(19)日本国特許庁(JP)　(12)公表特許公報(A)　(11)公表番号
特表2025-519057
(P2025-519057A)
(43)公表日　令和7年6月24日(2025.6.24)

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C07K 16/46 (2006.01)		C07K	16/46	ZNA	4B064
C07K 16/28 (2006.01)		C07K	16/28		4B065
C12N 15/13 (2006.01)		C12N	15/13		4C084
C12N 15/62 (2006.01)		C12N	15/62	Z	4C085
C12N 15/63 (2006.01)		C12N	15/63	Z	4H045

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全100頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-568175(P2024-568175)
(86)(22)出願日　令和5年5月17日(2023.5.17)
(85)翻訳文提出日　令和6年12月24日(2024.12.24)
(86)国際出願番号　PCT/US2023/022556
(87)国際公開番号　WO2023/225098
(87)国際公開日　令和5年11月23日(2023.11.23)
(31)優先権主張番号　63/343,441
(32)優先日　令和4年5月18日(2022.5.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(31)優先権主張番号　63/478,625
(32)優先日　令和5年1月5日(2023.1.5)
(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ
最終頁に続く

(71)出願人　597160510
リジェネロン・ファーマシューティカルズ・インコーポレイテッド
ＲＥＧＥＮＥＲＯＮ　ＰＨＡＲＭＡＣＥＵＴＩＣＡＬＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国１０５９１－６７０７ニューヨーク州タリータウン、オールド・ソー・ミル・リバー・ロード７７７番
(74)代理人　100102978
弁理士　清水 初志
(74)代理人　100205707
弁理士　小寺 秀紀
(74)代理人　100160923
弁理士　山口 裕孝
(74)代理人　100119507
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　ＣＤ３８及び４－１ＢＢに結合する多重特異性抗原結合分子、並びにその使用

(57)【要約】
ＣＤ３８は、悪性形質細胞上に発現される。４－１ＢＢは、Ｔ細胞の活性化及び生存に必要な共刺激分子である。例えば、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）×ＣＤ３二重特異性抗体によって提供される「シグナル１」又は抗原提示細胞によって提供される同種応答の存在下で、Ｔ細胞の活性化を増強するために「シグナル２」を提供するために、ＣＤ３８及び４－１ＢＢの両方に結合する新規の多重特異性抗原結合分子（ＭＡＢＭ）が本明細書において提供される。特定の実施形態では、本発明の多重特異性抗原結合分子は、ＣＤ３８を発現する腫瘍の増殖を阻害することができる。本発明の多重特異性抗原結合分子は、上方制御又は誘導されたＣＤ３８標的化免疫反応が望ましい及び／又は治療的に有益である、疾患及び障害の治療に有用である。例えば、本発明の多重特異性抗原結合分子は、多発性骨髄腫、リンパ腫、及び白血病を含む様々ながんの治療に有用である。
【選択図】図１

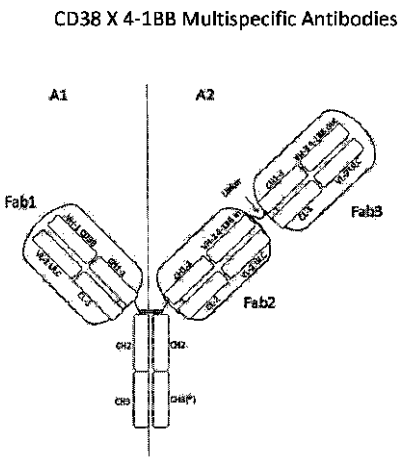


FIGURE 1

【特許請求の範囲】
【請求項１】
（ａ）重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）の３つの相補性決定領域（ＣＤＲ）及びＬＣＶＲの３つのＣＤＲ
を含む第１の抗原結合アームであって、
前記第１の抗原結合アームが、ＣＤ３８に特異的に結合する、
第１の抗原結合アーム、並びに
（ｂ）ＨＣＶＲ（Ｒ１－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ及びＬＣＶＲ（Ｒ１－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、ＨＣＶＲ（Ｒ２－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ及びＬＣＶＲ（Ｒ２－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む第２の抗原結合アームであって、
前記第２の抗原結合アームが、４－１ＢＢに特異的に結合する、
第２の抗原結合アーム
を含む、二重特異性抗原結合分子。
【請求項２】
Ｒ１及びＲ２が、４－１ＢＢ上の同じエピトープに結合する、請求項１に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３】
Ｒ１及びＲ２が、４－１ＢＢ上の異なるエピトープに結合する、請求項１に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４】
Ｒ１及びＲ２が、ペプチドリンカーを介して接続されている、請求項１～３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項５】
前記ペプチドリンカーが、（ＧＧＧＧＳ）ｎのペプチド配列を含み、ｎが、１～６である、請求項４に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項６】
前記第１の抗原結合アームが、配列番号２及び４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲの３つのＣＤＲを含む、請求項１～５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項７】
前記第１の抗原結合アームが、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲの３つのＣＤＲを含む、請求項１～６のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項８】
前記第１の抗原結合アームが、
それぞれ、配列番号４－６－８及び４２－４４－４６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３）
を含む、請求項１～７のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項９】
前記第１の抗原結合アームが、
それぞれ、配列番号２０－２２－２４及び５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３）
を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１０】
前記第１の抗原結合アームが、配列番号２及び４０からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲを含む、請求項１～９のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。

【請求項１１】
前記第１の抗原結合アームが、配列番号１８及び４８からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含む、請求項１～１０のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１２】
前記第１の抗原結合アームが、配列番号２及び４０からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲと、配列番号１８及び４８からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲと、を含む、請求項１～１１のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１３】
Ｒ１が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ１－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲを含む、請求項１～１２のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１４】
Ｒ１が、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ１－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲを含む、請求項１～１３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１５】
Ｒ１が、
それぞれ、配列番号１２－１４－１６、３４－３６－３８、６４－６６－６８、７４－７６－７８、８８－９０－９２、及び９６－９８－１００からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの重鎖相補性決定領域（Ｒ１－ＨＣＤＲ１－Ｒ１－ＨＣＤＲ２－Ｒ１－ＨＣＤＲ３）
を含む、請求項１～１４のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１６】
Ｒ１が、
それぞれ、配列番号２０－２２－２４及び５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む３つの軽鎖相補性決定領域（Ｒ１－ＬＣＤＲ１－Ｒ１－ＬＣＤＲ２－Ｒ１－ＬＣＤＲ３）
を含む、請求項１～１５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１７】
Ｒ１が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ１－ＨＣＶＲ）を含む、請求項１～１６のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１８】
Ｒ１が、配列番号１８及び４８からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ１－ＬＣＶＲ）を含む、請求項１～１７のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項１９】
Ｒ１が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲと、配列番号１８及び４８からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲと、を含む、請求項１～１８のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２０】
Ｒ２が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ２－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲを含む、請求項１～１９のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２１】
Ｒ２が、配列番号１８及び４８からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ２－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲを含む、請求項１～２０のいずれか一項に記載の

二重特異性抗原結合分子。
【請求項２２】
Ｒ２が、
それぞれ、配列番号１２－１４－１６、３４－３６－３８、６４－６６－６８、７４－７６－７８、８８－９０－９２、及び９６－９８－１００からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの重鎖相補性決定領域（Ｒ２－ＨＣＤＲ１－Ｒ２－ＨＣＤＲ２－Ｒ２－ＨＣＤＲ３）
を含む、請求項１～２１のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２３】
Ｒ２が、
それぞれ、配列番号２０－２２－２４及び５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む３つの軽鎖相補性決定領域（Ｒ２－ＬＣＤＲ１－Ｒ２－ＬＣＤＲ２－Ｒ２－ＬＣＤＲ３）
を含む、請求項１～２２のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２４】
Ｒ２が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ２－ＨＣＶＲ）を含む、請求項１～２３のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２５】
Ｒ２が、配列番号１８及び４８からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ２－ＬＣＶＲ）を含む、請求項１～２４のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２６】
Ｒ２が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲと、配列番号１８及び４８からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲと、を含む、請求項１～２５のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２７】
（ａ）前記第１の抗原結合アームが、配列番号４０の前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲの３つのＣＤＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲの３つのＣＤＲを含み、
（ｂ）前記第２の抗原結合アームが、
（ｉ）配列番号３２、６２、及び７２からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲの３つのＣＤＲ、並びに配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲの３つのＣＤＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号６２、８６、及び９４からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲの３つのＣＤＲ、並びに配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲの３つのＣＤＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む、
請求項１～２６のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２８】
（ａ）前記第１の抗原結合アームが、それぞれ、配列番号４２－４４－４６－５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３を含み、
（ｂ）前記第２の抗原結合アームが、
（ｉ）それぞれ、配列番号３４－３６－３８－５０－５２－５４、６４－６６－６８－５０－５２－５４、及び７４－７６－７８－５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＤＲ１－Ｒ１－ＨＣＤＲ２－Ｒ１－ＨＣＤＲ３－Ｒ１－ＬＣＤＲ１－Ｒ１－ＬＣＤＲ２－Ｒ１－ＬＣＤＲ３を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、

（ｉｉ）それぞれ、配列番号６４－６６－６８－５０－５２－５４、７４－７６－７８－５０－５２－５４、及び８８－９０－９２－５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＤＲ１－Ｒ２－ＨＣＤＲ２－Ｒ２－ＨＣＤＲ３－Ｒ２－ＬＣＤＲ１－Ｒ２－ＬＣＤＲ２－Ｒ２－ＬＣＤＲ３を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む、
請求項１～２７のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項２９】
（ａ）前記第１の抗原結合アームが、配列番号４０の前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含み、
（ｂ）前記第２の抗原結合アームが、
（ｉ）配列番号３２、６２、及び７２からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲ、並びに配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲを含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号６２、８６、及び９４からなる群から選択される前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲ、並びに配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲを含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む、
請求項１～２８のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３０】
（ａ）前記第１の抗原結合アームが、配列番号４０の前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含み、
（ｂ）前記第２の抗原結合アームが、
（ｉ）配列番号３２の前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲを含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号８６の前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲを含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む、
請求項１～２９のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３１】
（ａ）前記第１の抗原結合アームが、配列番号４０の前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含み、
（ｂ）前記第２の抗原結合アームが、
（ｉ）配列番号７２の前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲを含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号９４の前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲを含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む、
請求項１～２９のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３２】
（ａ）前記第１の抗原結合アームが、配列番号４０の前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含み、
（ｂ）前記第２の抗原結合アームが、
（ｉ）配列番号６２の前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲを含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号６２の前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲを含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む、
請求項１～２９のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３３】

前記分子が、二重特異性抗体である、請求項１～３２のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項３４】
前記二重特異性抗体が、ＩｇＧ１又はＩｇＧ４アイソタイプの重鎖定常領域を含む、請求項３３に記載の二重特異性抗体。
【請求項３５】
前記二重特異性抗体が、前記第１の抗原結合アームの前記ＨＣＶＲを含む第１の重鎖と、前記第２の抗原結合アームのＲ１－ＨＣＶＲ及びＲ２－ＨＣＶＲを含む第２の重鎖と、を含み、前記第２の重鎖が、変異Ｈ４３５Ｒ及びＹ４３６Ｆ（ＥＵ番号付け）を含む、請求項３３又は３４に記載の二重特異性抗体。
【請求項３６】
前記第１の抗原結合アームの前記ＬＣＶＲを含む軽鎖と対になった、前記第１の抗原結合アームの前記ＨＣＶＲを含む第１の重鎖を含み、
前記第１の重鎖が、配列番号５８のアミノ酸配列を含み、
前記軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含む、
請求項３３～３５のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項３７】
Ｒ１－ＬＣＶＲを含む第１の軽鎖及びＲ２－ＬＣＶＲを含む第２の軽鎖と対になった、前記第２の抗原結合アームのＲ１－ＨＣＶＲ及びＲ２－ＨＣＶＲを含む第２の重鎖を含み、
前記第２の重鎖が、配列番号５６、７０、８０、８２、及び８４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
前記第１の軽鎖が、配列番号６０の前記アミノ酸配列を含み、
前記第２の軽鎖が、配列番号６０の前記アミノ酸配列を含む、
請求項３６に記載の二重特異性抗体。
【請求項３８】
（ａ）ヒトＣＤ３８に特異的に結合する前記第１の抗原結合アームが、配列番号５８の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む軽鎖と、を含み、
（ｂ）ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号５６の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第２の軽鎖と、を含む、
請求項３３～３７のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項３９】
（ａ）ヒトＣＤ３８に特異的に結合する前記第１の抗原結合アームが、配列番号５８の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む軽鎖と、を含み、
（ｂ）ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号７０の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第２の軽鎖と、を含む、
請求項３３～３７のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項４０】
（ａ）ヒトＣＤ３８に特異的に結合する前記第１の抗原結合アームが、配列番号５８の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む軽鎖と、を含み、
（ｂ）ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号８０の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第２の軽鎖と、を含む、
請求項３３～３７のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項４１】
（ａ）ヒトＣＤ３８に特異的に結合する前記第１の抗原結合アームが、配列番号５８の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む軽鎖と、を含み、
（ｂ）ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号８２

の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第２の軽鎖と、を含む、
請求項３３～３７のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項４２】
（ａ）ヒトＣＤ３８に特異的に結合する前記第１の抗原結合アームが、配列番号５８の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む軽鎖と、を含み、
（ｂ）ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、配列番号８４の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第２の軽鎖と、を含む、
請求項３３～３７のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。
【請求項４３】
ＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームと、４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アームと、を含む、二重特異性抗原結合分子であって、
（ａ）前記第１の抗原結合アームが、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲの３つのＣＤＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲの３つのＣＤＲを含み、
（ｂ）前記第２の抗原結合アームが、
（ｉ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ１－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ１－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号６２の前記アミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ２－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、及び配列番号４８の前記アミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ２－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む、
二重特異性抗原結合分子。
【請求項４４】
前記分子が、二重特異性抗体である、請求項４３に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４５】
前記二重特異性抗体が、前記第１の抗原結合アームの前記ＨＣＶＲを含む第１の重鎖を含み、前記第１の重鎖が、前記第１の抗原結合アームの前記ＬＣＶＲを含む軽鎖と対であり、前記第１の重鎖が、配列番号５８のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含む、請求項４４に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４６】
前記二重特異性抗体が、前記第２の抗原結合アームのＲ１－ＨＣＶＲ及びＲ２－ＨＣＶＲを含む第２の重鎖を含み、前記第２の重鎖が、Ｒ１－ＬＣＶＲを含む第１の軽鎖及びＲ２－ＬＣＶＲを含む第２の軽鎖と対であり、前記第２の重鎖が、配列番号７０、８２、又は８４のアミノ酸配列を含み、前記第１の軽鎖が、配列番号６０の前記アミノ酸配列を含み、前記第２の軽鎖が、配列番号６０の前記アミノ酸配列を含む、請求項４５に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４７】
（ａ）ヒトＣＤ３８に特異的に結合する前記第１の抗原結合アームが、配列番号５８の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む軽鎖と、を含み、
（ｂ）ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する前記第２の抗原結合アームが、
（ｉ）配列番号７０の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第２の軽鎖と、を含むか、
（ｉｉ）配列番号８２の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第２の軽鎖と、を含むか、又は
（ｉｉｉ）配列番号８４の前記配列を含む重鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の前記配列を含む第２の軽鎖と、を含む、
請求項４３～４６のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子。
【請求項４８】

請求項１～４７のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子と、薬学的に許容される担体と、を含む、医薬組成物。
【請求項４９】
請求項１～４７のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子の前記第１の抗原結合アームのＨＣＶＲをコードする核酸配列を含む、単離核酸分子。
【請求項５０】
請求項１～４７のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子の前記第２の抗原結合アームのＲ１－ＨＣＶＲ及びＲ２－ＨＣＶＲをコードする核酸配列を含む、単離核酸分子。
【請求項５１】
請求項１～４７のいずれか一項に記載の二重特異性抗原結合分子のＬＣＶＲをコードする核酸配列を含む、単離核酸分子。
【請求項５２】
請求項４９～５１のいずれか一項に記載の単離核酸分子を含む、発現ベクター。
【請求項５３】
請求項５２に記載の発現ベクターを含む、宿主細胞。
【請求項５４】
大腸菌（Ｅ．ｃｏｌｉ）又はＣＨＯ細胞である、請求項５３に記載の宿主細胞。
【請求項５５】
多重特異性抗原結合分子を産生する方法であって、
前記方法が、前記多重特異性抗原結合分子の産生を許容する条件下で請求項５３に記載の宿主細胞を増殖させる工程を含み、
前記宿主細胞が、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ１の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む第１の核酸分子と、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む第２の核酸分子と、共通軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む第３の核酸分子と、を含む、
方法。
【請求項５６】
前記宿主細胞が、前記多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ１の重鎖をコードする核酸配列を含む第１の核酸分子と、前記多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の重鎖をコードする第２の核酸分子と、共通軽鎖をコードする核酸配列を含む第３の核酸分子と、を含む、請求項５５に記載の方法。
【請求項５７】
対象における形質細胞腫瘍の増殖を阻害する方法であって、
請求項１～４７のいずれか一項に記載の多重特異性抗原結合分子、又は請求項４８に記載の医薬組成物を、前記対象に投与する工程
を含む、方法。
【請求項５８】
前記形質細胞腫瘍が、多発性骨髄腫である、請求項５７に記載の方法。
【請求項５９】
対象における腫瘍の増殖を阻害する方法であって、
前記方法が、請求項１～４７のいずれか一項に記載の多重特異性抗原結合分子、又は請求項４８に記載の医薬組成物を、前記対象に投与する工程を含み、
前記腫瘍が、多発性骨髄腫、リンパ腫、Ｂ細胞白血病、肝細胞癌、非小細胞肺がん、黒色腫、膵管腺癌、神経膠腫、若しくは乳がん、又はＣＤ３８＋細胞を有することを部分的に特徴とする別のがんからなる群から選択される、
方法。
【請求項６０】
ＢＣＭＡ発現Ｂ細胞悪性腫瘍に罹患している患者を治療する方法であって、
請求項１～４７のいずれか一項に記載の多重特異性抗原結合分子、又は請求項４８に記

載の医薬組成物を、前記対象に投与する工程
を含む、方法。
【請求項６１】
前記ＢＣＭＡ発現Ｂ細胞悪性腫瘍が、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、多発性骨髄腫、及びホジキンリンパ腫からなる群から選択される、請求項６０に記載の方法。
【請求項６２】
第２の治療剤又は治療レジメンを与える工程を更に含む、請求項５７～６１のいずれか一項に記載の方法。
【請求項６３】
前記第２の治療剤が、形質細胞腫瘍に結合する抗体である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６４】
前記第２の治療剤が、抗ＢＣＭＡ／抗ＣＤ３二重特異性抗原結合分子である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６５】
前記第２の治療剤が、抗ＣＤ２０／抗ＣＤ３二重特異性抗原結合分子である、請求項６２に記載の方法。
【請求項６６】
前記第２の治療剤が、ＣＤ２８のアゴニスト又は４－１ＢＢのアゴニストである、請求項６２に記載の方法。
【請求項６７】
前記第２の治療剤又は治療レジメンが、化学療法薬、ＤＮＡアルキル化剤、免疫調節薬、プロテアソーム阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、放射線療法、幹細胞移植、異なる腫瘍細胞表面抗原及びＴ細胞若しくは免疫細胞抗原と相互作用する異なる二重特異性抗体、抗体薬物コンジュゲート、抗腫瘍剤にコンジュゲートされた二重特異性抗体、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、ＣＴＬＡ－４チェックポイント阻害剤、ＣＤ２８アゴニスト、４－１ＢＢアゴニスト、抗ＢＣＭＡ／抗ＣＤ３二重特異性抗原結合分子、抗ＣＤ２０／抗ＣＤ３二重特異性抗原結合分子、がんワクチン、腫瘍溶解性ウイルス、イムノサイトカイン、ＣＤ２２阻害剤、ＩＬ４阻害剤、ＩＬ６阻害剤、キメラ抗原受容体を含むＴ細胞（ＣＡＲ－Ｔ細胞）、又はそれらの組み合わせを含む、請求項６２に記載の方法。
【請求項６８】
ＣＤ３８＋腫瘍及び／又はＢＣＭＡ発現腫瘍に罹患している患者を治療する方法であって、
請求項１～４７のいずれか一項に記載の多重特異性抗原結合分子、又は請求項４８に記載の医薬組成物を、ＰＤ－１阻害剤と組み合わせて前記対象に投与する工程
を含む、方法。
【請求項６９】
前記ＰＤ－１阻害剤が、抗ＰＤ－１抗体若しくはその抗原結合断片、又は抗ＰＤ－Ｌ１抗体若しくはその抗原結合断片である、請求項６８に記載の方法。
【請求項７０】
前記抗ＰＤ－１阻害剤が、セミプリマブ、ニボルマブ、ペムブロリズマブ、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、及びアベルマブから選択される、請求項６９に記載の方法。
【請求項７１】
前記抗ＰＤ－１阻害剤が、セミプリマブである、請求項６９に記載の方法。
【請求項７２】
ＣＤ３８、ＣＤ２０、及び／又はＢＣＭＡの発現に関連する疾患又は障害の治療における、請求項１～４７のいずれか一項に記載の多重特異性抗原結合分子、又は請求項４８に記載の医薬組成物の使用。

【請求項７３】
前記疾患又は障害が、がんである、請求項７２に記載の使用。
【請求項７４】
前記がんが、多発性骨髄腫、リンパ腫、Ｂ細胞白血病、肝細胞癌、非小細胞肺がん、黒色腫、膵管腺癌、神経膠腫、若しくは乳がん、又はＣＤ３８＋細胞を有することを部分的に特徴とする別のがんである、請求項７３に記載の使用。
【請求項７５】
前記多重特異性抗原結合分子又は医薬組成物が、抗ＰＤ－１抗体又はその抗原結合断片と組み合わせて使用するためのものである、請求項７２～７４のいずれか一項に記載の使用。
【請求項７６】
前記多重特異性抗原結合分子又は医薬組成物が、静脈内、筋肉内、又は皮下に注射される、請求項７２に記載の使用。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
発明の分野
本発明は、ＣＤ３８及び４－１ＢＢに特異的である多重特異性抗原結合分子、並びにその使用方法に関する。
【０００２】
配列表
配列表の正式なコピーは、Ｐａｔｅｎｔ　Ｃｅｎｔｅｒを介して本明細書と同時に電子的に提出される。電子配列表（１０９２７ＷＯ０１＿Ｓｅｑｕｅｎｃｅ＿Ｌｉｓｔｉｎｇ＿ＳＴ２６．ｘｍｌ、サイズ：１５１，５５２バイト、及び作成日：２０２３年５月１７日）の内容は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。
【背景技術】
【０００３】
背景
多発性骨髄腫（ＭＭ）は、非ホジキンリンパ腫に次いで２番目に多い血液がんであり、米国での有病率は約１２０，０００人、並びに毎年約３０，０００の新規症例及び１３，０００人の死亡者がいる。ＭＭは、制御されない様式でサイトカインを分泌する悪性形質細胞のクローン性増殖を特徴とする。サイトカイン、特にＩＬ－６の産生は、骨髄腫に関連する多くの症状の原因となる局所的な臓器及び組織の損傷を引き起こす。ＭＭ患者は、骨痛及び骨粗しょう症、貧血、腎機能障害及び腎不全、細菌感染、並びに神経学的障害を患う。ＭＭは、平均余命が４～５年で、めったに治癒しない。ＭＭの治療は進歩しているが、新しい治療法は若い患者に不相応に利益をもたらしてきている。再発性ＭＭ患者の予後は不良であり、新しい治療アプローチが緊急に必要である。
【０００４】
環状ＡＤＰリボースヒドロラーゼとしても知られるＣＤ３８は、胸腺細胞、一部の活性化末梢血Ｔ細胞及びＢ細胞、形質細胞、及び樹状細胞上に発現される４５ＫＤａ表面糖タンパク質である。ＣＤ３８は、細胞外ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（ＮＡＤ$^{+}$）及び細胞質ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸（ＮＡＤＰ）の代謝に関与する外部酵素として機能し（Ｈｏｗａｒｄ，ｅｔ　ａｌ．Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ　ａｎｄ　ｈｙｄｒｏｌｙｓｉｓ　ｏｆ　ｃｙｃｌｉｃ　ＡＤＰ－ｒｉｂｏｓｅ　ｃａｔａｌｙｚｅｄ　ｂｙ　ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ　ａｎｔｉｇｅｎ　ＣＤ３８．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９３）２６２：１０５６－９（非特許文献1））、環状アデノシン二リン酸（ＡＤＰ）リボース、ＡＤＰリボース（ＡＤＰＲ）、及びニコチン酸アデニンジヌクレオチドリン酸などのＣａ$^{2+}$動員化合物の産生をもたらす。カルシウム調節は、リンパ球増殖、膵臓によるインスリン放出、心筋収縮、好中球走化性及びＴ細胞活性化を含む、幅広い生理学的機能を制御するシグナル伝達経路の活性化をもたらす。ＣＤ３８酵素活性は、ＮＡＤ$^{+}$レベルを調

節し、プロテアソーム阻害剤の機能を改善する（Ｃａｇｎｅｔｔａ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ＮＡＤ（＋）ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｂｏｒｔｅｚｏｍｉｂ－ｉｎｄｕｃｅｄ ａｎｔｉ－ｍｙｅｌｏｍａ ａｃｔｉｖｉｔｙ．Ｂｌｏｏｄ（２０１３）１２２：１２４３－５５（非特許文献2））。更に、ＡＤＰＲは、ＣＤ２０３ａ／ＰＣ－１及びＣＤ７３によって代謝されて、免疫抑制分子アデノシン（ＡＤＯ）を生成し、免疫系の制御から腫瘍細胞が逃れることを促進することができる（Ｃｈｉｌｌｅｍｉ ｅｔ ａｌ．Ｒｏｌｅｓ ａｎｄ ｍｏｄａｌｉｔｉｅｓ ｏｆ ｅｃｔｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄａｓｅｓ ｉｎ ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ ｔｈｅ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｍｙｅｌｏｍａ ｎｉｃｈｅ．Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０１７）８：３０５（非特許文献3））。ＣＤ３８は、Ｂ型慢性白血病／小リンパ球性リンパ腫の増殖能に寄与するようであり、骨髄中の悪性形質細胞は、高く均一なレベルのＣＤ３８を発現する。抗ＣＤ３８モノクローナル抗体は、骨髄系由来抑制細胞、制御性Ｔ細胞、及び制御性Ｂ細胞などのＣＤ３８＋免疫抑制細胞を枯渇させ、免疫エフェクター細胞の抗腫瘍活性の増加をもたらすと考えられる。抗ＣＤ３８抗原結合分子であるダラツムマブは、従来の治療に抵抗性の多発性骨髄腫患者に承認されている。

【０００５】

Ｔ細胞の活性化は、ＴＮＦ受容体スーパーファミリーを介した共刺激を伴い、生存、エフェクター機能の獲得、及びメモリー分化の鍵となる。ＣＤ１３７としても知られる４－１ＢＢ（Ｔｎｆｒｓｆ９）は、表面糖タンパク質ＴＮＦ受容体スーパーファミリーのメンバーである。受容体の発現は、ＴＣＲを介したプライミング後のリンパ球の活性化によって誘導されるが、そのレベルは、ＣＤ２８共刺激によって増強され得る。ＣＤ８$^{+}$Ｔ細胞上のリガンド又はアゴニスト性モノクローナル抗体への曝露は、４－１ＢＢを共刺激し、Ｔ細胞のクローン性増殖、生存、及び発達に寄与し、末梢単球に増殖を誘発し、ＮＦ－ｋａｐｐａＢを活性化し、ＴＣＲ／ＣＤ３によって誘発されたＴ細胞アポトーシスを増強し、Ｔｈ１細胞応答を促進するためのＣＤ２８共刺激の活性化、メモリー生成、及び調節を誘発する。完全ヒトＩｇＧ４モノクローナル抗体であるウレルマブ（ＢＭＳ－６６３５１３）は、臨床試験に入る最初の抗４－１ＢＢ治療薬であった。抗体に関連する肝毒性が明らかになったときに臨床開発は停止した。ウトミルマブ（ＰＦ－０５０８２５６６）は、内因性４－１ＢＢを活性化するが、一方で、内因性４－１ＢＢＬへの結合を遮断する、ヒト化ＩｇＧ２モノクローナル抗体である。したがって、がんを治療するための代替的なアプローチに対する当該技術分野のニーズが存在する。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【０００６】

【非特許文献１】Ｈｏｗａｒｄ，ｅｔ ａｌ．Ｆｏｒｍａｔｉｏｎ ａｎｄ ｈｙｄｒｏｌｙｓｉｓ ｏｆ ｃｙｃｌｉｃ ＡＤＰ－ｒｉｂｏｓｅ ｃａｔａｌｙｚｅｄ ｂｙ ｌｙｍｐｈｏｃｙｔｅ ａｎｔｉｇｅｎ ＣＤ３８．Ｓｃｉｅｎｃｅ（１９９３）２６２：１０５６－９

【非特許文献２】Ｃａｇｎｅｔｔａ，ｅｔ ａｌ．Ｉｎｔｒａｃｅｌｌｕｌａｒ ＮＡＤ（＋）ｄｅｐｌｅｔｉｏｎ ｅｎｈａｎｃｅｓ ｂｏｒｔｅｚｏｍｉｂ－ｉｎｄｕｃｅｄ ａｎｔｉ－ｍｙｅｌｏｍａ ａｃｔｉｖｉｔｙ．Ｂｌｏｏｄ（２０１３）１２２：１２４３－５５

【非特許文献３】Ｃｈｉｌｌｅｍｉ ｅｔ ａｌ．Ｒｏｌｅｓ ａｎｄ ｍｏｄａｌｉｔｉｅｓ ｏｆ ｅｃｔｏｎｕｃｌｅｏｔｉｄａｓｅｓ ｉｎ ｒｅｍｏｄｅｌｉｎｇ ｔｈｅ ｍｕｌｔｉｐｌｅ ｍｙｅｌｏｍａ ｎｉｃｈｅ．Ｆｒｏｎｔ Ｉｍｍｕｎｏｌ．（２０１７）８：３０５

【発明の概要】

【０００７】

本発明は、部分的には、ＣＤ３８及び４－１ＢＢに結合する多重特異性抗原結合分子、並びにがんを含む様々な疾患の治療におけるそれらの使用に関する。

【０００８】
多重特異性抗原結合分子は、単独で、又はＣＤ３８を発現するがんを治療するための他の薬剤と組み合わせて使用され得る。
【０００９】
本明細書に提供される多重特異性抗原結合分子は、２つの抗原結合アーム、Ａ１及びＡ２を含む。Ａ１アームは、ＣＤ３８に特異的に結合する。Ａ２アームは、第１の抗原結合ドメイン（Ｒ１）及び第２の抗原結合ドメイン（Ｒ２）を含み、Ａ２は、４－１ＢＢに特異的に結合する。Ｒ１は、リンカーを介してＲ２に連結され、Ａ２アーム上に積層抗原結合ドメインを形成する。Ａ１アームと、積層Ａ２アームとの組み合わせは、１＋２フォーマットと呼ばれる。Ａ２の抗原結合ドメインは、Ｆａｂ中に含まれ得る。図１を参照のこと。いくつかの態様では、Ｒ１及びＲ２は、異なる４－１ＢＢエピトープに結合する。いくつかの態様では、Ｒ１及びＲ２は、同一の４－１ＢＢエピトープに結合する。いくつかの態様では、Ｒ１及びＲ２重鎖可変領域のアミノ酸配列は、同一又は実質的に同様であり、すなわち、重鎖可変領域若しくは重鎖相補性決定領域における５未満、若しくは４未満、若しくは３未満のアミノ酸の差異、又は重鎖可変領域若しくは重鎖相補性決定領域における２アミノ酸若しくは１アミノ酸の差異である。いくつかの態様では、Ｒ１及びＲ２重鎖可変領域は、異なっており、すなわち、異なる抗原結合配列を有する。いくつかの実施形態では、Ｒ１は、第１のＦａｂ（Ｆａｂ２）に含まれ、Ｒ２は、第２のＦａｂ（Ｆａｂ３）に含まれる。抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２構築物のＦａｂ２及びＦａｂ３は、ＶＨ－２　４－１ＢＢ「イン」Ｆａｂ２のＮ末端からＣＨ１－３「アウト」Ｆａｂ３のＣ末端へのリンカーを介して接続される。
【００１０】
抗ＣＤ３８及び抗４－１ＢＢ抗原結合ドメインを含む多重特異性抗原結合分子
本開示は、ＣＤ３８及び４－１ＢＢに結合する多重特異性抗原結合分子を提供する。そのような多重特異性抗原結合分子はまた、本明細書では、「抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子」とも称される。ＣＤ３８抗原結合アームＡ１は、１つの抗原結合ドメインを含む。４－１ＢＢ抗原結合アームＡ２は、２つの抗原結合ドメイン、Ｒ１及びＲ２を含む。Ｒ１は、本明細書では４－１ＢＢ「イン」結合ドメインと称され、Ｒ２は、本明細書では４－１ＢＢ「アウト」ドメインと称される。積層抗原結合ドメインを有する多重特異性抗原結合分子は、本明細書では、抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子、又は抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子などと呼ばれる。
【００１１】
抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ多重特異性分子の抗ＣＤ３８部分は、ＣＤ３８を発現する腫瘍細胞（例えば、形質細胞）を標的化するのに有用であり、多重特異性分子の抗４－１ＢＢ部分は、同族ＭＨＣペプチド又は腫瘍標的化ＣＤ３多重特異性抗原結合分子によって活性化されたＴ細胞の共刺激を提供するのに有用である。腫瘍細胞上のＣＤ３８とＴ細胞上の４－１ＢＢとの同時結合は、活性化されたＴ細胞による標的化腫瘍細胞の直接的な殺傷（細胞溶解）を促進する。したがって、本明細書に提供される抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ１＋２多重特異性分子は、特に、ＣＤ３８発現腫瘍（例えば、リンパ腫、白血病、多発性骨髄腫、肝細胞癌、非小細胞肺がん、黒色腫、膵管腺癌、神経膠腫、又は乳がん）に関連するか、又はそれによって引き起こされる疾患及び障害を治療するのに有用である。
【００１２】
本明細書で提供される多重特異性抗原結合分子は、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する抗原結合ドメインを含む第１の抗原結合アームＡ１と、４－１ＢＢに特異的に結合する２つの抗原結合ドメインＲ１及びＲ２を含む第２の抗原結合アームＡ２と、を含む。本開示は、抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性分子（例えば、多重特異性抗原結合分子）を含み、各抗原結合ドメインは、軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）と対になった重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）を含む。本発明の特定の例示的な実施形態では、抗ＣＤ３８抗原結合ドメイン及び抗４－１ＢＢ抗原結合ドメインは、各々、共通ＬＣＶＲ又はユニバーサルＬＣＶＲ

と対になった、異なる別個のＨＣＶＲを含む。例えば、本明細書の実施例４に例示されるように、
ＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合ドメインであって、
前記第１の抗原結合ドメインが、抗ＣＤ３８抗原結合分子に由来するＨＣＶＲを含む、
第１の抗原結合ドメインと、
４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合ドメイン（Ｒ１）及び第３の抗原結合ドメイン（Ｒ２）であって、
前記第２の抗原結合ドメイン（Ｒ１）及び第３の抗原結合ドメイン（Ｒ２）が、各々、抗４－１ＢＢ抗原結合分子に由来するＨＣＶＲを含み、
各ＨＣＶＲが、ユニバーサル軽鎖ＬＣＶＲと対になった、
第２の抗原結合ドメイン（Ｒ１）及び第３の抗原結合ドメイン（Ｒ２）と、
を含む、多重特異性抗原結合分子を構築した。そのような実施形態では、第１、第２、及び第３の抗原結合ドメインは、それぞれ、別個の抗ＣＤ３８及び抗４－１ＢＢ　ＨＣＶＲを含むが、共通軽鎖ＬＣＶＲを共有する。

【００１３】

本明細書では、
（ａ）重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ及びＬＣＶＲの３つのＣＤＲ
を含む第１の抗原結合アームであって、
前記第１の抗原結合アームが、ＣＤ３８に特異的に結合する、
第１の抗原結合アーム、並びに
（ｂ）ＨＣＶＲ（Ｒ１－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ及びＬＣＶＲ（Ｒ１－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、ＨＣＶＲ（Ｒ２－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ及びＬＣＶＲ（Ｒ２－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と
を含む第２の抗原結合アームであって、
前記第２の抗原結合アームが、４－１ＢＢに特異的に結合する、
第２の抗原結合アーム、
を含む、二重特異性抗原結合分子が提供される。

【００１４】

いくつかの態様では、Ｒ１及びＲ２は、４－１ＢＢ上の同じエピトープに結合する。いくつかの態様では、Ｒ１及びＲ２は、４－１ＢＢ上の異なるエピトープに結合する。

【００１５】

いくつかの態様では、Ｒ１及びＲ２は、ペプチドリンカーを介して接続される。例示的なペプチドリンカーは、（ＧＧＧＧＳ）ｎのペプチド配列を含み、ｎは、１～６である。

【００１６】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子が、第１の抗原結合アームを含み、前記第１の抗原結合アームが、配列番号２及び４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲの３つのＣＤＲを含む。

【００１７】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子が、第１の抗原結合アームを含み、前記第１の抗原結合アームが、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲの３つのＣＤＲを含む。

【００１８】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子が、第１の抗原結合アームを含み、前記第１の抗原結合アームが、
それぞれ、配列番号４－６－８及び４２－４４－４６からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３）
を含む。

