領域 (C D R) - H 1 が配列番号 6 7 で示され、C D R - H 2 が配列番号 6 8 で示され、C D R - H 3 が配列番号 6 9 で示される、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3、又は配列番号 6 7、6 8 若しくは 6 9 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V H 領域、並びに、C D R - L 1 が配列番号 7 0 で示され、C D R - L 2 が配列番号 8 2 で示され、C D R - L 3 が配列番号 7 2 で示される、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3、又は配列番号 7 0、8 2 若しくは 7 2 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V L 領域、

(i i i) 相補性決定領域 (C D R) - H 1 が配列番号 6 7 で示され、C D R - H 2 が配列番号 6 8 で示され、C D R - H 3 が配列番号 6 9 で示される、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3、又は配列番号 6 7、6 8 若しくは 6 9 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V H 領域、並びに、C D R - L 1 が配列番号 7 0 で示され、C D R - L 2 が配列番号 8 4 で示され、C D R - L 3 が配列番号 7 2 で示される、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3、又は配列番号 7 0、8 4 若しくは 7 2 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V L 領域、あるいは

20

(i v) 相補性決定領域 (C D R) - H 1 が配列番号 6 7 で示され、C D R - H 2 が配列番号 6 8 で示され、C D R - H 3 が配列番号 6 9 で示される、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3、又は配列番号 6 7、6 8 若しくは 6 9 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V H 領域、並びに、C D R - L 1 が配列番号 7 0 で示され、C D R - L 2 が配列番号 8 6 で示され、C D R - L 3 が配列番号 7 2 で示される、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3、又は配列番号 7 0、8 6 若しくは 7 2 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む、V L 領域

30

を含む、請求項 4 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 4 4】

(i) 前記 V H 領域が、配列番号 6 5 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 6 7 ~ 6 9 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 6 6 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 7 0 ~ 7 2 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

40

(i i) 前記 V H 領域が、配列番号 6 5 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 6 7 ~ 6 9 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 8 1 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 7 0、8 2 及び 7 2 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、

(i i i) 前記 V H 領域が、配列番号 6 5 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 6 7 ~ 6 9 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 8 2 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 7 0、8 4 及び 7 2 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、又は

(i v) 前記 V H 領域が、配列番号 6 5 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番

50

号 67～69 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、前記 V L 領域が、配列番号 85 に対して少なくとも 80 % の同一性及び配列番号 70、86 及び 72 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する、
請求項 42 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 45】

前記第 2 の抗原結合領域が、免疫チェックポイント分子、又は免疫刺激分子に結合する、請求項 42 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 46】

配列番号 88、89、90 若しくは 91 のアミノ酸配列、又はそれに対して 90 % の同一性及びその結合特異性を有する配列を有する重鎖配列を含む、請求項 42 に記載の二重特異性抗体。

10

【請求項 47】

配列番号 66 のアミノ酸配列を有する軽鎖を更に含む、請求項 42 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 48】

F c ドメインを含む、請求項 42 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 49】

前記 F c ドメインが、I g G ドメイン、I g E ドメイン、I g M ドメイン、及び I g D ドメイン、I g A ドメイン、又は I g Y ドメインである、請求項 48 に記載の二重特異性抗体。

20

【請求項 50】

前記 F c ドメインが、I g G ドメインである、請求項 42 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 51】

前記 I g G ドメインが、I g G 1 ドメイン、I g G 2 ドメイン、I g G 3 ドメイン、又は I g G 4 ドメインである、請求項 50 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 52】

前記 F c ドメインの C 末端に s c F v が連結されている、請求項 48 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 53】

F a b ドメインと前記 s c F v ドメインとの間にリンカーを含む、請求項 52 に記載の二重特異性抗体。

30

【請求項 54】

前記 F c ドメインの N 末端に F a b 断片が連結されている、請求項 53 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 55】

前記 F a b が C D 73 結合部位を含み、前記 s c F v が C D 137 結合部位を含む、請求項 54 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 56】

治療剤と、請求項 33～41 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項 42～55 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、を含む、抗体－薬物コンジュゲート。

40

【請求項 57】

前記治療剤が、リンカーを介して、前記抗体、抗原結合断片、又は二重特異性抗体に共有結合している、請求項 56 に記載の抗体－薬物コンジュゲート。

【請求項 58】

請求項 33～41 のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗原結合断片、請求項 42～55 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、又は請求項 56～57 のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲートと、少なくとも 1 つの薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物。

【請求項 59】

50

前記薬学的に許容される担体が、前記抗体、抗原結合断片、二重特異性抗体、又は抗体－薬物コンジュゲートのアミノ酸配列のC末端にコンジュゲートされている、請求項58に記載の薬学的組成物。

【請求項60】

対象に、治療有効量の請求項33～41のいずれか一項に記載の抗体若しくは抗原結合断片、請求項42～55のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、又は請求項56～57のいずれか一項に記載の抗体－薬物コンジュゲートを投与し、それによってがんを治療することを含む、対象においてがんを治療する方法。

【請求項61】

前記がんが、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺がん（NSCLC）、黒色腫、リンパ腫、乳がん、頭頸部がん、腎細胞がん（RCC）、卵巣がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮がん、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、胃がん、結腸がん、直腸がん、口腔がん、咽頭がん、膵臓がん、甲状腺がん、皮膚がん、脳がん、骨がん、造血器がん、又は白血病から選択される、請求項60に記載の方法。

【請求項62】

配列番号49～86又は88～91で示される、単離されたアミノ酸配列。

【請求項63】

請求項32～40のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合断片、又は請求項41～54のいずれか一項に記載の二重特異性抗体をコードする、単離されたアミノ酸配列。

【請求項64】

配列番号49～86又は88～91のうちのいずれか1つをコードする、単離された核酸。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

この出願は、2021年11月19日に出願された米国仮出願第63／281,347号、及び2022年7月26日に出願された米国仮出願第63／392,474号の米国特許法第119条（e）に基づく優先権の利益を主張する。先行出願の開示は、本出願の開示の一部とみなされ、この出願の開示において参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

【0002】

配列表の組み込み

添付の配列表における資料は、参照により本出願に組み込まれる。AP1110__2WO.xmlという名前の添付の配列表XMLファイルは、2022年11月18日に作成され、206kbである。

【0003】

発明の分野

本発明は、概して、抗体及びその抗原結合断片に関し、より具体的には、がん細胞に対する細胞傷害性を有し、T細胞機能を増強する抗体及び抗原結合断片に関する。

【背景技術】

【0004】

背景情報

がん免疫療法は、ヒト免疫系による腫瘍に対する自然な防御を回復又は強化する。かかる療法は、通常、腫瘍関連抗原（TAA）などのがん細胞表面上の特定の生体分子を標的とする。抗腫瘍活性は、宿主免疫系をTAAに指向させることによって達成される可能性があり、その結果、がん細胞に対する適応免疫応答を確立又は誘導する。過去数十年にわたり、モノクローナル抗体（mAb）を使用したがん治療は、大きな成功を収めてきており、それらの多くが、がん治療又は臨床試験のために承認されてきた。

【0005】

CD137 (4-1BB/TNFRSF9) は、1989年に、抗原プライミングされたT細胞では発現したが、休止T細胞では発現しなかった誘導性遺伝子として同定された。加えて、これは樹状細胞(DC)、ナチュラルキラー細胞(NK)、活性化CD4+及びCD8+Tリンパ球、好酸球、ナチュラルキラーT細胞(NKT)、及び肥満細胞において発現することが知られているが、骨髄由来サプレッサー細胞(MDSC)は、その表面上でこの分子を発現しないことが調査された。抗CD137抗体は、細胞傷害性T細胞を活性化し、インターフェロンガンマ(IFN-γ)の産生を増加させる能力に起因して、抗がん活性において大きな可能性を示す。

【0006】

がん治療のための抗体ベースの戦略は、過去20年間で劇的に進歩している。リツキシマブが1997年にがんの治療のための最初のモノクローナル抗体(mAb)として承認されて以来、いくつかのmAbが、固形腫瘍及び血液悪性腫瘍の両方の治療のための標準治療となっている。承認されたmAbのほとんど(例えば、リツキシマブ、トラスツズマブ、及びセツキシマブ)は、がん細胞の表面上の腫瘍関連抗原を標的とし、細胞成長を阻害する。いくつかの有効な抗体が出現しているが、長期的で持続的な応答は依然として不可能であり、耐性及び再発は依然として主要な問題である。免疫調節抗体は、がん免疫療法に革命をもたらし、画期的な特徴を得るのに役立った。

【0007】

イピリムマブ及びペムブロリズマブなどのチェックポイント遮断剤に加えて、共刺激受容体の腫瘍壊死因子(TNF)スーパーファミリーを標的とする薬剤が、開発に入っている。CD137は、臨床試験に進んでいるTNF受容体ファミリー標的の1つである。CD137は、CD4+及びCD8+T細胞、調節性T細胞(Treg)、樹状細胞(DC)、並びにナチュラルキラー(NK)細胞を含む、多くの免疫細胞を調節する。最近の研究は、抗CD137 mAbの添加が、免疫調節抗体の抗腫瘍有効性を増強することができることを示す。しかしながら、CD137を標的とするより特異的かつより効果的な抗原結合分子の必要性は依然として満たされていない。

【発明の概要】

【0008】

本発明は、p95HER2発現がん細胞に結合する優れた活性を示す抗p95HER2抗体、及び細胞膜結合形態又は可溶性形態のCD73の酵素活性を中和する優れた活性を示す抗CD73抗体の発見に基づく。本発明は更に、p95HER2及びCD137を標的とする二重特異性抗体が、p95HER陽性がん細胞に対する抗体依存性細胞媒介性細胞傷害(ADCC)及びp95HER2依存性T細胞活性化という二重の機能を有し、CD73及びCD137を標的とする二重特異性抗体が、各抗体による単一治療又は併用治療よりも、T細胞エフェクター機能を高め、インビボでの腫瘍成長をよりよく阻害するための並外れた活性を有するという発見に基づいている。

【0009】

一実施形態では、本発明は、抗p95HER2抗体クローンR4-3(p95HER2 #R4-3)、抗p95HER2抗体クローンR4-5(p95HER2 #R4-5)、抗p95HER2抗体クローンR4-11(p95HER2 #R4-11)、抗p95HER2抗体クローンR4-15(p95HER2 #R4-15)、抗p95HER2抗体クローンR4-38(p95HER2 #R4-38)といった4つの抗体又はその抗原結合断片を提供する。一態様では、本明細書で提供される抗p95HER2抗体は、配列番号1、配列番号9、配列番号17、配列番号25及び配列番号33から選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変(VH)領域と、配列番号2、配列番号10、配列番号18、配列番号26及び配列番号34から選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変(VL)領域と、を含む。

【0010】

一態様では、抗体又は抗原結合断片は、配列番号 1 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 2 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有し、(a) V H C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 (ここで、C D R - H 1 が、配列番号 3 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 2 が、配列番号 4 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 3 が、配列番号 5 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) V L C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 (ここで、C D R - L 1 が、配列番号 6 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 2 が、配列番号 7 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 3 が、配列番号 8 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む)を含む。

10

【0011】

別の態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 9 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 10 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有し、(a) V H C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 (ここで、C D R - H 1 が、配列番号 11 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 2 が、配列番号 12 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 3 が、配列番号 13 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) V L C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 (ここで、C D R - L 1 が、配列番号 14 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 2 が、配列番号 15 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 3 が、配列番号 16 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む)を含む。

20

【0012】

一態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 17 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 18 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有し、(a) V H C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 (ここで、C D R - H 1 が、配列番号 19 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 2 が、配列番号 20 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 3 が、配列番号 21 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) V L C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 (ここで、C D R - L 1 が、配列番号 22 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 2 が、配列番号 23 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 3 が、配列番号 24 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む)を含む。

30

【0013】

別の態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 25 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 26 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有し、(a) V H C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 (ここで、C D R - H 1 が、配列番号 27 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 2 が、配列番号 28 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 3 が、配列番号 29 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) V L C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 (ここで、C D R - L 1 が、配列番号 30 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 2 が、配列番号 31 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 3 が、配列番号 32 に対して少なくとも 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む)を含む。

40

50

【0014】

更に別の態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号33に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号34に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を有し、(a) VH CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3(ここで、CDR-H1が、配列番号35に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-H2が、配列番号36に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-H3が、配列番号37に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに(b) VL CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3(ここで、CDR-L1が、配列番号38に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-L2が、配列番号39に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-L3が、配列番号40に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む)を含む。

10

【0015】

一態様では、抗体は、Fcドメインを含む。いくつかの態様では、Fcドメインは、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又はIgYドメインである。様々な態様では、IgGドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4ドメインである。他の態様では、IgG1ドメインは、配列番号41のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、IgG1ドメインは、野生型IgG1ドメインと比較して抗体依存性細胞傷害(ADCC)及び/又は補体依存性細胞傷害(CDC)を改変又は増強する点変異を含む。多くの態様では、点変異は、S241D/A332L/I334E変異を含む。

20

【0016】

別の実施形態では、本発明は、第1の抗原結合領域及び第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合領域が、p95HER2に結合する、二重特異性抗体を提供する。

【0017】

一態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域(CDR)-H1が配列番号19で示され、CDR-H2が配列番号20で示され、CDR-H3が配列番号21で示される、CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3、又は配列番号19、20若しくは21に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含むVH領域と、CDR-L1が配列番号22で示され、CDR-L2が配列番号23で示され、CDR-L3が配列番号24で示される、CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3、又は配列番号19、20若しくは21に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含むVL領域と、を含む。別の態様では、VH領域は、配列番号17に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号19~21の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、VL領域は、配列番号18に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号22~24の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。一態様では、第2の抗原結合領域は、免疫チェックポイント分子、又は免疫刺激分子に結合する。別の態様では、抗体は、配列番号46若しくは47のアミノ酸配列、又はそれに対して90%の同一性及びその結合特異性を有する配列を有する重鎖配列を含む。一態様では、二重特異性抗体は、配列番号18のアミノ酸配列を有する軽鎖を更に含む。別の態様では、二重特異性抗体は、Fcドメインを含む。いくつかの態様では、Fcドメインは、IgGドメイン、IgEドメイン、IgMドメイン、及びIgDドメイン、IgAドメイン、又はIgYドメインである。様々な態様では、Fcドメインは、IgGドメインである。多くの態様では、IgGドメインは、IgG1ドメイン、IgG2ドメイン、IgG3ドメイン、又はIgG4ドメインである。一態様では、FcドメインのC末端にscFvが連結されている。別の態様では、二重特異性抗体は、FabドメインとscFvドメインとの間にリンカーを含む。いくつかの態様では、FcドメインのN末端にFab断片が連結されている。様々な態様では、Fabはp95HER2結合部位を含み、scFvはCD137結合部位を含む。

30

40

【0018】

50

一実施形態では、本発明は、治療剤と、及び本明細書に記載される抗体若しくはその抗原結合断片のうちのいずれか1つ、又は本明細書に記載される二重特異性抗体のうちのいずれか1つと、を含む、抗体-薬物コンジュゲートを提供する。

【0019】

一態様では、治療剤は、リンカーを介して、抗体、抗原結合断片、又は二重特異性抗体に共有結合している。

【0020】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される抗体若しくはその抗原結合断片のうちのいずれか1つ、本明細書に記載される二重特異性抗体のうちのいずれか1つ、又は本明細書に記載される抗体-薬物コンジュゲートのうちのいずれか1つと、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物を提供する。

10

【0021】

一態様では、薬学的に許容される担体は、抗体、抗原結合断片、二重特異性抗体、又は抗体-薬物コンジュゲートのアミノ酸配列のC末端のC末端にコンジュゲートされている。

【0022】

一実施形態では、本発明は、がんを治療することを必要とする対象に、有効量の本明細書に記載される抗体又はその抗原結合断片のうちのいずれか1つ、本明細書に記載される二重特異性抗体のうちのいずれか1つ、又は本明細書に記載の抗体-薬物コンジュゲートのうちのいずれか1つを投与し、それによってがんを治療することを含む、がんを治療する方法を提供する。一態様では、がんは、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺癌（NSCLC）、黒色腫、リンパ腫、乳がん、頭頸部がん、腎細胞がん（RCC）、卵巣がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮がん、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、胃がん、結腸がん、直腸がん、口腔がん、咽頭がん、膵臓がん、甲状腺がん、皮膚がん、脳がん、骨がん、造血器がん、又は白血病から選択される。

20

【0023】

別の実施形態では、本発明は、配列番号1～42又は46～47に示される、単離されたアミノ酸配列を提供する。

【0024】

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載される抗体若しくはその抗原結合断片、又は二重特異性抗体のうちのいずれか1つをコードする、単離された核酸配列を提供する。別の実施形態では、本発明は、配列番号1～42又は46～47のうちのいずれか1つをコードする、単離された核酸を提供する。

30

【0025】

更なる実施形態では、本発明は、抗CD73抗体クローン3-4（CD73 #3-4）、抗CD73抗体クローン3-16（CD73 #3-16）、抗CD73抗体クローン3-1-28（CD73 #3-1-28）、及び抗CD73抗体クローン3-1-37（CD73 #3-1-37）といった4つの抗体又はその抗原結合断片、並びに抗CD73 #3-1-28（S51A Q54E）、抗CD73 #3-1-28（S107D S109H）、抗CD73 #3-1-28（S107D S109T A114S）といった抗CD73クローン3-1-28に由来する3つの親和性成熟抗体を提供する。

40

【0026】

一態様では、本明細書で提供される抗CD73抗体は、配列番号49、配列番号57、配列番号65、及び配列番号73から選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変（VH）領域と、配列番号50、配列番号58、配列番号66及び配列番号74、配列番号81、配列番号83及び配列番号85から選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変（VL）領域と、を含む。

【0027】

50

一態様では、抗体又は抗原結合断片は、配列番号 49 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 50 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有し、(a) V H C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 (ここで、C D R - H 1 が、配列番号 51 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 2 が、配列番号 52 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 3 が、配列番号 53 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) V L C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 (ここで、C D R - L 1 が、配列番号 54 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 2 が、配列番号 55 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 3 が、配列番号 56 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む) を含む。

10

【0028】

別の態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 57 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 58 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有し、(a) V H C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 (ここで、C D R - H 1 が、配列番号 59 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 2 が、配列番号 60 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 3 が、配列番号 61 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) V L C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 (ここで、C D R - L 1 が、配列番号 62 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 2 が、配列番号 63 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 3 が、配列番号 64 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む) を含む。

20

【0029】

一態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 65 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 66 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有し、(a) V H C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 (ここで、C D R - H 1 が、配列番号 67 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 2 が、配列番号 68 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 3 が、配列番号 69 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) V L C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 (ここで、C D R - L 1 が、配列番号 70 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 2 が、配列番号 71 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 3 が、配列番号 72 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む) を含む。

30

【0030】

別の態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 73 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 74 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有し、(a) V H C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 (ここで、C D R - H 1 が、配列番号 75 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 2 が、配列番号 76 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - H 3 が、配列番号 77 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) V L C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 (ここで、C D R - L 1 が、配列番号 78 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 2 が、配列番号 79 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、C D R - L 3 が、配列番号 80 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含

40

50

む)を含む。

【0031】

追加の実施形態では、本発明は、抗CD73 #3-1-28 (S51A Q54E)、抗CD73 #3-1-28 (S107D S109H)、抗CD73 #3-1-28 (S107D S109T A114S)といった抗CD73クローン3-1-28に由来する3つの親和性成熟抗体を提供する。

【0032】

一態様では、配列番号81に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL領域を有する抗CD73 #3-1-28 (S51A Q54E)抗体又はその抗原結合断片は、配列番号82に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL CDR-L2領域を含む。別の態様では、配列番号83に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域を有する抗CD73 #3-1-28 (S107D S109H)抗体又はその抗原結合断片は、配列番号84に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH CDR-H3領域を含む。更に別の態様では、配列番号85に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域を有する抗CD73 #3-1-28 (S107D S109T A114S)抗体又はその抗原結合断片は、配列番号86に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH CDR-H3領域を含む。

【0033】

一態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号65に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号81に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を有し、(a) VH CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3 (ここで、CDR-H1が、配列番号67に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-H2が、配列番号68に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-H3が、配列番号69に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに(b) VL CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3 (ここで、CDR-L1が、配列番号70に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-L2が、配列番号82に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-L3が、配列番号72に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む)を含む。

【0034】

別の態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号65に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号83に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を有し、(a) VH CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3 (ここで、CDR-H1が、配列番号67に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-H2が、配列番号68に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-H3が、配列番号69に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに(b) VL CDR-L1、CDR-L2、及びCDR-L3 (ここで、CDR-L1が、配列番号70に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-L2が、配列番号84に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-L3が、配列番号72に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含む)を含む。

【0035】

更に別の態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号65に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号85に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を有し、(a) VH CDR-H1、CDR-H2、及びCDR-H3 (ここで、CDR-H1が、配列番号67に対して少なくとも80%の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-H2が、配列番号6

8 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-H3 が、配列番号 69 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む)、並びに (b) VL CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3 (ここで、CDR-L1 が、配列番号 70 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-L2 が、配列番号 86 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含み、CDR-L3 が、配列番号 72 に対して少なくとも 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む)を含む。

【0036】

一態様では、本明細書で提供される抗体又はその抗原結合断片は、Fcドメインを含む。いくつかの態様では、Fcドメインは、IgG、IgE、IgM、IgD、IgA、又は IgY ドメインである。様々な態様では、IgG ドメインは、IgG1、IgG2、IgG3、又は IgG4 ドメインである。他の態様では、IgG1 ドメインは、配列番号 87 のアミノ酸配列を含む。様々な態様では、IgG1 は、野生型 IgG1 と比較して抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 及び/又は補体依存性細胞傷害 (CDC) を改変又は減少させる点変異を含む。多くの態様では、点変異は、K297A 及び K322A 変異を含む。

【0037】

別の実施形態では、本発明は、第1の抗原結合領域及び第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合領域が、CD73 に結合する、二重特異性抗体を提供する。

【0038】

一態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域 (CDR) -H1 が配列番号 67 で示され、CDR-H2 が配列番号 68 で示され、CDR-H3 が配列番号 69 で示される、CDR-H1、CDR-H2、及び CDR-H3、又は配列番号 67、68 若しくは 69 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む VH 領域と、CDR-L1 が配列番号 70 で示され、CDR-L2 が配列番号 71 で示され、CDR-L3 が配列番号 72 で示される、CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3、又は配列番号 70、71 若しくは 72 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む VL 領域と、を含む。別の態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域 (CDR) -H1 が配列番号 67 で示され、CDR-H2 が配列番号 68 で示され、CDR-H3 が配列番号 69 で示される、CDR-H1、CDR-H2、及び CDR-H3、又は配列番号 67、68 若しくは 69 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む VH 領域と、CDR-L1 が配列番号 70 で示され、CDR-L2 が配列番号 82 で示され、CDR-L3 が配列番号 72 で示される、CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3、又は配列番号 70、82 若しくは 72 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む VL 領域と、を含む。一態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域 (CDR) -H1 が配列番号 67 で示され、CDR-H2 が配列番号 68 で示され、CDR-H3 が配列番号 69 で示される、CDR-H1、CDR-H2、及び CDR-H3、又は配列番号 67、68 若しくは 69 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む VH 領域と、CDR-L1 が配列番号 70 で示され、CDR-L2 が配列番号 84 で示され、CDR-L3 が配列番号 72 で示される、CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3、又は配列番号 70、84 若しくは 72 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む VL 領域と、を含む。別の態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域 (CDR) -H1 が配列番号 67 で示され、CDR-H2 が配列番号 68 で示され、CDR-H3 が配列番号 69 で示される、CDR-H1、CDR-H2、及び CDR-H3、又は配列番号 67、68 若しくは 69 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む VH 領域と、CDR-L1 が配列番号 70 で示され、CDR-L2 が配列番号 86 で示され、CDR-L3 が配列番号 72 で示される、CDR-L1、CDR-L2、及び CDR-L3、又は配列番号 70、86 若しくは 72 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む VL 領域と、を含む。一態様では、VH 領域は、配列番号 65 に対して少なくとも 80

10

20

30

40

50

%の同一性及び配列番号67～69の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、V L領域は、配列番号66に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号70～72の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。別の態様では、V H領域は、配列番号65に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号67～69の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、V L領域は、配列番号81に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号70、82及び72の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。一態様では、V H領域は、配列番号65に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号67～69の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、V L領域は、配列番号82に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号70、84及び72の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。別の態様では、V H領域は、配列番号65に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号67～69の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、V L領域は、配列番号85に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号70、86及び72の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。一態様では、第2の抗原結合領域は、免疫チェックポイント分子、又は免疫刺激分子に結合する。一態様では、抗体は、配列番号88、89、90若しくは91のアミノ酸配列、又はそれに対して90%の同一性及びその結合特異性を有する配列を有する重鎖配列を含む。別の態様では、二重特異性抗体は、配列番号66のアミノ酸配列を有する軽鎖を更に含む。

10

【0039】

一実施形態では、本発明は、治療剤と、及び本明細書に記載される抗体若しくはその抗原結合断片のうちのいずれか1つ、又は本明細書に記載される二重特異性抗体のうちのいずれか1つと、を含む、抗体-薬物コンジュゲートを提供する。

20

【0040】

別の実施形態では、本発明は、本明細書に記載される抗体若しくはその抗原結合断片のうちのいずれか1つ、本明細書に記載される二重特異性抗体のうちのいずれか1つ、又は本明細書に記載される抗体-薬物コンジュゲートのうちのいずれか1つと、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物を提供する。

【0041】

一実施形態では、本発明は、がんを治療することを必要とする対象に、有効量の本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片のうちのいずれか1つ、本明細書に記載の二重特異性抗体のうちのいずれか1つ、又は本明細書に記載の抗体-薬物コンジュゲートのうちのいずれか1つを投与し、それによってがんを治療することを含む、がんを治療する方法を提供する。

30

【0042】

別の実施形態では、本発明は、配列番号49～86又は88～91に示される、単離されたアミノ酸配列を提供する。

【0043】

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載される抗体若しくはその抗原結合断片、又は二重特異性抗体のうちのいずれか1つをコードする、単離された核酸配列を提供する。別の実施形態では、本発明は、配列番号49～86又は88～91のうちのいずれか1つをコードする、単離された核酸を提供する。

40

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1-1】図1A～1Cは、フローサイトメーターによる、p95HER2に対して標的化されるファージクローンのスクリーニングを示す。p95HER2を認識するファージクローンを、4ラウンドのパニング後に濃縮した。陽性ファージ結合剤を、ファージ含有上清でp95HER2-HEK293細胞を染色することによって選択した。図1Aは、p95HER2-HEK293細胞に対する特異的結合を有するファージクローンをフローサイトメーターによって決定したことを示す。図1Bは、800を超えるΔMFIを有するp95HER2-HEK293細胞に特異的に結合したクローン（1～40と付番される）を配列決定のために選択したことを示す。二次抗体のみで染色された、陰性対照

50

(NC)。一次抗p95HER2 ref抗体及び二次抗体の両方で染色された、陽性対照(PC)。図1Cは、(灰色の背景が付いた太字でマークされた)異なる配列を有するファージクローンを、モノクローナル抗体への変換のために選択したことを示す。クローンは、R4-Xと命名され、Xは、図1Aの番号である。

