

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2024-507937

(P2024-507937A)

(43)公表日 令和6年2月21日(2024.2.21)

(51)国際特許分類	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z 4 B 0 6 5
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T Z N A 4 C 0 8 5
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	4 H 0 4 5
A 6 1 P 35/02 (2006.01)	A 6 1 P 35/02	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全57頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2023-551762(P2023-551762)	(71)出願人 517262346
(86)(22)出願日 令和4年2月28日(2022.2.28)	ラヴァ・セラピューティクス・エヌ・ヴィ
(85)翻訳文提出日 令和5年9月27日(2023.9.27)	イ
(86)国際出願番号 PCT/EP2022/054993	オランダ国, 3 5 8 4 セーエム ユトレ
(87)国際公開番号 WO2022/180271	ヒト ヤレラーン 6 2
(87)国際公開日 令和4年9月1日(2022.9.1)	(74)代理人 100079108
(31)優先権主張番号 21159698.6	弁理士 稲葉 良幸
(32)優先日 令和3年2月26日(2021.2.26)	(74)代理人 100109346
(33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)	弁理士 大貫 敏史
(31)優先権主張番号 63/166,339	(74)代理人 100117189
(32)優先日 令和3年3月26日(2021.3.26)	弁理士 江口 昭彦
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)	(74)代理人 100134120
(31)優先権主張番号 63/274,709	弁理士 内藤 和彦
	(72)発明者 ルーバーズ, ロベルトゥス コーネリス
	オランダ国, 3 5 8 4 シーエム ユトレ
	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 1 2 3 及びガンモデルタ T細胞受容体に結合する抗体

(57)【要約】

本発明は、ヒト C D 1 2 3 に結合することができ、ヒト V 9 V 2 T細胞受容体の V 2 鎖に結合することができる抗体に関する。本発明は更に、本発明の抗体を含む医薬組成物、及び医学的治療のための本発明の抗体の使用に関する。

【選択図】なし

## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

ヒトCD123に結合することができる第1の抗原結合領域と、ヒトV<sub>H</sub>9V<sub>H</sub>2T細胞受容体のV<sub>H</sub>2鎖に結合することができる第2の抗原結合領域とを含む、多重特異性抗体。

## 【請求項 2】

前記多重特異性抗体が、二重特異性抗体である、請求項1に記載の多重特異性抗体。

## 【請求項 3】

前記第1の抗原結合領域が、単ドメイン抗体であり、及び/または前記第2の抗原結合領域が、単ドメイン抗体である、先行請求項のいずれか1項に記載の多重特異性抗体

10

## 【請求項 4】

前記多重特異性抗体が、配列番号1に記載の配列を有する抗体と、ヒトCD123への結合のために競合し、好ましくは、前記多重特異性抗体が、前記配列番号1に記載の配列を有する抗体とヒトCD123上の同じエピトープに結合する、先行請求項のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

## 【請求項 5】

前記第1の抗原結合領域が、配列番号2に記載のV<sub>H</sub>CDR1配列、配列番号3に記載のV<sub>H</sub>CDR2配列、及び配列番号4に記載のV<sub>H</sub>CDR3配列を含み、好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、配列番号1、25～34に記載の配列の群から選択される配列、または配列番号1、25～34に記載の配列の群から選択される配列と少なくとも90%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる、先行請求項のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

20

## 【請求項 6】

前記多重特異性抗体が、配列番号9に記載の配列を有する抗体と、ヒトCD123への結合のために競合し、好ましくは、前記多重特異性抗体が、前記配列番号9に記載の配列を有する抗体とヒトCD123上の同じエピトープに結合する、請求項1～3のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

## 【請求項 7】

前記第1の抗原結合領域が、配列番号10に記載のV<sub>H</sub>CDR1配列、配列番号11に記載のV<sub>H</sub>CDR2配列、及び配列番号12に記載のV<sub>H</sub>CDR3配列を含み、好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、前記配列番号9に記載の配列、または前記配列番号9に記載の配列と少なくとも90%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる、請求項6に記載の多重特異性抗体。

30

## 【請求項 8】

前記多重特異性抗体が、ヒトV<sub>H</sub>9V<sub>H</sub>2T細胞を活性化することが可能である、先行請求項のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

## 【請求項 9】

前記多重特異性抗体が、配列番号17に記載の配列を有する抗体と、ヒトV<sub>H</sub>2への結合のために競合し、式中、X<sub>4</sub>がYであり、好ましくは、前記多重特異性抗体が、前記配列番号17に記載の配列を有する抗体とヒトV<sub>H</sub>2上の同じエピトープに結合し、式中、X<sub>4</sub>がYであり、

40

または

前記多重特異性抗体が、配列番号36に記載の配列を有する抗体と、ヒトV<sub>H</sub>2への結合のために競合し、好ましくは、前記多重特異性抗体が、前記配列番号36に記載の配列を有する抗体とヒトV<sub>H</sub>2上の同じエピトープに結合し、

または

前記多重特異性抗体が、配列番号37に記載の配列を有する抗体と、ヒトV<sub>H</sub>2への結

50

合のために競合し、好ましくは、前記多重特異性抗体が、前記配列番号 37 に記載の配列を有する抗体とヒト V<sub>H</sub> 2 上の同じエピトープに結合し、

または

前記多重特異性抗体が、配列番号 38 に記載の配列を有する抗体と、ヒト V<sub>H</sub> 2 への結合のために競合し、好ましくは、前記多重特異性抗体が、前記配列番号 38 に記載の配列を有する抗体とヒト V<sub>H</sub> 2 上の同じエピトープに結合する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 10】

前記第 2 の抗原結合領域が、配列番号 18 に記載の V<sub>H</sub> CDR1 配列、配列番号 19 に記載の V<sub>H</sub> CDR2 配列、及び配列番号 20 に記載の V<sub>H</sub> CDR3 配列を含み、好ましくは、前記第 2 の抗原結合領域が、前記配列番号 17 に記載の配列、もしくは前記配列番号 17 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば、少なくとも 92%、例えば、少なくとも 94%、例えば、少なくとも 96%、例えば、少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなり、

10

または

前記第 2 の抗原結合領域が、配列番号 39 に記載の V<sub>H</sub> CDR1 配列、配列番号 40 に記載の V<sub>H</sub> CDR2 配列、及び配列番号 41 に記載の V<sub>H</sub> CDR3 配列を含み、好ましくは、前記第 2 の抗原結合領域が、前記配列番号 36 に記載の配列、もしくは前記配列番号 36 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば少なくとも 92%、例えば少なくとも 94%、例えば少なくとも 96%、例えば少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなり、

20

または

前記第 2 の抗原結合領域が、配列番号 42 に記載の V<sub>H</sub> CDR1 配列、配列番号 43 に記載の V<sub>H</sub> CDR2 配列、及び配列番号 44 に記載の V<sub>H</sub> CDR3 配列を含み、好ましくは、前記第 2 の抗原結合領域が、前記配列番号 37 に記載の配列、もしくは前記配列番号 37 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば少なくとも 92%、例えば少なくとも 94%、例えば少なくとも 96%、例えば少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなり、

または

前記第 2 の抗原結合領域が、配列番号 45 に記載の V<sub>H</sub> CDR1 配列、配列番号 46 に記載の V<sub>H</sub> CDR2 配列、及び配列番号 47 に記載の V<sub>H</sub> CDR3 配列を含み、好ましくは、前記第 2 の抗原結合領域が、前記配列番号 38 に記載の配列、もしくは前記配列番号 38 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば少なくとも 92%、例えば少なくとも 94%、例えば少なくとも 96%、例えば少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなる、先行請求項のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

30

【請求項 11】

(i) 前記第 1 の抗原結合領域が、配列番号 2 に記載の V<sub>H</sub> CDR1 配列、配列番号 3 に記載の V<sub>H</sub> CDR2 配列、及び配列番号 4 に記載の V<sub>H</sub> CDR3 配列を含み、前記第 2 の抗原結合領域が、配列番号 18 に記載の V<sub>H</sub> CDR1 配列、配列番号 19 に記載の V<sub>H</sub> CDR2 配列、及び配列番号 20 に記載の V<sub>H</sub> CDR3 配列を含む、または

40

(ii) 前記第 1 の抗原結合領域が、配列番号 10 に記載の V<sub>H</sub> CDR1 配列、配列番号 11 に記載の V<sub>H</sub> CDR2 配列、及び配列番号 12 に記載の V<sub>H</sub> CDR3 配列を含み、前記第 2 の抗原結合領域が、配列番号 18 に記載の V<sub>H</sub> CDR1 配列、配列番号 19 に記載の V<sub>H</sub> CDR2 配列、及び配列番号 20 に記載の V<sub>H</sub> CDR3 配列を含む、先行請求項のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 12】

ヒト CD123 に結合することができる前記第 1 の抗原結合領域が、前記ヒト V<sub>H</sub> 2 鎖に結合することができる前記第 2 の抗原結合領域の N 末端に位置する、先行請求項のいずれか 1 項に記載の多重特異性抗体。

【請求項 13】

50

前記多重特異性抗体が、Fc領域、好ましくはヒトFc領域などの半減期延長ドメインを更に含む、先行請求項のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

【請求項14】

前記Fc領域が、2つのFcポリペプチドを含むヘテロ二量体であり、前記第1の抗原結合領域が、第1のFcポリペプチドに融合され、前記第2の抗原結合領域が、第2のFcポリペプチドに融合され、前記第1及び第2のFcポリペプチドが、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成を促進する非対称アミノ酸変異を含み、好ましくは、前記第1のFcポリペプチドが、T366W置換を含み、かつ前記第2のFcポリペプチドが、T366S、L368A及びY407V置換を含むか、またはその逆を含み、前記アミノ酸位置が、EU付番システムによるヒトIgG1に対応する、請求項13に記載の多重特異性抗体。

10

【請求項15】

前記第1及び第2のFcポリペプチドの220位のシステイン残基が欠失または置換されており、前記アミノ酸位置が、前記EU付番システムによるヒトIgG1に対応する、請求項13または14のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

【請求項16】

前記第1及び第2のFcポリペプチドが、234位及び/または235位に変異を更に含み、好ましくは、前記第1及び第2のFcポリペプチドが、L234F及びL235E置換を含み、前記アミノ酸位置が、前記EU付番システムによるヒトIgG1に対応する、請求項13～15のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

20

【請求項17】

前記第1のFcポリペプチドが配列番号21に記載の配列を含み、前記第2のFcポリペプチドが、配列番号22に記載の配列を含むか、またはその逆を含む、請求項13～16のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

【請求項18】

前記多重特異性抗体が、V9V2 T細胞によるCD123発現細胞、例えば、C1R-neo細胞またはTHP-1細胞の殺傷を媒介することが可能である、先行請求項のいずれか1項に記載の多重特異性抗体。

【請求項19】

ヒトCD123に結合することができる第1の抗原結合領域を含む抗体であって、前記第1の抗原結合領域が単ドメイン抗体であり、

30

(i) 配列番号2に記載のVH CDR1配列、配列番号3に記載のVH CDR2配列、及び配列番号4に記載のVH CDR3配列を含み、好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、配列番号1、25～34に記載の配列の群から選択される配列、もしくは配列番号1、25～34に記載の配列の群から選択される配列と少なくとも90%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなり、または、

(ii) 配列番号10に記載のVH CDR1配列、配列番号11に記載のVH CDR2配列、及び配列番号12に記載のVH CDR3配列を含み、好ましくは、前記第1の抗原結合領域が、配列番号9に記載の配列、または前記配列番号9に記載の配列と少なくとも90%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなる、前記抗体。

40

【請求項20】

先行請求項のいずれか1項に記載の多重特異性抗体、または請求項19に記載の抗体と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、薬学的組成物。

【請求項21】

請求項1～18のいずれか1項に記載の多重特異性抗体、または医薬として、好ましくはがんの治療に使用するため、より好ましくは急性骨髄性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病、有毛細胞白血病、ホジキンリンパ腫、芽細胞性形質細胞様樹状突起腫瘍、慢性

50

骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、B細胞慢性リンパ増殖性疾患または骨髄異形成症候群の治療に使用するための請求項19に記載の抗体。

【請求項22】

請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列、または請求項1～19のいずれか1項に記載の抗体をコードする1つ以上の核酸構築物を含む宿主細胞を含む、核酸構築物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、ヒトCD123に結合することができ、ヒトV<sub>H</sub>9V<sub>H</sub>2 T細胞受容体のV<sub>H</sub>2鎖に結合することができる、新規の多重特異性抗体に関する。本発明は更に、本発明の抗体を含む医薬組成物、及び医学的治療のための本発明の抗体の使用に関する。 10

【背景技術】

【0002】

CD123、またはインターロイキン-3(IL3)受容体鎖は、血液細胞産生に關与するサイトカインであるIL3によるシグナル伝達を伝達する膜タンパク質である。CD123は、共通鎖CD131とヘテロ二量体を形成する。CD123は、通常、形質細胞様樹状細胞または単球等のいくつかのタイプの血液細胞、及び正常な骨髄前駆細胞のサブセットによって発現される。しかしながら、CD123は、急性骨髄性白血病を有する患者の白血病幹細胞上で強く過剰発現される。したがって、CD123は、急性骨髄性白血病を含むいくつかの血液悪性腫瘍における潜在的な治療標的である。 20

【0003】

いくつかの二重特異性CD123-CD3 T細胞係合抗体が記載されている(Kuo et al. (2012) Protein Eng Des Set 10:561、Al-Hussaini et al. (2016) Blood 127:122)。二重特異性T細胞係合抗体は、腫瘍標的結合特異性及びT細胞結合特異性を有し、したがって、T細胞細胞毒性を悪性細胞に再誘導することによって有効性を高める、例えば、Huehls et al. (2015) Immunol Cell Biol 93:290、Ellerman (2019) Methods, 154:102、de Bruin et al. (2017) Oncoimmunology 7(1):e1375641 及びWO2015156673を参照されたい。しかし、結果は大きく異なる。例えば、CD3結合部分を8つの異なるB細胞標的(CD20、CD22、CD24、CD37、CD70、CD79b、CD138及びHLA-DR)に対する結合部分と組み合わせた1つの研究では、異なる腫瘍標的を標的とする二重特異性抗体は、標的細胞細胞毒性を誘導する能力において強い変動を示し、細胞毒性は抗原発現レベルと相関しないことが見出された。例えば、HLA-DRまたはCD138を標的とするCD3ベースの二重特異性抗体は、中間～高HLA-DR及びCD138発現レベルにもかかわらず、細胞毒性を誘導することができなかった(Engelberts et al. (2020) Ebiomedicine 52:102625)。T細胞リダイレクト療法のほとんどは、おそらく著しい毒性、製造上の問題、免疫原性、狭い治療期間及び低応答に起因して、後期臨床開発に到達していない。特に、毒性は、T細胞エンゲージャーがCD3結合アームを含む場合に生じ得、制御されていない、誇張された、免疫活性化及びサイトカイン放出をもたらす。 30 40

【0004】

したがって、有意な進歩がなされているが、治療上有効であるが、許容される毒性、ならびに安定性及び製造可能性を有する新規のCD123標的化抗体が依然として必要である。

【発明の概要】

【0005】

本発明は、CD123ベースの治療のための新規抗体を提供する。単一ドメインCD1 50

23結合領域を、ヒトV<sub>9V2</sub>T細胞受容体のV<sub>2</sub>鎖に結合し、したがってT細胞に係合することができる結合領域と組み合わせた二重特異性抗体を構築した。驚くべきことに、二重特異性抗体は、V<sub>9V2</sub>T細胞の活性化を媒介し、V<sub>9V2</sub>T細胞の存在下でCD123発現細胞株ならびに患者由来腫瘍細胞の死滅を誘導することにおいて非常に強力であった。

【0006】

したがって、第1の態様では、本発明は、ヒトCD123に結合することができる第1の抗原結合領域と、ヒトV<sub>9V2</sub>T細胞受容体のV<sub>2</sub>鎖に結合することができる第2の抗原結合領域とを含む多重特異性抗体を提供する。

【0007】

更なる主な態様では、本発明は、ヒトCD123に結合することができる第1の抗原結合領域を含む抗体であって、上記第1の抗原結合領域が単ドメイン抗体であり、

(i) 配列番号2に記載のV<sub>H</sub>CDR1配列、配列番号3に記載のV<sub>H</sub>CDR2配列、及び配列番号4に記載のV<sub>H</sub>CDR3配列を含み、好ましくは、上記第1の抗原結合領域が、配列番号1、25~34に記載の配列の群から選択される配列、もしくは配列番号1、25~34に記載の配列の群から選択される配列と、少なくとも90%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(ii) 配列番号10に記載のV<sub>H</sub>CDR1配列、配列番号11に記載のV<sub>H</sub>CDR2配列、及び配列番号12に記載のV<sub>H</sub>CDR3配列を含み、好ましくは、上記第1の抗原結合領域が、配列番号9に記載の配列、もしくは上記配列番号9に記載の配列と、少なくとも90%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなる、抗体を提供する。

【0008】

本発明の更なる態様及び実施形態を以下に記載する。

【図面の簡単な説明】

【0009】

【図1】全ての異なる二重特異性V<sub>H</sub>Hの、CD123、V<sub>9V2</sub>(GDT)TCR及びBSAへの結合を示すELISA(陰性対照として)を示す。OD値が示され、値が二連測定の前平均であり、エラーバーが平均値の標準誤差を示す。一価の抗V<sub>2</sub>V<sub>H</sub>HをTCR染色の対照として使用し(「TCR対照」、市販の抗CD123抗体(「抗CD123」)をCD123抗原コーティングの対照として使用した。「ABなし」は、一次抗体なしの陰性対照を示す。

【図2】フローサイトメトリーを使用した二重特異性V<sub>H</sub>Hの結合の特異性を示す。蛍光シグナルの幾何平均を、使用される抗体及び細胞型の関数としてプロットする。293F細胞によって内因的に発現されるEGFRを認識するV<sub>H</sub>Hを、陽性対照として含めた。一価抗V<sub>2</sub>V<sub>H</sub>Hを陰性対照V<sub>H</sub>Hとして用いた。

【図3】フローサイトメトリーを使用した、CD123への結合に対する1D2-5C8var1の見かけの親和性の決定を示す。精製された1D2-5C8var1の希釈シリーズを、CD123もしくはCD131、またはCD123及び-131の両方を一過性に発現する293F細胞への結合について試験した。蛍光強度の幾何平均を、使用される抗体濃度の関数としてプロットする。EC50値は、曲線当てはめによって決定した。

【図4】CD123への1D2-5C8var1の結合の代表的なBLI解析を示す。タンパク質質量結合を表す光反射のシフト(nmで測定)を時間の関数としてプロットする。0~300秒:会合期、300~900秒:解離期。

【図5】C1R-neo標的細胞依存性、1D2-5C8var1媒介V<sub>9V2</sub>T細胞活性化を示す。CD107A発現(脱顆粒)を示すCD3+-V<sub>9+</sub>T細胞の割合を、使用される抗体の濃度の関数としてプロットする。2つの異なるドナーを使用する実験が描かれている。

10

20

30

40

50

【図6】1D2-5C8 var 1誘導、V9V2 T細胞媒介性C1R-neo標的細胞細胞毒性を示す。生体C1R-neo標的細胞の割合を、使用される二重特異性VHHの濃度の関数としてプロットする。V9V2 T細胞の2つの異なるドナーで得られたデータを示す。

【図7】二重特異性VHH誘導、V9V2 T細胞媒介性THP-1標的細胞細胞毒性を示す。生存THP-1標的細胞の割合を、使用される濃度二重特異性VHHの関数としてプロットする。

【図8】二重特異性VHH媒介性V9V2 T細胞活性化及び患者由来のプライマリ-AMLサンプルの二重特異性VHH媒介性T細胞誘導溶解を示す。上部パネルは、CD107A発現によって測定されるT細胞活性化を示す。下側のパネルは、二重特異性VHHと併せたT細胞によるAML芽球の溶解を示す。

