

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2022-551345

(P2022-551345A)

(43)公表日 令和4年12月8日(2022.12.8)

| (51)国際特許分類 | F I | テーマコード(参考) |
|-------------------------|---------------|-----------------|
| C 1 2 N 15/13 (2006.01) | C 1 2 N 15/13 | 4 B 0 6 4 |
| C 0 7 K 16/28 (2006.01) | C 0 7 K 16/28 | Z N A 4 B 0 6 5 |
| C 1 2 N 15/63 (2006.01) | C 1 2 N 15/63 | Z 4 C 0 8 4 |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | 4 C 0 8 5 |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | 4 C 0 8 6 |

審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全112頁) 最終頁に続く

| | | | |
|-------------------|--------------------------------|---------|--|
| (21)出願番号 | 特願2022-536765(P2022-536765) | (71)出願人 | 593141953 ファイザー・インク アメリカ合衆国10017ニューヨーク 州ニューヨーク市イースト・フォーティ ーセカンド・ストリート235 |
| (86)(22)出願日 | 令和2年12月14日(2020.12.14) | (74)代理人 | 100133927 弁理士 四本 能尚 |
| (85)翻訳文提出日 | 令和4年8月2日(2022.8.2) | (74)代理人 | 100147186 弁理士 佐藤 真紀 |
| (86)国際出願番号 | PCT/IB2020/061896 | (74)代理人 | 100174447 弁理士 龍田 美幸 |
| (87)国際公開番号 | WO2021/124073 | (74)代理人 | 100185960 弁理士 池田 理愛 |
| (87)国際公開日 | 令和3年6月24日(2021.6.24) | (72)発明者 | ハビエル フェルナンド カパロ リッジ ヤーズ |
| (31)優先権主張番号 | 62/949,120 | | |
| (32)優先日 | 令和1年12月17日(2019.12.17) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | |
| (31)優先権主張番号 | 63/110,693 | | |
| (32)優先日 | 令和2年11月6日(2020.11.6) | | |
| (33)優先権主張国・地域又は機関 | 米国(US) | | |
| (81)指定国・地域 | AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA) | | |

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 CD47、PD-L1に特異的な抗体、およびその使用

(57)【要約】

CD47と特異的に結合する抗体およびPD-L1と特異的に結合する抗体、ならびにCD47/PD-L1二重特異性抗体を提供する。これらの抗体の使用、ならびに関連する組成物および方法も提供する。

【図1】

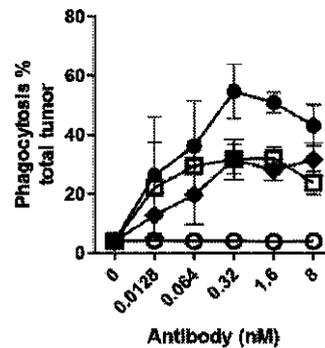


FIG. 1

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D 4 7 と特異的に結合し、重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) を含む単離抗体であって、V H が、(i) 配列番号 1 3、1 4、1 5、2 2、2 3、2 5、2 6、2 7、3 1、3 2、3 3、3 7、3 8、または 3 9 のアミノ酸配列を含む V H 相補性決定領域 (C D R) 1、(i i) 配列番号 1 6、1 7、2 8、2 9、3 4、または 3 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、(i i i) 配列番号 1 8、2 4、3 0、3 6、または 4 0 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含み、V L が、(i v) 配列番号 1 9 または 5 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(v) 配列番号 2 0 または 5 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (v i) 配列番号 2 1 または 5 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む、単離抗体。

10

【請求項 2】

V H が配列番号 1、3、7、8、または 9 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

V L が配列番号 2 または 6 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 4】

配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) を含む、C D 4 7 と特異的に結合する単離抗体。

20

【請求項 5】

P D - L 1 と特異的に結合し、重鎖可変領域 (V H) および軽鎖可変領域 (V L) を含む単離抗体であって、V H が、(i) 配列番号 4 1、4 2、4 3、4 7、4 8、または 4 9 のアミノ酸配列を含む V H 相補性決定領域 (C D R) 1、(i i) 配列番号 4 4、4 5、5 0、5 1、5 8、または 5 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 4 6、5 2、5 6、5 7、または 6 0 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含み、V L が、(i v) 配列番号 1 9 または 5 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(v) 配列番号 2 0 または 5 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (v i) 配列番号 2 1 または 5 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む、単離抗体。

【請求項 6】

V H が配列番号 4、5、1 0、1 1、または 1 2 の配列を含む、請求項 5 に記載の抗体。

30

【請求項 7】

V L が配列番号 2 または 6 の配列を含む、請求項 5 から 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

配列番号 4 に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 (V H) および配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域 (V L) を含む、P D - L 1 と特異的に結合する単離抗体。

【請求項 9】

二重特異性抗体である、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体。

40

【請求項 1 0】

二重特異性抗体が C D 4 7 および P D - L 1 と特異的に結合する、請求項 9 に記載の抗体。

【請求項 1 1】

第 1 の抗原結合部分および第 2 の抗原結合部分を含み、第 1 の抗原結合部分が C D 4 7 と特異的に結合し、第 2 の抗原結合部分が P D - L 1 と特異的に結合し、第 1 の抗原結合部分が V H および V L を含み、第 2 の抗原結合部分が V H および V L を含み、第 1 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列および第 2 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列が同じアミノ酸配列を有する、請求項 1 0 に記載の抗体。

50

【請求項 1 2】

第 1 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列および第 2 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列が配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む、請求項 1 1 に記載の抗体。

【請求項 1 3】

C D 4 7 と特異的に結合する第 1 の抗原結合部分および P D - L 1 と特異的に結合する第 2 の抗原結合部分を含む単離二重特異性抗体であって、第 1 の抗原結合部分が V H および V L を含み、第 2 の抗原結合部分が V H および V L を含み、

a) 第 1 の抗原結合部分 V H が、(i) 配列番号 1 3、1 4、1 5、2 2、2 3、2 5、2 6、2 7、3 1、3 2、3 3、3 7、3 8、または 3 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(i i) 配列番号 1 6、1 7、2 8、2 9、3 4、または 3 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 1 8、2 4、3 0、3 6、または 4 0 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含むこと、

b) 第 1 の抗原結合部分 V L が、(i) 配列番号 1 9 または 5 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 2 0 または 5 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 2 1 または 5 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含むこと、

c) 第 2 の抗原結合部分 V H が、(i) 配列番号 4 1、4 2、4 3、4 7、4 8、または 4 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(i i) 配列番号 4 4、4 5、5 0、5 1、5 8、または 5 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 4 6、5 2、5 6、5 7、または 6 0 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含むこと、な

d) 第 2 の抗原結合部分 V L が、(i) 配列番号 1 9 または 5 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 2 0 または 5 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 2 1 または 5 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含むこと

のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべてである、単離二重特異性抗体。

【請求項 1 4】

a) 第 1 の抗原結合部分 V H が、(i) 配列番号 1 3、1 4、または 1 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(i i) 配列番号 1 6 または 1 7 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含むこと、

b) 第 1 の抗原結合部分 V L が、(i) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含むこと、

c) 第 2 の抗原結合部分 V H が、(i) 配列番号 4 1、4 2、または 4 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(i i) 配列番号 4 4 または 4 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含むこと、ならびに

d) 第 2 の抗原結合部分 V L が、(i) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含むこと

のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべてである、請求項 1 3 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 1 5】

a) 第 1 の抗原結合部分 V H が配列番号 1 または 3 のアミノ酸配列を含むこと、

b) 第 1 の抗原結合部分 V L が配列番号 2 のアミノ酸配列を含むこと、

c) 第 2 の抗原結合部分 V H が配列番号 4 のアミノ酸配列を含むこと、および

d) 第 2 の抗原結合部分 V L が配列番号 2 のアミノ酸配列を含むこと

のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべてである、請求項 1 3 から 1 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 16】

C D 4 7 と特異的に結合する第 1 の抗原結合部分および P D - L 1 と特異的に結合する第 2 の抗原結合部分を含む単離二重特異性抗体であって、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む第 1 の抗原結合部分 V H、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む第 1 の抗原結合部分 V L、配列番号 4 に示すアミノ酸配列を含む第 2 の抗原結合部分 V H、および配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む第 2 の抗原結合部分 V L を含む、単離二重特異性抗体。

【請求項 17】

F c ドメインを含む、請求項 9 から 16 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 18】

F c ドメインが I g G 1 F c ドメイン、I g G 2 F c ドメイン、または I g G 4 F c ドメインである、請求項 17 に記載の二重特異性抗体。 10

【請求項 19】

F c ドメインの第 1 の F c 鎖および第 2 の F c 鎖が、第 1 の F c 鎖と第 2 の F c 鎖の会合を促進する 1 つまたは複数の修飾を含有する、請求項 17 から 18 のいずれかに記載の二重特異性抗体。

【請求項 20】

配列番号 6 1 または 6 3 のアミノ酸配列を含む抗 C D 4 7 重鎖を含み、配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含む抗 P D - L 1 重鎖を含む、請求項 17 から 19 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 21】

配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む抗 C D 4 7 軽鎖および配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む抗 P D - L 1 軽鎖をさらに含む、請求項 17 から 20 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。 20

【請求項 22】

第 1 の抗体重鎖、第 2 の抗体重鎖、第 1 の抗体軽鎖、および第 2 の抗体軽鎖を含み、第 1 の抗体重鎖が配列番号 6 1 のアミノ酸配列を含み、第 2 の抗体重鎖が配列番号 6 4 のアミノ酸配列を含み、第 1 の抗体軽鎖および第 2 の抗体軽鎖がどちらも配列番号 6 2 のアミノ酸配列を含む、C D 4 7 および P D - L 1 と特異的に結合する単離二重特異性抗体。

【請求項 23】

P D - L 1 に対する抗 P D - L 1 抗原結合部分の親和性が C D 4 7 に対する抗 C D 4 7 抗原結合部分の親和性よりも高い、請求項 9 から 22 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。 30

【請求項 24】

治療上有効な量の請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 9 から 23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物。

【請求項 25】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド。 40

【請求項 26】

請求項 25 に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項 27】

請求項 1 から 22 のいずれか一項に記載のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

【請求項 28】

請求項 27 に記載の宿主細胞を、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 9 から 23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の産生をもたらす条件下で培養することと、産生された抗体または二重特異性抗体を精製することとを含む、抗体または二重特異性抗体を産生させる方法。 50

【請求項 29】

癌の処置において使用するための医薬品の製造における、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 9 から 23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、請求項 24 に記載の医薬組成物、請求項 25 に記載のポリヌクレオチド、請求項 26 に記載のベクター、または請求項 27 に記載の宿主細胞の使用。

【請求項 30】

医薬品として使用するための、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 9 から 23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、または請求項 24 に記載の医薬組成物。

【請求項 31】

医薬品が癌の処置において使用するためのものである、請求項 30 に記載の使用のための抗体、二重特異性抗体、または医薬組成物。

10

【請求項 32】

対象に、有効量の請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 9 から 23 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、または請求項 24 に記載の医薬組成物を投与することを含む、それを必要としている対象において疾患を処置する方法。

【請求項 33】

第 2 の治療剤を対象に投与することをさらに含む、請求項 32 に記載の方法。

【請求項 34】

癌が、胃癌、肉腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、頭頸部癌、胸腺癌、上皮癌、唾液癌、肝臓癌、胃癌、甲状腺癌、肺癌（たとえば非小細胞肺癌を含む）、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、食道癌、膵癌、神経膠腫、白血病、多発性骨髄腫、腎細胞癌、膀胱癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸癌、口腔癌、膠芽細胞腫、皮膚癌、または黒色腫である、請求項 32 に記載の方法、または請求項 31 に記載の使用のための抗体、二重特異性抗体、もしくは医薬組成物。

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD47 および PD-L1 のうちの一方または両方と特異的に結合する抗体に関する。本発明はさらに、CD47 および PD-L1 と特異的に結合する二重特異性抗体に関する。本発明はまた、関連分子、たとえばそのような抗体または二重特異性抗体をコードしている核酸、組成物、関連方法、たとえばそのような抗体および二重特異性抗体を産生および精製する方法、ならびに診断剤および治療剤におけるその使用にも関する。

30

【背景技術】

【0002】

タンパク質 CD47 は様々な腫瘍型（たとえば、卵巣、肺、頭頸部）上で過剰発現されており、患者における低い生存率に相関している。CD47 は、マクロファージおよび樹状細胞（DC）などの骨髄細胞上で発現されてその活性を抑制する先天性免疫チェックポイントである、そのリガンド SIRP と結合する。これは、CD47 を過剰発現する腫瘍細胞が先天性免疫監視を回避することを可能にする。CD47 はまた、末梢血中の赤血球（RBC）および血小板などの健康な細胞上でも発現され、モノクローナル抗体による CD47-SIRP の相互作用の遮断がこれらの細胞を枯渇させることが示されており、一部の状況においては用量規制毒性をもたらしている。

40

【0003】

腫瘍または抗原提示細胞上の PD-L1 と T 細胞上の PD-1 との結合を遮断する抗 PD-L1 免疫療法は、複数種の癌（たとえば、NSCLC、RCC、HCC、HNSCC、リンパ腫、メルケル細胞癌）を有する患者において結果を出している。しかし、これらの抗 PD-L1 感受性の腫瘍型においてさえ、多くの患者は処置に応答しない。上記列挙した腫瘍型に加えて、低い抗 PD-(L)1 感度を有する多くの他の腫瘍型も CD47 が濃縮されている。

50

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0004】

したがって、現在の抗CD47抗体および抗PD-L1抗体治療剤の様々な制限を考慮すると、CD47およびPD-L1を標的とする改善された分子が必要である。

【課題を解決するための手段】

【0005】

本明細書中では、CD47と特異的に結合する抗体、PD-L1と特異的に結合する抗体、ならびにCD47およびPD-L1と特異的に結合する二重特異性抗体を提供する。また、関連核酸、組成物、ならびに抗体を作製および使用方法も本明細書中に提供する。

10

【0006】

一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する抗体を本明細書中で提供し、抗体は、配列番号1、3、7、8、または9に示すVH配列のVH相補性決定領域1(VH CDR1)、VH相補性決定領域2(VH CDR2)、およびVH相補性決定領域3(VH CDR3)を含む重鎖可変領域(VH)を含む。VHは、(i)配列番号13、14、15、22、23、25、26、27、31、32、33、37、38、または39のアミノ酸配列を含むVH CDR1、(ii)配列番号16、17、28、29、34、または35のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および(iii)配列番号18、24、30、36、または40のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含んでいてもよい。抗体は、配列番号2または6に示すVL配列のVL相補性決定領域1(VL CDR1)、VL相補性決定領域2(VL CDR2)、およびVL相補性決定領域3(VL CDR3)を含む軽鎖可変領域(VL)をさらに含んでいてもよい。VLは、(i)配列番号19または53のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20または54のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21または55のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含んでいてもよい。

20

【0007】

CD47と特異的に結合する抗体に関する、本明細書中で提供する一部の実施形態では、VHは、(i)配列番号13、14、または15のアミノ酸配列を含むVH CDR1、(ii)配列番号16または17のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および(iii)配列番号18のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含む。VLは、(i)配列番号19のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含んでいてもよい。VHは、配列番号1、3、7、8、または9のアミノ酸配列を含んでいてもよい。VLは、配列番号2または6のアミノ酸配列を含んでいてもよい。VHは配列番号1または3のアミノ酸配列を含んでいてもよく、VLは配列番号2のアミノ酸配列を含んでいてもよい。i) VHは、配列番号1のアミノ酸配列の変異体を含み、変異体配列は、配列番号1と比較して1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を含むこと、および、ii) VLは、配列番号2のアミノ酸配列の変異体を含み、変異体配列は、配列番号2と比較して1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を含むことの一方または両方であってもよい。置換は、保存的アミノ酸置換であってもよい。置換は、CDR領域内でない残基中のものであってもよい。

30

40

【0008】

一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する抗体を本明細書中で提供し、抗体は、配列番号1のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2のアミノ酸配列を含むVLを含む。一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する抗体を本明細書中で提供し、抗体は、配列番号3のアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2のアミノ酸配列を含むVLを含む。

【0009】

一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する単離抗体を本明細書中で提供し、抗

50

体は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFITNYAISWV
 RQAPGQGLEWMGGISPLFGTANYAQKFQGRVTITADESTST
 TAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGGRSSDVGWYVGMADVWG
 QGTLVTVSS (配列番号7) のVH配列またはその変異体を含むVHを含み、配列
 は、配列番号7の位置27、30、31、50、52、53、54、55、99、100
 、104、105、108、113、または114のうちの一つまたは複数に変異アミノ
 酸を有する。抗体は、(i)配列番号19または53のアミノ酸配列を含むVL CDR
 1、(ii)配列番号20または54のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(i
 iii)配列番号21または55のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含むVLをさらに
 含んでいてもよい。VLは、配列番号2または6のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

10

【0010】

一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する単離抗体を本明細書中で提供し、抗
 体は、QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFITNYAISWV
 RQAPGQGLEWMGGISPLFGTANYAQKFQGRVTITADESTST
 TAYMELSSLRSEDTAVYYCARDGGRSSDVGWYVGMADVWG
 QGTLVTVSS (配列番号7) のVH配列またはその変異体を含むVHを含み、a)
 位置27のアミノ酸はGである(Y27G)、b)位置30のアミノ酸はSである(T3
 0S)、c)位置31のアミノ酸はSである(N31S)、d)位置50のアミノ酸はR
 である(G50R)、e)位置52のアミノ酸はIである(S52I)、f)位置53の
 アミノ酸はGである(P53G)、g)位置54のアミノ酸はIである(L54I)、h)
)位置55のアミノ酸はLである(F55L)、i)位置99のアミノ酸はEである(D
 99E)、j)位置100のアミノ酸はA、S、Q、もしくはVである(G100A、G
 100S、G100Q、もしくはG100V)、k)位置105のアミノ酸はEである(D
 105E)、l)位置108のアミノ酸はY、F、もしくはAである(W108Y、W
 108F、もしくはW108A)、m)位置113のアミノ酸はLもしくはIである(M
 113LもしくはM113I)、n)位置114のアミノ酸はEである(D114E)、
 o)位置53のアミノ酸はGであり、位置105のアミノ酸はEである、p)位置53の
 アミノ酸はGであり、位置114のアミノ酸はEである、q)位置54のアミノ酸はAで
 あり、位置114のアミノ酸はEである、r)位置54のアミノ酸はAであり、位置10
 2のアミノ酸はAである、s)位置54のアミノ酸はAであり、位置104のアミノ酸は
 Eである、t)位置27のアミノ酸はGであり、位置54のアミノ酸はIであり、位置1
 00のアミノ酸はAである、u)位置27のアミノ酸はGであり、位置54のアミノ酸は
 Iであり、位置100のアミノ酸はAであり、位置113のアミノ酸はLである、v)位
 置27のアミノ酸はGであり、位置54のアミノ酸はIであり、位置100のアミノ酸は
 Aであり、位置113のアミノ酸はIである、w)位置30のアミノ酸はSであり、位置
 31のアミノ酸はSであり、位置54のアミノ酸はIであり、位置100のアミノ酸はA
 である、x)位置27のアミノ酸はGであり、位置31のアミノ酸はSであり、位置54
 のアミノ酸はIであり、位置100のアミノ酸はAであり、位置113のアミノ酸はLで
 ある、y)位置30のアミノ酸はSであり、位置31のアミノ酸はSであり、位置54の
 アミノ酸はIであり、位置100のアミノ酸はAであり、位置113のアミノ酸はLであ
 る、z)位置30のアミノ酸はSであり、位置31のアミノ酸はSであり、位置54のア
 ミノ酸はIであり、位置100のアミノ酸はAであり、位置113のアミノ酸はIである
 、またはaa)位置30のアミノ酸はSであり、位置31のアミノ酸はSであり、位置5
 4のアミノ酸はIであり、位置100のアミノ酸はAであり、位置108のアミノ酸はY
 であり、位置113のアミノ酸はLである。抗体は、(i)配列番号19または53のア
 ミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20または54のアミノ酸配列を含
 むVL CDR2、および(iii)配列番号21または55のアミノ酸配列を含むVL
 CDR3を含むVLをさらに含んでいてもよい。VLは、配列番号2または6の配列を含
 んでいてもよい。

20

30

40

【0011】

50

一部の実施形態では、PD-L1と特異的に結合する抗体を本明細書中で提供し、抗体は、配列番号4、5、10、11、または12のアミノ酸を有するVHのVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVHを含む。VHは、(i)配列番号41、42、43、47、48、または49のアミノ酸配列を含むVH CDR1、(ii)配列番号44、45、50、51、58、または59のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および(iii)配列番号46、52、56、57、または60のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含んでいてもよい。抗体は、配列番号2または6に示すVL配列のVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含む軽鎖可変領域(VL)をさらに含んでいてもよい。VLは、(i)配列番号19または53のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20または54のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21または55のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含んでいてもよい。

10

【0012】

PD-L1と特異的に結合する抗体に關与する、本明細書中で提供する一部の実施形態では、VHは、(i)配列番号41、42、または43のアミノ酸配列を含むVH CDR1、(ii)配列番号44または45のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および(iii)配列番号46のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含む。VLは、(i)配列番号19のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含んでいてもよい。VHは、配列番号4、5、10、11、または12のアミノ酸配列を含んでいてもよい。VLは、配列番号2または6のアミノ酸配列を含んでいてもよい。VHは配列番号4のアミノ酸配列を含んでいてもよく、VLは配列番号2のアミノ酸配列を含んでいてもよい。i)VHは、配列番号4のアミノ酸配列の変異体を含み、変異体配列は、配列番号4と比較して1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を含むこと、および、ii)VLは、配列番号2のアミノ酸配列の変異体を含み、変異体配列は、配列番号2と比較して1、2、3、4、5、6、7、または8個のアミノ酸置換を含むことの一方または両方であってもよい。置換は、保存的アミノ酸置換であってもよい。置換は、CDR領域内でない残基中のものであってもよい。

20

【0013】

一部の実施形態では、PD-L1と特異的に結合する抗体を本明細書中で提供し、抗体は、配列番号4に示すアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号2に示すアミノ酸配列を含むVLを含む。一部の実施形態では、PD-L1と特異的に結合する抗体を本明細書中で提供し、抗体は、配列番号5に示すアミノ酸配列を含むVHおよび配列番号6に示すアミノ酸配列を含むVLを含む。

30

【0014】

一部の実施形態では、PD-L1と特異的に結合する単離抗体を本明細書中で提供し、抗体は、EVQLVESGGGLVKGPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRVQAPGKGLEWVGRITKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTEDTAVYYCTTDPGSYWDSVYGGMDYWGQGTLLVTVSS(配列番号11)のVH配列またはその変異体を含むVHを含み、配列は、配列番号11の位置56、57、61、62、103、104、105、107、109、112、113のうちの一つまたは複数に変異アミノ酸を有する。抗体は、(i)配列番号19または53のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20または54のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21または55のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含むVLをさらに含んでいてもよい。VLは、配列番号2または6のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

40

【0015】

一部の実施形態では、PD-L1と特異的に結合する単離抗体を本明細書中で提供し、抗体は、EVQLVESGGGLVKGPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRVQAPGKGLEWVGRITKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDD

50

S K N T L Y L Q M N S L K T E D T A V Y Y C T T D P G S Y W D S V Y G G M D Y W
 G Q G T L V T V S S (配列番号 11) の V H 配列またはその変異体を含む V H を含み、
 a) 位置 56 のアミノ酸は E であり (D 56 E)、位置 57 のアミノ酸は E もしくは A である (G 57 E もしくは G 57 A)、b) 位置 61 のアミノ酸は Q、E、A、もしくは S であり (D 61 Q、D 61 E、D 61 A、もしくは D 61 S)、位置 62 のアミノ酸は E、S、Q、A である (Y 62 E、Y 62 S、Y 62 Q、もしくは Y 62 A)、c) 位置 103 のアミノ酸は I である (G 103 I)、d) 位置 104 のアミノ酸は A、H、Y、E、もしくは I である (S 104 A、S 104 H、S 104 Y、S 104 E、もしくは S 104 I)、e) 位置 105 のアミノ酸は H である (Y 105 H)、f) 位置 107 のアミノ酸は S、L、もしくは Y である (D 107 S、D 107 L、もしくは D 107 Y)、g) 位置 109 のアミノ酸は S である (V 109 S)、h) 位置 112 のアミノ酸は A もしくは S である (G 112 A もしくは G 112 S)、または i) 位置 113 のアミノ酸は L である (M 113 L)。抗体は、(i) 配列番号 19 または 53 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 20 または 54 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 21 または 55 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む V L をさらに含んでいてもよい。V L は、配列番号 2 または 6 のアミノ酸配列を含んでいてもよい。

10

【0016】

本明細書中で提供する抗体の一部の実施形態では、抗体は、F a b 断片、F a b ' 断片、F (a b ')₂ 断片、F d 断片、F v 断片、単鎖 F v 断片 (s c F v)、ジスルフィド安定化 F v (d s F v) 断片、単ドメイン抗体 (d A b) 断片、モノクローナル抗体、キメラ抗体、二重特異性抗体、三重特異性抗体、多特異性抗体、二重特異性ヘテロ二量体ジアボディ、二重特異性ヘテロ二量体 I g G、ポリクローナル抗体、標識抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、およびその断片からなる群から選択される。抗体は、ヒトまたはヒト化 V H フレームワークおよびヒトまたはヒト化 V L フレームワークを含んでいてもよい。抗体は二重特異性抗体であってもよい。

20

【0017】

本明細書中で提供する二重特異性抗体の一部の実施形態では、二重特異性抗体は C D 47 および P D - L 1 と特異的に結合する。抗体は、第 1 の抗原結合部分および第 2 の抗原結合部分を含んでいてもよく、第 1 の抗原結合部分は C D 47 と特異的に結合し、第 2 の抗原結合部分は P D - L 1 と特異的に結合し、第 1 の抗原結合部分は V H および V L を含み、第 2 の抗原結合部分は V H および V L を含み、第 1 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列および第 2 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列は同じアミノ酸配列を有する。第 1 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列および第 2 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列は、配列番号 2 に示すアミノ酸配列、または配列番号 2 と比較して 1、2、3、4、5、6、7、もしくは 8 個のアミノ酸置換を含むその変異体を含んでいてもよい。第 1 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列および第 2 の抗原結合部分の V L のアミノ酸配列は、配列番号 6 に示すアミノ酸配列、または配列番号 6 と比較して 1、2、3、4、5、6、7、もしくは 8 個のアミノ酸置換を含むその変異体を含んでいてもよい。置換は、保存的アミノ酸置換であってもよい。置換は、C D R 領域内でない残基中のものであってもよい。

30

40

【0018】

一部の実施形態では、C D 47 と特異的に結合する第 1 の抗原結合部分および P D - L 1 と特異的に結合する第 2 の抗原結合部分を含む C D 47 / P D - L 1 二重特異性抗体を本明細書中で提供し、第 1 の抗原結合部分は V H および V L を含み、第 2 の抗原結合部分は V H および V L を含み、以下のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべてである：a) 第 1 の抗原結合部分 V H は、配列番号 1、3、7、8、または 9 に示す V H 配列の V H C D R 1、V H C D R 2、および V H C D R 3 を含む、b) 第 1 の抗原結合部分 V L は、配列番号 2 に示す V L 配列の V L C D R 1、V L C D R 2、および V L C D R 3 を含む、c) 第 2 の抗原結合部分 V H は、配列番号 4、5、10、11、または 12 に示す V H 配列の V H C D R 1、V H C D R 2、および V H C D R 3 を含む、ならび

50

に d) 第 2 の抗原結合部分 V L は、配列番号 2 または 6 に示す V L 配列の V L C D R 1、V L C D R 2、および V L C D R 3 を含む。以下のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべてであってもよい： a) 第 1 の抗原結合部分 V H は、(i) 配列番号 1 3、1 4、1 5、2 2、2 3、2 5、2 6、2 7、3 1、3 2、3 3、3 7、3 8、または 3 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(i i) 配列番号 1 6、1 7、2 8、2 9、3 4、または 3 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 1 8、2 4、3 0、3 6、または 4 0 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含む、 b) 第 1 の抗原結合部分 V L は、(i) 配列番号 1 9 または 5 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 2 0 または 5 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 2 1 または 5 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む、 c) 第 2 の抗原結合部分 V H は、(i) 配列番号 4 1、4 2、4 3、4 7、4 8、または 4 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(i i) 配列番号 4 4、4 5、5 0、5 1、5 8、または 5 9 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 4 6、5 2、5 6、5 7、または 6 0 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含む、ならびに d) 第 2 の抗原結合部分 V L は、(i) 配列番号 1 9 または 5 3 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 2 0 または 5 4 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 2 1 または 5 5 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む。以下のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべてであってもよい： a) 第 1 の抗原結合部分 V H は、(i) 配列番号 1 3、1 4、または 1 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(i i) 配列番号 1 6 または 1 7 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含む、 b) 第 1 の抗原結合部分 V L は、(i) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む、 c) 第 2 の抗原結合部分 V H は、(i) 配列番号 4 1、4 2、または 4 3 のアミノ酸配列を含む V H C D R 1、(i i) 配列番号 4 4 または 4 5 のアミノ酸配列を含む V H C D R 2、および (i i i) 配列番号 4 6 のアミノ酸配列を含む V H C D R 3 を含む、ならびに d) 第 2 の抗原結合部分 V L は、(i) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列を含む V L C D R 1、(i i) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含む V L C D R 2、および (i i i) 配列番号 2 1 のアミノ酸配列を含む V L C D R 3 を含む。以下のうちの 1 つ、2 つ、3 つ、または 4 つすべてであってもよい： a) 第 1 の抗原結合部分 V H は配列番号 1 または 3 のアミノ酸配列を含む、 b) 第 1 の抗原結合部分 V L は配列番号 2 のアミノ酸配列を含む、 c) 第 2 の抗原結合部分 V H は配列番号 4 のアミノ酸配列を含む、および d) 第 2 の抗原結合部分 V L は配列番号 2 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態では、C D 4 7 と特異的に結合する第 1 の抗原結合部分および P D - L 1 と特異的に結合する第 2 の抗原結合部分を含む C D 4 7 / P D - L 1 二重特異性抗体を本明細書中で提供し、抗体は、配列番号 1 に示すアミノ酸配列を含む第 1 の抗原結合部分 V H、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む第 1 の抗原結合部分 V L、配列番号 4 に示すアミノ酸配列を含む第 2 の抗原結合部分 V H、および配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む第 2 の抗原結合部分 V L を含む。