【００１９】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子が、第１の抗原結合アームを含み、前記第１の抗原結合アームが、
それぞれ、配列番号２０－２２－２４及び５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの軽鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２－ＬＣＤＲ３）
を含む。
【００２０】
いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子が、第１の抗原結合アームを含み、前記第１の抗原結合アームが、配列番号２及び４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲを含む。
【００２１】
いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子が、第１の抗原結合アームを含み、前記第１の抗原結合アームが、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含む。
【００２２】
いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子が、第１の抗原結合アームを含み、前記第１の抗原結合アームが、配列番号２及び４０からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲと、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲと、を含む。
【００２３】
いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、第１の抗原結合アームを含み、第２の抗原結合アームは、第１の抗原結合領域（Ｒ１）及び第２の抗原結合領域（Ｒ２）を含む。
【００２４】
いくつかの態様では、Ｒ１が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ１－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲを含む。
【００２５】
いくつかの態様では、Ｒ１が、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ１－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲを含む。
【００２６】
いくつかの実施形態では、Ｒ１が、
それぞれ、配列番号１２－１４－１６、３４－３６－３８、６４－６６－６８、７４－７６－７８、８８－９０－９２、及び９６－９８－１００からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの重鎖相補性決定領域（Ｒ１－ＨＣＤＲ１－Ｒ１－ＨＣＤＲ２－Ｒ１－ＨＣＤＲ３）
を含む。
【００２７】
いくつかの実施形態では、Ｒ１が、
それぞれ、配列番号２０－２２－２４、及び５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの軽鎖相補性決定領域（Ｒ１－ＬＣＤＲ１－Ｒ１－ＬＣＤＲ２－Ｒ１－ＬＣＤＲ３）
を含む。
【００２８】
いくつかの態様では、Ｒ１が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ１－ＨＣＶＲ）を含む。
【００２９】
いくつかの態様では、Ｒ１が、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ１－ＬＣＶＲ）を含む。
【００３０】

いくつかの態様では、Ｒ１が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲと、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲと、を含む。

【００３１】

いくつかの態様では、Ｒ２が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ２－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲを含む。

【００３２】

いくつかの態様では、Ｒ２が、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ２－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲを含む。

【００３３】

いくつかの実施形態では、Ｒ２が、

それぞれ、配列番号１２－１４－１６、３４－３６－３８、６４－６６－６８、７４－７６－７８、８８－９０－９２、及び９６－９８－１００からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの重鎖相補性決定領域（Ｒ２－ＨＣＤＲ１－Ｒ２－ＨＣＤＲ２－Ｒ２－ＨＣＤＲ３）

を含む。

【００３４】

いくつかの実施形態では、Ｒ２が、

それぞれ、配列番号２０－２２－２４、及び５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、３つの軽鎖相補性決定領域（Ｒ２－ＬＣＤＲ１－Ｒ２－ＬＣＤＲ２－Ｒ２－ＬＣＤＲ３）

を含む。

【００３５】

いくつかの態様では、Ｒ２が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ２－ＨＣＶＲ）を含む。

【００３６】

いくつかの態様では、Ｒ２が、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ２－ＬＣＶＲ）を含む。

【００３７】

いくつかの態様では、Ｒ２が、配列番号１０、３２、６２、７２、８６、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲと、配列番号１８及び４８からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲと、を含む。

【００３８】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、

（ａ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲの３つのＣＤＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲの３つのＣＤＲ、を含む、第１の抗原結合アームと、

（ｂ）第２の抗原結合アームであって、

（ｉ）配列番号３２、６２、及び７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲの３つのＣＤＲ、並びに配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲの３つのＣＤＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、

（ｉｉ）配列番号６２、８４、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲの３つのＣＤＲ、並びに配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲの３つのＣＤＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と、

を含む、第２の抗原結合アームと、

を含む。

【００３９】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、

（ａ）それぞれ、配列番号４２－４４－４６－５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３－ＬＣＤＲ１－ＬＣＤＲ２

－ＬＣＤＲ３を含む、第１の抗原結合アームと、
（ｂ）第２の抗原結合アームであって、
（ｉ）それぞれ、配列番号３４－３６－３８－５０－５２－５４、６４－６６－６８－５０－５２－５４、及び７４－７６－７８－５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＤＲ１－Ｒ１－ＨＣＤＲ２－Ｒ１－ＨＣＤＲ３－Ｒ１－ＬＣＤＲ１－Ｒ１－ＬＣＤＲ２－Ｒ１－ＬＣＤＲ３
を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）それぞれ、配列番号６４－６６－６８－５０－５２－５４、７４－７６－７８－５０－５２－５４、及び８８－９０－９２－５０－５２－５４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＤＲ１－Ｒ２－ＨＣＤＲ２－Ｒ２－ＨＣＤＲ３－Ｒ２－ＬＣＤＲ１－Ｒ２－ＬＣＤＲ２－Ｒ２－ＬＣＤＲ３
を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と、
を含む、第２の抗原結合アームと、
を含む。

【００４０】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、
（ａ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含む、第１の抗原結合アームと、
（ｂ）第２の抗原結合アームであって、
（ｉ）配列番号３２、６２、及び７２からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲ、並びに配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号６２、８６、及び９４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲ、並びに配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と、
を含む、第２の抗原結合アームと、
を含む。

【００４１】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、
（ａ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含む、第１の抗原結合アームと、
（ｂ）第２の抗原結合アームであって、
（ｉ）配列番号３２のアミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲ、並びに配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号８６のアミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲ、並びに配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と、
を含む、第２の抗原結合アームと、
を含む。

【００４２】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、
（ａ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含む、第１の抗原結合アームと、
（ｂ）第２の抗原結合アームであって、
（ｉ）配列番号７２のアミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号９４のアミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と、
を含む、第２の抗原結合アームと、
を含む。

【００４３】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、
（ａ）配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲを含む、第１の抗原結合アームと、
（ｂ）第２の抗原結合アームであって、
（ｉ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＲ１－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ１－ＬＣＶＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＲ２－ＨＣＶＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＲ２－ＬＣＶＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と、
を含む、第２の抗原結合アームと、
を含む。

【００４４】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、二重特異性抗体である。

【００４５】

いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、ＩｇＧ１又はＩｇＧ４アイソタイプの重鎖定常領域を含む二重特異性抗体である。

【００４６】

いくつかの態様では、二重特異性抗体が、第１の抗原結合アームのＨＣＶＲを含む第１の重鎖と、第２の抗原結合アームのＲ１－ＨＣＶＲ及びＲ２－ＨＣＶＲを含む第２の重鎖と、を含み、前記第２の重鎖が、変異Ｈ４３５Ｒ及びＹ４３６Ｆ（ＥＵ番号付け）を含む。

【００４７】

いくつかの態様では、二重特異性抗体が、第１の抗原結合アームのＬＣＶＲを含む軽鎖と対になった、第１の抗原結合アームのＨＣＶＲを含む第１の重鎖を含み、前記第１の重鎖が、配列番号５８のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含む。

【００４８】

いくつかの態様では、二重特異性抗体が、
Ｒ１－ＬＣＶＲを含む第１の軽鎖及びＲ２－ＬＣＶＲを含む第２の軽鎖と対になった、第２の抗原結合アームのＲ１－ＨＣＶＲ及びＲ２－ＨＣＶＲを含む第２の重鎖
を含み、
前記第２の重鎖が、配列番号５６、７０、８０、８２、及び８４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、
前記第１の軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含み、第２の軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含む。

【００４９】

いくつかの態様では、二重特異性抗体は、
（ａ）配列番号５８の配列を含む重鎖、及び配列番号６０の配列を含む軽鎖
を含む、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームと、
（ｂ）配列番号５６の配列を含む重鎖、配列番号６０の配列を含む第１の軽鎖、及び配列番号６０の配列を含む第２の軽鎖
を含む、ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アームと、
を含む。

【００５０】

いくつかの態様では、二重特異性抗体は、
（ａ）配列番号５８の配列を含む重鎖、及び配列番号６０の配列を含む軽鎖
を含む、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームと、
（ｂ）配列番号７０の配列を含む重鎖、配列番号６０の配列を含む第１の軽鎖、及び配列番号６０の配列を含む第２の軽鎖
を含む、ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アームと、
を含む。

【００５１】
いくつかの態様では、二重特異性抗体は、
（ａ）配列番号５８の配列を含む重鎖、及び配列番号６０の配列を含む軽鎖
を含む、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームと、
（ｂ）配列番号８０の配列を含む重鎖、配列番号６０の配列を含む第１の軽鎖、及び配列番号６０の配列を含む第２の軽鎖
を含む、ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アームと、
を含む。
【００５２】
いくつかの態様では、二重特異性抗体は、
（ａ）配列番号５８の配列を含む重鎖、及び配列番号６０の配列を含む軽鎖
を含む、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームと、
（ｂ）配列番号８２の配列を含む重鎖、配列番号６０の配列を含む第１の軽鎖、及び配列番号６０の配列を含む第２の軽鎖
を含む、ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アームと、
を含む。
【００５３】
いくつかの態様では、二重特異性抗体は、
（ａ）配列番号５８の配列を含む重鎖、及び配列番号６０の配列を含む軽鎖
を含む、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームと、
（ｂ）配列番号８４の配列を含む重鎖、配列番号６０の配列を含む第１の軽鎖、及び配列番号６０の配列を含む第２の軽鎖
を含む、ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アームと、
を含む。
【００５４】
本明細書では、ＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームと、４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アームと、を含む、二重特異性抗原結合分子であって、
（ａ）第１の抗原結合アームが、配列番号４０のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲの３つのＣＤＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲの３つのＣＤＲを含み、
（ｂ）第２の抗原結合アームが、
（ｉ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ１－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ１－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、を含む、第１の抗原結合領域（Ｒ１）と、
（ｉｉ）配列番号６２のアミノ酸配列を含むＨＣＶＲ（Ｒ２－ＨＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、及び配列番号４８のアミノ酸配列を含むＬＣＶＲ（Ｒ２－ＬＣＶＲ）の３つのＣＤＲ、を含む、第２の抗原結合領域（Ｒ２）と、
を含む、
二重特異性抗原結合分子が提供される。
【００５５】
いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、二重特異性抗体である。
【００５６】
いくつかの態様では、二重特異性抗体が、第１の抗原結合アームのＨＣＶＲを含む第１の重鎖を含み、前記第１の重鎖が、第１の抗原結合アームのＬＣＶＲを含む軽鎖と対であり、前記第１の重鎖が、配列番号５８のアミノ酸配列を含み、前記軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含む。いくつかの態様では、二重特異性抗体が、第２の抗原結合アームのＲ１－ＨＣＶＲ及びＲ２－ＨＣＶＲを含む第２の重鎖を含み、前記第２の重鎖が、Ｒ１－ＬＣＶＲを含む第１の軽鎖及びＲ２－ＬＣＶＲを含む第２の軽鎖と対であり、前記第２の重鎖が、配列番号７０、８２、又は８４のアミノ酸配列を含み、前記第１の軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含み、前記第２の軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含む。

【００５７】
いくつかの態様では、二重特異性抗原結合分子は、
（ａ）配列番号５８の配列を含む重鎖、及び配列番号６０の配列を含む軽鎖、を含む、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームと、
（ｂ）ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アームであって、
（ｉ）配列番号７０の配列を含む重鎖と、配列番号６０の配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の配列を含む第２の軽鎖と、を含むか、
（ｉｉ）配列番号８２の配列を含む重鎖と、配列番号６０の配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の配列を含む第２の軽鎖と、を含むか、又は
（ｉｉｉ）配列番号８４の配列を含む重鎖と、配列番号６０の配列を含む第１の軽鎖と、配列番号６０の配列を含む第２の軽鎖と、を含む、
第２の抗原結合アームと、
を含む。
【００５８】
いくつかの実施形態では、多重特異性抗原結合分子が、骨髄腫細胞、白血病細胞、リンパ腫細胞、肝細胞癌細胞、非小細胞肺がん細胞、黒色腫細胞、膵管腺癌細胞、神経膠腫細胞、又は乳がん細胞からなる群から選択されるＣＤ３８＋腫瘍細胞の増殖を阻害する。
【００５９】
別の態様では、多重特異性抗原結合分子と、薬学的に許容される担体又は希釈剤とを含む、医薬組成物が提供される。関連の態様では、本発明は、抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子と第２の治療剤との組み合わせである組成物を特徴とする。一実施形態では、第２の治療剤は、抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子と有利に組み合わせられる任意の薬剤である。
【００６０】
別の態様では、Ａ１又はＡ２のうちのいずれか１つをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子が提供される。いくつかの態様では、ＨＣＶＲ、ＬＣＶＲ、ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、ＨＣＤＲ３、ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、ＬＣＤＲ３、重鎖、及び／又は軽鎖のうちのいずれか１つをコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子が提供される。いくつかの実施形態では、核酸分子は、表２、４、６、８、又は１０に記載される１つ以上のヌクレオチド配列を含む。核酸配列を含む核酸分子は、その任意の機能的組み合わせ又は配置であってもよい。
【００６１】
いくつかの態様では、本明細書では、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ１の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、Ａ１が、ＣＤ３８に結合し、
（ａ）前記ＨＣＶＲが、
それぞれ、配列番号４２、４４、及び４６のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１－ＨＣＤＲ２－ＨＣＤＲ３）
を含むか、又は
（ｂ）前記ＨＣＶＲが、配列番号４０のアミノ酸配列を含む、
単離核酸分子が提供される。
【００６２】
いくつかの態様では、本明細書では、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ１の重鎖をコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、Ａ１が、ＣＤ３８に結合し、前記重鎖が、配列番号５８のアミノ酸配列を含む、単離核酸分子が提供される。
【００６３】
一部の態様では、本明細書では、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、
Ａ２が、４－１ＢＢに結合する第１の抗原結合ドメイン（Ｒ１）及び４－１ＢＢに結合する第２の抗原結合ドメイン（Ｒ２）を含み、

（ａ）Ｒ１－ＨＣＶＲが、配列番号３４、３６、及び３８のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）を含み、Ｒ２－ＨＣＶＲが、配列番号８８、９０、及び９２のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）を含むか、又は

（ｂ）Ｒ１－ＨＣＶＲが、配列番号３２のアミノ酸配列を含み、Ｒ２－ＨＣＶＲが、配列番号８６のアミノ酸配列を含む、

単離核酸分子が提供される。

【００６４】

本明細書では、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の重鎖をコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、Ａ２が、４－１ＢＢに結合し、前記重鎖が、配列番号５６のアミノ酸配列を含む、単離核酸分子が提供される。

【００６５】

また本明細書では、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の第１の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）及び第２のＨＣＶＲをコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、

Ａ２が、４－１ＢＢに結合し、

（ａ）前記第１のＨＣＶＲが、配列番号６４、６６、及び６８のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）を含み、前記第２のＨＣＶＲが、配列番号６４、６６、及び６８のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）を含むか、又は

（ｂ）前記第１のＨＣＶＲが、配列番号６２のアミノ酸配列を含み、前記第２のＨＣＶＲが、配列番号６２のアミノ酸配列を含む、

単離核酸分子もまた提供される。

【００６６】

また本明細書では、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の重鎖をコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、Ａ２が、４－１ＢＢに結合し、前記重鎖が、配列番号７０、８２、及び８４からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、単離核酸分子が提供される。

【００６７】

本明細書では、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の第１の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）及び第２のＨＣＶＲをコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、

Ａ２が、４－１ＢＢに結合し、

（ａ）前記第１のＨＣＶＲが、配列番号７４、７６、及び７８のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）を含み、前記第２のＨＣＶＲが、配列番号９６、９８、及び１００のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域（ＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）を含むか、又は

（ｂ）前記第１のＨＣＶＲが、配列番号７２のアミノ酸配列を含み、前記第２のＨＣＶＲが、配列番号９４のアミノ酸配列を含む、

単離核酸分子もまた提供される。

【００６８】

本明細書では、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の重鎖をコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、Ａ２が、４－１ＢＢに結合し、前記重鎖が、配列番号８０のアミノ酸配列を含む、単離核酸分子が提供される。

【００６９】

また本明細書では、多重特異性抗原結合分子の軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、

（ａ）前記ＬＣＶＲが、配列番号５０、５２、及び５４のアミノ酸配列を含む３つの重鎖相補性決定領域（ＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）を含むか、又は

（ｂ）前記ＬＣＶＲが、配列番号４８のアミノ酸配列を含む、

単離核酸分子が提供される。

【００７０】

また本明細書では、多重特異性抗原結合分子の軽鎖をコードする核酸配列を含む単離核酸分子であって、前記軽鎖が、配列番号６０のアミノ酸配列を含む、単離核酸分子が提供される。

【００７１】

本明細書では、上記に説明された核酸のうちのいずれか１つの１つ以上の核酸分子を含む発現ベクター又は発現ベクターのセットが提供される。また、本明細書に提供される１つ以上の発現ベクターを含む宿主細胞も提供される。いくつかの態様では、宿主細胞は、哺乳類細胞又は原核細胞である。いくつかの態様では、宿主細胞は、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞又は大腸菌（Ｅｓｃｈｅｒｉｃｈｉａ ｃｏｌｉ（Ｅ．ｃｏｌｉ））細胞である。本明細書に説明される１つ以上の核酸分子を含む組成物が更に提供される。

【００７２】

いくつかの実施形態では、多重特異性抗原結合分子を産生するための方法が提供される。本明細書で提供されるように、方法は、多重特異性抗原結合分子の産生を許容する条件下で宿主細胞を増殖させることを含み、宿主細胞が、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ１の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む核酸分子、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む核酸分子、及び／又は共通軽鎖可変領域（ＬＣＶＲ）をコードする核酸配列を含む核酸分子、を含む。いくつかの態様では、各核酸分子は、同じ発現ベクター中にある。いくつかの態様では、核酸分子のうちの１つ以上は、異なる発現ベクター中にある。いくつかの態様では、宿主細胞が、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ１の重鎖をコードする核酸配列を含む核酸分子、多重特異性抗原結合分子抗原結合アームＡ２の重鎖をコードする核酸分子、及び／又は共通軽鎖をコードする核酸配列を含む核酸分子、を含む。いくつかの態様では、各核酸分子は、同じ発現ベクター中にある。いくつかの態様では、核酸分子のうちの１つ以上は、異なる発現ベクター中にある。

【００７３】

本明細書では、対象において形質細胞腫瘍の増殖を阻害する方法であって、本明細書に説明される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に提供される医薬組成物のうちのいずれか１つ以上を対象に投与することを含む、方法、が提供される。いくつかの態様では、形質細胞腫瘍は、多発性骨髄腫である。

【００７４】

また本明細書では、対象における形質細胞腫瘍の増殖を阻害するための医薬品の製造における、本明細書に説明される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に提供される医薬組成物の使用が提供される。多重特異性抗原結合分子又は医薬組成物が、対象に投与され得る。いくつかの態様では、形質細胞腫瘍は、多発性骨髄腫である。

【００７５】

本明細書では、対象において腫瘍の増殖を阻害する方法であって、本明細書に説明される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に提供される医薬組成物のうちのいずれか１つ以上を対象に投与することを含む、方法、が提供される。いくつかの態様では、腫瘍が、多発性骨髄腫、リンパ腫、Ｂ細胞白血病、肝細胞癌、非小細胞肺がん、黒色腫、膵管腺癌、神経膠腫、若しくは乳がん、又はＣＤ３８＋細胞を有することを部分的に特徴とする別のがんからなる群から選択される。

【００７６】

また本明細書では、対象における腫瘍の増殖を阻害するための医薬品の製造における、本明細書に説明される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に提供される医薬組成物の使用が提供される。多重特異性抗原結合分子又は医薬組成物が、対象に投与され得る。いくつかの態様では、腫瘍が、多発性骨髄腫、リンパ腫、Ｂ細胞白血病、肝細胞癌、非小細胞肺がん、黒色腫、膵管腺癌、神経膠腫、若しくは乳がん、又はＣＤ３８＋細胞を有することを部分的に特徴とする別のがんからなる群から選択される。

【００７７】

本明細書では、本明細書に提供される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に提供される医薬組成物を対象に投与することを含む、多発性骨髄腫、又は別のＢＣＭＡ発現Ｂ細胞悪性腫瘍に罹患している患者を治療する方法が提供される。いくつかの態様では、ＢＣＭＡ発現Ｂ細胞悪性腫瘍が、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、バーキットリンパ腫、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、及びホジキンリンパ腫からなる群から選択される。

【００７８】

また本明細書では、多発性骨髄腫又は別のＢＣＭＡ発現Ｂ細胞悪性腫瘍に罹患している患者を治療するための医薬品の製造における、本明細書に説明される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に提供される医薬組成物の使用が提供される。多重特異性抗原結合分子又は医薬組成物が、対象に投与され得る。

【００７９】

ＣＤ３８＋腫瘍及び／又はＢＣＭＡ発現腫瘍に罹患している患者を治療する方法が本明細書に提供される。方法は、抗ＰＤ－１抗体又はその抗原結合断片と組み合わせて、本明細書に説明される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に説明される医薬組成物を対象に投与することを含む。いくつかの態様では、抗ＰＤ－１抗体又は抗原結合断片は、抗ＰＤ－１抗体、例えば、セミプリマブ（ｂｓＡｂ２８１０）である。

【００８０】

また本明細書では、ＣＤ３８＋腫瘍及び／又はＢＣＭＡ発現腫瘍に罹患している患者を治療するための医薬品の製造における、本明細書に説明される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に提供される医薬組成物の使用が提供される。

【００８１】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される方法又は使用は、第２の治療剤又は治療レジメンを与えることを更に含む。いくつかの態様では、第２の治療剤は、形質細胞腫瘍に結合する抗体である。いくつかの態様では、第２の治療剤は、抗ＢＣＭＡ／抗ＣＤ３二重特異性抗原結合分子である。いくつかの態様では、第２の治療剤は、抗ＣＤ２０／抗ＣＤ３二重特異性抗原結合分子である。いくつかの態様では、第２の治療剤は、抗ＣＤ２８／抗４－１ＢＢ二重特異性抗原結合分子である。いくつかの態様では、第２の治療剤又は治療レジメンが、化学療法薬、ＤＮＡアルキル化剤、免疫調節薬、プロテアソーム阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、放射線療法、幹細胞移植、腫瘍溶解性ウイルス、がんワクチン、イムノサイトカイン、ＣＡＲ－Ｔ細胞、異なる腫瘍細胞表面抗原及びＴ細胞若しくは免疫細胞抗原と相互作用する異なる二重特異性抗体、抗体薬物コンジュゲート、抗腫瘍剤にコンジュゲートされた二重特異性抗体、ＰＤ－１阻害剤、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、ＣＴＬＡ－４チェックポイント阻害剤、ＣＤ２２阻害剤、ＢＣＭＡ阻害剤、ＣＤ２８アゴニスト、ＣＤ２０阻害剤、又はそれらの組み合わせを含む。

【００８２】

更に、ＣＤ３８、ＣＤ２０、及び／又はＢＣＭＡの発現に関連する疾患又は障害の治療における、本明細書に提供される多重特異性抗原結合分子、又は本明細書に提供される医薬組成物の使用が提供される。いくつかの態様では、疾患又は障害は、がんである。いくつかの態様では、がんは、多発性骨髄腫である。いくつかの態様では、多重特異性抗原結合分子又は医薬組成物は、抗ＰＤ－１抗体又はその抗原結合断片と組み合わせて使用するためのものである。多重特異性抗原結合分子、又は多重特異性抗原結合分子を含む医薬組成物は、静脈内、筋肉内、又は皮下に注射される。

【００８３】

修飾グリコシル化パターンを有する抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子が、本明細書に提供される。いくつかの用途では、例えば、抗原結合分子抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ）機能を増大させるために、望ましくないグリコシル化部位を除去する修飾、すなわち、オリゴ糖鎖上に存在するフコース部分を欠失している抗原結合分子が有用であり得る（Ｓｈｉｅｌｄ　ｅｔ　ａｌ．（２００２）ＪＢＣ　２７７：２６７

３３を参照されたい）。他の適用では、補体依存性細胞傷害活性（ＣＤＣ）を修飾するために、ガラクトシル化の修飾を行うことができる。

【００８４】

更に別の態様では、本明細書では、本発明の抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子を使用して、ＣＤ３８を発現する腫瘍細胞を標的化／殺傷するための治療方法であって、治療有効量の本明細書に提供される抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子を含む医薬組成物を、その必要のある対象に投与することを含む、治療方法、が提供される。

【００８５】

本開示はまた、ＣＤ３８発現に関連するか、又はそれに起因する疾患又は障害の治療のための医薬品の製造における、本明細書で提供される抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子の使用を含む。

【００８６】

他の実施形態は、後に続く発明を実施するための形態の検討から明らかになるであろう。

【図面の簡単な説明】

【００８７】

【図１】例示的な抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子の構造を図示する概略図である。Ａ１抗原結合アームは、ＣＤ３８に特異的であるＦａｂ１を含むが、一方で、Ａ２抗原結合アームは、２つのＦａｂであるＦａｂ２及びＦａｂ３を含み、その各々は、４－１ＢＢに特異的である。抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２構築物のＦａｂ２及びＦａｂ３は、ＶＨ－２　４－１ＢＢ「イン」Ｆａｂ２のＮ末端から、ＣＨ１－３「アウト」Ｆａｂ３のＣ末端へ、リンカーを介して接続される。Ｆａｂ１、Ｆａｂ２、及びＦａｂ３軽鎖は、それぞれ、ＶＬ－１、ＶＬ－２、及びＶＬ－３ユニバーサル軽鎖を含む。

【図２Ａ】同一の分割４－１ＢＢ　Ｆａｂ、同一の積層４－１ＢＢ　Ｆａｂ、及び混合積層４－１ＢＢ　Ｆａｂを含む、様々なフォーマットの多重特異性抗原結合分子による、Ｊｕｒｋａｔレポーターアッセイにおける４－１ＢＢの活性化パーセントを比較する。

【図２Ｂ】スクリーンで試験された様々な構築物を例示し、標的依存性バイオアッセイを図示している。

【図３】４×１０^{6}個のヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を腹腔内注射した免疫不全ＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}Ｉｌ２ｒｇ^{ｔｍ１Ｗｊｌ}／ＳｚＪ（ＮＳＧ）マウスへの、ヒト多発性骨髄腫腫瘍細胞の投与後の、経時的なインビボ腫瘍量を例示する。

【図４Ａ】腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＰＢＳで治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示する。

【図４Ｂ】腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＣＤ３結合対照ｂｓＡｂ（０．４ｍｇ／ｋｇ）＋４－１ＢＢ結合対照ｂｓＡｂ（４ｍｇ／ｋｇ）で治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示する。

【図４Ｃ】腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＣＤ３結合対照ｂｓＡｂ（０．４ｍｇ／ｋｇ）＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ（４ｍｇ／ｋｇ）で治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示する。

【図４Ｄ】腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ（０．４ｍｇ／ｋｇ）＋４－１ＢＢ結合対照ｂｓＡｂ（４ｍｇ／ｋｇ）で治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示する。

【図４Ｅ】腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ（０．４ｍｇ／ｋｇ）＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ（４ｍｇ／ｋｇ）で治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示する。

【発明を実施するための形態】

【００８８】

詳細な説明

本発明を説明する前に、説明される特定の方法及び実験条件が変化し得るため、本発明は、そのような方法及び条件に限定されないことを理解されたい。本発明の範囲は添付の特許請求の範囲のみによって制限されるものとなることから、本明細書に使用される用語は、特定の実施形態のみを説明する目的で使用されており、制限することを意図しないことも理解されるべきである。

【００８９】

別途定義されない限り、本明細書で使用される全ての技術用語及び科学用語は、本発明が属する技術分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を有する。

【００９０】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、特定の列挙される数値又は値の範囲に関して使用される場合、当該値が、列挙される値から１％以下変動し得ることを意味する。例えば、本明細書で使用される場合、「約１００」という表現には、９９及び１０１、並びにその間の全ての値（例えば、９９．１、９９．２、９９．３、９９．４など）が含まれる。

【００９１】

本明細書に説明されるものと同様又は同等である任意の方法及び材料を本発明の実施又は試験に使用することができるが、例示的な方法及び材料をここで説明する。本明細書で言及される全ての特許、出願、及び非特許刊行物は、参照によりそれらの全体で本明細書に組み込まれる。

【００９２】

定義

本明細書で使用される場合、発現「４－１ＢＢ」は、４－１ＢＢＬの受容体を指す。４－１ＢＢＬによる４－１ＢＢの架橋は、Ｔ細胞活性化を増強する。ＵｎｉＰｒｏｔアクセッション番号Ｑ０７０１１を有するヒト４－１ＢＢ（又はＣＤ１３７）は、配列番号１０１に記載されるアミノ酸配列を含み、アミノ酸残基１～２３は、シグナルペプチドである。残基２４～１８６は、受容体の細胞外ドメインを構成する。

【００９３】

ヒト４－１ＢＢ（免疫原）アミノ酸配列

MGNSCYNIVATLLLVLNFERTRSLQDPCSNCPAGTFCDNN RNQICSPCPPNSFSSAGGQR
TCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQ
ELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGAS
SVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMR
PVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

（配列番号１０１）

【００９４】

本明細書におけるタンパク質、ポリペプチド、及びタンパク質断片への全ての言及は、非ヒト種由来であると明示的に指定されていない限り、ヒトバージョンのそれぞれのタンパク質、ポリペプチド、又はタンパク質断片を指すことが意図されている。したがって、「４－１ＢＢ」という表現は、例えば、「マウス４－１ＢＢ」、「サル４－１ＢＢ」など、非ヒト種からであると特定されていない限り、ヒト４－１ＢＢを意味する。

【００９５】

本明細書で使用される場合、「４－１ＢＢに結合する抗原結合分子」、又は「抗４－１ＢＢ抗原結合分子」は、細胞の表面上に発現される４－１ＢＢを特異的に認識する抗原結合分子を含む。本明細書に提供される抗４－１ＢＢ抗原結合分子は、本明細書に開示されるＶＲ及びＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗原結合分子は、抗体である。特定の実施形態では、抗原結合分子は、二重特異性抗体である。

【００９６】

本明細書で使用される場合、「ＣＤ３８」という表現はまた、環状ＡＤＰリボースヒドロラーゼとしても知られ、悪性形質細胞上に発現される糖タンパク質を指す。ＣＤ３８は

、細胞内カルシウムレベルの調節において中心的な役割を果たす。タンパク質は、Ｎ末端細胞質テール、単一の膜貫通ドメイン、及び４つのＮ－グリコシル化部位を有するＣ末端細胞外領域を有する。本明細書で使用される場合、「ＣＤ３８」という用語は、非ヒト種（例えば、「マウスＣＤ３８」、「サルＣＤ３８」など）に由来すると指定されない限り、ヒトＣＤ３８タンパク質を指す。ヒトＣＤ３８タンパク質は、配列番号１０２（ヒトＣＤ３８細胞外ドメイン（Ｖ４３－Ｉ３００）．ｍＦｃ）に示されるアミノ酸配列を有し、及び／又はＮＣＢＩアクセッション番号ＮＰ＿００１７６６．２又はＮＭ＿００１７７５．３に記載されるアミノ酸配列を有する。

【００９７】

ヒトＣＤ３８細胞外ドメイン（Ｖ４３－Ｉ３００）．ｍＦｃ（免疫原）アミノ酸

VPRWRQQWSGPGTTKRFPETVLARCVKYTEIHPEMRHVDCQSVWDAFKGAFISKH
PCNITEEDYQPLMKLGTQTVPCNKILLWSRIKDLAHQFTQVQRDMFTLEDTLLGYLADDLTW
CGEFNTSKINYQSCPDWRKDCSNNPVSVFWKTVSRRFAEAACDVVHVMLNGSRSKIFDKN
STFGSVEVHNLQPEKVQTLEAWVIHGGREDSRDLCQDPTIKELESIISKRNIQFSCKNIYRPD
KFLQCVKNPEDSSCTSEIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPIVT
CVVVDVSEDDPDVQISWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFK
CKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW
TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSF
SRTPGK*

（配列番号１０２）ｍＦｃ配列は下線付き

【００９８】

本明細書で使用される場合、「ＣＤ３８に結合する抗原結合分子」又は「抗ＣＤ３８抗原結合分子」は、ＣＤ３８を特異的に認識する抗原結合分子を含む。

【００９９】

「抗原結合分子」という用語は、多重特異性抗原結合分子、例えば、抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子を含む。本明細書に提供される抗ＣＤ３８抗原結合分子は、本明細書に開示されるＶＲ及びＣＤＲを含む。特定の実施形態では、抗原結合分子は、抗体である。特定の実施形態では、抗原結合分子は、二重特異性抗体である。

【０１００】

「抗原結合分子」という用語は、本明細書で使用される場合、特定の抗原（例えば、ＣＤ３８又は４－１ＢＢ）と特異的に結合するか、又はそれと相互作用する少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含む、任意の抗原結合分子又は分子複合体を意味する。「抗原結合分子」という用語には、４つのポリペプチド鎖、ジスルフィド結合によって相互接続した２つの重（Ｈ）鎖及び２つの軽（Ｌ）鎖、並びにそれらの多量体（例えば、ＩｇＭ）、を含む、免疫グロブリン分子が包含される。「抗原結合分子」という用語は、２つの抗原結合アーム、Ａ１及びＡ２を含む免疫グロブリン分子を含む。「抗原結合分子」という用語はまた、ジスルフィド結合によって相互に接続した４つのポリペプチド鎖、すなわち、２つの重（Ｈ）鎖と２つの軽（Ｌ）鎖とからなる免疫グロブリン分子を含む。各抗原結合アームは、重鎖を含み、次いで、少なくとも１つの重鎖可変領域（本明細書ではＨＣＶＲ又はＶＨ－１、ＶＨ－２、若しくはＶＨ－３と省略される）及び重鎖定常領域（ＣＨ１－１、ＣＨ１－２、及びＣＨ１－３）を含む。重鎖定常領域はまた、ＣＨ２及びＣＨ３を含む。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書ではＬＣＶＲと省略され、Ａ１アーム上にＶＬ－１、Ａ２アーム上にＶＬ－２及びＶＬ－３）及び軽鎖定常領域（Ａ１アーム上にＣＬ－１、並びにＡ２アーム上にＣＬ－２及びＣＬ－３）を含む。ＶＨ領域及びＶＬ領域は、フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる比較的保存された領域が間に配された、相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる超可変領域に更に細分することができる。各ＶＨ及びＶＬは、以下の順序でアミノ末端からカルボキシ末端まで配列された３つのＣＤＲ及び４つのＦＲから構成される：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。本明細書の異なる実施形態では、抗ＣＤ３８抗原結合アーム又は抗４－１ＢＢ抗原結合

アーム（又はその抗原結合部分）のＦＲは、ヒト生殖系列配列と同一であってもよく、又は自然に若しくは人為的に修飾されていてもよい。アミノ酸コンセンサス配列は、２つ以上のＣＤＲの並列分析に基づいて定義され得る。

【０１０１】

本明細書で使用される場合、抗原結合分子の「抗原結合部分」、抗原結合分子の「その抗原結合断片」などという用語は、抗原に特異的に結合して複合体を形成する、任意の天然に存在する、酵素的に得ることができる、合成の、又は遺伝子操作されたポリペプチド又は糖タンパク質を含む。抗原結合分子の抗原結合断片は、例えば、抗原結合分子可変ドメイン及び任意選択的に定常ドメインをコードするＤＮＡの操作及び発現を伴う、タンパク質消化又は組換え遺伝子工学技術などの、任意の好適な標準技術を使用して、完全抗原結合分子に由来し得る。そのようなＤＮＡは、既知であり、かつ／又は、例えば、市販の供給源、ＤＮＡライブラリ（例えば、ファージ抗原結合分子ライブラリを含む）から容易に入手可能であるか、若しくは合成され得る。ＤＮＡを配列決定し、化学的に又は分子生物学技法を使用することによって操作して、例えば、１つ以上の可変ドメイン及び／若しくは定常ドメインを好適な構成に配置するか、又はコドンを導入する、システイン残基を作成する、アミノ酸を修飾、付加、若しくは欠失させるなどが可能である。

【０１０２】

抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２抗原結合分子は、典型的には、少なくとも３つの可変ドメインを含むことになる。可変ドメインは、任意の大きさ又はアミノ酸組成であってもよく、一般的には、１つ以上のフレームワーク配列に隣接するか、又はインフレームである、少なくとも１つのＣＤＲを含むものとなる。ＶＬドメインと関連付けられたＶＨドメインを有することにおいて、ＶＨ及びＶＬドメインは、任意の好適な配置で互いに対して位置し得る。例えば、可変領域は、二量体であり、ＶＨ－ＶＨ、ＶＨ－ＶＬ、又はＶＬ－ＶＬ二量体を含み得る。あるいは、抗原結合分子は、単量体のＶＨ又はＶＬドメインを含み得る。

【０１０３】

特定の実施形態では、抗原結合分子は、少なくとも１つの定常ドメインに共有結合された少なくとも１つの可変ドメインを含み得る。本発明の多重特異性抗原結合分子内に見出され得る可変及び定常ドメインの非限定的な例示的な構成としては、

（ｉ）V_H1-C_H1-1、
（ｉｉ）V_H2-C_H1-2、
（ｉｉｉ）V_H3-C_H1-3、
（ｉｖ）$V_H1-C_H1-C_H2$、
（ｖ）$V_H1-C_H1-C_H2-C_H3$、
（ｖｉ）$V_H2-C_H1-2-C_H2$、
（ｖｉｉ）$V_H2-C_H1-2-C_H2-C_H3$、
（ｖｉｉｉ）V_H3-C_H1-3、
（ｉｘ）$V_H3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2$、
（ｘ）$V_H3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2-C_H2$、
（ｘｉ）$V_H3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2-C_H2-C_H3$、
（ｘｉｉ）V_H-C_L、
（ｘｉｉｉ）V_L-1-C_L1、
（ｘｉｖ）V_L-2-C_L2、
（ｘｖ）V_L-3-C_L3、
（ｘｖｉ）$V_L-3-C_L3-C_H1-3$、
（ｘｖｉｉ）$V_L-2-C_L-2-C_H1-2$、
（ｘｖｉｉｉ）$V_L1-C_L1-C_H1-C_H2-C_H3$、
（ｘｉｘ）$V_L-2-C_L2-C_H1-2$、
（ｘｘ）$V_L-2-C_L2-C_H1-2-C_H2$、
（ｘｘｉ）$V_L-2-C_L2-C_H1-2-C_H2-C_H3$、