【図1-2】図1-1の説明を参照のこと。

【図2】SDS-PAGEによる、プロテインA精製された抗p95HER2抗体リードの純度を示す。ワンステップのプロテインA精製された抗p95HER2抗体リードの純度及び完全性を、非還元条件下及び還元条件下でSDS-PAGEによって分析した。

【図3】図3A~3Bは、フローサイトメーターによる、精製された抗p95HER2抗体リードの結合活性を示す。図3Aは、P95HER2発現HEK293細胞を、氷上で1時間かけて抗p95HER2抗体(30、3、0.3nM)で表面染色し、次いで、氷上で更に1時間かけてA488コンジュゲート抗ヒトIgG二次抗体とともにインキュベートしたことを示すグラフである。細胞をフローサイトメーターによって分析し、A488の蛍光強度を数字によって示した。図3Bは、P95HER2発現NCI-H292安定細胞を、選択された抗p95HER2抗体で表面染色し、フローサイトメーターによって分析したことを示すグラフである。結合曲線及びEC50を示した。

【図4A】図4A~4Bは、抗p95HER2抗体リードの結合エピトープマッピングを示す。図4Aは、抗p95HER2 #R4-3、R4-5、R4-11、R4-15及びR4-38抗体が、コンセンサスモチーフKFPDEを有するペプチドに対して、中程度から高いスポット強度で、高いシグナル対ノイズ比で、広く同一の応答を示したことを示す。強度レベルが著しく変化しなかったにもかかわらず、抗体R4-3は、わずかに弱い応答を示し、抗体R4-38は、これらの抗体の中で最も強い応答を示した。図4Bは、ペプチド-ペプチド重複を有する直鎖5、10、及び15アミノ酸ペプチドに結合する抗p95HER2抗体を示すヒートマップである。結合強度を各ペプチドについて示し、それ自体のバックグラウンド値で補正した。

【図4B】図4Aの説明を参照のこと。

【図5】抗p95HER2-CD137二重特異性抗体(bsAb)の対称形式を示す。

【図6】図6A~6Bは、それぞれSEC-HPLC及びμCE-SDS-PAGEによる、抗p95HER2-CD137 bsAbのタンパク質凝集及び完全性を示す。図6Aは、SEC-HPLCによるタンパク質凝集の分析を示す。図6Bは、非還元条件下及び還元条件下でのμCE-SDS-PAGEによるタンパク質完全性の分析を示し、データを以下の表にまとめた。

【図7】図7A~7Bは、バイオレイヤー干渉法による、p95HER2及びCD137抗原に対する抗p95HER2-CD137 bsAbの結合親和性を示す。図7Aは、ヒトp95HER2抗原に対する結合動態を示す。図7Bは、ヒトCD137抗原に対する結合動態を示す。

【図8】抗p95HER2-CD137 bsAbによるp95HER2及びCD137抗原に対する同時結合を示す。

【図9】図9A~9Bは、抗p95HER2-CD137 bsAbが、p95HER2発現NCI-H292細胞との共培養時にT細胞のIFN-γ産生を誘導することを示す。図9Aは、p95HER2発現NCI-H292細胞上のp95HER2の発現レベルを示す。図9Bは、p95HER2発現素NCI-H292肺がん細胞との共培養時のT細胞のIFN-γ産生を示す。

【図10】図10A~10Bは、抗p95HER2-CD137 bsAb p95HER2発現NCI-H292細胞の抗体依存性細胞媒介性細胞傷害を示す。図10Aは、CD137発現HEK293細胞上のCD137の発現レベルを示す(左)。正常又はADC増強IgG1フォーマットを有する抗p95HER2-CD137 bsAbのADC(右)。図10Bは、p95HER2発現NCI-H292細胞上のp95HER2の発現レベルを示す(左)。正常なIgG1フォーマットを有する抗p95HER2-CD137 bsAbは、#R4-11 IgG1モノクローナル抗体と同様に、用量依存

性 A D C C を誘導した（右）。

【図 1 1 - 1】図 1 1 A ~ 1 1 C は、インビボでの M D A - M B - 2 3 1 乳がんモデルによる抗体 p 9 5 H E R 2 - C D 1 3 7 b s A b の抗腫瘍活性を示す。図 1 1 A は、M D A = M B - 2 3 1 細胞による p 9 5 H E R 2 発現を示す。図 1 1 B は、腫瘍体積を示す。図 1 1 C は、腫瘍質量を示す。

【図 1 1 - 2】図 1 1 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 2】インビボでの抗 p 9 5 H E R 2 - C D 1 3 7 b s A b の薬物動態プロファイルを示す。

【図 1 3 - 1】図 1 3 A ~ 1 3 C は、E L I S A による、C D 7 3 に対して標的化されるファージクロンのスクリーニングを示す。図 1 3 A は、第 3 のラウンドの M D A - M B - 2 3 1 細胞ベースのパニングから単離されたファージクロンの E L I S A 結果を示す。図 1 3 B は、第 3 のラウンドにおける第 3 のラウンドの C D 7 3 過剰発現 E x p i 2 9 3 細胞ベースのパニングから単離されたファージクロンの E L I S A 結果を示す。図 1 3 C は、図 1 3 A 及び 1 3 B において付番されたクローン名のリストを示す。

【図 1 3 - 2】図 1 3 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 4】S D S - P A G E による、プロテイン A 精製された抗 C D 7 3 抗体リードの純度を示す。

【図 1 5】C D 7 3 発現 M D A - M B - 2 3 1 乳がん細胞に対する抗 C D 7 3 抗体の結合を示す。

【図 1 6】抗 C D 7 3 抗体による C D 7 3 酵素活性の遮断を示す。

【図 1 7 - 1】図 1 7 A ~ 1 7 C は、抗 C D 7 3 クローン 3 - 1 - 2 8 抗体に由来する親和性成熟クロンのスクリーニングを示す。図 1 7 A は、ファージクロンの C D 7 3 結合活性を示す。図 1 7 B は、図 1 7 A において付番されたファージクロンから変換された抗体の結合活性を示す。図 1 7 C は、図 1 7 B で選択される抗体の結合動態を示す。

【図 1 7 - 2】図 1 7 - 1 の説明を参照のこと。

【図 1 8】図 1 8 A ~ 1 8 B は、親和性成熟抗 C D 7 3 # 3 - 1 - 2 8 抗体による、膜結合及び可溶性 C D 7 3 酵素活性の遮断を示す。図 1 8 A は、M D A - M B - 2 3 1 細胞によって発現された膜結合 C D 7 3 を示す。図 1 8 B は、M D A - M B - 2 3 1 細胞によって分泌される可溶性 C D 7 3 を示す。

【図 1 9】抗 C D 7 3 - C D 1 3 7 二重特異性抗体（b s A b）の対称形式を示す。

【図 2 0 A】図 2 0 A ~ 2 0 B は、それぞれ S E C - H P L C 及び μ C E - S D S - P A G E による、抗 C D 7 3 - C D 1 3 7 b s A b のタンパク質凝集及び完全性を示す。図 2 0 A は、S E C - H P L C によるタンパク質凝集の分析を示す。図 2 0 B は、非還元条件下及び還元条件下での μ C E - S D S - P A G E によるタンパク質完全性の分析を示す。

【図 2 0 B - 1】図 2 0 A の説明を参照のこと。

【図 2 0 B - 2】図 2 0 A の説明を参照のこと。

【図 2 1】図 2 1 A ~ 2 1 B は、それぞれバイオレイヤー干渉法によって測定された、C D 7 3 及び C D 1 3 7 抗原に対する抗 C D 7 3 - C D 1 3 7 b s A b の結合親和性を示す。図 2 1 A は、ヒト C D 7 3 抗原に対する結合動態を示す。図 2 1 B は、ヒト C D 1 3 7 抗原に対する結合動態を示す。

【図 2 2】抗 C D 7 3 - C D 1 3 7 b s A b による C D 7 3 及び C D 1 3 7 抗原の同時結合を示す。

【図 2 3】抗 C D 7 3 - C D 1 3 7 b s A b による C D 7 3 酵素活性の遮断を示す。抗 C D 7 3 - C D 1 3 7 b s A b は、親抗 C D 7 3 抗体に対する C D 7 3 酵素活性を阻害するのに同等の有効性を示した。

【図 2 4】抗 C D 7 3 - C D 1 3 7 b s A b による A M P 抑制 T 細胞活性化のレスキューを示す。

【図 2 5 - 1】図 2 5 A ~ 2 5 C は、抗 C D 7 3 - C D 1 3 7 b s A b が、C D 7 3 発現がん細胞との共培養時に T 細胞の I F N - γ 産生を誘導することを示す。図 2 5 A は、

MDA-MB-231及びNCI-H292細胞上のCD73の発現レベルを示す。図25Bは、CD73発現MDA-MB-231（乳がん細胞）との共培養時のT細胞のIFN- γ 産生を示す。図25Cは、CD73発現NCI-H292（肺がん細胞）との共培養時のT細胞のIFN- γ 産生を示す。

【図25-2】図25-1の説明を参照のこと。

【図26-1】図26A～26Eは、インビボでのMDA-MB-231乳がんモデルによる抗体CD73-CD137 bsAbの抗腫瘍活性を示す。図26Aは、腫瘍体積を示す。図26Bは、腫瘍質量を示す。図26Cは、生存huCD45+細胞のパーセントを示す。図26Dは、CD3+細胞の中のCD8+T細胞のパーセントを示す。図26Eは、CD4+細胞の中のCD8+T細胞のパーセントを示す。

10

【図26-2】図26-1の説明を参照のこと。

【図27】インビボでの抗CD73-CD137 bsAbの薬物動態プロファイルを示す。

【発明を実施するための形態】

【0045】

発明の詳細な説明

本発明は、p95HER2発現がん細胞に結合する優れた活性を示す抗p95HER2抗体、及び細胞膜結合形態又は可溶性形態のCD73の酵素活性を中和する優れた活性を示す抗CD73抗体の発見に基づく。本発明は更に、p95HER2及びCD137を標的とする二重特異性抗体が、p95HER陽性がん細胞に対する抗体抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）及びp95HER2依存性T細胞活性化という二重の機能を有し、CD73及びCD137を標的とする二重特異性抗体が、各抗体による単一治療又は併用治療よりも、T細胞エフェクター機能を高め、インビボでの腫瘍成長をよりよく阻害するための並外れた活性を有するという発見に基づいている。

20

【0046】

本発明の組成物及び方法を説明する前に、本発明は、説明される特定の組成物、方法、及び実験条件に限定されず、かかる組成物、方法、及び条件は変化し得ることを理解されたい。本発明の範囲は、添付の特許請求の範囲にのみ限定されるため、本明細書で使用される用語は、特定の実施形態を説明するためのものであり、限定することを意図するものではないことも理解されるべきである。

30

【0047】

本明細書及び添付の特許請求の範囲で 사용되는場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈により明らかにそうではないと示されない限り、複数の参照物を含む。したがって、例えば、「方法」への言及は、本開示などを読むと当業者に明白になるであろう本明細書に記載される種類の1つ以上の方法、及び／又はステップを含む。

【0048】

本明細書で言及される全ての刊行物、特許、及び特許出願は、個々の刊行物、特許、又は特許出願が各々参照により組み込まれることが具体的かつ個別に示されているのと同じ程度に、参照により本明細書に組み込まれる。

【0049】

別途定義されない限り、本明細書で 사용되는全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解される意味と同一の意味を有する。本明細書に記載されるものと類似又は等価の任意の方法及び材料は、本発明の実践又は試験に使用され得るが、修正及び変形が本開示の精神及び範囲内に包含されることが理解されるであろう。ここで、好ましい方法及び材料を記載する。

40

【0050】

p95HER2標的化ペプチド

受容体チロシンキナーゼHER2（ErbB2）は、上皮成長因子受容体ファミリーの4つのメンバー（HER1～4）のうちの1つであり、乳がん及び胃がんの20～30%を含む異なる腫瘍で過剰発現している。HER1～4は、同様の構造、すなわち、細胞外

50

リガンド結合ドメイン、短い疎水性膜貫通領域、及び細胞質チロシンキナーゼドメインを共有する。リガンド結合又は受容体の過剰発現によって誘導され、細胞の増殖、分化、接着、移動、及び生存をもたらす、受容体のヘテロ／ホモ二量体化によるHERファミリーの活性化。

【0051】

組換えヒト化モノクローナル抗体トラスツズマブは、HER2の細胞外ドメインに結合する。トラスツズマブは、HER2陽性早期乳がん患者における無再発生存期間及び全生存期間を改善する。更に、トラスツズマブと化学療法の併用療法は、HER2陽性進行乳がん患者の生存期間を改善し、実質的な臨床的利益を提供する。しかしながら、HER2陽性乳がん患者の20～30%のみが、単剤療法として投与された場合にトラスツズマブに应答する。トラスツズマブに应答しない患者は、インスリン様成長因子受容体（IGF-1R）のシグナル伝達の活性化、染色体10上で欠失されたホスファターゼ及びテンシンホモログ（PTEN）の遺伝子の不活性化又は喪失、並びにp95HER2の蓄積を含む、一次耐性又は後天性耐性につながるいくつかの潜在的な機構によって引き起こされる。

10

【0052】

p95HER2は、細胞外トラスツズマブ結合ドメインを欠くHER2受容体の切断形態であり、HER2陽性腫瘍の約30～40%がp95HER2を発現する。いくつかの腫瘍では、p95HER2は、優勢なHER2形態である。p95HER2は、2つのメチオニン残基（611及び687）からの翻訳の選択的開始によって、又は完全長HER2のタンパク質分解性脱落によって生成された。p95HER2の生物学的役割は完全には評価されておらず、p95HER2と完全長HER2との間の可能性のある関係は不明である。p95HER2は、ヌードマウスにおける異種移植片腫瘍成長に不可欠であるチロシンキナーゼ活性を有する。がん性組織におけるその排他的発現に起因して、p95HER2は、がん療法のための良好な標的となるであろう。T細胞及びp95HER2発現がん細胞に關与する二重特異性抗体を開発し、同所性MCF-7乳がん及びPDXモデルにおいて有効な抗腫瘍活性を示した。加えて、インビボでp95HER2を発現する原発性腫瘍及び肺又は脳における転移に対して顕著な活性を有するp95HER2 CAR T細胞も開発した。

20

【0053】

腫瘍細胞のTAA及びT細胞のCD3に關与する二重特異性抗体（bsAb）、ブリナツモマブ（Blincty（登録商標））及びカツマキソマブ（Removab（登録商標））は、抗がん有効性が示され、フィラデルフィア染色体陰性B急性リンパ芽球性白血病（B-ALL）及び卵巣がんを伴う悪性腹水の治療のために承認されている。しかしながら、固形腫瘍における不十分な有効性及びBiTEの全身性サイトカイン放出は、それらの使用を制限する。抗CD3と比較して、抗CD137アゴニスト抗体は、臨床試験における固形腫瘍に対する実証済みの有効性及び架橋依存性アゴニスト活性として、よりよい治療ウィンドウ及び安全性プロファイルを提供し得る。がん特異的p95HER2発現及び本願発明者らが発明した架橋依存性抗CD137一本鎖抗体の標的依存性T細胞活性化プラットフォームを利用して、p95HER2陽性固形腫瘍に対して強力な有効性を有するとともに満足のいく安全性プロファイルを有する薬物を生成することができる。

30

40

【0054】

生成され、最も強力な結合親和性についてスクリーニングされた新規の抗p95HER2モノクローナル抗体が本明細書で提供される。また、p95HER2及びCD137を同時に標的化して、p95HER2の存在下で優れたT細胞活性化を誘導する新規の二重特異性抗体が本明細書で提供される。

【0055】

抗p95HER2抗体及びその抗原結合断片

一実施形態では、本発明は、p95HER2に結合する抗体及びその抗原結合断片を提供する。一態様では、本発明は、抗p95HER2抗体クローンR4-3（p95HER

50

2 # R 4 - 3)、抗 p 9 5 H E R 2 抗体クローン R 4 - 5 (p 9 5 H E R 2 # R 4 - 5)、抗 p 9 5 H E R 2 抗体クローン R 4 - 1 1 (p 9 5 H E R 2 # R 4 - 1 1)、抗 p 9 5 H E R 2 抗体クローン R 4 - 1 5 (p 9 5 H E R 2 # R 4 - 1 5)、抗 p 9 5 H E R 2 抗体クローン R 4 - 3 8 (p 9 5 H E R 2 # R 4 - 3 8) といった 4 つの抗体又はその抗原結合断片を提供する。一態様では、本明細書で提供される抗 p 9 5 H E R 2 抗体は、配列番号 1、配列番号 9、配列番号 1 7、配列番号 2 5 及び配列番号 3 3 から選択される配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変 (V H) 領域と、配列番号 2、配列番号 1 0、配列番号 1 8、配列番号 2 6 及び配列番号 3 4 から選択される配列に対して少なくとも 8 0 % の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変 (V L) 領域と、を含む。

10

【 0 0 5 6 】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、抗原に特異的に結合する能力を有する免疫グロブリン分子を指す。「抗体」という用語は、文脈により明らかにそうではないと示されない限り、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、及び抗イディオタイプ抗体を含むが、これらに限定されない。一態様では、本明細書で提供される抗体は、モノクローナル抗体を含む。本明細書で提供される抗体は、任意のアイソタイプ及びクラス（例えば、I g G、I g E、I g M、I g D、I g A、及び I g Y）、又はサブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1、及び I g A 2）を含む。本明細書で使用される場合、「抗原結合断片」は、免疫グロブリン分子又は抗体と同じ抗原に特異的に結合する能力を有する免疫グロブリン分子又は抗体の断片又は部分を意味する。例示的な抗原結合断片としては、s c F v、F a b、又は F (a b) 2 断片が挙げられる。本明細書で使用される場合、「抗原結合領域」は、例えば、抗原又はタンパク質に接触することによって抗原又はタンパク質に結合する抗体又は免疫グロブリン分子の一部を意味する。抗原結合領域は、概して、重鎖可変 (V H) 領域及び軽鎖可変 (V L) 領域を含む。抗原結合領域は、概して、1 つ以上の抗原結合部位又はパラトープを含む。

20

【 0 0 5 7 】

本明細書で提供される抗体は、配列番号 1、配列番号 9、配列番号 1 7、配列番号 2 5、又は配列番号 3 3 の配列に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、少なくとも約 9 1 % の同一性、少なくとも約 9 2 % の同一性、少なくとも約 9 3 % の同一性、少なくとも約 9 4 % の同一性、少なくとも約 9 5 % の同一性、少なくとも約 9 6 % の同一性、少なくとも約 9 7 % の同一性、少なくとも約 9 8 % の同一性、少なくとも約 9 9 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V H 領域を有する。本明細書で提供される抗体はまた、配列番号 2、配列番号 1 0、配列番号 1 8、配列番号 2 6 配列番号 3 4 の配列に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、少なくとも約 9 1 % の同一性、少なくとも約 9 2 % の同一性、少なくとも約 9 3 % の同一性、少なくとも約 9 4 % の同一性、少なくとも約 9 5 % の同一性、少なくとも約 9 6 % の同一性、少なくとも約 9 7 % の同一性、少なくとも約 9 8 % の同一性、少なくとも約 9 9 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V L 領域を含む。

30

40

【 0 0 5 8 】

概して、「配列同一性」又は「配列相同性」は、それぞれ、互換的に使用することができ、2 つのポリヌクレオチド又はポリペプチド配列の正確なヌクレオチドごとの対応又はアミノ酸ごとの対応を指す。典型的には、配列同一性を決定するための技術は、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を決定すること、及び／又はそれによってコードされるアミノ酸配列若しくはポリペプチドのアミノ酸配列を決定すること、及びこれらの配列を第 2 のヌクレオチド若しくはアミノ酸配列と比較することを含む。本明細書で使用される場合、「配列同一性パーセント (%)」又は「同一性パーセント (%)」という用語は、「相

50

同性」も含め、配列をアラインメントし、必要に応じてギャップを導入して最大の配列同一性パーセントを達成した後、配列同一性の一部として任意の保存的置換を考慮しない、参照配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドと同一である配列中のアミノ酸残基又はヌクレオチドのパーセンテージを指す。したがって、2つ以上の配列（ポリヌクレオチド又はアミノ酸）は、それらの「同一性パーセント」（「相同性パーセント」とも称される）を決定することによって比較され得る。より長い分子（例えば、ポリヌクレオチド又はポリペプチド）内の配列であってもよい、参照配列（例えば、核酸又はアミノ酸配列）に対する同一性パーセントは、2つの最適にアラインメントされた配列間の正確な一致の数を、参照配列の長さで割ったものに、100を乗じたものとして計算されてもよい。パーセント同一性はまた、例えば、National Institutes of Health から入手可能なバージョン2.2.9を含む高度なBLASTコンピュータプログラムを使用して配列情報を比較することによって決定されてもよい。BLASTプログラムは、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 (1990)のアラインメント方法に基づき、Altschul, et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990)、Karlin and Altschul, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993)、及びAltschul et al., Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 (1997)で考察される通りである。簡潔に述べると、BLASTプログラムは、同一性を、2つの配列のうちのより短いものにおけるシンボルの総数で割った、同一のアラインメントされたシンボル（すなわち、ヌクレオチド又はアミノ酸）の数として定義する。プログラムは、比較される配列の全長にわたる同一性パーセントを決定するために使用されてもよい。デフォルトパラメータは、例えば、blastpプログラムを使用して、短いクエリ配列を用いて検索を最適化するために提供される。このプログラムはまた、Wootton and Federhen, Computers and Chemistry 17:149-163 (1993)のSEGプログラムによって決定されるように、SEGフィルターを使用してクエリ配列のセグメントをマスクオフすることを可能にする。所望の程度の配列同一性の範囲は、およそ80%~100%、及びその間の整数値である。参照配列と特許請求される配列との間の同一性パーセントは、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、少なくとも99%、少なくとも99.5%、又は少なくとも99.9%であり得る。概して、完全一致は、参照配列の長さ全体にわたって100%の同一性を示す。配列を比較及び／又は配列同一性を評価するための追加のプログラム及び方法としては、Needleman-Wunschアルゴリズム（例えば、www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/で入手可能であり、任意選択的にデフォルト設定を用いる、EMBOSS Needle alignerを参照されたい）、Smith-Watermanアルゴリズム（例えば、www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_water/で入手可能であり、任意選択的にデフォルト設定を用いる、EMBOSS Water alignerを参照されたい）、Pearson and Lipman, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 2444の類似性検索方法、又はこれらのアルゴリズムを使用するコンピュータプログラム（Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.におけるGAP、BESTFIT、FASTA、BLAST P、BLAST N及びTFASTA）が挙げられる。いくつかの態様では、配列同一性パーセントへの言及は、BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) を使用して測定される配列同一性を指す。他の態様では、ClustalWは、多重配列アラインメントのために使用される。最適なアラインメントは、デフォルトパラメータを含む、選択されたアルゴリズムの任意の好適なパラメータを使用して評価され得る。

【0059】

10

20

30

40

50

一態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 1 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 2 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有する。配列番号 1 は、抗 p 9 5 H E R 2 抗体クローン # 4 - 3 重鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。配列番号 2 は、抗 p 9 5 H E R 2 抗体クローン # 4 - 3 軽鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。

10

【0060】

抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、概して、相補性決定領域 (C D R) を含む。「相補性決定領域 (C D R)」は、V H 及び V L の超可変領域を指す。C D R には、タンパク質又は抗原結合に対する特異性を付与する抗体の標的タンパク質又は抗原結合部位が含まれる。V H 及び V L は、概して、3 つの順番に付番された C D R を含む。本明細書で使用される場合、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3 は、重鎖ポリペプチドの N 末端から付番されるような、重鎖可変領域 (V H) の 3 つの連続して配置された C D R を指す。本明細書で使用される場合、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3 は、軽鎖ポリペプチドの N 末端から付番されるような、軽鎖可変領域 (V L) の 3 つの連続して配置された C D R を指す。

20

【0061】

一態様では、配列番号 1 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 2 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有する抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 3 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号 4 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R - H 2 と、配列番号 5 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R - H 3 と、を有する。別の態様では、配列番号 1 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 2 に対して少なくとも約 80 %

30

40

50

の同一性を有するアミノ酸配列を含むV L領域と、を有する抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号6に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むC D R - L 1と、配列番号7に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むC D R - L 2と、配列番号8に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むC D R - L 3と、を有する。

10

20

【0062】

いくつかの態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号9に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むV H領域と、配列番号10に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むV L領域と、を含む。配列番号9は、抗p95HER2抗体クローン#4-5重鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。配列番号10は、抗p95HER2抗体クローン#4-5軽鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。

30

【0063】

一態様では、配列番号9に対して少なくとも約80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むV H領域と、配列番号10に対して少なくとも約80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むV L領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号11に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むC D R - H 1と、配列番号12に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同

40

50

一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-H2 と、配列番号 13 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-H3 と、を有する。別の態様では、配列番号 9 に対して少なくとも約 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む VH 領域と、配列番号 10 に対して少なくとも約 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む VL 領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 14 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-L1 と、配列番号 15 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-L2 と、配列番号 16 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-L3 と、を有する。

10

20

30

【0064】

いくつかの態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 17 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む VH 領域と、配列番号 18 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む VL 領域と、を有する。配列番号 17 は、抗 p95HER2 抗体クローン #4-11 重鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。配列番号 18 は、抗 p95HER2 抗体クローン #4-11 軽鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。

40

【0065】

一態様では、配列番号 17 に対して少なくとも約 80% の同一性を有するアミノ酸配列

50

40

50

10

20

30

40

50

10

20

30

40

50

．５％の同一性、少なくとも約９９．９％の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ１と、配列番号３９に対して、少なくとも約８０％の同一性、少なくとも約８５％の同一性、少なくとも約９０％の同一性、少なくとも約９１％の同一性、少なくとも約９２％の同一性、少なくとも約９３％の同一性、少なくとも約９４％の同一性、少なくとも約９５％の同一性、少なくとも約９６％の同一性、少なくとも約９７％の同一性、少なくとも約９８％の同一性、少なくとも約９９％の同一性、少なくとも約９９．５％の同一性、少なくとも約９９．９％の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ２と、配列番号４０に対して、少なくとも約８０％の同一性、少なくとも約８５％の同一性、少なくとも約９０％の同一性、少なくとも約９１％の同一性、少なくとも約９２％の同一性、少なくとも約９３％の同一性、少なくとも約９４％の同一性、少なくとも約９５％の同一性、少なくとも約９６％の同一性、少なくとも約９７％の同一性、少なくとも約９８％の同一性、少なくとも約９９％の同一性、少なくとも約９９．５％の同一性、少なくとも約９９．９％の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むＣＤＲ－Ｌ３と、を有する。