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態では、C D 4 7 と特異的に結合する第 1 の抗原結合部分および P D - L 1 と特異的に結合する第 2 の抗原結合部分を含む C D 4 7 / P D - L 1 二重特異性抗体を本明細書中で提供し、抗体は、配列番号 3 に示すアミノ酸配列を含む第 1 の抗原結合部分 V H、配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む第 1 の抗原結合部分 V L、配列番号 4 に示すアミノ酸配列を含む第 2 の抗原結合部分 V H、および配列番号 2 に示すアミノ酸配列を含む第 2 の抗原結合部分 V L を含む。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態では、C D 4 7 と特異的に結合する第 1 の抗原結合部分および P D - L 1 と特異的に結合する第 2 の抗原結合部分を含む単離抗体を本明細書中で提供し、第 1 の

10

20

30

40

50

抗原結合部分はVHおよびVLを含み、第2の抗原結合部分はVHおよびVLを含み、a)第1の抗原結合部分VHは、(i)配列番号13、14、または15のアミノ酸配列を含むVH CDR1、(ii)配列番号16または17のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および(iii)配列番号18のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含み、b)第2の抗原結合部分VHは、(i)配列番号41、42、または43のアミノ酸配列を含むVH CDR1、(ii)配列番号44または45のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および(iii)配列番号46のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含む。第1の抗原結合部分VHは配列番号1に示すアミノ酸配列を含んでいてもよく、第2の抗原結合部分VHは配列番号4に示すアミノ酸配列を含んでいてもよい。a)第1の抗原結合部分VLは、(i)配列番号19のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含んでいてもよく、b)第2の抗原結合部分VLは、(i)配列番号19のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含んでいてもよい。第1の抗原結合部分VLは配列番号2に示すアミノ酸配列を含んでいてもよく、第2の抗原結合部分VLは配列番号2に示すアミノ酸配列を含んでいてもよい。

10

【0022】

一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する第1の抗原結合部分およびPD-L1と特異的に結合する第2の抗原結合部分を含む単離二重特異性抗体を本明細書中で提供し、第1の抗原結合部分は、本明細書中で提供する任意の抗CD47抗体のVHおよびVLを含み、第2の抗原結合部分は、本明細書中で提供する任意の抗PD-L1抗体のVHおよびVLを含む。

20

【0023】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する二重特異性抗体において、二重特異性抗体はFcドメインを含む。Fcドメインは、IgG1 Fcドメイン、IgG2 Fcドメイン、またはIgG4 Fcドメインであってもよい。Fcドメインの第1のFc鎖および第2のFc鎖は、第1のFc鎖と第2のFc鎖の会合を促進する1つまたは複数の修飾を含有してもよい。第1のFc鎖および第2のFc鎖はそれぞれ、野生型Fc鎖と比較して少なくとも1つのアミノ酸修飾を含んでノブまたはホールを形成してもよく、Fc鎖のうち的一方がノブを含み、他方のFc鎖がホールを含む。ノブを含むFc鎖は、突然変異Y349Cおよび/またはT366Wのうち的一方または両方を含んでいてもよく、ホールを含むFc鎖は、突然変異S354C、T366S、L368A、および/またはY407V(付番はEUIンデックスに従う)のうち1つ、2つ、3つ、または4つすべてを含む。

30

【0024】

一部の実施形態では、配列番号61または63のアミノ酸配列を含む抗CD47重鎖および配列番号64のアミノ酸配列を含む抗PD-L1重鎖を含むCD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供する。抗体は、配列番号62のアミノ酸配列を含む抗CD47軽鎖および配列番号62のアミノ酸配列を含む抗PD-L1軽鎖をさらに含んでいてもよい。抗CD47軽鎖および抗PD-L1軽鎖は同じアミノ酸配列を有していてもよい。

40

【0025】

一部の実施形態では、CD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供し、抗体は、第1の抗体重鎖、第2の抗体重鎖、第1の抗体軽鎖、および第2の抗体軽鎖を含み、第1の抗体重鎖は配列番号61のアミノ酸配列を含み、第2の抗体重鎖は配列番号64のアミノ酸配列を含み、第1の抗体軽鎖および第2の抗体軽鎖はどちらも配列番号62のアミノ酸配列を含む。

【0026】

一部の実施形態では、CD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供し、抗体は、第1の抗体重鎖、第2の抗体重鎖、第1の抗体軽鎖、および第2の抗体軽鎖を含み

50

、第1の抗体重鎖は配列番号63のアミノ酸配列を含み、第2の抗体重鎖は配列番号64のアミノ酸配列を含み、第1の抗体軽鎖および第2の抗体軽鎖はどちらも配列番号62のアミノ酸配列を含む。

【0027】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗体において、抗体中の1つまたは複数の重鎖はC末端リシンを欠き得る。たとえば、一部の実施形態では、本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体において、抗体中の1つまたは複数の重鎖はC末端リシンを欠き得る。たとえば、配列番号61、63、または64のアミノ酸配列を含む本明細書中で提供する二重特異性抗体において、配列番号61、63、または64のアミノ酸配列中のC末端リシンを欠く抗体も本明細書中に含まれる。

10

【0028】

本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体の一部の実施形態では、抗PD-L1抗体可変領域のPD-L1に対する親和性は、抗CD47抗体可変領域のCD47に対する親和性よりも高い。抗PD-L1抗体可変領域のPD-L1に対する親和性は、抗CD47抗体可変領域のCD47に対する親和性よりも100倍～1000倍または1000倍～5000倍高くてもよい。i)抗PD-L1抗体可変領域の K_D は0.1～1nMもしくは0.05～5nMであること、および/またはii)抗CD47抗体可変領域の K_D は10～500nM、10～1000nM、もしくは5～1000nMであることの一方向または両方であってもよい。

【0029】

本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体の一部の実施形態では、抗体はヒト、ヒト化、またはキメラ抗体である。

20

【0030】

一部の実施形態では、第1の抗体重鎖、第2の抗体重鎖、第1の抗体軽鎖、および第2の抗体軽鎖を含むCD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供し、以下のうちの1つ、2つ、または3つすべてである：a)第1の抗体重鎖は、ATCC受託番号PTA-126910を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有すること、b)第2の抗体重鎖は、ATCC受託番号PTA-126911を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有すること、ならびにc)第1の抗体軽鎖および第2の抗体軽鎖は、ATCC受託番号PTA-126912を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有すること。

30

【0031】

一部の実施形態では、治療上有効な量の本明細書中で提供する抗体（たとえば単一特異性または二重特異性）と、薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物を本明細書中で提供する。

【0032】

一部の実施形態では、本明細書中で提供するアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチド、ポリヌクレオチドを含むベクター、またはベクターもしくは組換えポリヌクレオチドを含む宿主細胞を本明細書中で提供する。一部の実施形態では、配列番号67～74のうちの任意の1つのヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを本明細書中で提供する。

40

【0033】

一部の実施形態では、以下のうちの1つ、2つ、または3つすべてを含む宿主細胞を本明細書中で提供する：a)配列番号1または3のアミノ酸配列を有するVHをコードしているヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチド、b)配列番号4のアミノ酸配列を有するVHをコードしているヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチド、およびc)配列番号2のアミノ酸配列を有するVLをコードしているヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチド。宿主細胞は、以下のうちの1つ、2つ、または3つすべてを含んで

50

いてもよい：a) 配列番号 61 または 63 のアミノ酸配列を有する重鎖をコードしているヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチド、b) 配列番号 64 のアミノ酸配列を有する重鎖をコードしているヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチド、および c) 配列番号 62 のアミノ酸配列を有する軽鎖をコードしているヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチド。宿主細胞は、本明細書中で提供する抗体を組換え産生してもよい。宿主細胞は、細菌、哺乳動物、酵母、または昆虫の細胞系であってもよい。哺乳動物細胞系は CHO 細胞系であってもよい。

【0034】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する宿主細胞を、本明細書中で提供する抗体または二重特異性抗体の産生をもたらす条件下で培養することと、産生された抗体または二重特異性抗体を精製することを含む、抗体または二重特異性抗体を産生させる方法を本明細書中で提供する。

10

【0035】

また、医薬品の製造における、本明細書中で提供する抗体、二重特異性抗体、医薬組成物、ポリヌクレオチド、ベクター、または宿主細胞の使用も本明細書中で提供する。

【0036】

また、医薬品として使用するための、本明細書中で提供する抗体、二重特異性抗体、または医薬組成物の使用も本明細書中で提供する。抗体、二重特異性抗体、医薬組成物、または医薬品は、癌の処置において使用するためのものであってもよい。

【0037】

一部の実施形態では、対象に、有効量の本明細書中で提供する抗体、二重特異性抗体、または医薬組成物を投与することを含む、それを必要としている対象において疾患を処置する方法を本明細書中で提供する。疾患を処置する方法は、免疫応答または機能をモジュレートするまたは刺激することを含んでいてもよい。適応および自然免疫応答または機能をどちらもモジュレートしても刺激してもよい。疾患は感染症であってもよい。疾患は癌であってもよい。方法は、第 2 の治療剤を対象に投与することをさらに含んでいてもよい。第 2 の治療剤は抗癌剤であってもよい。抗癌剤は、TLR3 作用剤、TLR7/8 作用剤、もしくは TLR9 作用剤などの TLR 作用剤、CDK4/6 もしくは CDK2/4/6 阻害剤などの CDK 阻害剤、またはオラパリブ、ルカパリブ、ニラパリブ、もしくはタラゾパリブなどの PARP 阻害剤であってもよい。TLR9 作用剤は、CpG 24555、CpG 10103、CpG 7909 (PF-3512676)、CpG 1018 であってもよい。CDK 阻害剤は、PF-06873600 または パルボシクリブであってもよい。

20

30

【0038】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する CD47/PD-L1 二重特異性抗体 + TLR 作用剤 (たとえば TLR9 作用剤) の組合せは、いずれかの薬剤の個々の抗癌活性よりも高い抗癌活性を有する。一部の実施形態では、組合せは相乗的な抗癌活性を有する。

【0039】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する CD47/PD-L1 二重特異性抗体 + CDK 阻害剤 (たとえば CDK2/4/6 阻害剤) の組合せは、いずれかの薬剤の個々の抗癌活性よりも高い抗癌活性を有する。一部の実施形態では、組合せは相乗的な抗癌活性を有する。

40

【0040】

一部の実施形態では、対象に、有効量の本明細書中で提供する抗体、二重特異性抗体、または医薬組成物を投与することを含む、対象において免疫応答を増強させる方法を本明細書中で提供する。

【0041】

一部の実施形態では、対象に、有効量の本明細書中で提供する抗体、二重特異性抗体、または医薬組成物を投与することを含む、対象において癌細胞の成長を阻害するまたは低下させる方法を本明細書中で提供する。一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗体

50

、二重特異性抗体、または医薬組成物は、癌細胞の成長を、抗体または二重特異性抗体の非存在下における癌細胞の成長よりも、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%阻害するまたは低下させる。

【0042】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗体または二重特異性抗体は、ヒトの赤血球および/または血小板に対してこれが有する親和性の、それぞれ少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%である親和性で、カニクイザルの赤血球および/または血小板と結合する。

10

【0043】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する処置方法において使用するための、本明細書中で提供する抗体、二重特異性抗体、または医薬組成物を本明細書中で提供する。一部の実施形態では、癌の処置において使用するためおよび/または対象において免疫応答を増強させるための、本明細書中で提供する抗体、二重特異性抗体、または医薬組成物を本明細書中で提供する。一部の実施形態では、本明細書中で提供する処置方法において使用するための医薬品の製造における、本明細書中で提供する抗体、二重特異性抗体、または医薬組成物の使用を本明細書中で提供する。一部の実施形態では、医薬品は、癌の処置において使用するためおよび/または対象において免疫応答を増強させるためのものである。

20

【0044】

癌に關与する、本明細書中で提供する一部の実施形態では、癌は、胃癌、肉腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、頭頸部癌、胸腺癌、上皮癌、唾液癌、肝臓癌、胃癌、甲状腺癌、肺癌（たとえば非小細胞肺癌を含む）、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、食道癌、膵癌、神経膠腫、膠芽細胞腫、脳腫瘍、白血病、多発性骨髄腫、腎細胞癌、腎臓癌、膀胱癌、尿路上皮癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸癌、口腔癌、皮膚癌、または黒色腫である。

30

【図面の簡単な説明】

【0045】

【図1】図1は、ヒトNCI-H292腫瘍細胞上のマクロファージの抗体依存性細胞貪食(ADCP)活性に対するBsAb1(黒丸)、抗CD47抗体P01A11_75(黒菱形)、抗PD-L1抗体P06B05_245(白四角)、または対照抗体(白丸)の効果を試験する実験からのデータを示す図である。Y軸は、X軸上に示すそれぞれの抗体の濃度で貪食された腫瘍細胞の%を示す。

【図2-1】図2Aは、CT26マウス腫瘍モデルにおける、BsAb3および他の関連抗体の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図2Aに示す実験では、CT26腫瘍を保有するマウスを、対照抗体(黒丸)、抗CD47単一特異性抗体(白四角)、抗PD-L1単一特異性抗体(黒三角形、点を実線につないだ)、抗PD-L1単一特異性抗体と合わせた抗CD47単一特異性抗体(白逆三角形)、BsAb3(黒菱形、点を破線につないだ)、またはFcヌルBsAb3(白丸)で処置した。X軸は処置後の日数を示し、Y軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。図2Bは、CT26マウス腫瘍モデルにおける、BsAb3および他の関連抗体の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図2Bに示す実験では、CT26腫瘍を保有するマウスを、対照抗体(黒丸)、抗CD47単一特異性抗体(白四角)、抗PD-L1単一特異性抗体(黒三角形、点を実線につないだ)、抗PD-L1単一特異性抗体と合わせた抗CD47単一特異性抗体(白逆三角形)、BsAb3(黒菱形、点を破線につないだ)、またはFcヌルBsAb3(白丸)で処置した。X軸は処置後の日数を示し、Y軸は体重の百分率を示す。

40

50

【図 2 - 2】図 2 C は、C T 2 6 マウス腫瘍モデルにおける、B s A b 3 および他の関連抗体の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 2 C に示す実験では、C T 2 6 腫瘍を保有するマウスを、対照抗体（黒丸）、抗 C D 4 7 単一特異性抗体（白四角）、抗 P D - L 1 単一特異性抗体（黒三角形、点を実線でつないだ）、抗 P D - L 1 単一特異性抗体と合わせた抗 C D 4 7 単一特異性抗体（白逆三角形）、B s A b 3（黒菱形、点を破線でつないだ）、または F c ヌル B s A b 3（白丸）で処置した。X 軸は処置後の日数を示し、Y 軸はパーセント生存を示す。

【図 3】図 3 A は、M C 3 8 マウス腫瘍モデルにおける、様々な用量の B s A b 3 の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 3 A に示す実験では、M C 3 8 腫瘍を保有するマウスを、対照アイソタイプ抗体（黒丸）、10 mg / kg の B s A b 3（白四角）、20 mg / kg の B s A b 3（黒三角形）、または 40 mg / kg の B s A b 3（白丸）で処置した。X 軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y 軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。図 3 B は、M C 3 8 マウス腫瘍モデルにおける、様々な用量の B s A b 3 の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 3 B に示す実験では、M C 3 8 腫瘍を保有するマウスを、対照アイソタイプ抗体（黒丸）、10 mg / kg の B s A b 3（白四角）、20 mg / kg の B s A b 3（黒三角形）、または 40 mg / kg の B s A b 3（白丸）で処置した。X 軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y 軸は体重の百分率を示す。

【図 4】図 4 A は、B 1 6 F 1 0 マウス腫瘍モデルにおける、B s A b 3 の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 4 A に示す実験では、B 1 6 F 1 0 腫瘍を保有するマウスを、対照アイソタイプ抗体（黒丸）または 20 mg / kg の B s A b 3（黒三角形）で処置した。X 軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y 軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。図 4 B は、B 1 6 F 1 0 マウス腫瘍モデルにおける、B s A b 3 の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 4 B に示す実験では、B 1 6 F 1 0 腫瘍を保有するマウスを、対照アイソタイプ抗体（黒丸）または 20 mg / kg の B s A b 3（黒三角形）で処置した。X 軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y 軸は体重の百分率を示す。

【図 5 - 1】図 5 A は、B s A b 3 を様々なクラスの免疫細胞を枯渇させるまたは阻害する様々な抗体と同時投与した場合に、M C 3 8 腫瘍を保有するマウスにおける、B s A b 3 の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 5 A に示す実験では、マウスを、対照アイソタイプ抗体（黒丸）、B s A b 3（白丸）、B s A b 3 + 抗 C D 8 m A b（黒逆三角形）、B s A b 3 + 抗 C D 4 m A b（黒三角形）、または B s A b 3 + 抗 C D 4 m A b + 抗 C D 8 m A b（白菱形）で処置した。X 軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y 軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。図 5 B は、B s A b 3 を様々なクラスの免疫細胞を枯渇させるまたは阻害する様々な抗体と同時投与した場合に、M C 3 8 腫瘍を保有するマウスにおける、B s A b 3 の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 5 B に示す実験では、野生型 C 5 7 B L / 6 マウスまたは B A T F 3 - / - マウスを、対照アイソタイプ抗体または B s A b 3 で処置した。図 5 B は、対照抗体で処置した野生型マウス（黒丸）、B s A b 3 で処置した野生型マウス（白丸）、対照抗体で処置した B A T F 3 - / - マウス（白四角）、および B s A b 3 で処置した B A T F 3 - / - マウス（黒三角形）からのデータを示す。X 軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y 軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。

【図 5 - 2】図 5 C は、B s A b 3 を様々なクラスの免疫細胞を枯渇させるまたは阻害する様々な抗体と同時投与した場合に、M C 3 8 腫瘍を保有するマウスにおける、B s A b 3 の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 5 C に示す実験では、マウスを、対照アイソタイプ抗体（黒丸）、B s A b 3（白丸）、または B s A b 3 + 抗 C S F 1 R m A b（黒逆三角形）で処置した。X 軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y 軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。図 5 D は、B s A b 3 を様々なクラスの免疫細胞を枯渇させるまたは阻害する様々な抗体と同時投与した場合に、M C 3 8 腫瘍を保有するマウスにおける、B s A b 3 の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。図 5 D に示す実験では、マウスを、対照アイソタイプ抗体（黒丸）、B s A b 3（白丸）、または B s A b 3 + 抗 N K 1 . 1 m A b（黒逆三角形）で処置した。X 軸は腫瘍接種後の日数を

10

20

30

40

50

示し、Y軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。

【図6】図6は、NSG免疫不全マウスにおける、MDA-MB-231ヒト乳癌細胞に対するBsAb1およびBsAb2の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。MDA-MB-231腫瘍を保有するマウスを、対照アイソタイプ抗体(黒丸)、 $1\text{mg}/\text{kg}$ のBsAb1(黒三角形)、 $5\text{mg}/\text{kg}$ のBsAb1(白菱形)、 $10\text{mg}/\text{kg}$ のBsAb1(白三角形)、 $1\text{mg}/\text{kg}$ のBsAb2(白丸)、 $5\text{mg}/\text{kg}$ のBsAb2(黒菱形)、または $10\text{mg}/\text{kg}$ のBsAb2(黒四角)で処置した。X軸は処置後の日数を示し、Y軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。

【図7】図7は、MC38マウス腫瘍モデルにおける、TLR9作用剤と組み合わせたBsAb3の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。MC38腫瘍を保有するマウスを、対照アイソタイプ抗体(黒丸)、BsAb3(白四角)、TLR9作用剤(黒逆三角形)、またはBsAb3およびTLR9作用剤の両方(白三角形)で処置した。X軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。

【図8】図8は、B16F10マウス腫瘍モデルにおける、CDK2/4/6阻害剤と組み合わせたBsAb3の抗腫瘍有効性を試験する実験からのデータを示す図である。B16F10腫瘍を保有するマウスを、対照アイソタイプ抗体(黒丸)、BsAb3(黒三角形)、CDK2/4/6阻害剤(白四角)、またはBsAb3およびCDK2/4/6阻害剤の両方(白菱形)で処置した。X軸は腫瘍接種後の日数を示し、Y軸は腫瘍体積を mm^3 で示す。

【発明を実施するための形態】

【0046】

本明細書中では、CD47と特異的に結合する抗体、PD-L1と特異的に結合する抗体、ならびにCD47およびPD-L1と特異的に結合する二重特異性抗体を提供する。共通軽鎖を共有する二重特異性抗体を、本明細書中でさらに提供する。また、関連核酸、組成物、ならびに抗体を作製および使用方法も本明細書中に提供する。

【0047】

一般技法

本発明の実施には、別段に指定しない限りは、当分野の技術範囲内にある、分子生物学(組換え技法を含む)、微生物学、細胞生物学、生化学、および免疫学の慣用技術を用いる。そのような技法は、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、第2版(Sambrookら、1989) Cold Spring Harbor Press、Oligonucleotide Synthesis (M. J. Gait編、1984)、Methods in Molecular Biology、Humana Press、Cell Biology: A Laboratory Notebook (J. E. Cellis編、1998) Academic Press、Animal Cell Culture (R. I. Freshney編、1987)、Introduction to Cell and Tissue Culture (J. P. Mather and P. E. Roberts、1998) Plenum Press、Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle、J. B. Griffiths、およびD. G. Newell編、1993~1998) J. Wiley and Sons、Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.)、Handbook of Experimental Immunology (D. M. WeirおよびC. C. Blackwell編)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J. M. MillerおよびM. P. Calos編、1987)、Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubelら編、1987)、PCR: The Polymerase Chain Reaction、(Mullisら編、1994)、Current Protocols in Immunology (J. E. Coliganら編、1991)、Short Protocols in Mol

ecular Biology (Wiley and Sons, 1999)、Immunobiology (C. A. Janeway および P. Travers, 1997)、Antibodies (P. Finch, 1997)、Antibodies: a practical approach (D. Catty, 編、IRL Press, 1988~1989)、Monoclonal antibodies: a practical approach (P. Shepherd および C. Dean 編、Oxford University Press, 2000)、Using antibodies: a laboratory manual (E. Harlow および D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1999)、The Antibodies (M. Zanetti および J. D. Capra 編、Harwood Academic Publishers, 1995) などの文献中、ならびに必要に応じて上記参考文献のその後の版および対応するウェブサイト、詳述されている。

【0048】

本発明を以下、以下の定義および実施例を参考として使用して詳述する。特許および刊行物中に開示されるすべての配列を含めた、本明細書中に引用するすべての特許および刊行物は、参考として明確に組み込まれている。

【0049】

定義

別段に定義しない限りは、本明細書中で使用するすべての専門用語、表記法、および他の科学用語または用語法は、本発明が属する分野の技術者によって一般的に理解される意味を有することを意図する。たとえば、本明細書中で「A および / または B」などの語句中で使用される用語「および / または」は、A および B、A または B の両方、A (単独)、ならびに B (単独) を含むことを意図する。同様に、「A、B、および / または C」などの語句中で使用される用語「および / または」は、以下の実施形態のそれぞれを包含することを意図する：A、B、および C、A、B、または C、A または C、A または B、B または C、A および C、A および B、B および C、A (単独)、B (単独)、ならびに C (単独)。一部の事例では、一般的に理解される意味を持つ用語は、明瞭性および / または即時参照のために本明細書中に定義されており、そのような定義を本明細書中に包含することは、必ずしも当分野において一般的に理解されているものとの実質的な差異を表すと解釈されるべきでない。

【0050】

本明細書中で使用する単数形「a」、「an」、および「the」は、内容により明確にそうでないと指示されない限りは、その対応する複数の指示対象を含む。

【0051】

本明細書中で使用する数値範囲は、範囲を定義する数値を包括する。

【0052】

本明細書中における「約」値またはパラメータへの言及は、その値またはパラメータ自体、およびそのパラメータについて記述した数値を 10% も下回るまたは上回る場合がある値またはパラメータを対象とする実施形態を含む (かつそれを説明する)。たとえば、「約 5 mg / kg」の用量は 5 mg / kg を含み、4.5 mg / kg ~ 5.5 mg / kg の任意の値も含む。用語「約」を期間 (年、月、週、日など) のコンテキスト内で使用する場合、用語「約」とは、その期間 ± 次の下位期間の 1 定量 (たとえば、約 1 年間とは 11 ~ 13 カ月間を意味し、約 6 カ月間とは 6 カ月 ± 1 週間を意味し、約 1 週間とは 6 ~ 8 日間を意味するなど) または示した値の 10 パーセント以内の、いずれか長い方を意味する。

【0053】

本明細書中で使用するように、それぞれ、核酸は左から右に 5' から 3' の方向に記載され、アミノ酸配列は左から右にアミノからカルボキシの配向で記載される。従事者は、当分野の定義および用語のために特に Sambrook から、1989 および Ausubel FM から、1993 を参照されたい。記載した具体的な方法論、プロトコル、および試薬は

変動し得るため、本発明はそれらに限定されないことを理解されたい。

【0054】

用語「ポリペプチド」、「オリゴペプチド」、「ペプチド」、および「タンパク質」は本明細書中で互換性があるように使用され、任意の長さのアミノ酸の鎖を指す。たとえば、鎖は比較的短いもの（たとえば10～100個のアミノ酸）またはより長いものであり得る。鎖は、直鎖状もしくは分枝状であってよく、修飾アミノ酸を含んでよく、および/または非アミノ酸によって中断されてよい。この用語は、天然にまたは介入によって修飾されたアミノ酸鎖、たとえば、ジスルフィド結合形成、グリコシル化、脂質化、アセチル化、リン酸化、または標識構成成分とのコンジュゲーションなどの任意の他の操作もしくは修飾も包含する。また、この定義内には、たとえば、アミノ酸の1つまたは複数の類似体（たとえば非天然アミノ酸などを含む）および当分野で知られている他の修飾を含有するポリペプチドも含まれる。ポリペプチドは単鎖または会合した鎖として生じることができることが理解されよう。

10

【0055】

「抗体」とは、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチドなどの標的と、免疫グロブリン分子の可変領域中に位置する少なくとも1つの抗原認識部位を通じて、特異的結合することができる免疫グロブリン分子である。本明細書中で使用するこの用語は、インタクトなポリクローナルまたはモノクローナル抗体だけでなく、別段に指定しない限りは、特異的結合についてインタクトな抗体と競合するその任意の抗原結合部分、抗原結合部分を含む融合タンパク質、および、抗原認識部位を含む、免疫グロブリン分子の任意の他の修飾された立体配置も包含する。抗原結合部分としては、たとえば、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、ドメイン抗体（dAb、たとえばサメおよびラクダ抗体）、相補性決定領域（CDR）を含む断片、単鎖可変断片抗体（scFv）、マキシボディ、ミニボディ、細胞内抗体、ジアボディ、トリアボディ、テトラボディ、v-NAR、およびビス-scFv、ならびに、ポリペプチドに特異的抗原結合を与えるために十分である免疫グロブリンの少なくとも一部分を含有するポリペプチドが挙げられる。抗体は、IgG、IgA、もしくはIgMなどの任意のクラス（またはそのサブクラス）の抗体を含み、抗体は任意の特定のクラスのものである必要はない。その重鎖の定常領域の抗体アミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンを様々なクラスへと割り当てることができる。免疫グロブリンの5つの主要なクラス、すなわち、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在し、これらのうちのいくつかは、サブクラス（アイソタイプ）、たとえば、IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁、およびIgA₂へとさらに分け得る。免疫グロブリンの様々なクラスに対応する重鎖定常領域は、それぞれアルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ばれる。免疫グロブリンの様々な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。

20

30

【0056】

抗体の「可変領域」とは、単独または組み合わせたもののどちらかの、抗体軽鎖の可変領域または抗体重鎖の可変領域を指す。当分野で知られているように、重鎖および軽鎖の可変領域はそれぞれ、3つの超可変領域としても知られる相補性決定領域（CDR）によって接続された4つのフレームワーク領域（FR）からなり、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する。対象可変領域の変異体、特にCDR領域外（すなわちフレームワーク領域中）のアミノ酸残基に置換を有するものが所望される場合、対象可変領域を、対象可変領域と同じカノニカルクラスのCDR1およびCDR2配列を含有する他の抗体の可変領域と比較することによって、適切なアミノ酸置換、好ましくは保存的アミノ酸置換を同定することができる（ChothiaおよびLesk、J Mol Biol、196（4）：901～917、1987）。

40

【0057】

ある特定の実施形態では、CDRの決定的な描写および抗体の結合部位を含む残基の同定は、抗体の構造を解像することおよび/または抗体-リガンド複合体の構造を解像することによって達成される。ある特定の実施形態では、これは、X線結晶構造解析などの当