（ｘｘｉｉ）$V_L-3-C_L3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2-C_H2$、
（ｘｘｉｉｉ）$V_L-3-C_L3-C_H1-3-V_H2-C_H1-2-C_H2-C_H3$、
及び
（ｘｘｉｖ）V_L-C_L
が挙げられる。上で列挙されたいずれかの例示的な構成を含む、可変ドメイン及び定常ドメインのいずれかの構成において、可変ドメイン及び定常ドメインは、互いに直接的に連結されていてもよいし、完全若しくは部分的なヒンジ又はリンカー領域により連結されていてもよい。ヒンジ領域は、単一ポリペプチド分子における隣接する可変ドメイン及び／又は定常ドメイン間の可動性又は半可動性連結をもたらす、少なくとも２個（例えば、５、１０、１５、２０、４０、６０個又はそれ以上）のアミノ酸から構成されてもよい。

【０１０４】

例示的に、図１は、ＣＤ３８に特異的であるＦａｂ１を含むＡ１抗原結合アームと、２つのＦａｂである、Ｆａｂ２、及びＦａｂ３を含み、その各々が、４－１ＢＢに特異的である、Ａ２抗原結合アームと、を示す。Ｆａｂ１、Ｆａｂ２、及びＦａｂ３軽鎖は、ユニバーサル軽鎖であり得る。この例では、V_L-1は、Ａ１アーム上のC_H1-1に結合されているC_L-1に結合されている。Ａ２アームでは、V_L-3は、C_H1-3に結合されているC_L-3に結合されている。同様に、V_L-2は、C_H1-2に結合されているC_L-2に結合されている。抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２構築物のＦａｂ２及びＦａｂ３は、V_H-2　４－１ＢＢ「イン」Ｆａｂ２のＮ末端からC_H1-3「アウト」Ｆａｂ３のＣ末端へのリンカーを介して接続される。

【０１０５】

本発明の抗原結合分子は、補体依存性細胞傷害性（ＣＤＣ）又は抗原結合分子依存性細胞媒介性細胞傷害性（ＡＤＣＣ）を介して機能し得る。「補体依存性細胞傷害性」（ＣＤＣ）は、補体の存在下における本開示の抗原結合分子による抗原発現細胞の溶解を指す。「抗原結合分子依存性細胞媒介性細胞傷害」（ＡＤＣＣ）は、Ｆｃ受容体（ＦｃＲ）を発現する非特異的細胞傷害性細胞（例えば、ナチュラルキラー（ＮＫ）細胞、好中球、及びマクロファージ）が、標的細胞上の結合した抗原結合分子を認識し、それによって標的細胞の溶解をもたらす、細胞媒介性反応を指す。ＣＤＣ及びＡＤＣＣは、当該技術分野で周知かつ利用可能であるアッセイを使用して測定され得る。（例えば、米国特許第５，５００，３６２号及び同第５，８２１，３３７号、並びにＣｌｙｎｅｓ　ｅｔ　ａｌ．（１９９８）Ｐｒｏｃ．Ｎａｔｌ．Ａｃａｄ．Ｓｃｉ．（ＵＳＡ）９５：６５２－６５６を参照されたい）。抗原結合分子の定常領域は、抗原結合分子が補体を固定し、細胞依存性細胞傷害性を媒介する能力において重要である。したがって、抗原結合分子のアイソタイプは、抗原結合分子が細胞傷害性を媒介することが望ましいかどうかに基づいて選択され得る。

【０１０６】

本発明の特定の実施形態では、本明細書に提供される抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子は、ヒト抗原結合分子である。本明細書で使用される場合、「ヒト抗原結合分子」という用語は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変領域及び定常領域を有する抗原結合分子を含むことを意図している。本発明のヒト抗原結合分子は、例えばＣＤＲにおいて、特にＣＤＲ３において、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含み得る（例えば、インビトロでの無作為若しくは部位特異的な突然変異誘発により、又はインビボでの体細胞変異により変異が導入される）。しかしながら、本明細書で使用される場合、「ヒト抗原結合分子」という用語は、マウスなどの別の哺乳類種の生殖系列由来のＣＤＲ配列がヒトフレームワーク配列上に移植されている、抗原結合分子を含むことを意図していない。

【０１０７】

本明細書に提供される多重特異性抗原結合分子は、いくつかの実施形態では、組換えヒト抗原結合分子であってもよい。「組換えヒト抗原結合分子」という用語は、本明細書で使用される場合、組換え手段によって、調製されるか、発現するか、作成されるか、又は

単離される全てのヒト抗原結合分子、例えば、宿主細胞中にトランスフェクトされた組換え発現ベクターを用いて発現した抗原結合分子（以下で詳述する）、組換え、コンビナトリアルヒト抗原結合分子ライブラリから単離された抗原結合分子（以下で詳述する）、ヒト免疫グロブリン遺伝子導入されている動物（例えば、マウス）から単離された抗原結合分子（例えば、Ｔａｙｌｏｒ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｎｕｃｌ．Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２０：６２８７－６２９５を参照されたい）、又はヒト免疫グロブリン遺伝子配列から他のＤＮＡ配列へスプライシングすることに関与する任意の他の手段によって調製されたか、発現したか、作成されたか、若しくは単離された抗原結合分子などを含むように意図される。そのような組換えヒト抗原結合分子は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列由来の可変領域及び定常領域を有する。しかしながら、特定の実施形態では、そのような遺伝子組換えヒト抗原結合分子はインビトロでの突然変異誘発（又は、ヒトＩｇ配列にトランスジェニックな動物を使用する場合、インビボでの体細胞の突然変異誘発）に供されるため、組換え抗原結合分子のV_H領域及びV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_H配列及びV_L配列に由来し、関連する配列である一方で、インビボでのヒト抗原結合分子生殖系列レパートリー中には自然に存在し得ない。

【０１０８】

ヒト抗原結合分子は、ヒンジ不均一性に関連する２つの形態で存在し得る。一形態では、免疫グロブリン分子は、およそ１５０～１６０ｋＤａの安定した４つの鎖構築物を含み、二量体が、鎖間重鎖ジスルフィド結合によって一緒に保持されている。第２の形態では、二量体が、鎖間ジスルフィド結合を介して結合されず、約７５～８０ｋＤａの分子は、共有結合した軽鎖及び重鎖から構成される（半抗原結合分子）。これらの形態は、親和性精製後であっても、分離が非常に困難であった。

【０１０９】

様々なインタクトなＩｇＧアイソタイプにおける第２の形態の出現頻度は、抗原結合分子のヒンジ領域アイソタイプに関連する構造的差異によるが、これに限定されない。ヒトＩｇＧ４ヒンジのヒンジ領域における単一アミノ酸置換は、第２の形態の出現を、ヒトＩｇＧ１ヒンジを使用して典型的に観察されるレベルまで著しく低減し得る（Ａｎｇａｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９３）Ｍｏｌｅｃｕｌａｒ　Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ　３０：１０５）。本発明は、ヒンジ、C_H2領域又はC_H3領域において１つ以上の変異を有する抗原結合分子を包含し、それら変異は、例えば、産生において、所望の抗原結合分子形態の収率を改善するために望ましいものであり得る。

【０１１０】

本発明の多重特異性抗原結合分子は、単離抗原結合分子であってもよい。本明細書で使用される場合、「単離多重特異性抗原結合分子」は、その天然環境の少なくとも１つの成分から特定及び分離及び／又は回収された抗原結合分子を意味する。例えば、生物体の少なくとも１つの構成要素から、又は当該抗原結合分子が自然に存在する、若しくは自然に産生される組織又は細胞から、分離され、又は取り出された抗原結合分子は、本発明の目的に対し、「単離抗原結合分子」である。単離抗原結合分子はまた、組換え細胞内でｉｎｓｉｔｕで抗原結合分子を含む。単離抗原結合分子は、少なくとも１つの精製又は単離工程に供されている抗原結合分子である。特定の実施形態によると、単離抗原結合分子は、他の細胞性物質及び／又は化学物質を実質的に含まなくてもよい。

【０１１１】

本明細書に開示される抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２抗原結合分子は、抗原結合分子が由来した対応する生殖系列配列と比較して、重鎖及び軽鎖可変ドメインのフレームワーク及び／又はＣＤＲにおける１つ以上のアミノ酸置換、挿入、及び／又は欠失を含み得る。そのような変異は、本明細書に開示されるアミノ酸配列を、例えば公開抗原結合分子配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認され得る。本開示は、本明細書に開示されるアミノ酸配列のいずれかに由来する多重特異性抗原結合分子又はその抗原結合断片を含み、１つ以上のフレームワーク及び／又はＣＤＲ内の１つ以上のアミノ酸は、本明細書に提供される配列に対して変異される。いくつかの態様

では、変異は、抗原結合分子が誘導された生殖系列配列の対応する残基、又は別のヒト生殖系列配列の対応する残基、又は対応する生殖系列残基の保存的アミノ酸置換を反映するように行われる（そのような配列変化は、本明細書では集合的に「生殖系列変異」と呼ばれる）。当業者であれば、本明細書に開示される重鎖及び軽鎖可変領域配列から開始して、個々の生殖系列変異又はそれらの組み合わせなどの１つ以上の変異を含む、多くの抗原結合分子を容易に産生することができる。特定の実施形態では、V_H及び／又はV_Lドメイン内のフレームワーク及び／又はＣＤＲ残基の全てが、抗原結合分子が由来する元の生殖系列配列に見られる残基に再び変異する。他の実施形態では、特定の残基のみ、例えば、ＦＲ１の最初の８アミノ酸内、若しくはＦＲ４の最後の８アミノ酸内に見出される変異残基のみ、又はＣＤＲ１、ＣＤＲ２、若しくはＣＤＲ３内に見出される変異残基のみが、元の生殖系列配列に再び変異される。他の実施形態では、フレームワーク及び／又はＣＤＲ残基のうちの１つ以上は、異なる生殖系列配列（すなわち、抗原結合分子が元々由来する生殖系列配列とは異なる生殖系列配列）の対応する残基に変異する。

【０１１２】

更に、本発明の多重特異性抗原結合分子は、フレームワーク及び／又はＣＤＲ領域内に２つ以上の変異の任意の組み合わせを含み得、例えば、特定の個々の残基が、本明細書に提供される配列に対して変異するか、又は特定の生殖系列配列の対応する残基に変異するが、一方で、元の生殖系列配列とは異なる、特定の他の残基が、維持されるか、又は異なる生殖系列配列の対応する残基に変異する。得られると、１つ以上の変異を含む抗原結合分子は、結合特異性の改善、結合親和性の増大、アンタゴニスト又はアゴニストの生物学的特性の改善又は増強（場合によっては）、免疫原性の減少などの１つ以上の所望の特性について容易に試験することができる。抗原結合分子及びこの一般的な様式で得られたものは、本発明に包含される。

【０１１３】

本明細書では、１つ以上の置換を有する、本明細書に開示されるＨＣＶＲ、ＬＣＶＲ、及び／又はＣＤＲのうちのいずれかのバリアントを含む抗ＣＤ３８抗体×抗４－１ＢＢ抗原結合分子が提供される。いくつかの態様では、置換は、保存的アミノ酸置換である。例えば、本開示は、本明細書において表１、３、５、又は７に記載されるＨＣＶＲ、ＬＣＶＲ、及び／又はＣＤＲアミノ酸配列のうちのいずれかに対して、例えば、１０個以下、８個以下、６個以下、又は４個以下、３個以下、２個、又は１個のアミノ酸置換を有するＨＣＶＲ、ＬＣＶＲ、及び／又はＣＤＲアミノ酸配列を有する、抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ抗原結合分子を含む。

【０１１４】

「エピトープ」という用語は、パラトープとして知られる抗原結合分子の可変領域中の特定の抗原結合部位と相互作用する抗原性決定基を指す。単一の抗原は、１つより多くのエピトープを有し得る。したがって、異なる抗原結合分子は、抗原上の異なる領域に結合し得、かつ異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、立体構造的又は直線状のいずれであってもよい。立体構造的エピトープは、直線状ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並置されたアミノ酸によって生成される。直線状エピトープは、ポリペプチド鎖内の隣接するアミノ酸残基によって生成されるエピトープである。特定の状況では、エピトープは、抗原上の糖、ホスホリル基、又はスルホニル基の部分を含み得る。

【０１１５】

「実質的な同一性」又は「実質的に同一である」という用語は、核酸又はその断片を指す場合、別の核酸（又はその相補鎖）との適切なヌクレオチド挿入又は欠失と最適に整列した場合、以下で説明するように、ＦＡＳＴＡ、ＢＬＡＳＴ、又はＧａｐなど、配列同一性の任意の周知のアルゴリズムによって測定したときに、ヌクレオチド塩基の少なくとも約９５％、より好ましくは少なくとも約９６％、９７％、９８％又は９９％においてヌクレオチド配列同一性があることを示す。参照核酸分子と実質的な同一性を有する核酸分子は、特定の事例では、参照核酸分子によってコードされるポリペプチドと同じ又は実質的に類似したアミノ酸配列を有するポリペプチドをコードし得る。

【０１１６】
ポリペプチドに適用される場合、「実質的な類似性」又は「実質的に類似した」という用語は、２つのペプチド配列が、デフォルトのギャップ重みを用いてプログラムＧＡＰ又はＢＥＳＴＦＩＴなどによって最適に整列した場合、少なくとも９５％の配列同一性、更により好ましくは少なくとも９８％又は９９％の配列同一性を共有する。本明細書では、多重特異性抗原結合分子の機能特性を実質的に変化させないアミノ酸置換が企図される。いくつかの態様では、同一ではない残基位置は、保存的アミノ酸置換だけ異なる。「保存的アミノ酸置換」とは、アミノ酸残基が、類似の化学的特性（例えば、電荷又は疎水性）を備えた側鎖（Ｒ基）を有する別のアミノ酸残基によって置換されたものである。一般に、保存的アミノ酸置換は、タンパク質の機能特性を実質的に変化させない。２つ以上のアミノ酸配列が保存的置換により互いに異なる場合、配列同一性のパーセント又は類似性の程度は、置換の保存的性質を補正するために上向きに調整されてもよい。この調整を行うための手段は、当業者に周知である。例えば、参照により本明細書に組み込まれるＰｅａｒｓｏｎ（１９９４）Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ．Ｂｉｏｌ．２４：３０７－３３１を参照されたい。類似の化学的特性を備えた側鎖を有するアミノ酸の基の例としては、（１）脂肪族側鎖：グリシン、アラニン、バリン、ロイシン及びイソロイシン、（２）脂肪族－ヒドロキシル側鎖：セリン及びトレオニン、（３）アミド含有側鎖：アスパラギン及びグルタミン、（４）芳香族側鎖：フェニルアラニン、チロシン、及びトリプトファン、（５）塩基性側鎖：リジン、アルギニン、及びヒスチジン、（６）酸性側鎖：アスパラギン酸及びグルタミン酸が挙げられ、（７）含硫側鎖は、システイン及びメチオニンである。例示的な保存的アミノ酸置換基は、バリン－ロイシン－イソロイシン、フェニルアラニン－チロシン、リシン－アルギニン、アラニン－バリン、グルタミン酸－アスパラギン酸及びアスパラギン－グルタミンである。あるいは、保存的置換とは、参照により本明細書に組み込まれるＧｏｎｎｅｔ　ｅｔ　ａｌ．（１９９２）Ｓｃｉｅｎｃｅ　２５６：１４４３－１４４５に開示されるＰＡＭ２５０対数尤度マトリクスにおいて正の値を有する任意の変化である。「適度に保存的な」置換とは、ＰＡＭ２５０対数尤度マトリクスにおいて負以外の値を有する何らかの変化である。

【０１１７】
ポリペプチドに対する配列類似性は、配列同一性とも呼称され、典型的には配列解析ソフトウェアを使用して測定される。タンパク質解析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む様々な置換、欠失及び他の修飾に割り当てられた類似性の尺度を使用して類似の配列と一致させる。例えば、ＧＣＧソフトウェアは、異なる種の生物由来の相同ポリペプチドなどの密接に関連するポリペプチド間の、又は野生型タンパク質とその変異タンパク質の間の配列相同性又は配列同一性を決定するためのデフォルトパラメータとともに使用することができる、Ｇａｐ及びＢｅｓｔｆｉｔなどのプログラムを含む。例えば、ＧＣＧ第６．１版を参照されたい。ポリペプチド配列は、ＧＣＧバージョン６．１におけるプログラムである、デフォルトパラメータ又は推奨パラメータを備えたＦＡＳＴＡを使用して比較することもできる。ＦＡＳＴＡ（例えば、ＦＡＳＴＡ２及びＦＡＳＴＡ３）は、問い合わせ配列と検索配列との間の最良重複の領域の整列及び配列同一性パーセントを提供する（Ｐｅａｒｓｏｎ（２０００）上述）。本発明の配列を、異なる生物由来の多数の配列を含有するデータベースと比較する場合の別の好ましいアルゴリズムは、コンピュータプログラムＢＬＡＳＴ、特にＢＬＡＳＴＰ又はＴＢＬＡＳＴＮであり、デフォルトパラメータを使用する。例えば、各々が参照により本明細書に組み込まれる、Ａｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９０）Ｊ．Ｍｏｌ．　Ｂｉｏｌ．２１５：４０３－４１０、及びＡｌｔｓｃｈｕｌ　ｅｔ　ａｌ．（１９９７）Ｎｕｃｌｅｉｃ　Ａｃｉｄｓ　Ｒｅｓ．２５：３３８９－４０２を参照されたい。

【０１１８】
抗原結合分子の結合特性
本明細書で使用される場合、抗原結合分子、免疫グロブリン、抗原結合分子結合断片、又はＦｃ含有タンパク質が、例えば、細胞表面タンパク質又はその断片などの所定の抗原

のいずれかに結合するという関連において、「結合」という用語は、典型的には、抗原結合分子－抗原相互作用などの少なくとも２つの実体又は分子構造間の相互作用又は会合を指す。

【０１１９】

例えば、抗原をリガンドとして、かつ抗原結合分子、Ｉｇ、抗原結合分子結合断片、又はＦｃ含有タンパク質を分析物（又は抗リガンド）として使用する、ＢＩＡｃｏｒｅ装置で表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）技術によって決定される場合、例えば、結合親和性は、典型的には、約10^{-7}Ｍ以下、約10^{-8}Ｍ以下、約10^{-9}Ｍ以下などのK_D値に相当する。蛍光活性化セルソーティング（ＦＡＣＳ）結合アッセイなどの細胞ベースの結合戦略も日常的に使用され、ＦＡＣＳデータは、放射性リガンド競合結合及びＳＰＲなどの他の方法とよく相関している（Ｂｅｎｅｄｉｃｔ，ＣＡ，Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．１９９７，２０１（２）：２２３－３１；Ｇｅｕｉｊｅｎ、ＣＡ，ｅｔ ａｌ．Ｊ Ｉｍｍｕｎｏｌ Ｍｅｔｈｏｄｓ．２００５，３０２（１－２）：６８－７７）。

【０１２０】

したがって、本明細書の多重特異性抗原結合分子又は抗原結合タンパク質は、非特異的抗原（例えば、ＢＳＡ、カゼイン）への結合に対するその親和性よりも少なくとも１０倍低いK_D値に対応する親和性を有する所定の抗原又は細胞表面分子（受容体）に結合する。本開示によれば、非特異的抗原よりも１０倍以下のK_D値に相当する抗原結合分子の親和性は、検出不能の結合とみなされ得るが、そのような抗原結合分子は、本発明の多重特異性抗原結合分子の産生のために第２の抗原結合アームと対になり得る。

【０１２１】

「K_D」（Ｍ）という用語は、特定の抗原結合分子－抗原相互作用の解離平衡定数、又は抗原に結合する抗原結合分子若しくは抗原結合分子結合断片の解離平衡定数を指す。K_Dと結合親和性の間に反比例の関係があり、したがって、K_D値が小さいほど、親和性が高い、すなわち、より強い。したがって、「より高い親和性」又は「より強い親和性」という用語は、相互作用を形成するより高い能力、したがって、より小さなK_D値に関し、逆に、「より低い親和性」又は「より弱い親和性」という用語は、相互作用を形成するより低い能力、したがって、より大きなK_D値に関する。いくつかの状況では、特定の分子（例えば、抗原結合分子）の相互作用パートナー分子（例えば、抗原Ｘ）に対する結合親和性（又はK_D）が、その分子（例えば、抗原結合分子）の別の相互作用パートナー分子（例えば、抗原Ｙ）に対する結合親和性と比較して高い場合、より大きなK_D値（より低い、又はより弱い、親和性）を、より小さなK_D値（より高い、又はより強い、親和性）で割ることによって決定される結合比で表すことができ、例えば、場合によっては、５倍又は１０倍高い結合親和性として表すことができる。

【０１２２】

「k_d」（ｓｅｃ －１又は１／ｓ）という用語は、特定の抗原結合分子－抗原相互作用の解離速度定数、又は抗原結合分子若しくは抗原結合分子結合断片の解離速度定数を指す。この値は、k_{off}値とも呼ばれている。

【０１２３】

「k_a」（Ｍ－１×ｓｅｃ－１又は１／Ｍ／ｓ）という用語は、特定の抗原結合分子－抗原相互作用の会合速度定数、又は抗原結合分子若しくは抗原結合分子結合断片の会合速度定数を指す。

【０１２４】

「K_A」（Ｍ－１又は１／Ｍ）という用語は、特定の抗原結合分子－抗原相互作用の会合平衡定数、又は抗原結合分子若しくは抗原結合分子結合断片の会合平衡定数を指す。会合平衡定数は、k_aをk_dで割ることによって得られる。

【０１２５】

「ＥＣ５０」又は「EC_{50}」という用語は、指定された曝露時間後にベースラインと最大値との中間の反応を誘発する抗原結合分子の濃度を含む、半最大有効濃度を指す。EC_{50}は基本的に、その最大効果の５０％が観察される抗原結合分子の濃度を表す。特定

の実施形態では、ＥＣ$_{50}$値は、例えば、ＦＡＣＳ結合アッセイによって決定される、４－１ＢＢ又は腫瘍関連抗原（例えば、ＣＤ３８）を発現する細胞への最大の半分の結合を与える本発明の抗原結合分子の濃度と等しい。したがって、ＥＣ$_{50}$又は半最大有効濃度値が大きくなると、結合の低下又は弱化が観察される。

【０１２６】

一実施形態では、結合の低下は、最大量の半分の標的細胞への結合を可能にするＥＣ$_{50}$抗原結合分子濃度の増加として定義することができる。

【０１２７】

別の実施形態では、ＥＣ$_{50}$値は、Ｔ細胞の細胞傷害活性による標的細胞の最大半量枯渇を誘発する本発明の抗原結合分子の濃度を表す。したがって、細胞傷害活性の増加（例えば、Ｔ細胞媒介腫瘍細胞殺傷）は、ＥＣ$_{50}$、又は半最大有効濃度値の減少とともに観察される。

【０１２８】

多重特異性抗原結合分子

本発明の抗原結合分子は、ＣＤ３８及び４－１ＢＢの両方に結合する。多重特異性抗原結合分子は、１つの標的ポリペプチドの異なるエピトープに対して特異的であってもよく、又は複数の標的ポリペプチドに特異的な抗原結合ドメインを含んでもよい。例えば、Ｔｕｔｔ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｊ．Ｉｍｍｕｎｏｌ． １４７：６０－６９、Ｋｕｆｅｒ ｅｔ ａｌ．，２００４，Ｔｒｅｎｄｓ Ｂｉｏｔｅｃｈｎｏｌ． ２２：２３８－２４４を参照されたい。

【０１２９】

特定の例示的な実施形態によると、本発明は、４－１ＢＢ及びＣＤ３８に特異的に結合する多重特異性抗原結合分子を含む。そのような分子は、本明細書では、例えば、「抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ １＋２」、又は「抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ １＋２」、又は「抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ １＋２」、又は「ＣＤ３８×４－１ＢＢ １＋２」多重特異性分子、又は他の類似の用語で称され得る。

【０１３０】

本開示は、多重特異性抗原結合分子を含み、免疫グロブリンの一方のアームＡ２は、ヒト４－１ＢＢに結合する２つの抗原結合ドメイン、４－１ＢＢ「イン」ドメイン及び４－１ＢＢ「アウト」ドメインを有し、免疫グロブリンの他方のアームＡ１は、ヒトＣＤ３８の結合に特異的である。４－１ＢＢ結合アームは、本明細書の表３（抗４－１ＢＢ「イン」）又は表５（抗４－１ＢＢ「アウト」）に記載されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ又はＣＤＲアミノ酸配列のうちのいずれかを、積層フォーマットで含み得る。

【０１３１】

特定の実施形態では、４－１ＢＢ結合アームは、ヒト４－１ＢＢに結合し、ヒトＴ細胞活性化を促進する。特定の実施形態では、４－１ＢＢ結合アームは、ヒト４－１ＢＢに結合し、ヒトＴ細胞活性化を誘導する。他の実施形態では、４－１ＢＢ結合アームは、ヒト４－１ＢＢに結合し、多重特異性又は多重特異性抗原結合分子との関連で、腫瘍関連抗原発現細胞殺傷を誘導する。ＣＤ３８結合アームは、本明細書の表１に記載されるＨＣＶＲ／ＬＣＶＲ又はＣＤＲのアミノ酸配列のうちのいずれかを含んでもよい。

【０１３２】

本明細書で使用される場合、「抗原結合分子」という表現は、単独で、又は１つ以上の追加のＣＤＲ及び／又はフレームワーク領域（ＦＲ）との組み合わせで、特定の抗原に特異的に結合する、少なくとも１つの相補性決定領域（ＣＤＲ）を含むか、又はそれからなる、タンパク質、ポリペプチド、又は分子複合体を意味する。特定の実施形態では、抗原結合分子は、抗原結合分子又は抗原結合分子の断片であり、それらの用語は本明細書の他の場所で定義される。

【０１３３】

本明細書で使用される場合、「多重特異性抗原結合分子」という表現は、少なくとも第１の抗原結合ドメインと第２の抗原結合ドメインとを含む、タンパク質、ポリペプチド、

又は分子複合体を意味する。多重特異性抗原結合分子内の各抗原結合ドメインは、単独で、又は１つ以上の追加のＣＤＲ及び／若しくはＦＲとの組み合わせで、特定の抗原に特異的に結合する少なくとも１つのＣＤＲを含む。本発明の文脈において、第１の抗原結合アームＡ１は、第１の抗原（例えば、ＣＤ３８）に特異的に結合し、第２の抗原結合アームＡ２は、第１の抗原とは別個の第２及び第３の抗原（例えば、４－１ＢＢ）に特異的に結合する。

【０１３４】

本明細書で考察される多重特異性抗原結合分子は、ヒトＩｇＧ重鎖定常領域を含み得る。いくつかの場合、ヒトＩｇＧ重鎖定常領域は、アイソタイプＩｇＧ１である。いくつかの場合、ヒトＩｇＧ重鎖定常領域は、アイソタイプＩｇＧ４である。様々な実施形態では、多重特異性抗原結合分子は、同じアイソタイプの野生型ヒンジと比較して、Ｆｃγ受容体結合を低減させるキメラヒンジを含む。

【０１３５】

第１の抗原結合アームＡ１及び第２の抗原結合アームＡ２は、互いに直接的又は間接的に接続されて、本発明の多重特異性抗原結合分子を形成し得る。あるいは、第１の抗原結合アームＡ１及び第２の抗原結合アームＡ２は、各々、別個の多量体形成ドメインに接続され得る。１つの多量体形成ドメインと別の多量体形成ドメインとの会合は、２つの抗原結合ドメイン間の会合を促進し、それによって、多重特異性抗原結合分子を形成する。本明細書で使用される場合、「多量体形成ドメイン」は、同じか又は類似の構造又は構成の第２の多量体形成ドメインと会合する能力を有する、任意の巨大分子、タンパク質、ポリペプチド、ペプチド、又はアミノ酸である。例えば、多量体形成ドメインは、免疫グロブリンC_H3ドメインを含むポリペプチドであってもよい。多量体形成成分の非限定的な例は、（C_H2～C_H3ドメインを含む）免疫グロブリンのＦｃ部分、例えば、アイソタイプＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４、並びに各アイソタイプ群内の任意のアロタイプから選択されるＩｇＧのＦｃドメインである。

【０１３６】

本発明の多重特異性抗原結合分子は、典型的には、２つの多量体形成ドメイン、例えば、別個の抗原結合分子重鎖の各個々の部分である２つのＦｃドメインを含むことになる。第１及び第２の多量体形成ドメインは、例えば、ＩｇＧ１／ＩｇＧ１、ＩｇＧ２／ＩｇＧ２、ＩｇＧ４／ＩｇＧ４などの同じＩｇＧアイソタイプのものであってもよい。あるいは、第１及び第２の多量体形成ドメインは、例えば、ＩｇＧ１／ＩｇＧ２、ＩｇＧ１／ＩｇＧ４、ＩｇＧ２／ＩｇＧ４などの異なるＩｇＧアイソタイプのものであってもよい。

【０１３７】

特定の実施形態では、多量体形成ドメインは、Ｆｃ断片、又は少なくとも１つのシステイン残基を含有する１～約２００のアミノ酸長のアミノ酸配列である。他の実施形態では、多量体形成ドメインは、システイン残基、又は短鎖システイン含有ペプチドである。その他の多量体形成ドメインとして、ロイシンジッパー、ヘリックス・ループ・モチーフ、又はコイルドコイル・モチーフを含むか、又はこれらからなるペプチド又はポリペプチドが挙げられる。

【０１３８】

本開示の多重特異性抗原結合分子を作製するために、任意の多重特異性抗原結合分子フォーマット又は技術が使用され得る。例えば、第１の抗原結合特異性を有する抗原結合分子又はその断片は、第２の結合特異性を有する別の抗原結合分子又は抗原結合分子断片などの１つ以上の他の分子実体に（例えば、化学的結合、遺伝子融合、又は非共有結合的会合、又はその他の方法で）機能的に連結して、多重特異性抗原結合分子を産生することができる。本発明に関して使用することのできる他の特定の例示的な多重特異性フォーマットとしては、非限定的に、例えば、ｓｃＦｖベース又はダイアボディ多重特異性フォーマット（ｄｉａｂｏｄｙ　ｍｕｌｔｉｓｐｅｃｉｆｉｃ　ｆｏｒｍａｔ）、ＩｇＧ－ｓｃＦｖ融合体、二重可変ドメイン（ＤＶＤ）－Ｉｇ、クアドローマ（Ｑｕａｄｒｏｍａ）、ノブ・イントゥ・ホール（ｋｎｏｂｓ－ｉｎｔｏ－ｈｏｌｅｓ）、共通軽鎖（例えば、ノブ

・イントゥ・ホールを有する共通軽鎖など）、ＣｒｏｓｓＭａｂ、ＣｒｏｓｓＦａｂ、（ＳＥＥＤ）ボディ、ロイシンジッパー、デュオボディ（Ｄｕｏｂｏｄｙ）、ＩｇＧ１／ＩｇＧ２、二重作用Ｆａｂ（ＤＡＦ）－ＩｇＧ、及びＭａｂ^{2}多重特異性フォーマットが挙げられる（例えば、前述のフォーマットの概要に関し、Ｋｌｅｉｎ　ｅｔ　ａｌ．２０１２，ｍＡｂｓ　４：６，１－１１及び当該文献中に引用される参照文献）。

【０１３９】

本発明の多重特異性抗原結合分子の文脈では、多量体形成ドメイン、例えば、Ｆｃドメインは、野生型であるＦｃドメインの天然に存在するバージョンと比較して、１つ以上のアミノ酸の変更（例えば、挿入、欠失又は置換）を含み得る。例えば、本発明は、ＦｃとＦｃＲｎとの間の修飾された結合相互作用（例えば、増強又は減少）を有する修飾されたＦｃドメインをもたらす、Ｆｃドメイン中に１つ以上の修飾を含む多重特異性抗原結合分子を含む。一実施形態では、多重特異性抗原結合分子は、$C_{H}2$又は$C_{H}3$領域に修飾を含み、この修飾は、酸性環境において（例えば、ｐＨが約５．５～約６．０の範囲のエンドソームにおいて）ＦｃＲｎに対するＦｃドメインの親和性を増加させる。そのようなＦｃ修飾の非限定的な例には、例えば、２５０位（例えば、Ｅ若しくは Ｑ）、２５０位及び４２８位（例えば、Ｌ若しくはＦ）、２５２位（例えば、Ｌ／Ｙ／Ｆ／Ｗ若しくはＴ）、２５４位（例えば、若しくはＴ）、及び２５６位（例えば、Ｓ／Ｒ／Ｑ／Ｅ／Ｄ若しくはＴ）における修飾、又は４２８位及び／若しくは４３３位（例えば、Ｌ／Ｒ／Ｓ／Ｐ／Ｑ若しくはＫ）及び／若しくは４３４位（例えば、Ｈ／Ｆ若しくはＹ）における修飾、又は２５０位及び／若しくは４２８位における修飾、又は３０７位若しくは３０８位（例えば、３０８Ｆ、Ｖ３０８Ｆ）、及び４３４位における修飾が含まれる。一実施形態では、修飾は、４２８Ｌ（例えば、Ｍ４２８Ｌ）及び４３４Ｓ（例えば、Ｎ４３４Ｓ）の修飾、４２８Ｌ、２５９Ｉ（例えば、Ｖ２５９Ｉ）、及び３０８Ｆ（例えば、Ｖ３０８Ｆ）の修飾、４３３Ｋ（例えば、Ｈ４３３Ｋ）及び４３４（例えば、４３４Ｙ）の修飾、２５２、２５４、及び２５６（例えば、２５２Ｙ、２５４Ｔ、及び２５６Ｅ）の修飾、２５０Ｑ及び４２８Ｌの修飾（例えば、Ｔ２５０Ｑ及びＭ４２８Ｌ）、並びに３０７及び／又は３０８の修飾（例えば、３０８Ｆ及び／又は３０８Ｐ）を含む。

【０１４０】

本開示はまた、第１の$C_{H}3$ドメイン及び第２のＩｇ　$C_{H}3$ドメインを含む多重特異性抗原結合分子を含み、第１及び第２のＩｇ　$C_{H}3$ドメインが、少なくとも１つのアミノ酸で互いに異なり、少なくとも１つのアミノ酸の差異が、アミノ酸の差異を欠く二重特異性抗原結合分子と比較して、プロテインＡへの多重特異性抗原結合分子の結合を低減する。一実施形態では、第１のＩｇ　$C_{H}3$ドメインはプロテインＡに結合し、第２のＩｇ　$C_{H}3$ドメインは、例えば、Ｈ９５Ｒ修飾（ＩＭＧＴエクソン番号付けによる；ＥＵ番号付けによるＨ４３５Ｒ）など、プロテインＡ結合を低減又は消失させる変異を含む。第２の$C_{H}3$は、Ｙ９６Ｆ修飾（ＩＭＧＴによる；ＥＵによるＹ４３６Ｆ）を更に含み得る。第２の$C_{H}3$は、Ｌ１０５Ｐ修飾（ＩＭＧＴによる；ＥＵによるＬ４５５Ｐ）を更に含み得る。例えば、米国特許第８，５８６，７１３号を参照されたい。第２の$C_{H}3$に見られ得る更なる修飾としては、以下が挙げられる：ＩｇＧ１抗原結合分子の場合、Ｄ１６Ｅ、Ｌ１８Ｍ、Ｎ４４Ｓ、Ｋ５２Ｎ、Ｖ５７Ｍ、及びＶ８２Ｉ（ＩＭＧＴによる、ＥＵではＤ３５６Ｅ、Ｌ３５８Ｍ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｖ３９７Ｍ、及びＶ４２２Ｉ）、ＩｇＧ２抗原結合分子の場合、Ｎ４４Ｓ、Ｋ５２Ｎ、及びＶ８２Ｉ（ＩＭＧＴ、ＥＵではＮ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、及びＶ４２２Ｉ）、並びにＩｇＧ４抗原結合分子の場合、Ｑ１５Ｒ、Ｎ４４Ｓ、Ｋ５２Ｎ、Ｖ５７Ｍ、Ｒ６９Ｋ、Ｅ７９Ｑ、及びＶ８２Ｉ（ＩＭＧＴによる、ＥＵではＱ３５５Ｒ、Ｎ３８４Ｓ、Ｋ３９２Ｎ、Ｖ３９７Ｍ、Ｒ４０９Ｋ、Ｅ４１９Ｑ、及びＶ４２２Ｉ）。

【０１４１】

特定の実施形態では、Ｆｃドメインは、２つ以上の免疫グロブリンアイソタイプに由来するＦｃ配列を組み合わせたキメラであってもよい。例えば、キメラＦｃドメインは、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、又はヒトＩｇＧ４　$C_{H}2$領域に由来する$C_{H}2$配列の一部

又は全て、及びヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、又はヒトＩｇＧ４に由来するＣ$_{H}$３配列の一部又は全てを含み得る。キメラＦｃドメインはまた、キメラヒンジ領域を含み得る。例えば、キメラヒンジは、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、又はヒトＩｇＧ４ヒンジ領域に由来する「下部ヒンジ」配列と組み合わせられた、ヒトＩｇＧ１、ヒトＩｇＧ２、又はヒトＩｇＧ４ヒンジ領域に由来する「上部ヒンジ」配列を含み得る。本明細書に記載の抗原結合分子のうちのいずれかに含まれ得るキメラＦｃドメインの特定の例は、Ｎ末端からＣ末端に向かって、［ＩｇＧ４　Ｃ$_{H}$１］－［ＩｇＧ４上部ヒンジ］－［ＩｇＧ２下部ヒンジ］－［ＩｇＧ４　ＣＨ２］－［ＩｇＧ４　ＣＨ３］を含む。本明細書に記載の抗原結合分子のうちのいずれかに含まれ得るキメラＦｃドメインの別の例は、Ｎ－末端からＣ末端に向かって、［ＩｇＧ１　Ｃ$_{H}$１］－［ＩｇＧ１上部ヒンジ］－［ＩｇＧ２下部ヒンジ］－［ＩｇＧ４　ＣＨ２］－［ＩｇＧ１　ＣＨ３］を含む。本発明の抗原結合分子のうちのいずれかに含まれ得るキメラＦｃドメインのこれら及び他の例は、米国特許第９，３５９，４３７号に説明されており、その全体が本明細書に組み込まれる。これらの一般的な構造的配置を有するキメラＦｃドメイン及びその変異体は、変化したＦｃ受容体結合を有し得、その結果Ｆｃエフェクター機能に影響を与える。