10

20

30

40

50

【００７０】

本明細書で提供される抗体又はその抗原結合断片は、更にＦｃドメインを含む。本明細書で使用される場合、Ｆｃドメインという用語は、文脈により明らかにそうではないと示されない限り、少なくともヒンジ領域、ＣＨ２ドメイン、及びＣＨ３ドメインを含む抗体領域を指す。Ｆｃドメイン及びＦｃ領域という用語は、文脈により明らかにそうではないと示されない限り、互換的に使用され得る。特定の態様では、Ｆｃドメインは、ＩｇＧドメイン、ＩｇＥドメイン、ＩｇＭドメイン、及びＩｇＤドメイン、ＩｇＡドメイン、又はＩｇＹドメインである。ヒト、類人猿、サル、マウス、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、モルモット、ウマ、及びその他を含む、任意の配列及び任意の種に由来するＦｃドメインを使用することができる。特定の態様では、Ｆｃドメインは、例えば、分子生物学の技術を使用して生成された、操作された、すなわち、天然に存在しないか、又は組換えＦｃドメインである。いくつかの態様では、ＩｇＧドメインは、ＩｇＧ１ドメイン、ＩｇＧ２ドメイン、ＩｇＧ３ドメイン、又はＩｇＧ４ドメインである。

【００７１】

抗ｐ９５ＨＥＲ２二重特異性抗体

二重特異性抗体（ｂｓＡｂ）などの二重特異性分子は、単一の治療剤で同じ又は異なる分子標的上の複数のエピトープを同時に標的化するための手段を提供する。理論に制限されないが、例えば、２つのモノクローナル抗体（ｍＡｂ）の混合物と比較して、がん治療薬としての二重特異性分子は、新規又はより強力な活性を付与し、商品のコストを低減し、新しい治療レジメンの開発を促進する可能性を有する。

【００７２】

いくつかの実施形態では、第１の抗原結合領域及び第２の抗原結合領域を含む二重特異性抗体が本明細書で提供される。概して、第１の抗原結合領域及び第２の抗原結合領域は、異なる抗原又は標的に特異的に結合する。いくつかの態様では、第１の抗原結合領域及び第２の抗原結合領域は、同じ抗原又は標的内の異なるエピトープに結合する。

【００７３】

ある実施形態では、本発明は、第１の抗原結合領域及び第２の抗原結合領域を含む二重特異性抗体を提供し、第１の抗原結合領域は、ｐ９５ＨＥＲ２に結合する。第１の抗原結合領域は、配列番号１７から選択される配列に対して、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の同一性、少なくとも９１％の同一性、少なくとも９２％の同一性、少なくとも９３％の同一性、少なくとも９４％の同一性、少なくとも９５％の同一性、少なくとも９６％の同一性、少なくとも９７％の同一性、少なくとも９８％の同一性、少なくとも９９％の同一性、少なくとも９９．５％の同一性、少なくとも９９．９％の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むＶＨ領域と、配列番号１８から選択される配列のＮ末端配列の約１００～１２０個のアミノ酸に対して、少なくとも８０％の同一性、少なくとも８５％の同一性、少なくとも９０％の

同一性、少なくとも 91% の同一性、少なくとも 92% の同一性、少なくとも 93% の同一性、少なくとも 94% の同一性、少なくとも 95% の同一性、少なくとも 96% の同一性、少なくとも 97% の同一性、少なくとも 98% の同一性、少なくとも 99% の同一性、少なくとも 99.5% の同一性、少なくとも 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V_L 領域と、を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の第 2 の抗原結合領域は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。

【0074】

一態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域 (CDR) - H1 が配列番号 19 で示され、CDR - H2 が配列番号 20 で示され、CDR - H3 が配列番号 21 で示される、CDR - H1、CDR - H2、及び CDR - H3、又は配列番号 19、20 若しくは 21 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む V_H 領域と、CDR - L1 が配列番号 22 で示され、CDR - L2 が配列番号 23 で示され、CDR - L3 が配列番号 24 で示される、CDR - L1、CDR - L2、及び CDR - L3、又は配列番号 19、20 若しくは 21 に対して 90% の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む V_L 領域と、を含む。別の態様では、V_H 領域は、配列番号 17 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列番号 19 ~ 21 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、V_L 領域は、配列番号 18 に対して少なくとも 80% の同一性及び配列番号 22 ~ 24 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。

【0075】

第 1 及び第 2 の抗原結合領域の任意の組み合わせは、例えば、任意の免疫チェックポイント分子、任意の免疫刺激分子、又は任意の腫瘍抗原に結合する第 1 及び第 2 の抗原結合領域を含む、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれ得る。したがって、いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の第 2 の抗原結合領域は、任意の免疫チェックポイント分子、任意の免疫刺激分子、又は任意の腫瘍抗原に結合する。いくつかの態様では、第 1 及び第 2 の抗原結合領域は、同じ分子に結合する。例えば、第 1 及び第 2 の抗原結合領域は、同じ分子の同じエピトープ又は異なるエピトープに結合し得る。他の態様では、第 1 及び第 2 の抗原結合領域は、異なる分子に結合する。

【0076】

一態様では、p95HER2 に結合する第 1 の抗原結合領域と、CD137 に結合する第 2 の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体は、p95HER2 及び CD137 に同時に結合する (図 8)。理論に限定されないが、p95HER2 及び CD137 の両方に結合することができる二重特異性抗体を設計することによって、p95HER2 を発現する腫瘍部位に対する抗 p95HER2 結合活性を制限することで、ウレルマブなどの抗 CD137 抗体を用いた臨床試験で見られる肝毒性及びその関連する致死性のリスクを低減し得る。加えて、p95HER2 及び CD137 に対する同時結合は、架橋の結果として T 細胞活性化を増強し得ると考えられる (以下の実施例 8 も参照されたい)。

【0077】

いくつかの態様では、第 1 の抗原結合領域及び第 2 の抗原結合領域は、scFv、F(ab)₂、Fab、又はそれらの任意の組み合わせを含む。一態様では、第 1 の抗原結合領域は、scFv を含み、第 2 の抗原結合領域は、Fab を含む。別の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれる scFv は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。更に別の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれる scFv は、CD137 に結合する。いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれる Fab は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。一態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれる Fab は、p95HER2 に結合する。別の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の scFv は、配列番号 48 のアミノ酸配列を含む。

【0078】

いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体は、scFv の V_H 領域と

V L 領域との間にリンカーを更に含む。任意のリンカーを使用することができる。例えば、リンカーは、任意のアミノ酸配列を含み得る。リンカーは、1アミノ酸、2アミノ酸、3アミノ酸、4アミノ酸、5アミノ酸、6アミノ酸、7アミノ酸、8アミノ酸、9アミノ酸、10アミノ酸、11アミノ酸、12アミノ酸、13アミノ酸、14アミノ酸、15アミノ酸、16アミノ酸、17アミノ酸、18アミノ酸、19アミノ酸、20アミノ酸、又はそれより多くのアミノ酸などの任意の長さのものであり得る。リンカーはまた、複数のアミノ酸配列を含み得る。任意の数の複数のアミノ酸配列が、リンカーに含まれ得る。例示的なリンカー配列は、配列番号44、配列番号45、及び配列番号160に提供される。

【0079】

いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体は、配列番号46の重鎖配列を含む。別の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体は、配列番号18の軽鎖配列を更に含む。配列番号46などの重鎖配列は、1つ以上のGリンカー（配列番号44）、1つ以上のG4Sリンカー（配列番号45若しくは配列番号160）、又は任意の複数のGリンカー若しくはG4Sリンカーを含むことができるが、任意の他の好適なリンカーを使用することができる。

【0080】

CD73 標的化ペプチド

適応免疫系の免疫調節は、副作用が少なく、がん再発からの長期的な保護のため、がん免疫療法において魅力的な分野である。進行がんにおける抗PD-1/PD-L1療法の成功にもかかわらず、患者のかなりの割合は、これらの治療に応答しないままである。このことは、他の免疫抑制機構が腫瘍微小環境に共存しており、アデノシン作動経路がその主要因として浮上していることを表している。

【0081】

腫瘍低酸素症、慢性炎症、及び代謝変化は、インフラマソーム集合体の誘導及び炎症促進性サイトカイン分泌を介して抗腫瘍活性を促進する細胞外ATP蓄積を生じる。しかしながら、低酸素症、炎症性サイトカイン、及びTGF- β の存在により、対応する非悪性組織と比較して、固形腫瘍において通常、より高いレベルのエクストヌクレオチダーゼCD39及びCD73が観察された。細胞外に蓄積されたATPを、腫瘍に関連するCD39及びCD73によってアデノシンに順次加水分解し、次いで、腫瘍細胞、間質細胞、及び腫瘍内の浸潤リンパ球によって発現されるアデノシン受容体に結合すると、その調節機能を媒介する。

【0082】

腫瘍細胞では、A2A及びA2B受容体を介するアデノシンシグナル伝達は、血管内皮成長因子（VEGF）の増殖、転移、及び分泌を促進する。がん関連線維芽細胞（CAF）では、A2BRを介したアデノシンシグナル伝達は、腫瘍前線維芽細胞成長因子2（FGF2）及びCXCL12の発現を誘導し、腫瘍前微小環境を生成する。腫瘍浸潤免疫細胞では、A2Aシグナル伝達は、近位TCRシグナル伝達を抑制し、同時に共阻害分子PD-1、LAG3、及びTIM3の発現を誘導することにより、エフェクターT細胞の活性化を阻害する。加えて、A2Aシグナル伝達は、マウスTreg細胞の分化、増殖、及びCTLA-4発現を促進する。NK細胞では、A2Aシグナル伝達は、成熟及び細胞傷害性を遮断する。専門的な抗原提示細胞、マクロファージ及び樹状細胞では、A2A及びA2Bシグナル伝達は、M2マクロファージ分化を促進しながら、抗原提示及び共刺激分子の発現を下方制御する。

【0083】

高レベルのCD73が、脾臓、消化器、腎臓及び肺がんを含む様々ながん種の悪性組織において見出され、予後不良に対応していた。高レベルの可溶性CD73も、転移性黒色腫を有する患者の循環において観察された。アデノシンの前腫瘍機能及びがん予後におけるCD73の関連性を考慮すると、CD73は、がんのための魅力的な治療標的となっている。前臨床試験では、低分子阻害剤及び抗体標的CD73の抗腫瘍活性は、腫瘍細胞の

10

20

30

40

50

成長及び移動の阻害だけでなく、適応免疫の関与にも起因した。加えて、抗CD73抗体を組み合わせることで、CTLA-4、PD-1、及びCD137を含む他の免疫調節分子に対する抗体の抗腫瘍活性が増強された。抗PD-1抗体との併用における相乗的な抗腫瘍活性は、腫瘍特異的CD8+T上のPD-1発現を増強するA2Aシグナル伝達の活性化に起因した。興味深いことに、抗CD137抗体療法に対する腫瘍耐性は、腫瘍浸潤CD8+T細胞上のCD73の上方制御に対して言及されたため、抗CD137抗体とCD73抗体の併用療法によってより効果的な抗腫瘍活性が誘発された。

【0084】

臨床試験では、MED19447（オレクルマブ）、CPI-006、BMS-986179、及びNZV930を含むいくつかの抗CD73抗体が、単剤療法又は併用療法において第I/I相を受けている。結腸直腸がんを有する4.8%（1/21）の患者、及び膵臓がんを有する10%（2/20）の患者において、オレクルマブ及びデュルバルマブ（抗PD-L1抗体）で治療することによって部分奏効が観察された。BMS-986179とニボルマブ（抗PD-1抗体）の併用によって、頭頸部、膵臓、前立腺、肛門、及び腎臓のがんを有する13.5%（7/52）の患者において部分奏効が観察された。

10

【0085】

生成され、最も強力な結合親和性及び酵素遮断活性についてスクリーニングされた新規の抗CD73モノクローナル抗体が本明細書で提供される。CD73+腫瘍細胞との共培養時に優れたT細胞活性化及びインビボでの抗腫瘍活性を誘導するために、CD73及びCD137又はPD-L1を同時に標的とする新規の二重特異性抗体もまた、本明細書で提供される。

20

【0086】

抗CD73抗体及びその抗原結合断片

一実施形態では、本発明は、CD73に結合する抗体及びその抗原結合断片を提供する。一態様では、本発明は、抗CD73抗体クローン3-4（CD73 #3-4）、抗CD73抗体クローン3-16（CD73 #3-16）、抗CD73抗体クローン3-1-28（CD73 #3-1-28）、及び抗CD73抗体クローン3-1-37（CD73 #3-1-37）といった4つの抗体又はその抗原結合断片を提供する。別の態様では、本発明は、抗CD73 #3-1-28（S51A Q54E）、抗CD73 #3-1-28（S107D S109H）、抗CD73 #3-1-28（S107D S109T A114S）といった抗CD73クローン3-1-28に由来する3つの親和性成熟抗体を提供する。

30

【0087】

一態様では、本明細書で提供される抗CD73抗体は、配列番号49、配列番号57、配列番号65、及び配列番号73から選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変（VH）領域と、配列番号50、配列番号58、配列番号66、配列番号74、配列番号81、配列番号83及び配列番号85から選択される配列に対して少なくとも80%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変（VL）領域と、を含む。

40

【0088】

本明細書で提供される抗体は、配列番号49、配列番号57、配列番号65、及び配列番号73の配列に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVH領域を有する。本明細書で提供される抗体はまた、配列番号50、配列番号58、配列番号66及び配列番号74、配列番号81、配列番号83、及び配列番号85の配列に対

50

20

30

40

50

一態様では、配列番号 49 に対して少なくとも約 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V_H 領域と、配列番号 50 に対して少なくとも約 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V_L 領域と、を有する抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 51 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C_{DR}-H1 と、配列番号 52 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C_{DR}-H2 と、配列番号 53 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、少なくとも約 92% の同一性、少なくとも約 93% の同一性、少なくとも約 94% の同一性、少なくとも約 95% の同一性、少なくとも約 96% の同一性、少なくとも約 97% の同一性、少なくとも約 98% の同一性、少なくとも約 99% の同一性、少なくとも約 99.5% の同一性、少なくとも約 99.9% の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C_{DR}-H3 と、を有する。別の態様では、配列番号 49 に対して少なくとも約 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V_H 領域と、配列番号 50 に対して少なくとも約 80% の同一性を有するアミノ酸配列を含む V_L 領域と、を有する抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 54 に対して、少なくとも約 80% の同一性、少なくとも約 85% の同一性、少なくとも約 90% の同一性、少なくとも約 91% の同一性、

10

20

30

40

50

D R-H 2 と、配列番号 6 1 に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、少なくとも約 9 1 % の同一性、少なくとも約 9 2 % の同一性、少なくとも約 9 3 % の同一性、少なくとも約 9 4 % の同一性、少なくとも約 9 5 % の同一性、少なくとも約 9 6 % の同一性、少なくとも約 9 7 % の同一性、少なくとも約 9 8 % の同一性、少なくとも約 9 9 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R-H 3 と、を有する。別の態様では、配列番号 5 7 に対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 5 8 に対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 6 2 に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、少なくとも約 9 1 % の同一性、少なくとも約 9 2 % の同一性、少なくとも約 9 3 % の同一性、少なくとも約 9 4 % の同一性、少なくとも約 9 5 % の同一性、少なくとも約 9 6 % の同一性、少なくとも約 9 7 % の同一性、少なくとも約 9 8 % の同一性、少なくとも約 9 9 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R-L 1 と、配列番号 6 3 に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、少なくとも約 9 1 % の同一性、少なくとも約 9 2 % の同一性、少なくとも約 9 3 % の同一性、少なくとも約 9 4 % の同一性、少なくとも約 9 5 % の同一性、少なくとも約 9 6 % の同一性、少なくとも約 9 7 % の同一性、少なくとも約 9 8 % の同一性、少なくとも約 9 9 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R-L 2 と、配列番号 6 4 に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、少なくとも約 9 1 % の同一性、少なくとも約 9 2 % の同一性、少なくとも約 9 3 % の同一性、少なくとも約 9 4 % の同一性、少なくとも約 9 5 % の同一性、少なくとも約 9 6 % の同一性、少なくとも約 9 7 % の同一性、少なくとも約 9 8 % の同一性、少なくとも約 9 9 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R-L 3 と、を有する。

10

20

30

40

【0093】

いくつかの態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 6 5 に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、少なくとも約 9 1 % の同一性、少なくとも約 9 2 % の同一性、少なくとも約 9 3 % の同一性、少なくとも約 9 4 % の同一性、少なくとも約 9 5 % の同一性、少なくとも約 9 6 % の同一性、少なくとも約 9 7 % の同一性、少なくとも約 9 8 % の同一性、少なくとも約 9 9 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 6 6 に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約 9 0 % の同一性、少なくとも約 9 1 % の同一性、少なくとも約 9 2 % の同一性、少なくとも約 9 3 % の同一性、少なくとも約 9 4 % の同一性、少なくとも約 9 5 % の同一性、少なくとも約 9 6 % の同一性、少なくとも約 9 7 % の同一性、少なくとも約 9 8 % の同一性、少なくとも約 9 9 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも約 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有する。配列番号 6 5 は、抗 C D 7 3 抗体クローン # 3-1-28 重鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。配列番号 6 6 は、抗 C D 7 3 抗体クローン # 3-1-28 軽鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。

【0094】

一態様では、配列番号 6 5 に対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 6 6 に対して少なくとも約 8 0 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 6 7 に対して、少なくとも約 8 0 % の同一性、少なくとも約 8 5 % の同一性、少なくとも約

50

40

50

10

20

30

40

50

【0097】

いくつかの態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号65に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号81に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を有する。配列番号65は、抗CD73抗体クローン#3-1-28重鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。配列番号81は、抗CD73抗体クローン#3-1-28(S51A Q54E)軽鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。

10

【0098】

一態様では、配列番号65に対して少なくとも約80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号81に対して少なくとも約80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号67に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むCDR-H1と、配列番号68に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むCDR-H2と、配列番号69に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むCDR-H3と、を有する。別の態様では、配列番号65に対して少なくとも約80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号81に対して少なくとも約80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号70に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むCDR-L1と、配列番号82に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91

20

30

40

50

%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むCDR-L2と、配列番号72に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むCDR-L3と、を有する。

10

【0099】

いくつかの態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号65に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号83に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を有する。配列番号65は、抗CD73抗体クローン#3-1-28重鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。配列番号83は、抗CD73抗体クローン#3-1-28(S107D S109H)軽鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。

20

【0100】

一態様では、配列番号65に対して少なくとも約80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号83に対して少なくとも約80%の同一性を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号67に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むCDR-H1と、配列番号68に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むCDR-H2と、配列番号69に対して、少なくとも約80%の同一性、少なくとも約85%の同一性、少なくとも約90%の同一性、少なくとも約91%の同一性、少なくとも約92%の同一性、少なくとも約93%の同一性、少なくとも約94%の同一性、少なくとも約95%の同一性、少なくとも約96%の同一性、少なくとも約97%の同一性、少なくとも約98%の同一性、少なくとも約99%の同一性、少なくとも約99.5%の同一性、少なくとも約99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸

30

40

50

配列を含む C D R - H 3 と、を有する。別の態様では、配列番号 65 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 83 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 70 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R - L 1 と、配列番号 84 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R - L 2 と、配列番号 72 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R - L 3 と、を有する。

10

20

30

40

50

【0101】

いくつかの態様では、抗体又はその抗原結合断片は、配列番号 65 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 85 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を有する。配列番号 65 は、抗 C D 73 抗体クローン # 3-1-28 重鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。配列番号 85 は、抗 C D 73 抗体クローン # 3-1-28 (S 1 0 7 D S 1 0 9 T A 1 1 4 S) 軽鎖の可変領域を含むアミノ酸配列を提供する。

【0102】

一態様では、配列番号 65 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V H 領域と、配列番号 85 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む V L 領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 67 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む C D R - H 1 と、配列番号 68 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、

少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-H2 と、配列番号 69 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-H3 と、を有する。別の態様では、配列番号 65 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む VH 領域と、配列番号 85 に対して少なくとも約 80 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む VL 領域と、を含む抗体の抗原結合領域又はその抗原結合断片は、配列番号 70 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-L1 と、配列番号 86 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-L2 と、配列番号 72 に対して、少なくとも約 80 % の同一性、少なくとも約 85 % の同一性、少なくとも約 90 % の同一性、少なくとも約 91 % の同一性、少なくとも約 92 % の同一性、少なくとも約 93 % の同一性、少なくとも約 94 % の同一性、少なくとも約 95 % の同一性、少なくとも約 96 % の同一性、少なくとも約 97 % の同一性、少なくとも約 98 % の同一性、少なくとも約 99 % の同一性、少なくとも約 99.5 % の同一性、少なくとも約 99.9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む CDR-L3 と、を有する。

10

20

30

40

50

【0103】

本明細書で提供される抗体又はその抗原結合断片は、更に Fc ドメインを含む。特定の態様では、Fc ドメインは、IgG ドメイン、IgE ドメイン、IgM ドメイン、及び IgD ドメイン、IgA ドメイン、又は IgY ドメインである。いくつかの態様では、IgG ドメインは、IgG1 ドメイン、IgG2 ドメイン、IgG3 ドメイン、又は IgG4 ドメインである。

【0104】

抗 CD73 二重特異性抗体

二重特異性抗体を含む二官能性タンパク質が本明細書で提供される。本明細書で使用される場合、「二官能性タンパク質」という用語は、少なくとも 2 つの機能を有するタンパク質を指す。二官能性タンパク質の非限定的な例としては、2 つの抗原に結合することができる二重特異性抗体が挙げられる。本明細書に提供される二重特異性抗体は、例えば、CD137 に結合し、抗 CD73 抗体の Fc ドメインの C 末端に融合される単離された機能的 scFv 断片を含み得る。いくつかの態様では、本明細書に提供される融合構築物中の CD137 に結合する C 末端に位置する scFv は、例えば、CD40 又は CTLA-4 などの他の免疫調節分子に結合する抗体の Fc ドメインに融合される。他の態様では、C 末端に位置する scFv は、例えば、CD40 又は CTLA-4 などの免疫調節分子に

結合することができる。

【0105】

一実施形態では、本発明は、第1の抗原結合領域及び第2の抗原結合領域を含む二重特異性抗体であって、第1の抗原結合領域が、CD73に結合する、二重特異性抗体を提供する。第1の抗原結合領域は、配列番号65から選択される配列に対して、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、少なくとも99.5%の同一性、少なくとも99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号66から選択される配列のN末端配列の約100～120個のアミノ酸に対して、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、少なくとも99.5%の同一性、少なくとも99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の第2の抗原結合領域は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。

10

【0106】

一態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域(CDR)－H1が配列番号67で示され、CDR－H2が配列番号68で示され、CDR－H3が配列番号69で示される、CDR－H1、CDR－H2、及びCDR－H3、又は配列番号67、68若しくは69に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含むVH領域と、CDR－L1が配列番号70で示され、CDR－L2が配列番号71で示され、CDR－L3が配列番号72で示される、CDR－L1、CDR－L2、及びCDR－L3、又は配列番号70、71若しくは72に対して90%の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含むVL領域と、を含む。別の態様では、VH領域は、配列番号65に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号67～69の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、VL領域は、配列番号66に対して少なくとも80%の同一性及び配列番号70～72の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。

20

30

【0107】

第1の抗原結合領域は、配列番号65から選択される配列に対して、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、少なくとも99.5%の同一性、少なくとも99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVH領域と、配列番号83から選択される配列のN末端配列の約100～120個のアミノ酸に対して、少なくとも80%の同一性、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも91%の同一性、少なくとも92%の同一性、少なくとも93%の同一性、少なくとも94%の同一性、少なくとも95%の同一性、少なくとも96%の同一性、少なくとも97%の同一性、少なくとも98%の同一性、少なくとも99%の同一性、少なくとも99.5%の同一性、少なくとも99.9%の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含むVL領域と、を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の第2の抗原結合領域は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。

40

【0108】

一態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域(CDR)－H1が配列番号67で示され、CDR－H2が配列番号68で示され、CDR－H3が配列番号69で示される、

50

C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3、又は配列番号 6 7、6 8 若しくは 6 9 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む V_H 領域と、C D R - L 1 が配列番号 7 0 で示され、C D R - L 2 が配列番号 8 4 で示され、C D R - L 3 が配列番号 7 2 で示される、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3、又は配列番号 7 0、8 4 若しくは 7 2 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む V_L 領域と、を含む。別の態様では、V_H 領域は、配列番号 6 5 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 6 7 ~ 6 9 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、V_L 領域は、配列番号 8 3 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 7 0、8 4 及び 7 2 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。

【0109】

第 1 の抗原結合領域は、配列番号 6 5 から選択される配列に対して、少なくとも 8 0 % の同一性、少なくとも 8 5 % の同一性、少なくとも 9 0 % の同一性、少なくとも 9 1 % の同一性、少なくとも 9 2 % の同一性、少なくとも 9 3 % の同一性、少なくとも 9 4 % の同一性、少なくとも 9 5 % の同一性、少なくとも 9 6 % の同一性、少なくとも 9 7 % の同一性、少なくとも 9 8 % の同一性、少なくとも 9 9 % の同一性、少なくとも 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V_H 領域と、配列番号 8 5 から選択される配列の N 末端配列の約 1 0 0 ~ 1 2 0 個のアミノ酸に対して、少なくとも 8 0 % の同一性、少なくとも 8 5 % の同一性、少なくとも 9 0 % の同一性、少なくとも 9 1 % の同一性、少なくとも 9 2 % の同一性、少なくとも 9 3 % の同一性、少なくとも 9 4 % の同一性、少なくとも 9 5 % の同一性、少なくとも 9 6 % の同一性、少なくとも 9 7 % の同一性、少なくとも 9 8 % の同一性、少なくとも 9 9 % の同一性、少なくとも 9 9 . 5 % の同一性、少なくとも 9 9 . 9 % の同一性、及びその間の任意の数又は範囲を有するアミノ酸配列を含む V_L 領域と、を含む。いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の第 2 の抗原結合領域は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。

【0110】

一態様では、二重特異性抗体は、相補性決定領域 (C D R) - H 1 が配列番号 6 7 で示され、C D R - H 2 が配列番号 6 8 で示され、C D R - H 3 が配列番号 6 9 で示される、C D R - H 1、C D R - H 2、及び C D R - H 3、又は配列番号 6 7、6 8 若しくは 6 9 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む V_H 領域と、C D R - L 1 が配列番号 7 0 で示され、C D R - L 2 が配列番号 8 5 で示され、C D R - L 3 が配列番号 7 2 で示される、C D R - L 1、C D R - L 2、及び C D R - L 3、又は配列番号 7 0、8 6 若しくは 7 2 に対して 9 0 % の同一性及びその抗原結合特異性を有する配列を含む V_L 領域と、を含む。別の態様では、V_H 領域は、配列番号 6 5 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 6 7 ~ 6 9 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有し、V_L 領域は、配列番号 8 5 に対して少なくとも 8 0 % の同一性及び配列番号 7 0、8 6 及び 7 2 の抗原結合特異性を有するアミノ酸配列を有する。

【0111】

いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の第 2 の抗原結合領域は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。

【0112】

第 1 及び第 2 の抗原結合領域の任意の組み合わせは、例えば、任意の免疫チェックポイント分子、任意の免疫刺激分子、又は任意の腫瘍抗原に結合する第 1 及び第 2 の抗原結合領域を含む、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれ得る。したがって、いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の第 2 の抗原結合領域は、任意の免疫チェックポイント分子、任意の免疫刺激分子、又は任意の腫瘍抗原に結合する。いくつかの態様では、第 1 及び第 2 の抗原結合領域は、同じ分子に結合する。例えば、第 1 及び第 2 の抗原結合領域は、同じ分子の同じエピトープ又は異なるエピトープに結合し得る。他の態様では、第 1 及び第 2 の抗原結合領域は、異なる分子に結合する。

