

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号  
特表2024-534880  
(P2024-534880A)

(43)公表日 令和6年9月26日(2024.9.26)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A 4 B 0 6 4
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z 4 C 0 8 5
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	4 C 0 8 6

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全114頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2024-513785(P2024-513785)	(71)出願人 514198367 バイオジェン・エムエイ・インコーポレ イテッド Biogen MA Inc. アメリカ合衆国02142マサチューセ ッツ州ケンブリッジ、ピニー・ストリー ト225番
(86)(22)出願日 令和4年8月31日(2022.8.31)	(74)代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(85)翻訳文提出日 令和6年4月24日(2024.4.24)	(74)代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(86)国際出願番号 PCT/US2022/042196	(74)代理人 100181674 弁理士 飯田 貴敏
(87)国際公開番号 WO2023/034409	(74)代理人 100181641 弁理士 石川 大輔
(87)国際公開日 令和5年3月9日(2023.3.9)	
(31)優先権主張番号 63/239,630	
(32)優先日 令和3年9月1日(2021.9.1)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	
(31)優先権主張番号 63/388,088	
(32)優先日 令和4年7月11日(2022.7.11)	
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)	

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 抗トランスフェリン受容体抗体及びその使用

(57)【要約】

本開示は、抗トランスフェリン受容体抗体、それを含む組成物及びそれらの使用方法を提供するものである。本開示はまた、抗トランスフェリン受容体抗体をコードするポリヌクレオチド及びベクター、ならびにそれらを含む細胞、当該抗体の作製方法、及び当該抗体を含む分子を提供するものである。

【選択図】 図1 A

```

ATTORNEY-IN-CHARGE
1 5 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225 230 235 240 245 250 255 260 265 270 275 280 285 290 295 300 305 310 315 320 325 330 335 340 345 350 355 360 365 370 375 380 385 390 395 400 405 410 415 420 425 430 435 440 445 450 455 460 465 470 475 480 485 490 495 500 505 510 515 520 525 530 535 540 545 550 555 560 565 570 575 580 585 590 595 600 605 610 615 620 625 630 635 640 645 650 655 660 665 670 675 680 685 690 695 700 705 710 715 720 725 730 735 740 745 750 755 760 765 770 775 780 785 790 795 800 805 810 815 820 825 830 835 840 845 850 855 860 865 870 875 880 885 890 895 900 905 910 915 920 925 930 935 940 945 950 955 960 965 970 975 980 985 990 995 1000 1005 1010 1015 1020 1025 1030 1035 1040 1045 1050 1055 1060 1065 1070 1075 1080 1085 1090 1095 1100 1105 1110 1115 1120 1125 1130 1135 1140 1145 1150 1155 1160 1165 1170 1175 1180 1185 1190 1195 1200 1205 1210 1215 1220 1225 1230 1235 1240 1245 1250 1255 1260 1265 1270 1275 1280 1285 1290 1295 1300 1305 1310 1315 1320 1325 1330 1335 1340 1345 1350 1355 1360 1365 1370 1375 1380 1385 1390 1395 1400 1405 1410 1415 1420 1425 1430 1435 1440 1445 1450 1455 1460 1465 1470 1475 1480 1485 1490 1495 1500 1505 1510 1515 1520 1525 1530 1535 1540 1545 1550 1555 1560 1565 1570 1575 1580 1585 1590 1595 1600 1605 1610 1615 1620 1625 1630 1635 1640 1645 1650 1655 1660 1665 1670 1675 1680 1685 1690 1695 1700 1705 1710 1715 1720 1725 1730 1735 1740 1745 1750 1755 1760 1765 1770 1775 1780 1785 1790 1795 1800 1805 1810 1815 1820 1825 1830 1835 1840 1845 1850 1855 1860 1865 1870 1875 1880 1885 1890 1895 1900 1905 1910 1915 1920 1925 1930 1935 1940 1945 1950 1955 1960 1965 1970 1975 1980 1985 1990 1995 2000 2005 2010 2015 2020 2025 2030 2035 2040 2045 2050 2055 2060 2065 2070 2075 2080 2085 2090 2095 2100 2105 2110 2115 2120 2125 2130 2135 2140 2145 2150 2155 2160 2165 2170 2175 2180 2185 2190 2195 2200 2205 2210 2215 2220 2225 2230 2235 2240 2245 2250 2255 2260 2265 2270 2275 2280 2285 2290 2295 2300 2305 2310 2315 2320 2325 2330 2335 2340 2345 2350 2355 2360 2365 2370 2375 2380 2385 2390 2395 2400 2405 2410 2415 2420 2425 2430 2435 2440 2445 2450 2455 2460 2465 2470 2475 2480 2485 2490 2495 2500 2505 2510 2515 2520 2525 2530 2535 2540 2545 2550 2555 2560 2565 2570 2575 2580 2585 2590 2595 2600 2605 2610 2615 2620 2625 2630 2635 2640 2645 2650 2655 2660 2665 2670 2675 2680 2685 2690 2695 2700 2705 2710 2715 2720 2725 2730 2735 2740 2745 2750 2755 2760 2765 2770 2775 2780 2785 2790 2795 2800 2805 2810 2815 2820 2825 2830 2835 2840 2845 2850 2855 2860 2865 2870 2875 2880 2885 2890 2895 2900 2905 2910 2915 2920 2925 2930 2935 2940 2945 2950 2955 2960 2965 2970 2975 2980 2985 2990 2995 3000 3005 3010 3015 3020 3025 3030 3035 3040 3045 3050 3055 3060 3065 3070 3075 3080 3085 3090 3095 3100 3105 3110 3115 3120 3125 3130 3135 3140 3145 3150 3155 3160 3165 3170 3175 3180 3185 3190 3195 3200 3205 3210 3215 3220 3225 3230 3235 3240 3245 3250 3255 3260 3265 3270 3275 3280 3285 3290 3295 3300 3305 3310 3315 3320 3325 3330 3335 3340 3345 3350 3355 3360 3365 3370 3375 3380 3385 3390 3395 3400 3405 3410 3415 3420 3425 3430 3435 3440 3445 3450 3455 3460 3465 3470 3475 3480 3485 3490 3495 3500 3505 3510 3515 3520 3525 3530 3535 3540 3545 3550 3555 3560 3565 3570 3575 3580 3585 3590 3595 3600 3605 3610 3615 3620 3625 3630 3635 3640 3645 3650 3655 3660 3665 3670 3675 3680 3685 3690 3695 3700 3705 3710 3715 3720 3725 3730 3735 3740 3745 3750 3755 3760 3765 3770 3775 3780 3785 3790 3795 3800 3805 3810 3815 3820 3825 3830 3835 3840 3845 3850 3855 3860 3865 3870 3875 3880 3885 3890 3895 3900 3905 3910 3915 3920 3925 3930 3935 3940 3945 3950 3955 3960 3965 3970 3975 3980 3985 3990 3995 4000 4005 4010 4015 4020 4025 4030 4035 4040 4045 4050 4055 4060 4065 4070 4075 4080 4085 4090 4095 4100 4105 4110 4115 4120 4125 4130 4135 4140 4145 4150 4155 4160 4165 4170 4175 4180 4185 4190 4195 4200 4205 4210 4215 4220 4225 4230 4235 4240 4245 4250 4255 4260 4265 4270 4275 4280 4285 4290 4295 4300 4305 4310 4315 4320 4325 4330 4335 4340 4345 4350 4355 4360 4365 4370 4375 4380 4385 4390 4395 4400 4405 4410 4415 4420 4425 4430 4435 4440 4445 4450 4455 4460 4465 4470 4475 4480 4485 4490 4495 4500 4505 4510 4515 4520 4525 4530 4535 4540 4545 4550 4555 4560 4565 4570 4575 4580 4585 4590 4595 4600 4605 4610 4615 4620 4625 4630 4635 4640 4645 4650 4655 4660 4665 4670 4675 4680 4685 4690 4695 4700 4705 4710 4715 4720 4725 4730 4735 4740 4745 4750 4755 4760 4765 4770 4775 4780 4785 4790 4795 4800 4805 4810 4815 4820 4825 4830 4835 4840 4845 4850 4855 4860 4865 4870 4875 4880 4885 4890 4895 4900 4905 4910 4915 4920 4925 4930 4935 4940 4945 4950 4955 4960 4965 4970 4975 4980 4985 4990 4995 5000 5005 5010 5015 5020 5025 5030 5035 5040 5045 5050 5055 5060 5065 5070 5075 5080 5085 5090 5095 5100 5105 5110 5115 5120 5125 5130 5135 5140 5145 5150 5155 5160 5165 5170 5175 5180 5185 5190 5195 5200 5205 5210 5215 5220 5225 5230 5235 5240 5245 5250 5255 5260 5265 5270 5275 5280 5285 5290 5295 5300 5305 5310 5315 5320 5325 5330 5335 5340 5345 5350 5355 5360 5365 5370 5375 5380 5385 5390 5395 5400 5405 5410 5415 5420 5425 5430 5435 5440 5445 5450 5455 5460 5465 5470 5475 5480 5485 5490 5495 5500 5505 5510 5515 5520 5525 5530 5535 5540 5545 5550 5555 5560 5565 5570 5575 5580 5585 5590 5595 5600 5605 5610 5615 5620 5625 5630 5635 5640 5645 5650 5655 5660 5665 5670 5675 5680 5685 5690 5695 5700 5705 5710 5715 5720 5725 5730 5735 5740 5745 5750 5755 5760 5765 5770 5775 5780 5785 5790 5795 5800 5805 5810 5815 5820 5825 5830 5835 5840 5845 5850 5855 5860 5865 5870 5875 5880 5885 5890 5895 5900 5905 5910 5915 5920 5925 5930 5935 5940 5945 5950 5955 5960 5965 5970 5975 5980 5985 5990 5995 6000 6005 6010 6015 6020 6025 6030 6035 6040 6045 6050 6055 6060 6065 6070 6075 6080 6085 6090 6095 6100 6105 6110 6115 6120 6125 6130 6135 6140 6145 6150 6155 6160 6165 6170 6175 6180 6185 6190 6195 6200 6205 6210 6215 6220 6225 6230 6235 6240 6245 6250 6255 6260 6265 6270 6275 6280 6285 6290 6295 6300 6305 6310 6315 6320 6325 6330 6335 6340 6345 6350 6355 6360 6365 6370 6375 6380 6385 6390 6395 6400 6405 6410 6415 6420 6425 6430 6435 6440 6445 6450 6455 6460 6465 6470 6475 6480 6485 6490 6495 6500 6505 6510 6515 6520 6525 6530 6535 6540 6545 6550 6555 6560 6565 6570 6575 6580 6585 6590 6595 6600 6605 6610 6615 6620 6625 6630 6635 6640 6645 6650 6655 6660 6665 6670 6675 6680 6685 6690 6695 6700 6705 6710 6715 6720 6725 6730 6735 6740 6745 6750 6755 6760 6765 6770 6775 6780 6785 6790 6795 6800 6805 6810 6815 6820 6825 6830 6835 6840 6845 6850 6855 6860 6865 6870 6875 6880 6885 6890 6895 6900 6905 6910 6915 6920 6925 6930 6935 6940 6945 6950 6955 6960 6965 6970 6975 6980 6985 6990 6995 7000 7005 7010 7015 7020 7025 7030 7035 7040 7045 7050 7055 7060 7065 7070 7075 7080 7085 7090 7095 7100 7105 7110 7115 7120 7125 7130 7135 7140 7145 7150 7155 7160 7165 7170 7175 7180 7185 7190 7195 7200 7205 7210 7215 7220 7225 7230 7235 7240 7245 7250 7255 7260 7265 7270 7275 7280 7285 7290 7295 7300 7305 7310 7315 7320 7325 7330 7335 7340 7345 7350 7355 7360 7365 7370 7375 7380 7385 7390 7395 7400 7405 7410 7415 7420 7425 7430 7435 7440 7445 7450 7455 7460 7465 7470 7475 7480 7485 7490 7495 7500 7505 7510 7515 7520 7525 7530 7535 7540 7545 7550 7555 7560 7565 7570 7575 7580 7585 7590 7595 7600 7605 7610 7615 7620 7625 7630 7635 7640 7645 7650 7655 7660 7665 7670 7675 7680 7685 7690 7695 7700 7705 7710 7715 7720 7725 7730 7735 7740 7745 7750 7755 7760 7765 7770 7775 7780 7785 7790 7795 7800 7805 7810 7815 7820 7825 7830 7835 7840 7845 7850 7855 7860 7865 7870 7875 7880 7885 7890 7895 7900 7905 7910 7915 7920 7925 7930 7935 7940 7945 7950 7955 7960 7965 7970 7975 7980 7985 7990 7995 8000 8005 8010 8015 8020 8025 8030 8035 8040 8045 8050 8055 8060 8065 8070 8075 8080 8085 8090 8095 8100 8105 8110 8115 8120 8125 8130 8135 8140 8145 8150 8155 8160 8165 8170 8175 8180 8185 8190 8195 8200 8205 8210 8215 8220 8225 8230 8235 8240 8245 8250 8255 8260 8265 8270 8275 8280 8285 8290 8295 8300 8305 8310 8315 8320 8325 8330 8335 8340 8345 8350 8355 8360 8365 8370 8375 8380 8385 8390 8395 8400 8405 8410 8415 8420 8425 8430 8435 8440 8445 8450 8455 8460 8465 8470 8475 8480 8485 8490 8495 8500 8505 8510 8515 8520 8525 8530 8535 8540 8545 8550 8555 8560 8565 8570 8575 8580 8585 8590 8595 8600 8605 8610 8615 8620 8625 8630 8635 8640 8645 8650 8655 8660 8665 8670 8675 8680 8685 8690 8695 8700 8705 8710 8715 8720 8725 8730 8735 8740 8745 8750 8755 8760 8765 8770 8775 8780 8785 8790 8795 8800 8805 8810 8815 8820 8825 8830 8835 8840 8845 8850 8855 8860 8865 8870 8875 8880 8885 8890 8895 8900 8905 8910 8915 8920 8925 8930 8935 8940 8945 8950 8955 8960 8965 8970 8975 8980 8985 8990 8995 9000 9005 9010 9015 9020 9025 9030 9035 9040 9045 9050 9055 9060 9065 9070 9075 9080 9085 9090 9095 9100 9105 9110 9115 9120 9125 9130 9135 9140 9145 9150 9155 9160 9165 9170 9175 9180 9185 9190 9195 9200 9205 9210 9215 9220 9225 9230 9235 9240 9245 9250 9255 9260 9265 9270 9275 9280 9285 9290 9295 9300 9305 9310 9315 9320 9325 9330 9335 9340 9345 9350 9355 9360 9365 9370 9375 9380 9385 9390 9395 9400 9405 9410 9415 9420 9425 9430 9435 9440 9445 9450 9455 9460 9465 9470 9475 9480 9485 9490 9495 9500 9505 9510 9515 9520 9525 9530 9535 9540 9545 9550 9555 9560 9565 9570 9575 9580 9585 9590 9595 9600 9605 9610 9615 9620 9625 9630 9635 9640 9645 9650 9655 9660 9665 9670 9675 9680 9685 9690 9695 9700 9705 9710 9715 9720 9725 9730 9735 9740 9745 9750 9755 9760 9765 9770 9775 9780 9785 9790 9795 9800 9805 9810 9815 9820 9825 9830 9835 9840 9845 9850 9855 9860 9865 9870 9875 9880 9885 9890 9895 9900 9905 9910 9915 9920 9925 9930 9935 9940 9945 9950 9955 9960 9965 9970 9975 9980 9985 9990 9995 10000 10005 10010 10015 10020 10025 10030 10035 10040 10045 10050 10055 10060 10065 10070 10075 10080 10085 10090 10095 10100 10105 10110 10115 10120 10125 10130 10135 10140 10145 10150 10155 10160 10165 10170 10175 10180 10185 10190 10195 10200 10205 10210 10215 10220 10225 10230 10235 10240 10245 10250 10255 10260 10265 10270 10275 10280 10285 10290 10295 10300 10305 10310 10315 10320 10325 10330 10335 10340 10345 10350 10355 10360 10365 10370 10375 10380 10385 10390 10395 10400 10405 10410 10415 10420 10425 10430 10435 10440 10445 10450 10455 10460 10465 10470 10475 10480 10485 10490 10495 10500 10505 10510 10515 10520 10525 10530 10535 10540 10545 10550 10555 10560 10565 10570 10575 10580 10585 10590 10595 10600 10605 10610 10615 10620 10625 10630 10635 10640 10645 10650 10655 10660 
```

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

VH相補性決定領域(CDR)1、VH CDR2、及びVH CDR3を含む重鎖可変領域(VH)を含む、ヒトトランスフェリン受容体に結合する抗体であって、

前記VH CDR1はアミノ酸配列G I D F S S S G Y M X (配列番号149)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、

前記VH CDR2はアミノ酸配列X I Y T Y S S N T Y Y A X X X K G (配列番号151)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、

前記VH CDR3はアミノ酸配列G T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L (配列番号106)を含み、

前記抗体は、VL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、

前記VL CDR1はアミノ酸配列Q A S Q N I N S Y L A (配列番号107)を含み、

前記VL CDR2はアミノ酸配列R A S X L X S (配列番号153)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、

前記VL CDR3はアミノ酸配列Q S Y Y Y S G S S N Y N A (配列番号110)を含む、前記抗体。

## 【請求項 2】

前記VH CDR1はアミノ酸配列G I D F S S S G Y M X<sub>1</sub> (配列番号150)を含み、ここでX<sub>1</sub>はC、A、またはHであり、

前記VH CDR2はアミノ酸配列X<sub>2</sub> I Y T Y S S N T Y Y A X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> K G (配列番号152)を含み、ここでX<sub>2</sub>はCまたはAであり、X<sub>3</sub>はSまたはAであり、X<sub>4</sub>はWまたはSであり、X<sub>5</sub>はAまたはVであり、

前記VH CDR3はアミノ酸配列G T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L (配列番号106)を含み、

前記VL CDR1はアミノ酸配列Q A S Q N I N S Y L A (配列番号107)を含み、

前記VL CDR2はアミノ酸配列R A S X<sub>6</sub> L X<sub>7</sub> S (配列番号154)を含み、ここでX<sub>6</sub>はTまたはSであり、X<sub>7</sub>はAまたはEであり、

前記VL CDR3はアミノ酸配列Q S Y Y Y S G S S N Y N A (配列番号110)を含む、請求項1に記載の抗体。

## 【請求項 3】

前記VH - CDR1、前記VH - CDR2、及び前記VH - CDR3はそれぞれ、図1Aに示される単一のVHクローンのVH CDRに対応し、前記VL - CDR1、前記VL - CDR2、及び前記VL - CDR3はそれぞれ、図1Cに示される単一のVLクローンのVL CDRに対応する、請求項1に記載の抗体。

## 【請求項 4】

前記VH - CDR1、前記VH - CDR2、前記VH - CDR3、前記VL - CDR1、前記VL - CDR2、及び前記VL - CDR3はそれぞれ、表1Aに示される単一のクローンのVH CDR及びVL CDRに対応する、請求項1に記載の抗体。

## 【請求項 5】

(a) 前記VH CDR1は、アミノ酸配列G I D F S S S G Y M C (配列番号101)を含み、前記VH CDR2は、アミノ酸配列C I Y T Y S S N T Y Y A S W A K G (配列番号104)を含み、前記VH CDR3は、アミノ酸配列G T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L (配列番号106)を含み、前記VL CDR1は、アミノ酸配列Q A S Q N I N S Y L A (配列番号107)を含み、前記VL CDR2は、アミノ酸配列R A S T L A S (配列番号109)を含み、前記VL CDR3は、アミノ酸配列Q S Y Y Y S G S S N Y N A (配列番号110)を含む、

(b) 前記VH CDR1は、アミノ酸配列G I D F S S S G Y M H (配列番号102)を含み、前記VH CDR2は、アミノ酸配列A I Y T Y S S N T Y Y A S W A K G (配列番号105)を含み、前記VH CDR3は、アミノ酸配列G T Y G Y T G Y T Y T

10

20

30

40

50

M G Y F S L (配列番号 106) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 Q A S Q N I N S Y L A (配列番号 107) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 R A S S L E S (配列番号 108) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q S Y Y Y S G S S N Y N A (配列番号 110) を含む、

(c) 前記 V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G I D F S S S G Y M C (配列番号 101) を含み、前記 V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I Y T Y S S N T Y Y A A S V K G (配列番号 103) を含み、前記 V H C D R 3 は、アミノ酸配列 G T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L (配列番号 106) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 Q A S Q N I N S Y L A (配列番号 107) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 R A S S L E S (配列番号 108) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q S Y Y Y S G S S N Y N A (配列番号 110) を含む、または

(d) 前記 V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G I D F S S S G Y M C (配列番号 101) を含み、前記 V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I Y T Y S S N T Y Y A S W A K G (配列番号 104) を含み、前記 V H C D R 3 は、アミノ酸配列 G T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L (配列番号 106) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 Q A S Q N I N S Y L A (配列番号 107) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 R A S S L E S (配列番号 108) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q S Y Y Y S G S S N Y N A (配列番号 110) を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 6】

(i) 前記 V H は、配列番号 12、または 15 ~ 18 のいずれか 1 つと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 %、または 100 % 同一である、及び

(ii) 前記 V L は、配列番号 35 ~ 37 のいずれか 1 つと少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、99 %、または 100 % 同一である、先行請求項のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 7】

前記 V H は配列番号 4、12、または 15 ~ 18 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 34 ~ 37 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 8】

(a) 前記 V H は配列番号 4 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 34 のアミノ酸配列を含む、

(b) 前記 V H は配列番号 12 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 35 のアミノ酸配列を含む、

(c) 前記 V H は配列番号 15 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 35 のアミノ酸配列を含む、

(d) 前記 V H は配列番号 16 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 35 のアミノ酸配列を含む、

(e) 前記 V H は配列番号 17 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 35 のアミノ酸配列を含む、または

(f) 前記 V H は配列番号 18 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 35 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 9】

ヒトトランスフェリン受容体に結合し、ヒトトランスフェリン受容体への結合に対して、以下：

(a) 配列番号 4 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 34 のアミノ酸配列を含む V L、

(b) 配列番号 12 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L、

(c) 配列番号 15 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L、

(d) 配列番号 16 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 35 のアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

V L、

( e ) 配列番号 17 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L、または

( f ) 配列番号 18 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 35 のアミノ酸配列を含む V L、を含む抗体と競合する抗体。

【請求項 10】

V H 相補性決定領域 ( C D R ) 1、V H C D R 2、及び V H C D R 3 を含む重鎖可変領域 ( V H ) を含む、ヒトトランスフェリン受容体に結合する抗体であって、

前記 V H C D R 1 はアミノ酸配列 G F S F S N S Y W I X ( 配列番号 155 ) を含み、ここで X は任意のアミノ酸であり、

前記 V H C D R 2 はアミノ酸配列 X I N T D A D S T N Y A X X X X G ( 配列番号 157 ) を含み、ここで X は任意のアミノ酸であり、

前記 V H C D R 3 はアミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L ( 配列番号 119 ) を含み、前記抗体は、V L C D R 1、V L C D R 2、及び V L C D R 3 を含む軽鎖可変領域 ( V L ) を含み、

前記 V L C D R 1 はアミノ酸配列 X A S Q N I G S N L A ( 配列番号 159 ) を含み、

前記 V L C D R 2 はアミノ酸配列 D A S K L X S ( 配列番号 161 ) を含み、ここで X は任意のアミノ酸であり、

前記 V L C D R 3 はアミノ酸配列 Q X T V R G G A Y G X A ( 配列番号 163 ) を含み、ここで X は任意のアミノ酸である、前記抗体。

【請求項 11】

前記 V H C D R 1 はアミノ酸配列 G F S F S N S Y W I X<sub>1</sub> ( 配列番号 156 ) を含み、ここで X<sub>1</sub> は C、A、または H であり、

前記 V H C D R 2 はアミノ酸配列 X<sub>2</sub> I N T D A D S T N Y A X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub> G ( 配列番号 158 ) を含み、ここで X<sub>2</sub> は C または A であり、X<sub>3</sub> は S または D であり、X<sub>4</sub> は W または S であり、X<sub>5</sub> は A または V であり、X<sub>6</sub> は R または K であり、

前記 V H C D R 3 はアミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L ( 配列番号 119 ) を含み、

前記 V L C D R 1 はアミノ酸配列 X<sub>7</sub> A S Q N I G S N L A ( 配列番号 160 ) を含み、ここで X<sub>7</sub> は Q または R であり、

前記 V L C D R 2 はアミノ酸配列 D A S K L X<sub>8</sub> S ( 配列番号 162 ) を含み、ここで X<sub>8</sub> は A または E であり、

前記 V L C D R 3 はアミノ酸配列 Q X<sub>9</sub> T V R G G A Y G X<sub>10</sub> A ( 配列番号 164 ) を含み、ここで X<sub>9</sub> は C、Q、A、S、T、または V であり、X<sub>10</sub> は N または L である、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 12】

前記 V H - C D R 1、前記 V H - C D R 2、及び前記 V H - C D R 3 はそれぞれ、図 1 B に示される単一の V H クローンの V H C D R に対応し、前記 V L - C D R 1、前記 V L - C D R 2、及び前記 V L - C D R 3 はそれぞれ、図 1 D に示される単一の V L クローンの V L C D R に対応する、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 13】

前記 V H - C D R 1、前記 V H - C D R 2、前記 V H - C D R 3、前記 V L - C D R 1、前記 V L - C D R 2、及び前記 V L - C D R 3 はそれぞれ、表 2 A に示される単一のクローンの V H 及び V L C D R に対応する、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 14】

( a ) 前記 V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C ( 配列番号 116 ) を含み、前記 V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G ( 配列番号 117 ) を含み、前記 V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L ( 配列番号 119 ) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 Q A S Q N I G S N L A ( 配列番号 121 ) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L A S ( 配列番号 123 ) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q C T V R G G A Y G N A

10

20

30

40

50

(配列番号 124) を含む、

(b) 前記 V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 116) を含み、前記 V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A D S V K G (配列番号 118) を含み、前記 V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 119) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 120) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 122) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q C T V R G G A Y G N A (配列番号 124) を含む、

(c) 前記 V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 116) を含み、前記 V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G (配列番号 117) を含み、前記 V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 119) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 120) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 122) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q C T V R G G A Y G N A (配列番号 124) を含む、

10

(d) 前記 V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 116) を含み、前記 V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G (配列番号 117) を含み、前記 V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 119) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 120) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 122) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q S T V R G G A Y G N A (配列番号 125) を含む、

20

(e) 前記 V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 116) を含み、前記 V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G (配列番号 117) を含み、前記 V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 119) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 120) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 122) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q T T V R G G A Y G N A (配列番号 126) を含む、または

(f) 前記 V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 116) を含み、前記 V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G (配列番号 117) を含み、前記 V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 119) を含み、前記 V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 120) を含み、前記 V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 122) を含み、前記 V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q V T V R G G A Y G N A (配列番号 127) を含む、請求項 10 に記載の抗体。

30

【請求項 15】

(i) 前記 V H は、配列番号 30 ~ 33 のいずれか 1 つと少なくとも 80%、85%、90%、95%、99%、または 100% 同一である、

(ii) 前記 V L は、配列番号 41 ~ 44 のいずれか 1 つと少なくとも 80%、85%、90%、95%、99%、または 100% 同一である、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の抗体。

40

【請求項 16】

前記 V H は配列番号 30 ~ 33 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 41 ~ 44 のいずれか 1 つのアミノ酸配列を含む、請求項 10 に記載の抗体。

【請求項 17】

(a) 前記 V H は配列番号 19 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 38 のアミノ酸配列を含む、

(b) 前記 V H は配列番号 30 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 41 のアミノ酸配列を含む、

50

(c) 前記 V H は配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む、

(d) 前記 V H は配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む、

(e) 前記 V H は配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む、

(f) 前記 V H は配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む、

(g) 前記 V H は配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む、または

(h) 前記 V H は配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含み、前記 V L は配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 0 に記載の抗体。

【請求項 1 8】

ヒトトランスフェリン受容体に結合し、ヒトトランスフェリン受容体への結合に対して、以下：

(a) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含む V L、

(b) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、

(c) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、

(d) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、

(e) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含む V L、

(f) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む V L、

(g) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む V L、または

(h) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含む V H 及び配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含む V L、を含む抗体と競合する抗体。

【請求項 1 9】

F a b フラグメントまたは F a b ' フラグメントである、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 2 0】

二重特異性抗体、一本鎖抗体、F a b フラグメント、F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメント、F a b ' フラグメント、F s c フラグメント、F v フラグメント、s c F v、s c ( F v )<sub>2</sub>、またはダイアボディである、請求項 1 ~ 1 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 2 1】

定常重鎖 ( C H ) ドメイン及び定常軽鎖 ( C L ) ドメインを含む、請求項 1 ~ 1 9 のいずれか 1 項に記載の抗体。

【請求項 2 2】

前記 C H ドメインは、配列番号 4 5 ~ 5 2 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む C H 1 ドメイン、を含む、請求項 2 1 に記載の抗体。

【請求項 2 3】

前記 C H 1 ドメインは、配列番号 4 5、4 7、及び 4 9 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 2 に記載の抗体。

【請求項 2 4】

前記 C H 1 ドメインは、配列番号 5 3 ~ 5 5 及び 5 7 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含むヒンジと融合される、請求項 2 3 に記載の抗体。

10

20

30

40

50

**【請求項 25】**

前記 C H 1 ドメインは、配列番号 5 1 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 2 に記載の抗体。

**【請求項 26】**

前記 C H 1 ドメインは、アミノ酸配列 E S または配列番号 5 6 に示されるアミノ酸配列を含むヒンジと融合される、請求項 2 5 に記載の抗体。

**【請求項 27】**

前記 C H 1 ドメインは、アミノ酸配列 E S、E S K、または配列番号 5 3 ~ 9 0 のいずれか 1 つに示されるアミノ酸配列を含むヒンジと融合される、請求項 2 3 または 2 5 に記載の抗体。

10

**【請求項 28】**

前記 C L ドメインは、配列番号 9 1 または 9 2 に示されるアミノ酸配列を含む、請求項 2 1 ~ 2 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

**【請求項 29】**

請求項 2 1 に記載の抗体であって、

( i ) 配列番号 9 3 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 9 4 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、

( i i ) 配列番号 9 5 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 9 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、

( i i i ) 配列番号 9 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 9 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、

20

( i v ) 配列番号 9 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 9 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、または

( v ) 配列番号 9 9 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 1 0 0 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、を含む、前記抗体。

**【請求項 30】**

請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体をコードする核酸 ( 複数可 ) 。

**【請求項 31】**

プロモーターに機能可能なように連結された、請求項 3 0 に記載の核酸 ( 複数可 ) を含む発現ベクター ( 複数可 ) 。

30

**【請求項 32】**

請求項 3 0 に記載の核酸 ( 複数可 ) または請求項 3 1 に記載の発現ベクター ( 複数可 ) を含む、単離された細胞。

**【請求項 33】**

プロモーターに機能可能なように連結された、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の抗体の前記 V H を含む第 1 のポリペプチドをコードする第 1 の核酸、を含む第 1 の発現ベクター、及びプロモーターに機能可能なように連結された、請求項 1 ~ 2 0 のいずれか 1 項に記載の抗体の前記 V L を含む第 2 のポリペプチドをコードする第 2 の核酸、を含む第 2 の発現ベクター、を含む単離された細胞。

**【請求項 34】**

請求項 3 2 または 3 3 に記載の細胞を培養し、請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体を単離することを含む、前記抗体を作製する方法。

40

**【請求項 35】**

請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物。

**【請求項 36】**

請求項 1 ~ 2 9 のいずれか 1 項に記載の抗体及び薬剤を含むコンジュゲート。

**【請求項 37】**

前記薬剤は核酸である、請求項 3 6 に記載のコンジュゲート。

**【請求項 38】**

50

前記核酸は、mRNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA (miRNA)、ガイドRNA (gRNA)、またはホスホロアミデートモルホリノオリゴマー (PMO) である、請求項 37 に記載のコンジュゲート。

【請求項 39】

前記核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである、請求項 37 に記載のコンジュゲート。

【請求項 40】

前記薬剤は、リンカーを介して前記抗体に連結される、請求項 36 ~ 39 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲート。

【請求項 41】

in vivo における薬剤送達方法であって、ヒト対象に請求項 36 ~ 40 のいずれか 1 項に記載のコンジュゲートを投与することを含む、前記方法。

【請求項 42】

(a) 前記ヒト対象は筋疾患、筋萎縮症、動脈硬化性疾患、心臓関連疾患、またはリソソーム蓄積症を有し、前記方法は前記薬剤を筋組織に送達するものである、

(b) 前記ヒト対象は脳疾患を有し、前記方法は前記薬剤を脳組織に送達するものである、

(c) 前記ヒト対象は肝疾患を有し、前記方法は前記薬剤を肝細胞に送達するものである、

(d) 前記ヒト対象はがんを有し、前記方法は前記薬剤を腫瘍細胞に送達するものである、または

(e) 前記ヒト対象は免疫障害を有し、前記方法は前記薬剤を免疫細胞に送達するものである、請求項 41 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、2021年9月1日に出願された米国仮出願第63/239,630号及び2022年7月11日に出願された米国仮出願第63/388,088号の優先権を主張するものである。前述の出願の内容は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0002】

本開示は、抗トランスフェリン受容体抗体、それを含む組成物及びそれらの使用に関する。本開示はまた、抗トランスフェリン受容体抗体をコードする、関連ポリヌクレオチド及びベクター、ならびにそれらを含む細胞も提供する。

【背景技術】

【0003】

トランスフェリン受容体 (TfR) は、細胞膜結合型糖タンパク質であり、細胞内への鉄の取り込み及び細胞増殖の制御に参与している。鉄の取り込みは、TfRとの相互作用によって媒介される、鉄積載トランスフェリン (Tf) の内在化により生じる。トランスフェリン受容体 1 (TfR1) (CD71またはp90としても知られる) は、ユビキタスに発現している高親和性の受容体であり、筋発達及び除神経による筋萎縮において重要な役割を果たしている (Li Y, et al. Neural Regen Res 2021; 16: 1308-16)。筋組織にTfRが広く存在していることから、in vivo における筋肉への薬物送達が、TfRを標的とすることで実現できる可能性がある (Schnyder A, et al. Biochem J. 2004 Jan 1; 377 (Pt 1): 61-7)。TfRは、受容体の細胞外ドメインに特異的なモノクローナル抗体によって標的化され得る (Daniels TR et al., Clin Immunol. 2006 Nov; 121 (2): 144-58)。

筋肉を標的とすることにより、筋肉における取り込み及び他の組織における限定的な取り込みの両方に特有の課題がいくつかもたらされる。筋肉における血管内皮が薬物取り込

10

20

30

40

50

みの障壁のように作用するため、筋組織は薬物送達が困難な組織であると考えられている (Ebner DC et al., Current pharmaceutical design. 21. 10. 2174 / 1381612820666140929095755 及び US 20190240346)。

したがって、筋ジストロフィー及びリソソーム蓄積症を含む様々な筋肉関連疾患の処置に使用することができる、新規かつ改良された抗 TfR 抗体等の、より効率的な筋肉への薬物送達方法を開発する必要がある。加えて、このような抗体は、非筋障害の遺伝子治療にも用いることができる。肝細胞、腫瘍細胞、免疫細胞、及び血液脳関門の内皮細胞等の非筋組織において TfR 1 が広く発現していることから、薬物送達及び / または治療目的で、これらの組織を標的とする抗体を開発する必要もある。

10

【先行技術文献】

【特許文献】

【0004】

【特許文献1】米国特許出願公開第20190240346号明細書

【非特許文献】

【0005】

【非特許文献1】Li Y, et al. Neural Regen Res 2021; 16: 1308 - 16

【非特許文献2】Schnyder A, et al. Biochem J. 2004 Jan 1; 377 (Pt 1): 61 - 7

20

【非特許文献3】Daniels TR et al., Clin Immunol. 2006 Nov; 121 (2): 144 - 58

【非特許文献4】Ebner DC et al., Current pharmaceutical design. 21. 10. 2174 / 1381612820666140929095755

【発明の概要】

【0006】

本開示は、筋障害、動脈硬化性疾患、心臓関連疾患、及びリソソーム蓄積疾患を処置するための抗トランスフェリン受容体抗体、及びその使用方法に関する。本開示の抗体はまた、脳組織、肝臓組織、腫瘍細胞及び免疫細胞を標的とするために使用され得る。

30

【0007】

第1の態様において、本開示は、VH相補性決定領域(CDR)1、VH CDR2、及びVH CDR3を含む重鎖可変領域(VH)を含む、ヒトトランスフェリン受容体に結合する抗体を特徴とし、VH CDR1はアミノ酸配列GIDFSSSGYMX(配列番号149)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VH CDR2はアミノ酸配列XIYTYSSNTYYAXXKXG(配列番号151)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VH CDR3はアミノ酸配列GTYGTYGYTYTMGYFSL(配列番号106)を含み、当該抗体は、VL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、VL CDR1はアミノ酸配列QASQNIINSYLA(配列番号107)を含み、VL CDR2はアミノ酸配列RASXLXS(配列番号153)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VL CDR3はアミノ酸配列QSYYSYGSSNYNA(配列番号110)を含む。

40

【0008】

いくつかの実施形態において、VH CDR1はアミノ酸配列GIDFSSSGYMX<sub>1</sub>(配列番号150)を含み、ここでX<sub>1</sub>はC、A、またはHであり、VH CDR2はアミノ酸配列X<sub>2</sub>XIYTYSSNTYYAX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>KXG(配列番号152)を含み、ここでX<sub>2</sub>はCまたはAであり、X<sub>3</sub>はSまたはAであり、X<sub>4</sub>はWまたはSであり、X<sub>5</sub>はAまたはVであり、VH CDR3はアミノ酸配列GTYGTYGYTYTMGYFSL(配列番号106)を含み、VL CDR1はアミノ酸配列QASQNIINSYLA(配列番号107)を含み、VL CDR2はアミノ酸配列RASX<sub>6</sub>LX<sub>7</sub>S(配列

50

番号154)を含み、ここでX<sub>6</sub>はTまたはSであり、X<sub>7</sub>はAまたはEであり、VL CDR3はアミノ酸配列QSYYS GSS NYNA(配列番号110)を含む。いくつかの実施形態において、VH-CDR1、VH-CDR2、及びVH-CDR3はそれぞれ、図1Aに示される単一のVHクローンのVH CDRに対応し、VL-CDR1、VL-CDR2、及びVL-CDR3はそれぞれ、図1Cに示される単一のVLクローンのVL CDRに対応する。いくつかの実施形態において、VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3、VL-CDR1、VL-CDR2、及びVL-CDR3はそれぞれ、表1Aに示される単一のクローンのVH CDR及びVL CDRに対応する。

**【0009】**

いくつかの実施形態において、(a) VH CDR1は、アミノ酸配列GIDFSSS GYMC(配列番号101)を含み、VH CDR2は、アミノ酸配列CIYTYSS NTYYASWAKG(配列番号104)を含み、VH CDR3は、アミノ酸配列GTYGYTYTYTMGYFSL(配列番号106)を含み、VL CDR1は、アミノ酸配列QASQNINSYLA(配列番号107)を含み、VL CDR2は、アミノ酸配列RASTLAS(配列番号109)を含み、VL CDR3は、アミノ酸配列QSYYS GSS NYNA(配列番号110)を含む、(b) VH CDR1は、アミノ酸配列GIDFSSS GYMH(配列番号102)を含み、VH CDR2は、アミノ酸配列AIYTYSS NTYYASWAKG(配列番号105)を含み、VH CDR3は、アミノ酸配列GTYGYTYTYTMGYFSL(配列番号106)を含み、VL CDR1は、アミノ酸配列QASQNINSYLA(配列番号107)を含み、VL CDR2は、アミノ酸配列RASSLES(配列番号108)を含み、VL CDR3は、アミノ酸配列QSYYS GSS NYNA(配列番号110)を含む、(c) VH CDR1は、アミノ酸配列GIDFSSS GYMC(配列番号101)を含み、VH CDR2は、アミノ酸配列CIYTYSS NTYYAASVKG(配列番号103)を含み、VH CDR3は、アミノ酸配列GTYGYTYTYTMGYFSL(配列番号106)を含み、VL CDR1は、アミノ酸配列QASQNINSYLA(配列番号107)を含み、VL CDR2は、アミノ酸配列RASSLES(配列番号108)を含み、VL CDR3は、アミノ酸配列QSYYS GSS NYNA(配列番号110)を含む、または(d) VH CDR1は、アミノ酸配列GIDFSSS GYMC(配列番号101)を含み、VH CDR2は、アミノ酸配列CIYTYSS NTYYASWAKG(配列番号104)を含み、VH CDR3は、アミノ酸配列GTYGYTYTYTMGYFSL(配列番号106)を含み、VL CDR1は、アミノ酸配列QASQNINSYLA(配列番号107)を含み、VL CDR2は、アミノ酸配列RASSLES(配列番号108)を含み、VL CDR3は、アミノ酸配列QSYYS GSS NYNA(配列番号110)を含む。