【０１４２】

配列バリアント

本発明の抗原結合分子及び多重特異性抗原結合分子は、個々の抗原結合ドメインが由来する、対応する生殖系列配列と比較して、重鎖及び軽鎖可変ドメインのフレームワーク及び／又はＣＤＲ領域における１つ以上のアミノ酸置換、挿入、及び／又は欠失を含み得る。そのような変異は、本明細書に開示されるアミノ酸配列を、例えば公開抗原結合分子配列データベースから入手可能な生殖系列配列と比較することによって容易に確認され得る。本明細書に開示される例示的アミノ酸配列であって、１つ以上のフレームワーク及び／又はＣＤＲ領域内の１つ以上のアミノ酸が、抗原結合分子が由来する生殖系列配列の対応する残基、又は別のヒト生殖系列配列の対応する残基、又は対応する生殖系列残基の保存的アミノ酸置換に変異している（そのような配列変化は、本明細書において集合的に「生殖系列変異」と称される）、例示的アミノ酸配列のいずれかに由来する抗原結合ドメインを、本発明の抗原結合分子は含んでいてもよい。当業者であれば、本明細書に開示される重鎖及び軽鎖可変領域配列から開始して、１つ以上の個々の生殖系列変異又はそれらの組み合わせを含む、多くの抗原結合分子を容易に産生することができる。特定の実施形態では、Ｖ$_{H}$ドメイン及び／又はＶ$_{L}$ドメイン内のフレームワーク残基及び／又はＣＤＲ残基の全てが、抗原結合ドメインが元々由来した元の生殖系列配列に見出される残基に再び変異される。他の実施形態では、特定の残基のみ、例えば、ＦＲ１の最初の８アミノ酸内、若しくはＦＲ４の最後の８アミノ酸内に見出される変異残基のみ、又はＣＤＲ１、ＣＤＲ２、若しくはＣＤＲ３内に見出される変異残基のみが、元の生殖系列配列に再び変異される。他の実施形態では、１つ以上のフレームワーク残基及び／又はＣＤＲ残基が、異なる生殖系列配列（すなわち、抗原結合ドメインが元々由来した生殖系列配列とは異なる生殖系列配列）の対応する残基に変異される。

【０１４３】

更に、抗原結合ドメインは、フレームワーク及び／又はＣＤＲ領域内に２つ以上の生殖系列変異の任意の組み合わせを含有してもよく、例えば、特定の個々の残基が、特別な生殖系列配列の対応する残基に変異する一方で、元の生殖系列配列とは異なる特定の他の残基が維持されるか、又は異なる生殖系列配列の対応する残基に変異する。得られると、１つ以上の生殖系列変異を含有する抗原結合ドメインは、結合特異性の改善、結合親和性の増大、アンタゴニスト又はアゴニストの生物学的特性の改善又は増強（場合によっては）、免疫原性の減少などの１つ以上の所望の特性について容易に試験することができる。この一般的な様式で取得された１つ以上の抗原結合ドメインを含む多重特異性抗原結合分子は、本開示に包含される。

【０１４４】

ｐＨ依存的結合

本発明は、ｐＨ依存的結合特性を有する抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子を含む。例えば、本発明の抗ＣＤ３８抗原結合アームは、中性ｐＨと比較して酸性ｐＨでＣＤ３８への結合の減少を示し得る。あるいは、本発明の抗ＣＤ３８抗原結合アームは、中性ｐＨと比較して酸性ｐＨでＣＤ３８への結合の増強を示し得る。「酸性ｐＨ」という表現には、約６．２未満、例えば、約６．０、５．９５、５．９、５．８５、５．８、５．７５、５．７、５．６５、５．６、５．５５、５．５、５．４５、５．４、５．３５、５．３、５．２５、５．２、５．１５、５．１、５．０５、５．０以下のｐＨ値が含まれる。本明細書で使用される場合、「中性ｐＨ」という表現は、約７．０～約７．４のｐＨを意味する。「中性ｐＨ」という表現には、約７．０、７．０５、７．１、７．１５、７．２、７．２５、７．３、７．３５、及び７．４のｐＨ値が含まれる。

【０１４５】

特定の例では、「中性ｐＨと比較して酸性ｐＨで・・・への結合の低減」は、酸性ｐＨでその抗原に結合する抗原結合分子のK_D値と、中性ｐＨでその抗原に結合する抗原結合分子のK_D値との比（又はその逆）で表される。例えば、抗原結合分子は、抗体又はその抗原結合断片が、約３．０以上の酸性／中性K_D比を呈する場合、発明の目的のために、「中性ｐＨと比較して酸性ｐＨでＣＤ３８への結合の低減」を呈するとみなされ得る。特定の例示的な実施形態では、本発明の抗原結合分子に対する酸性／中性K_D比は、約３．０、３．５、４．０、４．５、５．０、５．５、６．０、６．５、７．０、７．５、８．０、８．５、９．０、９．５、１０．０、１０．５、１１．０、１１．５、１２．０、１２．５、１３．０、１３．５、１４．０、１４．５、１５．０、２０．０、２５．０、３０．０、４０．０、５０．０、６０．０、７０．０、１００．０、又はそれ以上とすることができる。

【０１４６】

ｐＨ依存的結合特性を有する抗原結合分子は、例えば、中性ｐＨと比べて酸性のｐＨにおいて、特定の抗原との結合の低減（又は結合の増強）に対して抗原結合分子の集合をスクリーニングすることによって得られ得る。加えて、アミノ酸レベルにおける抗原結合ドメインの修飾は、ｐＨ依存的特性を有する抗原結合分子をもたらし得る。例えば、抗原結合ドメイン（例えば、ＣＤＲ内）の１つ以上のアミノ酸をヒスチジン残基によって置換することによって、中性ｐＨと比べ酸性ｐＨにおいて低減した抗原結合を有する抗原結合分子が得られ得る。

【０１４７】

Ｆｃバリアントを含む抗原結合分子

本発明の特定の実施形態によると、例えば、中性ｐＨと比較して酸性ｐＨで、ＦｃＲｎ受容体への抗原結合分子結合を増強するか、又は減少させる１つ以上の変異を含むＦｃドメインを含む、抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子が提供される。例えば、本発明は、ＦｃドメインのC_H2又はC_H3領域に変異を含む抗原結合分子を含み、突然変異は、酸性環境において（例えば、ｐＨが約５．５～約６．０の範囲のエンドソームにおいて）ＦｃＲｎに対するＦｃドメインの親和性を増加させる。そのような変異は、動物に投与されたときの抗原結合分子の血清半減期の延長をもたらし得る。そのようなＦｃ修飾の非限定的な例には、例えば、２５０位（例えば、Ｅ若しくはＱ）、２５０位及び４２８位（例えば、Ｌ若しくはＦ）、２５２位（例えば、Ｌ／Ｙ／Ｆ／Ｗ若しくはＴ）、２５４位（例えば、若しくはＴ）、及び２５６位（例えば、Ｓ／Ｒ／Ｑ／Ｅ／Ｄ若しくはＴ）における修飾、又は４２８位及び／若しくは４３３位（例えば、Ｈ／Ｌ／Ｒ／Ｓ／Ｐ／Ｑ若しくはＫ）及び／若しくは４３４位（例えば、Ｈ／Ｆ若しくはＹ）における修飾、又は２５０位及び／若しくは４２８位における修飾、又は３０７位若しくは３０８位（例えば、３０８Ｆ、Ｖ３０８Ｆ）、及び４３４位における修飾が含まれる。一実施形態では、修飾は、４２８Ｌ（例えば、Ｍ４２８Ｌ）及び４３４Ｓ（例えば、Ｎ４３４Ｓ）の修飾、４２８Ｌ、２５９Ｉ（例えば、Ｖ２５９Ｉ）、及び３０８Ｆ（例えば、Ｖ３０８Ｆ）の修飾、４３３Ｋ（例えば、Ｈ４３３Ｋ）及び４３４（例えば、４３４Ｙ）の修飾、２５２、２５４、及び２５６（例えば、２５２Ｙ、２５４Ｔ、及び２５６Ｅ）の修飾、２５０Ｑ及

び４２８Ｌの修飾（例えば、Ｔ２５０Ｑ及びＭ４２８Ｌ）、並びに３０７及び／又は３０８の修飾（例えば、３０８Ｆ及び／又は３０８Ｐ）を含む。

【０１４８】

例えば、本開示は、以下からなる群から選択される変異の１つ以上の対又は群を含むＦｃドメインを含む、抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子を含む：２５０Ｑ及び２４８Ｌ（例えば、Ｔ２５０Ｑ及びＭ２４８Ｌ）；２５２Ｙ、２５４Ｔ及び２５６Ｅ（例えば、Ｍ２５２Ｙ、Ｓ２５４Ｔ及びＴ２５６Ｅ）；４２８Ｌ及び４３４Ｓ（例えば、Ｍ４２８Ｌ及びＮ４３４Ｓ）；並びに４３３Ｋ及び４３４Ｆ（例えば、Ｈ４３３Ｋ及びＮ４３４Ｆ）。前述のＦｃドメイン変異、及び本明細書に開示される抗原結合分子可変ドメイン内の他の変異の全ての可能な組み合わせが、本発明の範囲内であることが企図される。

【０１４９】

抗原結合分子及び多重特異性抗原結合分子の生物学的特徴

本明細書では、ＭＯＬＰ８細胞上で発現したＣＤ３８に結合する抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子が提供される。実施例６に示されるように、ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２（ＲＥＧＮ７６３３、ＲＥＧＮ７６４７、及びＲＥＧＮ７６５０）及び１＋１（ＲＥＧＮ７１５０）二重特異性抗体の用量依存的結合を、ＭＯＬＰ８細胞の存在下で観察し、最大ｇＭＦＩは８．８×10^{4}～１．４×10^{5}の範囲であり、EC_{50}は４．２３×10^{-9}Ｍ～９．２７×10^{-9}Ｍの範囲であった。

【０１５０】

本明細書では、４－１ＢＢを発現するように操作されたＨＥＫ２９３細胞上に発現された４－１ＢＢに結合する抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子が提供される。ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２（ＲＥＧＮ７６３３、ＲＥＧＮ７６４７、及びＲＥＧＮ７６５０）及び１＋１（ＲＥＧＮ７１５０）二重特異性抗体の用量依存的結合を、ＨＥＫ２９３／ｈ４－１ＢＢ細胞の存在下で観察し、最大ｇＭＦＩは７．４ｘ10^{5}～２．４ｘ10^{6}の範囲であり、EC_{50}は１．４７ｘ10^{-8}Ｍ～９．９７ｘ10^{-10}Ｍの範囲であった。

【０１５１】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋１及び１＋２）多重特異性抗原結合分子は、ＣＤ３８＋標的細胞を４－１ＢＢ受容体陽性Ｔ細胞と架橋することによって、４－１ＢＢの天然リガンドを模倣する。そうすることで、構築物は、「シグナル２」を提供し、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）×ＣＤ３二重特異性抗体によって提供される「シグナル１」又はＡＰＣによって提供される同種応答の存在下でＴ細胞の活性化を増強する。実施例７に示されるように、標的及び「シグナル１」（ＲＥＧＮ１９７９によって提供される）の存在下で、多重特異性抗原結合分子は、Ｔ細胞活性化アッセイにおいて、対応アイソタイプ対照よりも高い最大ＩＬ－２応答及びより大きな効力をもたらした。実施例８に示されるように、多重特異性抗原結合分子は、Ｆａｂ２とＦａｂ３との間のリンカー長が変化した場合でも、ＩＬ－２及びＩＦＮγの用量依存的増加、並びにより高い効力を有した。

【０１５２】

特定の実施形態によると、本明細書に提供される多重特異性抗原結合分子は、操作されたレポーターアッセイで実証されるように、ＣＤ３８を発現する標的細胞の存在下で、４－１ＢＢ受容体を活性化し、４－１ＢＢ活性を刺激する。実施例９に示されるように、異なるリンカー長を有する構築物を使用して、４－１ＢＢ活性化を達成した。

【０１５３】

特定の実施形態では、本明細書に提供される多重特異性抗原結合分子は、ＩＬ－２及びＩＦＮγ放出の用量依存的増加を引き起こす。実施例１０に示されるように、ＰＤ－Ｌ１を発現するように操作された同種ＮＡＬＭ－６細胞又はＮＡＬＭ－６細胞の存在下で、ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体治療（ＲＥＧＮ７６３３、ＲＥＧＮ７６４７、及びＲＥＧＮ７６５０）は、ＩＬ－２及びＩＦＮγ放出の用量依存的増加及びより大きな効力をもたらした。

【０１５４】
特定の実施形態によると、ＢＣＭＡ×ＣＤ３二重特異性抗体と組み合わせてインビボで投与された場合、多重特異性抗原結合分子を用いた治療は、いずれかの治療単独よりも優れている、より強力な抗腫瘍有効性をもたらす。実施例１１では、４×１０^{6}個のヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を腹腔内注射した免疫不全のＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}Ｉｌ２ｒｇ^{ｔｍ１Ｗｊｌ}／ＳｚＪ（ＮＳＧ）マウスに、ヒト多発性骨髄腫細胞を投与した。腫瘍細胞を受容した後、マウスを、０．４ｍｇ／ｋｇのＣＤ３結合対照二重特異性Ａｂ又はＢＣＭＡ×ＣＤ３（ＲＥＧＮ５４５８）ｂｓＡｂで、４ｍｇ／ｋｇの４－１ＢＢ結合対照二重特異性Ａｂ（１＋２フォーマット）又はＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋２フォーマット、ＲＥＧＮ９６８６）と組み合わせて治療した。治療の組み合わせを、７日目及び１４日目に更に２回、合計３回、投与した。ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる併用治療は、いずれかの療法単独よりも強力な組み合わせ抗腫瘍有効性を実証した。

【０１５５】
エピトープマッピング及び関連技術
本発明の抗原結合分子が結合するＣＤ３８及び／又は４－１ＢＢ上のエピトープは、ＣＤ３８又は４－１ＢＢタンパク質の３つ以上（例えば、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１３、１４、１５、１６、１７、１８、１９、２０個以上）のアミノ酸の単一連続配列からなり得る。あるいは、エピトープは、ＣＤ３８又は４－１ＢＢの複数の非連続的アミノ酸（又はアミノ酸配列）からなり得る。

【０１５６】
本明細書で使用される場合の「エピトープ」という用語は、パラトープとして知られている抗原結合分子ｐ．ｍ．の可変領域中の特異的抗原結合部位と相互作用する抗原決定基を指す。単一の抗原は、１つより多くのエピトープを有し得る。したがって、異なる抗原結合分子は、抗原上の異なる領域に結合し得、かつ異なる生物学的効果を有し得る。エピトープは、立体構造的又は直線状のいずれであってもよい。立体構造的エピトープは、直線状ポリペプチド鎖の異なるセグメントから空間的に並置されたアミノ酸によって生成される。直線状エピトープは、ポリペプチド鎖内の隣接するアミノ酸残基によって生成されるエピトープである。特定の状況では、エピトープは、抗原上の糖、ホスホリル基、又はスルホニル基の部分を含み得る。

【０１５７】
当業者にとって公知の様々な技術を使用して、抗原結合分子の抗原結合ドメインが、ポリペプチド又はタンパク質内の「１つ以上のアミノ酸と相互作用する」かどうかを決定することができる。例示的な技術としては、例えば、Ａｎｔｉｇｅｎ　ｂｉｎｄｉｎｇ　ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ、Ｈａｒｌｏｗ　ａｎｄ　Ｌａｎｅ（Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂｏｒ　Ｐｒｅｓｓ、Ｃｏｌｄ　Ｓｐｒｉｎｇ　Ｈａｒｂ．，ＮＹ）に記載されているような常套的な交差遮断アッセイ、アラニンスキャニング変異解析、ペプチドブロット解析（Ｒｅｉｎｅｋｅ，２００４，Ｍｅｔｈｏｄｓ　Ｍｏｌ　Ｂｉｏｌ　２４８：４４３－４６３）、及びペプチド切断解析などが挙げられる。更に、抗原のエピトープ切り出し、エピトープ抽出、及び化学修飾などの方法を用いることができる（Ｔｏｍｅｒ，２０００，Ｐｒｏｔｅｉｎ　Ｓｃｉｅｎｃｅ　９：４８７－４９６）。抗原結合分子の抗原結合ドメインが相互作用するポリペプチド内のアミノ酸を同定するために使用され得る別の方法は、質量分析によって検出される水素／重水素交換である。総称的な用語としては、水素／重水素交換は、対象タンパク質を重水素標識すること、次いで抗原結合分子をこの重水素標識タンパク質に結合させることを含む。次に、タンパク質／抗原結合分子複合体を水に移し、抗原結合分子によって保護された残基（重水素標識のまま残る）を除く全ての残基で、水素－重水素交換を生じさせる。抗原結合分子の解離後、標的タンパク質をプロテアーゼ切断及び質量分析解析にかけ、それと抗原結合分子が相互作用する特異的なアミノ酸に対応する重水素標識残基を明らかにする。例えば、Ｅｈｒｉｎｇ（１９９９）Ａｎａｌｙｔｉｃａｌ　Ｂｉｏｃｈｅｍｉｓｔｒｙ２６７（２）：２５２－２５９、Ｅｎｇｅｎ

ａｎｄ　Ｓｍｉｔｈ（２００１）Ａｎａｌ．　Ｃｈｅｍ．　７３：２５６Ａ－２６５Ａを参照されたい。抗原／抗原結合分子複合体のＸ線結晶構造解析も、エピトープマッピングの目的に使用され得る。

【０１５８】

本明細書では、本明細書に説明される特定の例示的な抗原結合アーム（例えば、本明細書の表１に記載のアミノ酸配列のうちのいずれかを含む抗原結合分子）のうちのいずれかと同じエピトープに結合する抗ＣＤ３８抗原結合アームＡ１が提供される。同様に、本発明はまた、ＣＤ３８への結合について、本明細書に説明される特定の例示的な抗原結合アーム（例えば、本明細書の表１に記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかを含む抗原結合分子）のうちのいずれかと競合する抗ＣＤ３８抗原結合アームＡ１も含む。

【０１５９】

本明細書では、第１の抗原結合ドメイン（Ｒ１）及び第２の抗原結合ドメイン（Ｒ２）を含む抗４－１ＢＢ抗原結合アームＡ２であって、Ｒ１又はＲ２のいずれかが、本明細書に説明される特定の例示的な抗原結合ドメイン（例えば、本明細書の表３又は表５に記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかを含む抗原結合アーム）のうちのいずれかと同じエピトープに結合する、抗４－１ＢＢ抗原結合アームＡ２が提供される。同様に、本発明はまた、４－１ＢＢへの結合について、本明細書に説明される特定の例示的な抗原結合ドメイン（例えば、本明細書の表３又は表５に記載されるアミノ酸配列のうちのいずれかを含む抗原結合アーム）のうちのいずれかと競合する抗４－１ＢＢ抗原結合分子も含む。

【０１６０】

同様に、本明細書では、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アーム（Ｆａｂ１）と、ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する第２の抗原結合アーム（Ｆａｂ２及びＦａｂ３）とを含む、多重特異性抗原結合分子であって、第１の抗原結合ドメインが、ＣＤ３８への結合について、本明細書に説明される特定の例示的なＣＤ３８特異的抗原結合アームのうちのいずれかと競合し、及び／又は第２の抗原結合アームが、４－１ＢＢへの結合について、本明細書に説明される特定の例示的な４－１ＢＢ特異的抗原結合Ｆａｂのうちのいずれかと競合する、多重特異性抗原結合分子が提供される。

【０１６１】

特定の抗原結合分子（例えば、多重特異性１＋２抗原結合分子）又はその抗原結合断片が、本発明の参照抗原結合分子と同じエピトープに結合するか、又は結合について競合するかどうかは、当該技術分野で知られている通例的な方法を使用することによって、容易に決定することができる。例えば、試験抗原結合分子が、本発明の参照多重特異性抗原結合分子と同じＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）上のエピトープに結合するかどうかを決定するために、参照多重特異性分子を、最初にＣＤ３８タンパク質（又は４－１ＢＢタンパク質）に結合させる。次に、ＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）分子に結合する試験抗原結合分子の能力が評価される。試験抗原結合分子が参照多重特異性抗原結合分子との飽和結合後にＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）に結合することができる場合、試験抗原結合分子は、参照多重特異性抗原結合分子とは異なるＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）のエピトープに結合すると結論付けられ得る。一方で、試験抗原結合分子が参照多重特異性抗原結合分子との飽和結合後にＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）分子に結合することができない場合、試験抗原結合分子は、参照多重特異性抗原結合分子によって結合されるエピトープと同じＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）のエピトープに結合し得る。追加の通例的な実験（例えば、ペプチド変異及び結合分析）を実施して、観察された試験抗原結合分子の結合の欠落が実際に、参照多重特異性抗原結合分子と同じエピトープに結合することが原因であるのか、又は立体遮断（又は別の現象）が、観察された結合の欠落の原因であるのかを確認することができる。この種の実験は、ＥＬＩＳＡ、ＲＩＡ、Ｂｉａｃｏｒｅ、フローサイトメトリー、又は当分野で利用可能な任意の他の定量的又は定性的な抗原結合分子結合アッセイを使用して実施することができる。本発明の特定の実施形態によると、競合結合アッセイで測定して、例えば、一方の抗原結合タンパク質の１、５、１０、２０、又は１００倍の過剰が、他方の結合を少なくとも５０％、しかし好ましくは７５％、９０％、又は９９％までも阻害する場

合、２つの抗原結合タンパク質は同一（又は重複）エピトープに結合する（例えば、Ｊｕｎｇｈａｎｓ　ｅｔ　ａｌ．，Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．１９９０：５０：１４９５－１５０２を参照されたい）。あるいは、一方の抗原結合タンパク質の結合を減少させる又は排除する抗原中の本質的に全てのアミノ酸突然変異が、他方の結合を減少させる又は排除する場合、２つの抗原結合タンパク質は同一エピトープに結合するとみなされる。一方の抗原結合タンパク質の結合を減少させる又は排除するアミノ酸変異のサブセットのみが、他方の結合を減少させる又は排除する場合、２つの抗原結合タンパク質は「重複エピトープ」を有するとみなされる。

【０１６２】

抗原結合分子又はその抗原結合ドメインが、参照抗原結合分子と結合に関して競合するかどうかを決定するために、以下の２つの方向性で上述の結合方法論が実施される：第１の方向性では、参照抗原結合分子を、飽和条件下でＣＤ３８タンパク質（又は４－１ＢＢタンパク質）に結合させ、その後、ＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）分子への試験抗原結合分子の結合を評価する。第２の方向性では、試験抗原結合分子を、飽和条件下でＣＤ３８タンパク質（又は４－１ＢＢタンパク質）に結合させ、その後、ＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）分子への参照抗原結合分子の結合を評価する。両方の方向性で、第１の（飽和）抗原結合分子のみがＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）分子に結合することができる場合、試験抗原結合分子及び参照抗原結合分子は、ＣＤ３８（又は４－１ＢＢ）への結合について競合すると結論付けられる。当業者によって理解されるように、参照抗原結合分子との結合について競合する抗原結合分子は、必ずしも参照抗原結合分子と同じエピトープに結合しないことがあるが、重複したエピトープ又は隣接するエピトープに結合することによって参照抗原結合分子の結合を立体的に遮断することがある。

【０１６３】

抗原結合ドメインの調製及び多重特異性分子の構築

特定の抗原に特異的な抗原結合ドメインは、当該技術分野で公知の任意の抗原結合分子生成技術によって調製され得る。得られると、２つの異なる抗原（例えば、ＣＤ３８及び４－１ＢＢ）に特異的な、本明細書に提供される異なる抗原結合ドメインを互いに適切に配置して、通例的な方法を使用して本発明の多重特異性抗原結合分子を産生することができる。（本発明の多重特異性抗原結合分子を構築するために使用され得る例示的な多重特異性抗原結合分子フォーマットの考察が、本明細書の他の箇所に提供されている）。特定の実施形態では、本発明の多重特異性抗原結合分子の個々の構成要素（例えば、重鎖及び軽鎖）のうちの１つ以上は、キメラ、ヒト化、又は完全ヒト抗原結合分子に由来する。そのような抗原結合分子を作製するための方法は、当該技術分野で周知である。例えば、本発明の多重特異性抗原結合分子の重鎖及び／又は軽鎖のうちの１つ以上を、ＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（商標）技術を使用して調製することができる。ＶＥＬＯＣＩＭＭＵＮＥ（商標）技術（又は任意の他のヒト抗原結合分子生成技術）を使用して、ヒト可変領域及びマウス定常領域を有する特定の抗原（例えば、ＣＤ３８又は４－１ＢＢ）に対する高親和性キメラ抗原結合分子が、最初に単離される。抗原結合分子は、親和性、選択性、エピトープなどを含む望ましい特徴について特性評価され、選択される。マウス定常領域は、所望のヒト定常領域と置換されて、本発明の多重特異性抗原結合分子に組み込むことができる完全ヒト重鎖及び／又は軽鎖を生成する。

【０１６４】

遺伝子操作された動物を使用して、ヒト多重特異性抗原結合分子を作製してもよい。例えば、内因性マウス免疫グロブリン軽鎖可変配列を再配列及び発現することができない遺伝子改変マウスを使用してもよく、このマウスは、内因性マウスカッパ座位でマウスカッパ定常遺伝子に作動可能に連結されたヒト免疫グロブリン配列によってコードされる１つ又は２つのヒト軽鎖可変ドメインのみを発現する。そのような遺伝子改変マウスを使用して、２つの異なるヒト軽鎖可変領域遺伝子セグメントのうちの１つに由来する可変ドメインを含む、同一の軽鎖と会合する２つの異なる重鎖を含む、完全ヒト抗原結合分子を産生することができる。（例えば、ＵＳ２０１１／０１９５４５４を参照されたい）。完全ヒ

トとは、抗原結合分子、又はその抗原結合断片若しくはその免疫グロブリンドメインの各ポリペプチドの全長にわたってヒト配列に由来するＤＮＡによりコードされるアミノ酸配列を含む、抗原結合分子又はその抗原結合断片若しくはその免疫グロブリンドメインを指す。いくつかの事例では、完全ヒト配列は、ヒトに内因性のタンパク質に由来する。他の事例では、完全ヒトタンパク質又はタンパク質配列は、各構成要素配列がヒト配列に由来するキメラ配列を含む。いずれか１つの理論に拘束されないが、キメラタンパク質又はキメラ配列は、一般的に、例えば、任意の野生型ヒト免疫グロブリン領域又はドメインと比較して、構成要素配列の接合部における免疫原性エピトープの生成を最小限にするように設計されている。

【０１６５】

生物学的等価物

本明細書では、本明細書に開示される例示的な分子のものとは異なるが、ＣＤ３８及び／又は４－１ＢＢに結合する能力を保持するアミノ酸配列を有する抗原結合分子が提供される。そのようなバリアント分子は、親配列と比較してアミノ酸の１つ以上の付加、欠失、又は置換を含み得るが、説明された多重特異性抗原結合分子の生物学的活性とは本質的に同等である生物学的活性を呈する。

【０１６６】

本明細書に記載される例示的な抗原結合分子のうちのいずれかと生物学的に等価である抗原結合分子は、類似した実験条件下で、単回投与又は複数回投与のいずれかで同モル投与量で投与されたときに、その吸収の速度及び範囲が有意な差を示さない場合、薬学的等価物又は薬学的代替物である。いくつかの抗原結合タンパク質は、これらの吸収の程度は同等であるがこれらの吸収速度は同等ではなく、更に、吸収速度のこのような差異が、意図的であり、ラベル表示に反映されており、例えば、慢性使用において有効な体内薬物濃度の達成に不可欠ではなく、研究された特定の医薬品にとって医学的に重要ではないとみなされるため、生物学的同等物であるとみなされ得る場合、同等物又は薬学的代替物とみなされる。

【０１６７】

一実施形態では、２つの抗原結合タンパク質は、その安全性、純度、及び効力において臨床的に意義のある差異がなければ、生物学的に等価である。

【０１６８】

一実施形態では、患者を参照製品と生物学的製品との間で一回以上切り替えることができ、そのような切り替えがない継続的療法と比較して、免疫原性の臨床的に有意な変化又は有効性の減少を含む、有害作用のリスクの予期される増加がない場合、２つの抗原結合タンパク質は、生物学的に等価である。

【０１６９】

一実施形態では、２つの抗原結合タンパク質は、これらが両方とも、１つ以上の使用条件について１つ以上の共通の機序によって、このような機序の既知の程度まで作用する場合に、生物学的に等価である。

【０１７０】

生物学的等価性は、インビボ及びインビトロの方法によって実証され得る。生物学的等価性測定法には、例えば、（ａ）抗原結合分子又はその代謝産物の濃度が、血液、血漿、血清、又は他の生物学的流体中で時間の関数として測定される、ヒト又は他の哺乳類におけるインビボ検査、（ｂ）ヒトインビボ生体利用効率データと相関しており、このデータを合理的に予測するインビトロ検査、（ｃ）抗原結合分子（又はその標的）の適切な急性薬理学的効果が時間の関数として測定される、ヒト又は他の哺乳動物におけるインビボ検査、及び（ｄ）抗原結合タンパク質の安全性、有効性、又は生体利用効率若しくは生物学的同等性を立証する、適切に管理された臨床試験が含まれる。

【０１７１】

本明細書に記載される例示的な多重特異性抗原結合分子の生物学的に等価なバリアントは、例えば、残基若しくは配列の様々な置換を生じること、又は生物学的活性に必要とさ

れない末端若しくは内部の残基若しくは配列を欠失することによって構築され得る。例えば、生物学的活性にとって必須ではないシステイン残基は、再生の際の不必要又は不正確な分子内ジスルフィド架橋の形成を防止するために、欠失又は他のアミノ酸で置換することができる。他の文脈では、生物学的に等価の抗原結合タンパク質には、分子のグリコシル化特性を修飾するアミノ酸変化、例えば、グリコシル化を排除又は除去する変異を含む、本明細書に記載される例示的な多重特異性抗原結合分子のバリアントが含まれ得る。

【０１７２】

種選択性及び種交差反応性

本発明の特定の実施形態によると、ヒト４－１ＢＢには結合するが、他の種由来の４－１ＢＢには結合しない抗原結合分子が提供される。ヒトＣＤ３８には結合するが、他の種由来のＣＤ３８には結合しない抗原結合分子もまた提供される。本発明はまた、ヒト４－１ＢＢ及び１つ以上の非ヒト種由来のＣＤ３８に結合する抗原結合分子、及び／又はヒト４－１ＢＢ及び１つ以上の非ヒト種由来の４－１ＢＢに結合する抗原結合分子を含む。

【０１７３】

本発明の特定の例示的な実施形態によれば、ヒトＣＤ３８及び／又はヒト４－１ＢＢに結合し、場合によっては、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、アレチネズミ、ブタ、ネコ、イヌ、ウサギ、ヤギ、ヒツジ、ウシ、ウマ、ラクダ、カニクイザル、マーモセット、アカゲザル、又はチンパンジーのＣＤ３８及び／又は４－１ＢＢのうちの１つ以上に結合し得る又は結合し得ない抗原結合分子が提供される。例えば、本明細書に開示される特定の例示的な実施形態では、ヒトＣＤ３８及びカニクイザルＣＤ３８に結合する第１の抗原結合アームと、第１の抗原結合ドメイン及び第２の抗原結合ドメインを含む第２の抗原結合アームとを含む多重特異性抗原結合分子であって、第２の抗原結合アームが、ヒト４－１ＢＢに特異的に結合する、多重特異性抗原結合分子、又はヒト４－１ＢＢ及びカニクイザル４－１ＢＢに結合する第１及び第２の抗原結合ドメインを含む第２の抗原結合アームと、ヒトＣＤ３８に特異的に結合する第１の抗原結合アームとを含む、多重特異性抗原結合分子が提供される。

【０１７４】

治療用製剤及び投与

本発明は、本明細書に開示される多重特異性抗原結合分子を含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、適切な担体、賦形剤、及び輸送、送達、忍容性などの改善をもたらす他の剤とともに製剤化される。数多くの適切な製剤が、全ての薬剤師に既知の処方集：Ｒｅｍｉｎｇｔｏｎ‘ｓ Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔｉｃａｌ Ｓｃｉｅｎｃｅｓ，Ｍａｃｋ Ｐｕｂｌｉｓｈｉｎｇ Ｃｏｍｐａｎｙ，Ｅａｓｔｏｎ，ＰＡにおいて見出され得る。これらの製剤としては、例えば、粉末、ペースト、軟膏、ゼリー、ワックス、油、脂質、小胞を含有する脂質（カチオン性又はアニオン性）（例えば、ＬＩＰＯＦＥＣＴＩＮ（商標）、Ｌｉｆｅ Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ、Ｃａｒｌｓｂａｄ，ＣＡ）、ＤＮＡコンジュゲート、無水吸収ペースト、水中油及び油中水乳剤、乳剤カルボワックス（様々な分子量のポリエチレングリコール）、半固体ゲル、並びにカルボワックスを含有する半固体混合物が挙げられる。Ｐｏｗｅｌｌ ｅｔ ａｌ．“Ｃｏｍｐｅｎｄｉｕｍ ｏｆ ｅｘｃｉｐｉｅｎｔｓ ｆｏｒ ｐａｒｅｎｔｅｒａｌ ｆｏｒｍｕｌａｔｉｏｎｓ”ＰＤＡ（１９９８）Ｊ Ｐｈａｒｍ Ｓｃｉ Ｔｅｃｈｎｏｌ ５２：２３８－３１１も参照されたい。

【０１７５】

患者に投与される多重特異性抗原結合分子の用量は、患者の年齢及び体格、標的の疾患、状態、投与経路などに応じて変化し得る。好ましい用量は、典型的には体重又は体表面積に従い計算される。本発明の多重特異性抗原結合分子が、成人患者において治療目的のために使用される場合、本発明の多重特異性抗原結合分子を通常、体重１ｋｇ当たり約０．０１～約２０ｍｇ、より好ましくは体重１ｋｇ当たり約０．０２～約７ｍｇ、約０．０３～約５ｍｇ、又は約０．０５～約３ｍｇを単回投与で、静脈内投与することが有利であり得る。状態の重症度に応じて、治療の頻度及び期間を調整できる。多重特異性抗原結合

分子を投与するための効果的な投与量及びスケジュールは、経験的に決定され得るが、例えば、患者の経過は、定期的な評価によってモニタリングされ得、それに応じて用量が調整される。更に投与量の種間スケーリングは、当分野に周知の方法を使用して実施することができる（例えば、Ｍｏｒｄｅｎｔｉ ｅｔ ａｌ．，１９９１，Ｐｈａｒｍａｃｅｕｔ．Ｒｅｓ．８：１３５１）。

【０１７６】

様々な送達システムが公知であり、本発明の医薬組成物を投与するために使用され得る。例えば、リポソーム、微粒子、マイクロカプセルへの封入、変異ウイルスを発現することができる組換え細胞、受容体依存性エンドサイトーシスなど（例えば、Ｗｕ ｅｔ ａｌ．，１９８７，Ｊ．Ｂｉｏｌ．Ｃｈｅｍ．２６２：４４２９－４４３２を参照されたい）。導入方法としては限定されないが、皮内経路、筋肉内経路、腹腔内経路、静脈内経路、皮下経路、鼻腔内経路、硬膜外経路及び経口経路が挙げられる。組成物は、任意の便宜的な経路によって、例えば、注入若しくはボーラス注射によって、上皮若しくは粘膜皮膚内層（ｌｉｎｉｎｇｓ）（例えば、口腔粘膜、直腸及び腸粘膜など）を通した吸収によって投与され得、かつ他の生物学的活性剤と一緒に投与され得る。投与は全身性又は局所性であってもよい。

【０１７７】

本発明の医薬組成物は、標準的な針及びシリンジを用いて、皮下、筋肉内、又は静脈内に送達することができる。加えて、皮下送達に関して、ペン型送達デバイスは、本発明の医薬組成物の送達において、容易に適用される。そのようなペン型送達デバイスは、再利用可能であるか、又は使い捨てであり得る。再利用可能なペン型送達デバイスは、概して、医薬組成物を含有する交換可能なカートリッジを利用する。カートリッジ内部の医薬組成物の全てが投与され、カートリッジが空になると、空のカートリッジは、容易に廃棄することができ、医薬組成物を含有する新しいカートリッジと交換され得る。次に、ペン型送達デバイスは再利用することができる。使い捨てペン型送達デバイスでは、交換可能なカートリッジはない。むしろ、使い捨てペン型送達デバイスは、医薬組成物がデバイス内部のリザーバ内に保持された事前に充填された状態で販売される。リザーバの医薬組成物が空になると、デバイス全体が廃棄される。

【０１７８】

多数の再利用可能なペン型及び自動注入装置送達デバイスは、本発明の医薬組成物の皮下送達において用途を見出す。例としては、ほんの数例を挙げると、限定されないが、ＡＵＴＯＰＥＮ（商標）（Ｏｗｅｎ Ｍｕｍｆｏｒｄ，Ｉｎｃ．、Ｗｏｏｄｓｔｏｃｋ，ＵＫ）、ＤＩＳＥＴＲＯＮＩＣ（商標）ペン（Ｄｉｓｅｔｒｏｎｉｃ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｂｅｒｇｄｏｒｆ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、ＨＵＭＡＬＯＧ ＭＩＸ７５／２５（商標）ペン、ＨＵＭＡＬＯＧ（商標）ペン、ＨＵＭＡＬＩＮ ７０／３０（商標）ペン（Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ ａｎｄ Ｃｏ．、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，ＩＮ）、ＮＯＶＯＰＥＮ（商標）Ｉ、ＩＩ、及びＩＩＩ（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＮＯＶＯＰＥＮ ＪＵＮＩＯＲ（商標）（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＢＤ（商標）ペン（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，ＮＪ）、ＯＰＴＩＰＥＮ（商標）、ＯＰＴＩＰＥＮ ＰＲＯ（商標）、ＯＰＴＩＰＥＮ ＳＴＡＲＬＥＴ（商標）、及びＯＰＴＩＣＬＩＫ（商標）（ｓａｎｏｆｉ－ａｖｅｎｔｉｓ、Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）が挙げられる。本開示の医薬組成物の皮下送達での用途を有するディスポーザブルペン及び／又は自動注射器送達装置の例としては、いくつか例を挙げると、ＳＯＬＯＳＴＡＲ（商標）ペン（ｓａｎｏｆｉ－ａｖｅｎｔｉｓ）、ＦＬＥＸＰＥＮ（商標）（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ）、及びＫＷＩＫＰＥＮ（商標）（Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ）、ＳＵＲＥＣＬＩＣＫ（商標）Ａｕｔｏｉｎｊｅｃｔｏｒ（Ａｍｇｅｎ、Ｔｈｏｕｓａｎｄ Ｏａｋｓ，ＣＡ）、ＰＥＮＬＥＴ（商標）（Ｈａｓｅｌｍｅｉｅｒ、Ｓｔｕｔｔｇａｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、ＥＰＩＰＥＮ（Ｄｅｙ，Ｌ．Ｐ．）、及びＨＵＭＩＲＡ（商標）Ｐｅｎ（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ ＩＬ）が挙げられるが

