

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7037359号

(P7037359)

(45)発行日 令和4年3月16日(2022.3.16)

(24)登録日 令和4年3月8日(2022.3.8)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

Z N A

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

N

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

A 6 1 P 35/02 (2006.01)

A 6 1 P 35/02

A 6 1 P 35/04 (2006.01)

A 6 1 P 35/04

請求項の数 9 (全65頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2017-518540(P2017-518540)

(86)(22)出願日 平成27年10月9日(2015.10.9)

(65)公表番号 特表2018-502051(P2018-502051
A)

(43)公表日 平成30年1月25日(2018.1.25)

(86)国際出願番号 PCT/EP2015/073370

(87)国際公開番号 WO2016/055609

(87)国際公開日 平成28年4月14日(2016.4.14)

審査請求日 平成30年10月5日(2018.10.5)

審判番号 不服2020-9972(P2020-9972/J1)

審判請求日 令和2年7月16日(2020.7.16)

(31)優先権主張番号 62/062,323

(32)優先日 平成26年10月10日(2014.10.10)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

最終頁に続く

(73)特許権者 506000184

イナート・ファルマ・ソシエテ・アノニ
ムINNATE PHARMA PHARM
A S . A .フランス、エフ - 1 3 0 0 9 マルセイユ
、アブニュ・ドゥ・リュミニエー 1 1 7 番

(74)代理人 100145403

弁理士 山尾 憲人

(74)代理人 100122301

弁理士 富田 憲史

(74)代理人 100157956

弁理士 稲井 史生

(74)代理人 100170520

弁理士 笹倉 真奈美

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 7 3 遮断

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

細胞表面でヒト C D 7 3 に特異的に結合し、その 5 ' - エクトヌクレオチダーゼ活性を中和可能である単離抗体であって、該抗体が、

(a) (i) 配列番号 3 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 4 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖と、を含むモノクローナル抗体；

(b) (i) 配列番号 2 1 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 2 2 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖と、を含むモノクローナル抗体；

(c) (i) 配列番号 2 8 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 2 9 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖と、を含むモノクローナル抗体；および

(d) (i) 配列番号 3 6 の重鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む重鎖と、(i i) 配列番号 3 7 の軽鎖可変領域の C D R 1、2 および 3 を含む軽鎖と、を含むモノクローナル抗体

からなる群から選択される、単離抗体。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の抗体と、薬学的に許容可能な担体と、を含む医薬組成物。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の抗体の重鎖および軽鎖をコードする、核酸。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の抗体を産生する、組み換え宿主細胞。

【請求項 5】

癌の処置における使用のための、請求項 1 に記載の単離抗体を含む医薬組成物または請求項 2 に記載の医薬組成物。

【請求項 6】

請求項 1 に記載の抗体または請求項 5 に記載の医薬組成物であって、前記抗体が I g G 1 であり、残基 2 3 4、2 3 5 および 3 3 1 で、または 2 3 4、2 3 5 および 3 2 2 で (E U 付番)、1、2 または 3 個の置換を含む、抗体または医薬組成物。

10

【請求項 7】

癌の処置または予防を必要とする個体における癌の処置または予防のための診断を補助する方法であって、

a) 個体から得た癌組織および / または癌に対して近位のまたは癌の周辺の組織を含む生体試料を C D 7 3 ポリペプチドに結合する抗体と接触させ、C D 7 3 を発現する細胞を検出すること、および

b) 腫瘍環境が、任意選択により参照レベルと比較して上昇しているレベルで、C D 7 3 ポリペプチドを発現する細胞を含むと判定されると、前記個体が請求項 1 に記載の抗体または請求項 2、5 ~ 6 の何れか 1 項に記載の組成物を投与すべきと判定されること、を含む、方法。

20

【請求項 8】

前記腫瘍または癌が固形腫瘍である、請求項 5 または 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 9】

前記腫瘍または癌が、白血病、膀胱癌、神経膠腫、神経膠芽腫、卵巣癌、メラノーマ、前立腺癌、甲状腺癌、食道癌または乳癌である、請求項 5 または 6 に記載の医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願に対する相互参照

本願は、あらゆる図面を含め、その全体において参照により本明細書中に全て組み込まれる、2014年10月10日提出の米国仮特許出願第62/062,323号明細書；2015年2月20日提出の同第62/118,549号明細書；2015年3月16日提出の同第62/133,597号明細書；および2015年7月6日提出の同第62/188,881号明細書の優先権を主張する。

30

【0002】

配列表に対する参照

本願は、電子方式の配列リストとともに提出されている。本配列リストは、2015年10月8日作成の「C D 7 3 - 1 _ S T 2 5」という題名のファイルとして提供されており、サイズは24KBである。本配列リストの電子方式の情報はその全体において参照により本明細書中に組み込まれる。

40

【0003】

本発明は、C D 7 3 を阻害する抗原結合化合物 (例えば抗体) に関する。本発明はまた、このような化合物を産生する細胞；このような化合物および抗体、断片、変異体およびその誘導体を作製する方法；これらを含む医薬組成物；疾患、例えば癌を診断、処置または予防するための化合物を使用する方法にも関する。

【背景技術】

【0004】

C D 7 3 (エクト - 5 ' - ヌクレオチダーゼ) は、通常は内皮細胞および造血性細胞のサブセットにおいて発現される、70kDaグリコシルホスファチジルイノシトール (G P I) - アンカードタンパク質である。C D 3 9 とともに、C D 7 3 は、アデノシン三リン酸

50

(ATP)代謝を制御する。CD39 (NTPDase-1)はATPをAMPに変換し、微量のADPのみが放出され、一方でCD73はアデノシンへのAMPの変換を触媒する。

【0005】

アデノシン三リン酸(ATP)およびその代謝物AMPおよびアデノシンは、細胞代謝、シグナル伝達および免疫ホメオスタシスにおいて重要な役割を有する。細胞死または細胞ストレスに反応した細胞外アデノシン三リン酸(ATP)の放出は、免疫反応を活性化するために作用する。しかし、その代謝産物アデノシンは免疫抑制活性を有する。細胞外アデノシンは癌性組織に蓄積し、腫瘍免疫逸脱の重要な機序を構成する。効果の中でもとりわけ、腫瘍由来アデノシンは、アデニリルシクラーゼ活性化A2A受容体を通じて浸潤性のエフェクターT細胞を大きく阻害する。

10

【0006】

CD73発現は、白血病、膀胱癌、神経膠腫、神経膠芽腫、卵巣癌、メラノーマ、前立腺癌、甲状腺癌、食道癌および乳癌を含む一連の腫瘍細胞で報告されている。CD73発現は、メラノーマおよび乳癌における前転移性表現型とも関連付けられている。マウスにおいて、マウスCD73に結合する抗体での治療によって、乳腺腫瘍の成長および転移が阻害され得ることが示されている((非特許文献1))。しかし、抗体は一般に、ヒトおよびマウスCD73と交差反応せず、CD73の抗体および生物学的機能の研究を複雑化している。A2A受容体の遺伝子欠失がT細胞依存性の腫瘍拒絶を誘導し得ることが示されている((非特許文献2))。siRNAまたは腫瘍細胞上でのCD73過剰発現を用いたノックダウンは、腫瘍成長および転移を変化させ得る((非特許文献3))；(非特許文献1)前出；(非特許文献4))。CD73-/-マウスでは、移植および自然発症腫瘍が妨げられる((非特許文献5))。ヒトにおいて、高CD73発現は、トリプルネガティブ乳癌に対するネガティブな予後兆候であることが示されている((非特許文献6))。

20

【0007】

治療標的としてのCD73への長年にわたる関心にもかかわらず、インビボでCD73を標的とするための薬剤の求められる活性は、完全には解明されていない。腫瘍細胞上でCD73が発現される一方で、これは、免疫系の様々な細胞、とりわけCD4およびCD8 T細胞ならびにB細胞上でも発現される。いくつかの抗体が、ヒトCD73に結合し、T細胞の活性または増殖を向上させるかまたは腫瘍細胞の遊走を変化させることが報告されている一方で、このようなT細胞調整および同時刺激シグナルのCD73介在性伝達はCD73のエクト-5'ヌクレオチダーゼ活性に依存することなく可能であることが報告されているので、このような抗体がどのように機能するかについては明確になっていない((非特許文献7))。結果的に、総称的にCD73阻害剤と呼ばれる抗体は、CD73のエクト-5'ヌクレオチダーゼ活性を調整することにより作用し得ない。ある1つの抗体、7G2 (mIgG2アイソタイプ、Life Technologies)は、CD73を阻害することが報告されているが、この抗体は、フローサイトメトリーで細胞表面CD73に結合しないか、または結合するとしても親和性が非常に低い。CD73に結合する別の抗体であるクローンAD2 (マウスIgG1アイソタイプ)は、受容体クラスター形成および内部移行を引き起こすが、酵素活性には僅かな効果しかないことが報告されている。また別の薬剤である1E9 (マウスIgG3アイソタイプ、Santa Cruz Biotechnology, Inc.)は、独立に酵素性阻害のT細胞シグナル伝達を促進することが報告されている。さらなるmAb、4G4 (IgG1アイソタイプ、Novus Biologicals)は、T細胞表面からのCD73脱落を誘導することが報告されている。さらなる特徴は分かっていないが、1つの薬剤のみ、組み換えCD73を用いたアッセイにおいて部分的な酵素遮断能があることが報告されており((非特許文献8))、後に細胞内の内部移行を誘導する抗体として記載された((非特許文献9))。さらに、あるさらなる複雑化因子は、文献に記載の抗体が一般に、Fc受容体が結合可能であるマウスアイソタイプのものであることであり、それにより、Fc介在性効果から何らかの潜在的な遮断効果を分離することが困難となる。Fc受容体が結合する抗CD7

30

40

50

3 抗体は、例えば C D 7 3 発現腫瘍細胞（およびおそらく C D 7 3 発現免疫抑制細胞）の（例えば A D C C による）枯渇に介在し得、および/または、何らかの真の遮断効果ではなく、炎症促進性サイトカインの産生を誘発し得る。結果的に、抗体の作用形式は未だに理解が困難である。

【 0 0 0 8 】

したがって、C D 7 3 を標的化することへの関心にもかかわらず、最も効果的な抗 C D 7 3 抗体の特徴は分かっていない。C D 7 3 活性部位に結合することが報告されている抗体はない。免疫細胞および腫瘍細胞を含む様々な細胞型での C D 7 3 発現によって、実際に C D 7 3 を遮断しないかまたは純粋な遮断因子ではないかの何れかの抗体の使用と相まって、抗体の基本的な活性の評価のための設定が複雑になる。新規アッセイおよび抗体が必要である。

10

【先行技術文献】

【非特許文献】

【 0 0 0 9 】

【文献】Staggら(2010)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104:1547-1552

Ohtaら(2006)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:13132-13137

Beavisら(2013)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:14711-716

20

Jinら(2010)Cancer Res. 70:2245-55

Staggら(2010)Cancer Res. 71:2892-2900

Loiら(2013)Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:11091-11096

Gutensohnら(1995)Cell Immunol. 161:213-217

Sachsenmeierら(2012)J. Biomed. Screening 17:993-998

Rustら(2013)Mol. Cancer 12:11

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

30

【 0 0 1 0 】

発明者らは、腫瘍細胞を含む細胞表面で発現される C D 7 3 上に存在するエピトープに結合し、C D 7 3 酵素の酵素的（エクト-5'ヌクレオチダーゼ）活性を阻害する抗体を発見した。本抗体は、細胞表面で発現される膜結合 C D 7 3 タンパク質の酵素活性を阻害し得る。有利に、これらの抗体は純粋な C D 7 3 遮断抗体として使用し得、例えばこれらは、F c 受容体への実質的な結合なく、および/または実質的に C D 7 3 発現細胞に対して A D C C を向けることなく、細胞表面で発現される膜結合 C D 7 3 タンパク質の酵素活性を阻害する。任意選択により、本抗体は、F c ドメインを保持し、ヒト F c R n への結合を保持する。

【 0 0 1 1 】

40

任意選択により、（例えば受容体飽和を与えるものと同等かまたはこれよりも実質的に低い濃度で完全な有効性を提供し得る）C D 7 3 発現腫瘍細胞を枯渇させることが可能なくつつかの抗体と対照的に、本抗体は、有利に、純粋な遮断因子として使用し得、例えば抗 C D 7 3 抗体の次の連続的投与まで1週間、2週間、1カ月、所望の期間にわたり C D 7 3 の酵素活性を中和するのに有効な量で投与され得る。

【 0 0 1 2 】

任意選択により、本抗体は、純粋な遮断因子であり、腫瘍環境における C D 7 3 の酵素活性を中和することを目的とする。任意選択により、本抗体は、例えば（例えば腫瘍環境において MMP などのプロテアーゼに対して）プロテアーゼ感受性を低下させるために、および/またはヒト F c 受容体（例えば C D 1 6 ）への結合を減少させるための修飾 F c

50

ドメインを含む。

【0013】

ある態様における開示は、真のCD73機能遮断抗体を同定するために使用し得るアッセイを提供する。本明細書中で示されるように、先行する可溶性酵素遮断アッセイにおいて、二価抗体として遮断することが分かった抗体の大部分は偽陽性であり、一方で一価結合抗体は、おそらく活性部位を遮断できないかまたはCD73二量体内の各CD73ポリペプチドに結合しない場合はアロステリック阻害剤として作用できないので、遮断活性はないかまたは僅かであり得る。先行細胞アッセイは作用機序を区別することができず、CD73活性を低下させることが報告される抗体は、複数の作用機序、例えば受容体内部移行、受容体脱落および/またはFc 受容体介在性効果の誘導を組み合わせ得る。残留CD73酵素活性の結果、免疫抑制効果を媒介するのに十分なアデノシン生成が起こり得るので、高レベルの抗体介在性酵素遮断は、治療効果を媒介するために有利である。

10

【0014】

ある態様における開示は、腫瘍細胞を含むが限定されない細胞表面で発現されるヒトCD73ポリペプチド上に存在するエピトープに結合し、CD73酵素の酵素的（エクト-5'ヌクレオチダーゼ）活性を阻害する抗体を提供する。

【0015】

ある態様における開示は、可溶性組み換えCD73タンパク質の酵素活性を阻害し得る抗体を提供する。

【0016】

本開示の抗体は、細胞内内部移行、またはより一般的には細胞表面で発現されるCD73の下方調整を引き起こさず、および/またはそれらのCD73阻害活性についてそれに依存しない。本開示の抗体は、CD73内部移行を引き起こすことによりCD73を阻害する抗体よりも大きい阻害能（CD73酵素活性を実質的に中和する能力）を提供し得る。他の機序（例えばCD73-抗体オリゴマー形成を引き起こすこと）により可溶性CD73を阻害する抗体とは対照的に、本開示の抗体は、より高い（例えば10倍）過剰な抗体：酵素を含む全ての濃度でCD73の酵素活性を阻害することが可能である。さらに、修飾され得るかまたは細胞表面CD73に存在しない（例えば抗体7G2）かまたは親和性が低すぎてCD73発現細胞における有効性につながらない組み換えCD73上のエピトープに結合する抗体とは異なり、本抗体は、細胞表面CD73上に存在し、および/またはインタクトなままであるエピトープに高親和性で結合し、細胞性CD73の酵素活性を強く中和する能力がある抗体を提供する。本抗体は、細胞においてCD73酵素活性を阻害するが、任意選択により可溶性組み換えCD73のエクト-5'ヌクレオチダーゼ活性も阻害し得る（可溶性二量体CD73ポリペプチドを使用して細胞不含アッセイで観察する場合）。

20

30

【0017】

さらに、細胞により発現されるCD73のアロステリック阻害剤として作用可能であると考えられる代表的な抗体（例えば、抗体11E1、6E1、3C12および8C7を参照）が本明細書中で開示され、例えばこれらは、CD73ポリペプチドの酵素活性部位へ結合せずに、ヒトCD73ポリペプチドの活性を阻害し、および/またはこれらはCD73の非競合型の阻害剤であり、例えばこれらはCD73ポリペプチドとその天然基質との間の結合を検出可能に減少させることなく、ヒトCD73ポリペプチドの活性を阻害する。代表的な抗体は、残基A99、E129、K133、E134およびA135での置換を有するCD73突然変異体への結合を失う。CD73活性部位阻害剤APCPの存在下および非存在下の両方でのCD73への代表的な抗体の結合を考慮すると、CD73上でのそれらのエピトープは、基質に結合しない場合の「開いた」立体構造だけでなく、基質（例えばAMPなどの天然基質またはAMP類似アデノシン5'-(, -メチレン)ニリン酸（APCP）などの活性部位に結合する、阻害剤または他の化合物）に結合した場合の「閉じた」立体構造でもCD73上に存在すると思われる。

40

【0018】

50

したがって、ある態様において、本開示は、CD73ポリペプチドのアロステリック阻害剤を提供する。ある態様において、アロステリック阻害剤は抗体である。ある態様において、腫瘍細胞を含むが限定されない、細胞表面で発現されるヒトCD73ポリペプチドに結合し、酵素（エクト-5'ヌクレオチダーゼ）活性CD73ポリペプチドを阻害し、CD73ポリペプチドのアロステリック阻害剤である抗体を提供する。

【0019】

さらに、代表的な抗体は、本明細書中に記載されており、これらは、CD73がCD73二量体として存在する場合、同じ面上に存在するCD73上のエピトープに結合し、これにより、例えば抗体が1つのCD73二量体に、とりわけ結合部位が空間的にさらに離れる「閉じた」位置で二価的に結合可能になる可能性がある。リガンド結合CD73への結合を考慮して、本明細書中に記載の抗体は、例えば処置前に)上流ADPおよび/またはAMPが顕著なレベルで存在する腫瘍環境において、AMPに結合する場合、CD73への結合に有用であり得る。腫瘍微小環境は、高レベルのAMPを得るために間質および細胞浸潤（例えばTreg細胞）においてCD39により取り込まれる何らかの適切なパラメーター、例えば（例えば死細胞により生成される）高レベルのADP、ならびにより一般的にはAMP、アデノシン、CD39発現またはCD39発現細胞の存在もしくはレベル、CD73発現またはCD73発現細胞の存在もしくはレベル、アデノシン受容体発現またはアデノシン受容体発現細胞の存在もしくはレベルを特徴とし得る。したがって、腫瘍環境におけるCD73分子は、基質結合型の立体構造であり得、非基質結合型CD73に加えて、基質結合型細胞性CD73（例えばAMPなどの基質と一緒に予め温置されたCD73を発現する細胞）に結合し、阻害する能力によって、インビボでのより大きなCD73阻害能がもたらされ得る。任意選択により、ADPまたはAMP（および/またはATPまたはアデノシン）のレベルを処置前に腫瘍環境において評価し得る。本抗体は、腫瘍試料中のADP、AMP、ATPまたはアデノシンが顕著なレベル（例えば参照と比較して高いレベル）である個体での処置に対して特別な利点を有し得る。

【0020】

したがって、ある態様において、本開示は、細胞表面で発現されるヒトCD73ポリペプチドに結合し、CD73ポリペプチドの酵素（エクト-5'ヌクレオチダーゼ）活性を阻害する抗体を提供し、この抗体は、1つのCD73ポリペプチド二量体（可溶性CD73ポリペプチド二量体または細胞により発現されるCD73ポリペプチド二量体）に二価的に結合可能である。任意選択により、本抗体は、二量体内の第一のCD73ポリペプチドに第一の抗原結合ドメインで結合し、第二のCD73ポリペプチドに第二の抗原結合ドメインで結合する。ある態様において、本抗体はCD73ポリペプチドのアロステリック阻害剤である。

【0021】

したがって、別の態様において、本開示は、細胞表面で発現されるヒトCD73ポリペプチドに結合し、CD73ポリペプチドの酵素（エクト-5'ヌクレオチダーゼ）活性を阻害する抗体を提供し、この抗体は、基質結合型立体構造でCD73ポリペプチドに結合可能である。

【0022】

CD73阻害抗体についてスクリーニングするという文献中での取り組みにもかかわらず、既存の抗体は、細胞性CD73を中和せず、または良くてCD73下方調整を引き起こすのみである。発明者らは、本明細書中でこれらの抗体がなぜ細胞においてCD73を阻害しないかについての説明を提供する：二価方式でCD73ホモ二量体に結合可能であり、溶液中の組み換えCD73を阻害する抗体は、CD73ポリペプチドおよび抗CD73抗体の複合体へのオリゴマー形成（例えば2つ以上の抗体および2つ以上のCD73二量体を含有する構造）を引き起こしている可能性があり、偽陽性から真の阻害剤を区別することが困難になる。

【0023】

過剰に高い抗体：酵素で行われる改良アッセイ法の設計を通じて、発明者らは、本明細書

10

20

30

40

50

中で、オリゴマー化に依存しないCD73への二価結合を有する抗体を提供する。特に、本明細書中で提供される抗CD73抗体は、この抗体が、オリゴマーを形成できない設定／立体構造にある場合、例えばそれらがCD73ポリペプチド二量体に対して実質的なモル過剰（例えば少なくとも10倍、20倍、100倍など）で提供される場合、可溶性ヒト二量体CD73ポリペプチドの酵素活性を阻害可能である。オリゴマー化を引き起こすことにより機能する抗体は、CD73ポリペプチド二量体に対して実質的なモル過剰で抗体が提供される場合、CD73を阻害できない。本抗体は、さらに、CD73が細胞表面で発現される場合、維持されているCD73上のエピトープに結合する。このアッセイの使用を通じて、抗体が二価的に1つのCD73二量体に結合することも確認され得；このような抗体は、CD73発現細胞におけるインビトロおよびインビボでのCD73結合の向上およびCD73遮断活性を有し得る。次に、精製抗体を使用した細胞酵素活性アッセイにおいてこれらの方法により同定された抗体を試験し、細胞性CD73の酵素活性を中和することが分かった。内部移行を誘導することによりCD73を阻害するかまたは細胞性CD73に対する顕著な結合を喪失する抗体はあまり強力ではなく、酵素活性を中和できず、良くて細胞においてCD73の酵素活性を部分的に阻害するだけであった。

10

【0024】

これらの抗体が結合するCD73上のエピトープは、一連の細胞、例えば癌細胞、CD4 T細胞、CD8 T細胞、B細胞、遺伝子移入細胞により発現される場合、CD73ポリペプチド上に存在し、フローサイトメトリーにより決定される場合、高親和性で結合する。例えば、抗体は、それらの表面でCD73ポリペプチドを発現する細胞への結合について、5 µg/mLを超えない、任意選択により2 µg/mLを超えない、1 µg/mLを超えない、0.5 µg/mLを超えない、0.1 µg/mLを超えない、または0.05 µg/mLを超えない、フローサイトメトリーにより決定される場合のEC50を特徴とし得る。ある実施形態において、細胞は、それらの表面でCD73を発現させるために作製される細胞である。ある実施形態において、細胞は、それらの表面でCD73を内因性に発現する細胞、例えば癌細胞、白血病細胞、膀胱癌細胞、神経膠腫細胞、神経膠芽腫細胞、卵巣癌細胞、メラノーマ細胞、前立腺癌細胞、甲状腺癌細胞、食道癌細胞または乳癌細胞である。

20

【0025】

ある実施形態において、CD73中和抗体は、CD73の細胞の5'-エクトヌクレオチダーゼ活性の少なくとも60%、75%または80%の低下を引き起こすことが可能であることを特徴とし得る。ある実施形態において、CD73中和抗体は、1 µg/mLを超えない、任意選択により0.5 µg/mLを超えない、任意選択により0.2 µg/mLを超えない、細胞により発現されるCD73の5'-エクトヌクレオチダーゼ活性の阻害に対するEC50を特徴とし得る。

30

【0026】

任意選択により、細胞により発現されるCD73の5'-エクトヌクレオチダーゼ活性の阻害は、AMPからアデノシンへの加水分解を定量することによるMDA-MB-231細胞における5'エクトヌクレオチダーゼ活性の中和を評価することによって判定される（例えば実施例5を参照）。

40

【0027】

二価方式でCD73に結合する全長抗体が使用される場合を含め、本明細書中で開示される中和抗体が結合するCD73上のエピトープにより、細胞上でのCD73発現の下方調整は起こらない（および、例えば、抗体-CD73複合体のクラスター形成および内部移行が起こらない）。したがって、抗CD73抗体は、細胞表面でCD73と一緒に結合したままである。CD73の広い組織発現を考慮すると、CD73下方調整および／または内部移行を惹起しない抗体によって、薬理学的特性が改善され、腫瘍微小環境でより多量の抗体が提供され得る。

【0028】

ある実施形態において、ヒトCD73（例えば配列番号1または2のアミノ酸配列を含む

50

ポリペプチド)に特異的に結合し、溶液中でホモ二量体ヒトCD73ポリペプチドの5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を中和する単離抗体が提供される。ある実施形態において、可溶性ヒトCD73ポリペプチドに結合し、この酵素活性を阻害する抗体、とりわけAMPからアデノシンへのCD73介在性異化反応を中和する抗体が提供される。ある実施形態において、本抗体は、CD73に二価方式で結合する。ある実施形態において、本抗体は、非枯渇抗体、例えばFcサイレント抗体である。ある実施形態において、本抗体は、CD73ポリペプチド：抗CD73抗体オリゴマーの誘導に依存せずに、溶液中でCD73を中和する。

【0029】

ある実施形態において、細胞表面でヒトCD73に特異的に結合し、可溶性ヒトCD73ポリペプチドの5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を中和可能である単離抗体が提供される。ある実施形態において、本抗体は、可溶性CD73のオリゴマー化を誘導しない。

【0030】

ある実施形態において、細胞表面でヒトCD73に特異的に結合し、細胞性CD73(細胞により発現されるCD73)の5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を中和可能である単離抗体が提供される。ある実施形態において、特異的に結合し、細胞表面でヒトCD73の5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を中和し、CD73への結合時にCD73発現細胞に内部移行されない単離抗体が提供される。本抗体は、CD73のマルチマー化および続いて起こる内部移行を引き起こさない。ある実施形態において、溶液中で組み換えヒトCD73ポリペプチドに結合し、その酵素活性を阻害可能である抗体が提供され、この抗体は、CD73発現細胞中に内部移行されない。ある実施形態において、非内部移行抗体は、CD73に二価方式で結合する。ある実施形態において、この抗体は非枯渇抗体、例えばFcサイレント抗体である。この抗体は、さらにCD73ポリペプチド：抗CD73抗体オリゴマーの誘導に依存することなく、溶液中で二量体のヒトCD73ポリペプチドの5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を中和可能である。

【0031】

ある実施形態において、ヒトCD73ポリペプチドに二価的に特異的に結合し、細胞ヒトCD73(および任意選択によりさらに組み換え可溶性ヒトCD73)の酵素活性を阻害する抗体が提供され、この抗体はCD73発現細胞に内部移行されない。好ましくは、この抗体は実質的に(例えばそのFcドメインを介した)Fc受容体結合を欠く。

【0032】

ある態様において、AMPと予め温置した細胞の表面でヒトCD73に特異的に結合し、その5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を中和可能である単離抗体が提供される。任意選択により、5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を中和することは、AMPからアデノシンへの加水分解を定量することによりMDA-MB-231細胞における5'エクトヌクレオチダーゼ活性の中和を評価することによって、判定される(例えば実施例5を参照)。

【0033】

本明細書中での実施形態の何れかにおいて、本抗体は、活性部位が基質、例えばAMP、APCPにより占有されているヒトCD73ポリペプチドに結合可能であることを特徴とし得る。本明細書中での実施形態の何れかにおいて、本抗体は、CD73を発現する細胞をAMPと予め温置した場合、このCD73を発現する細胞の5'-エクトヌクレチダーゼ(5'-ectonucleotidase)活性を阻害可能であることを特徴とし得る。本発明はまた、とりわけ、細胞および癌に罹患している個体においてCD73活性を中和することに対して非常に有効な標的化を可能とするヒトCD73上のエピトープの探索からの結果でもある。本抗体は、CD73への結合について互いに対して競合し(しかし、参照可溶性CD73遮断抗体とは競合しなかった)、このことから、特にCD73の酵素活性の阻害に適切であり、細胞表面で発現されたときにCD73ポリペプチド上に存在し続けるCD73上の領域が示唆される。有利に、このエピトープは、細胞表面で発現される場合、各ヒトおよび非ヒト霊長類CD73上に、同様に癌細胞により発現される場合もCD73上に存在する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 4 】