**【0010】**

いくつかの実施形態において、(i) VHは、配列番号12、または15~18のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%同一であり、(ii) VLは、配列番号35~37のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%同一である。いくつかの実施形態において、VHは配列番号4、12、または15~18のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、VLは配列番号34~37のアミノ酸配列を含む。

**【0011】**

いくつかの実施形態において、(a) VHは配列番号4のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号34のアミノ酸配列を含む、(b) VHは配列番号12のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号35のアミノ酸配列を含む、(c) VHは配列番号15のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号35のアミノ酸配列を含む、(d) VHは配列番号16のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号35のアミノ酸配列を含む、(e) VHは配列番号17のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号35のアミノ酸配列を含む、または(f) VHは配列番号18のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号35のアミノ酸配列を含む。

## 【0012】

第2の態様において、本開示は、ヒトトランスフェリン受容体に結合し、ヒトトランスフェリン受容体への結合に対して、以下：(a)配列番号4のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号34のアミノ酸配列を含むVL、(b)配列番号12のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、(c)配列番号15のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、(d)配列番号16のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、(e)配列番号17のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、または(f)配列番号18のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号35のアミノ酸配列を含むVL、を含む抗体と競合する抗体を特徴とする。

10

## 【0013】

第3の態様において、本開示は、VH相補性決定領域(CDR)1、VH CDR2、及びVH CDR3を含む重鎖可変領域(VH)を含む、ヒトトランスフェリン受容体に結合する抗体を特徴とし、VH CDR1はアミノ酸配列GF S F S N S Y W I X(配列番号155)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VH CDR2はアミノ酸配列X I N T D A D S T N Y A X X X X G(配列番号157)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VH CDR3はアミノ酸配列Q N N V F D P G Y N L(配列番号119)を含み、当該抗体は、VL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、VL CDR1はアミノ酸配列X A S Q N I G S N L A(配列番号159)を含み、VL CDR2はアミノ酸配列D A S K L X S(配列番号161)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VL CDR3はアミノ酸配列Q X T V R G G A Y G X A(配列番号163)を含み、ここでXは任意のアミノ酸である。

20

## 【0014】

第3の態様のいくつかの実施形態において、VH CDR1はアミノ酸配列GF S F S N S Y W I X<sub>1</sub>(配列番号156)を含み、ここでX<sub>1</sub>はC、A、またはHであり、VH CDR2はアミノ酸配列X<sub>2</sub> I N T D A D S T N Y A X<sub>3</sub> X<sub>4</sub> X<sub>5</sub> X<sub>6</sub> G(配列番号158)を含み、ここでX<sub>2</sub>はCまたはAであり、X<sub>3</sub>はSまたはDであり、X<sub>4</sub>はWまたはSであり、X<sub>5</sub>はAまたはVであり、X<sub>6</sub>はRまたはKであり、VH CDR3はアミノ酸配列Q N N V F D P G Y N L(配列番号119)を含み、VL CDR1はアミノ酸配列X<sub>7</sub> A S Q N I G S N L A(配列番号160)を含み、ここでX<sub>7</sub>はQまたはRであり、VL CDR2はアミノ酸配列D A S K L X<sub>8</sub> S(配列番号162)を含み、ここでX<sub>8</sub>はAまたはEであり、VL CDR3はアミノ酸配列Q X<sub>9</sub> T V R G G A Y G X<sub>10</sub> A(配列番号164)を含み、ここでX<sub>9</sub>はC、Q、A、S、T、またはVであり、X<sub>10</sub>はNまたはLである。

30

## 【0015】

第3の態様のいくつかの実施形態において、VH - CDR1、VH - CDR2、及びVH - CDR3はそれぞれ、図1Bに示される単一のVHクローンのVH CDRに対応し、VL - CDR1、VL - CDR2、及びVL - CDR3はそれぞれ、図1Dに示される単一のVLクローンのVL CDRに対応する。第3の態様のいくつかの実施形態において、VH - CDR1、VH - CDR2、VH - CDR3、VL - CDR1、VL - CDR2、及びVL - CDR3はそれぞれ、表2Aに示される単一のクローンのVH CDR及びVL CDRに対応する。

40

## 【0016】

第3の態様のいくつかの実施形態において、(a)VH CDR1は、アミノ酸配列GF S F S N S Y W I C(配列番号116)を含み、VH CDR2は、アミノ酸配列C I N T D A D S T N Y A S W A R G(配列番号117)を含み、VH CDR3は、アミノ酸配列Q N N V F D P G Y N L(配列番号119)を含み、VL CDR1は、アミノ酸配列Q A S Q N I G S N L A(配列番号121)を含み、VL CDR2は、アミノ酸配列D A S K L A S(配列番号123)を含み、VL CDR3は、アミノ酸配列Q C T V R G G A Y G N A(配列番号124)を含む、(b)VH CDR1は、アミノ酸配列G

50

F S F S N S Y W I C (配列番号 1 1 6) を含み、V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A D S V K G (配列番号 1 1 8) を含み、V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 1 1 9) を含み、V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 1 2 0) を含み、V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 1 2 2) を含み、V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q C T V R G G A Y G N A (配列番号 1 2 4) を含む、(c) V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 1 1 6) を含み、V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G (配列番号 1 1 7) を含み、V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 1 1 9) を含み、V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 1 2 0) を含み、V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 1 2 2) を含み、V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q C T V R G G A Y G N A (配列番号 1 2 4) を含む、(d) V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 1 1 6) を含み、V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G (配列番号 1 1 7) を含み、V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 1 1 9) を含み、V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 1 2 0) を含み、V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 1 2 2) を含み、V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q S T V R G G A Y G N A (配列番号 1 2 5) を含む、(e) V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 1 1 6) を含み、V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G (配列番号 1 1 7) を含み、V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 1 1 9) を含み、V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 1 2 0) を含み、V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 1 2 2) を含み、V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q T T V R G G A Y G N A (配列番号 1 2 6) を含む、または (f) V H C D R 1 は、アミノ酸配列 G F S F S N S Y W I C (配列番号 1 1 6) を含み、V H C D R 2 は、アミノ酸配列 C I N T D A D S T N Y A S W A R G (配列番号 1 1 7) を含み、V H C D R 3 は、アミノ酸配列 Q N N V F D P G Y N L (配列番号 1 1 9) を含み、V L C D R 1 は、アミノ酸配列 R A S Q N I G S N L A (配列番号 1 2 0) を含み、V L C D R 2 は、アミノ酸配列 D A S K L E S (配列番号 1 2 2) を含み、V L C D R 3 は、アミノ酸配列 Q V T V R G G A Y G N A (配列番号 1 2 7) を含む。

10

20

30

【0017】

第3の態様のいくつかの実施形態において、(i) V H は、配列番号 30 ~ 33 のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%同一であり、(ii) V L は、配列番号 41 ~ 44 のいずれか1つと少なくとも80%、85%、90%、95%、99%、または100%同一である。いくつかの実施形態において、V H は配列番号 30 ~ 33 のいずれか1つのアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 41 ~ 44 のいずれか1つのアミノ酸配列を含む。

【0018】

第3の態様のいくつかの実施形態において、(a) V H は配列番号 19 のアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 38 のアミノ酸配列を含む、(b) V H は配列番号 30 のアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 41 のアミノ酸配列を含む、(c) V H は配列番号 31 のアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 41 のアミノ酸配列を含む、(d) V H は配列番号 32 のアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 41 のアミノ酸配列を含む、(e) V H は配列番号 33 のアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 41 のアミノ酸配列を含む、(f) V H は配列番号 33 のアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 42 のアミノ酸配列を含む、(g) V H は配列番号 33 のアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 43 のアミノ酸配列を含む、または (h) V H は配列番号 33 のアミノ酸配列を含み、V L は配列番号 44 のアミノ酸配列を含む。

40

【0019】

第4の態様において、本開示は、ヒトトランスフェリン受容体に結合し、ヒトトランス

50

フェリン受容体への結合に対して、以下：(a)配列番号19のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号38のアミノ酸配列を含むVL、(b)配列番号30のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号41のアミノ酸配列を含むVL、(c)配列番号31のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号41のアミノ酸配列を含むVL、(d)配列番号32のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号41のアミノ酸配列を含むVL、(e)配列番号33のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号41のアミノ酸配列を含むVL、(f)配列番号33のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号42のアミノ酸配列を含むVL、(g)配列番号33のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号43のアミノ酸配列を含むVL、または(h)配列番号33のアミノ酸配列を含むVH及び配列番号44のアミノ酸配列を含むVL、を含む抗体と競合する抗体を特徴とする。

10

## 【0020】

上記態様のいずれかのいくつかの実施形態において、抗体は、FabフラグメントまたはFab'フラグメントである。いくつかの実施形態において、抗体は、二重特異性抗体、一本鎖抗体、Fabフラグメント、F(ab')<sub>2</sub>フラグメント、Fab'フラグメント、Fscフラグメント、Fvフラグメント、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、またはダイアボディである。

## 【0021】

いくつかの実施形態において、抗体は、定常重鎖(CH)ドメイン及び定常軽鎖(CL)ドメインを含む。いくつかの実施形態において、CHドメインは、配列番号45~52のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むCH1ドメインを含む。いくつかの実施形態において、CH1ドメインは、配列番号45、47、及び49のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、CH1ドメインは、配列番号53~55及び57のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むヒンジと融合される。いくつかの実施形態において、CH1ドメインは、配列番号51に示されるアミノ酸配列を含む。いくつかの実施形態において、CH1ドメインは、アミノ酸配列ESまたは配列番号56に示されるアミノ酸配列を含むヒンジと融合される。いくつかの実施形態において、CH1ドメインは、アミノ酸配列ES、ESK、または配列番号53~90のいずれか1つに示されるアミノ酸配列を含むヒンジと融合される。いくつかの実施形態において、CLドメインは、配列番号91または92に示されるアミノ酸配列を含む。

20

## 【0022】

いくつかの実施形態において、抗体は、(i)配列番号93に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号94に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、(ii)配列番号95に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号96に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、(iii)配列番号97に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号96に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、(iv)配列番号98に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号96に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、または(v)配列番号99に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号100に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、を含む。

30

## 【0023】

別の態様において、本開示は、配列番号1のアミノ酸K231~E369内に全体的または部分的に位置するエピトープにおいて、ヒトトランスフェリン受容体に結合する抗体を特徴とする。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号1の残基K231、D245、L246、Y247、T248、P249、E350、G351、D352、C353、P354、S355、D356、K358、T359、D360、S361、R364、M365、V366、T367、及びE369からなる群より選択される1つ以上の残基に結合する。いくつかの実施形態において、抗体は、K231、D245~P249、E244~V250、E350~S361、M349~T362、R364~E369、及びC363~S370からなる群より選択される、配列番号1のうちの1つ以上のアミノ酸に結合する。

40

## 【0024】

50

別の態様において、本開示は、配列番号1のアミノ酸D139～K145及びG490～E582内に全体的または部分的に位置するエピトープにおいて、ヒトトランスフェリン受容体に結合する抗体を特徴とする。いくつかの実施形態において、抗体は、配列番号1の残基D139、T141、K145、G490、T491、V517、T518、Y573、K574、I577、E578、R579、I580、P581、及びE582からなる群より選択される1つ以上の残基に結合する。いくつかの実施形態において、抗体は、以下の配列：配列番号1のD139～E369、D139～E582、T141～E369、T141～E582、K145～E369、K145～E582、K231～E369、K231～E582、D245～E369、D245～E582、E350～E369、E350～E582、K358～E369、K358～E582、R364～E369、R364～E582、G490～E582、V517～E582、K573～E582、I577～E582、またはY573～E582のいずれかのうちの1つ以上のアミノ酸に結合する。いくつかの実施形態において、抗体は、以下の配列：配列番号1のD139～T141、D139～K145、T141～K145、T138～K145、T138～L146、G490～T491、L489～T491、L489～S492、V517～T518、P516～T518、P516～G519、Y573～E582、Y573～L583、T572～E582、またはT572～L583のいずれかのうちの1つ以上のアミノ酸に結合する。

10

#### 【0025】

別の態様において、本開示は、上記態様のいずれか1つの抗体をコードする核酸（複数可）を特徴とする。さらに別の態様において、本開示は、プロモーターに機能可能なように連結された核酸（複数可）を含む発現ベクター（複数可）を特徴とする。別の態様において、本開示は、核酸（複数可）または発現ベクター（複数可）を含む、単離された細胞を特徴とする。

20

#### 【0026】

別の態様において、本開示は、プロモーターに機能可能なように連結された、本開示の抗体のVHを含む第1のポリペプチドをコードする第1の核酸、を含む第1の発現ベクター、及びプロモーターに機能可能なように連結された、本開示の抗体のVLを含む第2のポリペプチドをコードする第2の核酸、を含む第2の発現ベクター、を含む単離された細胞を特徴とする。

30

#### 【0027】

さらに別の態様において、本開示は、本開示の細胞を培養し、抗体を単離することを含む、本開示の抗体を作製する方法を特徴とする。別の態様において、本開示は、本開示の抗体及び薬学的に許容される担体を含む医薬組成物を特徴とする。別の態様において、本開示は、本開示の抗体及び薬剤を含むコンジュゲートを特徴とする。

#### 【0028】

いくつかの実施形態において、薬剤は核酸である。いくつかの実施形態において、核酸は、mRNA、siRNA、アンチセンスオリゴヌクレオチド、マイクロRNA（miRNA）、ガイドRNA（gRNA）、またはホスホロアミデートモルホリノオリゴマー（PMO）である。いくつかの実施形態において、核酸は、アンチセンスオリゴヌクレオチドである。いくつかの実施形態において、薬剤は、リンカーを介して抗体に連結される。

40

#### 【0029】

別の態様において、本開示は、*in vivo*における薬剤送達方法を特徴とし、当該方法は、ヒト対象に本開示のコンジュゲートを投与することを含む。いくつかの実施形態において、（a）ヒト対象は筋疾患、筋萎縮症、動脈硬化性疾患、心臓関連疾患、またはリソソーム蓄積症を有し、本方法は薬剤を筋組織に送達するものである、（b）ヒト対象は神経障害（例えば、脳疾患）を有し、本方法は薬剤を脳組織に送達するものである、（c）ヒト対象は肝疾患を有し、本方法は薬剤を肝細胞に送達するものである、（d）ヒト対象はがんを有し、本方法は薬剤を腫瘍細胞に送達するものである、または（e）ヒト対象は免疫障害を有し、本方法は薬剤を免疫細胞に送達するものである。

50

## 【図面の簡単な説明】

## 【0030】

【図1A】Union CDR（下線）によるANTIBODY - A抗TfR1抗体ファミリーのVH配列アライメントである。

【図1B】Union CDR（下線）によるANTIBODY - B抗TfR1抗体ファミリーのVH配列アライメントである。

【図1C】Union CDR（下線）によるANTIBODY - A抗TfR1抗体ファミリーのVL配列アライメントである。

【図1D】Union CDR（下線）によるANTIBODY - B抗TfR1抗体ファミリーのVL配列アライメントである。

10

【図2A】ChothiaのCDR（下線）によるANTIBODY - A抗TfR1抗体ファミリーのVH配列アライメントである。

【図2B】ChothiaのCDR（下線）によるANTIBODY - B抗TfR1抗体ファミリーのVH配列アライメントである。

【図2C】ChothiaのCDR（下線）によるANTIBODY - A抗TfR1抗体ファミリーのVL配列アライメントである。

【図2D】ChothiaのCDR（下線）によるANTIBODY - B抗TfR1抗体ファミリーのVL配列アライメントである。

【図3】3.4 分解能のクライオEM密度に組み込んだ、内在性リガンドであるトランスフェリンの存在下でヒトトランスフェリン受容体に結合したヒト化ANTIBODY - A Fabの原子モデルである。

20

【図4】ANTIBODY - Aエピトープを有するトランスフェリン受容体アピカルドメイン配列の部分的アライメントである。ヒトトランスフェリン受容体外部ドメインに結合したANTIBODY - AのクライオEM構造で観察された、ANTIBODY - A Fabから5 以内の残基は、灰色でハイライトしている。ヒトトランスフェリン受容体と異なるエピトープ残基は太字のものである。厳密に保存された残基はアスタリスクで、強度に保存された残基はコロンで、中程度に保存された残基はピリオドで示している。配列供給源：ヒト（Homo sapiens、Uniprot P02786.2）、カニクイザル（Macaca fascicularis、Uniprot G8F602）、マウス（Mus musculus、GenBank NP\_035768.1）。

30

【図5】3.96 分解能のクライオEM密度に組み込んだ、内在性リガンドであるトランスフェリンの存在下でヒトトランスフェリン受容体に結合したヒト化ANTIBODY - B Fabの原子モデルである。

【図6】ANTIBODY - Bエピトープを有するトランスフェリン受容体プロテアーゼ様ドメイン配列の部分的アライメントである。cynoトランスフェリン受容体外部ドメインに結合したANTIBODY - BのクライオEM構造で観察された、ANTIBODY - Bから5 以内の残基は、灰色でハイライトしている。ヒトトランスフェリン受容体と異なるエピトープ残基は太字のものである。厳密に保存された残基はアスタリスクで、強度に保存された残基はコロンで、中程度に保存された残基はピリオドで示している。配列供給源：ヒト（Homo sapiens、Uniprot P02786.2）、カニクイザル（Macaca fascicularis、Uniprot G8F602）、マウス（Mus musculus、GenBank NP\_035768.1）。

40

【図7A】タンパク質インデックス1（「A」）、タンパク質インデックス2（「B」）、タンパク質インデックス3（「C」）、及びタンパク質インデックス4（「D」）に対応する抗体の構造を描写している。

【図7B】タンパク質インデックス5、6、7、8、9、10、11、及び12に対応する抗体の構造を描写している。

【図7C】タンパク質インデックス13、14、15、16、17、18、19、及び20に対応する抗体の構造を描写している。

【図7D】タンパク質インデックス21に対応する抗体の構造を描写している。

50

【図 7 E】タンパク質インデックス 2 2 に対応する抗体の構造を描写している。

【図 8 A】カニクイザルトランスフェリン受容体 ( c y T f R ) に結合している、タンパク質インデックス 1、2、3、及び 4 で識別される抗体を表すグラフである。

【図 8 B】ヒトトランスフェリン受容体 ( h u T f R ) に結合している、タンパク質インデックス 1、2、3、及び 4 で識別される抗体を表すグラフである。

【図 9 A】ヒトトランスフェリン受容体に結合している、タンパク質インデックス 1 及び 2 で識別される抗体によるトランスフェリンの排除を表すグラフである。

【図 9 B】ヒトトランスフェリン受容体に結合している、タンパク質インデックス 3 及び 4 で識別される抗体によるトランスフェリンの排除を表すグラフである。

【図 1 0】ヒトトランスフェリン受容体に結合している、タンパク質インデックス 3 ( 「 x 」 ) 及びタンパク質インデックス 1 4 ( 三角形 ) で識別される抗体によるトランスフェリンの排除を表すグラフである。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 3 1 】

本開示は、トランスフェリン受容体 1 ( T f R 1 ) に特異的に結合する抗体を提供するものである。関連するポリペプチド、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、当該抗体を含む組成物及びコンジュゲート、当該抗体の作製方法、ならびに当該組成物及びコンジュゲートを送達する方法も提供される。本開示はまた、新規の抗 T f R 抗体の使用方法を提供するものである。

【 0 0 3 2 】

定義

本明細書で別途定義されない限り、本記載で使用される技術用語及び科学用語は、当業者により一般的に理解されている意味を有する。本明細書の解釈のために、以下の用語説明が適用され、適切な場合は常に、単数形で使用される用語には複数形も含まれ、その逆もまた同様である。記載された用語の任意の説明が、参照により本明細書に組み込まれる任意の文書と矛盾する場合、下記の使用の説明が優先されるものとする。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、少なくとも 1 つの抗原結合部位を介して標的を認識し、その標的に結合する免疫グロブリン分子を指す。「抗体」は、本明細書において最も広い意味で使用され、「抗体フラグメント」及び「抗原結合フラグメント」を含む、様々な抗体構造を包含する。したがって、「抗体」という用語には、限定されないが、所望の抗原結合活性を示す限り、組み換え抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、二重特異性抗体、多重特異性抗体、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、一本鎖 F v ( s c F v ) 抗体、及び抗体フラグメントが含まれる。

【 0 0 3 4 】

「インタクトな抗体」または「全長抗体」という用語は、天然の抗体構造と実質的に類似する構造を有する抗体を指す。これには、例えば、2 つの軽鎖 ( それぞれが可変領域及び軽鎖定常領域 ( C L ) を含む ) 及び 2 つの重鎖 ( それぞれが可変領域ならびに少なくとも重鎖定常領域 C H 1、C H 2、及び C H 3 ならびに C H 1 領域と C H 2 領域との間のヒンジ領域を含む ) を含む抗体が含まれる。

【 0 0 3 5 】

本明細書で使用される場合、「抗原結合フラグメント」という用語は、抗体の一部及び抗原結合部位を含む、インタクトな抗体以外の分子を指す。抗体フラグメントの例としては、限定されないが、F a b、F a b'、F ( a b' )<sub>2</sub>、F v、一本鎖抗体分子 ( 例えば、s c F v、s c ( F v )<sub>2</sub> )、ジスルフィド連結 s c F v ( d s s c F v )、ダイアボディ、トリボディ、テトラボディ、ミニボディ、二重可変領域抗体 ( D V D )、単一可変領域抗体 ( 例えば、ラクダ科抗体 )、及び抗体フラグメントから形成される多重特異性抗体が挙げられる。

【 0 0 3 6 】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、単一の抗原決定基

10

20

30

40

50

またはエピトープを高度に特異的に認識し、それに結合することに関与する、実質的に均質な抗体集団を指す。「モノクローナル抗体」という用語は、インタクト及び全長モノクローナル抗体ならびに抗体フラグメント（例えば、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv）、一本鎖抗体（例えば、scFv）、抗体フラグメントを含む融合タンパク質、及び少なくとも1つの抗原結合部位を含む任意の他の改変免疫グロブリン分子を包含する。さらに、「モノクローナル抗体」は、限定されないが、ハイブリドーマ産生、ファージディスプレイライブラリー、組み換え発現、及び遺伝子導入動物を含む、任意の数の技法により作製されたそのような抗体を指す。

【0037】

「キメラ抗体」という用語は、重鎖及び/または軽鎖の一部が第1の供給源または種に由来し、重鎖及び/または軽鎖の残りが異なる供給源または種に由来する抗体を指す。 10

【0038】

本明細書で使用される場合、「ヒト化抗体」という用語は、ヒト重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗体であって、天然のCDRアミノ酸残基が、非ヒト抗体（例えば、マウス、ラット、ウサギ、または非ヒト霊長類）由来の対応するCDR残基により置き換えられており、当該非ヒト抗体は、所望の特異性、親和性、及び/または活性を有する、前記抗体を指す。いくつかの実施形態において、ヒト重鎖可変領域またはヒト軽鎖可変領域の1つ以上のフレームワーク領域アミノ酸残基は、非ヒト抗体に由来する対応する残基により置き換えられている。さらに、ヒト化抗体は、ヒト抗体または非ヒト抗体には見られないアミノ酸残基を含み得る。いくつかの実施形態において、これらの改変は、抗体特性をさらに改良及び/または最適化するためになされる。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域の少なくとも一部（例えば、CH1、ヒンジ、CH2、CH3、Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリンのそれを含む。 20

【0039】

本明細書で使用される場合、「ヒト抗体」という用語は、ヒトにより産生される抗体に対応するアミノ酸配列を有する抗体、及び/または当業者に既知であるヒト抗体を作製するための技法のいずれかを使用して作製されている抗体を指す。これらの技法としては、限定されないが、ファージディスプレイライブラリー、酵母ディスプレイライブラリー、遺伝子導入動物、組み換えタンパク質産生、及びB細胞ハイブリドーマ技法が挙げられる。 30

【0040】

「エピトープ」及び「抗原決定基」という用語は、本明細書では互換的に使用され、特定の抗体により認識及び結合されることが可能な抗原または標的の一部を指す。抗原または標的がポリペプチドである場合、エピトープは、隣接アミノ酸及びタンパク質の三次フォールディングにより並置される非隣接アミノ酸の両方から形成され得る。隣接アミノ酸から形成されるエピトープ（線状エピトープとも呼ばれる）は通常、タンパク質変性時に保持されるが、三次フォールディングにより形成されるエピトープ（コンフォメーションエピトープとも呼ばれる）は通常、タンパク質変性時に失われる。エピトープは通常、特有の空間的立体構造において、少なくとも3つの、より一般には、少なくとも5、6、7、または8～10のアミノ酸を含む。エピトープは、インターネット上で利用可能な多数のソフトウェアバイオインフォマティクスツールのいずれか1つを用いて予測され得る。X線結晶構造解析または電子顕微鏡法（例えば、クライオ電子顕微鏡法）は、抗原/抗体複合体のアミノ酸残基相互作用を分析することによって、標的タンパク質上のエピトープを特性評価するために使用されることがある。 40

【0041】

本明細書で使用される場合、「特異的に結合する」または「結合する」という用語は、特定の抗原、エピトープ、タンパク質、または標的分子に対して、別の物質よりも、より頻繁に、より迅速に、より持続的に、より高い親和性で、または上記のいくつかの組み合わせで相互作用する抗体を指す。抗原に特異的に結合する抗体は、例えば、イムノアッセイ、ELISA、表面プラズモン共鳴法（SPR）、または当業者に既知の他の技法によ 50

り同定することができる。いくつかの実施形態において、抗原（例えば、ヒト T f R 1）に特異的に結合する抗体は、関連する抗原（例えば、c y n o T f R 1）に結合し得る。抗原に特異的に結合する抗体は、異なる抗原に対するその親和性よりも高い親和性で標的抗原に結合することができる。異なる抗原とは、関連する抗原であり得る。いくつかの実施形態において、抗原に特異的に結合する抗体は、異なる抗原に対するその親和性よりも、少なくとも 20 倍高い、少なくとも 30 倍高い、少なくとも 40 倍高い、少なくとも 50 倍高い、少なくとも 60 倍高い、少なくとも 70 倍高い、少なくとも 80 倍高い、少なくとも 90 倍高い、または少なくとも 100 倍高い親和性で標的抗原に結合し得る。いくつかの実施形態において、特定の抗原に特異的に結合する抗体は、本明細書に記載されるアッセイまたは他の当該技術分野で既知の方法を使用して結合を検出できないほど低い親和性で異なる抗原に結合する。いくつかの実施形態において、親和性は、本明細書に記載される、または当業者に既知の B i a c o r e システムにおける S P R 技術を使用して測定される。

10

#### 【0042】

「ポリペプチド」及び「ペプチド」ならびに「タンパク質」という用語は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さのアミノ酸ポリマーを指す。ポリマーは直鎖または分岐鎖であり得、ポリマーは修飾アミノ酸を含んでいてもよく、ポリマーは非アミノ酸に割り込まれていてもよい。また、当該用語には、天然にまたは介入により修飾されている（例えば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質修飾、アセチル化、リン酸化、または任意の他の操作もしくは修飾）アミノ酸ポリマーも包含される。例えば、限定されないが、非天然アミノ酸を含む 1 つ以上のアミノ酸アナログ、ならびに当該技術分野で既知の他の修飾物を含むポリペプチドもこの定義に含まれる。本開示のポリペプチドは抗体に基づくものであり得るので、「ポリペプチド」という用語には、単鎖としてのポリペプチド及び 2 つ以上の関連する鎖のポリペプチドが包含されると理解される。

20

#### 【0043】

「ポリヌクレオチド」ならびに「核酸」及び「核酸分子」という用語は、本明細書では互換的に使用され、任意の長さのヌクレオチドポリマーを指し、DNA 及び RNA を含む。ヌクレオチドは、デオキシリボヌクレオチド、リボヌクレオチド、修飾ヌクレオチドもしくは塩基、及び/またはそれらのアナログ、あるいは DNA または RNA ポリメラーゼによりポリマーに組み込まれ得る任意の基質であり得る。

30

#### 【0044】

2 つ以上の核酸またはポリペプチドとの関係における「同一である」またはパーセント「同一性」という用語は、いずれの保存的アミノ酸置換も配列同一性の一部として考慮せず、対応関係を最大にして比較及びアライメント（必要に応じて、ギャップを導入）した場合に、同一であるか、または同一のヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を特定の割合で有する、2 つ以上の配列または部分配列を指す。パーセント同一性は、配列比較ソフトウェアもしくはアルゴリズムを使用して測定され得るかまたは目視検査により測定され得る。アミノ酸またはヌクレオチド配列のアライメントを得るために使用され得る種々のアルゴリズム及びソフトウェアは、当該技術分野で周知である。これらには、限定されないが、B L A S T、A L I G N、M e g a l i g n、B e s t F i t、G C G W i s c o n s i n P a c k a g e、及びそれらのバリエーションが含まれる。いくつかの実施形態において、本開示の 2 つの核酸またはポリペプチドは実質的に同一であり、このことは、それらが、対応関係を最大にして比較及びアライメントした場合に、配列比較アルゴリズムを使用して測定するかまたは目視検査により測定して、少なくとも 70 %、少なくとも 75 %、少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、いくつかの実施形態では、少なくとも 95 %、96 %、97 %、98 %、99 % のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の同一性を有することを意味する。いくつかの実施形態において、同一性は、少なくとも約 10 個、少なくとも約 20 個、少なくとも約 20 ~ 40 個、少なくとも約 40 ~ 60 個のヌクレオチドまたはアミノ酸残基、少なくとも約 60 ~ 80 個のヌクレオチドまたはアミノ酸残基の長さ、またはそれらの間にある任意の整数値である長さの配列領域にわた

40

50

って存在する。いくつかの実施形態において、同一性は、60～80個のヌクレオチドまたはアミノ酸残基よりも長い領域、例えば、少なくとも約80～100個のヌクレオチドまたはアミノ酸残基にわたって存在し、いくつかの実施形態では、配列は、比較される配列、例えば、(i)ヌクレオチド配列のコード領域または(ii)アミノ酸配列の全長にわたって実質的に同一である。

**【0045】**

本明細書で使用される場合、「保存的アミノ酸置換」という語句は、1つのアミノ酸残基が類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基で置き換えられる置換を指す。塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファン）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含む、類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーが、当該技術分野で一般に定義されている。例えば、フェニルアラニンのチロシンへの置換は、保存的置換であるとみなされる。概して、ポリペプチド及び/または抗体の配列における保存的置換により、標的結合部位へのポリペプチドまたは抗体の結合は抑止されない。結合を消失させないヌクレオチド及びアミノ酸の保存的置換を同定する方法は、当該技術分野で周知である。

10

**【0046】**

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、宿主細胞中に1つ以上の目的の遺伝子（複数可）または配列（複数可）を送達し、通常、発現させることが可能なコンストラクトを意味する。ベクターの例としては、限定されないが、ウイルスベクター、裸のDNAもしくはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミド、またはファージベクター、カチオン性縮合剤と関連するDNAもしくはRNA発現ベクター、及びリポソーム中に包埋されたDNAもしくはRNA発現ベクターが挙げられる。

20

**【0047】**

本明細書で使用される場合、「単離された」という用語は、天然では見られない形態であるポリペプチド、可溶性タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物を指す。「単離された」抗体には、その由来となる供与細胞に由来する物質が実質的に含まれない。いくつかの実施形態において、単離されたポリペプチド、可溶性タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、それらがもはや天然に見られる形態ではない程度に精製されているものである。いくつかの実施形態において、単離されたポリペプチド、可溶性タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、実質的に純粋である。ポリペプチド、可溶性タンパク質、抗体、ポリヌクレオチド、ベクター、細胞、または組成物は、天然の供給源（例えば、組織）から、または操作された細胞株等の供給源から単離され得る。

30

**【0048】**

本明細書で使用される場合、「実質的に純粋な」という用語は、少なくとも50%純粋な（すなわち、夾雑物を含まない）、少なくとも90%純粋な、少なくとも95%純粋な、少なくとも98%純粋な、または少なくとも99%純粋な原料を指す。

40

**【0049】**

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される」という用語は、ヒトを含む動物に使用するために、規制当局により承認されるかもしくは承認可能な物質、または米国薬局方、欧州薬局方、もしくは他の一般に認められた薬局方に記載されている物質を指す。

**【0050】**

本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される賦形剤、担体、またはアジュバント」という用語は、少なくとも1つの本開示の抗体と共に対象に投与することができ、一般に安全、非毒性であり、治療薬の薬理的活性に効果を及ぼさない賦形剤、担体、またはアジュバントを指す。一般に、当業者及び米国FDAは、薬学的に許容される賦形剤、担

50

体、またはアジュバントを、任意の製剤の不活性成分であるとみなしている。

【0051】

本明細書で使用される場合、「医薬組成物」という用語は、抗体の生物学的活性が有効であることを可能にするような形態である調製物を指す。医薬製剤または医薬組成物は一般に、例えば、薬学的に許容される賦形剤、担体、アジュバント、緩衝液などの追加の構成成分を含む。

【0052】

本明細書で使用される場合、「コンジュゲート」という用語は、2つの物質が共有結合によって連結された組み合わせ（例えば、治療薬に接続された本開示の抗体）を指す。コンジュゲートにおいて、2つの物質は直接結び付けられていてもよく、またはリンカーを介して結び付けられていてもよい。本開示において、2つの物質の一方は本開示の抗体であり、他方は薬物（例えば、生理活性物質）である。リンカーは、切断可能なリンカーまたは切断不可能なリンカーであり得る。

【0053】

本明細書で使用される場合、「有効量」または「治療有効量」という用語は、目的とする組織に到達させるのに必要な本開示の抗体の量、または（i）対象における疾患、障害もしくは病状、及び/または（ii）対象における症状の重症度及び/または持続期間を低減及び/または改善するのに十分な、本開示の抗体と治療薬とを含むコンジュゲート、融合タンパク質もしくは融合ポリペプチド、または複合体の量を指す。当該用語には、（i）所与の疾患、障害、もしくは病状の発症もしくは進行を低減または改善すること、（ii）所与の疾患、障害、もしくは病状の再発、発症、もしくは発病を低減または改善すること、及び/または（iii）別の薬剤もしくは療法（例えば、本明細書で提供されるコンジュゲート以外の薬剤）の予防効果（複数可）もしくは治療効果（複数可）を改良または増強すること、に必要なコンジュゲートの量も包含される。

【0054】

本明細書で使用される場合、「治療効果」という用語は、（i）対象における疾患、障害、もしくは病状、及び/または（ii）対象における症状の重症度及び/または持続期間を低減及び/または改善する薬剤（例えば、本開示の抗体、コンジュゲート、融合タンパク質もしくは融合ポリペプチド、または抗体を含む複合体）の効果及び/または能力を指す。当該用語には、（i）所与の疾患、障害、もしくは病状の発症もしくは進行を低減または改善すること、（ii）所与の疾患、障害、もしくは病状の再発、発症、もしくは発病を低減または改善すること、及び/または（iii）別の薬剤もしくは療法（例えば、本明細書で提供されるコンジュゲート以外の薬剤）の予防効果（複数可）もしくは治療効果（複数可）を改良または増強すること、に対する薬剤（例えば、コンジュゲート）の能力も包含される。

【0055】

本明細書で使用される場合、「約」または「およそ」が付く値またはパラメーターへの言及には、その値またはパラメーターを目的とする実施形態が含まれる（及び記載される）。例えば、「約X」に言及している記載には、「X」の記載が含まれる。「約X」とは、Xの+/-10%を意味する。そのため、「約10」とは、9~11の値を意味する。

【0056】

TfR1及び抗TfR1抗体

CD71としても知られるトランスフェリン受容体は、人体の様々な部位において異なるレベルで発現している膜貫通型糖タンパク質であり、その機能は、血漿糖タンパク質であるトランスフェリンからの鉄の細胞内への取り込みを媒介することである。トランスフェリンからの鉄の取り込みには、トランスフェリン受容体へのトランスフェリンの結合、受容体介在性エンドサイトーシスによるエンドサイトーシス小胞内でのトランスフェリンの内在化、及びエンドソームのpH低下による当該タンパク質からの鉄の放出が必要とされる。Ponka P, Lok CN. Int J Biochem Cell Biol. 1999 Oct; 31(10): 1111-37及びXiaopeng Mo,

10

20

30

40

50

in Brain Targeted Drug Delivery System, 2019。TfRは、筋肉（例えば、心筋及び腓腹筋）で高発現している。アポトランスフェリン（すなわち、非鉄コンジュゲート）は、2つの鉄3+イオンに結合してホロトランスフェリン（すなわち、鉄コンジュゲート）を形成すると、TfRに結合する。TfRとホロトランスフェリンとの複合体は、受容体介在性エンドサイトーシスにより細胞内に移行する。CD71及びトランスフェリンはエンドソーム環境で解離し、トランスフェリンは細胞内に移動し、CD71は細胞膜へとリサイクルされる。したがって、トランスフェリンは、TfRに対して適切に結合し、適切に解離することによって、細胞内に移行すると考えられている。トランスフェリン受容体システムは、抗がん剤及びタンパク質、治療遺伝子を悪性細胞内へ送達するため、及び他の治療薬を血液脳関門を通過させて脳へ送達するために利用されてきた。

10

【0057】

ヒト及びカニクイザルでは、TfR1及びTfR2という2種のトランスフェリン受容体が特性評価されている。TfR1はユビキタスに発現している高親和性の受容体であるが、TfR2の発現は特定の細胞型に限定されており、細胞内の鉄濃度による影響を受けない。TfR2は、TfR1より25～30倍低い親和性でトランスフェリンに結合する。本開示の抗体は、TfR1に結合する。

【0058】

ヒトTfR1 (UniProt No. P02786.2)、カニクイザルTfR1 ("cyno" TfR1 (Genbank No. XP\_005545315.1)、及びマウスTfR1 (Genbank No. NP\_035768.1)の代表的なアミノ酸 (aa) 配列は、それぞれ配列番号1、配列番号2、及び配列番号3として本明細書に示される。本明細書で使用される場合、TfR1のアミノ酸位置に対する言及は、シグナル配列を含むアミノ酸配列のナンバリングに言及するものである。ヒトTfR1、cyno TfR1、及びマウスTfR1の配列は以下の通りである：

ヒトTfR1 (UniProt No. P02786.2、配列番号1)  
MMDQARS AFSNLF GG EPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKL  
AVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFFLIG  
FMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAAR  
RLYWDDLKRKLSEKLDSTDFGTIKLLNENSYPREAGSQ  
KDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDS AQNSV  
IIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFGTK  
KDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAE SLNAIGVL  
IYMDQTKFP IVNAELSF FGH AHLGTGDPYTPGFPSFNHTQ  
FPPSRSSGLPNIPVQTISR AAEKLFGNMEGDCPSDWKTD  
STCRMVTSESKNVKLT VSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPD  
HYVVVGAQRDAWGP GAAKSGVGTALLKLAQMFS DMVLKD  
GFQPSRSIIFASWSAGDFGSV GATEWLEGYLSSLHLK AFT  
YINLDKAVLGT SNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQ  
FLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYS GIPAVSFCFCED  
TDYPYLGT TMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIK  
LTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSLQ  
WLYSARGDFFRATSR LTTDFGNAEKTD R FVMKKLNDRVMR  
VEYHFLSPYVSPKES PFRHVFWGSGSHTLPALLENLKLRK  
QNNGAFNETLFRNQ LALATWTIQGAANALS GDVWDIDNEF

30

40

Cyno TfR1 (UniProt No. G8F602、配列番号2)  
MMDQARS AFSNLF GG EPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMKL  
AVDDEENADNNTKANGTKPKRCGGNICYGTIAV IIFFLIG  
FMIGYLG YCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAP  
RLYWDDLKRKLSEKLD TTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQ

50

K D E N L A L Y I E N Q F R E F K L S K V W R D Q H F V K I Q V K D S A Q N S V  
 I I V D K N G G L V Y L V E N P G G Y V A Y S K A A T V T G K L V H A N F G T K  
 K D F E D L D S P V N G S I V I V R A G K I T F A E K V A N A E S L N A I G V L  
 I Y M D Q T K F P I V K A D L S F F G H A H L G T G D P Y T P G F P S F N H T Q  
 F P P S Q S S G L P N I P V Q T I S R A A A E K L F G N M E G D C P S D W K T D  
 S T C K M V T S E N K S V K L T V S N V L K E T K I L N I F G V I K G F V E P D  
 H Y V V V G A Q R D A W G P G A A K S S V G T A L L L K L A Q M F S D M V L K D  
 G F Q P S R S I I F A S W S A G D F G S V G A T E W L E G Y L S S L H L K A F T  
 Y I N L D K A V L G T S N F K V S A S P L L Y T L I E K T M Q D V K H P V T G R  
 S L Y Q D S N W A S K V E K L T L D N A A F P F L A Y S G I P A V S F C F C E D 10  
 T D Y P Y L G T T M D T Y K E L V E R I P E L N K V A R A A A E V A G Q F V I K  
 L T H D T E L N L D Y E R Y N S Q L L L F L R D L N Q Y R A D V K E M G L S L Q  
 W L Y S A R G D F F R A T S R L T T D F R N A E K R D K F V M K K L N D R V M R  
 V E Y Y F L S P Y V S P K E S P F R H V F W G S G S H T L S A L L E S L K L R R  
 Q N N S A F N E T L F R N Q L A L A T W T I Q G A A N A L S G D V W D I D N E F  
 マウス T f R 1 ( G e n b a n k N o . N P \_ 0 3 5 7 6 8 . 1、配列番号 3 )  
 M M D Q A R S A F S N L F G G E P L S Y T R F S L A R Q V D G D N S H V E M K L  
 A A D E E E N A D N N M K A S V R K P K R F N G R L C F A A I A L V I F F L I G  
 F M S G Y L G Y C K R V E Q K E E C V K L A E T E E T D K S E T M E T E D V P T 20  
 S S R L Y W A D L K T L L S E K L N S I E F A D T I K Q L S Q N T Y T P R E A G  
 S Q K D E S L A Y Y I E N Q F H E F K F S K V W R D E H Y V K I Q V K S S I G Q  
 N M V T I V Q S N G N L D P V E S P E G Y V A F S K P T E V S G K L V H A N F G  
 T K K D F E E L S Y S V N G S L V I V R A G E I T F A E K V A N A Q S F N A I G  
 V L I Y M D K N K F P V V E A D L A L F G H A H L G T G D P Y T P G F P S F N H  
 T Q F P P S Q S S G L P N I P V Q T I S R A A A E K L F G K M E G S C P A R W N  
 I D S S C K L E L S Q N Q N V K L I V K N V L K E R R I L N I F G V I K G Y E E  
 P D R Y V V V G A Q R D A L G A G V A A K S S V G T G L L L K L A Q V F S D M I  
 S K D G F R P S R S I I F A S W T A G D F G A V G A T E W L E G Y L S S L H L K  
 A F T Y I N L D K V V L G T S N F K V S A S P L L Y T L M G K I M Q D V K H P V  
 D G K S L Y R D S N W I S K V E K L S F D N A A Y P F L A Y S G I P A V S F C F 30  
 C E D A D Y P Y L G T R L D T Y E A L T Q K V P Q L N Q M V R T A A E V A G Q L  
 I I K L T H D V E L N L D Y E M Y N S K L L S F M K D L N Q F K T D I R D M G L  
 S L Q W L Y S A R G D Y F R A T S R L T T D F H N A E K T N R F V M R E I N D R  
 I M K V E Y H F L S P Y V S P R E S P F R H I F W G S G S H T L S A L V E N L K  
 L R Q K N I T A F N E T L F R N Q L A L A T W T I Q G V A N A L S G D I W N I D  
 N E F

【 0 0 5 9 】

本開示は、T f R 1 に結合する抗体を提供するものである。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 フラグメントに結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 の細胞外ドメインに結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 のプロテアーゼ様ドメイン、ヘリカルドメイン、及び/またはアピカルドメイン（複数可）に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 上のコンフォメーションエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 のアピカルドメインに位置するコンフォメーションエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 のプロテアーゼ様ドメインに位置するコンフォメーションエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 のヘリカルドメインに位置するコンフォメーションエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、ヒト T f R 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、c y n o T f R 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、ヒト T f R 1 及 40 50

び cyno TfR1 に結合する。

【0060】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のアミノ酸K231～E369の範囲内で全体的または部分的にヒトTfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のK231～E369の範囲内にあるアミノ酸を含むエピトープにおいてヒトTfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のK231～E369の範囲内にあるアミノ酸のうち少なくとも1つのアミノ酸に結合する。

【0061】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のアミノ酸D139～K145及びG490～E582の範囲内で全体的または部分的にヒトTfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のD139～K145及びG490～E582の範囲内にあるアミノ酸を含むエピトープにおいてヒトTfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のD139～K145及びG490～E582の範囲内にある少なくとも1つのアミノ酸に結合する。

【0062】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ヒトTfR1またはカニクイザルTfR1の不連続性エピトープに特異的に結合する。一例では、抗TfR1抗体はヒトTfR1に特異的に結合し、当該抗体は、残基K231、D245、L246、Y247、T248、P249、E350、G351、D352、C353、P354、S355、D356、K358、T359、D360、S361、R364、M365、V366、T367、及びE369からなる群より選択される1つ以上の残基に結合する。別の例では、抗TfR1抗体はカニクイザルTfR1に特異的に結合し、当該抗体は、残基K231、D245、L246、D247、S248、P249、E350、G351、D352、C353、P354、S355、D356、K358、T359、D360、S361、K364、M365、V366、T367、及びE369からなる群より選択される1つ以上の残基に結合する。一例では、抗TfR1抗体はヒトTfR1に特異的に結合し、当該抗体は、残基D139、T141、K145、G490、T491、V517、T518、Y573、K574、I577、E578、R579、I580、P581、及びE582からなる群より選択される1つ以上の残基に結合する。別の例では、抗TfR1抗体はカニクイザルTfR1に特異的に結合し、当該抗体は、残基D139、T141、K145、G490、T491、V517、T518、Y573、K574、V577、E578、R579、I580、P581、及びE582からなる群より選択される1つ以上の残基に結合する。

【0063】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のアミノ酸D139～E582の範囲内にある1つ以上のアミノ酸においてヒトTfR1に結合し、当該1つ以上のアミノ酸は、以下の配列：D139～E369、D139～E582、T141～E369、T141～E582、K145～E369、K145～E582、K231～E369、K231～E582、D245～E369、D245～E582、E350～E369、E350～E582、K358～E369、K358～E582、R364～E369、R364～E582、G490～E582、V517～E582、K573～E582、I577～E582、及び/またはY573～E582のいずれかの範囲内にある。

【0064】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1の以下のアミノ酸：K231、D245～P249、E244～V250、E350～S361、M349～T362、R364～E369、及び/またはC363～S370のうち1つ以上においてヒトTfR1に結合する。

【0065】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のアミノ酸K231～S370の範囲内にある1つ以上のアミノ酸に結合する。

【0066】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号1のアミノ酸D139～L583の範囲内にある1つ以上のアミノ酸においてヒトTfR1に結合し、当該1つ以上のアミノ酸は、以下の配列：D139～T141、D139～K145、T141～K145、T138～K145、T138～L146、G490～T491、L489～T491、L489～S492、V517～T518、P516～T518、P516～G519、Y573～E582、Y573～L583、T572～E582、及び/またはT572～L583のいずれかの範囲内にある。

10

【0067】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ヒトTfR1（配列番号1）のアミノ酸607～760に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合し、例えば、当該抗体は、ヒトTfR1のアミノ酸607～730、607～700、607～670、640～760、640～730、640～700、670～760、670～730、700～760、または730～760に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合する。

【0068】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ヒトTfR1（配列番号1）のアミノ酸189～383に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合し、例えば、当該抗体は、ヒトTfR1のアミノ酸189～350、189～320、189～290、189～260、189～230、220～383、220～350、220～320、220～290、220～260、230～383、230～350、230～320、230～290、230～260、240～383、240～350、240～320、240～290、240～260、250～383、250～350、250～320、250～290、280～383、280～350、280～320、310～383、310～350、330～383、330～370、340～370、340～383、350～370、または350～383に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ヒトTfR1のアミノ酸208～348に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ヒトTfR1のアミノ酸340～370に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ヒトTfR1のアミノ酸190～230に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合する。

20

30

【0069】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ヒトTfR1（配列番号1）のアミノ酸122～188に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合し、例えば、当該抗体は、ヒトTfR1のアミノ酸122～170、122～150、130～188、130～170、130～150、140～188、140～170、150～188、または150～170に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合する。

【0070】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ヒトTfR1（配列番号1）のアミノ酸384～606に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合し、例えば、当該抗体は、ヒトTfR1のアミノ酸384～570、384～540、384～510、384～480、384～450、384～420、410～606、410～570、410～540、410～510、410～480、410～450、440～606、440～570、440～540、440～510、440～480、470～606、470～590、470～570、470～540、470～510、490～606、490～590、490～570、490～540、490～510、510～606、510～590、510～570、510～540、540～606、540～590、540～570、570～590、または570～606に及ぶ領域内の1つ以上の残基に結合する。

40

【0071】

50

いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、TfR1の細胞外ドメインに結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、TfR1のプロテアーゼ様ドメイン、ヘリカルドメイン、及び/またはアピカルドメイン（複数可）に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、TfR1上のコンフォメーションエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、TfR1のアピカルドメインに位置するコンフォメーションエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、TfR1のプロテアーゼ様ドメインに位置するコンフォメーションエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、TfR1のヘリカルドメインに位置するコンフォメーションエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、ヒトTfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、cyno TfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1 Ab（例えば、本明細書に記載されるANTIBODY AまたはANTIBODY B）は、ヒトTfR1及びcyno TfR1に結合する。

10

20

#### 【0072】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は組み換え抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はモノクローナル抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はキメラ抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はヒト化抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はヒト抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はIgA、IgD、IgE、IgG、またはIgM抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はIgG抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はIgG1抗体である。いくつかの実施形態において、抗体はIgG2抗体である。いくつかの実施形態では、抗体はIgG3抗体である。いくつかの実施形態様において、抗体はIgG4抗体である。いくつかの例では、抗体はヒトカップ軽鎖定常領域を含む。他の実施形態において、抗体はヒトラムダ軽鎖定常領域を含む。いくつかの実施形態において、抗体は抗原結合部位を含む抗体フラグメントである。いくつかの実施形態において、抗体はscFvである。いくつかの実施形態において、抗体はジスルフィド連結scFvである。いくつかの実施形態において、抗体は、二重特異性抗体または多重特異性抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は一価抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は単特異性抗体である。いくつかの実施形態において、抗体は二価抗体である。

30

#### 【0073】

いくつかの例では、抗体は、Fab、Fab'、F(ab)<sub>2</sub>、scFv、sc(Fv)<sub>2</sub>、ダイアボディ、またはナノボディである。いくつかの実施形態において、抗体または抗原結合フラグメント（例えば、Fab）における鎖間ジスルフィドは除去される。FabまたはFab'は、可変重鎖ドメイン（VH）及び可変軽鎖ドメイン（VL）を含有する。

40

#### 【0074】

いくつかの実施形態において、抗体は単離される。いくつかの実施形態において、抗体は実質的に純粋である。

#### 【0075】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体はモノクローナル抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に既知の任意の方法によって調製され得る。いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、当業者に既知のハイブリドーマ法を用いて調製される。

50

例えば、マウス、ラット、ウサギ、ハムスター、または他の適切な宿主動物は、ハイブリドーマ法を用いて上記のように免疫化される。いくつかの実施形態において、リンパ球は *in vitro* で免疫化される。いくつかの実施形態において、免疫抗原は、ヒトタンパク質またはそのフラグメントである。いくつかの実施形態において、免疫抗原は、*cyn*oタンパク質またはそのフラグメントである。

#### 【0076】

免疫化に続いて、リンパ球は単離され、例えば、ポリエチレングリコールを使用して適切な骨髓腫細胞株と融合される。ハイブリドーマ細胞は、当該技術分野で知られているように、特殊培地を使用して選択され、融合していないリンパ球及び骨髓腫細胞は、選択プロセスによって排除される。選択した抗原に対して指向性があるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは、限定されないが、免疫沈降、イムノプロットティング、ならびに *in vitro* 結合アッセイ（例えば、フローサイトメトリー、FACS、ELISA、SPR（例えば、Biacore）、及びラジオイムノアッセイ）を含む様々な方法によって同定することができる。所望の特異性、親和性、及び/または活性を有する抗体を産生するハイブリドーマ細胞が同定されると、限界希釈法または他の技法によってクローニングがサブクローニングされ得る。ハイブリドーマは、標準的な方法を用いて *in vitro* 培養液中で増殖させるか、または動物における腹水腫瘍として *in vivo* において増殖させることができる。モノクローナル抗体は、限定されないが、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル電気泳動、及び透析を含む、当該技術分野における標準的な方法に従って、培養液または腹水から精製され得る。

10

20

#### 【0077】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、当業者に既知の組み換えDNA技術を用いて作製される。例えば、抗体をコードするポリヌクレオチドは、成熟B細胞またはハイブリドーマ細胞から（例えば、当該抗体の重鎖及び軽鎖をコードする遺伝子を特異的に増幅する、オリゴヌクレオチドプライマーを用いたRT-PCRによって）単離され、それらの配列は、標準技法を用いて決定される。重鎖及び軽鎖をコードする単離されたポリヌクレオチドは、次いで、適切な発現ベクターにクローニングされる。この適切な発現ベクターは、宿主細胞（他の場合には免疫グロブリンタンパク質を産生しない、*E. coli*、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、または骨髓腫細胞）内にトランスフェクトされるとモノクローナル抗体を産生する。

30

#### 【0078】

いくつかの実施形態において、組み換えモノクローナル抗体は、所望の種の可変ドメインまたはCDRを発現するファージディスプレイライブラリーから単離される。ファージライブラリーのスクリーニングは、当該技術分野で既知の様々な技法によって達成することができる。

#### 【0079】

いくつかの実施形態において、モノクローナル抗体は、代替抗体を生成させるために、組み換えDNA技術の使用によって改変される。いくつかの実施形態において、キメラ抗体を生成させるために、マウスモノクローナル抗体の軽鎖及び重鎖の定常ドメインがヒト抗体の定常領域に置き換えられる。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体の所望の抗体フラグメントを生成させるために、定常領域が切断または除去される。いくつかの実施形態では、可変領域（複数可）を部位特異的または高密度に変異誘発させて、モノクローナル抗体の特異性及び/または親和性を最適化する。

40

#### 【0080】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体はヒト化抗体である。ヒト化抗体を生成させるための様々な方法が当該技術分野において既知である。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、その配列内に導入されている、非ヒト供給源に由来する1つ以上のアミノ酸残基を含む。いくつかの実施形態において、ヒト化は、1つ以上の非ヒトCDR配列を、ヒト抗体の対応するCDR配列の代わりに用いることによって行われる。いくつかの実施形態において、ヒト化抗体は、非ヒト抗体（例えば、マウス抗体）の6つのCDR

50

すべてを、ヒト抗体の対応する C D R の代わりに用いることによって構築される。

【 0 0 8 1 】

ヒト化抗体を生成させるために、どのヒト重鎖可変領域及び/または軽鎖可変領域を使用するかという選択は、様々な要因に基づいて、当該技術分野で既知の様々な方法によってなされ得る。いくつかの実施形態において、非ヒト（例えば、げっ歯類）抗体の可変領域の配列を、既知のヒト可変領域配列のライブラリー全体に対してスクリーニングする場合、「ベストフィット ( b e s t - f i t ) 」法が使用される。非ヒト（例えば、げっ歯類）配列の配列と最も類似しているヒト配列が、ヒト化抗体のヒト可変領域フレームワークとして選択される。いくつかの実施形態において、軽鎖または重鎖の特定のサブグループからなる、すべてのヒト抗体のコンセンサス配列に由来する特定の可変領域フレームワークが、当該可変領域フレームワークとして選択される。いくつかの実施形態において、可変領域フレームワーク配列は、最も豊富なヒトサブクラスのコンセンサス配列に由来する。いくつかの実施形態において、可変領域フレームワーク配列の供給源として、ヒト生殖細胞系列遺伝子が使用される。

10

【 0 0 8 2 】

他のヒト化方法としては、限定されないが、( i ) ヒト生殖細胞系列フレームワークへの C D R の直接導入として説明される「超ヒト化 ( s u p e r h u m a n i z a t i o n ) 」と呼ばれる方法、( i i ) 「抗体のヒトらしさ」の測定基準に基づく、H S C ( H u m a n S t r i n g C o n t e n t ) と称される方法、( i i i ) ヒト化バリエーションの大規模ライブラリー（ファージ、リボソーム、及び酵母ディスプレイライブラリーを含む）の生成に基づく方法、及び( i v ) フレームワーク領域のシャッフリングに基づく方法が挙げられる。

20

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は「ヒト抗体」である。ヒト抗体は、当該技術分野で既知の様々な技法を使用して調製することができる。いくつかの実施形態において、ヒト抗体は、i n v i t r o で免疫化された不死化ヒト B リンパ球から生成される。いくつかの実施形態において、ヒト抗体は、免疫化された個体から単離されたリンパ球から生成される。いずれの場合も、標的抗原に対して指向性を有する抗体を産生する細胞が生成及び単離され得る。いくつかの実施形態において、ヒト抗体はファージライブラリーから選択され、そのファージライブラリーは、ヒト抗体を発現する。代替的には、ファージディスプレイ技術を使用して、非免疫化ドナーに由来する免疫グロブリン可変領域遺伝子レパートリーから、i n v i t r o でヒト抗体及び抗体フラグメントを産生してもよい。抗体ファージライブラリーを生成及び使用するための技術は、当該技術分野において周知である。抗体を同定した後は、限定されないが、鎖シャッフリング及び部位特異的変異誘発法を含む、当該技術分野で既知の親和性成熟化ストラテジーを採用して、高親和性ヒト抗体を生成させてもよい。いくつかの実施形態において、ヒト抗体は、ヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有する遺伝子導入マウスにおいて産生される。これらのマウスは免疫化されると、内因性の免疫グロブリンを産生しない場合に、ヒト抗体の全レパートリーを産生することができる。

30

【 0 0 8 4 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は二重特異性抗体である。二重特異性抗体は、少なくとも 2 つの異なる抗原またはエピトープを認識し、それらに結合することができる。異なるエピトープは、同じ分子内にあり得るか（例えば、T f R 1 上の 2 つのエピトープ）、または異なる分子上にあり得るか（例えば、T f R 1 上の 1 つのエピトープ及び異なる標的上の 1 つのエピトープ）。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、個々の抗体または 2 つ以上の抗体の組み合わせと比較して、効力が増している。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、個々の抗体または 2 つ以上の抗体の組み合わせと比較して、毒性が低減されている。任意の治療薬が固有の薬物動態 ( P K ) ( 例えば、循環半減期 ) を有し得ることが、当業者に知られている。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、2 種の活性結合剤の P K を同調させる能力を有する。この場合、2

40

50

種の個々の結合剤は、異なるPKプロファイルを有する。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、対象の共通領域（例えば、組織）に、2種の薬剤の作用を集中させる能力を有する。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、共通の標的（例えば、特定の細胞型）に、2種の薬剤の作用を集中させる能力を有する。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、2種の薬剤の作用を2つ以上の生物学的経路または機能に向ける能力を有する。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、2つの異なる細胞を標的とし、それらを互いに近づける能力を有する。

【0085】

いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、毒性及び/または副作用が減少している。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、2種の個々の抗体の混合物または単剤としての抗体と比較して、毒性及び/または副作用が減少している。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体では、治療指数が増加している。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体では、2種の個々の抗体の混合物または単剤としての抗体と比較して、治療指数が増加している。

10

【0086】

二重特異性抗体を作製するためのいくつかの技法が、当業者に知られている。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、2つの重鎖間の界面の一部であるアミノ酸に修飾を伴う重鎖定常領域を含む。こうした修飾は、ヘテロ二量体の形成を増進させ、一般にホモ二量体の形成を低減または排除するためになされる。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、knobs-into-holes (KIH) ストラテジーを使用して生成される。例えば、Ridgway et al. Protein Eng. 1996; 9(7): 617-21及びKlein et al. MAbs. 2012; 4(6): 653-663を参照のこと。

20

【0087】

いくつかの実施形態において、二重特異性抗体は、2つの軽鎖間の界面の一部であるアミノ酸に修飾を有する軽鎖定常領域を含む。こうした修飾は、軽鎖のミスペアリングを低減または排除するためになされる。例えば、Lewis et al. Nat Biotech. 2014; 32(2): 191-98を参照のこと。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体には、VH及びVLが共有結合性に連結され、CH1及びCLが除去されているscFvが含まれる。いくつかの実施形態において、二重特異性抗体には、scFabまたはFcab（例えば、Wozniak-Knopp et al. PEDS 2010; 23(4): 289-97を参照のこと）、単ドメイン抗体（例えば、ラクダ科の種またはサメ類に由来するVHHを有する）、またはDuet Mab（例えば、Mazor et al. MAbs 2015; 7(2): 377-89を参照のこと）が含まれる。

30

【0088】

二重特異性抗体は、インタクトな抗体または抗原結合部位を含む抗体フラグメントであり得る。

【0089】

本開示では、2つ以上の特異性を有する抗TfR1抗体が企図される。いくつかの実施形態において、三重特異性抗体または四重特異性抗体が生成される。二価以上の抗TfR1抗体が企図される。いくつかの実施形態において、三価抗体または四価抗体が生成される。

40

【0090】

抗体のCDRは、当業者によって様々な方法/システムを用いて定義される。こうしたシステム及び/または定義は、長年にわたって開発及び改良されており、システム及び/または定義としては、Kabata、Chothia、IMGT、AbM、及びContactが挙げられる。Kabataの定義は、配列可変性に基づいており、一般的に使用されているものである。Chothiaの定義は、構造上のループ領域の位置に基づいている。IMGTシステムは、配列可変性及び可変ドメインの構造内の位置に基づいている。A

50

b Mの定義は、KabatとChothiaとの間の折衷案である。Contactの定義は、利用可能な抗体の結晶構造の分析に基づいている。例示的なシステムは、KabatとChothiaとの組み合わせである。抗体配列の分析及びCDRの決定にはソフトウェアプログラム（例えば、abYsis）が利用可能であり、こうしたソフトウェアプログラムは当業者に知られている。

【0091】

図1A～1Dに記載されたCDR配列は、KabatのCDR定義（Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit. National Institutes of Health, Bethesda, MD）及びChothiaのCDR定義（Chothia, C. & Lesk, A. M. J. Mol. Biol (1987) 196, 901-917）（Chothia, C. et al. Nature (1989) 342, 877-883）（Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. J. Mol. Biol (1997) 273, 927-948）における全位置を集合させたもの（union）を含む。このCDRの「union」定義は、Bujotzek et al.による「Wolfguy」定義としても知られている（Bujotzek A1, Dunbar J, Lipsmeier F, Schafer W, Antes I, Deane CM, Georges G. (2015) "Prediction of VH-VL domain orientation for antibody variable domain modeling." Proteins Apr; 83(4): 681-95. doi: 10.1002/prot.24756）。いくつかの実施形態において、CDRの定義は、Kabatの定義とChothiaの定義との組み合わせに基づく（例示的システム）。しかしながら、特定の抗体の重鎖CDR（複数可）及び/または軽鎖CDR（複数可）への言及には、当業者に既知の全CDR定義が包含されると理解されるであろう。一例では、本明細書に記載される方法で使用される抗TfR1抗体は、Wolfguy定義またはUnion定義に基づく、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Aクローンまたは本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの6つのCDRを含む。一例では、本明細書に記載される方法のいずれかで使用される抗TfR1抗体は、Chothiaの定義に基づく、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Aクローンまたは本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの6つのCDRを含む。一例では、本明細書に記載される方法で使用される抗TfR1抗体は、Kabatの定義に基づく、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Aクローンまたは本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの6つのCDRを含む。一例では、本明細書に記載される方法で使用される抗TfR1抗体は、AbM定義に基づく、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Aクローンまたは本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの6つのCDRを含む。一例では、本明細書に記載される方法で使用される抗TfR1抗体は、IMGT定義に基づく、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Aクローンまたは本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの6つのCDRを含む。一例では、本明細書に記載される方法で使用される抗TfR1抗体は、Contact定義に基づく、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Aクローンまたは本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの6つのCDRを含む。

【0092】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、本明細書に記載される抗体のいずれか1つの1、2、3、4、5、及び/または6つのCDRを含む抗TfR1抗体である。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表1Aに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの重鎖CDR、及び/または(ii)表1Aに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表2Aに示されるクローンのいずれか

1つの1、2、及び/または3つの重鎖CDR、及び/または(ii)表2Aに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの軽鎖CDRを含む。

【0093】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、本明細書に記載される抗体のいずれか1つの1、2、3、4、5、及び/または6つのCDRを含む抗TfR1抗体である。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表1Bに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの重鎖CDR、及び/または(ii)表1Bに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表2Bに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの重鎖CDR、及び/または(ii)表2Bに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの軽鎖CDRを含む。

10

【0094】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、表1Aに示されるクローンのいずれか1つの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、表2Aに示されるクローンのいずれか1つの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む。

【0095】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、表1Bに示されるクローンのいずれか1つの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、表2Bに示されるクローンのいずれか1つの3つの重鎖CDR及び3つの軽鎖CDRを含む。

20

【0096】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表3Aに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの重鎖CDR、及び/または(ii)表3Bに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表4Aに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの重鎖CDR、及び/または(ii)表4Bに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの軽鎖CDRを含む。

【0097】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表3Cに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの重鎖CDR、及び/または(ii)表3Dに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表4Cに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの重鎖CDR、及び/または(ii)表4Dに示されるクローンのいずれか1つの1、2、及び/または3つの軽鎖CDRを含む。

30

【0098】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表3Aに示されるクローンのいずれか1つの3つの重鎖CDR、及び(ii)表3Bに示されるクローンのいずれか1つの3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表4Aに示されるクローンのいずれか1つの3つの重鎖CDR、及び(ii)表4Bに示されるクローンのいずれか1つの3つの軽鎖CDRを含む。

40

【0099】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表3Cに示されるクローンのいずれか1つの3つの重鎖CDR、及び(ii)表3Dに示されるクローンのいずれか1つの3つの軽鎖CDRを含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)表4Cに示されるクローンのいずれか1つの3つの重鎖CDR、及び(ii)表4Dに示されるクローンのいずれか1つの3つの軽鎖CDRを含む。

【表 1 A】

表 1 A : ANTI BODY-A クローンの Union CDR

クローン	H2C/L0	H3C/L0	H4C/L0	H1C/L0	H3C(HA)/L0	RabAB-A
重鎖 CDR1	GIDFSSSGYMC (配列番号101)	GIDFSSSGYMC (配列番号101)	GIDFSSSGYMC (配列番号101)	GIDFSSSGYMC (配列番号101)	GIDFSSSGYMH (配列番号102)	GIDFSSSGYMC (配列番号101)
重鎖 CDR2	CIYTYSSNTIYY AASVKG (配列番号103)	CIYTYSSNTIYY ASWAKG (配列番号104)	CIYTYSSNTIYY ASWAKG (配列番号104)	CIYTYSSNTIYY AASVKG (配列番号103)	AIYTYSSNTIYY ASWAKG (配列番号105)	CIYTYSSNTIYY ASWAKG (配列番号104)
重鎖 CDR3	GIYGYTGTYT TMGYFSL (配列番号106)	GIYGYTGTYT TMGYFSL (配列番号106)	GIYGYTGTYT TMGYFSL (配列番号106)	GIYGYTGTYT TMGYFSL (配列番号106)	GIYGYTGTYT TMGYFSL (配列番号106)	GIYGYTGTYT TMGYFSL (配列番号106)
軽鎖 CDR1	QASQNINSYLA (配列番号107)	QASQNINSYLA (配列番号107)	QASQNINSYLA (配列番号107)	QASQNINSYLA (配列番号107)	QASQNINSYLA (配列番号107)	QASQNINSYLA (配列番号107)
軽鎖 CDR2	RASSLES (配列番号108)	RASSLES (配列番号108)	RASSLES (配列番号108)	RASSLES (配列番号108)	RASSLES (配列番号108)	RASTLAS (配列番号109)
軽鎖 CDR3	QSYYYSGSSNY NA (配列番号110)	QSYYYSGSSNY NA (配列番号110)	QSYYYSGSSNY NA (配列番号110)	QSYYYSGSSNY NA (配列番号110)	QSYYYSGSSNY NA (配列番号110)	QSYYYSGSSNY NA (配列番号110)

10

20

【表 1 B】

表 1 B : ANTI BODY-A クローンの Chothia CDR

クローン	H2C/L0	H3C/L0	H4C/L0	H1C/L0	H3C(HA)/L0	RabAB-A
重鎖 CDR1	GIDFSSSG (配列番号111)	GIDFSSSG (配列番号111)	GIDFSSSG (配列番号111)	GIDFSSSG (配列番号111)	GIDFSSSG (配列番号111)	GIDFSSSG (配列番号111)
重鎖 CDR2	TYSS (配列番号112)	TYSS (配列番号112)	TYSS (配列番号112)	TYSS (配列番号112)	TYSS (配列番号112)	TYSS (配列番号112)
重鎖 CDR3	TYGYTGTYT MGYFS (配列番号113)	TYGYTGTYT MGYFS (配列番号113)	TYGYTGTYT MGYFS (配列番号113)	TYGYTGTYT MGYFS (配列番号113)	TYGYTGTYT MGYFS (配列番号113)	TYGYTGTYT MGYFS (配列番号113)
軽鎖 CDR1	SQNINSY (配列番号114)	SQNINSY (配列番号114)	SQNINSY (配列番号114)	SQNINSY (配列番号114)	SQNINSY (配列番号114)	SQNINSY (配列番号114)
軽鎖 CDR2	RAS (配列番号115)	RAS (配列番号115)	RAS (配列番号115)	RAS (配列番号115)	RAS (配列番号115)	RAS (配列番号115)
軽鎖 CDR3	YYYSGSSNYN (配列番号115)	YYYSGSSNYN (配列番号115)	YYYSGSSNYN (配列番号115)	YYYSGSSNYN (配列番号115)	YYYSGSSNYN (配列番号115)	YYYSGSSNYN (配列番号115)

30

40

50

【表 2 A】

表 2 A : ANTI BODY-B クローンの Union CDR

クローン	H4C/L2	H1C/L2	H3C/L2	H4C (C90S)/L2	H4C (C90T)/L2	H4C (C90V)/L2	H2C/L2	RabANTI BODY-B
重鎖 CDR1	GFSFSNSY WIC (配列番号 116)	GFSFSNSY WIC (配列番号 116)	GFSFSNSY WIC (配列番号 116)	GFSFSNSY WIC (配列番号 116)	GFSFSNSY WIC (配列番号 116)	GFSFSNSY WIC (配列番号 116)	GFSFSNSY WIC (配列番号 116)	GFSFSNSY WIC (配列番号 116)
重鎖 CDR2	CINTDADS TNYASWARG (配列番号 117)	CINTDADS TNYADSVKG (配列番号 118)	CINTDADS TNYASWARG (配列番号 117)	CINTDADS TNYASWARG (配列番号 117)	CINTDADST NYASWARG (配列番号 117)	CINTDADST NYASWARG (配列番号 117)	CINTDADST NYADSVKG (配列番号 118)	CINTDADST NYASWARG (配列番号 117)
重鎖 CDR3	QNNVFDP GYNL (配列番号 119)	QNNVFDP GYNL (配列番号 119)	QNNVFDP GYNL (配列番号 119)	QNNVFDP GYNL (配列番号 119)	QNNVFDPG YNL (配列番号 119)	QNNVFDPG YNL (配列番号 119)	QNNVFDPG YNL (配列番号 119)	QNNVFDPG YNL (配列番号 119)
軽鎖 CDR1	RASQNIGS NLA (配列番号 120)	RASQNIGS NLA (配列番号 120)	RASQNIGS NLA (配列番号 120)	RASQNIGS NLA (配列番号 120)	RASQNIGSN LA (配列番号 120)	RASQNIGSN LA (配列番号 120)	RASQNIGSN LA (配列番号 120)	QASQNIGSN LA (配列番号 121)
軽鎖 CDR2	DASKLES (配列番号 122)	DASKLES (配列番号 122)	DASKLES (配列番号 122)	DASKLES (配列番号 122)	DASKLES (配列番号 122)	DASKLES (配列番号 122)	DASKLES (配列番号 122)	DASKLAS (配列番号 123)
軽鎖 CDR3	QCTVRGG AYGNA (配列番号 124)	QCTVRGG AYGNA (配列番号 124)	QCTVRGG AYGNA (配列番号 124)	QSTVRGG AYGNA (配列番号 125)	QTTVRGGA YGNA (配列番号 126)	QVTVRGGGA YGNA (配列番号 127)	QCTVRGGGA YGNA (配列番号 124)	QCTVRGGGA YGNA (配列番号 124)

10

20

【表 2 B - 1】

表 2 B : ANTI BODY-B クローンの Chothia CDR

クローン	H4C/L2	H1C/L2	H3C/L2	H4C (C90S)/L2	H4C (C90T)/L2	H4C (C90V)/L2	H2C/L2	RabANTI BODY-B
重鎖 CDR1	GFSFSNSY (配列番号 128)	GFSFSNSY (配列番号 128)	GFSFSNSY (配列番号 128)	GFSFSNSY (配列番号 128)	GFSFSNSY (配列番号 128)	GFSFSNSY (配列番号 128)	GFSFSNSY (配列番号 128)	GFSFSNSY (配列番号 128)
重鎖 CDR2	TDAD (配列番号 129)	TDAD (配列番号 129)	TDAD (配列番号 129)	TDAD (配列番号 129)	TDAD (配列番号 129)	TDAD (配列番号 129)	TDAD (配列番号 129)	TDAD (配列番号 129)
重鎖 CDR3	NNVFDPG YN (配列番号 130)	NNVFDPG YN (配列番号 130)	NNVFDPG YN (配列番号 130)	NNVFDPG YN (配列番号 130)	NNVFDPGY N (配列番号 130)	NNVFDPGY N (配列番号 130)	NNVFDPGY N (配列番号 130)	NNVFDPGY N (配列番号 130)
軽鎖 CDR1	SQNIGSN (配列番号 131)	SQNIGSN (配列番号 131)	SQNIGSN (配列番号 131)	SQNIGSN (配列番号 131)	SQNIGSN (配列番号 131)	SQNIGSN (配列番号 131)	SQNIGSN (配列番号 131)	SQNIGSN (配列番号 131)
軽鎖 CDR2	DAS	DAS	DAS	DAS	DAS	DAS	DAS	DAS

30

40

50

【表 2 B - 2】

軽鎖 CDR3	TVRGGAY GN (配列番号 132)	TVRGGAY GN (配列番号 132)	TVRGGAY GN (配列番号 132)	TVRGGAY GN (配列番号 132)	TVRGGAYG N (配列番号 132)	TVRGGAYG N (配列番号 132)	TVRGGAYG N (配列番号 132)	TVRGGAYG N (配列番号 132)
------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------	--------------------------------

【表 3 A】

表 3 A : ANTIBODY-A クロンの Union 重鎖 CDR

クローン	重鎖 CDR1	重鎖 CDR2	重鎖 CDR3
H0	GIDFSSSGYMA (配列番号 133)	AIYTYSSNTYYAASVKG (配列番号 135)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H1	GIDFSSSGYMA (配列番号 133)	AIYTYSSNTYYAASVKG (配列番号 135)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H2	GIDFSSSGYMA (配列番号 133)	AIYTYSSNTYYAASVKG (配列番号 135)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H3	GIDFSSSGYMA (配列番号 133)	AIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 105)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H3(SV)	GIDFSSSGYMS (配列番号 134)	VIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 136)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H3(SR)	GIDFSSSGYMS (配列番号 134)	RIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 137)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H3(SY)	GIDFSSSGYMS (配列番号 134)	YIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 138)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H3(HA)	GIDFSSSGYMH (配列番号 102)	AIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 105)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H4	GIDFSSSGYMA (配列番号 133)	AIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 105)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H0C	GIDFSSSGYMC (配列番号 101)	CIYTYSSNTYYAASVKG (配列番号 103)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H1C	GIDFSSSGYMC (配列番号 101)	CIYTYSSNTYYAASVKG (配列番号 103)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H2C	GIDFSSSGYMC (配列番号 101)	CIYTYSSNTYYAASVKG (配列番号 103)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H3C	GIDFSSSGYMC (配列番号 101)	CIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 104)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
H4C	GIDFSSSGYMC (配列番号 101)	CIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 104)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)
RabAb	GIDFSSSGYMC (配列番号 101)	CIYTYSSNTYYASWAKG (配列番号 104)	GTYGTYGYTYTMGYFSL (配列番号 106)

10

20

30

40

50

【表 3 B】

表 3 B : ANTI BODY-A クローンの Union 軽鎖 CDR

クローン	L0	L1	L2	RabAb-A
軽鎖 CDR1	QASQNINSYLA (配列番号 107)	QASQNINSYLA (配列番号 107)	QASQNINSYLA (配列番号 107)	QASQNINSYLA (配列番号 107)
軽鎖 CDR2	RASSLES (配列番号 108)	RASTLAS (配列番号 109)	RASTLAS (配列番号 109)	RASTLAS (配列番号 109)
軽鎖 CDR3	QSYYYSGSSNYNA (配列番号 110)	QSYYYSGSSNYNA (配列番号 110)	QSYYYSGSSNYNA (配列番号 110)	QSYYYSGSSNYNA (配列番号 110)

10

【表 3 C - 1】

表 3 C : ANTI BODY-A クローンの Chothia 重鎖 CDR

クローン	重鎖 CDR1	重鎖 CDR2	重鎖 CDR3
H0	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H1	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H2	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H3	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H3(SV)	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H3(SR)	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H3(SY)	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H3(HA)	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H4	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H0C	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H1C	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H2C	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)
H3C	GIDFSSSG (配列番号 111)	TYSS (配列番号 112)	TYGYTGTYTMGYFS (配列番号 113)

20

30

40

50

【表 3 C - 2】

<b>H4C</b>	<b>GIDFSSSG</b> (配列番号 111)	<b>TYSS</b> (配列番号 112)	<b>TYGYTGTYTMGYFS</b> (配列番号 113)
<b>RabAb</b>	<b>GIDFSSSG</b> (配列番号 111)	<b>TYSS</b> (配列番号 112)	<b>TYGYTGTYTMGYFS</b> (配列番号 113)

【表 3 D】

表 3 D : ANTI BODY-A クローンの Ch o t h i a 軽鎖 CDR

クローン	L0	L1	L2	RabAb-A
軽鎖 <b>CDR1</b>	<b>SQNINSY</b> (配列番号 114)	<b>SQNINSY</b> (配列番号 114)	<b>SQNINSY</b> (配列番号 114)	<b>SQNINSY</b> (配列番号 114)
軽鎖 <b>CDR2</b>	<b>RAS</b>	<b>RAS</b>	<b>RAS</b>	<b>RAS</b>
軽鎖 <b>CDR3</b>	<b>YYYSGSSNYN</b> (配列番号 115)	<b>YYYSGSSNYN</b> (配列番号 115)	<b>YYYSGSSNYN</b> (配列番号 115)	<b>YYYSGSSNYN</b> (配列番号 115)

10

20

30

40

50

【表 4 A - 1】

表 4 A : ANTIBODY-B クロンの Union 重鎖 CDR

クローン	重鎖 CDR1	重鎖 CDR2	重鎖 CDR3
H0	GFSFSNSYWIA(配列番号139)	AINTDADSTNYADSVKG (配列番号 142)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H1	GFSFSNSYWIA (配列番号 139)	AINTDADSTNYADSVKG (配列番号 142)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H1(SV)	GFSFSNSYWIS (配列番号 140)	VINTDADSTNYADSVKG (配列番号 143)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H1(SR)	GFSFSNSYWIS (配列番号 140)	RINTDADSTNYADSVKG (配列番号 144)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H1(SY)	GFSFSNSYWIS (配列番号 140)	YINTDADSTNYADSVKG (配列番号 145)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H1(HA)	GFSFSNSYWIH (配列番号 141)	AINTDADSTNYADSVKG (配列番号 142)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H2	GFSFSNSYWIA (配列番号 139)	AINTDADSTNYADSVKG (配列番号 142)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H3	GFSFSNSYWIA (配列番号 139)	AINTDADSTNYASWARG (配列番号 146)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H4	GFSFSNSYWIA (配列番号 139)	AINTDADSTNYASWARG (配列番号 146)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H0C	GFSFSNSYWIC (配列番号 116)	CINTDADSTNYADSVKG (配列番号 118)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)