、これらに限定されない。

【０１７９】

特定の状況では、医薬組成物は、制御放出系で送達され得る。一実施形態では、ポンプを使用してもよい（上記のＬａｎｇｅｒ、Ｓｅｆｔｏｎ，１９８７，ＣＲＣ Ｃｒｉｔ．Ｒｅｆ．Ｂｉｏｍｅｄ．Ｅｎｇ．１４：２０１を参照されたい）。別の実施形態では、多量体性材料を使用することができる。Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ，Ｌａｎｇｅｒ ａｎｄ Ｗｉｓｅ（ｅｄｓ．），１９７４，ＣＲＣ Ｐｒｅｓ．，Ｂｏｃａ Ｒａｔｏｎ，Ｆｌｏｒｉｄａを参照されたい。更に別の実施形態では、制御放出系を組成物の標的の近傍に配置することができる。したがって全身用量のほんの一部しか必要としない（例えば、Ｇｏｏｄｓｏｎ，１９８４，Ｍｅｄｉｃａｌ Ａｐｐｌｉｃａｔｉｏｎｓ ｏｆ Ｃｏｎｔｒｏｌｌｅｄ Ｒｅｌｅａｓｅ、上記、ｖｏｌ．２，ｐｐ．１１５－１３８を参照されたい）。他の制御放出系は、Ｌａｎｇｅｒ，１９９０，Ｓｃｉｅｎｃｅ ２４９：１５２７－１５３３によるレビューにおいて検討されている。

【０１８０】

注入可能な調製物は、静脈内、皮下、皮内、及び筋肉内注射、点滴などのための剤形を含み得る。これらの注射用調製物は、公知の方法によって調製されてもよい。例えば、注射可能な調製物は、例えば、注射に従来使用される無菌水性媒体又は油性媒体に、上述される抗原結合分子又はその塩を溶解、懸濁、又は乳化させることによって調製され得る。注射用水性媒体としては、例えば、生理食塩水、グルコースを含有する等張液、及び他の助剤などがあり、これらは、アルコール（例えば、エタノール）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール）、非イオン性界面活性剤［例えば、ポリソルベート８０、ＨＣＯ－５０（水素化ヒマシ油のポリオキシエチレン（５０ｍｏｌ）付加物）］などの適切な可溶化剤と組み合わせて使用され得る。油性媒体としては、例えば、ゴマ油、ダイズ油などが採用され、これらは安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールなどの可溶化剤と併用され得る。このようにして調製した注射液は、好ましくは、適切なアンプル中に充填される。

【０１８１】

有利に、上述の経口又は非経口使用のための医薬組成物は、活性成分の用量を適合させるのに適した単位用量で剤形に調製される。単位用量におけるこのような剤形には、例えば、錠剤、丸剤、カプセル剤、注射剤（アンプル剤）、坐剤などが含まれる。含まれる前述の抗原結合分子の量は、一般的に単位用量で剤形当たり約１～約１０００ｍｇであり、特に注射の形態では、上記の抗原結合分子は約１～約１００ｍｇに含有されることが好ましく、及びその他の剤形に対しては約１０～約２５０ｍｇに含有されることが好ましい。いくつかの実施形態では、単位用量は、約７５０ｍｇ、８００ｍｇ、９００ｍｇ、又は１０００ｍｇと同じであり得る。

【０１８２】

抗原結合分子の治療的使用

本発明は、その必要のある対象に、ＣＤ３８及び４－１ＢＢに特異的に結合する多重特異性抗原結合分子の治療用組成物を投与することを含む方法を含む。治療用組成物は、本明細書に開示される多重特異性抗原結合分子のうちのいずれか、及び薬学的に許容される担体又は希釈剤を含み得る。本明細書で使用される場合、「その必要のある対象」という表現は、１つ以上のがんの症状又は兆候を示すヒト又は非ヒト動物（例えば、腫瘍を発現しているか、又は以下に記載されるがんのいずれかを患う対象）、又はそうでなければ、ＣＤ３８活性の阻害若しくは減少、又はＣＤ３８＋細胞（例えば、多発性骨髄腫細胞）の枯渇から利益を得るであろう対象を意味する。

【０１８３】

本発明の多重特異性抗原結合分子（及びそれを含む治療用組成物）は、特に、免疫応答の刺激、活性化及び／又は標的化が有益である任意の疾患又は障害を治療するために有用である。特に、本発明の抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子は、

ＣＤ３８及び／若しくはＢＣＭＡの発現若しくは活性、又はＣＤ３８＋及び／若しくはＢＣＭＡ＋細胞の増殖に関連又は媒介される任意の疾患又は障害の治療、予防、及び／又は改善に使用され得る。本発明の治療方法が達成される作用機序には、エフェクター細胞の存在下で、例えばＣＤ３８を発現する細胞を、例えば、ＣＤＣ、アポトーシス、ＡＤＣＣ、食作用、又はこれらの機序のうちの２つ以上の組み合わせによって殺傷することが含まれる。本発明の多重特異性抗原結合分子を使用して阻害又は殺傷することができるＣＤ３８を発現する細胞には、例えば、多発性骨髄腫細胞が含まれる。

【０１８４】

本開示の多重特異性抗原結合分子は、例えば、多発性骨髄腫、Ｂ細胞白血病、肝細胞癌、非小細胞肺がん、黒色腫、膵管腺癌、神経膠腫、又は乳がん、又はＣＤ３８＋細胞を有することを部分的に特徴とする別のがんを含む、ＣＤ３８発現に関連する疾患又は障害を治療するために使用され得る。

【０１８５】

特定の実施形態によると、抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２抗原結合分子は、対象における形質細胞腫瘍の増殖を阻害するのに有用である。いくつかの態様では、形質細胞腫瘍は、多発性骨髄腫である。

【０１８６】

本開示の多重特異性抗原結合分子は、対象における腫瘍の増殖を阻害するために使用され得る。腫瘍が、多発性骨髄腫、リンパ腫、Ｂ細胞白血病、肝細胞癌、非小細胞肺がん、黒色腫、膵管腺癌、神経膠腫、若しくは乳がん、又はＣＤ３８＋細胞を有することを部分的に特徴とする別のがんからなる群から選択される。

【０１８７】

特定の実施形態によると、抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２抗原結合分子は、例えば、ＢＣＭＡ又はＣＤ２０を発現する腫瘍細胞の治療に有用である。本明細書に提供される抗原結合分子は、例えば、多発性骨髄腫又は他のＢ細胞若しくは形質細胞がんを含むがん、例えば、ワルデンシュトレームマクログロブリン血症、バーキットリンパ腫、及びびまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ性白血病、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、リンパ形質性細胞性リンパ腫、並びにホジキンリンパ腫、を含む、ＢＣＭＡ発現に関連する疾患又は障害を治療するためにも使用され得る。本発明の特定の実施形態によると、抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ抗原結合分子は、多発性骨髄腫に罹患している患者の治療に有用である。本発明の他の関連する実施形態によると、本明細書で提供される抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子を、本明細書に開示される抗ＢＣＭＡ抗原結合分子、又は抗ＢＣＭＡ×抗ＣＤ３多重特異性抗原結合分子、又は抗ＣＤ２０×抗ＣＤ３多重特異性抗原結合分子、又は抗ＣＤ２８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子と組み合わせて、ＢＣＭＡ又はＣＤ２０を発現するがん細胞に罹患している患者に投与することを含む方法が提供される。腫瘍スキャニングなどの当該技術分野で公知の分析／診断方法は、患者が多発性骨髄腫又は別のＢ細胞系統がんを保有しているかどうかを確認するために使用され得る。

【０１８８】

いくつかの実施形態では、本明細書に提供される抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子は、化学療法薬、ＤＮＡアルキル化剤、免疫調節薬、プロテアソーム阻害剤、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、放射線療法、幹細胞移植、異なる腫瘍細胞表面抗原及びＴ細胞若しくは免疫細胞抗原と相互作用する異なる二重特異性抗体、抗体薬物コンジュゲート、抗腫瘍剤にコンジュゲートされた二重特異性抗体、ＰＤ－１阻害剤（抗ＰＤ－１抗体、例えば、セミプリマブなどの）、ＰＤ－Ｌ１阻害剤、ＣＴＬＡ－４チェックポイント阻害剤、又はこれらの組み合わせを含む、第２の治療剤又は治療レジメンと組み合わせて投与され得る。

【０１８９】

本開示はまた、対象において残存がんを治療するための方法を含む。本明細書で使用される場合、「残存がん」という用語は、抗がん療法による治療後の対象における１つ以上

のがん細胞の存在又は持続を意味する。

【０１９０】

特定の態様によると、本発明は、ＣＤ３８発現に関連する疾患又は障害（例えば、多発性骨髄腫）を治療するための方法であって、対象が多発性骨髄腫を有すると決定された後に、本明細書に説明される抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２抗原結合分子抗体のうちの１つ以上を対象に投与することを含む、方法を提供する。例えば、本開示は、対象が他の免疫療法又は化学療法を受けた、１日、２日、３日、４日、５日、６日、１週間、２週間、３週間、若しくは４週間、２か月、４か月、６か月、８か月、１年、又はそれ以上後に、抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子を患者に投与することを含む、多発性骨髄腫を治療するための方法を含む。

【０１９１】

併用療法及び製剤

本開示は、本明細書に説明される例示的な抗原結合分子及び多重特異性抗原結合分子のいずれかを含む医薬組成物を、１つ以上の追加の治療剤と組み合わせて投与することを含む、方法を提供する。本発明の抗原結合分子と治療的に組み合わせるか、又は組み合わせて投与され得る例示的な追加の治療剤としては、例えば、抗腫瘍剤（例えば、メルファラン、ビンクリスチン（Ｏｎｃｏｖｉｎ）、シクロホスファミド（Ｃｙｔｏｘａｎ）、エトポシド（ＶＰ－１６）、ドキソルビシン（Ａｄｒｉａｍｙｃｉｎ）、リポソーマルドキソルビシン（Ｄｏｘｉｌ）、オベンダムスチン（ｏｂｅｎｄａｍｕｓｔｉｎｅ）（Ｔｒｅａｎｄａ）を含む化学療法剤、又は対象の形質細胞腫瘍の治療に有効であることが知られているその他のもの）が含まれる。いくつかの実施形態では、第２の治療剤は、ステロイドを含む。いくつかの実施形態では、第２の治療剤は、サリドマイド、レナリドミド、及びボルテゾミブを含む標的化療法を含み、これは、新たに診断された患者を治療するために承認された療法である。レナリドミド、ポマリドミド、ボルテゾミブ、カルフィルゾミブ、パノビノスタット、イキサゾミブ、エロツズマブ、及びダラツムマブは、再発性骨髄腫の治療に有効な第２の治療剤の例である。

【０１９２】

いくつかの実施形態では、第２の治療剤は、抗ＢＣＭＡ×ＣＤ３二重特異性抗原結合分子である。例示的な抗ＢＣＭＡ×ＣＤ３二重特異性抗原結合分子は、参照により本明細書に組み込まれるＵ．Ｓ．２０２０／００２４３５６に開示されている。例示的な抗ＢＣＭＡｘＣＤ３二重特異性抗原結合分子は、Ｕ．Ｓ．２０２０／００２４３５６に開示されるように、ＲＥＧＮ５４５８である。いくつかの実施形態では、第２の治療剤は、抗ＣＤ２０×ＣＤ３二重特異性抗原結合分子である。例示的な抗ＣＤ２０×ＣＤ３二重特異性結合分子は、参照により本明細書に組み込まれる米国特許第９，６５７，１０２号に開示されている。例示的な抗ＣＤ２０×ＣＤ３二重特異性抗原結合分子は、ＲＥＧＮ１９７９（米国特許第９，６５７，１０２号）である。

【０１９３】

特定の実施形態では、第２の治療剤は、放射線療法又は幹細胞移植を含むレジメンである。特定の実施形態では、第２の治療剤は、免疫調節剤であってもよい。特定の実施形態では、第２の治療剤は、ボルテゾミブ（Ｖｅｌｃａｄｅ）、カルフィルゾミブ（Ｋｙｐｒｏｌｉｓ）、イキサゾミブ（Ｎｉｎｌａｒｏ）を含むプロテアソーム阻害剤であってもよい。特定の実施形態では、第２の治療剤は、パノビノスタット（Ｆａｒｙｄａｋ）などのヒストンデアセチラーゼ阻害剤であってもよい。特定の実施形態では、第２の治療剤は、モノクローナル抗体、抗体薬物コンジュゲート、抗腫瘍剤にコンジュゲートされた多重特異性／二重特異性／一特異性抗原結合分子、チェックポイント阻害剤、腫瘍溶解性ウイルス、がんワクチン、ＣＡＲ－Ｔ細胞、又はそれらの組み合わせであってもよい。本発明の抗原結合分子と組み合わせて有益に投与され得る他の薬剤には、低分子サイトカイン阻害剤、並びにＩＬ－１、ＩＬ－２、ＩＬ－３、ＩＬ－４、ＩＬ－５、ＩＬ－６、ＩＬ－８、ＩＬ－９、ＩＬ－１１、ＩＬ－１２、ＩＬ－１３、ＩＬ－１７、ＩＬ－１８などのサイトカインに、又はそれらのそれぞれの受容体に結合する抗原結合分子を含む、サイトカイン

阻害剤が含まれる。本発明の医薬組成物（例えば、本明細書に開示される抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子を含む医薬組成物）はまた、形質細胞表面上の異なる抗原と相互作用する可能性がある、本明細書に記載されているもの以外のモノクローナル抗原結合分子；片方のアームが腫瘍細胞表面の抗原に結合し、もう一方のアームがＴ細胞上の抗原に結合する多重特異性抗原結合分子；抗体薬物コンジュゲート；抗腫瘍剤とコンジュゲートされた二重特異性抗体；チェックポイント阻害剤、例えば、ＰＤ－１又はＣＴＬＡ－４を標的とするもの；又はそれらの組み合わせ、から選択される１つ以上の治療の組み合わせを含む、治療レジメンの一部として投与されてもよい。特定の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、ペムブロリズマブ（Ｋｅｙｔｒｕｄａ）、ニボルマブ（Ｏｐｄｉｖｏ）、又はセミプリマブ（ＲＥＧＮ２８１０、Ｌｉｂｔａｙｏ）などのＰＤ－１阻害剤から選択され得る。特定の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、アテゾリズマブ（Ｔｅｃｅｎｔｒｉｑ）、アベルマブ（Ｂａｖｅｎｃｉｏ）、又はデュルバルマブ（Ｉｍｆｉｎｚｉ））などのＰＤ－Ｌ１阻害剤、から選択されてもよい。特定の実施形態では、チェックポイント阻害剤は、イピリムマブ（Ｙｅｒｖｏｙ）などのＣＴＬＡ－４阻害剤から選択されてもよい。本発明の抗原結合分子と併せて使用され得る他の組み合わせは、上記に記載されている。

【０１９４】

本開示はまた、本明細書に言及される抗原結合分子のいずれかと、ＶＥＧＦ、Ａｎｇ２、ＤＬＬ４、ＥＧＦＲ、ＥｒｂＢ２、ＥｒｂＢ３、ＥｒｂＢ４、ＥＧＦＲｖＩＩＩ、ｃＭｅｔ、ＩＧＦ１Ｒ、Ｂ－ｒａｆ、ＰＤＧＦＲ－α、ＰＤＧＦＲ－β、ＦＯＬＨ１（ＰＳＭＡ）、ＰＲＬＲ、ＳＴＥＡＰ１、ＳＴＥＡＰ２、ＴＭＰＲＳＳ２、ＭＳＬＮ、ＣＡ９、ウロプラキン、又は前述のサイトカインのいずれかのうちの１つ以上の阻害剤とを含む、治療的組み合わせも含み、阻害剤は、アプタマー、アンチセンス分子、リボザイム、ｓｉＲＮＡ、ペプチボディ、ナノボディ又は抗原結合分子断片（例えば、Ｆａｂ断片；Ｆ（ａｂ’）$_2$断片；Ｆｄ断片；Ｆｖ断片；ｓｃＦｖ；ｄＡｂ断片；又はダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、及び最小認識単位などの他の操作された分子）である。本発明の抗原結合分子はまた、抗ウイルス剤、抗生物質、鎮痛剤、コルチコステロイド、及び／又はＮＳＡＩＤと組み合わせて投与及び／又は共製剤化されてもよい。本発明の抗原結合分子はまた、放射線療法及び／又は従来の化学療法も含む治療レジメンの一部として投与されてもよい。

【０１９５】

追加的治療活性成分は、本発明の抗原結合分子の投与の直前に、それと同時に、又はその直後に投与されてもよい；（本開示の目的のために、そのような投与レジメンは、追加的治療活性成分と「組み合わせた」、抗原結合分子の投与とみなされる）。

【０１９６】

本発明は、本発明の抗原結合分子が、本明細書の他の箇所に記載される追加的治療活性成分のうちの１つ以上と共製剤化されている医薬組成物を含む。

【０１９７】

投与レジメン

本発明の特定の実施形態によると、抗原結合分子（例えば、抗ＣＤ３８抗体及び４－１ＢＢに特異的に結合する多重特異性抗原結合分子）の複数回用量は、定義された時間コースにわたって対象に投与されてもよい。本発明の本態様による方法は、本発明の多重特異性抗原結合分子の複数回用量を対象に逐次的に投与することを含む。本明細書で使用される場合、「逐次的に投与する」とは、抗原結合分子の各用量が、異なる時点で、例えば、所定の間隔（例えば、時間、日、週又は月）をあけた異なる日に、対象に投与されることを意味する。本発明は、抗原結合分子の単回初回用量を、次に抗原結合分子の１回以上の二次用量を、そして随意に、その後に抗原結合分子の１回以上の三次用量を、患者に逐次的に投与することを含む方法を含む。

【０１９８】

「初回用量」、「二次用量」、及び「三次用量」という用語は、本発明の抗原結合分子

の投与の時系列を指す。したがって、「初回用量」は、治療レジメンの開始時に投与される用量であり（また「ベースライン用量」とも称される）、「二次用量」は初回用量の後に投与される用量であり、「三次用量」は二次用量の後に投与される用量である。初回用量、二次用量及び三次用量は全て、同じ量の抗原結合分子を含有できるが、投与頻度に関しては一般的に互いに異なっていてもよい。しかしながら、特定の実施形態では、初回用量、二次用量及び／又は三次用量に含有される抗原結合分子の量は、治療過程で、互いに異なる（例えば、適宜調整して加減する）。特定の実施形態では、２つ以上（例えば、２、３、４、又は５）の用量が、治療レジメンの開始時に「負荷用量」として投与され、その後に続く用量は、より少ない頻度ベースで投与される（例えば、「維持用量」）。

【０１９９】

本発明の例示的な一実施形態では、各二次用量及び／又は三次用量は、直前の用量の１～２６週間後（例えば、１週間後、１週間半後、２週間後、２週間半後、３週間後、３週間半後、４週間後、４週間半後、５週間後、５週間半後、６週間後、６週間半後、７週間後、７週間半後、８週間後、８週間半後、９週間後、９週間半後、１０週間後、１０週間半後、１１週間後、１１週間半後、１２週間後、１２週間半後、１３週間後、１３週間半後、１４週間後、１４週間半後、１５週間後、１５週間半後、１６週間後、１６週間半後、１７週間後、１７週間半後、１８週間後、１８週間半後、１９週間後、１９週間半後、２０週間後、２０週間半後、２１週間後、２１週間半後、２２週間後、２２週間半後、２３週間後、２３週間半後、２４週間後、２４週間半後、２５週間後、２５週間半後、２６週間後、２６週間半後、又はそれ以上）に投与される。「直前の投与」という文言は、本明細書において使用される場合、複数回の投与の順序を意味し、当該順序のまさに次の用量の投与が、その間の投与を伴わずに患者に投与される抗原結合分子の投与を意味する。

【０２００】

本発明のこの態様による方法は、抗原結合分子（例えば、ＣＤ３８及び４－１ＢＢに特異的に結合する多重特異性１＋２抗原結合分子）の任意の数の二次用量及び／又は三次用量を、患者に投与することを含み得る。例えば、特定の実施形態では、患者に単回の二次用量のみが投与される。他の実施形態では、２回以上（例えば、２、３、４、５、６、７、８、又はそれ以上）の二次用量を患者に投与する。同様に、特定の実施形態では、患者に単回の三次用量のみが投与される。他の実施形態では、２回以上（例えば、２、３、４、５、６、７、８、又はそれ以上）の三次用量を患者に投与する。

【０２０１】

複数の二次用量を含む実施形態では、各二次用量は、他の二次用量と同じ頻度で投与されてもよい。例えば、各二次用量は、直前の投与の１～２週間後に患者に投与されてもよい。同様に、複数回の三次用量を含む実施形態では、各三次用量は、他の三次用量と同じ頻度で投与されてもよい。例えば、各三次用量は、直前の投与の２～４週間後に患者に投与されてもよい。あるいは、二次用量及び／又は三次用量が患者に投与される頻度は、治療レジメンの過程で変化する可能性がある。投与の頻度はまた、臨床検査後の個々の患者の必要性に応じて、医師によって治療過程の間に調整され得る。

【０２０２】

抗原結合分子の診断的使用

本開示の抗ＣＤ３８抗原結合分子は、例えば、診断目的のために、試料中のＣＤ３８又はＣＤ３８発現細胞を検出及び／又は測定するためにも使用され得る。例えば、抗ＣＤ３８抗原結合分子、又はその断片は、ＣＤ３８の異常発現（例えば、過剰発現、過小発現、発現の欠如、など）によって特徴付けられる状態又は疾患を診断するために使用され得る。ＣＤ３８に対する例示的な診断アッセイは、例えば、患者から取得された試料を、本明細書に開示される抗ＣＤ３８抗原結合分子と接触させることなどを含み得、当該抗ＣＤ３８抗原結合分子は、検出可能な標識又はレポーター分子で標識される。あるいは、標識されていない抗ＣＤ３８抗原結合分子は、それ自体が検出可能に標識された二次抗原結合分子との組み合わせで、診断用途に使用することができる。検出可能な標識又はレポーター分子は、例えば^{3}Ｈ、^{14}Ｃ、^{32}Ｐ、^{35}Ｓ、又は^{125}Ｉなどの放射性同位体、フルオ

レセインイソチオシアネート若しくはローダミンなどの蛍光部分若しくは化学発光部分、又はアルカリホスファターゼ、ベーターガラクトシダーゼ、セイヨウワサビペルオキシダーゼ、若しくはルシフェラーゼなどの酵素であり得る。本明細書の抗ＣＤ３８抗原結合分子の別の例示的な診断的使用は、対象における腫瘍細胞の非侵襲的同定及び追跡を目的とした、^{89}Ｚｒ－デスフェリオキサミン標識などの、^{89}Ｚｒ標識抗体を含む（例えば、陽電子放出断層撮影（ＰＥＴ）撮像）。（例えば、Ｔａｖａｒｅ，Ｒ．ｅｔ　ａｌ．Ｃａｎｃｅｒ　Ｒｅｓ．２０１６　Ｊａｎ　１；７６（１）：７３－８２；及びＡｚａｄ，ＢＢ．ｅｔ　ａｌ．Ｏｎｃｏｔａｒｇｅｔ．２０１６　Ｍａｒ　１５；７（１１）：１２３４４－５８を参照されたい。）試料中のＣＤ３８を検出又は測定するために使用することのできる具体的な例示的アッセイには、酵素結合免疫吸着検定法（ＥＬＩＳＡ）、ラジオイムノアッセイ（ＲＩＡ）、及び蛍光標識細胞分取（ＦＡＣＳ）が含まれる。

【０２０３】

本発明によるＣＤ３８診断アッセイで使用できる試料としては、正常な状態又は病理学的状態下で、検出可能な量のＣＤ３８タンパク質又はその断片を含有する、患者から取得可能な任意の組織又は体液試料が挙げられる。一般的に、健常な患者（例えば、異常なＣＤ３８レベル又は活性と関連した疾患又は状態に罹患していない患者）から取得された特定の試料中のＣＤ３８レベルを測定して、最初にベースライン又は標準のＣＤ３８レベルを確立する。次に、このＣＤ３８のベースラインレベルを、ＣＤ３８関連の疾患（例えば、ＣＤ３８発現細胞を含有する腫瘍）又は状態を有すると疑われる個体から得られた試料において測定されたＣＤ３８のレベルと比較することができる。

【０２０４】

装置

本発明はまた、本明細書に記載されている二重特異性抗原結合分子（例えば、その医薬製剤）を含む、容器（例えば、バイアル又はクロマトグラフィーカラム）又は注射装置（例えば、シリンジ、充填済みシリンジ又は自動注射器）も提供する。容器又は注射デバイスは、キット内に包装され得る。

【０２０５】

注射装置は、物質を対象（例えば、ヒト）の身体内に非経口経路、例えば、眼内、硝子体内、筋肉内、皮下又は静脈内、を介して導入する装置である。例えば、注射装置は、例えば、注入される流体（例えば、抗原結合分子、又はその断片又はその医薬製剤を含む）を保持するためのシリンダー又はバレル、流体の注入のための皮膚、血管又はその他の組織を貫通するためのニードル、を含むシリンジ（例えば、自動注射器など、医薬製剤が充填済みの）、及び液体をシリンダーからニードルの穴を通って対象の体内へ押し出すためのプランジャーであってもよい。

【０２０６】

本明細書で提供される医薬組成物は、標準的なニードル及びシリンジで皮下又は静脈内に送達され得る。加えて、皮下送達に関して、ペン型送達デバイスは、本発明の医薬組成物の送達において、容易に適用される。そのようなペン型送達デバイスは、再利用可能であるか、又は使い捨てであり得る。再利用可能なペン型送達デバイスは、概して、医薬組成物を含有する交換可能なカートリッジを利用する。カートリッジ内部の医薬組成物の全てが投与され、カートリッジが空になると、空のカートリッジは、容易に廃棄することができ、医薬組成物を含有する新しいカートリッジと交換され得る。次に、ペン型送達デバイスは再利用することができる。使い捨てペン型送達デバイスでは、交換可能なカートリッジはない。むしろ、使い捨てペン型送達デバイスは、医薬組成物がデバイス内部のリザーバ内に保持された事前に充填された状態で販売される。リザーバの医薬組成物が空になると、デバイス全体が廃棄される。

【０２０７】

多数の再利用可能なペン型及び自動注入装置送達デバイスは、本発明の医薬組成物の皮下送達において用途を見出す。例としては、ほんの数例を挙げると、限定されないが、ＡＵＴＯＰＥＮ（商標）（Ｏｗｅｎ　Ｍｕｍｆｏｒｄ，Ｉｎｃ．、Ｗｏｏｄｓｔｏｃｋ，Ｕ

Ｋ）、ＤＩＳＥＴＲＯＮＩＣ（商標）ペン（Ｄｉｓｅｔｒｏｎｉｃ Ｍｅｄｉｃａｌ Ｓｙｓｔｅｍｓ、Ｂｅｒｇｄｏｒｆ，Ｓｗｉｔｚｅｒｌａｎｄ）、ＨＵＭＡＬＯＧ ＭＩＸ ７５／２５（商標）ペン、ＨＵＭＡＬＯＧ（商標）ペン、ＨＵＭＡＬＩＮ ７０／３０（商標）ペン（Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ ａｎｄ Ｃｏ．、Ｉｎｄｉａｎａｐｏｌｉｓ，Ｉｎｄ．）、ＮＯＶＯＰＥＮ（商標）Ｉ、ＩＩ、及びＩＩＩ（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＮＯＶＯＰＥＮ ＪＵＮＩＯＲ（商標）（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ、Ｃｏｐｅｎｈａｇｅｎ，Ｄｅｎｍａｒｋ）、ＢＤ（商標）ペン（Ｂｅｃｔｏｎ Ｄｉｃｋｉｎｓｏｎ、Ｆｒａｎｋｌｉｎ Ｌａｋｅｓ，Ｎ．Ｊ．）、ＯＰＴＩＰＥＮ（商標）、ＯＰＴＩＰＥＮ ＰＲＯ（商標）、ＯＰＴＩＰＥＮ ＳＴＡＲＬＥＴ（商標）、及びＯＰＴＩＣＬＩＫ（商標）（ｓａｎｏｆｉ－ａｖｅｎｔｉｓ、Ｆｒａｎｋｆｕｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）が挙げられる。本開示の医薬組成物の皮下送達において用途を有する使い捨てペン型送達デバイスの例としては、ほんの数例を挙げると、限定されないが、ＳＯＬＯＳＴＡＲ（商標）ペン（ｓａｎｏｆｉ－ａｖｅｎｔｉｓ）、ＦＬＥＸＰＥＮ（商標）（Ｎｏｖｏ Ｎｏｒｄｉｓｋ）、及びＫＷＩＫＰＥＮ（商標）（Ｅｌｉ Ｌｉｌｌｙ）、ＳＵＲＥＣＬＩＣＫ（商標）Ａｕｔｏｉｎｊｅｃｔｏｒ（Ａｍｇｅｎ、Ｔｈｏｕｓａｎｄ Ｏａｋｓ，Ｃａｌｉｆ．）、ＰＥＮＬＥＴ（商標）（Ｈａｓｅｌｍｅｉｅｒ、Ｓｔｕｔｔｇａｒｔ，Ｇｅｒｍａｎｙ）、ＥＰＩＰＥＮ（Ｄｅｙ，Ｌ．Ｐ．）、及びＨＵＭＩＲＡ（商標）Ｐｅｎ（Ａｂｂｏｔｔ Ｌａｂｓ、Ａｂｂｏｔｔ Ｐａｒｋ，Ｉｌｌ．）が挙げられる。

【０２０８】

本明細書では、本開示の多重特異性抗原結合分子を投与するための方法であって、例えば、注射デバイスを用いて、対象の体内に分子を導入すること、例えば、注射することを含む、方法が提供される。

【０２０９】

発現方法

本明細書では、本発明の多重特異性抗原結合分子、又はそのイムノグロブリン鎖を作製するための組換え方法であって、

（ｉ）例えば、そのような多重特異性抗原結合分子の、軽及び／又は重イムノグロブリン鎖をコードする１つ以上のポリヌクレオチドを宿主細胞に導入することであって、１つ以上のポリヌクレオチドが、１つ以上のベクター内で構成され、及び／又は宿主細胞染色体に組み込まれ、及び／又はプロモーターに作動可能に結合されている、導入することと、

（ｉｉ）ポリヌクレオチド発現に好ましい条件下で、宿主細胞（例えば、哺乳類、真菌、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）、ピキア（Ｐｉｃｈｉａ）又はピキア・パストリス（Ｐｉｃｈｉａ ｐａｓｔｏｒｉｓ））を培養することと、

（ｉｉｉ）任意選択的に、宿主細胞及び／又は宿主細胞が増殖される培地から、多重特異性抗原結合分子、又はイムノグロブリン鎖を単離することと、

を含む、方法が提供される。そのような方法の産物もまた、その医薬組成物とともに本開示の一部を形成する。

【０２１０】

いくつかの態様では、工程（ｉ）は、個々のＡ１重鎖、Ａ２重鎖、及びユニバーサル軽鎖を別個の発現ベクターにクローニングすることを含む。例えば、ＣＤ３８結合重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）（ＶＨ－１）は、重鎖発現プラスミド（ＣＨ１－１＿ＣＨ２＿ＣＨ３）にクローニングされ得る。様々な長さ（リンカー）のリンカーを有するＣＨ１ドメイン（ＣＨ１－３）に融合された４－１ＢＢ結合重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）（ＶＨ－３）、続いて、別の４－１ＢＢ結合重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）（ＶＨ－２）を、変異Ｈ４３５Ｒ及びＹ４３６Ｆを含む重鎖発現プラスミド（ＣＨ１－２＿ＣＨ２＿ＣＨ３（＊））にクローニングすることができる（ＥＵ番号付け）（ＵＳ８，５８６，７１３）。ユニバーサル軽鎖を含むプラスミドとともに、発現プラスミドは、ＣＨＯ細胞などの宿主細胞にトランスフェクトされ得る。次いで、宿主細胞は、本明細書に説明される多重特異性抗原結合分子を

産生することができる。
【０２１１】
実施形態では、多重特異性抗原結合分子を作製するための方法は、例えば、カラムクロマトグラフィー、沈殿、及び／又は濾過によって、分子を精製する方法を含む。そのような方法の産物もまた、その医薬組成物とともに本開示の一部を形成する。
【０２１２】
本開示の多重特異性抗原結合分子及び／又はそのような分子の免疫グロブリン鎖をコードするポリヌクレオチドを（例えば、ベクター中に）含む宿主細胞もまた、本発明の一部である。宿主細胞としては、例えば、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ）細胞及び、ピキア細胞（例えば、Ｐ．パストリス）などの真菌細胞などの哺乳類細胞が含まれる。
【実施例】
【０２１３】
以下の実施例は、本発明の方法及び組成物をどのように作製し使用するかという完全な開示及び説明を当業者に提供するように記載され、発明者がその発明とみなすものの範囲を限定することを意図していない。使用される数字（例えば、量、温度など）に関して正確性を確保するための努力がなされているが、いくらかの実験誤差及び偏差を考慮に入れるべきである。別段の指示がない限り、部は重量部、分子量は平均分子量、温度は摂氏、圧力は大気圧又は大気圧付近である。
【０２１４】
実施例６～１０の対照として使用される抗原結合分子は、以下を含む。
・対応アイソタイプ対照（ＲＥＧＮ７５４０）とともにシグナル１として使用されるＣＤ２０×ＣＤ３二重特異性抗体（ＲＥＧＮ１９７９）（ＵＳ１０，５５０，１９３）。ＲＥＧＮ１９７９及びＲＥＧＮ７５４０の両方は、ｈＩｇＧ４$^{P-PVA}$アイソタイプを含む（ＵＳ９，３５９，４３７）。
・シグナル１として使用される第２のＣＤ２０×ＣＤ３二重特異性抗体（ＲＥＧＮ２２８１）。ＲＥＧＮ２２８１は、Ｓ１０８Ｐ置換を有するｈＩｇＧ４アイソタイプ（ｈＩｇＧ４^{P}）を含むＲＥＧＮ１９７９と同一の可変領域を含む
・同様にシグナル１として使用されるＢＣＭＡ×ＣＤ３（ＲＥＧＮ５４５８）（ＵＳ１１，３８４，１５３）。
・コンパレータ１：抗体「１０Ｃ７」の可変領域を含む４－１ＢＢ二価アゴニスト（ＲＥＧＮ４２４９）（ＵＳ７，２８８，６３８）。
・抗ＰＤ－１抗体セミプリマブ（ＲＥＧＮ２８１０、ＬＩＢＴＡＹＯ（登録商標））（ＵＳ９，９８７，５００）。
・４－１ＢＢ二価アゴニスト（ｈＩｇＧ４Ｐ）に対するアイソタイプ対照（ＲＥＧＮ１９４５）、ＲＥＧＮ１９４５もまた、セミプリマブのアイソタイプ対照として使用した。
・二重特異性４－１ＢＢ×非ＴＡＡアイソタイプ対照（ＲＥＧＮ１３１６８）。
【０２１５】
適切なＴ細胞活性化には、「シグナル１」及び「シグナル２」の２つのシグナルが必要である。「シグナル１」は、Ｔ細胞上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のペプチド結合主要組織適合複合体（ＭＨＣ）分子に結合することによって誘導される。「シグナル２」は、共刺激受容体をＴ細胞に結合させることによって提供される。そのような共刺激受容体の１つは、誘導性Ｉ型膜タンパク質であり、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーのメンバーである、４－１ＢＢ受容体である。４－１ＢＢ受容体の発現は、抗原又はマイトジェン誘導活性化後にＴ細胞の表面上で誘導される。４－１ＢＢの活性化は、ＡＰＣ上に存在する４－１ＢＢＬとの結合を介して起こる。したがって、４－１ＢＢシグナル伝達の活性化は、既存のＴＣＲシグナル伝達を増強するための標的アプローチを提供する。
【０２１６】
細胞株の説明
以下の実施例のうちのいくつかで使用される細胞株の特性を以下に提供する。