50

業者に知られている様々な技法のうちの任意のものによって達成することができる。ある特定の実施形態では、様々な分析方法を用いてCDR領域を同定または近似することができる。そのような方法の例としては、それだけには限定されないが、Kabata定義、Chothia定義、AbM定義、接触定義、およびコンホメーション定義が挙げられる。Kabata定義は、抗体中の残基に付番するための標準であり、典型的にはCDR領域を同定するために使用される。たとえばJohnsonおよびWu、2000、Nucleic Acids Res.、28:214~8を参照されたい。Chothia定義はKabata定義と似ているが、Chothia定義は特定の構造的ループ領域の位置を考慮に入れる。たとえば、Chothiaら、1986、J. Mol. Biol.、196:901~17、Chothiaら、1989、Nature、342:877~83を参照されたい。AbM定義は、抗体構造をモデリングする、Oxford Molecular Groupによって作成されたコンピュータプログラムの統合スイートを使用する。たとえば、Martinら、1989、Proc Natl Acad Sci (USA)、86:9268~9272、「AbM(商標)、A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies」、英国Oxford、Oxford Molecular, Ltd.を参照されたい。AbM定義は、知識データベースおよびSamudralaら、1999、「Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach」、PROTEINS, Structure, Function and Genetics 補遺、3:194~198によって記載されているものなどのアブイニシオ方法の組合せを使用して、一次配列から抗体の三次構造をモデリングする。接触定義は、利用可能な複合体結晶構造分析に基づく。たとえばMacCallumら、1996、J. Mol. Biol.、5:732~45を参照されたい。本明細書中でCDRの「コンホメーション定義」と呼ぶ別の手法では、CDRの位置は、抗原結合にエンタルピーの寄与を行う残基として同定され得る。たとえばMakabeら、2008、Journal of Biological Chemistry、283:1156~1166を参照されたい。さらに他のCDR境界定義は、上記手法のうちの1つに厳密に従わない場合があるが、それにもかかわらずKabata CDRの少なくとも一部分と重複するであろう。ただし、これらは、特定の残基または残基群が抗原結合に有意に影響を与えないという予測または実験的発見に鑑みて、短縮または延長されている場合がある。本明細書中で使用するCDRとは、手法の組合せを含めた、当分野で知られている任意の手法によって定義されるCDRを指し得る。本明細書中で使用する方法は、これらの手法のうちの任意ものに従って定義されたCDRを利用し得る。複数のCDRを含有する任意の所定の実施形態について、CDRは、Kabata、Chothia、延長、AbM、接触、および/またはコンホメーション定義のうちの任意のものに従って定義し得る。

【0058】

本明細書中で使用する用語「Fc鎖」とは抗体重鎖のC末端領域を指し、アイソタイプに応じて2~3個の定常ドメインを含む。本明細書中で使用するFc鎖は、ネイティブまたは変異Fc配列を含み得る。本明細書中で別段に指定しない限りは、Fc鎖または定常領域中のアミノ酸残基の付番は、Kabataら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、Public Health Service、National Institutes of Health、メリーランド州Bethesda、1991に記載されている、EUインデックスとも呼ばれるEU付番システムに従うものである。

【0059】

本明細書中で使用する用語「Fcドメイン」とは、2本のFc鎖を含む抗体の領域を指す。たとえば、標準のIgG形式では、抗体は2本の重鎖を有しており、それらはどちらも1本のFc鎖を有する。合わせて、2本のFc鎖は本明細書中で「Fcドメイン」と呼ばれる。

【0060】

「野生型Fc鎖」は、自然で見つかるFc鎖のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を含む。「野生型」ヒトIgG Fcとは、ヒト集団内で天然に生じるアミノ酸の配列を意味する。もちろん、個体間で若干変動し得ることと同様に、1つまたは複数の変更を野生型配列へ行っても、依然として本発明の範囲内にとどまり得る。

【0061】

「変異Fc鎖」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾が理由で野生型Fc鎖のものとは異なるが、それでも野生型Fc鎖の少なくとも1つのエフェクター機能を保持しているアミノ酸配列を含む。一部の実施形態では、変異Fc鎖は、野生型Fc鎖と比較して少なくとも1つのアミノ酸置換を有する、たとえば、野生型Fc鎖中に約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは約1～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書中における変異Fc鎖は、好ましくは野生型Fc鎖と少なくとも約80%の配列同一性、最も好ましくはそれと少なくとも約90%の配列同一性、より好ましくはそれと少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%の配列同一性を有する。一部の実施形態では、Fc鎖は野生型ヒンジ領域の一部または全部を（一般的にそのN末端に）含む。一部の実施形態では、Fcポリペプチドは機能的または野生型ヒンジ領域を含まない。

10

【0062】

本明細書中で使用する用語「ヒンジ領域」は、たとえば、Janewayら、Immunobiology: the immune system in health and disease、Elsevier Science Ltd.、NY（第4版、1999）、Bloomら、Protein Science、6:407～415、1997、およびHumphreysら、J. Immunol. Methods、209:193～202、1997に例示されている、当分野で知られている意味を含む。

20

【0063】

本明細書中で使用する用語「連結した」、「融合した」、および「融合」とは、互換性があるように使用され、さらに2つの要素または構成成分を、化学的コンジュゲーションまたは組換え手段を含めた任意の手段によって一緒に合わせることを指す。

【0064】

本明細書中で使用する用語「共有連結した」とは、指定した部分が、互いに直接共有結合しているか、連結ペプチドもしくは部分などの介在部分もしくは複数の部分を通じて互いに間接的に共有的に一緒になっているかどうかであることを意味する。

30

【0065】

本明細書中で使用する用語「遺伝子融合した」および「遺伝子融合」とは、2つ以上のタンパク質、ポリペプチド、またはその断片の、その個々のペプチド主鎖を介した、これらのタンパク質、ポリペプチド、または断片をコードしている単一のポリヌクレオチド分子の遺伝子発現を通じた、同一直鎖状の共有連結または付着を指す。そのような遺伝子融合は、単一の連続した遺伝子配列の発現をもたらす。

【0066】

本明細書中で使用する用語「修飾」とは、ポリペプチド配列中のアミノ酸の置換、挿入、および/もしくは欠失、タンパク質と化学的に連結した部分への変更、またはタンパク質、たとえば抗体の機能の改変を指す。たとえば、修飾は、抗体の機能の変更、またはタンパク質に付着した炭水化物構造の変更であり得る。本明細書中で使用する「アミノ酸修飾」とは、抗体中の1つまたは複数のアミノ酸残基の突然変異（置換）、挿入（付加）、または欠失を指す。用語「アミノ酸突然変異」とは、少なくとも1つの既存のアミノ酸残基を別の異なるアミノ酸残基で置換すること（たとえばアミノ酸残基を置き換えること）を示す。用語「アミノ酸欠失」とは、アミノ酸配列中の事前に決定された位置での少なくとも1つのアミノ酸残基の除去を示す。たとえば、突然変異L234Aは、抗体Fc領域中の位置234のアミノ酸残基リシンが、アミノ酸残基アラニンによって置換されていることを示す（リシンをアラニンで置換）（付番はEUインデックス付番システムに従う）

40

50

【 0 0 6 7 】

本明細書中で使用する用語「薬剤」とは、生体高分子、生体物質から作製した抽出物、生体高分子の混合物、化学物質、化学物質の混合物、および/または化学物質と生体高分子の混合物を示す。用語「治療剤」とは、生物活性を有する薬剤を指す。

【 0 0 6 8 】

「ヒト化」抗体とは、非ヒト超可変領域由来のアミノ酸残基およびヒトフレームワーク領域由来のアミノ酸残基を含むキメラ抗体を指す。好ましくは、ヒト化抗体はヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、レシピエントの相補性決定領域（CDR）由来の残基が、所望の特異性、親和性、および容量を有するマウス、ラット、またはウサギなどの非ヒト種のCDR由来の残基（ドナー抗体）によって置き換えられている。ヒト化抗体は、レシピエント抗体中にもインポートされたCDRまたはフレームワーク配列中にも見つかからないが、抗体の性能をさらに洗練および最適化するために含められる残基を含み得る。

10

【 0 0 6 9 】

「ヒト抗体」とは、ヒトによって産生された抗体のものに対応するアミノ酸配列、および/または本明細書中に開示するヒト抗体を作製する技法のうちの任意のものを使用して作製されたアミノ酸配列を保有するものである。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を明確に排除する。

【 0 0 7 0 】

用語「キメラ抗体」とは、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域配列がヒト抗体に由来する抗体などの、可変領域配列が1つの種に由来し、定常領域配列が別の種に由来する抗体を指すことを意図する。

20

【 0 0 7 1 】

「単一特異性抗体」とは、抗体の任意かつすべての結合部位が抗原上の同一のエピトープを特異的に認識するように、1個の分子あたり1つまたは複数の抗原結合部位を含む抗体を指す。したがって、単一特異性抗体が複数の抗原結合部位を有する場合、結合部位は、1つの抗原分子との結合について互いに競合する。

【 0 0 7 2 】

本明細書中で使用する「二重特異性抗体」とは、少なくとも2つの異なるエピトープに対して結合特異性を有する分子である。一部の実施形態では、二重特異性抗体は、2つの異なる抗原と同時に結合することができる。他の実施形態では、2つの異なるエピトープは同じ抗原上に存在し得る。

30

【 0 0 7 3 】

本明細書中で使用する「標的抗原」、「標的細胞抗原」、「腫瘍抗原」、または「腫瘍特異的抗原」とは、標的細胞、たとえば、癌細胞または腫瘍間質の細胞などの腫瘍中の細胞の表面上に提示される抗原決定基を指す。

【 0 0 7 4 】

本明細書中で使用する「単離抗体」とは、同定され、その天然環境の少なくとも1つの構成成分から分離および/または回収された抗体を意味する。たとえば、生物の少なくとも1つの構成成分から、または抗体が天然に存在するもしくは天然に産生される組織もしくは細胞から分離または除去された抗体は、本発明の目的のために「単離抗体」である。単離抗体はまた、組換え細胞内に *in situ* の抗体も含む。単離抗体は、少なくとも1つの精製または単離ステップに供された抗体である。特定の実施形態によれば、単離抗体は、他の細胞物質および/または化学薬品を実質的に含まない場合がある。

40

【 0 0 7 5 】

本明細書中で使用する用語「リンカー」とは、2つ以上のアミノ酸の長さのアミノ酸配列を指す。リンカーは、中性の極性または無極性のアミノ酸からなることができる。リンカーは、たとえば、2～50個のアミノ酸の長さ、たとえば、3、5、10、15、20、25、30、35、40、45、または50個のアミノ酸の長さなどの、2～100個

50

のアミノ酸の長さであり得る。リンカーは、たとえば、自己切断、または酵素的もしくは化学的な切断によって、「切断可能」であり得る。アミノ酸配列中の切断部位ならびにそのような部位で切断する酵素および化学薬品は当分野で周知であり、本明細書中にも記載されている。

【0076】

本明細書中で使用する用語「ジスルフィド結合」または「システイン - システインジスルフィド結合」とは、2つのシステイン間の共有的相互作用を指し、システインの硫黄原子が酸化されてジスルフィド結合を形成する。水素結合の1~2 kcal/molと比較して、ジスルフィド結合の平均結合エネルギーは約60 kcal/molである。本発明のコンテキストにおいて、ジスルフィド結合を形成するシステインは単鎖抗体のフレームワーク領域内にあり、抗体のコンホメーションを安定化する役割を果たす。システイン残基は、安定化ジスルフィド結合を分子内に作製することができるように、たとえば部位特異的突然変異誘発によって導入することができる。

10

【0077】

抗体に関して本明細書中で使用する用語「競合する」とは、第1の抗体またはその抗原結合断片（もしくは一部分）が第2の抗体またはその抗原結合部分の結合と十分に類似した様式でエピトープと結合し、その結果、第1の抗体とそのコグネイトエピトープとの結合の結果が、第2の抗体の非存在下における第1の抗体の結合と比較して、第2の抗体の存在下において検出可能に減少することを意味する。第2の抗体とそのエピトープとの結合も第1の抗体の存在下において検出可能に減少しているその代替は、そうである場合があるが、必ずしもそうではない。すなわち、第1の抗体は、第2の抗体が第1の抗体とその対応するエピトープとの結合を阻害することなしに、第2の抗体とそのエピトープとの結合を阻害することができる。しかし、それぞれの抗体が、他方の抗体とそのコグネイトエピトープまたはリガンドとの結合を、同程度、より多い程度、または少ない程度までかにかかわらず、検出可能に阻害する場合、抗体は、そのそれぞれのエピトープの結合について互いに「交叉競合する」と言われる。競合および交叉競合抗体はどちらも本発明に包含される。そのような競合または交叉競合が起こる機構にかかわらず（たとえば、立体障害、コンホメーション変化、または共通エピトープもしくはその一部分との結合）、当業者には、本明細書中で提供する教示に基づいて、そのような競合および/または交叉競合抗体が包含され、本明細書中に開示した方法に有用である可能性があることが理解された。

20

30

【0078】

本明細書中で使用する「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」または「ADCC」とは、Fc受容体（FcRs）を発現する非特異的細胞毒性細胞（たとえば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）が標的細胞上の結合抗体を認識し、続いて標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応を指す。目的分子のADCC活性は、米国特許第5,500,362号または第5,821,337号に記載されているものなどの*in vitro* ADCCアッセイを使用して評価することができる。そのようなアッセイのために有用なエフェクター細胞としては、末梢血単核球（PBMC）およびNK細胞が挙げられる。その代わりに、またはそれに加えて、目的分子のADCC活性は、*in vivo*で、たとえばClynesら、PNAS（USA）、95:652~656、1998中に開示されているものなどの動物モデルにおいて評価し得る。

40

【0079】

本明細書中で使用する「補体依存性細胞傷害」または「CDC」とは、補体の存在下における標的の溶解を指す。補体活性化経路は、補体系の第1の構成成分（C1q）と、コグネイト抗原と複合体形成した分子（たとえば抗体）との結合によって開始される。補体活性化を評価するために、たとえばGazzano-Santoroら、J. Immunol. Methods、202:163、1996に記載されているCDCアッセイを行い得る。

【0080】

50

本明細書中で使用する用語「免疫特異的に結合する」、「免疫特異的に認識する」、「特異的に結合する」、「特異的に認識する」、および類似の用語は、抗原（たとえばエピトープまたは免疫複合体）と特異的に結合し、別の分子と特異的に結合しない分子、たとえば結合ドメインを指す。抗原と特異的に結合する分子は、当分野で知られているアッセイ、たとえば、免疫アッセイ、B I A C O R E（商標）、または他のアッセイによって決定して、より低い親和性で他のペプチドまたはポリペプチドと結合し得る。好ましくは、抗原と特異的に結合する分子は、他のタンパク質と交叉反応しない。

【0081】

用語「エピトープ」とは、パラトープとして知られる抗体の抗原結合領域のうちの1つまたは複数で、抗体が認識、接触、および/または結合し得る、分子の一部分を指す。単一の抗原は複数のエピトープを有し得る。したがって、様々な抗体が抗原上の様々な領域と結合してよく、様々な生物学的効果を有し得る。エピトープはしばしば、アミノ酸または糖側鎖などの化学活性のある表面分子群からなり、特異的三次元構造的特徴および特異的電荷特徴を有する。本明細書中で使用するエピトープは、立体構造的または直鎖状のどちらかであり得る。コンフォメーションエピトープは、直鎖状ポリペプチド鎖の様々なセグメントからの空間的に並置されたアミノ酸によって生じる。直鎖状エピトープとは、ポリペプチド鎖中の隣接アミノ酸残基によって生じるものである。ある特定の実施形態では、エピトープは、抗原上のサッカライドの部分、ホスホリル基、またはスルホニル基を含み得る。

10

【0082】

本明細書中で使用する用語「抗原エピトープ」とは、当分野で周知の任意の方法、たとえば慣例の免疫アッセイによって決定して抗体が特異的に結合することができる、ポリペプチドの一部として定義される。「非線形エピトープ」または「コンフォメーションエピトープ」は、エピトープに特異的な抗体が結合する抗原タンパク質内の、連続していないポリペプチド（またはアミノ酸）を含む。抗原上の所望のエピトープが決定された後、そのエピトープに対する抗体を、たとえば本明細書中に記載の技法を使用して作製することが可能である。

20

【0083】

抗体とタンパク質またはペプチドとの相互作用を参照して使用する用語「特異的結合」または「特異的に結合する」とは、タンパク質上の特定の構造（すなわち抗原決定基またはエピトープ）の存在に依存する相互作用を指す。言い換えれば、抗体は、タンパク質一般ではなく特異的タンパク質構造を認識してそれと結合する。たとえば、抗体がエピトープ「A」に特異的である場合、標識した「A」および抗体を含有する反応中における、エピトープAを含有するタンパク質（または遊離した未標識のA）の存在は、抗体と結合した標識したAの量を減らすであろう。

30

【0084】

ある特定の実施形態では、「特異的に結合する」とは、たとえば、抗体が、約0.1 nM以下、より一般的には約1 μ M未満の K_D でタンパク質と結合することを意味する。ある特定の実施形態では、「特異的に結合する」とは、抗体が、ある時には少なくとも約0.1 μ M以下、またある時には少なくとも約0.01 μ M以下、またある時には少なくとも約1 nM以下の K_D で標的と結合することを意味する。様々な種中の相同タンパク質間の配列同一性が理由で、特異的結合は、複数の種中のタンパク質（たとえばヒトCD47およびマウスCD47）を認識する抗体を含むことができる。同様に、様々なタンパク質のポリペプチド配列の特定の領域内の相同性が理由で、特異的結合は、複数のタンパク質を認識する抗体を含むことができる。ある特定の実施形態では、第1の標的と特異的に結合する抗体または結合部分は、第2の標的と特異的に結合してもしなくてもよいことを理解されたい。したがって、「特異的結合」は、排他的結合、すなわち単一の標的との結合を必ずしも必要としない（ただし、含むことはできる）。したがって、一部の実施形態では、抗体は複数の標的と特異的に結合し得る。ある特定の実施形態では、複数の標的が抗体上の同じ抗原結合部位と結合し得る。たとえば、特定の事例では、抗体は2つの同一の

40

50

抗原結合部位を含んでよく、そのそれぞれが2つ以上のタンパク質上の同じエピトープと特異的に結合する。特定の代替実施形態では、抗体は多特異性であってよく、異なる特異性を有する少なくとも2つの抗原結合部位を含む。非限定的な例として、二重特異性抗体は、1つのタンパク質上のエピトープを認識する1つの抗原結合部位を含んでよく、第2のタンパク質上の異なるエピトープを認識する第2の異なる抗原結合部位をさらに含んでよい。一般的に、必ずしもではないが、結合への言及は特異的結合を意味する。

【0085】

抗原と特異的に結合する抗体は、当分野で知られているアッセイ、たとえば、免疫アッセイ、B I A C O R E (商標)、または他のアッセイによって決定して、より低い親和性で他のペプチドまたはポリペプチドと結合し得る。好ましくは、抗原と特異的に結合する抗体は他のタンパク質と交叉反応しない。

10

【0086】

抗体とタンパク質またはペプチドとの相互作用を参照して使用する用語「非特異的結合」または「バックグラウンド結合」とは、特定の構造の存在に依存しない相互作用を指す(すなわち、抗体は、エピトープなどの特定の構造ではなくタンパク質一般と結合している)。

【0087】

本明細書中で使用する用語「 k_{on} 」または「 k_a 」とは、抗体と抗原との会合の速度定数を指す。

【0088】

本明細書中で使用する用語「 k_{off} 」または「 k_d 」とは、抗体の抗体/抗原複合体からの解離の速度定数を指す。

20

【0089】

本明細書中で使用する用語「 K_D 」とは、抗体-抗原相互作用の平衡解離定数を指す。

【0090】

K_D および他の比を決定するための、会合および解離速度定数 k_{on} および k_{off} のそれぞれの決定は、たとえば、表面プラズモン共鳴に基づくバイオセンサーを使用して、分析物/リガンドの相互作用を特徴づけるために、捕捉試薬を介して低容量でセンサー表面上に固定されたリガンドの結合に関して分析物が一価である条件下で行い得る。分析は、たとえば、Karlssoonら、Anal. Biochem、349、136~147、2006に記載の動力学的滴定方法を使用して、またはマルチサイクル動力学的分析を使用して行い得る。所定のアッセイで用いるセンサーチップ、捕捉試薬、およびアッセイ緩衝剤は、Myszka、J. Mol. Recognit、12、279~284、1999における推奨のように、リガンドのセンサー表面上への安定した捕捉を与えるため、分析物と表面との非特異的結合を最小限にするため、動力学的分析に適切な分析物結合応答を得るために選択する。分析物/リガンドの相互作用あたりの分析物結合応答は二重参照を行い、MyszkaおよびMortonら、Biophys. Chem、64、127~137(1997)中に記載のように k_a 、 k_d 、および R_{max} をグローバルパラメータとして用いた1:1ラングミュア-「物質輸送限定モデル(mass transport limited model)」に当てはめた。平衡解離定数 K_D は運動速度定数の比から推定し、 $K_D = k_{off} / k_{on}$ である。そのような決定は、好ましくは25 または37 で行う。典型的には、速度定数(k_{on} / k_a および k_{off} / k_d)ならびに平衡解離定数は、全抗体および単量体(たとえばCD47タンパク質またはPD-L1タンパク質)を使用して測定する。

30

40

【0091】

本明細書中で使用する用語「結合親和性」とは、一般的に、分子(たとえば抗体)の単一の結合部位とその結合パートナー(たとえば抗原)との非共有的相互作用の合計の強度を指す。別段に指摘しない限りは、本明細書中で使用する「結合親和性」とは、結合対のメンバー(たとえば抗体および抗原)間の1:1の相互作用を反映する、内因性の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYに対する親和性は、一般的に解離定数(K_D)に

50

よって表すことができる。たとえば、 K_D は、約200 nM、150 nM、100 nM、60 nM、50 nM、40 nM、30 nM、20 nM、10 nM、8 nM、6 nM、4 nM、2 nM、1 nM、またはより強力であり得る。親和性は、本明細書中に記載したものを含めた、当分野で知られている一般方法によって測定することができる。低親和性抗体は、一般的に抗原とゆっくり結合し、容易に解離する傾向にある一方で、高親和性抗体は、一般的に抗原とより速く結合し、より長く結合したまま保たれる傾向にある。結合親和性を測定する様々な方法が当分野で知られており、これらのうちの任意ものを、本発明の目的のために使用することができる。具体的には、用語「結合親和性」とは、特定の抗原-抗体の相互作用の解離速度を指すことを意図する。 K_D は、「オフ速度(k_{off})」とも呼ばれる解離速度対会合速度または「オン速度(k_{on})」の比である。したがって、 K_D は k_{off}/k_{on} に等しく、モル濃度(M)として表される。したがって、 K_D が小さければ小さいほど、結合の親和性がより強力になるということになる。したがって、1 μ Mの K_D は、1 nMの K_D と比較して弱い結合親和性を示す。抗体の K_D 値は、当分野で十分に確立された方法を使用して決定することができる。抗体の K_D を決定するための一方法は、表面プラズモン共鳴(SPR)を使用すること、典型的にはBIAcoreシステムなどのバイオセンサーシステムを使用することによるものである。BIAcore動力的分析は、固定された分子(たとえばエピトープ結合ドメインを含む分子)をその表面上に有するチップからの、抗原の結合および解離を分析することを含む。抗体の K_D を決定するための別の方法は、バイオ層干渉法を使用すること、典型的にはOctet(Octet QK^eシステム、ForteBio)を使用することによるものである。

10

20

【0092】

抗体、断片、またはその誘導体などの本発明の二重特異性抗体に関して「生物活性のある」、「生物活性」、および「生物学的特徴」とは、そうでないと指定されない限りは、生体分子と結合する能力を有することを意味する。

【0093】

本明細書中で使用する用語「ポリヌクレオチド」、「核酸」、および「ヌクレオチド配列」としては、DNA分子(たとえばcDNAまたはゲノムDNA)、RNA分子(たとえばmRNA)、DNAおよびRNA分子の組合せまたはハイブリッドDNA/RNA分子、およびDNAまたはRNA分子の類似体が挙げられる。そのような類似体は、たとえば、それだけには限定されないがイノシンまたはトリチル化塩基を含むヌクレオチド類似体を使用して作製することができる。そのような類似体は、たとえばヌクレアーゼ耐性または細胞膜を横切る能力の増加などの有益な特質を分子に添える修飾された主鎖を含むDNAまたはRNA分子も含むことができる。核酸またはヌクレオチド配列は、一本鎖、二本鎖であり得、また、一本鎖および二本鎖部分をどちらも含有してよく、三重鎖部分を含有してよいが、好ましくは二本鎖DNAである。

30

【0094】

本明細書中で使用する用語「単離した」とは、その元の環境(たとえば、天然に存在するものであれば天然環境)から取り出された物質を指す。たとえば、生きた動物中に存在する、天然に存在するポリヌクレオチドまたはポリペプチドは単離されていないが、天然系において共存する物質の一部または全部から分離された、同じポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、単離されている。そのようなポリヌクレオチドはベクターの一部であり得る、および/あるいは、そのようなポリヌクレオチドまたはポリペプチドは、組成物、たとえば、混合物、溶液、もしくは懸濁液の一部である、または、ポリヌクレオチドもしくはポリペプチドを含む単離細胞もしくは培養細胞を含むことができ、それでも、ベクターまたは組成物がその天然環境の一部ではないという点で依然として単離されている。本明細書中で提供する任意の分子を単離し得る。

40

【0095】

本明細書中で使用する用語「作動可能に連結した」とは、記載した構成成分が、それらがその意図される様式で機能することを許可する関係性にある状況を指す。たとえば、コ

50

ード配列と「作動可能に連結した」制御配列は、制御配列に適したまたは適合性のある条件下でコード配列の発現が達成されるような様式でライゲーションされる。一般的に、「作動可能に連結した」とは、連結されるDNA配列が連続していること、分泌リーダーの場合は連続しておりかつ読取り相が一致していることを意味する。しかし、エンハンサーは連続している必要がない。連結は、好都合な制限部位でのライゲーションによって達成される。そのような部位が存在しない場合、合成オリゴヌクレオチドアダプターまたはリンカーを慣用の実施に従って使用する。

【0096】

本明細書中で使用する「ベクター」とは、1つまたは複数の目的の遺伝子または配列を宿主細胞中に送達すること、かつ好ましくは発現させることが可能な構築体を意味する。ベクターの例としては、それだけには限定されないが、ウイルスベクター、裸DNAまたはRNA発現ベクター、プラスミド、コスミドまたはファージベクター、陽イオン性縮合剤と会合させたDNAまたはRNA発現ベクター、リポソーム中にカプセル封入したDNAまたはRNA発現ベクター、およびプロデューサー細胞などの特定の真核細胞が挙げられる。

10

【0097】

本明細書中で使用する用語「発現制御配列」または「制御配列」とは、それがライゲーションされているコード配列の発現をもたらすために必要なポリヌクレオチド配列を指す。そのような制御配列の性質は宿主生物に応じて異なる。たとえば、原核生物では、そのような制御配列は一般的にプロモーター、リポソーム結合部位、およびターミネーターを含み、一部の例ではエンハンサーを含む。したがって、用語「制御配列」とは、最小限でも、その存在が発現に必要であるすべての構成成分を含むことを意図し、その存在が有利である追加の構成成分、たとえばリーダー配列も含み得る。

20

【0098】

「宿主細胞」は、ポリヌクレオチド挿入物を取り込むためのベクターレシピエントとなることができる、またはそうであった、個々の細胞または細胞培養物を含む。宿主細胞は単一の宿主細胞の子孫を含み、子孫は、天然、偶発的、または意図的な突然変異が原因で、必ずしも元の親細胞と完全に同一でなくてよい（形態学またはゲノムDNA補体において）。宿主細胞は、本発明のポリヌクレオチドを *in vivo* でトランスフェクトした細胞を含む。

30

【0099】

本明細書中で使用する「哺乳動物細胞」は、ヒト、ラット、マウス、ハムスター、モルモット、チンパンジー、またはマカクを含めた哺乳動物に由来する細胞への言及を含む。細胞は *in vivo* または *in vitro* で培養し得る。

【0100】

本明細書中で使用する用語「精製生成物」とは、生成物が通常会合している細胞構成物および/または目的試料中に存在し得る他の種類の細胞から単離された生成物の調製物を指す。

【0101】

本明細書中で使用する「実質的に純粋」とは、少なくとも50%純粋（すなわち汚染物質を含まない）、より好ましくは少なくとも90%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、さらにより好ましくは少なくとも98%純粋、最も好ましくは少なくとも99%純粋である材料を指す。

40

【0102】

本明細書中で使用する用語「癌」または「癌性」とは、異常な制御されない細胞の成長から生じる調節されない細胞成長、新生物、または腫瘍によって典型的に特徴づけられる、哺乳動物における生理的条件を指すまたはそれを説明する。一部の態様では、癌とは、局所的に留められている、転移のない悪性原発性腫瘍を指す。他の態様では、癌とは、隣接する身体構造に浸潤しそれを破壊し、遠位にまで拡大している、悪性腫瘍を指す。一部の態様では、癌は特異的癌抗原に関連している。