10

20

30

【表 4 A - 2】

H1C	GFSFSNSYWIC (配列番号 116)	CINTDADSTNYADSVKG (配列番号 118)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H2C	GFSFSNSYWIC (配列番号 116)	CINTDADSTNYADSVKG (配列番号 118)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H3C	GFSFSNSYWIC (配列番号 116)	CINTDADSTNYASWARG (配列番号 117)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
H4C	GFSFSNSYWIC (配列番号 116)	CINTDADSTNYASWARG (配列番号 117)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
RabAb	GFSFSNSYWIC (配列番号116)	CINTDADSTNYASWARG (配列番号 117)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)

40

50

## 【表 4 B】

表 4 B : ANTI BODY-B クローンの Union 軽鎖 CDR

クローン	軽鎖 CDR1	軽鎖 CDR2	軽鎖 CDR3
<b>L0</b>	RASQNIGSNLA (配列番号 120)	DASKLES (配列番号 122)	QQTVRGGAYGLA (配列番号 147)
<b>L1</b>	RASQNIGSNLA (配列番号 120)	DASKLES (配列番号 122)	QATVRGGAYGLA (配列番号 148)
<b>L2</b>	RASQNIGSNLA (配列番号 120)	DASKLES (配列番号 122)	QCTVRGGAYGNA (配列番号 124)
<b>L2(C90S)</b>	RASQNIGSNLA (配列番号 120)	DASKLES (配列番号 122)	QSTVRGGAYGNA (配列番号 125)
<b>L2(C90T)</b>	RASQNIGSNLA (配列番号 120)	DASKLES (配列番号 122)	QTTVRGGAYGNA (配列番号 126)
<b>L2(C90V)</b>	RASQNIGSNLA (配列番号 120)	DASKLES (配列番号 122)	QVTVRGGAYGNA (配列番号 127)
<b>rabAB-B</b>	QASQNIGSNLA (配列番号 121)	DASKLAS (配列番号 123)	QCTVRGGAYGNA (配列番号 124)

10

20

## 【表 4 C - 1】

表 4 C : ANTI BODY-B クローンの Chothia 重鎖 CDR

クローン	重鎖 CDR1	重鎖 CDR2	重鎖 CDR3
<b>H0</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)
<b>H1</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)

30

40

50

【表 4 C - 2】

<b>H1(SV)</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H1(SR)</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H1(SY)</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H1(HA)</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	10
<b>H2</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H3</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H4</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H0C</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H1C</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	20
<b>H2C</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H3C</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>H4C</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	
<b>RabAb</b>	GFSFSNSY (配列番号 128)	TDAD (配列番号 129)	NNVFDPGYN (配列番号 130)	30

【表 4 D - 1】

表 4 D : ANTI BODY-B クローンの Ch o t h i a 軽鎖 CDR

クローン	軽鎖 CDR1	軽鎖 CDR2	軽鎖 CDR3	
<b>L0</b>	SQNIGSN (配列番号 131)	DAS	TVRGGAYGN (配列番号132)	
<b>L1</b>	SQNIGSN (配列番号 131)	DAS	TVRGGAYGN (配列番号132)	40
<b>L2</b>	SQNIGSN (配列番号 131)	DAS	TVRGGAYGN (配列番号132)	
<b>L2(C90S)</b>	SQNIGSN (配列番号 131)	DAS	TVRGGAYGN (配列番号132)	
<b>L2(C90T)</b>	SQNIGSN (配列番号 131)	DAS	TVRGGAYGN (配列番号132)	50

【表 4 D - 2】

<b>L2(C90V)</b>	<b>SQNIGSN</b> (配列番号131)	<b>DAS</b>	<b>TVRGGAYGN</b> (配列番号132)
<b>rabAB-B</b>	<b>SQNIGSN</b> (配列番号131)	<b>DAS</b>	<b>TVRGGAYGN</b> (配列番号132)

## 【0100】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に記載される抗体の重鎖 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3、及び / または軽鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に記載される抗体の重鎖 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 ならびに軽鎖 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体には、本明細書に記載される抗体のヒト化バージョンまたはヒト化バリエーションが含まれる。

## 【0101】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - A クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションの重鎖 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3、及び / または軽鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - A クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションの重鎖 C D R 1、重鎖可変領域 C D R 2、及び重鎖可変領域 C D R 3 を含む。他の実施形態では、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - A クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションの軽鎖可変領域 C D R 1、軽鎖可変領域 C D R 2、及び軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の抗体 A N T I B O D Y - A クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションの重鎖 C D R 1、重鎖可変領域 C D R 2、重鎖可変領域 C D R 3、軽鎖可変領域 C D R 1、軽鎖可変領域 C D R 2、及び軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - A クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションのヒト化バージョンである。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - A クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションのバリエーションである。

## 【0102】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - B クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションの重鎖 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3、及び / または軽鎖可変領域 C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - B クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションの重鎖 C D R 1、重鎖可変領域 C D R 2、及び重鎖可変領域 C D R 3 を含む。他の実施形態では、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - B クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションの軽鎖可変領域 C D R 1、軽鎖可変領域 C D R 2、及び軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。ある特定の実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の抗体 A N T I B O D Y - B クローン、そのヒト化バージョン、またはそのバリエーションの重鎖 C D R 1、重鎖可変領域 C D R 2、重鎖可変領域 C D R 3、軽鎖可変領域 C D R 1、軽鎖可変領域 C D R 2、及び軽鎖可変領域 C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、A N T I B O D Y - B のヒト化バージョンである。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、A N T I B O D Y - B のバリエーションである。

## 【0103】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、1 ~ 30 個の保存的アミノ酸置換を含む、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体のバリエーションである。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体のバリエーションは、1 ~ 25 個の保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体のバリエーションは、1 ~ 20 個の保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体のバリエーションは、1 ~ 15 個

の保存的アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体のバリエーションは、1～10個の保存的アミノ酸置換（複数可）を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体のバリエーションは、1～5つの保存的アミノ酸置換（複数可）を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体のバリエーションは、1～3つの保存的アミノ酸置換を（複数可）含む。いくつかの実施形態において、保存的アミノ酸置換（複数可）は、抗体のCDRにある。いくつかの実施形態において、保存的アミノ酸置換（複数可）は、抗体のCDRにはない。いくつかの実施形態において、保存的アミノ酸置換（複数可）は、抗体のフレームワーク領域にある。

【0104】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(a) G I D F S S S G Y M C（配列番号101）を含む重鎖可変領域CDR1、C I Y T Y S S N T Y Y A A S V K G（配列番号103）を含む重鎖可変領域CDR2、及びG T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L（配列番号106）を含む重鎖可変領域CDR3、及び/または(b) Q A S Q N I N S Y L A（配列番号107）を含む軽鎖可変領域CDR1、R A S S L E S（配列番号108）を含む軽鎖可変領域CDR2、及びQ S Y Y Y S G S S N Y N A（配列番号110）を含む軽鎖可変領域CDR3、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、G I D F S S S G Y M C（配列番号101）を含む重鎖可変領域CDR1、C I Y T Y S S N T Y Y A A S V K G（配列番号103）を含む重鎖可変領域CDR2、及びG T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L（配列番号106）を含む重鎖可変領域CDR3、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、Q A S Q N I N S Y L A（配列番号107）を含む軽鎖可変領域CDR1、R A S S L E S（配列番号108）を含む軽鎖可変領域CDR2、及びQ S Y Y Y S G S S N Y N A（配列番号110）を含む軽鎖可変領域CDR3、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(a) G I D F S S S G Y M C（配列番号101）を含む重鎖可変領域CDR1、C I Y T Y S S N T Y Y A A S V K G（配列番号103）を含む重鎖可変領域CDR2、及びG T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L（配列番号106）を含む重鎖可変領域CDR3、及び(b) Q A S Q N I N S Y L A（配列番号107）を含む軽鎖可変領域CDR1、R A S S L E S（配列番号108）を含む軽鎖可変領域CDR2、及びQ S Y Y Y S G S S N Y N A（配列番号110）を含む軽鎖可変領域CDR3、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(a) G I D F S S S G Y M C（配列番号101）を含む重鎖CDR1、C I Y T Y S S N T Y Y A A S V K G（配列番号103）を含む重鎖CDR2、及びG T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L（配列番号106）を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域、または(b) Q A S Q N I N S Y L A（配列番号107）を含む軽鎖CDR1、R A S S L E S（配列番号108）を含む軽鎖CDR2、及びQ S Y Y Y S G S S N Y N A（配列番号110）を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、を含む。

【0105】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、G I D F S S S G Y M C（配列番号101）を含む重鎖可変領域CDR1、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、C I Y T Y S S N T Y Y A A S V K G（配列番号103）を含む重鎖可変領域CDR2、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、G T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L（配列番号106）を含む重鎖可変領域CDR3、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、Q A S Q N I N S Y L A（配列番号107）を含む軽鎖可変領域CDR1、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、R A S S L E S（配列番号108）を含む軽鎖可変領域CDR2、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、及びQ S Y Y Y S G S S N Y N A（配列番号110）を含む軽鎖可変領域CDR3、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、を含む。いくつかの実施形態において、CDRは、1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、CDRは、2つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、CDRは、3つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、CDRは、4つの

アミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換は、保存的置換である。いくつかの実施形態において、CDRは、重鎖CDR1である。いくつかの実施形態において、CDRは、重鎖可変領域CDR2である。いくつかの実施形態において、CDRは、重鎖可変領域CDR3である。いくつかの実施形態において、CDRは、軽鎖可変領域CDR1である。いくつかの実施形態において、CDRは、軽鎖可変領域CDR2である。いくつかの実施形態において、CDRは、軽鎖可変領域CDR3である。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換は、ヒト化プロセスの一部としてなされる。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換は、生殖細胞系ヒト化プロセスの一部としてなされる。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換は、親和性成熟プロセスの一部としてなされる。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換は、最適化プロセスの一部としてなされる。

10

## 【0106】

いくつかの実施形態において、本開示の抗TfR1抗体は、VH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3を含む重鎖可変領域(VH)を含み、VH CDR1はアミノ酸配列GIDFSSSGYMX(配列番号149)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VH CDR2はアミノ酸配列XIYTYSSNTYYAXXKXG(配列番号151)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VH CDR3はアミノ酸配列GT YGYTG YTYTMGYFSL(配列番号106)を含み、当該抗体は、VL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、VL CDR1はアミノ酸配列QASQNINSYLA(配列番号107)を含み、VL CDR2はアミノ酸配列RASXLXS(配列番号153)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VL CDR3はアミノ酸配列QSYYSYGSSNYNA(配列番号110)を含む。いくつかの実施形態において、VH CDR1はアミノ酸配列GIDFSSSGYMX<sub>1</sub>(配列番号150)を含み、ここでX<sub>1</sub>はC、A、またはHであり、VH CDR2はアミノ酸配列X<sub>2</sub>IYTYSSNTYYAX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>KXG(配列番号152)を含み、ここでX<sub>2</sub>はCまたはAであり、X<sub>3</sub>はSまたはAであり、X<sub>4</sub>はWまたはSであり、X<sub>5</sub>はAまたはVであり、VH CDR3はアミノ酸配列GT YGYTG YTYTMGYFSL(配列番号106)を含み、VL CDR1はアミノ酸配列QASQNINSYLA(配列番号107)を含み、VL CDR2はアミノ酸配列RASX<sub>6</sub>LX<sub>7</sub>S(配列番号154)を含み、ここでX<sub>6</sub>はTまたはSであり、X<sub>7</sub>はAまたはEであり、VL CDR3はアミノ酸配列QSYYSYGSSNYNA(配列番号110)を含む。

20

30

## 【0107】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Aクローンの3つのVH CDRを有し、配列番号16に示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び本明細書に開示される任意のANTIBODY-Aクローンの3つのVL CDRを有し、配列番号35に示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む。

40

## 【0108】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号16に示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性で構成される重鎖可変領域、及び配列番号35に示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性で構成される軽鎖可変領域、を含む。本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号16に示される配列において1つ以上(例えば、1、2、または3つ)の置換、欠失、または挿入を有する重鎖可変領域、及び配列番号35に示される配列番号において1つ以上の置換、欠失、または挿入を有する軽鎖可変領域、を含む。本明細書に記

50

載される方法のいくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - A クロンの 3 つの V H C D R を有し、図 1 A に示される V H 配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び本明細書に開示される任意の A N T I B O D Y - B クロンの 3 つの V L C D R を有し、図 1 C に示される配列のいずれか 1 つに対して少なくとも 75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 100 % の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む。

【 0 1 0 9 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 に対して少なくとも約 80 % の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び / または配列番号 3 5 に対して少なくとも約 80 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 に対して少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 3 5 に対して少なくとも約 85 %、少なくとも約 90 %、少なくとも約 95 %、少なくとも約 97 %、または少なくとも約 99 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

10

【 0 1 1 0 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 に対して少なくとも約 80 % の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び / または配列番号 3 5 に対して少なくとも約 80 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 に対して少なくとも約 80 % の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 3 5 に対して少なくとも約 80 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 に対して少なくとも約 90 % の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び / または配列番号 3 5 に対して少なくとも約 90 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 に対して少なくとも約 90 % の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 3 5 に対して少なくとも約 90 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 に対して少なくとも約 95 % の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び / または配列番号 3 5 に対して少なくとも約 95 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 に対して少なくとも約 95 % の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び配列番号 3 5 に対して少なくとも約 95 % の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

20

30

【 0 1 1 1 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 3 5 を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 を含む重鎖可変領域及び配列番号 3 5 を含む軽鎖可変領域、を含む。

【 0 1 1 2 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3、ならびに配列番号 3 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、( i ) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む重鎖可変領域、及び ( i i ) 配列番号 3 5 のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域の C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 を含む軽鎖可変領域、を含む。

40

【 0 1 1 3 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、( a ) G F S F S N S Y W I C ( 配列番号 1 1 6 ) を含む重鎖可変領域 C D R 1、C I N T D A D S T N Y A S W A R G ( 配

50

列番号117)を含む重鎖可変領域CDR2、及びQNNVFDPGYNL(配列番号119)を含む重鎖可変領域CDR3、及び/または(b)RASQNI GSNLA(配列番号120)を含む軽鎖可変領域CDR1、DASKLES(配列番号122)を含む軽鎖可変領域CDR2、及びQCTVRGGAYGNA(配列番号124)を含む軽鎖可変領域CDR3、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、GFSFSNSYWIC(配列番号116)を含む重鎖可変領域CDR1、CINTDADSTNYASWARG(配列番号117)を含む重鎖可変領域CDR2、及びQNNVFDPGYNL(配列番号119)を含む重鎖可変領域CDR3、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、RASQNI GSNLA(配列番号120)を含む軽鎖可変領域CDR1、DASKLES(配列番号122)を含む軽鎖可変領域CDR2、及びQCTVRGGAYGNA(配列番号124)を含む軽鎖可変領域CDR3、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(a)GFSFSNSYWIC(配列番号116)を含む重鎖可変領域CDR1、CINTDADSTNYASWARG(配列番号117)を含む重鎖可変領域CDR2、及びQNNVFDPGYNL(配列番号119)を含む重鎖可変領域CDR3、ならびに(b)RASQNI GSNLA(配列番号120)を含む軽鎖可変領域CDR1、DASKLES(配列番号122)を含む軽鎖可変領域CDR2、及びQCTVRGGAYGNA(配列番号124)を含む軽鎖可変領域CDR3、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(a)GFSFSNSYWIC(配列番号116)を含む重鎖CDR1、CINTDADSTNYASWARG(配列番号117)を含む重鎖CDR2、及びQNNVFDPGYNL(配列番号119)を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域、または(b)RASQNI GSNLA(配列番号120)を含む軽鎖CDR1、DASKLES(配列番号122)を含む軽鎖CDR2、及びQCTVRGGAYGNA(配列番号124)を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、を含む。

10

20

#### 【0114】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(a)GFSFSNSYWIC(配列番号116)を含む重鎖可変領域CDR1、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、CINTDADSTNYASWARG(配列番号117)を含む重鎖可変領域CDR2、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、QNNVFDPGYNL(配列番号119)を含む重鎖可変領域CDR3、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、RASQNI GSNLA(配列番号120)を含む軽鎖可変領域CDR1、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、DASKLES(配列番号122)を含む軽鎖可変領域CDR2、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、及びQCTVRGGAYGNA(配列番号124)を含む軽鎖可変領域CDR3、または1、2、3、もしくは4つのアミノ酸置換を含むそのバリエーション、を含む。いくつかの実施形態において、CDRは、1つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、CDRは、2つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、CDRは、3つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、CDRは、4つのアミノ酸置換を含む。いくつかの実施形態において、1つ以上のアミノ酸置換は、保存的置換である。いくつかの実施形態において、CDRは、重鎖CDR1である。いくつかの実施形態において、CDRは、重鎖可変領域CDR2である。いくつかの実施形態において、CDRは、重鎖可変領域CDR3である。いくつかの実施形態において、CDRは、軽鎖可変領域CDR1である。いくつかの実施形態において、CDRは、軽鎖可変領域CDR2である。いくつかの実施形態において、CDRは、軽鎖可変領域CDR3である。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換は、ヒト化プロセスの一部としてなされる。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換は、生殖細胞系ヒト化プロセスの一部としてなされる。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換は、親和性成熟プロセスの一部としてなされる。いくつかの実施形態において、1つ以上の置換は、最適化プロセスの一部としてなされる。

30

40

50

## 【0115】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、VH CDR1、VH CDR2、及びVH CDR3を含む重鎖可変領域(VH)を含み、VH CDR1はアミノ酸配列GFSFSNSYWI<sub>X</sub>(配列番号155)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VH CDR2はアミノ酸配列XINTDADSTNYAX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>G(配列番号157)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VH CDR3はアミノ酸配列QNNVFDPGYNL(配列番号119)を含み、当該抗体は、VL CDR1、VL CDR2、及びVL CDR3を含む軽鎖可変領域(VL)を含み、VL CDR1はアミノ酸配列XASQNI<sub>GS</sub>NLA(配列番号159)を含み、VL CDR2はアミノ酸配列DASKLX<sub>8</sub>S(配列番号161)を含み、ここでXは任意のアミノ酸であり、VL CDR3はアミノ酸配列QXTVRGGAYGX<sub>9</sub>A(配列番号163)を含み、ここでXは任意のアミノ酸である。いくつかの実施形態において、VH CDR1はアミノ酸配列GFSFSNSYWI<sub>X<sub>1</sub></sub>(配列番号156)を含み、ここでX<sub>1</sub>はC、A、またはHであり、VH CDR2はアミノ酸配列X<sub>2</sub>INTDADSTNYAX<sub>3</sub>X<sub>4</sub>X<sub>5</sub>X<sub>6</sub>G(配列番号158)を含み、ここでX<sub>2</sub>はCまたはAであり、X<sub>3</sub>はSまたはDであり、X<sub>4</sub>はWまたはSであり、X<sub>5</sub>はAまたはVであり、X<sub>6</sub>はRまたはKであり、VH CDR3はアミノ酸配列QNNVFDPGYNL(配列番号119)を含み、VL CDR1はアミノ酸配列X<sub>7</sub>ASQNI<sub>GS</sub>NLA(配列番号160)を含み、ここでX<sub>7</sub>はQまたはRであり、VL CDR2はアミノ酸配列DASKLX<sub>8</sub>S(配列番号162)を含み、ここでX<sub>8</sub>はAまたはEであり、VL CDR3はアミノ酸配列QX<sub>9</sub>TVRGGAYGX<sub>10</sub>A(配列番号164)を含み、ここでX<sub>9</sub>はC、Q、A、S、T、またはVであり、X<sub>10</sub>はNまたはLである。

## 【0116】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの3つのVH CDRを有し、配列番号33に示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの3つのVL CDRを有し、配列番号41に示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む。

## 【0117】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性で構成される重鎖可変領域、及び配列番号41に示される配列に対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性で構成される軽鎖可変領域を含む。

## 【0118】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に示される配列において1つ以上の置換、欠失、または挿入を有する重鎖可変領域、及び配列番号41に示される配列番号において1つ以上の置換、欠失、または挿入を有する軽鎖可変領域を含む。

## 【0119】

本明細書に記載される方法のいくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの3つのVH CDRを有し、図1Bに示されるVH配列のいずれか1つに対して少なくとも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、及び本明細書に開示される任意のANTIBODY-Bクローンの3つのVL CDRを有し、図1Dに示される配列のいずれか1つに対して少なく

とも75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、または100%の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、を含む。

【0120】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び/または配列番号41に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の配列同一性を有する重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号41に対して少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約97%、または少なくとも約99%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

10

【0121】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び/または配列番号41に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び配列番号41に対して少なくとも約80%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び/または配列番号41に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び配列番号41に対して少なくとも約90%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び/または配列番号41に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する重鎖可変領域、及び配列番号41に対して少なくとも約95%の配列同一性を有する軽鎖可変領域を含む。

20

【0122】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33を含む重鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号41を含む軽鎖可変領域を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33を含む重鎖可変領域及び配列番号41を含む軽鎖可変領域、を含む。

30

【0123】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号33のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3、ならびに配列番号41のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、(i)配列番号33のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖可変領域、及び(ii)配列番号41のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域のCDR1、CDR2、及びCDR3を含む軽鎖可変領域、を含む。

40

【0124】

本開示のヒト化VH/VLコンストラクトとしては、限定されないが、図1A~1Dに記載されている配列番号のものが挙げられる。

【0125】

抗TfR1抗体の定常領域

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗TfR1抗体の可変領域は、定常領域と融合される。定常領域は、定常重鎖(CH)ドメイン(例えば、CH1、ヒンジ、CH2、及び/またはCH3ドメイン(複数可)またはそれらの任意の組み合わせ)及び定常軽鎖(CL)ドメインを有する。いくつかの実施形態において、CHドメインは、

50

I g G 1 分子または I g G 4 分子由来である。いくつかの実施形態において、C H ドメインは、I g G 2 分子、I g G 3 分子、または I g G 分子由来である。本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の V H は、下の表 5 に示されている以下の定常重鎖 ( C H ) コンストラクトのいずれか 1 つと融合され得る。本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の V L は、下の表 5 に示されている以下の定常軽鎖 ( C L ) コンストラクトのいずれか 1 つと融合され得る。いくつかの実施形態において、V H / C H 1 ( I g G 1 由来の C H 1 ) コンストラクトは、さらに、下の表 5 に示されているヒンジ領域 ( 例えば、E S ) と融合される。いくつかの実施形態において、V H / C H 1 ( I g G 1 由来の C H 1 ) コンストラクトは、さらに、アミノ酸配列 E、E P、E P K、または配列番号 5 8 ~ 7 4 のいずれか 1 つを含むヒンジ領域と融合される。いくつかの実施形態において、V H / C H 1 ( I g G 4 由来の C H 1 ) コンストラクトは、さらに、下の表 5 に示されているヒンジ領域 ( 例えば、E S ) と融合される。いくつかの実施形態において、V H / C H 1 ( I g G 4 由来の C H 1 ) コンストラクトは、さらに、アミノ酸配列 E、E S、E S K、または配列番号 7 5 ~ 9 0 のいずれか 1 つを含むヒンジ領域と融合される。いくつかの実施形態において、V H / V L - C H 1 / C L コンストラクトは、ヒンジを含有しない。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は、当該技術分野で既知の任意のヒンジ領域である。いくつかの実施形態において、ヒンジ領域は天然に存在するものであり、例えば、天然に存在する I g G 1、I g G 2、I g G 3、または I g G 4 分子に由来する。他の実施形態では、ヒンジ領域は、天然に存在するヒンジを基準とする修飾 ( 複数可 ) を含有する。

10

**【 0 1 2 6 】**

20

いくつかの実施形態において、本開示の抗 T f R 1 抗体は、定常領域のうちの少なくとも 1 つ以上が修飾されているかまたは欠失しているものである。いくつかの実施形態において、抗体は、重鎖定常ドメイン ( C H 1、C H 2 または C H 3 ) 及び / または軽鎖定常領域 ( C L ) に対する 1 つ以上の修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、修飾された抗体の重鎖定常領域は、少なくとも 1 つのヒト定常領域を含む。いくつかの実施形態において、修飾された抗体の重鎖定常領域は、2 つ以上のヒト定常領域を含む。いくつかの実施形態において、V H は、当該技術分野で既知の任意の C H 1 コンストラクトと融合され、V L は、当該技術分野で既知の任意の C L と融合される。いくつかの実施形態において、コンストラクトの定常軽鎖 ( C L ) は、天然に存在するヒトカップ定常領域である。いくつかの実施形態において、定常領域に対する修飾には、1 つ以上の領域における 1 つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換が含まれる。いくつかの実施形態においては、1 つ以上の領域が、修飾された抗体の定常領域から部分的または全体的に欠失する。いくつかの実施形態においては、C H 2 ドメイン及び C H 3 ドメインの全体が、抗体から除去されている。いくつかの実施形態において、欠失した定常領域は、短いアミノ酸スペーサーで置き換えられ、これにより、不在の定常領域によって通常付与される分子の可撓性がいくらかもたらされる。いくつかの実施形態において、修飾された抗体は、抗体のヒンジ領域と直接融合した C H 1 ドメインを含む。いくつかの実施形態において、修飾された抗体は、底部 F c と融合した F a b を含む。

30

**【 0 1 2 7 】**

いくつかの実施形態において、本開示の抗 T f R 1 抗体は、リンカー ( 例えば、下の表 5 に示されているリンカー ) を含有する。いくつかの実施形態において、リンカーは、本開示の抗 T f R 1 抗体の F c 領域と F a b 領域との間に配置される。

40

## 【表 5 - 1】

表 5 : 定常領域及びヒンジ配列

ドメイン	配列
I g G 1 または I g G 4 C H 1	
IgG1 CH1(ヒンジなし) (配列番号 45)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKV
IgG1 CH1 (下線部ヒンジ) (配列番号 46)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN <b>TKVDKKVEPKSCDKTHTCPP</b>
IgG1 CH1(ヒンジなし) (配列番号 47)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN <b>TKVDKRV</b>
IgG1 CH1 (下線部ヒンジ) (配列番号 48)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN <b>TKVDKRVESKYGPPCP</b>
IgG1 CH1(ヒンジなし) (配列番号 49)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSN <b>TKVDKKV</b>

10

20

30

40

50

【表 5 - 2】

IgG1 CHI (下線部ヒンジ) (配列番号 50)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALG <u>CL</u> VKDYPFPEPVTVSWNSGAL LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN <u>HKPSN</u> <u>TKVDKKVEPKSC</u>
IgG4 CHI (ヒンジなし) (配列番号 51)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG <u>CL</u> VKDYPFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV <u>DHKPSNT</u> <u>KVDKRV</u>
IgG4 CHI (下線部ヒンジ) (配列番号 52)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALG <u>CL</u> VKDYPFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNV <u>DHKPSNT</u> <u>KVDKR<u>VE</u>S</u>
Fc hIgG1.agly DelPG (配列番号 198)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL <u>S</u>
Fc hIgG1.agly DelG (配列番号 199)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL <u>SP</u>
Fc hIgG1.agly (配列番号 200)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL <u>SPG</u>
ヒンジFc hIgG1.agly (配列番号 201)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSR DELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL <u>SP</u> <u>G</u>
ヒンジFc hIgG1.agly(KnobS) (配列番号 202)	DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL <u>SP</u> <u>G</u>
Fc hIgG1.agly(KnobS) (配列番号 203)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL <u>SPG</u>
ヒンジFc hIgG1.agly(HoleS) (配列番号 195)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSD GSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL <u>SPG</u>
ヒンジ領域	
IgG1ヒンジA (配列番号 53)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGP
IgG1ヒンジB (配列番号 54)	EPKSCDKTHTCPP
IgG1ヒンジC (配列番号 55)	EPKSC
IgG4ヒンジD (配列番号 56)	ESKYGPPCPPCPAPELLGGP
IgG4ヒンジE (配列番号 57)	ESKYGPPCP

10

20

30

40

50

【表 5 - 3】

IgG4ヒンジF	ES
IgG1ヒンジG (配列番号 58)	EPKS
IgG1ヒンジH (配列番号 59)	EPKSCD
IgG1ヒンジI (配列番号 60)	EPKSCDK
IgG1ヒンジJ (配列番号 61)	EPKSCDKT
IgG1ヒンジK (配列番号 62)	EPKSCDKTH
IgG1ヒンジL (配列番号 63)	EPKSCDKTHT
IgG1ヒンジM (配列番号 64)	EPKSCDKTHTC
IgG1ヒンジN (配列番号 65)	EPKSCDKTHTCP
IgG1ヒンジO (配列番号 66)	EPKSCDKTHTCPPC
IgG1ヒンジP (配列番号 67)	EPKSCDKTHTCPPCP
IgG1ヒンジQ (配列番号 68)	EPKSCDKTHTCPPCPA
IgG1ヒンジR (配列番号 69)	EPKSCDKTHTCPPCPAP
IgG1ヒンジS (配列番号 70)	EPKSCDKTHTCPPCPAPE
IgG1ヒンジT (配列番号 71)	EPKSCDKTHTCPPCPAPEL
IgG1ヒンジU (配列番号 72)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELL
IgG1ヒンジV (配列番号 73)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLG
IgG1ヒンジW (配列番号 74)	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG
IgG4ヒンジX	ESK
IgG4ヒンジY (配列番号 75)	ESKY
IgG4ヒンジZ (配列番号 76)	ESKYG
IgG4ヒンジZA (配列番号 77)	ESKYGP
IgG4ヒンジZB (配列番号 78)	ESKYGPP
IgG4ヒンジZC (配列番号 79)	ESKYGPPC
IgG4ヒンジZD (配列番号 80)	ESKYGPPCPP
IgG4ヒンジZE (配列番号 81)	ESKYGPPCPPC
IgG4ヒンジZF (配列番号 82)	ESKYGPPCPPCP
IgG4ヒンジZG (配列番号 83)	ESKYGPPCPPCPA
IgG4ヒンジZH (配列番号 84)	ESKYGPPCPPCPAP
IgG4ヒンジZI (配列番号 85)	ESKYGPPCPPCPAPE
IgG4ヒンジZJ (配列番号 86)	ESKYGPPCPPCPAPEF
IgG4ヒンジZK (配列番号 87)	ESKYGPPCPPCPAPEFL
IgG4ヒンジZL (配列番号 88)	ESKYGPPCPPCPAPEFLG
IgG4ヒンジZM (配列番号 89)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGG
IgG4ヒンジZN (配列番号 90)	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGP
C L ドメイン	

10

20

30

40

50

【表 5 - 4】

ヒトカップ CL (配列番号 91)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGEC
ヒトカップ CL (Δ C214) (配列番号 92)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDN ALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVT HQGLSSPVTKSFNRGE
リンカー	
リンカーS	S
リンカーSG2	SGG
リンカーSG4 (配列番号 204)	SGGGG
リンカーSG4SG4 (配列番号 205)	SGGGGSGGGG
リンカーSG4SG4SG4 (配列番号 206)	SGGGGSGGGGSGGGG
リンカーG3SG5 (配列番号 207)	GGGSGGGGG
リンカーG4SG4SG4S (配列番号 208)	GGGGSGGGGSGGGGS
リンカーTG	TG

10

20

## 【0128】

本明細書に記載される抗体可変領域と組み合わせることができる他の例示的な定常領域（例えば、ヒンジ領域）としては、限定されないが、Peters SJ, et al. J Biol Chem. 2012 Jul 13; 287(29): 24525-33、及びHeads JT, et al. Protein Sci. 2012 Sep; 21(9): 1315-22（参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）に記載されるヒンジ領域が挙げられる。

## 【0129】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1796（配列番号192）を含む第1のポリペプチド及びTOC1775（配列番号94）を含む第2のポリペプチド、を含む。

30

## 【0130】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1797（配列番号193）を含む第1のポリペプチド、TOC1801（配列番号195）を含む第2のポリペプチド、及びTOC1775（配列番号94）を含む第3のポリペプチド、を含む。

## 【0131】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1798（配列番号180）を含む第1のポリペプチド及びTOC1775（配列番号94）を含む第2のポリペプチド、を含む。

## 【0132】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1799（配列番号194）を含む第1のポリペプチド、TOC1801（配列番号195）を含む第2のポリペプチド、及びTOC1775（配列番号94）を含む第3のポリペプチド、を含む。

40

## 【0133】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1785（配列番号174）を含む第1のポリペプチド及びTOC1715（配列番号196）を含む第2のポリペプチド、を含む。

## 【0134】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1786（配列番号175）を含む第1のポリペプチド及びTOC1715（配列番号196）を含む第2のポリペ

50

チド、を含む。

【0135】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1787（配列番号176）を含む第1のポリペプチド及びTOC1715（配列番号196）を含む第2のポリペプチド、を含む。

【0136】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1710（配列番号177）を含む第1のポリペプチド及びTOC1715（配列番号196）を含む第2のポリペプチド、を含む。

【0137】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1711（配列番号178）を含む第1のポリペプチド及びTOC1715（配列番号196）を含む第2のポリペプチド、を含む。

10

【0138】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1712（配列番号179）を含む第1のポリペプチド及びTOC1715（配列番号196）を含む第2のポリペプチド、を含む。

【0139】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1713（配列番号180）を含む第1のポリペプチド及びTOC1715（配列番号196）を含む第2のポリペプチド、を含む。

20

【0140】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1714（配列番号181）を含む第1のポリペプチド及びTOC1715（配列番号196）を含む第2のポリペプチド、を含む。

【0141】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1788（配列番号182）を含む第1のポリペプチド及びTOC1721（配列番号197）を含む第2のポリペプチド、を含む。

【0142】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1789（配列番号183）を含む第1のポリペプチド及びTOC1721（配列番号197）を含む第2のポリペプチド、を含む。

30

【0143】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1790（配列番号184）を含む第1のポリペプチド及びTOC1721（配列番号197）を含む第2のポリペプチド、を含む。

【0144】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1791（配列番号185）を含む第1のポリペプチド及びTOC1721（配列番号197）を含む第2のポリペプチド、を含む。

40

【0145】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1792（配列番号186）を含む第1のポリペプチド及びTOC1721（配列番号197）を含む第2のポリペプチド、を含む。

【0146】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、TOC1793（配列番号187）を含む第1のポリペプチド及びTOC1721（配列番号197）を含む第2のポリペプチド、を含む。

【0147】

50

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T O C 1 7 9 4 ( 配列番号 1 8 8 ) を含む第 1 のポリペプチド及び T O C 1 7 2 1 ( 配列番号 1 9 7 ) を含む第 2 のポリペプチド、を含む。

【 0 1 4 8 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T O C 1 7 9 5 ( 配列番号 1 8 9 ) を含む第 1 のポリペプチド及び T O C 1 7 2 1 ( 配列番号 1 9 7 ) を含む第 2 のポリペプチド、を含む。

【 0 1 4 9 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T O C 1 7 2 8 ( 配列番号 1 9 0 ) を含むポリペプチド、を含む。

10

【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T O C 1 7 2 9 ( 配列番号 1 9 1 ) を含むポリペプチド、を含む。

【 0 1 5 1 】

また、本明細書では、ヒト T f R 1 への結合に対して、本明細書に記載される抗体の 1 つ以上と競合する抗体も提供される。いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体のうちの一つと同じエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、抗体は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体のうちの一つによって結合されるエピトープと重なり合うエピトープに結合する。いくつかの実施形態において、T f R 1 への結合に対して、本明細書に記載される抗体の 1 つ以上と競合する抗体は、本明細書に記載されるエピトープビニング法を使用して同定される。

20

【 0 1 5 2 】

いくつかの実施形態において、抗体は、T f R 1 への結合に対して、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体と競合する。いくつかの実施形態において、抗体は、ヒト T f R 1 への結合に対して、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体と競合する。いくつかの実施形態において、抗体は、T f R 1 ( 例えば、ヒト T f R 1 ) への結合に対して、参照抗体と競合し、当該参照抗体は、( a ) G I D F S S S G Y M C ( 配列番号 1 0 1 ) を含む重鎖可変領域 C D R 1、C I Y T Y S S N T Y Y A A S V K G ( 配列番号 1 0 3 ) を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び G T Y G Y T G Y T Y T M G Y F S L ( 配列番号 1 0 6 ) を含む重鎖可変領域 C D R 3、を含む重鎖可変領域、及び ( b ) Q A S Q N I N S Y L A ( 配列番号 1 0 7 ) を含む軽鎖可変領域 C D R 1、R A S S L E S ( 配列番号 1 0 8 ) を含む軽鎖可変領域 C D R 2、及び Q S Y Y Y S G S S N Y N A ( 配列番号 1 1 0 ) を含む軽鎖可変領域 C D R 3、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、T f R 1 ( 例えば、ヒト T f R 1 ) への結合に対して、参照抗体と競合し、当該参照抗体は、配列番号 1 6 を含む重鎖可変領域及び配列番号 3 5 を含む軽鎖可変領域、を含む。

30

【 0 1 5 3 】

いくつかの実施形態において、抗体は、T f R 1 ( 例えば、ヒト T f R 1 ) への結合に対して、参照抗体と競合し、当該参照抗体は、( a ) G F S F S N S Y W I C ( 配列番号 1 1 6 ) を含む重鎖可変領域 C D R 1、C I N T D A D S T N Y A S W A R G ( 配列番号 1 1 7 ) を含む重鎖可変領域 C D R 2、及び Q N N V F D P G Y N L ( 配列番号 1 1 9 ) を含む重鎖可変領域 C D R 3、を含む重鎖可変領域、及び ( b ) R A S Q N I G S N L A ( 配列番号 1 2 0 ) を含む軽鎖可変領域 C D R 1、D A S K L E S ( 配列番号 1 2 2 ) を含む軽鎖可変領域 C D R 2、及び Q C T V R G G A Y G N A ( 配列番号 1 2 4 ) を含む軽鎖可変領域 C D R 3、を含む軽鎖可変領域、を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、T f R 1 ( 例えば、ヒト T f R 1 ) への結合に対して、参照抗体と競合し、当該参照抗体は、配列番号 3 3 を含む重鎖可変領域及び配列番号 4 1 を含む軽鎖可変領域、を含む。

40

【 0 1 5 4 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体は、定常領域のうち少なくとも 1 つ以上が修飾されているかまたは欠失している抗体を含む。いくつかの

50

実施形態において、抗体は、重鎖定常領域（C H 1、ヒンジ、C H 2またはC H 3）の1つ以上に対する、及び/または軽鎖定常領域（C L）に対する1つ以上の修飾を含み得る。いくつかの実施形態において、修飾された抗体の重鎖定常領域は、少なくとも1つのヒト定常領域を含む。いくつかの実施形態において、修飾された抗体の重鎖定常領域は、2つ以上のヒト定常領域を含む。いくつかの実施形態において、定常領域に対する修飾には、1つ以上の領域における1つ以上のアミノ酸の付加、欠失、または置換が含まれる。いくつかの実施形態においては、1つ以上の領域が、修飾された抗体の定常領域またはヒンジ領域から部分的または全体的に欠失する。いくつかの実施形態においては、C H 2ドメインの全体が、抗体から除去されている。いくつかの実施形態において、欠失した定常領域は、短いアミノ酸スペーサーで置き換えられ、これにより、不在の定常領域によって通常付与される分子の可撓性がいくらかもたらされる。いくつかの実施形態において、修飾された抗体は、抗体のヒンジ領域と直接融合したC H 3ドメインを含む。いくつかの実施形態において、修飾された抗体は、ヒンジ領域と修飾C H 2及び/または修飾C H 3ドメインとの間に挿入されたペプチドスペーサーを含む。

10

**【0155】**

いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号94に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖を含み、配列番号94に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号94に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号94に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号94に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号94に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93の重鎖及び/または配列番号94の軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93の重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号94の軽鎖を含む抗体である。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93の重鎖及び配列番号94の軽鎖を含む。

20

30

**【0156】**

いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93に対して1、2、もしくは3つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号94に対して1、2、もしくは3つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号93に対して1、2、もしくは3つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する重鎖を含み、配列番号94に対して1、2、もしくは3つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する軽鎖を含む。

40

**【0157】**

いくつかの実施形態において、抗T f R 1抗体は、配列番号95に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有

50



の実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 7 の重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 6 の軽鎖を含む抗体である。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 7 の重鎖及び配列番号 9 6 の軽鎖を含む。

【 0 1 6 0 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 7 に対して 1、2、もしくは 3 つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 6 に対して 1、2、もしくは 3 つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 7 に対して 1、2、もしくは 3 つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する重鎖を含み、配列番号 9 6 に対して 1、2、もしくは 3 つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する軽鎖を含む。