【０２１７】
ＮＡＬＭ６（ＡＣＬ１４０３６）
ＮＡＬＭ６クローンは、１９歳の男性から単離された急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ）細胞株［ＮＡＬＭ６クローンＧ５（ＡＴＣＣ、＃ＣＲＬ－３２７３）］である。ＮＡＬＭ６細胞は、ＲＰＭＩ１６４０＋１０％ＦＢＳ＋Ｐ／Ｓ／Ｇ、３７℃　５％CO_2中で維持される。
発現を確認するための染色
【０２１８】
ＮＡＬＭ６／ｈＰＤ－Ｌ１（ＡＣＬ１６３８９）
ヒトＰＤ－Ｌ１（アクセッション番号ＮＰ＿０５４８６２．１のアミノ酸Ｍ１－Ｔ２９０）を安定的に発現するように遺伝子操作されたＮＡＬＭ６細胞。細胞は、ＲＰＭＩ１６４０＋１０％ＦＢＳ＋Ｐ／Ｓ／Ｇ＋１ｕｇ／ｍｌ　Ｐｕｒｏ、３７℃　５％CO_2中で維持される。
ウイルストランスフェクション及び形質導入
発現を確認するための染色
【０２１９】
ＨＥＫ２９３親（ＡＣＬ２３９７）
胎児から単離されたヒト胚性腎細胞株［ＨＥＫ－２９３（ＡＴＣＣ、＃ＣＲＬ－１５７３）］。ＨＥＫ２９３親細胞株と称される。ＨＥＫ２９３細胞は、ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ＋Ｐ／Ｓ／Ｇ中で維持される。
【０２２０】
ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０（ＡＣＬ１４２６８）
ＨＥＫ２９３（ＨＺ）細胞をヒトＣＤ２０（Ｕｎｉｐｒｏｔアクセッション番号：Ｐ１１８３６、アミノ酸Ｍ１～Ｐ２９７）で安定的に形質導入することによって作製された細胞株。操作された株は、５％CO_2で、ＤＭＥ＋１０％ＦＢＳ＋ペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミン（Ｐ／Ｓ／Ｇ）＋１００μｇ／ｍＬハイグロマイシン中で維持される。
ウイルストランスフェクション／産生
細胞株形質導入
発現を確認するための染色
【０２２１】
ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８（ＡＣＬ１４２７０）
ＨＥＫ２９３（ＨＺ）細胞をヒトＣＤ２０（Ｕｎｉｐｒｏｔアクセッション番号：Ｐ１１８３６、アミノ酸Ｍ１～Ｐ２９７）及びヒトＣＤ３８（Ｕｎｉｐｒｏｔアクセッション番号Ｐ２８９０７、アミノ酸Ｍ１～Ｉ３００）で安定的に形質導入することによって作製された細胞株。操作された株は、５％CO_2で、ＤＭＥ＋１０％ＦＢＳ＋ペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミン（Ｐ／Ｓ／Ｇ）＋５００μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８＋１００μｇ／ｍＬハイグロマイシン中で維持される。
ウイルストランスフェクション／産生
細胞株形質導入
発現を確認するための染色
【０２２２】
ＨＥＫ２９３／ｈ４－１ＢＢ（ＡＣＬ７８８８）
ＨＥＫ２９３（ＨＺ）細胞をヒトＴＮＦＲＳＦ９（４－１ＢＢ）（アクセッション番号：ＮＭ＿００１５６１、アミノ酸Ｍ１～Ｌ２５５）で安定的に形質導入することによって作製された細胞株。操作された株は、５％CO_2で、ＤＭＥ＋１０％ＦＢＳ＋ペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミン（Ｐ／Ｓ／Ｇ）＋５００μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８中で維持される。
ウイルストランスフェクション／産生
細胞株形質導入

発現を確認するための染色
【０２２３】
ＨＥＫ２９３／ＮＦｋＢ－Ｌｕｃ（ＡＣＬ５０２１）
最小ＴＡＴＡプロモーターの上流に位置するＮＦ－κＢ応答エレメントの５つのコピーによって駆動されるホタルルシフェラーゼ－ＩＲＥＳ－ＧＦＰ遺伝子をトランスフェクトすることによって作製された細胞株。陽性細胞株の選択をフローサイトメトリーによって実施し、単一クローンＤ９を単離した。
プラスミド生成
発現を確認するための染色
【０２２４】
ＨＥＫ２９３／ＮＦｋＢ－Ｌｕｃ／ｈ４－１ＢＢ（ＡＣＬ１１０９０）
ＨＥＫ２９３／ＮＦｋＢ－Ｌｕｃ細胞をヒトＴＮＦＲＳＦ９（４－１ＢＢ）（アクセッション番号：ＮＭ＿００１５６１、アミノ酸Ｍ１～Ｌ２５５）で安定的に形質導入することによって作製された細胞株。操作された株は、５％CO_2で、ＤＭＥ＋１０％ＦＢＳ＋ペニシリン／ストレプトマイシン／グルタミン（Ｐ／Ｓ／Ｇ）＋５００μｇ／ｍＬ　Ｇ４１８中で維持される。
ウイルストランスフェクション／産生
細胞株形質導入
発現を確認するための染色
【０２２５】
ＭＯＬＰ８（ＡＣＬ１４１９８）
２００２年に多発性骨髄腫を有する５２歳の日本の男性の末梢血から確立されたヒト多発性骨髄腫株。ＤＳＭＺ番号で取得：ＡＣＣ５６９。
発現を確認するための染色
【０２２６】
ＯＰＭ２（ＡＣＬ１４１６４）
１９８２年に白血病期に多発性骨髄腫を有する５６歳の女性の末梢血から確立された。ＤＳＭＺ番号で取得：ＡＣＣ５０。
発現を確認するための染色
【０２２７】
実施例１．抗ＣＤ３８抗体及び抗４－１ＢＢ抗体の生成及びスクリーニング
抗ヒトＣＤ３８抗体は、ヒト免疫グロブリンの重鎖及びカッパ軽鎖可変領域をコードするＤＮＡを含む遺伝子操作されたマウスを、ＣＤ３８を発現する細胞又はＣＤ３８をコードするＤＮＡで免疫することによって得られた。抗体の免疫応答を、ＣＤ３８特異的免疫測定法によってモニタリングした。所望の免疫応答が得られたときに、脾細胞を採取し、マウス骨髄腫細胞と融合させて、それらの生存性を維持し、ハイブリドーマ細胞株を形成した。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニング及び選択して、ＣＤ３８特異的抗体を産生する細胞株を同定した。この技術を使用して、数種の抗ＣＤ３８キメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインとマウス定常ドメインとを保有する抗体）を得た。更に、ＵＳ２００７／０２８０９４５Ａ１に説明されるように、いくつかの完全ヒト抗ＣＤ３８抗体を、骨髄腫細胞との融合を行わずに、抗原陽性Ｂ細胞を直接単離することから生成した。
【０２２８】
同様に、抗４－１ＢＢ抗体は、ヒト免疫グロブリン重鎖及びカッパ軽鎖可変領域をコードするＤＮＡを含む遺伝子操作マウスを、４－１ＢＢを発現する細胞又は４－１ＢＢをコードするＤＮＡで免疫化することによって得られた。抗体の免疫応答を、４－１ＢＢ特異的免疫測定法によってモニタリングした。所望の免疫応答が得られたときに、脾細胞を採取し、マウス骨髄腫細胞と融合させて、それらの生存性を維持し、ハイブリドーマ細胞株を形成した。ハイブリドーマ細胞株をスクリーニング及び選択して、４－１ＢＢ特異的抗体を産生する細胞株を同定した。この技術を使用して、数種の抗４－１ＢＢキメラ抗体（すなわち、ヒト可変ドメインとマウス定常ドメインとを保有する抗体）を得た。更に、Ｕ

Ｓ２００７／０２８０９４５Ａ１に説明されるように、いくつかの完全ヒト抗４－１ＢＢ抗体を、骨髄腫細胞との融合を行わずに、抗原陽性Ｂ細胞を直接単離することから生成した。

【０２２９】

抗体は、親和性、選択性などを含む望ましい特徴について特徴付けられ、選択された。必要であれば、マウス定常領域は、所望のヒト定常領域、例えば野生型又は修飾ＩｇＧ１又はＩｇＧ４定常領域で置換されて、完全ヒト抗ＣＤ３８抗原結合分子又は完全ヒト抗４－１ＢＢ抗原結合分子が生成された。選択された定常領域が、具体的な用途に従って変化し得るが、一方で、高親和性抗原結合及び標的特異性特性は、可変領域に存在する。

【０２３０】

実施例２．抗ＣＤ３８結合アームの重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸及び核酸配列

表１は、本発明の選択された抗ＣＤ３８抗原結合アームの重鎖及び軽鎖可変領域並びにＣＤＲのアミノ酸配列識別子を記載する。対応する核酸配列識別子を、表２に記載する。

【０２３１】

（表１）抗CD38アミノ酸配列識別子

Ab名称	HCVR (VH-1)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-1)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb26871P2	2	4	6	8	18 (3-20GL)	20	22 GAS	24
mAb26812P2	40	42	44	46	48 (1-39GL)	50	52 AAS	54

【０２３２】

（表２）抗CD38核酸配列識別子

Ab名称	HCVR (VH-1)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-1)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb26871P2	1	3	5	7	17 (3-20GL)	19	21 ggggcaagt	23
mAb26812P2	39	41	43	45	47 (1-39GL)	49	51 gctgcatcc	53

【０２３３】

抗ＣＤ３８結合アームは、表１に記載の可変ドメイン及びＣＤＲ配列、並びにアイソタイプＩｇＧ４、ＩｇＧ１などのヒトＦｃドメインを含み得る。特定の用途又は実験では、Ｆｃドメインはマウスの Ｆｃドメインであってもよい。当業者によって理解されるように、特定のＦｃアイソタイプを有する抗原結合アームは、異なるＦｃアイソタイプを有する抗原結合アームに変換することができる（例えば、マウスＩｇＧ４　Ｆｃを有する抗原結合分子は、ヒトＩｇＧ１を有する抗原結合分子に変換することができる、など）が、いずれの場合でも、可変ドメイン（ＣＤＲを含む）－これは、表１に示される数値識別子によって示されている－は変わらず同じであり、結合特性はＦｃドメインの性質に関わらず同一又は実質的に類似していると予想される。

【０２３４】

実施例３：抗４－１ＢＢ結合アームの重鎖及び軽鎖可変領域アミノ酸及び核酸配列

表３は、二重特異性抗体の、選択された抗４－１ＢＢ結合アームの重鎖及び軽鎖可変領域並びにＣＤＲのアミノ酸配列識別子を記載する。対応する核酸配列識別子を表４に記載する。

【０２３５】

（表３）抗４－１ｂｂアミノ酸配列識別子

Ab名称	HCVR (VH-2)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-2)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb25921P	10	12	14	16	18	20	22	24
mAb25889P2	32	34	36	38	48	50	52	54
mAb35333P2	62	64	66	68	48	50	52	54
mAb25898P2	72	74	76	78	48	50	52	54
mAb35388P2	86	88	90	92	48	50	52	54
mAb35321P2	94	96	98	100	48	50	52	54

【０２３６】

（表４）抗４－１ｂｂ核酸配列識別子

Ab名称	HCVR (VH-2)	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCVR (VL-2)	LCDR1	LCDR2	LCDR3
mAb25921P	9	11	13	15	17	19	21	23
mAb25889P2	31	33	35	37	47	49	51	53
mAb35333P2	61	63	65	67	47	49	51	53
mAb25898P2	71	73	75	77	47	49	51	53
mAb35388P2	85	87	89	91	47	49	51	53
mAb35321P2	93	95	97	99	47	49	51	53

【０２３７】

抗４－１ＢＢ抗原結合アームは、表３に記載の可変ドメイン及びＣＤＲ配列、並びにアイソタイプＩｇＧ４、ＩｇＧ１などのヒトＦｃドメインを含み得る。特定の用途又は実験では、Ｆｃドメインはマウスｆｃドメインであってもよい。当業者によって理解されるように、特定のＦｃアイソタイプを有する抗原結合分子は、異なるＦｃアイソタイプを有する抗原結合分子に変換することができる（例えば、マウスＩｇＧ４　Ｆｃを有する抗原結合分子は、ヒトＩｇＧ１を有する抗原結合分子に変換することができる、など）が、いずれの場合でも、可変ドメイン（ＣＤＲを含む）－これは、表３に示される数値識別子によって示されている－は変わらず同じであり、結合特性はＦｃドメインの性質に関わらず同一又は実質的に類似していると予想される。

【０２３８】

実施例４：ＣＤ３８及び４－１ＢＢに結合する多重特異性抗原結合分子の生成

ＣＤ３８及び４－１ＢＢに結合する多重特異性抗原結合分子は、本明細書では、「抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ　１＋２」、又は「抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性分子」、又は「抗ＣＤ３８／抗４－１ＢＢ　１＋２」、又は「ＣＤ３８×４－１ＢＢ多重特異性分

子」とも称される。抗ＣＤ３８×抗４－１ＢＢ多重特異性分子の抗ＣＤ３８部分は、ＣＤ３８を発現する腫瘍細胞を標的化するのに有用であり、多重特異性分子の抗４－１ＢＢ部分は、Ｔ細胞を活性化するのに有用である。

【０２３９】

４－１ＢＢエピトープ１（ｅｐ１）又はエピトープ２（ｅｐ２）に結合する様々な４－１ＢＢ　Ｆａｂ（Ｆａｂ３、重鎖ＣＨ１ドメイン及び軽鎖を有する重鎖可変領域（ＨＣＶＲ））を、４－１ＢＢ及びＣＤ３８の両方を標的化する既存のＩｇＧ様二重特異性分子からの４－１ＢＢ　ＶＨドメインのＮ末端に融合した。

【０２４０】

（ｉ）様々な４－１ＢＢ重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、（ｉｉ）重鎖ＣＨ１ドメイン、続いて、重鎖ＣＨ１ドメインを第２の４－１ＢＢ重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）に接続するための様々な長さのリンカー、（ｉｉｉ）ＣＤ３８重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）、をコードするＤＮＡ断片を、Ｉｎｔｅｇｒａｔｅｄ　ＤＮＡ　Ｔｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓ，Ｉｎｃ．（Ｓａｎ　Ｄｉｅｇｏ、Ｃａｌｉｆｏｒｎｉａ）によって合成した。

【０２４１】

個々の重鎖に対する哺乳類発現ベクターを、Ｔａｋａｒａ　Ｂｉｏ　ＵＳＡ　Ｉｎｃ．によって提供されたプロトコルに従って、ＩｎＦｕｓｉｏｎ　Ｃｌｏｎｉｎｇ（Ｔａｋａｒａ　Ｂｉｏ　ＵＳＡ　Ｉｎｃ．）によって作成した。ＣＤ３８重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）（ＶＨ－１）を重鎖発現プラスミド（ＣＨ１－１＿ＣＨ２＿ＣＨ３）にクローニングした。様々な長さのリンカー（リンカー）を有するＣＨ１ドメイン（ＣＨ１－３）に融合された４－１ＢＢ重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）（ＶＨ－３）、続いて、別の４－１ＢＢ重鎖可変領域（ＨＣＶＲ）（ＶＨ－２）を、スター変異（Ｈ４３５Ｒ、Ｙ４３６Ｆ、ＥＵ番号付け）を含む重鎖発現プラスミド（ＣＨ１－２＿ＣＨ２＿ＣＨ３（＊））にクローニングした。

【０２４２】

組換えＣＤ３８×４－１ＢＢ×４－１ＢＢ　１＋２　Ｎ－Ｆａｂ　ＭＢＭを、３つの発現プラスミドである、（ｉ）ＣＤ３８重鎖プラスミド、（ｉｉ）４－１ＢＢ＋４－１ＢＢ重鎖スタープラスミド、（ｉｉｉ）ユニバーサル軽鎖を含むプラスミド、によるトランスフェクション後にＣＨＯ細胞中で産生した。安定的にトランスフェクトされたＣＨＯ細胞プールを、４００μｇ／ｍｌのハイグロマイシンで１２日間選択した後に単離した。ＣＨＯ細胞プールを使用して、ＣＤ３８×４－１ＢＢ×４－１ＢＢ　１＋２　Ｎ－Ｆａｂ　ＭＢＭを産生し、その後、上記に説明されたように精製した（Ｓｃｉ　Ｒｅｐ．２０１５　Ｄｅｃ　１１；５：１７９４３）。

【０２４３】

本実施例に従って作製された、選択された多重特異性抗原結合分子の構成部分の概要を表５に記載する。構成要素部分のそれぞれの核酸配列識別子を表６に提供する。表７及び８は、それぞれ、対照二重特異性抗原結合分子の構成要素部分、ポリペプチド配列、及び核酸配列を提供する。

【０２４４】

（表５）

選択された1+2フォーマット抗体-アミノ酸配列識別子の構成要素部分

	CD38アーム(Fab1)					4-1BB「イン」アーム(Fab2)					4-1BB「アウト」アーム(Fab3)					LCVR					完全長重鎖及び軽鎖		
REGN番号	Ab名称	VH-1	CDR1	CDR2	CDR3	Ab名称	VH-2	CDR1	CDR2	CDR3	Ab名称	VH-3	CDR1	CDR2	CDR3	Ab名称	Vk	CDR1	CDR2	CDR3	HC-4-1BB	HC-CD38	LC ULC 1-39GL
7633	26812P2	40	42	44	46	25889P2	32	34	36	38	35388P2	86	88	90	92	1-39(PP)GL	48	50	52	54	56	58	60
7647	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP)GL	48	50	52	54	70	58	60
7650	26812P2	40	42	44	46	25898P2	72	74	76	78	35321P2	94	96	98	100	1-39(PP)GL	48	50	52	54	80	58	60
9682	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP)GL	48	50	52	54	82	58	60
9686	26812P2	40	42	44	46	35333P2	62	64	66	68	35333P2	62	64	66	68	1-39(PP)GL	48	50	52	54	84	58	60

【０２４５】
（表６）

【０２４６】
（表７）

選択された1+2フォーマット抗体-核酸配列識別子の構成要素部分																							
	CD38アーム(Fab1)					4-1BB「イン」アーム(Fab2)					4-1BB「アウト」アーム(Fab3)					LCVR					完全長重鎖及び軽鎖		
REGN番号	Ab名称	VH-1	CDR1	CDR2	CDR3	Ab名称	VH-2	CDR1	CDR2	CDR3	Ab名称	VH-3	CDR1	CDR2	CDR3	Ab名称	Vk	CDR1	CDR2	CDR3	HC-4-1BB	HC-CD38	LCULC1-39GL
7633	26812P2	39	41	43	45	25889P2	31	33	35	37	35388P2	85	87	89	91	1-39(PP)GL	47	49	51	53	55	57	59
7647	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	69	57	59
7650	26812P2	39	41	43	45	25898P2	71	73	75	77	35321P2	93	95	97	99	1-39(PP)GL	47	49	51	53	79	57	59
9682	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	81	57	59
9686	26812P2	39	41	43	45	35333P2	61	63	65	67	35333P2	61	63	65	67	1-39(PP)GL	47	49	51	53	83	57	59

1+1フォーマット対照抗体-アミノ酸配列識別子の構成要素部分

	CD38アーム						4-1BB「イン」(Fab2)						4-1BB「アウト」(Fab3)				LCVR					完全長HC及びLC		
REGN番号	Ab名称	VH-1	CDR1	CDR2	CDR3		Ab名称	VH-2	CDR1	CDR2	CDR3		Ab名称	VH-3	CDR1	CDR2	CDR3	Ab名称	Vk	CDR1	CDR2	CDR3		HC	LC
7150	26871P2	2	4	6	8		該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし		25921P	10	12	14	16	3-20GL	18	20	22	24		26	30

【０２４７】
（表８）

1+1フォーマット対照抗体-核酸配列識別子の構成要素部分

	CD38アーム						4-1BB「イン」(Fab2)						4-1BB「アウト」(Fab3)						LCVR				完全長HC及びLC		
			VH -1	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab 名称	VH -2	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab 名称	VH-3	CDR 1	CDR 2	CDR 3	Ab名称	Vk	CDR 1	CDR 2	CDR 3	HC	HC	LC
REGN 番号	Ab名称																								
7150	26871P2		1	3	5	7	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	該当なし	25921P	9	11	13	15	3-20GL	17	19	21	23	25	27	29

【０２４８】

実施例５：多重特異性抗原結合分子のスクリーニング

次に、４－１ＢＢシグナル伝達経路を活性化する構築物を、スクリーニングによって同定した。

【０２４９】

ヒト４－１ＢＢへの細胞結合、共通軽鎖の利用、及びＣＤＲ３配列の多様性に基づいて、３４個の４－１ＢＢ結合抗体を１＋２スクリーニングに含めるために選択した。スクリーニングについては、４－１ＢＢ可変ドメインを、分割４－１ＢＢ又は積層４－１ＢＢの２つの異なる１＋２フォーマットで配列した。図２Ｂを参照されたい。

【０２５０】
分割フォーマットについては、４－１ＢＢの標準的な二価アーキテクチャを維持し、腫瘍標的化を、Ｇ４Ｓ×３スペーサードメインによって分離された４－１ＢＢ分子の一方側のＮ末端でＣＤ３８腫瘍標的化アーム（２６８１２）から可変ドメイン及びＣＨ１を付加することによって達成した。これらの構築物は、Ｋｎｏｂ　ｉｎ　Ｈｏｌｅ（ＫｉＨ）二重特異性体として発現され、そのため、発現された分子の１つのアームのみがＣＤ３８標的化モチーフを含んだ。
【０２５１】
積層ＦＡＢフォーマットについては、タンデム４－１ＢＢ配列を、上記に説明されたＣＤ３８×４－１ＢＢと同じ様式で結合し、腫瘍標的化を、対向するアーム上に存在する抗ＣＤ３８を有する二重特異性分子としての発現によって達成した。３４個の４－１ＢＢ可変ドメインを、１つの無関係な対照配列（抗ＢｅｔＶ１）とともに、１２２５個の組み合わせを生成するタンデムＦＡＢの全ての可能な組み合わせで組み立てた。これは、２つの積層４－１ＢＢ可変配列が同一である３４個の分子を含んだ。
【０２５２】
スクリーニングのために、１＋２構築物をＣＨＯ細胞中で一過性に発現させ、４日後に二重特異性を含む上清を採取した。ｈＣＤ３８を過剰発現するＨＥＫ細胞と、ＮＦｋＢルシフェラーゼレポーターを担持し、ヒト４－１ＢＢを過剰発現するＪｕｒｋａｔ細胞とを含む細胞の共培養物に、上清を添加した。試験試料による４－１ＢＢの結合及び活性化を、４－１ＢＢリガンドを発現するＨＥＫ細胞（１００％）とのＪｕｒｋａｔレポーター細胞の共培養と比較した。分割ＦＡＢからのスクリーニング結果は、Ｊｕｒｋａｔレポーターアッセイにおいてほとんど又は全く活性を示さず、最高の活性は３．７％であることが観察された。対照的に、積層ＦＡＢフォーマットで堅牢な活性化が観察され、試験された試料の２５％超が、３０％超の活性をもたらした。積層ＦＡＢ内の４－１ＢＢ可変ドメインが同一又は固有の配列である場合、活性が観察され、６６％程度の高さの活性が観察された。積層ＦＡＢ内の任意の場所における無関係な対照ＦＡＢの導入は、活性の喪失をもたらした。図２Ａを参照されたい。
【０２５３】
実施例６：フローサイトメトリーを使用したＣＤ３８×４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子結合の特性評価
ＣＤ３８アームの結合を、ＣＤ３８を内因的に発現するＭＯＬＰ８細胞を使用して試験した。ｈ４－１ＢＢを発現するように操作されたＨＥＫ２９３細胞（ＨＥＫ２９３／ｈ４－１ＢＢ）を使用して、４－１ＢＢアームの結合を評価した。ＣＤ３８も４－１ＢＢも発現しないため、ＨＥＫ２９３細胞を使用して、非標的化細胞結合を決定した。
【０２５４】
細胞に結合する多重特異性抗原結合分子の能力を、フローサイトメトリーを使用して評価した。細胞株は、抗ＣＤ３８及び抗４－１ＢＢアームの両方がそれらの標的に結合する能力を決定するように選択された。第１の実験では、試験抗体を、ＭＯＬＰ８（ｈＣＤ３８を内因的に発現する）及びＨＥＫ２９３（ｈＣＤ３８を発現しない）細胞とインキュベートした。第２の実験では、試験抗体を、ＨＥＫ２９３／ｈ４－１ＢＢ（ｈ４－１ＢＢを発現するように操作された）及びＨＥＫ２９３（ｈ４－１ＢＢを発現しない）細胞とインキュベートした。標識二次抗体を使用して、フローサイトメトリー上で蛍光を測定することによって結合を検出した。
【０２５５】
多重特異性抗原結合分子：
これら２つの実験で試験された多重特異性抗原結合分子及び対照は、表９に示されるとおりである。
【０２５６】
（表９）ＣＤ３８×４－１ＢＢ結合分子及び対照

MABM識別子	説明
REGN7633	CD38×4-1BB(1+2)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN7647	CD38×4-1BB(1+2)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN7650	CD38×4-1BB(1+2)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN7150	CD38×4-1BB(1+1)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN4249	コンパレータ1
REGN7540	アイソタイプ対照(hIgG4^{P-PVA})
REGN1945	アイソタイプ対照(hIgG4^{P})

【０２５７】

実験１－　ＣＤ３８結合：

ＨＥＫ２９３細胞をトリプシンで剥離し、洗浄し、染色緩衝液（ＰＢＳ中２％ＦＢＳ）中に再懸濁した。ＭＯＬＰ８細胞を洗浄し、染色緩衝液中に再懸濁した。細胞を、９６ウェルＶ底プレートのウェルに添加した（３×１０^{5}細胞／ウェル）。染色緩衝液中で、試験抗体を１：４、９ポイントで用量滴定用に希釈し、６１０ｆＭ～１０ｎＭの範囲の最終濃度まで細胞に添加した（「抗体なし」対照を９番目のポイント（１５３ｆＭ）として含め、「二次のみ」として標識した）。細胞及び抗体を氷上で３０分間インキュベートし、次いで、染色緩衝液で洗浄した。細胞を、２ｕｇ／ｍｌのアロフィコシアニン（ＡＰＣ）コンジュゲートヤギ抗ヒト二次抗体中に再懸濁し、氷上で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、生存率色素中に再懸濁し（製造業者のプロトコルに従って）、氷上で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で洗浄し、２％ＰＦＡ中に再懸濁し、氷上で３０分間おいた。洗浄後、細胞を濾過し、フローサイトメトリーによって分析して、幾何平均蛍光強度（ｇＭＦＩ）を決定し、その後、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用してプロットした。抗体のＥＣ$_{50}$値を、９ポイント用量応答曲線（９番目のポイントを表す二次のみの対照を含む）にわたる４パラメータロジスティック方程式から決定した。結果を表１０に示す。

【０２５８】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２（ＲＥＧＮ７６３３、ＲＥＧＮ７６４７、及びＲＥＧＮ７６５０）並びに１＋１（ＲＥＧＮ７１５０）多重特異性抗原結合分子の用量依存的結合が、ＣＤ３８を内因的に発現するＭＯＬＰ８細胞の存在下で観察された。しかしながら、二価抗４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ４２４９については、結合が観察されなかった。アイソタイプ対照抗体（ＲＥＧＮ７５４０及びＲＥＧＮ１９４５）についても結合が観察されなかった。

【０２５９】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体ＲＥＧＮ７６３３又はアイソタイプ対照抗体（ＲＥＧＮ７５４０及びＲＥＧＮ１９４５）の結合は、ＣＤ３８を発現しないＨＥＫ２９３細胞の存在下では観察されなかった。ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２（ＲＥＧＮ７６４７及びＲＥＧＮ７６５０）及び１＋１二重特異性（ＲＥＧＮ７１５０）抗体、並びに二価抗４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ４２４９で、弱い結合（ＭＯＬＰ８細胞上よりも＞１００倍低いｇＭＦＩ）が観察された。

【０２６０】

（表１０）抗体に対する結合の最大結合及びＥＣ５０値

	MOLP8		HEK293	
	最大 [gMFI]	EC50[M]	最大 [gMFI]	EC50[M]
REGN7633	8.8E+04	NC	7.1E+02	ND
REGN7647	1.2E+05	NC	1.2E+03	2.43E-10
REGN7650	1.4E+05	NC	9.5E+02	ND
REGN7150	2.1E+05	NC	1.1E+03	NC*
REGN4249	5.3E+02	ND	1.4E+03	NC*
REGN7540	4.6E+02	ND	7.4E+02	ND
REGN1945	4.5E+02	ND	7.5E+02	ND

略語： ＮＤ：決定せず、ＮＣ：データが４パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため、計算されなかった。
＊非特異的結合に起因する可能性が最も高い

【０２６１】

実験２－ ４－１ＢＢ結合：

ＨＥＫ２９３及びＨＥＫ２９３／４－１ＢＢ細胞をトリプシンで剥離し、洗浄し、染色緩衝液（ＰＢＳ中２％ＦＢＳ）中に再懸濁し、９６ウェルＶ底プレートのウェルに添加した（３×１０^{5}細胞／ウェル）。染色緩衝液中で、試験抗体を１：５、９ポイントで用量滴定用に希釈し、１．３ｐＭ～１００ｎＭの範囲の最終濃度まで細胞に添加した（「抗体なし」対照を９番目のポイント（０．２６ｎＭ）として含め、「二次のみ」として標識した）。細胞及び抗体を氷上で３０分間インキュベートし、次いで、染色緩衝液で洗浄した。細胞を、２ｕｇ／ｍｌのアロフィコシアニン（ＡＰＣ）コンジュゲートヤギ抗ヒト二次抗体中に再懸濁し、氷上で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、生存率色素中に再懸濁し（製造業者のプロトコルに従って）、氷上で３０分間インキュベートした。次いで、細胞を染色緩衝液で洗浄し、２％ＰＦＡ中に再懸濁し、氷上で３０分間おいた。洗浄後、細胞を濾過し、フローサイトメトリーによって分析して、幾何平均蛍光強度（ｇＭＦＩ）を決定し、その後、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用してプロットした。抗体のＥＣ$_{50}$値を、９ポイント用量応答曲線（二次のみの対照を含む）にわたる４パラメータロジスティック方程式から決定した。結果を表１１に示す。

【０２６２】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ １＋２（ＲＥＧＮ７６３３、ＲＥＧＮ７６４７、及びＲＥＧＮ７６５０）並びに１＋１（ＲＥＧＮ７１５０）多重特異性抗原結合分子の用量依存的結合が、ｈ４－１ＢＢを発現するように操作されたＨＥＫ２９３／ｈ４－１ＢＢ細胞の存在下で観察された。二価抗４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ４２４９の結合も観察された。アイソタイプ対照抗体（ＲＥＧＮ７５４０及びＲＥＧＮ１９４５）については、結合が観察されなかった。

【０２６３】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ １＋２抗体ＲＥＧＮ７６３３又はアイソタイプ対照抗体（ＲＥＧＮ７５４０及びＲＥＧＮ１９４５）の結合は、ｈ４－１ＢＢを発現しないＨＥＫ２９３細胞の存在下では観察されなかった。ＣＤ３８×４－１ＢＢ １＋２多重特異性抗原結合分子（ＲＥＧＮ７６４７及びＲＥＧＮ７６５０）、ＣＤ３８×４－１ＢＢ二重特異性（ＲＥＧＮ７１５０）、及び二価抗４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ４２４９で、わずかな結合（ＨＥＫ２９３／ｈ４－１ＢＢ細胞上よりも１，０００倍超低いｇＭＦＩ）が観察された。

【０２６４】

（表１１）抗体に対する結合の最大結合及びＥＣ５０値

	HEK293/4-1BB		HEK293	
	最大 [gMFI]	EC50[M]	最大 [gMFI]	EC50[M]
REGN7633	8.9E+05	1.47E-08	1.6E+04	ND
REGN7647	1.4E+06	6.08E-10	1.8E+04	ND
REGN7650	1.0E+06	9.97E-10	2.4E+04	NC*
REGN7150	2.4E+06	2.86E-09	2.5E+04	2.72E-09*
REGN4249	7.4E+05	8.86E-10	1.8E+04	ND
REGN7540	2.5E+04	ND	1.9E+04	ND
REGN1945	1.6E+04	ND	1.4E+04	ND

略語：　ＮＤ：決定せず、ＮＣ：データが４パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため、計算されなかった。
＊非特異的結合に起因する可能性が最も高い

【０２６５】

実施例７：ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８、ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０、ＭＯＬＰ８、及びヒト初代Ｔ細胞を使用したＴ細胞活性化アッセイにおける、ＣＤ３８×４－１ＢＢ二重特異性抗体の特性評価

適切なＴ細胞活性化には、「シグナル１」及び「シグナル２」の２つのシグナルが必要である。「シグナル１」は、Ｔ細胞上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のペプチド結合主要組織適合複合体（ＭＨＣ）分子に結合することによって誘導される。一方で、「シグナル２」は、共刺激受容体をＴ細胞に結合させることによって提供される。そのような共刺激受容体の１つは、誘導性Ｉ型膜タンパク質であり、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーのメンバーである、４－１ＢＢ受容体である。４－１ＢＢ受容体の発現は、抗原又はマイトジェン誘導活性化後にＴ細胞の表面上で誘導される。４－１ＢＢの活性化は、ＡＰＣ上に存在する４－１ＢＢＬとの結合を介して起こる。したがって、４－１ＢＢシグナル伝達の活性化は、既存のＴＣＲシグナル伝達を増強するための標的アプローチを提供する。

【０２６６】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋１及び１＋２）二重特異性抗体は、ＣＤ３８$^{+}$標的細胞を４－１ＢＢ受容体陽性Ｔ細胞と架橋することによって、４－１ＢＢの天然リガンドを模倣するように設計されて、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）×ＣＤ３二重特異性抗体又はＡＰＣによって提供される同種応答によって提供される「シグナル１」の存在下でＴ細胞の活性化を増強するために、「シグナル２」を提供する。

【０２６７】

多重特異性抗原結合分子：

この実験で試験された多重特異性抗原結合分子及び対照は、表１２に示されるとおりである。

【０２６８】

（表１２）ＣＤ３８×４－１ＢＢ結合分子及び対照

MABM識別子	説明
REGN7633	CD38×4-1BB(1+2)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN7647	CD38×4-1BB(1+2)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN7650	CD38×4-1BB(1+2)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN7150	CD38×4-1BB(1+1)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN4249	コンパレータ1
REGN7540	アイソタイプ対照、(hIgG4^{P-PVA})
REGN1945	アイソタイプ対照、(hIgG4^{P})
REGN5458	BCMA×CD3、(hIgG4^{P-PVA})
REGN1979	CD20×CD3、(hIgG4^{P-PVA})

【０２６９】

ＩＬ－２放出によって決定される、ＣＤ３８及び４－１ＢＢ受容体に結合して「シグナル２」を送達することによってヒト初代Ｔ細胞を活性化するＣＤ３８×４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子の能力は、「シグナル１」として機能するＲＥＧＮ１９７９（ＣＤ２０×ＣＤ３）を使用して、ｈＣＤ２０及びｈＣＤ３８を発現するように操作されたヒト胚性腎がん細胞株（ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８）の存在下で評価された。ｈＣＤ２０のみを発現するＨＥＫ２９３細胞は、ＡＰＣ上のＣＤ３８の非存在下で起こり得る活性を測定するための対照として含まれた。更に、ＣＤ３８×４－１ＢＢ二重特異性抗体の試験には、ｈＣＤ３８を内因的に発現する多発性骨髄腫細胞株、ＭＯＬＰ８が、含まれていた。ＭＯＬＰ８細胞は、ＢＣＭＡを内因的に発現するため、ＲＥＧＮ５４５８（ＢＣＭＡ×ＣＤ３）を含めて「シグナル１」として機能させた。注目すべきは、ＨＥＫ２９３細胞とは異なり、ＭＯＬＰ８細胞は、ＲＥＧＮ５４５８によって提供されるＣＤ３刺激が存在しない場合、「シグナル１」として機能するＴ細胞の検出可能な同種刺激を提供できることである。

【０２７０】

ヒト初代ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞の単離：

ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、密度勾配遠心分離を使用して、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ ｆｏｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅからの健常ドナー白血球パック（Ｄｏｎｏｒ ５５５１０５）から単離した。簡潔に述べると、１５ｍｌのＦｉｃｏｌｌ－Ｐａｑｕｅ ＰＬＵＳを５０ｍｌの円錐管に添加し、その後、２％ＦＢＳを含むＰＢＳで１：１に希釈した３０ｍｌの血液を上に重ねる。４００×ｇでブレーキをかけずに３０分間遠心分離した後、バフィーコート（単核細胞を含む）を新鮮な管に移し、２％ＦＢＳを含むＰＢＳで５倍希釈し、３００×ｇで８分間遠心分離する。続いて、ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞を、ＳｔｅｍＣｅｌｌ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのＥａｓｙＳｅｐ（商標）Ｈｕｍａｎ ＣＤ３$^{+}$Ｔ Ｃｅｌｌ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔを使用して、製造業者の推奨する指示に従って、ＰＢＭＣから単離した。

【０２７１】

ＩＬ－２放出アッセイ：

刺激培地に再懸濁した濃縮ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞を、１×１０^{5}細胞／ウェルの濃度で９６ウェル丸底プレートに添加した。増殖停止したＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８又はＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０を、１×１０^{4}細胞／ウェルの最終濃度でＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞に添加した。増殖停止したＭＯＬＰ８細胞を、５×１０^{4}細胞／ウェルの最終濃度でＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞に添加した。細胞の添加後、一定の０．１ｎＭ ＲＥＧＮ１９７９又はその対応アイソタイプ対照（ＲＥＧＮ７５４０）を、ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８又はＨ

ＥＫ２９３／ｈＣＤ２０を含むウェルに添加した。一定の０．５ｎＭ　ＲＥＧＮ５４５８又はアイソタイプ対照を、ＭＯＬＰ８細胞を含むウェルに添加した。続いて、ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋１又は１＋２）、二価４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ４２４９）、又はアイソタイプ対照（ＲＥＧＮ７５４０又はＲＥＧＮ１９４５）を、１：４で３ｐＭ～２００ｎＭに滴定用に希釈し、ウェルに添加した。１０ポイント希釈の最終ポイントには、滴定用の抗体は含まれなかった。プレートを３７℃、５％CO_2で７２時間インキュベートし、５μＬの合計上清を、ＩＬ－２を測定するために使用した。アッセイ上清中のサイトカインの量は、製造業者のプロトコルに従って、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒのＡｌｐｈａＬｉｓａキットを使用して決定した。サイトカインの測定値は、Ｐｅｒｋｉｎ　ＥｌｍｅｒのマルチラベルプレートリーダーＥｎｖｉｓｉｏｎで取得し、値はｐｇ／ｍＬとして報告された。全ての段階希釈物を、２回ずつ試験した。

【０２７２】

抗体のＥＣ$_{50}$値を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（商標）ソフトウェアを使用して、１０ポイント用量応答曲線に対する４パラメータロジスティック方程式から決定した。最大ＩＬ－２は、試験された用量範囲内で検出された平均最大応答として与えられる。結果を表１３に提供する。

【０２７３】

ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０及びＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８細胞株による結果