【0113】

一態様では、C D 7 3 に結合する第 1 の抗原結合領域と、C D 1 3 7 に結合する第 2 の抗原結合領域とを有する二重特異性抗体は、C D 7 3 及び C D 1 3 7 に同時に結合する（図 2 2）。理論に限定されないが、C D 7 3 及び C D 1 3 7 の両方に結合することができる二重特異性抗体を設計することによって、C D 7 3 を発現する腫瘍部位に対する抗 C D 7 3 結合活性を制限することで、ウレルマブなどの抗 C D 1 3 7 抗体を用いた臨床試験で見られる肝毒性及びその関連する致死性のリスクを低減し得る。加えて、C D 7 3 及び C D 1 3 7 に対する同時結合は、架橋の結果として T 細胞活性化を増強し得ると考えられる（以下の実施例 2 1 も参照されたい）。

【0114】

いくつかの態様では、第 1 の抗原結合領域及び第 2 の抗原結合領域は、s c F v、F (a b) 2、F a b、又はそれらの任意の組み合わせを含む。一態様では、第 1 の抗原結合領域は、s c F v を含み、第 2 の抗原結合領域は、F a b を含む。別の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれる s c F v は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。更に別の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれる s c F v は、C D 1 3 7 に結合する。いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれる F a b は、免疫チェックポイント分子、免疫刺激分子、又は腫瘍抗原に結合する。一態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体に含まれる F a b は、C D 7 3 に結合する。一態様では、抗体は、配列番号 8 8、8 9、9 0 若しくは 9 1 のアミノ酸配列、又はそれに対して 9 0 % の同一性及びその結合特異性を有する配列を有する重鎖配列を含む。別の態様では、二重特異性抗体は、配列番号 6 6 のアミノ酸配列を有する軽鎖を更に含む。別の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体の s c F v は、配列番号 9 1 のアミノ酸配列を含む。

【0115】

いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体は、s c F v の V H 領域と V L 領域との間にリンカーを更に含む。任意のリンカーを使用することができる。例えば、リンカーは、任意のアミノ酸配列を含み得る。リンカーは、1 アミノ酸、2 アミノ酸、3 アミノ酸、4 アミノ酸、5 アミノ酸、6 アミノ酸、7 アミノ酸、8 アミノ酸、9 アミノ酸、1 0 アミノ酸、1 1 アミノ酸、1 2 アミノ酸、1 3 アミノ酸、1 4 アミノ酸、1 5 アミノ酸、1 6 アミノ酸、1 7 アミノ酸、1 8 アミノ酸、1 9 アミノ酸、2 0 アミノ酸、又はそれより多くのアミノ酸などの任意の長さのものであり得る。リンカーはまた、複数のアミノ酸配列を含み得る。任意の数の複数のアミノ酸配列が、リンカーに含まれ得る。例示的なリンカー配列は、配列番号 4 4、配列番号 4 5 及び 1 6 0 に提供される。

【0116】

いくつかの態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体は、配列番号 8 8、配列番号 8 9、又は配列番号 9 1 の重鎖配列を含む。別の態様では、本明細書で提供される二重特異性抗体は、配列番号 6 6 又は配列番号 8 1 の軽鎖配列を更に含む。配列番号 8 8、配列番号 8 9、配列番号 9 1 などの重鎖配列は、1 つ以上の G リンカー（配列番号 4 4）、1 つ以上の G 4 S リンカー（配列番号 4 5 及び配列番号 1 6 0）、又は任意の複数の G リンカー若しくは G 4 S リンカーを含むことができるが、任意の他の好適なリンカーを使用することができる。

【0117】

抗体－薬物コンジュゲート

一実施形態では、本発明は、治療剤と、及び本明細書に記載される抗体若しくはその抗原結合断片のうちのいずれか 1 つ、又は本明細書に記載される二重特異性抗体のうちのいずれか 1 つと、を含む、抗体－薬物コンジュゲートを提供する。例えば、抗体、その抗原結合断片又は二重特異性抗体は、抗 p 9 5 H E R 2 抗体、その抗原結合断片、p 9 5 H E R 2 及び第 2 の標的を標的とする二重特異性抗体、抗 C D 7 3 抗体、その抗原結合断片、並びに C D 7 3 及び第 2 の標的を標的とする二重特異性抗体、例えば本明細書に記載されるものを含む。

【0118】

「抗体薬物コンジュゲート」という用語は、本明細書で使用される「免疫コンジュゲート」又は「コンジュゲート」という用語と互換的に使用することができ、細胞結合剤（すなわち、抗体若しくはその断片、又は二重特異性抗体）に連結され、一般式：C－L－A（式中、C＝サイトトキシン、L＝リンカー、A＝細胞結合剤又は抗体）によって定義される、化合物又はその誘導体、例えば、薬物（すなわち、抗がん薬物）を指す。免疫コンジュゲートは、一般的な式によって、逆の順序：A－L－Cで定義することもできる。

【0119】

一態様では、治療剤は、リンカーを介して、抗体、抗原結合断片、又は二重特異性抗体に共有結合している。

【0120】

「治療剤」とは、本明細書に記載の結合剤に連結することができる、がんの治療に有用な任意の薬物、化合物又は小分子を意味する。様々な態様では、治療剤は、化学療法剤である。化学療法剤及び抗腫瘍剤は、周知の細胞傷害性剤であり、以下が挙げられるが、これらに限定されない。（i）ビンカアルカロイド（ビンブラスチン、ビンクリスチン、ビンフルニン、ビンデシン、及びビノレルビン）、タキサン（カバジタキセル、ドセタキセル、ラロタキセル、オルタタキセル、パクリタキセル、及びテセタキセル）、エポチロン（イキサベピロン）、及びポドフィロトキシン（エトポシド及びテニポシド）を含む抗微小管薬；（ii）抗葉酸薬（アミノプテリン、メトトレキサート、ペメトレキセド、プララトレキサート、及びラルチトレキセド）、及びデオキシヌクレオシド類似体（アザシチジン、カペシタビン、カルモフル、クラドリビン、クロファラビン、シタラビン、デシタビン、ドキシフルリジン、フロキシウリジン、フルダラビン、フルオロウラシル、ゲムシタビン、ヒドロキシカルバミド、メルカプトプリン、ネララビン、ペントスタチン、テガフル、及びチオグアニン）を含む抗代謝剤；（iii）トポイソメラーゼⅠ阻害剤（ベロテカン、カンプトテシン、コシテカン、ギマテカン、エキサテカン、イリノテカン、ルルトテカン、シラテカン、トポテカン、及びルビテカン）及びトポイソメラーゼⅡ阻害剤（アクリルピシン、アムルピシン、ダウノルピシン、ドキソルピシン、エピルピシン、エトポシド、イダルピシン、メルバロン、ミトキサントロン、ノボビオシン、ピラルピシン、テニポシド、バルルピシン、及びゾルピシン）を含むトポイソメラーゼ阻害剤、（iv）窒素マスタード（ベンダムスチン、ブスルファン、クロラムブシル、シクロホスファミド、エストラムスチンリン酸エステル、イホサミド、メクロレタミン、メルファラン、プレドニムスチン、トロホスファミド、及びウラムスチン）、ニトロソウレア（カルムスチン（BCNU）、フォテムスチン、ロムスチン（CCNU）、N－ニトロソ－N－メチルウレア（MNU）、ニムスチン、ラニムスチンセムスチン（MeCCNU）、及びストレプトゾトシン）、白金系（シスプラチン、カルボプラチン、ジシクロプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチン及びサトラプラチン）、アジリジン（カルボクオン、チオテパ、マイトマイシン、ジアジコン（AZQ）、トリアジコン及びトリエチレンメラミン）、アルキルスルホネート（ブスルファン、マンノスルファン、及びトレオスルファン）、非古典的アルキル化剤（ヒドラジン、プロカルバジン、トリアゼン、ヘキサメチルメラミン、アルトレタミン、ミトブロニトール、及びピボプロマン）、テトラジン（ダカルバジン、ミトゾロミド及びテモゾロミド）、（v）ドキソルピシン及びダウノルピシンを含むアントラサイクリン剤。これらの化合物の誘導体としては、エピルピシン及びイダルピシン；ピラルピシン、アクルピシン、及びミトキサントロン、ブレオマイシン、マイトマイシンC、ミトキサントロン、及びアクチノマイシン；（vi）FⅠ阻害剤（ティピファルニブ）、CDK阻害剤（アベマシクリブ、アルボシジブ、パルボシクリブ、リボシクリブ、及びセリクリブ）、PrⅠ阻害剤（ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、及びイキサゾミブ）、PhⅠ阻害剤（アナグレリド）、IMPDI阻害剤（チアゾフリン）、LI阻害剤（マソプロコール）、PARP阻害剤（ニラパリブ、オラパリブ、ルカパリブ）、HDAC阻害剤（ベリノスタット、パノビノスタット、ロミデプシン、ポリノスタット）、及びPIKI阻害剤（イデラリシブ）を含む酵素阻害剤；（vii）ERA受容体アンタゴニスト（アトラセンタン）、レチノイドX受容体アンタゴニスト（ベキサロテン）、性ステ

10

20

30

40

50

ロイド受容体アンタゴニスト（テストステロン）を含む受容体アンタゴニスト剤；（v i i）アムサクリン、トラベクテジン、レチノイド（アリトレチノイン トレチノイン）三酸化ヒ素、アスパラギン枯渇剤（アスパラギナーゼ／ペグアスパラガーゼ）、セレコキシブ、デメコルシン エレスクロモール、エルサミトルシン、エトグルシド、ロニダミン、ルカントン、ミトグアゾン、ミトタン、オブリメルセン、オマセタキシンメペスクシナート、及びエリブリンを含む、グループ分けされていない薬剤。

【0121】

薬学的組成物

一実施形態では、本発明は、本明細書に記載される抗体若しくはその抗原結合断片のうちのいずれか1つ、本明細書に記載される二重特異性抗体のうちのいずれか1つ、又は本明細書に記載される抗体－薬物コンジュゲートのうちのいずれか1つと、少なくとも1つの薬学的に許容される担体と、を含む、薬学的組成物を提供する。

10

【0122】

例えば、薬学的組成物は、抗p95HER2抗体、その抗原結合断片、p95HER2及び第2の標的を標的とする二重特異性抗体、それらの抗体－薬物コンジュゲート、抗CD73抗体、その抗原結合断片、CD73及び第2の標的を標的とする二重特異性抗体、又はそれらの抗体－薬物コンジュゲート、例えば本明細書に記載されるものを含む。

【0123】

本明細書で使用される場合、「薬学的組成物」は、活性成分、及び任意選択的に1つ以上の薬学的に許容される担体、希釈剤又は賦形剤を含む製剤を指す。「活性成分」という用語は、互換的に「有効成分」を指すことができ、投与時に需要が高い効果を誘導することができる任意の薬剤を指すことを意味する。一実施形態では、活性成分は、生物学的に活性な分子を含む。本明細書で使用される場合、「生物学的に活性な分子」という語句は、細胞内に生物学的効果を有する分子を指す。特定の実施形態では、活性分子である抗体、抗体断片、二重特異性抗体、又は抗体－薬物コンジュゲート、例えば、本明細書に記載されるもの、又はモルホリノ。

20

【0124】

「薬学的に許容される」とは、担体、希釈剤又は賦形剤が製剤の他の成分と適合性があり、そのレシピエント、又は製剤の活性成分の活性に有害でないことを意味する。薬学的に許容される担体、賦形剤又は安定剤は、当該技術分野で周知である。例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)。薬学的に許容される担体、賦形剤、又は安定剤は、用いられる投薬量及び濃度でレシピエントに非毒性であり、リン酸塩、クエン酸塩、及び他の有機酸などの緩衝剤；アスコルビン酸及びメチオニンを含む抗酸化剤；保存剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、又はベンジルアルコール；メチル若しくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペンタノール；及びm-クレゾール）；低分子量（約10残基未満）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、又は免疫グロブリン；ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー；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、又はリジン；単糖類、二糖類、及びグルコース、マンノース、又はデキストリンを含む他の炭水化物；EDTAなどのキレート剤；糖類、例えば、スクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトール；ナトリウムなどの塩形成対イオン；金属複合体（例えば、Zn-タンパク質複合体）；並びに／あるいは非イオン性界面活性剤、例えば、TWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、又はポリエチレングリコール（PEG）が挙げられ得る。担体の例としては、限定されないが、リポソーム、ナノ粒子、軟膏、ミセル、ミクロスフェア、微粒子、クリーム、エマルション、及びゲルが挙げられる。賦形剤の例としては、限定されないが、ステアリン酸マグネシウムなどの抗接着剤、糖及びそれらの誘導體（スクロース、ラクトース、デンプン、セルロース、糖アルコールなど）などの結合剤、ゼラチン及び合成

30

40

50

ポリマーなどのタンパク質、タルク及びシリカなどの滑沢剤、並びに酸化防止剤、ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC、パルミチン酸レチニル、セレン、システイン、メチオニン、クエン酸、硫酸ナトリウム及びパラベンなどの保存剤が挙げられる。希釈剤の例として、限定されないが、水、アルコール、食塩水溶液、グリコール、鉱物油、及びジメチルスルホキシド（DMSO）が挙げられる。

【0125】

いくつかの態様では、薬学的に許容される担体は、抗体又は抗原結合断片の1つ以上のポリペプチドのC末端にコンジュゲートされる。例えば、共有結合コンジュゲート化及びリンカーの使用を含む、薬学的に許容される担体をコンジュゲートする任意の好適な手段を使用することができる。

【0126】

使用方法

一実施形態では、本発明は、がんを治療することを必要とする対象に、有効量の本明細書に記載の抗体又はその抗原結合断片のうちのいずれか1つ、本明細書に記載の二重特異性抗体のうちのいずれか1つ、又は本明細書に記載の抗体-薬物コンジュゲートのうちのいずれか1つを投与し、それによってがんを治療することを含む、がんを治療する方法を提供する。

【0127】

本明細書で使用される場合、「治療する」、「治療」、「療法」、「治療用」などの用語は、所望の薬理学的効果及び／又は生理学的効果を得ることを指し、これらの効果には、限定されないが、ある疾患又は障害を緩和すること、その進行を遅延若しくは遅らせること、その影響若しくは症状を軽減すること、その発症を予防すること、抑制すること、その発症を改善すること、治療的利益及び／又は予防的利益などのある疾患、障害、又は医学的状态に関して有益な結果若しくは所望な結果を得ることが含まれる。「治療」は、本明細書で使用される場合、哺乳動物、特にヒトにおける疾患の任意の治療を含み、(a) 疾患の素因があるか、又は疾患を獲得するリスクがあるが、まだそれを有すると診断されていない対象を含む対象において疾患が発生するのを防止すること、(b) 疾患を阻害すること、すなわち、その発症を阻止すること、及び／又は(c) 疾患を軽減すること、すなわち、疾患の退行を引き起こすことを含む。治療的利益には、治療されている基礎となる障害の根絶又は改善が含まれる。また、治療的利益は、対象が依然として基礎となる障害を患っている可能性があるにもかかわらず、対象において改善が観察されるように、基礎となる障害に関連する生理学的症状のうちの1つ以上の根絶又は改善によって達成される。いくつかの態様では、予防的利益のために、治療、又は治療のための組成物は、特定の疾患を発症するリスクのある対象、又は疾患の診断がなされていない場合であっても、疾患の生理学的症状のうちの1つ以上を報告する対象に投与される。本開示の方法は、任意の哺乳動物又は他の動物に対して使用されてもよい。いくつかの態様では、治療は、症状の低下又は中止をもたらす。予防効果は、ある疾患又は状態の出現を遅延させるか、若しくは排除すること、ある疾患又は状態の症状の発症を遅延させるか、若しくは排除すること、ある疾患又は状態の進行を遅らせるか、停止させるか、若しくは逆転させること、又はそれらの任意の組み合わせを含む。

【0128】

本明細書で使用される場合、「対象」という用語は、本明細書に開示される方法が実施される任意の個体又は患者を指す。「対象」という用語は、「個体」又は「患者」という用語と互換的に使用され得る。対象は、ヒトであってもよく、当業者には理解されるであろうが、動物であってもよい。したがって、げっ歯類（マウス、ラット、ハムスター、及びモルモットを含む）、ネコ、イヌ、ウサギ、ウシ、ウマ、ヤギ、ヒツジ、ブタなどを含む家畜、並びに霊長類（サル、チンパンジー、オランウータン、及びゴリラを含む）などの哺乳動物を含む他の動物が、対象の定義に含まれる。

【0129】

本明細書で使用される場合、「有効量」又は「治療有効量」という用語は、本明細書で

10

20

30

40

50

定義される疾患治療を含むがこれらに限定されない、意図される効果を誘導するのに十分な量の本明細書に記載の抗体、その抗原結合断片、又は他の組成物を指す。治療有効量は、意図される治療用途（例えば、インビボ）、又は治療される患者及び疾患状態、例えば、患者の体重及び年齢、疾患状態の重症度、投与の様式などに応じて変動してもよく、これらは、当業者によって容易に決定され得る。この用語は、標的細胞において特定の応答を誘導する用量にも適用される。特定の用量は、特定の抗体、その抗原結合断片、又は選択される他の組成物、従うべき投薬レジメン、それが他の化合物と組み合わせて投与されるかどうか、投与のタイミング、それが投与される組織、及びそれが担持される物理的送達系に応じて変化する。

【0130】

いくつかの態様では、本発明の抗体又はその抗原結合断片は、単剤療法として、又は併用療法として、放射線療法、細胞傷害性化学療法、免疫チェックポイント阻害剤を含む免疫療法、並びにワクチン、インターロイキン、サイトカイン、ケモカイン、及び生物学的製剤などの他の免疫調節剤などの他の治療剤と併用される。免疫療法のための例示的なインターロイキンとしては、IL-1、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、及びIL-23が挙げられる。免疫療法のための例示的なサイトカインとしては、インターフェロン、TNF- α 、TGF- β 、G-CSF、及びGM-CSFが挙げられる。免疫療法のための例示的なケモカインとしては、CCL3、CCL26、及びCXCL7が挙げられる。例示的な生物学的製剤として、CAR-T細胞療法、腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）療法、及びモノクローナル抗体、例えば、アレムツズマブ、トラスツズマブ、イブリツモマブチウキセタン、ブレンツキシマブベドチン、アドラスツズマブエムタンシン、ブリナツモマブ、ペバシズマブ、及びセツキシマブが挙げられる。抗体はまた、例えば、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、及びセミプリマブなどのPD-1阻害剤、例えば、アテゾリズマブ、アベルマブ、及びデュルバルマブなどのPD-L1阻害剤、例えば、イブリムマブなどのCTLA-4阻害剤、例えば、イブリムマブなどのCTLA-4阻害剤、並びに例えば、抗B7-H3抗体、抗KIR抗体、及び抗LAG3抗体などの他のチェックポイント阻害剤を含む、チェックポイント阻害剤も含む。

【0131】

いくつかの実施形態では、対象においてがんを治療する方法が、本明細書に提供される。がんを治療する方法は、対象に、がんを治療するのに有効な、ある量の本明細書に提供される任意の二重特異性抗体又はその抗原結合断片を投与することを含む。

【0132】

がんは、身体の他の部分に侵入又は拡散する可能性のある、異常な細胞成長を伴う疾患の一群である。2015年には、約9,050万人が、がんを患い、年間約1,410万人の新規症例が発生し、約880万人の死亡（死亡の15.7%）を引き起こした。男性におけるがんの最も一般的な種類は、肺がん、前立腺がん、結腸直腸がん、及び胃がんである。女性において、最も一般的な種類は、乳がん、結腸直腸がん、肺がん及び子宮頸がんである。「がん」という用語は、がん（悪性腫瘍）を良性腫瘍から区別する、他の部位（続発性部位、転移）に侵入し、拡散する可能性のある、1つの部位（原発性部位）から始まる異常で無制御な細胞増殖を特徴とする疾患群を指す。事実上全ての臓器が影響を受ける可能性があり、ヒトに影響を与える可能性のある100種類を超えるがんを引き起こす。がんは、遺伝的素因、ウイルス感染、電離放射線への曝露、環境汚染物質への曝露、タバコ及び／又はアルコールの使用、肥満、食事不良、身体活動の欠如、又はそれらの任意の組み合わせを含む多くの原因に起因し得る。本明細書で使用される場合、それらの文法的変形語を含む「新生物」又は「腫瘍」は、良性又はがん性であり得る組織の新規で異常な成長を意味する。関連する態様では、新生物は、限定されないが、様々ながんを含む新生物性の疾患又は障害を示す。例えば、かかるがんには、前立腺がん、膵臓がん、胆道がん、結腸がん、直腸がん、肝臓がん、腎臓がん、肺がん、精巣がん、乳がん、卵巣がん、膵臓がん、脳がん、頭頸部がん、黒色腫、肉腫、多発性骨髄腫、白血病、リンパ腫など

10

20

30

40

50

が含まれ得る。

【0133】

いくつかの態様では、がんは、前立腺がん、肺がん、非小細胞肺がん（NSCLC）、黒色腫、リンパ腫、乳がん、頭頸部がん、腎細胞がん（RCC）、卵巣がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮がん、子宮頸がん、卵巣がん、肝臓がん、胃がん、結腸がん、直腸がん、口腔がん、咽頭がん、膵臓がん、甲状腺がん、皮膚がん、脳がん、骨がん、造血器がん、又は白血病である。

【0134】

アミノ酸配列及び核酸配列

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体、その抗原結合断片又は二重特異性抗体のうちのいずれかをコードする、単離されたアミノ酸配列が本明細書で提供される。

10

【0135】

「ペプチド」、「ポリペプチド」、及び「タンパク質」という用語は、本明細書で互換的に使用され、共有結合した化学物質によって連結された少なくとも2つのアミノ酸の任意の鎖を指す。本明細書で使用される場合、ポリペプチドは、タンパク質全体又はその一部をコードする完全なアミノ酸配列を指し得る。「タンパク質コード配列」又は特定のポリペプチド若しくはペプチドを「コードする」配列は、適切な調節配列の制御下に配置されると、転写される核酸配列であり（DNAの場合）、インビトロ又はインビボでポリペプチドに翻訳される核酸配列である（mRNAの場合）。コード配列の境界は、5'（アミノ）末端の開始コドン及び3'（カルボキシル）末端の翻訳停止コドンによって決定される。コード配列には、原核生物又は真核生物のmRNAからのcDNA、原核生物又は真核生物のDNAからのゲノムDNA配列、更には合成DNA配列が含まれるが、これらに限定されない。転写終結配列は、通常、コード配列に対して3'側に位置するであろう。

20

【0136】

様々な態様では、アミノ酸配列は、配列番号1～40及び46～91に示される通りである。

【0137】

本明細書に提供されるアミノ酸配列をコードする単離された核酸配列も、本明細書で提供される。

30

【0138】

本明細書で使用される場合、「核酸」という用語は、デオキシリボ核酸（DNA）又はリボ核酸（RNA）などのポリヌクレオチドを指す。核酸は、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、iRNA、miRNA、tRNA、ncRNA、rRNA、並びにアプタマー、プラスミド、アンチセンスDNA鎖、shRNA、リボザイム、コンジュゲートされた核酸及びオリゴヌクレオチドなどの組換え的に産生され、化学的に合成された分子を含むが、これらに限定されない。本発明によれば、核酸は、一本鎖又は二本鎖及び線状又は共有結合的に環状に閉じた分子として存在し得る。核酸を単離することができる。「単離された核酸」という用語は、核酸が、（i）例えば、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を介してインビトロで増幅されたこと、（ii）クローニングによって組換え的に産生されたこと、（iii）例えば、切断及びゲル電気泳動による分離によって精製されたこと、又は（iv）例えば、化学合成によって合成されたことを意味する。核酸は、特に、DNAテンプレートからのインビトロ転写によって調製することができるRNAの形態で、細胞への導入、すなわち、トランスフェクションのために用いることができる。更に、RNAは、配列の安定化、キャッピング、及びポリアデニル化によって、適用前に修飾することができる。

40

【0139】

いくつかの実施形態では、配列番号1～40及び46～91のアミノ酸配列のうちのいずれか1つをコードする単離された核酸配列が、本明細書で提供される。

【0140】

50

いくつかの実施形態では、本発明は、以下の実施例で詳述される、抗 p 9 5 H E R 2 及び抗 C D 7 3 抗体の発現、精製、及び特性評価を更に提供する。シグナル配列は、本明細書に提供される抗体の発現構築物に含まれてもよい。任意の好適なシグナル配列、例えば、配列番号 4 3 の配列を使用することができる。

【 0 1 4 1 】

以下に、説明された用途のために企図される、抗 p 9 5 H E R 2 及び抗 C D 7 3 抗体、その抗原結合断片、及びその二重特異性抗体を説明する例を提示する。以下の実施例は、本発明の実施形態を更に例示するために提供されるが、本発明の範囲を限定することを意図するものではない。これらは、使用され得るものの典型的であるが、代替的に、当業者に既知の他の手順、方法論、又は技術を使用してもよい。

【実施例】

【 0 1 4 2 】

実施例 1

O m n i M a b ライブラリからの抗体の生成

p 9 5 H E R 2 に対する抗体を生成するために、A P B i o s c i e n c e s I n c . (A P B i o s c i e n c e s , I n c .) によって 1 0 0 を超える健康なドナーの P B M C から収集された I g G 可変領域配列に対して構築された O m n i M a b ファージミドライブラリを用いて、パニングを行った。ファージディスプレイを、H y p e r p h a g e (M 1 3 K 0 7 Δ p I I I , P r o g e n , H e i d e l b e r g , G e r m a n y) を使用して実行した。

【 0 1 4 3 】

パニングを、第 1 のラウンドで p 9 5 H E R 2 過剰発現 H E K 2 9 3 細胞を使用して、次いで、以下の 3 ラウンドの選択において、E x p i - 2 9 3 細胞によって産生された組換え p 9 5 H E R 2 タンパク質を使用して実施した。簡単に述べると、第 1 のラウンドの細胞パニングのために、o m n i M a b ファージライブラリを、P B S 中の 1 倍の 1 % B S A と混合した。ファージ / P B S 混合物を、減算のために、野生型 E x p i 2 9 3 細胞を含有するチューブに添加した。次に、野生型 E x p i 2 9 3 細胞を遠心分離で収集し、P B S 中の 0 . 5 % B S A で細胞を 3 回洗浄して、E x p i 2 9 3 細胞を認識しなかったファージを収集した。また、収集したファージを、完全長 p 9 5 H E R 2 トランスフェクトされた E x p i 2 9 3 と振とうしつつ混合した。トランスフェクトした E x p i 2 9 3 細胞を、P B S 中の 0 . 5 % B S A で 1 0 回洗浄し、p 9 5 H E R 2 トランスフェクトされた E x p i 2 9 3 細胞に結合したファージを T E A 溶液により溶出させた。溶出したファージを収集して、ファージレスキューのために T G 1 に感染させた。