ある態様において、可溶性 C D 7 3 および細胞表面上で発現される C D 7 3 の両方に存在する共通する抗原性決定基に結合する抗 C D 7 3 抗体が提供される。

【 0 0 3 5 】

ある態様において、「開かれた」立体構造（C D 7 3 活性部位が基質、例えば A M P、A P C P により占有されていない / これに結合されていない場合）、および「閉じた」立体構造のときに「閉じた」C D 7 3（C D 7 3 活性部位が、例えば A M P、A P C P により占有される / これに結合される場合）である場合に C D 7 3 上に存在する共通する抗原性決定基に結合する抗 C D 7 3 抗体が提供される。

【 0 0 3 6 】

ある態様において、C D 7 3 二量体内の各 C D 7 3 ポリペプチド鎖内の抗原性決定基に結合する抗 C D 7 3 抗体が提供され、例えば、この抗原性決定基は C D 7 3 二量体の共通する面上に存在する。

【 0 0 3 7 】

ある態様において、A 9 9、E 1 2 9、K 1 3 3、E 1 3 4 および A 1 3 5（配列番号 1 に対する）からなる群から選択される残基のうち 1、2、3、4 または 5 個を含む C D 7 3 上でエピトープに結合する抗 C D 7 3 抗体が提供される。

【 0 0 3 8 】

ある態様において、A 9 9、E 1 2 9、K 1 3 3、E 1 3 4 および A 1 3 5（配列番号 1 に対する）からなる群から選択される残基で突然変異を有する C D 7 3 ポリペプチドへの結合が減少した抗 C D 7 3 抗体が提供され；任意選択により、この突然変異体 C D 7 3 ポリペプチドは、突然変異：A 9 9 S、E 1 2 9 A、K 1 3 3 A、E 1 3 4 N および A 1 3 5 S を有する。

【 0 0 3 9 】

ある態様において、1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 および / または 6 E 1 により結合される C D 7 3 上のエピトープへの結合について競合する（例えば、1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 の何れかの重および軽鎖 C D R または可変領域を有する抗体と、C D 7 3 ポリペプチド上のエピトープへの結合について競合する）抗 C D 7 3 抗体が提供される。

【 0 0 4 0 】

本明細書中の実施形態の何れかのある態様において、同じエピトープに結合し、および / または C D 7 3 ポリペプチドへの結合についてモノクローナル抗体 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 および / または 6 E 1 と競合する（例えば 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 の何れかの重および軽鎖 C D R または可変領域を有する抗体と、C D 7 3 ポリペプチドへの結合について競合する）抗原結合化合物が提供される。ある実施形態において、これは、同じエピトープに結合し、および / または C D 7 3 ポリペプチドへの結合について、
（ a ）配列番号 3 および 4 の V H および V L 領域をそれぞれ有する抗体（1 1 E 1）；
（ b ）配列番号 2 1 および 2 2 の V H および V L 領域をそれぞれ有する抗体（6 E 1）
（ c ）配列番号 2 8 および 2 9 の V H および V L 領域をそれぞれ有する抗体（8 C 7）；
および

（ d ）配列番号 3 6 および 3 7 の V H および V L 領域をそれぞれ有する抗体（3 C 1 2）
からなる群から選択される抗体と競合する、抗原結合化合物が提供される。

【 0 0 4 1 】

ある実施形態において、抗 C D 7 3 抗体は、1 1 E 1、6 E 1、3 C 1 2 または 8 C 7 により結合される C D 7 3 上のアミノ酸残基からなる群から選択される 1、2 または 3 個のアミノ酸残基を含むエピトープに結合する。ある実施形態において、C D 7 3 上のアミノ酸残基は、表 1 で列挙される残基からなる群から選択される。

【 0 0 4 2 】

本明細書中の実施形態の何れかのある態様において、本抗体は、抗体 1 1 E 1、6 E 1、3 C 1 2 および 8 C 7 からなる群から選択される抗体の重および / または軽鎖それぞれの 1、2 または 3 個の C D R を有する重および / または軽鎖を有し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 4 3 】

本明細書中での実施形態の何れかにおいて、抗CD73抗体は、細胞（例えば、腫瘍細胞、実施例で示されるように、CD73を発現するように作製される細胞、例えばMDA-MB-231腫瘍細胞株またはCD73を発現するように作製される組み換え宿主細胞）の表面上で発現されるヒトCD73ポリペプチドへの結合を特徴とし得、任意選択によりさらに、本抗体は、フローサイトメトリーにより判定される場合、高親和性で結合する。例えば、抗体は、それらの表面でCD73ポリペプチドを発現する細胞、例えばCD73を発現する腫瘍細胞、それらの表面でCD73ポリペプチドを発現する細胞、CD73を発現するリンパ球などへの結合に対して、 $5\mu\text{g/mL}$ を超えない、任意選択により $1\mu\text{g/mL}$ を超えない、 $0.5\mu\text{g/mL}$ を超えない、 $0.1\mu\text{g/mL}$ を超えない、または $0.05\mu\text{g/mL}$ を超えない、フローサイトメトリーにより判定される場合のEC₅₀を特徴とし得る。任意選択により、(i)それらの表面でヒトCD73（例えば配列番号1のアミノ酸配列を有するポリペプチド）を発現する細胞および/または(ii)それらの表面でヒト非ヒト霊長類CD73（例えばカニクイザルCD73）を発現する細胞への結合について、抗原結合化合物は、 $1\mu\text{g/mL}$ を超えない、任意選択により $0.5\mu\text{g/mL}$ を超えない、 $0.1\mu\text{g/mL}$ を超えない、または $0.05\mu\text{g/mL}$ を超えないEC₅₀を有する。

10

【 0 0 4 4 】

本明細書中の実施形態の何れかのある態様において、本抗CD73抗体は、2本の重鎖および2本の軽鎖を含む四量体抗体であり、重鎖は、ヒトアイソタイプのFc領域を含み、実質的にヒトFc受容体への結合を欠く（例えばCD16A、CD16B、CD32A、CD32Bおよび/またはCD64）。

20

【 0 0 4 5 】

ある実施形態において、本抗体は、癌を有する個体に、腫瘍微小環境においてCD73の活性を中和するのに十分な量および頻度で投与される。ある実施形態において、本抗体は、腫瘍微小環境においてアデノシンの生成および/または濃度を減少させるのに十分な量および頻度で投与される。ある実施形態において、本抗体は、腫瘍微小環境においてATPの生成および/または濃度を増加させるのに十分な量および頻度で投与される。ある実施形態において、本抗体は、腫瘍細胞により発現されるCD73の活性を中和するのに十分な量および頻度で投与される。ある実施形態において、本抗体は、CD4 T細胞、CD8 T細胞および/またはB細胞により発現されるCD73の活性を中和するのに十分な量および頻度で投与される。

30

【 0 0 4 6 】

本抗体は、AMPからアデノシンへのCD73介在性の異化反応を阻害すること、例えば腫瘍微小環境においてアデノシン濃度を低下させることにおいて有用である。したがってこれらの抗体は、T細胞、B細胞およびアデノシン受容体を発現する他の細胞上でCD73および/またはアデノシンの免疫抑制効果を逆転させることにおいて、例えば癌の処置において有用である。ある実施形態において、抗CD73抗体は、T細胞での、増殖、サイトカイン産生、細胞傷害性および/またはNF B活性のアデノシン介在性阻害を中和する。

40

【 0 0 4 7 】

AMPからアデノシンへのCD73介在性の異化反応は不可逆的なので、CD39による（それぞれNDKキナーゼおよびアデニル酸キナーゼによる）ATPからADPおよびADPからAMPへの異化反応が可逆的である一方で、不可逆的なCD73介在性の異化反応を遮断する抗体は、AMPの貯蔵を増加させ、それにより例えば腫瘍微小環境においてADPおよびATPの濃度を上昇させることにおいて役立つ。本抗体は、AMPからのADPの形成およびADPからのATPの形成を増加させるために有用であり得る。ATPは免疫活性化の役割を有するので、抗CD73抗体は、例えば癌の処置で、T細胞を活性化することにおいて有用であり得る。

【 0 0 4 8 】

50

本抗体は、腫瘍微小環境へのアデノシンの、生成、量および/または濃度を阻害することにおいて有用である。

【0049】

可溶性ヒトCD73ポリペプチド二量体の活性を中和する抗体は、何らかの他の適切な関連において、例えばT細胞においてCD73を発現させるために作製されるレポーター細胞などにおいて、CD73をさらに中和し得る。

【0050】

個体を処置するための方法が提供され、この方法は、治療的に活性のある量の本明細書中に記載の抗CD73抗原結合化合物の何れかを個体（例えば疾患、腫瘍などを有する個体）に投与することを含む。ある態様において、個体を処置するための方法が提供され、この方法は、次のこと：個体（例えば疾患、腫瘍などを有する個体）に治療的に活性のある量の、CD73ポリペプチドを阻害する本開示の抗原結合化合物を投与することを含むか、基本的にこのことからなるか、またはこのことからなる。ある実施形態において、本抗体は、細胞性および任意選択によりさらに非細胞アッセイ、例えば組み換えCD73、可溶性CD73において、CD73ポリペプチドを阻害する。好ましくは、本化合物は非枯渇抗体（それに結合する細胞を枯渇させない抗体、例えばFcサイレント抗体）である。任意選択により、本化合物は、CD73に二価方式で結合する。任意選択により、本抗体は、キメラ、ヒト化またはヒト抗体である。任意選択により、本抗体はIgG4アイソタイプの重鎖定常領域を含む。

10

【0051】

ある態様において、CD73発現細胞（例えば個体中の免疫細胞および/または腫瘍細胞）により生成されるアデノシンを減少させるための方法または、細胞性CD73の酵素活性を中和するための方法が提供され、この方法は、CD73を阻害する本開示の抗原結合化合物とCD73発現細胞を接触させることを含むか、基本的にこのことからなるか、またはこのことからなる。ある実施形態において、本開示の抗原結合化合物とCD73発現細胞を接触させる段階は、個体に治療的に活性のある量の、CD73を阻害する抗原結合化合物を投与することを含む。ある実施形態において、個体は癌を有する。

20

【0052】

ある態様において、腫瘍環境において（例えば個体において）存在するアデノシンを減少させるための方法が提供され、この方法は、治療的に活性のある量の、CD73ポリペプチドを阻害する抗原結合化合物を個体に投与することを含むか、基本的にこのことからなるか、またはこのことからなる。ある実施形態において、個体は癌を有する。

30

【0053】

ある実施形態において、CD73ポリペプチドを阻害する抗原結合化合物の、活性のある量とは、個体におけるAMPからアデノシンへのCD73介在性の異化作用の阻害に対して、少なくともEC50、任意選択によりEC70、任意選択により実質的にEC100の血液濃度を達成および/または（例えば抗原結合化合物の続く投与まで）維持するのに有効な量である。ある実施形態において、CD73ポリペプチドを阻害する抗原結合化合物の活性のある量とは、個体の血管外組織におけるAMPからアデノシンへのCD73介在性の異化反応の阻害に対して、EC50、任意選択によりEC70、任意選択により実質的にEC100を達成するのに有効な量である。ある実施形態において、CD73ポリペプチドを阻害する抗原結合化合物の活性のある量は、1～20mg/kg体重の間である。ある実施形態において、毎週、2週間ごと、毎月または2カ月ごとに個体に活性のある量を投与する。

40

【0054】

任意選択により、個体は、癌を有するかまたは癌を有する疑いがあるヒトである。

【0055】

50

本抗体は、任意選択により、 10^{-9} M未満（より良好）、好ましくは 10^{-10} M未満または好ましくは 10^{-11} M未満のヒトCD73ポリペプチドに対する結合親和性（ K_D ）および/または $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ より低い（より良好な結合） EC_{50} でのヒトCD73への結合を特徴とし、好ましくは、細胞表面でヒトCD73を発現する細胞（例えば腫瘍細胞）への結合に対する本抗体の EC_{50} は、 $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ を超えない、任意選択により $0.2\text{ }\mu\text{g/mL}$ を超えない、任意選択により $0.1\text{ }\mu\text{g/mL}$ を超えない。

【0056】

本抗体は、任意選択によりキメラ、ヒトまたはヒト化抗体である。

【0057】

本抗体は、任意選択により、 $1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 未満（より良好）、任意選択により $0.5\text{ }\mu\text{g/mL}$ 未満の、CD73発現細胞におけるCD73の酵素活性の中和に対する EC_{50} を特徴とする。

【0058】

ある実施形態において、本抗体は、結合特異性およびCD73の酵素活性を中和する能力を保持するモノクローナル抗体またはその断片である。ある実施形態において、本抗体は、IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4抗体である。例えば、本抗体は、ヒトIgG4アイソタイプのFcドメインを含む抗体または、FcドメインとFc受容体（例えばCD16）との間の結合を減少させるために修飾される何れかのヒトIgGアイソタイプ（例えばIgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4）のFcドメインを含む抗体であり得る。好ましくは、抗原結合化合物は、抗体介在性細胞傷害性（ADCC）および/またはCDCを誘導可能であるFcドメインを含まず；任意選択により、この抗原結合化合物は、実質的にFcRIIIA（CD16）ポリペプチドに結合可能であるFcドメインを含まない（例えばFcRIIIA（CD16）ポリペプチドに実質的に結合可能ではないFcドメインを含み；Fcドメインを欠く（例えばCH2および/またはCH3ドメインを欠き；IgG4アイソタイプのFcドメインを含む）。ある実施形態において、（例えばヒトIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4アイソタイプの）Fcドメインは、野生型Fcドメインと比較して、アミノ酸修飾（例えば置換）を含み、この置換は、Fcドメイン（またはそれを含有する抗体）がFc受容体（例えばCD16）に結合する、および/または補体に結合する能力を低下させる。任意選択により、IgG4アイソタイプのFcドメインが存在する場合、このようなFcドメインは、ヒンジにおける突然変異、例えばS241P（S228P）突然変異など、半抗体の形成を減少させるための安定化突然変異を含み得る。任意選択により、抗原結合化合物は、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、ダイアボディ、1本鎖抗体断片または複数の異なる抗体断片を含む多特異的抗体からなるかまたはこれらを含む。ある実施形態において、抗原結合化合物は毒性部分と連結されない。

【0059】

前出の特性の何れかを有する、ヒトまたはヒト化抗体もしくは抗体断片をコードする核酸、このような核酸を含むベクター、このようなベクターを含む細胞および、抗CD73抗体の発現に適切な条件下でこのような細胞を培養することを含む、ヒト抗CD73抗体を作製する方法も提供される。本開示はまた、このようなタンパク質、核酸、ベクター、および/または細胞および一般的には組成物の処方、送達、安定性または他の特徴を促進する、活性成分または不活性成分であり得る1つ以上のさらなる成分（例えば様々な担体）を含む、薬学的に許容可能な組成物などの組成物およびキットにも関する。本開示は、さらに、CD73介在性の生物学的活性の調整において、例えばそれに関連する疾患、とりわけ癌の処置などにおいて、このような抗体、核酸、ベクター、細胞、生物および/または組成物を作製および使用する、様々な新規のおよび有用な方法に関する。

【0060】

本開示はまた、CD73に結合し、CD73の酵素活性を中和する抗体を作製または試験する方法も提供し、この方法は、

(a) CD73ポリペプチドに結合する複数の抗体を提供し、

10

20

30

40

50

(b) この抗体のそれぞれを(例えば細胞不含アッセイにおいて、例えばAMP存在下で)可溶性CD73ポリペプチドと(例えば個別に、互いに)接触させ、

(c) この可溶性CD73ポリペプチドの酵素活性を中和する抗体(例えば段階(b)のもの)を選択する、

段階を含む。ある実施形態において、本抗体は、CD73に二価方式で結合可能であり、例えば本抗体は全長IgG抗体である。任意選択により、段階(b)は、細胞不含アッセイにおいてこの抗体のそれぞれを可溶性CD73ポリペプチドと接触させることを含み、ここで抗体は、(CD73ポリペプチドと比較して)抗体のモル過剰量で提供される。任意選択により、CD73ポリペプチドは可溶性CD73二量体である。任意選択により、段階(c)は、抗体がCD73二量体に対して抗体のモル過剰量(例えば、少なくとも2倍、5倍、10倍または100倍モル過剰量)で提供される場合に、この可溶性CD73ポリペプチドの酵素活性を中和する抗体を選択することを含む。

10

【0061】

ある実施形態において、複数の抗体を提供する段階は、CD73ポリペプチドを含む免疫原で非ヒト哺乳動物に免疫付与することを含む。

【0062】

本開示はまた、必要とする対象においてリンパ球(例えばT細胞)の活性を増強する、またはリンパ球(例えばT細胞)の活性を回復させるための方法またはリンパ球(例えばT細胞)のアデノシン介在性の障害を緩和する方法も提供し、この方法は、有効量の前述の組成物の何れかを対象に投与することを含む。ある実施形態において、対象は、癌に罹患している患者である。例えば、患者は、固形腫瘍、例えば結直腸癌、腎臓癌、卵巣癌、肺癌、乳癌または悪性メラノーマに罹患し得る。あるいは、患者は、造血性癌、例えば急性骨髄性白血病、慢性骨髄性白血病、多発性骨髄腫または非ホジキンリンパ腫に罹患し得る。

20

【0063】

本開示はまた、個体における疾患の処置のための方法も提供し、この処置は、CD73の酵素活性の中和に対して、少なくともEC50(例えば0.01~0.5μg/mLの間のEC50)、任意選択によりEC70または任意選択によりEC100に対応する(例えば0.05~1μg/mLの間および0.1~1μg/mLの間のEC100)、血液(血清)または血管外組織(例えば腫瘍環境)における濃度を達成し、および/または抗CD73抗体の2回の連続投与の間に維持するのに有効である量で、抗CD73抗体が少なくとも1回、任意選択により少なくとも2回投与される、少なくとも1回の投与サイクルにわたり、CD73の酵素活性を中和する抗CD73抗体を個体に投与することを含む。本抗体は、例えば、少なくとも約0.1μg/mL、0.5μg/mL、1μg/mLまたは2μg/mL)の、循環中または血管外組織(例えば腫瘍環境)中の濃度を達成し、および/または維持するための量で投与され得る。例えば、0.05~1μg/mLの間、または0.1~1μg/mLの間の血管外組織中の濃度を達成するために、抗CD73抗体が、0.5~10μg/mLの間、または1~10μg/mLの間の、抗CD73抗体の循環中の濃度を達成するのに有効な量で投与される。任意選択により、抗CD73抗体は、少なくとも2回、少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間にわたり、抗CD73抗体の2回の連続投与の間、および/または投与サイクル全体を通じて、少なくとも上述の濃度で抗CD73抗体の濃度を維持するのに有効な量で投与される。

30

40

【0064】

本開示はまた、個体における疾患の処置のための方法も提供し、この処置は、少なくとも1回、任意選択により少なくとも2回、少なくとも1μg/mL、任意選択により少なくとも10μg/mL、任意選択により1~100μg/mLの抗CD73抗体の血液または組織濃度を達成し、および/または抗CD73抗体の2回の連続投与の間に維持するのに有効な量で抗CD73抗体が投与される、少なくとも1回の投与サイクルにわたり、CD73の酵素活性を中和する抗CD73抗体を個体に投与することを含む。任意選択により、抗CD73抗体は、少なくとも1週間、2週間、3週間、4週間にわたり、抗CD73抗体の2回の連続投与の間、および/または投与サイクル全体を通じて、少なくとも2

50

回、少なくとも $1 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、任意選択により少なくとも $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ 、任意選択により $1 \sim 100 \mu\text{g} / \text{mL}$ の抗 CD73 抗体の連続的な血液または組織濃度を維持するのに有効な量で投与される。

【0065】

これらの態様をより詳しく記載し、本明細書中で提供される説明から、さらなる態様、特性および長所が明らかとなろう。

【図面の簡単な説明】

【0066】

【図1】図1は、ルシフェラーゼ活性および発光を回復させる、CD73がAMPを切断してアデノシン+無機リン酸化物にする能力に試験mAbが影響を及ぼす能力を測定することによって評価した、抗CD73抗体のCD73酵素活性断能を示す。結果は残存酵素活性(%)として表す。抗体11E1、8C7、6E1および3C12(図示せず)は、酵素活性の強い低下を引き起こし、過剰な、免疫複合体に依存しない状態で提供された場合も、残留酵素活性を低下させ続ける。

10

【図2】図2は、可溶性組み換えヒトCD73ポリペプチドにおけるELISAによる抗体の滴定の結果を示す。

【図3】図3は、ヒト、カニクイザルおよびマウスCD73発現組み換え宿主細胞株におけるフローサイトメトリーによる抗体の滴定の結果を示す。11E1、8C7、3C12および6E1はヒトおよびカニクイザル(マウスではない)CD73を発現する組み換え宿主細胞に優れた親和性で結合するが、7G2または1E9はそうではない。

20

【図4】図4は、CD73を内因性に発現するヒトMDA-MB-231乳癌細胞におけるフローサイトメトリーによる抗体の滴定の結果を示す。11E1、8C7、3C12および6E1はMDA-MB-231細胞に優れた親和性で結合するが、7G2または1E9はそうではない。

【図5】図5は、抗体11E1、8C7、3C12および6E1が細胞性CD73の酵素活性を中和することを示す。

【図6】図6は、様々な抗体が細胞でのCD73発現の下方調整を引き起こす能力を示す。各AD2、7G2および1E9は、CD73の下方調整を引き起こしたが、抗体11E1、8C7、3C12または6E1のうち、細胞表面CD73の減少を引き起こしたものはなかった。

30

【図7】図7は、ヒトCD73の突然変異体を発現する細胞における、フローサイトメトリーによる抗体の滴定を示す。抗体3C12は、野生型CD73および突然変異体2に結合するが、突然変異体3には結合せず、一方で抗体AD2は野生型CD73および突然変異体3に結合するが、突然変異体2には結合しない。

【図8】図8Aは、「開いた」または「閉じた」立体構造の両方で示される(白丸)、突然変異体2において突然変異しているアミノ酸(AD2による結合喪失)があるCD73二量体の分子構造を示す。図8Bは、「開いた」または「閉じた」立体構造の両方で示される、突然変異体3において突然変異しているアミノ酸(11E1、8C7、3C12または6E1による結合の喪失)があるCD73二量体の分子構造を示す。活性部位はボックス(点線)により示す。

40

【発明を実施するための形態】

【0067】

定義

本明細書で使用される場合、「a」または「an」は1つ以上を意味し得る。請求項で使用される場合、「を含む(comprising)」という語と組み合わせて使用される時、「a」または「an」という語は、1または1を超えるものを意味し得る。本明細書中で使用される場合、「別の」は、少なくとも第二またはそれを超えるものを意味し得る。

【0068】

「を含む(comprising)」が使用される場合、これは、任意選択により、「基

50

本的にからなる (c o n s i s t i n g e s s e n t i a l l y o f) 」または「からなる (c o n s i s t i n g o f) 」により置き換えられ得る。

【 0 0 6 9 】

N T 5 E 遺伝子によりコードされる、エクト - 5 ' - ヌクレオチダーゼとして、および 5 - プライム - リボヌクレオチドホスホヒドロラーゼ、E C 3 . 1 . 3 . 5 としても知られるヒト C D 7 3 は、5 ' - ヌクレオチダーゼ、特に A M P - 、N A D - および N M N - ヌクレオシダーゼ活性を示す。C D 7 3 は、中性 pH でプリン 5 - プライムモノヌクレオチドからヌクレオシドへの変換を触媒し、好ましい基質は A M P である。この酵素は、原形質膜の外面にグリコシルホスファチジルイノシトール結合により結合される 2 つの同一である 7 0 k D サブユニットの二量体からなる。アミノ酸 1 ~ 2 6 にシグナル配列を含むヒト C D 7 3 タンパク質前駆体 (単量体) のアミノ酸配列は、全体的な開示が参照により本明細書中に組み込まれる、受入番号 N P _ 0 0 2 5 1 のもと G e n b a n k で示され、次のとおりである：

【 化 1 】

```

MCPRAARAPA TLLLALGAVL WPAAGAWELT ILHTNDVHSR LEQTSSEDSSK CVNASRCMGG
VARLFTKVQQ IRRAEPNVLL LDAGDQYQGT IWFTVYKGAE VAHFMNALRY DAMALGNHEF
DNGVEGLIEP LLKEAKFPIL SANIKAKGPL ASQISGLYLP YKVLPGVDEV VGIVGYTSKE
TFFLSNPGTN LVFEDEITAL QPEVDKLTTL NVNKIIALGH SGFEMDKLIA QKVRGVVDVVV
GGHSNTFLYT GNPPSKEVPA GKYPFIVTSD DGRKVPVVQA YAFGKYLGYL KIEFDERGNV
ISSHGNPILL NSSIPEDPSI KADINKWRIK LDNYSTQELG KTIVYLDGSS QSCRFRECNM
GNLICDAMIN NNLRHTDEMF WNHVSMCILN GGGIRSPIDE RNNGTITWEN LAAVLPFGGT
FDLVQLKGST LKKA FEHSVH RYQGSTGEFL QVGGIHVVYD LSRKPGDRVV KLDVLCTKCR
VPSYDPLKMD EVYKVILPNF LANGGDGFQM IKDELLRHDS GDQDINNVST YISKMKVIYP
AVEGRIKFST GSHCHGSFSL IFLSLWAVIF VLYQ (配列番号 1)

```

【 0 0 7 0 】

本明細書中での関連において、「C D 7 3 の酵素活性を中和する」は、C D 7 3 の 5 ' - ヌクレオチダーゼ (5 ' - エクトヌクレオチダーゼ) 活性が阻害される過程を指す。これは、とりわけアデノシンの C D 7 3 介在性の産生の阻害、すなわち A M P からアデノシンへの C D 7 3 介在性の異化反応の阻害を含む。これは、例えば、直接的または間接的に、の何れかで、試験化合物が A M P からアデノシンへの変換を阻害する能力を測定する細胞不含アッセイにおいて測定し得る。ある実施形態において、抗体標品は、例えば本明細書中に記載のアッセイに関して、A M P からアデノシンへの変換の少なくとも 5 0 % の減少、A M P からアデノシンへの変換の少なくとも 7 0 % の減少、または A M P からアデノシンへの変換の少なくとも 8 0 % の減少を引き起こす。

【 0 0 7 1 】

この明細書全体内で抗 C D 7 3 結合剤 (例えば抗体) に関して「癌の処置」などに言及する場合は常に、(a) 癌の処置の方法であって、このような処置を必要とする個体、哺乳動物、特にヒトに、癌の処置を可能にする用量で、(治療的有効量) 、好ましくは本明細書中で指定されるような用量 (量) で、(少なくとも 1 回の処置に対して) (好ましくは薬学的に許容可能な担体物質中で) 抗 C D 7 3 結合剤を投与する段階を含む方法；(b) 癌の処置のための抗 C D 7 3 結合剤の使用またはこの処置での使用のための抗 C D 7 3 結合剤 (特にヒトにおいて) ；(c) 癌の処置用の医薬標品の製造のための抗 C D 7 3 結合剤の使用、抗 C D 7 3 結合剤を薬学的に許容可能な担体と混合することを含む、癌の処置用の医薬標品の製造のための抗 C D 7 3 結合剤を使用する方法または、癌の処置に適切である有効用量の抗 C D 7 3 結合剤を含む医薬標品；または (d) 本願が提出される国で特許を得ることを可能とする主題に従う、a) 、b) および c) の何れかの組み合わせを意味する。