50

【0103】

本明細書中で使用する用語「悪性細胞」または「悪性腫瘍」とは、侵襲性であるおよび/または転移を受けることができる腫瘍または腫瘍細胞、すなわち癌細胞を指す。

【0104】

本明細書中で使用する用語「処置する」、「処置すること」、または「処置」とは、有益または所望の臨床結果を得るための手法である。本発明の目的のために、処置は、抗CD47、抗PD-L1、または抗CD47/抗PD-L1抗体分子（たとえば、CD47モノクローナル抗体、PD-L1モノクローナル抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体）を、対象、たとえば患者に投与することとして定義される。そのような投与は、たとえば、対象への直接投与によるもの、または対象に戻される、対象由来の単離した組織もしくは細胞への施用によるものであり得る。抗CD47、抗PD-L1、またはCD47/PD-L1抗体分子は、単独で、または1つもしくは複数の薬剤と組み合わせることで投与することができる。処置は、障害、障害の症状、または障害、たとえば癌に対する素因を治す、治癒する、緩和させる、解放する、変更する、救済する、軽快させる、和らげる、改善させる、またはそれに影響を与えるためのものであり得る。

10

【0105】

本明細書中で使用する用語「対象」とは、特定の処置のレシピエントとなる、それだけには限定されないが、ヒト、非ヒト霊長類、げっ歯動物などを含めた任意の動物（たとえば哺乳動物）を含むことを意図する。たとえば、対象は癌を有する患者（たとえばヒト患者または獣医学的患者）であり得る。典型的には、用語「対象」、「個体」、および「患者」は、ヒト対象への言及に関して本明細書中で互換性があるように使用される。

20

【0106】

本発明の用語「非ヒト動物」は、別段に注記しない限りは、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類、マウス、ラット、ウサギ、またはヤギなどの、すべての非ヒト脊椎動物、たとえば非ヒト哺乳動物および非哺乳動物を含む。

【0107】

本明細書中で使用する用語「薬学的に許容できる」とは、連邦政府もしくは州政府の規制機関によって認可された（もしくは認可可能な）、または米国薬局方もしくはヒトを含めた動物における使用について他の一般的に認識されている薬局方に列挙されている生成物または化合物を指す。

30

【0108】

本明細書中で使用する用語「薬学的に許容できる賦形剤、担体、もしくはアジュバント」または「許容される医薬担体」とは、対象に、本開示の少なくとも1つの抗体と一緒に投与ことができ、抗体の活性を破壊しない、賦形剤、担体、またはアジュバントを指す。賦形剤、担体、またはアジュバントは、治療効果を送達するために十分な用量で抗体と共に投与した場合に無毒性であるべきである。

【0109】

本明細書中で使用する用語「軽快させること」とは、本発明の抗体分子を投与しないことと比較して1つまたは複数の症状減らすまたは改善させることを意味する。また、「軽快させること」は、症状の持続期間の短縮または低下も含む。

40

【0110】

本明細書中で使用する用語「防止する」、「防止すること」、および「防止」とは、予防剤または治療剤の投与の結果、対象における、障害の1つまたは複数の症状の再発または発症の防止を指す。

【0111】

本明細書中で使用する「有効量」、「治療上有効な量」、「治療上十分な量」、または「有効投与量」とは、対象に単一または複数の用量で投与した際に、疾患、障害、もしくは副作用を防止する、治癒する、軽快させる、処置する、もしくは管理することにおいて、または疾患もしくは障害の進行速度を減少することにおいて、または本明細書中に記載の障害を有する対象の状態を、そのような処置の非存在下において予想されるものを超え

50

て、治癒を延長する、緩和させる、解放する、もしくは改善させることにおいて有効または十分な、任意の量の治療剤を指す。この用語はまた、その範囲内に、正常な生理的機能を増強させるために有効な量も含む。有効量は1つまたは複数の治療剤を投与するコンテキストにおいて考慮されることがあり、1つまたは複数の他の薬剤と併せて望ましい結果が達成され得るまたは達成される場合は、単一の薬剤を有効量で与えることが考慮されることがある。

【0112】

本明細書中で使用する、腫瘍または癌の「成長を阻害すること」とは、その成長および/または転移を遅くする、中断させる、静止させる、または停止させることを指し、必ずしも腫瘍成長の完全排除を示さない。

10

【0113】

作用強度とは、所定の強度の効果を生じるために必要な量の観点から表す、治療剤の活性の測度である。低濃度でより小さな応答を引き起こすより低い作用強度の薬剤と比較して、非常に強力な薬剤は低濃度でより大きな応答を引き起こす。作用強度は親和性および有効性の関数である。有効性とは、標的リガンドと結合した際に生物学的応答を生じる治療剤の能力、およびこの応答の定量的規模を指す。本明細書中で使用する用語「最大半量有効濃度 (EC₅₀)」とは、ベースラインと指定した曝露時間後の最大との真ん中の応答を引き起こす治療剤の濃度を指す。治療剤は阻害または刺激を引き起こし得る。EC₅₀値は、作用強度の測度として一般的に使用される、および本明細書中で使用する。

【0114】

20

本明細書中で使用する「組合せ療法」または「と組み合わせた」投与とは、複数の予防剤および/または治療剤の使用を指す。用語「組合せ療法」または「組み合わせる」の使用は、予防剤および/または治療剤を障害を有する対象に投与する順序を制限しない。言い換えれば、組合せ療法は、別々、順次、または同時に治療剤で処置することによって行い得る。「順次投与」の場合、第2の薬剤を投与した際またはそれが対象において活性となった際に、第1の投与した薬剤は対象に対して何らかの生理的効果を発揮している場合がある。

【0115】

予防剤および/または治療剤の投与に関して本明細書中で使用する用語「同時投与」とは、個々の薬剤が対象内に同時に存在するように薬剤を投与することを指す。同時投与は、分子を単一の組成物中で、または同じもしくは近い時間に投与する別々の組成物中で配合することによってもたらし得る (affected)。順次投与は必要に応じて任意の順序であり得る。

30

【0116】

本明細書中で使用する「CD47」とは、哺乳動物表面抗原分類47 (CD47) タンパク質、好ましくはヒトCD47タンパク質を指す。ヒトCD47のアミノ酸配列および関連情報は、たとえば、すべての目的のために本明細書中に参考として組み込まれている UniProtKB 番号 A0A0A1TSG4 の下で提供されている。

【0117】

典型的には、CD47の天然に存在する対立遺伝子変異体は、UniProtKB 番号 A0A0A1TSG4 に記載されているタンパク質と少なくとも95%、97%、または99%同一であるアミノ酸配列を有する。CD47タンパク質は、免疫グロブリンスーパーファミリーに属しており、シグナル調節タンパク質アルファ (SIRP)、トロンボスポンジン-1 (TSP-1)、および膜インテグリンなどの様々なリガンドと相互作用する膜貫通タンパク質として特徴づけられている。CD47は様々な種類の癌細胞によって過剰発現される。CD47リガンドSIRPは、マクロファージおよび樹状細胞 (DC) などの先天性免疫系の様々な細胞上で発現される。CD47とSIRPとの結合はSIRPを発現する免疫細胞の活性を抑制し、したがって、腫瘍細胞が先天性免疫系監視を回避することを可能にする。

40

【0118】

50

本明細書中で使用する「CD47と結合する抗体」、「CD47を認識する抗体」、「抗CD47抗体」、「抗CD47抗体分子」、「CD47と特異的に結合する抗体」、「CD47抗体」などは、CD47と特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインを含有する分子を含む。本発明のCD47抗体分子は、CD47、たとえば、ヒトCD47、マウスCD47、ラットCD47、カニクイザルCD47と相互作用するまたはそれを認識する、たとえば結合する（たとえば特異的に結合する）その抗体を含む。

【0119】

本明細書中で使用する「PD-L1」とは、哺乳動物プログラム死リガンド1（PD-L1）タンパク質、好ましくはヒトPD-L1タンパク質を指す。PD-L1はCD274またはB7-H1としても知られる。ヒトPD-L1のアミノ酸配列および関連情報は、たとえば、すべての目的のために本明細書中に参考として組み込まれているUniProtKB番号Q9NZQ7の下で提供されている。

10

【0120】

典型的には、PD-L1の天然に存在する対立遺伝子変異体は、UniProtKB番号Q9NZQ7に記載されているタンパク質と少なくとも95%、97%、または99%同一であるアミノ酸配列を有する。PD-L1タンパク質は、たとえばPD-1との結合によって、免疫系の適応アームの抑制に関与している膜貫通タンパク質として特徴づけられている。PD-L1は様々な種類の癌細胞によって過剰発現される。PD-L1は、T細胞などの適応免疫系の細胞上で発現される受容体PD-1のリガンドである。PD-L1とPD-1との結合はPD-1を発現する免疫細胞の活性を抑制し、したがって、腫瘍細胞が免疫細胞（たとえばエフェクターT細胞）を発現するPD-1を回避することを可能にする。

20

【0121】

本明細書中で使用する「PD-L1と結合する抗体」、「PD-L1を認識する抗体」、「抗PD-L1抗体」、「抗PD-L1抗体分子」、「PD-L1と特異的に結合する抗体」、「PD-L1抗体」などは、PD-L1と特異的に結合する少なくとも1つの結合ドメインを含有する分子を含む。本発明のPD-L1抗体分子は、PD-L1、たとえば、ヒトPD-L1、マウスPD-L1、ラットPD-L1、カニクイザルPD-L1と相互作用するまたはそれを認識する、たとえば結合する（たとえば特異的に結合する）その抗体を含む。

30

【0122】

本明細書中で使用する用語「CD47/PD-L1二重特異性抗体」とは、CD47およびPD-L1と特異的に結合するように設計された分子を指す。

【0123】

本明細書中で使用する「第1のポリペプチド」とは、第2のポリペプチドと会合させる任意のポリペプチドである。第1のポリペプチドおよび第2のポリペプチドは界面で対面する。界面に加えて、第1のポリペプチドは、「結合ドメイン」（たとえば、抗体可変ドメイン、受容体結合ドメイン、リガンド結合ドメイン、もしくは酵素ドメイン）、またはCH2、CH1、およびCLドメインを含む抗体定常ドメイン（もしくはその部分）などの、1つまたは複数の追加のドメインを含み得る。通常、第1のポリペプチドは、抗体に由来する少なくとも1つのドメインを含む。このドメインは、好都合には抗体のCH3ドメインなどの定常ドメインであり、第1のポリペプチドの界面を形成することができる。例示的な第1のポリペプチドとしては、抗体重鎖ポリペプチド、抗体定常ドメインを異種ポリペプチドの結合ドメインと組み合わせたキメラ、受容体ポリペプチド、リガンドポリペプチド、および抗体可変ドメインポリペプチド（たとえば二重特異性抗体）が挙げられる。

40

【0124】

界面に加えて、第2のポリペプチドは、「結合ドメイン」（たとえば、抗体可変ドメイン、受容体結合ドメイン、リガンド結合ドメイン、もしくは酵素ドメイン）、またはCH2、CH1、およびCLドメインを含む抗体定常ドメイン（もしくはその部分）などの追

50

加のドメインを含み得る。通常、第2のポリペプチドは、抗体に由来する少なくとも1つのドメインを含む。このドメインは、好都合には抗体のCH3ドメイン定常領域であり、第2のポリペプチドの界面を形成することができる。例示的な第2のポリペプチドとしては、抗体重鎖ポリペプチド、抗体定常ドメインを異種ポリペプチドの結合ドメインと組み合わせさせたキメラ、および抗体可変ドメインポリペプチド（たとえば二重特異性抗体）が挙げられる。

【0125】

本明細書中で使用する用語「複合体」または「複合体形成した」とは、ペプチド結合ではない結合および/または力（たとえば、ファンデルワールス、疎水性、親水性の力）を通じて互いに相互作用する2つ以上の分子の会合を指す。一実施形態では、複合体はヘテロ多量体である。本明細書中で使用する用語「タンパク質複合体」または「ポリペプチド複合体」は、タンパク質複合体中にタンパク質とコンジュゲーションした非タンパク質実体を有する複合体を含むことが、理解されよう（たとえば、それだけには限定されないが毒素または検出剤などの化学的分子を含む）。

10

【0126】

本明細書中に記載したものに類似または等価な任意の材料および方法を本発明の実施または試験において使用することができるが、好ましい材料および方法を以下に記載する。

【0127】

材料および方法

抗体を産生するための様々な技法が記載されており、モノクローナル抗体を作製するための従来のハイブリドーマ方法、抗体（キメラ抗体、たとえばヒト化抗体を含む）を作製するための組換え技法、トランスジェニック動物中における抗体産生、および「完全ヒト」抗体を調製するための最近記載されたファージディスプレイ技術が挙げられる。

20

【0128】

本明細書中で提供する抗体のうちの任意のものを作製する方法を、本明細書中で提供する。本発明の抗体は、当分野で知られている手順によって作製することができる。ポリペプチドは、抗体のタンパク質分解もしくは他の分解によって、上述の組換え方法（すなわち単一もしくは融合ポリペプチド）によって、または化学合成によって生成することができる。抗体のポリペプチド、特に約50個までのアミノ酸のより短いポリペプチドは、化学合成によって好都合に作製される。化学合成の方法は当分野で知られており、市販されている。たとえば、抗体は、固相方法を用いた自動ポリペプチド合成器によって生成することができる。米国特許第5,807,715号、第4,816,567号、および第6,331,415号も参照されたい。

30

【0129】

二重特異性抗体を調製するための任意の適切な方法を使用して、本明細書中で提供する二重特異性抗体を調製し得る（たとえば抗体の特長および構成成分の選択に応じて）。

【0130】

二重特異性抗体を作製する一手法によれば、所望の結合特異性を有する抗体可変ドメインを免疫グロブリン定常領域配列と融合する。融合は、好ましくは、ヒンジ、CH2、およびCH3領域の少なくとも一部を含む免疫グロブリン重鎖定常領域とのものである。一部の実施形態では、軽鎖結合の部位を含有する第1の重鎖定常領域（CH1）が、融合体のうちの少なくとも1つ中に存在することができる。一部の実施形態では、免疫グロブリン重鎖融合体および所望する場合は免疫グロブリン軽鎖をコードしているポリヌクレオチドを別々の発現ベクター内に挿入してよく、適切な宿主生物内にコトランスフェクトしてよい。他の実施形態では、少なくとも2本のポリペプチド鎖の等比での発現が高収率をもたらす場合、または比が特に有意差をもたらさない場合は、2本または3本すべてのポリペプチド鎖のコード配列を1つの発現ベクター内に挿入し得る。

40

【0131】

一手法では、二重特異性抗体は、一方のアーム中に第1の結合特異性を有し、他方のアーム中にハイブリッド免疫グロブリン重鎖-軽鎖の対（第2の結合特異性を提供する）を

50

有する、ハイブリッド免疫グロブリン重鎖から構成される。二重特異性分子の半分にのみ免疫グロブリン軽鎖を有するこの不斉構造は、所望の二重特異性化合物を、望まない免疫グロブリン連鎖反応から分離することを容易にする。この手法はPCT公開WO94/04690号中に記載されている。

【0132】

別の手法では、二重特異性抗体は、1つのアーム中の第1のヒンジ領域中のアミノ酸修飾から構成されており、第1のヒンジ領域中の置換されたアミノ酸は、別のアーム中の第2のヒンジ領域中の対応するアミノ酸とは逆の電荷を有する。この手法は国際特許出願PCT/US2011/036419号(WO2011/143545号)中に記載されている。

【0133】

別の手法では、所望のヘテロ多量体またはヘテロ二量体タンパク質(たとえば二重特異性抗体)の形成は、第1および第2のFc鎖の間の界面を変更または操作設計することによって増強される。この手法では、二重特異性抗体はCH3領域から構成されており、CH3領域は、一緒に相互作用してCH3界面を形成する第1のCH3ポリペプチドおよび第2のCH3ポリペプチドを含み、CH3界面内の1つまたは複数のアミノ酸はホモ二量体形成を不安定化し、ホモ二量体形成にとって静電的に不利ではない。この手法は国際特許出願PCT/US2011/036419号(WO2011/143545号)中に記載されている。一部の実施形態では、二重特異性抗体の一方Fc鎖は、ヒンジ領域中の位置223および228(たとえば(C223EまたはC223R)および(P228EまたはP228R))ならびにヒトIgG2のCH3領域中の位置409(たとえばK409R(EU付番スキーム))にアミノ酸修飾を含むことができ、二重特異性抗体の他方のFc鎖は、ヒンジ領域中の位置223、225、および228(たとえば、(C223EまたはC223R)、(E225R)、および(P228EまたはP228R))ならびにヒトIgG2のCH3領域中の位置368(たとえばL368E(EU付番スキーム))にアミノ酸修飾を含むことができる。他の実施形態では、二重特異性抗体の一方Fc鎖は、ヒンジ領域中の位置223および228(たとえば(C223EまたはC223R)および(P228EまたはP228R))ならびにヒトIgG2のCH3領域中の位置368(たとえばL368E(EU付番スキーム))にアミノ酸修飾を含むことができ、二重特異性抗体の他方のFc鎖は、ヒンジ領域中の位置223、225、および228(たとえば、(C223EまたはC223R)、(E225R)、および(P228EまたはP228R))ならびにヒトIgG2のCH3領域中の位置409(たとえばK409R(EU付番スキーム))にアミノ酸修飾を含むことができる。一部の実施形態では、二重特異性抗体は、ヒンジ領域中の位置221および228(たとえば(D221RまたはD221E)および(P228RまたはP228E))ならびにヒトIgG1のCH3領域中の位置409または368(たとえばK409RまたはL368E(EU付番スキーム))にアミノ酸修飾を含むことができる。一部の実施形態では、二重特異性抗体は、ヒンジ領域中の位置228(たとえば(P228EまたはP228R))およびヒトIgG4のCH3領域中の位置409または368(たとえばR409またはL368E(EU付番スキーム))にアミノ酸修飾を含むことができる。

【0134】

一部の実施形態では、二重特異性抗体はFc鎖中にノブ-イン-ホール突然変異を有し得る。たとえば、一部の実施形態では、ノブ-イン-ホール突然変異を有する二重特異性抗体において、抗体Fcドメインの第1のFc鎖は「ノブ」を形成するための1つもしくは複数の突然変異を有しており、抗体Fcドメインの第2のFc鎖は「ホール」を形成するための1つもしくは複数の突然変異を有している(またはその逆)。例示的な抗体のノブ-イン-ホール操作設計は、米国特許第5,731,168号、PCT公開WO2009089004号、米国公開第20090182127号、MarvinおよびZhu、Acta Pharmacologica Sincia(2005)26(6):649~658、ならびにKontermann(2005)Acta Pharmacol.

10

20

30

40

50

S i n .、 2 6 : 1 ~ 9 中に記載されている。

【 0 1 3 5 】

「ノブ」とは、第1のポリペプチド（たとえば第1のFc鎖）の界面から突出しており、したがって隣接する第2のポリペプチド（たとえば第2のFc鎖）中の埋め合わせをするホール中に配置してヘテロ二量体を安定化することができ、それによってホモ二量体形成よりもヘテロ二量体形成を支持する、少なくとも1つのアミノ酸側鎖を指す。ノブは元の界面中に存在してよく、または合成により導入してもよい（たとえば界面をコードしている核酸を変更することによって）。通常、第1のポリペプチドの界面をコードしている核酸は、ノブをコードするように変更されている。これを達成するために、第1のポリペプチド中の少なくとも1つの元のアミノ酸残基をコードしている核酸を、元のアミノ酸残基よりも長い側鎖体積を有する少なくとも1つの「インポート」アミノ酸残基をコードしている核酸で置き換える。ノブを形成するための特定のインポート残基は、一般的には天然に存在するアミノ酸残基であり、好ましくはアルギニン（R）、フェニルアラニン（F）、チロシン（Y）、およびトリプトファン（W）から選択される。

10

【 0 1 3 6 】

「ホール」とは、第2のポリペプチド（たとえば第2のFc鎖）の界面からくぼんでおり、したがって隣接する第1のポリペプチド（たとえば第1のFc鎖）中の対応するノブを収容する、少なくとも1つのアミノ酸側鎖を指す。ホールは元の界面中に存在してよく、または合成により導入してもよい（たとえば界面をコードしている核酸を変更することによって）。通常、第2のポリペプチドの界面をコードしている核酸は、ホールをコードするように変更されている。これを達成するために、第2のポリペプチド中の少なくとも1つの元のアミノ酸残基をコードしている核酸を、元のアミノ酸残基よりも小さい側鎖体積を有する少なくとも1つの「インポート」アミノ酸残基をコードしているDNAで置き換える。ホールを形成するための特定のインポート残基は、通常は天然に存在するアミノ酸残基であり、好ましくはアラニン（A）、セリン（S）、スレオニン（T）、およびバリン（V）から選択される。

20

【 0 1 3 7 】

本明細書中で使用する用語「界面」とは、典型的には、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの接触に関与する場合があるドメイン中に存在する任意のアミノ酸残基を指す。「元のアミノ酸」残基とは、「インポートアミノ酸」残基によって置き換えられるものであり、これは元の残基よりも小さいまたは大きい側鎖体積を有することができる。インポートアミノ酸残基は天然に存在するまたは天然に存在しないアミノ酸残基であり得るが、好ましくは前者である。「天然に存在する」アミノ酸残基とは、遺伝暗号によってコードされている残基である。「天然に存在しない」アミノ酸残基とは、遺伝暗号によってコードされていないが、ポリペプチド鎖中の隣接アミノ酸残基と共有結合することができる残基を意味する。天然に存在しないアミノ酸残基の例は、ノルロイシン、オルニチン、ノルバリン、ホモセリン、およびE l l m a nら、M e t h . E n z y m .、 2 0 2 : 3 0 1 ~ 3 3 6 (1 9 9 1) 中に記載されているものなどの他のアミノ酸残基類似体である。

30

【 0 1 3 8 】

一部の実施形態では、二重特異性抗体は、W O 2 0 1 6 1 6 6 6 2 9 号中に提供される二重特異性抗体のうちの任意のものの特長または特徴のうちの任意のものを有し得る。

40

【 0 1 3 9 】

任意選択の二重特異性抗体形式は、共有連結した二重特異性ヘテロ二量体ジアボディ構造に基づくFv由来の戦略であり、二重親和性再標的化（DART（登録商標））タンパク質としても知られており、これは、たとえば、米国特許公開第2007/0004909号、第2009/0060910号、および第2010/0174053号中に記載されている。

【 0 1 4 0 】

本発明の分子（すなわち結合ドメイン）をコードしている核酸配列が得られた後、分子

50

を生成するためのベクターを当分野で周知の技法を使用して、組換えDNA技術によって生成させ得る。

【0141】

本発明の抗体（たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体）結合ドメインをコードしているポリヌクレオチドは、当分野で知られている天然において会合しているまたは異種のプロモーター領域を含めた、抗体コード配列と作動可能に連結した発現制御ポリヌクレオチド配列を含み得る。発現制御配列は、真核宿主細胞を形質転換させるまたはそれにトランスフェクトすることができるベクター中の真核プロモーター系であってよいが、原核宿主のための制御配列も使用し得る。ベクターが適切な宿主細胞系内に取り込まれた後、宿主細胞を、ヌクレオチド配列を発現させるため、かつ所望に応じて抗体を収集および精製するために適した条件下で繁殖させる。真核細胞系としては、CHO細胞系、様々なCOS細胞系、HeLa細胞、骨髓腫細胞系、形質転換B細胞、またはヒト胎児腎臓細胞系が挙げられる。

10

【0142】

一実施形態では、本発明の抗体をコードしているDNAは、慣用の手順を使用して（たとえば抗体の重鎖および軽鎖をコードしている遺伝子と特異的に結合することができるオリゴヌクレオチドプローブを使用することによって）単離および配列決定する。単離した後、DNAを発現ベクター内に入れてよく、その後、これをそうでなければ免疫グロブリンタンパク質を産生しないサルCOS細胞、CHO細胞、または骨髓腫細胞などの宿主細胞内にトランスフェクトして、組換え宿主細胞中でのモノクローナル抗体の合成を得る。また、DNAは、たとえば対応する抗体の1つまたは複数の特性（たとえば結合親和性、免疫原性など）を改善させるために修飾してもよい。

20

【0143】

抗CD47抗体

一実施形態では、抗CD47抗体を本明細書中で提供する。

【0144】

一態様では、(a)配列番号1、3、7、8、もしくは9に示すVH配列のVH相補性決定領域1(VH CDR1)、VH相補性決定領域2(VH CDR2)、およびVH相補性決定領域3(VH CDR3)を含む重鎖可変領域(VH)、ならびに/または(b)配列番号2もしくは6に示すVL配列のVL相補性決定領域1(VL CDR1)、VL相補性決定領域2(VL CDR2)、およびVL相補性決定領域3(VL CDR3)を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、抗CD47抗体を提供する。

30

【0145】

別の態様では、表1に列挙したVHのうちの任意の1つおよび/またはVL配列のうちの任意の1つを有する抗CD47抗体を提供する。表1では、下線を引いた配列はKabataによるCDR配列であり、太字のものはChothiaによるものである。一実施形態では、本発明は、VHおよび/またはVLを含む抗体であって、(a)VHは配列番号1、3、7、8、もしくは9を含む、および/または(b)VLは配列番号2もしくは6を含む抗体を提供する。

【0146】

40

【表 1】

表 1:例示的な抗 CD47 VH および VL 配列

| 説明 | 配列 |
|---------------------------|--|
| CD47_ P01A11_75 VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSSY AI SWVRQAPGQ GLEWMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDAGRSSDVGWYVGAIDVWGQGTLVTVSS (配列 番号 1) |
| CD47_ P01A11_497 VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFTSY AI SWVRQAPGQ GLEWMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDAGRSSDVGWYVGALDVWGQGTLVTVSS (配列 番号 3) |
| CD47_ P01A11_親 VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFTNY AI SWVRQAPGQ GLEWMGGISPLFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLR SEDTAVYYCARDGGRSSDVGWYVGAMDVWGQGTLVTVSS (配 列番号 7) |
| CD47_ P14D04_親 VH | EVQLLESGGGLVQPGGSLRRLSCAASGFSFSTFTMNWVRQAPGK GLEWVSTISGTGGNTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR AEDTAVYYCARRRSTVGSNGHSYWFDYWGQGTLVTVSS (配列 番号 8) |
| CD47_ P01A08_親 VH | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFSNYAITWVRQAPGQ GLEWMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRS EDTAVYYCARDGGRSSDGGWRGAGMDYWGQGTLVTVSS (配 列番号 9) |
| 共通軽鎖 1 VL | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYQQLPGTA PKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYC AAWDDSLSGVVFGGGKLTVL (配列番号 2) |
| 共通軽鎖 2 VL | DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAP KLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCQ QSYSTPLTFGQGTKVEIK (配列番号 6) |

10

20

30

【0147】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗 CD47 抗体は VH および VL を含み、VH は配列番号 1 の配列を含み、VL は配列番号 2 の配列を含む。一実施形態では、本明細書中で提供する抗 CD47 抗体は VH および VL を含み、VH は配列番号 3 の配列を含み、VL は配列番号 2 の配列を含む。一実施形態では、本明細書中で提供する抗 CD47 抗体は VH および VL を含み、VH は配列番号 7 の配列を含み、VL は配列番号 2 の配列を含む。一実施形態では、本明細書中で提供する抗 CD47 抗体は VH および VL を含み、VH は配列番号 9 の配列を含み、VL は配列番号 2 の配列を含む。一実施形態では、本明細書中で提供する抗 CD47 抗体は VH および VL を含み、VH は配列番号 8 の配列を含み、VL は配列番号 6 の配列を含む。

40

【0148】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗 CD47 抗体は、様々な結合特異性を有する複数の様々な抗体と同じ VL アミノ酸配列を有する。したがって、本明細書中で提供する様々な抗体において、抗体は、異なる VH 配列であるが同じ VL 配列を有し得る。これらの抗体は同じ VL 配列を有するが、異なる VH 配列を有することが原因で、これらは互いに異なる結合親和性および/または特異性を有する。一部の実施形態では、同じ VL 配列を共有する本明細書中で提供する抗体は、様々な抗原と特異的に結合する。たとえば

50

、同じアミノ酸配列を共有するV Lを有する抗C D 4 7および抗P D - L 1抗体を本明細書中で提供する。複数の抗体によって共有される、本明細書中で提供するV L配列は、本明細書中で「共通軽鎖」と呼ぶ。表1は、本明細書中で提供する抗体の一部である様々な共通軽鎖の配列情報を提供する。たとえば、「共通軽鎖1」V Lは、以下の様々な抗C D 4 7および抗P D - L 1抗体によって共有される：C D 4 7 __ P 0 1 A 1 1 __ 7 5、C D 4 7 __ P 0 1 A 1 1 __ 4 9 7、C D 4 7 __ P 0 1 A 1 1 __ 親、C D 4 7 __ P 0 1 A 0 8 __ 親、P D L 1 __ P 0 6 B 0 5 __ 2 4 5、P D L 1 __ P 0 6 B 0 5 __ 親、P D L 1 __ P 0 6 A 0 9 __ 親。別の例では、「共通軽鎖2」V Lは、以下の様々な抗C D 4 7および抗P D - L 1抗体によって共有される：C D 4 7 __ P 1 4 D 0 4 __ 親、P D L 1 __ D 0 4 D 0 9 __ 親V L。