10

【 0 1 6 1 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 6 に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する重鎖を含み、配列番号 9 6 に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 6 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号 9 6 に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号 9 6 に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 の重鎖及び/または配列番号 9 6 の軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 の重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 6 の軽鎖を含む抗体である。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 の重鎖及び配列番号 9 6 の軽鎖を含む。

20

30

【 0 1 6 2 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 に対して 1、2、もしくは 3 つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 6 に対して 1、2、もしくは 3 つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 8 に対して 1、2、もしくは 3 つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する重鎖を含み、配列番号 9 6 に対して 1、2、もしくは 3 つ、またはそれ以上の修飾（例えば、置換、欠失、または挿入）を有するアミノ酸配列、を有する軽鎖を含む。

40

【 0 1 6 3 】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 9 9 に対して少なくとも 8 0 %、少なくとも 8 5 %、少なくとも 9 0 %、または少なくとも 9 5 % の配列同一性を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、配列番号 1 0 0 に対

50

して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号99に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖を含み、配列番号100に対して少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号99に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号100に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号99に対して少なくとも90%の配列同一性を有する重鎖、及び配列番号100に対して少なくとも90%の配列同一性を有する軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号99に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号100に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号99に示されるアミノ酸配列を含む重鎖、及び配列番号100に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖、を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号99の重鎖及び/または配列番号100の軽鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号99の重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号100の軽鎖を含む抗体である。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、配列番号99の重鎖及び配列番号100の軽鎖を含む。

10

20

#### 【0164】

本開示は、さらに、本明細書に記載される組み換え抗体、モノクローナル抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、及びヒト抗体、またはそれらの抗体フラグメントに対して実質的に相同である、追加のバリエーション及び同等物を包含する。いくつかの実施形態においては、抗体の結合親和性を改善することが望ましい。いくつかの実施形態においては、限定されないが、特異性、熱安定性、発現レベル、エフェクター機能（複数可）、グリコシル化、免疫原性、及び/または溶解性を含む、抗体の生物学的特性を調節することが望ましい。当業者は、アミノ酸の変化により、グリコシル化部位の数もしくは位置の変化または膜アンカリング特性の変更等、抗体の翻訳後プロセスが変更され得ることを認めるであろう。

#### 【0165】

抗体のエフェクター機能は、アミノ酸変異及び/またはドメイン置換（例えば、限定されないが、Dumet et al. MABS 2019; 11(8): 1341-50に記載されているものを含む）によって調節することができる。薬物動態（例えば、Dall'acqua et al. J of Immunology 2002; 169(9) 5171-80）、グリコシル化、免疫原性、溶解性、及び安定性等の追加特性は、変異または置換によるFcの修飾によって操作することができる。加えて、定常ドメイン内に新規の抗原特異性を導入して、新しいパラトープを創出することもできる（例えば、Wozniak-Knopp et al. P E D S 2010; 23(4): 289-97）。Fabの親和性またはアビディティは、抗体のドメイン間の結合状態を変化させること（抗体の上部からFabを取り外し、0~40個のアミノ酸による任意の長さのリンカーでFabをFc C末端に連結させ、FabのVHドメインまたはVLドメインのいずれかのN末端に融合すること等）によって調節され得、それによって、潜在的に抗原への結合に対する親和性またはアビディティが調節され、エフェクター機能が調節された、「逆さ」の抗体が創出される（例えば、Weber et al. Cell Reports 2018; 22: 149-62）。

30

40

#### 【0166】

バリエーションは、抗体またはポリペプチドをコードする1つ以上のヌクレオチドの置換、欠失、または挿入であり得、その結果、天然の抗体またはポリペプチドの配列と比較して、アミノ酸配列が変化する。いくつかの実施形態において、アミノ酸置換は、あるアミノ酸を、類似の構造的特性及び/または化学的特性を有する別のアミノ酸で置き換える

50

こと（ロイシンをセリンで置き換えること等、例えば、保存的アミノ酸置換）の結果である。挿入または欠失は、任意選択で、約1～5個のアミノ酸の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、置換、欠失、または挿入には、親分子と比較して25個未満のアミノ酸置換、20個未満のアミノ酸置換、15個未満のアミノ酸置換、10個未満のアミノ酸置換、5個未満のアミノ酸置換、4個未満のアミノ酸置換、3個未満のアミノ酸置換、または2個未満のアミノ酸置換が含まれる。いくつかの実施形態において、生物学的に有用な及び/または関連性のあるアミノ酸配列のバリエーションは、当該配列において系統的に挿入、欠失、または置換を行い、得られるバリエーションタンパク質の活性を親タンパク質と比較して検証することによって決定され得る。

**【0167】**

10

いくつかの実施形態において、バリエーションは、抗体またはポリペプチドのアミノ末端及び/またはカルボキシル末端に付加されたアミノ酸残基を含み得る。付加されるアミノ酸残基の長さは、1残基～100残基またはそれ以上の範囲であり得る。いくつかの実施形態において、バリエーションは、N末端メチオニル残基を含む。いくつかの実施形態において、バリエーションは、融合タンパク質を創出するための追加のポリペプチド/タンパク質（例えば、Fc領域）を含む。いくつかの実施形態において、バリエーションは、検出可能であるように操作され、検出可能な標識及び/またはタンパク質（例えば、蛍光タグまたは酵素）を含み得る。

**【0168】**

20

いくつかの実施形態においては、抗体の適切なコンフォメーションの維持に関与しないシステイン残基を置換するかまたは欠失させて、抗体の特性を調節する（例えば、酸化安定性を改善する、及び/または異常なジスルフィド架橋を防止する）。逆に、いくつかの実施形態においては、1つ以上のシステイン残基を付加して、ジスルフィド結合（複数可）を創出させて、安定性を改善する。

**【0169】**

いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、同一の重鎖間にジスルフィド結合を形成することができない（例えば、ホモ二量体形成を減少させる）ヒンジ領域バリエーションを含む。いくつかの実施形態において、抗体は、静電相互作用を変質させるアミノ酸の変化を有する重鎖を含む。いくつかの実施形態において、抗体は、疎水性/親水性相互作用を変質させるアミノ酸の変化を有する重鎖を含む。

30

**【0170】**

いくつかの実施形態において、本開示の抗体は「脱免疫化（deimmunized）」されている。抗体の脱免疫化は、一般に、抗体の結合親和性または他の所望の特性を優位に低下させることなく、予測されるT細胞エピトープを除去する結果となる、特定のアミノ酸変異（例えば、置換、欠失、付加）の導入からなる。

**【0171】**

本明細書に記載されるバリエーション抗体またはポリペプチドは、限定されないが、部位特異的変異誘発法、アラニンスキャニング変異誘発法、及びPCR変異誘発法を含む、当該技術分野で既知の方法を使用して生成され得る。

**【0172】**

40

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗TfR1抗体は、化学的に修飾される。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、グリコシル化、アセチル化、ペグ化、リン酸化、アミド化、既知の保護/ブロック基による誘導体化、タンパク質切断、及び/または細胞リガンドもしくは他のタンパク質への連結によって化学修飾されている。多数の化学修飾のいずれかが、既知の技法によって実施され得る。

**【0173】**

一般的に言って、抗原-抗体相互作用は、非共有結合性かつ可逆的であり、水素結合、疎水性相互作用、静電力及びファンデルワールス力の組み合わせによって形成される。抗原-抗体複合体の強度を説明する場合、親和性及び/またはアビディティという用語がよく使用される。抗体のその抗原に対する結合は可逆的なプロセスであり、結合の親和性は

50

通常、平衡解離定数 ( $K_D$ ) として報告される。 $K_D$  は、抗体の解離速度 ( $k_{off}$ ) (抗体がその抗原からどれくらいすぐに解離するか) と抗体の会合速度 ( $k_{on}$ ) (抗体がその抗原にどれくらいすぐに結合するか) の比である。いくつかの実施形態において、 $K_D$  値は、特定の抗体 / 抗原相互作用の  $k_{on}$  速度及び  $k_{off}$  速度を測定し、次いで、これらの値の比を使用して  $K_D$  値を算出することによって求められる。いくつかの実施形態において、 $K_D$  値は、個々の抗体 / 抗原相互作用の強度を評価及びランク付けするために使用される。抗体の  $K_D$  が低いほど、抗体のその標的に対する親和性が高い。いくつかの実施形態において、親和性は、Biacore システムの SPR 技術を用いて測定される。アビディティは、抗体 - 抗原複合体の総合的強度の指標を与えるものである。これは 3 つの主要パラメーターに依存する: (i) 標的に対する抗体の親和性、(ii) 抗体及び抗原の両方の価数、及び (iii) 相互作用する部分の構造配置。

10

【0174】

抗 T f R 1 抗体の結合特性

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 100 nM ~ 約 0.1 nM の  $K_D$  範囲 (一価の親和性) 内で T f R 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 1  $\mu$ M 以下、約 100 nM 以下、約 40 nM 以下、約 20 nM 以下、約 10 nM 以下、約 1 nM 以下、約 0.1 nM 以下、50 pM 以下、10 pM 以下、または 1 pM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f R 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 20 nM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 10 nM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 1 nM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 0.5 nM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 0.1 nM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 50 pM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 25 pM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 10 pM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 1 pM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、T f R 1 に対する抗体の解離定数は、Biacore チップ上に固定された T f R 1 タンパク質またはそのフラグメントを用い、チップ越しに結合剤を流して決定する解離定数である。いくつかの実施形態において、T f R 1 に対する結合剤 (例えば、抗体) の解離定数は、Biacore チップ上に捕捉した結合剤を用い、チップ越しに可溶性 T f R 1 を流して決定する解離定数である。

20

30

【0175】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 5 nM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f R 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 3 nM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 2 nM 以下の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 0.01 nM ~ 約 2.5 nM の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 0.1 nM ~ 約 5 nM の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 1 nM ~ 約 5 nM の  $K_D$  (一価の親和性) で T f r 1 に結合する。

40

【0176】

いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 1  $\mu$ M ~ 約 1 nM の範囲の半数効果濃度 ( $EC_{50}$ ) (一価の親和性) で T f R 1 に結合する。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、約 1  $\mu$ M 以下、約 100 nM 以下、約 40 nM 以下、約 20 nM 以下、約 10 nM 以下、約 1 nM 以下、または約 0.1 nM 以下の  $EC_{50}$  (一価の親和

50

性)でTfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、約1 $\mu$ M以下、約100nM以下、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、約1nM以下、または約0.1nM以下のEC<sub>50</sub>(一価の親和性)でTfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、約40nM以下、約20nM以下、約10nM以下、約1nM以下、または約0.1nM以下のEC<sub>50</sub>(一価の親和性)で、cyano TfR1及び/またはヒトTfR1に結合する。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、0.1nM~3nM、0.1nM~2nM、0.1nM~1nM、0.5nM~3nM、0.5nM~2nM、または0.5nM~1nMのEC<sub>50</sub>(一価の親和性)でTfR1に結合する。

#### 【0177】

いくつかの実施形態において、EC<sub>50</sub>値は、TfR1を発現する細胞に対する抗TfR1抗体の結合によって、蛍光活性化セルソーティング(FACS)を用いて決定される。いくつかの実施形態において、EC<sub>50</sub>値は、限定されないが、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)及びMesoscale Discovery(MSD)を含む、huTfR1外部ドメインでコーティングされたプレート上でのアッセイによって決定される。

#### 【0178】

##### 抗TfR1抗体の作製方法

本明細書に記載される抗TfR1抗体は、当該技術分野で既知の任意の適切な方法によって産生され得る。このような方法は、直接的なタンパク質合成法から、ポリペプチド配列をコードするDNA配列を構築し、その配列を適切な宿主で発現させる方法に及ぶ。いくつかの実施形態において、DNA配列は、目的の野生型タンパク質をコードするDNA配列を単離または合成することによる組み換え技術を用いて構築される。任意選択で、配列は、その機能的バリエーションを得るために、部位特異的変異誘発法によって変異誘発され得る。いくつかの実施形態において、目的のポリペプチドをコードするDNA配列は、オリゴヌクレオチドシンセサイザーを用いた化学合成によって構築される。オリゴヌクレオチドは、所望のポリペプチドのアミノ酸配列に基づいて、及び目的の組み換えポリペプチドを産生する宿主細胞に有利なコドンの選択に基づいてデザインされ得る。標準的な方法を適用して、単離される目的のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列を合成することができる。例えば、完全なアミノ酸配列を使用して、逆翻訳された遺伝子を構築することができる。さらに、単離される特定のポリペプチドをコードするヌクレオチド配列を含有する、DNAオリゴマーが合成され得る。例えば、所望のポリペプチドの一部をコードする、いくつかの小さなオリゴヌクレオチドを合成し、次いで、ライゲーションすることができる。個々のオリゴヌクレオチドは、典型的には、相補的アセンブリ用に5'または3'オーバーハングを含有する。

#### 【0179】

一旦組み立てられた(合成、部位特異的変異誘発、または別の方法によって)後、目的の特定のポリペプチドをコードするポリヌクレオチド配列は、発現ベクターに挿入され、所望の宿主におけるタンパク質発現に適切な発現制御配列に、有効に連結され得る。適切なアセンブリは、ヌクレオチド配列決定、制限酵素マッピング、及び/または適切な宿主における生物学的に活性なポリペプチドの発現によって確認され得る。当該技術分野でよく知られているように、トランスフェクトした遺伝子を宿主において高レベルで発現させるためには、当該遺伝子を、選択した発現宿主において機能する転写及び翻訳発現制御配列に、有効に連結させなければならない。

#### 【0180】

いくつかの実施形態において、組み換え発現ベクターは、ヒトTfR1に対する抗体をコードするDNAを増幅及び発現させるために使用される。例えば、組み換え発現ベクターは、哺乳動物、微生物、ウイルスまたは昆虫遺伝子由来の適切な転写及び/または翻訳調節エレメントに有効に連結された、抗TfR1抗体のポリペプチド鎖をコードする合成またはcDNA由来のDNAフラグメントを含む、複製可能なDNAコンストラクトであ

10

20

30

40

50

り得る。転写ユニットは一般に、(1) 遺伝子発現において調節的な役割を持つ遺伝要素(複数可)(例えば、転写プロモーターまたはエンハンサー)、(2) mRNAに転写され、タンパク質に翻訳される、構造配列またはコード配列、ならびに(3) 適切な転写及び翻訳の開始配列及び終止配列からなるアセンブリを含む。調節要素には、転写を制御するためのオペレーター配列が含まれ得る。通常は複製起点によって付与される宿主中で複製する機能、及び形質転換体を認識しやすくするための選択遺伝子も含まれ得る。DNA領域は、それらが互いに機能的に関連している場合、「有効に連結」されている。例えば、シグナルペプチド(分泌リーダー)に対するDNAは、ポリペプチドの分泌に関与する前駆体として発現される場合、ポリペプチドに対するDNAに有効に連結されている。プロモーターは、コード配列の転写を制御する場合、当該コード配列に有効に連結されている。またはリボソーム結合部位は、翻訳を可能にするように配置されている場合、コード配列に有効に連結されている。いくつかの実施形態において、酵母発現系における使用が意図される構造要素は、宿主細胞による翻訳されたタンパク質の細胞外分泌を可能にするリーダー配列を含む。いくつかの実施形態において、組み換えタンパク質がリーダー配列または輸送配列なしで発現される状況では、ポリペプチドは、N末端メチオニン残基を含み得る。続いて任意選択で、この残基を発現された組み換えタンパク質から切断することによって、最終生成物を得ることができる。

10

#### 【0181】

発現制御配列及び発現ベクターの選択は、一般に、宿主の選択に依存する。多種多様な発現宿主/ベクターの組み合わせを採用することができる。真核生物宿主に有用な発現ベクターとしては、例えば、SV40、ウシ乳頭腫ウイルス、アデノウイルス、及びサイトメガロウイルス由来の発現制御配列を含むベクターが挙げられる。細菌宿主に有用な発現ベクターとしては、既知の細菌プラスミド(pCR1、pBR322、pMB9及びそれらの誘導体を含む、E. coli由来のプラスミド等)、ならびに宿主範囲がより広いプラスミド(M13及び他の糸状一本鎖DNAファージ等)が挙げられる。

20

#### 【0182】

いくつかの実施形態において、本開示の抗TfR1抗体は、1つ以上のベクターから発現される。いくつかの実施形態において、重鎖ポリペプチドは、1つのベクターによって発現され、軽鎖ポリペプチドは、第2のベクターによって発現される。いくつかの実施形態において、重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドは、1つのベクターによって発現される。したがって、本開示は、本明細書に記載される抗TfR1抗体をコードするベクターを提供するものである。一実施形態において、ベクターは、本明細書に記載される抗TfR1抗体の重鎖ポリペプチドをコードする。一実施形態において、ベクターは、本明細書に記載される抗TfR1抗体の軽鎖ポリペプチドをコードする。一実施形態において、ベクターは、本明細書に記載される抗TfR1抗体の重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドをコードする。

30

#### 【0183】

抗TfR1抗体または抗原もしくは免疫原として使用するためのTfR1タンパク質もしくはそのフラグメントの発現に適切な宿主細胞としては、適切なプロモーターの制御下にある原核生物、酵母細胞、昆虫細胞、または高等真核細胞が挙げられる。原核生物としては、グラム陰性菌またはグラム陽性菌(例えば、E. coliまたはBacillus)が挙げられる。高等真核細胞としては、本明細書に記載されるような哺乳動物由来の樹立細胞系が挙げられる。無細胞翻訳系もまた採用され得る。細菌、真菌、酵母、及び哺乳動物細胞の宿主で使用するのに適切なクローニングベクター及び発現ベクター、ならびに抗体産生を含むタンパク質産生方法は、当該技術分野において周知である。

40

#### 【0184】

組み換えポリペプチドを発現させるために、様々な哺乳動物培養系が使用され得る。哺乳動物細胞における組み換えタンパク質の発現は、これらのタンパク質が、一般に正しくフォールディングされ、適切に修飾され、かつ生物学的に機能するという理由で望ましい場合がある。適切な哺乳動物宿主細胞株の例としては、限定されないが、COS-7(サ

50

ル腎臓由来)、L-929(マウス線維芽細胞由来)、C127(マウス乳腺腫瘍由来)、3T3(マウス線維芽細胞由来)、CHO(チャイニーズハムスター卵巣由来)、HeLa(ヒト子宮頸がん由来)、BHK(ハムスター腎臓線維芽細胞由来)、HEK-293(ヒト胎生腎由来)細胞株及びそれらのバリエーションが挙げられる。哺乳動物発現ベクターは、非転写要素(複製起点、発現対象の遺伝子に連結された適切なプロモーター及びエンハンサー、ならびに他の5'または3'隣接非転写配列等)、ならびに5'または3'非翻訳配列(必然的リボソーム結合部位、ポリアデニル化部位、スプライスドナー部位及びスプライスアクセプター部位等)ならびに転写終結配列を含み得る。

#### 【0185】

また、昆虫細胞培養系(例えば、バキュロウイルス)における組み換えタンパク質の発現も、正しくフォールディングされ、かつ生物学的に機能するタンパク質を産生するための最適な方法を提供するものである。昆虫細胞において異種タンパク質を産生させるためのバキュロウイルス系は、当業者に周知である。

#### 【0186】

したがって、本開示は、本明細書に記載される抗TfR1抗体を含む細胞を提供するものである。本開示はまた、本明細書に記載される抗TfR1抗体をコードする1つ以上のポリヌクレオチド、または本明細書に記載される抗TfR1抗体をコードする1つ以上のベクターを含む細胞を提供するものである。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載される抗TfR1抗体をコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載される抗TfR1抗体の重鎖をコードする第1のポリヌクレオチド、及び本明細書に記載される抗TfR1抗体の軽鎖をコードする第2のポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載される抗TfR1抗体の重鎖及び軽鎖をコードするポリヌクレオチドを含む。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載される抗TfR1抗体をコードするベクターを含む。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載される抗TfR1抗体の重鎖をコードする第1のベクター、及び本明細書に記載される抗TfR1抗体の軽鎖をコードする第2のベクターを含む。一実施形態では、細胞は、本明細書に記載される抗TfR1抗体の重鎖及び軽鎖をコードするベクターを含む。いくつかの実施形態において、細胞は、本明細書に記載される抗TfR1抗体を産生する。いくつかの実施形態において、細胞は抗体を産生する。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒトTfR1に結合する抗体を産生する。いくつかの実施形態において、細胞は、cyno TfR1に結合する抗体を産生する。いくつかの実施形態において、細胞は、ヒトTfR1及びcyno TfR1に結合する抗体を産生する。いくつかの実施形態において、細胞は、ANTIBODY-Aと名付けられた抗体を産生する。いくつかの実施形態において、細胞は、ANTIBODY-Aのヒト化バージョンを産生する。いくつかの実施形態において、細胞は、ANTIBODY-Bと名付けられた抗体を産生する。いくつかの実施形態において、細胞は、ANTIBODY-Bのヒト化バージョンを産生する。いくつかの実施形態において、細胞は原核細胞(例えば、E. coli)である。いくつかの実施形態において、細胞は真核細胞である。いくつかの実施形態において、細胞は哺乳動物細胞である。いくつかの実施形態において、細胞はハイブリドーマ細胞である。

#### 【0187】

宿主細胞によって産生されたタンパク質は、任意の適切な方法に従って精製され得る。標準的な方法としては、クロマトグラフィー(例えば、イオン交換、アフィニティー、及びサイズ排除カラムクロマトグラフィー)、遠心分離、溶解度差、またはタンパク質精製に関する任意の他の標準的技法によるものが挙げられる。アフィニティータグ(ヘキサヒスチジン(配列番号209)、マルトース結合ドメイン、インフルエンザ外被配列、及びグルタチオン-S-トランスフェラーゼ等)をタンパク質に付着させて、適切なアフィニティーカラムを通過させることによって、精製が容易になり得る。免疫グロブリンを精製するために使用されるアフィニティークロマトグラフィーとしては、限定されないが、プロテインA、プロテインG、及びプロテインLクロマトグラフィーが挙げられる。単離されたタンパク質は、限定されないが、タンパク質分解、サイズ排除クロマトグラフィー(

S E C )、質量分析 ( M S )、核磁気共鳴 ( N M R )、等電点電気泳動 ( I E F )、高速液体クロマトグラフィー ( H P L C )、及び x 線結晶構造解析を含む、当業者に既知の技法を使用して、物理的に特性評価することができる。単離されたタンパク質の純度は、限定されないが、S D S - P A G E、S E C、キャピラリーゲル電気泳動、I E F、及びキャピラリー等電点電気泳動 ( c I E F ) を含む、当業者に既知の技法を使用して測定することができる。

#### 【 0 1 8 8 】

いくつかの実施形態において、組み換えタンパク質を培養液中に分泌する発現系からの上清が、まず、市販のタンパク質濃縮フィルター (例えば、A m i c o n (登録商標) または M i l l i p o r e P e l l i c o n (登録商標) 限外濾過ユニット) を使用して濃縮される。濃縮ステップに続いて、濃縮物が適切な精製マトリックスにアプライされ得る。いくつかの実施形態において、陰イオン交換樹脂 (例えば、ペンダントジエチルアミノエチル ( D E A E ) 基を有するマトリックスまたは基質) が採用される。マトリックスは、アクリルアミド、アガロース、デキストラン、セルロース、またはタンパク質精製において一般的に採用される他のタイプであり得る。いくつかの実施形態において、陽イオン交換ステップが採用される。適切な陽イオン交換体としては、スルホプロピル基またはカルボキシメチル基を含む様々な不溶性マトリックスが挙げられる。いくつかの実施形態において、限定されないが、セラミックハイドロキシアパタイト ( C H T ) を含む、ハイドロキシアパタイト担体が採用される。いくつかの実施形態において、組み換えタンパク質をさらに精製するために、疎水性 R P - H P L C 担体 (例えば、ペンダントメチル基または他の脂肪族基を有するシリカゲル) を採用する、1つ以上の逆相 H P L C ステップが採用される。いくつかの実施形態において、組み換えタンパク質を分離するために、その疎水性に基づいて疎水性相互作用クロマトグラフィー ( H I C ) が用いられる。H I C では、一部の他の技法よりも変性が少ない条件下で機能する条件及びマトリックスが使用されるため、H I C は、生物学的活性を維持しながらタンパク質を精製するための有用な分離技術である。前述の精製ステップのいくつかまたはすべてを様々な組み合わせで用いることで、均質な組み換えタンパク質を得ることができる。

#### 【 0 1 8 9 】

いくつかの実施形態において、本開示の抗体は F a b であり、F a b は、まず、完全なモノクローナル A b を作製し、続いて化学的または酵素的切断 (例えば、ペプシン、パパイン、またはフィシン消化) によってモノクローナル抗体を消化して F ( a b ' )<sub>2</sub> フラグメントを得、続いてそのフラグメントを還元して F a b フラグメントを得ることによって生成され得る。このような技法は、当該技術分野において知られている。例えば、V i c t o r C - G e t a l . , B i o s e n s o r s a n d B i o e l e c t r o n i c s , 2 0 1 6 ( 8 5 ) : 3 2 - 4 5 を参照のこと。あるいは、本開示の抗体は、F ( a b ' )<sub>2</sub> 抗体フラグメントを組み換え合成した後、このフラグメントを化学的に還元して F a b ユニットを得ることによって作製される。

#### 【 0 1 9 0 】

##### ポリヌクレオチド

いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるポリペプチド (例えば、抗 T f R 1 抗体) をコードするポリヌクレオチドを含むポリヌクレオチド、を包含する。「ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド」という用語には、ポリペプチドのコード配列のみを含むポリヌクレオチド、ならびに追加のコード配列及び/または非コード配列を含むポリヌクレオチドが包含される。本開示のポリヌクレオチドは、R N A 形態であり得るか、または D N A 形態であり得る。D N A としては、c D N A、ゲノム D N A、及び合成 D N A が挙げられ、D N A は二本鎖または一本鎖であり得、一本鎖の場合、コード鎖または非コード (アンチセンス) 鎖であり得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド (例えば、ヌクレオチド配列) を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド (例え

ば、ヌクレオチド配列)を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、本明細書に記載される抗TfR1抗体の重鎖をコードするポリヌクレオチド(例えば、ヌクレオチド配列)、及び抗TfR1抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチド(例えば、ヌクレオチド配列)を含む。

#### 【0191】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号4~164のいずれか1つからなる群より選択されるアミノ酸配列を含むポリペプチド、をコードするポリヌクレオチド(例えば、ヌクレオチド配列)を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号4、配列番号5、配列番号6、配列番号7、配列番号8、配列番号9、配列番号10、配列番号11、配列番号12、配列番号13、配列番号14、配列番号15、配列番号16、配列番号17、配列番号18、配列番号19、配列番号20、配列番号21、配列番号22、配列番号23、配列番号24、配列番号25、配列番号26、配列番号27、配列番号28、配列番号29、配列番号30、配列番号31、配列番号32、配列番号33、配列番号34、配列番号35、配列番号36、配列番号37、配列番号38、配列番号39、配列番号40、配列番号41、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号93、配列番号94、配列番号95、配列番号96、配列番号97、配列番号98、配列番号99及び配列番号100のいずれか1つのアミノ酸配列を含むポリペプチド、をコードするポリヌクレオチド(例えば、ヌクレオチド配列)を含む。

#### 【0192】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号4~164のいずれか1つからなる群より選択されるアミノ酸配列を2つ以上含むポリペプチド、をコードするポリヌクレオチド(例えば、ヌクレオチド配列)を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号93のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号94のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号95のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号96のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号97のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号96のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号98のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号96のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号99のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号100のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

#### 【0193】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号4のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号34のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号12のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号35のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号15のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号35のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号16のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号35のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号17のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号35のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、(i)配列番号18のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び(ii)配列番号35のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 9 4 】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、( i ) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び( i i ) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、( i ) 配列番号 3 0 のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び( i i ) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、( i ) 配列番号 3 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び( i i ) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、( i ) 配列番号 3 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び( i i ) 配列番号 4 1 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、( i ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び( i i ) 配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、( i ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び( i i ) 配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、( i ) 配列番号 3 3 のアミノ酸配列を含むポリペプチド及び( i i ) 配列番号 4 4 のアミノ酸配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含む。

10

## 【 0 1 9 5 】

本開示はまた、本明細書に記載されるポリヌクレオチドのバリエーションを提供するものであり、当該バリエーションは、例えば、ポリペプチドのフラグメント、アナログ、及び/または誘導体をコードする。いくつかの実施形態において、本開示は、本明細書に記載されるポリペプチドをコードするポリヌクレオチドと少なくとも約 8 0 % 同一、少なくとも約 8 5 % 同一、少なくとも約 9 0 % 同一、少なくとも約 9 5 % 同一であり、いくつかの実施形態では、少なくとも約 9 6 %、9 7 %、9 8 % または 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド、を含むポリヌクレオチドを提供するものである。

20

## 【 0 1 9 6 】

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、配列番号 4 ~ 1 6 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドと少なくとも約 8 0 % 同一、少なくとも約 8 5 % 同一、少なくとも約 9 0 % 同一、少なくとも約 9 5 % 同一であり、いくつかの実施形態では、少なくとも約 9 6 %、9 7 %、9 8 %、または 9 9 % 同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを含む。また、配列番号 4 ~ 1 6 4 からなる群より選択されるアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズするポリヌクレオチドを含む、ポリヌクレオチドも提供される。いくつかの実施形態において、ハイブリダイゼーションは、当業者に既知であるように、高ストリンジェンシー条件下のものである。

30

## 【 0 1 9 7 】

本明細書で使用される場合、「参照ヌクレオチド配列と少なくとも、例えば、9 5 % 同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチド」という語句は、ポリヌクレオチド配列が、参照ヌクレオチド配列の各 1 0 0 ヌクレオチドあたり最大 5 つの点変異を含み得ることを除いて、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列が、参照配列と同一であることを意味することが意図される。換言すれば、参照ヌクレオチド配列と少なくとも 9 5 % 同一であるヌクレオチド配列を有するポリヌクレオチドを得るために、参照配列におけるヌクレオチドの最大 5 % が、欠失し得るかもしくは別のヌクレオチドで置換され得、またはいくつかのヌクレオチドが、参照配列における全ヌクレオチドの最大 5 % まで参照配列に挿入され得る。参照配列のこれらの変異は、参照ヌクレオチド配列の 5 ' 末端もしくは 3 ' 末端位置で、またはそれらの末端位置間の任意の位置で、参照配列におけるヌクレオチドの中で個々に点在して生じ得るか、または参照配列内の 1 つ以上の連続した群で点在して生じ得る。

40

## 【 0 1 9 8 】

50

ポリヌクレオチドバリエーションは、コード領域、非コード領域、またはその両方において変化を含有し得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションは、サイレント置換、付加、または欠失をもたらすが、コードされたポリペプチドの特性または活性を変更しない変化を含有する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションは、（遺伝暗号の縮重に起因して）ポリペプチドのアミノ酸配列を変えないサイレント置換を含む。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションは、コドンによってコードされるアミノ酸を変化させる、そのコドンに対する1つ以上（例えば、1、2、または3つ）の置換を含む、1つ以上の変異コドンを含む。コドンに1つ以上の置換を導入する方法は、当該技術分野において既知であり、例えば、PCR変異誘発及び部位特異的変異誘発等がある。ポリヌクレオチドバリエーションは、様々な理由により、例えば、特定の宿主に対してコドン発現を最適化する（例えば、ヒトmRNAのコドンを、E. coli等の細菌宿主が好むものに変更する）ために産生され得る。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションは、配列の非コード領域またはコード領域に、少なくとも1つのサイレント変異を含む。

10

**【0199】**

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションは、コードされたポリペプチドの発現（または発現レベル）を調節または変更するために産生される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションは、コードされたポリペプチドの発現を増加させるために産生される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションは、コードされたポリペプチドの発現を減少させるために産生される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションでは、親ポリヌクレオチド配列と比較して、コードされたポリペプチドの発現が増加する。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドバリエーションでは、親ポリヌクレオチド配列と比較して、コードされたポリペプチドの発現が減少する。

20

**【0200】**

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、同じリーディングフレーム内で、宿主細胞からのポリペプチドの発現及び分泌を補助するポリヌクレオチド（例えば、ポリペプチドの輸送を制御するための分泌配列として機能するリーダー配列）と融合した、ポリペプチド（例えば、抗体）のコード配列を含む。ポリペプチドは、当該ポリペプチドの「成熟」形態を形成するために宿主細胞によって切断されるリーダー配列を有し得る。

30

**【0201】**

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは、同じリーディングフレーム内で、マーカー配列またはタグ配列と融合した、ポリペプチド（例えば、抗体）のコード配列を含む。例えば、いくつかの実施形態において、マーカー配列はヘキサヒスチジン（配列番号209）タグ（HISタグ）であり、これにより、当該マーカーと融合したポリペプチドの効率的な精製が可能になる。いくつかの実施形態において、哺乳動物宿主（例えば、COS-7細胞）が使用される場合、マーカー配列は、インフルエンザヘマグルチニンタンパク質に由来するヘマグルチニン（HA）タグである。いくつかの実施形態において、マーカー配列は、FLAG（商標）タグである。いくつかの実施形態において、マーカーは、他のマーカーまたはタグと組み合わせて使用される。

40

**【0202】**

いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは単離される。いくつかの実施形態において、ポリヌクレオチドは実質的に純粋である。

**【0203】****ベクター及び細胞**

本明細書に記載されるポリヌクレオチドの1つ1つを含むベクター及び細胞もまた提供される。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、本明細書に記載される抗TfR1抗体をコードするポリヌクレオチド分子を含む。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、本明細書に記載される抗TfR1抗体の一部であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、本明細書

50

に記載される抗 T f R 1 抗体の重鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む。いくつかの実施形態において、発現ベクターは、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の重鎖ポリペプチド及び軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体をコードするポリヌクレオチド分子を含む発現ベクター、を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の一部であるポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む発現ベクター、を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体をコードするポリヌクレオチド分子を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の重鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む発現ベクター、を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む発現ベクター、を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の重鎖ポリペプチドをコードする第 1 のポリヌクレオチド及び本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の軽鎖ポリペプチドをコードする第 2 のポリヌクレオチドを含む発現ベクター、を含む。いくつかの実施形態において、宿主細胞は、( i i ) 本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体の重鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む第 1 の発現ベクター、及び ( i i ) 抗 T f R 1 抗体の軽鎖ポリペプチドをコードするポリヌクレオチド分子を含む第 2 の発現ベクター、を含む。

#### 【 0 2 0 4 】

##### 抗 T f R 1 抗体の物理的 / 化学的特性の解析

本開示の抗 T f R 1 抗体は、その物理的 / 化学的特性及び / または生物学的活性について、当該技術分野で既知の様々な方法によって解析され得る。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 (例えば、ヒト T f R 1 及び / または c y n o T f R 1) に結合する能力について試験される。結合アッセイとしては、限定されないが、S P R (例えば、B i a c o r e)、E L I S A、及び F A C S が挙げられる。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 受容体へのトランスフェリンの結合を阻害、低減、または遮断する能力について試験される。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T f R 1 活性を阻害、低減、または遮断する能力について試験される。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、T F R 1 と共に内在化し、T f R 1 内在化の増加を誘導する能力について試験される。加えて、抗体は、溶解性、安定性、熱安定性、粘度、発現レベル、発現品質、及び / または精製効率について評価され得る。

#### 【 0 2 0 5 】

いくつかの実施形態において、T f R 1 に対して生成されたモノクローナル抗体は、各抗体それぞれが認識するエピトープに基づいて、「エピトープビニング」として知られるプロセスでグループ分けされる。一般に、抗体は、ペアワイズコンビナトリアル様式で試験され、互いに競合する抗体がピンにグループ分けされる。例えば、プレミックスピニングアッセイでは、一次抗体が表面に固定され、固定された一次抗体越しに、二次抗体及び抗原のプレミックス溶液が流される。並行して、標的タンパク質が表面に固定され、固定された抗原越しに 2 種の抗体が流され、2 種の抗体は競合して標的に結合する。この技法から、互いに遮断し合う抗体を同定することができる。各抗体について、他の抗体と比較した競合的遮断プロファイルが創出される。その結果により、各抗体がどのピンに入るかが決定される。エピトープビニングのハイスループット法が当該技術分野で既知であり、それは、多数の抗体のスクリーニング及び特性評価を可能にするものである。同様のエピトープに結合する抗体は、多くの場合、同様の機能を共有している。逆に、異なるエピトープに結合する抗体は、異なる機能活性を有し得る。

#### 【 0 2 0 6 】

いくつかの実施形態において、エピトープピンは、A N T I B O D Y - A 及び A N T I B O D Y - B からなる群の少なくとも 1 つの抗体を含む。

## 【0207】

エピトープマッピングは、抗体（または他の結合剤）が結合する、標的タンパク質上の結合部位、領域、またはエピトープを同定する方法である。標的タンパク質上のエピトープをマッピングするための様々な方法が当該技術分野で既知である。これらの方法としては、変異誘発法（限定されないが、ショットガン変異誘発法、部位特異的変異誘発法、及びアラニンスキャニング法を含む）、ドメインまたはフラグメントスキャニング法、ペプチドスキャニング法（例えば、Pepscan技術）、ディスプレイ法（例えば、ファージディスプレイ法、微生物ディスプレイ法、及びリボソーム/mRNAディスプレイ法）、タンパク質分解及び質量分析を伴う方法、ならびに構造決定（例えば、X線結晶構造解析及びNMR）が挙げられる。抗体が結合するエピトープをマッピングするための詳細な例示的方法は、Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, N.J.)のMorris (1996) “Epitope Mapping Protocols” に示されている。

10

## 【0208】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗TfR1抗体は、限定されないが、N末端配列決定、アミノ酸分析、HPLC、質量分析、イオン交換クロマトグラフィー、及びパイン消化を含むアッセイによって特性評価される。

## 【0209】

いくつかの実施形態において、TfR1活性に影響を及ぼす抗TfR1抗体を同定するためのアッセイが提供される。いくつかの実施形態において、TfへのTfR1の結合を遮断する抗TfR1抗体の能力を評価するために、SPR、ELISA、またはFACSアッセイが使用される。いくつかの実施形態において、ナチュラルキラー（NK）細胞活性に影響を及ぼす抗TfR1抗体の能力を評価するために、細胞毒性アッセイが使用される。いくつかの実施形態において、T細胞活性に影響を及ぼす抗TfR1抗体の能力を評価するために、増殖アッセイが使用される。

20

## 【0210】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗TfR1抗体は、ヒトTfR1のアンタゴニストである。いくつかの例では、「阻害する」、「誘導する」、「低減する」、「増加する」、「増強する」という用語は、抗TfR1抗体を含むコンジュゲートで処理しない場合のレベル/活性と比較したものである。いくつかの例では、「阻害する」、「誘導する」、「低減する」、「増加する」、「増強する」という用語は、抗TfR1抗体を含むコンジュゲートで処理する前のレベル/活性と比較したものである。

30

## 【0211】

抗TfR1抗体コンジュゲート、融合物、及び複合体

本開示はまた、本明細書に記載される抗TfR1抗体を含むコンジュゲート、融合タンパク質、及び複合体を提供する。いくつかの実施形態において、本開示の抗TfR1抗体は、第2の分子にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、細胞傷害性薬剤または細胞傷害性成分にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、ADC（抗体薬物複合体）を形成するために細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされる。

40

## 【0212】

本明細書に記載される抗TfR1抗体を含むコンジュゲートは、当該技術分野で既知の任意の適切な方法を用いて作製され得る。いくつかの実施形態において、コンジュゲートの構成要素は、共有結合相互作用によって連結される。いくつかの実施形態において、コンジュゲートは、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオール)プロピオン酸塩（SPDP）、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（アジブイミド酸ジメチルHCl等）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジル等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス(p-アジドベンゾイル)ヘキサジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス-(p-ジアゾニウムベンゾイル)-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トルエン2,6-ジイソシアネート等）

50

、及びビス - 活性フッ素化合物 ( 1 , 5 - ジフルオロ - 2 , 4 - ジニトロベンゼン等 ) 等の様々な二官能性タンパク質カップリング剤を用いて作製される。