【図9】精製された抗CD123 x V9V2 TCR二重特異性抗体1D2-5C8 var 1 (Y105F) - FcのHP-SECプロファイルを示す。

【図10】1D2-5C8 var 1 (Y105F) - Fcは、V9V2 T細胞活性化を誘導することを示す。典型的な実験を示す。CD107a- (リソソーム関連タンパク質-1、またはLAMP-1)陽性V9V2細胞の割合は、使用される化合物の濃度の関数として示される。EC50値 (pM単位、曲線当てはめにより決定) をグラフの下に示す。データポイントは3回の測定の平均値である。エラーバーは標準偏差を表す。

【図11】1D2-5C8 var 1 (Y105F) - Fc誘導T細胞媒介性標的細胞溶解を示す。典型的な実験を示す。グラフは、使用される化合物の濃度の関数として、24時間の共培養後に死滅した標的細胞の割合を示す。EC50値 (pM単位、曲線当てはめにより決定) をグラフの下に示す。データポイントは3回の測定の平均値である。エラーバーは標準偏差を表す。

【図12】形質細胞様樹状細胞 (上部パネル) 及びTHP-1細胞株 (下部パネル) 上のCD123発現レベルを示す。典型的な染色を示す。非染色細胞を示すヒストグラム、アイソタイプ対照染色 (左重複ヒストグラム)、及びCD123の染色 (右ピーク) を示す。事象の数 (Y軸) は、蛍光強度 (X軸) の関数として示される。

【図13】1D2-5C8 var 1 (Y105F) - Fcは、pDCと比較して、THP-1細胞の優先的な死滅を誘導する。代表的な結果が示される。死滅された標的細胞の割合は、標的細胞集団 (すなわち、THP-1またはpDC) 当たりで使用される化合物の濃度の関数として示される。EC50値 (pM単位、曲線当てはめにより決定) をグラフの下に示す。データポイントは3回の測定の平均値である。エラーバーは標準偏差を表す。

【図14】全長ヒトCD123の一次アミノ酸配列 (GenBank受配列番号NM\_002183.4) (配列番号23) を示す。1D2抗体に架橋されていることが見出された残基は太字であり、下線が引かれている。斜体の残基 (発見された反応性残基に隣接) も、認識されたエピトープの一部であり得る。

【図15】CD123のCトレースモデル (IL-3受容体鎖: Broughton et al., 2018 Nat Commun. 9:386)、抗体に架橋されていることが見出された残基を示す。膜貫通螺旋は、図の左側に位置する。

【図16A-1】変性 (SDS) 条件下 (CE-SDS) 及び還元後の、紫外線吸収 (SEC-UV) によって検出されたサイズ排除クロマトグラフィー、よって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16A-2】変性 (SDS) 条件下 (CE-SDS) 及び還元後の、紫外線吸収 (SEC-UV) によって検出されたサイズ排除クロマトグラフィー、よって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16A-3】変性 (SDS) 条件下 (CE-SDS) 及び還元後の、紫外線吸収 (SEC-UV) によって検出されたサイズ排除クロマトグラフィー、よって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16A-4】変性 (SDS) 条件下 (CE-SDS) 及び還元後の、紫外線吸収 (S

10

20

30

40

50

EC - UV) によって検出されたサイズ排除クロマトグラフィー、よって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16A-5】変性(SDS)条件下(CE-SDS)及び還元後の、紫外線吸収(SEC-UV)によって検出されたサイズ排除クロマトグラフィー、よって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16B-1】変性(SDS)条件下(CE-SDS)及び還元後の、キャピラリーゲル電気泳動によって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16B-2】変性(SDS)条件下(CE-SDS)及び還元後の、キャピラリーゲル電気泳動によって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16B-3】変性(SDS)条件下(CE-SDS)及び還元後の、キャピラリーゲル電気泳動によって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16B-4】変性(SDS)条件下(CE-SDS)及び還元後の、キャピラリーゲル電気泳動によって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図16B-5】変性(SDS)条件下(CE-SDS)及び還元後の、キャピラリーゲル電気泳動によって測定した凝集体及び断片によって決定されるストレス誘発性変化を示す。

【図17A】フローサイトメトリーを介してCD107a(リソソーム関連タンパク質-1、またはLAMP-1)陽性細胞の割合を測定することによって、4時間後に脱顆粒を分析することを示す。

【図17B】CD25陽性細胞の割合を測定することによって分析したT細胞活性化を示す。

【図17C】フローサイトメトリーを介して24時間後の生体標的細胞の割合を決定することによって分析される細胞毒性を示す。

【発明を実施するための形態】

【0010】

定義

「ヒトCD123」という用語は、本明細書で使用される場合、インターロイキン-3受容体鎖(GenBank受託番号NM\_002183.4、NCBI参照配列:NP\_002174.1)とも呼ばれるヒトCD123タンパク質を指す。ヒトCD123の配列は、配列番号23に記載されている。IL3受容体は、共通鎖であるCD131を有するCD123のヘテロ二量体である(NCBI参照配列:NP\_000386.1)。CD131は、配列番号24に記載される。

【0011】

「ヒトV<sub>2</sub>」という用語は、本明細書で使用される場合、V<sub>9V<sub>2</sub></sub>-T細胞受容体(TCR)(配列番号48)の再配列鎖を指す。UniProtKB-A0JD36(A0JD36\_HUMAN)は、可変TRDV<sub>2</sub>配列の一例を示す。

【0012】

「ヒトV<sub>9</sub>」という用語は、本明細書で使用される場合、V<sub>9V<sub>2</sub></sub>-T細胞受容体(TCR)の再配列y<sub>9</sub>鎖を指す。UniProtKB-Q99603\_HUMANは、可変TRGV<sub>9</sub>配列の一例を示す。

【0013】

「抗体」という用語は、免疫グロブリン分子、免疫グロブリン分子の断片、またはそれらのいずれかの誘導体を指すことが意図され、これは、典型的な生理学的条件下で、重要な期間、例えば、少なくとも約30分、少なくとも約1時間、少なくとも約2時間、少なくとも約8時間、少なくとも約12時間、約24時間以上、約48時間以上、約3、4、5、6、7日、もしくはそれ以上などの半減期、または任意の他の関連する機能的に定義

50

される期間（例えば、抗原に結合する抗体に関連する生理学的応答を誘導、促進、増強、及び/または調節するのに十分な時間、及び/または抗体がエフェクター活性を獲得するのに十分な時間）で、抗原に特異的に結合する能力を有する。抗原と相互作用する抗原結合領域は、免疫グロブリン分子の重鎖及び軽鎖の両方の可変領域を含み得るか、または単一ドメイン抗原結合領域、例えば、重鎖可変領域のみを含み得るか、またはそれからなり得る。抗体の定常領域は、存在する場合、免疫系の様々な細胞（エフェクター細胞及びT細胞など）、ならびに補体活性化の古典的経路における第1の構成要素であるC1qなどの補体系の構成要素を含む、宿主組織または因子への免疫グロブリンの結合を媒介し得る。しかしながら、いくつかの実施形態では、本抗体のFc領域は不活性になるように修飾されており、「不活性」とは、個々の抗体の2つのFc領域を介して、任意のFc受容体に結合したり、FcRのFc媒介性架橋を誘導したり、または標的抗原のFcR媒介性架橋を誘導することが少なくともできないFc領域を意味する。更なる実施形態では、不活性Fc領域は、加えて、C1qに結合することができない。一実施形態では、抗体は、234位及び235位に変異（Canfield and Morrison (1991) J Exp Med 173:1483）、例えば、234位にLeuからPheへの変異、及び235位にLeuからGluへの変異を含有する（EU付番に従う、以下を参照されたい）。別の実施形態では、抗体は、234位にLeuからAlaへの変異、235位にLeuからAlaへの変異、及び329位にProからGlyへの変異を含有する。別の実施形態では、抗体は、234位にLeuからPheへの変異、235位にLeuからGluへの変異、及び265位にAspからAlaへの変異を含有する。

10

20

#### 【0014】

免疫グロブリンのFc領域は、典型的には、免疫グロブリンの2つのCH2-CH3領域及び接続領域（例えば、ヒンジ領域）を含むパペインによる抗体の消化後に生成される抗体の断片として定義される。抗体重鎖の定常ドメインは、抗体アイソタイプ、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgD、またはIgEを定義する。Fc領域は、補体系のFc受容体及びタンパク質と呼ばれる細胞表面受容体とともに、抗体のエフェクター機能を媒介する。

#### 【0015】

本明細書で使用される「ヒンジ領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のヒンジ領域を指すことを意図している。したがって、例えば、ヒトIgG1抗体のヒンジ領域は、EU付番に従うアミノ酸216~230に対応する。

30

#### 【0016】

本明細書で使用される「CH2領域」または「CH2ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のCH2領域を指すことが意図される。したがって、例えば、ヒトIgG1抗体のCH2領域は、EU付番に従うアミノ酸231~340に対応する。しかしながら、CH2領域はまた、本明細書に記載の他のサブタイプのいずれであってもよい。

#### 【0017】

本明細書で使用される「CH3領域」または「CH3ドメイン」という用語は、免疫グロブリン重鎖のCH3領域を指すことが意図される。したがって、例えば、ヒトIgG1抗体のCH3領域は、EU付番に従うアミノ酸341~447に対応する。しかしながら、CH3領域はまた、本明細書に記載の他のサブタイプのいずれであってもよい。

40

#### 【0018】

本発明におけるFc領域/Fcドメインにおけるアミノ酸位置への言及は、EU番号付けによるものである（Edelman et al., Proc Natl Acad Sci USA. 1969 May; 63(1):78-85、Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest, 5th Edition - 1991 NIH Publication No. 91-3242）。

#### 【0019】

上記に示されるように、本明細書で使用される抗体という用語は、別段の記載がない限

50

り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、抗原と特異的に結合する能力を保持する抗体の断片を含む。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって行われ得ることが示されてきた。「抗体」という用語に包含される結合断片の例としては、(i) Fab' または Fab 断片、すなわち、VL、VH、CL 及び CH1 ドメインからなる一価断片、または WO 2007059782 に記載されている一価抗体；(ii) F(ab')<sub>2</sub> 断片、すなわち、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つの Fab 断片を含む二価断片；(iii) VH 及び CH1 ドメインから本質的になる Fd 断片；ならびに(iv) 抗体の単一アームの VL 及び VH ドメインから本質的になる Fv 断片が挙げられる。更に、Fv 断片の2つのドメイン、VL 及び VH は、別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え法を使用して、それらが単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって接合することができ、VL 及び VH 領域は対となって、一価の分子（一本鎖抗体または一本鎖 Fv (scFv) として知られる）を形成する（例えば、Bird et al., Science 242, 423-426 (1988) 及び Huston et al., PNAS USA 85, 5879-5883 (1988) 参照）。かかる一本鎖抗体は、文脈によって明らかに示されない限り、抗体という用語に包含される。抗体という用語は、別途指定されない限り、ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体 (mAb)、キメラ抗体及びヒト化抗体、ならびに酵素切断、ペプチド合成、及び組換え技術などの任意の既知の技術によって提供される抗体断片も含む。

#### 【0020】

本発明の抗体のいくつかの実施形態では、第1の抗原結合領域または第2の抗原結合領域、またはその両方は、単一ドメイン抗体である。単一ドメイン抗体 (sdAb、Nanobody (登録商標) と呼ばれる、または VHH) は、当業者に周知であり、例えば、Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363: 446、Roovers et al. (2007) Curr Opin Mol Ther 9: 327 及び Krah et al. (2016) Immunopharmacol Immunotoxicol 38: 21 を参照されたい。単一ドメイン抗体は、単一の CDR1、単一の CDR2 及び単一の CDR3 を含む。単一ドメイン抗体の例は、重鎖のみの抗体、軽鎖を天然に含まない抗体、従来抗体に由来する単一ドメイン抗体、及び操作された抗体の可変断片である。単一ドメイン抗体は、マウス、ヒト、ラクダ、ラマ、サメ、ヤギ、ウサギ、及びウシを含む任意の種に由来し得る。例えば、天然由来の VHH 分子は、ラクダ科の種、例えば、ラクダ、ヒトコブラクダ、ラマ、アルパカ、及びグアナコにおいて産生される、抗体に由来し得る。全抗体と同様に、単一ドメイン抗体は、特異的抗原に選択的に結合することができる。単一ドメイン抗体は、免疫グロブリン鎖の可変ドメイン、すなわち、CDR1、CDR2、及び CDR3 ならびにフレームワーク領域のみを含み得る。

#### 【0021】

本明細書で使用される「免疫グロブリン」という用語は、典型的には、2対のポリペプチド鎖、1対の軽(L)鎖、及び1対の重(H)鎖からなる構造的に関連する糖タンパク質のクラスを指すことを意図しており、4つ全ては、ジスルフィド結合によって潜在的に相互接続されているが、一部の哺乳動物種は、軽鎖を生成せず、重鎖抗体のみを作製する。本明細書で使用される「免疫グロブリン重鎖」、「免疫グロブリンの重鎖」または「重鎖」という用語は、免疫グロブリンの鎖のうちの1つを指すことが意図されている。重鎖は、典型的には、重鎖可変領域（本明細書では VH と略される）と、免疫グロブリンのアイソタイプを定義する重鎖定常領域（本明細書では CH と略される）とからなる。重鎖定常領域は、典型的には、3つのドメイン、CH1、CH2、及び CH3 からなる。重鎖定常領域は、更に、ヒンジ領域を更に含む。免疫グロブリン（例えば、IgG）の構造内では、2つの重鎖は、ヒンジ領域内のジスルフィド結合を介して相互接続される。重鎖と同様に、各軽鎖は、典型的には、いくつかの領域、軽鎖可変領域 (VL) 及び軽鎖定常領域 (CL) からなる。更に、VH 及び VL 領域は、超可変性の領域（または、配列において超可変であり得る及び/または構造的に画定されたループを形成し得る超可変領域）、ま

た相補性決定領域（CDR）とも称され、より保存性の高い領域が散在し、フレームワーク領域（FR）と称される超可変性の領域に細分化され得る。各VH及びVLは、典型的には、以下の順でアミノ末端からカルボキシ末端に配列されている3つのCDR及び4つのFR、すなわちFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4からなる。CDR配列は、様々な方法、例えば、Choitia and Lesk (1987) J. Mol. Biol. 196:901またはKabata et al. (1991) Sequence of protein of immunological interest, fifth edition. NIH publicationによって提供される方法を使用して決定され得る。CDR決定及びアミノ酸番号付けのための様々な方法は、www.abysis.org (UCL)上で比較することができる。

10

【0022】

本明細書で使用される「アイソタイプ」という用語は、免疫グロブリン（サブ）クラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE、またはIgM）、または重鎖定常領域遺伝子によってコードされるIgG1m(z)及びIgG1m(f)などのその任意のアロタイプを指す。各重鎖アイソタイプは、カッパ（ $\kappa$ ）またはラムダ（ $\lambda$ ）軽鎖のいずれかと組み合わせることができる。本発明の抗体は、任意のアイソタイプを有することができる。

【0023】

「親抗体」という用語は、本発明に従う抗体と同一であるが、親抗体が特定の変異のうちの1つ以上を有しない抗体として理解されるべきである。本発明の「変異体」または「抗体変異体」または「親抗体の変異体」は、「親抗体」と比較して1つ以上の変異を含む抗体分子である。アミノ酸置換は、天然アミノ酸を別の天然に存在するアミノ酸、または天然に存在しないアミノ酸誘導体と交換し得る。アミノ酸置換は保存的であっても非保存的であってもよい。本発明の文脈において、保存的置換は、以下の3つの表のうちの1つ以上に反映されるアミノ酸のクラス内の置換によって画定され得る。

20

【表1】

保存的置換のためのアミノ酸残基クラス

酸性残基	Asp (D) 及びGlu (E)
塩基性残基	Lys (K)、Arg (R)、及びHis (H)
親水性非荷電残基	Ser (S)、Thr (T)、Asn (N)、及びGln (Q)
脂肪族非荷電残基	Gly (G)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L)、及びIle (I)
非極性非電荷残基	Cys (C)、Met (M)、及びPro (P)
芳香族残基	Phe (F)、Tyr (Y)、及びTrp (W)

30

40

50

【表 2】

代替保存的アミノ酸残基置換クラス

1	A	S	T
2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

10

【表 3】

アミノ酸残基の代替的な物理的及び機能的分類

アルコール基含有残基	S及びT
脂肪族残基	I、L、V、及びM
シクロアルケニル関連残基	F、H、W、及びY
疎水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、 T、V、W、及びY
負に荷電した残基	DとE
極性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S、 及びT
正に荷電した残基	H、K、及びR
小さな残基	A、C、D、G、N、P、S、T、及び V
非常に小さな残基	A、G、及びS
ターン形成に関与する残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、 R、S、P、及びT
可撓性残基	Q、T、K、S、G、N、D、E、及び R

20

30

## 【0024】

本発明の文脈において、変異体における置換は、以下のように示されている：

元のアミノ酸 - 位置 - 置換アミノ酸

アミノ酸残基を示すために、コード X a a 及び X を含む 3 文字コード、または 1 文字コードが使用される。したがって、表記「T 3 6 6 W」は、変異体が、親抗体における 3 6 6 位のアミノ酸に対応する変異体アミノ酸位置において、トリプトファンによるスレオニンの置換を含むことを意味する。

40

## 【0025】

更に、「置換」という用語は、他の 19 個の天然アミノ酸のいずれか 1 つへの置換、または非天然アミノ酸等の他のアミノ酸への置換を含む。例えば、3 6 6 位のアミノ酸 T の置換は、以下の置換のそれぞれを含む：3 6 6 A、3 6 6 C、3 6 6 D、3 6 6 G、3 6 6 H、3 6 6 F、3 6 6 I、3 6 6 K、3 6 6 L、3 6 6 M、3 6 6 N、3 6 6 P、3 6 6 Q、3 6 6 R、3 6 6 S、3 6 6 E、3 6 6 V、3 6 6 W、及び 3 6 6 Y。

50

## 【 0 0 2 6 】

「全長抗体」という用語は、本明細書で使用される場合、そのアイソタイプの野生型抗体に通常見出されるものに対応する全ての重鎖及び軽鎖定常及び可変ドメインを含む抗体を指す。

## 【 0 0 2 7 】

「キメラ抗体」という用語は、可変領域が非ヒト種（例えば、げっ歯類に由来する）に由来し、定常領域がヒトなどの異なる種に由来する抗体を指す。キメラ抗体は、遺伝子工学によって生成され得る。治療用途のためのキメラモノクローナル抗体は、抗体免疫原性を低減するために開発される。

## 【 0 0 2 8 】

「ヒト化抗体」という用語は、ヒト抗体定常ドメイン、及びヒト可変ドメインと高レベルの配列相同性を含有するように改変された非ヒト可変ドメインを含有する遺伝子操作された非ヒト抗体を指す。これは、一緒に抗原結合部位を形成する6つの非ヒト抗体相補性決定領域（CDR）を相同ヒトアクセプターフレームワーク領域（FR）に移植することによって達成することができる。親抗体の結合親和性及び特異性を完全に再構築するために、親抗体（すなわち、非ヒト抗体）からのフレームワーク残基のヒトフレームワーク領域への置換（逆変異）が必要とされ得る。構造相同性モデリングは、抗体の結合特性に重要なフレームワーク領域内のアミノ酸残基を同定するのに役立つ。したがって、ヒト化抗体は、非ヒトCDR配列、主に、非ヒトアミノ酸配列に対する1つ以上のアミノ酸逆変異を任意選択で含むヒトフレームワーク領域、及び任意選択で完全ヒト定常領域を含んでもよい。任意選択で、必ずしも逆変異ではない追加のアミノ酸修飾を導入して、親和性及び生化学的特性等の好ましい特性を有するヒト化抗体を得ることができる。非ヒト治療抗体のヒト化は、ヒトにおけるその免疫原性を最小限に抑えるために行われるが、そのようなヒト化抗体は同時に、非ヒト由来の抗体の特異性及び結合親和性を維持する。