【 0 0 7 2 】

「抗体」という用語は、本明細書中で使用される場合、ポリクローナルおよびモノクロー

ナル抗体を指す。重鎖における定常ドメインのタイプに依存して、抗体は5つの主要なクラス：Ig A、Ig D、Ig E、Ig GおよびIg Mのうち1つに割り当てられる。これらのうち一部は、サブクラスまたはアイソタイプ、例えばIg G 1、Ig G 2、Ig G 3、Ig G 4などにさらに分類される。代表的な免疫グロブリン（抗体）構造単位は四量体を含む。各四量体は、ポリペプチド鎖の2つの同一の対から構成され、各対は1本の「軽」（約25 kDa）および1本の「重」鎖（約50～70 kDa）を有する。各鎖のN末端は、抗原認識に主に関与する約100～110個またはそれ以上のアミノ酸の可変領域を定める。可変軽鎖（VL）および可変重鎖（VH）という用語は、これらの軽および重鎖をそれぞれ指す。免疫グロブリンの異なるクラスに対応する重鎖定常ドメインは、「アルファ」、「デルタ」、「イプシロン」、「ガンマ」および「ミュー」とそれぞれ呼ばれる。免疫グロブリンの異なるクラスのサブユニット構造および三次元立体配置は周知である。Ig Gは、生理学的状況において最も共通する抗体であるので、および実験室で最も容易に作製されるので、本明細書中で使用される抗体の代表的なクラスである。任意選択により、本抗体はモノクローナル抗体である。抗体の特定の例は、ヒト化、キメラ、ヒトまたはそうでなければヒトに適切な抗体である。「抗体」はまた、本明細書中に記載の抗体の何れかの何らかの断片または誘導体も含む。

10

【0073】

「特異的に結合する」という語は、単離標的細胞の表面上に存在するタンパク質、その中のエピトープまたはネイティブタンパク質の何れかの組み換え形態を用いて評価した場合に、抗体が好ましくは競合的結合アッセイにおいて結合パートナー、例えばCD73に結合し得ることを意味する。競合的結合アッセイおよび特異的な結合を決定するための他の方法を以下でさらに記載するが、これらは当技術分野で周知である。

20

【0074】

抗体が特定のモノクローナル抗体「と競合する」と言われる場合、これは、本抗体が、組み換えCD73分子または表面発現CD73分子の何れかを用いた結合アッセイにおいて、モノクローナル抗体と競合することを意味する。例えば、試験抗体が結合アッセイにおいて参照抗体のCD73ポリペプチドまたはCD73発現細胞への結合を減少させる場合、本抗体は、参照抗体とそれぞれ「競合する」と言われる。

【0075】

「親和性」という用語は、本明細書中で使用される場合、エピトープへの抗体の結合の強度を意味する。抗体の親和性は、 $[Ab] \times [Ag] / [Ab - Ag]$ （式中、 $[Ab - Ag]$ は、抗体-抗原複合体のモル濃度であり、 $[Ab]$ は未結合抗体のモル濃度であり、 $[Ag]$ は未結合抗原のモル濃度である）として定められる解離定数 K_d により与えられる。親和性定数 K_a は、 $1 / K_d$ により定義される。 mAb の親和性を決定するための方法は、Harlowら、Antibody: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1988）、Coliganら編、Current Protocols in Immunology, Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience, N.Y., (1992, 1993)およびMuller, Meth. Enzymol. 92: 589-601 (1983)で見出すことができ、この参考文献は、全体的に参照により本明細書中に組み込まれる。 mAb の親和性を決定するための当技術分野で周知のある標準的な方法は、表面プラズモン共鳴（SPR）スクリーニング（BIAcore（商標）SPR分析装置による分析によるなど）の使用である。

30

40

【0076】

本明細書の文脈内で、「決定基」はポリペプチド上の相互作用または結合の部位を指す。

【0077】

「エピトープ」という用語は、抗原性決定基を指し、抗体が結合する抗原上のエリアまたは領域である。タンパク質エピトープは、直接結合に関与するアミノ酸残基ならびに特異的な抗原結合抗体またはペプチドにより効果的に遮断されるアミノ酸残基、すなわち抗体

50

の「フットプリント」内のアミノ酸残基を含み得る。これは、例えば抗体または受容体と組み合わせ得る複合抗原分子上の最も単純な形態または最小構造領域である。エピトープは、直鎖状または立体構造／構造であり得る。「直鎖状エピトープ」という用語は、アミノ酸の直鎖状配列（一次構造）上で隣接するアミノ酸残基から構成されるエピトープとして定義される。「立体構造または構造エピトープ」という用語は、全てが隣接しておらず、したがって分子の折り畳みにより互いに対して近接するようになるアミノ酸の直鎖状配列の分離部分を表す（二次、三次および／または四次構造）アミノ酸残基から構成されるエピトープとして定義される。立体構造エピトープは三次元構造に依存する。したがって「立体構造」という用語は、「構造」と交換可能に使用されることが多い。

【0078】

「枯渇させる (deplete)」または「枯渇させること (depleting)」という用語は、CD73発現細胞に関して、結果として、試料または対象中に存在するこのようなCD73発現細胞の数に負の影響を与えるように、死滅させる、排除する、溶解する、またはこのような死滅、排除もしくは溶解の誘導を引き起こす、過程、方法または化合物を意味する。

【0079】

「内部移行」という用語は「細胞内内部移行」と交換可能に使用され、細胞外細胞表面から分子を細胞内細胞表面に移行させる過程と関連する、分子的、生化学的および細胞事象を指す。分子の細胞内内部移行に関与する過程は周知であり、とりわけ細胞外分子（ホルモン、抗体および小さい有機分子など）；膜結合性分子（細胞表面受容体など）；および細胞外分子に結合される膜結合性分子の複合体（例えば、膜貫通受容体に結合されるリガンドまたは膜結合性分子に結合される抗体）の内部移行を含み得る。したがって、「内部移行を誘導するおよび／または増加させる」は、細胞内内部移行が開始され、および／または細胞内内部移行の速度および／または程度が上昇する事象を含む。

【0080】

「薬剤」という用語は、本明細書中で、化学的化合物、化学的化合物の混合物、生体高分子または生体物質から作製される抽出物を指すために使用される。「治療剤」という用語は、生物学的活性を有する薬剤を指す。

【0081】

本明細書中で目的のために、「ヒト化」または「ヒト」抗体は、1つ以上のヒト免疫グロブリンの定常および可変フレームワーク領域が動物免疫グロブリンの結合領域、例えばCDRと融合される抗体を指す。このような抗体は、結合領域が由来する非ヒト抗体の結合特異性を維持するが、非ヒト抗体に対する免疫反応を回避するために設計される。このような抗体は、抗原負荷に反応して特異的なヒト抗体を作製させるために「操作」されている、トランスジェニックマウスまたは他の動物から入手し得る（例えば、全体的な教示が参照により本明細書中に組み込まれる、Greenら（1994）Nature Genet 7:13; Lonbergら（1994）Nature 368:856; Taylorら（1994）Int Immun 6:579を参照）。全て当技術分野で公知である、遺伝学的または染色体導入法ならびにファージディスプレイ技術によって、完全ヒト抗体も構築し得る（例えば、McCaffertyら（1990）Nature 348:552-553を参照）。ヒト抗体は、インビトロ活性化B細胞によっても作製し得る（例えば、参照によりそれらの全体において組み込まれる米国特許第5,567,610号明細書および同第5,229,275号明細書を参照）。

【0082】

「キメラ抗体」は、(a) 抗原結合部位（可変領域）が、異なるかまたは改変されているクラス、エフェクター機能および／または種の定常領域、またはキメラ抗体に新しい特性を付与する完全に異なる分子、例えば、酵素、毒素、ホルモン、成長因子、薬物などに連結されるように、定常領域またはそれらの一部が、改変され、置き換えられ、または交換されているか；または(b) 可変領域またはそれらの一部が、改変され、置き換えられ、または異なるかもしくは改変されている抗原特異性を有する可変領域と交換されている、

抗体分子である。

【0083】

「超可変領域」という用語は、本明細書中で使用される場合、抗原結合に関与する抗体のアミノ酸残基を指す。超可変領域は一般に、「相補性決定領域」または「CDR」（例えば軽鎖可変ドメイン中の、残基24～34（L1）、50～56（L2）および89～97（L3）および重鎖可変ドメイン中の、31～35（H1）、50～65（H2）および95～102（H3）；Kabatら1991）および/または「超可変ループ」からの残基（例えば軽鎖可変ドメイン中の、残基26～32（L1）、50～52（L2）および91～96（L3）および重鎖可変ドメイン中の、26～32（H1）、53～55（H2）および96～101（H3）；ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol. 1987; 196:901-917）または抗原結合に関与する必須アミノ酸を決定するための同様の系からのアミノ酸残基を含む。一般的には、この領域中のアミノ酸残基の付番は、Kabatら、前出に記載の方法により行われる。「Kabat位置」、「Kabatにおけるような可変ドメイン残基付番」および「Kabatによる」などの句は、本明細書中で、重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインに対するこの付番系を指す。Kabat付番系を用いて、ペプチドの実際の直鎖状アミノ酸配列は、可変ドメインのFRもしくはCDRの短縮またはそれへの挿入に対応する少数のまたはさらなるアミノ酸を含有し得る。例えば、重鎖可変ドメインは、CDR H2の残基52の後に1個のアミノ酸挿入（Kabatによる残基52a）および重鎖FR残基82の後に残基の挿入（例えばKabatによる、残基82a、82bおよび82cなど）を含み得る。残基のKabat付番は、「標準的な」Kabat付番配列での抗体の配列の相同性の領域でのアライメントにより、ある一定の抗体に対して決定され得る。

10

20

【0084】

「フレームワーク」または「FR」残基は、本明細書中で使用される場合、CDRとして定められる領域を除く、抗体可変ドメインの領域を意味する。各抗体可変ドメインフレームワークは、CDRによって分離される隣接領域（FR1、FR2、FR3およびFR4）にさらに分けられ得る。

【0085】

「Fcドメイン」、「Fc部分」および「Fc領域」という用語は、例えば、ヒト（ガンマ）重鎖の約アミノ酸（aa）230～約aa450からの、抗体重鎖のC末端断片、または他のタイプの抗体重鎖（例えば、ヒト抗体の場合、 γ 、 δ 、 ϵ および μ ）におけるその対応配列またはその天然のアロタイプを指す。別段の指定がない限り、免疫グロブリンに対する一般的に受容されるKabatアミノ酸付番がこの開示を通じて使用される（Kabatら（1991）Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., United States Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MDを参照）。

30

【0086】

「単離」、「精製」または「生物学的に純粋」という用語は、実質的にまたは基本的に、そのネイティブ状態で見られるような通常それに付随する成分を含まない物質を指す。純度および均一性は、一般的にはポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィーなどの分析学的化学技術を用いて決定される。標品中に存在する主要な種であるタンパク質は実質的に精製されている。

40

【0087】

「ポリペプチド」、「ペプチド」および「タンパク質」という用語は、アミノ酸残基のポリマーを指すために本明細書中で交換可能に使用される。この用語は、1個以上のアミノ酸残基が対応する天然のアミノ酸の人工的な化学模倣物であるアミノ酸ポリマーならびに天然のアミノポリマーおよび非天然のアミノポリマーに適用される。

【0088】

「組み換え」という用語は、例えば細胞または核酸、タンパク質またはベクターに関して

50

使用される場合、細胞、核酸、タンパク質またはベクターが、異種核酸もしくはタンパク質の導入またはネイティブ核酸もしくはタンパク質の改変により修飾されているか、または細胞が、そのように修飾された細胞に由来することを示す。したがって、例えば、組み換え細胞は、細胞のネイティブ（非組み換え）形態内では見いだされない遺伝子を発現するか、またはそうでなければ異常に発現されるか、発現が少ないかまたは全く発現されないネイティブ遺伝子を発現する。

【0089】

本明細書の文脈内で、ポリペプチドまたはエピトープに「結合」する抗体という用語は、特異性および/または親和性をもって前記の決定基に結合する抗体を指す。

【0090】

「同一性」または「同一である」という用語は、2つ以上のポリペプチドの配列間において使用される場合、一連の2個以上のアミノ酸残基の間の一致数により決定される場合の、ポリペプチド間の配列関連性の度合いを指す。「同一性」は、特定の数学的モデルまたはコンピュータープログラム（すなわち「アルゴリズム」）により扱われるギャップアライメント（もしあれば）を用いた2つ以上の配列のうちより小さいものの間の完全な一致のパーセントを評価する。関連ポリペプチドの同一性は、公知の方法により容易に計算され得る。このような方法としては、Computational Molecular Biology, Lesk, A.M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D.W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A.M. および Griffin, H.G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. および Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; および Carilloら、SIAM J. Applied Math. 48, 1073 (1988) に記載のものが挙げられるが限定されない。

【0091】

同一性を決定するための方法は、試験される配列間の一致が最大となるように設計される。同一性を決定する方法は、公開されているコンピュータープログラムに記載されている。2つの配列間の同一性を決定するためのコンピュータープログラム法としては、GAP (Devereuxら、Nucl. Acid. Res. 12, 387 (1984); Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTP、BLASTN および FASTA (Altschulら、J. Mol. Biol. 215, 403-410 (1990)) を含む、GCGプログラムパッケージが挙げられる。BLASTXプログラムは、National Center for Biotechnology Information (NCBI) および他のソース (BLAST Manual, Altschulら、NCB/NLM/NIH Bethesda, Md. 20894; Altschulら、前出) から公開されている。周知のSmith Watermanアルゴリズムも同一性を決定するために使用し得る。

【0092】

抗体の産生

癌の処置のために使用し得る抗CD73剤は、ヒトCD73ポリペプチドの細胞外部分に結合し、細胞、例えば腫瘍細胞の表面上で発現されるCD73の酵素活性を中和する。ある実施形態において、本剤は、CD73の5'-エクトヌクレオチダーゼ活性を阻害する。ある実施形態において、本抗体は、CD73介在性のアデノシン生成を阻害する。ある実施形態において、本抗体は、AMPからアデノシンへのCD73介在性の異化反応を阻害

10

20

30

40

50

する。ある実施形態において、本抗体は、リンパ球活性（例えばT細胞）のアデノシン介在性の阻害を阻害する。ある実施形態において、本抗体は、CD73上で酵素活性部位に結合し、および/またはこれを阻害する。ある態様において、本剤は、全長抗体、抗体断片および合成または半合成抗体由来分子から選択される抗体である。

【0093】

ある態様において、本剤は、完全ヒト抗体、ヒト化抗体およびキメラ抗体から選択される抗体である。

【0094】

ある態様において、本剤は、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4から選択される定常ドメインを含む抗体の断片である。

10

【0095】

ある態様において、本剤は、Fab断片、Fab'断片、Fab'-SH断片、F(ab)2断片、F(ab')2断片、Fv断片、重鎖Ig（ラムまたはラクダIg）、VH断片、シングルドメインFvおよび1本鎖抗体断片から選択される抗体断片である。

【0096】

ある態様において、本剤は、scFv、dsFv、ミニボディー、ダイアボディ、トリアボディー、カップボディー、IgNARから選択される、合成または半合成抗体由来分子；および多特異性抗体である。

【0097】

したがって、本開示は、CD73に結合する、抗体または他の抗原結合剤に関する。

20

【0098】

ある態様において、本抗体は、少なくとも部分的に精製された形態である。

【0099】

ある態様において、本抗体は、基本的に単離形態である。

【0100】

本抗体は、当技術分野で公知の様々な技術により作製し得る。一般的には、これらは、CD73ポリペプチド、好ましくはヒトCD73ポリペプチドを含む免疫原での非ヒト動物、好ましくはマウスの免疫付与によって作製される。CD73ポリペプチドは、ヒトCD73ポリペプチドの全長配列またはその断片もしくは誘導体、一般的には免疫原性断片、すなわち、CD73ポリペプチドを発現する細胞の表面に露出したエピトープを含むポリペプチドの部分を含み得る。このような断片は、一般的には、成熟ポリペプチド配列の少なくとも約7連続アミノ酸、さらにより好ましくはその少なくとも約10連続アミノ酸を含有する。断片は、一般的には、基本的に受容体の細胞外ドメイン由来である。ある実施形態において、免疫原は、脂質膜中、一般的には細胞の表面の、野生型ヒトCD73ポリペプチドを含む。具体的な実施形態において、免疫原は、任意選択により処理されるかまたは溶解される、インタクトな細胞、特にインタクトなヒト細胞を含む。他の実施形態において、本ポリペプチドは組み換えCD73ポリペプチドである。

30

【0101】

非ヒト哺乳動物に抗原で免疫付与する段階は、マウスにおいて抗体の産生を刺激するための当技術分野で周知の何らかの方式で行われ得る（例えば、その全体的な開示が参照により本明細書中に組み込まれる、E. HarlowおよびD. Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1988)を参照）。任意選択により完全または不完全フロインドアジュバントなどのアジュバントとともに、免疫原を緩衝液中で懸濁するかまたは溶解させる。免疫原の量、緩衝液のタイプおよびアジュバントの量を決定するための方法は、当業者にとって周知であり、何ら限定していない。これらのパラメーターは、異なる免疫原に対して異なり得るが、容易に明らかとなる。

40

【0102】

同様に、抗体の産生を刺激するのに十分な免疫付与の位置および頻度も当技術分野で周知

50

である。典型的な免疫付与プロトコールにおいて、第1日に非ヒト動物に抗原を腹腔内注射し、約1週間後に再び注射する。この後、第20日前後に、任意選択により不完全フロインドアジュバントなどのアジュバントとともに、抗原のリコール注射を行う。リコール注射は、静脈内で行い、数日連続して反復し得る。この後、第40日に、静脈内または腹腔内の何れかで、一般的にはアジュバントなしで、ブースター注射を行う。このプロトコールの結果、約40日後、抗原特異的な抗体産生B細胞が生成する。結果として免疫付与で使用した抗原に対する抗体を発現するB細胞の生成が起こる限り、他のプロトコールも使用し得る。

【0103】

ポリクローナル抗体調製の場合、免疫付与非ヒト動物から血清を得て、周知の技術によりその中に存在する抗体を単離する。CD73ポリペプチドと反応する抗体を得るために、固体支持体上に連結される上記の免疫原の何れかを使用して、血清をアフィニティー精製し得る。

【0104】

代替的な実施形態において、非免疫付与非ヒト哺乳動物からのリンパ球を単離し、インビトロで増殖させ、次いで細胞培養中で免疫原に曝露する。次いで、リンパ球を回収し、下記の融合段階を行う。

【0105】

モノクローナル抗体の場合、次の段階は、免疫付与した非ヒト哺乳動物から脾臓細胞を単離し、続いて、抗体産生ハイブリドーマを形成させるために、不死化細胞とこれらの脾臓細胞を融合させることである。非ヒト哺乳動物からの脾臓細胞の単離は当技術分野で周知であり、一般的には、麻酔下の非ヒト哺乳動物から脾臓を摘出し、それを切って小片にし、単一の細胞懸濁液を生成させるために、細胞ストレイナーのナイロンメッシュを通じて脾臓から脾臓細胞を適切な緩衝液中に圧搾することを含む。この細胞を洗浄し、遠心し、あらゆる赤血球細胞を溶解する緩衝液中で再懸濁する。溶液を再び遠心し、ペレット中の残留リンパ球を新鮮な緩衝液中で最終的に再懸濁する。

【0106】

単離し、単一細胞懸濁液の中に入れたら、リンパ球を不死細胞株に融合させ得る。これは、一般的にはマウス骨髄腫細胞株であるが、ハイブリドーマを作製するのに有用な多くの他の不死細胞株が当技術分野で公知である。マウス骨髄腫株としては、Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, U.S.A. から入手可能なMOPC-21およびMPC-11マウス腫瘍、American Type Culture Collection, Rockville, Maryland U.S.A. から入手可能なX63 Ag8653およびSP-2細胞由来のものが挙げられるが限定されない。融合はポリエチレングリコールなどを使用して達成される。次いで、未融合の親骨髄腫細胞の増殖または生存を阻害する1つ以上の物質を含有する選択培地中で、得られたハイブリドーマを増殖させる。例えば、親骨髄腫細胞が酵素ヒポキサンチングアニンホスホリボシルトランスフェラーゼ(HGPRTまたはHPR T)を欠く場合、ハイブリドーマのための培地は、一般的にはヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジン(HAT培地)を含み、これらの物質はHGPRT欠損細胞の増殖を妨害する。

【0107】

ハイブリドーマは、一般的にはマクロファージのフィーダー層上で増殖させる。マクロファージは、脾臓細胞を単離するために使用される、好ましくは非ヒト哺乳動物の同腹仔からのものであり、一般的にはハイブリドーマを播種する数日前に不完全フロインドアジュバントなどで刺激する。融合方法は、その開示が参照により本明細書中に組み込まれる、Goding, 「Monoclonal Antibodies: Principles and Practice」、pp. 59-103 (Academic Press, 1986) に記載されている。

【0108】

10

20

30

40

50

コロニー形成および抗体産生のために十分な時間にわたり選択培地中で細胞を増殖させる。これは通常、約7～約14日の間である。

【0109】

次いで、CD73ポリペプチド遺伝子産物に特異的に結合する抗体産生についてハイブリドーマコロニーをアッセイする。このアッセイは、一般的には、比色分析ELISA型アッセイであるが、ハイブリドーマを増殖させるウェルに適合させ得るあらゆるアッセイを使用し得る。他のアッセイとしては、ラジオイムノアッセイまたは蛍光励起細胞分取が挙げられる。1つ以上の別個のコロニーが存在するか否かを決定するために、所望の抗体産生について陽性であるウェルを調べる。複数のコロニーが存在する場合、単一細胞のみが所望の抗体を産生するコロニーを生じさせていることを確実にするために、細胞を再クローン化し、増殖させ得る。一般的には、抗体はまた、CD73ポリペプチド、例えばCD73発現細胞に結合する能力についても試験され得る。

10

【0110】

モノクローナル抗体を産生することが確認されるハイブリドーマを、DMEMまたはRPMI-1640などの適切な培地中でより大量に増殖させ得る。あるいは、ハイブリドーマ細胞を動物における腹水腫瘍としてインビボで増殖させ得る。

【0111】

所望のモノクローナル抗体を産生させるのに十分な増殖後、モノクローナル抗体を含有する増殖培地（または腹水）を細胞から分離して除き、その中に存在するモノクローナル抗体を精製する。精製は一般的には、ゲル電気泳動、透析、プロテインAもしくはプロテインG-セファロースを使用したクロマトグラフィーまたはアガロースもしくはセファロースビーズなどの固体支持体に連結される抗マウスIgによって達成される（例えば、開示が参照により本明細書によって組み込まれる、Antibody Purification Handbook, Biosciences, publication No. 18-1037-46, Edition ACに全て記載されている）。結合される抗体は、一般的には、抗体含有分画の即時の中和とともに低pH緩衝液（pH3.0以下のグリシンまたは酢酸緩衝液）を使用することによって、プロテインA/プロテインGカラムから溶出される。これらの分画をプールし、透析し、必要に応じて濃縮する。

20

【0112】

一般的には単一の明らかなコロニーがある陽性ウェルを再びクローン化し、再アッセイして、1つのモノクローナル抗体のみが検出され、産生されていることを保証する。

30

【0113】

抗体は、例えば（全体的な開示が参照により本明細書中に組み込まれる、Wardら、Nature, 341(1989)p.544）に開示されるような免疫グロブリンのコンビナトリアルライブラリの選択によっても作製され得る。

【0114】

CD73、特に実質的にまたは基本的にモノクローナル抗体11E1、8C7または6E1と同じエピトープに結合する1つ以上の抗体の同定は、抗体競合が評価され得る様々な免疫学的スクリーニングアッセイの何れか1つを用いて容易に決定し得る。多くのこのようなアッセイは、日常的に実施され、当技術分野で周知である（例えば参照により本明細書中に特に組み込まれる、1997年8月26日発行の米国特許第5,660,827号明細書を参照）。本明細書中に記載の抗体が結合するエピトープを実際に決定することは、本明細書中に記載のモノクローナル抗体と同じまたは実質的に同じエピトープに結合する抗体を同定するのに何ら必要とされないことを理解されたい。

40

【0115】

例えば、調べようとする試験抗体は、異なるソースの動物から得られるか、または異なるIgアイソタイプのものである場合、対照（例えば11E1、8C7または6E1）および試験抗体を混合し（または予め吸着させ）、CD73ポリペプチドを含有する試料に適用する、単純な競合アッセイを使用し得る。ウエスタンブロッティングおよびBIAcore分析の使用に基づくプロトコールは、このような競合実験での使用に適切である。

50

【 0 1 1 6 】

ある一定の実施形態において、C D 7 3 抗原試料に適用する前のある時間、対照抗体（例えば 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1）を様々な量の試験抗体と予め混合する（例えば、約 1 : 1 0 または約 1 : 1 0 0）。他の実施形態において、対照および様々な量の試験抗体を C D 7 3 抗原試料への曝露中に単純に混合し得る。（例えば未結合抗体を排除するための分離または洗浄技術を使用することによって）遊離抗体から結合抗体を、（例えば種特異的なまたはアイソタイプ特異的な二次抗体を使用することにより、または検出可能標識で 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 を特異的に標識することにより）試験抗体から 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 を区別し得る限り、試験抗体が 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 の抗原への結合を減少させるか否かを判定し得、これは、試験抗体が 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 と実質的に同じエピトープを認識することを示す。完全に無関係な抗体の非存在下での（標識化）対照抗体の結合は、対照高値となり得る。対照低値は、標識化（1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1）抗体を完全に同じタイプの（1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1）非標識抗体と温置することによって得られ得るが、この温置時に競合が起こり、標識抗体の結合が減少する。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下での標識化抗体の反応性の顕著な低下は、実質的に同じエピトープを認識する試験抗体、すなわち標識化（1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1）抗体と「交差反応する」かまたは競合するエピトープを認識する試験抗体を示す。約 1 : 1 0 ~ 約 1 : 1 0 0 の間の 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 : 試験抗体の何れかの比率で C D 7 3 抗原への 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 の結合を少なくとも約 5 0 %、例えば少なくとも約 6 0 % またはより好ましくは少なくとも約 8 0 % または 9 0 %（例えば約 6 5 ~ 1 0 0 %）減少させる何らかの試験抗体は、1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 と実質的に同じエピトープまたは決定基と結合する抗体であるとみなされる。好ましくは、このような試験抗体は、少なくとも約 9 0 %（例えば約 9 5 %）、C D 7 3 抗原への 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 の結合を減少させる。

【 0 1 1 7 】

例えばフローサイトメトリー試験により競合を評価することもできる。このような試験において、ある種の C D 7 3 ポリペプチドを保有する細胞を最初に例えば 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 と温置し、次いで蛍光色素またはビオチンで標識した試験抗体と温置し得る。本抗体は、飽和量の 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 との予備温置時に得られる結合が、1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 との予備温置を行わずに抗体により得られる結合の約 8 0 %、好ましくは約 5 0 %、約 4 0 % またはそれ以下（例えば、約 3 0 %、2 0 % または 1 0 %）（蛍光手段により測定される場合）である場合、1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 と競合すると言われる。あるいは、抗体は、飽和量の試験抗体と予備温置された細胞上で（蛍光色素またはビオチンによる）標識化 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 抗体とともに得られる結合が、試験抗体との予備温置を行わずに得られる結合の約 8 0 %、好ましくは約 5 0 %、約 4 0 % またはそれ以下（例えば約 3 0 %、2 0 % または 1 0 %）である場合、1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 と競合すると言われる。

【 0 1 1 8 】

試験抗体が予め吸着され、C D 7 3 抗原が固定化される表面に飽和濃度で適用される単純な競合アッセイも使用し得る。単純競合アッセイにおける表面は、好ましくは B I A C O R E チップ（または表面プラズモン共鳴分析に適切な他の媒体）である。次いで、対照抗体（例えば、1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1）を C D 7 3 飽和濃度で表面と接触させ、C D 7 3 および対照抗体の表面結合を測定する。対照抗体のこの結合を試験抗体の非存在下での C D 7 3 含有面への対照抗体の結合と比較する。試験アッセイにおいて、試験抗体の存在下での対照抗体による C D 7 3 含有面の結合の顕著な減少は、試験抗体が対照抗体と実質的に同じエピトープを認識し、試験抗体が対照抗体と「交差反応する」ようになることを示す。少なくとも約 3 0 % またはそれ以上、好ましくは約 4 0 %、C D 7