【 0 2 1 3 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体は、検出可能な物質または分子にコンジュゲートされ、この検出可能な物質または分子により、薬剤が診断及び/または検出のために使用可能となる。検出可能な物質としては、限定されないが、酵素 ( 西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ベータガラクトシダーゼ、及びアセチルコリンエステラーゼ等 )、補欠分子族 ( ビオチン及びフラビン ( 複数可 ) 等 )、蛍光物質 ( ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート ( F I T C )、ローダミン、テトラメチルローダミンイソチオシアネート ( T R I T C )、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、ダンシルクロリド、シアニン ( C y 3 )、及びフィコエリトリン等 )、生物発光物質 ( ルシフェラーゼ等 )、放射性物質 (  $^{212}\text{Bi}$ 、 $^{14}\text{C}$ 、 $^{57}\text{Co}$ 、 $^{51}\text{Cr}$ 、 $^{67}\text{Cu}$ 、 $^{18}\text{F}$ 、 $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ 、 $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ 、 $^{68}\text{Ge}$ 、 $^3\text{H}$ 、 $^{166}\text{Ho}$ 、 $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ 、 $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ 、 $^{140}\text{La}$ 、 $^{177}\text{Lu}$ 、 $^{54}\text{Mn}$ 、 $^{99}\text{Mo}$ 、 $^{32}\text{P}$ 、 $^{103}\text{Pd}$ 、 $^{149}\text{Pm}$ 、 $^{142}\text{Pr}$ 、 $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ 、 $^{105}\text{Rh}$ 、 $^{97}\text{Ru}$ 、 $^{35}\text{S}$ 、 $^{47}\text{Sc}$ 、 $^{75}\text{Se}$ 、 $^{153}\text{Sm}$ 、 $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ 、 $^{85}\text{Sr}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 $^{201}\text{Tl}$ 、 $^{133}\text{Xe}$ 、 $^{90}\text{Y}$ 、 $^{69}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ 、 $^{65}\text{Zn}$  等 )、陽電子放出金属、及び磁性金属イオンを挙げることができる。

10

【 0 2 1 4 】

本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体はまた、抗体ヘテロコンジュゲートを形成するために第 2 の抗体にコンジュゲートされ得る。

20

【 0 2 1 5 】

本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体は、固体支持体に取り付けられ得る。このような固体支持体としては、限定されないが、ガラス、セルロース、ポリアクリルアミド、ナイロン、ポリスチレン、ポリ塩化ビニル、またはポリプロピレンが挙げられる。いくつかの実施形態において、固定された抗 T f R 1 抗体は、イムノアッセイにおいて使用される。いくつかの実施形態において、固定された抗 T f R 1 抗体は、標的抗原 ( 例えば、ヒト T f R 1 または c y n o T f R 1 ) の精製において使用される。

【 0 2 1 6 】

いくつかの実施形態において、本開示の抗 T f R 1 抗体は、核酸 ( 例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、短鎖干渉 RNA ( s i R N A )、RNA ( メッセンジャー RNA ( m R N A )、マイクロ RNA ( m i R N A )、ガイド RNA ( g R N A ) 等 )、ホスホロアミデートモルホリノオリゴマーまたはアプタマーなど ) 等の分子または薬物にコンジュゲートされ得る。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に記載されるもの等の治療薬を含有することができる粒子 ( 例えば、脂質粒子またはナノ粒子 ) にコンジュゲートされる。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、ウイルス粒子 ( 例えば、治療用核酸及び/またはタンパク質を含むウイルス粒子、例えば、遺伝子治療用ウイルス粒子 ) にコンジュゲートされる。抗 T f R 1 抗体は、リンカーによって薬物に連結されていてもよい。本開示で企図されるコンジュゲート等の抗体 - 核酸コンジュゲートを調製する方法は、当該技術分野において周知である。例えば、米国特許出願公開第 U S 2 0 1 9 0 2 4 0 3 4 6 号、ならびに米国特許第 U S 1 0 8 8 1 7 4 3 号及び同第 U S 1 0 5 5 0 1 8 8 号、ならびに国際特許出願公開第 W O 1 9 9 1 0 0 4 7 5 3 号 ( これらの開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる ) を参照のこと。

30

40

【 0 2 1 7 】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体を含む融合タンパク質は、当該技術分野で既知の任意の適切な方法を使用して作製され得る。このような融合タンパク質には、本明細書に記載される本開示の抗 T f R 1 抗体 ( 二重特異性抗 T f R 1 抗体、多重特異性抗 T f R 1 抗体、または多価抗 T f R 1 抗体を含む ) と、治療用ポリペプチドまたはタンパク質との融合物が含まれ得る。一例では、C a n d e l a r i a

50

P V e t a l . F r o n t I m m u n o l . 2 0 2 1 ; 1 2 : 6 0 7 6 9 2 に記載されているように、アビジンを重鎖C末端に付加して、融合タンパク質を産生することができる。融合タンパク質は、D a n i e l s T R , e t a l . B i o c h i m B i o p h y s A c t a . 2 0 1 2 ; 1 8 2 0 ( 3 ) : 2 9 1 - 3 1 7 に記載されているように、ビオチン化薬物等の第2の分子または薬物とさらにコンジュゲートまたは複合化され得る。

#### 【0218】

いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗TfR1 Abを含む複合体は、当該技術分野で既知の任意の適切な方法を用いて作製され得る。いくつかの実施形態において、複合体の構成要素は、非共有結合相互作用によって連結される。このような化合物は、別の薬剤（例えば、治療薬）と複合化された抗TfR1抗体、または脂質もしくはナノ粒子（治療用ポリペプチドもしくはタンパク質を有する）と複合化された抗TfR1抗体を含む。

10

#### 【0219】

##### 抗TfR1抗体の組織標的化及び使用

いくつかの実施形態において、本開示の抗体は、筋肉組織（例えば、骨格筋または随意筋、心筋、平滑筋など）を標的とするように使用され得る。いくつかの実施形態において、本明細書では、対象における筋萎縮症または筋強直性ジストロフィーを処置する方法であって、本明細書に記載される抗TfR1抗体を含むコンジュゲート/融合物/複合体の治療有効量を当該対象に投与することを含む、前記方法が記載される。いくつかの例では、筋萎縮症は、悪液質（例えば、がん性悪液質）、除神経、ミオパシー、運動ニューロン疾患、糖尿病、慢性閉塞性肺疾患、肝疾患、うっ血性心不全、慢性腎不全、慢性感染症、敗血症、絶食、サルコペニア、グルココルチコイド誘導性萎縮、廃用、または宇宙飛行に関連するもの及び/または誘発されるものである。場合によっては、筋強直性ジストロフィーはDM1である。本開示の抗TfR1抗体を含むコンジュゲートで処置することができる筋疾患の例としては、限定されないが、筋疾患、筋萎縮症、動脈硬化性疾患、心臓関連疾患、及びリソソーム蓄積症が挙げられる。

20

#### 【0220】

筋疾患の例としては、筋ジストロフィー（例えば、デュシェンヌ型筋ジストロフィー（DMD）、ベッカー型筋ジストロフィー（ベッカー型MD）、エメリー・ドライフス型筋ジストロフィー、顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー、眼咽頭型筋ジストロフィー、遠位筋ジストロフィー、肢帯型筋ジストロフィー、福山型先天性筋ジストロフィー、筋強直性ジストロフィー、周期性麻痺、横隔膜麻痺、横隔膜アトニー、遠位型ミオパシー、ミオトニー症候群、ミトコンドリア病、及び筋消耗性疾患が挙げられる。

30

#### 【0221】

筋萎縮症の例としては、サルコペニア（年齢関連性筋萎縮）、廃用性筋萎縮、悪液質、筋萎縮性側索硬化症（ALS）、及び脊髄性筋萎縮が挙げられる。

#### 【0222】

筋肉の消耗に関連する疾患の例としては、DMD、ベッカー型MD、肢帯型MD、筋強直性MD及び顔面肩甲上腕型筋ジストロフィー（FSHD）、筋炎、ミオパシー（遺伝性ミオパシー及び後天性ミオパシーを含む）、運動ニューロン疾患（ルーゲーリック病またはALS等）、及び神経変性疾患（パーキンソン病、ハンチントン病及びアルツハイマー病等）が挙げられる。

40

#### 【0223】

動脈硬化性疾患の例としては、末梢動脈閉塞性疾患が挙げられる。

#### 【0224】

心臓関連疾患の例としては、狭心症（労作性狭心症、異型狭心症を含む）、急性冠動脈症候群（不安定狭心症、急性心筋梗塞、心筋梗塞後の心不全を含む）、心不全（HF r EF、HF p EF、急性心不全、慢性心不全、非代償性心不全を含む）、心筋症（拡張型心筋症、肥大型心筋症、拘束型心筋症を含む）、肺性心、無症候性心筋虚血、不整脈（伝導

50

障害、洞結節機能障害、異所性上室性律動、房室ブロック、心房細動、心房粗動、リエントリー性上室頻拍（S V T、P S V T）、ウォルフ・パーキンソン・ホワイト（W P W）症候群、脚ブロック及び束ブロック（脚ブロック及び束枝ブロック）、心室性期外収縮、心室頻拍、心室細動及び心臓突然死）、弁膜異常（大動脈弁閉鎖不全症、大動脈弁狭窄症、僧帽弁逸脱症（M V P）、僧帽弁閉鎖不全症、僧帽弁狭窄症、肺動脈弁閉鎖不全症、肺動脈狭窄症、三尖弁逆流、三尖弁狭窄症を含む）、心内膜炎、心臓腫瘍、心肺バイパス手術後の心機能低下、重症心不全に対する非薬物療法（例えば、大動脈内バルーンパンピング、補助人工心臓、パチスタ手術、細胞移植、遺伝子治療、心臓移植）中の心機能維持及び心事故予防が挙げられる。本開示の抗 T f R 1 抗体を含むコンジュゲートで処置され得る疾患のリストについては、例えば、米国特許出願公開第 U S 2 0 1 9 0 2 4 0 3 4 6 号、ならびに米国特許第 U S 1 0 8 8 1 7 4 3 号及び同第 U S 1 0 5 5 0 1 8 8 号、ならびに国際特許出願公開第 W O 1 9 9 1 0 0 4 7 5 3 号（これらの開示は参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる）を参照のこと。

#### 【0225】

筋肉に加えて、本開示の抗体は、T f R 1 が発現している他の組織を標的とするように使用され得る。このような組織の例としては、限定されないが、肝細胞、免疫細胞、腫瘍、及び脳組織が挙げられる。トランスフェリン受容体は、貧血、神経変性疾患、及びがんを含む多くの種類の疾患に関係している。T f R は、肝組織に発現していることが知られており、アルコール性肝障害（A L D）の肝臓における鉄過剰に関係している（S u z u k i Y , e t a l . , A l c o h o l C l i n E x p R e s . 2 0 0 2 A u g ; 2 6 ( 8 S u p p l ) : 2 6 S - 3 1 S）。また、T f R は血液脳関門の内皮細胞にも発現している（J o h n s e n K B , e t a l . P r o g r e s s i n N e u r o b i o l o g y . 1 8 1 : 1 0 1 6 6 5）。さらに、T f R 1 は様々ながんで異常発現していることも知られている（S h e n Y , e t a l . A m J C a n c e r R e s . 2 0 1 8 ; 8 ( 6 ) : 9 1 6 - 9 3 1）。T f R の発現はまた、免疫細胞の活性化に応じて増加する（H a r e l E , e t a l . P L O S O N E 2 0 1 1 ; 6 ( 9 ) : e 2 4 2 0 2）。T f R は、増殖細胞に発現しており、その増殖に必要なものであり、正常な末梢血 T 細胞及び B 細胞の分裂刺激後に検出され得る（N e c k e r s , L M e t a l . , J I m m u n o l N o v e m b e r 1 , 1 9 8 4 , 1 3 3 ( 5 ) 2 4 3 7 - 2 4 4 1）。

#### 【0226】

##### 医薬組成物

本開示は、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体を含む組成物を提供するものである。本開示はまた、本明細書に記載される抗 T f R 1 抗体及び薬学的に許容されるビヒクルを含む医薬組成物を提供するものである。

#### 【0227】

製剤は、保存及び/または使用のために、本開示の抗 T f R 1 抗体を薬学的に許容されるビヒクル（例えば、担体または賦形剤）と組み合わせることによって調製される。一般に、薬学的に許容される担体、賦形剤、及び/または安定剤は、当業者に製剤または医薬組成物の不活性成分とみなされている。

#### 【0228】

適切な薬学的に許容されるビヒクルとしては、限定されないが、非毒性緩衝剤（リン酸、クエン酸、及び他の有機酸等）、塩（塩化ナトリウム等）、抗酸化剤（アスコルビン酸及びメチオニンを含む）、保存剤（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、ブチルまたはベンジルアルコール等）、アルキルパラベン（メチルまたはプロピルパラベン、カテコール、レゾルシノール、シクロヘキサノール、3 - ペンタノール、及び m - クレゾール等）、低分子量ポリペプチド（例えば、約 1 0 アミノ酸残基未満）、タンパク質（血清アルブミン、ゼラチン、または免役グロブリン等）、親水性ポリマー（ポリビニルピロリドン等）、アミノ酸（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、

またはリジン等)、炭水化物(単糖、二糖、グルコース、マンノース、またはデキストリン等)、キレート剤(EDTA等)、糖(スクロース、マンニトール、トレハロースまたはソルビトール等)、塩形成対イオン(ナトリウム等)、金属錯体(Zn-タンパク質複合体等)、及び非イオン性界面活性剤(TWEEN(登録商標)またはポリエチレングリコール(PEG)等)が挙げられる(Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22<sup>nd</sup> Edition, 2012, Pharmaceutical Press, London.)。いくつかの実施形態において、製剤は、水溶液の形態である。いくつかの実施形態において、製剤は、凍結乾燥形態または代替りの乾燥形態である。

#### 【0229】

治療用製剤は、単位剤形であり得る。このような製剤としては、錠剤、丸剤、カプセル剤、散剤、顆粒剤、水もしくは非水性媒質中の液剤もしくは懸濁液剤、または坐剤が挙げられる。錠剤等の固形組成物において、主要活性成分は、薬学的担体と混合される。従来の錠剤形成成分としては、トウモロコシデンプン、ラクトース、スクロース、ソルビトール、タルク、ステアリン酸、ステアリン酸マグネシウム、リン酸ニカルシウムまたはガム、及び希釈剤(例えば、水)が挙げられる。これらを使用して、本開示の化合物、または薬学的に許容されるその非毒性塩の均質混合物を含有する、固形の製剤前組成物を形成することができる。次いで、固形の製剤前組成物は、上記したタイプの単位剤形に細別される。製剤または組成物の錠剤、丸剤などをコーティングするか、または他の方法で配合して、作用の持続という利点をもたらす剤形を得ることができる。例えば、錠剤または丸剤は、外部の構成成分で覆われた内部組成物を含み得る。さらに、2種の構成成分は、腸溶性の層によって分離され得、この腸溶性の層は、崩壊に抵抗するように働き、内部の構成成分が損なわれずに胃を通過すること、または内部の構成成分の放出が遅延することを可能にするものである。このような腸溶性の層またはコーティングには様々な材料が使用され得、このような材料としては、多数の高分子酸、及び高分子酸とセラック、セチルアルコール、及び酢酸セルロース等の材料との混合物が挙げられる。

#### 【0230】

本開示の結合剤は、標的細胞/組織への送達に適切な任意の形態で製剤化され得る。いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、リポソーム、微小粒子、マイクロカプセル、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、ナノカプセル、またはマクロエマルジョンとして製剤化され得る。いくつかの実施形態において、医薬製剤は、リポソームと複合化された本開示の抗TfR1抗体を含む。リポソームを得る方法は、当業者に既知である。例えば、いくつかのリポソームは、ホスファチジルコリン、コレステロール、及びPEG誘導体化ホスファチジルエタノールアミン(PEG-PE)を含む脂質組成物を用いた逆相蒸発法によって生成され得る。

#### 【0231】

いくつかの実施形態において、抗TfR1抗体は、徐放性調製物として製剤化される。徐放性調製物の適切な例としては、薬剤を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスが挙げられ、当該マトリックスは成形品(例えば、フィルムまたはマイクロカプセル)形態である。徐放性マトリックスとしては、限定されないが、ポリエステル、ハイドロゲル(ポリ(2-ヒドロキシエチル-メタクリレート)またはポリ(ビニルアルコール)等)、ポリ乳酸、L-グルタミン酸と7エチル-L-グルタメートとのコポリマー、非分解性エチレン-酢酸ビニル、分解性乳酸-グリコール酸コポリマー(LUPRON DEPOT(商標)(乳酸-グリコール酸コポリマー及び酢酸ロイプロリドから構成される注射可能マイクロスフェア)等)、イソ酪酸酢酸スクロース、及びポリ-D-( )-3-ヒドロキシ酪酸が挙げられる。

#### 【0232】

本開示の医薬組成物または医薬製剤は、局所性処置または全身性処置のいずれかのために、多くの方法で投与され得る。いくつかの実施形態において、投与は、表皮または経皮パッチ、軟膏剤、ローション剤、クリーム剤、ゲル剤、点滴剤、坐剤、噴霧剤、液剤及び

10

20

30

40

50

散剤による局所投与である。いくつかの実施形態において、投与は、ネブライザーによるものを含む、粉末もしくはエアロゾルの吸入または吹送による、肺内、気管内、及び鼻腔内投与である。いくつかの実施形態において、投与は、経口投与である。いくつかの実施形態において、投与は、静脈内、動脈内、腫瘍内、皮下、腹腔内、筋肉内（例えば、注射もしくは注入）、または頭蓋内（例えば、髄腔内もしくは脳室内）投与を含む、非経口投与である。いくつかの実施形態において、投与は、静脈内注射または静脈内注入によるものである。いくつかの実施形態において、投与は、筋肉内注射によるものである。

#### 【0233】

様々な送達系が知られており、それらは本明細書に記載される抗TfR1抗体を投与するために使用され得る。いくつかの実施形態において、本明細書に記載される抗TfR1抗体または組成物は、制御放出系または徐放系で送達される。いくつかの実施形態において、制御放出または徐放を実現するために、ポンプが使用される。いくつかの実施形態において、本明細書における抗TfR1抗体の制御放出または徐放を実現するために、ポリマー材料が使用される。徐放性製剤に使用されるポリマーの例としては、限定されないが、ポリ2-ヒドロキシエチルメタクリレート、ポリメチルメタクリレート、ポリアクリル酸、ポリエチレン-co-酢酸ビニル、ポリメタクリル酸、ポリグリコリド(PLG)、ポリ酸無水物、ポリN-ビニルピロリドン、ポリビニルアルコール(PVA)、ポリアクリルアミド、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリラクチド(PLA)、ポリラクチド-co-グリコリド(PLGA)、及びポリオルトエステルが挙げられる。徐放性製剤に使用される任意のポリマーは、不活性であり、濾過可能不純物を含まず、保存時に安定であり、無菌であり、かつ、生分解性でなければならない。

#### 【0234】

本明細書に記載される抗TfR1抗体を投与するために、追加の送達系を使用することができ、追加の送達系としては、限定されないが、注射可能な薬物送達デバイス及び浸透圧ポンプが挙げられる。注射可能な薬物送達デバイスとしては、例えば、手持ち式デバイス（例えば、自己注射器）または装着式デバイスが挙げられる。浸透圧ポンプ系の種々のタイプとしては、単一コンパートメント系、二重コンパートメント系、及び多重コンパートメント系を挙げることができる。

#### 【0235】

以下の実施例は、特許請求される発明をより良く例示するために提供するものであり、本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。特定の物質が言及される範囲において、それは単に例示の目的であり、本発明の限定を意図するものではない。当業者は、発明能力を発揮することなく、かつ、本発明の範囲から逸脱することなく、同等の手段または反応物を開発することができる。

#### 【実施例】

#### 【0236】

実施例1：ウサギ抗トランスフェリン受容体1(TfR1)モノクローナル抗体の産生  
ウサギ抗TfR1モノクローナル抗体を、以下のプロセスにより生成した。cynotransフェリン受容体を免疫原としてニュージーランドホワイトウサギに2回免疫し、次いで、ヒトトランスフェリン受容体で追加免疫した。ヒト及びcynotransフェリン受容体に対する血清反応は、ヒト及びcynotransフェリン受容体を発現しているBa/F3細胞株への結合で確認した。最後の免疫から2週間後に全血を採取し、Ficol1-Paqueを用いて末梢血単核球(PBMC)を単離した。

#### 【0237】

モノクローナル抗体を生成するために、cynotransフェリン受容体を、プレート上に固定し、PBMCとインキュベートし、適切な特異性を有するB細胞を捕捉するために使用した。付着したB細胞を、抗体分泌細胞の分化及び増殖を促進する細胞培養条件で1週間インキュベートした。蛍光活性化セルソーティング(FACS)及び酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)を用いて、ヒト及びcynotransフェリン受容体反応性について、個々のウェルの上清を評価した。ELISAアッセイでは、ホロトランスフェリ

ンと複合化したトランスフェリン受容体に対する結合を測定した。E L I S A に使用したフォーマットは、96ウェルプレート上にヒトまたはc y n oトランスフェリン受容体をコーティングし、次いで、各ウェルにホロトランスフェリンを添加することを必要とした。1.5時間インキュベートした後、希釈した上清を1時間かけてプレートに添加した。プレートに結合した抗体は、抗ウサギI g G H R P 試薬で検出した。F A C S アッセイでは、ヒト及びc y n oトランスフェリン受容体を発現しているB a f / 3細胞株を用いた。ヒトトランスフェリン受容体及びc y n oトランスフェリン受容体の両方が陽性であるウェルのB細胞を回収し、V H及びV L抗体配列を検索した。

#### 【0238】

B細胞からR N Aを単離し、c D N A合成に用いた。重鎖及び軽鎖（Vカッパ）をP C R増幅し、T O P O / T Aクローニングによりp C R 4ベクターにクローニングした。クローン化産物でE . c o l iを形質転換し、サンガーシーケンシングを用いて耐性コロニーに対し配列決定を行った。

#### 【0239】

実施例2：キメラ抗体R a b A N T I B O D Y - A及びR a b A N T I B O D Y - Bの選定

コンセンサスV H及びV L配列を同定し、ヒトI g G 1フレームワークを有する上記生成ウサギ抗体を発現させるために、それらを用いた。キメラウサギ抗体候補をチャイニーズハムスター卵巣S ( C H O - S )細胞で一過性に発現させ、精製した。ヒト及びc y n o T f R 1に対する結合は、ヒトまたはc y n o T f R 1を過剰発現しているB a / F 3細胞に対するF A C s結合を用いて確認し、次いで、ヒトまたはc y n o T f R 1の組み換え細胞外ドメインに対する親和性は、S P R解析を用いて測定した。

#### 【0240】

ヒト化のために、2種の抗体（R a b A N T I B O D Y - A及びR a b A N T I B O D Y - B）を以下の特性に基づいて選択した。

- 1) ヒトT f R 1に対して1桁n Mの一価の親和性、
- 2) c y n o T f R 1に対する交差反応性、
- 3) c y n o T f R 1とヒトT f R 1との間の親和性の差が10x未満であること、
- 4) T f R 2に対する交差反応性がないこと、及び
- 5) エピトープがT f R 1のトランスフェリン結合領域と重なり合わないこと。

#### 【0241】

R a b A N T I B O D Y - A及びR a b A N T I B O D Y - Bの相補性決定領域（C D R）ならびに成熟重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列を以下に示す。下記及び本明細書に記載されるC D Rは、K a b a tのC D R定義（K a b a t , E . A . , W u , T . T . , P e r r y , H . M . , G o t t e s m a n , K . S . & F o e l l e r , C . ( 1 9 9 1 ) 及びC h o t h i aのC D R定義（C h o t h i a , C . & L e s k , A . M . J . M o l . B i o l ( 1 9 8 7 ) 1 9 6 , 9 0 1 - 9 1 7 ）（C h o t h i a , C . e t a l . N a t u r e ( 1 9 8 9 ) 3 4 2 , 8 7 7 - 8 8 3 ）（A l - L a z i k a n i , B . , L e s k , A . M . & C h o t h i a , C . J . M o l . B i o l ( 1 9 9 7 ) 2 7 3 , 9 2 7 - 9 4 8 ）における全位置を集合させたもの（u n i o n）を含む。このC D Rの「u n i o n」定義は、B u j o t z e k e t a l . による「W o l f g u y」定義としても知られており（B u j o t z e k A , . ( 2 0 1 5 ) P r o t e i n s A p r ; 8 3 ( 4 ) : 6 8 1 - 9 5 ）、本明細書では表6に示され、また、図1A～1Dの配列アライメントにおける下線位置として示されるものである。C D RのC h o t h i aの定義は、本明細書では表7に示され、また、図2A～2Dの配列アライメントにおける下線位置として示されるものである。

10

20

30

40

【表 6 - 1】

表 6 : RabANTIBODY-A CDR (Union定義)

ドメイン	RabANTIBODY-A	RabANTIBODY-B
VH CDR1	GIDFSSSGYMC (配列番号 101)	GFSFSNSYWIC (配列番号 116)
VH CDR2	CIITYSSNTYYASWAKG (配列番号 104)	CINTDADSTNYASWARG (配列番号 117)

10

【表 6 - 2】

VH CDR3	GTYGYTGYTYTMGYFSL (配列番号 106)	QNNVFDPGYNL (配列番号 119)
VL CDR1	QASQNINSYLA (配列番号 107)	QASQNIGSNLA (配列番号 121)
VL CDR3	RASTLAS (配列番号 109)	DASKLAS (配列番号 123)
VL CDR3	QSYYSGSSNYNA (配列番号 110)	QCTVRGGAYGNA (配列番号 124)

20

【表 7】

表 7 : RabANTIBODY-B CDR (Chothia定義)

ドメイン	RabANTIBODY-A	RabANTIBODY-B
VH CDR1	GIDFSSSG (配列番号 111)	GFSFSNSY (配列番号 128)
VH CDR2	TYSS (配列番号 112)	TDAD (配列番号 129)
VH CDR3	TYGYTGYTYTMGYFS (配列番号 113)	NNVFDPGYN (配列番号 130)
VL CDR1	SQNINSY (配列番号 114)	SQNIGSN (配列番号 131)
VL CDR3	RAS	DAS
VL CDR3	YYYSGSSNYN (配列番号 115)	TVRGGAYGN (配列番号 132)

30

40

50

## 【化 1 - 1】

R a b A N T I B O D Y - A 重鎖可変領域 (VH) :

QSLEESGGGLVQPGASLTLTCKASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGLEWIGCIYTYSSNTY  
YASWAKGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTATYFCARGTYGYTYTMGYFSLWGP  
 GTLVTVSS (配列番号 4)

R a b A N T I B O D Y - A 軽鎖可変領域 (VL) :

ELDMTQTPASVEAAVGGTVTIKCQASQNINSYLAWYQQKPGQPPKLLIYRASTLASGVP  
SRFKGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYCQSYYYSGSSNYNAFGGGTELEIL (配列番号 34)

10

RabANTIBODY-B VH:

QSLEESGGGLVQPEGLTLTCKASGFSEFSNSYWICWVRQAPGKGLEWIGCINTDADSTN  
YASWARGRFTISKTSSTTVTLQMTSLTAADTASYFCARQNNVFDPGYNLWGPGLTV  
 SS (配列番号 19)

20

## 【化 1 - 2】

RabANTIBODY-B VL:

ELVLTQTPASVSEAVGGTVTIKCQASQNIGSNLAWYQQKPGQPPKLLIYDASKLASGVP  
SRFSGSGSGTEFTLTISDLECADAATYYCQCTVRGGAYGNAFGGGTEVVVK (配列番号  
 38)

30

## 【0 2 4 2】

実施例 3 : 抗 T f R 1 抗体のヒト化

米国特許第 8 , 9 6 1 , 9 7 6 号 ( 参照によりその全体が本明細書に組み込まれる ) に記載される方法を用いて、R a b A N T I B O D Y - A 抗体及び R a b A N T I B O D Y - B 抗体をヒト化した。簡潔に記載すると、本方法は、選択したヒトフレームワーク内に成熟非ヒト C D R を移植し、続いて、安定性及び結合親和性を保護するために、成熟非ヒト配列のアミノ酸配列にヒトフレームワーク残基の「復帰突然変異」を導入することを必要とするものである。さらに、結果として生じるヒトにより近い配列が結合親和性を著しく犠牲にしないはずであると予測される場合、免疫原性のリスクを最小化するために、( i ) 親和性に影響を与える可能性がない C D R のいくつかのセクションにヒト配列を用いること、及び ( i i ) ヒト抗体のアミノ酸配列に対していくつかの非ヒト C D R 残基の「前進突然変異」を選択すること、が試みられている。このような方法は、米国特許第 8 , 3 4 9 , 3 2 4 号 ( 参照によりその全体が本明細書に組み込まれる ) に記載されている。

40

## 【0 2 4 3】

ステップ 1 : ヒトアクセプターフレームワークの選択 :

選択方法には以下を含めた :

( a ) 複数の配列比較法を組み合わせた方法により、ヒト生殖細胞系列の全候補をスコアリングし、構造的に重要な特定の位置での一致により重きを置くこと、

( b ) 3 D 構造ホモロジーモデルの助けを借りて、各ミスマッチ位置を評価すること、

50

及び

(c) 典型的に humVH3 の安定性がより高いこと及び humVH3 の SpA 結合の潜在性に起因して、humVH1 よりも humVH3 を若干優先し、ウサギ抗体のヒト化における過去の使用実績がより長いことに関して、humVK3 よりも humVK1 を若干優先すること。

【0244】

ANTIBODY - A については、ヒト生殖細胞系列 humIGHV3 - 72 \* 1 + humIGHJ1 \* 1 及び humIGKV1 - 5 \* 1 + humIGKJ4 \* 1 をヒトアクセプターフレームワークとして選択した。ANTIBODY - B については、ヒト生殖細胞系列 humIGHV3 - 30 \* 1 + humIGHJ4 \* 1 及び humIGKV1 - 5 \* 1 + humIGKJ4 \* 1 をヒトアクセプターフレームワークとして選択した。

10

【0245】

ステップ2：最もヒトに近いデザインである H0 及び L0 をデザインする：

最もヒトに近いデザインを「H0」及び「L0」と名付けた。これらは CDR 移植配列であり、上記のように、ヒト CDR 配列のいくつかのセクションを使用すること及び/または「前進突然変異」を使用することにより、いくつかのヒト CDR 残基を潜在的に加えたものである。CDR は、Kabat の CDR 定義 (Kabat, E. A., Wu, T. T., Perry, H. M., Gottesman, K. S. & Foeller, C. (1991). Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th edit. National Institutes of Health, Bethesda, MD) 及び Chothia の CDR 定義 (Chothia, C. & Lesk, A. M. J. Mol. Biol (1987) 196, 901 - 917) (Chothia, C. et al. Nature (1989) 342, 877 - 883) (Al-Lazikani, B., Lesk, A. M. & Chothia, C. J. Mol. Biol (1997) 273, 927 - 948) における全位置を集合させたもの (union) を含むように定義されている。この CDR の「union」定義は、Bujotzek et al. による「Wolfguy」定義としても知られている (Bujotzek et al., Proteins Apr; 83 (4) : 681 - 95)。この CDR の「union」定義は、本明細書では、図 1A ~ 1D の配列アライメントにおける下線位置として示されるものである。このヒト化セクション全体を通じて、A<sub>H0</sub> 位置ナンバリングを使用している。例えば、Honegger A & Plueckthun A, JMB 2001 309 : 657 - 670 を参照のこと。ANTIBODY - A 及び ANTIBODY - B のそれぞれに関して、デザイン H0 には、A<sub>H0</sub> # C42A C57A (成熟ウサギ CDR から余分なジスルフィド結合を除去) を含めた。ANTIBODY - A に関して、デザイン L0 には、ウサギ R58 を除くヒト CDR - L2 を含めた。ANTIBODY - B に関して、デザイン L0 には、CDR - L3 に成熟ウサギの不对システイン 108C ではなく Q108 を、CDR - L3 に L137 を、CDR - L1 に R24 を、CDR - L2 に E71 を含めた。

20

30

【0246】

ステップ3：予測される構造を研究して提案される変異リストを構成する：

ウサギ/ヒトの各ミスマッチについて、及びそれらの隣接構造の多くについて、合理的デザイン (場合によっては、コンピュータによるエネルギー計算) を用いて、成熟ウサギアミノ酸、または場合によっては他の新たに発生したアミノ酸に対する変異が、どのくらい安定性を改善し得るかもしくは安定性をリスクにさらし得るか、結合親和性を保存するために必要とされ得るか、または免疫原性のリスクを高め得るか予測した。

40

【0247】

ANTIBODY - A VH に関して、用いた変異には、セット { E1 - (欠失) V2 Q Q3S }、Q141P、A24K、セット { A42C A57C }、「CDR - H2 Kabat extension」におけるセット { ASV 72 - 74 SWA }、及びセット { RDDSKNSL 82 - 89 KT - SSTTV } (配列番号 210 として

50

開示される「R D D S K N S L」及び配列番号211として開示される「K T - S S T T V」)または成熟ウサギ配列のものよりも短い、いわゆる「C D R - H 4」フレームワークグループにおけるセット{ R 8 2 K D 8 4 - L 8 9 V }が含まれる。

## 【0248】

ANTIBODY - B V Hに関して、用いた変異には、セット{ Q 1 - (欠失) V 2 Q Q 3 S }、Q 1 4 1 P、セット{ A 4 2 C A 5 7 C }、4 2 C 5 7 Cジスルフィド結合に影響を与え得るA 5 6 G、「C D R - H 2 K a b a t e x t e n s i o n」におけるセット{ D S V K 7 2 - 7 5 S W A R } (配列番号212として開示される「D S V K」及び配列番号213として開示される「S W A R」)、セット{ A 2 4 K N 8 7 T }及び/またはD 8 3 T及び/またはN 8 4 - (欠失)及び/またはセット{ N 8 7 T A 2 4 K }及び/または成熟ウサギ配列のものよりも短い、いわゆる「C D R - H 4」フレームワークグループにおけるL 8 9 Vが含まれる。

## 【0249】

ANTIBODY - A V Kに関して、用いた変異には、C 9 8 P、セットD I Q 1 - 3 E L D、及びセットS 6 9 T E 7 1 Aが含まれる。

## 【0250】

ANTIBODY - B V Kに関して、用いた変異には、C 9 8 P、成熟ウサギ配列の不对システインを再導入するためのQ 1 0 8 C、セット{ D I Q M 1 - 4 E L V L } (配列番号214として開示される「D I Q M」、及び配列番号215として開示される「E L V L」)、108Cと同じくらい小規模であるが不適切なジスルフィド結合の潜在性がないアミノ酸を試すためのQ 1 0 8 A、及びL 1 3 7 Nが含まれる。

## 【0251】

ステップ4：変異をいくつかのデザインに分類する：

予測されたリスクをトリアージするために、目的の変異をいくつかのV HデザインといくつかのV Kデザインに分類した。免疫原性リスクは、ヒト生殖細胞系列との比較及びC D 4 e p i s c o r e法により予測した。例えば、D h a n d a e t . a l . , F r o n t i e r s i n I m m u n o l o g y , 2 0 1 8 , 9 , 1 3 6 9を参照のこと。ANTIBODY - A及びANTIBODY - Bの各々に関して、ヒトV H A 4 2 A 5 7と同様に、ウサギ余剰ジスルフィドV H 4 2 C 5 7 C (「C」デザインにおける)を試すために、デザイン数を2倍にした。

## 【0252】

ANTIBODY - Aに関して、10種のV Hデザイン(H 0、H 1、H 2、H 3、H 4、H 1 C、H 2 C、H 3 C、及びH 4 C)と3種のV Lデザイン(L 0、L 1、及びL 2)とを作製した。

## 【0253】

ANTIBODY - Bに関して、ANTIBODY - Aの場合と同一ではないが同様の理由で、10種のV Hデザインと3種のV Lデザインとを作製した。

## 【0254】

ヒト化バリエーションをU n i o n C D Rで図1 A ~ 1 Dに示す。図2 A ~ 2 Dにおいては、ヒト化バリエーションをC h o t h i aのC D Rで示す。ヒト化重鎖及び軽鎖プラスミドの様々な組み合わせを、C H O - S細胞で一過性に発現させた。上清における力価は、O c t e t a n t i - H u m a n F a b - C H 1 2 n d G e n e r a t i o n ( F A B 2 G ) バイオセンサーを用いて推定した。

## 【0255】

ヒトT f R 1またはc y n o T f R 1のいずれかを過剰発現しているB a / F 3細胞を用いてF A C S結合アッセイを実施した。細胞を、U底96ウェルプレートに50,000細胞/ウェル/50µl F A C S緩衝液で分注し、氷上に置いた。次いで、段階希釈したF a b上清または精製F a bを細胞に添加し、続いて、氷上でインキュベートした。細胞をF A C S緩衝液で2回洗浄し、二次抗体を1:400で希釈してウェルに添加し、続いて、氷上で30分間インキュベートした。細胞をF A C S緩衝液で2回洗浄し、P

BSで調製した2% PFAで固定した。最後に、PE蛍光を測定することによりフローサイトメトリ解析を実施した。

【0256】

表8及び表9は、一過性トランスフェクションによる上清に由来するANTIBODY-A(表8)及びANTIBODY-B(表9)のヒト化バージョンの、Octetで測定した発現力価及びEC<sub>50</sub>を示している。Octet力価は、anti-Human Fab-CH1 2nd Generation(FAB2G)バイオセンサーを用いて推定した。FACS結合アッセイは、段階希釈した上清を用いて実施した。EC<sub>50</sub>値は、GraphPad Prismを用いて、ベストフィット曲線から求めた。~ = Prismによって推定されたおおよそのEC<sub>50</sub>。> = GraphPad Prismによって推定された値より大きいEC<sub>50</sub>。NA = EC<sub>50</sub>は、試験した濃度範囲では得られなかった。ヒトTfR1及びcyno TfR1の両方に対して強い親和性を示したFabを精製し、精製物を用いてFACS結合アッセイを繰り返した。

10

【表8-1】

表8: ANTIBODY-Aのヒト化バージョンの発現力価/EC<sub>50</sub>

抗体名称	Octet 力価 (mg/L)	EC <sub>50</sub> (nM)	
		ヒト	Cyno
TfR1 ANTIBODY-A HC-H0 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	116.9	18	>85
TfR1 ANTIBODY-A HC-H0 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	80.3	~19	>107
TfR1 ANTIBODY-A HC-H0 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	97.6	>70	NA
TfR1 ANTIBODY-A HC-H1 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	110.8	25	>176
TfR1 ANTIBODY-A HC-H1 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	75.3	~30	>162
TfR1 ANTIBODY-A HC-H1 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	84.9	>74	NA
TfR1 ANTIBODY-A HC-H2 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	88.8	2.8	>26
TfR1 ANTIBODY-A HC-H2 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	87.9	4.4	>36
TfR1 ANTIBODY-A HC-H2 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	94.5	6.5	>52
TfR1 ANTIBODY-A HC-H3 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	107.8	2.6	~19
TfR1 ANTIBODY-A HC-H3 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	90.3	3.3	>26
TfR1 ANTIBODY-A HC-H3 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	102.7	7.6	>38

20

30

40

50

【表 8 - 2】

TfR1 ANTIBODY-A HC-H4 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	110.8	4.1	>29
TfR1 ANTIBODY-A HC-H4 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	60.3	3.3	>21
TfR1 ANTIBODY-A HC-H4 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	88.3	7.2	>64
TfR1 ANTIBODY-A HC-H0C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	126.2	1.9	11.5
TfR1 ANTIBODY-A HC-H0C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	99.4	3.2	~22
TfR1 ANTIBODY-A HC-H0C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	112.1	3.6	~32
TfR1 ANTIBODY-A HC-H1C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	112.2	2.5	15.5
TfR1 ANTIBODY-A HC-H1C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	90.7	3.6	~26
TfR1 ANTIBODY-A HC-H1C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	103.2	3.6	~39
TfR1 ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	117.2	1.7	2.8
TfR1 ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	93.9	2.6	3.3
TfR1 ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	105.2	2.8	7.4
TfR1 ANTIBODY-A HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	120.7	2.5	2.7
TfR1 ANTIBODY-A HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	100.2	2.1	4.5
TfR1 ANTIBODY-A HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	108.3	1.6	10.4
TfR1 ANTIBODY-A HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	114.2	1.4	1.8
TfR1 ANTIBODY-A HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	97.9	2.2	1.8
TfR1 ANTIBODY-A HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	106.5	1.6	3.3

10

20

【表 9 - 1】

表 9 : ANTIBODY-B のヒト化バージョンの発現力価 / EC<sub>50</sub>

抗体名称	Octet 力価 (mg/L)	EC <sub>50</sub> (nM)	
		ヒト	Cyno
TfR1 ANTIBODY-B HC-H0 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	142.9	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H0 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	128.2	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H0 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	148.4	167.6	44.5
TfR1 ANTIBODY-B HC-H1 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	119.4	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H1 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	126.6	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H1 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	122.4	9.6	4.9
TfR1 ANTIBODY-B HC-H2 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	141.3	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H2 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	92.0	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H2 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	130.0	10.2	7.7
TfR1 ANTIBODY-B HC-H3 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	167.8	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H3 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	105.3	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H3 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	163.8	15.7	5.7
TfR1 ANTIBODY-B HC-H4 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	141.8	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H4 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	79.6	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H4 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	141.3	2.3	4.6
TfR1 ANTIBODY-B HC-H0C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	160.3	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H0C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	102.2	-	-