【 0 1 4 4 】

第 2 ~ 第 4 のラウンドの固相パニングのために、シグナルペプチド及び F L A G - t a q を有する分泌型 p 9 5 H E R 2 E C D (E R B B 2 _ H U M A N アミノ酸位置 6 1 1 ~ 6 5 2) を E x p i 2 9 3 プラットフォーム上で産生させた。培養上清を、を用いてパニングするための標的抗原として遠心分離して収集した。免疫チューブを、P B S を有する抗 F L A G マウス抗体で予めコーティングし、様々な F L A G - T a q 組換えタンパク質をローディングした。以前のパニングラウンドからの免疫チューブ及びファージを、ブロッキングのために P B S 中の 5 % N F M 又は 1 % B S A と混合し、次いで、ファージ混合物を、減算のために F L A G - t a g 組換えタンパク質 (p 9 5 H E R 2 E C D - F L A G を除く) を含有する予めローディングした免疫チューブに加えた。他の免疫チューブを、分泌型 p 9 5 H E R 2 E C D F L A G - t a g を含有する培養上清に添加した。インキュベーション後、収集し、P B S 中の 1 % の t w e e n - 2 0 でチューブを 3 回洗浄して、免疫チューブを認識しなかったファージを収集した。次に、抗原結合のために、F L A G - t a q を有する p 9 5 H E R 2 E C D を含有する免疫チューブにファージ混合物を移す。インキュベーション後、免疫チューブを P B S 中 1 % の t w e e n - 2 0 で 1 0 回洗浄し、結合したファージを T E A 溶液で溶出させた。溶出したファージを収集して、ファージレスキューのために T G 1 に感染させた。次に、p 9 5 H E R 2 に特異的

10

20

30

40

50

な単一のクローンを単離し、FACSによって決定し（図1A～1C）、配列決定のために選択して、重鎖及び軽鎖の多様性を確認した。この試験で使用した参照抗体は、ヒトIgG1骨格を有するUS2018/118849A1の配列番号20及び21から生成し、ExpichOプラットフォーム上で産生した。

【0145】

次に、独自の抗体配列をサブクロニングし、更なる分析のために発現させた。

【0146】

実施例2

IgGの形態でのp95HER2特異的結合タンパク質のサブクロニング、発現、及び精製

候補を迅速にスクリーニングするために、FACSによって同定された陽性p95HER2結合剤の重鎖及び軽鎖を増幅させ、消化し、IgG1定常領域（配列番号41）を有する社内で生成したIgG発現ベクターにサブクロニングした。配列検証後、プラスミドを調製し、抗体産生のためにExpichO細胞（Invitrogen）にトランスフェクトした。6日間の培養後、抗体をプロテインAクロマトグラフィーによって培養上清からアフィニティー精製した。精製された抗体を濃縮し、PBS緩衝液中で透析した。抗体濃度をNanoDrop2000分光光度計を用いて決定した。抗体の純度及び完全性は、NuPAGE（ThermoFisher、カタログNP0321BOX）によって、非還元条件下又は還元条件下で決定し、Coomassie Brilliant Blue G-250染色溶液によって可視化した。

【0147】

図2は、精製された抗p95HER2抗体リードのPAGE結果を示す。結果は、タンパク質が、非還元条件下で約145kDaの分子量を有し、重鎖及び軽鎖が、還元条件下でそれぞれ55kDa及び25kDaの分子量を有することを示した。ほとんどの抗体リードは、ワンステップのプロテインAクロマトグラフィーから、90%を超える純度を示した。

【0148】

図3A～3Bは、フローサイトメーターによる、精製された抗p95HER2抗体リードの結合活性を示す。

【0149】

実施例3

抗p95HER2モノクローナル抗体の結合エピトープマッピング

結合エピトープマッピングを、PEPPERPRINT Inc. によって行った。結合エピトープを決定するために、GSリンカーの細長い完全長p95HER2ペプチド配列を、各々4、9、及び14個のアミノ酸と重複する直鎖の5、10、及び15個のアミノ酸ペプチドに変換した。

【0150】

直鎖ペプチドマイクロアレイを、1µg/mlの濃度の抗体リードとともにインキュベートし、続いて二次抗体（ヤギ抗ヒトIgG（H+L）DyLight680）及び対照抗体（マウスモノクローナル抗HA（12CA5）DyLight800）で染色し、更にOdyssey Imaging System（LI-COR, Inc）で読み出した。スポット強度の定量化及びペプチドアノテーションは、PepSlide（登録商標）Analyzer（SICASYS Software GmbH）を用いて行った。p95HER2抗体のエピトープを図4Aに示し、まとめた。エピトープマッピング結果のヒートマップは、抗p95HER2# R4-3、R4-5、R4-11、R4-15及びR4-38の両方がモチーフKFPDE（配列番号96）を強く認識することができることを示した。しかしながら、KFPDEモチーフを含有する10個及び15個のアミノ酸ペプチドからのシグナルは、p95HER2の構造が単純な線形ではないことを開示した。モチーフKFPDEがアミノ酸配列の端に位置する場合、比較的強いシグナルが生成された。すなわち、モチーフKFPDEの近傍のアミノ酸は、抗p95HER2抗体の

結合親和性に影響を及ぼすであろう（図4B）。

【0151】

実施例4

SEC-HPLCによる抗p95HER2-CD137 scFv二重特異性抗体のタンパク質凝集の評価

精製及び濃縮された抗体（1mg/mLを超える）を適用し、SEC-HPLC分析によってバリエーション及び凝集を決定した。SEC-HPLCを、Waters 2489 UV/VIS検出器を有するWaters ACQUITY Arcシステムを使用して行った。試料を、SEC分離のための移動相緩衝液として、均一濃度の25mMのリン酸ナトリウム、200mMのNaCl、pH6.8を用いて、XBridge Protein BEH SECカラム（Waters、カタログ番号186007640）にローディングした。流量は0.4mL/分、試料注入量は40μgであった。ピークは、280nmでの吸光度によって検出した。SECカラムへの注入の前に、全ての試料を0.22μmフィルター（Millipore、カタログ番号SLGP003RB）で濾過して、沈殿したタンパク質材料を除去した。データをEmpower 3ソフトウェアによって分析した。まとめると、1カラムのプロテインA精製された抗p95HER2-CD137抗体の純度は、95%を超える（図6A）。

10

【0152】

二重特異性抗体の一般的な構造を図5に提示する。

【0153】

20

実施例5

MCE-SDS-PAGEによる抗p95HER2-CD137二重特異性抗体のタンパク質完全性の評価

精製された抗体の全てのサイズバリエーション分析を、LabChip GXII機器（Perkin Elmer, Inc.）上で行った。アッセイは、製造者のプロトコルとして「Protein Clear HR Assay」を用いて行った。簡潔に述べると、1mg/mLの2.5μLのタンパク質試料を18μLの試料緩衝液と混合した。700μLのProtein Clear HR試料緩衝液を、24.5μLの1MのDTT（還元アッセイ用）又は24.5μLの0.25MのNEM（非還元アッセイ用）のいずれかと混合することによって、試料緩衝液を調製した。試料を70℃で10分間インキュベートした。室温まで冷却した後、35μLの水を各試料に添加してから、機器にローディングした。次いで、試料を、Protein Clear HR Assayスクリプトを使用して分析した。一方、チップを、製造業者の指示に従って調製し、分析全体を通して30℃で維持した。励起波長及び検出波長は、それぞれ、630nm及び700nmである。まとめると、1カラムのプロテインA精製された抗p95HER2-CD137抗体の純度及び完全性は、約95%に達する（図6B）。

30

【0154】

実施例6

バイオレイヤー干渉法による抗p95HER2-CD137二重特異性抗体の結合親和性

抗p95HER2-CD137 bsAbの親和性を、バイオレイヤー干渉分析（Fortebio, USA）によって決定した。CD137に対する抗p95HER2-CD137 bsAbの結合親和性を評価するために、bsAbをAHC（Anti-Human IgG Fc Capture, Fortebio、カタログ番号18-5060）に対して5μg/mLでローディングし、シグナルをおよそ0.5nmに到達させた。次に、センサを、マウスFcタグ組換えタンパク質と融合したCD137（カタログ番号41B-H5256）細胞外ドメインであった7シリーズの濃度分析物に曝露した。p95HER2に対する抗p95HER2-CD137 bsAbの親和性を決定するために、カスタム合成ビオチン化Her2 p95ペプチド（GenScript）を、5ng/mLでSA（ストレプトアビジン、Fortebio、カタログ番号18-5019）バイオセンサに1分間ローディングした。次いで、センサを、bsAbであった7シリ

40

50

ーズの濃縮分析物に曝露した。測定は、以下の通り実施した。動態緩衝液中で1分間ベースライン、動態緩衝液中で1分間ベースライン、7つの異なる濃度の分析物中で5分間の会合、及び動態緩衝液中への5分間の解離。動態パラメータを、Octet Data Acquisition and Analysis Softwareによって計算し、作成した。まとめると、p95HER2及びCD137抗原に対する抗p95HER2 #R4-11-CD137 #54 bsAbの親和性 (K_D) は、それぞれ0.189及び1.12 nMであった (図7A~7Bを参照されたい)。

【0155】

実施例7

抗p95HER2 #R4-11-CD137 #54 bsAbによるp95HER2及びCD137への同時結合

抗p95HER2-CD137二重特異性抗体の結合活性は、ForteBio (登録商標) (Menlo Park, Calif.) バイオセンサ分析によって決定された。この方法では、カスタム合成ビオチン化Her2 p95ペプチド (GenScript) を、50 µg/mLでSA (ストレプトアビジン、ForteBio、カタログ番号18-5019) バイオセンサに5分間ローディングした。次いで、センサを抗体試料に100 nMで5分間曝露し、その後、マウスFcタグ化ヒトCD137タンパク質 (AcroBiosystems、カタログ番号41B-H5256) と100 nMで5分間会合させた。結合チャートをOctet Data Acquisition and Analysis Softwareによって作成した。まとめると、これらの結果は、抗p95HER2-CD137二重特異性抗体が、ForteBio (登録商標) バイオセンサ分析によって決定されるように、p95HER2及びCD137を同時に認識することを示す (図8)。

【0156】

実施例8

抗p95HER2-CD137二重特異性抗体によって誘導されるp95HER2依存性T細胞活性化

ヒトT細胞を、RosetteSep (商標) Human T Cell Enrichment Cocktail (STEMCELLカタログ番号15061) を使用して単離した。精製されたT細胞 (1×10^5 個の細胞) を、抗CD3 (OKT3) コーティングされたポリビーズ存在下、T細胞:ビーズ比1:1でp95HER2発現NCI-H292肺がん細胞 (1×10^4 個の細胞) と共培養した。3日後、ELISAによって測定したように、IFN-γ産生によってT細胞活性化を測定した。

【0157】

NCI-H292肺がん細胞上のp95HER2の発現レベルをフローサイトメトリーによって確認した (図9A)。単剤療法又は抗p95HER2及び抗CD137 #54抗体との併用療法と比較して、抗p95HER2-CD137 bsAbによって、より強力なIFN-γ産生が誘導された (図9B)。

【0158】

実施例9

抗p95HER2-CD137二重特異性抗体による抗体依存性細胞媒介性細胞傷害 (ADCC)

ADCC誘導のために、CD16-NK92エフェクター細胞を、U底96ウェルプレートウェル中、E/T比1、3、及び10でCD137発現HEK293標的細胞 (2×10^4 個の細胞) と共培養した。2つの抗p95HER2-CD137 bsAbである#R4-11-#54 (元々のIgG1 Fcを有する) 及び#R4-11e5-#54 (ADCCを増強するIgG1 Fcを有する、配列番号42) をこの試験に適用した。6時間後、細胞傷害性活性を、Cytotox 96 (登録) Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, G1780) によって決定した。

【0159】

アイソタイプ対照と比較して、#R4-11e5-#54は、#R4-11及び#R4-11-#54とは異なり、CD137-HEK293細胞においてADCCを誘導した。このことは、#R4-11e5-#54のIgG1Fc領域におけるADCCを増強する変異に対応していた（図10A）。#R4-11-#54は、p95HER2-NCI-H292細胞及びその親#R4-11mAbに対するADCC活性を誘導した（図10B）。

【0160】

まとめると、これらの結果は、#R4-11e5-#54bsAbが、がんにおける重要なエフェクター細胞であるNK細胞及びT細胞などのCD137発現細胞に対して有害であり得ることを示した。したがって、正常なIgG1Fcを有する#R4-11-#54bsAbを、更なる開発のために選択した。

【0161】

実施例10

インビボでの抗p95HER2-CD137二重特異性抗体による腫瘍成長の阻害。

マウスCD137と交差反応しない抗p95HER2#4-11-CD137#54bsAbの抗腫瘍活性を検証するために、ヒト腫瘍細胞（p95HER2発現MDA-MB-231）をヒトPBMCと予め混合し、雌SCIDベージュマウスの前方の乳房脂肪体に同所性同種移植して、インビボで抗がん活性を評価した。腫瘍接種から10日後、等モルのmAb（M.W. 150kDa、7.7mg/kg）及びbsAb（M.W. 195kDa、10、2、0.4mg/kg）を週に2回腹腔内注射した。腫瘍サイズ（mm³）を週に2回測定し、（長さ×幅×幅）／2として計算した。腫瘍阻害率を、腫瘍体積（TGIV）又は腫瘍重量（TGIW）に基づいて以下の方程式によって計算した。TGIV（%）＝[1－（治療群のV_t－V₀）／（対照群のV_t－V₀）]×100%、ここで、V_t：治療後の平均腫瘍体積、V₀：治療前の平均腫瘍体積。TGIW（%）＝（対照群の平均腫瘍重量－治療群の平均腫瘍重量）／対照群の平均腫瘍重量×100%。

【0162】

まとめると、これらの結果は、PBSによる治療と比較して、治療時の腫瘍成長の有意な阻害を示す（図11A～11C）。TGIWによれば、それぞれ、10、2及び0.4mg/kgで、95.6%、91.5%及び93.7%のより大きな腫瘍阻害が示されたが、TGIVは、125.5%、113%及び117%であった。

【0163】

実施例11

マウスにおける抗p95HER2-CD137二重特異性抗体の薬物動態プロファイル

二重特異性抗p95HER2-CD137抗体（体重1kg当たり5mg）を、静脈内ボラス注射を介してSCIDベージュマウスに投与した。末梢血を、注射後0.5、24、72、168、264、336、504、672及び840時間で収集した。抗体の血漿濃度をELISAによって決定した。MaxiSorpプレート（Invitrogen）を、CD137-Fc融合タンパク質（AP Biosciences、0.5μg/mL）でコーティングし、その後、血漿試料を連続希釈し、標準曲線として抗CD73-CD137#54bsAbを適用した。結合した抗体を、CD73-Flag-His抗原（AP Biosciences）及びHRPコンジュゲート抗Flag抗体によって、TMB基質を使用して検出した。血漿抗体濃度を内挿法により計算した。PKパラメータを、PKSolverソフトウェアを使用して計算した。抗p95HER2-CD137は、t_{1/2}が336時間であり、AUCが63896μg/mL*hであるPKプロファイルを示した（図12）。

【0164】

実施例12

OmnimAbライブラリからの抗体の生成

CD73に対する抗体を生成するために、OmnimAbファージミドライブラリを用

10

20

30

40

50

いた選択を行った。ファージミドライブラリは、A P B i o s c i e n c e s I n c . (A P B i o I n c .) によって、100名を超える健康なドナーからの末梢血単核細胞の集合から構築された。

【0165】

第1のラウンドのパニングを、H y p e r p h a g e (M 1 3 K 0 7 Δ p I I I , P r o g e n , H e i d e l b e r g , G e r m a n y) を使用して実行した。溶液相パニングを、C D 7 3 特異的結合剤の選択及びO m n i M a b ライブラリからの単離に使用した。第1のラウンドの選択で使用される哺乳動物細胞発現系によって産生されるC末端にf l a g タグ及びポリヒスチジンタグを有する組換えC D 7 3 タンパク質を使用して、溶液相パニングを行った。第2のラウンドの濃縮もまた、溶液相パニングを使用した。C D 7 3 発現E x p i 2 9 3 細胞及び乳がん細胞株M D A - M B - 2 3 1 を別々に第3のラウンドの濃縮に使用した。特異的なC D 7 3 結合剤をスクリーニングし、3ラウンドのパニング後に直接E L I S A 及びF A C S によって単離した(図13A~13C)。ファージクローンは、O m n i M a b ファージライブラリからの3ラウンドのヒトC D 7 3 特異的濃縮プロセス後に、ヒトC D 7 3 を特異的に認識する。ファージ含有上清をC D 7 3 E L I S A に適用し、陽性結合剤に付番した。M D A - M B - 2 3 1 乳がん細胞株を、C D 7 3 ファージ上清(50μl/ウェル)で染色し、C D 7 3 結合活性を調べるために、M D A - M B - 2 3 1 細胞ベースのパニングから単離した。図13Bは、結合剤の結合活性のランキングを示した。結合剤を単離し、配列決定のために送り、重鎖の配列及び多様性を確認した。

10

20

【0166】

実施例13

I g G の形態でのC D 7 3 特異的結合タンパク質のサブクローニング、発現、及び精製候補を迅速にスクリーニングするために、E L I S A 及びF A C S によって同定された陽性C D 7 3 結合剤の重鎖及び軽鎖を増幅させ、消化し、A P B i o によって生成され、操作されたI g G 1 定常領域(配列番号87)を保有するI g G 発現ベクターにサブクローニングした。配列検証後、プラスミドを調製し、抗体産生のためにE x p i C H O 細胞(I n v i t r o g e n) にトランスフェクトした。6日間の培養後、無血清培地に分泌された抗体をプロテインAクロマトグラフィーによって培養上清からアフィニティー精製した。精製された抗体を濃縮し、次いでP B S 緩衝液中で透析した。透析したタンパク質の最終濃度を、N a n o D r o p 2 0 0 0 分光光度計を使用して決定し、純度及び完全性を、還元試薬の有無にかかわらずS D S - P A G E によって決定した。精製された抗体を、N u P A G E (T h e r m o F i s h e r , カタログ番号N P 0 3 2 1 B O X) によって、非還元条件下又は還元条件下で分析した。染料フロントがゲルの底に達したら、電圧をオフにして、ガラスプレートからゲルを取り外す。ゲルをプラスチック容器中のC o o m a s s i e B r i l l i a n t B l u e G - 2 5 0 染色溶液に入れ、数時間ロックする。脱色液は、ヒュームフード内の指定された廃棄物容器に流し込み、バンドがゲルの背景に対して明確に視覚化され得るようになるまで数回交換することができる。

30

【0167】

図14は、精製された抗C D 1 3 7 抗体リードの異なるバッチの代表的なP A G E ゲル分析を示す。ワンステップのプロテインA精製された抗C D 7 3 抗体リードの純度及び完全性を、非還元条件下及び還元条件下でS D S - P A G E によって分析した。結果は、タンパク質が、非還元条件下で約145kDaの分子量を有し、重鎖及び軽鎖が、還元条件下でそれぞれ55kDa及び25kDaの分子量を有することを示した。プロテインAクロマトグラフィーの1つのステップによって、90%を超える純度を得ることができた。

40

【0168】

実施例14

抗C D 7 3 抗体によるC D 7 3 酵素活性の遮断

M D A - M B - 2 3 1 細胞(2×10⁴個の細胞)を、96ウェル組織培養プレートのウェル内で、4℃で30分間、抗C D 7 3 抗体とともにインキュベートした。A M P (1

50

2.5 μ M、Sigma、カタログ番号A1752)を添加し、4℃で更に1時間インキュベートした。上清を96ウェルの白色プレートに移し、残留AMPを、AMP-Gloアッセイによって、製造業者の指示に従って検出した(Promega、カタログ番号V5011)。酵素活性阻害のパーセンテージを、 $[(細胞+AMP+抗体)-(細胞+AMP)]/[AMP-(細胞+AMP)] \times 100$ として計算した。可溶性CD73に対する抗CD73抗体の遮断活性を試験するために、MDA-MB-231細胞(4.8×10^6 個の細胞)を24ウェルプレートのウェルに40時間播種し、次いで培養培地を収集し、抗体とともに37℃で1時間インキュベートした。AMP(12.5 μ M、Sigma、カタログ番号A1752)を添加し、37℃で更に2時間インキュベートし、その後、残留AMPを検出し、酵素阻害のパーセンテージを計算するために、上記と同じ手順を行った。

10

【0169】

まとめると、抗CD73抗体の結合親和性は、必ずしも酵素活性のそれらの遮断に対応していなかった。クローン#3-4よりも良好な結合活性を有するが、クローン#3-6、#3-27、#3-34、#3-1-14、#3-1-21、及び#3-1-31において、より弱いCD73酵素活性の遮断が観察された。興味深いことに、クローン#3-1-28は、クローン#3-4と同等の結合活性であってもCD73酵素活性の最も強力な遮断を示し、#3-1-28を親和性成熟のために選択した(図15及び図16)。図15に示されるように、抗CD73抗体リードの結合活性をフローサイトメーターによって評価した。MDA-MB-231細胞(1×10^5 個の細胞)を抗CD73抗体(4 μ g/ml)で30分間表面染色した後、A488コンジュゲート抗ヒトIgG二次抗体とともに氷上で15分間インキュベートした。細胞をフローサイトメーターによって分析し、A488の蛍光強度をヒストグラム(左)及び数字(右の表)によって示した。図16に示されるように、抗CD73抗体リードによるCD73酵素活性の遮断を評価した。細胞表面上のMDA-MB-231によって発現されるCD73の酵素活性は、抗CD73抗体リードによって遮断された。

20

【0170】

改善された結合親和性(図17A~17C及び実施例15)に対応して、抗CD73クローン#3-1-28-v1、#3-1-28-v2、及び#3-1-28-v3のCD73酵素遮断活性は、それらの親クローン#3-1-28よりも優れていた(図18)。細胞膜結合型CD73酵素の阻害において、抗CD73#3-1-28-v1(0.213 nM)及び抗CD73#3-1-28-v2(0.245 nM)のIC₅₀は、親の#3-1-28(0.49 nM)のIC₅₀よりも約2分の1低かった(図18A)。興味深いことに、可溶性CD73酵素の阻害において、抗CD73#3-1-28-v1(0.187 nM)、抗CD73#3-1-28-v2(0.273 nM)、及び抗CD73#3-1-28-v3(0.241 nM)のIC₅₀は、親#3-1-28(1.478 nM)のIC₅₀よりも5分の1を超えて低かった(図18B)。

30

【0171】

更に、CD137 scFvをそれらのFcのC末端に連結することによって、親和性成熟した抗CD73#3-1-28-v1、#3-1-28-v2、及び#3-1-28-v3の二重特異性抗体への変換は、それらの酵素遮断活性を変化させなかった(図23)。

40

【0172】

実施例15

抗CD73#3-1-28の親和性成熟

親和性成熟抗体は、増加した生物学的有効性を示すことができる。抗体がハイブリドーマ又はヒトFvファージライブラリから単離されているかどうかにかかわらず。親和性の増加はまた、治療用抗体の投薬量の減少を可能にし得、毒性副作用を低減し得る。生殖細胞系ホットスポット残基は、同じエピトープを認識する同じ生殖細胞系遺伝子に由来する独立したモノクローナル抗体の統計分析に基づいて、親和性に大きな影響を与える可能

50

性が最も高い。抗体相補性決定領域（CDR）内の生殖細胞系ホットスポットは、自然に超変異を起こしやすい（Neuberger and Milstein, 1995）。
#3-1-28の結合活性を改善するために、本願発明者らは、LCDR2／HCDR3にランダム変異を導入し、これら2つのCDR領域でそれぞれ約 10^2 及び 10^8 の多様性を有するファージディスプレイライブラリを作製した。これらのホットスポットライブラリのパニングは、増加した親和性を有する変異体抗体をもたらした。CD73発現MDA-MB-231乳がん細胞を3ラウンドの細胞ベースのパニング濃縮に使用した。親ファージ#3-1-28よりも良好な結合活性を有する結合剤をFACSによってスクリーニングし（図17A）、27個の結合剤を配列決定して、操作されたCDR領域の多様性を確認した。FACSによって同定された陽性CD73結合剤の重鎖及び軽鎖を増幅させ、消化し、操作されたIgG1定常領域を保有するIgG発現ベクターにサブクローニングした。ベクターをIgG産生のために哺乳動物細胞発現系にトランスフェクトした。

10

【0173】

ELISA及びバイオレイヤー干渉法（図17B及び17C）によって測定される改善された結合に基づいて、クローン#1919-003、#1911-022、及び#1911-030を、（図19に示すような一般的な構造を有する）二重特異性抗体の更なる開発のために選択した。親#3-1-28に由来することを強調するために、クローン#1919-003、#1911-022、及び#1911-030を、以下、それぞれ#3-1-28-v1、#3-1-28-v2、及び#3-1-28-v3として改名した。
図17Aに示されるように、小規模親和性成熟ライブラリ由来のファージクローンのCD73結合活性を、CD73発現MDA-MB-231細胞の染色によって決定し、フローサイトメーターによって分析した。親ファージクローン#3-1-28と比較して、より良好な結合活性を有するクローンに付番した。図17Bに示されるように、図17Aにおいて付番されたファージクローンから変換された抗体の結合活性を、CD73 ELISAによって測定した。太字の#1919-002、#1919-003、#1919-004、#1911-022、及び#1911-030のクローンは、親の#3-1-28抗体よりも優れた結合活性を示した。図17Cに示されるように、図17Bで選択した抗体の結合動態を、バイオレイヤー干渉法によって測定した。クローン#3-1-28に由来することを強調するために、クローン#1919-003、#1911-022、及び#1911-030を、以下、それぞれ#3-1-28-v1、#3-1-28-v2、及び#3-1-28-v3として命名した。検出された K_D 値に基づいて、#3-1-28-v1、#3-1-28-v2、及び#3-1-28-v3の親和性は、親#3-1-28と比較して約2倍改善された。

20

30

【0174】

実施例16

バイオレイヤー干渉法による抗CD73モノクローナル抗体及び抗CD73-CD137二重特異性抗体の結合親和性

抗CD73 mAb及びbsAbの親和性を、バイオレイヤー干渉分析（ForteBio, USA）によって決定した。この方法では、抗CD73抗体を、AHC（Anti-Human IgG Fc Capture, ForteBio、カタログ番号18-5060）に対して $5\mu\text{g/mL}$ でローディングし、シグナルをおよそ0.5nmに到達させた。次いで、センサを、最高濃度30nMから2倍の連続希釈して合計7点のhisタグ化ヒトCD73（AcroBiosystems、カタログ番号CD3-H52H7）を含有する溶液に露出させた。測定は、以下のように行った：動態緩衝液中で1分間ベースライン、hCD73-His含有溶液中で5分間の会合、及び動態緩衝液中への5分間の解離。動態パラメータを、Octet Data Acquisition and Analysis Softwareによって計算し、作成した。

40

【0175】

まとめると、抗CD73 #3-1-28-v1、#3-1-28-v2、及び#3-

50

1-28-v3の結合親和性は、親#3-1-28と比較して、親和性成熟後に約2倍の改善を示す(図17C)。#3-1-28-v1、#3-1-28-v2、及び#3-1-28-v3の改善されたCD73結合親和性は、抗CD73-CD137二重特異性抗体への変換後も残る(図21A~21B)。