10

20

30

40

50

3 抗原への、対照（11E1、8C7、3C12または6E1など）抗体の結合を減少させる何らかの試験抗体は、対照（例えば、11E1、8C7、3C12または6E1）と実質的に同じエピトープまたは決定基に結合する抗体であるとみなされ得る。好ましくは、このような試験抗体は、少なくとも約50%（例えば少なくとも約60%、少なくとも約70%またはそれ以上）、CD73抗原への対照抗体（例えば、11E1、8C7、3C12または6E1）の結合を減少させる。当然のことながら、対照および試験抗体の順序は逆転し得：すなわち、対照抗体を最初に表面に結合させ得、試験抗体をその後競合アッセイにおいて表面と接触させる。好ましくは、CD73抗原に対してより高い親和性を有する抗体は、（抗体が交差反応することが推測される）第二の抗体に対して見られる結合の減少がより大きい規模であると予想されるので、最初に表面と結合させる。このようなアッセイのさらなる例は、例えば、開示が参照により本明細書中に組み込まれる *Saunal (1995) J. Immunol. Methods 183: 33-41* で提供される。

10

【0119】

本抗体は、CD73陽性細胞の発現を特徴とする疾患を有する個体、すなわち抗CD73抗体を用いた本明細書中に記載の方法の1つによる処置に対する候補である個体からのCD73発現細胞に結合する。したがって、細胞上でCD73を特異的に認識する抗体を得たら、任意選択によりこれをCD73陽性細胞（例えば癌細胞）へのその結合能について試験し得る。特に、治療が患者において有益である可能性を最大にするために、本抗体の1つで患者を処置する前に、任意選択により、例えば血液試料または腫瘍生検において、本抗体がその患者から採取した悪性細胞に結合する能力を試験し得る。

20

【0120】

ある実施形態において、CD73発現細胞、例えば悪性細胞に結合するそれらの能力を試験するために、本抗体を免疫アッセイにおいて確認する。例えば、血液試料または腫瘍生検を行い、腫瘍細胞を回収する。次いで、当業者にとって周知の標準的方法を使用して、ある種の抗体の細胞への結合能を評価する。抗体は、例えば、個体または患者のかんりのパーセンテージ（例えば、10%、20%、30%、40%、50%またはそれ以上）からの、CD73を発現することが知られている細胞、例えば腫瘍細胞、のかんりの割合（例えば、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%またはそれ以上）に結合し得る。例えば患者が、抗CD73剤での処置にまたは本明細書中に記載の治療方法での使用に適切であるか否かを評価するためのバイオマーカーとして、患者における悪性細胞の存在またはレベルを判定するための診断目的で抗体を使用し得る。細胞への抗体の結合を評価するために、抗体を直接的または間接的の何れかで標識し得る。間接的に標識される場合、標識化二次抗体が一般的に添加される。

30

【0121】

抗体がエピトープ領域内で結合するか否かの判定は、当業者にとって公知のように行い得る。このようなマッピング/特徴評価方法の一例として、抗CD73抗体に対するエピトープ領域は、CD73タンパク質における露出アミン/カルボキシルの化学修飾を用いて、エピトープ「フットプリンティング」により決定され得る。このようなフットプリンティング技術のある具体例は、H X M S（質量分析により検出される水素-重水素交換）の使用であり、ここで受容体およびリガンドタンパク質アミドプロトンの水素/重水素交換、結合および逆交換が起こり、タンパク質結合に関与する骨格アミド基は、逆交換から保護され、したがって重水素化されたままとなる。関連領域は、この点でペプシン性のタンパク質分解、ファストマイクロボア高速液体クロマトグラフィー分離および/またはエレクトロスプレーイオン化質量分析により同定され得る。例えば、Ehring H, *Analytical Biochemistry*, Vol. 267 (2) pp. 252-259 (1999) Engen, J. R. および Smith, D. L. (2001) *Anal. Chem.* 73, 256A-265Aを参照。適切なエピトープ同定技術の別の例は核磁気共鳴エピトープマッピング (NMR) であり、一般的には遊離抗原および抗体などの抗原結合ペプチドと複合体形成する抗原の二次元NMRスペクトルにおけるシグナルの

40

50

位置を比較する。抗原は、一般的には、15Nで選択的に同位体標識され、抗原に対応するシグナルのみがNMR - スペクトルで見られ、抗原結合ペプチドからのシグナルが見られないようになる。抗原結合ペプチドとの相互作用に關与するアミノ酸由来の抗原シグナルは一般的に、遊離抗原のスペクトルと比較して、複合体のスペクトルにおいて位置をシフトさせ、結合に關与するアミノ酸はそのように同定され得る。例えばErnst Schering Res Found Workshop, 2004; (44): 149 - 67; Huangら、Journal of Molecular Biology, Vol. 281 (1) pp. 61 - 67 (1998); およびSaitoおよびPatterson, Methods, 1996 Jun; 9 (3): 516 - 24を参照。

【0122】

エピトープマッピング / 特徴評価は質量分析方法を用いて行うこともできる。例えば、Downard, J Mass Spectrom. 2000 Apr; 35 (4): 493 - 503 およびKisselarおよびDownard, Anal Chem. 1999 May 1; 71 (9): 1792 - 1801を参照。プロテアーゼ消化技術もエピトープマッピングおよび同定との関連で有用であり得る。抗原性決定基関連領域 / 配列は、プロテアーゼ消化によって、例えばCD73に対して約1:50の比率でトリプシンを使用することによって、またはpH7 - 8でo/n消化を使用することによって、続いてペプチド同定のために質量分析(MS)を行うことによって決定し得る。続いて、抗CD73結合物によりトリプシン切断から保護されるペプチドは、トリプシン消化に供した試料および抗体と温置し、続いて例えばトリプシン(それにより結合物に対するフットプリントが明らかにになる)による消化に供した試料の比較により同定し得る。キモトリプシン、ペプシンなどの他の酵素も、またはあるいは同様のエピトープ特徴評価方法で使用し得る。さらに、酵索性消化によって、可能性のある抗原性決定基配列が表面に露出していない、したがっておそらく免疫原性 / 抗原性について関連がないと思われるCD73ポリペプチドの領域内にあるか否かを分析するための迅速な方法が提供され得る。

【0123】

部位特異的突然変異誘発は、結合エピトープを明らかにするのに有用な別の技術である。例えば、「アラニンスキヤニング」において、タンパク質セグメント内の各残基をアラニン残基で置き換え、結合親和性に対する結果を測定する。突然変異が結合親和性の顕著な低下につながる場合、おそらく結合に關与すると思われる。構造エピトープに特異的なモノクローナル抗体(すなわち、折り畳まれていないタンパク質に結合しない抗体)を使用して、アラニン置換がタンパク質の全体的な折り畳みに影響しないことを確認し得る。例えば、ClacksonおよびWells, Science 1995; 267: 383 - 386; およびWells, Proc Natl Acad Sci USA 1996; 93: 1 - 6を参照。

【0124】

エピトープ「フットプリンティング」のために電子顕微鏡も使用し得る。例えば、Wangら、Nature 1992; 355: 275 - 278は、低温電子顕微鏡、三次元画像再構成およびX結晶学の同時適用を使用して、ネイティブササゲモザイクウイルスのキャプシド表面上のFab断片の物理学的フットプリントを決定した。

【0125】

エピトープ評価のための「標識不含」アッセイの他の形態としては、表面プラズモン共鳴(SPR、BIACORE)および反射型干渉分光法(RiFS)が挙げられる。例えば、Faegerstamら、Journal Of Molecular Recognition 1990; 3: 208 - 14; Niceら、J. Chromatogr. 1993; 646: 159 - 168; Leipertら、Angew. Chem. Int. Ed. 1998; 37: 3308 - 3311; Kroegerら、Biosensors and Bioelectronics 2002; 17: 937 - 944を参照。

【0126】

ある抗体と同じであるかまたは実質的に同じであるエピトープに結合する抗体が本明細書

10

20

30

40

50

中に記載の代表的な競合アッセイのうち1つ以上で同定され得ることも注意すべきである。

【0127】

脊椎動物または細胞での免疫付与および抗体産生時に、主張されるような抗体を単離するために特定の選択段階を行い得る。この点において、具体的な実施形態において、本開示はまた、このような抗体を作製する方法にも関し、この方法は、(a) CD73ポリペプチドを含む免疫原で非ヒト哺乳動物に免疫付与し；(b) 前記の免疫付与動物から抗体を調製し；(c) CD73に結合可能な抗体を段階(b)から選択することを含む。

【0128】

一般的には、本明細書中で提供される抗CD73抗体の、CD73ポリペプチド(例えばCD73ホモ二量体として)に対する親和性は、約 $10^4 \sim 10^{11} \text{ M}^{-1}$ (例えば、約 $10^8 \sim 10^{10} \text{ M}^{-1}$)の範囲である。例えば、特定の態様において、本開示は、例えば表面プラズモン共鳴(SPR)スクリーニング(BIAcore(商標)SPR分析装置での分析によるなど)で決定した場合、CD73に関して平均解離定数(KD)が $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 未満である抗CD73抗体を提供する。より特定の代表的な態様において、本開示は、CD73に対してKDが約 $1 \times 10^{-8} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-10} \text{ M}$ または約 $1 \times 10^{-9} \text{ M} \sim 1 \times 10^{-11} \text{ M}$ である抗CD73抗体を提供する。

【0129】

抗体は、例えば、約100、60、10、5または1ナノモル濃度を超えない(すなわちより良好な親和性)、好ましくはナノモル濃度より小さいかまたは任意選択により約500、200、100または10ピコモル濃度を超えない平均KDを特徴とし得る。KDは、例えば組み換え産生ヒトCD73タンパク質をチップ表面上に固定化し、続いて、溶液中の試験しようとする抗体を適用することによって決定し得る。ある実施形態において、本方法は、CD73への結合について抗体11E1、8C7、3C12または6E1と競合可能である抗体を(b)から選択する、段階(d)をさらに含む。

【0130】

実施形態の何れかのある態様において、本方法に従い調製される抗体はモノクローナル抗体である。別の態様において、本明細書中の方法に従い抗体を作製するために使用される非ヒト動物は、哺乳動物、例えば、げっ歯類、ウシ、ブタ、家禽、ウマ、ウサギ、ヤギまたはヒツジなどである。

【0131】

CD73ポリペプチド上に存在するエピトープに結合する抗体をコードするDNAをハイブリドーマから単離し、適切な宿主への遺伝子移入のために適切な発現ベクターに入れる。次いで、抗体またはそれらの変異体、例えばそのモノクローナル抗体のヒト化バージョン、抗体の活性断片、抗体の抗原認識部分を含むキメラ抗体または検出可能部分を含むバージョンの組み換え産生のために宿主を使用する。

【0132】

本開示のモノクローナル抗体をコードするDNA、例えば、抗体11E1、8C7、3C12または6E1は、従来の手順を使用して、容易に単離し、配列決定し得る(例えば、マウス抗体の重および軽鎖をコードする遺伝子に特異的に結合可能なオリゴヌクレオチドプローブを用いることによる)。ある態様において、本明細書中の何れかの実施形態の抗CD73抗体の重鎖または軽鎖をコードする核酸が提供される。単離したら、DNAを発現ベクターに入れ得、次いで、組み換え宿主細胞においてモノクローナル抗体の合成を得るために、これを、そのままでは免疫グロブリンタンパク質を産生しない、E. コリ(E. coli)細胞、サルCOS細胞、チャイニーズハムスター卵巣(CHO)細胞または骨髓腫細胞などの宿主細胞に遺伝子移入する。本明細書中の他所に記載されるように、多数の目的の何れかのために、例えば抗体をヒト化する、断片もしくは誘導体を作製するために、または例えば抗体の結合特異性を最適化するために抗原結合部位において抗体の配列を修飾するために、このようなDNA配列を修飾し得る。ある実施形態において、抗体(例えば11E1、8C7、3C12または6E1)の軽鎖および/または重鎖をコードする単離核酸配列ならびに(例えばそのゲノムにおいて)このような核酸を含む組み換え

10

20

30

40

50

宿主細胞が提供される。抗体をコードするDNAの細菌中の組み換え発現は、当技術分野で周知である（例えば、Skerraら、Curr. Opin. Immunol., 5, pp. 256 (1993); および Pluckthun, Immunol. 130, p. 151 (1992)を参照）。

【0133】

任意選択により、本開示の抗体は、抗体7G2 (Life Technologies Corp.)、抗体4G4 (Abcam, product ref. ab81720)、抗体AD2 (Biolegend Corp, product ref. 344004)、抗体1E9 (Santa Cruz Biotechnology Corp., product sc-32299)、米国特許出願第2014/0235833号明細書に記載の067-213抗体、Sachsenmeierら((2012) J. Biomed. Screening 17:993-998および/またはRustら(2013) Mol. Cancer 12:11で言及される抗CD73抗体またはHuangら(2015) AACR Annual meeting; Abstract 1538で言及される抗体MED19447 (Medimmune Corp, Gaithersburg MD) または前出のものの誘導体、例えば抗原結合領域または重および/または軽鎖CDRの全体または一部を含むものの何れか1つ以上以外の抗体であると規定され得る。他の実施形態において、上述の抗体は、抗体の性質に依存して、本開示の抗体の特徴を有するように修飾され得る。

【0134】

CD73に結合可能であり、および/または他の所望の特性を有することが可能な抗体が同定されたら、一般的には、これらの、無関係なポリペプチドを含む他のポリペプチドへの結合能について、本明細書中に記載のものを含む標準的な方法を使用してこれらも評価する。理想的には、本抗体はかなりの親和性でCD73にのみ結合し、無関係のポリペプチドまたは5'-ヌクレオチダーゼファミリーの他のポリペプチドに対して顕著なレベルで結合しない。しかし、当然のことながら、CD73に対する親和性が他の無関係なポリペプチドに対する親和性よりも実質的に大きい限り（例えば、10x、100x、500x、1000x、10,000xまたはそれ以上）、抗体は、本方法での使用に適切である。

【0135】

ある実施形態において、抗CD73抗体は、それらがヒトFc受容体、例えばCD16A、CD16B、CD32A、CD32Bおよび/またはCD64の何れか1つ以上、に対して実質的な特異的結合を有さないように調製し得る。このような抗体は、Fc受容体に結合しないことが知られている様々な重鎖の定常領域を含み得る。あるこのような例は、野生型ヒトIgG4定常領域（IgG4は最小のFc受容体結合を有する）である。ヒトIgG4定常領域は、Fabアーム交換を防ぐことによって、インビボでの二価結合能を保持するために、S228P (S241P) 置換)を安定化することをさらに含み得る。あるいは、F(ab')₂断片など、定常領域を含まない（またはその一部を含む）抗体断片は、Fc受容体結合を回避するために使用し得る。Fc受容体結合は、例えばBIACOREアッセイにおいてFc受容体タンパク質への抗体の結合を試験することを含む、当技術分野で公知の方法に従い評価し得る。また、一般に、Fc受容体への結合を最小化するかまたは排除するために（例えば1、2、3、4、5個またはそれ以上のアミノ酸置換を導入することにより）Fc部分が修飾されている何れかの抗体IgGアイソタイプを使用し得る（例えば、開示が参照により本明細書中に組み込まれる、国際公開第03/101485号パンフレットを参照）。Fc受容体結合を評価するための、細胞に基づくアッセイなどのアッセイは、当技術分野で周知であり、例えば国際公開第03/101485号パンフレットに記載されている。

【0136】

ある実施形態において、本抗体は、エフェクター細胞との相互作用が最小限である「Fcサイレント」抗体を生じさせる、Fc領域における1個以上の特異的な突然変異を含み得る。抑制化エフェクター機能は、抗体のFc領域における突然変異によって得られ得、当

10

20

30

40

50

技術分野に記載されている：N 2 9 7 A 突然変異、L A L A 突然変異、(S t r o h l , W . , 2 0 0 9 , C u r r . O p i n . B i o t e c h n o l . v o l . 2 0 (6) : 6 8 5 - 6 9 1) ; および D 2 6 5 A (B a u d i n o ら、2 0 0 8 , J . I m m u n o l . 1 8 1 : 6 6 6 4 - 6 9)、H e u s s e r ら、国際公開第 2 0 1 2 / 0 6 5 9 5 0 号パンフレットを参照するが、これらの開示は参照により本明細書中に組み込まれる。ある実施形態において、抗体は、ヒンジ領域において 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸置換を含む。ある実施形態において、本抗体は、I g G 1 または I g G 2 であり、残基 2 3 3 - 2 3 6、任意選択により 2 3 3 ~ 2 3 8 (E U 付番) で 1、2 または 3 個の置換を含む。ある実施形態において、本抗体は I g G 4 であり、残基 3 2 7、3 3 0 および / または 3 3 1 (E U 付番) で 1、2 または 3 個の置換を含む。サイレント F c I g G 1 抗体の例は、I g G 1 F c アミノ酸配列において L 2 3 4 A および L 2 3 5 A 突然変異を含む L A L A 突然変異体である。F c サイレント突然変異の別の例は、例えば D A P A (D 2 6 5 A、P 3 2 9 A) 突然変異として I g G 1 抗体において使用される場合の、残基 D 2 6 5 での、または D 2 6 5 および P 3 2 9 での突然変異である (米国特許第 6 , 7 3 7 , 0 5 6 号明細書)。別のサイレント I g G 1 抗体は、残基 N 2 9 7 (例えば N 2 9 7 A、N 2 9 7 S 突然変異) で突然変異を含み、その結果、アグリコシル化 / 非グリコシル化抗体が生じる。他のサイレント突然変異としては、残基 L 2 3 4 および G 2 3 7 での置換 (L 2 3 4 A / G 2 3 7 A) ; 残基 S 2 2 8、L 2 3 5 および R 4 0 9 での置換 (S 2 2 8 P / L 2 3 5 E / R 4 0 9 K、T、M、L) ; 残基 H 2 6 8、V 3 0 9、A 3 3 0 および A 3 3 1 での置換 (H 2 6 8 Q / V 3 0 9 L / A 3 3 0 S / A 3 3 1 S) ; 残基 C 2 2 0、C 2 2 6、C 2 2 9 および P 2 3 8 での置換 (C 2 2 0 S / C 2 2 6 S / C 2 2 9 S / P 2 3 8 S) ; 残基 C 2 2 6、C 2 2 9、E 2 3 3、L 2 3 4 および L 2 3 5 (C 2 2 6 S / C 2 2 9 S / E 2 3 3 P / L 2 3 4 V / L 2 3 5 A での置換 ; 残基 K 3 2 2、L 2 3 5 および L 2 3 5 での置換 (K 3 2 2 A / L 2 3 4 A / L 2 3 5 A) ; 残基 L 2 3 4、L 2 3 5 および P 3 3 1 での置換 (L 2 3 4 F / L 2 3 5 E / P 3 3 1 S) ; 残基 2 3 4、2 3 5 および 2 9 7 での置換 ; 残基 E 3 1 8、K 3 2 0 および K 3 2 2 での置換 (L 2 3 5 E / E 3 1 8 A / K 3 2 0 A / K 3 2 2 A) ; 残基 (V 2 3 4 A、G 2 3 7 A、P 2 3 8 S) での置換 ; 残基 2 4 3 および 2 6 4 での置換 ; 残基 2 9 7 および 2 9 9 での置換 ; E U 付番系により定義される残基 2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 3 7 および 2 3 8 が P A A A P、P A A A S および S A A A S から選択される配列を含むような置換 (国際公開第 2 0 1 1 / 0 6 6 5 0 1 号パンフレットを参照) が挙げられる。

【 0 1 3 7 】

F c サイレント抗体により A D C C 活性がなくなるかまたは低くなり、これは、F c サイレント抗体が、5 0 % を下回る特異的細胞溶解である A D C C 活性を示すことを意味する。好ましくは、抗体は、実質的に A D C C 活性を欠き、例えば F c サイレント抗体は、5 % を下回るかまたは 1 % を下回る A D C C 活性 (特異的細胞溶解) を示す。F c サイレント抗体の結果また、C D 7 3 発現面での C D 7 3 の F c R 介在性の架橋が欠如し得る。

【 0 1 3 8 】

ある実施形態において、本抗体は、重鎖定常領域において、2 2 0、2 2 6、2 2 9、2 3 3、2 3 4、2 3 5、2 3 6、2 3 7、2 3 8、2 4 3、2 6 4、2 6 8、2 9 7、2 9 8、2 9 9、3 0 9、3 1 0、3 1 8、3 2 0、3 2 2、3 2 7、3 3 0、3 3 1 および 4 0 9 (重鎖定常領域での残基の付番は K a b a t に従う E U 付番によるものである) からなる群から選択される、何れか 1、2、3、4、5 個またはそれ以上の残基で置換を有する。ある実施形態において、本抗体は、残基 2 3 4、2 3 5 および 3 2 2 で置換を含む。ある実施形態において、本抗体は、残基 2 3 4、2 3 5 および 3 3 1 で置換を有する。

【 0 1 3 9 】

ある実施形態において、F c サイレント抗体は、残基 2 3 4、2 3 5 および 3 3 1 でアミノ酸置換を含む F c ドメインを含み、例えば「T M」突然変異は、置換 L 2 3 4 F、L 2 3 5 E および P 3 3 1 S を有する。ある実施形態において、本抗体は、米国特許出願第 2 0 1 5 / 0 1 2 5 4 4 4 号明細書に記載の、残基 2 3 4、2 3 5 および 3 2 2 で、または

10

20

30

40

50

残基 234、235 および 331 でアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含み、ここで残基 234 は F (フェニルアラニン) ; 残基 235 はアラニン (A)、アスパラギン (N)、フェニルアラニン (F)、グルタミン (Q) またはバリン (V) ; 残基 322 はアラニン (A)、アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)、ヒスチジン (H)、アスパラギン (N) またはグルタミン (Q) ; および残基 331 はアラニン (A) またはグリシン (G) である。アミノ酸残基は K a b a t に従う E U 付番に従い示される。

【0140】

ある実施形態において、本抗体は、抗体のインビボ半減期を延長させるためにヒト Fc R n ポリペプチドへの結合を増加させるアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。代表的な突然変異は、Stroh l, W., 2009, Curr. Opin. Biotechnol. vol. 20 (6) : 685 - 691 に記載され、その開示は参照により本明細書中に組み込まれる。ヒト Ig G 1 アイソタイプの抗体で使用される置換の例は、残基 M252、S254 および T256 での置換 ; 残基 T250 および M428 での置換 ; 残基 N434 での置換 ; 残基 H433 および N434 での置換 ; 残基 T307、E380 および N434 での置換 ; 残基 T307、E380 および N434 での置換 ; 残基 M252、S254、T256、H433、N434 および 436 での置換 ; 残基 I253 での置換 ; 残基 P257、N434、D376 および N434 での置換である。

【0141】

ある実施形態において、本抗体は、プロテアーゼによる切断への感受性低下をもたらすアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。マトリクスメタロプロテイナーゼ (MMP) は、腫瘍発生と関連するプロテイナーゼの最も代表的なファミリーに相当する。癌細胞が MMP を発現し得る一方で、細胞外 MMP の大部分は、腫瘍に浸潤し、特異的な一連のプロテイナーゼおよびプロテイナーゼ阻害剤をそれぞれ産生する様々なタイプの間質細胞により提供され、産生されたものは、細胞外間隙に放出され、腫瘍周囲の環境を特異的に変化させる。腫瘍微小環境に存在する MMP は、ヒンジ領域内で抗体を切断し得るので、腫瘍部位内で機能するように設計されている治療用抗体の不活性化につながり得る。ある実施形態において、アミノ酸置換を含む Fc ドメインは、GluV8、IdeS、ゼラチナーゼ A (MMP2)、ゼラチナーゼ B (MMP-9)、マトリクスメタロプロテイナーゼ-7 (MMP-7)、ストロメリシン (MMP-3) およびマクロファージエラスターゼ (MMP-12) からなる群から選択されるプロテアーゼの何れか 1、2、3 個またはそれ以上 (または全て) による切断に対する感受性が低下している。ある実施形態において、切断に対する感受性が低下した抗体は、残基 E233 - L234 および / または L235 でのアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。ある実施形態において、本抗体は、残基 E233、L234、L235 および G236 でアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。ある実施形態において、本抗体は、例えば、E233 - L234 - L235 - G236 配列が P233 - V234 - A235 により置換される (G236 が欠失している) ように、1 個以上の残基 233 ~ 238 でのアミノ酸置換を含む Fc ドメインを含む。例えば、開示が参照により本明細書中に組み込まれる、国際公開第 99 / 58572 号パンフレットおよび同第 2012087746 号パンフレットを参照。

【0142】

抗原結合化合物は、CD73 の酵素活性を阻害する、とりわけ CD73 の 5' - ヌクレオチダーゼ活性を遮断する、および CD73 発現細胞による アデノシン 産生を減少させ、次にリンパ球の活性を回復させ、および / またはリンパ球のアデノシン介在性の阻害を緩和する、その能力について何らかの所望の段階で評価し得る。

【0143】

組み換え可溶性ヒト CD73 (二量体として) および AMP を用いた細胞不含アッセイにおいて、抗体が CD73 の酵素活性を阻害する能力を試験し得、ここで AMP から アデノシン への変換 (および / またはその阻害) を直接 (例えば基質および生成物、すなわち AMP、アデノシン および / またはリン酸の測定による) または間接的に検出する。一例において、AMP および / またはアデノシンは、組み換え CD73 との試験化合物の温置前

10

20

30

40

50

後にHPLCを介して検出される。組み換えCD73は、例えばR&D Systems (Minneapolis, MN) から入手可能である。

【0144】

抗体の阻害活性(すなわち細胞傷害性促進能)は、多くの他の方法の何れかでも評価し得る。例えば、間接的アッセイにおいて、AMPの消失を検出するために、ルシフェラーゼに基づく試薬を使用する(例えばPromegaから入手可能なCellTiter-Glo(商標)システム)。このアッセイにおけるルシフェラーゼ反応は、AMPにより阻害される。反応系にCD73酵素を添加することによって、AMPが分解され、阻害が緩和され、検出可能なシグナルが生じる(本明細書中の実施例2参照)。

【0145】

可溶性CD73を使用するアッセイは、CD73ポリペプチド二量体に対してかなりのモル過剰量(例えば10倍、20倍、50倍、100倍など)で抗体が提供される条件で試験することを含む。酵素に対してモル過剰量で提供される場合、抗CD73抗体は、抗体およびCD73二量体の多量体の複合体を形成できなくなり; CD73の酵素活性の阻害を保持する抗体が選択され得る。

【0146】

抗体がCD73の5'-エクトヌクレオチダーゼ酵素活性を阻害する能力は、あるいはまたはさらに、細胞アッセイ(CD73を発現する細胞を使用)でも試験し得る。有利に、CD73の内部移行を引き起こすことによりCD73を阻害する抗体を選択する可能性を低下させるため、酵素の活性を遮断する抗体を同定するために最初に細胞不含アッセイにおいて抗体を試験またはスクリーニングし得、次いで細胞アッセイにおいて精製抗体として試験し得る。細胞アッセイは、本明細書中の実施例で示されるように行い得る。例えば、CD73発現細胞株(例えばMDA-MB-231細胞株)を抗CD73抗体の存在下で平底96ウェルプレートに播種し、温置する。AMPを細胞に添加し、4で温置する(CD73下方調整を回避するため)。次いでプレートを遠心し、上清を平底96ウェル培養プレートに移す。次に、AMPからアデノシンへの加水分解により生成した遊離リン酸を定量する。抗体存在下でのAMPからアデノシンへの加水分解の減少は、その抗体が細胞性CD73を阻害することを示す。

【0147】

ある実施形態において、抗体標品は、CD73ポリペプチドの酵素活性の少なくとも50%の低下、好ましくは、CD73ポリペプチドの酵素活性の、少なくとも60%、70%または80%の低下を引き起こす(例えば可溶性ホモ二量体CD73ポリペプチド; 細胞により発現されるCD73)。

【0148】

抗体の活性は、リンパ球の活性を調整する、例えばリンパ球活性のアデノシン介在性阻害を緩和するかまたはリンパ球活性の活性化を引き起こす、その能力について、間接的アッセイでも測定し得る。これは、例えばサイトカイン放出アッセイを用いて対処し得る。別の例において、間接的アッセイにおいて、リンパ球の増殖を調整する能力について抗体を評価し得る。