## 【 0 0 2 9 】

「多重特異性抗体」という用語は、2つ以上の抗原結合領域の存在に起因する、少なくとも2つの異なる、例えば少なくとも3つの、典型的には重複しないエピトープに対する特異性を有する抗体を指す。そのようなエピトープは、同じ標的抗原上にあっても、異なる標的抗原上にあってもよい。エピトープが異なる標的上にある場合、そのような標的は同じ細胞上にある場合もあれば、異なる細胞または細胞型上にある場合もある。

## 【 0 0 3 0 】

「二重特異性抗体」という用語は、2つの抗原結合領域の存在に起因して、2つの異なる、典型的には重複しないエピトープに対する特異性を有する抗体を指す。そのようなエピトープは、同じ標的上にあっても、異なる標的上にあってもよい。エピトープが異なる標的上にある場合、そのような標的は同じ細胞上にある場合もあれば、異なる細胞または細胞型上にある場合もある。

## 【 0 0 3 1 】

異なるクラスの二重特異性抗体の例としては、以下に限定するものではないが、(i) ヘテロ二量体化を強制するための相補性CH3ドメインを有するIgG様分子、(ii) 組換えIgG様二重標的分子であって、分子の2つの側面がそれぞれ、少なくとも2つの異なる抗体のFab断片またはFab断片の一部を含有する、組換えIgG様二重標的分子、(iii) IgG融合分子であって、全長IgG抗体が余分なFab断片またはFab断片の一部に融合される、IgG融合分子、(iv) Fc融合分子であって、単鎖Fv分子または安定化ダイアボディが重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合される、Fc融合分子、(v) Fab融合分子であって、異なるFab断片と一緒に融合される、重鎖定常ドメイン、Fc領域またはその一部に融合される、Fab融合分子、及び(vi) scFv及び二重鎖抗体ベースの抗体及び重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、Nanobodies（登録商標））であって、異なる単鎖Fv分子もしくは異なる二重特異性抗体もしくは異なる重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、Nanobodies（登録商標））が互いに融合され、または重鎖定常ドメイン、Fc領域もしくはその一部に融合され

10

20

30

40

50

る別のタンパク質もしくは担体分子に融合される、s c F v 及び二重特異性抗体ベースの抗体及び重鎖抗体が挙げられる。

【0032】

相補的なCH3ドメイン分子を有するIgG様分子の例としては、限定されないが、Triomab (登録商標) (Trion Pharma/Fresenius Biotech)、Knobs-into-Hole (Genentech)、CrossMAB (Roche) 及び静電的にマッチングした (Amgen, Chugai, Oncome d)、LUZ-Y (Genentech, Wranik et al. J. Biol. Chem. 2012, 287(52):43331-9, doi:10.1074/jbc.M112.397869. Epub 2012 Nov 1)、DIG-body and PIG-body (Pharmabcine, WO2010134666, WO2014081202)、Strand Exchange Engineered Domain body (SEEDbody) (EMD Serono)、Biclonics (Merus, WO2013157953)、Fc Adp (Regeneron)、二重特異性IgG1及びIgG2 (Pfizer/Rinat)、Asymmetric scaffold (Zymeworks/Merck)、mAb-Fv (Xencor)、二価の二重特異性抗体 (Roche, WO2009080254) 及び DuoBody (登録商標) 分子 (Genmab) が挙げられる。

10

【0033】

組換えIgG様二重標的分子の例として、限定されないが、Dual Targeting (DT)-Ig (GSK/Domantis, WO2009058383)、Two-in-one Antibody (Genentech, Bostrom, et al 2009. Science 323, 1610-1614)、Cross-linked Mabs (Karmanos Cancer Center)、mAb2 (F-Star)、Zybodies (商標) (Zyngenia, LaFleur et al. MAbs. 2013 Mar-Apr; 5(2):208-18)、一般的な軽鎖を用いたアプローチ (approaches with common light chain)、Bodies (NovImmune, WO2012023053)、及び CovX-body (登録商標) (CovX/Pfizer, Doppalapudi, V.R., et al 2007. Bioorg. Med. Chem. Lett. 17, 501-506) が挙げられる。

20

30

【0034】

IgG融合分子の例として、限定されないが、二重可変ドメイン (DVD)-Ig (Abbott)、二重ドメイン二重ヘッド抗体 (Unilever, Sanofi Aventis)、IgG様二重特異性 (IgG-like Bispecific) (ImClone/Eli Lilly, Lewis et al. Nat Biotechnol. 2014 Feb; 32(2):191-8)、Ts2Ab (MedImmune/AZ, Dimasi et al. J Mol Biol. 2009 Oct 30; 393(3):672-92)、及びBsAb (Zymogenetics, WO2010111625)、HERCULES (Biogen Idec)、s c F v 融合 (Novartis)、s c F v 融合 (Changzhou Adam Biotech Inc)、及びTvAb (Roche) が挙げられる。

40

【0035】

Fc融合分子の例として、限定されないが、s c F v / Fc融合 (Academic Institution, Pearce et al Biochem Mol Biol Int. 1997 Sep; 42(6):1179)、SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Blankenship JW, et al. AACR 100th Annual meeting 2009 (Abstract #5465)、Zymogenetics/BMS, WO2010111625)、Dual Affinity Retargeting Technolog

50

y (Fc-DARTTM) (MacroGenics) 及び Dual (ScFv) 2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine - China) が挙げられる。

【0036】

Fab融合二重特異性抗体の例として、限定されないが、F(ab)2 (Medarex / AMGEN)、Dual-Action or Bis-Fab (Genentech)、Dock-and-Lock (登録商標) (DNL) (ImmunoMedics)、Bivalent Bispecific (Biotecnol) 及び Fab-Fv (UCB-Celltech) が挙げられる。

【0037】

scFvベース、二重特異性抗体ベースの抗体、及びドメイン抗体の例として、限定されないが、Bispecific T Cell Engager (BiTE (登録商標)) (Micromet, Tandem Diabody (Tandab) (Affimed)、Dual Affinity Retargeting Technology (DARTTM) (MacroGenics)、Single-chain Diabody (Academic, Lawrence FEBS Lett. 1998 Apr 3; 425 (3): 479-84)、TCR-like Antibodies (AIT, ReceptorLogics)、Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack, WO2010059315) 及び COMBODY分子 (Epigen Biotech, Zhu et al. Immunol Cell Biol. 2010 Aug; 88 (6): 667-75)、dual targeting nanobodies (登録商標) (Ablynx, Hmila et al., FASEB J. 2010)、デュアルターゲティング重鎖単独ドメイン抗体が挙げられる。いくつかの実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、VHH-Fcフォーマットであり、すなわち、抗体は、ヒトFc領域二量体を介して互いに連結されている2つ以上の単ドメイン抗原結合領域を含む。このフォーマットでは、各単ドメイン抗原結合領域は、Fc領域ポリペプチドに融合され、2つの融合ポリペプチドは、ヒンジ領域内のジスルフィド架橋を介して二量体二重特異性抗体を形成する。かかる構築物は、典型的には、完全な、または任意のCH1または軽鎖配列を含有しない。WO06064136の図12Bは、本実施形態の一例の例示を提供する。

【0038】

抗原に結合する抗体の文脈では、「結合する」または「特異的に結合する」という用語は、例えば、本明細書の実施例に記載されるフローサイトメトリーを使用して決定される場合、典型的には、約 $10^{-6}$  M以下、例えば、 $10^{-7}$  M以下、例えば、約 $10^{-8}$  M以下、例えば、約 $10^{-9}$  M以下、約 $10^{-10}$  M以下、または約 $10^{-11}$  M以下の $K_D$ に対応する親和性を有する、所定の抗原または標的 (例えば、ヒトCD123またはV2) への抗体の結合を指す。あるいは、 $K_D$ 値は、例えば、BIAcoreT200の表面プラズモン共鳴 (SPR) 技術、またはOctetRED96機器のバイオ層干渉法 (BLI) を使用して、抗原をリガンドとして、結合部分または結合分子を分析物として使用して決定することができる。特異的結合とは、抗体が、所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原 (例えば、BSA、カゼイン) との結合に対する親和性よりも少なくとも10倍低い、例えば、少なくとも100倍低い、例えば、少なくとも1,000倍低い、例えば、少なくとも10,000倍低い、 $K_D$ に対応する親和性で所定の抗原と結合することを意味する。親和性が低い程度は、結合部分または結合分子の $K_D$ に依存するため、結合部分または結合分子の $K_D$ が非常に低い場合 (すなわち、結合部分または結合分子が非常に特異的である場合)、抗原に対する親和性が非特異的抗原に対する親和性よりも低い程度は、少なくとも10,000倍であり得る。「 $K_D$ 」(M) という用語は、本明細書で使用される場合、抗原と結合部分または結合分子との間の特定の相互作用の解離平衡定数を指す。

【0039】

10

20

30

40

50

本発明の文脈では、「競合」または「競合できる」または「競合する」とは、結合パートナーに結合する別の分子（例えば、異なるCD123抗体）の存在下で、特定の結合分子（例えば、CD123抗体）が特定の結合パートナー（例えば、CD123）に結合する傾向が検出可能に有意に低下することを指す。典型的には、競合とは、例えば、十分な量の2つ以上の競合分子、例えば、抗体を使用したELISA分析またはフローサイトメトリーによって決定される、抗体などの別の分子の存在によって引き起こされる、少なくとも約25%の低下、例えば、少なくとも約50%、例えば、少なくとも約75%、例えば、少なくとも約90%の結合の低下を意味する。競合阻害によって結合特異性を決定するための追加の方法は、例えば、Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993)、及びMuller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983))に見出すことができる。一実施形態では、本発明の抗体は、抗体1D2または1A3と同じCD123上のエピトープ、及び/または抗体5C8、6H4、6C1、5D3(WO2015156673)または5C8 var 1(WO2020060405)と同じV2上のエピトープに結合する。5C8のエピトープは、残基S33、S43及びK45(配列番号48)を含むことが決定されている。6H4のエピトープは、残基R139、K152、S189及びS191(配列番号48)を含むことが決定されている。エピトープの一部であるペプチドの同定を可能にする架橋結合質量分析、及びエピトープを形成する抗原上の個々の残基を同定するX線結晶学を含むが、これらに限定されない、当該技術分野で知られている標的抗原上の抗体エピトープをマッピングするために利用可能なくつかの方法がある。エピトープ残基は、抗体由来の5以下少なくとも1つの原子を有する全てのアミノ酸残基であると決定することができる。ファン・デル・ワールス半径内の原子及び水を媒介する可能性のある水素結合を考慮して、5をエピトープカットオフ距離として選択した。次に、エピトープ残基は、少なくとも1つの原子が8以下である全てのアミノ酸残基であると決定することができる。8以下が、伸長されたアルギニンアミノ酸の長さを考慮するためのエピトープカットオフ距離として選択される。架橋結合質量分析は、抗体及び抗原を質量標識された化学架橋剤で結合することから始まる。次に、複合体の存在を、高質量MALDI検出を使用して確認する。化学的に架橋した後、Ab/Ag複合体は非常に安定であるため、多くの様々な酵素及び消化条件を複合体に適用して、多くの異なる重複するペプチドを提供することができる。これらのペプチドの同定は、高分解能質量分析及びMS/MS技術を使用して行われる。架橋ペプチドの同定は、架橋試薬に連結された質量タグを使用して決定される。MS/MS断片化及びデータ解析後、架橋され、抗原に由来するペプチドはエピトープの一部であり、抗体に由来するペプチドはパラトープの一部である。発見された個々の架橋ペプチドからの最もN末端及びC末端の架橋残基間の全ての残基は、エピトープまたはパラトープの一部であるとみなされる。

#### 【0040】

「第1の」及び「第2の」抗原結合領域という用語は、本明細書で使用される場合、抗体におけるそれらの向き/位置を指さず、すなわち、それらは、N末端またはC末端に関して意味を持たない。「第1の」及び「第2の」という用語は、特許請求の範囲及び説明における2つの異なる抗原結合領域を正確かつ一貫して指すようにのみ機能する。

#### 【0041】

「ヒトCD123に結合することができる」とは、抗体が、別個の分子として、及び/またはCD123/CD131複合体の一部として、ヒトCD123に結合することができることを意味する。しかしながら、抗体は、別個の分子としてCD131に結合しない。

10

20

30

40

50

## 【0042】

「V<sub>9</sub>V<sub>2</sub>-TCRのV<sub>2</sub>鎖に結合することができる」とは、抗体が別個の分子として、及び/またはV<sub>9</sub>V<sub>2</sub>-TCRの一部として、V<sub>2</sub>鎖に結合することができることを意味する。しかしながら、抗体は、別個の分子としてV<sub>9</sub>鎖と結合しない。

## 【0043】

「%の配列同一性」は、本明細書で使用する場合、異なる配列が共有する同一のヌクレオチドまたはアミノ酸位置の数（すなわち、%の同一性 = 同一の位置の# / 位置の総# × 100）を指し、最適なアラインメントのために導入する必要のあるギャップの数及び各ギャップの長さを考慮する。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間のパーセント同一性は、例えば、PAM120重み残基表（PAM120 weight residue table）、12のギャップ長さペナルティ及び4のギャップペナルティを使用する、ALIGNプログラム（バージョン2.0）中に組み込まれているE. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4, 11-17 (1988)のアルゴリズムを用いて決定してもよい。

## 【0044】

本発明の更なる態様及び実施形態

上記のように、第1の主な態様では、本発明は、ヒトCD123に結合することができる第1の抗原結合領域と、ヒトV<sub>9</sub>V<sub>2</sub>T細胞受容体のV<sub>2</sub>鎖に結合することができる第2の抗原結合領域とを含む多重特異性抗体に関する。

## 【0045】

一実施形態では、多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。他の実施形態では、多重特異性抗体は、三重特異性抗体である。他の実施形態では、第1の抗原結合領域は、単ドメイン抗体、例えば、重鎖可変領域からなる単ドメイン抗体である。他の実施形態では、第2の抗原結合領域は、単ドメイン抗体、例えば、重鎖可変領域からなる単ドメイン抗体である。更なる実施形態では、第1の抗原-抗原結合領域及び第2の抗原結合領域の両方は、単ドメイン抗体、例えば、それぞれが重鎖可変領域からなる単ドメイン抗体である。

## 【0046】

更なる実施形態において、多重特異性抗体は二重特異性抗体であり、第1の抗原結合領域は単ドメイン抗体であり、第2の抗原結合領域は単ドメイン抗体である。上記二重特異性抗体は、リンカー及び/または免疫グロブリンFc領域等の更なる配列を任意選択で含んでもよい。

## 【0047】

一実施形態では、多重特異性抗体は、ヒトCD123への結合のために、配列番号1に記載の配列を有する抗体と競合する（すなわち、競合することができる）、好ましくは、多重特異性抗体は、配列番号1に記載の配列を有する抗体とヒトCD123上の同じエピトープに結合する。一実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書の実施例11に記載されるように決定される、S203~R273の領域内に完全に含まれるエピトープ等の、S203~R273の領域内の1つ以上の残基を含むエピトープに結合する。

## 【0048】

別の実施形態では、多重特異性抗体は、領域S203~T214内の1つ以上の残基と、領域H221~K227内の1つ以上の残基と、領域Y238~K244内の1つ以上の残基と、領域Y268~R273内の1つ以上の残基とを含むヒトCD123上のエピトープに結合する（図14）。

## 【0049】

別の実施形態では、多重特異性抗体は、残基S203、T209、T214、H221、H225、K227、Y238、K244、Y268、T269及びR273のうちの1つ、複数、全てを含むヒトCD123上のエピトープに結合する（図14）。

## 【0050】

一実施形態では、第1の抗原結合領域は、配列番号2に記載のVH CDR1配列、配

10

20

30

40

50

列番号 3 に記載の V H C D R 2 配列、及び配列番号 4 に記載の V H C D R 3 配列を含む。

【 0 0 5 1 】

一実施形態では、配列番号 2 において、X<sub>1</sub> は G である。別の実施形態では、X<sub>1</sub> は S である。

【 0 0 5 2 】

一実施形態では、配列番号 3 において、X<sub>2</sub> は A である。別の実施形態では、X<sub>2</sub> は T である。

【 0 0 5 3 】

一実施形態では、配列番号 4 において、X<sub>3</sub> は Y である。別の実施形態では、X<sub>3</sub> は F である。

10

【 0 0 5 4 】

一実施形態では、X<sub>1</sub> は G であり、X<sub>2</sub> は A であり、X<sub>3</sub> は Y である。

【 0 0 5 5 】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は G であり、X<sub>2</sub> は A であり、X<sub>3</sub> は F である。

【 0 0 5 6 】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は G であり、X<sub>2</sub> は T であり、X<sub>3</sub> は Y である。

【 0 0 5 7 】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は G であり、X<sub>2</sub> は T であり、X<sub>3</sub> は F である。

【 0 0 5 8 】

一実施形態では、X<sub>1</sub> は S であり、X<sub>2</sub> は A であり、X<sub>3</sub> は Y である。

20

【 0 0 5 9 】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は S であり、X<sub>2</sub> は A であり、X<sub>3</sub> は F である。

【 0 0 6 0 】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は S であり、X<sub>2</sub> は T であり、X<sub>3</sub> は Y である。

【 0 0 6 1 】

別の実施形態では、X<sub>1</sub> は S であり、X<sub>2</sub> は T であり、X<sub>3</sub> は F である。

【 0 0 6 2 】

一実施形態では、第 1 の抗原結合領域は、配列番号 1 に記載の配列、または配列番号 1 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば、少なくとも 92%、例えば、少なくとも 94%、例えば、少なくとも 96%、例えば、少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる。

30

【 0 0 6 3 】

別の実施形態において、第 1 の抗原結合領域は、配列番号 25 ~ 34 に記載の配列の群から選択される配列、または配列番号 25 ~ 34 に記載の配列の群から選択される配列と少なくとも 90%、例えば、少なくとも 92%、例えば、少なくとも 94%、例えば、少なくとも 96%、例えば、少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなる。

【 0 0 6 4 】

別の実施形態では、多重特異性抗体は、配列番号 9 に記載の配列を有する抗体と、ヒト 3CD123 への結合のために競合し、好ましくは、多重特異性抗体は、配列番号 9 に記載の配列を有する抗体とヒト CD123 上の同じエピトープに結合する。

40

【 0 0 6 5 】

一実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書の実施例 11 に記載されるように決定される、H225 ~ T267 の領域内に完全に含まれるエピトープ等の、H225 ~ T267 の領域内の 1 つ以上の残基を含むエピトープに結合する。

【 0 0 6 6 】

別の実施形態では、多重特異性抗体は、領域 H225 及び R234 に 1 つ以上の残基、ならびに領域 T251 ~ T267 に 1 つ以上の残基を含むヒト CD123 上のエピトープに結合する。

50

【 0 0 6 7 】

別の実施形態では、多重特異性抗体は、残基 H 2 2 5、H 2 3 1、R 2 3 4、T 2 5 1、R 2 5 5、及び T 2 6 7 のうちの 1 つ、複数、全てを含むヒト C D 1 2 3 上のエピトープに結合する。

【 0 0 6 8 】

一実施形態では、第 1 の抗原結合領域は、配列番号 1 0 に記載の V H C D R 1 配列、配列番号 1 1 に記載の V H C D R 2 配列、及び配列番号 1 2 に記載の V H C D R 3 配列を含む。

【 0 0 6 9 】

一実施形態では、第 1 の抗原結合領域は、配列番号 9 に記載の配列、または配列番号 9 に記載の配列と少なくとも 9 0 %、例えば、少なくとも 9 2 %、例えば、少なくとも 9 4 %、例えば、少なくとも 9 6 %、例えば、少なくとも 9 8 % の配列同一性を有する配列を含むか、もしくははそれからなる。