10

【0149】

本発明はまた、C D 4 7に対する抗体のC D R部分も提供する。

【0150】

一態様では、表2に列挙したV H C D R配列のうちの任意の1つおよび/またはV L C D R配列のうちの任意の1つを有する抗C D 4 7抗体を提供する。一態様では、本発明は、C D 4 7と特異的に結合する抗体であって、(a) (i) 配列番号1 3、1 4、1 5、2 2、2 3、2 5、2 6、2 7、3 1、3 2、3 3、3 7、3 8、もしくは3 9を含むV H C D R 1、(i i) 配列番号1 6、1 7、2 8、2 9、3 4、もしくは3 5を含むV H C D R 2、および(i i i) 配列番号1 8、2 4、3 0、3 6、もしくは4 0を含むV H C D R 3を含むV H、ならびに/または(b) (i) 配列番号1 9もしくは5 3を含むV L C D R 1、(i i) 配列番号2 0もしくは5 4を含むV L C D R 2、および(i i i) 配列番号2 1もしくは5 5を含むV L C D R 3を含むV Lを含む抗体を提供する。

20

【0151】

30

40

50

【表 2 - 1】

表 2:例示的な抗 CD47 CDR 配列

| VH CDRs | | | | |
|----------------------------|---|---|--|----|
| mAb | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | |
| CD47_ P01A11 _75 VH | GYTFSSY (配列番号 13)(Chothia) SYAIS (配列番号 14) (Kabat) GYTFSSY AIS (配列 番号 15)(延長) | SPIFGT (配列番号 16) (Chothia) GISPIFGTANYAQKF QG (配列番号 17) (Kabat) | DAGRSSDVGWYVGA IDV (配列番号 18)(Chothia / Kabat) | 10 |
| CD47_ P01A11 _497 VH | GGTFTSY (配列番号 22) (Chothia) SYAIS (配列番号 14) (Kabat) GGTFTSYAIS (配列 番号 23) (延長) | SPIFGT (配列番号 16) (Chothia) GISPIFGTANYAQKF QG (配列番号 17) (Kabat) | DAGRSSDVGWYVGA LDV (配列番号 24) (Chothia / Kabat) | 20 |
| CD47_ P01A11 _親 VH | GYTFTNY (配列番号 25) (Chothia) NYAIS (配列番号 26) (Kabat) GYTFTNYAIS (配列 番号 27) (延長) | SPLFGT (配列番号 28) (Chothia) GISPLFGTANYAQKF QG (配列番号 29) (Kabat) | DGGRSSDVGWYVGA MDV (配列番号 30) (Chothia / Kabat) | 20 |
| CD47_ P14D04 _親 VH | GFSFSTF (配列番号 31) (Chothia) TFTMN (配列番号 32) (Kabat) GFSFSTFTMN (配列 番号 33) (延長) | SGTGGN (配列番号 34) (Chothia) TISGTGGNTYYADSV KG (配列番号 35) (Kabat) | RRSTVGSNGHSYWF DY (配列番号 36) (Chothia / Kabat) | 30 |
| CD47_ P01A08 _親 VH | GYTFSNY (配列番号 37) (Chothia) NYAIT (配列番号 38) (Kabat) GYTFSNYAIT (配列 番号 39) (延長) | SPIFGT (配列番号 16) (Chothia) GISPIFGTANYAQKF QG (配列番号 17) (Kabat) | DGGRSSDGGWRGA GMDY (配列番号 40) (Chothia / Kabat) | 40 |

【 0 1 5 2 】

【表 2 - 2】

| VL CDRs | | | |
|--------------|---|--|--|
| mAb | VL CDR1 | VL CDR2 | VL CDR3 |
| 共通軽鎖 1 VL | SGSSSNIGSNYVY (配列番号 19) (Chothia / Kabat) | RNNQRPS (配列番号 20) (Chothia / Kabat) | AAWDDSLSGVV (配列 番号 21) (Chothia / Kabat) |
| 共通軽鎖 2 VL | RASQSISSYLN (配 列番号 53) (Chothia / Kabat) | AASSLQS (配列番号 54) (Chothia / Kabat) | QQSYSTPLT (配列番 号 55) (Chothia / Kabat) |

10

【0153】

一部の実施形態では、抗CD47抗体を本明細書中で提供し、VHは、配列番号1、3、7、8、もしくは9の配列、または配列中に1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個のアミノ酸置換を有するその変異体を含む、および/あるいは、VLは、配列番号2もしくは6の配列、または配列中に1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10個のアミノ酸置換を有するその変異体を含む。置換は保存的アミノ酸置換であってもよい。置換はCDR領域中でなくてもよい。

【0154】

本発明はまた、本明細書中で提供する抗CD47抗体のscFvも包含する。単鎖可変領域断片は、たとえば、それだけには限定されないが、短い連結ペプチドを使用することによって軽および/または重鎖可変領域を遺伝子融合させることによって作製される(Birdら、Science、242:423~426、1988)。ジアボディまたはミニボディなどの単鎖抗体の他の形態も包含される。

20

【0155】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗CD47抗体はモノクローナル抗体である。抗CD47抗体はヒト抗体またはヒト化抗体であってもよい。

【0156】

抗PD-L1抗体

一部の実施形態では、抗PD-L1抗体を本明細書中で提供する。

30

【0157】

一態様では、(a)配列番号4、5、10、11、または12に示すVH配列のVH CDR1、VH CDR2、およびVH CDR3を含むVH、ならびに/または(b)配列番号2または6に示すVL配列のVL CDR1、VL CDR2、およびVL CDR3を含むVLを含む、抗PD-L1抗体を提供する。

【0158】

別の態様では、表3に列挙したVHのうちの任意の1つおよび/またはVL配列のうちの任意の1つを有する抗PD-L1抗体を提供する。表3では、下線を引いた配列はKabatによるCDR配列であり、太字のものはChothiaによるものである。一実施形態では、本発明は、VHおよび/またはVLを含む抗体であって、(a)VHは配列番号4、5、10、11、もしくは12を含む、および/または(b)VLは配列番号2もしくは6を含む抗体を提供する。

40

【0159】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗PD-L1抗体はVHおよびVLを含み、VHは配列番号4のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号2のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本明細書中で提供する抗PD-L1抗体はVHおよびVLを含み、VHは配列番号5のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号6のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本明細書中で提供する抗PD-L1抗体はVHおよびVLを含み、VHは配列番号10のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号6のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、

50

本明細書中で提供する抗PD-L1抗体はVHおよびVLを含み、VHは配列番号11のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号2のアミノ酸配列を含む。一実施形態では、本明細書中で提供する抗PD-L1抗体はVHおよびVLを含み、VHは配列番号12のアミノ酸配列を含み、VLは配列番号2のアミノ酸配列を含む。

【0160】

【表3】

表3:例示的な抗PD-L1 VH および VL 配列

| 説明 | 配列 |
|---------------------------|--|
| PDL1_ P06B05_245 VH | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSNAWMNWVRQAPG KGLEWVGR IKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTT DPGEYWDSVYGGMDY WGQGTLVTVSS (配 列番号 4) |
| PDL1_ P04D09_113 VH | EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSSY AMSWVRQAPGK GLEWVSA IGVRRGGITYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYC ARERSVGELVGIDQMDH WGQGTLVTVSS (配列 番号 5) |
| PDL1_ P04D09_親 VH | EVQLLES GGGLVQP GGSLRLS CAASGFTFSSY AMSWVRQAPGK GLEWVSA IGVRRGGITYY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLR AEDTAVYYC ARERSVGELVGIDWMDH WGQGTLVTVSS (配列 番号 10) |
| PDL1_ P06B05_親 VH | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSNAWMNWVRQAPG KGLEWVGR IKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTT DPGSYWDSVYGGMDY WGQGTLVTVSS (配列番号 11) |
| PDL1_ P06A09_親 VH | EVQLVESGGGLVKPGGSLRLS CAASGFTFSNAWMNWVRQAPG KGLEWVGR IKSESDGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMN SLKTEDTAVYYCTT DYRIDDWGYPYPGMDY WGQGTLVTVSS (配列番号 12) |
| 共通軽鎖 1 VL | QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS CSGSSSNIGSNYVY WYQQLPQT APKLLIY RNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADY Y CAAWDDSLSGV FGGGTKLTVL (配列番号 2) |
| 共通軽鎖 2 VL | DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC RASQSISSYLN WYQQKPGKAP KLLIY AASSLQSG VPSRFSGSGSGTDFLTIS SLQPEDFATYYCQ QSYSTPLT FGQGTKVEIK (配列番号 6) |

10

20

30

【0161】

本発明はまた、PD-L1に対する抗体のCDR部分も提供する。

40

【0162】

一態様では、表4に列挙したVH CDR配列のうちの任意の1つおよび/またはVL CDR配列のうちの任意の1つを有する抗PD-L1抗体を提供する。一態様では、本発明は、PD-L1と特異的に結合する抗体であって、(a)(i)配列番号41、42、43、47、48、もしくは49を含むVH CDR1、(ii)配列番号44、45、50、51、58、もしくは59を含むVH CDR2、および(iii)配列番号46、52、56、57、もしくは60を含むVH CDR3を含むVH、ならびに/または(b)(i)配列番号19もしくは53を含むVL CDR1、(ii)配列番号20もしくは54を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21もしくは55を含むVL CDR3を含むVLを含む抗体を提供する。

50

【 0 1 6 3 】

【 表 4 - 1 】

表 4:例示的な抗 PD-L1 CDR 配列

| VH CDRs | | | | |
|---------------------------|---|--|---|----|
| mAb | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | |
| PDL1_ P06B05_245 VH | GFTFSNA (配列番号 41)(Chothia) NAWMN (配列番号 42) (Kabat) GFTFSNAWMN (配列番号 43)(延長) | KTKADGGT (配列番号 44) (Chothia) RIKTKADGGTTDYA APVKG (配列番号 45) (Kabat) | DPGEYWDSVYGGMD Y (配列番号 46)(Chothia / Kabat) | 10 |
| PDL1_ P04D09_113 VH | GFTFSSY (配列番号 47) (Chothia) SYAMS (配列番号 48) (Kabat) GFTFSSYAMS (配列番号 49) (延長) | GVRGGI (配列番号 50) (Chothia) AIGVRGGITYYADS VKG (配列番号 51) (Kabat) | ERSVGELVGIDQMDH (配列番号 52) (Chothia / Kabat) | 20 |
| PDL1_ P04D09_ 親 VH | GFTFSSY (配列番号 47) (Chothia) SYAMS (配列番号 48) (Kabat) GFTFSSYAMS (配列番号 49) (延長) | GVRGGI (配列番号 50) (Chothia) AIGVRGGITYYADS VKG (配列番号 51) (Kabat) | ERSVGELVGIDWMD H (配列番号 56) (Chothia / Kabat) | |
| PDL1_ P06B05_ 親 VH | GFTFSNA (配列番号 41)(Chothia) NAWMN (配列番号 42) (Kabat) GFTFSNAWMN (配列番号 43)(延長) | KTKADGGT (配列番号 44) (Chothia) RIKTKADGGTTDYA APVKG (配列番号 45) (Kabat) | DPGSYWDSVYGGMD Y (配列番号 57) (Chothia / Kabat) | 30 |
| PDL1_ P06A09_ 親 VH | GFTFSNA (配列番号 41)(Chothia) NAWMN (配列番号 42) (Kabat) GFTFSNAWMN (配列番号 43)(延長) | KSESDGGT (配列番号 58) (Chothia) RIKSESDGGTTDYA APVKG (配列番号 59) (Kabat) | DYRIDDWGYPYPGM DY (配列番号 60) (Chothia / Kabat) | 40 |

【 0 1 6 4 】

【表 4 - 2】

| VL CDRs | | | |
|--------------|--|-------------------------------------|---|
| mAb | VL CDR1 | VL CDR2 | VL CDR3 |
| 共通軽鎖 1 VL | SGSSSNIGSNYYVY (配列番号 19) (Chothia / Kabat) | RNNQRPS (配列番号 20) (Chothia / Kabat) | AAWDDSLSGVV (配列番号 21) (Chothia / Kabat) |
| 共通軽鎖 2 VL | RASQSISSYLN (配列番号 53) (Chothia / Kabat) | AASSLQS (配列番号 54) (Chothia / Kabat) | QQSYSTPLT (配列番号 55) (Chothia / Kabat) |

10

【0165】

一部の実施形態では、抗 PD - L 1 抗体を本明細書中で提供し、VH は、配列番号 4、5、10、11、もしくは 12 の配列、または配列中に 1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは 10 個のアミノ酸置換を有するその変異体を含む、および / あるいは、VL は、配列番号 2 もしくは 6 の配列、または配列中に 1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは 10 個のアミノ酸置換を有するその変異体を含む。置換は保存的アミノ酸置換であってもよい。置換は CDR 領域中でなくてもよい。

【0166】

本発明はまた、本明細書中で提供する抗 PD - L 1 抗体の scFv も包含する。ジアボディまたはミニボディなどの単鎖抗体の他の形態も包含される。

20

【0167】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗 PD - L 1 抗体はモノクローナル抗体である。抗 PD - L 1 抗体はヒト抗体またはヒト化抗体であってもよい。

【0168】

CD47 / PD - L 1 二重特異性抗体

一部の実施形態では、CD47 / PD - L 1 二重特異性抗体を本明細書中で提供する。

【0169】

CD47 / PD - L 1 二重特異性抗体は、少なくとも第 1 の抗原結合部分 (CD47 と特異的に結合する) および第 2 の抗原結合部分 (PD - L 1 と特異的に結合する) を含む。一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部分は第 1 の VH を含み、第 2 の抗原結合部分は第 2 の VH を含む。一部の実施形態では、第 1 の抗原結合部分は第 1 の VH および第 1 の VL を含み、第 2 の抗原結合部分は第 2 の VH および第 2 の VL を含む。一部の実施形態では、第 1 の VL および第 2 の VL のアミノ酸配列は同じである。

30

【0170】

本明細書中で提供する CD47 / PD - L 1 二重特異性抗体は、本明細書中で提供する抗 CD47 抗体のうちの任意もの (たとえば第 1 の抗原結合部分として) および本明細書中で提供する抗 PD - L 1 抗体のうちの任意のもの (たとえば第 2 の抗原結合部分として) を含有し得る。

40

【0171】

一部の実施形態では、CD47 と特異的に結合する第 1 の抗原結合部分および PD - L 1 と特異的に結合する第 2 の抗原結合部分を含む CD47 / PD - L 1 二重特異性抗体であって、第 1 の抗原結合部分が VH および / または VL を含み、(a) VH が配列番号 1 を含み、(b) VL が配列番号 2 を含み、ならびに、第 2 の抗原結合部分が VH および / または VL を含み、(a) VH が配列番号 4 を含み、(b) VL が配列番号 2 を含む、CD47 / PD - L 1 二重特異性抗体を提供する。

【0172】

一部の実施形態では、CD47 と特異的に結合する第 1 の抗原結合部分および PD - L 1 と特異的に結合する第 2 の抗原結合部分を含む CD47 / PD - L 1 二重特異性抗体で

50

あって、第1の抗原結合部分がVHおよび/またはVLを含み、(a) VHが配列番号3を含み、(b) VLが配列番号2を含み、ならびに、第2の抗原結合部分がVHおよび/またはVLを含み、(a) VHが配列番号4を含み、(b) VLが配列番号2を含む、CD47/PD-L1二重特異性抗体を提供する。

【0173】

一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する第1の抗原結合部分およびPD-L1と特異的に結合する第2の抗原結合部分を含むCD47/PD-L1二重特異性抗体であって、第1の抗原結合部分が表2に列挙したVH CDR配列のうちの任意の1つを含み、第2の抗原結合部分が表4に列挙したVH CDR配列のうちの任意の1つを含む、CD47/PD-L1二重特異性抗体を提供する。

10

【0174】

一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する第1の抗原結合部分およびPD-L1と特異的に結合する第2の抗原結合部分を含むCD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供し、二重特異性抗体は、表5に示す抗CD47抗体のうちの任意のVHおよびVLまたはそのCDRを含有し、二重特異性抗体は、表5に示す抗PD-L1抗体のうちの任意のVHおよびVLまたはそのCDRを含有する。

【0175】

【表5】

表5:抗CD47および抗PD-L1抗体のVHおよびVL配列:

20

| 抗体 | VH 配列番号 | VL 配列番号 |
|-----------------|---------|---------|
| CD47_P01A11_75 | 1 | 2 |
| CD47_P01A11_497 | 3 | 2 |
| CD47_P01A11_親 | 7 | 2 |
| CD47_P14D04_親 | 8 | 6 |
| CD47_P01A08_親 | 9 | 2 |
| PDL1_P06B05_245 | 4 | 2 |
| PDL1_P04D09_113 | 5 | 6 |
| PDL1_P04D09_親 | 10 | 6 |
| PDL1_P06B05_親 | 11 | 2 |
| PDL1_P06A09_親 | 12 | 2 |

30

【0176】

一部の実施形態では、CD47および/またはPD-L1と結合し、対応する抗原との結合について本明細書中に記載の抗体と競合する、たとえば、CD47との結合についてCD47_P01A11_75、CD47_P01A11_497、CD47_P01A11_親、CD47_P14D04_親、もしくはCD47_P01A08_親と競合する、またはPD-L1との結合についてPDL1_P06B05_245、PDL1_P04D09_113、PDL1_P04D09_親、PDL1_P06B05_親、もしくはPDL1_P06A09_親と競合する抗体を本明細書中で提供する。

40

【0177】

本明細書中に記載の抗体のCD47またはPD-L1に対する結合親和性(K_D)は、約0.001 nM~約6500 nMであり得る。一部の実施形態では、結合親和性は、約6500 nM、6000 nM、5500 nM、4500 nM、4000 nM、3500 nM、3000 nM、2500 nM、2000 nM、1500 nM、1000 nM、750 nM、500 nM、400 nM、300 nM、250 nM、200 nM、150 nM、100 nM、75 nM、50 nM、45 nM、40 nM、35 nM、30 nM、25 nM、20 nM、19 nM、17 nM、16 nM、15 nM、10 nM、8 nM、7.5 nM、

50

7 nM、6.5 nM、6 nM、5.5 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.5 nM、0.3 nM、0.1 nM、0.01 nM、0.002 nM、または0.001 nMのうちの任意のものである。一部の実施形態では、結合親和性は、約6500 nM、6000 nM、5500 nM、5000 nM、4000 nM、3000 nM、2000 nM、1000 nM、900 nM、800 nM、500 nM、250 nM、200 nM、100 nM、50 nM、30 nM、20 nM、10 nM、7.5 nM、7 nM、6.5 nM、6 nM、5 nM、4.5 nM、4 nM、3.5 nM、3 nM、2.5 nM、2 nM、1.5 nM、1 nM、0.5 nM、0.1 nM、0.05 nM、0.01 nM、またはそれより低いnMのうちの任意のもの未満である。

【0178】

一部の実施形態では、本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体は、CD47よりもPD-L1に対して高い親和性を有する（たとえば、PD-L1に対する抗体の第2の抗原結合部分の親和性が、CD47に対する抗体の第1の抗原結合部分の親和性よりも高い）。理論に束縛されずに、CD47よりもPD-L1に対して高い親和性を有するCD47/PD-L1二重特異性抗体は、抗体の抗CD47抗体結合部分によって潜在的に引き起こされる潜在的な副作用または毒性を減らすために望ましい場合がある。様々な癌細胞上で発現されることに加えて、CD47は広範囲の健康なヒト細胞（赤血球（RBC）を含む）中で発現され、抗CD47抗体と健康な細胞との結合が原因の、抗CD47抗体からの顕著な望ましくない副作用の潜在性が存在する。比較的低い親和性の抗CD47抗原結合部分を含有するCD47/PD-L1二重特異性抗体は、そのような二重特異性抗体の、RBCなどの健康な細胞（CD47タンパク質を発現するがPD-L1タンパク質は発現しないもの）に対する比較的低い親和性、およびそのような二重特異性抗体の、癌細胞（しばしばCD47およびPD-L1をどちらも発現する）に対する比較的高い親和性が原因で、健康な細胞よりも癌細胞と優先的に結合し得る。一部の実施形態では、CD47よりもPD-L1に対して高い親和性を有する、本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体において、抗体の抗PD-L1結合部分は、抗体の抗CD47結合部分がCD47に対して有するよりも、PD-L1に対して少なくとも2x（すなわち2倍）、3x、5x、10x、20x、50x、100x、200x、500x、1000x、2000x、または5000x高い親和性を有する。一部の実施形態では、CD47よりもPD-L1に対して高い親和性を有する、本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体において、抗体の抗PD-L1結合部分は、およそ10 nM、5 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、または0.1 nM以下の、PD-L1に対する結合親和性（ K_D ）を有し、抗体の抗CD47結合部分は、およそ1000 nM、600 nM、500 nM、400 nM、300 nM、200 nM、100 nM、50 nM、20 nM、または10 nM以下の、CD47に対する結合親和性（ K_D ）を有し、PD-L1に対する抗体の抗PD-L1結合部分の親和性は、CD47に対する抗体の抗CD47結合部分の親和性よりも少なくとも2x、3x、5x、10x、20x、50x、100x、200x、500x、1000x、2000x、または5000x高い（すなわちnMの値が小さい（より高い親和性はより低いnM値によって示されるため））。

【0179】

一部の実施形態では、本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体は、CD47およびPD-L1の両方に対して同様の親和性を有する。

【0180】

本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体は、任意の適切な形式を有することができる。一部の実施形態では、本明細書中で提供する二重特異性抗体は完全長ヒト抗体を含む。一部の実施形態では、ヒト抗体は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4アイソタイプを有する。一部の実施形態では、抗体は免疫学的に不活性なFc鎖を含む。

10

20

30

40

50

【0181】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する二重特異性CD47/PD-L1抗体は、Suurs, F.V.ら、Pharmacology & Therapeutics、201(2019)ページ103~119中に記載の形式を有することができる。

【0182】

二重特異性抗体は、VHとVLの間に、V領域の鎖間対合は達成されるが鎖内対合は達成されないように短いリンカー（たとえば約3~10個の残基）を用いてscFv断片を構築し、二価断片、すなわち2つの抗原結合部位を有する断片をもたらすことによって調製してもよい。二重特異性抗体は、完全長抗体または抗体断片に由来することができる（たとえばF(ab')₂二重特異性抗体）。ジアボディは、たとえば、EP404,097号、WO93/11161号、およびHollingerら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA、90:6444~6448、1993中により完全に記載されている。

10

【0183】

本発明は、Fc鎖もしくはドメイン、またはその一部分を含む二重特異性抗体を包含する。一部の実施形態では、Fc鎖またはその一部分は、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFc鎖の1つまたは複数の定常ドメイン（たとえばCH2またはCH3ドメイン）を含む。別の実施形態では、本発明は、Fc鎖またはその一部分を含む分子を包含し、Fc鎖またはその一部分は、匹敵する野生型Fc鎖またはその一部分と比較して少なくとも1つのアミノ酸修飾（たとえば置換）を含む。変異Fc鎖は当分野で周知であり、当分野で周知の結合活性またはエフェクター機能アッセイ、たとえば、ELISA、SPR分析、またはADCCのうちの任意のものにおいてアッセイして、変異Fc鎖を含む抗体の表現型を変更するために主に使用される。そのような変異Fc鎖またはその一部分は、Fc鎖またはその一部分を含む本発明の二重特異性抗体によって示される血漿半減期および安定性を延長させ得る。別の実施形態では、本発明は、当分野で知られている任意のFc変異体の使用を包含する。

20

【0184】

一部の実施形態では、1つまたは複数の修飾をFc鎖のアミノ酸に行って、Fc鎖、したがって本発明の二重特異性抗体分子の、1つまたは複数のFcR受容体に対する親和性および結合力を低下させる。具体的な実施形態では、本発明は、変異Fc鎖またはその一部分を含む二重特異性抗体であって、変異Fc鎖が、野生型Fc鎖と比較して少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、1つのFcRとのみ結合し、FcRがFcRIIAである抗体を包含する。別の具体的な実施形態では、本発明は、変異Fc鎖またはその一部分を含む二重特異性抗体であって、変異Fc鎖が、野生型Fc鎖と比較して少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、1つのFcRとのみ結合し、FcRがFcRIIAである抗体を包含する。別の具体的な実施形態では、本発明は、変異Fc鎖またはその一部分を含む二重特異性抗体であって、変異Fc鎖が、野生型Fc鎖と比較して少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、1つのFcRとのみ結合し、FcRがFcRIIBである抗体を包含する。別の実施形態では、本発明は、変異Fc鎖を含む分子を包含し、変異体は、当業者に知られており本明細書中に記載されている方法を使用して測定して、Fc鎖を含まないまたは野生型Fc鎖を含む分子と比較して、ADCC活性（もしくは他のエフェクター機能）の減少および/またはFcRIIB(CD32B)との結合の増加を与えるまたは媒介する。

30

40

【0185】

本発明はまた、2つ以上のIgGアイソタイプ由来のドメインまたは領域を含むFc鎖の使用も包含する。当分野で知られているように、Fc鎖のアミノ酸修飾は、Fc媒介性エフェクター機能および/または結合活性に大きな影響を与え得る。しかし、機能的特徴のこれらの変更は、選択したIgGアイソタイプのコンテキストにおいて実装した場合に、さらに洗練および/または操作し得る。同様に、アイソタイプFcのネイティブ特徴は、1つまたは複数のアミノ酸修飾によって操作し得る。複数のIgGアイソタイプ（すな

50

わち、I g G 1、I g G 2、I g G 3、およびI g G 4)は、そのヒンジおよび/またはFc鎖アミノ酸配列中の相違が原因で、血清半減期、補体結合、Fc R結合親和性、およびエフェクター機能活性(たとえば、ADCC、CDC)を含めた異なる物理的および機能的特性を示す。

【0186】

一部の実施形態では、アミノ酸修飾およびI g G Fc鎖は、所望の特徴を有する二重特異性抗体を操作設計するために、そのそれぞれの、別々の結合および/またはエフェクター機能活性について独立して選択される。特定の実施形態では、アミノ酸修飾およびI g Gヒンジ/Fc鎖は、本明細書中に記載されているまたはI g G 1のコンテキストにおいて当分野で知られているように、結合および/またはエフェクター機能活性について別々にアッセイされている。一実施形態では、アミノ酸修飾およびI g Gヒンジ/Fc鎖は、二重特異性抗体または他のFc含有分子(たとえば、免疫グロブリン)のコンテキストにおいて、同様の機能性、たとえば、ADCC活性(もしくは他のエフェクター機能)の減少および/またはFc R I I Bとの結合の増加を示す。別の実施形態では、本発明は、新規特性を示す当分野で知られているアミノ酸修飾および選択したI g G領域の組合せを含む変異Fc鎖を包含し、特性は、修飾および/または領域を本明細書中に記載のように独立してアッセイした場合は検出可能でなかったものである。

10

【0187】

一部のそのような実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、第1のポリペプチド鎖上の第1のヘテロ二量体促進ドメインおよび第2のポリペプチド鎖上の第2のヘテロ二量体促進ドメインを含む。一緒になって、第1および第2のヘテロ二量体促進ドメインは、ヘテロ二量体化を駆動する、および/または二重特異性抗体を安定化する(たとえば、相補的ヘテロ二量体促進ドメイン上のノブとホールとの相互作用によって)、および/または二重特異性抗体を安定化させる役割を果たす。

20

【0188】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する二重特異性抗体のFcドメインは第1のFc鎖および第2のFc鎖を含み、第1および第2のFc鎖のそれぞれは、野生型Fc鎖と比較して少なくとも1つのアミノ酸修飾を含んで、ノブまたはホールを形成する。一部の実施形態では、第1のFc鎖がノブを含み、第2のFc鎖がホールを含む。一部の実施形態では、第1のFc鎖は、ノブまたはホールのどちらかを含むように修飾されたCH2および/またはCH3ドメインを含み得る。一部の実施形態では、第1のFc鎖は、突然変異Y349Cおよび/またはT366Wを含んでノブを形成し、第2のFc鎖は、突然変異S354C、T366S、L368A、および/またはY407Vを含んでホールを形成する(付番はEUIンデックスに従う)。一部の具体的な実施形態では、突然変異はエフェクター機能の低下をもたらす。

30

【0189】

前述のもののそれぞれの特定の実施形態において、第1のFc鎖は配列番号65の配列を含んでノブを形成し(ノブ突然変異を有するヒトI g G 1 Fc鎖)、第2のFc鎖は配列番号66の配列を含んでホールを形成する(ホール突然変異を有するヒトI g G 1 Fc鎖)。

40

【0190】

本明細書中で提供する抗CD47 VHを配列番号65または配列番号66のアミノ酸配列と遺伝子融合させて二重特異性抗体の第1の重鎖を形成してもよく、本明細書中で提供する抗PD-L1 VHを配列番号65または配列番号66のアミノ酸配列と遺伝子融合させて二重特異性抗体の第2の重鎖を形成してもよく、一方が配列番号65と遺伝子融合しており、他方が配列番号66と遺伝子融合している。配列番号65または配列番号66のアミノ酸配列を含有する本明細書中で提供する抗CD47または抗PD-L1重鎖は、配列番号65または配列番号66のC末端リシンを欠いていてもよい。言い換えれば、一部の状況においては、本明細書中で提供する抗体の重鎖のC末端リシンは抗体から切断されていてよく、C末端リシンを欠くそのような抗体は、本明細書中で提供する抗体重鎖