【0149】

本抗体は、CD73を内部移行させるかまたはCD73の下方調整を誘導するその能力、例えば細胞表面からのCD73の内部移行またはCD73脱落誘導によるか否かについて試験し得る。哺乳動物細胞上でのCD73への結合時に抗CD73抗体が内部移行するか否かまたはCD73ポリペプチドが(例えば抗体により結合されているとき)細胞内内部移行されるか否かは、本明細書中の実験例(例えば実施例7)に記載のものを含む様々なアッセイにより決定し得る。他の例において、インビボで内部移行を試験するために、試験抗体を標識し、ある一定の細胞表面上でCD73が発現されることが知られている動物に導入する。本抗体は、放射性標識し得るかまたは例えば蛍光もしくは金粒子で標識し得る。このアッセイに適切な動物としては、哺乳動物、例えばヒトCD73発現腫瘍移植片もしくは異種移植片を含有するヌードマウスまたはヒトCD73を遺伝子移入された細胞

10

20

30

40

50

が導入されているマウスまたはヒトCD73導入遺伝子を発現するトランスジェニックマウスなどが挙げられる。適切な対照としては、試験抗体を与えられなかったか、または無関係の抗体を与えられた動物、および、抗原への結合時に内部移行されることが知られている、関心のある細胞上の別の抗原に対する抗体を与えられた動物が挙げられる。本抗体は、動物に、例えば静脈内注射によって投与し得る。適切な時間間隔で、公知の方法を使用して、または下記実験例に記載のように、動物の組織切片を調製し、内部移行ならびに細胞における内部移行抗体の位置について、光学顕微鏡または電子顕微鏡により分析し得る。インビトロでの内部移行について、培地に添加される関連抗体の存在下または非存在下で組織培養皿において細胞を温置し、所望の時点で顕微鏡分析のために処理し得る。細胞中の内部移行した標識化抗体の存在は、顕微鏡によって、または放射線標識抗体を使用する場合はオートラジオグラフィーによって、直接可視化し得る。任意選択により、顕微鏡において、公知のポリペプチドまたは他の細胞構成成分との共局在を評価し得；例えばエンドソーム/リソソームマーカーLAMP-1(CD107a)との共局在は、内部移行抗体の細胞内局在に関する情報を提供し得る。あるいは、定量的生化学アッセイにおいて、CD73発現細胞を含む細胞集団は、インビトロまたはインビボで放射性標識試験抗体と接触させ、細胞(インビボで接触させる場合、細胞は適切な時間の後に単離される)をプロテアーゼで処理するか、または細胞表面上の非内部移行抗体を除去するために酸洗浄に供する。細胞を破碎し、ホモジェネートをシンチレーションカウンターに通すことによって細胞の各バッチと会合するプロテアーゼ耐性の、放射性カウント/分(cpm)の量を測定する。放射性標識抗体の既知の比活性に基づき、細胞あたりの内部移行抗体分子数を破碎細胞のシンチレーションカウントから推定し得る。培養皿またはフラスコ中の細胞培養液に細胞を添加し、抗体を培地とよく混合して確実に細胞を抗体に均一に曝露することなどによって、細胞をインビトロ、好ましくは溶液形態の抗体と「接触」させる。

【0150】

抗体エピトープ

ある態様において、本抗体は、可溶性CD73および細胞表面で発現されるCD73の両方の上に存在する共通の抗原性決定基と結合する。

【0151】

ある態様において、本抗体は、抗体11E1、8C7、3C12または6E1と実質的に同じエピトープと結合する。ある実施形態において、本抗体は、抗体11E1、8C7、3C12または6E1が結合するエピトープ中の少なくとも1個の残基と少なくとも部分的に重複するかまたはこれを含むCD73のエピトープに結合する。本抗体が結合する残基は、CD73ポリペプチドの表面上に、例えば細胞表面上で発現されるCD73ポリペプチドに存在するものとして特定され得る。本抗体が結合するCD73上のアミノ酸残基は、例えば表1で列挙される残基からなる群から選択され得る。

【0152】

CD73突然変異体が遺伝子移入された細胞への抗CD73抗体の結合を測定し、抗CD73抗体の、野生型CD73ポリペプチド(例えば配列番号1または2)への結合能を比較し得る。抗CD73抗体と突然変異体CD73ポリペプチド(例えば表1の突然変異体CD73)との間の結合の減少は、結合親和性の低下(例えば、特定の突然変異体を発現する細胞のこのようなFACS試験の公知の方法によって、または突然変異体ポリペプチドへの結合のBiacore試験によって測定される場合)および/または抗CD73抗体の総結合能の低下(例えば、抗CD73抗体濃度対ポリペプチド濃度のプロットでのBmaxの低下により明らかにされる場合)があることを意味する。結合の顕著な減少は、突然変異した残基が抗CD73抗体への結合に直接関与するか、または抗CD73抗体がCD73と結合するときに結合タンパク質に対して近接近していることを示す。

【0153】

いくつかの実施形態において、結合の顕著な減少は、抗体と野生型CD73ポリペプチドとの間の結合と比較して、抗CD73抗体と突然変異体CD73ポリペプチドとの間の結合親和性および/または結合能が、40%超、50%超、55%超、60%超、65%超

10

20

30

40

50

、 70 % 超、 75 % 超、 80 % 超、 85 % 超、 90 % または 95 % 超低下することを意味する。ある一定の実施形態において、結合が検出限界を下回って減少する。いくつかの実施形態において、突然変異体 C D 7 3 ポリペプチドへの抗 C D 7 3 抗体の結合が、抗 C D 7 3 抗体と野生型 C D 7 3 ポリペプチドとの間で観察される結合の 50 % 未満（例えば 45 %、40 %、35 %、30 %、25 %、20 %、15 % または 10 % 未満）であるとき、結合の顕著な減少が明らかになる。

【 0 1 5 4 】

いくつかの実施形態において、抗体 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 または 6 E 1 が結合するアミノ酸残基を含むセグメント中の残基が異なるアミノ酸で置換される突然変異体 C D 7 3 ポリペプチドに対して顕著に低い結合を示す抗 C D 7 3 抗体が提供される。ある実施形態において、野生型 C D 7 3 ポリペプチド（例えば配列番号 1 のポリペプチド）への結合と比較して、突然変異体は、表 1 の突然変異体 1 ~ 15 から選択される突然変異体、例えば、突然変異体 3、またはこのような突然変異体 3 のアミノ酸置換のうち 1 個以上を含む突然変異体である。

10

【 0 1 5 5 】

任意選択により、突然変異体 1 ~ 15 のうち 1 つ以上の突然変異体への結合を喪失する抗体は、表 1 の 1 つ以上の他の突然変異体 C D 7 3 ポリペプチド、例えば突然変異体 2、5、6 または 7 のうち 1 つ以上（または全て）に対して顕著に低い結合を示さない。

【 0 1 5 6 】

ある態様において、抗 C D 7 3 抗体は、A 9 9、E 1 2 9、K 1 3 3、E 1 3 4 および A 1 3 5（配列番号 1 に対する）からなる群から選択される残基で突然変異を有する C D 7 3 ポリペプチドへの結合が減少しており；任意選択により、突然変異体 C D 7 3 ポリペプチドは突然変異：A 9 9 S、E 1 2 9 A、K 1 3 3 A、E 1 3 4 N および A 1 3 5 S を有する。

20

【 0 1 5 7 】

任意選択により、ある態様において、抗 C D 7 3 抗体は、Q 7 0、R 7 3、A 7 4、A 1 0 7 および R 1 0 9（配列番号 1 に対する）からなる群から選択される残基で突然変異を有する C D 7 3 ポリペプチドへの結合が減少しておらず；任意選択により、突然変異体 C D 7 3 ポリペプチドは、突然変異：A 9 9 S、Q 7 0 S、R 7 3 A、A 7 4 E、A 1 0 7 I および R 1 0 9 G を有する。

30

【 0 1 5 8 】

ある態様において、抗 C D 7 3 抗体は、A 9 9、E 1 2 9、K 1 3 3、E 1 3 4 および A 1 3 5（配列番号 1 に対する）からなる群から選択される残基のうち 1、2、3、4 または 5 個を含む C D 7 3 上のエピトープに結合する。

【 0 1 5 9 】

任意選択により、ある態様において、抗 C D 7 3 抗体は、Q 7 0、R 7 3、A 7 4、A 1 0 7 および R 1 0 9（配列番号 1 に対する）からなる群から選択される残基のうち 1、2、3、4 または 5 個を含む C D 7 3 上のエピトープに結合しない。

【 0 1 6 0 】

抗体 C D R 配列

40

抗体 1 1 E 1

抗体 1 1 E 1 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 3 として記載し、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 4 として記載する。具体的な実施形態において、本開示は、モノクローナル抗体 1 1 E 1 と同じエピトープまたは決定基と基本的に結合する抗体を提供し；任意選択により、本抗体は、抗体 1 1 E 1 の超可変領域を含む。本明細書中での実施形態の何れかにおいて、抗体 1 1 E 1 は、そのアミノ酸配列および/またはそれをコードする核酸配列を特徴とし得る。ある実施形態において、本モノクローナル抗体は、1 1 E 1 の F a b または F (a b ')₂ 部分を含む。1 1 E 1 の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体も提供される。ある実施形態によれば、本モノクローナル抗体は、1 1 E 1 の重鎖可変領域の 3 個の C D R を含む。1 1 E 1 の可変軽鎖可変領域または 1 1 E 1 の軽鎖可変領

50

域の C D R のうち 1、2 または 3 個をさらに含むモノクローナル抗体も提供される。任意選択により、その軽または重鎖 C D R のうち何れか 1 つ以上は、1、2、3、4 もしくは 5 個またはそれ以上のアミノ酸修飾（例えば置換、挿入または欠失）を含有し得る。任意選択により、抗体 1 1 E 1 の抗原結合領域の一部または全てを含む軽および/または重鎖可変領域の何れかが、ヒト I g G 型の免疫グロブリン定常領域、任意選択によりヒト定常領域、任意選択によりヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 アイソタイプと融合され、任意選択により、エフェクター機能（ヒト F c 受容体への結合）を低下させるためにアミノ酸置換をさらに含む抗体が提供される。

【0161】

別の態様において、本開示は、表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 1 1 E 1 の H C D R 1 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 1 1 E 1 の H C D R 2 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 1 1 E 1 の H C D R 3 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 1 1 E 1 の L C D R 1 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 1 1 E 1 の L C D R 2 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 1 1 E 1 の L C D R 3 領域であって、任意選択により、これらのアミノ酸のうち 1 個以上が欠失され得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。H C D R 1、2、3 および L C D R 1、2、3 配列は、任意選択により、全てが（またはそれぞれ、独立に）K a b a t 付番系（各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のもの、C h o t i a 付番系各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のもの、I M G T 付番系各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のものまたは何らかの他の適切な付番系のものとして特定され得る。

【0162】

抗体 6 E 1

抗体 6 E 1 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 2 1 として記載し、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 2 2 として記載する。具体的な実施形態において、本開示は、モノクローナル抗体 6 E 1 と同じエピトープまたは決定基と基本的に結合する抗体を提供し；任意選択により本抗体は、抗体 6 E 1 の超可変領域を含む。本明細書中での実施形態の何れかにおいて、抗体 6 E 1 は、そのアミノ酸配列および/またはそれをコードする核酸配列を特徴とし得る。ある実施形態において、本モノクローナル抗体は、6 E 1 の F a b または F (a b ')₂ 部分を含む。6 E 1 の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体も提供される。ある実施形態によれば、本モノクローナル抗体は、6 E 1 の重鎖可変領域の 3 個の C D R を含む。6 E 1 の可変軽鎖可変領域または 6 E 1 の軽鎖可変領域の C D R のうち 1、2 または 3 個をさらに含むモノクローナル抗体も提供される。任意選択により、その軽または重鎖 C D R の何れか 1 つ以上は、1、2、3、4 もしくは 5 個またはそれ以上のアミノ酸修飾（例えば置換、挿入または欠失）を含有し得る。任意選択により、抗体 6 E 1 の抗原結合領域の一部または全てを含む軽および/または重鎖可変領域の何れかが、ヒト I g G 型の免疫グロブリン定常領域、任意選択によりヒト定常領域、任意選択によりヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 アイソタイプと融合され、任意選択により、エフェクター機能（ヒト F c 受容体への結合）を低下させるためにアミノ酸置換をさらに含む抗体が提供される。

【 0 1 6 3 】

別の態様において、本開示は、表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 6 E 1 の H C D R 1 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 6 E 1 の H C D R 2 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 6 E 1 の H C D R 3 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 6 E 1 の L C D R 1 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 6 E 1 の L C D R 2 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 6 E 1 の L C D R 3 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が欠失され得るか、または異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。H C D R 1、2、3 および L C D R 1、2、3 配列は任意選択により、全てが（またはそれぞれ、独立に）K a b a t 付番系（各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のもの、C h o t i a 付番系各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のもの、I M G T 付番系各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のものまたは何らかの他の適切な付番系のものとして特定され得る。

【 0 1 6 4 】

抗体 3 C 1 2

抗体 3 C 1 2 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 3 6 として記載し、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 3 7 として記載する。具体的な実施形態において、本開示は、モノクローナル抗体 3 C 1 2 と同じエピトープまたは決定基と基本的に結合する抗体を提供し；任意選択により本抗体は、抗体 3 C 1 2 の超可変領域を含む。本明細書中での実施形態の何れかにおいて、抗体 3 C 1 2 は、そのアミノ酸配列および／またはそれをコードする核酸配列を特徴とし得る。ある実施形態において、本モノクローナル抗体は、3 C 1 2 の F a b または F (a b ')₂ 部分を含む。3 C 1 2 の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体も提供される。ある実施形態によれば、本モノクローナル抗体は、3 C 1 2 の重鎖可変領域の 3 個の C D R を含む。3 C 1 2 の可変軽鎖可変領域または 3 C 1 2 の軽鎖可変領域の C D R のうち 1、2 または 3 個をさらに含むモノクローナル抗体も提供される。任意選択により、その軽または重鎖 C D R の何れか 1 つ以上は、1、2、3、4 もしくは 5 個またはそれ以上のアミノ酸修飾（例えば置換、挿入または欠失）を含有し得る。任意選択により、抗体 3 C 1 2 の抗原結合領域の一部または全てを含む軽および／または重鎖可変領域の何れかが、ヒト I g G 型の免疫グロブリン定常領域、任意選択によりヒト定常領域、任意選択によりヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 アイソタイプと融合され、任意選択により、エフェクター機能（ヒト F c 受容体への結合）を低下させるためにアミノ酸置換をさらに含む抗体が提供される。

【 0 1 6 5 】

別の態様において、本開示は、表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 3 C 1 2 の H C D R 1 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 3 C 1 2 の H C D R 2 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連

続アミノ酸の配列を含む 3 C 1 2 の H C D R 3 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 3 C 1 2 の L C D R 1 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 3 C 1 2 の L C D R 2 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 3 C 1 2 の L C D R 3 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が欠失され得るか、または異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。H C D R 1、2、3 および L C D R 1、2、3 配列は任意選択により、全てが（またはそれぞれ、独立に）K a b a t 付番系（各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のもの、C h o t i a 付番系各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のもの、I M G T 付番系各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のものまたは何らかの他の適切な付番系のものとして特定され得る。

10

【0166】

抗体 8 C 7

抗体 8 C 7 の重鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 28 として記載し、軽鎖可変領域のアミノ酸配列を配列番号 29 として記載する。具体的な実施形態において、本開示は、モノクローナル抗体 8 C 7 と同じエピトープまたは決定基と基本的に結合する抗体を提供し；任意選択により、本抗体は、抗体 8 C 7 の超可変領域を含む。本明細書中での実施形態の何れかにおいて、抗体 8 C 7 は、そのアミノ酸配列および/またはそれをコードする核酸配列を特徴とし得る。ある実施形態において、本モノクローナル抗体は、8 C 7 の F a b または F (a b ')₂ 部分を含む。8 C 7 の重鎖可変領域を含むモノクローナル抗体も提供される。ある実施形態によれば、本モノクローナル抗体は、8 C 7 の重鎖可変領域の 3 個の C D R を含む。8 C 7 の可変軽鎖可変領域または 8 C 7 の軽鎖可変領域の C D R のうち 1、2 または 3 個をさらに含むモノクローナル抗体も提供される。任意選択により、その軽または重鎖 C D R の何れか 1 つ以上は、1、2、3、4 もしくは 5 個またはそれ以上のアミノ酸修飾（例えば置換、挿入または欠失）を含有し得る。任意選択により、抗体 8 C 7 の抗原結合領域の一部または全てを含む軽および/または重鎖可変領域の何れかが、ヒト I g G 型の免疫グロブリン定常領域、任意選択によりヒト定常領域、任意選択によりヒト I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 アイソタイプと融合され、任意選択により、エフェクター機能（ヒト F c 受容体への結合）を低下させるためにアミノ酸置換をさらに含む抗体が提供される。

20

30

【0167】

別の態様において、本開示は、表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 8 C 7 の H C D R 1 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 8 C 7 の H C D R 2 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 8 C 7 の H C D R 3 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 8 C 7 の L C D R 1 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 8 C 7 の L C D R 2 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上が異なるアミノ酸により置換され得るもの；表 A に規定のアミノ酸配列またはその少なくとも 4、5、6、7、8

40

50

、 9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を含む 8 C 7 の L C D R 3 領域であって、任意選択によりこれらのアミノ酸のうち 1 個以上欠失され得るかまたは異なるアミノ酸により置換され得るものを含む抗体を提供する。H C D R 1、2、3 および L C D R 1、2、3 配列は任意選択により、全てが（またはそれぞれ、独立に）K a b a t 付番系（各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のもの、C h o t t i a 付番系各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のもの、I M G T 付番系各 C D R に対して表 A で示されるとおり）のものまたは何らかの他の適切な付番系のものとして特定され得る。

【0168】

別の態様において、本開示は、

（a）配列番号 3、21、28 または 36 の重鎖可変領域の超可変領域であって、任意選択により 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換されるもの；および（b）配列番号 3、22、29 または 37 の軽鎖可変領域の超可変領域であって、任意選択により 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換されるものを含む、ヒト C D 7 3 に結合する抗体を提供する。

10

【0169】

別の態様において、本開示は、

（a）配列番号 5～7 または 30～32 のうち何れか 1 つで示されるような重鎖 C D R 1 アミノ酸配列であって、任意選択により C D R 中の 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換され得るもの；

（b）配列番号 8～10、23、24 または 33 のうち何れか 1 つで示されるような重鎖 C D R 2 アミノ酸配列であって、任意選択により C D R 中の 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換され得るもの；

20

（c）配列番号 11～13、25 または 27 のうち何れか 1 つで示されるような重鎖 C D R 3 アミノ酸配列であって、任意選択により C D R 中の 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換され得るもの；

（d）配列番号 14、15、16、34 または 35 のうち何れか 1 つで示されるような軽鎖 C D R 1 アミノ酸配列であって、任意選択により C D R 中の 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換され得るもの；

（e）配列番号 17 または 18 のうち何れか 1 つで示されるような軽鎖 C D R 2 アミノ酸配列であって、任意選択により C D R 中の 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換され得るもの；および / または

30

（f）配列番号 19 または 20 のうち何れか 1 つで示されるような軽鎖 C D R 3 アミノ酸配列であって、任意選択により C D R 中の 1、2、3 個またはそれ以上のアミノ酸が異なるアミノ酸により置換され得るもの

を含む、ヒト C D 7 3 に結合する抗体を提供する。

【0170】

本明細書中の実施形態の何れかの別の態様において、11E1、8C7、3C12 または 6E1 の重および軽鎖の C D R 1、2 および 3 の何れも、その少なくとも 4、5、6、7、8、9 もしくは 10 個の連続アミノ酸の配列を特徴とし得、および / または対応する配列番号で列挙される特定の C D R または一連の C D R と少なくとも 50%、60%、70%、80%、85%、90% または 95% 配列同一性を共有するアミノ酸配列を有することを特徴とし得る。

40

【0171】

本明細書中の実施形態の何れかのある態様において、何れの抗体も、個々の式（I）～（V）から選択される個々の式に従う、C D R 1、2 および / または 3 配列を有する重および / または軽鎖を含み得る。本明細書中の何れかの実施形態において、特定の H C D R 1～3 または L C D R - 1～3 が、個々の式（I）～（VI）の配列を有するものとして規定され得る。ある 44 好ましい実施形態において、本抗体は、3 個の L C D R を含む軽鎖および 3 個の H C D R を含む重鎖を含む。

【0172】

50

ある実施形態において、HCDR1は、式(I)のアミノ酸配列：

S - Y - N - M - Xaa₁ (配列番号38)

(式中、Xaa₁は、指定されるアミノ酸の何れかの保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であり得、任意選択によりXaa₁はY(Tyr)またはN(Asn)である)を含む。

【0173】

ある実施形態において、HCDR2は、式(IIa)のアミノ酸配列：

Y - I - D - P - Y - N - G - G - Xaa₂ - S - Y - N - Xaa₃ - Xaa₄ - F - K - G (配列番号39) またはその部分配列、例えば式(IIb)のアミノ酸配列：

Y - I - D - P - Y - N - G - G - Xaa₂ (配列番号40)

(式中、Xaa₂は、指定されるアミノ酸の何れかの保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であり得、任意選択により、Xaa₂はS(Ser)またはT(Thr)であり；式中、Xaa₃は、指定されるアミノ酸の何れかの保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であり得、任意選択によりXaa₃はQ(Gln)またはL(Leu)であり；Xaa₄は、指定されるアミノ酸の何れかの保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であり得、任意選択によりXaa₄はK(Lys)またはT(Thr)である)を含む。

【0174】

ある実施形態において、HCDR3は、式(III)のアミノ酸配列：

G - Y - Xaa₅ - N - Y - K - A - W - F - A - Y (配列番号41)

(式中、Xaa₅は、指定されるアミノ酸の何れかの保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であり得、任意選択によりXaa₅はG(Gly)またはN(Asn)である)を含む。

【0175】

ある実施形態において、LCDR1は、式(IV)のアミノ酸配列：

K - A - S - Q - S - V - Xaa₆ - N - D - V - A (配列番号42)、

(式中、Xaa₆は、指定されるアミノ酸の何れかの保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であり得、任意選択によりXaa₆は、T(Thr)またはS(Ser)である)を含む。

【0176】

ある実施形態において、LCDR2は、式(V)のアミノ酸配列：

Y - A - S - Xaa₇ - R - Y - T (配列番号43)

(式中、Xaa₇は、指定されるアミノ酸の何れかの保存的もしくは非保存的置換または欠失または挿入であり得、任意選択によりXaa₇はT(Thr)またはN(Asn)である)を含む。

【0177】

ある実施形態において、LCDR3は、配列番号19または20のアミノ酸配列を含む。

【0178】

ある実施形態において、抗体は、

- a 配列番号38のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1(HCDR1)；および/または
 - b 配列番号39(または40)のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2(HCDR2)；および/または
 - c 配列番号41のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3(HCDR3)
- を含む重鎖を含み得る。

【0179】

ある実施形態において、抗体は、

- a 配列番号42から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1(LCDR1)；および/または
- b 配列番号43のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2(LCDR2)；および/または
- c 配列番号19または20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3(LCDR3)

を含む軽鎖を含み得る。

【0180】

抗体、例えば、11E1、8C7、3C12または6E1の何れかにおいて、特定される可変領域およびCDR配列は、配列修飾、例えば置換（1、2、3、4、5、6、7、8個またはそれ以上の配列修飾）を含み得る。ある実施形態において、重および軽鎖のCDR1、2および/または3は、置換される残基が、ヒト起源の配列中に存在する残基である、1、2、3個またはそれ以上のアミノ酸置換を含む。ある実施形態において、置換は保存的修飾である。保存的配列修飾は、そのアミノ酸配列を含有する抗体の結合特性に顕著に影響しないかまたはこれを変化させないアミノ酸修飾を指す。このような保存的修飾としては、アミノ酸置換、付加および欠失が挙げられる。部位特異的突然変異誘発およびPCR介在性突然変異誘発など、当技術分野で公知の標準的技術によって、抗体に修飾を導入し得る。保存的アミノ酸置換は、一般的には、あるアミノ酸残基が、同様の物理化学的特性の側鎖を有するアミノ酸残基で置換されるものである。特定される可変領域およびCDR配列は、1、2、3、4個またはそれ以上のアミノ酸挿入、欠失または置換を含み得る。置換が行われる場合、好ましい置換は保存的修飾である。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは当技術分野で定められている。これらのファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えばグリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐状側鎖（例えばスレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）があるアミノ酸を含む。したがって、ある抗体のCDR領域内の1個以上のアミノ酸残基は、同じ側鎖ファミリーからの他のアミノ酸残基で置換され得、改変された抗体は、本明細書中に記載のアッセイを用いて、保有される機能（すなわち本明細書中に記載の特性）について試験し得る。

10

20

【0181】

IMGT、KabattおよびChothia定義系に従うCDRの配列を以下の表Aでまとめた。本抗体の可変領域の配列を以下の表Bに挙げ（リーダー配列が存在する場合、リーダー配列の終わりのすぐ後のアミノ酸位置で開始するように何らかの抗体鎖が指定され得る）、各CDRに下線を付す。本明細書中の何れかの実施形態において、シグナルペプチドまたはその何らかの部分を含むかまたは欠くように、VLまたはVH配列を指定または付番し得る。

30

【0182】

40

50

【表 1】

表A

mAb	CDR 定義	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		配列番号	配列	配列番号	配列	配列番号	配列
1E11	Kabat	5	SYNMY	8	YIDPYNGGTSYNQKFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	6	GYAFTSY	9	PYNG	12	YGNYKAWFA
	IMGT	7	GYAFTSYN	10	IDPYNGGT	13	ARGYGNYKAW FAY
6E1	Kabat	5	SYNMY	23	YIDPYNGGSSYNQKFKG	25	GYNNYKAWFAY
	Chotia	6	GYAFTSY	9	PYNG	26	YNNYKAWFA
	IMGT	7	GYAFTSYN	24	IDPYNGGS	27	ARGYNNYKAW FAY
8C7	Kabat	30	SYNMN	33	YIDPYNGGSSYNLTFFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	31	GYAFASY	9	PYNG	12	YGNYKAWFA
	IMGT	32	GYAFASYN	24	IDPYNGGS	13	ARGYGNYKAW- FAY
3C12	Kabat	30	SYNMN	33	YIDPYNGGSSYNLTFFKG	11	GYGNYKAWFAY
	Chotia	31	GYAFASY	9	PYNG	12	YGNYKAWFA
	IMGT	32	GYAFASYN	24	IDPYNGGS	13	ARGYGNYKAW- FAY
mAb	CDR 定義	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		配列番号	配列	配列番号	配列	配列番号	配列
1E11	Kabat	14	KASQSVTNDVA	17	YASNRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	15	SQSVTND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	16	QSVTND	18	YAS	19	QQDYSSLT
6E1	Kabat	14	KASQSVTNDVA	17	YASNRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	15	SQSVTND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	16	QSVTND	18	YAS	19	QQDYSSLT
8C7	Kabat	44	KASQSVSNDVA	17	YASTRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	34	SQSVSND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	35	QSVSND	18	YAS	19	QQDYSSLT
3C12	Kabat	38	KASQSVSNDVA	17	YASTRYT	19	QQDYSSLT
	Chotia	34	SQSVSND	18	YAS	20	DYSSL
	IMGT	35	QSVSND	18	YAS	19	QQDYSSLT

【 0 1 8 3 】

10

20

30

40

50

【表 2】

表B

	配列 番号	アミノ酸配列
11E1 VH	3	EIQ LQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFTSYNMYWVKQSH- GKSLEWIGYIDPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAY- MHLNSLTSEDSAVYYCARGYGNKAWFAYWGQGLTVTVSA
11E1 VL	4	DAVMTQTTPKFLVLSAGDRVITITCK- ASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYG- TDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELK
6E1 VH	21	EFQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFTSYNMYWVKQSHGKR- LEWIGYIDPYNGGSSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNNLTSED- SAVYYCARGYNNYKAWFAYWGQGLTVTVSA
6E1 VL	22	SIVMTQTTPKFLVLSAGDRVITITCK- ASQSVTNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYG- TDFTFTISTMQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELK
8C7 VH	28	EVQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFASYNMNVKQSHGKSLD- WIGYIDPYNGGSSYNLTFTKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCAR- GYGNKAWFAYWGQGLTVTVSAASTKGP
8C7 VL	29	SIVMTPTTPKFLVLSAGDRVITITCK- ASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASTRYTGVPDRFTGSGYG- TDFTFTISTVQAEDLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELKRTVAAP
3C12 VH	36	QIQ LQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFASYNMNVKQSHGKSLDWIGYID- PYNGGSSYNLTFTKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARGYGN- KAWFAYWGQGLTVTVSAASTKGP
3C12 VL	37	DVVMTQTTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVSND- VAWYQQKPGQSPKLLIYYASTRYTGVPDRFTGSGYGTDFFTISTVQAE- DLAVYFCQQDYSSLTFGAGTKLELKRTVAAP