10

【 0 0 7 0 】

上述のように、本発明の多重特異性抗体は、ヒト V 9 V 2 - T 細胞受容体の V 2 鎖に結合することができる第 2 の抗原結合領域を含む。V 2 は、V 9 V 2 - T C R のデルタ鎖の一部である。ヒト V 2 に結合することができる抗体は、V 2 領域内に完全に位置するエピトープに結合するか、または V 2 領域とデルタ鎖の定常領域との残基の組み合わせであるエピトープに結合し得る。一実施形態では、多重特異性抗体は、ヒト V 9 V 2 T 細胞を活性化することができる。V 9 V 2 T 細胞の活性化は、遺伝子発現及び/または(表面)マーカー発現(例えば、C D 2 5、C D 6 9、または C D 1 0 7 a などの活性化マーカー)及び/または分泌タンパク質(例えば、サイトカインまたはケモカイン)プロファイルによって測定され得る。好ましい実施形態では、多重特異性抗体は、V 9 V 2 T 細胞による、C D 1 0 7 a 発現の増加(本明細書の実施例を参照)及び/またはサイトカイン産生(例えば、T N F、I F N)によって特徴付けられる脱顆粒をもたらす活性化(例えば、C D 6 9 及び/または C D 2 5 発現の上方調節)を誘導することができる。好ましくは、本発明の多重特異性抗体は、本明細書の実施例に記載されるように試験した場合、C D 1 0 7 a 陽性細胞の数を少なくとも 2 倍、例えば少なくとも 5 倍増加させることができる。別の好ましい実施形態において、本発明の多重特異性抗体は、本明細書の実施例に記載の V 9 V 2 T 細胞及び C 1 R - n e o 標的細胞を使用して試験した場合、C D 1 0 7 a 陽性細胞の割合を、5 0 p M 以下、例えば、2 5 p M 以下、例えば、2 0 p M 以下、例えば、1 5 p M 以下、例えば、1 0 p M 以下、増加させるための E C 5 0 値を有する。

20

30

【 0 0 7 1 】

V 2 に結合するいくつかの抗体が、W O 2 0 1 5 1 5 6 6 7 3 に記載されており、それらの抗原結合領域または少なくともその C D R 配列を、本発明の多重特異性抗体に組み込むことができる。

【 0 0 7 2 】

一実施形態では、多重特異性抗体は、配列番号 1 7 に記載の配列を有する抗体と、ヒト V 2 への結合のために競合し、式中、X 4 は Y である。

40

【 0 0 7 3 】

更なる実施形態では、多重特異性抗体は、配列番号 1 7 に記載の配列を有する抗体とヒト V 2 上の同じエピトープに結合する。

【 0 0 7 4 】

一実施形態では、多重特異性抗体は、配列番号 3 6 に記載の配列を有する抗体とヒト V 2 への結合のために競合し、好ましくは、多重特異性抗体は、配列番号 3 6 に記載の配列を有する抗体とヒト V 2 上の同じエピトープに結合する。

【 0 0 7 5 】

一実施形態では、多重特異性抗体は、配列番号 3 7 に記載の配列を有する抗体とヒト V 2 への結合のために競合し、好ましくは、多重特異性抗体は、配列番号 3 7 に記載の配

50

列を有する抗体とヒト V<sub>H</sub> 2 上の同じエピトープに結合する。

【0076】

一実施形態では、多重特異性抗体は、配列番号 38 に記載の配列を有する抗体とヒト V<sub>H</sub> 2 への結合のために競合し、好ましくは、多重特異性抗体は、配列番号 38 に記載の配列を有する抗体とヒト V<sub>H</sub> 2 上の同じエピトープに結合する。

【0077】

本発明の多重特異性抗体の一実施形態では、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 18 に記載の V<sub>H</sub> CDR 1 配列、配列番号 19 に記載の V<sub>H</sub> CDR 2 配列、及び配列番号 20 に記載の V<sub>H</sub> CDR 3 配列を含む。一実施形態では、配列番号 20 の X<sub>4</sub> は Y である。別の実施形態では、配列番号 20 の X<sub>4</sub> は F である。別の実施形態では、配列番号 20 の X<sub>4</sub> は S である。

10

【0078】

本発明の多重特異性抗体の一実施形態では、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 40 に記載の V<sub>H</sub> CDR 1 配列及び配列番号 41 に記載の V<sub>H</sub> CDR 3 配列を含み、好ましくは、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 36 に記載の配列、または配列番号 36 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば、少なくとも 92%、例えば、少なくとも 94%、例えば、少なくとも 96%、例えば、少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる。

【0079】

本発明の多重特異性抗体の一実施形態では、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 42 に記載の V<sub>H</sub> CDR 1 配列、配列番号 43 に記載の V<sub>H</sub> CDR 2 配列、及び配列番号 44 に記載の V<sub>H</sub> CDR 3 配列を含み、好ましくは、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 37 に記載の配列、または配列番号 37 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば、少なくとも 92%、例えば、少なくとも 94%、例えば、少なくとも 96%、例えば、少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる。

20

【0080】

本発明の多重特異性抗体の一実施形態では、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 45 に記載の V<sub>H</sub> CDR 1 配列、配列番号 46 に記載の V<sub>H</sub> CDR 2 配列、及び配列番号 47 に記載の V<sub>H</sub> CDR 3 配列を含み、好ましくは、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 38 に記載の配列、または配列番号 38 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば、少なくとも 92%、例えば、少なくとも 94%、例えば、少なくとも 96%、例えば、少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる。

30

【0081】

本発明の多重特異性抗体の一実施形態では、第 2 の抗原結合領域はヒト化される。

【0082】

更なる実施形態では、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 17 に記載の配列または配列番号 17 に記載の配列と少なくとも 90%、例えば、少なくとも 92%、例えば、少なくとも 94%、例えば、少なくとも 96%、例えば、少なくとも 98% の配列同一性を有する配列を含むか、またはそれからなる。一実施形態では、配列番号 17 の X<sub>4</sub> は Y である。別の実施形態では、配列番号 17 の X<sub>4</sub> は F である。別の実施形態では、配列番号 17 の X<sub>4</sub> は S である。

40

【0083】

本発明の多重特異性抗体の好ましい実施形態において、

(i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 に記載の V<sub>H</sub> CDR 1 配列、配列番号 3 に記載の V<sub>H</sub> CDR 2 配列、及び配列番号 4 に記載の V<sub>H</sub> CDR 3 配列を含み、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 18 に記載の V<sub>H</sub> CDR 1 配列、配列番号 19 に記載の V<sub>H</sub> CDR 2 配列、及び配列番号 20 に記載の V<sub>H</sub> CDR 3 配列を含む、または

(ii) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 10 に記載の V<sub>H</sub> CDR 1 配列、配列番号 11 に記載の V<sub>H</sub> CDR 2 配列、及び配列番号 12 に記載の V<sub>H</sub> CDR 3 配列を含み、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 18 に記載の V<sub>H</sub> CDR 1 配列、配列番号 19 に記載

50

の V H C D R 2 配列、及び配列番号 2 0 に記載の V H C D R 3 配列を含む。

【 0 0 8 4 】

本発明の多重特異性抗体の更なる好ましい実施形態では、

( i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 1 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で、X<sub>4</sub> は Y であり、または

( i i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 9 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y であり、または

( i i i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 5 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y であり、または

( i v ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 6 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y であり、または

( v ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択的に X<sub>4</sub> は Y であり、または

( v i ) 第 1 の抗原結合領域は配列番号 2 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択的に X<sub>4</sub> は Y であり、または

( v i i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 9 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y であり、または

( v i i i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 0 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y であり、または

( i x ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 1 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y であり、または

( x ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 2 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y であり、または

( x i ) 第 1 の抗原結合領域は配列番号 3 3 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y であり、または

( x i i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 4 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 1 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、任意選択で X<sub>4</sub> は Y である。

【 0 0 8 5 】

本発明の多重特異性抗体の更なる好ましい実施形態では、

( i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 1 に示される配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 6 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

( i i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 9 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 6 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

( i i i ) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 5 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 6 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

10

20

30

40

50



(v i i i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 0 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(i x) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 1 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(x) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 2 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(x i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 3 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(x i i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 4 に示される配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなる。

【 0 0 8 7 】

本発明の多重特異性抗体の更なる好ましい実施形態では、

(i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 1 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(i i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 9 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(i i i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 5 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(i v) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 6 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(v) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 7 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(v i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(v i i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 2 9 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(v i i i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 0 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(i x) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 1 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(x) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 2 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(x i) 第 1 の抗原結合領域は、配列番号 3 3 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、第 2 の抗原結合領域は、配列番号 3 8 に記載の配列を含むか、もしくはそれからなり、または

10

20

30

40

50

( x i i ) 第 1 の 抗 原 結 合 領 域 は、 配 列 番 号 3 4 に 記 載 の 配 列 を 含 む か、 も し く は そ れ か ら な り、 第 2 の 抗 原 結 合 領 域 は、 配 列 番 号 3 8 に 記 載 の 配 列 を 含 む か、 も し く は そ れ か ら な る。

【 0 0 8 8 】

多重特異性抗体中の第 1 及び第 2 の抗原結合領域は、様々な方法で配置され得る。一実施形態では、抗原結合領域は、共有結合リンカーなどのリンカーを介して互いに接続される。一実施形態では、第 1 の抗原結合領域及び第 2 の抗原結合領域は、ペプチドリンカー、例えば、2、3、4、5、6、7、8、または 10 個のアミノ酸など、1 ~ 20 個のアミノ酸、例えば、1 ~ 10 個のアミノ酸の長さを有するリンカーを介して、互いに共有結合している。一実施形態では、ペプチドリンカーは、セリンに続く 4 つのグリシンの配列を含むか、またはそれからなる。

10

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態では、ヒト CD 1 2 3 に結合することができる第 1 の抗原結合領域は、ヒト V 2 鎖に結合することができる第 2 の抗原結合領域の N 末端に位置する。別の実施形態では、ヒト CD 1 2 3 に結合することができる第 1 の抗原結合領域は、ヒト V 2 鎖に結合することができる第 2 の抗原結合領域の C 末端に位置する。

【 0 0 9 0 】

二重特異性抗体などの本発明の多重特異性抗体は、第 1 及び第 2 の抗原結合領域を超える更なる分子、ドメインまたはポリペプチド配列を含有し得る。一実施形態では、多重特異性抗体は、半減期延長ドメイン、すなわち、ヒト患者の循環中の分子の半減期を延長するドメインを更に含む。一実施形態では、多重特異性抗体は、ヒト対象に投与された場合に約 168 時間よりも長い末端半減期を有する。最も好ましくは、末端半減期は 336 時間以上である。本明細書で使用される場合、抗体の「末端半減期」は、排除の最終段階でインピボで、ポリペプチドの血清濃度が 50 % 減少するのにかかる時間を指す。

20

【 0 0 9 1 】

一実施形態では、多重特異性抗体は、Fc 領域、好ましくはヒト Fc 領域を含む。一実施形態では、多重特異性抗体は、VHH - Fc フォーマットであり、すなわち、抗体は、ヒト Fc 領域二量体を介して互いに連結される 2 つ以上の単一ドメイン抗原結合領域を含み、各単一ドメイン抗原結合領域は、Fc 領域ポリペプチド (CH1 または軽鎖配列を含まない) に融合され、2 つの融合ポリペプチドは、ヒンジ領域内のジスルフィド架橋を介して二量体二重特異性抗体を形成する。

30

【 0 0 9 2 】

二重特異性抗体を作製するための様々な方法が当該技術分野で説明されており、例えば、Brinkmann and Kontermann (2017) MAbs 9 : 182 及び Labrijn et al (2019) Nature Reviews Drug Discovery 18 : 585 で考察されている。本発明の一実施形態では、Fc 領域は、2 つの Fc ポリペプチドを含むヘテロ二量体であり、第 1 の抗原結合領域は第 1 の Fc ポリペプチドに融合され、第 2 の抗原結合領域は第 2 の Fc ポリペプチドに融合され、第 1 及び第 2 の Fc ポリペプチドは、ホモ二量体の形成よりもヘテロ二量体の形成を促進する非対称アミノ酸変異を含む (例えば、Ridgway et al. (1996) 'Knobs - into - holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9 : 617 を参照されたい)。本明細書の更なる実施形態では、Fc ポリペプチドの CH3 領域は、上記非対称アミノ酸変異を含み、好ましくは、第 1 の Fc ポリペプチドは、T366W 置換を含み、かつ第 2 の Fc ポリペプチドは、T366S、L368A 及び Y407V 置換を含むか、またはその逆を含み、ここでのアミノ酸位置は、EU 付番システムによるヒト IgG1 に対応する。更なる実施形態では、第 1 及び第 2 の Fc ポリペプチドの 220 位のシステイン残基は、欠失または置換されており、アミノ酸位置は、EU 付番システムによるヒト IgG1 に対応する。更なる実施形態では、当該領域は、配列番号 35 に記載の配列を含む。

40

50

## 【0093】

いくつかの実施形態では、第1及び/または第2のFcポリペプチドは、Fc領域を不活性にする、すなわちエフェクター機能を媒介することができない変異を含有する。一実施形態では、第1及び第2のFcポリペプチドは、234位及び/または235位に変異を含み、好ましくは、第1及び第2のFcポリペプチドは、L234F及びL235E置換を含み、アミノ酸位置は、EU付番システムによるヒトIgG1に対応する。

## 【0094】

好ましい実施形態では、

第1の抗原結合領域は、配列番号2に記載のVH CDR1配列、配列番号3に記載のVH CDR2配列、及び配列番号4に記載のVH CDR3配列を含み、第2の抗原結合領域は、配列番号18に記載のVH CDR1配列、配列番号19に記載のVH CDR2配列、配列番号20に記載のVH CDR3配列を含み、

10

第1のFcポリペプチドは、配列番号21に記載の配列を含み、第2のFcポリペプチドは、配列番号22に記載の配列を含むか、またはその逆を含む。

## 【0095】

別の好ましい実施形態では、

第1の抗原結合領域は、配列番号10に記載のVH CDR1配列、配列番号11に記載のVH CDR2配列、配列番号12に記載のVH CDR3配列を含み、第2の抗原結合領域は、配列番号18に記載のVH CDR1配列、配列番号19に記載のVH CDR2配列、配列番号20に記載のVH CDR3配列を含み、

20

第1のFcポリペプチドは、配列番号21に記載の配列を含み、第2のFcポリペプチドは、配列番号22に記載の配列を含むか、またはその逆を含む。

## 【0096】

更に好ましい実施形態では、本発明の抗体は以下からなる：

(i) 配列番号1、9、及び25～34に記載の配列、配列番号35に記載の配列、及び配列番号21に記載の配列からなる群から選択される配列からなる第1の抗原結合領域からなる第1のポリペプチド鎖、及び

(ii) 配列番号17に記載の配列(X<sub>4</sub>はYであり、配列番号35に記載の配列、及び配列番号22に記載の配列)からなる第2の抗原結合領域からなる第2のポリペプチド鎖。

30

## 【0097】

更に好ましい実施形態では、本発明の抗体は以下からなる：

(i) 配列番号1、9、及び25～34に記載の配列、配列番号35に記載の配列、及び配列番号22に記載の配列からなる群から選択される配列からなる第1の抗原結合領域からなる第1のポリペプチド鎖、及び

(ii) 配列番号17に記載の配列(X<sub>4</sub>はYであり、配列番号35に記載の配列、及び配列番号21に記載の配列)からなる第2の抗原結合領域からなる第2のポリペプチド鎖。

## 【0098】

一実施形態では、本発明の多重特異性抗体は、V<sub>9V2</sub> T細胞によるCD123発現細胞、例えば、C1R-neo細胞またはTHP-1細胞の死滅を媒介することが可能である。

40

## 【0099】

好ましくは、抗体は、本明細書の実施例5に記載されるように試験した場合、50 pM以下、例えば、25 pM以下、例えば、20 pM以下、例えば、15 pM以下、例えば、10 pM以下、または5 pM以下、例えば、2 pM以下のEC50値を有するV<sub>9V2</sub> T細胞の活性化によってC1R-neo細胞の死滅を誘導することができる。

## 【0100】

別の実施形態では、本抗体は、本明細書の実施例5に記載されるように試験した場合、100 pM以下、例えば、50 pM以下、例えば、25 pM以下、例えば、20 pM以下、例えば、15 pM以下、例えば、10 pM以下、または更には5 pM以下、例えば、2 pM以下のEC50値を有するV<sub>9V2</sub> T細胞の活性化によって、THP-1細胞

50

の死滅を誘導することができる。

【0101】

更なる実施形態では、多重特異性抗体は、ヒト患者由来CD123発現骨髄由来AML腫瘍細胞の死滅を媒介することができる。そのような死滅は、例えば、本明細書の実施例6に記載されるように決定され得る。一実施形態では、本発明の多重特異性抗体は、本明細書の実施例6に記載のアッセイにおいて決定される100fMの濃度において、25%超、例えば50%超の特異的細胞死を媒介することができる。

【0102】

更なる実施形態では、多重特異性抗体は、CD123陰性ヒト細胞等のCD123陰性細胞の死滅を媒介することができない。

10

【0103】

更なる実施形態では、本発明の多重特異性抗体は、本明細書の実施例3に記載されるように試験される場合、50nM以下、例えば、20nM以下、例えば、10nM以下、例えば、5nM以下のEC50で一過性CD123発現293F細胞に結合することができる。

【0104】

更なる実施形態では、本発明の多重特異性抗体は、本明細書の実施例4に記載されるように試験される場合、50nM以下、例えば20nM以下、例えば10nM以下、例えば5nM以下のEC50を有する組換えCD123-Fc融合タンパク質に結合することができる。

20

【0105】

更なる主な態様では、本発明は、ヒトCD123に結合することができる第1の抗原結合領域を含む抗体であって、上記第1の抗原結合領域が単ドメイン抗体であり、

(i) 配列番号2に記載のVH CDR1配列、配列番号3に記載のVH CDR2配列、及び配列番号4に記載のVH CDR3配列を含み、好ましくは、上記第1の抗原結合領域が、配列番号1、25~34に記載の配列の群から選択される配列、もしくは配列番号1、25~34に記載の配列の群から選択される配列と少なくとも90%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなり、または

(ii) 配列番号10に記載のVH CDR1配列、配列番号11に記載のVH CDR2配列、配列番号12に記載のVH CDR3配列を含み、好ましくは、上記第1の抗原結合領域が、配列番号9に記載の配列、もしくは上記配列番号9に記載の配列と少なくとも90%、例えば少なくとも92%、例えば少なくとも94%、例えば少なくとも96%、例えば少なくとも98%の配列同一性を有する配列を含むか、もしくはそれからなる、抗体に関する。