ＲＥＧＮ１９７９によって提供される、標的及び「シグナル１」の存在下で、４－１ＢＢ抗体治療は、対応アイソタイプ対照（ＲＥＧＮ７５４０及びＲＥＧＮ１９４５）と比較して、より高いＩＬ－２応答をもたらした。注目すべきことに、１＋２フォーマットのＣＤ３８×４－１ＢＢは、１＋１　ＣＤ３８×４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ７１５０）及び二価４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ４２４９）抗体と比較して、より高い最大ＩＬ－２及びより高い効力をもたらした。ＣＤ３８標的の非存在下では、二価４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ４２４９）のみが、ＩＬ－２放出の用量依存的増加を呈した。「シグナル１」の非存在下では、いずれの抗体もＩＬ－２放出の用量依存的増強につながらない。

【０２７４】

ＭＯＬＰ８細胞株による結果

同種ＭＯＬＰ８細胞の存在下、かつＲＥＧＮ５４５８の非存在下で、１＋２　ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ７６４７及びＲＥＧＮ７６５０についてＩＬ－２の用量依存的増加が観察され、１＋２　ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ７６３３及び二価４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ４２４９については、より少ない程度でＩＬ－２の用量依存的増加が観察された。１＋１　ＣＤ３８×４－１ＢＢ及びアイソタイプ対照抗体は、ＩＬ－２放出の用量依存的増強を呈さなかった。「シグナル１」は同種ＭＯＬＰ８細胞によって提供され得るが、一方で、ＲＥＧＮ５４５８の添加も評価された。これらの条件下では、全ての４－１ＢＢ抗体は、対応アイソタイプ対照と比較してＩＬ－２放出の用量依存的増加をもたらし、１＋２　ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体は、ＩＬ－２の最大の効力及び最大の増加を呈した。

【０２７５】

（表１３）抗体の最大ＩＬ－２放出及び効力値

	HEK293/CD20/CD38+REGN1979		HEK293/CD20+REGN1979		HEK293/CD20/CD38+IsoC		MOLP-8+IsoC		MOLP-8+REGN5458	
	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]
REGN7633	1934	8.3E-11	218	2.16E-09	16	ND	177	1.31E-11	534	4.482E-10
REGN7647	2847	5.8E-12	199	NC	18	ND	331	2.21E-12	692	2.31E-11
REGN7650	2721	1.4E-11	184	NC	10	ND	288	NC	553	3.166E-11
REGN7150	1303	1E-10	182	ND	12	ND	163	ND	308	6.338E-08
REGN4249	931	1.4E-09	729	1.42E-09	15	ND	174	NC	183	5.883E-10
REGN7540	176	ND	195	ND	9	ND	170	ND	156	ND
REGN1945	173	ND	208	ND	10	ND	155	ND	164	ND

略語：　ＮＤ：決定せず、ＮＣ：データが４パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため、計算されなかった。

【０２７６】

実施例８：ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８、ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０、ＭＯＬＰ８、ＮＡＬＭ６、及びヒト初代Ｔ細胞を使用したＴ細胞活性化アッセイにおける、ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋２）多重特異性抗原結合分子の特性評価

適切なＴ細胞活性化には、「シグナル１」及び「シグナル２」の２つのシグナルが必要である。「シグナル１」は、Ｔ細胞上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のペプチド結合主要組織適合複合体（ＭＨＣ）分子に結合することによって誘導される。「シグナル２」は、共刺激受容体をＴ細胞に結合させることによって提供される。そのような共刺激受容体の１つは、誘導性Ｉ型膜タンパク質であり、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーのメンバーである、４－１ＢＢ受容体である。４－１ＢＢ受容体の発現は、抗原又はマイトジェン誘導活性化後にＴ細胞の表面上で誘導される。４－１ＢＢの活性化は、ＡＰＣ上に存在する４－１ＢＢＬとの結合を介して起こる。したがって、４－１ＢＢシグナル伝達の活性化は、既存のＴＣＲシグナル伝達を増強するための標的化アプローチを提供する。

【０２７７】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋１及び１＋２）二重特異性抗体は、ＣＤ３８$^{+}$標的細胞を４－１ＢＢ受容体陽性Ｔ細胞と架橋することによって、４－１ＢＢの天然リガンドを模倣するように設計されて、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）×ＣＤ３二重特異性抗体又はＡＰＣによって提供される同種応答によって提供される「シグナル１」の存在下でＴ細胞の活性化を増強するために、「シグナル２」を提供する。

【０２７８】

多重特異性抗原結合分子：
この実験で試験された多重特異性抗原結合分子及び対照は、表１４に示されるとおりである。
【０２７９】
（表１４）ＣＤ３８×４－１ＢＢ結合分子及び対照

MABM識別子	説明、リンカー、アイソタイプ
REGN7647	CD38×4-1BB(1+2)、(G4S)3v15(hIgG4^{P-PVA})
REGN9682	CD38×4-1BB(1+2)、(G4S)3(hIgG4^{P-PVA})
REGN9686	CD38×4-1BB(1+2)、(G4S)2(hIgG4^{P-PVA})
REGN7150	CD38×4-1BB(1+1)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN13168	非TAA×4-1BB(1+2)対照、(hIgG4^{P-PVA})
REGN4249	コンパレータ1
REGN5458	BCMA×CD3、(hIgG4^{P-PVA})
REGN2281	CD20×CD3、(hIgG4^{P})
REGN7540	アイソタイプ対照、(hIgG4^{P-PVA})
REGN1945	アイソタイプ対照、(hIgG4^{P})

【０２８０】
ＩＬ－２又はＩＦＮγ放出によって決定される、ＣＤ３８及び４－１ＢＢ受容体に結合して「シグナル２」を送達することによってヒト初代Ｔ細胞を活性化する、２つのタンデム４－１ＢＢ結合Ｆａｂドメイン間の異なる結合を担持するＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子の能力は、「シグナル１」として機能するＲＥＧＮ２２８１（ＣＤ２０×ＣＤ３）を使用して、ｈＣＤ２０及びｈＣＤ３８を発現するように操作されたヒト胚性腎がん細胞株（ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８）の存在下で評価された。ｈＣＤ２０のみを発現するＨＥＫ２９３細胞は、ＡＰＣ上のＣＤ３８の非存在下で起こり得る活性を測定するための対照として含まれた。更に、ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋２）二重特異性抗体の試験には、ｈＣＤ３８を内因的に発現する多発性骨髄腫細胞株、ＭＯＬＰ８が、含まれていた。ＭＯＬＰ８細胞は、ＢＣＭＡを内因的に発現するため、ＲＥＧＮ５４５８（ＢＣＭＡ×ＣＤ３）を含めて「シグナル１」として機能させた。最後に、ＣＤ３二重特異性の非存在下で、標的細胞としてＭＯＬＰ８又はＮＡＬＭ－６（ＣＤ３８を内因的に発現する急性リンパ芽球性白血病細胞株）のいずれかを含んだ状態を試験した。注目すべきは、ＨＥＫ２９３細胞とは異なり、ＭＯＬＰ８及びＮＡＬＭ－６細胞は、ＣＤ３抗体刺激が存在しない場合、「シグナル１」として機能するＴ細胞の検出可能な同種刺激を提供することができることである。
【０２８１】
ヒト初代ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞の単離：
ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、ＳｔｅｍＣｅｌｌ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓからのＥａｓｙＳｅｐ　Ｈｕｍａｎ　Ｔ－Ｃｅｌｌ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　ｋｉｔを使用して、製造業者の推奨に従って、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ　ｆｏｒ　Ｍｅｄｉｃｉｎｅからの健常ドナー白血球パック（Ｄｏｎｏｒ　５５５１１４）から単離した。続いて、ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞を、ＳｔｅｍＣｅｌｌ　ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのＥａｓｙＳｅｐ（商標）Ｈｕｍａｎ　ＣＤ３$^{+}$Ｔ　Ｃｅｌｌ　Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ　Ｋｉｔを使用して、製造業者の推奨する指示に従って、ＰＢＭＣから単離した。
【０２８２】

初代Ｔ細胞活性化アッセイ：
刺激培地に再懸濁した濃縮ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞を、１×１０^{5}細胞／ウェルの濃度で、９６ウェル丸底プレートに添加した。標的細胞を、ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８若しくはＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０細胞については１×１０^{4}細胞／ウェル、又はＭＯＬＰ８及びＮＡＬＭ－６細胞については５×１０^{4}細胞／ウェルの最終濃度で、ＣＤ３$^{+}$Ｔ細胞に添加した。細胞の添加後、一定の０．２５ｎＭのＲＥＧＮ２２８１を、ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８又はＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０細胞を含むウェルに添加した。一定の０．５ｎＭ　ＲＥＧＮ５４５８又はアイソタイプ対照を、ＭＯＬＰ８細胞を含むウェルに添加した。ＮＡＬＭ－６標的細胞を含むウェルにＣＤ３二重特異性は添加されなかった。続いて、ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋１又は１＋２）、二価４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ４２４９）、又はアイソタイプ対照（ＲＥＧＮ７５４０又はＲＥＧＮ１９４５）を、１：５で１２８ｆＭ～５０ｎＭに滴定用に希釈し、ウェルに添加した。１０ポイント希釈の最終ポイントには、滴定用の抗体は含まれなかった。プレートを３７℃、５％CO_2で７２時間インキュベートし、５μＬの合計上清を、ＩＬ－２又はＩＦＮγを測定するために使用した。アッセイ上清中のサイトカインの量は、製造業者のプロトコルに従って、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒのＡｌｐｈａＬｉｓａキットを使用して決定した。サイトカインの測定値は、Ｐｅｒｋｉｎ　ＥｌｍｅｒのマルチラベルプレートリーダーＥｎｖｉｓｉｏｎで取得し、値はｐｇ／ｍＬとして報告された。全ての段階希釈物を、２回ずつ試験した。

【０２８３】
抗体のEC_{50}値を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍ（商標）ソフトウェアを使用して、１０ポイント用量応答曲線に対する４パラメータロジスティック方程式から決定した。最大サイトカインは、試験された用量範囲内で検出された平均最大応答として与えられる。結果を表１５及び１６に提供する。

【０２８４】
ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０及びＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８
ＲＥＧＮ２２８１によって提供される、標的及び「シグナル１」の存在下で、４－１ＢＢ抗体治療は、対応アイソタイプＩｇＧ４$^{P-PVA}$、ＩｇＧ４^{P}、又は二重特異性抗体対照（それぞれ、ＲＥＧＮ７５４０、ＲＥＧＮ１９４５、及びＲＥＧＮ１３１６８）と比較して、より高いＩＬ－２及びＩＦＮγ応答をもたらした。注目すべきことに、１＋２フォーマットのＣＤ３８×４－１ＢＢは、１＋１　ＣＤ３８×４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ７１５０）及び二価４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ４２４９）抗体と比較して、より高い最大サイトカイン放出及びより高い効力をもたらし、２つのタンデム４－１ＢＢ結合Ｆａｂドメイン間の結合に関係なく、サイトカイン放出の同様のレベル及び効力が観察された。ＣＤ３８標的の非存在下では、二価４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ４２４９）のみが、サイトカイン放出の用量依存的増加を呈した。

【０２８５】
ＭＯＬＰ８
同種ＭＯＬＰ８細胞の存在下、かつＣＤ３二重特異性抗体刺激の非存在下で、１＋２ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ７６４７、ＲＥＧＮ９６８２、及びＲＥＧＮ９６８６は、ＩＬ－２及びＩＦＮγの用量依存的増加を媒介した。比較すると、１＋１　ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体であるＲＥＧＮ７１５０、及び二価４－１ＢＢ抗体であるＲＥＧＮ４２４９は、ＩＦＮγではなくＩＬ－２のわずかな用量依存的増加をもたらした。アイソタイプ及び非標的化１＋２　４－１ＢＢ対照抗体については、ＩＬ－２又はＩＦＮγのいずれかの用量依存的増加は観察されなかった。ＭＯＬＰ８細胞及び初代ヒトＴ細胞を用いた条件下における固定量のＲＥＧＮ５４５８（ＢＣＭＡ×ＣＤ３）の添加は、全てのＣＤ３８標的化４－１ＢＢ抗体及びＲＥＧＮ４２４９について、ＩＬ－２及びＩＦＮγの用量依存的増加をもたらした。上記のように、１＋２　ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体は、ＲＥＧＮ７１５０及びＲＥＧＮ４２４９と比較して、より大きな効力及び最大サイトカイン増加を呈し、４－１ＢＢ結合Ｆａｂ間の結合フォーマットは、効力又は最大サイトカイン放出にほとんど影響を与えなかった。アイソタイプ対照及び非ＴＡＡ×４－１ＢＢ　１＋２対照抗

体は、用量依存的サイトカイン放出をもたらさなかった。

【０２８６】

ＮＡＬＭ－６

同種ＮＡＬＭ－６細胞の存在下、かつＣＤ３二重特異性抗体刺激の非存在下で、全てのＣＤ３８標的化４－１ＢＢ抗体（ＲＥＧＮ７６４７、ＲＥＧＮ９６８２、ＲＥＧＮ９６８６、及びＲＥＧＮ７１５０）、並びに二価４－１ＢＢ抗体（ＲＥＧＮ４２４９）は、ＩＦＮγ及びＩＬ－２の用量依存的増加をもたらした。１＋２　ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体ＲＥＧＮ７６４７、ＲＥＧＮ９６８２、及びＲＥＧＮ９６８６は、１＋１　ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体であるＲＥＧＮ７１５０、及び二価４－１ＢＢ抗体であるＲＥＧＮ４２４９と比較して、より大きな効力及び最大サイトカイン放出を呈した。上記のように、全ての１＋２　ＣＤ３８×４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子は、４－１ＢＢ結合Ｆａｂ間のリンカーに関係なく、同様に実施した。アイソタイプ対照及び非ＴＡＡ×４－１ＢＢ　１＋２対照抗体は、用量依存的サイトカイン放出をもたらさなかった。

【０２８７】

（表１５）

【０２８８】
（表１６）

最大ＩＬ２放出及び効力値

	HEK293/CD20/CD38+REGN2281		HEK293/CD20+REGN2281		MOLP-8+REGN5458		MOLP-8+IsoC		NALM-6	
	最大 [pg/mL]	EC50[M]	最大 [pg/mL]	EC50[M]	最大 [pg/mL]	EC50[M]	最大 [pg/mL]	EC50[M]	最大 [pg/mL]	EC50[M]
REGN7647	781	5.35E-11	61	ND	66	2.16E-10	73	NC	192	4.85E-11
REGN9682	912	6.07E-11	52	ND	79	1.33E-10	96	NC	205	7.17E-11
REGN9686	709	4.53E-11	57	ND	62	8.33E-11	90	3.61E-11	169	7.23E-11
REGN7150	593	NC	63	ND	32	NC	48	NC	122	1.08E-10
REGN13168	41	ND	57	ND	16	ND	28	ND	48	ND
REGN4249	110	NC	126	8.19E-10	19	NC	54	NC	108	NC
REGN7540	37	ND	54	ND	17	ND	21	ND	35	ND
REGN1945	48	ND	63	ND	18	ND	33	ND	41	ND

略語：ＮＣ、データが４パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため、計算されなかった。ＮＤ、濃度依存性増加が観察されなかったため、決定されなかった。

最大ＩＦＮγ放出及び効力値

	HEK293/CD20/CD38+REGN2281		HEK293/CD20+REGN2281		MOLP-8+REGN5458		MOLP-8+IsoC		NALM-6	
	最大 [pg/mL]	EC50[M]	最大 [pg/mL]	EC50[M]	最大 [pg/mL]	EC50[M]	最大 [pg/mL]	EC50[M]	最大 [pg/mL]	EC50[M]
REGN7647	6046	6.17E-11	1908	ND	3284	7.07E-11	103	NC	655	7.03E-11
REGN9682	5271	5.26E-11	1573	ND	3406	7.25E-11	161	NC	658	4.19E-11
REGN9686	6823	8.74E-11	1449	ND	3891	1.02E-10	85	NC	651	NC
REGN7150	3951	7.80E-10	1843	ND	1297	4.38E-08	56	NC	620	NC
REGN13168	1805	ND	1638	ND	656	ND	1	ND	102	ND
REGN4249	2474	6.40E-10	2279	4.29E-09	1003	NC	37	NC	400	NC
REGN7540	2080	ND	1455	ND	602	ND	1	ND	130	ND
REGN1945	2086	ND	1664	ND	542	ND	83	NC	117	ND

略語：ＮＣ、データが４パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため、計算されなかった。ＮＤ、濃度依存性増加が観察されなかったため、決定されなかった。

【０２８９】

実施例９：ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８、ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０、ＭＯＬＰ８、ＯＰＭ２、及びＨＥＫ２９３／ＮＦｋＢ－Ｌｕｃ／ｈ４－１ＢＢ細胞を使用した、操作されたレポーターアッセイにおける、ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋２）多重特異性抗原結合分子の特性評価

ＣＤ３８を発現する標的細胞の存在下で４－１ＢＢ受容体を特異的に活性化するＣＤ３８×４－１ＢＢ多重特異性抗原結合分子の能力を、操作されたレポーターアッセイで測定した。このアッセイでは、操作されたＨＥＫ２９３細胞は、転写因子ＮＦ－ＫＢ（ＮＦＫＢ－Ｌｕｃ）の制御下で、共刺激受容体４－１ＢＢ（ＨＥＫ２９３／ＮＦｋＢ－Ｌｕｃ／

ｈ４－１ＢＢ）とともにレポーター遺伝子ルシフェラーゼを発現する。このアッセイで使用される標的細胞は、ＣＤ２０を単独で、若しくはＣＤ３８と組み合わせて発現するように操作されたＨＥＫ２９３細胞、又はＣＤ３８を内因的に発現する細胞株、すなわち、ＯＰＭ２及びＭＯＬＰ８であった。４－１ＢＢ活性を刺激する４－１ＢＢアームの能力は、レポーター細胞を標的細胞と組み合わせること、及びＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体の滴定によって評価される。４－１ＢＢの活性化は、ＮＦＫＢ駆動ルシフェラーゼ産生をもたらし、次いで、これを発光読み出しを介して測定する。これらのアッセイでは、２つのタンデム４－１ＢＢ標的化ドメイン間の異なるタイプの結合の影響も評価した。

【０２９０】

多重特異性抗原結合分子：

この実験で試験された多重特異性抗原結合分子及び対照は、表１７に示されるとおりである。

【０２９１】

（表１７）ＣＤ３８×４－１ＢＢ結合分子及び対照

MABM識別子	説明
REGN7647	CD38×4-1BB(1+2)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN7650	CD38×4-1BB(1+2)、(hIgG4^{P-PVA})
REGN9682	CD38×4-1BB(1+2)、(G4S)3(hIgG4^{P-PVA})
REGN9686	CD38×4-1BB(1+2)、(G4S)2(hIgG4^{P-PVA})
REGN4249	コンパレータ1
REGN7540	アイソタイプ対照(hIgG4^{P-PVA})
REGN1945	アイソタイプ対照(hIgG4^{P})

【０２９２】

実験の１日前に、ＨＥＫ２９３レポーター細胞を、ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ＋Ｐ／Ｓ／Ｇ＋５００μｇ／ｍｌ　Ｇ４１８増殖培地中で、５×１０^{5}細胞／ｍｌに分割した。

【０２９３】

実験当日、接着性ＨＥＫ２９３レポーター及び標的細胞をトリプシン処理し、洗浄し、アッセイ培地（ＤＭＥＭ＋１０％ＦＢＳ＋Ｐ／Ｓ／Ｇ）中に再懸濁した。レポーターＨＥＫ２９３／ＮＦＫＢ－Ｌｕｃ／ｈ４－１ＢＢ細胞を、最終濃度５×１０^{3}細胞／ウェルで、９６ウェルの白色マイクロタイタープレートのウェルに添加し、続いて、標的細胞、ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０又はＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８のいずれかの添加を、最終濃度１×１０^{4}細胞／ウェルで添加するか、又はＭＯＬＰ８及びＯＰＭ２標的細胞を最終濃度２．５×１０^{4}細胞／ウェルで添加した。

【０２９４】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２及び対照抗体を、１：３、１０ポイント、３．０ｐＭ～２０ｎＭの最終濃度の範囲の段階希釈で滴定用とし、最後のポイントは、抗体を含まず、対照として含めた。抗体の添加後、９６ウェルの白色マイクロタイタープレートを３７℃／５％CO_2で５時間インキュベートし、続いて、等量のＯＮＥ－Ｇｌｏ（商標）（Ｐｒｏｍｅｇａ）試薬を添加して細胞を溶解させ、ルシフェラーゼ活性を検出した。放射光を、マルチラベルプレートリーダーＥｎｖｉｓｉｏｎ（ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒ）上で、相対光単位（ＲＬＵ）で捕捉した。抗体のEC_{50}値を、ＧｒａｐｈＰａｄ　Ｐｒｉｓｍソフトウェアを使用して、１０ポイント用量応答曲線に対する４パラメータロジスティック方程式から決定した（１０番目のポイントは抗体を含まない）。結果を表１８に提供する。

【０２９５】
ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０及びＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８
ＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０／ｈＣＤ３８標的細胞の存在下で、ＣＤ３８×４－１ＢＢ１＋２二重特異性抗体（ＲＥＧＮ７６４７、ＲＥＧＮ９６８２、ＲＥＧＮ９６８６、及びＲＥＧＮ７６５０）は、２つの抗４－１ＢＢ結合Ｆａｂドメイン間の結合に関係なく、ルシフェラーゼ活性の同様の増加をもたらした。抗４－１ＢＢ二価抗体（ＲＥＧＮ４２４９）はまた、ルシフェラーゼ活性の用量依存的増加をもたらしたが、アイソタイプ対照抗体は生じなかった。
【０２９６】
ＣＤ３８を欠くＨＥＫ２９３／ｈＣＤ２０標的細胞の存在下では、ＣＤ３８×４－１ＢＢ二重特異性抗体でもアイソタイプ対照でも応答は見られなかった。抗４－１ＢＢ二価抗体（ＲＥＧＮ４２４９）のみが、ルシフェラーゼ活性の用量依存的増加をもたらした。
【０２９７】
ＭＯＬＰ８及びＯＰＭ２細胞
ＭＯＬＰ８又はＯＰＭ２標的細胞のいずれかの存在下で、ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２（ＲＥＧＮ７６４７、ＲＥＧＮ７６５０、ＲＥＧＮ９６８２、及びＲＥＧＮ９６８６）抗体、並びに二価抗４－１ＢＢ抗体（ＲＥＧＮ４２４９）は、ルシフェラーゼ活性の用量依存的増加をもたらし、異なるリンカー長の１＋２　ＣＤ３８×４－１ＢＢバリアントは、同様の活性をもたらした。アイソタイプ対照抗体は、いずれのシグナルももたらさなかった。
【０２９８】
（表１８）抗体の最大ルシフェラーゼ活性及び効力値

	HEK293/CD20/CD38		HEK293/CD20		OPM2		MOLP-8	
	最大[RLU]	EC50[M]	最大[RLU]	EC50[M]	最大[RLU]	EC50[M]	最大[RLU]	EC50[M]
REGN7647	2.4E+06	NC	1.2E+06	ND	1.9E+06	7.35E-12	2.3E+06	NC
REGN7650	2.3E+06	NC	1.5E+06	NC	2.0E+06	9.89E-11	2.4E+06	NC
REGN9682	2.4E+06	NC	1.0E+06	ND	2.1E+06	2.19E-11	2.2E+06	NC
REGN9686	2.4E+06	NC	1.1E+06	NC	2.1E+06	1.80E-11	2.2E+06	NC
REGN4249	2.8E+06	4.28E-11	3.3E+06	6.82E-11	2.9E+06	5.25E-11	2.7E+06	4.59E-11
REGN7540	9.9E+05	ND	1.2E+06	ND	8.5E+05	ND	7.9E+05	ND
REGN1945	1.0E+06	ND	9.5E+05	ND	7.5E+05	ND	7.8E+05	ND

略語：　ＮＤ：濃度依存的応答が観察されなかったため、決定されなかった、ＮＣ：データが４パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため、計算されなかった。
【０２９９】
実施例１０：ＮＡＬＭ－６、ＮＡＬＭ－６／ＰＤＬ１、及びヒト初代Ｔ細胞を使用したＴ細胞同種セミプリマブ組み合わせアッセイにおける、ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２二重特異性抗体の特性評価
適切なＴ細胞活性化には、「シグナル１」及び「シグナル２」の２つのシグナルが必要である。「シグナル１」は、Ｔ細胞上のＴ細胞受容体（ＴＣＲ）を抗原提示細胞（ＡＰＣ）上のペプチド結合主要組織適合複合体（ＭＨＣ）分子に結合することによって誘導される。「シグナル２」は、共刺激受容体をＴ細胞に結合させることによって提供される。そのような共刺激受容体の１つは、誘導性Ｉ型膜タンパク質であり、腫瘍壊死因子受容体（ＴＮＦＲ）スーパーファミリーのメンバーである、４－１ＢＢ受容体である。４－１ＢＢ

受容体の発現は、抗原又はマイトジェン誘導活性化後にＴ細胞の表面上で誘導される。４－１ＢＢの活性化は、ＡＰＣ上に存在する４－１ＢＢＬとの結合を介して起こる。したがって、４－１ＢＢシグナル伝達の活性化は、既存のＴＣＲシグナル伝達を増強するための標的化アプローチを提供する。

【０３００】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ（１＋２）二重特異性抗体は、ＣＤ３８$^{+}$標的細胞を４－１ＢＢ受容体陽性Ｔ細胞と架橋することによって、４－１ＢＢの天然リガンドを模倣するように設計されて、腫瘍関連抗原（ＴＡＡ）×ＣＤ３二重特異性抗体又はＡＰＣによって提供される同種応答によって提供される「シグナル１」の存在下でＴ細胞の活性化を増強するために、「シグナル２」を提供する。しかしながら、Ｔ細胞活性化は、ＡＰＣ上のリガンドＰＤ－Ｌ１へのＴ細胞上のプログラム細胞死タンパク質１受容体（ＰＤ－１）のライゲーションによって阻害され得る。ライゲーションＰＤ－１は、ＣＤ２８及びＴＣＲ複合体へのホスファターゼの動員につながり（Ｚｏｕ ｅｔ ａｌ．Ｉｎｈｉｂｉｔｏｒｙ Ｂ７－ｆａｍｉｌｙ ｍｏｌｅｃｕｌｅｓ ｉｎ ｔｈｅ ｔｕｍｏｒ ｍｉｃｒｏｅｎｖｉｒｏｎｍｅｎｔ．Ｎａｔｕｒｅ Ｒｅｖｉｅｗｓ Ｉｍｍｕｎｏｌｏｇｙ ２００８，８：４６７－４７７、Ｆｒａｎｃｉｓｃｏ ｅｔ ａｌ．２０１０，Ｈｕｉ ｅｔ ａｌ．Ｔ ｃｅｌｌ ｃｏｓｔｉｍｕｌａｔｏｒｙ ｒｅｃｅｐｔｏｒ ＣＤ２８ ｉｓ ａ ｐｒｉｍａｒｙ ｔａｒｇｅｔ ｆｏｒ ＰＤ－１－ｍｅｄｉａｔｅｄ ｉｎｈｉｂｉｔｉｏｎ．Ｓｃｉｅｎｃｅ．２０１７，３５５（６３３２）：１４２８－３３）、その結果、ＴＣＲシグナル伝達及び４－１ＢＢ刺激を抑制する。したがって、ＣＤ３８×４－１ＢＢ二重特異性抗体と組み合わせたＰＤ－１アンタゴニストであるセミプリマブとのＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１相互作用の遮断は、Ｔ細胞機能を促進し得る。

【０３０１】

多重特異性抗原結合分子：

この実験で試験された多重特異性抗原結合分子及び対照は、表１９に示されるとおりである。

【０３０２】

（表１９）ＣＤ３８×４－１ＢＢ結合分子及び対照

MABM識別子	説明
REGN7633	CD38×4-1BB 1+2、hIgG4^{P-PVA}
REGN7647	CD38×4-1BB 1+2、hIgG4^{P-PVA}
REGN7650	CD38×4-1BB 1+2、hIgG4^{P-PVA}
REGN4249	コンパレータ1
REGN2810	PD-1抗体(セミプリマブ)、hIgG4^{P}
REGN7540	アイソタイプ対照、hIgG4^{P-PVA}
REGN1945	アイソタイプ対照、hIgG4^{P}

【０３０３】

ＩＬ２及びＩＦＮγ放出によって決定されるように、ＣＤ３８及び４－１ＢＢを結合させて「シグナル２」を送達することによって、ヒト初代Ｔ細胞を活性化する、ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２多重特異性抗原結合分子の能力を、ＰＤ－Ｌ１を発現するように操作されたＣＤ３８$^{+}$ヒト急性リンパ芽球性白血病がん細胞株（ＮＡＬＭ６／ｈＰＤ－Ｌ１）の存在下で評価した。ＮＡＬＭ６細胞は、「シグナル１」として機能するのに十分な同種ＴＣＲ応答を提供する。固定濃度のＰＤ－１アンタゴニスト抗体であるセミプリマブの添加を、ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２又は対照抗体の滴定の存在下で評価した。

【０３０４】
ヒト初代ＣＤ３＋Ｔ細胞の単離：
ヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を、ＥａｓｙＳｅｐ（商標）Ｄｉｒｅｃｔ Ｈｕｍａｎ ＰＢＭＣ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔを使用して、製造業者が推奨するプロトコルに従って、Ｐｒｅｃｉｓｉｏｎ ｆｏｒ Ｍｅｄｉｃｉｎｅ（ドナー５５５１９２）からの健康なドナー白血球パックから単離し、凍結した。ＣＤ３＋Ｔ細胞を、凍結ＰＢＭＣのバイアルを解凍することによって単離した。ドナーＰＢＭＣは、ＳｔｅｍＣｅｌｌ ＴｅｃｈｎｏｌｏｇｉｅｓのＥａｓｙＳｅｐ（商標）Ｈｕｍａｎ ＣＤ３＋Ｔ Ｃｅｌｌ Ｉｓｏｌａｔｉｏｎ Ｋｉｔを使用して、製造業者の推奨する指示に従って、ＣＤ３＋Ｔ細胞を濃縮した。
【０３０５】
ＩＬ－２及びＩＦＮγ放出アッセイ：
刺激培地に再懸濁した濃縮ＣＤ３＋Ｔ細胞を、１×１０^{5}細胞／ウェルの濃度で９６ウェル丸底プレートに添加した。ＮＡＬＭ６細胞又はｈＰＤ－Ｌ１を発現するように操作されたＮＡＬＭ－６細胞を、５×１０^{4}細胞／ウェルの最終濃度でＣＤ３＋Ｔ細胞に添加した。その後、ＲＥＧＮ７６３３、ＲＥＧＮ７６４７、ＲＥＧＮ７６５０、ＲＥＧＮ４２４９、及びＲＥＧＮ７５４０を、１：４で０．７６ｐＭ～５０ｎＭに滴定用に希釈し、ウェルに添加した。１０ポイント希釈の最終ポイントには、滴定用の抗体は含まれなかった。滴定された抗体の添加後、一定の２０ｎＭのセミプリマブ又はその対応アイソタイプ対照（ＲＥＧＮ１９４５）のいずれかをウェルに添加した。プレートを３７℃、５％ＣＯ$_{2}$で７２時間インキュベートし、上清からの５μＬを、ＩＬ－２及びＩＦＮγを測定するために使用した。アッセイ上清中のサイトカインの量は、製造業者のプロトコルに従って、ＰｅｒｋｉｎＥｌｍｅｒのＡｌｐｈａＬｉｓａキットを使用して決定した。サイトカインの測定値は、Ｐｅｒｋｉｎ Ｅｌｍｅｒのマルチラベルプレートリーダー Ｅｎｖｉｓｉｏｎで取得し、値はｐｇ／ｍＬとして報告された。全ての段階希釈物を、３回ずつ試験した。
【０３０６】
結果
抗体のＥＣ$_{50}$値を、ＧｒａｐｈＰａｄ Ｐｒｉｓｍ（商標）ソフトウェアを使用して、１０ポイント用量応答曲線に対する４パラメータロジスティック方程式から決定した。最大サイトカインは、試験された用量範囲内で検出された平均最大応答として与えられる。結果を表２０及び２１に提供する。
【０３０７】
同種ＮＡＬＭ６細胞又はＰＤ－Ｌ１を発現するように操作されたＮＡＬＭ６細胞の存在下で、ＣＤ３８×４－１ＢＢ １＋２抗体治療（ＲＥＧＮ７６３３、ＲＥＧＮ７６４７、及びＲＥＧＮ７６５０）は、対応アイソタイプ対照（ＲＥＧＮ７５４０）と比較して、ＩＬ－２及びＩＦＮγ放出の用量依存的増加をもたらした。最大ＩＬ－２及びＩＦＮγ放出は、ＮＡＬＭ－６（ＰＤ－Ｌ１を発現していない）と比較して、ＮＡＬＭ６／ＰＤ－Ｌ１細胞を用いた条件で低かった。ＰＤ－Ｌ１を発現するＮＡＬＭ６細胞の存在下で、セミプリマブは、セミプリマブの対応アイソタイプ対照、ＲＥＧＮ１９４５と比較して、最大サイトカイン放出を増加させた。注目すべきことに、１＋２フォーマットのＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体は、二価４－１ＢＢ（ＲＥＧＮ４２４９）抗体と比較して、より高い最大サイトカイン放出及びより高い効力をもたらした。
【０３０８】
（表２０）最大ＩＬ－２放出及び効力値

	NALM6+IgG4P		NALM6+セミプリマブ		NALM6/PD-L1+IgG4P		NALM6/PD-L1+セミプリマブ	
IL-2	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]
REGN7633	853	6.22E-10	756	4.54E-10	205	4.13E-10	470	5.20E-10
REGN7647	1117	5.79E-11	1043	4.77E-11	433	1.17E-10	683	9.11E-11
REGN7650	1242	1.79E-10	1359	1.55E-10	326	2.28E-10	665	2.83E-10
REGN7540	125	ND	135	ND	32	ND	102	ND
REGN4249	413	6.03E-10	307	4.132E-10	143	3.96E-10	259	2.43E-10

略語：　ＮＤ：決定せず、ＮＣ：データが４パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため、計算されなかった。

【０３０９】

（表２１）最大ＩＦＮγ放出及び効力値

	NALM-6+IgG4P		NALM-6+セミプリマブ		NALM-6/PD-L1+IgG4P		NALM-6/PD-L1+セミプリマブ	
IFNγ	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]	最大[pg/mL]	EC50[M]
REGN7633	519	6.37E-10	1095	NC	1	ND	272	1.28E-09
REGN7647	707	8.15E-11	1067	NC	67	NC	557	NC
REGN7650	1008	NC	962	1.56E-10	15	NC	244	NC
REGN7540	86	ND	333	ND	1	ND	14	ND
REGN4249	616	NC	919	NC	7	NC	324	NC

略語：　ＮＤ：決定せず、ＮＣ：データが４パラメータロジスティック方程式に適合しなかったため、計算されなかった。

【０３１０】

実施例１１：ＢＣＭＡ×ＣＤ３二重特異性抗体との組み合わせにおけるＣＤ３８×４－１ＢＢ二重特異性抗体のインビボ抗腫瘍有効性

　この実験で試験された多重特異性抗原結合分子及び対照は、表２２に示されるとおりである。

【０３１１】

（表２２）ＣＤ３８×４－１ＢＢ結合分子及び対照

MABM識別子	説明
REGN5458	BCMA×CD3 bsAB
REGN13168	非TAA×4-1BB(1+2)対照、(hIgG4^{P-PVA})
REGN9686	CD38×4-1BB(1+2)、(G4S)2(hIgG4^{P-PVA})

【０３１２】
ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂと組み合わせたＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２フォーマット二重特異性抗体（ｂｓＡｂ）のインビボ抗腫瘍効果を決定するために、異種腫瘍研究を実施した。－１１日目に、免疫不全のＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}Ｉｌ２ｒｇ^{ｔｍ１Ｗｊｌ}／ＳｚＪ（ＮＳＧ）マウスに、正常な健常ドナー由来の４×１０^{6}個のヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を腹腔内注射した。ホタルルシフェラーゼ（ＭＯＬＰ－８－ルシフェラーゼ細胞）も発現するように操作された、２×１０^{6}個のＢＣＭＡ$^{+}$ＣＤ３８$^{+}$ ＭＯＬＰ－８ヒト多発性骨髄腫腫瘍細胞を、０日目に、マウスに静脈内投与した。次いで、マウス（群当たりｎ＝４～５）に、０．４ｍｇ／ｋｇのＣＤ３結合対照二重特異性Ａｂ又はＢＣＭＡ×ＣＤ３二重特異性抗体（ＲＥＧＮ５４５８、米国特許出願公開第２０２０／００２４３５６号）のいずれかを、４ｍｇ／ｋｇの４－１ＢＢ結合対照二重特異性Ａｂ（１＋２フォーマット）又はＣＤ３８×４－１ＢＢ二重特異性抗体（１＋２フォーマット、ＲＥＧＮ９６８６）と組み合わせて直ちに投与した。マウスには、これらの抗体を７日目及び１４日目に更に２回、合計３回、投与した。麻酔した動物における腫瘍生物発光（ＢＬＩ）を測定することによって、５３日間にわたって腫瘍増殖を評価した。陽性対照として、ある群のマウス（ｎ＝５）に、ＭＯＬＰ－８ルフシェラーゼ細胞及びＰＢＭＣのみを与えたが、抗体は与えなかった（ＰＢＳ処置群）。バックグラウンドＢＬＩレベルを測定するために、ある群のマウス（ｎ＝５）を未処置にし、腫瘍、ＰＢＭＣ、又は抗体を受けなかった（腫瘍なし群）。

【０３１３】
これらの研究は、ＢＣＭＡ×ＣＤ３二重特異性抗体単独療法が、わずかな抗腫瘍有効性のみを実証し、ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２二重特異性抗体単独療法が、抗腫瘍活性をほとんど又は全く実証せず、ＢＣＭＡ×ＣＤ３二重特異性抗体とＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２二重特異性抗体との組み合わせ治療が、いずれかの療法単独よりも優れた、より強力な組み合わせ抗腫瘍有効性をもたらすことを実証している。