10

20

30

【 0 1 8 4 】

抗体の断片および誘導体（別段の指定がない限り、または文脈と明らかに矛盾しない限り、本願で使用される場合の「抗体」という用語に包含される）は、当技術分野で公知の技術により作製し得る。「断片」は、インタクト抗体の一部、一般的には抗原結合部位または可変領域を含む。抗体断片の例としては、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂およびFv断片；ダイアボディ；（１）１本鎖Fv分子（２）会合する重鎖部分なく、軽鎖可変ドメインを１つのみ含有する１本鎖ポリペプチドまたは、軽鎖可変ドメインの３個のCDRを含有するその断片および（３）会合する軽鎖部分なく、重鎖可変領域を１個のみ含有する１本鎖ポリペプチドまたは重鎖可変領域の３個のCDRを含有するその断片を含むが限定されない、連続アミノ酸残基の１つの連続した配列からなる一次構造を有するポリペプチド（本明細書中で「１本鎖抗体断片」または「１本鎖ポリペプチド」と呼ぶ）である何らかの抗体断片；および抗体断片から形成される多特異性（例えば二特異性）抗体が挙げられる。とりわけ、ナノボディ、ドメイン抗体、単ドメイン抗体または「dAb」が挙げられる。

40

50

【0185】

ある一定の実施形態において、抗体を産生するハイブリドーマのDNAは、例えば相同非ヒト配列の代わりにヒト重および軽鎖定常ドメインに対するコード配列を置換することによって（例えば、Morrissonら、PNAS pp. 6851 (1984)）、または免疫グロブリンコード配列に非免疫グロブリンポリペプチドに対するコード配列の全てまたは一部を共有結合により連結することによって、発現ベクターに挿入する前に修飾し得る。このようにして、オリジナル抗体の結合特異性を有する「キメラ」または「ハイブリッド」抗体を調製する。一般的には、このような非免疫グロブリンポリペプチドが抗体の定常ドメインに対して置換される。

【0186】

任意選択により、抗体はヒト化される。抗体の「ヒト化」型は、マウス免疫グロブリン由来の最小配列を含有する特異的なキメラ免疫グロブリン、免疫グロブリン鎖またはその断片（例えばFv、Fab、Fab'、F(ab')₂または抗体の他の抗原結合サブ配列など）である。殆どの部分に対して、ヒト化抗体は、オリジナル抗体の所望の特異性、親和性および能力を維持しながら、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基がオリジナル抗体（ドナー抗体）のCDRからの残基により置換されるヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。

【0187】

一部の例において、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基を対応する非ヒト残基により置換し得る。さらに、ヒト化抗体は、レシピエント抗体または移入されたCDRもしくはフレームワーク配列の何れでも見出されない残基を含み得る。これらの修飾は、抗体性能をさらに高め、最適化するために行われる。一般に、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、一般的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含み、CDR領域の全てまたは実質的に全てがオリジナル抗体のものに対応し、FR領域の全てまたは実質的に全てが、ヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものである。ヒト化抗体は、最適には、通常はヒト免疫グロブリンのものである免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部分も含む。さらなる詳細については、全体的な開示が参照により本明細書中に組み込まれる、Jonesら、Nature, 321, pp. 522 (1986); Reichmannら、Nature, 332, pp. 323 (1988); Presta, Curr. Op. Struct. Biol., 2, pp. 593 (1992); Verhoeyen et al. Science, 239, pp. 1534; および米国特許第4,816,567号明細書を参照）。抗体をヒト化するための方法は当技術分野で周知である。

【0188】

ヒト化抗体を作製することにおいて使用しようとするヒト可変ドメイン、軽および重鎖両方の選択は、抗原性を低下させるために非常に重要である。いわゆる「最良適合」方法に従い、公知のヒト可変ドメイン配列のライブラリ全体に対して抗体の可変ドメインの配列をスクリーニングする。次に、マウスのものに最も近いヒト配列が、ヒト化抗体のためのヒトフレームワーク（FR）として受容される（Simsら、J. Immunol. 151, pp. 2296 (1993); ChothiaおよびLesk, J. Mol. Biol. 196, 1987, pp. 901）。別の方法は、軽または重鎖の特定のサブグループの全ヒト抗体のコンセンサス配列からの特定のフレームワークを使用する。いくつかの異なるヒト化抗体のために同じフレームワークを使用し得る（Carterら、PNAS 89, pp. 4285 (1992); Prestaら、J. Immunol., 151, p. 2623 (1993)）。

【0189】

抗体がCD73に対する高親和性および他の有利な生物学的特性を保有してヒト化されることはさらに重要である。この目的を達成するために、ある方法に従い、親およびヒト化配列の三次元モデルを用いた、親配列および様々な概念的ヒト化産物の分析の過程によってヒト化抗体を調製する。三次元免疫グロブリンモデルは一般的に利用可能であり、当業者によく知られている。選択された候補免疫グロブリン配列の可能性が高い三次元構造を

10

20

30

40

50

例示し、表示するコンピュータープログラムが利用可能である。これらの表示を調べることにより、候補免疫グロブリン配列の機能における残基の可能性のある役割の分析、すなわち候補免疫グロブリンのその抗原への結合能に影響を及ぼす残基の分析が可能になる。このようにして、F R 残基を選択し、コンセンサスおよび輸入配列から組み合わせ得、標的抗原に対する親和性向上などの所望の抗体特性が達成されるようになる。一般に、C D R 残基は、抗原結合に影響を及ぼすことに直接的に、および最も実質的に関与する。

【0190】

「ヒト化」モノクローナル抗体を作製する別の方法は、免疫付与のために使用されるマウスとして、X e n o M o u s e (A b g e n i x , F r e m o n t , C A) を使用することである。X e n o M o u s e は、その免疫グロブリン遺伝子が機能的ヒト免疫グロブリン遺伝子により置換されているマウス宿主である。したがって、このマウスにより、またはこのマウスのB細胞から作製されるハイブリドーマにおいて産生される抗体は既にヒト化されている。X e n o M o u s e は、参照によりその全体において本明細書中に組み込まれる、米国特許第6,162,963号明細書に記載されている。

10

【0191】

ヒト抗体は、免疫付与のためにヒト抗体レパートリーを発現するように操作されている他のトランスジェニック動物を使用することによる(J a k o b o v i t z ら、N a t u r e 362(1993)255)かまたはファージディスプレイ法を用いた抗体レパートリーの選択によるなど、様々な他の技術によっても作製され得る。このような技術は、当業者にとって公知であり、本願で開示されるようにモノクローナル抗体から出発して実行され得る。

20

【0192】

抗体処方物

1 m g / m L ~ 5 0 0 m g / m L の濃度で含む医薬処方物中に抗C D 7 3 抗体が組み込まれ得、この処方物のp Hは2.0~10.0である。本処方物は、緩衝液系、保存剤、等張化剤、キレート剤、安定化剤および界面活性剤をさらに含む得る。ある実施形態において、医薬処方物は、水性処方物、すなわち水を含む処方物である。このような処方物は一般的に溶液または懸濁液である。さらなる実施形態において、本医薬処方物は水性溶液である。「水性処方物」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む処方物として定義される。同様に「水溶液」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む溶液として定義され、「水性懸濁液」という用語は、少なくとも50%w/wの水を含む懸濁液として定義される。

30

【0193】

別の実施形態において、本医薬処方物は、凍結乾燥処方物であり、医師または患者が使用前にそれに溶媒および/または希釈剤を添加する。

【0194】

別の実施形態において、本医薬処方物は、前もって溶解する必要がない使用準備済みの乾燥処方物(例えば凍結乾燥または噴霧乾燥)である。

【0195】

さらなる態様において、本医薬処方物は、このような抗体の水溶液および緩衝液を含み、この抗体は1 m g / m L またはそれ以上の濃度で存在し、本処方物のp Hは約2.0~約10.0である。

40

【0196】

別の実施形態において、本処方物のp Hは、約2.0~約10.0、約3.0~約9.0、約4.0~約8.5、約5.0~約8.0および約5.5~約7.5からなる一覧から選択される範囲である。

【0197】

さらなる実施形態において、緩衝液は、酢酸ナトリウム、炭酸ナトリウム、クエン酸塩、グリシルグリシン、ヒスチジン、グリシン、リジン、アルギニン、リン酸二水素ナトリウム、リン酸水素二ナトリウム、リン酸ナトリウムおよびトリス(ヒドロキシメチル)-ア

50

ミノメタン、ピシン、トリシン、リンゴ酸、コハク酸塩、マレイン酸、フマル酸、酒石酸、アスパラギン酸またはこれらの混合物からなる群から選択される。これらの具体的な緩衝液のそれぞれ1つは、代替的な実施形態を構成する。

【0198】

さらなる実施形態において、本処方物は、薬学的に許容可能な保存剤をさらに含む。さらなる実施形態において、本処方物は等張剤をさらに含む。さらなる実施形態において、本処方物はキレート剤も含む。さらなる実施形態において、本処方物は安定化剤をさらに含む。さらなる実施形態において、本処方物は界面活性剤をさらに含む。便宜上、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 19th edition, 1995を参照する。

10

【0199】

ペプチド医薬処方物中に他の成分が存在し得ることが可能である。このようなさらなる成分としては、湿潤剤、乳化剤、抗酸化剤、充填剤、等張性調節剤、キレート剤、金属イオン、油性ビヒクル、タンパク質（例えば、ヒト血清アルブミン、ゼラチンまたはタンパク質）および双性イオン（例えば、ベタイン、タウリン、アルギニン、グリシン、リジンおよびヒスチジンなどのアミノ酸）が挙げられ得る。このようなさらなる成分は、当然ではあるが本医薬処方物の全体的な安定性に悪影響を与えるべきではない。

【0200】

抗体を含有する医薬組成物は、いくつかの部位、例えば局所部位、例えば皮膚および粘膜部位、吸収を迂回する部位、例えば動脈における、静脈における、心臓における投与、および吸収を含む部位、例えば皮膚、皮下における、筋肉における、または腹部における投与において、このような処置を必要とする患者に投与し得る。医薬組成物の投与は、このような処置を必要とする患者への、いくつかの投与経路を通じた、例えば、皮下、筋肉内、腹腔内、静脈内、舌、舌下、頬側、口腔中、経口、胃腸中、鼻腔、肺、例えば細気管支および肺胞またはそれらの組み合わせを通じた投与、上皮、真皮、経皮、膻、直腸、眼、例えば結膜を通じた投与、ウレタル（uretal）および非経口投与であり得る。

20

【0201】

適切な抗体処方物は、他の既に開発されている治療用モノクローナル抗体での経験を調べることによって決定し得る。いくつかのモノクローナル抗体は、リツキサン（リツキシマブ）、ハーセプチン（トラスツズマブ）ゾーレア（オマリズマブ）、ベクザー（トシツモマブ）、キャンパス（アレムツズマブ）、ゼバリン、オンコリム（Oncoly m）など、臨床的状況で有効であることが示されており、本抗体とともに同様の処方物を使用し得る。例えば、モノクローナル抗体は、100 mg（10 mL）または500 mg（50 mL）の何れかの単回使用バイアルで、9.0 mg/mL塩化ナトリウム、7.35 mg/mLクエン酸ナトリウム二水和物、0.7 mg/mLポリソルベート80および注射用の滅菌水中でIV投与用に処方された10 mg/mLの濃度で供給され得る。pHは6.5に調整する。別の実施形態において、本抗体は、pHが約6.0の約20 mMクエン酸Na、約150 mM NaClを含む処方物中で供給される。

30

【0202】

悪性腫瘍の診断および処置

40

本明細書中に記載のような抗CD73抗体を使用して、個体、とりわけヒト患者を処置する方法も提供される。ある実施形態において、本開示は、ヒト患者への投与のための医薬組成物の調製における本明細書中に記載のような抗体の使用を提供する。一般的には、患者は、癌に罹患しているか、またはそのリスクがある。

【0203】

例えば、ある態様において、必要とする患者においてリンパ球の活性を回復させるかまたは増強する方法が提供され、この方法は、中和抗CD73抗体をその患者に投与する段階を含む。本抗体は、例えばヒトまたはヒト化抗CD73抗体であり得、この抗体は、ヒトCD73の5'-ヌクレオチダーゼ活性を低下させるかまたは妨害する。ある実施形態において、本方法は、リンパ球活性向上が有益であるか、または免疫抑制、免疫抑制細胞また

50

は例えば、CD4 T細胞、CD8 T細胞、B細胞)によるアデノシン生成を引き起こすかまたはこれを特徴とする疾患を有する患者における、リンパ球(例えばT細胞)の活性の向上を対象とする。本方法は、例えば、腫瘍微小環境(およびそこでのCD73介在性のアデノシン産生)が免疫系による認識の欠如(免疫逸脱)に関与し得ることが疑われる固形腫瘍を有する患者に特に有用となろう。腫瘍は、例えば、CD73発現免疫細胞、例えば、CD4 T細胞、CD8 T細胞、B細胞を特徴とし得る。

【0204】

より具体的に、本方法および組成物は、様々な癌および他の増殖性疾患の処置のために利用される。これらの方法は、リンパ球の抗腫瘍活性を阻害するアデノシンを減少させることにより、およびおそらくさらにリンパ球の抗腫瘍活性を向上させ得るATPを増加させることにより、効果を発揮するので、これらは、特に、腫瘍微小環境中のアデノシンが抗腫瘍免疫反応を抑制することに強い関与があり得る固形腫瘍を含め、非常に広い範囲の癌に適用可能である。ある実施形態において、抗CD73抗体で処置されるヒト患者は、肝臓癌、骨癌、膵臓癌、皮膚癌、頭頸部の癌、乳癌、肺癌、非小細胞肺癌(NSCLC)、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)、メラノーマ、子宮癌、結腸癌、直腸癌、肛門領域の癌、胃癌、精巣癌、子宮癌、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、非ホジキンリンパ腫、食道癌、小腸癌、内分泌系の癌、甲状腺癌、副甲状腺癌、副腎癌、軟組織の肉腫、尿道癌、陰茎癌、小児期の固形腫瘍、リンパ球性リンパ腫、膀胱癌、腎臓または尿管の癌、腎盂の癌腫、中枢神経系(CNS)の新生物、原発性CNSリンパ腫、腫瘍の血管新生、脊髄軸腫瘍、脳幹グリオーマ、下垂体腺腫、カボジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、アスベストにより誘導されるものを含む環境誘導性の癌、例えば多発性骨髄腫、B細胞リンパ腫、ホジキンリンパ腫/縦隔原発性B細胞性リンパ腫、非ホジキンリンパ腫、急性骨髄性リンパ腫、慢性骨髄性白血病、慢性リンパ性白血病、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、パーキットリンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、急性リンパ芽球性白血病、菌状息肉腫、未分化大細胞型リンパ腫、T細胞リンパ腫および前駆Tリンパ芽球性リンパ腫を含む血液系悪性腫瘍およびこれらの癌の何れかの組み合わせを有する。本開示は転移性癌の処置にも適用可能である。患者は、処置前、処置中または処置後に、上記臨床特性のうち1つ以上に対して試験または選択され得る。

【0205】

ある実施形態において、抗CD73抗体は、CD73の酵素活性の中和に対して少なくともEC50、任意選択によりEC70、任意選択により実質的にEC100の血液濃度を個体において(例えば1、2、3、4週間にわたり、および/または抗原結合化合物の次の投与まで)達成および/または維持するのに有効な量で投与される。ある実施形態において、抗CD73抗体の活性量は、個体の血管外組織で、CD73の酵素活性の中和に対してEC50、任意選択によりEC70、任意選択により実質的にEC100を達成するのに有効な量である。ある実施形態において、抗CD73抗体の活性量は、CD73の酵素活性の中和の阻害に対して、個体においてEC50、任意選択によりEC70、任意選択により実質的にEC100を達成(または維持)するのに有効な量である。

【0206】

任意選択により、ある実施形態において、(例えば、受容体飽和を提供するものと同等または実質的により低い濃度で完全な有効性を提供し得る)ADCCによるCD73発現腫瘍細胞の枯渇を対象とする一部の抗体とは対照的に、抗CD73抗体は、純粋な遮断因子であり(実質的なFc受容体介在性の活性なし)、抗CD73抗体の次の連続する投与まで、所望の期間にわたり、例えば1週間、2週間、1カ月、CD73の酵素活性を中和するのに有効な量で投与される。

【0207】

ある実施形態において、本抗CD73抗体は、AMPからアデノシンへのCD73介在性の異化反応の阻害(例えば、AMPからアデノシンへの加水分解を定量することによって、MDA-MB-231細胞における5'エクトヌクレオチダーゼ活性の中和を評価するこ

10

20

30

40

50

とによる。実施例 5 参照) に対して、個体において、少なくとも EC₅₀、任意選択により EC₇₀、任意選択により実質的に EC₁₀₀ の血液濃度を達成および / または (例えば 1、2、3、4 週間にわたり、および / または抗 CD73 抗体の次の投与まで) 維持するのに有効な量で投与される。ある実施形態において、抗 CD73 抗体の量は、個体の血管外組織での AMP から アデノシンへの CD73 介在性の異化反応の阻害に対して、EC₅₀、任意選択により EC₇₀、任意選択により実質的に EC₁₀₀ を達成 (または維持) するのに有効な量である。

【0208】

ある実施形態において、個体において癌を処置または予防するための方法が提供され、この方法は、循環中、任意選択により関心のある血管外組織 (例えば腫瘍または腫瘍環境) 中、循環中での 50%、70% または完全な (例えば 90%) 受容体飽和 CD73 発現細胞に必要とされる濃度よりも高い (例えば PBM C において評価した場合) 濃度を達成または指定の期間にわたり維持する量で、抗 CD73 抗体を疾患がある個体に投与することを含む。任意選択により、達成される濃度は、指定される受容体飽和に必要とされる濃度よりも少なくとも 20%、50% または 100% 高い。

10

【0209】

ある実施形態において、個体において癌を処置または予防するための方法が提供され、この方法は、循環中、任意選択により関心のある血管外組織 (例えば腫瘍または腫瘍環境) 中で、CD73 発現細胞への結合に対する EC₅₀、任意選択により EC₇₀、または任意選択により EC₁₀₀ よりも高い濃度を達成または指定の期間にわたり維持する量で抗 CD73 抗体を個体に投与することを含む (例えば、CD73 発現細胞、例えば実施例 4 のように MDA - MB - 231 細胞上で抗 CD73 抗体を滴定することにより評価した場合)。任意選択により、達成される濃度は、CD73 発現細胞への結合に対する EC₅₀、任意選択により EC₇₀、任意選択により EC₁₀₀ よりも、少なくとも 20%、50% または 100% 高い。

20

【0210】

何らかの実施形態において、本抗体は、例えば、ヒト PBM C において、0.5 ~ 100 ng / mL、任意選択により 1 ~ 100 ng / mL、任意選択により 30 ~ 100 ng / mL、例えば約 30 ~ 90 ng / mL の間の、CD73 発現細胞への結合に対する EC₅₀、任意選択により EC₇₀ または任意選択により EC₁₀₀ を有し得る (例えば、CD73 発現細胞、例えば実施例 4 のように MDA - MB - 231 細胞上で抗 CD73 抗体を滴定することにより評価した場合)。例えば、EC₅₀ は、約 30、37、39、43、57、58、61、62、90、95、143 ng / mL であり得る。

30

【0211】

抗 CD73 抗体での CD73 の酵素活性の中和に対する EC₅₀ は、例えば約 0.01 μg / mL ~ 1 μg / mL、任意選択により 0.1 μg / mL ~ 10 μg / mL、任意選択により 0.1 μg / mL ~ 1 μg / mL の間であり得る。例えば EC₅₀ は、約 0.1 μg / mL、約 0.2 μg / mL または約 0.3 μg / mL であり得る。したがって、この抗 CD73 抗体の量は、例えば少なくとも 0.1 μg / mL、任意選択により少なくとも 0.2 μg / mL、任意選択により少なくとも 1 μg / mL または任意選択により少なくとも 2 μg / mL の血液濃度を達成および / または維持するために投与される。

40

【0212】

脈管構造外の組織 (腫瘍環境、例えば固形腫瘍の処置中) が標的とされる場合、一般的には、循環中での対応する濃度を提供する用量と比較して、およそ 10 倍高い用量が必要であると考えられる。約 1 μg / mL、2 μg / mL、10 μg / mL または 20 μg / mL の循環 (血液) 中の濃度を達成 (および / または維持) するために投与される抗 CD73 抗体の量は、それぞれ約 0.1 μg / mL、0.2 μg / mL、1 μg / mL、2 μg / mL の血管外組織 (例えば腫瘍組織) 濃度を達成 (および / または維持) すると予想される。

【0213】

50

ある実施形態において、抗CD73抗体は、例えば、少なくとも $0.1 \mu\text{g/mL}$ 、任意選択により少なくとも $0.2 \mu\text{g/mL}$ 、任意選択により少なくとも $1 \mu\text{g/mL}$ または任意選択により少なくとも $2 \mu\text{g/mL}$ の組織（例えば腫瘍環境）濃度を達成および/または維持するための量で投与される。本抗体は、例えば、少なくとも約 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $2 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ または $20 \mu\text{g/mL}$ 、例えば $1 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \sim 50 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ または $1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ の血液濃度を達成および/または維持するための量で投与され得る。投与される量は、投与後の指定の期間（例えば1、2、3、4週間など）にわたる所望濃度の維持を提供するために調整し得る。

【0214】

10

いくつかの実施形態において、CD73の酵素活性の中和に対する少なくともEC70またはEC100に対応する、血液（血清）または血管外組織（例えば腫瘍環境）中の濃度を達成するための抗CD73抗体の量が投与される。本抗体は、例えば、少なくとも約 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $2 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ または $20 \mu\text{g/mL}$ の血液濃度または血管外組織（例えば腫瘍環境）を達成および/または維持する量で投与され得る。

【0215】

EC50、EC70またはEC100は、本明細書中の実施例で示されるように、例えばCD73の酵素活性の中和に対する細胞アッセイにおいて評価し得る（例えば、AMPからアデノシンへの加水分解を定量することによる、MDA-MB-231細胞での5' エクトヌクレオチダーゼ活性の中和、実施例5参照）。CD73の酵素活性の中和と関連する「EC50」は、酵素活性の中和に関してその最大反応または効果の50%を生じさせる抗CD73抗体の有効濃度を指す。CD73の酵素活性の中和に関して「EC70」は、その最大反応または効果の70%を生じさせる抗CD73抗体の有効濃度を指す。CD73の酵素活性の中和に関する「EC100」は、酵素活性のこのような中和に関してその実質的な最大反応または効果を生じさせる抗CD73抗体の有効濃度を指す。

20

【0216】

いくつかの実施形態において、特に固形腫瘍の処置に対して、達成される濃度は、組織中（脈管構造外、例えば腫瘍または腫瘍環境において）での酵素活性の中和に対する少なくともEC50、任意選択により約または少なくとも約EC100に対応する濃度につながるように設定される。

30

【0217】

ある実施形態において、抗CD73抗体の量は、 $1 \sim 20 \text{mg/kg}$ 体重である。ある実施形態において、この量が個体に毎週、2週間ごと、毎月または2カ月ごとに投与される。

【0218】

ある実施形態において、少なくとも1回の投与サイクル（任意選択により少なくとも2、3、4回またはそれ以上の投与サイクル）にわたり、有効量の本開示の抗CD73抗体を個体に投与することを含む、癌を有するヒト個体を処置する方法が提供され、この投与サイクルは、8週間以下であり、少なくとも1回のサイクルのそれぞれに対して、抗CD73抗体が1、2、3または4回、 $1 \sim 20 \text{mg/kg}$ 体重の用量で投与される。ある実施形態において、本抗CD73抗体を静脈内点滴により投与する。

40

【0219】

ヒトを処置するための適切な治療プロトコールは、例えば、本明細書中で開示されるような量の抗CD73抗体を患者に投与することを含み、本方法は、抗CD73抗体が少なくとも1回投与される、少なくとも1回の投与サイクルを含む。任意選択により、抗CD73抗体が少なくとも2、3、4、5、6、7または8回投与される。ある実施形態において、投与サイクルは2週間～8週間である。

【0220】

ある実施形態において、個体において疾患（例えば癌、固形腫瘍、血液腫瘍）を処置または予防するための方法が提供され、この方法は、少なくとも1回の投与サイクルにわたり、疾患（例えば癌、固形腫瘍）を有する個体にCD73の酵素活性を中和する抗CD73

50

抗体を投与することを含み、この投与サイクルは、抗CD73抗体の少なくとも第1回および第2回（および任意選択により第3、第4、第5、第6、第7および/または第8回またはそれ以上）の投与を含み、この抗CD73抗体は、少なくとも $0.1 \mu\text{g/mL}$ 、任意選択により少なくとも $0.2 \mu\text{g/mL}$ 、任意選択により少なくとも $1 \mu\text{g/mL}$ もしくは任意選択により少なくとも $2 \mu\text{g/mL}$ （例えば血液腫瘍の処置の場合）または任意選択により少なくとも約 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $2 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ もしくは $20 \mu\text{g/mL}$ 、例えば $1 \sim 100 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \sim 50 \mu\text{g/mL}$ 、 $1 \sim 20 \mu\text{g/mL}$ または $1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ （例えば固形腫瘍の処置の場合、血液腫瘍の処置の場合）の抗CD73抗体の血液（血清）濃度を達成するかまたは2回の連続する投与の間に維持するのに有効な量で投与される。ある実施形態において、指定の連続血液濃度が維持され、この血液濃度は、指定の期間にわたり（例えば、抗体の2回の投与の間、数週間、1週間、2週間、3週間、4週間）、実質的に指定の血液濃度を下回って下落せず、すなわち指定の期間中に血液濃度が変動し得るものの、維持される指定の血液濃度は、最小または「トラフ値」濃度に相当する。ある実施形態において、抗CD73抗体の治療的活性量は、抗体の投与後、少なくとも約1週間、約2週間または約1カ月にわたり、CD73の酵素活性の中和に対して、血液および/または組織中で、（少なくとも）EC50濃度、任意選択によりEC70濃度、任意選択によりEC100濃度を提供することが可能なこのような抗体の量である。

10

【0221】

本開示の抗CD73抗体での一連の処置前または処置中、患者が処置に適切であるか否かを評価するために（例えば患者が処置に反応する可能性があるか否かを予測するために）、存在またはレベルまたはCD73発現細胞、アデノシン、ADPおよび/またはAMPレベルを患者の腫瘍内および/またはその隣接部で評価し得る。存在またはレベルまたはCD73発現細胞、アデノシン、ADPおよび/またはAMPのレベルの上昇は、（基質結合CD73を阻害する抗体を含むが限定されない）本開示の抗CD73抗体での処置に対して個体が適切である（例えば抗CD73が有益である可能性がある）ことを示し得る。

20

【0222】

本開示の抗CD73抗体での一連の処置前または処置中、患者にとって抗CD73抗体での処置が有益であるか否かを評価するために、アデノシン、ADPおよび/またはAMPレベルをまた患者の腫瘍内および/またはその隣接部で評価し得る。処置（または抗体の投薬）前のレベルと比較した、投与（または抗体の投薬）後に比較されるアデノシン、ADPおよび/またはAMPのレベルの低下は、個体にとって、（基質結合CD73を阻害する抗体を含むが限定されない）本開示の抗CD73抗体での処置が有益であることを示し得る。任意選択により、患者にとって抗CD73抗体での処置が有益である場合、方法は、抗CD73抗体のさらなる用量を患者に投与することをさらに含み得る（例えば連続処置）。