30

【0106】

一実施形態では、配列番号2において、X<sub>1</sub>はGである。別の実施形態では、X<sub>1</sub>はSである。

【0107】

一実施形態では、配列番号3において、X<sub>2</sub>はAである。別の実施形態では、X<sub>2</sub>はTである。

40

【0108】

一実施形態では、配列番号4において、X<sub>3</sub>はYである。別の実施形態では、X<sub>3</sub>はFである。

【0109】

一実施形態では、X<sub>1</sub>はGであり、X<sub>2</sub>はAであり、X<sub>3</sub>はYである。

【0110】

別の実施形態では、X<sub>1</sub>はGであり、X<sub>2</sub>はAであり、X<sub>3</sub>はFである。

【0111】

別の実施形態では、X<sub>1</sub>はGであり、X<sub>2</sub>はTであり、X<sub>3</sub>はYである。

50

## 【0112】

別の実施形態では、 $X_1$ はGであり、 $X_2$ はTであり、 $X_3$ はFである。

## 【0113】

一実施形態では、 $X_1$ はSであり、 $X_2$ はAであり、 $X_3$ はYである。

## 【0114】

別の実施形態では、 $X_1$ はSであり、 $X_2$ はAであり、 $X_3$ はFである。

## 【0115】

別の実施形態では、 $X_1$ はSであり、 $X_2$ はTであり、 $X_3$ はYである。

## 【0116】

別の実施形態では、 $X_1$ はSであり、 $X_2$ はTであり、 $X_3$ はFである。

10

## 【0117】

更なる主な態様では、本発明は、本明細書に記載される本発明による多重特異性抗体等の抗体と、薬学的に許容される賦形剤とを含む薬学的組成物に関する。

## 【0118】

抗体は、(Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2012 June, ISBN 9780857110275)に開示されているような従来技術に従って、薬学的に許容される賦形剤を用いて製剤化することができる。薬学的に許容される賦形剤、ならびに任意の他の担体、希釈剤またはアジュバントは、抗体及び選択された投与様式に好適であるべきである。賦形剤及び薬学的組成物の他の成分に対する適合性は、本発明の選択された抗体または薬学的組成物の所望の生物学的特性に対する有意な悪影響(例えば、抗原結合に対する実質的な影響(10%以下の相対的阻害、5%以下の相対的阻害等)未満)の欠如に基づいて決定される。

20

## 【0119】

薬学的組成物は、希釈剤、充填剤、塩、緩衝液、洗剤(例えば、Tween-20またはTween-80などの非イオン性洗剤)、安定剤(例えば、糖またはタンパク質を含まないアミノ酸)、防腐剤、組織固定剤、可溶化剤、及び/または薬学的組成物に包含するのに適した他の材料を含み得る。更なる薬学的に許容される賦形剤としては、本発明の抗体と生理学的に互換性のある任意の及び全ての好適な溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤及び抗真菌剤、等張性剤、酸化防止剤及び吸収遅延剤等が挙げられる。

30

## 【0120】

更なる主な態様では、本発明は、薬剤として使用するための本明細書に記載の本発明に従う多重特異性抗体に関する。

## 【0121】

本発明による多重特異性抗体は、V<sub>9V2</sub>T細胞による腫瘍細胞、特にCD123陽性腫瘍細胞の死滅に有益な微小環境を作製することを可能にする。

## 【0122】

したがって、更なる主な態様では、本発明は、がんの治療に使用するための本明細書に記載の本発明にかかる多重特異性抗体に関する。更なる主な態様では、本発明は、急性骨髄性白血病、B細胞急性リンパ芽球性白血病、有毛細胞白血病、ホジキンリンパ腫、芽細胞性形質細胞様樹状突起腫瘍、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、B細胞慢性リンパ増殖性障害または骨髄異形成症候群の治療に使用するための、本明細書に記載の本発明に従う多重特異性抗体に関する。

40

## 【0123】

同様に、本発明は、本明細書に記載の本発明による多重特異性抗体を、それを必要とするヒト対象に投与することを含む、疾患の治療方法に関する。一実施形態では、疾患は、がん、例えば、急性骨髄性白血病である。

## 【0124】

いくつかの実施形態では、抗体は、単剤療法として投与される。しかしながら、本発明の抗体も、併用療法、すなわち、治療する疾患または状態に関連する他の治療剤と併用し

50

て投与してもよい。

【0125】

「治療する」または「治療すること」は、症状または疾患状態を緩和、改善、阻止、根絶（硬化）または予防する目的で、本発明にかかる有効量の抗体を投与することを指す。「有効な量」は、所望の治療結果を達成するために必要な用量及び期間に有効な量を指す。抗体等の有効量のポリペプチドは、疾患の病期、年齢、性別、及び個体の体重、ならびに抗体が個体において所望の応答を誘発する能力等の要因に応じて変化し得る。有効量はまた、治療上有益な効果によって抗体の任意の毒性または有害な効果を上回るものである。本発明の抗体の有効量の例示的な非限定的な範囲は、約  $0.1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 100 \text{mg}/\text{kg}$ 、例えば、約  $1 \mu\text{g}/\text{kg} \sim 50 \text{mg}/\text{kg}$ 、例えば、約  $0.01 \sim 20 \text{mg}/\text{kg}$ 、例えば、約  $0.1 \sim 10 \text{mg}/\text{kg}$ 、例えば、約  $0.5$ 、約  $0.3$ 、約  $1$ 、約  $3$ 、約  $5$ 、または約  $8 \text{mg}/\text{kg}$  である。投与は、任意の好適な経路によって行われ得るが、典型的には、静脈内、筋肉内、または皮下等の非経口である。

10

【0126】

本発明の多重特異性抗体は、典型的には、組換えで、すなわち、適切な宿主細胞において抗体をコードする核酸構築物の発現、続いて、細胞培養物から産生された組換え抗体の精製によって産生される。核酸構築物は、当該技術分野で周知の標準的な分子生物学的技法によって産生され得る。構築物は、典型的には、発現ベクターを使用して宿主細胞に導入される。好適な核酸構築物及び発現ベクターは当該技術分野で既知である。抗体の組換え発現に好適な宿主細胞は、当該技術分野で周知であり、CHO、HEK-293、Exp293F、PER-C6、NS/O及びSp2/O細胞を含む。

20

【0127】

したがって、更なる態様では、本発明は、本発明の抗体、例えば、本発明にかかる多重特異性抗体をコードする核酸構築物に関する。一実施形態では、構築物は、DNA構築物である。別の実施形態では、構築物はRNA構築物である。

【0128】

更なる態様では、本発明は、本発明にかかる多重特異性抗体をコードする核酸構築物を含む発現ベクターに関する。

【0129】

更なる態様において、本発明は、本発明にかかる多重特異性抗体をコードする1つ以上の核酸構築物または本発明にかかる多重特異性抗体をコードする核酸構築物を含む発現ベクターを含む宿主細胞に関する。

30

40

50

【表 4 - 1】

表 1 : 配列表

配列番号	コード	説明	配列
1	1D2	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTASSYVMGWFRQ APGKEREFVAVINWNGDSTYYTDSVKGRFAISRDNANTV YLQMNSLKPEDTAVYYCAADTRREWYRDGYWGPPARYE YDYRGQGTQVTVSS
2	1D2	CDR1	GRTASSYVMX <sub>1</sub> 、式中、X <sub>1</sub> は、GまたはSである。
3	1D2	CDR2	VINWNGDSTYYX <sub>2</sub> DSVKG、式中、X <sub>2</sub> はAまたはTである
4	1D2	CDR3	DTRREWYRDGX <sub>3</sub> WGPPARYEYDY、式中、X <sub>3</sub> はYまたはFである
5	1D2	FR1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
6	1D2	FR2	WFRQAPGKEREFVA
7	1D2	FR3	RFAISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
8	1D2	FR4	RGQGTQVTVSS
9	1A3	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRAINTYAMAWFRQ APGKERDFVATISYSGGTTDYAGSVKGRFTISRDNANTV YLQMNSLKPEDTAVYYCAARDRYNPLARNYNYWGQGTQ VTVSS
10	1A3	CDR1	GRAINTYAMA
11	1A3	CDR2	TISYSGGTTDYAGSVKG
12	1A3	CDR3	RDRYNPLARNYNY
13	1A3	FR1	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAS
14	1A3	FR2	WFRQAPGKERDFVA
15	1A3	FR3	RFTISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAA
16	1A3	FR4	WGQGTQVTVSS
17	5C8var	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAMSWFRQA PGKEREFVSAISWGGSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYL QMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGADX <sub>4</sub> GFGRLGIRGYEYDY WGQGTQVTVSS、X <sub>4</sub> はY、FまたはSである
18	5C8var	CDR1	NYAMS
19	5C8var	CDR2	AISWGGSTSYADSVKG
20	5C8var	CDR3	QFSGADX <sub>4</sub> GFGRLGIRGYEYDY、式中、X <sub>4</sub> はY、FまたはSである

10

20

30

40

50

【表 4 - 2】

21	KiH(穴)L FLE	Fc	APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVD KSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
22	KiH(ノ ブ)LFLE	Fc	APEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
23	ヒト CD123		MVLLWLTLLLIALPCLLQTKEDPNPPITNLRMKAKAQ QLTWDLNRNVTDIECVKDADYSMPAVNNSYCF GAISLCEVTNYTVRVANPPFSTWILFPENSGKPWAGA ENLTCWIHDVDFLSCSWAVGPGAPADVQYDLYLNV ANRRQQYECLHYKTDAGTRIGCRFDDISRLSSGSQS SHILVRGRSAAFIPCTDKFVVFSQIEILTP PNMTAKCNKTHSFMHWKMRSHFNRFYELQIQKR MQPVITEQVRDRTSFQLLNPGTYTVQIRARERVYEFL SAWSTPQRFECDEEGANTRAWRTSLIALGTLLAL VCVFVICRRYLVMQRLFPRIPHMKDPIGDSFQ NDKLVVWEAGKAGLEECLVTEVQVVQKT

10

20

30

40

50

【表 4 - 3】

24	ヒト CD131		<p>MVLAQGLLSMALLALCWERSLAGAEETIPLQTL  RCYNDYTSHITCRWADTQDAQRLVNVTLIRRVN  EDLLEPVSCDLSDDMPWSACPHPRCVPRRCVIPC  QSFVVTVDVDYFSFQPDRPLGTRRLTVTLTQHVQPP  EPRDLQISTDQDHFLLTWSVALGSPQSHWLSPGD  LEFEVVYKRLQDSWEDAAILLSNTSQATLGPEHL  MPSSTYVARVRTRLAPGSRLSGRPSKWSPEVCW  DSQPGDEAQPQNLECFDGA AVLSCSWEVRKEV  ASSVSFGLFYKPSPDAGEEECSVLREGLGSLHTR  HHCQIPVPDPATHGQYIVSVQPRRAEKHIKSSVNI  QMAPPSLNVTKDGDSYSLRWETMKMRYEIDH  TFEIYQRKDTATWKDSKTETLQNAHSMALPALE  PSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSEARSWD  TESVLPMWVLALIVIFLTIAVLLALRFCGIYGYRL  RRKWEKIPNPSKSHLFQNGSAELWPPGSMSAFT  SGSPPHQGPWGSRFPELEGVFPVGFVGDSEVSPLTI  EDPKHVCDPSPGPDTPAASDLPTAQPPSPQPGPP  AASHTPEKQASSDFDNGPYLGPPHSRSLPDILGQP  EPPQEGGSQKSPPPGSLEYLCLPAGGQVQLVPLA  QAMGPGQAVEVERRPSQGAAGSPSLESGGGPAP  PALGPRVGGQDQKDSPVAIPMSSGDTEDPGVAS  GYVSSADLVFTPNNGASSVSLVPSLGLPSDQTPSL  CPGLASGPPGAPGPVKSGFEGYVELPPIEGRSPRS  PRNNPVPEAKSPVLNPGERPADVSPSPQPEGLL  VLQQVGDYCFPLPGLGPGPLSLRSKPSSPGPGPEIK  NLDQAFQVKKPPGQAVPQVPVIQLFKALKQQDY  LSLPPWEVNKPGVC</p>
25	1D2 var1		<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSYV  MGWFRQAPGKEREFVSVINWNGDSTYYADSVK  GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAA  DTRREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGTQVTVS  S</p>

10

20

30

40

50

【表 4 - 4】

26	1D2 var2		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSYVM GWVRQAPGKEREWVSVINWNGDSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADTR REWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGTLTVSS
27	1D2 var3		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSYVM SWFRQAPGKEREWVAVINWNGDSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCAADTR REWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGTLTVSS
28	1D2 var4		EVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRTASSYVM SWFRQAPGKEREWVAVINWNGDSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADTR REWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGTTVTVSS
29	1D2 var5		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSYVM SWFRQAPGKEREFVAVINWNGDSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCAADTR REWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGTLTVSS
30	1D2 var6		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSYVM GWVRQAPGKGLEWVSVINWNGDSTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADT RREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGTLTVSS
31	1D2 var7		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSYVM SWVRQAPGKGLEWVSVINWNGDSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAADTR REWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGTLTVSS
32	1D2 var8		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSYVM SWFRQAPGKGLEWVAVINWNGDSTYYADSVKGR FTISRDNSKNTVYLLQMNSLRAEDTAVYYCAADTR REWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGTLTVSS

10

20

30

40

50

【表 4 - 5】

33	1D2 var9		EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTASSY VMGWFRQAPGKEREWVAVINWNGDSTYYTD SVKGRFAISRDNKNTVYVYLMNSLRAEDTAVY YCAADTRREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQG TQVTVSS
34	1D2 var10		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTASSY VMGWFRQAPGKEREFVSVINWNGDSTYYADS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNLSLRAEDTAVYY CAADTRREWYRDGFWGPPARYEYDYRGQGTQ VTVSS
35		変形ヒンジ	AAASDKTHTCPPCP
36	6H4	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSSNY GMGWFRQAPGKKREFVAGISWSGGSTDYADS VKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYY CAAVFSGAETAYYPSDDYDYWGQGTQVTVSS
37	6C1	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSSNY GMGWFRQAPGKKRESVAGISWSGGSTDYADS VKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYY CAAVFSGAETAYYPSDDYDYWGQGTQVTVSS
38	5D3	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFSSNY AMGWFRQAPGKEREFVTVISWSGGSTYYADS VKGRFTISRDNKNTVYVYLMNSLKPEDTAVYY CAAQFSGASTVVAGTALDYDYWGQGTQVTVSS S
39	6H4	CDR1	GRPFSSNYGMG
40	6H4	CDR2	GISWSGGSTDYADSVKG
41	6H4	CDR3	VFSGAETAYYPSDDYDY
42	6C1	CDR1	GRPFSSNYGMG
43	6C1	CDR2	GISWSGGSTDYADSVKG
44	6C1	CDR3	VFSGAETAYYPSDDYDY
45	5D3	CDR1	GRPFSSNYAMG
46	5D3	CDR2	VISWSGGSTYYADSVKG
47	5D3	CDR3	QFSGASTVVAGTALDYDY

10

20

30

40

50

【表 4 - 6】

48	V82		MQRISLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQTPVPSI GVPATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNTM TFIYREKDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLKIL APSERDEGSYYCACDTLGMGGEYTDKLIFGKG TRVTVEPRSQPHTKPSVFMKNGTNAVCLVKE FYPKDIRINLVSSKKITEFDPAIVISPSGKYNAVK LGKYEDSNSVTCVQHDNKTVHSTDFEVKTDS TDHVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVHTEKVN MMSLT
49	5C8var1( Y105F)	VHH-Fc	EVQLLESGGGSVQPGSLRLSCAASGRPFSNYA MSWFRQAPGKEREFVSAISWSGGSTSYADSVK GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA AQFSGADFGFGRGLGIRGYEYDYWGQGTQVTVS SAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 4 - 7】

50	1D2	VHH-Fc	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRTASSY VMGWFRQAPGKEREFVAVINWNGDSTYYTDS VKGRFAISRDNANTVYLQMNSLKPEDTAVYY CAADTRREWYRDGYWGPPARYEYDYRGQGT QVTVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA KGQPREPVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFF LVSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK	10
51	7A5	重鎖	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGFTFTDH YINWVKQRTGQGLEWIGQIYPGNGNTYYNEKF KGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFC APNYGDYTLDFWQGQTSVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT CPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTK PREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPVYTLPPSR DELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKAAAE PEA	20 30
52	7A5	軽鎖	DIVMSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLYSS NQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVP DRFTGSGSGTDFLTITISSVKAEDLAVYYCQQYY RYHTFGTGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKS GTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN SQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKV YACEVTHQGLSPVTKSFNRGEC	
53	Cタグ		AAAEPEA	40

## 【0130】

本明細書で引用される全ての参考文献、論文、刊行物、特許、特許公報、及び特許出願は、あらゆる目的のためにそれらの全体が参照により組み込まれる。しかしながら、本明細書で引用されるいずれの参考文献、論文、刊行物、特許、特許公報、及び特許出願の言及も、それらが有効な先行技術を構成するか、または世界のいずれかの国で共通の一般知識の一部を形成するという承認または何らかの形態の示唆ではなく、そのようにみなされるべきではない。

## 【実施例】

## 【0131】

実施例 1 : C 1 R - C D 1 d 細胞で免疫化した動物から作製したファージディスプレイライブラリーからの抗 C D 1 2 3 V H H の選択及び同定

ラマグラマ ( 2 匹の動物 ) を、C D 1 2 3 発現 C 1 R - C D 1 d 細胞で免疫化し、その後、「免疫」V H H ファージ抗体ライブラリーを記載通りに作製した ( L a m e r i s e t a l . , 2 0 1 6 I m m u n o l o g y 1 4 9 : 1 1 1 ) 。これらのライブラリーを、捕捉された組換えヒト C D 1 2 3 または直接コーティングされた C D 1 2 3 抗原 ( 細胞外ドメイン、S i n o B i o l o g i c a l ) 上のファージ選択に使用した。1 回または 2 回の連続した選択ラウンドを実施した。ファージ選択の 1 回及び 2 回のラウンドの後、単一のファージクローンを E L I S A で組換え捕捉された抗原への結合についてスクリーニングした。結合に対して陽性と評価されたこれらのクローンを配列決定し、次いで、異なる配列を有する全てのクローンを、フローサイトメトリーにおいて免疫化に使用される細胞株への結合について試験した。次いで、F A C S に結合を示す V H H クローンを、更なる特性評価のために選択した。8 つの異なるクローンを特定し、以下と称した : 1 E 2、1 B 4、1 A 3、2 D 1 1、1 D 2、1 E 4、1 H 1、及び 1 F 1。

10

【 0 1 3 2 】

実施例 2 : 二重特異性 V H H の合成遺伝子合成、産生及び精製

次いで、C D 1 2 3 特異的 V H H ドメイン抗体の配列を、V 2 特異的 V H H ( 5 C 8 v a r 1 ; 配列番号 1 7、式中、X<sub>4</sub> は Y ) を配向させた二重特異的 V H H に再形成した : N 末端 - 抗 C D 1 2 3 V H H - リンカー - 抗 V 2 V H H - C タグ。使用される V 2 特異的 V H H は、配列番号 1 7 ( 式中、X<sub>4</sub> は Y である ) に記載される。2 つの V H H ドメイン間のリンカーは、配列 G 4 S を有するグリシン ( G ) - セリン ( S ) ストレッチであった。これらのタンパク質をコードする c D N A を、G e n s c r i p t での合成遺伝子合成によって作製し、次いで、方向性クローニングによって真核発現ベクター p C D N A 3 . 1 + ( T h e r m o f i s h e r S c i e n t i f i c ) にクローニングした。タンパク質を、H e k 2 9 3 E 細胞中で一過性トランスフェクションによって発現させ、次いで ( 発現の 5 日後に ) サプライヤーのプロトコルに従って、C a p t u r e S e l e c t C - t a g 親和性マトリックス ( T h e r m o F i s h e r S c i e n t i f i c ) を使用して、条件付け細胞培養上清から精製した。精製二重特異性 V H H は、C o o m a s s i e 染色を使用した S D S - P A G E 分析によって決定されるように、常に > 9 5 % 純粋であり、非常に低レベルのエンドトキシン ( < 0 . 5 E U / m g ) を含有した。