30

40

50

【表 9 - 2】

TfR1 ANTIBODY-B HC-H0C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	163.7	9.3	5.5
TfR1 ANTIBODY-B HC-H1C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	167.5	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H1C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	104.9	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H1C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	149.3	3.8	2.8
TfR1 ANTIBODY-B HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	169.7	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	108.5	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	161.8	3.3	2.2
TfR1 ANTIBODY-B HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	176.2	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	119.3	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	178.9	6.8	2.6
TfR1 ANTIBODY-B HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	173.1	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	106.1	-	-
TfR1 ANTIBODY-B HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	172.9	4.7	2.9

10

【0 2 5 7】

20

表 10 及び表 11 は、精製物から選択した ANTIBODY - A 及び ANTIBODY - B のヒト化バージョンの EC<sub>50</sub> をそれぞれ示している。FACS 結合アッセイは、段階希釈した精製物を用いて実施した。EC<sub>50</sub> 値は、GraphPad Prism を用いてベストフィット曲線から求めた。

【表 10】

表 10 : 選択した ANTIBODY - A のヒト化バージョンの EC<sub>50</sub>

抗体名称	EC <sub>50</sub> (nM)	
	ヒト	Cyno
TfR1 ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	1.7	1.5
TfR1 ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	1.3	3.3
TfR1 ANTIBODY-A HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	1.6	5.0
TfR1 ANTIBODY-A HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	1.5	5.5
TfR1 ANTIBODY-A HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	1.4	2.0
TfR1 ANTIBODY-A HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	1.8	2.4

30

40

50

## 【表 1 1】

表 1 1 : 選択したANTIBODY-Bのヒト化バージョンのEC<sub>50</sub>

抗体名称	EC <sub>50</sub> (nM)	
	ヒト	Cyno
TfR1 ANTIBODY-B HC-H4 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	9.8	3.4
TfR1 ANTIBODY-B HC-H1C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	8.2	2.3
TfR1 ANTIBODY-B HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	6.5	2.6
TfR1 ANTIBODY-B HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	5.5	1.9
TfR1 ANTIBODY-B HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	4.8	2.0

10

上記の例示的コンストラクトの完全な重鎖及び軽鎖配列を以下の表 1 2 に示す。

20

30

40

50

【表 1 2 - 1】

表 1 2 : 例示的コンストラクトの重鎖及び軽鎖配列

抗体	ドメイン	配列
(i) Tfr1 ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC- L0 hKappa	重鎖  (配列番号 93) (太字は定常領域、 太字下線はヒンジ)	QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGL EWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNSLKTEDTA VYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKK <u>VEPKSCDKHTICPP</u>
	軽鎖  (配列番号 94) (太字は定常領域)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTCQASQNINSYLAWYQKPKGKAPKL LIYRASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEATYYCQSYYYYS GSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(ii) Tfr1 ANTIBODY-A HC-H2C hIgG4Fab / LC-L0 hKappa (ΔC214)	重鎖  (配列番号 95)  (太字は定常領域、 太字下線はヒンジ)	QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGL EWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNSLKTEDTA VYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVDHKPSNTKVDKRV <u>ES</u>
	軽鎖  (配列番号 96) (太字は定常領域)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTCQASQNINSYLAWYQKPKGKAPKL LIYRASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEATYYCQSYYYYS GSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
(iii) Tfr ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1G4 Fab'(1C) (PPCP)/ LC-L0 hKappa (ΔC214)	重鎖  (配列番号 97)  (太字は定常領域、 太字下線はヒンジ)	QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGL EWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNSLKTEDTA VYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR <u>VESKYGPPCP</u>
	軽鎖  (配列番号 96) (太字は定常領域)	DIQMTQSPSTLSASVGDRTTTCQASQNINSYLAWYQKPKGKAPKL LIYRASSLESQVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEATYYCQSYYYYS GSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
(iv) Tfr1 ANTIBODY-A HC-H2C	重鎖  (配列番号 98)	QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGL EWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNSLKTEDTA VYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGLVTVSSASTKGPSVFP

10

20

30

40

50

【表 1 2 - 2】

hIgG1Fab/ LC-L0 hKappa (AC214)	(太字は定常領域、太字下線はヒンジ)	<b>LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC</b>
	軽鎖 (配列番号 96) (太字は定常領域)	DIQMTQSPSTLSASVGRVTITCQASQNINSYLAWYQQKPGKAPKL LIYRASSLESGLVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQSYYS GSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
(v) Tfr1 ANTIBODY-B HC-H4C hIgG1 Fab(1C)/LC-L2 hKappa	重鎖 (配列番号 99) (太字は定常領域、太字下線はヒンジ)	QSLVESGGGVVQPGRSLRLSCKASGFSTFSNSYWICWVRQAPGKGL EWVGCINTDADSTNYASWARGRFTISKTSSTTVYLQMNSLRAEDT AVYYCARQNNVEDPGYNLWGPGLTVVSSASTKGPSVFPLAASS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS <b>CDKTHITCPP</b>
	軽鎖 (配列番号 100) (太字は定常領域)	ELVLTQSPSTLSASVGRVTITCRASQNIQNSLAWYQQKPGKAPKL LIYDASKLESGLVPSRFRSGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQCTVR GGAYGNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSST LTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

10

【 0 2 5 8 】

20

実施例 4：余剰ジスルフィド及び不對システインを除去するための抗 T f R 1 抗体デザイン  
の続きと選択プロセス

初期のデザインでは、C 3 5 C 5 0 ( A H o # C 4 2 C 5 7 ) を C、C から A、A に変異させることにより、余剰のウサギ V H ジスルフィド結合を除去した。さらに、A N T I B O D Y - B V L の不對システイン C 9 0 ( A H o # C 1 0 8 ) を、Q または A に変異させることにより除去した。これらの試みでは、試験したコンストラクトにおいて結合親和性が弱まることが認められ、したがって、デザインの後続ラウンドを行った。A N T I B O D Y - A H 3 / L 0 に関して、また A N T I B O D Y - B H 1 / L 2 に関して、第 2 のジスルフィドの C、C を、S、V または S、R または S、Y または H、A に、それぞれ様々な類似のヒト生殖細胞系列配列から借用して変異させ、次いで、分子モデリング、エネルギー理論計算、及び/または公的に入手可能な構造体によって妥当であることを確かなものとした。A N T I B O D Y - B H 1 C / L 2 に関して、また A N T I B O D Y - B H 4 C / L 2 に関して、不對システインを、S または T または V に変異させた。余剰ジスルフィド及び不對システインを除去した後続デザインを、図 1 A ~ 1 D に示す。

30

【 0 2 5 9 】

表 1 3 は、一過性トランスフェクションによる上清に由来する抗 T f R 1 抗体 A N T I B O D Y - A 及び A N T I B O D Y - B のヒト化バージョン変異体の、O c t e t で測定した発現力価及び E C 5 0 を示している。O c t e t 力価は、a n t i - H u m a n F a b - C H 1 2 n d G e n e r a t i o n ( F A B 2 G ) バイオセンサーを用いて推定した。F A C S 結合アッセイは、段階希釈した上清を用いて実施した。E C 5 0 値は、G r a p h P a d P r i s m を用いて、ベストフィット曲線から求めた。

40

50

## 【表 1 3】

表1 3 : ANTI B O D Y - A 及び ANTI B O D Y - B のヒト化バージョンジスルフィド変異体の発現力価/EC<sub>50</sub>

抗体名称	Octet 力価 (mg/L)	EC <sub>50</sub> (nM)	
		ヒト	Cyno
TfRANTIBODY-A HC-H3(SV) hlgG1Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	158	>150	結合なし
TfRANTIBODY-A HC-H3(SR) hlgG1Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	105.5	>290	結合なし
TfRANTIBODY-A HC-H3(SY) hlgG1Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	141.3	>125	結合なし
TfRANTIBODY-A HC-H3(HA) hlgG1Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	145.2	16.8	~30
TfRANTIBODY-A HC-H3C hlgG1Fab'(1C)/LC-L0 hKappa	165	1.1	1.5
TfRANTIBODY-B HC-H1(SV) hlgG1Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	307.9	98.6	30
TfRANTIBODY-B HC-H1(SR) hlgG1Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	349.6	結合なし	結合なし
TfRANTIBODY-B HC-H1(SY) hlgG1Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	256.2	113.4	>55
TfRANTIBODY-B HC-H1(HA) hlgG1Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	325.2	18.2	7.1
TfRANTIBODY-B HC-H1C hlgG1Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	291.2	10.1	2.8

10

20

## 【 0 2 6 0】

表 1 4 は、一過性トランスフェクションによる上清に由来する、余剰ウサギジスルフィド対が除去されている ANTI B O D Y - A 及び ANTI B O D Y - B のヒト化バージョン変異体の Octet 力価及び EC<sub>50</sub> を示している。Octet 力価は、anti-Human Fab-CH1 2nd Generation (FAB2G) バイオセンサーを用いて推定した。FACS 結合アッセイは、段階希釈した上清を用いて実施した。EC<sub>50</sub> 値は、GraphPad Prism を用いて、ベストフィット曲線から求めた。

## 【表 1 4 - 1】

表 1 4 : ANTI B O D Y - B のヒト化バージョン変異体の発現力価/EC<sub>50</sub>

30

抗体名称	Octet 力価 (mg/L)	EC <sub>50</sub> (nM)	
		ヒト	Cyno
TfRANTIBODY-B HC-H1C/LC-L2 (C90V) hlgG1Fab'(1C)	149.2	10.7	2.9
TfRANTIBODY-B HC-H3C/LC-L2 (C90V) hlgG1Fab'(1C)	167.5	7.7	3.2
TfRANTIBODY-B HC-H4C/LC-L2 (C90V) hlgG1Fab'(1C)	167.6	4.9	2.2
TfRANTIBODY-B HC-H1C/LC-L2 (C90S) hlgG1Fab'(1C)	133.6	14.9	4.4
TfRANTIBODY-B HC-H3C/LC-L2 (C90S) hlgG1Fab'(1C)	155.8	16.8	6.2
TfRANTIBODY-B HC-H4C/LC-L2 (C90S) hlgG1Fab'(1C)	139.7	11.3	3.3

40

50

【表 1 4 - 2】

TfRANTIBODY-B HC-H1C/LC-L2 (C90T) hlgG1Fab'(1C)	168.8	12.6	5.4
TfRANTIBODY-B HC-H3C/LC-L2 (C90T) hlgG1Fab'(1C)	160.6	15.9	6.3
TfRANTIBODY-B HC-H4C/LC-L2 (C90T) hlgG1Fab'(1C)	154.9	7.7	2.9
TfRANTIBODY-B HC-H1C/LC-L2 hlgG1Fab'(1C)	187.3	5.9	2.3
TfRANTIBODY-B HC-H3C/LC-L2 hlgG1Fab'(1C)	278.3	7.0	4.0
TfRANTIBODY-B HC-H4C/LC-L2 hlgG1Fab'(1C)	192	5.4	1.9

10

表 1 5 は、精製物から選択した ANTIBODY - B 変異体の EC<sub>50</sub> を示している。これらの変異体では、軽鎖上で不對システインを変異させた。FACS 結合アッセイは、段階希釈した精製済み Fab を用いて実施した。EC<sub>50</sub> 値は、GraphPad Prism を用いて、ベストフィット曲線から求めた。

【表 1 5】

表 1 5 : 選択した ANTIBODY - B ヒト化変異体の EC<sub>50</sub>

抗体名称	EC <sub>50</sub> (nM)	
	ヒト	Cyno
TfRANTIBODY B HC-H1C/LC-L2 (C90S) hlgG1Fab'(1C)	6.1	3.2
TfRANTIBODY B HC-H4C/LC-L2 (C90S) hlgG1Fab'(1C)	7.3	1.5
TfRANTIBODY B HC-H1C/LC-L2 (C90T) hlgG1Fab'(1C)	13.6	3.2
TfRANTIBODY B HC-H4C/LC-L2 (C90T) hlgG1Fab'(1C)	5.1	3.4

20

30

## 【0 2 6 1】

実施例 5 : ヒト及びカニクイザル TfR1 結合に対する親和性及びカイネティクス  
キメラウサギ及びヒト化形態における抗 TfR1 Fab フラグメントの、組み換えヒト及び cyno トランスフェリン受容体細胞外ドメインに対する結合を、SPR を用いて評価し、カイネティクス及び親和性の値を得た。

## 【0 2 6 2】

SPR の結果は、Biacore 8K+ (Cytiva) と共に、製造業者のプロトコール (His Capture Kit, Cytiva) に従ってヒスチジンタグ付きリガンドの捕捉用に調製した、CM5 センサーチップ (Series S, Cytiva) を用いて得た。ランニングバッファーは、10 mM HEPES、150 mM NaCl、3 mM EDTA、0.05% ウシ血清アルブミン、0.005% 界面活性剤 P20、pH 7.4 であり、30 ul / 分で流した。カイネティクス及び親和性を求めるために、組み換えヒトまたはカニクイザル TfR1 ECD - His を、15 ~ 20 センサーレスポンスユニット (RU) で捕捉し、Fab フラグメントを、0.78、3.1、12.5、50、及び 200 nM でそれぞれ 4 分間連続的に注入し (シングルサイクルカイネティクスモード)、続いて 15 分間バッファーを流して解離をモニターした。Tf 競合結合解析のために、ヒトまたは cyno TfR1 ECD - His を 25 ~ 40 RU で捕捉し、続いて、バッファーまたは 1 mM ホロヒトトランスフェリン (Sigma T0665) のいずれかを 4 分間注入し、1 mM ホロヒトトランスフェリンと共に、または 1 mM ホロヒトトランスフェリンなしで、それぞれ、50 nM 及び 500 nM の Fab を 3 分間

40

50

連続的に注入し、解離を10分間モニターした。各サイクル後、1分間の10 mMグリシン (pH 1.5) の注入を2 x 行い、捕捉表面を再生した。SPRレスポンスは、TfR1がないセンサー表面からのシグナルに対して、及びFabの代わりにバッファーを注入するサイクルからのシグナルに対してリファレンス減算したものである。カインेटクス及び親和性パラメーターは、Biacore Insight Evaluation Software (Cytiva) を用いて、データを1:1 binding modelにフィッティングすることにより求めた。

【0263】

TfR1 ECDタンパク質は、SPRセンサー表面に捕捉した。会合速度 ( $k_a$ )、解離速度 ( $k_d$ )、及び対応する平衡解離定数 ( $K_D$ ) は、Fab (0.78 ~ 200 nM) の連続的注入から得られたSPR結合レスポンスを、1:1 binding modelにフィッティングすることにより求めた。表16は、試験した各Fabの親和性及びカインेटクスパラメーターを示している。

【表16-1】

表16：試験した抗TfR1抗体の親和性及びカインेटクスパラメーター

抗TfR1 Fab	ヒト TfR1 ECD			Cyno TfR1 ECD		
	$k_a$ (/M/s)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)	$k_a$ (/M/s)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)
ウサギ ANTIBODY-A chi Fab	1.92E+05	1.01E-03	5.2	3.17E+05	9.25E-03	29
ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-LO hKappa	8.62E+05	1.03E-03	1.2	1.60E+06	6.74E-03	4.2
ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	7.73E+05	9.47E-04	1.2	6.56E+06	1.95E-02	3.0
ANTIBODY-A HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	9.52E+05	2.13E-03	2.2	1.76E+06	1.37E-02	7.8
ANTIBODY-A HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-LO hKappa	8.35E+05	1.20E-03	1.4	4.10E+06	1.03E-02	2.5
ANTIBODY-A HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	1.02E+06	1.26E-03	1.2	2.58E+06	1.06E-02	4.1
ANTIBODY-A HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	8.86E+05	2.15E-03	2.4	2.16E+06	1.78E-02	8.3
ANTIBODY-A HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-LO hKappa	8.87E+05	8.78E-04	0.99	1.75E+06	5.83E-03	3.3
ANTIBODY-A HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L1 hKappa	9.83E+05	8.94E-04	0.91	4.40E+06	1.14E-02	2.6
ANTIBODY-A HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	9.31E+05	1.48E-03	1.6	2.16E+06	1.34E-02	6.2
ウサギ ANTIBODY-B chi Fab	9.92E+04	5.73E-04	5.8	2.83E+05	4.36E-04	1.5
ANTIBODY-B HC-H1 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	9.47E+04	4.53E-03	47.8	8.83E+04	1.05E-03	12

【表 16 - 2】

ANTIBODY-B HC-H2 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	8.32E+04	3.28E-03	39.4	1.29E+05	1.13E-03	8.7
ANTIBODY-B HC-H3 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	9.15E+04	5.95E-03	65.0	1.43E+05	1.72E-03	12
ANTIBODY-B HC-H4 hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	1.34E+05	1.55E-03	11.6	2.28E+05	5.08E-04	2.2
ANTIBODY-B HC-H0C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	2.44E+05	3.43E-03	14.1	2.10E+05	1.36E-03	6.5
ANTIBODY-B HC-H1C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	1.71E+05	1.15E-03	6.7	3.15E+05	4.25E-04	1.3
ANTIBODY-B HC-H2C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	1.70E+05	9.99E-04	5.8	4.45E+05	4.72E-04	1.1
ANTIBODY-B HC-H3C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	2.00E+05	1.47E-03	7.4	3.48E+05	6.08E-04	1.7
ANTIBODY-B HC-H4C hIgG1 Fab'(1C)/LC-L2 hKappa	2.23E+05	7.67E-04	3.4	3.98E+05	2.79E-04	0.7

10

## 【0264】

実施例 6：ヒト及びカニクイザル T f R 1 結合におけるトランスフェリンとの競合  
ヒト及び c y n o T f R 1 への抗 T f R 1 F a b フラグメントの結合におけるホロ  
ヒトトランスフェリンの影響を、S P R により評価した。表面捕捉したヒト及び c y n o  
T f R 1 に結合するキメラウサギ F a b フラグメント ( 5 0 n M 及び 5 0 0 n M で使用 )  
について、飽和濃度 ( 1 m M ) のホロヒトトランスフェリンの非存在下及び存在下で、結  
合カイネティクス (  $k_a$ 、 $k_d$  )、親和性 (  $K_D$  )、及びレスポンスレベル (  $R_{max}$  )  
パラメーターを求めた ( 表 1 7 )。

20

【表 17】

表 1 7 : 抗 T f R 1 F a b フラグメントの結合に対するホロヒトトランスフェリンの影響

	ヒト T f R 1 E C D				C y n o T f R 1 E C D			
	$k_a$ (M/s)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)	$R_{max}$ (RU)	$k_a$ (M/s)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)	$R_{max}$ (RU)
ウサギ ANTIBODY-A chi Fab	1.7E+05	1.2E-03	7.0	22	2.3E+05	1.0E-02	43	18
ウサギ ANTIBODY-A chi Fab + 1mM ホロ-huTf	1.7E+05	1.2E-03	6.8	22	2.3E+05	1.0E-02	43	18
ウサギ ANTIBODY-B chi Fab	1.4E+05	1.8E-03	12	7.3	2.5E+05	9.5E-04	3.8	11
ウサギ ANTIBODY-B chi Fab + 1mM ホロ-huTf	1.8E+05	1.5E-03	8.2	7.7	2.7E+05	9.4E-04	3.5	10

30

40

## 【0265】

これらのアッセイから、ヒト T f R 1 細胞外ドメイン ( E C D ) または c y n o T f R 1 E C D のいずれかに対するウサギ A N T I B O D Y - A c h i F a b またはウサギ A N T I B O D Y - B c h i F a b の結合は、競合アッセイにおけるホロ - h u T f の存在により有意に変化しなかったことが示される。このことは、どちらの抗体もトランスフェリンと競合しないことを示唆している。

## 【0266】

実施例 7：抗 T f R 1 抗体は T f R 2 に結合しない

50

抗 T f R 1 抗体の T f R 2 との交差反応性を F A C S 中に評価した。簡潔に記載すると、ヒト T f R 2 を過剰発現している B a F 3 細胞を用いて F A C S 結合アッセイを実施した。細胞を、U 底 9 6 ウェルプレートに 5 0 , 0 0 0 細胞 / ウェル / 5 0 μ l F A C S 緩衝液で分注し、氷上に置いた。次いで、2 5 0 n M の二価 h u I g G 1 抗体を細胞に添加し、続いて、氷上でインキュベートした。細胞を F A C S 緩衝液で 2 回洗浄し、二次抗体を 1 : 4 0 0 で希釈してウェルに添加し、続いて、氷上で 3 0 分間インキュベートした。細胞を F A C S 緩衝液で 2 回洗浄し、P B S で調製した 2 % P F A で固定した。最後に、P E 蛍光を測定することによりフローサイトメトリー解析を実施した。

#### 【 0 2 6 7 】

キメラ A N T I B O D Y - A m A b またはキメラ A N T I B O D Y B m A b とインキュベートした細胞では、単独の二次抗体とインキュベートした細胞と比較して、P E シグナルにいかなる変化も示されなかったことから、細胞表面の T f R 2 受容体に対する結合がないことが示された（データは示していない）。 10

#### 【 0 2 6 8 】

実施例 8 : 例示的な抗 T f R 1 抗体

以下の例示的な抗 T f R 1 抗体を構築した。これらの抗体が高い親和性で標的 ( T f R 1 ) に結合することが示された :

- ( 1 ) ( i ) 配列番号 9 3 の重鎖 + 配列番号 9 4 の軽鎖、
- ( 2 ) ( i i ) 配列番号 9 5 の重鎖 + 配列番号 9 6 の軽鎖、
- ( 3 ) ( i i i ) 配列番号 9 7 の重鎖 + 配列番号 9 6 の軽鎖、 20
- ( 4 ) ( i v ) 配列番号 9 8 の重鎖 + 配列番号 9 6 の軽鎖、及び

薬剤 ( 核酸 ( 例えば、アンチセンスオリゴヌクレオチド、短鎖干渉 R N A ( s i R N A ) 、メッセンジャー R N A ( m R N A ) 、マイクロ R N A ( m i R N A ) 、ガイド R N A ( g R N A ) 、ホスホロアミデートモルホリノオリゴマー、またはアプタマー ) 等 ) に連結してコンジュゲートを創出することができる、これらの抗体のいずれか。いくつかの実施形態において、抗 T f R 1 抗体は、本明細書に記載されるもの等の治療薬を含有することができる粒子 ( 例えば、脂質粒子またはナノ粒子 ) にコンジュゲートされる。

#### 【 0 2 6 9 】

実施例 9 : A N T I B O D Y - A のクライオ E M 構造

抗原認識の分子基盤を調査するために、ヒト ( h u ) トランスフェリン受容体 ( T f R ) 及び h u トランスフェリン ( T f ) と複合体を形成したヒト化 A N T I B O D Y - A F a b ( 配列番号 9 5 に示される重鎖配列及び配列番号 9 6 に示される軽鎖配列を含有する ) のクライオ E M 構造を、3 . 4 分解能で求めた。複合体の原子モデルは、A N T I B O D Y - A のホモロジーモデルならびに利用可能な T f R 及び T f の結晶構造を、クライオ E M 密度マップにフィッティングすることにより得た ( 図 3 ) 。最終モデルから、A N T I B O D Y - A が、T f R のアピカルドメインに位置するコンフォメーションエピトープに結合することが明らかになった。結合相手から 5 以内に、T f R の 2 2 残基及び A N T I B O D Y - A F a b の 1 8 残基がある。不連続性エピトープは、h u T f R の K 2 3 1 、 D 2 4 5 、 L 2 4 6 、 Y 2 4 7 、 T 2 4 8 、 P 2 4 9 、 E 3 5 0 、 G 3 5 1 、 D 3 5 2 、 C 3 5 3 、 P 3 5 4 、 S 3 5 5 、 D 3 5 6 、 K 3 5 8 、 T 3 5 9 、 D 3 6 0 、 S 3 6 1 、 R 3 6 4 、 M 3 6 5 、 V 3 6 6 、 T 3 6 7 、 E 3 6 9 残基によって形成され、疎水性残基と、親水性残基と、荷電残基との組み合わせを含有している。A N T I B O D Y - A の抗原結合部位は、4 つの C D R ( H 1 、 H 2 、 H 3 、 L 3 ) によって形成され、重鎖の S 2 9 、 S 3 0 、 S 3 1 、 Y 3 3 、 Y 5 2 、 Y 5 4 、 S 5 5 、 N 5 7 、 Y 5 9 、 Y 1 0 0 、 Y 1 0 2 、 T 1 0 3 、 G 1 0 4 、 Y 1 0 5 、 T 1 0 6 、及び Y 1 0 7 と、軽鎖の Y 9 3 及び G 9 5 とで構成される ( 表 1 8 ) 。 30 40 50

## 【表 18】

表18：TfRと接触するANTIBODY-Aパラトープ残基

CDR	接触残基 (<math><5\text{\AA}</math>)	CDR配列
CDR H1	S29, S30 S31, Y33	GIDF <u>SSSG</u> YMC (配列番号101)
CDR H2	Y52, Y54, S55, N57, Y59	C <u>IY</u> T <u>YSS</u> N <u>TY</u> YAASVKG(配列番号103)
CDR H3	Y100, Y102, T103, G104, Y105, T106, Y107	G <u>TYGYTGYTY</u> TMGYFSL (配列番号 106)
CDR L1		QASQNINSYLA (配列番号107)
CDR L2		RASSLES (配列番号108)
CDR L3	Y93, G95	QSY <u>Y</u> S <u>G</u> SSNYNA (配列番号110)

TfRから5.0Å以内の接触残基は太字下線で示している。

## 【0270】

ANTIBODY-Aは、ヒト及びカニクイザルのTfRを認識するが、マウスTfRとは交差反応しない。これらの構造研究により、ANTIBODY-Aの結合特性に対する詳細な洞察が得られた。TfRアピカルドメインにおける結合エピトープは、ヒトとカニクイザルとの間で概ね保存されているが、マウスとは有意に異なっており、この種に由来するANTIBODY-Aが結合しないことと一致する(図4)。

## 【0271】

## 実施例10：ANTIBODY-BのクライオEM構造

抗原認識の分子基盤を調査するために、hu TfR及びhu Tfと複合体を形成したヒト化ANTIBODY-B Fab(配列番号99に示される重鎖配列及び配列番号100に示される軽鎖配列を含有する)のクライオEM構造を、3.96Å分解能で求めた。複合体の原子モデルは、ANTIBODY-Bのホモロジーモデルならびに利用可能なTfR及びTfの結晶構造を、クライオEM密度マップにフィッティングすることにより得た(図5)。最終モデルから、ANTIBODY-Bが、TfRのプロテアーゼ様ドメインに位置するコンフォメーションエピトープに結合することが明らかになった。結合相手から5Å以内に、TfRの15残基及びANTIBODY-B Fabの18残基がある。不連続性エピトープは、hu TfRのD139、T141、K145、G490、T491、V517、T518、Y573、K574、I577、E578、R579、I580、P581、及びE582残基によって形成され、疎水性残基と、親水性残基と、荷電残基との組み合わせを含有している。ANTIBODY-Bの抗原結合部位は、5つのCDR(H1、H2、H3、L1、及びL3)によって形成され、重鎖のN30、W33、N52、D54、A55、D56、S57、T58、N59、N100、及びV101と、軽鎖のN28、I29、G30、V92、R93、G94、及びG95とで構成される(表19)。

10

20

30

40

50

## 【表 19 - 1】

表 19 : T f R と接触する A N T I B O D Y - B パラトープ残基

CDR	接触残基 (<math><5\text{\AA}</math>)	CDR配列
CDR H1	N30, W33	<u>G</u> F <u>S</u> F <u>S</u> <u>N</u> <u>S</u> <u>Y</u> <u>W</u> <u>I</u> <u>C</u> (配列番号 116)
CDR H2	N52, D54, A55, D56, S57, T58, N59	<u>C</u> <u>I</u> <u>N</u> <u>T</u> <u>D</u> <u>A</u> <u>D</u> <u>S</u> <u>T</u> <u>N</u> <u>Y</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>W</u> <u>A</u> <u>R</u> <u>G</u> (配列番号 117)
CDR H3	N100, V101	<u>Q</u> <u>N</u> <u>N</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>D</u> <u>P</u> <u>G</u> <u>Y</u> <u>N</u> <u>L</u> (配列番号 119)
CDR L1	N28, I29, G30	<u>R</u> <u>A</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>N</u> <u>I</u> <u>G</u> <u>S</u> <u>N</u> <u>L</u> <u>A</u> (配列番号 120)
CDR L2		DASKLES (配列番号 122)

10

## 【表 19 - 2】

CDR L3	V92, R93, G94, G95	<u>Q</u> <u>C</u> <u>T</u> <u>V</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>G</u> <u>A</u> <u>Y</u> <u>G</u> <u>N</u> <u>A</u> (配列番号 124)
--------	--------------------	--

T f R から 5.0 Å 以内の接触残基は太字下線で示している。

20

## 【0272】

A N T I B O D Y - B は、ヒト及びカニクイザルの T f R を認識するが、マウス T f R とは交差反応しない。これらの構造研究により、A N T I B O D Y - B の結合特性に対する詳細な洞察が得られた。T f R プロテアーゼ様ドメインにおける結合エピトープは、ヒトとカニクイザルとの間で概ね保存されているが、マウスとは有意に異なっており、この種に由来する A N T I B O D Y - B が結合しないことと一致する (図 6)。

## 【0273】

実施例 11 : A N T I B O D Y - A ヒト化バージョンのフォーマットバリエーション

A N T I B O D Y - A ヒト化バージョンの 22 種の異なるフォーマットバリエーションを調製した。表 20 は、抗体バリエーションの各々を、インデックス番号 (実験に用いる抗体を識別するために使用)、抗体を構成する個々のタンパク質 (Fc 鎖及び / または非 Fc 鎖) の名称、抗体の一般的構造を示す図の識別 (図 7 A ~ 7 E から選択される)、及び抗体の説明によって記載している。各抗体を構成する個々のタンパク質 (Fc 鎖及び / または非 Fc 鎖) それぞれのアミノ酸配列を表 21 に示す。

30

40

50

## 【表 20 - 1】

表 20 : ヒト化ANTIBODY-Aフォーマットバリエーションのタンパク質の説明

タンパク質インデックス	Fc 鎖 #1	Fc 鎖 #2	非Fc 鎖	「符号」 / 図の描写	説明
1	TOC1796		TOC1775	図 7 A の A	huANTIBODY-A 二価 RSU hIgG1.agly
2	TOC1797	TOC1801	TOC1775	図 7 A の B	huANTIBODY-A 一価 RSU hIgG1.agly (KIH-SS)
3	TOC1798		TOC1775	図 7 A の C	Fc hIgG1.agly ANTIBODY-A Fab 二価 USD
4	TOC1799	TOC1801	TOC1775	図 7 A の D	Fc hIgG1.agly ANTIBODY-A Fab 一価 USD (KIH-SS)
5	TOC1785		TOC1715	VH 融合セット / 図 7B	Fc hIgG1.agly-DelPG-ANTIBODY-A Fab VH 融合物
6	TOC1786		TOC1715	VH 融合セット	Fc hIgG1.agly-DelG-ANTIBODY-A Fab VH 融合物
7	TOC1787		TOC1715	VH 融合セット / 図 7B	Fc hIgG1.agly-ANTIBODY-A Fab VH 融合物

10

20

30

40

50

【表 2 0 - 2】

8	TOC1710		TOC1715	VH融合セット /図 7B	Fc hIgG1.agly-S-ANTIBODY-A Fab VH 融合物	
9	TOC1711		TOC1715	VH融合セット /図 7B	Fc hIgG1.agly-SG2- ANTIBODY-A Fab VH 融合物	
10	TOC1712		TOC1715	VH融合セット /図 7B	Fc hIgG1.agly-SG4- ANTIBODY-A Fab VH 融合物	
11	TOC1713		TOC1715	VH融合セット /図 7B	Fc hIgG1.agly-SG4SG4- ANTIBODY-A Fab VH 融合物	
12	TOC1714		TOC1715	VH融合セット /図 7B	Fc hIgG1.agly-SG4SG4SG4- ANTIBODY-A Fab VH 融合物	10
13	TOC1788		TOC1721	VL融合セット /図 7C	Fc hIgG1.agly-DelPG- ANTIBODY-A Fab VL 融合物	
14	TOC1789		TOC1721	VL融合セット /図 7C	Fc hIgG1.agly-DelG- ANTIBODY-A Fab VL 融合物	
15	TOC1790		TOC1721	VL融合セット /図 7C	Fc hIgG1.agly-ANTIBODY-A Fab VL 融合物	
16	TOC1791		TOC1721	VL融合セット /図 7C	Fc hIgG1.agly-S-ANTIBODY-A Fab VL 融合物	
17	TOC1792		TOC1721	VL融合セット /図 7C	Fc hIgG1.agly-SG2- ANTIBODY-A Fab VL 融合物	20
18	TOC1793		TOC1721	VL融合セット /図 7C	Fc hIgG1.agly-SG4- ANTIBODY-A Fab VL 融合物	
19	TOC1794		TOC1721	VL融合セット /図 7C	Fc hIgG1.agly-SG4SG4- ANTIBODY-A Fab VL 融合物	
20	TOC1795		TOC1721	VL融合セット /図 7C	Fc hIgG1.agly-SG4SG4SG4- ANTIBODY-A Fab VL 融合物	
21	TOC1728			J /図 7D	Fc hIgG1.agly-SG4SG4- ANTIBODY-A VH-VL scFv	
22	TOC1729			K /図 7E	Fc hIgG1.agly-SG4SG4- ANTIBODY-A VL-VH scFv	30

【表 2 1 - 1】

表 2 1 : 抗体構成要素のタンパク質配列

タンパク質 ID	タンパク質 の説明	タンパク質配列
TOC1785	hIgG1.agly- DelPG- ANTIBODY- A VH-CH1  (配列番号174)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSQSLVESGGGLVQP GGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGLEWVGCY TYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNLSLKTEDTAV YYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGLTVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 2】

		LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSC	
TOC1786	hIgG1.agly- DelG- ANTIBODY- A VH-CH1  (配列番号175)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPQSLVESGGGLVQ PGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGLEWVGC ITYYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNSLKTEDTA VYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NPKPSNTKVDKKVEPKSC	10
TOC1787	hIgG1.agly- ANTIBODY- A VH-CH1  (配列番号176)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGQSLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGLEWVG CIYTYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNSLKTED TAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGLVTVSSAS TKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC NVNPKPSNTKVDKKVEPKSC	20
TOC1710	hIgG1.agly-S- ANTIBODY- A VH-CH1  (配列番号177)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSQSLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGLEWV GCIYTYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNSLKTE DTAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYI CNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC	30
TOC1711	hIgG1.agly- SG2- ANTIBODY- A VH-CH1  (配列番号178)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGQSLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGLE WVGCITYYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNSL	40

【表 2 1 - 3】

		KTEDTAVYYCARGTYGYTYTGMGYFSLWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
TOC1712	hIgG1.agly- SG4- ANTIBODY- A VH-CH1  (配列番号179)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGQSLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQAPGKGL EWVGCITYYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVYLQMNLSL KTEDTAVYYCARGTYGYTYTGMGYFSLWGQGLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
TOC1713	hIgG1.agly- SG4SG4- ANTIBODY- A VH-CH1  (配列番号180)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGG QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQ APGKGLEWVGCITYYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVY LQMNLSLKTEDTAVYYCARGTYGYTYTGMGYFSLWG QGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
TOC1714	hIgG1.agly- SG4SG4SG4- ANTIBODY- A VH-CH1  (配列番号181)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGS GGGQSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMC WVRQAPGKGLEWVGCITYYSSNTYYAASVKGRFTISKTS STTVYLQMNLSLKTEDTAVYYCARGTYGYTYTGMGYF SLWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC
TOC1788	hIgG1.agly- DelPG- ANTIBODY- A VL-Ck	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSDIQMTQSPSTLSAS

10

20

30

40

50

【表 2 1 - 4】

	(配列番号182)	VGDRVTITCQASQNINSYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQSYYYSS GSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	
TOC1789	hIgG1.agly- DelG- ANTIBODY- A VL-Ck  (配列番号183)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPDIQMTQSPSTLSA SVGDRVTITCQASQNINSYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASS LESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQSYYYSS GSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTA SVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC	10
TOC1790	hIgG1.agly- ANTIBODY- A VL-Ck  (配列番号184)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGDIQMTQSPSTLS ASVGDRVTITCQASQNINSYLAWYQQKPGKAPKLLIYRA SSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQSY YSGSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPV TKSFNRGEC	20
TOC1791	hIgG1.agly-S- ANTIBODY- A VL-Ck  (配列番号185)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSDIQMTQSPSTL SASVGDRVTITCQASQNINSYLAWYQQKPGKAPKLLIYR ASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQSY YYSGSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSP VTKSFNRGEC	30
TOC1792	hIgG1.agly- SG2- ANTIBODY- A VL-Ck	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV	40

【表 2 1 - 5】

	(配列番号186)	EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGDIQMTQSP STLSASVGDRVITITCQASQNINSYLAWYQQKPGKAPKLLI YRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQ SYYYYSGSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	
TOC1793	hIgG1.agly- SG4- ANTIBODY- A VL-Ck  (配列番号187)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGDIQMTQ SPSTLSASVGDRVITITCQASQNINSYLAWYQQKPGKAPKL LIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYC QSYYYSGSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC	10
TOC1794	hIgG1.agly- SG4SG4- ANTIBODY- A VL-Ck  (配列番号188)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGG DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCQASQNINSYLAWYQQK GKAPKLLIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPD FATYYCQSYYYSGSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ GNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	20
TOC1795	hIgG1.agly- SG4SG4SG4- ANTIBODY- A VL-Ck  (配列番号189)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGGS GGGGDIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCQASQNINSYLA WYQQKPGKAPKLLIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTIS SLQPDDEFATYYCQSYYYSGSSNYNAFGGGTKVEIKRTVA APSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEK KVVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	30
TOC1728	hIgG1.agly- SG4SG4-	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY	40

【表 2 1 - 6】

	ANTIBODY-A VH-VL scFv (配列番号190)	RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGG QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQ APGKGLEWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVY LQMNSLKTEDTAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWG QGTLLTVSSGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSTLSASV GDRVTITCQASQNINSYLAWYQQKPKGAPKLLIYRASSLE SGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQSYYYSGS SNYNFAGGGTKVEIK	10
TOC1729	hIgG1.agly-SG4SG4-ANTIBODY-A VL-VH scFv (配列番号191)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGG DIQMTQSPSTLSASV GDRVTITCQASQNINSYLAWYQQKPKGAPKLLIYRASSLE SGVPSRFSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCQSYYYSGS SNYNFAGGGTKVEIKGGGGSGGGG GGGGSQSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYM CWVRQAPGKGLEWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVY LQMNSLKTEDTAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWGQGTLLTVSS	20
TOC1796	huANTIBODY-A 二価 RSU hIgG1.agly (配列番号192)	QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQ APGKGLEWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVY LQMNSLKTEDTAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWG QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG QPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	30
TOC1797	huANTIBODY-A 片腕 RSU hIgG1.agly (knob+cys) (配列番号193)	QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQ APGKGLEWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVY LQMNSLKTEDTAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWG QGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESN	40

【表 2 1 - 7】

		GQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
TOC1798	Fc hIgG1.agly ANTIBODY- A Fab 二価 USD  (配列番号 180)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGSGGGGSGGGG QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQ APGKGLEWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVY LQMNSLKTEDTAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC	10
TOC1799	Fc hIgG1.agly ANTIBODY- A Fab 片腕 USD (knob+cys)  (配列番号 194)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPCRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGGGGSGGGG QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQ APGKGLEWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVY LQMNSLKTEDTAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC	20
TOC1801	Fc hIgG1.ag(N29 7Q) (ホロ+cys)  (配列番号 195)	KTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYQSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVCTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	
TOC1715	ANTIBODY- A LC hKappa Cterm HA  (配列番号 196)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQNINSYLAWYQQKP GKAPKLLIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDD FATYYCQSYYYSGSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGECTGYPYDVPDYA	30
TOC1721	ANTIBODY- A VH CH1 HA 融合物  (配列番号 197)	QSLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGIDFSSSGYMCWVRQ APGKGLEWVGCITYSSNTYYAASVKGRFTISKTSSTTVY LQMNSLKTEDTAVYYCARGTYGYTGYTYTMGYFSLWG QGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSCTGYPYDVP DYA	40