30

【0223】

ある実施形態において、患者の腫瘍組織試料内および/またはその隣接部でアデノシン、ADPおよび/またはAMPレベルを評価することは、癌患者からの組織、例えば癌組織、癌に対して近位または癌の周辺の組織、癌隣接組織、隣接する非腫瘍組織または正常な隣接組織からなる群から選択されるヒト組織の生体試料を患者から得て、組織内でアデノシン、ADPおよび/またはAMPレベルを検出することを含む。患者からのレベルは、例えば健康な個体に対応する参照レベルとそのレベルを比較し得る。

40

【0224】

ある実施形態において、本開示は、癌の処置または予防を必要とする個体における癌の処置または予防のための方法を提供するが、この方法は、

- a) CD73発現細胞（またはアデノシン、ADPおよび/またはAMP）を腫瘍環境で、任意選択により腫瘍内および/または隣接組織内で検出し、
- b) 腫瘍環境が、任意選択により参照レベルと比較して上昇しているレベルで、CD73発現細胞（またはアデノシン、ADPおよび/またはAMP）を含むと判定されたら、抗

50

C D 7 3 抗体を個体に投与すること

を含む。任意選択により、腫瘍環境内でC D 7 3 発現細胞（またはアデノシン、A D P および／またはA M P ）を検出することは、癌組織および／または癌に対して近位もしくは癌の周辺の組織（例えば、癌隣接組織、隣接非腫瘍組織または正常な隣接組織）を含む生体試料を個体から得て、C D 7 3 発現細胞（またはアデノシン、A D P および／またはA M P ）のレベルを検出することを含む。C D 7 3 発現細胞は、例えば、腫瘍細胞、C D 4 T細胞、C D 8 T細胞、B細胞を含み得る。

【 0 2 2 5 】

癌を有する患者は、腫瘍微小環境における細胞上（例えば腫瘍細胞、C D 4 T細胞、C D 8 T細胞、B細胞上）でのC D 7 3 の発現を評価するために予め検出する段階を行うかまたは行わずに、抗C D 7 3 抗体で処置され得る。任意選択により、処置方法は、個体からの腫瘍の生体試料中で（例えば、癌組織、癌の近位または癌の周囲の組織、癌隣接組織、隣接非腫瘍組織または正常な隣接組織において）C D 7 3 核酸またはポリペプチドを検出する段階を含み得る。生体試料がC D 7 3 を発現する（例えば顕著に発現する；参照と比較して、高レベルでC D 7 3 を発現、抗C D 7 3 抗体での高強度染色）細胞を含むという判定は、C D 7 3 を阻害する薬剤での処置が非常に有益であり得る癌を患者が有することを示す。ある実施形態において、本方法は、生体試料中のC D 7 3 核酸またはポリペプチドの発現のレベルを決定し、健康な個体に対応する参照レベルとそのレベルを比較することを含む。生体試料が、参照レベルと比較して上昇しているレベルでC D 7 3 核酸またはポリペプチドを発現する細胞を含むという判定は、患者が、本開示の抗C D 7 3 抗体で処置され得る癌を有することを示す。任意選択により、生体試料中でC D 7 3 ポリペプチドを検出することは、悪性細胞、C D 4 T細胞、C D 8 T細胞、B細胞の表面上で発現されるC D 7 3 ポリペプチドを検出することを含む。ある実施形態において、生体試料が顕著にC D 7 3 核酸またはポリペプチドを発現する細胞を含むという判定は、患者が、本開示の抗C D 7 3 抗体で処置され得る癌を有することを示す。「顕著に発現される」とは、C D 7 3 ポリペプチドに言及する場合、C D 7 3 ポリペプチドが、ある一定の患者から採取されるかなりの数の細胞で発現されることを意味する。「顕著に発現される」という用語の定義が正確なパーセント値に縛られない一方で、「顕著に発現される」と言われる受容体は、患者から採取される腫瘍細胞の少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%またはそれ以上において存在することである。

【 0 2 2 6 】

個体がC D 7 3 ポリペプチドを発現する細胞を特徴とする癌を有するか否かを判定することは、例えば、癌環境（例えば腫瘍または腫瘍隣接組織）からの細胞を含む個体から（例えば生検を行うことにより）生体試料を得て、C D 7 3 ポリペプチドに結合する抗体とその細胞を接触させ、その細胞がそれらの表面上でC D 7 3 を発現するか否かを検出することを含む。任意選択により、個体がC D 7 3 を発現する細胞を有するか否かを判定することは、免疫組織化学アッセイを行うことを含む。

【 0 2 2 7 】

ある実施形態において、本開示は、癌の処置または予防を必要とする個体における癌の処置または予防のための方法を提供し、この方法は、

- a) 腫瘍環境内、任意選択により腫瘍内および／または隣接組織内で細胞のC D 7 3 ポリペプチド状況を判定し、
- b) 腫瘍環境が、任意選択により参照レベルと比較して上昇しているレベルで、C D 7 3 ポリペプチドを発現する細胞を含むという判定時に、抗C D 7 3 抗体を個体に投与することを含む。ある実施形態において、細胞は腫瘍細胞である。別の実施形態において、腫瘍環境、腫瘍および／または隣接組織内の細胞は非悪性免疫細胞、例えばT細胞である。任意選択により、腫瘍環境内のC D 7 3 ポリペプチド状況を判定することは、癌組織および／または癌に対して近位のまたは癌の周辺の組織（例えば、癌隣接組織、隣接非腫瘍組織または正常隣接組織）を含む生体試料を個体から得て、C D 7 3 ポリペプチドに結合する抗体とその細胞を接触させ、C D 7 3 を発現する細胞を検出することを含む。

【 0 2 2 8 】

本抗体組成物は、単剤療法または、本抗体が投与されている特定の治療目的のために通常利用される薬剤を含む1つ以上の他の治療剤との併用処置で使用し得る。さらなる治療剤は、通常、処置している特定の疾患または状態のための単剤療法での薬剤に対して一般的に使用される量および処置計画で投与される。このような治療剤としては、抗癌剤および化学療法剤が挙げられるが、限定されない。

【 0 2 2 9 】

ある実施形態において、第二またはさらなる第二の治療剤は、例えばNK細胞により発現されるCD16を介してそれが結合される細胞に対してADCCを誘導可能である、抗体または他のFcドメイン含有タンパク質である。一般的には、このような抗体または他のタンパク質は、関心のある抗原に結合するドメイン、例えば腫瘍細胞上に存在する抗原（腫瘍抗原）およびFcドメインまたはそれらの一部を含み、抗原結合ドメインを介した抗原への、およびFcドメインを介したFc受容体（例えばCD16）への結合を示す。ある実施形態において、そのADCC活性には少なくとも部分的にCD16が介在する。ある実施形態において、さらなる治療剤は、ネイティブまたは修飾ヒトFcドメイン、例えばヒトIgG1またはIgG3抗体からのFcドメインを有する抗体である。「抗体依存性細胞介在性細胞傷害」または「ADCC」という用語は、当技術分野でよく理解されている用語であり、Fc受容体（FcR）を発現する非特異的な細胞傷害性細胞が標的細胞上で結合される抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞介在性反応を指す。ADCCに介在する非特異的な細胞傷害性細胞としては、ナチュラルキラー（NK）細胞、マクロファージ、単球、好中球および好酸球が挙げられる。「ADCC誘導抗体」という用語は、当業者にとって公知のアッセイにより測定した場合にADCCを示す抗体を指す。このような活性は、一般的には様々なFcRとのFc領域の結合を特徴とする。何らかの特定の機序により限定されるものではないが、当業者は、抗体がADCCを示す能力が、例えば、そのサブクラス（IgG1またはIgG3など）によるか、Fc領域に導入される突然変異によるか、または抗体のFc領域での炭水化物パターンに対する修飾によるものであり得ることを認識する。

【 0 2 3 0 】

ある実施形態において、第二またはさらなる第二の治療剤は、CTLA-4またはPD-1系を阻害する（すなわちPD-1またはPD-L1を阻害する）薬剤（例えば抗体）である。例えば下記のような、例えばこのような薬剤が単剤療法として使用される代表的な用量および/または頻度で、CTLA-4、PD1またはPD-L1に結合する抗体を使用し得る。

【 0 2 3 1 】

PD-1は、CD28、CTLA-4、ICOSおよびBTLAも含む受容体のCD28ファミリーの阻害性メンバーである。PD-1は、活性化B細胞、T細胞および骨髄細胞上で発現される。Okazakiら（2002）Curr. Opin. Immunol. 14:391779-82; Bennettら（2003）J Immunol 170:711-8）。PD-1に対する2つのリガンド、PD-L1およびPD-L2が同定されており、これらは、PD-1への結合時にT細胞活性化を下方制御することが示されている（Freemanら（2000）J Exp Med 192:1027-34; Latchmanら（2001）Nat Immunol 2:261-8; Carterら（2002）Eur J Immunol 32:634-43）。PD-L1は、様々なヒト癌において豊富である（Dongら（2002）Nat. Med. 8:787-9）。PD-1とPD-L1との間の相互作用の結果、腫瘍浸潤性のリンパ球が減少し、T細胞受容体介在性増殖が減少し、癌性細胞による免疫回避が起こる。免疫抑制は、PD-1とPD-L1との局所的な相互作用を阻害することによって逆転させ得、その効果は、PD-1とPD-L2との相互作用が同時に遮断される場合、相加的である。PD-1の遮断は、例えばその天然リガンドPD-L1との相互作用を遮断することによって、PD-L1誘導性のPD-1シグナル伝達を妨げる抗体の使用を有利に含み得る。ある態様におい

10

20

30

40

50

て、本抗体は、PD - 1 に結合し（抗 PD - 1 抗体）；このような抗体は、PD - 1 と PD - L 1 との間のおよび／または PD - 1 と PD - L 2 との間の相互作用を遮断し得る。別の態様において、本抗体は、PD - L 1 に結合し（抗 PD - L 1 抗体）、PD - 1 と PD - L 1 との間の相互作用を遮断する。

【0232】

現在、市販されているかまたは臨床評価中の、PD - 1 / PD - L 1 経路を遮断する、少なくとも 6 種類の薬剤があり、これらの何れも、本開示の抗 CD 7 3 抗体との併用において有用であり得る。ある薬剤は、BMS - 936558（ニボルマブ / ONO - 4538、Bristol - Myers Squibb；旧名 MDX - 1106）である。ニボルマブ（商品名 オプジーボ（登録商標））は、PD - 1 および CD 8 0 の両方への PD - L 1 リガンドの結合を阻害する FDA により承認された完全ヒト Ig G 4 抗 PD - L 1 mAb であり、抗体 5 C 4 として国際公開第 2006 / 121168 号パンフレットに記載されており、この開示は参照により本明細書中に組み込まれる。メラノーマ患者に対して、最も顕著である OR は、3 mg / kg の用量で観察され、一方で他の癌タイプの場合は 10 mg / kg であった。ニボルマブは、一般に癌の増悪まで 3 週間ごとに 10 mg / kg で投与される。

10

【0233】

ランプロリズマブまたはペンプロリズマブ（商品名 キートルーダ（登録商標））とも呼ばれる MK - 3475（Merck からのヒト Ig G 4 抗 PD 1 mAb）は、メラノーマの処置に対して FDA により承認されており、他の癌において試験されている。ペンプロリズマブは、疾患増悪まで 2 または 3 週間ごとに 2 mg / kg または 10 mg / kg で試験された。ヒト化抗体 h 409 A11 の重および軽鎖の可変領域をコードする DNA コンストラクトは、American Type Culture Collection Patent Depository（10801 University Blvd., Manassas, VA）に預託されている。h 409 A - 11 の重鎖をコードする DNA を含有するプラスミドは 2008 年 6 月 9 日に預託され、081469__SPD - H とされ、h 409 A11 の軽鎖をコードする DNA を含有するプラスミドは 2008 年 6 月 9 日に預託され、0801470__SPD - L - 11 とされた。

20

【0234】

MPDL3280A / RG7446（Roche / Genentech からの抗 PD - L 1）は、Fc R 結合および結果として生じる抗体依存性細胞性細胞傷害（ADCC）を最小化することにより効率および安全性を最適化するために設計された改変 Fc ドメインを含有するヒト抗 PD - L 1 mAb である。1、10、15 および 25 mg / kg MPDL3280A の用量が 3 週間ごとに最長 1 年間投与された。第 3 相試験において、MPDL3280A は、NSCLC において 3 週間ごとに静脈内点滴により 1200 mg で投与される。

30

【0235】

AMP - 224（Amplimmune および GSK）は、Fc ドメインに融合された PD - L 2 細胞外ドメインを含むイムノアドヘシンである。

【0236】

ピドリズマブ（Pidlizumab）（CT - 011；CureTech）（CureTech / Teva からのヒト化 Ig G 1 抗 PD 1 mAb）、ピドリズマブ（Pidlizumab）（CT - 011；CureTech）（例えば国際公開第 2009 / 101611 号パンフレット参照）。CT - 011 の最初の点滴から 2 週間後に開始して、4 週間にわたり毎週、375 mg / m² で投与されるリツキシマブと組み合わせ、3 mg / kg 静脈内 CT - 011 で 4 週間ごとに 4 回の点滴にわたり、リツキシマブ感受性の再発 FL の 30 名の患者を処置した。

40

【0237】

さらなる公知の PD - 1 抗体および他の PD - 1 阻害剤としては、AMP - 224（GSK にライセンスされた B7 - DC / Ig G 1 融合タンパク質）、国際公開第 2012 / 1

50

45493号パンフレットに記載のAMP-514、国際公開第2011/066389号パンフレットおよび米国特許出願第2013/034559号明細書に記載の抗体ME DI-4736 (AstraZeneca/Medimmuneにより開発された抗PD-L1)、国際公開第2010/077634号パンフレットに記載の抗体YW243.55.S70 (抗PD-L1)、国際公開第2007/005874号パンフレットに記載のBristol-Myers Squibbにより開発された抗PD-L1抗体であるBMS-936559としても知られるMDX-1105、および国際公開第2006/121168号パンフレット、同第2009/014708号パンフレット、同第2009/114335号パンフレットおよび同第2013/019906号パンフレットに記載の抗体および阻害剤が挙げられ、これらの開示は参照により本明細書によって組み込まれる。抗PD1抗体のさらなる例は、国際公開第2015/085847号パンフレット (Shanghai Hengrui Pharmaceutical Co., Ltd.) で開示されており、例えばそれぞれ配列番号6、配列番号7および/または配列番号8の軽鎖可変ドメインCDR1、2および3およびそれぞれ配列番号3、配列番号4または配列番号5の抗体重鎖可変ドメインCDR1、2および3を有する抗体であり、これらの配列番号参照番号は、開示が参照により本明細書中に組み込まれる国際公開第2015/085847号パンフレットに従う付番である。PD-1またはPD-L1への結合に対してこれらの抗体の何れかと競合する抗体も使用し得る。

10

【0238】

CD152としても知られるCTLA-4 (細胞傷害性Tリンパ球関連タンパク質4) は、受容体のCD28ファミリーの他の阻害性メンバーであり、T細胞上で発現される。CTLA-4に結合し、これを阻害する抗体は当技術分野で公知である。一例において、本抗体は、イピリマブ (商品名エルボイ (登録商標)、Bristol-Myers Squibb)、ヒトIgG抗体である。エルボイに対する代表的な投与計画は、3週間ごとに90分間にわたり3mg/kgを静脈投与することである。一例において、本開示の抗CD73抗体と組み合わせて使用する抗体は、CTLA-4への結合に対してイピリマブと競合する抗体である。

20

【0239】

処置方法において、CD73結合化合物および第二の治療剤は、個別に、一緒にまたは連続的に、またはカクテルで投与し得る。いくつかの実施形態において、抗原結合化合物は、第二の治療剤の投与前に投与する。例えば、第二の治療剤の投与前およそ0~30日にCD73結合化合物を投与し得る。いくつかの実施形態において、CD73結合化合物は、第二の治療剤の投与前、約30分~約2週間、約30分~約1週間、約1時間~約2時間、約2時間~約4時間、約4時間~約6時間、約6時間~約8時間、約8時間~1日または約1~5日で投与する。いくつかの実施形態において、CD73結合化合物を治療剤の投与と同時に投与する。いくつかの実施形態において、CD73結合化合物は、第二の治療剤の投与後に投与する。例えば、CD73結合化合物は、第二の治療剤の投与後、およそ0~30日で投与し得る。いくつかの実施形態において、CD73結合化合物は、第二の治療剤の投与後、約30分~約2週間、約30分~約1週間、約1時間~約2時間、約2時間~約4時間、約4時間~約6時間、約6時間~約8時間、約8時間~1日または約1~5日で投与する。

30

40

【実施例】

【0240】

実施例1：新規抗huCD73抗体の作製

抗ヒトCD73抗体を得るために、組み換えヒトCD73-His細胞外ドメイン組み換えタンパク質 (下記のとおりInnate Pharmaでクローニングおよび作製) でBalb/cマウスに免疫付与した。マウスに対して、50μg CD73タンパク質および完全フロインドアジュバントの溶液で腹腔内に1回の初回免疫付与を行い、50μg CD73タンパク質および不完全フロインドアジュバントの乳液で腹腔内に2回目の免疫付与を行い、最後に10μg CD73タンパク質で静脈内に追加免疫を行った。追加免

50

疫から3日後に免疫脾臓細胞をX63・Ag8.653不死化B細胞と融合させ、照射した脾臓細胞の存在下で培養した。ハイブリドーマを半固体メチルセルロース含有培地に播種し、clonepix2装置(Molecular Devices)を用いて増殖クローンを採取した。

【0241】

一次スクリーニング：親およびhuCD73、cynoCD73またはmoCD73発現組み換え宿主細胞株を使用して、フローサイトメトリーによって一次スクリーニングにおいて増殖クローンの上清(SN)を試験した。0.35 μMおよび0.035 μM CFSEをそれぞれ用いてHuCD73およびcynoCD73発現組み換え宿主細胞を染色した。フローサイトメトリースクリーニングのために、全細胞を等しく混合し、PEで標識されたヤギ抗マウスポリクローナル抗体(pAb)によって上清中の反応抗体の存在を明らかにした。47種類の抗体が、ヒトおよびカニクイザルCD73の両方に結合することが分かった。huCD73およびcynoCD73に結合した抗体は全て、重鎖N297Q(Kabat EU付番)突然変異を有し、その結果、N-結合グリコシル化を欠き、Fc受容体への結合を実質的に欠く、キメラヒトIgG1抗体として作製した。

10

【0242】

二次スクリーニング：この有益なスクリーニング(実施例2参照)は、47種類の選択抗体のCD73酵素活性遮断特性を評価するために組み換えCD73タンパク質において行った。47種類のうち35種類の抗体が、完全にまたは部分的にCD73活性を遮断すると思われる。

20

【0243】

組み換えhuCD73のクローニング、作製および精製
分子生物学

次のプライマーを使用して、MIAPACA-2 cDNAからhuCD73タンパク質をクローニングした：TACGACTCACAAAGCTTGCCGCCACCATGTGTCCCCCGAGCCGCGCG(配列番号45)(フォワード)およびCCGCCCCGACTCTAGAtcaGTGATGGTGATGATGGTGcttgatccgaccttcaactg(配列番号46)(リバーサ)。次に、InFusionクローニングシステムを用いて発現ベクターに精製PCR産物をクローニングした。精製段階のためにタンパク質のC末端部分に6xHisタグを付加した。

30

クローニングされたhuCD73のアミノ酸配列：

【化2】

MCPRAARAPATLLLLALGAVLWPAAGAWELTILHTNDVHS
RLEQTSSEDSSKCVNASRCMGGVARLFTKVQQIRRAEPNVLLLD
AGDQYQGTIWFTVYKGAEVAHF MNALRYDAMALGNHEFDNGV
EGLIEPLLKEAKFPILSANIKAKGPLASQISGLYLPYKVLPVGDE
VVGIVGYTSKETPFLSNPGTNLVFEDEITALQPEVDKCLKTLNVN
KIIALGHSGFEMDKLIAQKVRGVDVVVG GHSNTFLYTGNPPSKE
VPAGKYPFIVTSDDGRKVPVVQAYAFGKYLGYLKIEFDERGNVI
SSHGNPILLNSSIPEDPSIKADINKWRIKLDNYSTQELGKTIVYL
DGSSQSCRFRECNMGNLICDAMINNNLRHTDEMFWNHVSMCIL
NGGGIRSPIDERNNGTITWENLAAVL PFGGTFDLVQLKGSTLKK
AFEHSVHRYGQSTGEFLQVGGIHVVYDLSRKPGDRVVKLDVLC
TKCRVPSYDPLKMDEVYKVILPNFLANGGDGFQMIKDELLRHDS
GDQDINVVSTYISKMKVIYPAVEGRIKHHHHHH(配列番号2)

40

【0244】

h u C D 7 3 タンパク質の発現および精製

クローニングされた配列の確認後、細胞に対してヌクレオフェクションを行い、次いで h u C D 7 3 タンパク質を産生する細胞クローンを得るために作製プールをサブクローニングした。ローラー中で増殖させた h u C D 7 3 クローンからの上清を回収し、Ni - N T A カラムを用いて精製し、250 mM イミダゾールを用いて溶出した。次に、精製タンパク質を S 200 サイズ排除クロマトグラフィーカラム上に載せた。酵素活性アッセイのために Tris 20 mM pH 7.5、NaCl 120 mM および CaCl₂ 4 mM 緩衝液中で二量体に対応する精製タンパク質を処方し、一方で処方緩衝液に 20 % グリセロールを供給する。

10

【0245】

実施例 2：可溶性 C D 7 3 遮断の評価

Sachsenmeier ら (J Biomol Screening , 2012) に記載のように、抗 C D 7 3 抗体が C D 7 3 の酵素活性を遮断する能力を評価した。簡潔に述べると、抗 C D 7 3 またはアイソタイプ対照 A b の用量範囲の存在下で白色 96 W 平底マイクロプレート中で 500 ng / mL の組み換えヒト C D 7 3 - h i s を温置した。プレートを 37 °C で 1 時間温置した。12.5 μM ATP および 125 μM AMP を各ウェルに添加し、プレートを 37 °C でさらに 30 分間温置する。ルシフェラーゼ / ルシフェリン含有 Cell Titer Glo (Promega) をウェルに添加し、プレートを暗所にて RT で 5 分間温置し、Enspire 装置 (Perkin Elmer) を使用して

20

【0246】

過剰な AMP は、ATP 依存性ルシフェラーゼ活性を遮断することが知られている。AMP を切断してアデノシン + 無機リン酸にする C D 7 3 の添加は、ルシフェラーゼ活性および光の放射を回復させる。したがって、C D 7 3 の酵素活性を遮断する抗体は、光の放射を減少させる。

【0247】

酵素阻害のパーセンテージを下記のように評価する：

- 条件：

○ ATP + AMP：最大ルシフェラーゼ阻害 (100 %)

30

○ ATP + AMP + C D 7 3：ルシフェラーゼ阻害なし (0 %)

- 式：

【数 1】

$$\text{残存CD73活性} = \frac{(\text{CD73+Ab+ATP+AMP}) - (\text{ATP+AMP})}{(\text{CD73+ATP+AMP}) - (\text{ATP+AMP})} * 100$$

【0248】

実施例 1 で得た 35 種類の抗体ならびに参照抗体 mAb 7G2、4G4 および 1E9 は全て、この実験設定を使用して C D 7 3 活性を阻害することが分かった。

40

【0249】

参照抗体を用いて報告された種々の結果を考慮して、発明者らは、C D 7 3 遮断が酵素性部位の真の遮断ではなく、二価抗体による C D 7 3 二量体の架橋から生じ得るか否かを考えた。すなわち、二価的結合 mAb が 2 つの異なる C D 7 3 ホモ二量体と結合し得、次により大きいタンパク質複合体につながるのを、抗体は、C D 7 3 二量体のオリゴマー複合体を生じさせている可能性がある。次に、発明者らは、高い比の抗体：C D 7 3 二量体で遮断アッセイを行うことによって、この可能性を試験した。この設定において、mAb は大過剰であり、オリゴマー複合体の誘導が生じ得、真の C D 7 3 機能遮断が観察されるようになる。この設定において、実際に、参照 mAb 4G4 および 1E9 を含む全ての抗体は、C D 7 3 の酵素活性を阻害しなかった。

50

【 0 2 5 0 】

抗体 1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 および 6 E 1 は、試験した全ての濃度で C D 7 3 を機能的に遮断した。m A b 1 1 E 1、8 C 7 および 6 E 1 について、代表的な結果を図 1 で示す。その後、さらなる抗体（結果は示さない）は、細胞表面上で発現される C D 7 3 に対して親和性が低く、したがって、細胞表面 C D 7 3 への高親和性結合に適切でないエピトープを提示する可能性があることが分かった。最近の刊行物で報告されている入手可能な抗 C D 7 3 参照抗体も試験した：C D 7 3 遮断について 7 G 2、4 G 4 および 1 E 9 を評価した。結果（図 1 参照）から、7 G 2 は C D 7 3 を遮断し、一方で、4 G 4 および 1 E 9 は、残存酵素活性がおよそ出発レベルまたは陰性対照まで回復したので、C D 7 3 活性を遮断しなかったことが示された。抗体 A D 2 も試験し、何れの濃度でも C D 7 3 活性を遮断しないことが分かった。したがって、4 G 4 および 1 E 9 は、このアッセイにおいて、おそらく溶液中でオリゴマー化を引き起こすことにより C D 7 3 を非特異的に阻害する抗体のクラスの代表である。したがって、抗体 7 G 2、1 1 E 1、8 C 7、3 C 1 2 および 6 E 1 は、このアッセイにおいて C D 7 3 を機能的に遮断した。

10

【 0 2 5 1 】

C D 7 3 遮断に対する E C 5 0 値を以下の表で示す。

【 0 2 5 2 】

【表 3】

Ab	EC50 (μg/ml)
1E11	0.41
6E1	0.33
8C7	1.29
3C12	0.41

20

【 0 2 5 3 】

実施例 3：E L I S A による r e c C D 7 3 タンパク質における A b 滴定
可溶性組み換えヒト C D 7 3 に対する結合について、機能的に可溶性組み換え C D 7 3 を遮断した抗体の特徴をより詳細に調べた。

30

【 0 2 5 4 】

P B S 中で 5 μ g / m L の組み換えヒト C D 7 3 タンパク質（I P H、アイソフォーム E 6）で M a x - i S o r p E L I S A プレート（N u n c）を 4 で一晚コーティングした。洗浄緩衝液（P B S、0.05% T w e e n 2 0）中でプレートを 5 回洗浄し、200 μ L / w T B S 出発ブロック緩衝液（T h e r m o F i c h e r）を添加することによって、非特異的部位を飽和させた。用量範囲の抗 C D 7 3 抗体を 3 7 で 2 時間温置した。洗浄緩衝液中でプレートを 5 回洗浄し、H R P 連結ヤギ抗ヒトまたはヤギ抗マウス I g G F c 断片二次抗体（B e t h y l、1 / 5 0 0 0 0）を R T で 1 時間添加して、結合抗 C D 7 3 抗体を検出した。洗浄緩衝液中でプレートを 5 回洗浄し、T M B（H R P 基質）を添加し、プレートを R T で 5 ~ 1 0 分間、暗所で温置することによって、結合二次抗体を明らかにする。H C l 1 M を添加することによって、酵素反応を停止させ、450 n m で O . D . を測定した。光学密度対抗 C D 7 3 A b 濃度をグラフ上にプロットし、G r a p h P a d P r i s m ソフトウェアを使用して E C 5 0 を計算する。

40

【 0 2 5 5 】

結果を図 2 で示す。抗体、1 1 E 1、8 C 7、6 E 1 および 7 G 2 は全て、可溶性組み換え C D 7 3 と結合した。結合に対する E C 5 0 値を以下の表で示す。