50

の範囲内に含まれる。

【0191】

一部の実施形態では、表6A中に提供される抗CD47重鎖および抗PD-L1重鎖のアミノ酸配列を有するCD47/PD-L1二重特異性抗体を提供する。表6A中の抗CD47重鎖はどちらもFc鎖中にホール突然変異を有しており、抗PD-L1重鎖はFc鎖中にノブ突然変異を有する。一部の実施形態では、配列番号61に示すアミノ酸配列を含む抗CD47重鎖と、配列番号64に示すアミノ酸配列を含む抗PD-L1重鎖とを含むCD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供する。CD47/PD-L1二重特異性抗体は、配列番号62に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を2コピーさらに含んでもよい。配列番号62に示すアミノ酸配列を含む軽鎖は共通軽鎖であり、これは抗CD47重鎖および抗PD-L1重鎖と対合することができる。一部の実施形態では、配列番号63に示すアミノ酸配列を含む抗CD47重鎖と、配列番号64に示すアミノ酸配列を含む抗PD-L1重鎖とを含むCD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供する。CD47/PD-L1二重特異性抗体は、配列番号62に示すアミノ酸配列を含む軽鎖を2コピーさらに含んでもよい。

10

【0192】

20

30

40

50

【表 6 - 1】

表 6A: 例示的な CD47/PD-L1 二重特異性抗体の重鎖および軽鎖配列

| 説明 | 配列 |
|---|--|
| CD47_ P01A11_75 重鎖[Fc 鎖中にホール突然変異を含有するヒト IgG1、ホール突然変異は下線が引いてある (S354C、T366S、L368A、および Y407VE、U 付番)、VH は斜体] | <i>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYTFSSYAISWVRQAPGQG LEWMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDAGRSSDVGWYVGAIDVWGQGLVTVSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTF PAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE PKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVL TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P<u>CREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u>TTTP VLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKS LSLSPGK (配列番号 61)</i> |
| CD47_ P01A11_497 重鎖[Fc 鎖中にホール突然変異を含有するヒト IgG1、ホール突然変異は下線が引いてある (S354C、T366S、L368A、および Y407V、EU 付番)、VH は斜体] | <i>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGGTFTSYAISWVRQAPGQG LEWMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSED TAVYYCARDAGRSSDVGWYVGAIDVWGQGLVTVSSASTKGPS VFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKE EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL P<u>CREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u>TTTP PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQK SLSLSPGK (配列番号 63)</i> |
| PDL1_ P06B05_245 重鎖 [ノブ突然変異を含有するヒト IgG1、ノブ突然変異は下線が引いてある (Y349C および Y366W)、VH は斜体] | <i>EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGK GLEWVGRITKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSL KTEDTAVYYCTTDPGEYWDSVYGGMDYWGQGLVTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV C<u>TLPPSREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK</u> TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHY TQKLSLSLSPGK (配列番号 64)</i> |

10

20

30

40

【 0 1 9 3 】

【表 6 - 2】

| | |
|----------------------|---|
| 共通軽鎖 1 完全軽鎖 (VL は斜体) | <i>QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAP KLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAA WDDSLSGVVFVGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATL VCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSY LSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号 62)</i> |
|----------------------|---|

50

【0194】

重鎖を有する抗体を含む本明細書中で提供する任意の実施形態において、重鎖中にC末端リシンを有さない抗体が実施形態の範囲内に含まれる。したがって、たとえば、配列番号61に示すアミノ酸配列を有する重鎖を含む本明細書中で提供する抗体について、配列番号61のC末端リシン以外の配列番号61に示すアミノ酸配列を有する抗体も提供する。別の例では、配列番号63に示すアミノ酸配列を有する重鎖を含む本明細書中で提供する抗体について、配列番号63のC末端リシン以外の配列番号63に示すアミノ酸配列を有する抗体も提供する。別の例では、配列番号64に示すアミノ酸配列を有する重鎖を含む本明細書中で提供する抗体について、配列番号64のC末端リシン以外の配列番号64に示すアミノ酸配列を有する抗体も提供する。一部の実施形態では、配列番号61に示すアミノ酸配列を有する第1の重鎖および配列番号64に示すアミノ酸配列を有する第2の重鎖を含むCD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供し、重鎖のうち的一方もしくは両方がそれぞれの重鎖配列のC末端リシンを欠く、またはどちらも欠かない。一部の実施形態では、配列番号63に示すアミノ酸配列を有する第1の重鎖および配列番号64に示すアミノ酸配列を有する第2の重鎖を含むCD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供し、重鎖のうち的一方もしくは両方がそれぞれの重鎖配列のC末端リシンを欠く、またはどちらも欠かない。

10

【0195】

一態様では、CD47/PD-L1二重特異性抗体を本明細書中で提供し、二重特異性抗体は、CD47に特異的な第1の重鎖、PD-L1に特異的な第2の重鎖、および共通軽鎖を含み、第1の重鎖は、ATCC受託番号PTA-126910を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有し、第2の重鎖は、ATCC受託番号PTA-126911を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有し、共通軽鎖は、ATCC受託番号PTA-126912を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有する。

20

【0196】

抗体を生成する、特徴づける、および修飾するためのポリヌクレオチドおよび方法

本発明はまた、抗体のポリペプチドおよび結合領域を含む、本発明の抗体をコードしているポリヌクレオチドも含む。本発明の分子をコードしているポリヌクレオチドを得て、ポリヌクレオチドのヌクレオチド配列を、当分野で知られている任意の方法によって決定し得る。

30

【0197】

本発明の抗体をコードしているポリヌクレオチドは、以下を含み得る：変異体のコード配列のみ、変異体のコード配列および機能的ポリペプチドなどの追加のコード配列、またはシグナルもしくは分泌配列、または前駆タンパク質配列、抗体のコード配列およびイントロンまたは抗体のコード配列の5'および/もしくは3'側の非コード配列などの非コード配列。用語「抗体をコードしているポリヌクレオチド」は、変異体の追加のコード配列を含むポリヌクレオチドを包含するが、追加のコードおよび/または非コード配列を含むポリヌクレオチドも包含する。特定の宿主細胞/発現系について最適化されているポリヌクレオチド配列は、所望のタンパク質のアミノ酸配列から容易に得ることができるが、当分野で知られている(GENEART(登録商標)AG、ドイツRegensburgを参照)。

40

【0198】

一部の実施形態では、本明細書中の他の箇所(たとえば表1、2、3、4、または5のうち任意のもの中)で提供されている抗CD47または抗PD-L1抗体のアミノ酸配列のうち任意のものをコードしているヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを本明細書中で提供する。また、ポリヌクレオチドを含む関連するベクターおよび宿主細胞も本明細書中で提供する。

【0199】

50

一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する抗体のVHをコードしているポリヌクレオチドを本明細書中で提供し、ポリヌクレオチドは配列番号67または69に示すヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、CD47およびPD-L1と特異的に結合する抗体の共通軽鎖のVLをコードしているポリヌクレオチドを本明細書中で提供し、ポリヌクレオチドは配列番号68に示すヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、PD-L1と特異的に結合する抗体のVHをコードしているポリヌクレオチドを本明細書中で提供し、ポリヌクレオチドは配列番号70に示すヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、CD47と特異的に結合する抗体の重鎖をコードしているポリヌクレオチドを本明細書中で提供し、ポリヌクレオチドは配列番号71または73に示すヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、CD47およびPD-L1と特異的に結合する抗体の共通軽鎖をコードしているポリヌクレオチドを本明細書中で提供し、ポリヌクレオチドは配列番号72に示すヌクレオチド配列を含む。一部の実施形態では、PD-L1と特異的に結合する抗体の重鎖をコードしているポリヌクレオチドを本明細書中で提供し、ポリヌクレオチドは配列番号74に示すヌクレオチド配列を含む。また、配列番号67~74のいずれかに示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを含む、関連するベクターおよび宿主細胞も本明細書中で提供する。

10

【0200】

一部の実施形態では、表6Bに示すヌクレオチド配列を含むポリヌクレオチドを本明細書中で提供する。

【0201】

20

30

40

50

【表 7 - 1】

表 6B:

| 説明 | 配列 |
|---|--|
| CD47_ P01A11_75 VH をコードしているポリヌクレオチド(配列番号 1) | Caagtgaactggtgcagtcaggcgccgaagtcaagaagccgggtctagcgtgaaagtgtcgtgcaaggcctcaggctacacctctcctctatgcatcagctgggtcagacagccgctggacagggactcagtggtgatgggtggcattccccatcttcggaaccgcaactacgcccagaagttcagggccgctgacatcactgcccagagagcacttcgaccgctacatggaactgtcctcgtcgtcggtccgaagataccgccgtgtactactgtctcgggatgctggaaggctcctccgacgtcgggttgtaacgtggggccattgacgtctgggacagggaaactctgtcaccgtctcctca (配列番号 67) |
| 共通軽鎖 1 VL をコードしているポリヌクレオチド(配列番号 2) | Caatcagtgctgaccagcctcctctcgtcatccggaacccgggacagagagtcaccatctcctgctccggctcgtcctgaacatcggcagcaactacgtgtactgtaccagcaactcctgggactgccccaaagctgtcatctatcgaacaatcagcggcctccggagtgccggacaggttctccggaagcaaatcgggactagcgcctcactggctattagcggtttgcgtccgaggacgaagccgactactactgtgcccgtgggatgattcccttccggcgtcgtgtccggggcggaaccaagctgactgtgcta (配列番号 68) |
| CD47_ P01A11_497 VH をコードしているポリヌクレオチド(配列番号 3) | Caagtgcagctgtgctgagtcggcgctgaagtcaagaagcctgggtcatcgggtgaaagtgtcctgcaaggcctctggggaaacctcacgtcctacgcgattagctgggtccgcaagcaccgggacagggactggagtggatggggggaatcagccccatcttcggaactacgcccagaagttcagggctcgtgactatcaccgcccagcaatccacctcaaccgctacatggaactgagctccctcgggtccgaggacactgcccgtattactgtgcgagagatgctggaagcgtcctccgatgctgggttgtaacgtgggagccctcagctctggggacaggggaccctgtcaccgtctcctca (配列番号 69) |
| PDL1_ P06B05_245 VH をコードしているポリヌクレオチド(配列番号 4) | Gaagtgcagctggtgaaagcgggtggcctgggtcaaacctgggtgtagcctcgtcgtgagctgtcggcgtcaggtttactctcaaatcgtggaatgaaatgggtcagacagccgcccggaaagggactggatgggtcggcgcatataaacaaggctgatggcggtactaccgattatgcagcggcggtaagggacgtttaccatctcagtgacgattcgaaaaacacctgtacctcagatgaacagcctgaaaaccgaggacaccgcagataactattgactaccgcccggcgagtagctgggatagcgttatgcccgtatggattactgggccaaggtactggtcaccgtctcctca (配列番号 70) |
| CD47_ P01A11_75 重鎖をコードしているポリヌクレオチド(配列番号 61) | caagtgaactggtgcagtcaggcgccgaagtcaagaagccgggtctagcgtgaaagtgtcgtgcaaggcctcaggctacacctctcctctatgcatcagctgggtcagacagccgctggacagggactcagtggtgatgggtggcattccccatcttcggaaccgcaactacgcccagaagttcagggccgctgacatcactgcccagagagcacttcgaccgctacatggaactgtcctcgtcgtcggtccgaagataccgcccgtgtactactgtctcgggatgctggaaggctcctccgacgtcgggttgtaacgtggggccattgacgtctgggacagggaaactctgtcaccgtctcctcagcgtcgaaccaagggccatcgttccccctggcaccctctccaagagcacctctggggcacagcggccctgggtgctggtcaaggactactccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctccccggctgtcctcagctcagactctactcctcagcagcgtggtgaccgtgcccagcagctgggacccagacctaactctgcaactgaaatcacaagcccagcaacaccaagggtggacaagaaagttagcccaaatctgtgacaaaactcacatgcccaccgtgcccagcacctgaaactcctgggggaccgtcagcttctcctcccccaaaacccaaggacacctcatgactccccggaccctgagggtcacatgctggtggtggacgtgagccaagaccctgaggtaagttcaactgtacgtggacggcgtggaggtgataatgccaagacaaagccgcccaggagcagtaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggtgaaatggcaaggagtaacagtgcaaggctccaacaaagccctcccagccccatcga gaaacctctccaaagccaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatgcccggaggagatgaccaagaaccagctgacccgtctcgtcgtcgggtcaaggctctatccagcgaatcccggtggagtgggagcaatgggacggcggagaacaactacaagaccgcctcccgtcgtggactccgacggctcctctctcgttagcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaaactctctcatgctccgtgatgaggctctgcacaaccactacacgcagaagacctctccctgtccccggaaaa (配列番号 71) |

10

20

30

40

【 0 2 0 2 】

【表 7 - 2】

| | | |
|---|---|-----------|
| <p>共通軽鎖 1 完全軽鎖をコードしているポリヌクレオチド (配列番号 62)</p> | <p>Caatcagtgtgaccagcctccctctgcatccggaaccccgggacagagagtcaccatctcctgctccggttcgtcctcgaacatcggcagcaactacgtgtactggaccagcaactccctgggactgccccaaagctgctcatctatcggaacaatcagcggccttccggagtgccggacaggttctccggaagcaaatcgggcactagcgcctcactggctattagcggttgctcgcgaggaagccgactactactgtgcccgtgggatgattcccttccggcgtcgtgtcggggcggaaccaagctgactgtgctaggtcagcccaaggctgccctcggtcactctgttccaccctcctctgaggagcttcaagccaacaaggccacactggtgtctca taagtgacttctaccgggagccgtgacagtggcctggaaggcagatagcagccccgtaaggcggg agtggagaccaccacacctcaaacaagaacaacaagtacgcgccagcagctacctgagcc tgacgctgagcagtggaagcccacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaagggagcaccg tggagaagacagtgggcccctacagaatgttca (配列番号 72)</p> | <p>10</p> |
| <p>CD47_P01A11_497 重鎖をコードしているポリヌクレオチド (配列番号 63)</p> | <p>caagtgcagcttgtcagtcgggctgaagtcaagaagcctgggtcatcgggtgaaagtgtcctgcaag gcctctgggggaacctcacgtcctacgcgattagctgggtccgccaagcaccgggacagggactgga gtggatggcggaatcagccccatctcggcactgccaactacgccagaagtttcagggtcgcgtgac tatcaccgacgaatccacctcaaccgctacatggaactgagctccctgcggtccgaggacactg ccgtgtactgtgagagatgctggacggctcggatgtcggttggtacgtgggagccctcgacgtc tggggacagggcaccctggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaagggcccctcgggtctccccctggca ccctcctcaagagcacctctgggggacagcggccctgggctgctggtcaaggactacttccccga accggtgacgggtgctggaactcaggcgcctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgtcctaca gtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctgggacccagaccta catctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgt gacaaaactcacatgcccaccgtgccagcacctgaaactcctgggggaccgtcagcttctctctc cccccaaaaccaaggacacctcatgatctccggacccctgaggtcacatgcgtggtggagct gagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaag acaaagccgcgggaggagcagtaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacc aggactggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctccaacaagccctcccagccccatcga gaaaacatctccaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtacacctgccccatgccg ggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtcctgcggtgcaaaggcttatcccagcgacatcg ccgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccacgcctcccgtgtggact ccgacggctccttctcctcgttagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtct tcatgtccgtgatgcatgaggctctgcacaacctacacgcagaagagcctctcctgtccccgg aaaa (配列番号 73)</p> | <p>20</p> |
| | | <p>30</p> |

【 0 2 0 3 】

【表 7 - 3】

| | |
|--|---|
| <p>PDL1_ P06B05_245 重鎖をコードしているポリヌクレオチド (配列番号 64)</p> | <pre> gaagtgcagctggtgaaagcgggtggcctgggtcaaacctgggtgtagcctgctgagctgtgagg cgtaggttttacgttctcaaatgcgtggatgaattgggtcagacaggcgcccggaaagggactggaat gggtcggggcgattaaaacaaaggctgatggcgggtactaccgattatgcagcgccggtgaaaggacgt ttaccatctcacgtgacgattcgaaaaacaccctgtacctcagatgaacagcctgaaaaccgaggac accgcagtatactattgactaccgaccggcgagtagctgggatagcgttatggcggtatggattactg ggccaaggtactggtcaccgtctcctcagcgtcgaccaagggcccacggcttccccctggcacc ctcctcaagagcacctctgggggcacagcggccctgggctgcctgggtcaaggactactccccgaac cggtagcgggtgctggaactcaggcgccctgaccagcggcgtgcacacctcccggctgctctacagt cctcaggactctactccctcagcagcgtggtgaccgtgccctccagcagctgggcacccagacctaca tctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacaccaaggtggacaagaaagttgagcccaaatcttgtga caaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaactcctggggggaccgtagcttctcttcccc ccaaaaccaaggacaccctcatgatctcccgaccctgagggtcacatgctggtggtggacgtgag ccacgaagaccctgaggtaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgataatgccaagaca aagccgaggaggagcagtagcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctaccgtcctgcaccagg actggctgaatggcaaggagtacaagtgaaggtctcaacaaagccctccagccccatcgagaa aaccatctcaaagccaaagggcagccccgagaaccacaggtgtgaccctgccccatccggga ggagatgaccaagaaccaggtcagcctgtggtgctggtcaaaggcttctatccagcagatcgccgt ggagtgggagagcaatgggcagccggagaacaactacaagaccagcctcccgtgctggactccg acggctccttctctatagcaagctaccgtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctc atgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccactacgcgagaagagcctctccctgtccccggaaa a (配列番号 74) </pre> |
|--|---|

10

20

【0204】

任意のそのような配列に相補的なポリヌクレオチドも本発明によって包含される。ポリヌクレオチドは一本鎖（コードもしくはアンチセンス）または二本鎖であってよく、DNA（ゲノム、cDNA、もしくは合成）またはRNA分子であってよい。RNA分子としては、成熟および前駆体mRNA（プレmRNA）またはヘテロ核mRNA（hnRNA）などの未成熟mRNAならびに成熟mRNAが挙げられる。追加のコードまたは非コード配列が、必ずしも必要ではないが、本発明のポリヌクレオチド内に存在してよく、ポリヌクレオチドは、必ずしも必要ではないが、他の分子および/または支持物質と連結されていてよい。

30

【0205】

当業者には、遺伝暗号の縮重の結果、本明細書中で提供するアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列が多く存在することが理解されよう。コドン使用頻度の相違が原因で変動するポリヌクレオチドは、本発明によって具体的に企図される。

【0206】

一態様では、CD47と特異的に結合する抗体の少なくともVHをコードしている単離核酸を本明細書中で提供し、核酸は、ATCC受託番号PTA-126910を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列を含む。また、ATCC受託番号PTA-126910を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有するポリペプチドも、本明細書中で提供する。

40

【0207】

一態様では、CD47およびPD-L1と特異的に結合する抗体の共通軽鎖の少なくともVLをコードしている単離核酸を本明細書中で提供し、核酸は、ATCC受託番号PTA-126912を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列を含む。また、ATCC受託番号PTA-126912を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有するポリペプチドも、本明細書中で提供する。

【0208】

50

一態様では、PD-L1と特異的に結合する抗体の少なくともVHをコードしている単離核酸を本明細書中で提供し、核酸は、ATCC受託番号PTA-126911を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列を含む。また、ATCC受託番号PTA-126911を有する、ATCCに寄託されたプラスミドの挿入物の核酸配列によってコードされているアミノ酸配列を有するポリペプチドも、本明細書中で提供する。

【0209】

一態様では、本発明は、本明細書中に記載するポリヌクレオチドのうちの任意のものを作製する方法を提供する。たとえば、本発明のポリヌクレオチドは、化学合成、組換え方法、またはPCRを使用して得ることができる。化学的ポリヌクレオチド合成の方法は当分野で周知であり、本明細書中に詳述する必要はない。当業者は、本明細書中で提供する配列および市販のDNA合成器を使用して、所望のDNA配列を生成することができる。

10

【0210】

組換え方法を使用してポリヌクレオチドを調製するために、所望の配列を含むポリヌクレオチドを適切なベクター内に挿入することができ、立ち代って、ベクターを、本明細書中にさらに記述されているように、複製および増幅のために適切な宿主細胞内に導入することができる。ポリヌクレオチドは、当分野で知られている任意の手段によって宿主細胞内に挿入し得る。細胞は、直接取り込み、エンドサイトーシス、トランスフェクション、F接合、または電気穿孔によって外因性ポリヌクレオチドを導入することによって、形質転換させる。導入された後、外因性ポリヌクレオチドは、非組込みベクター（プラスミドなど）として細胞内で維持されることも、または宿主細胞ゲノム内に組み込まれることもある。このようにして増幅されたポリヌクレオチドは、当分野内で周知の方法によって宿主細胞から単離することができる（たとえばSambrookら、1989）。

20

【0211】

あるいは、PCRがDNA配列の複製を可能にする。PCR技術は当分野で周知であり、米国特許第4,683,195号、第4,800,159号、第4,754,065号、および第4,683,202号、ならびにPCR: The Polymerase Chain Reaction、Mullisら編、Birkhäuser Press、Boston、1994中に記載されている。

【0212】

RNAは、単離DNAを適切なベクター中で使用し、それを適切な宿主細胞内に挿入することによって得ることができる。細胞が複製され、DNAがRNAへと転写される際に、たとえばSambrookら、1989、上記に記載されているように、当業者に周知の方法を使用して、RNAをその時に単離することができる。

30

【0213】

適切なクローニングベクターは、標準技法に従って構築し得る、または当分野で利用可能な多数のクローニングベクターから選択し得る。選択したクローニングベクターは使用を意図する宿主細胞に応じて変動し得るが、有用なクローニングベクターは、一般的に、自己複製する能力を有する、特定の制限エンドヌクレアーゼに対して単一の標的を有し得る、および/またはベクターを含有するクローンの選択に使用することができるマーカーの遺伝子を保有し得るであろう。適切な例としては、プラスミドおよび細菌ウイルス、たとえば、pUC18、pUC19、Bluescript（たとえばpBS SK+）およびその誘導体、mp18、mp19、pBR322、pMB9、ColE1、pCR1、RP4、ファージDNA、ならびにpSA3およびpAT28などのシャトルベクターが挙げられる。これらおよび多くの他のクローニングベクターが、BioRad、Stratagene、およびInvitrogenなどの商業供給業者から利用可能である。

40

【0214】

発現ベクターは、一般的に、本発明によるポリヌクレオチドを含有する複製可能なポリヌクレオチド構築体である。発現ベクターは、エピソームとしてまたは染色体DNAの一体部分としてのいずれかで、宿主細胞中で複製可能でなければならないことが暗示されている。適切な発現ベクターとしては、それだけには限定されないが、PCT公開WO87

50

／ 0 4 4 6 2 号中に開示されている、プラスミド、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、レトロウイルスを含めたウイルスベクター、コスミド、および発現ベクターが挙げられる。ベクターの構成成分としては、一般的に、それだけには限定されないが、以下のうちの1つまたは複数を挙げ得る：シグナル配列、複製起点、1つまたは複数のマーカー遺伝子、適切な転写制御要素（プロモーター、エンハンサー、およびターミネーターなど）。発現（すなわち翻訳）には、リボソーム結合部位、翻訳開始部位、およびストップコドンなどの1つまたは複数の翻訳制御要素も通常は必要である。

【 0 2 1 5 】

目的ポリヌクレオチドを含有するベクターは、電気穿孔、塩化カルシウム、塩化ルビジウム、リン酸カルシウム、D E A E - デキストラン、または他の物質を用いたトランスフェクション、微粒子銃、リポフェクション、および感染（たとえば、ベクターがワクシニアウイルスなどの感染性因子である場合）を含めた、いくつかの適切な手段のうちの任意のものによって宿主細胞内に導入することができる。ベクターまたはポリヌクレオチドを導入する選択肢は、多くの場合は宿主細胞の特長に依存する。

10

【 0 2 1 6 】

異種DNAを過剰発現することができる任意の宿主細胞を、目的の抗体、ポリペプチド、またはタンパク質をコードしている遺伝子を発現する目的のために使用することができる。哺乳動物宿主細胞の非限定的な例としては、それだけには限定されないが、C O S、H e L a、およびC H O細胞が挙げられる。P C T公開W O 8 7 / 0 4 4 6 2号も参照されたい。適切な非哺乳動物宿主細胞としては、原核生物（大腸菌（E . c o l i）または枯草菌（B . s u b t i l l i s）など）および酵母（出芽酵母（S . c e r e v i s a e）、分裂酵母（S . p o m b e）、またはケー・ラクチス（K . l a c t i s）など）が挙げられる。目的の抗体またはタンパク質を過剰発現している細胞は、既知のスクリーニング方法によって同定することができる。

20

【 0 2 1 7 】

本発明はまた、その特性に有意な影響を与えない機能的に等価な抗体ならびに増強または減少した活性および／または親和性を有する変異体を含めた、本明細書中で提供する抗体への修飾も包含する。たとえば、アミノ酸配列を突然変異させて、C D 4 7および／またはP D - L 1に対して所望の結合親和性を有する抗体が得られ得る。修飾ポリペプチドの例としては、アミノ酸残基の保存的置換を有するポリペプチド、機能的活性を大きく有害に変化させないアミノ酸の1つもしくは複数の欠失もしくは付加、またはポリペプチドのそのリガンドに対する親和性を成熟（増強）させるもの、あるいは化学的類似体の使用が挙げられる。

30

【 0 2 1 8 】

アミノ酸配列挿入物としては、1個の残基から数百個以上の残基を含有するポリペプチドの範囲の長さのアミノおよび／またはカルボキシル末端融合体、ならびに単一または複数のアミノ酸残基の配列内挿入物が挙げられる。末端挿入物の例としては、N末端メチオニル残基を有する抗体またはエピトープタグと融合した抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体としては、血液循環中の抗体の半減期を増加させる酵素またはポリペプチドの、抗体のNまたはC末端との融合が挙げられる。

40

【 0 2 1 9 】

置換変異体では、抗体分子中の少なくとも1つのアミノ酸残基が除去されており、異なる残基がその代わりに挿入される。置換突然変異誘発において最も興味深い部位としては超可変領域が挙げられるが、F Rの変更も企図される。保存的置換は、表7中に、見出し「保存的置換」の下で示されている。そのような置換が生物活性の変化をもたらす場合、表7中に「例示的な置換」と命名するまたはアミノ酸クラスに言及して以下にさらに記載するより実質的な変化を導入し、生成物をスクリーニングし得る。

【 0 2 2 0 】

50

【表 8】

表 7: アミノ酸置換

| 元の残基 (天然に存在するアミノ酸) | 保存的置換 | 例示的な置換 |
|-----------------------|-------|------------------------------------|
| Ala (A) | Val | Val; Leu; Ile |
| Arg (R) | Lys | Lys; Gln; Asn |
| Asn (N) | Gln | Gln; His; Asp, Lys; Arg |
| Asp (D) | Glu | Glu; Asn |
| Cys (C) | Ser | Ser; Ala |
| Gln (Q) | Asn | Asn; Glu |
| Glu (E) | Asp | Asp; Gln |
| Gly (G) | Ala | Ala |
| His (H) | Arg | Asn; Gln; Lys; Arg |
| Ile (I) | Leu | Leu; Val; Met; Ala; Phe; ノルロイシン |
| Leu (L) | Ile | ノルロイシン; Ile; Val; Met; Ala; Phe |
| Lys (K) | Arg | Arg; Gln; Asn |
| Met (M) | Leu | Leu; Phe; Ile |
| Phe (F) | Tyr | Leu; Val; Ile; Ala; Tyr |
| Pro (P) | Ala | Ala |
| Ser (S) | Thr | Thr |
| Thr (T) | Ser | Ser |
| Trp (W) | Tyr | Tyr; Phe |
| Tyr (Y) | Phe | Trp; Phe; Thr; Ser |
| Val (V) | Leu | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; ノルロイシン |

10

20

30

【0221】

抗体の生物学的特性の実質的な改変は、(a) 置換領域中のポリペプチド主鎖の、たとえばシートもしくはヘリックスコンホメーションとしての構造、(b) 標的部位での分子の電荷もしくは疎水性、または(c) 側鎖の嵩を維持することに対するその効果が有意に異なる置換を選択することによって、達成される。天然に存在するアミノ酸残基は、共通側鎖の特性に基づいて群分けされる：

40

- (1) 非極性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、
- (2) 電荷なしの極性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、
- (3) 酸性（負荷電）：Asp、Glu、
- (4) 塩基性（正荷電）：Lys、Arg、
- (5) 鎖の配向に影響を与える残基：Gly、Pro、および
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe、His。

【0222】

非保存的置換は、これらのクラスのうちのメンバーを別のクラスと交換することによって行われる。

【0223】

抗体の適切なコンホメーションの維持に関与していない任意のシステイン残基も、一般

50

的にセリンで置換して、分子の酸化安定性を改善させ、異常架橋連結防止し得る。逆に、特に抗体がFv断片などの抗体断片である場合は、その安定性を改善させるためにシステイン結合を抗体に付加し得る。

【0224】

アミノ酸修飾は、1つまたは複数のアミノ酸を変化または修飾することから、可変領域などの領域を完全に再設計することに及ぶことができる。可変領域中の変化は結合親和性および/または特異性を変更することができる。一部の実施形態では、1~5個を超えない保存的アミノ酸置換をCDRドメイン内で行う。他の実施形態では、1~3個を超えない保存的アミノ酸置換をCDRドメイン内で行う。さらに他の実施形態では、CDRドメインはVH CDR3および/またはVL CDR3である。