20

30

【 0 1 3 3 】

実施例 3 : E L I S A における二重特異性抗 C D 1 2 3 x V 2 V H H の結合の特異性 組換え精製 C D 1 2 3 抗原 ( 細胞外ドメイン ; S i n o B i o l o g i c a l )、または C D 1 2 3 抗原の F c 融合物 ( B i o - T e c h n e / R & D S y s t e m s ) を、P B S 中の E L I S A プレート ( G r e i n e r ) のウェルに、2 μ g / m l の濃度でコーティングした。陰性対照として、ウェルを 1 % ( w / v ) の B S A でコーティングした。ヒト F c に融合したヒト V 9 及び V 2 T C R 鎖の細胞外ドメインの、自社で設計、産生、及び精製した組換え形態も、2 μ g / m l で抗原としてコーティングした。2 % ( w / v ) の B S A でウェルをコーティング及びブロックした後、二重特異性 V H H タンパク質を 5 0 n M の飽和濃度での結合について試験し、結合した V H H を、H R P 標識抗 V H H 抗体 ( G e n s c r i p t ) を用いて検出し、3 , 3 ' , 5 , 5 ' - テトラメチルベンジジン ( T M B ) / H 2 O 2 を用いて染色した。

40

【 0 1 3 4 】

図 1 は、E L I S A において、1 A 3 - 5 C 8 v a r 1 及び 1 D 2 - 5 C 8 v a r 1 のみが、C D 1 2 3 及び - T C R ( T 細胞受容体 ) の両方に対して強力かつ特異的な結合を示したことを示す。他の二重特異性は、C D 1 2 3 に弱く結合したか、または結合しなかった。

【 0 1 3 5 】

実施例 4 : フローサイトメトリーを使用した二重特異性抗 C D 1 2 3 x V 2 V H H の

50

## 結合の特異性

ヒトCD123及び受容体の共通鎖(CD131)の発現構築物をIn vivo genから購入した。プラスミドを化学的に能力のあるDH5細菌に形質転換し、選択的培地上で増殖する単一のコロニーを使用して50ml培養物を接種し、両方の構築物を増幅した。次いで、ポリエチレンイミン(PEI)を使用して、精製DNAをフリースタイル293F細胞にトランスフェクトした。プラスミド単独、または2つのプラスミドの混合物のいずれかをトランスフェクションに使用した。陰性対照として、トランスフェクションしていない細胞もフローサイトメトリーに使用した。トランスフェクションの1日後、細胞を使用して、FACSでの染色を使用して二重特異性VHHの結合を試験した。手短に言えば、飽和濃度が100nMの二重特異性VHHのトランスフェクト細胞への結合を、AF647標識抗VHH(Genscript)抗体で検出し、FACS Celesta(Becton and Dickinson)を使用して染色を視覚化した。

10

### 【0136】

図2は、1A3-5C8var1及び1D2-5C8var1の両方が、抗原が単独で発現されたとき、またはCD131と併せて発現されたときに、CD123を強くかつ特異的に認識したことを示す。1D2-5C8var1は、フローサイトメトリーにおいて最も強いシグナルを与えた。

### 【0137】

フローサイトメトリーを用いてCD123に対する1D2-5C8var1の見かけの親和性を決定するために、この二重特異性VHHの濃度範囲を、CD123、CD131またはCD123及び-131の両方を発現する一過性にトランスフェクトされた293F細胞への結合について試験した。前者の細胞(CD131を発現する)を陰性対照として用いた。

20

### 【0138】

図3は、CD123を(一過性に)発現する細胞のみが認識されたが、CD131は認識されなかったため、1D2-5C8var1がCD123に対して絶妙に特異的であったことを再び示す。更に、データは、フローサイトメトリーを使用して決定された、CD123への1D2-5C8var1結合の見かけの親和性が、約3nMであったことを示す。この値は、CD123単独への結合、または共発現CD123及び-131への結合について同等であった。

30

### 【0139】

実施例5：バイオレイヤー干渉法(BLI)を使用したCD123を結合するための1D2-5C8var1の親和性決定

1D2-5C8var1のCD123への結合の動態を決定するために、組換え精製CD123-Fc融合タンパク質(Bio-Techne/R&D Systems)を、Octet Red 96e(Sartorius)機器用の抗ヒトIgG Fc Captureセンサー(5µg/mlの濃度を使用して)に1nmの密度までロードした。次いで、異なるセンサーを異なる濃度の1D2-5C8var1に浸し、供給者によって提供される10倍の速度論的緩衝液(10×KB)中で希釈を行った。得られたセンサーグラムから、速度論的な結合速度定数と解離速度定数をカーブフィッティングによって決定した。

40

### 【0140】

図4は、カーブフィッティングに使用された実際のセンサーグラムを示している。後者は、図中で直線として示される。これを使用して、速度論的な結合速度定数及び解離速度定数を決定し、それによって抗CD123 VHH 1D2の親和性を決定した。測定を2回実施し、CD123に対する1D2-5C8var1の親和性を3~5nMの間で測定した。

### 【0141】

実施例6：CD123依存性、1D2-5C8var1媒介性V9V2 T細胞活性化及びT細胞媒介性標的細胞細胞毒性

50

バフィーコートを手取し、Sanquin (Amsterdam, the Netherlands) から入手した。説明された手順を使用して、Ficoll密度勾配遠心分離によって、PBMCをこれらのバフィーコートから単離した。高純度のV<sub>9V2</sub>T細胞を、V<sub>2</sub>特異的抗体を使用してMACSによって得て、これらを、公開されている方法を使用して増殖した (de Bruin et al., 2016 Clin Immunol. 169: 128)。CD123陽性Bリンパ芽細胞、EBV形質転換C1R neo細胞株 (CRL-2369) 及びCD123陽性AML由来THP-1細胞株 (TIB-202) をアメリカ型培養物収集物から入手し、供給者の指示に従って培養した。標的細胞を、細胞トレースバイオレット (CTV) により、37℃で20分間標識した。T細胞活性化を測定するために、細胞を、細胞が脱顆粒すると細胞表面に露出する活性化マーカーCD107a (またはLAMP-1、リソソーム関連膜タンパク質-1) について染色した。二重特異性抗体の濃度範囲を、PE標識抗CD107A抗体の存在下で、標的細胞及び増殖したV<sub>9V2</sub>T細胞 (各50,000細胞) の1:1の混合物を用いて、最終体積100µlで4時間インキュベートした。インキュベーション後、細胞を洗浄し、蛍光標識された抗CD3及び抗V<sub>9</sub>抗体の混合物で染色して、T細胞及び生/死染色を同定した (7-ADD)。サンプルを、FACS Celesta (Beckton and Dickinson) を使用して分析した。T細胞が媒介する標的細胞細胞毒性を評価するために、本質的に同じ設定を使用し、抗CD107A抗体のみを添加せず、CTV標識された標的細胞及びV<sub>9V2</sub>T細胞を二重特異性VHHの存在下で24時間インキュベートした。アッセイの終わりに、細胞を再びCD3及びV<sub>9</sub>について染色し、生/死染色 (7-ADD) の存在下でフローサイトメトリーを使用して分析した。

10

20

## 【0142】

図5は、1D2-5C8var1が、pM範囲内のEC50で強力なT細胞活性化を引き起こしたことを示す。標的細胞の非存在下では、高濃度の1D2-5C8var1は、バックグラウンド活性化のみを引き起こした (データ割愛)。T細胞活性化を誘導する1D2-5C8var1の効力は、使用されるT細胞ドナーにわずかに依存した; EC50値は、3~13pMの範囲であった。

## 【0143】

観察されたT細胞の活性化が標的細胞の溶解をもたらすかどうかを決定するために、1:1のエフェクター対標的 (E:T) の比及び24時間の時点を使用して、細胞毒性アッセイを実行した。図6は、増殖したV<sub>9V2</sub>T細胞の存在下で、1D2-5C8var1がC1R-neo標的細胞の溶解を強力に誘導したことを示す。細胞毒性のEC50は、使用されるT細胞ドナーに依存して、1~2pMの間のカーブフィッティングによって決定した (2人のドナーのデータが示されている)。

30

## 【0144】

同じ細胞毒性アッセイをCD123陽性AML細胞株、THP-1、で繰り返した。THP-1標的細胞溶解を誘導する1D2-5C8var1の効力は、非常に同等であった。EC50は1pMと測定した。対照的に、標的細胞溶解を誘導するための1A3-5C8var1の効力は、約50pMと測定された。図7。

## 【0145】

実施例7: 二重特異性VHH媒介性、V<sub>9V2</sub>T細胞活性化及びT細胞誘導による原発性AML細胞の溶解

40

AML患者に由来する25,000個の骨髄由来の単核細胞を、健康なドナーに由来する増殖したV<sub>9V2</sub>T細胞と1:1の比率で一晩共培養した。細胞を、PE標識CD107a抗体の存在下、及び1D2-5C8var1の濃度範囲 (10fM~100nMの範囲) で培養した。細胞を採取し、洗浄し、蛍光標識された抗CD45、CD117、CD34、CD33及びCD2抗体を含有する抗体混合物を用いて4℃で30秒間標識した。洗浄後、細胞を生/死染色 (7-ADD) 及び123カウントビーズの混合物中に再懸濁し、続いてLSRFortessaフローサイトメーターを使用して分析した。

## 【0146】

50

図8は、両方の二重特異性VHH化合物が、CD123陽性原発性AML芽球に依存して、強力なT細胞活性化を誘導することが可能であったことを示す。加えて、化合物は、高レベルの腫瘍細胞溶解を引き起こし、両方とも、この細胞毒性において有意な効力を示した。EC50値は、得られたカーブから明確に決定することができなかったが、fM範囲内(1pM未満)であった。

【0147】

実施例8：CDRグラフティングを使用した抗CD123 VHH 1D2のヒト化

1D2 VHH抗体断片を、CDRグラフティング技術を使用してヒト化した(例えば、米国特許第5,225,539号、及びWilliams, D. G. et al., 2010, *Antibody Engineering*, volume 1, Chapter 21を参照)。まず、IgBLASTを使用してヒト生殖細胞系列配列を特定した(Ye J. et al., 2013, *Nucleic Acids Res.* 41:W34-40)。最も近いヒト生殖細胞系列配列として、V遺伝子IGVH3-23\*04を特定した(78.4%同一性)。この生殖細胞系列配列を使用して、ラマCDR(ヒト生殖細胞系列IGVH3-23\*04と91.8%の同一性)を直接移植し、以下のcDNA構築物を得た。配列番号31である。次に、NCBI NRデータベース(2020年9月27日にダウンロード)をBLASTP(バージョン2.10.0+)を使用してクエリして、1D2配列との最も高い同一性を示したヒト鋳型配列を同定した。70%以上の類似性スコアを示し、好ましくは、それぞれ1D2 CDR1、CDR2、CDR3のものと同様である、類似のCDR長を示した2つのVH配列が同定された。GenBank(Benson, D. A. et al., 2013, *Nucleic Acids Res.* 41(D1):D36-42)受託#CAD60357.1、及びAKU38567.1によってコードされるフレームワークを、1D2 CDRのグラフト化のためのテンプレートとして選択し、以下のcDNA構築物を得た：各々、配列番号28及び32である。フレームワーク及びCDRの定義は、Kabat et al.によって決定されるものである("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E., et al., US Department of Health and Human Services, (1983))。VHHの構造に対するヒト化フレームワーク残基の効果を理解するために、BioLuminate 4.2.156(Schrodinger)内の「Antibody Prediction(抗体予測)」ツール(デフォルトパラメータ)を使用して、1D2 VHHの相同性モデルを作製した。相同性モデルは、PDB ID 6GKUに基づいて構築した。CDRをシリコーでグラフトして、CDRのループコンフォメーション、表面の疎水性、及び構造的完全性(例えば、剛性の増加)としての特徴に対するヒト残基の効果を研究した。得られた構築物をこれらの特徴についてチェックし、追加の構築物の設計をもたらした。配列番号25、26、27、29、30、33、及び34。次いで、これらのヒト化1D2-VHHの配列を、V2特異的VHH(5C8var1;配列番号17、式中、X4はY)を配向させた二重特異的VHHに再形成した：N末端-ヒト化-抗1D2 VHH-リンカー-抗V2 VHH-Cタグ。次いで、これらの分子をコードするcDNAを合成し、HEK293E細胞における発現のための発現ベクターにクローニングした。タンパク質を細胞の一過性トランスフェクションによって作製し、Cタグ親和性クロマトグラフィーを使用して培養上清から精製し、続いて分取サイズ排除クロマトグラフィーを使用した。

【0148】

実施例9：バイオレイヤー干渉法(BLI)を使用したCD123を結合するためのヒト化1D2-5C8var1(Y105F)変異体の親和性決定

ヒト化1D2-5C8var1変異体のCD123への結合の動態を決定するために、組換え精製CD123-Fc融合タンパク質(Bio-Techne/R&D Systems)を、Octet Red96e(Sartorius)機器用の抗ヒトIgG Fc Captureセンサー(5µg/mlの濃度を使用して)に1nmの密度まで口

ードした。次いで、異なるセンサーを、50 nM及びその2倍希釈から開始して、異なる濃度のヒト化1D2-5C8var1変異体に浸した。希釈は、供給者によって提供される10倍速度論的緩衝液(10×KB)中で行った。得られたセンサーグラムから、速度論的な結合速度定数と解離速度定数をカーブフィッティングによって決定した。適合が可能な場合、結合速度定数及び解離速度定数を使用して、CD123への結合についてのヒト化1D2-5C8var1変異体の親和性を算出した。測定を2回実施し、CD123に対する異なるヒト化1D2-5C8var1変異体の親和性は、表2に示されるように、親1D2と比較して類似した2.6 nMから非結合変異体までの範囲であった。参照のために、非ヒト化(親)1D2をこれらの実験に含めた。

【表5】

10

表2：1D2のヒト化変異体と組換えCD123との親和性

配列番号	KD(nM)	SD
1	3.1	0.7
25	7.2	0.4
26	24.5*	
27	14.9	4.3
28	20.0	7.5
29	7.7	1.5
30	29.1*	
31	n.b.	
32	44.1*	
33	2.6	0.5
34	10.4	7.5

20

\*低結合(>20 nM)、1回の測定のみ、n. b. : 結合は観察されなかった

【0149】

実施例10：半減期延長(Fc含有)二重特異性構築物

30

1D2-5C8var1二重特異性VHHを、ヒトFcドメインを含有する治療用抗体フォーマットに再フォーマットした。両方のVHHドメインを、以下の特徴を有するヒトIgG1 Fc(すなわち、CH2及びCH3)ドメインにカップリングした：VHHを修飾ヒンジ(AAA、続いてSDKTHTCP)及びヒトCH2及びCH3ドメインにカップリングした。CH2ドメインは、LFL E変異対(L234F、L235E)によってFcサイレンシングされ、CH3ドメインは、同じ細胞内の2つの鎖の共発現時に、ヘテロ二量体化を強制する、「ノブ-イントゥ-ホール」変異(ノブ：T366W及びホール：T366S、L368A、及びY407V)により変異された。この変異対は、科学文献に記載されている(Ridgway et al. (1996) Protein Eng 9:617)。抗V9V2重鎖のC末端に、精製目的のC末端タグを装備した(AAAEPEA(配列番号53))。構築物の配列は、配列番号49及び配列番号50に記載されている。結果として得られた抗体構築物を1D2-5C8var1(Y105F)-Fcと称した。

40

【0150】

タンパク質は、HEK293E細胞における2つの発現ベクターをコードする共トランスフェクションをすることと、C-tag親和性クロマトグラフィー、続いて分取サイズ排除クロマトグラフィーによって培養上清から精製することとを介して作製した。これにより、1D2-5C8var1(Y105F)-Fcの高単量体タンパク質調製物が得られた。図9。

【0151】

50

実施例 11 : 1 D 2 - 5 C 8 v a r 1 ( Y 1 0 5 F ) - F c は、標的依存性 T 細胞活性化を誘導し、二重特異性 V H H と同等の効力を有する T 細胞媒介性標的細胞細胞毒性を引き起こす

次いで、V 9 V 2 T 細胞と T H P - 1 腫瘍細胞との共培養 ( 1 : 1 の比率で ) に  
おいて、1 D 2 - 5 C 8 v a r 1 ( Y 1 0 5 F ) - F c が標的依存性 V 9 V 2 T 細胞  
活性化を誘導する能力について試験した。V 9 V 2 T 細胞を、当該技術分野で既  
知の手順を使用して、健康なドナーの血液から増殖させた。T H P - 1 細胞株 ( A T C C  
カタログ番号 N r . T I B - 2 0 2 ) をサプライヤーの推奨に従って培養した。両方の細胞  
型の 4 時間の共培養において、V 9 V 2 T 細胞の活性化を、C D 1 0 7 a を染色  
し、フローサイトメトリーによって C D 1 0 7 a 陽性細胞の割合を測定することによって  
測定した。図 1 0 は、1 D 2 - 5 C 8 v a r 1 ( Y 1 0 5 F ) - F c が標的依存性 T 細胞  
活性化を誘導したことを示す ( 化合物の非存在下での V 9 V 2 T 細胞と腫瘍細胞の  
共培養において活性化は観察されなかった、データ割愛 ) 。E C 5 0 は、典型的には、p  
M の範囲であり、4 ~ 1 6 p M の範囲であった ( 使用されるドナーに依存する ) 。

10

【 0 1 5 2 】

注目すべきは、V 9 V 2 T 細胞活性化を誘導する F c 含有分子の効力は、二重特  
異性 V H H とは測定可能に異なるものではなかった。これは、3 つの異なる独立した T 細胞  
ドナーについて観察された。この T 細胞の活性化が標的細胞の溶解ももたらしたかどう  
かを決定するために、T H P - 1 標的細胞の生存率を、抗体の存在下での V 9 V 2  
T 細胞との 2 4 時間の共培養 ( 1 : 1 の比 ) 後に測定した。V 9 V 2 T 細胞を健康  
なドナーの血液から単離し、標準化されたプロトコルを用いて増殖させた。アッセイの前  
日に、T H P - 1 標的細胞株を、フローサイトメトリーでエフェクター細胞集団と区別す  
ることができるように、細胞トレースバイオレット ( C T V ) で標識した。増加した濃度  
の化合物の存在下での 2 4 時間の共培養後、生体標的細胞の割合を決定した。図 1 1 。

20

【 0 1 5 3 】

図 1 1 は、二重特異性 V H H 及び F c 含有対応物が両方とも強力な T 細胞媒介性標的細胞  
細胞毒性を誘導し、標的細胞溶解を引き起こす際の両方の分子の効力が測定可能に異なる  
わけではないことを示す。E C 5 0 値は、使用されるドナーに応じて、1 ~ 3 p M の範  
囲であった。化合物の非存在下での共培養では、標的細胞溶解は観察されなかった ( デー  
タ割愛 ) 。2 4 時間後、アッセイ中の全ての標的細胞を死滅させた。

30

【 0 1 5 4 】

実施例 12 : 1 D 2 - 5 C 8 v a r 1 ( Y 1 0 5 F ) - F c は、標的陽性正常細胞よりも  
腫瘍細胞の優先的な殺傷を引き起こす

抗体が C D 1 2 3 陽性正常細胞の死滅をどの程度誘導したかを決定するために、C D 1  
2 3 を発現することが知られている形質細胞様樹状細胞 ( p D C ) ( C o l l i n e t  
a l . , 2 0 1 3 I m m u n o l o g y 1 4 0 , 1 : 2 2 - 3 0 ) を、M A C S 選別  
( M i l t e n y i B i o t e c h , C a t . N r . 1 3 0 - 0 9 7 - 4 1 5 ) を用い  
て 2 人の健康なドナーの血液から単離した末梢血単核細胞 ( P B M C ) 画分から濃縮した  
。T H P - 1 細胞株を、C D 1 2 3 を発現する腫瘍細胞株として使用した。C D 1 2 3 の  
染色及びフローサイトメトリーによる分析を使用して、C D 1 2 3 の発現レベルが p D C  
上で T H P - 1 細胞株よりも約 1 0 倍高いことが示された。図 1 2 。