【 0 2 5 6 】

50

【表 4】

抗体	EC50 (μg/ml)
11E1	0.012
6E1	0.014
8C7	0.009
3C12	0.014
7G2	0.037

10

【0257】

実施例 4：フローサイトメトリー測定

ヒト、カニクイザルおよびマウス CD73 発現組み換え宿主細胞株または CD73 を内因性に発現するヒト MDA-MB-231 乳癌を使用して、抗 CD73 抗体がヒト CD73 に結合する能力およびカニクイザルおよび / またはマウス CD73 上で交差反応する能力を評価した。MDA-MB-231 細胞は ATCC (参照 HTB-26) から入手可能である。PBS/0.2% BSA/0.02% NaN₃ (「染色緩衝液」と呼ぶ) 中で再懸濁した 10⁵ 個の細胞を丸底 96w マイクロプレートに分注する。用量範囲の抗 CD73 抗体をプレートに添加し、細胞を 4 で 45 分間温置する。プレートを 4 にて 400g で 3 分間、回転させることにより、染色緩衝液中で細胞を 3 回洗浄した。染色緩衝液中で希釈した PE 連結ヤギ抗マウスまたはヤギ抗ヒト IgG Fc 断片二次抗体 (Beckman Coulter) を細胞に添加し、プレートを 4 にてさらに 30 分間温置する。細胞を上記のように 3 回洗浄し、HTFC プレートリーダーを備える Accury C6 フローサイトメーター上で分析した。

20

【0258】

蛍光の中央値対抗体濃度をグラフ上にプロットし、GraphPad Prism プログラムを使用して EC50 を計算する。

【0259】

新規 mAb 11E1、8C7、3C12 および 6E1 ならびに参照 mAb 7G2 および 1E9 について図 3 で結果を示す。mAb 11E1、8C7、3C12 および 6E1 は、優れた親和性でヒトまたはカニクイザル (マウスではない) CD73 を発現する組み換え宿主細胞に結合する。しかし、mAb 7G2 および 1E9 は、ヒトまたはカニクイザル CD73 を発現する細胞に対して乏しい結合性を示す。

30

【0260】

CD73 を内因性に発現するヒト MDA-MB-231 乳癌細胞を使用して、実験を繰り返した。再び、mAb 11E1、8C7、3C12 および 6E1 は優れた親和性で結合し、一方で mAb 7G2 および 1E9 は乏しい結合性を示す。MDA-MB-231 細胞での結果を図 4 で示す。

【0261】

7G2 および 1E9 は、組み換え CD73 および、とりわけ内因性に CD73 を発現するヒト腫瘍細胞を含め、CD73 発現細胞の表面上の CD73 において異なって提示される CD73 上のエピトープに結合することが可能であり、その結果、組み換え CD73 によく結合する (例えば免疫付与で使用される) が、細胞表面 CD73 にはよく結合しない mAb が得られる。一方、11E1、8C7、3C12 および 6E1 が結合するエピトープは細胞表面 CD73 上に存在し続ける。

40

【0262】

次いで、内因性に CD73 を発現するヒト MDA-MB-231 乳癌細胞を使用して実験を繰り返した。200 μM アデノシン 5'-(, -メチレン) ジホスフェート (APC P) 存在下または非存在下で細胞を 37 で 30 分間予め温置し、次いで抗体を添加した

50

。APCPは、ADPの類似体であり、CD73の活性部位に不可逆的に結合する。APCPが結合するとき、CD73は、「開いた」立体構造から「閉じた」立体構造へと立体構造を変化させる。mAb 11E1、8C7、3C12および6E1は、APCP存在下および非存在下の両方で、良好な親和性でMDA-MB-231細胞に結合した。APCP存在下で、EC50は、APCP非存在下で観察されるものと同等であった。11E1、8C7、3C12および6E1の最大結合に対するプラトーは、APCP存在下よりもAPCP非存在下で高く、一方でAD2については逆であった。EC50の数値を以下の表で示す。

【0263】

【表5】

抗体	EC50 (ng/ml)	
	培地	APCP
11E1	61.11	37.5
3C12	57.22	43.11
6E1	58.39	39.48
8C7	90.29	143.4
AD2	62.89	95.92

【0264】

実施例5：細胞性CD73活性遮断

パートA：MDA-MB-231腫瘍細胞における遮断

抗CD73抗体が細胞表面発現CD73の5'-エクトヌクレオチダーゼ酵素活性を中和する能力を評価した。CD73を発現するモデル腫瘍細胞株として、MDA-MB-231腫瘍細胞株を使用した。

【0265】

以下で詳述する実験で使用する試薬は全て、TBS pH7.5 (Tris 20 mM pH7.5、NaCl 150 mM) 中で希釈した。PBS-EDTA中でMDA-MB-231細胞株を回収し、TBS pH7.5 中で2回洗浄した。用量範囲の抗CD73抗体の存在下で平底96ウェルプレート中で0.5~1×10⁵個の細胞を播種し、4℃で2時間温置した。4℃で30分間の温置時間の間、細胞に200 mM AMPを添加した (CD73下方調整を回避するため)。次いで、プレートを遠心し、50 μL 上清を平底96ウェル培養プレートに移す。Malachite Green Phosphate 検出キット (R&D Systems) を使用して、製造者により提供されるTDSに従い、AMPからアデノシンへの加水分解により生じた遊離リン酸を定量した。リン酸濃度対抗CD73 Ab濃度をグラフ上にプロットし、GraphPad Prismソフトウェアを用いてEC50を計算する。

【0266】

結果を図5で示す。抗体11E1、8C7、3C12および6E1は、細胞性CD73の酵素活性を中和し、EC50値を以下の表で示す。

【0267】

10

20

30

40

50

【表 6】

Ab	EC50 (μg/ml)
1E11	0.195
6E1	0.209
8C7	0.319
3C12	0.210

【0268】

10

各抗体が、酵素活性の75%超または80%超の低下を達成した。細胞性CD73に対する結合性不良と一致する抗体7G2（実施例4参照）は細胞性CD73の酵素活性を中和しなかった。細胞表面CD73に結合する能力が限定的であることと一致する抗体7G2は、何れの濃度でもCD73酵素活性を中和せず、試験した最大濃度で僅かな部分的阻害しか示さなかった。

【0269】

各場合において、非内部移行抗体1E11、6E1、8C7および3C12に対して、MDA-MB-231細胞での細胞性CD73の酵素活性の中和に必要とされるEC50値は、MDA-MB-231細胞における細胞表面CD73への結合に必要とされるEC50値よりも数倍高かった。

20

【0270】

パートB：MDA-MB-231、H292およびA375腫瘍細胞における遮断
並行してCD73株を発現する3種類の腫瘍細胞株を用いて複数の実験においてこの時間、上記と同じアッセイを使用して、抗CD73抗体が細胞表面発現CD73の5'-エクソヌクレチダーゼ（5'-ectonucleotidase）酵素活性を中和する能力を評価した：MDA-MB-231乳癌腫瘍細胞株、H292肺癌細胞株（例えば、ATCC参照番号CRL-1848を参照）およびA375メラノーマ癌細胞株（例えば、ATCC参照番号CRL-1619を参照）。以下の表で示される中和に必要とされる有効濃度（EC、例えばEC50、EC70、EC100）は、3種類の様々なCD73発現細胞型での反復実験からの平均として計算した。

30

【0271】

【表 7】

抗体	1E11	3C12	6E1	8C7
N=	8	8	8	2
EC ₅₀ (μg/ml)	0.10	0.14	0.13	0.21
EC ₇₀ (μg/ml)	0.15	0.18	0.19	0.46
EC ₁₀₀ (μg/ml)	0.52	0.30	0.68	0.72

【0272】

40

実施例6：フローサイトメトリー競合実験

発明者らの候補および他の市販の抗CD73抗体との間の競合を評価するために、ヒトCD73発現組み換え宿主細胞株を使用した。染色緩衝液中で再懸濁した10⁵個の細胞を丸底96Wマイクロプレートに分注した。用量範囲の参照マウス抗ヒトCD73抗体の存在下または非存在下で試験抗体（1 μg/mL）の固定用量を細胞に添加する。細胞を4で45分間温置し、次いで上記のように3回洗浄した。染色緩衝液中で希釈したPE連結またはヤギ抗ヒトIgG Fc断片二次抗体（Beckman Coulter）を細胞に添加し、プレートを4でさらに30分間温置する。細胞を3回洗浄し、HTFCプレートリーダーを備えるAccury C6フローサイトメーター上で分析した。

【0273】

50

蛍光の中央値対抗体濃度をプロットした。CD73 中和抗体のエピトープを試験するために、抗体間の競合として、既知の抗体が細胞膜CD73 への新規抗体の結合を遮断する能力を評価した。新規抗体候補とともに、オリゴマー化の誘導に依存することなくCD73 を中和する能力を有するが、細胞アッセイにおいてCD73 に結合しないかまたはこれを中和しないことが実施例2 で示される参照抗体7G2 を試験した。抗体11E1、8C7、3C12、6E1 の何れも、CD73 への結合について7G2 と競合せず、このことから、7G2 は、新規抗体とは異なるCD73 上の領域に結合することが示される。

【0274】

実施例7：CD73 下方調整

抗CD73 抗体がCD73 発現を下方制御する能力を評価するために、CD73 を内因性に発現するヒトMDA-MB-231 乳癌細胞株を使用した。染色緩衝液中で再懸濁した 10^5 個の細胞を平底96Wマイクロプレートに分注した。 $10\mu\text{g/mL}$ の抗CD73 抗体を細胞に添加し、プレートを4 または37 でタイムコースにわたり温置する。T = 10分、30分、1h、2h、3hおよび4hで、PSB/2mM EDTAを使用して細胞を回収し、前記のように染色緩衝液中で3回洗浄し、タイムコース終了まで4 で温置した。 $10\mu\text{g/mL}$ のAlexaFluor 647 連結非競合抗CD73 抗体を細胞に添加し、プレートを4 で30分間温置する。細胞を3回洗浄し、HTFCプレートリーダーを備えたAccury C6フローサイトメーター上で分析した。

【0275】

発現のパーセンテージ対温置時間をグラフ上にプロットする。

【0276】

細胞においてCD73 発現の下方調整を引き起こすそれらの能力について抗体を評価し、参照mAb AD2、7G2 および1E9 と比較した。AD2、7G2 および1E9 のそれぞれは、CD73 の下方調整を引き起こし、このことから、これらのmAb が、CD73 のクラスター形成および内部移行を引き起こしている可能性があることが示唆される。AD2 は20%を大幅に上回る低下を引き起こし、一方で7G2 および1E9 はそれぞれ、細胞表面の受容体の50%超の低下を引き起こした。抗体11E1、8C7、3C12 または6E1 の何れも、細胞表面でCD73 の減少を引き起こさなかった。結果は図6 で示す。

【0277】

実施例8：エピトープマッピング

抗CD73 抗体のエピトープを定義するために、発明者らは、CD73 の表面にわたり分子表面で露出されるアミノ酸の置換によって規定されるCD73 突然変異体を設計した。以下の表で示されるように、突然変異体をHeK-293T細胞に遺伝子移入した。以下の表1の標的化アミノ酸突然変異は、配列番号1の付番を使用して示す。

【0278】

10

20

30

40

50

【表 8】

表1

突然変異体	置換						
1	E46A	S49A	V52A	N53A	R56L	M58V	
2	Q70S	R73A	A74E	A107I	R109G		
3	A99S	E129A	K133A	E134N	A135S		
4	K145A	K147A	S152H	S155A	Y161S	E203A	K206A
5	P165S	D168G	N211A	E296A	R297A		
6	K179A	E196A	I197S	T198A	E224A	M225S	Q231A
7	K262A	F265S	I266A	K274Q	I292A	S302A	H304Y
8	P318A	S319A	K321A	N325A	K326Q		
9	Y345A	D347A	S349A	S352A	D399A	R401A	
10	D460A	L461S	S462A	R463A	G466W	D467N	K471A
11	D473A	K478A	R480A	S483A	D485A	K488E	E491K
12	N503A	Q509A	K512S	D513A			
13	R354A	R395A	Q444A	T446A			
14	D332A	N333A	T336A	E409A			
15	H375A	E378A	R517A	S520A	D522A		

【0279】

突然変異体の作製

CD73突然変異体をPCRにより作製する。増幅配列をアガロースゲル上で泳動し、Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extraction キット(参照番号740609)を用いて精製する。次いで、ClonTech InFusion systemを用いて、各突然変異体に対して作製される精製PCR産物を発現ベクターに連結する。突然変異配列を含有するベクターをMiniprepとして調製し、配列決定する。配列決定後、Promega PureYield(商標)プラスミドMidiprep Systemを使用して、突然変異配列を含有するベクターをMidiprepとして調製する。HEK293T細胞をDMEM培地(Invitrogen)中で増殖させ、InvitrogenのLipofectamine 2000を使用してベクターを遺伝子移入し、CO₂インキュベーター中、37℃で24時間、温置し、その後、導入遺伝子発現について試験する。

【0280】

HEK293T遺伝子移入細胞への抗CD73結合のフローサイトメトリー分析

フローサイトメトリーによって、抗CD73抗体を、各突然変異体へのそれらの結合について試験する。ある濃度で1つまたはいくつかの突然変異体への結合を喪失する抗体を決定するために、第一の実験を行う。結合の喪失を確認するために、CD73突然変異により結合が影響を受けるとされる抗体において抗体の滴定を行う(1~0.1~0.01~0.001μg/mL)。抗体11E1、8C7、3C12または6E1は、CD73の突然変異体3に対する結合を喪失したが、その他の何れの突然変異体に対しても結合を喪失しなかった。突然変異体3は、残基A99、E129、K133、E134およびA135でアミノ酸置換を含有し、これは、突然変異体の残基のうち1個以上または全てが

これらの抗体のコアエピトープにとって重要であることを示す。CD73のクラスター形成および内部移行を引き起こす抗体AD2は、突然変異体3に対する結合を喪失せず；AD2は代わりに、残基Q70、R73、A74、A107およびR109での置換を有する突然変異体2への結合を喪失した。抗体3C12およびAD2に対する代表的な結果を図7で示す。抗体7G2は、突然変異体5、6および7への結合を喪失した（しかし突然変異体2または3に対しては喪失しなかった）。

【0281】

不可逆的にADP類似体結合物APCPにより例示されるように、活性部位リガンドが結合したとき、CD73は、「開かれた」立体構造から「閉じた」立体構造に立体構造を変化させる。実施例4で示されるように、mAb 11E1、8C7、3C12および6E1は、APCPの存在下および非存在下の両方で細胞性CD73に結合し、このことから、これらの抗体のエピトープは、活性部位が塞がっている際、CD73上に存在したままであることが示される。図8Aは、CD73二量体の分子構造を示し、突然変異体2で突然変異が起こったアミノ酸（AD2による結合の喪失）を「開かれた」または「閉じた」立体構造の両方で示した（白丸）。図8Bは、CD73二量体の分子構造を示し、突然変異体3で突然変異が起こったアミノ酸（11E1、8C7、3C12または6E1による結合の喪失）を「開かれた」または「閉じた」立体構造の両方で示した。活性部位は、囲み（点線）により示す。興味深いことに、図8Bから、CD73が二量体型と仮定する場合、突然変異体3で突然変異が起こったアミノ酸はCD73二量体の共通面上、例えば平面上、またはほぼ平面上にあることが分かり得る（他の突然変異体の他のエピトープはそうではない）。最終的に、突然変異体3内のアミノ酸の比較から、これらの残基が比較的酵素活性部位とは離れていることが分かり得（図8Bで示される）、CD73のアロステリック阻害を含む作用方式と一致する。

【0282】

実施例9：表面プラズモン共鳴（SPR）によるCD73結合親和性

Biacore T100 一般の手順および試薬

25 でBiacore T100装置（Biacore GE Healthcare）上でSPR測定を行った。全てのBiacore実験において、HBS-EP+（Biacore GE Healthcare）およびNaOH 10mMをそれぞれランニング緩衝液および再生緩衝液とした。Biacore T100 Evaluationソフトウェアを用いてセンサーグラムを分析した。プロテインAは（GE Healthcare）から購入した。Innate Pharmaでヒト可溶性二量体CD73タンパク質をクローニングし、作製し、精製した。

【0283】

プロテインAの固定化

プロテインAタンパク質をセンサーチップCM5上でデキストラン層中のカルボキシル基に共有結合により固定化した。EDC/NHS（N-エチル-N'-（3-ジメチルアミノ）プロピル）カルボジイミド塩酸塩およびN-ヒドロキシスクシンイミド（Biacore GE Healthcare）でチップ表面を活性化した。プロテインAをカップリング緩衝液（10mM酢酸塩、pH5.6）中で10μg/mLに希釈し、適切な固定レベルに到達するまで注入した（すなわち2000RU）。100mMエタノールアミンpH8（Biacore GE Healthcare）を使用して、残存する活性化基の脱活性化を行った。

【0284】

親和性実験

製造者（Biacore GE Healthcare kinetic wizard）により推奨される標準的なキャプチャー-キネティック（Capture-Kinetic）プロトコールに従い、親和性実験を行った。捕捉抗CD73抗体に対して、1.23~300nMの範囲のヒト組み換え可溶性二量体のCD73タンパク質の連続希釈物を連続的に注入し、再生前に10分間、解離させた。1:1動力学的結合モデルを用いて、セ

ンサーグラムセット全体をフィットさせた。二価親和性および動力的結合および解離速度定数を以下の表 2 で示す。

【 0 2 8 5 】

【表 9】

表2

CD73 Ab	KD (nM)
1E11	0.822
3C12	0.682
6E1	0.819

10

【 0 2 8 6 】

本明細書中で引用される、刊行物、特許出願および特許を含む全ての参照物は、本明細書中の他所でなされる特定の文書の何れかの個別に提供される組み込みにかかわらず、（法律によって許される最大の限度で）各参照物が個々におよび具体的に参照により組み込まれることが示され、本明細書中でその全体において記載されているかのように同定度に、その全体において参照により本明細書によって組み込まれる。

【 0 2 8 7 】

「a」および「an」および「the」という語および同様の言及の使用は、本明細書中で別段の指示がない限り、または文脈に明らかに矛盾しない限り、単数および複数の両方を包含するものと解釈すべきである。

20

【 0 2 8 8 】

別段の指定がない限り、本明細書中で提供される全ての厳密値は、対応する近似値の代表である（例えば、特定の要因に関して提供される全ての代表的厳密値または測定値は、必要に応じて、「約」により修飾される対応する近似測定値も提供するとみなされ得る）。

【 0 2 8 9 】

1つまたは複数の要素に関する「含む (comprising)」、「有する (having)」、「含む (including)」または「含有する (containing)」などの語を使用した本明細書中の何らかの態様または実施形態の本明細書中の記述は、別段の指定がない限り、または内容に明らかに矛盾しない限り、その特定の1つまたは複数の要素「からなる (consists of)」、「基本的からなる (consists essentially of)」またはそれを「実質的に含む (substantially comprises)」本明細書中の同様の態様または実施形態に対する支持を提供するものとする（例えば、特定の要素を含む場合の本明細書中に記載の組成物は、別段の指定がない限り、または内容に明らかに矛盾しない限り、その要素からなる組成物も記載するものとしても理解されるべきである）。

30

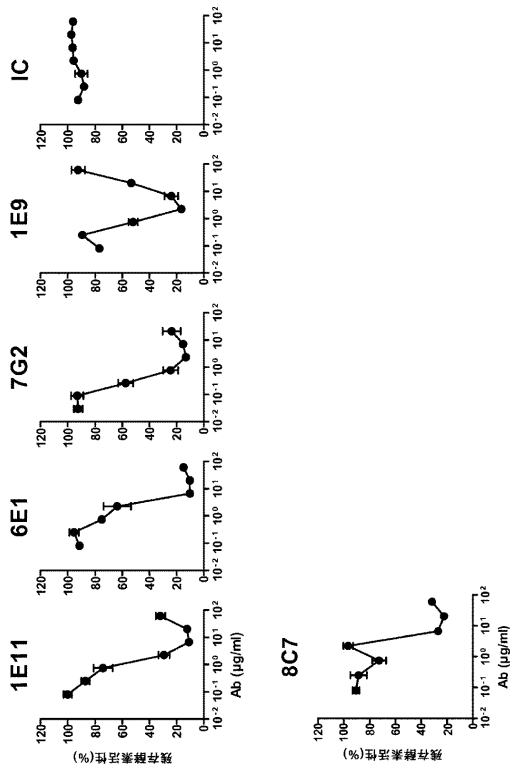
【 0 2 9 0 】

本明細書中で提供されるあらゆる実施例または代表的な語（例えば「など (such as)」）の使用は、本発明を単により詳しく明らかにするものとして意図され、別段の主張がない限り、本発明の範囲において限定を提起しない。本願中のいかなる語も、何らかの請求項に記載されていない要素を本発明の実施に必須であるものとして示すものと解釈すべきではない。

40

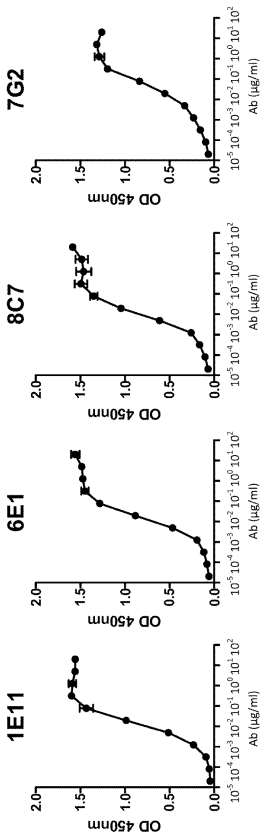
【図面】
【図 1】

図 1



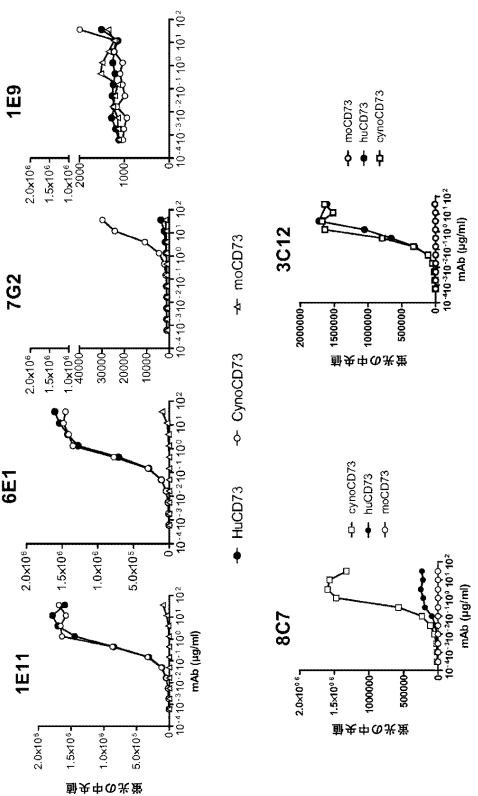
【図 2】

図 2



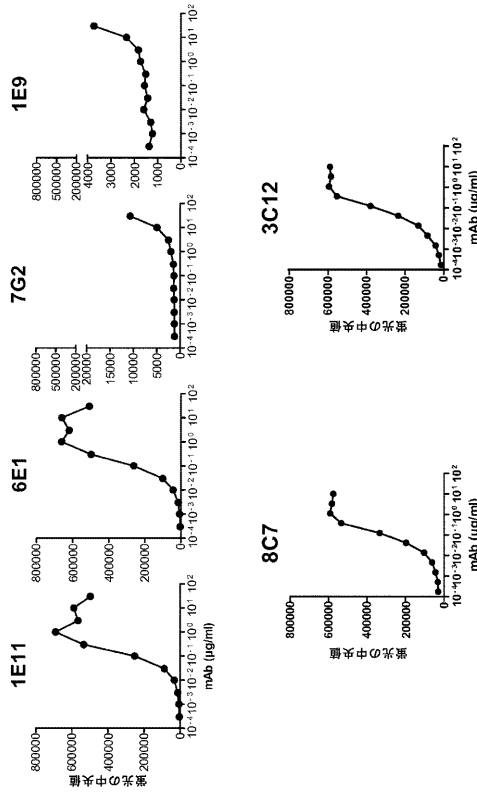
【図 3】

図 3



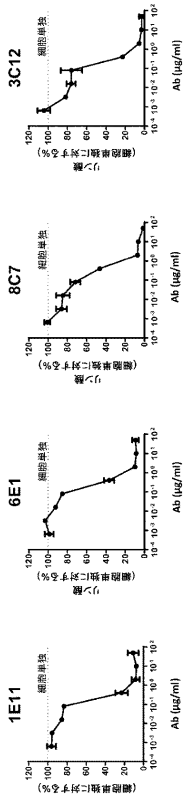
【図 4】

図 4



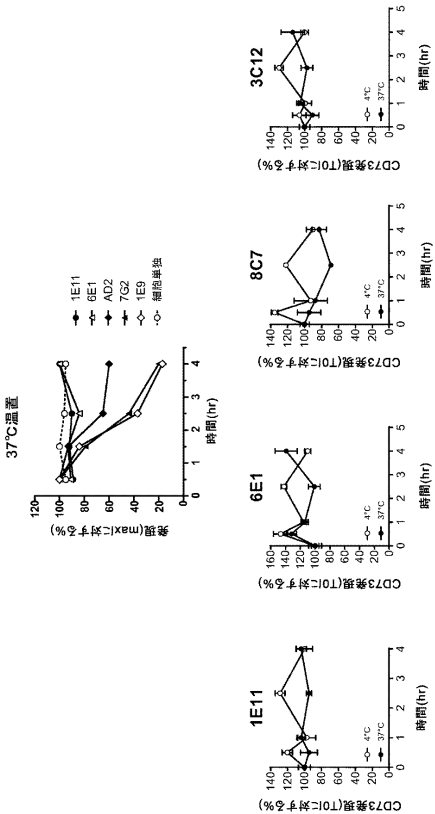
【図 5】

図 5



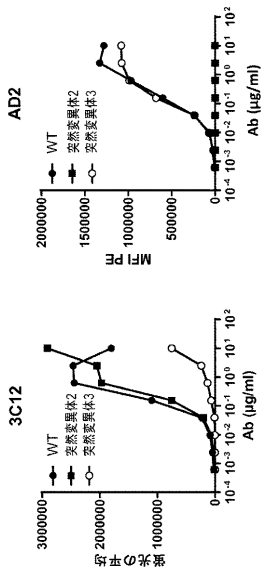
【図 6】

図 6

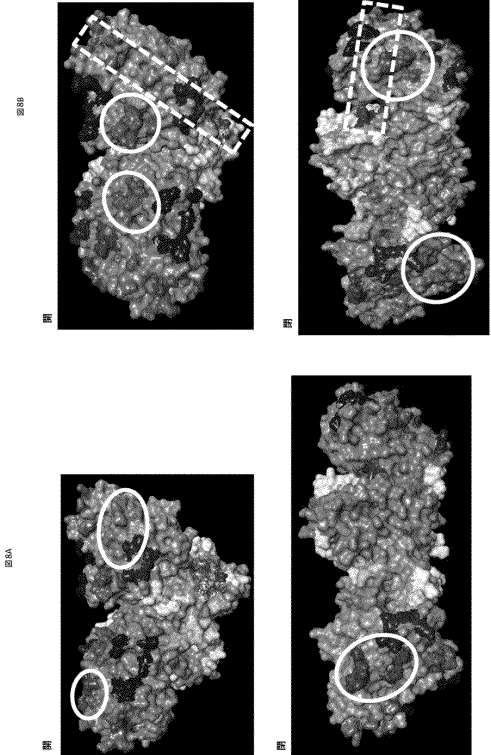


【図 7】

図 7



【図 8】



【配列表】

0007037359000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1
C 0 7 K	16/46	(2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/13	(2006.01)	C 1 2 N	15/13	
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53	D

(31)優先権主張番号 62/118,549

(32)優先日 平成27年2月20日(2015.2.20)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/133,597

(32)優先日 平成27年3月16日(2015.3.16)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/188,881

(32)優先日 平成27年7月6日(2015.7.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(72)発明者 イワン・ペロ

フランス、エフ - 1 3 8 3 0 ロックフォール・ラ・ベドゥール、ブルヴァール・テオドル・オーバネル 1 0 番

(72)発明者 カリーヌ・パトゥレル

フランス、エフ - 6 9 2 8 0 マルシー・レトワール、アレ・デュ・ボワ 4 1 1 番

(72)発明者 ローラン・ゴージェ

フランス、エフ - 1 3 0 0 8 マルセイユ、シュマン・デュ・ランシエ 3 0 番、レジダンス・ラ・サレット・バティマン 8

合議体

審判長 中島 庸子

審判官 上條 肇

平林 由利子

(58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C07K 16/00 -16/46

C12N 15/00 - 15/90

CAP l u s / B I O S I S / E M B A S E / M E D L I N E / W P I D S (S T N)