【0176】

実施例17

SEC-HPLCによる抗CD73-CD137 scFv二重特異性抗体のタンパク質凝集の評価

精製及び濃縮された抗体(1mg/mLを超える)を適用し、SEC-HPLC分析によってバリエーション及び凝集を決定した。SEC-HPLCを、Waters 2489 UV/VIS検出器を有するWaters ACQUITY Arcシステムを使用して行った。試料を、SEC分離のための移動相緩衝液として、均一濃度の25mMのリン酸ナトリウム、200mMのNaCl、pH6.8を用いて、XBridge Protein BEH SECカラム(Waters、カタログ番号186007640)にローディングした。流量は0.4mL/分、試料注入量は40µgであった。ピークは、280nmでの吸光度によって検出した。SECカラムへの注入の前に、全ての試料を0.22µmフィルター(Millipore、カタログ番号SLGP003RB)で濾過して、沈殿したタンパク質材料を除去した。データをEmpower 3ソフトウェアによって分析した。まとめると、1カラムのプロテインA精製された抗CD73-CD137抗体の純度は、90%を超える(図20A~20B)。

【0177】

実施例18

MCE-SDS-PAGEによる抗CD73-CD137二重特異性抗体のタンパク質完全性の評価

精製された抗体の全てのサイズバリエーション分析を、LabChip GXII機器(Perkin Elmer, Inc.)上で行った。アッセイは、製造者のプロトコルとして「Protein Clear HR Assay」を用いて行った。簡潔に述べると、1mg/mLの2.5µLのタンパク質試料を18µLの試料緩衝液と混合した。700µLのProtein Clear HR試料緩衝液を、24.5µLの1MのDTT(還元アッセイ用)又は24.5µLの0.25MのNEM(非還元アッセイ用)のいずれかと混合することによって、試料緩衝液を調製した。試料を70°Cで10分間インキュベートした。室温まで冷却した後、35µLの水を各試料に添加してから、機器にローディングした。次いで、試料を、Protein Clear HR Assayスクリプトを使用して分析した。一方、チップを、製造業者の指示に従って調製し、分析全体を通して30°Cで維持した。励起波長及び検出波長は、それぞれ、630nm及び700nmである。まとめると、1カラムのプロテインA精製された抗CD73-CD137抗体の純度及び完全性は、約95%に達する(図20A~20B)。

【0178】

実施例19

抗CD73-CD137二重特異性抗体による抗原認識

AP601の結合活性は、ForteBIO(登録商標)(Menlo Park, Calif.)バイオセンサ分析によって決定された。この方法では、Hisタグ化ヒトCD73タンパク質(AcroBiosystems、カタログ番号CD3-H52H7)を、HIS1K(Anti-Penta-HIS)バイオセンサ(カタログ番号18-5120)に5µg/mLで5分間ローディングした。次いで、センサを抗体試料に100nMで5分間曝露し、その後、マウスFcタグ化ヒトCD137タンパク質(AcroBiosystems、カタログ番号41B-H5256)と100nMで5分間会合させた。結合チャートをOctet Data Acquisition and Analysis Softwareによって作成した。

【0179】

まとめると、これらの結果は、抗CD73-CD137二重特異性抗体が、Forte B I O（登録商標）バイオセンサ分析によって決定されるように、CD73及びCD137を同時に認識することを示す（図22）。

【0180】

実施例20

抗CD73-CD137二重特異性抗体によるAMP抑制T細胞増殖のレスキュー

ヒトT細胞を、RosetteSep（商標）Human T Cell Enrichment Cocktail（STEMCELLカタログ番号15061）を使用して単離した。精製されたT細胞をCFSE（ThermoFisher、カタログ番号C34554）で標識し、ヒトT活性化剤CD3/CD28ダイナビーズ（ThermoFisher、カタログ番号11131D）により、T細胞：ビーズ比1：0.5で、AMP（400μM、Sigma、カタログ番号A1752）存在下で刺激した。3日後、ELISAによって測定されたIFN-γ産生によってT細胞活性化を決定し、フローサイトメリーによって細胞増殖を分析した。

10

【0181】

まとめると、結合親和性に対応して、親和性が改善した抗CD73-CD173二重特異性抗体は、AMP抑制T細胞活性化のよりよいレスキューを示した（図24）。

【0182】

実施例21

抗CD73-CD137二重特異性抗体によって誘導されるCD73依存性T細胞活性化

20

ヒトT細胞を、RosetteSep（商標）Human T Cell Enrichment Cocktail（STEMCELLカタログ番号15061）を使用して単離した。精製されたT細胞（ 1×10^5 個の細胞）を、抗CD3（OKT3）コーティングされたポリビーズ存在下、T細胞：ビーズ比1：1でCD73発現MDA-MB-231乳がん細胞及びNCI-H292肺がん細胞（ 1×10^4 個の細胞）と共培養した。3日後、ELISAによって測定したように、IFN-γ産生によってT細胞活性化を決定した。

【0183】

MDA-MB-231乳がん細胞及びNCI-H292肺がん細胞上のCD73発現レベルをフローサイトメリーによって確認した（図25A）。単剤療法又は抗CD73及び抗CD137#54抗体との併用療法と比較して、抗CD73-CD137 bsAbによって、より強力なIFN-γ産生が誘導された（図25B～25C）。

30

【0184】

実施例22

インビボでの抗CD73#3-1-28-V2-CD137#54二重特異性抗体による腫瘍成長の阻害。

マウスCD73及びマウスCD137と交差反応しない抗CD73#3-1-28-V2-CD137#54 bsAbの抗腫瘍活性を検証するために、ヒト腫瘍細胞（MDA-MB-231）をヒトPBMCと予め混合し、雌SCIDベージュマウスの前方の乳房脂肪体に同所性同種移植して、インビボで抗がん活性を評価した。腫瘍接種から10日後、等モルのmAb（M.W. 150kDa、10mg/kg）及びbsAb（M.W. 195kDa、13mg/kg）を週に2回腹腔内注射した。腫瘍サイズ（mm³）を週に2回測定し、（長さ×幅×幅）／2として計算した。腫瘍阻害率を、腫瘍体積（TGIV）又は腫瘍重量（TGIW）に基づいて以下の方程式によって計算した。TGIV（%）＝ $[1 - (治療群のV_t - V_0) / (対照群のV_t - V_0)] \times 100\%$ 、ここで、V_t：治療後の平均腫瘍体積、V₀：治療前の平均腫瘍体積。TGIW（%）＝ $(対照群の平均腫瘍重量 - 治療群の平均腫瘍重量) / 対照群の平均腫瘍重量 \times 100\%$ 。腫瘍浸潤リンパ球（TIL）の単離のために、解剖された腫瘍を細かく切断し、コラゲナーゼIV（Worthington、カタログ番号LS004188）、ヒアルロニダーゼ（Sigma、カタログ番号H6254）、及びDNase I（Sigma、カタログ番号D50

40

50

25) を含有するRPMI-1640培地で、gentleMACS (Miltenyi Biotec Inc.) により消化し、その後、Lymphoprep (STEMCELL、カタログ番号07811) により密度勾配分離した。単離されたTILを細胞型特異的マーカーで染色し、フローサイトメーターによって分析した。

【0185】

まとめると、これらの結果は、抗CD73 ref mAbによる治療と比較して、10 mg/kgの抗CD73 #3-1-28-v2-CD137 #54 bsAbによって治療すると、腫瘍成長の有意な阻害を示す(図26)。TGI_wによれば、それぞれ、10及び3 mg/kgで、40.9%及び17.5%のより大きな腫瘍阻害が示されたが、TGI_vは、27%及び10%であった。抗腫瘍活性に対応して、抗CD73 #3-1-28-v2-CD137 #54 bsAbは、腫瘍におけるCD8+の拡大を特異的に誘導したが、CD4+、T細胞は減少した(図26A~26E)。

10

【0186】

実施例23

マウスにおける抗CD73-CD137二重特異性

抗体の薬物動態プロファイル

二重特異性抗CD73 #3-1-28-v2-CD137 #54抗体(体重1 kg当たり5 mg)を、静脈内ボラス注射を介してSCIENCEマウスに投与した。末梢血を、注射後0.5、24、72、168、240、336、504、及び672時間で収集した。抗体の血漿濃度をELISAによって決定した。MaxiSorpプレート(Invitrogen)を、CD137-Fc融合タンパク質(AP Biosciences、0.5 µg/mL)でコーティングし、その後、血漿試料を連続希釈し、標準曲線として抗CD73-CD137 #54 bsAbを適用した。結合した抗体を、CD73-Flag-His抗原(AP Biosciences)及びHRPコンジュゲート抗Flag抗体によって、TMB基質を使用して検出した。血漿抗体濃度を内挿法により計算した。PKパラメータを、PK Solverソフトウェアを使用して計算した。抗CD73 #3-1-28-v3は、 $t_{1/2}$ が103時間、AUCが16438 µg/mL*hを有する、更に悪いPKプロファイルを示したが、抗CD73 #3-1-28、#3-1-28-v1、#3-1-28-v2-CD137 #54 bsAbは、同等の $t_{1/2}$ 及びAUCを示した(図27)。

20

30

【0187】

配列

配列番号	名称	配列 (Kabatによって定義されるCDR)
抗p95HER2モノクローナル抗体		
配列番号1	抗p95HER2クローンR4-3重鎖	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSGGVGVGWIRQPPGKALEWLALIIYWD ~~DDDKRYS~~ PSLKSRLTITKDTSKKQVVLTMNMDPVDATYYCAHL ~~DYPENY~~ FDQWGKGLTVTVSS
配列番号2	抗p95HER2クローンR4-3軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYA ~~AASSLQ~~ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQOSYSTPTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号3	抗p95HER2クローンR4-3のCDR-H1	SGGVGVG

40

配列番号 4	抗p95HER2クローンR4-3の CDR-H2	LIYWDDDKRYSPSLKS
配列番号 5	抗p95HER2クローンR4-3の CDR-H3	LDYPENYFDQ
配列番号 6	抗p95HER2クローンR4-3の CDR-L1	RASQSISSYLN
配列番号 7	抗p95HER2クローンR4-3の CDR-L2	AASSLQS
配列番号 8	抗p95HER2クローンR4-3の CDR-L3	QQSYSTPT
配列番号 9	抗p95HER2クローンR4-5 重鎖	QITLKESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE WLAL <u>LIYWDDDKRYSPSLKS</u> RLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDAT YYCAHSRLPYNSHGYWGQGTTVTVSS
配列番号 10	抗p95HER2クローンR4-5 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC <u>QASQAIGNYLS</u> WYQQKPGRAPKLLI Y <u>AAS</u> TLHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSLQPDFFATYYC <u>QQSYSPV</u> <u>Y</u> TFGLGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 11	抗p95HER2クローンR4-5の CDR-H1	TSGVGVG
配列番号 12	抗p95HER2クローンR4-5の CDR-H2	LIYWDDDKRYSPSLKS
配列番号 13	抗p95HER2クローンR4-5の CDR-H3	SRLPYNSHGY
配列番号 14	抗p95HER2クローンR4-5の CDR-L1	QASQAIGNYLS
配列番号 15	抗p95HER2クローンR4-5の CDR-L2	AASTLHS
配列番号 16	抗p95HER2クローンR4-5の CDR-L3	QQSYSPVPT
配列番号 17	抗p95HER2クローンR4-11 重鎖	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALE WLAL <u>LIYWDDDKRYSPSLKS</u> RLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDAT YYCAH <u>AHPFSGSYNF</u> WGQGTTLTVTVSS
配列番号 18	抗p95HER2クローンR4-11 軽鎖	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC <u>KSSQSVLFSSNNKDYL</u> AWYQORPG QPPKLLIH <u>WASTREP</u> GVDPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC <u>L</u> <u>QSYSNPPT</u> FGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLNN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKAD YEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 19	抗p95HER2クローンR4-11の CDR-H1	TSGVGVG
配列番号 20	抗p95HER2クローンR4-11の CDR-H2	LIYWDDDKRYSPSLKS
配列番号 21	抗p95HER2クローンR4-11の CDR-H3	AHPFSGSYNF
配列番号 22	抗p95HER2クローンR4-11の CDR-L1	KSSQSVLFSSNNKDYLA
配列番号 23	抗p95HER2クローンR4-11の CDR-L2	WASTREP
配列番号 24	抗p95HER2クローンR4-11の CDR-L3	LQSYSNPPT

10

20

30

40

50

配列番号 25	抗p95HER2クローンR4-15 重鎖	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSSGGVGVGWIRQPPGKALE WLA LIYWDDDKRYSPSLKS RSLTITKDTSKKQVVLMTNMDPVDAT YYCAH LDYPENYFDQ WGQGLVTVSS
配列番号 26	抗p95HER2クローンR4-15 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTFTC RASQISISTYLN WYQQKPGKAPKLLI Y AASTLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLAISSLQPEDFATYFC QQSYSFPTF GQGTRLEIKRTMAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 27	抗p95HER2クローンR4-15の CDR-H1	SGGVGVG
配列番号 28	抗p95HER2クローンR4-15の CDR-H2	LIYWDDDKRYSPSLKS
配列番号 29	抗p95HER2クローンR4-15の CDR-H3	LDYPENYFDQ
配列番号 30	抗p95HER2クローンR4-15の CDR-L1	RASQISISTYLN
配列番号 31	抗p95HER2クローンR4-15の CDR-L2	AASTLQS
配列番号 32	抗p95HER2クローンR4-15の CDR-L3	QQSYSFPT
配列番号 33	抗p95HER2クローンR4-38 重鎖	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSL STSGVGVG WIRQHPGKALE WLA LIYWDDDKRYSPSLKS RSLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDAT YYCAH STVDVHYFDY WGQGLVTVSS
配列番号 34	抗p95HER2クローンR4-38 軽鎖	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC RASQISSYLN WYQQKPGKAPKLLI Y AASSLQ SGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC QQSYSTPTF GQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
配列番号 35	抗p95HER2クローンR4-38の CDR-H1	TSGVGVG
配列番号 36	抗p95HER2クローンR4-38の CDR-H2	LIYWDDDKRYSPSLKS
配列番号 37	抗p95HER2クローンR4-38の CDR-H3	STVDVHYFDY
配列番号 38	抗p95HER2クローンR4-38の CDR-L1	RASQISSYLN
配列番号 39	抗p95HER2クローンR4-38の CDR-L2	AASSLQS
配列番号 40	抗p95HER2クローンR4-38の CDR-L3	QQSYSTPT
配列番号 41	重鎖中の定常ドメイン (IgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 42	重鎖e5中の定常ドメイン (hIgG1e5)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP D VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALP LPE EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 43	SP1	METDTLLLWVLLLWVPGSTG
配列番号 44	GS リンカー	GGGGS
配列番号 45	(G4S)4 リンカー	GGGSGGGSGGGSGGGGS
抗p95HER2-CD137二重特異性抗体		

10

20

30

40

配列番号 46	抗 p95HER2#4-11- CD137#54 bsAb 重鎖	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEW LALIYWDDDKRYSPLKSRITITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYY CAHAHPFSGSYNFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGS TVKVSCKASGCTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGLIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPPYDSSGYYPGLA FDIWGQGTMTVTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGSSYELTQPPSVSV SPGQTASITCSGDKLGEKYASWYQQKAGQSPILVIYQDSKRPSGIPERF SGSNSGNTATLTISGLQAGDEADYYCQAWDGSSTYVFGTGKVTVLG
配列番号 47	抗 p95HER2#4-11- CD137#54 bsAb 重鎖 (hlgG1e5)	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGVGVGWIRQPPGKALEW LALIYWDDDKRYSPLKSRITITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATATYY CAHAHPFSGSYNFWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTP SSSLGTQTYICNVNHHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG P <u>D</u> VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALP <u>L</u> P <u>E</u> KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGSGVQLVQSGAEVKKPGS TVKVSCKASGCTFSSYAISWVRQAPGQGLEWMGRIIPILGLIANYAQKF QGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCASPPYDSSGYYPGLA FDIWGQGTMTVTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGSSYELTQPPSVSV SPGQTASITCSGDKLGEKYASWYQQKAGQSPILVIYQDSKRPSGIPERF SGSNSGNTATLTISGLQAGDEADYYCQAWDGSSTYVFGTGKVTVLG
配列番号 48	CD137#54-scFv	QVQLVQSGAEVKKPGSTVKVSCKASGCTFSSYAISWVRQAPGQGLE WMGRIIPILGLIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVY YCASPPYDSSGYYPGLAFDIWGQGTMTVTVSSAGGGGSGGGGSGGG GSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGEKYASWYQQKAG QSPILVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGLQAGDEADYYCQA WDGSSTYVFGTGKVTVLG
抗CD73モノクローナル抗体		
配列番号 49	抗CD73クローンCR3-4重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFT <u>GYMH</u> WVRQAPGQGL EWMG <u>WINPNSGGTNYAQEFQGR</u> VTMTTRDTSISTAYMELSLRSDDT AVYYCARESMVRGVSGAFDIWGQGTMTVTVSSA
配列番号 50	抗CD73クローンCR3-4軽鎖	QSALTQPASVSGSPGQSITISCT <u>TGTSSDVGSYNLVS</u> WYQQHPGKAPKL MIY <u>EGSKRPS</u> GVSNRFGSGKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC <u>CSYAG</u> <u>SSGWD</u> IGTGTGKVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDF YPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKNYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 51	抗CD73クローンCR3-4の CDR-H1	GYMH
配列番号 52	抗CD73クローンCR3-4の CDR-H2	WINPNSGGTNYAQEFQG
配列番号 53	抗CD73クローンCR3-4の CDR-H3	ESMVRGVSGAFDI
配列番号 54	抗CD73クローンCR3-4の CDR-L1	TGTSSDVGSYNLVS
配列番号 55	抗CD73クローンCR3-4の CDR-L2	EGSKRPS
配列番号 56	抗CD73クローンCR3-4の CDR-L3	CSYAGSSGWD
配列番号 57	抗CD73クローンCR3-16 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT <u>DFYIH</u> WVRQAPGQGLE WMG <u>WINPNSGNTNYPOKFOGR</u> VTMTTRDTSISTAYMDLSSLTSDDTA VYLCVR <u>GRWFDFDY</u> WGQGTMTVTVSSA

10

20

30

40

50

配列番号 58	抗CD73クローンCR3-16 軽鎖	QSALTQPPSVSGSPQSITISCTGTSSDVGTYNFVSWYQQHPGKVPKL IIYDVSNRPSGVSRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADYYC SSFRSGST YV FGTGTRVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC
配列番号 59	抗CD73クローンCR3-16の CDR-H1	DFYIH
配列番号 60	抗CD73クローンCR3-16の CDR-H2	WINPYSGSTNYPQKFQG
配列番号 61	抗CD73クローンCR3-16の CDR-H3	GRWFDFDY
配列番号 62	抗CD73クローンCR3-16の CDR-L1	TGTSSDVGTYNFVS
配列番号 63	抗CD73クローンCR3-16の CDR-L2	DVSNRPS
配列番号 64	抗CD73クローンCR3-16の CDR-L3	SSFRSGSTYV
配列番号 65	抗CD73クローンCR3-1-28 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFSS SYAIS WVRQAPGQGLE WMGRIIPILG IANYAOKFOG RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAV YYCAR DSPVHHYSGSYRDAFDI WGQGTMTVSS
配列番号 66	抗CD73クローンCR3-1-28 軽鎖	QSVLTQPPSASGTPGQRVIIIS SGSSNIGSNSVY WYQQLPGTAPKLLI Y SNNORPS GVPRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC AAWDDSL RGPV FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSH HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 67	抗CD73クローンCR3-1-28の CDR-H1	SYAIS
配列番号 68	抗CD73クローンCR3-1-28の CDR-H2	RIIPILGIANYAQKFQG
配列番号 69	抗CD73クローンCR3-1-28の CDR-H3	DSPVHHYSGSYRDAFDI
配列番号 70	抗CD73クローンCR3-1-28の CDR-L1	SGSSNIGSNSVY
配列番号 71	抗CD73クローンCR3-1-28の CDR-L2	SNNQRPS
配列番号 72	抗CD73クローンCR3-1-28の CDR-L3	AAWDDSLRGPV
配列番号 73	抗CD73クローンCR3-1-37 重鎖	QVQLVQSGAEVKRPGSSVKVSCASGGTFSS SYAIS WVRQAPGQGLE WMG GIPIFGTANYAOKFOG RVITITADESTSTAYMELSSLRSEDYAV YYCAR GVSYYYGMHV WGQGTMTVSS
配列番号 74	抗CD73クローンCR3-1-37 軽鎖	SYVLTQPPSVSVTPGKTARIAC GGNNLESKIV SWYQQKPGQAPVLVIF YDTRPS GISERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYC QVWDSNSD HVIF FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPG AVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSH RSYSCQVTHEGSTVEKTVAPAEC
配列番号 75	抗CD73クローンCR3-1-37の CDR-H1	SYAIS
配列番号 76	抗CD73クローンCR3-1-37の CDR-H2	GIPIFGTANYAOKKFQG
配列番号 77	抗CD73クローンCR3-1-37の CDR-H3	GVSYYYGMHV

10

20

30

40

50

配列番号 78	抗CD73クローンCR3-1-37の CDR-L1	GGNNLESKIVS
配列番号 79	抗CD73クローンCR3-1-37の CDR-L2	YDTRPS
配列番号 80	抗CD73クローンCR3-1-37の CDR-L3	QVWDSNSDHVI
配列番号 81	抗CD73クローンCR3-1- 28-v1軽鎖	QSVLTQPPSASGTPGQQRVHISC <u>SGSSSNIGSN</u> SVYWYQQLPGTAPKLLI Y <u>ANNE</u> <u>RPS</u> GVPGRFSGSGKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC <u>AAWDDSL</u> <u>RGPV</u> FGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
配列番号 82	抗CD73クローンCR3-1- 28-v1のCDR-L2	ANNEERPS
配列番号 83	抗CD73クローンCR3-1- 28-v2重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY <u>AI</u> SWVRQAPGGGLE WMGR <u>RIIPIL</u> GIANYA <u>OKFOG</u> RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDAV YYCARD <u>SPVHYHYGDGHYYRDAFDI</u> WGQGTMTVTVSS
配列番号 84	抗CD73クローンCR3-1- 28-v2のCDR-H3	DSPVHYHYGDGHYYRDAFDI
配列番号 85	抗CD73クローンCR3-1- 28-v3重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY <u>AI</u> SWVRQAPGGGLE WMGR <u>RIIPIL</u> GIANYA <u>OKFOG</u> RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDAV YYCARD <u>SPVHYHYGDGHYYRDAFDI</u> WGQGTMTVTVSS
配列番号 86	抗CD73クローンCR3-1- 28-v3のCDR-H3	DSPVHYHYGDGHYYRDAFDI
配列番号 87	重鎖中の定常ドメイン (操作されたIgG1)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT LHQDWLNGKEYKCAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
配列番号 43	SP1	METDTLLLWVLLLVWPGSTG
配列番号 44	GS リンカー	GGGGS
配列番号 160	(G4S)2 リンカー	GGGGSGGGGS
抗CD73-CD137 二重特異性抗体		
配列番号 88	抗 CD73#CR3-1-28- CD137#54 bsAb 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY <u>AI</u> SWVRQAPGGGLE WMGR <u>RIIPIL</u> GIANYA <u>OKFOG</u> RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVY YCARDSPVHYHYGSGSYRDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSG LYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQQDWLNGKEYK CAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGSGVQLVQ SGAEVKKPGSTVKVSCKASGGTFSSY <u>AI</u> SWVRQAPGGGLEWMGR <u>RIIP</u> LGIANYA <u>OKFOG</u> RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVYYCASPPYY DSSGYYPGAFDIWGQGTMTVTVSSAGGGGGGGGGGGGGGGGGGGSS YELTQPPSVSVPGQTASITCSGDKLGEKYASWYQQKAGQSPILVIYQ DSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGLQAGDEADYYCQAWDGSSTYV FGTGTKVTVLG
配列番号 89	抗 CD73 #CR3-1-28- v2-CD137#54 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFSSY <u>AI</u> SWVRQAPGGGLE WMGR <u>RIIPIL</u> GIANYA <u>OKFOG</u> RVITITADKSTSTAYMELSSLRSEDAVY YCARDSPVHYHYGDGHYYRDAFDIWGQGTMTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQQDWLNGKEYK CAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGGGGGGGGSGVQLV QSGAEVKKPGSTVKVSCKASGGTFSSY <u>AI</u> SWVRQAPGGGLEWMGR <u>RIIP</u>

10

20

30

40

50

		PILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYVYYCASPP YYDSSGYYPPLGAFDIWGQGTMTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGG SSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGEKYASWYQQKAGQSPILVIY QDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGLQAGDEADYYCQAWDGSSTY VFGTGKVTVLG
配列番号 90	抗 CD73 #CR3-1-28- v3-CD137#54 重鎖	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLE WMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYVY YCARDSPVHYGDTYRDSFDIWGQGTMTVSSASTKGPSVFPLAP SSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSG LYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTC PPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CAVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGVQLVQ SGAEVKKPGSTVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLEWMGRIPI LGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYVYYCASPPYY DSSGYYPPLGAFDIWGQGTMTVSSAGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSS YELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGEKYASWYQQKAGQSPILVIY QDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGLQAGDEADYYCQAWDGSSTYV FGTGKVTVLG
配列番号 91	CD137#54-scFv	QVQLVQSGAEVKKPGSTVKVSKASGGTFSSYAISWVRQAPGGGLE WMGRIIPILGIANYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYVY YCASPPYYDSSGYYPPLGAFDIWGQGTMTVSSAGGGGSGGGGSGGGG GSGGGGSSYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDKLGEKYASWYQQKAG QSPILVIYQDSKRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISGLQAGDEADYYCQA WDGSSTYVFGTGKVTVLG

10

20

30

40

50

【 0 1 8 8 】

参考文献

Allard, B., Allard, D., Buisseret, L., and Stagg, J. (2020). The adenosine pathway in immuno-oncology. *Nat Rev Clin Oncol* 17, 611-629.

Allard, B., Pommey, S., Smyth, M.J., and Stagg, J. (2013). Targeting CD73 enhances the antitumor activity of anti-PD-1 and anti-CTLA-4 mAbs. *Clin Cancer Res* 19, 5626-5635.

Anido, J., Scaltriti, M., Bech Serra, J.J., Santiago Josef, B., Todo, F.R., Baselga, J., and Arribas, J. (2006). Biosynthesis of tumorigenic HER2 C-terminal fragments by alternative initiation of translation. *Embo j* 25, 3234-3244.

Bacac, M., Colombetti, S., Herter, S., Sam, J., Perro, M., Chen, S., Bianchi, R., Richard, M., Schoenle, A., Nicolini, V., et al. (2018). CD20-TCB with Obinutuzumab Pretreatment as Next-Generation Treatment of Hematologic Malignancies. *Clin Cancer Res* 24, 4785-4797.