40

【 0 1 5 5 】

次いで、T H P - 1 細胞株、p D C、及び V 9 V 2 T 細胞の共培養において、標  
的細胞の混合物に対する C D 1 2 3 標的化合物と V 9 V 2 T 細胞との併用による細胞  
傷害効果を、1 : 1 : 2 の比率で決定した。V 9 V 2 T 細胞を健康なドナーの血  
液から単離し、標準化されたプロトコルを用いて増殖させた。アッセイの前日に、T H P  
- 1 標的細胞株を、フローサイトメトリーでエフェクター細胞集団及び他の標的細胞と区  
別することができるように、細胞トレースバイオレット ( C T V ) で標識した。増加する  
濃度の化合物の存在下での 2 4 時間の共培養後、V 9 ( T 細胞 ) 、C D 3 0 3 ( p D C  
 ) 、C T V ( T H P - 1 ) 及び C D 1 2 3 ( T H P - 1 及び p D C ) を染色することによ

50

って、生体標的細胞の割合を決定し、フローサイトメトリーによって分析した。

【0156】

図13は、二重特異性抗体が、約1 pMの効力( EC50 )で予想されるTHP-1標的細胞溶解(図11)を誘導したことを示す。しかし驚くべきことに、pDC上のCD123標的分子の10倍高い発現レベルにもかかわらず(図12)、これらの細胞は、はるかに少ない影響を受けた。観察された最大溶解は、より低く、アッセイで見出されたEC50は、THP-1細胞溶解で見出されたものよりもほぼ10倍高かった。ドナー番号2の結果は類似していた(THP-1及びpDCのそれぞれについて1及び11 pMのEC50値、データ割愛)。これらのデータは、化合物及びV9V2 T細胞による標的陽性正常細胞よりも腫瘍細胞の溶解の優先的な誘導を示す。

10

【0157】

実施例13：エピトープマッピングは、膜近位エピトープに結合するための1D2 VHHを明らかにする

CD123上のどのエピトープが抗CD123 VHH 1D2によって認識されたかを決定するために、このエピトープを、質量分析に基づく方法を使用してマッピングした(Pimenova et al., 2008 J Mass Spectrom. 43(2): 185-95)。CD123分子内のいくつかの残基が、抗体に架橋されていることが見出された。図14。

【0158】

図14は、ヒトCD123のアミノ酸203~273の領域に存在する1D2のエピトープを同定する。これらの残基を分子の結晶構造(PDB ID 5UV8: Broughton et al., 2018 Nat Commun. 9: 386)でハイライトすると、これは、最も近位の膜であり、1011<sup>2</sup>の表面積をカバーする第2のドメインにマッピングされる。

20

【0159】

図15は、リード抗CD123抗体によって認識されるエピトープが膜の近くに位置することを示す。スパンした距離は約40Åであり、これはエピトープにとって珍しいことではない。1D2 VHHの全てのCDR領域は、CDR3に対して特に強いシグナルを伴って、抗原に架橋されていることが見出された。

【0160】

同様の実験を行って、CD123上のどのエピトープが抗CD123 VHH 1A3によって認識されたかを決定した。CD123の残基H225、H231、R234、T251、R255及びT267は、1A3抗体に架橋していることが見出された。

30

【0161】

実施例14：1D2 x 5C8 var 1 (Y105F) - Fcは、良好な安定性プロファイルを示す

1D2 x 5C8 var 1 (Y105F) - Fcの熱安定性を、ナノ微分走査蛍光測定法(nano-DSF)によって分析した。タンパク質は、>60°Cのアンフォールディング温度で高い熱安定性を示した(表3)。更に、1D2 x 5C8 var 1 (Y105F) - Fcを加速ストレス試験に供した。サンプルを、高温(40°C)及び酸性(50 mM酢酸塩緩衝液、pH 5.0)及び塩基性(100 mMリン酸緩衝液、pH 8.5)条件下で1週間、ならびに酸化条件下(リン酸塩緩衝液、pH 7.4及び0.05% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)で、6時間及び24時間インキュベートした。任意のストレス誘発性変化を、変性(SDS)条件下(CE-SDS)及び還元後の(A)紫外線吸収(SEC-UV)によって検出されたサイズ排除クロマトグラフィー及び(B)キャピラリーゲル電気泳動によって凝集体及び断片を測定することによって分析した(図16)。非ストレス基準サンプルと比較して、ストレスタンパク質サンプルの検出可能な分解は観察されなかった。タンパク質は非常に安定であることが見出された。

40

## 【表 6】

表 3 :

結果 nanoDSF		1D2×5C8var1(Y105F)-Fc	
350nm/Tm で観察されたアンフォールディング遷移	ON [°C]	平均	60.45
		標準偏差	1.71
	IP #1 [°C]	平均	65.65
		標準偏差	0.01
	IP #2 [°C]	平均	71.61
		標準偏差	0.09
濁り発生 T <sub>on</sub>	平均	67.75	
	標準偏差	2.13	

10

## 【 0 1 6 2 】

実施例 15: V<sub>2</sub>-CD123 二重特異性抗体 1D2×5C8var1(Y105F) は、T細胞活性化及びT細胞媒介性腫瘍細胞細胞毒性の誘導において、7A5ベースの V<sub>9</sub>-CD123 二重特異性抗体よりも強力である

V<sub>2</sub>-CD123 二重特異性抗体 1D2×5C8var1(Y105F)-Fc の効力を、V<sub>9</sub> 結合 Fab 抗体 7A5 に基づく V<sub>9</sub>-CD123-Fc 二重特異性抗体と比較した。7A5 の配列は、Kabelitz 教授の好意により提供された。抗体は、Oberget al. (2014) Cancer Res 74(5):1349 に特徴付けられている。抗体 7A5 の変異体は、Ganesan et al. (2021) Leukemia 35(8):2274-2284 及び WO2020/227457 に記載されている。Fab 7A5 の配列を、CH3 におけるノブ-イントゥ-ホール変異、及び Fc サイレンシング変異 L234F 及び L235E を含むヒト CH2 及び CH3 配列に融合させた。次いで、この V<sub>9</sub> 結合「半 IgG」(配列番号 51 及び 52) を、HEK293E 細胞において CD123 特異的 VHH-Fc 融合物と共発現させて、二重特異性 V<sub>9</sub>×CD123 二重特異性抗体を形成した。タンパク質を、V<sub>9</sub> 結合アーム内の CH3 の C 末端に存在する C 末端タグを介して精製し、次いで調製サイズ除外を介して更に精製した。これにより、純粋で本質的にエンドトキシンを含まないタンパク質が得られた。1D2×Fab 7A5-Fc は、1D2×5C8var1(Y105F)-Fc と同じ CD123 結合 VHH アームを有する。アッセイのために、50,000 個の増殖した V<sub>9</sub>V<sub>2</sub> T 細胞を、50,000 個の Kasumi-3 または THP1 標的細胞、及び 2 つの化合物の希釈系列と共培養した。結果が図 17 に示される。(A) 脱顆粒を、フローサイトメトリーを介して CD107a (リソソーム関連タンパク質-1、または LAMP-1) 陽性細胞の割合を測定することによって、4 時間後に分析した。(B) V<sub>9</sub>V<sub>2</sub> T 細胞活性化を、CD25 陽性細胞の割合を測定することにより分析し、(C) 細胞毒性をフローサイトメトリーを介して 24 時間後の生体標的細胞の割合を分析することにより、分析した。1D2×5C8var1(Y105F)-Fc は、CD107a 陽性細胞ならびに CD25 陽性細胞の割合が高く、V<sub>9</sub> 標的化合物を使用したときに観察されたものよりも低い EC50 値によって証明されるように、V<sub>9</sub>V<sub>2</sub> T 細胞のより強力な活性化及び脱顆粒を誘導した。細胞毒性におけるより高い効力は、有意に低い EC50 値によって証明されるように、1D2×Fab 7A5-Fc と比較して、1D2×5C8var1(Y105F)-Fc を使用して観察された。

20

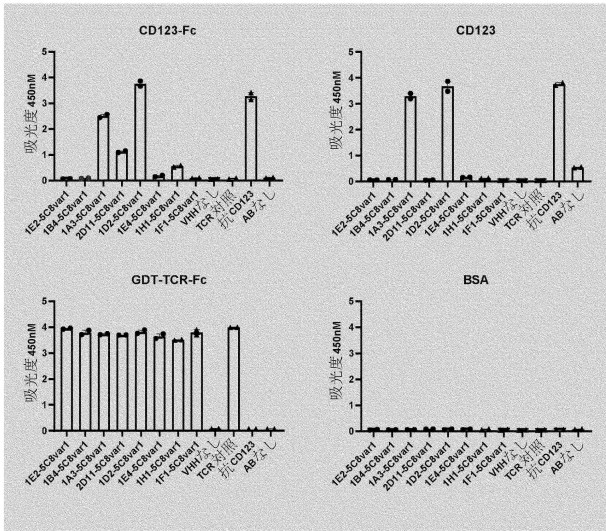
30

40

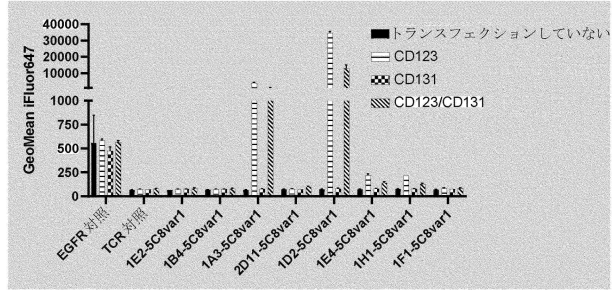
50

【 図 面 】

【 図 1 】

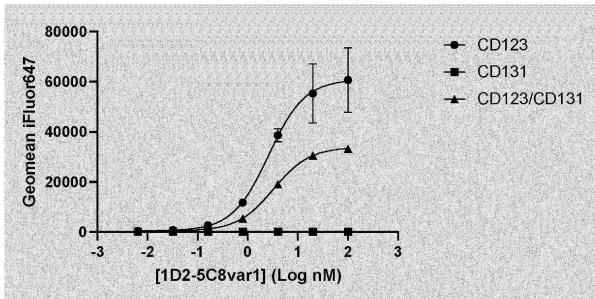


【 図 2 】

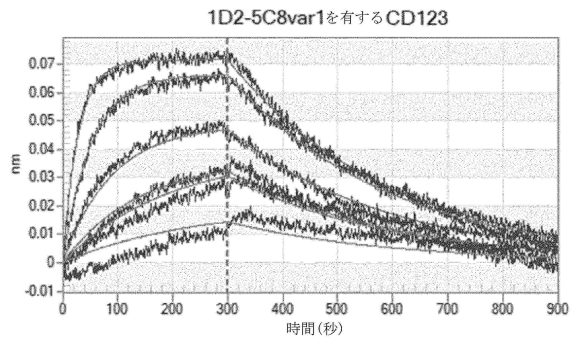


10

【 図 3 】



【 図 4 】



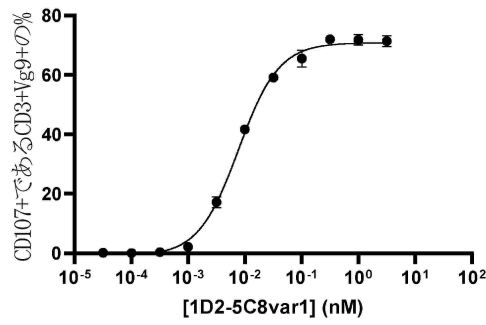
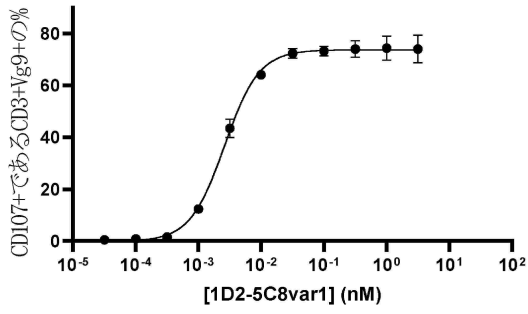
20

30

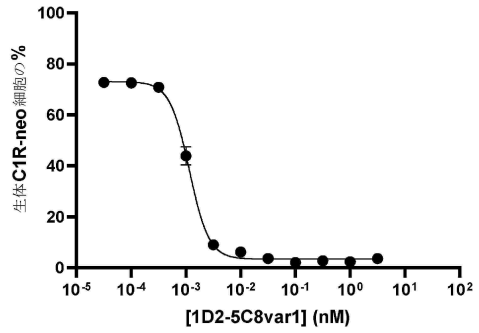
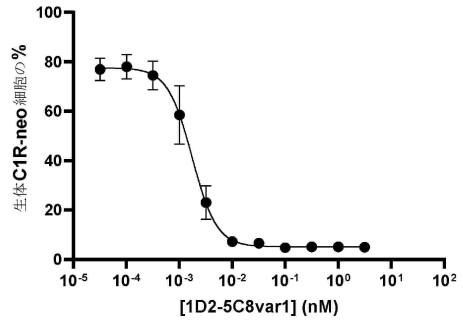
40

50

【 図 5 】



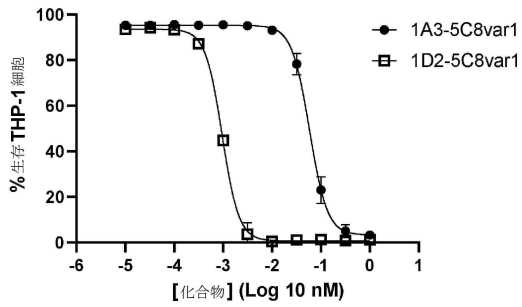
【 図 6 】



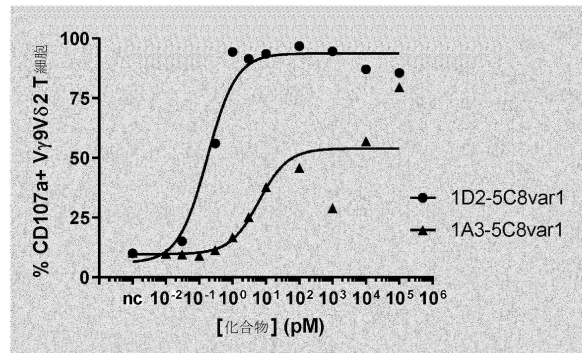
10

20

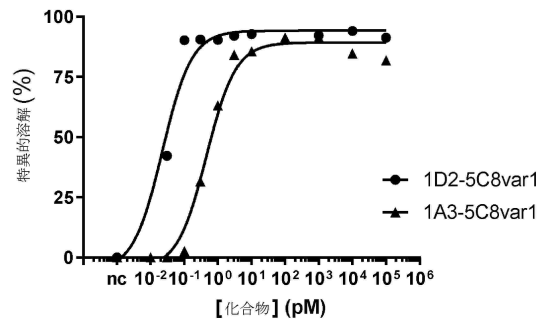
【 図 7 】



【 図 8 】



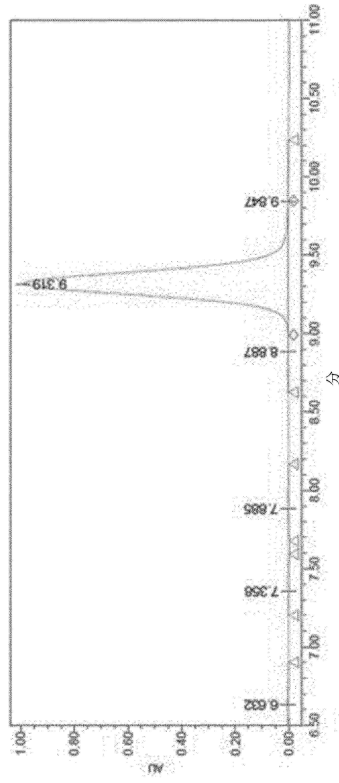
30



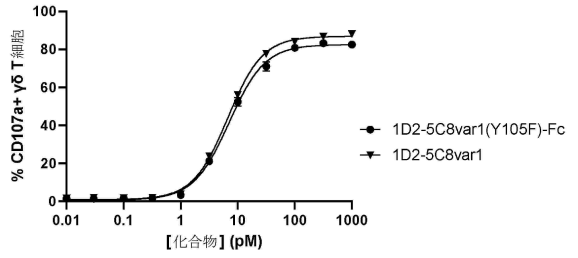
40

50

【 図 9 】



【 図 10 】

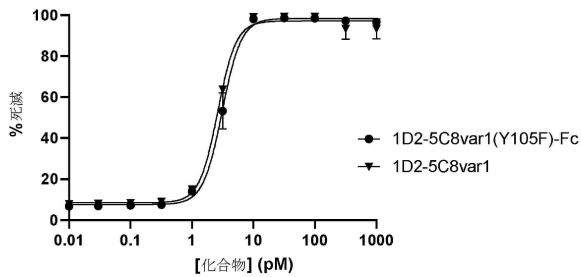


	EC50
1D2-5C8var1(Y105F)-Fc	7.120
1D2-5C8var1	6.728

10

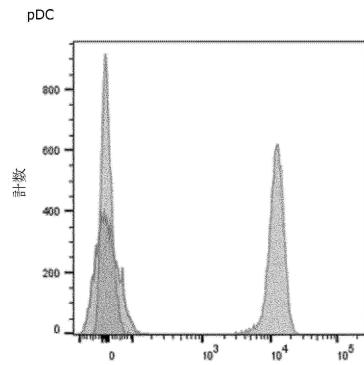
20

【 図 11 】

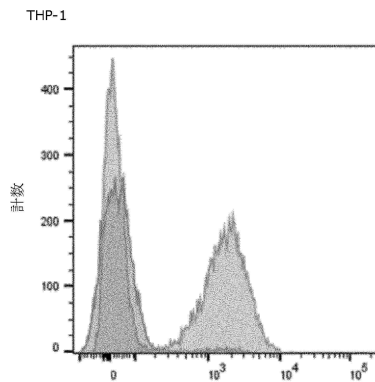


	EC50
1D2-5C8var1(Y105F)-Fc	3.116
1D2-5C8var1	2.636

【 図 12 】



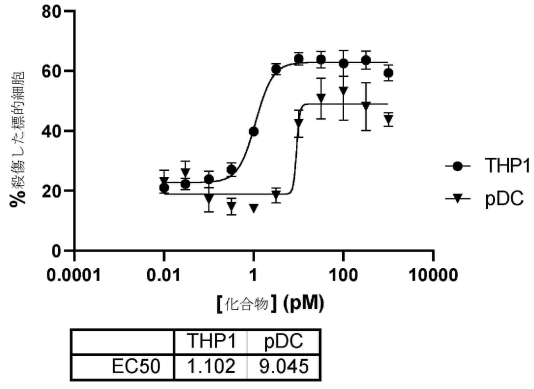
30



40

50

【 図 1 3 】



【 図 1 4 】

10  
20  
30  
40  
50  
60  
70  
80  
90  
100  
110  
120  
130  
140  
150  
160  
170  
180  
190  
200  
210  
220  
230  
240  
250  
260  
270  
280  
290  
300  
310  
320  
330  
340  
350  
360  
370  
378