【表 2 1 - 8】

TOC1775	ANTIBODY- A LC hKappa  (配列番号 94)	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCQASQNINSYLAWYQQKP GKAPKLLIYRASSLESGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDD FATYYCQSYYYSGSSNYNAFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC
---------	---	--

## 【0274】

ハムスターTfR欠損CHO細胞に、全長ヒトTfRまたは全長カニクイザルTfRのいずれかを発現するレンチウイルスプラスミドを用いて形質導入した。フローサイトメトリーは、カニクイザルTfRまたはヒトTfRのいずれかを有するCHO細胞を、ウェルあたり50,000細胞(100マイクロリットル)で、試験物(タンパク質インデックス1、2、3、または4で識別される抗体)を滴定すると共に氷上で1時間インキュベートした後、2回の洗浄、二次抗ヒトFcPE標識コンジュゲート(Jackson ImmunoResearch)とのインキュベート、2回の洗浄、及び1%パラホルムアルデヒドで固定した後のフローサイトメーターでの分析により実施した。

## 【0275】

試験した4つのフォーマットの抗体(タンパク質インデックス1、2、3、及び4で識別される抗体)はすべて、カニクイザルTfR及びヒトTfRの両方に十分に結合し、2つの種に対する結合性は、ほぼ同程度であった(図8A~8B及び表22)。二価のコンストラクトでは、それらの結合アビディティに起因して、細胞に対するわずかに高い結合性が示された。

## 【表22】

表22: ヒト化ANTIBODY-Aフォーマットバリエーションのカニクイザル及びヒトTfRに対する結合性

タンパク質インデックス	説明	EC50 (nM) cyTfR	EC50 (nM) huTfR
1	huANTIBODY-A 二価 RSU hIgG1.agly	0.1	0.3
2	huANTIBODY-A 片腕 RSU hIgG1.agly (KIH-SS)	1.3	0.7
3	Fc hIgG1.agly ANTIBODY-A Fab 二価 USD	1.7	0.5
4	Fc hIgG1.agly ANTIBODY-A Fab 片腕 USD (KIH-SS)	2.5	0.8

## 【0276】

ANTIBODY-Aのヒト化バージョンによるトランスフェリンの排除について、種々のフォーマットで評価した。ハムスターTfRが欠損しており、ヒトTfRを過剰発現しているCHO細胞を、3nMのAlexaFluor647複合化トランスフェリンと共に、かつ、必要とされる濃度の試験物(タンパク質インデックス1、2、3、または4で識別される抗体)を滴定すると共に氷上で1時間インキュベートし、3回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光トランスフェリンの排除についてフローサイトメトリーで分析した。

## 【0277】

右側上向き(「RSU」)コンストラクト(タンパク質インデックス1及び2)では、両方ともTf排除が最小限であることが示された(図9A)。二価RSU(タンパク質インデックス1)では、>2nMの濃度で、約10%のTf排除が示された。

## 【0278】

逆さ(「USD」)のコンストラクト(タンパク質インデックス3及び4)では、両方ともTf排除が約40%であることが示された(図9B)。これはおそらく、これらのコンストラクトのFcとトランスフェリンとの間の立体上の衝突によるものと思われる。

## 【0279】

ヒトホトランスフェリンの存在下または非存在下における、抗TfRヒト化ANTIBODY-A一価Fc融合物(タンパク質インデックス2及び4)のTfRに対する結合

10

20

30

40

50

性を、N末端His x 6タグを有するヒトまたはカニクイザルTfR外部ドメイン (ECD) を捕捉するためのCM5チップ抗Hisタグ捕捉法を用いて、Biacore 8K+装置における摂氏25での表面プラズモン共鳴により調べた。結合は、pH7.4のヘブス緩衝食塩水 (3mM EDTA、0.05% BSA、0.005% P20を含む) 中で行った。トランスフェリンとの競合を試験するために、試験物 (タンパク質インデックス2または4) を注入する前に、表面に捕捉したTfR ECDを1マイクロモルのホロヒトトランスフェリンであらかじめ飽和させた。一価抗体は、0.2 ~ 200 nMの4倍希釈系列で滴定した。マルチサイクルカインेटィクスを、1:1 binding modelにフィッティングして、結合パラメーターを生成した。抗TfRヒト化ANTIBODY-A一価Fc融合物のTfRに対する結合性は、トランスフェリンによる影響を受けなかった (表23)。

10

【表23】

表23: トランスフェリンの存在下または非存在下におけるヒト化ANTIBODY-A一価Fc融合物のTfRに対する結合性

	Tf (1uM)	ヒトTfR ECD結合				Cyno TfR ECD結合			
		ka (/M.s)	kd (/s)	KD (nM)	Rmax (%)	ka (/M.s)	kd (/s)	KD (nM)	Rmax (%)
タンパク質インデックス2 (huANTIBODY-A一価RSU hlgG1.agly (KIH-SS))	-	6.3E+05	1.1E-03	1.7	74	1.4E+06	6.8E-03	5.0	80
	+	7.0E+05	8.9E-04	1.3	73	1.5E+06	7.6E-03	5.2	76
タンパク質インデックス4 (Fc hlgG1.agly ANTIBODY-A Fab一価USD (KIH-SS))	-	4.1E+05	9.8E-04	2.4	75	8.2E+05	4.9E-03	6.0	80
	+	3.0E+05	7.6E-04	2.5	76	6.0E+05	5.8E-03	9.6	78

20

【0280】

ヒト化ANTIBODY-A一価バージョン (タンパク質インデックス2及び4) の存在下または非存在下における、ヒトホロトランスフェリンのcyno TfR ECDに対する結合性を、N末端His x 6タグを有するヒトまたはカニクイザルTfR外部ドメイン (ECD) を捕捉するためのCM5チップ抗Hisタグ捕捉法を用いて、Biacore 8K+装置における摂氏25での表面プラズモン共鳴により調べた。結合は、pH7.4のヘブス緩衝食塩水 (3mM EDTA、0.05% BSA、0.005% P20を含む) 中で行った。TfRでの競合を試験するために、0.2 ~ 200 nMの4倍希釈系列ヒトホロトランスフェリンを注入する前に、表面に捕捉したTfR ECDを200 nMのヒト化ANTIBODY-A (タンパク質インデックス2または4) であらかじめ飽和させた。マルチサイクルカインेटィクスを、1:1 binding modelにフィッティングして、結合パラメーターを生成した。逆さフォーマット (USD、Fc-Fab) では、一価抗TfRヒト化ANTIBODY-Aは、TfRに対するトランスフェリンの結合性を弱めた (表24)。右側上向きフォーマット (RSU、Fab-Fc) では、一価抗TfRヒト化ANTIBODY-Aは、TfRに対するトランスフェリンの結合性に影響を与えなかった (表24)。

30

40

## 【表 2 4】

表 2 4：トランスフェリンのTfRへの結合に対する一価ヒト化ANTIBODY-A Fc融合物の影響

試験物	あらかじめ飽和させた競合物	cyTfR ECD	
		見かけのKD (nM)	Rmax (%)
ホロ huTf	なし	3.1	38
ホロ huTf	200 nM タンパク質インデックス 2 (ANTIBODY-A hIgG1.agly 一価 RSU)	3.9	34
ホロ huTf	200 nM タンパク質インデックス 4 (hIgG1.agly - ANTIBODY-A 一価 USD)	9.8	31

10

## 【0281】

ハムスターTfRが欠損しており、ヒトTfRを過剰発現しているCHO細胞を、3 nMのAlexaFluor647複合化トランスフェリンと共に、かつ、必要とされる濃度の試験物（抗体 - タンパク質インデックス3または14）を滴定すると共に氷上で1時間インキュベートし、3回洗浄し、1%パラホルムアルデヒドで固定し、蛍光トランスフェリンの排除についてフローサイトメトリーで分析した。FabがFab VHN末端を通してFcのC末端に連結されたUSDフォーマットのヒト化ANTIBODY-Aは、細胞表面huTfRからのトランスフェリン（Tf-AF647）の排除を約40%誘導する（図10、「x」で識別されるタンパク質インデックス3）。このことは、VLドメインのN末端を通してFabをFcに連結し、FcとFabとの間のリンカーを短くすることによって最小化された（図10、三角形で識別されるタンパク質インデックス14）。

20

## 【0282】

フローサイトメトリー実験において、ハムスターTfRが欠損しており、全長ヒトTfRを過剰発現しているCHO細胞を用いて、抗TfR抗体の結合性を試験した。フローサイトメトリーは、ヒトTfRを発現しているCHO細胞を、ウェルあたりおよそ50,000細胞（100マイクロリットル）で、試験物（タンパク質インデックス5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、16、17、18、19、または20）を滴定すると共に氷上で1時間インキュベートした後、2回の洗浄、二次抗ヒトIgG PEコンジュゲート（Jackson ImmunoResearch）とのインキュベート、2回の洗浄、及び1%パラホルムアルデヒドで固定した後のフローサイトメーターでの分析により実施した。

30

## 【0283】

VHN末端（タンパク質インデックス5、6、7、8、9、10、11、及び12）またはVLN末端（タンパク質インデックス13、14、16、17、18、19、及び20）のいずれかを介してFcのC末端に融合されたヒト化ANTIBODY-A Fabでは、同様の結合結果が得られた（表25）。さらに、FcとFabとの間のリンカーは、15アミノ酸（3xSG4）から「マイナス2」（CH3ドメインの最後の2残基（Pro-Gly）が除去されている）まで変動し得る。FcがFabのVLドメインに融合し、かつリンカーが短い場合、最大平均蛍光強度が変化することに留意されたい。これは、試験物上の二次抗体の立体障害に起因するものと考えられる。

40

50

## 【表 2 5】

表 2 5 : ヒト化ANTIBODY-Aは、VHまたはVLのN末端を介して、より長いまたはより短いリンカーと共にFcに融合することができ、見かけの結合性の消失がない

タンパク質インデックス	EC50 (nM)	最大MFI (フィット)
5	0.29	1191
6	0.35	1189
7	0.27	1183
8	0.21	1232
9	0.26	1244
10	0.20	1290
11	0.22	1300
12	0.15	1359
13	0.20	553
14	0.31	498
16	0.20	567
17	0.32	497
18	0.26	527
19	0.33	659
20	0.32	1167

10

20

## 【0 2 8 4】

フローサイトメトリー実験において、ハムスターTfRが欠損しており、全長ヒトTfRを過剰発現しているCHO細胞を用いて、抗TfR抗体の結合性を試験した。フローサイトメトリーは、ヒトTfRを発現しているCHO細胞を、ウェルあたりおよそ50,000細胞(100マイクロリットル)で、試験物(タンパク質インデックス3、21、または22)を滴定すると共に氷上で1時間インキュベートした後、2回の洗浄、二次抗ヒトIgG PEコンジュゲート(Jackson ImmunoResearch)とのインキュベート、2回の洗浄、及び1%パラホルムアルデヒドで固定した後のフローサイトメーターでの分析により実施した。

30

## 【0 2 8 5】

ヒト化ANTIBODY-AのVH及びVLDメインをscFvフォーマットに変換し、ヒトIgG FcのC末端に融合した場合、ヒトTfRに対する結合性が保持された(表26)。MFIの明らかな差は、二次検出抗体が利用できるエピトープが非scFvフォーマットではより大きいことに起因するものと考えられる。

## 【表 2 6】

表 2 6 : scFvとして再フォーマットされたヒト化ANTIBODY-AはTfRに対する結合性を保持する

タンパク質インデックス	説明	EC50 (nM)	最大MFI (フィット)
3	Fc hIgG1.agly ANTIBODY-A Fab 二価 USD	0.28	1325
21	Fc hIgG1.agly-SG4SG4-ANTIBODY-A VH-VL scFv	0.21	415
22	Fc hIgG1.agly-SG4SG4-ANTIBODY-A VL-VH scFv	0.18	395

40

## 【0 2 8 6】

他の実施形態

50

本発明を、発明を実施するための形態と共に説明してきたが、前述の説明は、添付の特許請求の範囲によって定義される本発明の範囲の例示を意図したものであり、限定を意図するものではない。他の態様、利点、及び変更は、特許請求の範囲の範囲内にある。

【図面】

【図 1 A】

ANTIBODY-A フラグメント-VH

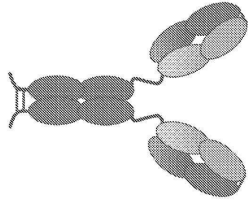
1 5 18 15 28 25 38 a 48 45 58 a 55 68 65 78 75 88 abc 85 98 95 abcdefghijkl 185  
 2 5 9 10 15 20 27 35 40 45 50 57 65 72 80 85 92 99 106 113 120 127 134 141 148 155 162 169 176 183 190 197 204 211 218 225 232 239 246 253 260 267 274 281 288 295 302 309 316 323 330 337 344 351 358 365 372 379 386 393 400 407 414 421 428 435 442 449 456 463 470 477 484 491 498 505 512 519 526 533 540 547 554 561 568 575 582 589 596 603 610 617 624 631 638 645 652 659 666 673 680 687 694 701 708 715 722 729 736 743 750 757 764 771 778 785 792 800 807 814 821 828 835 842 849 856 863 870 877 884 891 898 905 912 919 926 933 940 947 954 961 968 975 982 989 996 1003 1010 1017 1024 1031 1038 1045 1052 1059 1066 1073 1080 1087 1094 1101 1108 1115 1122 1129 1136 1143 1150 1157 1164 1171 1178 1185 1192 1199 1206 1213 1220 1227 1234 1241 1248 1255 1262 1269 1276 1283 1290 1297 1304 1311 1318 1325 1332 1339 1346 1353 1360 1367 1374 1381 1388 1395 1402 1409 1416 1423 1430 1437 1444 1451 1458 1465 1472 1479 1486 1493 1500 1507 1514 1521 1528 1535 1542 1549 1556 1563 1570 1577 1584 1591 1598 1605 1612 1619 1626 1633 1640 1647 1654 1661 1668 1675 1682 1689 1696 1703 1710 1717 1724 1731 1738 1745 1752 1759 1766 1773 1780 1787 1794 1801 1808 1815 1822 1829 1836 1843 1850 1857 1864 1871 1878 1885 1892 1899 1906 1913 1920 1927 1934 1941 1948 1955 1962 1969 1976 1983 1990 1997 2004 2011 2018 2025 2032 2039 2046 2053 2060 2067 2074 2081 2088 2095 2102 2109 2116 2123 2130 2137 2144 2151 2158 2165 2172 2179 2186 2193 2200 2207 2214 2221 2228 2235 2242 2249 2256 2263 2270 2277 2284 2291 2298 2305 2312 2319 2326 2333 2340 2347 2354 2361 2368 2375 2382 2389 2396 2403 2410 2417 2424 2431 2438 2445 2452 2459 2466 2473 2480 2487 2494 2501 2508 2515 2522 2529 2536 2543 2550 2557 2564 2571 2578 2585 2592 2600 2607 2614 2621 2628 2635 2642 2649 2656 2663 2670 2677 2684 2691 2698 2705 2712 2719 2726 2733 2740 2747 2754 2761 2768 2775 2782 2789 2796 2803 2810 2817 2824 2831 2838 2845 2852 2859 2866 2873 2880 2887 2894 2901 2908 2915 2922 2929 2936 2943 2950 2957 2964 2971 2978 2985 2992 3000 3007 3014 3021 3028 3035 3042 3049 3056 3063 3070 3077 3084 3091 3098 3105 3112 3119 3126 3133 3140 3147 3154 3161 3168 3175 3182 3189 3196 3203 3210 3217 3224 3231 3238 3245 3252 3259 3266 3273 3280 3287 3294 3301 3308 3315 3322 3329 3336 3343 3350 3357 3364 3371 3378 3385 3392 3399 3406 3413 3420 3427 3434 3441 3448 3455 3462 3469 3476 3483 3490 3497 3504 3511 3518 3525 3532 3539 3546 3553 3560 3567 3574 3581 3588 3595 3602 3609 3616 3623 3630 3637 3644 3651 3658 3665 3672 3679 3686 3693 3700 3707 3714 3721 3728 3735 3742 3749 3756 3763 3770 3777 3784 3791 3798 3805 3812 3819 3826 3833 3840 3847 3854 3861 3868 3875 3882 3889 3896 3903 3910 3917 3924 3931 3938 3945 3952 3959 3966 3973 3980 3987 3994 4001 4008 4015 4022 4029 4036 4043 4050 4057 4064 4071 4078 4085 4092 4099 4106 4113 4120 4127 4134 4141 4148 4155 4162 4169 4176 4183 4190 4197 4204 4211 4218 4225 4232 4239 4246 4253 4260 4267 4274 4281 4288 4295 4302 4309 4316 4323 4330 4337 4344 4351 4358 4365 4372 4379 4386 4393 4400 4407 4414 4421 4428 4435 4442 4449 4456 4463 4470 4477 4484 4491 4498 4505 4512 4519 4526 4533 4540 4547 4554 4561 4568 4575 4582 4589 4596 4603 4610 4617 4624 4631 4638 4645 4652 4659 4666 4673 4680 4687 4694 4701 4708 4715 4722 4729 4736 4743 4750 4757 4764 4771 4778 4785 4792 4799 4806 4813 4820 4827 4834 4841 4848 4855 4862 4869 4876 4883 4890 4897 4904 4911 4918 4925 4932 4939 4946 4953 4960 4967 4974 4981 4988 4995 5002 5009 5016 5023 5030 5037 5044 5051 5058 5065 5072 5079 5086 5093 5100 5107 5114 5121 5128 5135 5142 5149 5156 5163 5170 5177 5184 5191 5198 5205 5212 5219 5226 5233 5240 5247 5254 5261 5268 5275 5282 5289 5296 5303 5310 5317 5324 5331 5338 5345 5352 5359 5366 5373 5380 5387 5394 5401 5408 5415 5422 5429 5436 5443 5450 5457 5464 5471 5478 5485 5492 5500 5507 5514 5521 5528 5535 5542 5549 5556 5563 5570 5577 5584 5591 5598 5605 5612 5619 5626 5633 5640 5647 5654 5661 5668 5675 5682 5689 5696 5703 5710 5717 5724 5731 5738 5745 5752 5759 5766 5773 5780 5787 5794 5801 5808 5815 5822 5829 5836 5843 5850 5857 5864 5871 5878 5885 5892 5900 5907 5914 5921 5928 5935 5942 5949 5956 5963 5970 5977 5984 5991 5998 6005 6012 6019 6026 6033 6040 6047 6054 6061 6068 6075 6082 6089 6096 6103 6110 6117 6124 6131 6138 6145 6152 6159 6166 6173 6180 6187 6194 6201 6208 6215 6222 6229 6236 6243 6250 6257 6264 6271 6278 6285 6292 6300 6307 6314 6321 6328 6335 6342 6349 6356 6363 6370 6377 6384 6391 6398 6405 6412 6419 6426 6433 6440 6447 6454 6461 6468 6475 6482 6489 6496 6503 6510 6517 6524 6531 6538 6545 6552 6559 6566 6573 6580 6587 6594 6601 6608 6615 6622 6629 6636 6643 6650 6657 6664 6671 6678 6685 6692 6700 6707 6714 6721 6728 6735 6742 6749 6756 6763 6770 6777 6784 6791 6798 6805 6812 6819 6826 6833 6840 6847 6854 6861 6868 6875 6882 6889 6896 6903 6910 6917 6924 6931 6938 6945 6952 6959 6966 6973 6980 6987 6994 7001 7008 7015 7022 7029 7036 7043 7050 7057 7064 7071 7078 7085 7092 7100 7107 7114 7121 7128 7135 7142 7149 7156 7163 7170 7177 7184 7191 7198 7205 7212 7219 7226 7233 7240 7247 7254 7261 7268 7275 7282 7289 7296 7303 7310 7317 7324 7331 7338 7345 7352 7359 7366 7373 7380 7387 7394 7401 7408 7415 7422 7429 7436 7443 7450 7457 7464 7471 7478 7485 7492 7500 7507 7514 7521 7528 7535 7542 7549 7556 7563 7570 7577 7584 7591 7598 7605 7612 7619 7626 7633 7640 7647 7654 7661 7668 7675 7682 7689 7696 7703 7710 7717 7724 7731 7738 7745 7752 7759 7766 7773 7780 7787 7794 7801 7808 7815 7822 7829 7836 7843 7850 7857 7864 7871 7878 7885 7892 7900 7907 7914 7921 7928 7935 7942 7949 7956 7963 7970 7977 7984 7991 7998 8005 8012 8019 8026 8033 8040 8047 8054 8061 8068 8075 8082 8089 8096 8103 8110 8117 8124 8131 8138 8145 8152 8159 8166 8173 8180 8187 8194 8201 8208 8215 8222 8229 8236 8243 8250 8257 8264 8271 8278 8285 8292 8300 8307 8314 8321 8328 8335 8342 8349 8356 8363 8370 8377 8384 8391 8398 8405 8412 8419 8426 8433 8440 8447 8454 8461 8468 8475 8482 8489 8496 8503 8510 8517 8524 8531 8538 8545 8552 8559 8566 8573 8580 8587 8594 8601 8608 8615 8622 8629 8636 8643 8650 8657 8664 8671 8678 8685 8692 8700 8707 8714 8721 8728 8735 8742 8749 8756 8763 8770 8777 8784 8791 8798 8805 8812 8819 8826 8833 8840 8847 8854 8861 8868 8875 8882 8889 8896 8903 8910 8917 8924 8931 8938 8945 8952 8959 8966 8973 8980 8987 8994 9001 9008 9015 9022 9029 9036 9043 9050 9057 9064 9071 9078 9085 9092 9100 9107 9114 9121 9128 9135 9142 9149 9156 9163 9170 9177 9184 9191 9198 9205 9212 9219 9226 9233 9240 9247 9254 9261 9268 9275 9282 9289 9296 9303 9310 9317 9324 9331 9338 9345 9352 9359 9366 9373 9380 9387 9394 9401 9408 9415 9422 9429 9436 9443 9450 9457 9464 9471 9478 9485 9492 9500 9507 9514 9521 9528 9535 9542 9549 9556 9563 9570 9577 9584 9591 9598 9605 9612 9619 9626 9633 9640 9647 9654 9661 9668 9675 9682 9689 9696 9703 9710 9717 9724 9731 9738 9745 9752 9759 9766 9773 9780 9787 9794 9801 9808 9815 9822 9829 9836 9843 9850 9857 9864 9871 9878 9885 9892 9900 9907 9914 9921 9928 9935 9942 9949 9956 9963 9970 9977 9984 9991 9998 10005 10012 10019 10026 10033 10040 10047 10054 10061 10068 10075 10082 10089 10096 10103 10110 10117 10124 10131 10138 10145 10152 10159 10166 10173 10180 10187 10194 10201 10208 10215 10222 10229 10236 10243 10250 10257 10264 10271 10278 10285 10292 10299 10306 10313 10320 10327 10334 10341 10348 10355 10362 10369 10376 10383 10390 10397 10404 10411 10418 10425 10432 10439 10446 10453 10460 10467 10474 10481 10488 10495 10502 10509 10516 10523 10530 10537 10544 10551 10558 10565 10572 10579 10586 10593 10600 10607 10614 10621 10628 10635 10642 10649 10656 10663 10670 10677 10684 10691 10698 10705 10712 10719 10726 10733 10740 10747 10754 10761 10768 10775 10782 10789 10796 10803 10810 10817 10824 10831 10838 10845 10852 10859 10866 10873 10880 10887 10894 10901 10908 10915 10922 10929 10936 10943 10950 10957 10964 10971 10978 10985 10992 11000 11007 11014 11021 11028 11035 11042 11049 11056 11063 11070 11077 11084 11091 11098 11105 11112 11119 11126 11133 11140 11147 11154 11161 11168 11175 11182 11189 11196 11203 11210 11217 11224 11231 11238 11245 11252 11259 11266 11273 11280 11287 11294 11301 11308 11315 11322 11329 11336 11343 11350 11357 11364 11371 11378 11385 11392 11399 11406 11413 11420 11427 11434 11441 11448 11455 11462 11469 11476 11483 11490 11497 11504 11511 11518 11525 11532 11539 11546 11553 11560 11567 11574 11581 11588 11595 11602 11609 11616 11623 11630 11637 11644 11651 11658 11665 11672 11679 11686 11693 11700 11707 11714 11721 11728 11735 11742 11749 11756 11763 11770 11777 11784 11791 11798 11805 11812 11819 11826 11833 11840 11847 11854 11861 11868 11875 11882 11889 11896 11903 11910 11917 11924 11931 11938 11945 11952 11959 11966 11973 11980 11987 11994 12001 12008 12015 12022 12029 12036 12043 12050 12057 12064 12071 12078 12085 12092 12099 12106 12113 12120 12127 12134 12141 12148 12155 12162 12169 12176 12183 12190 12197 12204 12211 12218 12225 12232 12239 12246 12253 12260 12267 12274 12281 12288 12295 12302 12309 12316 12323 12330 12337 12344 12351 12358 12365 12372 12379 12386 12393 12400 12407 12414 12421 12428 12435 12442 12449 12456 12463 12470 12477 12484 12491 12498 12505 12512 12519 12526 12533 12540 12547 12554 12561 12568 12575 12582 12589 12596 12603 12610 12617 12624 12631 12638 12645 12652 12659 12666 12673 12680 12687 12694 12701 12708 12715 12722 12729 12736 12743 12750 12757 12764 12771 12778 12785 12792 12799 12806 12813 12820 12827 12834 12841 12848 12855 12862 12869 12876 12883 12890 12897 12904 12911 12918 12925 12932 12939 12946 12953 12960 12967 12974 12981 12988 12995 13002 13009 13016 13023 13030 13037 13044 13051 13058 13065 13072 13079 13086 13093 13100 13107 13114 13121 13128 13135 13142 13149 13156 13163 13170 13177 13184 13191 13198 13205 13212 13219 13226 13233 13240 13247 13254 13261 13268 13275 13282 13289 13296 13303 13310 13317 13324 13331 13338 13345 13352 13359 13366 13373 13380 13387 13394 13401 13408 13415 13422 13429 13436 13443 13450 13457 13464 13471 13478 13485 13492 13499 13506 13513 13520 13527 13534 13541 13548 13555 13562 13569 13576 13583 13590 13597 13604 13611 13618 13625 13632 13639 13646 13653 13660 13667 13674 13681 13688 13695 13702 13709 13716 13723 13730 13737 13744 13751 13758 13765 13772 13779 13786 13793 13800 13807 13814 13821 13828 13835 13842 13849 13856 13863 13870 13877 13884 13891 13898 13905 13912 13919 13926 13933 13940 13947 13954 13961 13968 13975 13982 13989 13996 14003 14010 14017 14024 14031 14038 14045 14052 14059 14066 14073 14080 14087 14094 14101 14108 14115 14122 14129 14136 14143 14150 14157 14164 14171 14178 14185 14192 14199 14206 14213 14220 14227 14234 14241 14248 14255 14262 14269 14276 14283 14290 14297 14304 14311 14318 14325 14332 14339 14346 14353 14360 14367 14374 14381 14388 14395 14402 14409 14416 14423 14430 14437 14444 14451 14458 14465 14472 14479 14486 14493 14500 14507 14514 14521 14528 14535 14542 14549 14556 14563 14570 14577 14584 14591 14598 14605 14612 14619 14626 14633 14640 14647 14654 14661 14668 14675 14682 14689 14696 14703 14710 14717 14724 14731 14738 14745 14752 14759 14766 14773 14780 14787 14794 14801 14808 14815 14822 14829 14836 14843 14850 14857 14864 14871 14878 14885 14892 14899 14906 14913 14920 14927 14934 14941 14948 14955 14962 14969 14976 14983 14990 14997 15004 15011 15018 15025 15032 15039 15046 15053 15060 15067 15074 15081 15088 15095 15102 15109 15116 15123 15130 15137 15144 15151 15158 15165 15172 15179 15186 15193 15200 15207 15214 15221 15228 15235 15242 15249 15256 15263 15270 15277 15284 15291 15298 15305 15312 15319 15326 15333 15340 15347 15354 15361 15368 15375 15382 15389 15396 15403 15410 15417 15424 15431 15438 15445 15452 15459 15466 15473 15480 15487 15494 15501 15508 15515 15522 15529 15536 15543 15550 15557 15564 15571 15578 15585 15592 15599 15606 15613 15620 15627 15634 15641 15648 15655 15662 15669 15676 15683 15690 15697 15704 15711 15718 15725 15732 15739 15746 15753 15760 15767 15774 15781 15788 15795 15802 15809 15816 15823 15830 15837



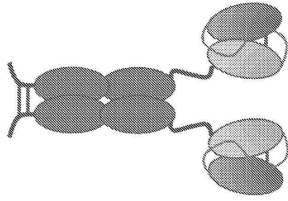




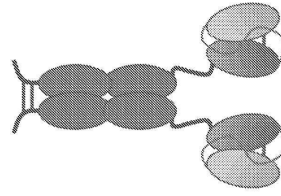
【 図 7 C 】



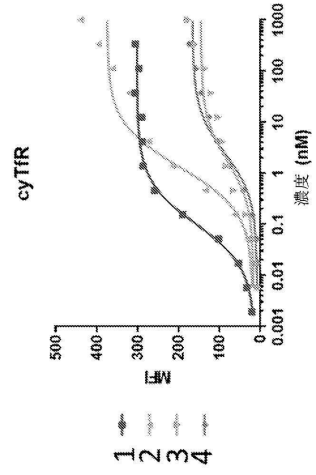
【 図 7 E 】



【 図 7 D 】



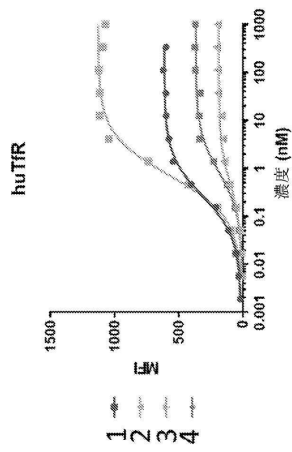
【 図 8 A 】



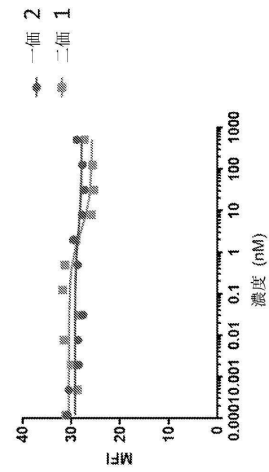
10

20

【 図 8 B 】



【 図 9 A 】

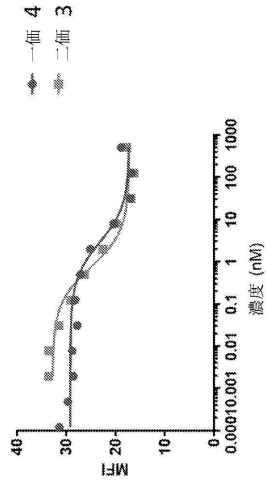


30

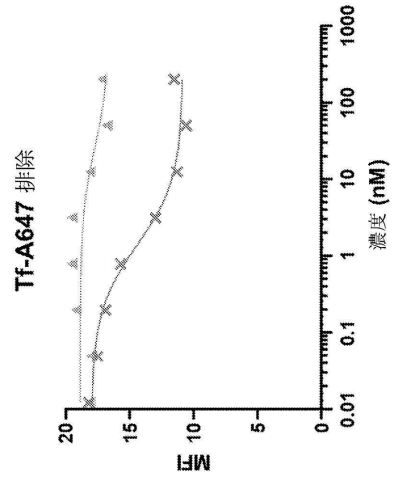
40

50

【 図 9 B 】



【 図 1 0 】



10

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2022/042196

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b> <b>INV. C07K16/28</b> <b>ADD.</b>  According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b> Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) <b>C07K</b>		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) <b>EPO-Internal, INSPEC</b>		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<b>X</b>	<b>WO 2021/154477 A1 (DYNE THERAPEUTICS INC [US]) 5 August 2021 (2021-08-05) paragraph [0402]; figure 4; examples 2,3 the whole document</b>  ----- -/--	<b>1-42</b>
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
<b>13 December 2022</b>		<b>19/12/2022</b>
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer  <b>Siaterli, Maria</b>

10

20

30

40

50

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/US2022/042196
---

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>LURIA-PÉREZ ROSENDO ET AL: "Antibody-mediated targeting of the transferrin receptor in cancer cells", BOLETIN MEDICO DEL HOSPITAL INFANTIL DE MEXICO, vol. 73, no. 6, 1 November 2016 (2016-11-01), pages 372-379, XP055978238, ISSN: 1665-1146, DOI: 10.1016/j.bmhmx.2016.11.004 Retrieved from the Internet: URL:https://www.scielo.org.mx/pdf/bmim/v73n6/1665-1146-bmim-73-06-00372.pdf&gt; the whole document paragraph [0006]; table 1 page 375, paragraph 5</p> <p>-----</p>	1-42
X	<p>CANDELARIA PIERRE V. ET AL: "Antibodies Targeting the Transferrin Receptor 1 (TFR1) as Direct Anti-cancer Agents", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 12, 17 March 2021 (2021-03-17), XP055976138, DOI: 10.3389/fimmu.2021.607692 the whole document page 4, right-hand column, last paragraph - page 14, left-hand column, paragraph 1; figure 2</p> <p>-----</p>	1-42
X	<p>TAKAHASHI S ET AL: "An epitope on the transferrin receptor preferentially exposed during tumor progression in human lymphoma is close to the ligand binding site", BLOOD, AMERICAN SOCIETY OF HEMATOLOGY, US, vol. 77, no. 4, 15 February 1991 (1991-02-15), pages 826-832, XP002594434, ISSN: 0006-4971 the whole document paragraph [introduction]</p> <p>-----</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1-42

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/US2022/042196

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>SHEN XIN ET AL: "An anti-transferrin receptor antibody enhanced the growth inhibitory effects of chemotherapeutic drugs on human non-hematopoietic tumor cells", INTERNATIONAL IMMUNOPHARMACOLOGY, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 8, no. 13, 24 September 2008 (2008-09-24), pages 1813-1820, XP087107295, ISSN: 1567-5769, DOI: 10.1016/J.INTIMP.2008.08.022 [retrieved on 2008-09-24] the whole document</p> <p>-----</p>	1-42
X	<p>WO 2005/121179 A2 (RAVEN BIOTECHNOLOGIES INC [US]; MATHER JENNIE P [US] ET AL.) 22 December 2005 (2005-12-22) the whole document paragraph [0233]; examples 2,9,19</p> <p>-----</p>	1-42
X	<p>WO 2016/081643 A1 (GENENTECH INC [US]; HOFFMANN LA ROCHE [CH]) 26 May 2016 (2016-05-26) the whole document paragraph [0316] - paragraph [0317]; examples 1,3,8</p> <p>-----</p>	1-42
X	<p>WO 2016/179257 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS INC [US]) 10 November 2016 (2016-11-10) paragraph [0593]; claims 1-99; examples 3,6,8,9</p> <p>-----</p>	1-42

10

20

30

40

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/US2022/042196

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

- 1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
  - a.  forming part of the international application as filed.
  - b.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)).
    - accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
- 2.  With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
- 3. Additional comments:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No  
**PCT/US2022/042196**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<b>WO 2021154477</b>	<b>A1</b>	<b>05-08-2021</b>	<b>NONE</b>
-----			
<b>WO 2005121179</b>	<b>A2</b>	<b>22-12-2005</b>	<b>AU 2005252699 A1 22-12-2005</b>
		<b>CA 2569692 A1 22-12-2005</b>	
		<b>CN 101432305 A 13-05-2009</b>	
		<b>EP 1765868 A2 28-03-2007</b>	
		<b>JP 4824025 B2 24-11-2011</b>	
		<b>JP 2008508904 A 27-03-2008</b>	
		<b>KR 20070042959 A 24-04-2007</b>	
		<b>US 2006039908 A1 23-02-2006</b>	
		<b>US 2010166745 A1 01-07-2010</b>	
		<b>WO 2005121179 A2 22-12-2005</b>	
-----			
<b>WO 2016081643</b>	<b>A1</b>	<b>26-05-2016</b>	<b>CN 107001473 A 01-08-2017</b>
		<b>EP 3221362 A1 27-09-2017</b>	
		<b>JP 6779876 B2 04-11-2020</b>	
		<b>JP 2018503357 A 08-02-2018</b>	
		<b>JP 2021035365 A 04-03-2021</b>	
		<b>US 2018134797 A1 17-05-2018</b>	
		<b>US 2020123267 A1 23-04-2020</b>	
		<b>WO 2016081643 A1 26-05-2016</b>	
-----			
<b>WO 2016179257</b>	<b>A2</b>	<b>10-11-2016</b>	<b>AU 2016258628 A1 30-11-2017</b>
		<b>AU 2021257886 A1 18-11-2021</b>	
		<b>BR 112017023862 A2 17-07-2018</b>	
		<b>CA 2984945 A1 10-11-2016</b>	
		<b>CA 3176004 A1 10-11-2016</b>	
		<b>CN 108026170 A 11-05-2018</b>	
		<b>CN 114507283 A 17-05-2022</b>	
		<b>DK 3292149 T3 28-02-2022</b>	
		<b>EA 201792413 A1 29-06-2018</b>	
		<b>EP 3292149 A2 14-03-2018</b>	
		<b>EP 4029880 A1 20-07-2022</b>	
		<b>ES 2910407 T3 12-05-2022</b>	
		<b>HK 1250035 A1 23-11-2018</b>	
		<b>HR P20220172 T1 24-06-2022</b>	
		<b>HU E057720 T2 28-06-2022</b>	
		<b>JP 2018520991 A 02-08-2018</b>	
		<b>JP 2022120070 A 17-08-2022</b>	
		<b>KR 20180011127 A 31-01-2018</b>	
		<b>LT 3292149 T 10-03-2022</b>	
		<b>PL 3292149 T3 21-03-2022</b>	
		<b>PT 3292149 T 04-04-2022</b>	
		<b>RS 62956 B1 31-03-2022</b>	
		<b>SG 10201913762Q A 30-03-2020</b>	
		<b>SI 3292149 T1 29-04-2022</b>	
		<b>TW 201704265 A 01-02-2017</b>	
		<b>TW 202146456 A 16-12-2021</b>	
		<b>US 2016355599 A1 08-12-2016</b>	
		<b>US 2019202927 A1 04-07-2019</b>	
		<b>US 2022306759 A1 29-09-2022</b>	
		<b>WO 2016179257 A2 10-11-2016</b>	
-----			

10

20

30

40

50

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)
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	4 H 0 4 5
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
C 1 2 P 21/08 (2006.01)	C 1 2 P 21/08	
C 1 2 N 15/113 (2010.01)	C 1 2 N 15/113	Z
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	D
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 K 31/7088 (2006.01)	A 6 1 K 47/68	
A 6 1 K 31/713 (2006.01)	A 6 1 K 31/7088	
A 6 1 P 9/10 (2006.01)	A 6 1 K 31/713	
A 6 1 P 21/00 (2006.01)	A 6 1 P 9/10	1 0 1
A 6 1 P 21/02 (2006.01)	A 6 1 P 21/00	
A 6 1 P 9/00 (2006.01)	A 6 1 P 21/02	
A 6 1 P 39/02 (2006.01)	A 6 1 P 9/00	
A 6 1 P 1/16 (2006.01)	A 6 1 P 39/02	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 1/16	
A 6 1 P 37/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 P 37/02	

,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,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,VN,W  
S,ZA,ZM,ZW

- (74)代理人 230113332  
弁護士 山本 健策
- (72)発明者 ダルキリッチ - リドル , アイシン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , ビニー ストリート 2 2 5
- (72)発明者 スミス , ベンジャミン エー .  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , ビニー ストリート 2 2 5
- (72)発明者 ハンプ , カール ジェイ . エム .  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , ビニー ストリート 2 2 5
- (72)発明者 チャン , ファン  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , ビニー ストリート 2 2 5
- (72)発明者 ペピンスキー , アール . ブレイク  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , ビニー ストリート 2 2 5
- (72)発明者 キャメロン , トーマス オー .  
アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 1 4 2 , ケンブリッジ , ビニー ストリート 2 2 5

F ターム (参考) 4B064 AG27 CA19 CC24 DA01  
4B065 AA01X AA57X AA72X AA87X AA92Y AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25  
CA44  
4C076 AA95 CC01 CC07 CC11 CC16 CC27 EE41 EE59 FF68  
4C085 AA13 BB11 BB41 CC01 CC08 CC21 DD23 DD31 DD62 EE01  
4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA13 ZA02 ZA36 ZA45 ZA75  
ZA94 ZB07 ZB26 ZC37  
4H045 AA11 AA30 BA54 DA76 EA20 FA74