Baselga, J., Carbonell, X., Castañeda-Soto, N.J., Clemens, M., Green, M., Harvey, V., Morales, S., Barton, C., and Ghahramani, P. (2005). Phase II study of efficacy, safety, and pharmacokinetics of trastuzumab monotherapy administered on a 3-weekly schedule. *J Clin Oncol* 23, 2162-2171.

Baselga, J., Tripathy, D., Mendelsohn, J., Baughman, S., Benz, C.C., Dantis, L., Sklarin, N.T., Seidman, A.D., Hudis, C.A., Moore, J., et al. (1996). Phase II study of weekly intravenous recombinant humanized anti-p185HER2 monoclonal antibody in patients with HER2/neu-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 14, 737-744.

Burgess, A.W., Cho, H.S., Eigenbrot, C., Ferguson, K.M., Garrett, T.P., Leahy, D.J., Lemmon, M.A., Sliwkowski, M.X., Ward, C.W., and Yokoyama, S. (2003). An open-and-shut case? Recent insights into the activation of EGF/ErbB receptors. *Mol Cell* 12, 541-552.

Carter, P., Presta, L., Gorman, C.M., Ridgway, J.B., Henner, D., Wong, W.L., Rowland, A.M., Kotts, C., Carver, M.E., and Shepard, H.M. (1992). Humanization of an anti-p185HER2 antibody for human cancer therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4285-4289.

Chen, S., Fan, J., Zhang, M., Qin, L., Dominguez, D., Long, A., Wang, G., Ma, R., Li, H., Zhang, Y., et al. (2019). CD73 expression on effector T cells sustained by TGF-beta facilitates tumor resistance to anti-4-1BB/CD137 therapy. *Nat Commun* 10, 150.

Christianson, T.A., Doherty, J.K., Lin, Y.J., Ramsey, E.E., Holmes, R., Keenan, E.J., and Clinton, G.M. (1998). NH2-terminally truncated HER-2/neu protein: relationship with shedding of the extracellular domain and with prognostic factors in breast cancer. *Cancer Res* 58, 5123-5129.

10

Cobleigh, M.A., Vogel, C.L., Tripathy, D., Robert, N.J., Scholl, S., Fehrenbacher, L., Wolter, J.M., Paton, V., Shak, S., Lieberman, G., et al. (1999). Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17, 2639-2648.

Codony-Servat, J., Albanell, J., Lopez-Talavera, J.C., Arribas, J., and Baselga, J. (1999). Cleavage of the HER2 ectodomain is a pervanadate-activable process that is inhibited by the tissue inhibitor of metalloproteases-1 in breast cancer cells. *Cancer Res* 59, 1196-1201.

Forte, G., Sorrentino, R., Montinaro, A., Luciano, A., Adcock, I.M., Maiolino, P., Arra, C., Cicala, C., Pinto, A., and Morello, S. (2012). Inhibition of CD73 improves B cell-mediated anti-tumor immunity in a mouse model of melanoma. *J Immunol* 189, 2226-2233.

20

Ho M, Kreitman RJ, Onda M, Pastan I. (2005) In vitro antibody evolution targeting germline hot spots to increase activity of an anti-CD22 immunotoxin. *J Biol Chem* 280, 607

Hudziak, R.M., Lewis, G.D., Winget, M., Fendly, B.M., Shepard, H.M., and Ullrich, A. (1989). p185HER2 monoclonal antibody has antiproliferative effects in vitro and sensitizes human breast tumor cells to tumor necrosis factor. *Mol Cell Biol* 9, 1165-1172.

Hynes, N.E., and Lane, H.A. (2005). ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 5, 341-354.

Jiang, T., Xu, X., Qiao, M., Li, X., Zhao, C., Zhou, F., Gao, G., Wu, F., Chen, X., Su, C., et al. (2018). Comprehensive evaluation of NT5E/CD73 expression and its prognostic significance in distinct types of cancers. *BMC Cancer* 18, 267.

30

Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., Mascarenhas, D., and Pollak, M. (2001). Insulin-like growth factor-I receptor signaling and resistance to trastuzumab (Herceptin). *J Natl Cancer Inst* 93, 1852-1857.

Marty, M., Cignetti, F., Maraninchi, D., Snyder, R., Mauriac, L., Tubiana-Hulin, M., Chan, S., Grimes, D., Antón, A., Lluch, A., et al. (2005). Randomized phase II trial of the efficacy and safety of trastuzumab combined with docetaxel in patients with human epidermal growth factor receptor 2-positive metastatic breast cancer administered as first-line treatment: the M77001 study group. *J Clin Oncol* 23, 4265-4274.

Molina, M.A., Sáez, R., Ramsey, E.E., Garcia-Barchino, M.J., Rojo, F., Evans, A.J., Albanell, J., Keenan, E.J., Lluch, A., García-Conde, J., et al. (2002). NH(2)-terminal truncated

40

HER-2 protein but not full-length receptor is associated with nodal metastasis in human breast cancer. *Clin Cancer Res* 8, 347-353.

Nagata, Y., Lan, K.H., Zhou, X., Tan, M., Esteva, F.J., Sahin, A.A., Klos, K.S., Li, P., Monia, B.P., Nguyen, N.T., et al. (2004). PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell* 6, 117-127.

Neuberger MS, Milstein C. (1995) Somatic hypermutation. *Curr Opin Immunol* 7, 248

Ohta, A., Kini, R., Ohta, A., Subramanian, M., Madasu, M., and Sitkovsky, M. (2012). The development and immunosuppressive functions of CD4(+) CD25(+) FoxP3(+) regulatory T cells are under influence of the adenosine-A2A adenosine receptor pathway. *Front Immunol* 3, 190.

Press, M.F., Cordon-Cardo, C., and Slamon, D.J. (1990). Expression of the HER-2/neu proto-oncogene in normal human adult and fetal tissues. *Oncogene* 5, 953-962.

Qi, X., Li, F., Wu, Y., Cheng, C., Han, P., Wang, J., and Yang, X. (2019). Optimization of 4-1BB antibody for cancer immunotherapy by balancing agonistic strength with FcγR affinity. *Nat Commun* 10, 2141.

Rius Ruiz, I., Vicario, R., Morancho, B., Morales, C.B., Arenas, E.J., Herter, S., Freimoser-Grundschober, A., Somandin, J., Sam, J., Ast, O., et al. (2018). p95HER2-T cell bispecific antibody for breast cancer treatment. *Sci Transl Med* 10.

Román, M., Rius-Ruiz, I., Grinyó-Escuer, A., Duro-Sánchez, S., Escorihuela, M., Moessner, E., Klein, C., and Arribas, J. (2022). Humanized CAR T cells targeting p95HER2. *bioRxiv*, 2022.2005.2020.492812.

Slamon, D.J., Clark, G.M., Wong, S.G., Levin, W.J., Ullrich, A., and McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235, 177-182.

Slamon, D.J., Leyland-Jones, B., Shak, S., Fuchs, H., Paton, V., Bajamonde, A., Fleming, T., Eiermann, W., Wolter, J., Pegram, M., et al. (2001). Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344, 783-792.

Stagg, J., Beavis, P.A., Divisekera, U., Liu, M.C., Moller, A., Darcy, P.K., and Smyth, M.J. (2012). CD73-deficient mice are resistant to carcinogenesis. *Cancer Res* 72, 2190-2196.

Stagg, J., Divisekera, U., Duret, H., Sparwasser, T., Teng, M.W., Darcy, P.K., and Smyth, M.J. (2011). CD73-deficient mice have increased antitumor immunity and are resistant to experimental metastasis. *Cancer Res* 71, 2892-2900.

Stagg, J., Divisekera, U., McLaughlin, N., Sharkey, J., Pommey, S., Denoyer, D., Dwyer, K.M., and Smyth, M.J. (2010). Anti-CD73 antibody therapy inhibits breast tumor growth and metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 1547-1552.

Tolcher, A.W., Sznol, M., Hu-Lieskovan, S., Papadopoulos, K.P., Patnaik, A., Rasco, D.W., Di Gravio, D., Huang, B., Gambhire, D., Chen, Y., et al. (2017). Phase Ib Study of Utomilumab (PF-05082566), a 4-1BB/CD137 Agonist, in Combination with Pembrolizumab (MK-3475) in Patients with Advanced Solid Tumors. *Clin Cancer Res* 23, 5349-5357.

10

20

30

40

50

Turiello, R., Capone, M., Giannarelli, D., Morretta, E., Monti, M.C., Madonna, G., Mallardo, D., Festino, L., Azzaro, R., Levesque, M.P., et al. (2020). Serum CD73 is a prognostic factor in patients with metastatic melanoma and is associated with response to anti-PD-1 therapy. *J Immunother Cancer* 8.

Vijayan, D., Young, A., Teng, M.W.L., and Smyth, M.J. (2017). Targeting immunosuppressive adenosine in cancer. *Nat Rev Cancer* 17, 709-724.

Vogel, C.L., Cobleigh, M.A., Tripathy, D., Gutheil, J.C., Harris, L.N., Fehrenbacher, L., Slamon, D.J., Murphy, M., Novotny, W.F., Burchmore, M., et al. (2002). Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20, 719-726.

10

Yakes, F.M., Chinratanalab, W., Ritter, C.A., King, W., Seelig, S., and Arteaga, C.L. (2002). Herceptin-induced inhibition of phosphatidylinositol-3 kinase and Akt is required for antibody-mediated effects on p27, cyclin D1, and antitumor action. *Cancer Res* 62, 4132-4141.

Yarden, Y., Baselga, J., and Miles, D. (2004). Molecular approach to breast cancer treatment. *Semin Oncol* 31, 6-13.

Young, A., Ngiow, S.F., Gao, Y., Patch, A.M., Barkauskas, D.S., Messaoudene, M., Lin, G., Coudert, J.D., Stannard, K.A., Zitvogel, L., et al. (2018). A2AR Adenosine Signaling Suppresses Natural Killer Cell Maturation in the Tumor Microenvironment. *Cancer Res* 78, 1003-1016.

20

Zhang, Y., Huo, M., Zhou, J., and Xie, S. (2010). PKSolver: An add-in program for pharmacokinetic and pharmacodynamic data analysis in Microsoft Excel. *Comput Methods Programs Biomed* 99, 306-314.

【 0 1 8 9 】

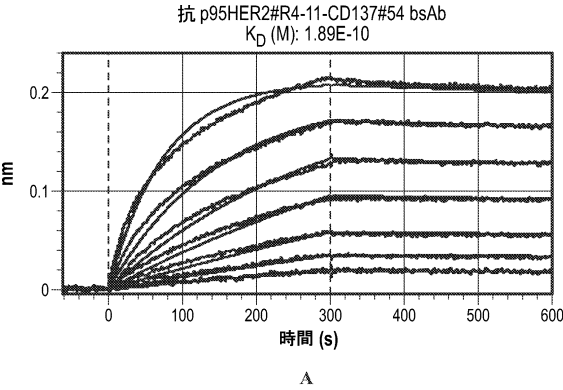
本発明は、上記の実施例を参照して記載されているが、修正及び変形は、本発明の趣旨及び範囲内に包含されることを理解されたい。したがって、本発明は、以下の特許請求の範囲によってのみ限定される。

30

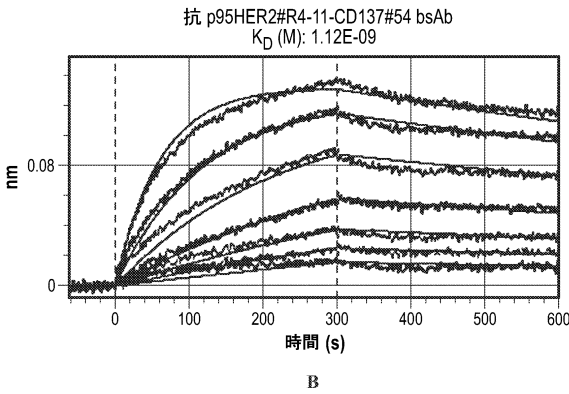
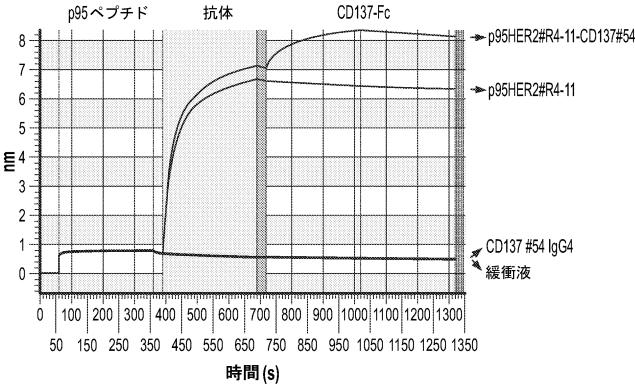
40

50

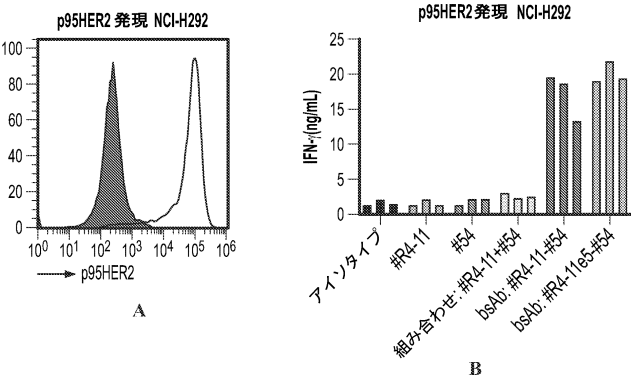
【図 7】



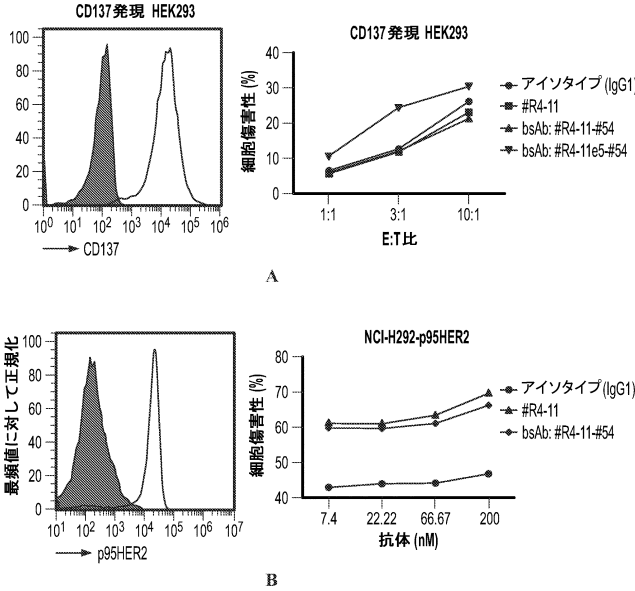
【図 8】



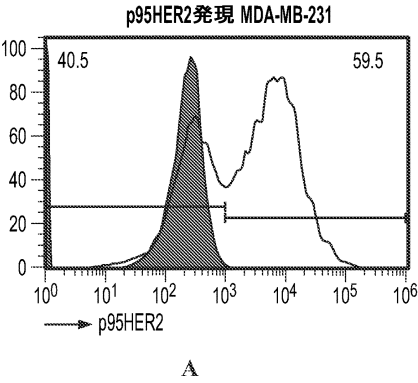
【図 9】



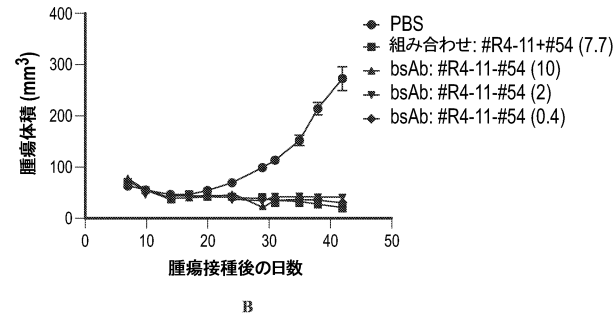
【図 10】



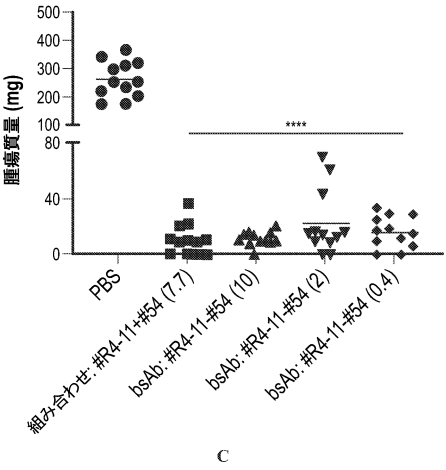
【図 1 1 - 1】



【図 1 1 - 2】

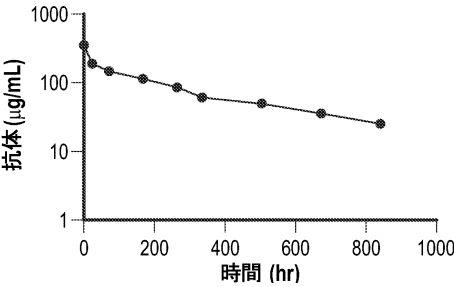


10

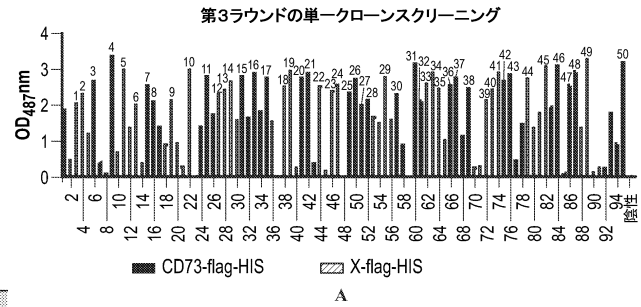


20

【図 1 2】



【図 1 3 - 1】



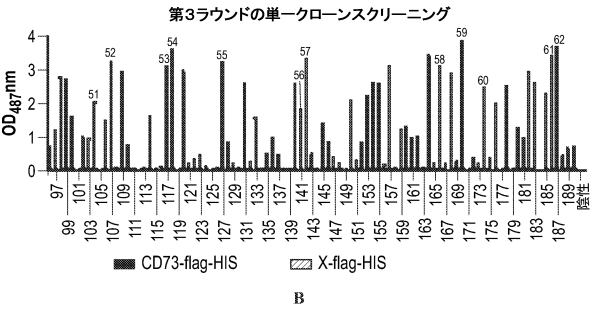
30

パラメータ	単位	#R4-11-#54
ラムダ _z	1/h	0.002061747
t _{1/2}	h	336.194049
T _{max}	h	0.5
C _{max}	μg/ml	354.88
C ₀	μg/ml	359.5411154
C _{last_obs} /C _{max}		0.070446348
AUC 0-t	μg/ml*h	63896.23778
AUC 0-inf_obs	μg/ml*h	76021.87496
AUC 0-t/0-inf_obs		0.840498052
AUMC 0-inf_obs	μg/ml*h ²	33233919.58
MRT 0-inf_obs	h	437.1625876
V _{z_obs}	(mg/kg)/(μg/ml)	5.263564299
Cl_obs	(mg/kg)/(μg/ml)/h	0.01085214
V _{ss_obs}	(mg/kg)/(μg/ml)	4.744149431

40

50

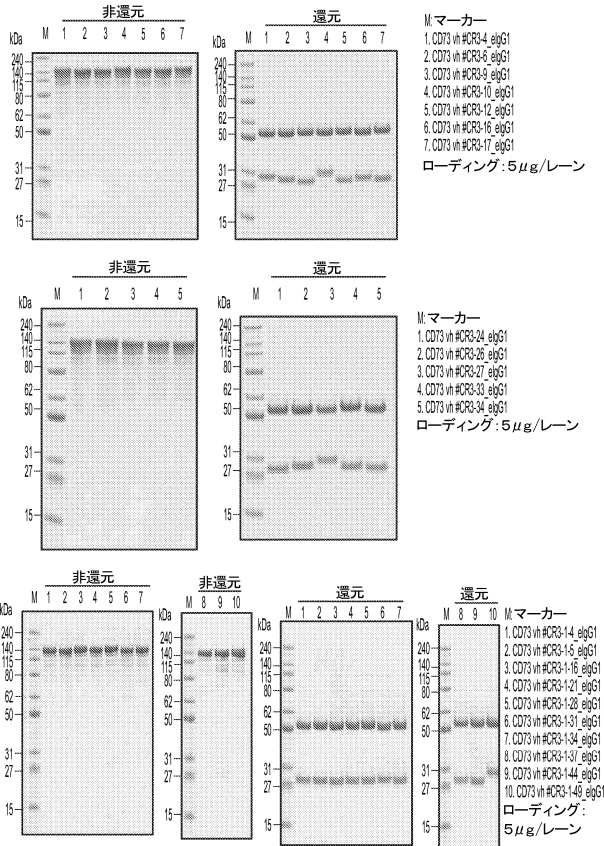
【図 13-2】



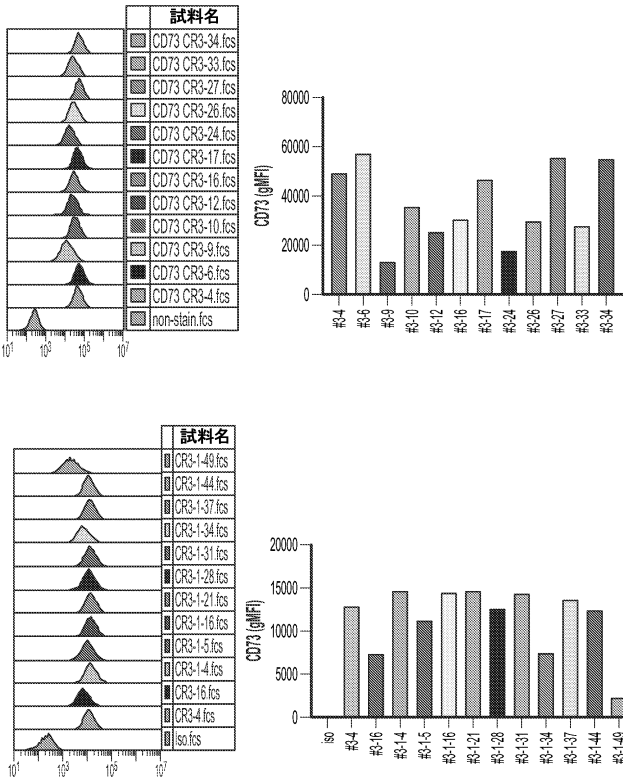
番号	クローン名	番号	クローン名	番号	クローン名	番号	クローン名
1	CR3-1-1	16	CR3-1-16	31	CR3-1-31	46	CR3-1-46
2	CR3-1-2	17	CR3-1-17	32	CR3-1-32	47	CR3-1-47
3	CR3-1-3	18	CR3-1-18	33	CR3-1-33	48	CR3-1-48
4	CR3-1-4	19	CR3-1-19	34	CR3-1-34	49	CR3-1-49
5	CR3-1-5	20	CR3-1-20	35	CR3-1-35	50	CR3-1-50
6	CR3-1-6	21	CR3-1-21	36	CR3-1-36	51	CR3-4
7	CR3-1-7	22	CR3-1-22	37	CR3-1-37	52	CR3-6
8	CR3-1-8	23	CR3-1-23	38	CR3-1-38	53	CR3-9
9	CR3-1-9	24	CR3-1-24	39	CR3-1-39	54	CR3-10
10	CR3-1-10	25	CR3-1-25	40	CR3-1-40	55	CR3-12
11	CR3-1-11	26	CR3-1-26	41	CR3-1-41	56	CR3-16
12	CR3-1-12	27	CR3-1-27	42	CR3-1-42	57	CR3-17
13	CR3-1-13	28	CR3-1-28	43	CR3-1-43	58	CR3-24
14	CR3-1-14	29	CR3-1-29	44	CR3-1-44	59	CR3-26
15	CR3-1-15	30	CR3-1-30	45	CR3-1-45	60	CR3-27
						61	CR3-33
						62	CR3-34

C

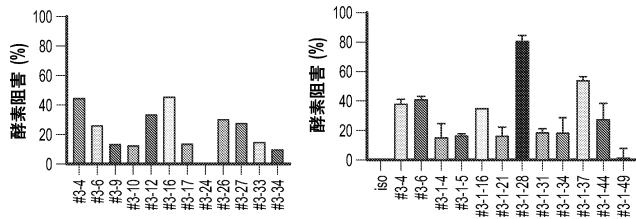
【図 14】



【図 15】



【図 16】



10

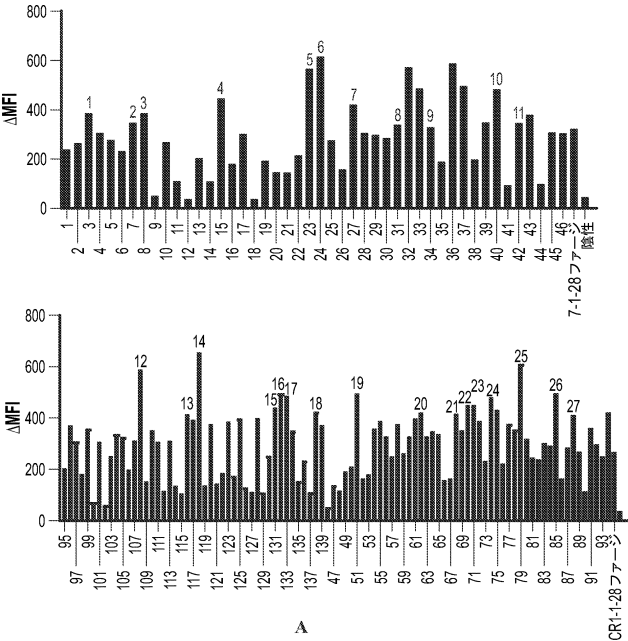
20

30

40

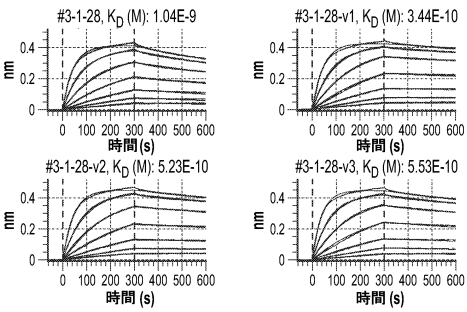
50

【図 17-1】

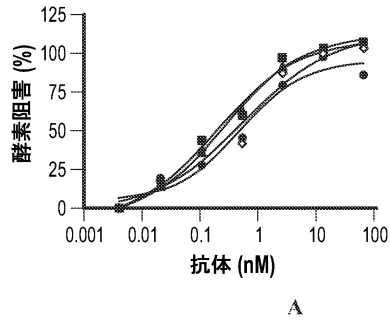


【図 17-2】

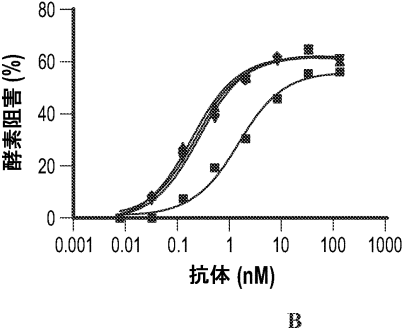
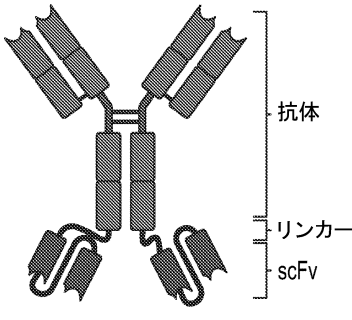
番号	クローン名	抗体 (nM)		
		0.37	3.33	30
第1のバッチ	#3-1-28	2.009	3.464	3.811
	1919-001	1.067	2.081	3.086
	2	3.034	3.816	3.961
	3	3.598	3.956	4.000
	4	3.101	3.852	4.000
	1919-005	1.141	2.286	3.342
	6	1.796	3.000	3.760
	7	1.366	2.417	3.276
	8	0.928	1.616	2.433
	9	2.535	3.729	3.945
	1919-010	1.972	3.264	3.912
第2のバッチ	#3-1-28	1.558	3.063	3.790
	1911-020	0.684	1.624	2.952
	14	0.312	0.520	1.347
	16	1.311	2.635	3.622
	17	2.469	3.508	3.877
	20	1.840	3.191	3.815
	21	2.065	3.103	3.772
	23	2.721	3.770	4.000
	24	2.146	3.341	3.917
	26	2.534	3.769	3.880
	27	2.289	3.712	3.873
第3のバッチ	#3-1-28	2.343	3.734	3.934
	1911-019	2.755	3.788	3.891
	15	3.393	3.947	3.962
	18	1.856	3.271	3.878
	19	2.291	3.740	3.909
	22			
	1911-029			
	25	2.849	3.801	3.973