10

【0225】

修飾としては、グリコシル化および非グリコシル化ポリペプチド、ならびにたとえば様々な糖を用いたグリコシル化、アセチル化、およびリン酸化などの他の翻訳後修飾を有するポリペプチドも挙げられる。抗体は、その定常領域中の保存的位置でグリコシル化される(JefferysおよびLund、Chem. Immunol.、65:111~128、1997、WrightおよびMorrisson、TibTECH、15:26~32、1997)。免疫グロブリンのオリゴ糖側鎖は、タンパク質の機能(Boydら、Mol. Immunol.、32:1311~1318、1996、WittweおよびHoward、Biochem.、29:4175~4180、1990)ならびに糖タンパク質のコンホメーションおよび提示される三次元表面に影響を与える場合がある糖タンパク質の部分間の分子内相互作用(JefferysおよびLund、上記、WyssoおよびWagner、Current Opin. Biotech.、7:409~416、1996)に影響を与える。オリゴ糖は、特異的認識構造に基づいて所定の糖タンパク質を特定の分子に標的化する役割も果たし得る。抗体のグリコシル化は抗体依存性細胞性細胞傷害(ADCC)に影響を与えることも報告されている。特に、二分岐GlcNAcの形成を触媒するグリコシルトランスフェラーゼである(1,4)-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII(GnTIII)のテトラサイクリン調節性発現を有するCHO細胞は、改善されたADCC活性を有することが報告されている(Umanaraら、Mature Biotech.、17:176~180、1999)。

20

【0226】

抗体のグリコシル化は、典型的にはN連結またはO連結のどちらかである。N連結とは、炭水化物部分とアスパラギン残基の側鎖との付着を指す。トリペプチド配列のアスパラギン-X-セリン、アスパラギン-X-スレオニン、およびアスパラギン-X-システイン[式中、Xはプロリン以外の任意のアミノ酸である]が、炭水化物部分とアスパラギン側鎖との酵素的付着の認識配列である。したがって、これらのトリペプチド配列のいずれかがポリペプチド中に存在することで、潜在的なグリコシル化部位が作られる。O連結グリコシル化とは、糖であるN-アセチルガラクトサミン、ガラクトース、またはキシロースのうちの一つと、最も一般的にはセリンまたはスレオニンであるが、5-ヒドロキシプロリンまたは5-ヒドロキシリシンも使用し得るヒドロキシアミノ酸との付着を指す。

30

【0227】

抗体へのグリコシル化部位の付加は、上述のトリペプチド配列のうちの一つまたは複数を含むようにアミノ酸配列を変更することによって好都合に達成される(N連結グリコシル化部位用)。変更は、元の抗体の配列に1つまたは複数のセリンまたはスレオニン残基を付加するまたはそれによって置換することによっても行い得る(O連結グリコシル化部位用)。

40

【0228】

根底にあるヌクレオチド配列を変更せずに抗体のグリコシル化パターンも変更し得る。グリコシル化は、抗体を発現させるために使用する宿主細胞に大部分が依存する。組換え糖タンパク質、たとえば抗体の、潜在的な治療剤としての発現に使用する細胞種がネイティブ細胞であることは稀であるため、抗体のグリコシル化パターンの変動を予想すること

50

ができる（たとえばH s eら、J . B i o l . C h e m . 、 2 7 2 : 9 0 6 2 ~ 9 0 7 0 、 1 9 9 7を参照）。

【0229】

宿主細胞の選択肢に加えて、抗体の組換え産生中にグリコシル化に影響を与える要因としては、成長様式、培地の配合、培養密度、酸素化、pH、精製スキームなどが挙げられる。特定の宿主生物において達成されるグリコシル化パターンを変更するために様々な方法が提案されており、オリゴ糖産生に關与する特定の酵素を導入するまたは過剰発現させることが挙げられる（米国特許第5,047,335号、第5,510,261号、および第5,278,299号）。グリコシル化、または特定の種類のグリコシル化は、たとえば、エンドグリコシダーゼH（エンドH）、N-グリコシダーゼF、エンドグリコシダーゼF1、エンドグリコシダーゼF2、エンドグリコシダーゼF3を使用して、糖タンパク質から酵素的に除去することができる。さらに、組換え宿主細胞を、特定の種類の多糖のプロセッシングに欠陥があるように遺伝子操作することができる。これらおよび同様の技法が当分野で周知である。

10

【0230】

他の修飾方法は、当分野で知られているカップリング技法を使用することを含み、それだけには限定されないが、酵素的手段、酸化置換、およびキレート化が挙げられる。修飾は、たとえば、免疫アッセイのための標識の付着に使用することができる。修飾ポリペプチドは当分野において確立された手順を使用して作製され、その一部が以下および実施例中に記載されている、当分野で知られている標準アッセイを使用してスクリーニングすることができる。

20

【0231】

本発明の一部の実施形態では、抗体は、ヒトFcガンマ受容体に対して増加した親和性を有するもの、免疫学的に不活性または部分的に不活性である、たとえば、補体媒介性溶解を始動させない、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）を刺激しない、もしくはマクロファージを活性化させないもの、あるいは、補体媒介性溶解を始動させること、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）を刺激すること、またはミクログリアを活性化させることのうちの任意の1つまたは複数において低下した活性を有するもの（未修飾の抗体と比較して）などの、修飾された定常領域を含む。定常領域の様々な修飾を使用して、エフェクター機能の最適レベルおよび/または組合せを達成し得る。たとえば、M o r g a nら、I m m u n o l o g y 、 8 6 : 3 1 9 ~ 3 2 4 、 1 9 9 5 、 L u n dら、J . I m m u n o l o g y 、 1 5 7 : 4 9 6 3 ~ 9 1 5 7 : 4 9 6 3 ~ 4 9 6 9 、 1 9 9 6 、 I d u s o g i eら、J . I m m u n o l o g y 、 1 6 4 : 4 1 7 8 ~ 4 1 8 4 、 2 0 0 0 、 T a oら、J . I m m u n o l o g y 、 1 4 3 : 2 5 9 5 ~ 2 6 0 1 、 1 9 8 9 、 および J e f f e r i sら、I m m u n o l o g i c a l R e v i e w s 、 1 6 3 : 5 9 ~ 7 6 、 1 9 9 8を参照されたい。一部の実施形態では、定常領域は、E u r . J . I m m u n o l . 、 2 9 : 2 6 1 3 ~ 2 6 2 4 、 1 9 9 9 、 P C T出願PCT/GB99/01441号、および/またはUK出願第9809951.8号に記載のように修飾される。さらに他の実施形態では、定常領域は、N連結グリコシル化について脱グリコシル化されている。一部の実施形態では、定常領域は、定常領域中のN-グリコシル化認識配列の一部であるグリコシル化されたアミノ酸残基または隣接残基を突然変異させることによって、N連結グリコシル化について脱グリコシル化されている。たとえば、N-グリコシル化部位N297をA、Q、K、またはHへと突然変異させ得る。T a oら、J . I m m u n o l o g y 、 1 4 3 : 2 5 9 5 ~ 2 6 0 1 、 1 9 8 9 および J e f f e r i sら、I m m u n o l o g i c a l R e v i e w s 、 1 6 3 : 5 9 ~ 7 6 、 1 9 9 8を参照されたい。一部の実施形態では、定常領域は、N連結グリコシル化について脱グリコシル化されている。定常領域は、N連結グリコシル化について、酵素的に（酵素PNGaseによって炭水化物を除去することなど）、またはグリコシル化欠損宿主細胞中での発現によって脱グリコシル化させ得る。

30

40

【0232】

50

他の抗体修飾としては、PCT公開WO99/58572号中に記載のように修飾された抗体が挙げられる。これらの抗体は、標的分子に向けられた結合ドメインに加えて、ヒト免疫グロブリン重鎖の定常領域の全体または一部と実質的に相同的なアミノ酸配列を有するエフェクタードメインを含む。これらの抗体は、標的の顕著な補体依存性溶解または細胞媒介性破壊を始動させずに、標的分子と結合することができる。一部の実施形態では、エフェクタードメインは、FcRnおよび/またはFcRIIbと特異的に結合することができる。これらは、典型的には、2つ以上のヒト免疫グロブリン重鎖CH2ドメインに由来するキメラドメインに基づく。この様式で修飾された抗体は、慢性抗体療法における使用において、慣用の抗体療法に対する炎症性および他の有害な反応を回避するために、特に適している。

10

【0233】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗体のFc鎖を、エフェクター機能を除去するために修飾し得る。たとえば、FcRIIIとの結合が原因のエフェクター機能を除去するために、ヒトIgG1のFc鎖を、標準のプライマードイレクトPCR突然変異誘発を使用して突然変異L234A、L235A、およびG237Aを導入して修飾し、エフェクター機能を表現型を提供し得る(Canfieldら、J. Exp. Med. (1991) 173:1483~1491、Shieldsら、J. Biol. Chem. (2001) 276:6591~604)。

【0234】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する二重特異性抗体は、本発明の別のポリペプチド鎖上の対応システイン残基と相互作用して鎖間ジスルフィド結合を形成し得る、少なくとも1つのシステイン残基を含むように操作設計し得る。鎖間ジスルフィド結合は、二重特異性抗体を安定化し、組換え系における発現および回収を改善させ、安定かつ一貫した形成をもたらす、ならびに単離および/または精製生成物のin vivoの安定性を改善させる役割を果たし得る。システイン残基または複数の残基は、単一のアミノ酸として、またはより大きなアミノ酸配列、たとえばヒンジ領域の一部として、ポリペプチド鎖の任意の部分中に導入し得る。特定の態様では、少なくとも1つのシステイン残基は、ポリペプチド鎖のC末端で起こるように操作設計する。

20

【0235】

組成物、方法、およびキット

一部の実施形態では、本発明は、本明細書中に記載の、または本明細書中に記載の方法によって作製しその特徴を有する、本発明の抗体を含む医薬組成物を含めた、組成物を包含する。本明細書中で使用する医薬組成物は、CD47と結合する1つもしくは複数の抗体、PD-L1と結合する1つもしくは複数の抗体、CD47およびPD-L1と結合する1つもしくは複数の二重特異性抗体、ならびに/または1つもしくは複数のこれらの抗体をコードしている配列を含む1つもしくは複数のポリヌクレオチドを含み得る。これらの組成物は、当分野で周知である緩衝剤を含めた薬学的に許容できる賦形剤などの適切な賦形剤をさらに含み得る。

30

【0236】

本明細書中で提供する本発明は、治療上有効な量の本明細書中で提供する抗CD47、抗PD-L1、または二重特異性CD47/PD-L1抗体を対象に投与することを含む、対象において癌を処置、防止、または管理するための方法および組成物をさらに包含する。抗CD47、抗PD-L1、およびCD47/PD-L1二重特異性抗体は、原発性腫瘍および癌細胞の転移の防止、阻害、成長低下、および/または回帰において特に有用であり得る。

40

【0237】

一態様では、本発明は、対象においてCD47および/またはPD-L1の発現に関連する状態を処置する方法を提供する。一部の実施形態では、対象においてCD47および/またはPD-L1の発現に関連する状態を処置する方法は、それを必要としている対象に、有効量の、本明細書中に記載のそれぞれの抗CD47、抗PD-L1、および/また

50

はCD47/PD-L1二重特異性抗体を含む組成物（たとえば医薬組成物）を投与することを含む。CD47および/またはPD-L1の発現に関連する状態としては、それだけには限定されないが、異常なCD47および/またはPD-L1の発現、変更されたまたは異常なCD47および/またはPD-L1の発現、CD47および/またはPD-L1を発現する悪性細胞、ならびに増殖性障害（たとえば癌）が挙げられる。具体的な実施形態では、癌は、膀胱癌、乳癌、明細胞腎臓癌、頭部/頸部扁平細胞癌[頭頸部の扁平細胞癌(SCCHN)]、肺扁平細胞癌、肺腺癌、悪性黒色腫、非小細胞肺癌(NSCLC)、卵巣癌、膵癌、前立腺癌、腎細胞癌、小細胞肺癌(SCLC)、三重陰性乳癌、尿路上皮癌、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、急性骨髄性白血病(AML)、慢性リンパ球性白血病(CLL)、慢性骨髄性白血病(CML)、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(DLBCL)、濾胞性リンパ腫、ホジキンリンパ腫(HL)、マントル細胞リンパ腫(MCL)、多発性骨髄腫(MM)、骨髄細胞白血病-1タンパク質(Mc1-1)、脊髄形成異常症候群(MDS)、非ホジキンリンパ腫(NHL)、小リンパ球性リンパ腫(SLL)、子宮内膜癌、B細胞急性リンパ芽球性白血病、結腸直腸癌、膠芽細胞腫、子宮癌、子宮頸癌、陰茎癌、または非黒色腫皮膚癌である。

10

【0238】

一態様では、本発明は、本明細書中に記載の抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、および/もしくはCD47/PD-L1二重特異性抗体、または、治療において使用するための、そのような抗体を含む医薬組成物を提供する。特定の実施形態では、本発明はまた、CD47および/またはPD-L1に関連する障害の処置において使用するための、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、および/またはCD47/PD-L1二重特異性抗体も提供する。具体的な実施形態では、CD47および/またはPD-L1に関連する障害は本明細書中に定義する癌である。

20

【0239】

本発明は、本明細書中に記載の抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、および/もしくはCD47/PD-L1二重特異性抗体、または、治療において使用するための医薬品の製造において使用するための、そのような抗体を含む医薬組成物をさらに提供する。一部の実施形態では、治療は、CD47および/またはPD-L1に関連する障害の処置である。具体的な実施形態では、CD47および/またはPD-L1に関連する障害は癌である。

30

【0240】

特定の態様では、本明細書中で提供する抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、および/またはCD47/PD-L1二重特異性抗体は、癌細胞の成長を、抗体または二重特異性抗体の非存在下における癌細胞の成長よりも、少なくとも99%、少なくとも95%、少なくとも90%、少なくとも85%、少なくとも80%、少なくとも75%、少なくとも70%、少なくとも60%、少なくとも50%、少なくとも45%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも35%、少なくとも30%、少なくとも25%、少なくとも20%、または少なくとも10%阻害するまたは低下させる。

【0241】

特定の態様では、本明細書中で提供する抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、および/またはCD47/PD-L1二重特異性抗体は、抗体または二重特異性抗体の非存在下よりも少なくとも5%、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも25%、少なくとも30%、少なくとも35%、少なくとも40%、少なくとも45%、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、または少なくとも100%良好に、細胞を死滅させる、または癌細胞の成長を阻害するもしくは低下させる。

40

【0242】

一部の実施形態では、本明細書中に記載の方法および使用は、対象を、追加の形態の治療で処置するステップをさらに含む。一部の実施形態では、追加の形態の治療は追加の抗癌治療であり、それだけには限定されないが、化学療法、放射線照射、手術、ホルモン療

50

法、および/または追加の免疫療法が挙げられる。

【0243】

本発明は、本発明の分子を、それだけには限定されないが、現在の標準および実験的な化学療法、生物療法、免疫療法、放射線療法、または手術を含めた、癌を処置または防止するために当業者に知られている他の治療と組み合わせると投与することをさらに包含する。一部の態様では、本発明の分子は、治療上または予防上有効な量の1つまたは複数の薬剤、治療的抗体、または癌の処置および/もしくは防止について当業者に知られている他の薬剤と組み合わせると投与し得る。

【0244】

したがって、癌を処置するための方法および使用は、それを必要としている対象に、有効量の本発明の抗体または二重特異性抗体を、化学療法剤と組み合わせると投与することを含む。そのような組合せ処置は、別々に、順次に、または同時に投与し得る。適切な化学療法剤としては、それだけには限定されないが、ペバシズマブ、セツキシマブ、シロリムス、パニツムマブ、5-フルオロウラシル(5-FU)、カペシタピン、チボザニブ、イリノテカン、オキサリプラチン、シスプラチン、トリフルリジン、チピラシル、ロイコボリン)、ゲムシタピン、および/または塩酸エルロチニブなどの少なくとも1つの追加の薬剤が挙げられる。

10

【0245】

本明細書中で提供する投与の投与量および頻度は、治療上有効および予防上有効に関して包含される。投与の量および頻度は、それぞれの患者に特異的な要因次第で、投与した特定の治療剤または予防剤、癌の重篤度および種類、投与経路、ならびに患者の年齢、体重、応答、および過去の病歴に応じて、さらに変動し得る。適切なレジメンは、そのような要因を考慮することによって、ならびにたとえば文献中に報告され、Physician's Desk Reference(第56版、2002)中に推奨される投与量に従うことによって、当業者によって選択され得る。

20

【0246】

本発明の抗体または二重特異性抗体は、選択した投与様式に適切であるように配合された投与用の医薬組成物、および緩衝剤、界面活性剤、保存料、可溶化剤、等張化剤、安定化剤、担体などの薬学的に許容できる希釈剤または賦形剤の形態であり得る。Remington's Pharmaceutical Sciences、Mack Publishing Co.、ペンシルバニア州Easton、第18版、1995は、従事者に一般的に知られている配合技法の概論を提供する。

30

【0247】

これらの医薬組成物は、癌を処置する一般的に意図される目的を達成する、当分野で知られている任意の手段によって投与し得る。投与経路は、本明細書中において、それだけには限定されないが、経食道、腫瘍内、経結腸内視鏡、経皮、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下、および関節内の注射および輸液を含む投与様式を指すと定義される、非経口であり得る。本発明による分子(たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体、関連医薬組成物)の投与および投薬の様式は、闘う疾患の種類、必要に応じてその段階、制御する抗原、存在する場合は同時発生的処置の種類、処置の頻度、所望する効果の性質、ならびに患者の体重、年齢、健康、食習慣、および性別に依存する。したがって、実際に用いる投薬レジメンは幅広く変動する場合があります。したがって、本明細書中に記載した投薬レジメンから逸脱する場合がある。

40

【0248】

本発明の抗体(たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体)の様々な配合物を投与に使用し得る。一部の実施形態では、抗体はニートで投与し得る。一部の実施形態では、抗体および薬学的に許容できる賦形剤は様々な配合物中であり得る。薬学的に許容できる賦形剤は当分野で知られており、薬理的に有効な物質の投与を容易にする比較的不活性な物質である。たとえば、賦形剤は、形もしくは稠度を与える、または希釈剤として作用することができる。適切な賦形剤としては、それ

50

だけには限定されないが、安定化剤、湿潤剤および乳化剤、様々な容積モル浸透圧濃度のための塩、カプセル封入剤、緩衝剤、および皮膚浸透促進剤が挙げられる。賦形剤ならびに非経口および非経口でない薬物送達のための配合物は、Remington, The Science and Practice of Pharmacy、第21版、MacK Publishing、2005に記載されている。

【0249】

一部の実施形態では、これらの薬剤は、注射による投与（たとえば、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内など）用に配合される。したがって、これらの薬剤は、生理食塩水、リンゲル液、デキストロス溶液などの薬学的に許容できるビヒクルと組み合わせることができる。具体的な投薬レジメン、すなわち、用量、タイミング、および反復は、具体的な個体およびその個体の病歴に依存する。

10

【0250】

本明細書中に記載の抗体（たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体）は、注射によるもの（たとえば、腹腔内、静脈内、皮下、筋肉内など）を含めた任意の適切な方法を使用して投与することができる。抗体、たとえばモノクローナル抗体または二重特異性抗体は、本明細書中に記載のように吸入を介しても投与される。一般的に、本抗体の投与では、投与量は処置する宿主および具体的な投与様式に依存する。一実施形態では、本発明の抗体の用量範囲は、約0.001 μg/kgの体重～約20,000 μg/kgの体重である。用語「体重」は、患者を処置する場合に適応可能である。単離細胞を処置する場合は、本明細書中で使用する「体重」とは「全細胞体重」を指す。用語「全体重」を、単離細胞および患者の処置の両方に適用するために使用し得る。すべての濃度および処置レベルは、本出願中において「体重」または単に「kg」として表され、また、類似の「全細胞体重」および「全体重」濃度をカバーするとみなされる。しかし、当業者は、様々な投与量範囲、たとえば、0.01 μg/kgの体重～20,000 μg/kgの体重、0.02 μg/kgの体重～15,000 μg/kgの体重、0.03 μg/kgの体重～10,000 μg/kgの体重、0.04 μg/kgの体重～5,000 μg/kgの体重、0.05 μg/kgの体重～2,500 μg/kgの体重、0.06 μg/kgの体重～1,000 μg/kgの体重、0.07 μg/kgの体重～500 μg/kgの体重、0.08 μg/kgの体重～400 μg/kgの体重、0.09 μg/kgの体重～200 μg/kgの体重、または0.1 μg/kgの体重～100 μg/kgの体重の有用性を認識するであろう。さらに、当業者は、様々な投与量レベル、たとえば、0.0001 μg/kg、0.0002 μg/kg、0.0003 μg/kg、0.0004 μg/kg、0.0005 μg/kg、0.0007 μg/kg、0.001 μg/kg、0.1 μg/kg、1.0 μg/kg、1.5 μg/kg、2.0 μg/kg、5.0 μg/kg、10.0 μg/kg、15.0 μg/kg、30.0 μg/kg、50 μg/kg、75 μg/kg、80 μg/kg、90 μg/kg、100 μg/kg、120 μg/kg、140 μg/kg、150 μg/kg、160 μg/kg、180 μg/kg、200 μg/kg、225 μg/kg、250 μg/kg、275 μg/kg、300 μg/kg、325 μg/kg、350 μg/kg、375 μg/kg、400 μg/kg、450 μg/kg、500 μg/kg、550 μg/kg、600 μg/kg、700 μg/kg、750 μg/kg、800 μg/kg、900 μg/kg、1 μg/kg、5 μg/kg、10 μg/kg、12 μg/kg、15 mg/kg、20 mg/kg、および/または30 mg/kgが役に立つことを認識するであろう。これらの投与量はすべて例示的であり、これらの点の間の任意の投与も、本発明において役立つことが予想される。上記の投与量範囲または投与量レベルのうちの任意のものを本発明の抗体に用い得る。数日間またはそれより長くにわたる繰り返し投与では、状態に応じて、症状の所望の抑制が起こるまで、または、たとえば腫瘍の成長/進行もしくは癌細胞の転移を阻害もしくは遅延させるために十分な治療レベルが達成されるまで、処置を持続させる。

20

30

40

【0251】

50

一般的に、本明細書中で提供する抗体の投与では、候補投与量を、1日1回、週に1回、隔週、3週間毎、4週間毎、5週間毎、6週間毎、7週間毎、8週間毎、10週間毎、12週間毎、または12週間毎より長くに投与することができる。

【0252】

一部の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、1日1回、約1 μ g/kg、30 μ g/kgまで、300 μ g/kgまで、3mg/kgまで、30mg/kgまで、100mg/kgまで、またはそれより多くのうちの任意のものの範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.01mg/kg、約0.03mg/kg、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約1mg/kg、約2.5mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、および約25mg/kgの1日投与量を使用し得る。 10

【0253】

一部の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、週に1回、約1 μ g/kg、30 μ g/kgまで、300 μ g/kgまで、3mg/kgまで、30mg/kgまで、100mg/kgまで、またはそれより多くのうちの任意のものの範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.01mg/kg、約0.03mg/kg、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約0.5mg/kg、約1mg/kg、約2.5mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約25mg/kg、および約30mg/kgの週1回の投与量を使用し得る。

【0254】

一部の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、2週間毎に、約1 μ g/kg、30 μ g/kgまで、300 μ g/kgまで、3mg/kgまで、30mg/kgまで、100mg/kgまで、またはそれより多くのうちの任意のものの範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約1mg/kg、約2.5mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約25mg/kg、および約30mg/kgの2週間毎の投与量を使用し得る。 20

【0255】

一部の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、3週間毎に、約1 μ g/kg、30 μ g/kgまで、300 μ g/kgまで、3mg/kgまで、30mg/kgまで、100mg/kgまで、またはそれより多くのうちの任意のものの範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約1mg/kg、約2.5mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、および約50mg/kgの3週に1回の投与量を使用し得る。 30

【0256】

一部の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、1カ月毎または4週間毎に、約1 μ g/kg、30 μ g/kgまで、300 μ g/kgまで、3mg/kgまで、30mg/kgまで、100mg/kgまで、またはそれより多くのうちの任意のものの範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.1mg/kg、約0.3mg/kg、約1mg/kg、約2.5mg/kg、約3mg/kg、約5mg/kg、約10mg/kg、約15mg/kg、約25mg/kg、約30mg/kg、約35mg/kg、約40mg/kg、約45mg/kg、および約50mg/kgの月1回の投与量を使用し得る。 40

【0257】

他の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、1日1回、約0.01mg~約1200mgまたはそれより多い範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.01mg、約0.1mg、約1mg、約10mg、約50mg、約100mg、約200mg、約300mg、約400mg、約500mg、約600mg、約700mg、約800mg、約900mg、約1000mg、約1100mg、または約1200mgの1日投与量を使用し得る。

【 0 2 5 8 】

他の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、週に1回、約0.01 mg ~ 約2000 mg またはそれより多い範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.01 mg、約0.1 mg、約1 mg、約10 mg、約50 mg、約100 mg、約200 mg、約300 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg、約700 mg、約800 mg、約900 mg、約1000 mg、約1100 mg、約1200 mg、約1300 mg、約1400 mg、約1500 mg、約1600 mg、約1700 mg、約1800 mg、約1900 mg、または約2000 mg の週1回の投与量を使用し得る。

【 0 2 5 9 】

他の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、2週間毎に、約0.01 mg ~ 約2000 mg またはそれより多い範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.01 mg、約0.1 mg、約1 mg、約10 mg、約50 mg、約100 mg、約200 mg、約300 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg、約700 mg、約800 mg、約900 mg、約1000 mg、約1100 mg、約1200 mg、約1300 mg、約1400 mg、約1500 mg、約1600 mg、約1700 mg、約1800 mg、約1900 mg、または約2000 mg の2週間毎の投与量を使用し得る。

【 0 2 6 0 】

他の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、3週間毎に、約0.01 mg ~ 約2500 mg またはそれより多い範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.01 mg、約0.1 mg、約1 mg、約10 mg、約50 mg、約100 mg、約200 mg、約300 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg、約700 mg、約800 mg、約900 mg、約1000 mg、約1100 mg、約1200 mg、約1300 mg、約1400 mg、約1500 mg、約1600 mg、約1700 mg、約1800 mg、約1900 mg、約2000 mg、約2100 mg、約2200 mg、約2300 mg、約2400 mg、または約2500 mg の3週に1回の投与量を使用し得る。

【 0 2 6 1 】

他の実施形態では、候補投与量は、上で言及した要因に応じて、4週間または1カ月毎に、約0.01 mg ~ 約3000 mg またはそれより多い範囲の投与量で投与する。たとえば、約0.01 mg、約0.1 mg、約1 mg、約10 mg、約50 mg、約100 mg、約200 mg、約300 mg、約400 mg、約500 mg、約600 mg、約700 mg、約800 mg、約900 mg、約1000 mg、約1100 mg、約1200 mg、約1300 mg、約1400 mg、約1500 mg、約1600 mg、約1700 mg、約1800 mg、約1900 mg、約2000 mg、約2100 mg、約2200 mg、約2300 mg、約2400 mg、約2500 mg、約2600 mg、約2700 mg、約2800 mg、約2900 mg、または約3000 mg の月1回の投与量を使用し得る。

【 0 2 6 2 】

従事者が達成を望む薬物動態学的崩壊のパターン次第では、他の投薬レジメンも有用であり得る。一実施形態では、本発明の抗体は、初期のプライム用量、次いでより高いおよび/または連続的な、実質的に一定した投与量で投与する。一部の実施形態では、週に1 ~ 4回の投薬が企図される。他の実施形態では、月に1回または隔月または3カ月に1回の投薬が企図される。この治療の進行は慣用技術およびアッセイによって容易にモニタリングされる。投薬レジメンは時間に伴って変動する場合がある。

【 0 2 6 3 】

本発明の目的のために、抗体（たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体）の適切な投与量は、用いる抗体またはその組成物、処置する症状の種類および重篤度、薬剤を治療目的で投与するのかがどうか、以前の治療、患者の病歴および薬剤に対する応答、投与した薬剤に対する患者のクリアランス速度、ならびに担当医の裁量に依存する。典型的には、臨床家は、所望の結果を達成する投与量に到達するまで抗体を投与する。用量および/または頻度は処置の経過中に変動する場合がある

。半減期などの経験的考慮事項が、投与量の決定に一般的に寄与する。たとえば、抗体の半減期を延ばすため、および抗体が宿主の免疫系によって攻撃されることを防止するために、ヒト化抗体または完全ヒト抗体などのヒト免疫系に適合性のある抗体を使用し得る。投与の頻度は、治療の経過中に決定および調整してよく、必ずしもではないが、一般的に、症状の処置および/または抑制および/または軽快および/または遅延、たとえば、腫瘍成長の阻害または遅延などに基づく。あるいは、抗体の持続的連続放出配合物が適切であり得る。持続放出を達成するための様々な配合物および装置が当分野で知られている。

【0264】

一実施形態では、抗体（たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体）の投与量は、抗体の1回または複数回の投与を与えられた個体において経験的に決定し得る。個体には、抗体の増加する投与量を与える。有効性を評価するためには、疾患の指標に従うことができる。

10

【0265】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗体（たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体）は、疾患（たとえば癌）の処置のために抗PD-1または抗PD-L1抗体治療剤を以前に受けた対象に投与し得る。一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗体を、疾患の処置のために抗PD-1または抗PD-L1抗体治療剤を以前に受けており、以前の抗PD-1または抗PD-L1抗体治療剤が対象において限られた有効性しかないまたは有効性をもたない（たとえば、対象の疾患が以前の抗PD-1または抗PD-L1治療剤を用いた処置に耐性である）、対象に投与し得る。