【０３１４】
異種腫瘍の移植及び測定
－１１日目に、免疫不全のＮＯＤ．Ｃｇ－Ｐｒｋｄｃ^{ｓｃｉｄ}Ｉｌ２ｒｇ^{ｔｍ１Ｗｊｌ}／ＳｚＪ（ＮＳＧ）マウスに、正常な健常ドナー由来の４×１０^{6}個のヒト末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）を腹腔内注射した。ホタルルシフェラーゼ（ＭＯＬＰ－８－ルシフェラーゼ細胞）も発現するように操作された、２×１０^{6}個のＢＣＭＡ$^{+}$ＣＤ３８$^{+}$ ＭＯＬＰ－８ヒト多発性骨髄腫腫瘍細胞を、０日目に、マウスに静脈内投与した。次いで、マウス（群当たりｎ＝４～５）に、０．４ｍｇ／ｋｇのＣＤ３結合対照二重特異性抗体又はＢＣＭＡ×ＣＤ３二重特異性抗体（ＲＥＧＮ５４５８）のいずれかを、４ｍｇ／ｋｇの４－１ＢＢ結合対照二重特異性抗体（１＋２フォーマット）又はＣＤ３８×４－１ＢＢ二重特異性抗体（１＋２フォーマット、ＲＥＧＮ９６８６）と組み合わせて直ちに投与した。マウスには、これらのＡｂを７日目及び１４日目に更に２回、合計３回、投与した。麻酔した動物における腫瘍生物発光（ＢＬＩ）を測定することによって、５３日間にわたって腫瘍増殖を評価した。陽性対照として、ある群のマウス（ｎ＝５）に、ＭＯＬＰ－８ルフシェラーゼ細胞及びＰＢＭＣのみを与えたが、抗体は与えなかった（ＰＢＳ処置群）。バックグラウンドＢＬＩレベルを測定するために、ある群のマウス（ｎ＝５）を未処置にし、腫瘍、ＰＢＭＣ、又は抗体を受けなかった（腫瘍なし群）。

【０３１５】
異種腫瘍増殖の測定
ＢＬＩイメージングを使用して、腫瘍量を測定した。ＰＢＳ中に懸濁した１５０ｍｇ／ｋｇのルシフェラーゼ基質Ｄ－ルシフェリンを、マウスに腹腔内注射した。この注射の５分後に、Ｘｅｎｏｇｅｎ　ＩＶＩＳシステムを使用してイソフルラン麻酔下でマウスのＢＬＩイメージングを行った。画像取得は、Ｄでの視野、１．５ｃｍの被写体の高さ、中程度のビニングレベルで、Ｌｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅ　Ｓｏｆｔｗａｒｅによって決定された自動露出時間で実行された。ＢＬＩシグナルは、Ｌｉｖｉｎｇ　Ｉｍａｇｅソフトウェ

アを使用して抽出された。関心領域は、各腫瘍塊の周りに描かれ、光子強度は、総フラックス（光子／秒－ｐ／秒）として記録された。

【０３１６】

結果：

表２３～３２は、ヒト多発性骨髄腫腫瘍細胞の投与後６、１０、１３、１７、２０、２４、２７、３１、３４、及び３８日目の腫瘍量及び対象生存率に対する治療組み合わせの結果を提供する。図３は、３８日間にわたる表に示されるデータのグラフ表現である。図４Ａは、腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＰＢＳで治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示し、図４Ｂは、腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＣＤ３結合対照ｂｓＡｂ（０．４ｍｇ／ｋｇ）＋４－１ＢＢ結合対照ｂｓＡｂ（４ｍｇ／ｋｇ）で治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示し、図４Ｃは、腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＣＤ３結合対照ｂｓＡｂ（０．４ｍｇ／ｋｇ）＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ（４ｍｇ／ｋｇ）で治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示し、図４Ｄは、腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ（０．４ｍｇ／ｋｇ）＋４－１ＢＢ結合対照ｂｓＡｂ（４ｍｇ／ｋｇ）で治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示し、図４Ｅは、腫瘍細胞を受容していないマウスと比較した、ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ（０．４ｍｇ／ｋｇ）＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ（４ｍｇ／ｋｇ）で治療されたマウスにおける経時的な腫瘍量を例示する。

【０３１７】

ＢＣＭＡ×ＣＤ３単独療法：　ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ（ＲＥＧＮ５４５８）＋４－１ＢＢ結合対照ｂｓＡｂは、ある程度の抗腫瘍有効性を提供し、ＣＤ３結合対照ｂｓＡｂ＋４－１ＢＢ結合陰性対照ｂｓＡｂを受容したマウスと比較して、二元配置分散分析により、２４日目にｐ＜０．０００１、２６日目にｐ＝０．００１５で、平均ＢＬＩ測定値が低減した。

【０３１８】

ＣＤ３８×４－１ＢＢ単独療法：　ＣＤ３結合対照ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ１＋２ｂｓＡｂ（ＲＥＧＮ９６８６）を用いた治療は、ＣＤ３結合対照ｂｓＡｂ＋４－１ＢＢ結合対照ｂｓＡｂを受容したマウスと比較して、平均ＢＬＩ読み取り値を有意に低減しなかった。

【０３１９】

ＢＣＭＡ×ＣＤ３＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２：　ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ（ＲＥＧＮ５４５８）とＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂ（ＲＥＧＮ９６８６）との組み合わせは、ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂと４－１ＢＢ結合対照ｂｓＡｂを受容したマウスよりも低い平均ＢＬＩ測定値をもたらした（二元配置分散分析により３８日目にｐ＜０．０００１）。

【０３２０】

したがって、これらの研究は、ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ単独療法が、わずかな抗腫瘍有効性のみを実証し、ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂ単独療法が、抗腫瘍活性をほとんど又は全く実証せず、ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂとＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂとの組み合わせ治療が、いずれかの療法単独よりも優れた、より強力な組み合わせ抗腫瘍有効性をもたらすことを実証している。

【０３２１】

（表２３）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－６日目

抗体 治療	6日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	6日目の 総フラックス SEM	6日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	8.67E+05	4.66E+04	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	8.80E+05	4.38E+04	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	7.81E+05	5.36E+04	5
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	8.40E+05	4.47E+04	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	7.82E+05	2.34E+04	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	9.54E+05	3.42E+04	5

【０３２２】
（表２４）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－１０日目

抗体 治療	10日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	10日目の 総フラックス SEM	10日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	1.01E+06	4.01E+04	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	8.84E+05	2.98E+04	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	7.69E+05	3.04E+04	5
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	8.96E+05	4.41E+04	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	8.49E+05	4.95E+04	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	9.41E+05	3.62E+04	5

【０３２３】
（表２５）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－１３日目

抗体 治療	13日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	13日目の 総フラックス SEM	13日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	1.24E+06	1.07E+05	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	1.01E+06	1.60E+05	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	7.67E+05	2.92E+04	5
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	7.20E+05	3.41E+04	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	6.37E+05	2.39E+04	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	7.88E+05	3.52E+04	5

【０３２４】
（表２６）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－１７日目

抗体 治療	17日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	17日目の 総フラックス SEM	17日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	6.16E+06	1.51E+06	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	3.81E+06	1.07E+06	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	1.84E+06	3.30E+05	5
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	6.74E+05	7.70E+04	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	7.69E+05	5.96E+04	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	7.63E+05	4.76E+04	5

【０３２５】
（表２７）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－２０日目

抗体 治療	20日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	20日目の 総フラックス SEM	20日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	1.10E+07	1.70E+06	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	1.06E+07	5.11E+06	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	3.81E+06	5.67E+05	5
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	7.88E+05	3.78E+04	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	7.36E+05	2.41E+04	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	8.52E+05	1.57E+04	5

【０３２６】
（表２８）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－２４日目

抗体 治療	24日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	24日目の 総フラックス SEM	24日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	2.44E+07	4.43E+06	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	3.60E+07	1.18E+07	5
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	1.82E+07	6.39E+06	5
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	1.14E+06	4.30E+05	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	7.15E+05	1.19E+04	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	7.91E+05	2.05E+04	5

【０３２７】
（表２９）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－２７日目

抗体 治療	27日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	27日目の 総フラックス SEM	27日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	4.21E+07	7.71E+06	4
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	2.67E+07	7.65E+06	2
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	6.11E+07	3.02E+07	5
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	1.47E+06	5.55E+05	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	6.92E+05	5.29E+04	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	8.85E+05	6.27E+04	5

【０３２８】
（表３０）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－３１日目

抗体 治療	31日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	31日目の 総フラックス SEM	31日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	生存マウスなし	該当なし	0
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	7.95E+07	0.00E+00	1
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	1.15E+08	5.50E+07	5
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	3.91E+06	2.35E+06	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	8.08E+05	8.44E+04	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	8.65E+05	3.41E+04	5

【０３２９】
（表３１）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－３４日目

抗体 治療	34日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	34日目の 総フラックス SEM	34日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	生存マウスなし	該当なし	0
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	生存マウスなし	該当なし	0
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	2.24E+08	1.60E+08	2
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	3.25E+06	1.75E+06	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	9.27E+05	1.26E+05	5
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	9.75E+05	2.55E+04	5

【０３３０】

（表３２）ＢＣＭＡ×ＣＤ３　ｂｓＡｂ＋ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２　ｂｓＡｂによる組み合わせ治療を通じた抗腫瘍有効性－３８日目

抗体 治療	38日目の腫瘍量- 平均総フラックス (p/s)	38日目の 総フラックス SEM	38日目にまだ 生存している マウスの数
PBSビヒクル	生存マウスなし	該当なし	0
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	生存マウスなし	該当なし	0
CD3結合対照bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	生存マウスなし	該当なし	0
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ 4-1BB結合対照bsAb(4mg/kg)	2.12E+07	1.11E+07	4
BCMA×CD3 bsAb(0.4mg/kg)+ CD38×4-1BB(4mg/kg)	1.79E+06	1.13E+06	4
腫瘍なし(バックグラウンドBLI)	8.22E+05	7.30E+04	5

【０３３１】

実施例１２：抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗原結合分子のＢｉａｃｏｒｅ結合動態

抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ抗体の結合動態を、単量体及び二量体ヒト４－１ＢＢ試薬に結合する抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体の抗体捕捉フォーマットＢｉａｃｏｒｅ結合動態、並びに二量体ヒト４－１ＢＢ試薬に結合する抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体

の抗原捕捉フォーマットＢｉａｃｏｒｅ結合動態によって決定した。両方の実験を２５℃で実施した。

【０３３２】

抗体捕捉フォーマット方法：

精製された抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体に結合する、Ｃ末端ｍｙｃ－ｍｙｃ－ヘキサヒスチジンタグ（ｈ４－１ＢＢ．ｍｍＨ、ＲＥＧＮ３５８４）を伴って発現されたヒト４－１ＢＢ、又はＣ末端マウスＦｃタグ（ｈ４－１ＢＢ．ｍＦｃ、ＲＥＧＮ３５８５）を伴って発現されたヒト４－１ＢＢの平衡解離定数（K_D値）を、Ｂｉａｃｏｒｅ　８ｋ機器を使用したリアルタイム表面プラズモン共鳴バイオセンサーを使用して決定した。ＣＭ５　Ｂｉａｃｏｒｅセンサー表面を、モノクローナルマウス抗ヒトＦｃ抗体（ＲＥＧＮ２５６７）とアミンカップリングすることにより誘導体化した。全てのＢｉａｃｏｒｅ結合試験を、０．０１ＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、０．１５ＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、０．０５％ｖ／ｖの界面活性剤Ｐ２０（ＨＢＳ－ＥＰ泳動緩衝液）から構成される緩衝液中で実施した。ＨＢＳ－ＥＰ泳動緩衝液中で調製された異なる濃度のｈ４－１ＢＢ．ｍｍＨ（ＲＥＧＮ３５８４）（４倍段階希釈で１００～６．２５ｎＭの範囲）、又はＨＢＳ－ＥＰ泳動緩衝液中で調製されたｈ４－１ＢＢ．ｍＦｃ（ＲＥＧＮ３５８５）（４倍段階希釈で１００～１．５６ｎＭの範囲）を、３０μＬ／分の流量で、捕捉された抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体上に注入した。抗体－試薬の会合を５分間モニタリングし、一方で、ＨＢＳ－ＥＰ泳動緩衝液中の解離を１０分間モニタリングした。各サイクルの終了時に、抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体捕捉表面を、２０ｍＭリン酸の１０秒間の注入を使用して再生した。全ての結合動態実験を２５℃で実施した。結果を表３３及び３４に提示する。

【０３３３】

抗原捕捉フォーマット方法：

精製された抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体に結合する、Ｃ末端マウスＦｃタグ（ｈ４－１ＢＢ．ｍＦｃ、ＲＥＧＮ３５８５）を伴って発現されたヒト４－１ＢＢの平衡解離定数（K_D値）を、Ｂｉａｃｏｒｅ　４０００機器を使用したリアルタイム表面プラズモン共鳴バイオセンサーを使用して決定した。ＣＭ５　Ｂｉａｃｏｒｅセンサー表面を、ポリクローナルウサギ抗マウスＦｃ抗体（ＧＥ、＃ＢＲ－１００８－３８）とアミンカップリングすることにより誘導体化した。全てのＢｉａｃｏｒｅ結合試験を、０．０１ＭのＨＥＰＥＳ（ｐＨ７．４）、０．１５ＭのＮａＣｌ、３ｍＭのＥＤＴＡ、０．０５％ｖ／ｖの界面活性剤Ｐ２０（ＨＢＳ－ＥＰ泳動緩衝液）から構成される緩衝液中で実施した。ＨＢＳ－ＥＰ泳動緩衝液中で調製された異なる濃度のＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２構築物（４倍段階希釈で１００～６．２５ｎＭの範囲）を、ｈ４－１ＢＢ．ｍＦｃ（ＲＥＧＮ３５８５）捕捉表面上に３０μＬ／分の流量で注入した。抗体－試薬の会合を５分間モニタリングし、一方で、ＨＢＳ－ＥＰ泳動緩衝液中の解離を１０分間モニタリングした。各サイクルの終了時に、ｈ４－１ＢＢ．ｍＦｃ捕捉表面を、１０ｍＭグリシン、ｐＨ１．５の４０秒間の注入を使用して再生した。全ての結合動態実験を２５℃で実施した。結果を表３５に提示する。

【０３３４】

両フォーマットのデータ分析：

Ｃｙｔｉｖａ　Ｉｎｓｉｇｈｔ曲線フィッティングソフトウェアを用いて、リアルタイムセンサーグラムを１：１結合モデルにフィッティングさせることによって、動力学的結合速度定数（k_a）及び解離速度定数（k_d）を決定した。結合解離平衡定数（K_D）及び解離半減期（$t_{1/2}$）を、反応速度定数から、以下：

$$K_D\,(\mathrm{M}) = \frac{kd}{ka}, \quad \text{及び} \quad t½\,(\mathrm{min}) = \frac{\ln(2)}{60 * kd}$$

のように計算した。

【０３３５】

（表３３）２５℃における表面捕捉抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体に対する単量体ヒト４－１ＢＢの動態及び平衡結合パラメータ

REGN番号/ Ab PID番号	Ab捕捉 (RU)	100nM h4-1BB.mmH結合 (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分)
REGN7633	394.6±1.4	24.9*	IC**	IC**	IC**	IC**
REGN7647	506.8±3.1	86.1	3.24E+05	5.33E-03	1.65E-08	2.2
REGN7650	458.9±0.4	41.9	2.62E+05	5.35E-03	2.04E-08	2.2
REGN9682	607.1±1.1	106.8	3.58E+05	4.94E-03	1.38E-08	2.3
REGN9686	606.9±0.5	101.3	3.19E+05	4.74E-03	1.48E-08	2.4

＊ｈ４－１ｂｂ．ｍｍＨの用量依存的結合が観察された
＊＊ＩＣ：観察された結合は、結合シミュレーションモデルに適合せず、現在の実験条件下で結合動態パラメータが決定されなかった。

【０３３６】

（表３４）２５℃における表面捕捉抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体に対する二量体ヒト４－１ＢＢの動態及び平衡結合パラメータ

REGN番号/ Ab PID番号	Ab捕捉 (RU)	100nM h4-1BB.mFc結合 (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分)
REGN7633	395.4±0.3	82.1	2.74E+05	2.51E-04	9.17E-10	46.0
REGN7647	505.3±1.4	223.6	1.95E+05	2.31E-04	1.18E-09	50.0
REGN7650	458.3±0.6	152.0	1.02E+05	1.22E-04	1.20E-09	94.9
REGN9682	603.2±1.7	283.3	2.06E+05	1.77E-04	8.60E-10	65.3
REGN9686	600.2±2.4	267.4	1.71E+05	2.05E-04	1.20E-09	56.3

【０３３７】

（表３５）２５℃における表面捕捉二量体ヒト４－１ＢＢに対する抗ＣＤ３８×４－１ＢＢ　１＋２抗体の動態及び平衡結合パラメータ

REGN番号/ Ab PID番号	Ag+捕捉	100nM Ab結合 (RU)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	KD (M)	t1/2 (分)
REGN7633	132.0±0.4	285.3	1.86E+05	2.37E-03	1.27E-08	4.9
REGN7647	142.2±0.5	205.8	6.26E+05	3.51E-04	5.60E-10	32.9
REGN7650	127.5±0.8	265.7	2.12E+05	1.69E-04	7.97E-10	68.4
REGN9682	116.8±0.4	233.7	4.30E+05	3.08E-04	7.16E-10	37.6
REGN9686	127.4±0.8	232.3	4.70E+05	3.37E-04	7.17E-10	34.3

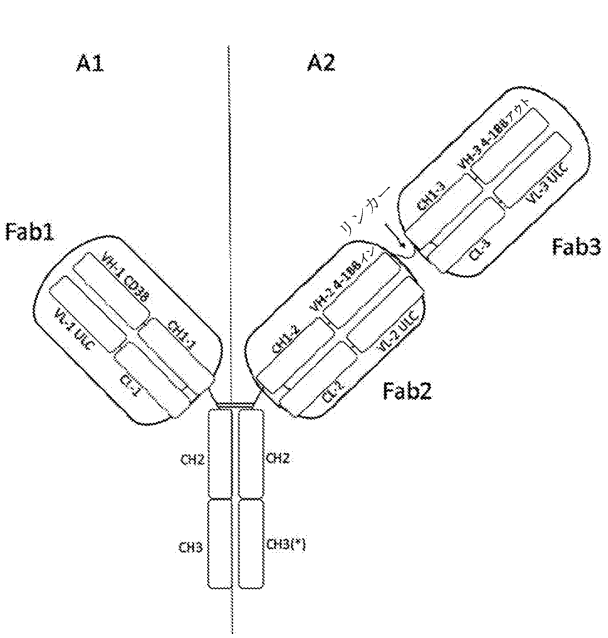
【０３３８】

本発明は、本明細書に説明される具体的な実施形態によって範囲を限定されるものでは

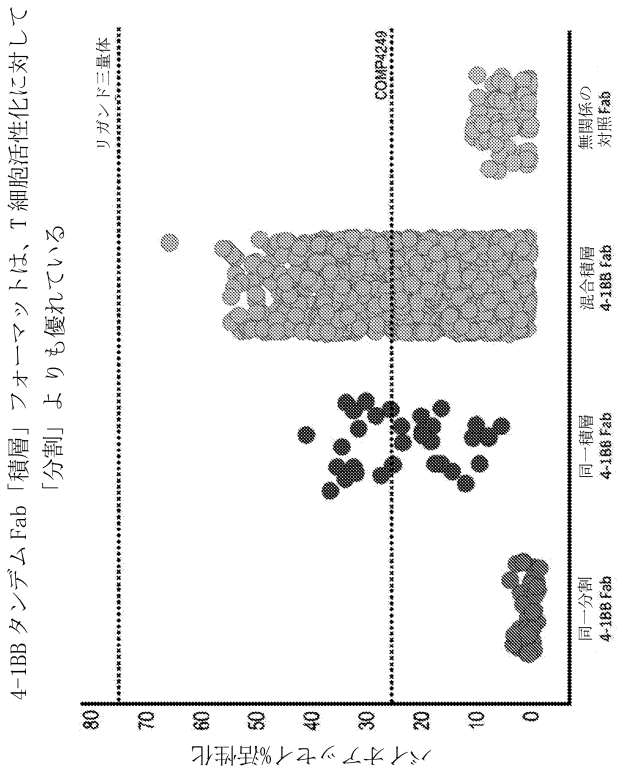
ない。実際には、本明細書に説明されるものに加えて本発明の様々な修正が、前述の記載から当業者に明らかとなるであろう。そのような修正は、添付される特許請求の範囲内にあることを意図している。

【図面】

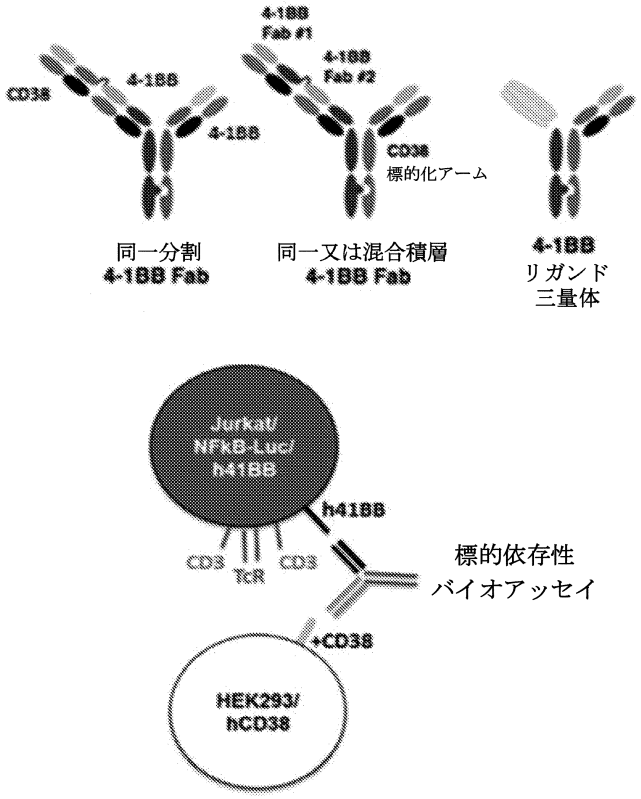
【図１】



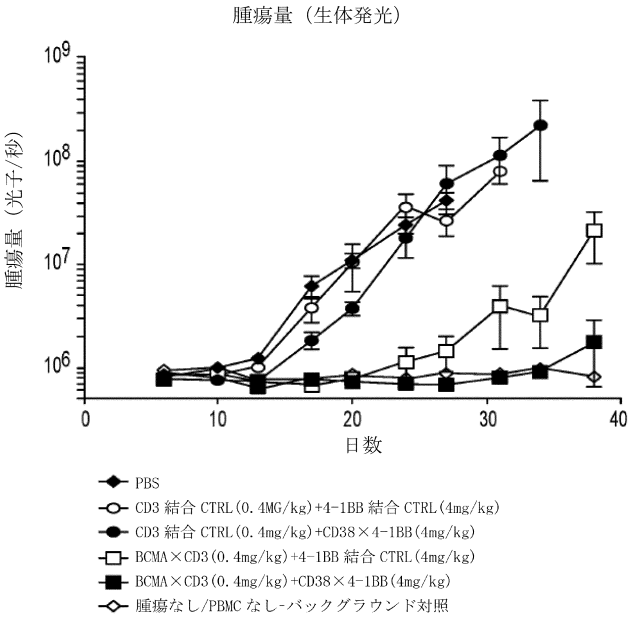
【図２Ａ】



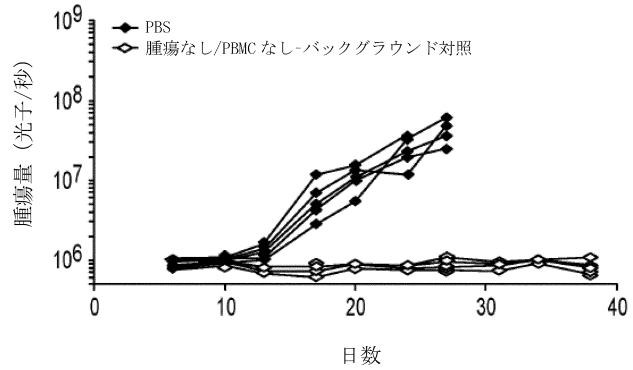
【図２Ｂ】



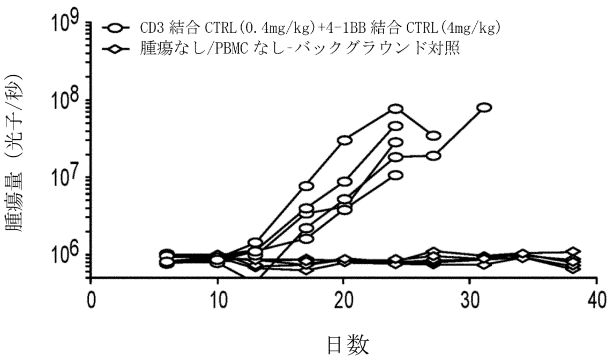
【図３】



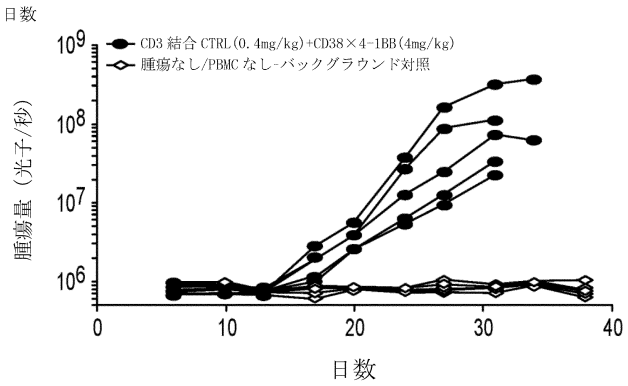
【図４Ａ】



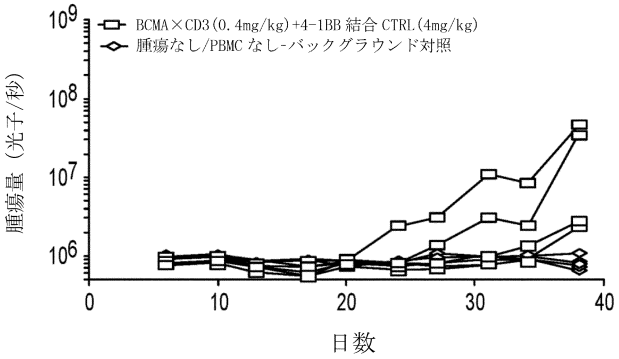
【図４Ｂ】



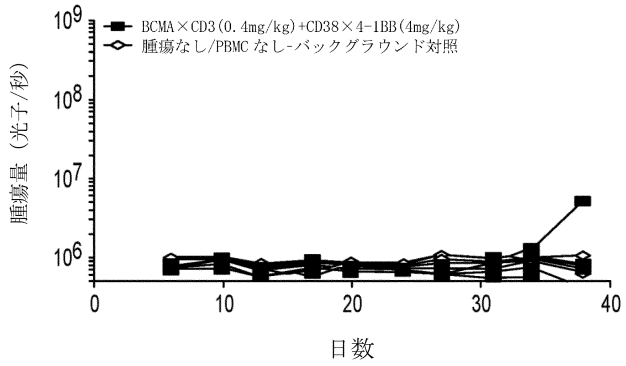
【図４Ｃ】



【図４Ｄ】



【図４Ｅ】



【配列表】

2025519057000001.xml

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/022556

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. A61P35/00 C07K16/28
ADD.

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
A61P C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
EPO-Internal, EMBASE, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CHRISTINA CLAUS ET AL: "Tumor-targeted 4-1BB agonists for combination with T cell bispecific antibodies as off-the-shelf therapy", SCIENCE TRANSLATIONAL MEDICINE, vol. 11, no. 496, 12 June 2019 (2019-06-12), page eaav5989, XP055722436, ISSN: 1946-6234, DOI: 10.1126/scitranslmed.aav5989 abstract Results -----	1-76
Y	WO 2018/114754 A1 (HOFFMANN LA ROCHE [CH]; HOFFMANN LA ROCHE [US]) 28 June 2018 (2018-06-28) figures 1A, 1B; example 12 -----	1-76

-/--

[x] Further documents are listed in the continuation of Box C.
[x] 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
11 August 2023	22/08/2023

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Rojo Romeo, Elena

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/022556

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	MIKKELSEN KASPER ET AL: "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific 4-1BB-Costimulation Induced by CEA-Targeted 4-1BB-Agonistic Trimerbodies", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 10, 31 July 2019 (2019-07-31), XP093072904, DOI: 10.3389/fimmu.2019.01791 abstract figure 1 -----	1-76
Y	MARLON J. HINNER ET AL: "Tumor-Localized Costimulatory T-Cell Engagement by the 4-1BB/HER2 Bispecific Antibody-Anticalin Fusion PRS-343", CLINICAL CANCER RESEARCH, vol. 25, no. 19, 28 May 2019 (2019-05-28), pages 5878-5889, XP55708423, US ISSN: 1078-0432, DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-18-3654 abstract figure 1 -----	1-76
Y	LEJEUNE MARGAUX ET AL: "Bispecific, T-Cell-Recruiting Antibodies in B-Cell Malignancies", FRONTIERS IN IMMUNOLOGY, vol. 11, 7 May 2020 (2020-05-07), XP55965850, DOI: 10.3389/fimmu.2020.00762 table 3 -----	1-38
Y	RUIZ-ARGUEELLES G J ET AL: "CELL SURFACE MARKERS IN MULTIPLE MYELOMA", MAYO CLINIC PROCEEDINGS, DOWDEN HEALTH MEDIA, INC, US, vol. 69, no. 7, 1 July 1994 (1994-07-01), pages 684-690, XP008002967, ISSN: 0025-6196 abstract -----	1-76
A	VAN BLARCOM THOMAS ET AL: "Productive common light chain libraries yield diverse panels of high affinity bispecific antibodies", MABS, vol. 10, no. 2, 17 February 2018 (2018-02-17), pages 256-268, XP93053006, US ISSN: 1942-0862, DOI: 10.1080/19420862.2017.1406570 abstract ----- -/--	1-76

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/022556

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2022/061098 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 24 March 2022 (2022-03-24) The query sequence SEQ ID NO:40 has 100 % identity (100 % similarity) over 124 positions in a common overlap (range (q:s): 1-124:1-124) with subject CAS:2022_781588_2765126030_1 (length: 124) from WO2022061098-A1 published on 2022-03-24. The query sequence SEQ ID NO:48 has 100 % identity (100 % similarity) over 108 positions in a common overlap (range (q:s): 1-108:1-108) with subject CAS:2022_781588_2765126052_1 (length: 108) from WO2022061098-A1 published on 2022-03-24. -----	1-76
A	WO 2017/189959 A1 (VOYAGER THERAPEUTICS INC [US]) 2 November 2017 (2017-11-02) The query sequence SEQ ID NO:32 has 89.8 % identity (93.7 % similarity) over 127 positions in a common overlap (range (q:s): 1-127:1-127) with subject GSP:BEO60236 (length: 127) from WO2017189959-A1 published on 2017-11-02. -----	1-76
A	WO 2015/138460 A1 (REGENERON PHARMA [US]) 17 September 2015 (2015-09-17) The query sequence SEQ ID NO:62 has 90.6 % identity (96.9 % similarity) over 127 positions in a common overlap (range (q:s): 1-127:1-126) with subject CAS:2015_1504949_1808969676_1 (length: 126) from WO2015138460-A1 published on 2015-09-17. -----	1-76
A	WO 2022/023292 A2 (UNIV FRIEDRICH ALEXANDER ER [DE]) 3 February 2022 (2022-02-03) The query sequence SEQ ID NO:72 has 89.5 % identity (95.6 % similarity) over 114 positions in a common overlap (range (q:s): 1-114:1-114) with subject CAS:2022_259225_2758743643_1 (length: 114) from WO2022023292-A2 published on 2022-02-03. ----- -/--	1-76

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2023/022556

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2018/056821 A1 (MERUS NV [NL]) 29 March 2018 (2018-03-29) The query sequence SEQ ID NO:86 has 85.5 % identity (92.7 % similarity) over 124 positions in a common overlap (range (q:s): 1-121:1-122) with subject GSP:BFE06487 (length: 122) from WO2018056821-A1 published on 2018-03-29. The query sequence SEQ ID NO:86 has 85.2 % identity (94.3 % similarity) over 122 positions in a common overlap (range (q:s): 1-121:1-122) with subject GSP:BFE06433 (length: 122) from WO2018056821-A1 published on 2018-03-29. The query sequence SEQ ID NO:94 has 89.3 % identity (95.9 % similarity) over 121 positions in a common overlap (range (q:s): 1-121:1-121) with subject GSP:BFE06440 (length: 121) from WO2018056821-A1 published on 2018-03-29 -----	1-76

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/022556

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. [X] forming part of the international application as filed.

   b. [ ] furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)).

      [ ] accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. [ ] With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/US2023/022556

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

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

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☒ Claims Nos.: 1-76 (partially)
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims;; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.

☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.

☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

International Application No. PCT/US2023/022556

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

Claims Nos.: 1-76(partially)

Please see WO-ISA, Item III.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guidelines C-IV, 7.2), should the problems which led to the Article 17(2) PCT declaration be overcome.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/022556

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2018114754 A1	28-06-2018	AU 2017380981 A1	02-05-2019
		CA 3039430 A1	28-06-2018
		CN 110087682 A	02-08-2019
		EP 3554542 A1	23-10-2019
		IL 267284 A	29-08-2019
		JP 7125400 B2	24-08-2022
		JP 2020504104 A	06-02-2020
		JP 2022176951 A	30-11-2022
		KR 20190097039 A	20-08-2019
		TW 201834683 A	01-10-2018
		US 2020325225 A1	15-10-2020
		WO 2018114754 A1	28-06-2018
WO 2022061098 A1	24-03-2022	AU 2021345262 A1	11-05-2023
		CA 3191839 A1	24-03-2022
		CN 116348495 A	27-06-2023
		CO 2023004448 A2	27-04-2023
		EP 4214234 A1	26-07-2023
		IL 301037 A	01-05-2023
		KR 20230070259 A	22-05-2023
		US 2022089766 A1	24-03-2022
		WO 2022061098 A1	24-03-2022
WO 2017189959 A1	02-11-2017	EP 3448874 A1	06-03-2019
		US 2019153471 A1	23-05-2019
		US 2022389449 A1	08-12-2022
		WO 2017189959 A1	02-11-2017
WO 2015138460 A1	17-09-2015	AU 2015229591 A1	29-09-2016
		BR 112016020752 A2	23-01-2018
		CA 2940685 A1	17-09-2015
		CL 2016002252 A1	30-06-2017
		CN 106459199 A	22-02-2017
		DK 3126388 T3	29-07-2019
		EA 201691824 A1	30-12-2016
		EP 3126388 A1	08-02-2017
		ES 2736126 T3	26-12-2019
		HR P20191335 T1	18-10-2019
		HU E045307 T2	30-12-2019
		JP 6632984 B2	22-01-2020
		JP 2017510559 A	13-04-2017
		KR 20160131026 A	15-11-2016
		LT 3126388 T	26-08-2019
		MA 39313 A1	31-01-2018
		ME 03525 B	20-04-2020
		MY 178160 A	06-10-2020
		NZ 724229 A	30-06-2023
		PH 12016501680 A1	24-10-2016
		PL 3126388 T3	31-10-2019
		PT 3126388 T	20-08-2019
		SG 11201606979T A	29-09-2016
		SI 3126388 T1	30-08-2019
		US 2015259423 A1	17-09-2015
		US 2016304615 A1	20-10-2016
		US 2018312594 A1	01-11-2018
		US 2021147557 A1	20-05-2021
		WO 2015138460 A1	17-09-2015
		ZA 201605894 B	31-07-2019

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/US2023/022556

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2022023292 A2	03-02-2022	NONE	
WO 2018056821 A1	29-03-2018	AU 2017332452 A1	11-04-2019
		AU 2021202085 A1	29-04-2021
		BR 112019005895 A2	11-06-2019
		CA 3038020 A1	29-03-2018
		CN 109983033 A	05-07-2019
		EA 201990578 A1	31-10-2019
		EP 3515951 A1	31-07-2019
		IL 265541 A	30-05-2019
		JP 7305538 B2	10-07-2023
		JP 2019537429 A	26-12-2019
		KR 20190065318 A	11-06-2019
		MA 46278 A	31-07-2019
		NZ 751956 A	28-01-2022
		PH 12019550044 A1	11-11-2019
		TW 201920653 A	01-06-2019
		US 2020017595 A1	16-01-2020
		WO 2018056821 A1	29-03-2018

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (April 2005)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI			テーマコード（参考）
C12N 1/15 (2006.01)		C12N	1/15		
C12N 1/19 (2006.01)		C12N	1/19		
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21		
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10		
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08		
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	T	
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00		
A61P 35/02 (2006.01)		A61P	35/02		
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	121	
A61K 45/00 (2006.01)		A61K	45/00		

,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,ME,MK,MT,NL,NO,PL,PT,RO,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CV,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IQ,IR,IS,IT,JM,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,MG,MK,MN,MU,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW

弁理士　刑部 俊
(74)代理人　100142929
弁理士　井上 隆一
(74)代理人　100148699
弁理士　佐藤 利光
(74)代理人　100188433
弁理士　梅村 幸輔
(74)代理人　100128048
弁理士　新見 浩一
(74)代理人　100129506
弁理士　小林 智彦
(74)代理人　100114340
弁理士　大関 雅人
(74)代理人　100214396
弁理士　塩田 真紀
(74)代理人　100121072
弁理士　川本 和弥
(72)発明者　バブ ロバート
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７ リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内
(72)発明者　ディリロ デイヴィッド
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７ リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内
(72)発明者　ハーマン アイナー
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７ リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内
(72)発明者　オルソン カーラ
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７ リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内
(72)発明者　シェン ヤン
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７

７７ リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内
(72)発明者 ウルマン エリカ
アメリカ合衆国 １０５９１ ニューヨーク州 タリタウン オールド ソー ミル リバー ロード ７７ リジェネロン ファーマシューティカルズ インコーポレイテッド内

Ｆターム（参考） 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01
4B065 AA01X AA26X AA57X AA72X AA87X AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA19 MA66 NA14 ZB26 ZB27 ZC41 ZC75
4C085 AA14 BB11 EE01 EE03 GG02 GG03 GG04
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA76 EA22 EA28 FA72
FA74 GA26