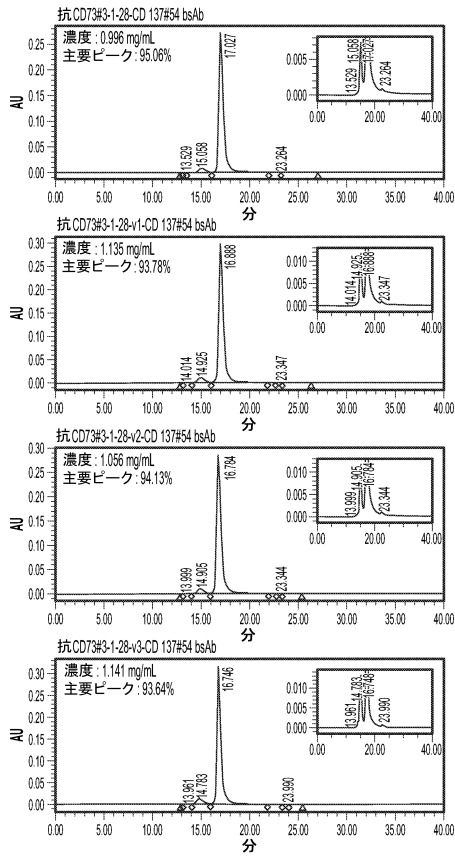
【図 18】



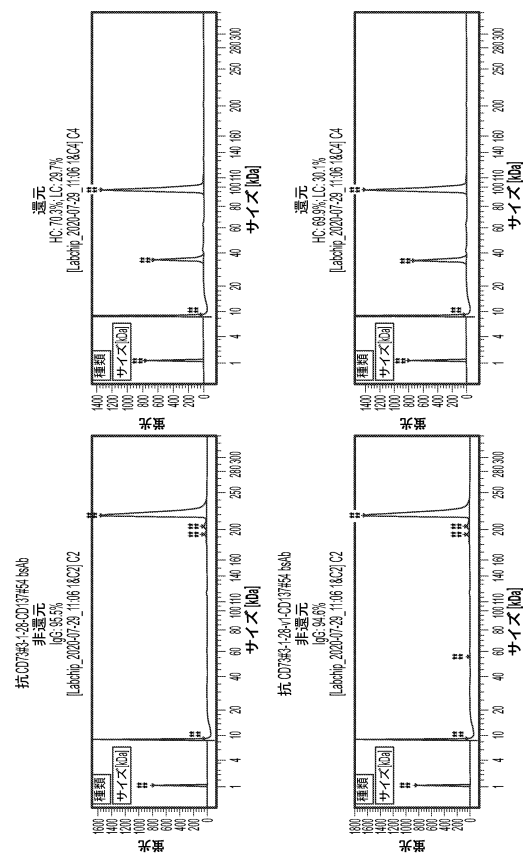
【図 19】



【図 20 A】



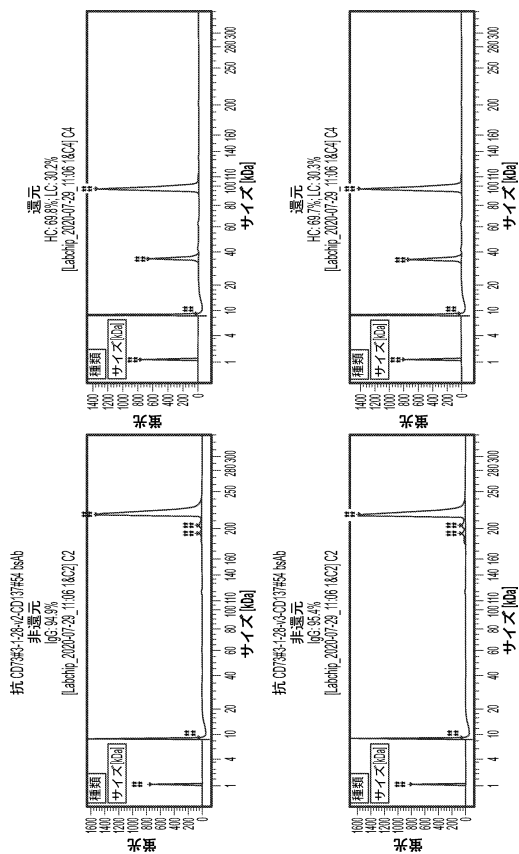
【図 20 B - 1】



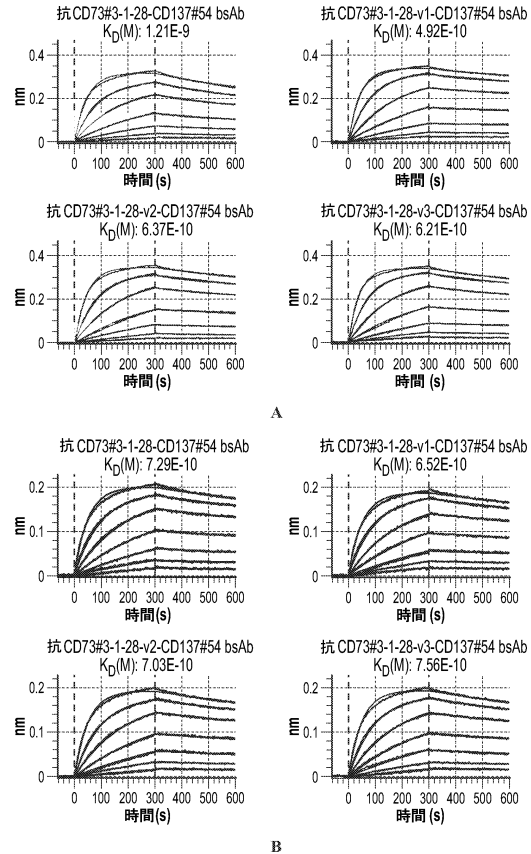
10

20

【図 20 B - 2】



【図 21】

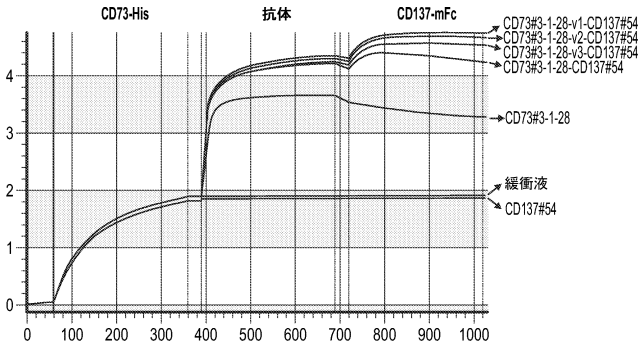


30

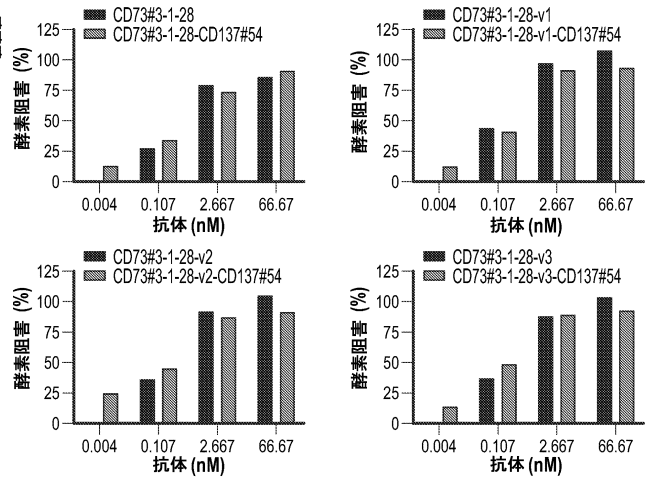
40

50

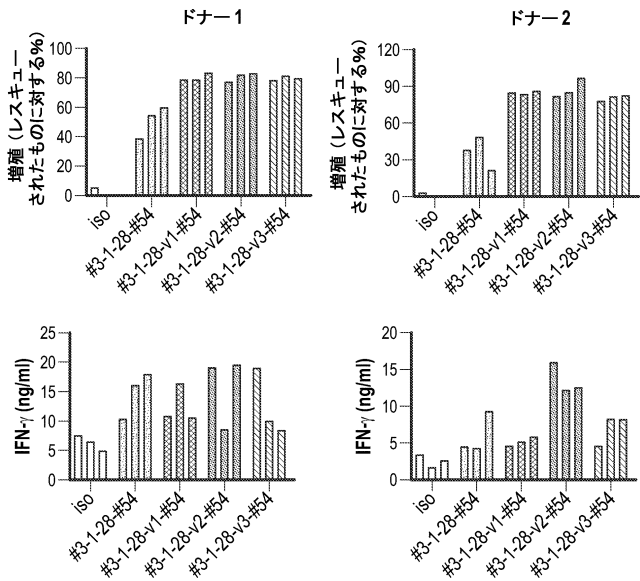
【図 2 2】



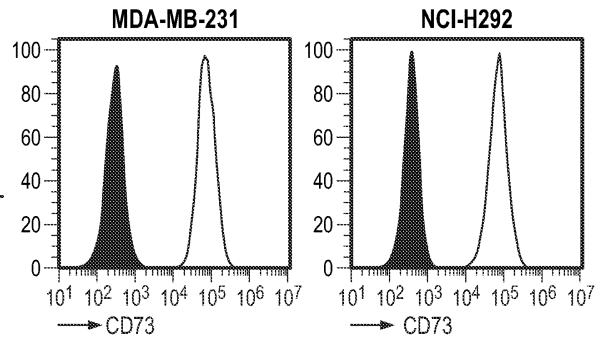
【図 2 3】



【図 2 4】



【図 2 5 - 1】



A

10

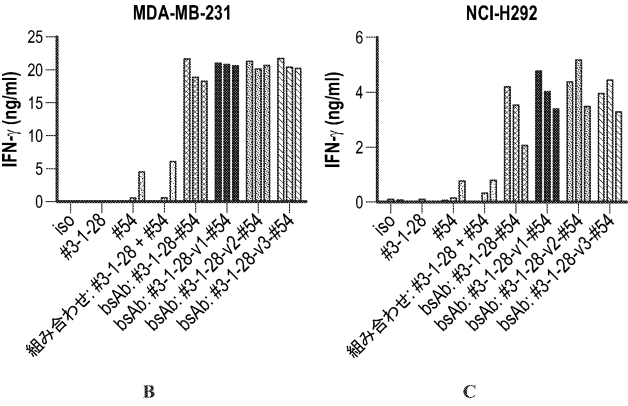
20

30

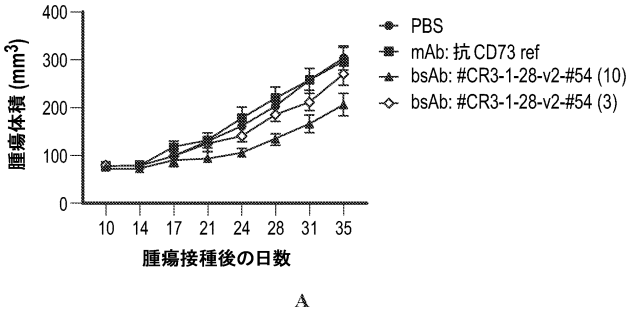
40

50

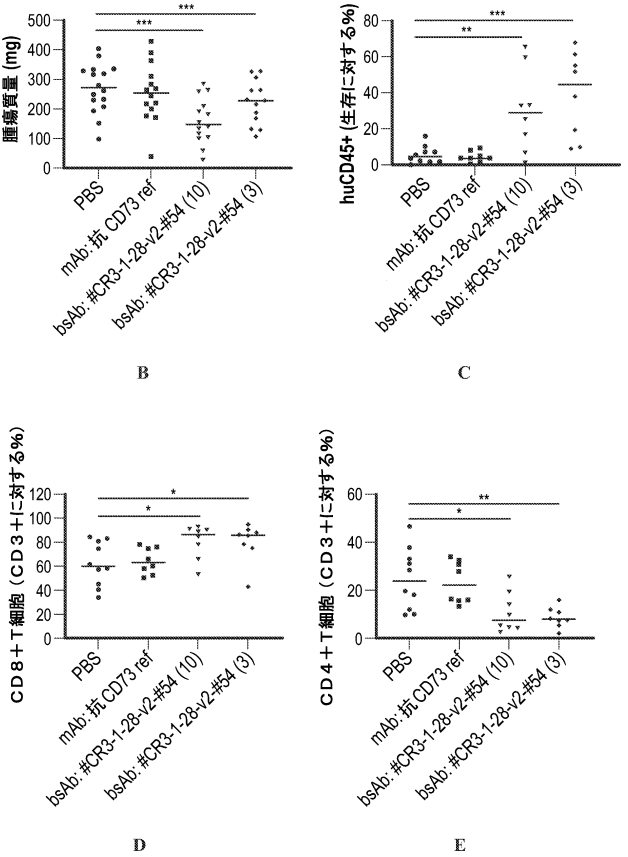
【図 25-2】



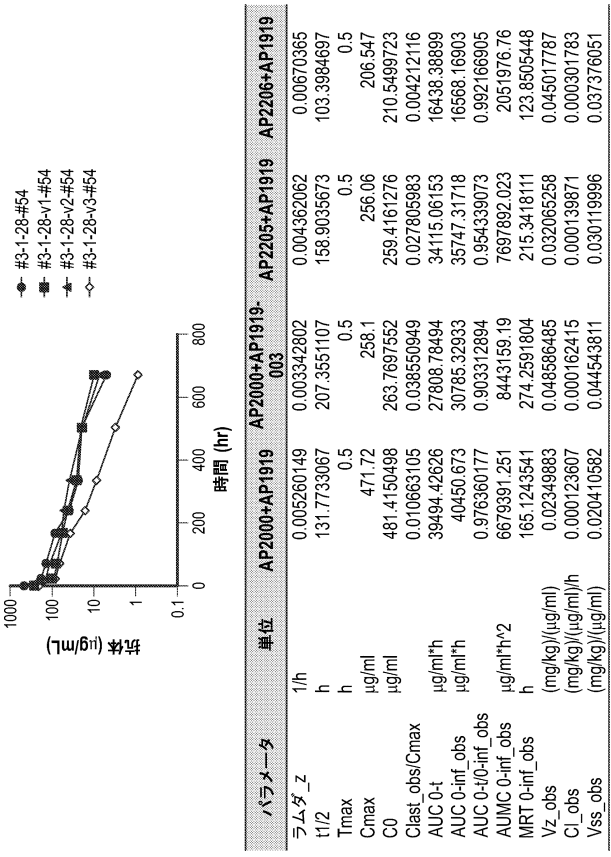
【図 26-1】



【図 26-2】



【図 27】



【配列表】

2024540604000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/050472

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - INV. - C07K 16/28; A61K 39/395; A61K 47/68; A61P 35/00; C12N 15/63 (2023.01) ADD. CPC - INV. - C07K 16/2803; A61K 39/39558; C12N 15/63; C07K 16/468; A61K 47/6803; A61P 35/00 (2023.02) ADD. - A61K 2039/505 (2023.02) 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) See Search History document Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched See Search History document Electronic database consulted during the international search (name of database and, where practicable, search terms used) See Search History document		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 2021/0292393 A1 (ABCELLERA BIOLOGICS INC. et al) 23 September 2021 (23.09.2021) entire document	1-6, 30-32
A	US 2020/0407456 A1 (AP BIOSCIENCES INC.) 31 December 2020 (31.12.2020) entire document	1-6, 30-32
A	US 2020/0308259 A1 (BIOGEN INTERNATIONAL NEUROSCIENCE GMBH) 01 October 2020 (01.10.2020) entire document	1-6, 30-32
A	US 2021/0355234 A1 (HOFFMANN-LA ROCHE INC.) 18 November 2021 (18.11.2021) entire document	1-6, 30-32
☐ 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 "D" document cited by the applicant in the international application "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 03 March 2023		Date of mailing of the international search report MAR 30 2023
Name and mailing address of the ISA/ Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, VA 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer Taina Matos Telephone No. PCT Helpdesk: 571-272-4300

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/050472

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2022/050472

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☒ Claims Nos.: 26-29, 58-61
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

See extra sheet(s).

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
1-6, 30-32

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/050472

Continued from Box No. III Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees need to be paid.

Group I+: claims 1-25 and 30-32 are drawn to anti-p95HER2 antibodies, and nucleic acids encoding the same.

Group II+: claims 33-57 and 62-64 drawn to anti-CD73 antibodies, and nucleic acids encoding the same.

The first invention of Group I+ is restricted to an antibody comprising a VH and VL, where the VH is selected to be SEQ ID NO: 1, which further contains a CDRH1 (SEQ ID NO: 3), CDRH2 (SEQ ID NO: 4), CDRH3 (SEQ ID NO: 5), and the VL is selected to be SEQ ID NO: 2, which further contains CDRL1 (SEQ ID NO: 6), CDRL2 (SEQ ID NO: 7), and CDRL3 (SEQ ID NO: 8), and nucleic acids encoding the same. It is believed that claims 1-6, and 30-32 read on this first named invention and thus these claims will be searched without fee to the extent that they read on SEQ ID NOs: 1 and 2.

The first invention of Group II+ is restricted to an antibody comprising a VH and VL, where the VH is selected to be SEQ ID NO: 49, which further contains a CDRH1 (SEQ ID NO: 51), CDRH2 (SEQ ID NO: 52), CDRH3 (SEQ ID NO: 53), and the VL is selected to be SEQ ID NO: 50, which further contains CDRL1 (SEQ ID NO: 54), CDRL2 (SEQ ID NO: 55), and CDRL3 (SEQ ID NO: 56), and nucleic acids encoding the same.

Applicant is invited to elect additional antibody VH, VL, isolated amino acid sequences, encoding nucleic acid sequences, and their respective, corresponding SEQ ID NOs to be searched in a specific combination by paying additional fee for each set of election. An exemplary election would be an antibody comprising a VH and VL, isolated amino acid sequences, encoding nucleic acid sequences, and their respective, corresponding SEQ ID NOs where the VH is selected to be SEQ ID NO: 1, which further contains a CDRH1 (SEQ ID NO: 3), CDRH2 (SEQ ID NO: 4), CDRH3 (SEQ ID NO: 5), and the VL is selected to be SEQ ID NO: 2, which further contains CDRL1 (SEQ ID NO: 6), CDRL2 (SEQ ID NO: 7), and CDRL3 (SEQ ID NO: 8). Additional antibody VH, VL, isolated amino acid sequences, encoding nucleic acid sequences will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that read on any additional elected inventions. Applicants must further indicate, if applicable, the claims which read on the first named invention if different than what was indicated above for this group. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched/examined.

The inventions listed in Groups I+ and II+ do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1, because under PCT Rule 13.2 they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

The Groups I+ and II+ formulas do not share a significant structural element responsible for treating cancer, requiring the selection of alternative VH and VL where "An antibody or antigen binding fragment thereof comprising: (i) a VH region comprising complementarity-determining region (CDR)-H1, CDR-H2, and CDR-H3, wherein CDR-H1 is set forth in SEQ ID NO: 3, CDR-H2 is set forth in SEQ ID NO: 4, and CDR-H3 is set forth in SEQ ID NO: 5 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 3, 4, or 5 and the antigen binding specificity thereof; and a VL region comprising CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3, wherein CDR-L1 is set forth in SEQ ID NO: 6, CDR-L2 is set forth in SEQ ID NO: 7, and CDR-L3 is set forth in SEQ ID NO: 8 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 6, 7, or 8 and the antigen binding specificity thereof; (ii) a VH region comprising CDR-H1, CDR-H2, and CDR-H3, wherein CDR-H1 is set forth in SEQ ID NO: 11, CDR-H2 is set forth in SEQ ID NO: 12, and CDR-H3 is set forth in SEQ ID NO: 13 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 11, 12, or 13 and the antigen binding specificity thereof; and a VL region comprising CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3, wherein CDR-L1 is set forth in SEQ ID NO: 14, CDR-L2 is set forth in SEQ ID NO: 15, and CDR-L3 is set forth in SEQ ID NO: 16 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 14, 15, or 16 and the antigen binding specificity thereof; (iii) a VH region comprising CDR-H1, CDR-H2, and CDR-H3, wherein CDR-H1 is set forth in SEQ ID NO: 19, CDR-H2 is set forth in SEQ ID NO: 20, and CDR-H3 is set forth in SEQ ID NO: 21 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 19, 20, or 21 and the antigen binding specificity thereof; and a VL region comprising CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3, wherein CDR-L1 is set forth in SEQ ID NO: 22, CDR-L2 is set forth in SEQ ID NO: 23, and CDR-L3 is set forth in SEQ ID NO: 24 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 22, 23, or 24 and the antigen binding specificity thereof; (iv) a VH region comprising CDR-H1, CDR-H2, and CDR-H3, wherein CDR-H1 is set forth in SEQ ID NO: 27, CDR-H2 is set forth in SEQ ID NO: 28, and CDR-H3 is set forth in SEQ ID NO: 29 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 27, 28, or 29 and the antigen binding specificity thereof; and a VL region comprising CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3, wherein CDR-L1 is set forth in SEQ ID NO: 30, CDR-L2 is set forth in SEQ ID NO: 31, and CDR-L3 is set forth in SEQ ID NO: 32 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 30, 31, or 32 and the antigen binding specificity thereof; (v) a VH region comprising CDR-H1, CDR-H2, and CDR-H3, wherein CDR-H1 is set forth in SEQ ID NO: 35, CDR-H2 is set forth in SEQ ID NO: 36, and CDR-H3 is set forth in SEQ ID NO: 37 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 35, 36, or 37 and the antigen binding specificity thereof; and a VL region comprising CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3, wherein CDR-L1 is set forth in SEQ ID NO: 38, CDR-L2 is set forth in SEQ ID NO: 39, and CDR-L3 is set forth in SEQ ID NO: 40 or sequences having 90% identity to SEQ ID NO: 38, 39, or 40 and the antigen binding specificity thereof, wherein the antibody or antigen binding fragment binds to p95HER2."

The special technical features of Groups I+, SEQ ID NOs: 1-42 or 46-47, are not present on Groups II+; and the special technical features of Groups II+, SEQ ID NOs: 49-86 or 88-91, are not present in Groups I+.

Additionally, even if Groups I+ and II+ were considered to share the technical features of an antibody or antigen binding fragment thereof comprising: (i) a VH region comprising complementarity-determining region (CDR)-H1, CDR-H2, and CDR-H3; and a VL region comprising CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3, a bispecific antibody, an isolated amino acid sequence, and an isolated nucleic acid sequence. However, these shared technical features do not represent a contribution over the prior art.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2022/050472

Specifically, US 2020/0407456 to Ap Biosciences Inc. discloses an antibody or antigen binding fragment thereof (antibody, Para. [0011]) comprising: (i) a VH region (the antibody or antigen binding fragment having a VH region, Para. [0011]) comprising complementarity-determining region (CDR)-H1, CDR-H2, and CDR-H3 (CDR-H1, CDR-H2, and CDR-H3, Para. [0011]); and a VL region (and a VL region, Para. [0011]) comprising CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3 (CDR-L1, CDR-L2, and CDR-L3, Para. [0011]), a bispecific antibody (bispecific antibody, Para. [0010]), an isolated amino acid sequence (an isolated amino acid sequence, Para. [0027]), and an isolated nucleic acid sequence (an isolated nucleic acid sequence, Para. [0028]).

The inventions listed in Groups I+ and II+ therefore lack unity under Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical features.

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

A 6 1 K 47/68 (2017.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 K 39/44 (2006.01)
 A 6 1 K 48/00 (2006.01)

A 6 1 K 47/68
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02
 A 6 1 K 39/395 Y
 A 6 1 K 39/44
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 39/395 C
 A 6 1 K 39/395 E
 A 6 1 K 39/395 L
 A 6 1 K 48/00

,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,D
 K,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),O
 A(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,B
 B,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,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,JM,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,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,V
 N,WS,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一

(74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光

(74)代理人 100188433
 弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396
 弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(74)代理人 100221741
 弁理士 酒井 直子

(74)代理人 100114926
 弁理士 枝松 義恵

(72)発明者 ハー チェンーホーン

アメリカ合衆国 9 5 1 2 9 カリフォルニア州 サンノゼ キャッスルウッド ドライブ 4 7 6 0

(72)発明者 ホァン ポーリン

台湾 1 1 5 0 1 1 タイペイ シティ ナンガン ディストリクト チョンシャオ イースト ロード
 セクション 7 ナンバー 5 0 8 1 1 エフー 2 エーピー バイオサイエンスーズ, インコーポレ
 イテッド内

(72)発明者 シェ シンータ

台湾 1 1 5 0 1 1 タイペイ シティ ナンガン ディストリクト チョンシャオ イースト ロード
 セクション 7 ナンバー 5 0 8 1 1 エフー 2 エーピー バイオサイエンスーズ, インコーポレ
 イテッド内

(72)発明者 スー チンーシュアン

台湾 115011 タイペイ シティ ナンガン ディストリクト チョンシャオ イースト ロード
セクション 7 ナンバー 508 11エフー2 エーピー バイオサイエンシーズ, インコーポレ
イテッド内

(72)発明者 イウ ジョーンーチェ

台湾 115011 タイペイ シティ ナンガン ディストリクト チョンシャオ イースト ロード
セクション 7 ナンバー 508 11エフー2 エーピー バイオサイエンシーズ, インコーポレ
イテッド内

F ターム (参考) 4C076 AA95 BB11 BB21 CC27 CC41 EE41 EE59 FF31 FF68
4C084 AA13 MA05 MA66 NA05 NA13 NA14 ZB261 ZB262 ZB271 ZB272
4C085 AA13 AA14 BB33 BB34 BB35 BB36 BB37 BB42 CC22 CC23
DD62 EE01 EE05 GG06
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 BA72

【要約の続き】