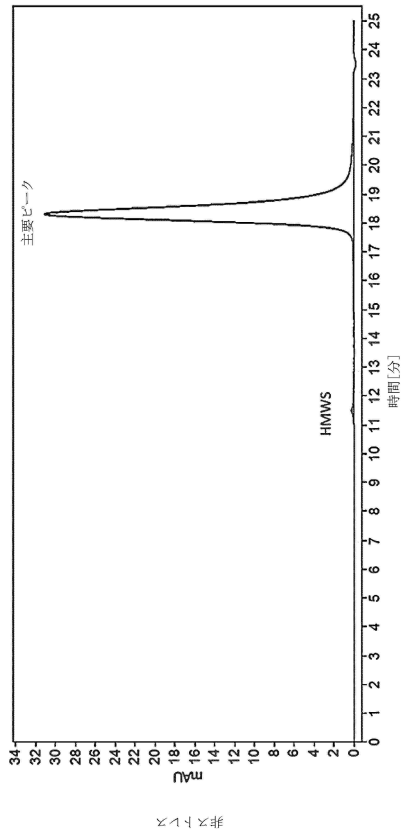
10

20

【 図 1 5 】



【 図 1 6 A - 1 】

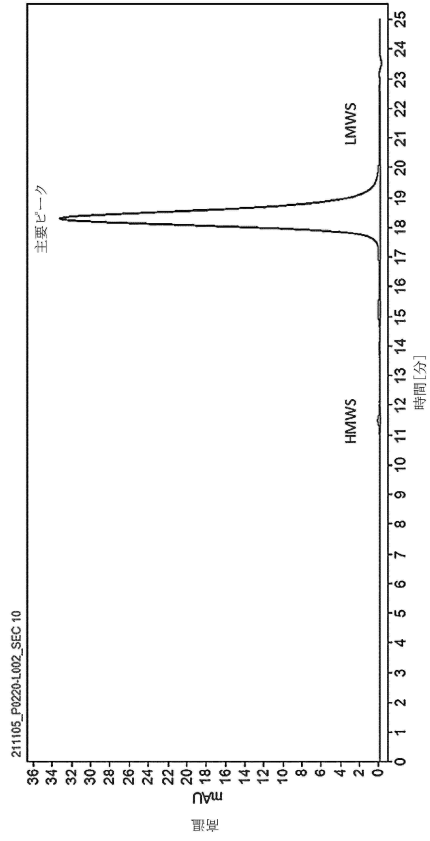


30

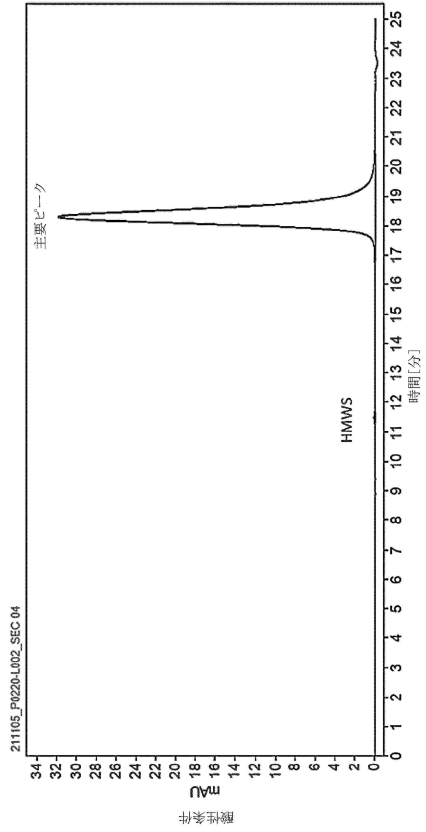
40

50

【 図 1 6 A - 2 】



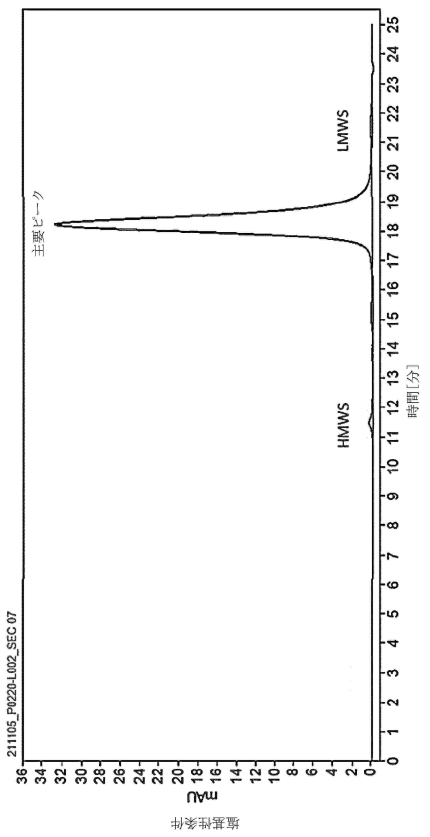
【 図 1 6 A - 3 】



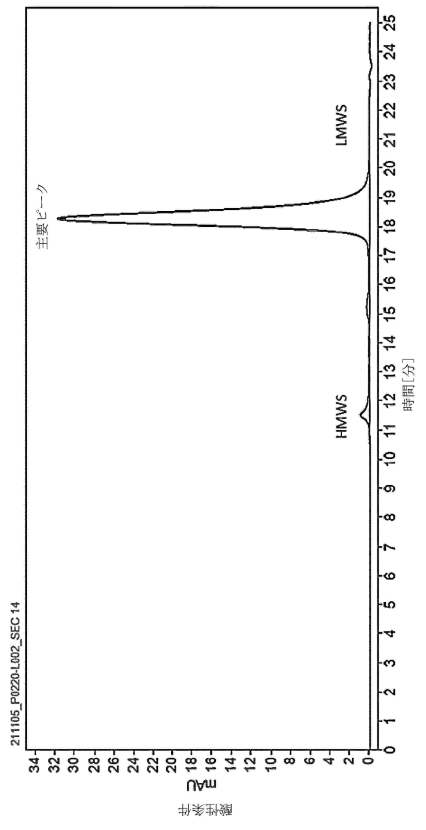
10

20

【 図 1 6 A - 4 】



【 図 1 6 A - 5 】

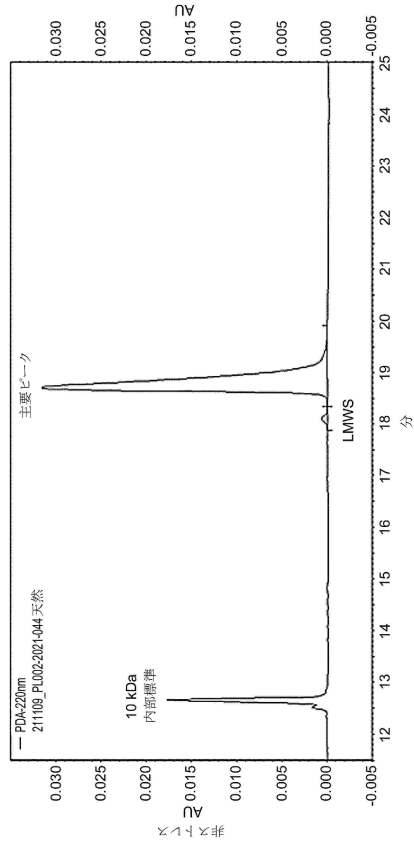


30

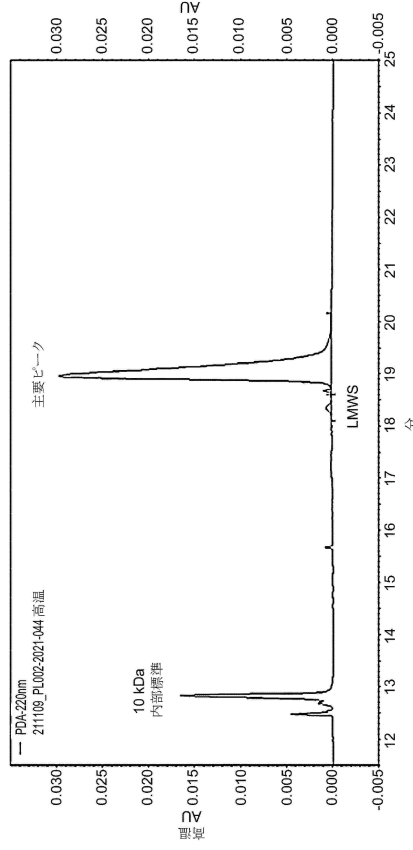
40

50

【 図 1 6 B - 1 】



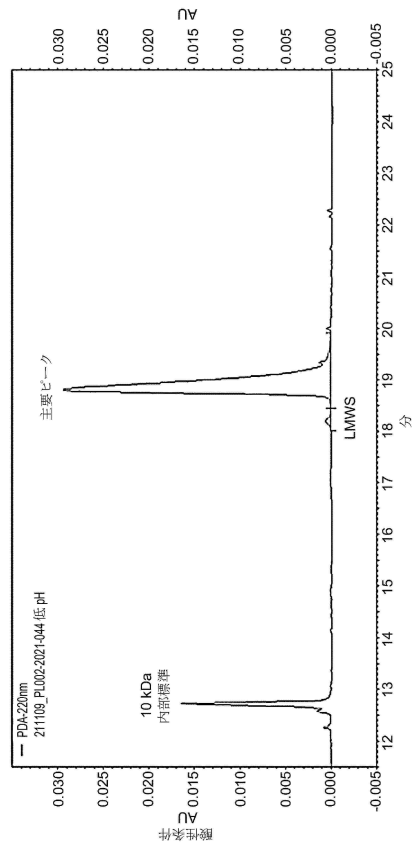
【 図 1 6 B - 2 】



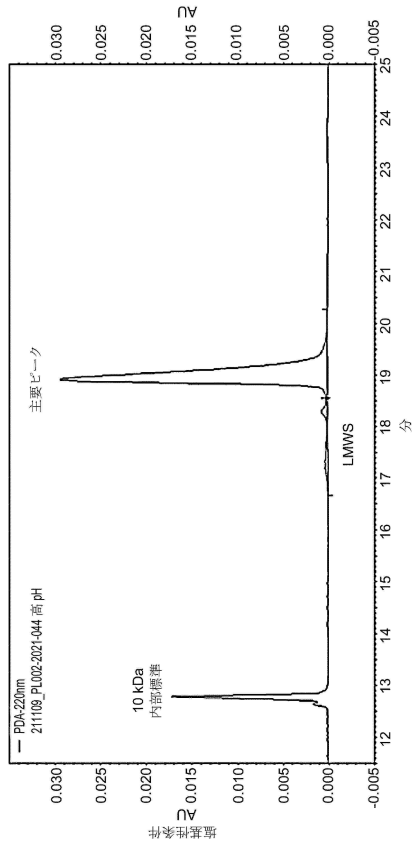
10

20

【 図 1 6 B - 3 】



【 図 1 6 B - 4 】

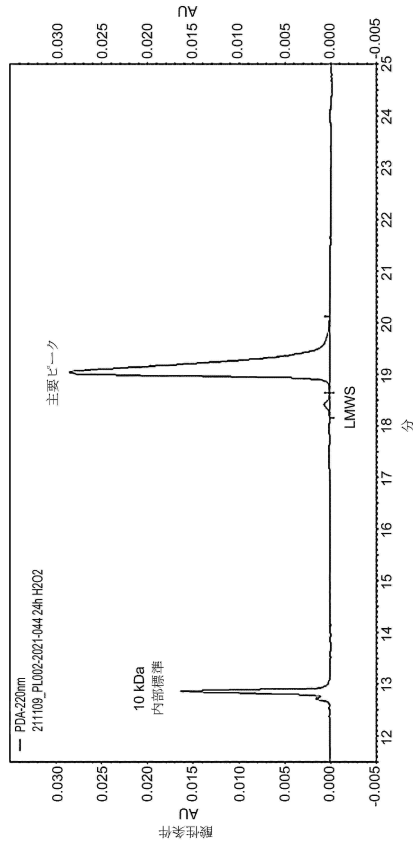


30

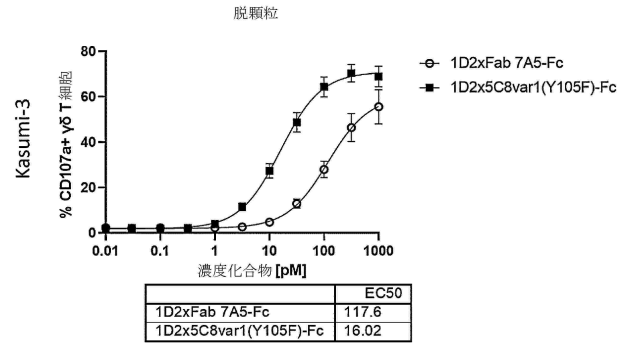
40

50

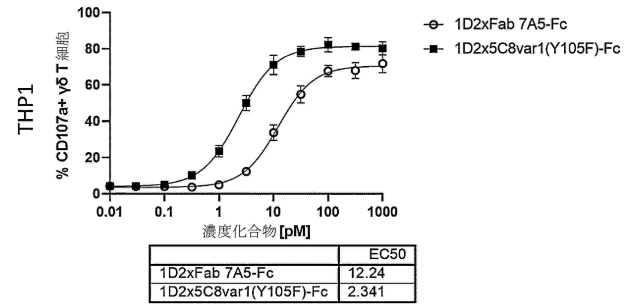
【 図 1 6 B - 5 】



【 図 1 7 A 】

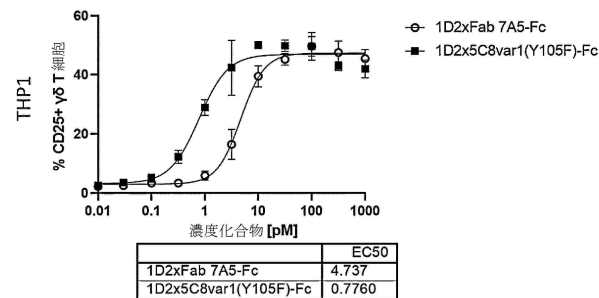
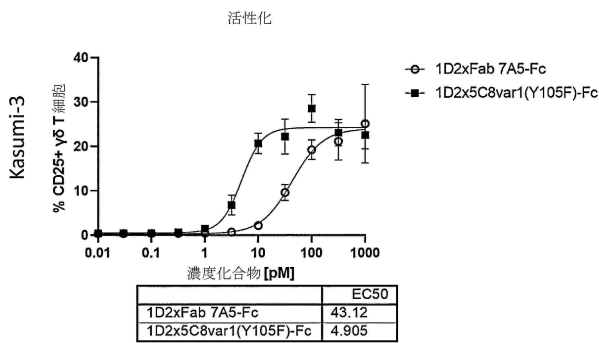


10

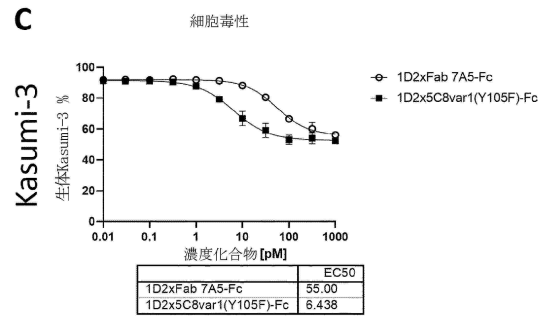


20

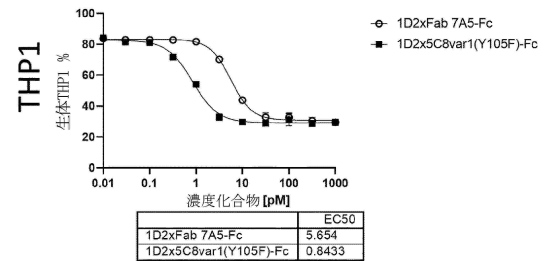
【 図 1 7 B 】



【 図 1 7 C 】



30



40

【 配列表 】

2024507937000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2022/054993

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
INV. C07K16/28 A61P35/00 A61K39/395		
ADD.		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2020/227071 A1 (INHIBRX INC [US]) 12 November 2020 (2020-11-12) paragraph [0004]	1
Y	----- GANESAN RAJKUMAR ET AL: "Selective recruitment of gamma-delta T cells by a bispecific antibody for the treatment of acute myeloid leukemia", LEUKEMIA , 1 February 2021 (2021-02-01), XP055824447, London ISSN: 0887-6924, DOI: 10.1038/s41375-021-01122-7 Retrieved from the Internet: URL: <a href="http://www.nature.com/articles/s41375-021-01122-7">http://www.nature.com/articles/s41375-021-01122-7</a> Page 1, abstract; figure 6 ----- -/--	1-18, 21, 22
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search <b>2 May 2022</b>	Date of mailing of the international search report <b>04/07/2022</b>	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer <b>Sitch, David</b>	

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No  
PCT/EP2022/054993

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>DE WEERDT IRIS ET AL: "A Bispecific Antibody Antagonizes Prosurvival CD40 Signaling and Promotes V[gamma]9V[delta]2 T cell-Mediated Antitumor Responses in Human B-cell Malignancies", CANCER IMMUNOLOGY RESEARCH</p> <p>, vol. 9, no. 1 1 January 2021 (2021-01-01), pages 50-61, XP055825456, US ISSN: 2326-6066, DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-20-0138 Retrieved from the Internet: URL:https://cancerimmunolres.aacrjournals.org/content/canimm/9/1/50.full.pdf Abstract on page 50; page 52 -----</p>	1-18, 21, 22

10

20

30

40

1

50

International application No.

PCT/EP2022/054993

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:

a.  forming part of the international application as filed:

in the form of an Annex C/ST.25 text file.

on paper or in the form of an image file.

b.  furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.

c.  furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:

in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).

on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2.  In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.  
**PCT/EP2022/054993**

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

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

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

10

20

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

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

**see additional sheet**

- 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.:  
**1-18 (completely); 21, 22 (partially)**

30

40

**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.

**FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210**

**This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:**

10

**1. claims: 1-18 (completely); 21, 22 (partially)**

**A multispecific antibody comprising a first antigen-binding region capable of binding human CD123 and a second antigen-binding region capable of binding the V $\alpha$ 2 chain of a human V $\alpha$ 2V $\beta$ 2 T cell receptor; matter related thereto**

---

**2. claims: 19, 20 (completely); 21, 22 (partially)**

**An antibody comprising a first antigen-binding region capable of binding human CD123, and wherein the first antigen-binding region is a single-domain antibody defined as having any of the combination of sequences, or any of the sequences, set out in claim 19; matter related thereto**

20

---

30

40

50

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

Information on patent family members

International application No

**PCT/EP2022/054993**

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
<b>WO 2020227071 A1</b>	<b>12-11-2020</b>	<b>AU 2020269268 A1</b>	<b>11-11-2021</b>
		<b>CA 3139061 A1</b>	<b>12-11-2020</b>
		<b>CN 114040926 A</b>	<b>11-02-2022</b>
		<b>EP 3966242 A1</b>	<b>16-03-2022</b>
		<b>US 2020347142 A1</b>	<b>05-11-2020</b>
		<b>WO 2020227071 A1</b>	<b>12-11-2020</b>
-----			

10

20

30

40

50

## フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
(32)優先日 令和3年11月2日(2021.11.2)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 米国(US)		
(31)優先権主張番号 21211114.0		
(32)優先日 令和3年11月29日(2021.11.29)		
(33)優先権主張国・地域又は機関 欧州特許庁(EP)		
(81)指定国・地域 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV,MC,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,CZ,DE,DJ,DK,DM,DO,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,IT,JO,JP,KE,KG,KH,KN,KP,KR,KW,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US,UZ,VC,VN,WS,ZA,ZM,ZW		

(特許庁注：以下のものは登録商標)

## 1 . T W E E N

ヒト ヤレラーン 6 0

- (72)発明者 ヴァン デル ヴリット, ヨハネス ジェレ  
オランダ国, 3 5 8 4 シーエム ユトレヒト ヤレラーン 6 0
- (72)発明者 ルジェ フルシク, デイヴィッド  
オランダ国, 3 5 8 4 シーエム ユトレヒト ヤレラーン 6 0
- (72)発明者 パーレン, ポール ウィレム アンリ イダ  
オランダ国, 3 5 8 4 シーエム ユトレヒト ヤレラーン 6 0
- (72)発明者 ルーベン, ジャーレン マタイス  
オランダ国, 3 5 8 4 シーエム ユトレヒト ヤレラーン 6 0
- (72)発明者 ムセ, シャーロット メレーテ  
オランダ国, 3 5 8 4 シーエム ユトレヒト ヤレラーン 6 0
- F ターム (参考) 4B065 AA90X AA90Y AB01 AC14 AC20 BA01 CA25 CA44  
4C085 AA16 BB01 BB11 BB36  
4H045 AA11 AA30 BA10 BA40 CA40 DA75 EA20 FA74