20

【0266】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗体（たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体）は、PD-L1の発現の試験において陽性となる癌を有する対象に投与し得る。一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗体は、PD-L1の発現の試験において陽性とならない癌を有する対象に投与し得る。

【0267】

本明細書中で使用する「PD-L1の発現」とは、細胞表面上のPD-L1タンパク質または細胞もしくは組織内のPD-L1 mRNAの、任意の検出可能な発現レベルを指す。PD-L1タンパク質の発現は、診断的抗PD-L1抗体を用いて、腫瘍組織切片の免疫組織化学（IHC）アッセイにおいてまたはフローサイトメトリーによって検出し得る。細胞によるPD-L1の発現は、PETイメージングによって、PD-L1と特異的に結合する結合剤（たとえば抗体）を使用しても検出し得る。PD-L1 mRNAの発現を検出および測定するための技法としては、たとえば、RT-PCRおよびリアルタイム定量的RT-PCRが挙げられる。

30

【0268】

いくつかの手法が、腫瘍組織切片のIHCアッセイにおいてPD-L1の発現を定量するために記載されている。たとえば、Thompson, R.H.ら、PNAS、101(49)、17174~17179(2004)、Thompson, R.H.ら、Cancer Res.、66:3381~3385(2006)、Gadiot, J.ら、Cancer、117:2192~2201(2011)、Taube, J.M.ら、Sci Transl Med、4、127ra37(2012)、およびToplián, S.L.ら、New Eng. J Med、366(26):2443~2454(2012)を参照されたい。

40

【0269】

一手法は、PD-L1の発現について陽性または陰性の単純なバイナリエンドポイントを用い、陽性結果は、細胞表面膜染色の組織学的証拠を示す腫瘍細胞の百分率の観点から定義される。腫瘍組織切片は、特定の百分率の腫瘍細胞がPD-L1の発現について陽性である場合に、PD-L1の発現について陽性として数え得る。たとえば、腫瘍組織切片は、腫瘍細胞の少なくとも0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、50%、7

50

5%、90%、または95%がPD-L1の発現について陽性である場合に、PD-L1の発現について陽性として数え得る。

【0270】

別の手法では、腫瘍組織切片中のPD-L1の発現は、主にリンパ球を含む腫瘍細胞中および浸潤性免疫細胞中において定量する。膜染色を示す腫瘍細胞および浸潤性免疫細胞の百分率を、<5%、5~9%、その後は10%の増分ずつ100%までなどで、別々に定量し得る。腫瘍細胞では、PD-L1の発現は、それぞれ、スコアがたとえば1%、2%、または5%未満である場合に陰性として、およびスコアが1%、2%、または5%より高い場合に陽性として数え得る。浸潤性免疫細胞中のPD-L1の発現は、膜染色細胞のパーセントを、なし(0)、軽度(スコア1、稀なリンパ球)、中等度(スコア2、リンパ組織球性凝集体による腫瘍の限局性浸潤)、または重篤(スコア3、びまん性浸潤)として等級付けされる浸潤の強度と乗算することによって決定される、調整炎症スコア(AIS)と呼ばれる半定量的測定値として報告し得る。腫瘍組織切片は、AISが5よりも高い場合に、免疫浸潤物によるPD-L1の発現について陽性として数え得る。

10

【0271】

PD-L1 mRNAの発現のレベルは、ユビキチンCなどの定量的RT-PCRにおいて頻繁に使用される1つまたは複数の参照遺伝子のmRNAの発現レベルと比較し得る。

【0272】

一部の実施形態では、腫瘍内の悪性細胞および/または浸潤性免疫細胞によるPD-L1の発現(タンパク質および/またはmRNA)のレベルは、適切な対照によるPD-L1の発現(タンパク質および/またはmRNA)のレベルとの比較に基づいて、「過剰発現されている」または「上昇している」と決定される。たとえば、対照PD-L1タンパク質またはmRNAの発現レベルは、同じ種類の非悪性細胞または一致した正常組織由来の切片において定量されたレベルであり得る。一部の実施形態では、腫瘍試料中におけるPD-L1の発現は、試料中のPD-L1タンパク質(および/またはPD-L1 mRNA)が対照中におけるものよりも少なくとも10%、20%、または30%高い場合に、上昇していると決定される。

20

【0273】

一部の実施形態では、癌におけるPD-L1の発現は、診断的抗PD-L1抗体を使用して、患者から取り出した腫瘍試料の組織切片上の免疫組織化学(IHC)アッセイにおいて検出する。典型的には、本明細書中で提供する抗体を用いた処置の前にPD-L1の発現を決定するために腫瘍の試料を試験するが、処置の開始後に試験することもできる。

30

【0274】

腫瘍組織切片中におけるPD-L1の発現のIHC検出のための診断的mAbとして有用な診断的抗ヒトPD-L1 mAbの具体的な例は、WO2014/100079号中に記載されている抗体20C3および抗体22C3である。例示的なPD-L1 IHC試験としては、PD-L1 IHC 22C3 PharmDx(Dacco)およびVentana PD-L1 SP263アッセイが挙げられる。

【0275】

ある特定の実施形態では、抗体(たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体)の投与は、腫瘍成長の阻害、腫瘍回帰、腫瘍のサイズの低下、腫瘍細胞数の低下、腫瘍成長の遅延、アブスコパル効果、腫瘍転移の阻害、経時的な転移性病変の低下、化学療法剤または細胞毒性剤の使用の低下、腫瘍量の低下、無進行生存の増加、全生存の増加、完全応答、部分応答、および安定疾患からなる群から選択される少なくとも1つの効果をもたらす。

40

【0276】

本発明における方法に従った抗体(たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体)の投与は、たとえば、レシピエントの生理的条件、投与の目的が治療的であるか予防的であるか、および当業者に知られている他の要因に依

50

じて、連続的または断続的であり得る。抗体の投与は、事前に選択された期間にわたって本質的に連続的であり得る、または一連の間隔を空けた用量であり得る。

【0277】

本発明に従って使用する抗体（たとえば、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、CD47/PD-L1二重特異性抗体）の治療的配合物は、所望の度合の純度を有する抗体を、任意選択の薬学的に許容できる担体、賦形剤、または安定化剤（Remington、The Science and Practice of Pharmacy、第21版、Mack Publishing、2005）と、凍結乾燥配合物または液剤の形態で混合することによって、貯蔵用に調製される。許容される担体、賦形剤、または安定化剤は、用いる投与量および濃度でレシピエントに対して無毒性であり、リン酸、クエン酸、および他の有機酸などの緩衝剤、塩化ナトリウムなどの塩、アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤、保存料（オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムクロリド、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブチルもしくはベンジルアルコール、メチルもしくはプロピルパラベンなどのアルキルパラベン、カテコール、レソルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、およびm-クレゾールなど）、低分子量（約10個未満の残基）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン、もしくは免疫グロブリンなどのタンパク質、ポリビニルピロリドンなどの親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、もしくはリシンなどのアミノ酸、グルコース、マンノース、もしくはデキストリンを含む単糖、二糖、および他の炭水化物、EDTAなどのキレート化剤、スクロース、マンニトール、トレハロース、もしくはソルビトールなどの糖、ナトリウムなどの塩形成対イオン、金属錯体（たとえばZn-タンパク質複合体）、ならびに/またはTWEEN（商標）、PLURONICS（商標）、もしくはポリエチレングリコール（PEG）などの非イオン性界面活性剤を含み得る。

【0278】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体は、1つまたは複数の追加の治療剤の投与と組み合わせ投与し得る。追加の治療剤は、追加の抗癌剤を含んでもよい。これらとしては、それだけには限定されないが、ワクチン、CAR-T細胞に基づく治療、放射線療法、サイトカイン治療、CD3二重特異性抗体、他の免疫抑制経路の阻害剤、血管形成の阻害剤、T細胞活性化剤、代謝経路の阻害剤、mTOR阻害剤、アデノシン経路の阻害剤、それだけには限定されないがInlyta、ALK阻害剤、およびスニチニブを含むチロシンキナーゼ阻害剤、BRAF阻害剤、後成的モディファイヤー、IDO1阻害剤、JAK阻害剤、STAT阻害剤、サイクリン依存性キナーゼ阻害剤、生物治療剤（それだけには限定されないが、VEGF、VEGFR、EGFR、Her2/neu、他の成長因子受容体、CD40、CD-40L、CTLA-4、OX-40、4-1BB、TIGIT、およびICOSに対する抗体を含む）、免疫原性剤（たとえば、弱毒化癌細胞、腫瘍抗原、腫瘍由来の抗原または核酸をパルスした樹状細胞などの抗原提示細胞、免疫刺激サイトカイン（たとえば、IL-2、IFN-2、GM-CSF）、およびそれだけには限定されないがGM-CSFなどの免疫刺激サイトカインをコードしている遺伝子をトランスフェクトした細胞）などの生物治療剤および/または化学療法剤の投与が挙げられるが、それだけには限定されない。

【0279】

生物治療剤の例としては、治療的抗体、免疫調節剤、および治療的免疫細胞が挙げられる。

【0280】

治療的抗体は、様々な異なる抗原に対して特異性を有し得る。たとえば、治療的抗体は、抗体と抗原との結合が、抗原を発現する細胞の死を促進するように、腫瘍関連抗原に向けられていてよい。他の例では、治療的抗体は、抗体の結合が、抗原を発現する細胞の活性の下方調節を防止する（したがって抗原を発現する細胞の活性を促進する）ように、免

10

20

30

40

50

疫細胞上の抗原（たとえばPD-1）に向けられていてよい。一部の状況では、治療用抗体は複数の異なる機構を通じて機能し得る（たとえば、これは、i）抗原を発現する細胞の死を促進すること、ii）抗原が、抗原を発現する細胞と接触している免疫細胞の活性の下方調節を引き起こすことを防止することの両方を行い得る）。

【0281】

治療的抗体は、たとえば、以下に列挙する抗原に向けられていてよい。一部の抗原では、抗原に向けられた例示的な抗体も以下に挙げられる（抗原の後の角括弧／括弧中）。以下の抗原は、本明細書中において「標的抗原」などとも呼び得る。本明細書中における治療的抗体に対する標的抗原としては、たとえば、4-1BB（たとえばウトミルマブ）、5T4、A33、アルファ-葉酸受容体1（たとえばミレベツキシマブ ソラブタンシン）、Alk-1、BCMA [たとえばPF-06863135（US9969809号を参照）]、BTN1A1（たとえばWO2018222689号を参照）、CA-125（たとえばアバゴボマブ）、炭酸脱水酵素IX、CCR2、CCR4（たとえばモガムリズマブ）、CCR5（たとえばレロンリマブ）、CCR8、CD3 [たとえば、プリナツモマブ（CD3/CD19二重特異性）、PF-06671008（CD3/P-カドヘリン二重特異性）、PF-06863135（CD3/BCMA二重特異性）、CD19（たとえば、プリナツモマブ、MOR208）、CD20（たとえば、イブリツモマブチウキセタン、オビヌツズマブ、オフアツムマブ、リツキシマブ、ウブリツキシマブ）、CD22（イノツズマブオゾガマイシン、モキセツムモマブパストクス）、CD25、CD28、CD30（たとえばブレンツキシマブ ベドチン）、CD33（たとえばゲムツズマブオゾガマイシン）、CD38（たとえば、ダラツムマブ、イサツキシマブ）、CD40、CD-40L、CD44v6、CD47、CD52（たとえばアレムツズマブ）、CD63、CD79（たとえばポラツズマブ ベドチン）、CD80、CD123、CD276/B7-H3（たとえばオムブルタマブ）、CDH17、CEA、ClhCG、CTLA-4（たとえば、イピリムマブ、トレメリムマブ）、CXCR4、デスモグレイン4、DLL3（たとえばロバルピツズマブ テシリン）、DLL4、E-カドヘリン、EDA、EDB、EFNA4、EGFR（たとえば、セツキシマブ、デパツキシズマブ マホドチン、ネシツムマブ、パニツムマブ）、EGFRvIII、エンドシアリン、EpCAM（たとえばオボルツズマブ モナトクス）、FAP、胎児性アセチルコリン受容体、FLT3（たとえばWO2018/220584号を参照）、GD2（たとえば、ジヌツキシマブ、3F8）、GD3、GITR、GloboH、GM1、GM2、GUCY2C（たとえばPF-07062119）、HER2/neu [たとえば、マルゲツキシマブ、ペルツズマブ、トラスツズマブ、アド-トラスツズマブエムタンシン、トラスツズマブデュオカルマジン、PF-06804103（US8828401号を参照）]、HER3、HER4、ICOS、IL-10、ITG-AvB6、LAG-3（たとえばレラトリマブ）、ルイス-Y、LG、Ly-6、M-CSF [たとえばPD-0360324（US7326414号を参照）]、MCSF、メソテリン、MUC1、MUC2、MUC3、MUC4、MUC5AC、MUC5B、MUC7、MUC16、Notch1、Notch3、ネクチン-4（たとえばエンホルツマブ ベドチン）、OX40 [たとえばPF-04518600（US7960515号を参照）]、P-カドヘリン [たとえばPF-06671008（WO2016/001810号を参照）]、PCDHB2、PD-1 [たとえば、BCD-100、カムレリズマブ、セミプリマブ、ゲノリムズマブ（genolimzumab、CBT-501）、MED10680、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、RN888（WO2016/092419号を参照）、シンチリマブ、スパルタリズマブ、STI-A1110、チスレリズマブ、TSR-042]、PD-L1（たとえば、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、BMS-936559（MDX-1105）、またはLY3300054）、PDGFRA（たとえばオララツマブ）、形質細胞抗原、ポリSA、PSCA、PSMA、PTK7 [たとえばPF-06647020（US9409995号を参照）]、Ror1、SAS、SCRx6、SLAMF7（たとえばエロツズマブ）、SHH、SIRPa（たとえば、ED9、Effi-DEM）、STE A

10

20

30

40

50

P、TGF-ベータ、TIGIT、TIM-3、TMPRSS3、TNF-アルファ前駆体、TROP-2（たとえばサシズマブゴビテカン）、TSPAN8、VEGF（たとえば、ペバシズマブ、プロルシズマブ）、VEGFR1（たとえばラニビズマブ）、VEGFR2（たとえば、ラムシルマブ、ラニビズマブ）、Wue-1が挙げられる。

【0282】

本明細書中で提供する抗体と組み合わせて投与する治療的抗体は、任意の適切な形式を有し得る。たとえば、治療的抗体は、本明細書中に他の箇所記載した任意の形式を有し得る。一部の実施形態では、治療用抗体は裸抗体であり得る。一部の実施形態では、治療用抗体は、薬物または他の薬剤と連結してよい（「抗体-薬物コンジュゲート」（ADC）としても知られる）。一部の実施形態では、特定の抗原に対する治療用抗体を多特異性抗体（たとえば二重特異性抗体）内に取り込ませ得る。

10

【0283】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体は、パターン認識受容体（PRR）作用剤、免疫賦活性サイトカイン、および癌ワクチンと組み合わせて投与し得る。複数クラスのPRR分子が存在し、トール様受容体（TLR）、RIG-I様受容体（RLR）、ヌクレオチド-結合オリゴマー化ドメイン（NOD）様受容体（NLR）、C型レクチン受容体（CLR）、およびインターフェロン遺伝子の刺激因子（STING）タンパク質が挙げられる。他のPRRとしては、たとえば、IFN調節因子のDNA依存性活性化剤（DNA-dependent Activator of IFN-regulatory factors、DAI）、および黒色腫中に非存在（Absent in Melanoma）2（AIM2）が挙げられる。

20

【0284】

一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体は、本明細書中で「TLR作用剤」と呼ぶ、1つまたは複数のTLRを活性化させる分子と組み合わせて投与し得る。TLR作用剤としては、たとえば、低分子（たとえば約1000ダルトン未満の分子量を有する有機分子）ならびに大分子（たとえばオリゴヌクレオチドおよびタンパク質）を挙げることができる。一部のTLR作用剤は単一種類のTLR（たとえばTLR3またはTLR9）に特異的である一方で、一部のTLR作用剤は2種類以上のTLR（たとえばTLR7およびTLR8の両方）を活性化させる。本明細書中で提供する例示的なTLR作用剤としては、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、およびTLR9の作用剤が挙げられる。例示的な低分子TLR作用剤としては、たとえば、米国特許第4,689,338号、第4,929,624号、第5,266,575号、第5,268,376号、第5,346,905号、第5,352,784号、第5,389,640号、第5,446,153号、第5,482,936号、第5,756,747号、第6,110,929号、第6,194,425号、第6,331,539号、第6,376,669号、第6,451,810号、第6,525,064号、第6,541,485号、第6,545,016号、第6,545,017号、第6,573,273号、第6,656,938号、第6,660,735号、第6,660,747号、第6,664,260号、第6,664,264号、第6,664,265号、第6,667,312号、第6,670,372号、第6,677,347号、第6,677,348号、第6,677,349号、第6,683,088号、第6,756,382号、第6,797,718号、第6,818,650号、および第7,7091,214号、米国特許公開第2004/0091491号、第2004/0176367号、および第2006/0100229号、ならびに国際公開WO2005/18551号、WO2005/18556号、WO2005/20999号、WO2005/032484号、WO2005/048933号、WO2005/048945号、WO2005/051317号、WO2005/051324号、WO2005/066169号、WO2005/066170号、WO2005/066172号、WO2005/076783号、WO2005/

30

40

50

079195号、WO2005/094531号、WO2005/123079号、WO
 2005/123080号、WO2006/009826号、WO2006/00983
 2号、WO2006/026760号、WO2006/028451号、WO2006/
 028545号、WO2006/028962号、WO2006/029115号、WO
 2006/038923号、WO2006/065280号、WO2006/07400
 3号、WO2006/083440号、WO2006/086449号、WO2006/
 091394号、WO2006/086633号、WO2006/086634号、WO
 2006/091567号、WO2006/091568号、WO2006/09164
 7号、WO2006/093514号、およびWO2006/098852号中に開示さ
 れているものが挙げられる。低分子TLR作用剤のさらなる例としては、特定のプリン誘
 導体（米国特許第6,376,501号および6,028,076号中に記載されている
 ものなど）、特定のイミダゾキノリンアミド誘導体（米国特許第6,069,149号中
 に記載されているものなど）、特定のイミダゾピリジン誘導体（米国特許第6,518,
 265号中に記載されているものなど）、特定のベンズイミダゾール誘導体（米国特許第
 6,387,938号中に記載されているものなど）、五員の窒素含有複素環と融合した
 4-アミノピリミジンの特定の誘導体（米国特許第6,376,501号、第6,028,
 076号、および第6,329,381号、ならびにWO02/08905号中に記載
 されているアデニン誘導体など）、特定の3-ベータ-D-リボフラノシルチアゾロ[4
 ,5-d]ピリミジン誘導体（米国公開第2003/0199461号中に記載されてい
 るものなど）、ならびに、たとえば米国特許公開第2005/0136065号中に記載
 されているものなどの特定の低分子免疫賦活化化合物が挙げられる。例示的な大分子TLR
 作用剤としては、オリゴヌクレオチド配列が挙げられる。一部のTLR作用性オリゴヌク
 レオチド配列はシトシン-グアニンジヌクレオチド(CpG)を含有し、たとえば、米国
 特許第6,194,388号、第6,207,646号、第6,239,116号、第6
 ,339,068号、および第6,406,705号中に記載されている。一部のCpG
 含有オリゴヌクレオチドとしては、たとえば米国特許第6,426,334号および第6
 ,476,000号中に記載されているものなどの合成免疫調節構造モチーフを挙げるこ
 とができる。他のTLR作用性ヌクレオチド配列はCpG配列を欠いており、たとえば国
 際公開公報WO00/75304号中に記載されている。さらに他のTLR作用性ヌクレ
 オチド配列としては、たとえばHeilら、Science、第303巻、ページ152
 6~1529、2004年3月5日中に記載されているものなどのグアノシンおよびウリ
 ジンに富んだ一本鎖RNA(ssRNA)が挙げられる。他のTLR作用剤としては、ア
 ミノアルキルグルコサミニドホスフェート(AGP)などの生体分子が挙げられ、たと
 えば、米国特許第6,113,918号、第6,303,347号、第6,525,028
 号、および第6,649,172号中に記載されている。TLR作用剤としては、複数の
 異なる種類のTLR受容体を活性化させ得る、失活させた病原体またはその画分も挙げら
 れる。例示的な病原体由来のTLR作用剤としては、BCG、マイコバクテリウム・オブ
 エンセ(mycobacterium obuense)抽出物、タリモジン ラヘルパ
 レベク(T-Vec)(HSV-1に由来)、およびPexa-Vec(ワクシニアウ
 イルスに由来)が挙げられる。一部の実施形態では、本明細書中で提供する抗CD47抗
 体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体は、SPM-105
 (オートクレーブしたマイコバクテリウムに由来)、OM-174(脂質A誘導体)、O
 mpS1(チフス菌(Salmonella typhi)由来のポリリン)、OmpS1
 (チフス菌(Salmonella typhi)由来のポリリン)、OspA(ボレリア
 ・ブルグドルフェリ(Borrelia burgdorferi)に由来)、MALP
 -2(マイコプラズママクロファージ活性化リポペプチド-2kD)、STF(可溶性結
 核因子)、CU-T12-9、Diprovocim、ならびにPAM2CSK4、PA
 M3CSK4、およびPAM3Cysなどの細胞壁構成成分に由来するリポペプチド類と
 組み合わせて投与し得る。本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なTLR
 2作用剤の例としては、たとえば、SPM-105(オートクレーブしたマイコバクテリ

10

20

30

40

50

ウムに由来)、OM-174(脂質A誘導体)、OmpS1(チフス菌(*Salmonella typhi*)由来のポリン)、OmpS1(チフス菌(*Salmonella typhi*)由来のポリン)、OspA(ボレリア・ブルグドルフェリに由来)、MALP-2(マイコプラズママクロファージ活性化リポペプチド-2kD)、STF(可溶性結核因子)、CU-T12-9、Diprovocim、Amplivant、ならびにPAM2CSK4、PAM3CSK4、およびPAM3Cysなどの細胞壁構成成分に由来するリポペプチド類などの細菌リポタンパク質(たとえばジアシル化リポタンパク質)およびその誘導体が挙げられる。本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なTLR3作用剤の例としては、合成dsRNA、ポリイノシン酸-ポリシチジル酸[「ポリ(I:C)」](たとえばInvivoGenから高分子量(HMW)および低分子量(LMW)の調製物として入手可能)、ポリアデニル酸-ポリウリジル酸[「ポリ(A:U)」](たとえばInvivoGenから入手可能)、ポリICLC(Levyら、*Journal of Infectious Diseases*、第132巻、第4号、ページ434~439、1975を参照)、Ampligen(Jasaniら、*Vaccine*、第27巻、第25~26号、ページ3401~3404、2009を参照)、Hiltonol、リントリモド、およびRGC100(Naumannら、*Clinical and Developmental Immunology*、第2013巻、論文ID283649を参照)などのTLR3リガンドが挙げられる。本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なTLR4作用剤の例としては、たとえば、B:0111(Sigma)、モノホスホリル脂質A(MPLA)、3DMPL(3-O-脱アシル化MPL)、GLA-AQ、G100、AS15、ASO2、GSK1572932A(GlaxoSmithKline、英国)などの細菌リポ多糖(LPS)およびその誘導体が挙げられる。本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なTLR5作用剤の例としては、たとえば、枯草菌(*B. subtilis*)から精製された細菌フラゲリン、緑膿菌(*P. aeruginosa*)から精製されたフラゲリン、ネズミチフス菌(*S. typhimurium*)から精製されたフラゲリン、および組換えフラゲリン(すべてInvivoGenから入手可能)、エントリモド(CBLB502、薬理的に最適化されたフラゲリン誘導体)が挙げられる。本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なTLR6作用剤の例としては、TLR2およびTLR6はヘテロ二量体を形成することができるため、たとえば、上記提供したTLR2作用剤の多くが挙げられる。TLR6はTLR4ともヘテロ二量体を形成することができ、TLR6作用剤としては、上記提供した様々なTLR4作用剤を挙げることができる。本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なTLR7作用剤の例としては、組換え一本鎖(ss)RNA、イミキモド(R837)、ガルジキモド、およびレシキモド(R848)などのイミダゾキノリン化合物、ロキソリピン(7-アリル-7,8-ジヒドロ-8-オキソグアノシン)および関連化合物、7-チア-8-オキソグアノシン、7-デアザグアノシン、および関連グアノシン類似体、ANA975(Anadys Pharmaceuticals)および関連化合物、SM-360320(Sumimoto)、3M-01、3M-03、3M-852、および3M-S-34240(3M Pharmaceuticals)、GSK2245035(GlaxoSmithKline、8-オキソアデニン分子)、AZD8848(Astrazeneca、8-オキソアデニン分子)、MEDI9197(Medimmune、以前は3M-052)、ssRNA40、ならびにUC-1V150(Jinら、*Bioorganic Medicinal Chemistry Letters*(2006)16:4559~4563、化合物4)などのアデノシン類似体が挙げられる。多くのTLR7作用剤はTLR8作用剤でもある。

【0285】

本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なTLR8作用剤の例としては、組換え一本鎖ssRNA、イミキモド(R837)、ガルジキモド、レシキモド(R848)、3M-01、3M-03、3M-852、および3M-S-34240(3M Pharmaceuticals)、GSK2245035(GlaxoSmithKline

ne、8 - オキソアデニン分子)、AZD8848 (Astrazeneca、8 - オキソアデニン分子)、MEDI9197 (Medimmune、以前は3M-052)、ポリ-G10、モトリモド、ならびに上記提供した様々なTLR7作用剤(既に注記したように、多くのTLR7作用剤はTLR8作用剤でもある)が挙げられる。本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なTLR9作用剤の例としては、非メチル化CpG含有DNA、免疫賦活性オリゴデオキシヌクレオチド(ODN)、たとえばCpG含有ODN、たとえば、CpG24555、CpG10103、CpG7909 (PF-3512676 / アガトリモド)、CpG1018、AZD1419、ODN2216、MGN1703、SD-101、1018ISS、およびCMP-001が挙げられる。TLR9作用剤としては、合成シトシン-リン酸-2'-デオキシ-7-デアザグアノシンジヌクレオチド(CpR) (Hybridon, Inc.)、dSLIM-30L1、および免疫グロブリン-DNA複合体を含有するヌクレオチド配列も挙げられる。例示的なTLR9作用剤は、それぞれがすべての目的のために本明細書中に参考として組み込まれている、WO2003/015711号、WO2004/016805号、WO2009/022215号、PCT/US95/01570号、PCT/US97/19791号、ならびに米国特許第8552165号、第6194388号、および第6239116号中に開示されている。

【0286】

本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なRLR作用剤の例としては、たとえば、キャップのない5'三リン酸を有する短い二本鎖RNA (RIG-I作用剤)、ポリI:C (MDA-5作用剤)、およびBO-112 (MDA-A作用剤)が挙げられる。

【0287】

本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なNLR作用剤の例としては、たとえばリボソームムラミルトリペプチド/ミファミルチド (NOD2作用剤)が挙げられる。

【0288】

CLRとしては、たとえば炭水化物および糖タンパク質を検出する様々なPRRが挙げられる。CLRは膜貫通CLRおよび分泌CLRをどちらも含む。CLRの例としては、たとえば、DEC-205 / CD205、マクロファージマンノース受容体 (MMR)、デクチン-1、デクチン-2、ミンクル (mincle)、DC-SIGN、DNGR-1、およびマンノース-結合レクチン (MBL)が挙げられる。

【0289】

本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なCLR作用剤の例としては、たとえば、MD画分 (マイタケ (Grifolia frondosa) 由来の精製した可溶性ベータ-グルカン抽出物) およびインプライムPGG (酵母由来のベータ1,3/1,6-グルカンPAMP)が挙げられる。

【0290】

本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用なSTING作用剤の例としては、合成二本鎖DNA、環状ジ-GMP、環状-GMP-AMP (cGAMP)、MK-1454およびADU-S100 (MIW815)などの合成環状ジヌクレオチド(CDN)、ならびにP0-424などの低分子などの様々な免疫賦活性核酸が挙げられる。

【0291】

本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用な免疫賦活性サイトカインの例としては、GM-CSF、G-CSF、IFN-アルファ、IFN-ガンマ、IL-2 (たとえばデニロイキンジフィテイトクス)、IL-6、IL-7、IL-11、IL-12、IL-15、IL-18、IL-21、およびTNF-アルファが挙げられる。

【0292】

本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用な癌ワクチンの例としては、たとえばシプリューセル-Tおよびタリモジン ラヘルパレブベク (T-VEC)が挙げられ

る。

【0293】

本発明の処置方法、医薬品、および使用において有用な免疫細胞治療の例としては、たとえば腫瘍浸潤性リンパ球（TIL）およびキメラ抗原受容体T細胞（CAR-T細胞）が挙げられる。

【0294】

化学療法剤の例としては、チオテパおよびシクロホスファミドなどのアルキル化剤、ブスルファン、インブrosルファン、およびピボスルファンなどのスルホン酸アルキル、ベンゾドーパ、カルボコン、メツレドーパ、およびウレドーパなどのアジリジン、アルトレタミン、トリエチレンメラミン、トリエチレンホスホルアミド、トリエチレンチオホスホルアミド、およびトリメチロールメラミンを含むエチレンイミンおよびメチラメラミン（methy lamel amine）、アセトゲニン（特にプラタシンおよびプラタシノン）、カンプトテシン（合成類似体トポテカンを含む）、プリオスタチン、カリスタチン、CC-1065（そのアドゼレシン、カルゼレシン、およびビゼレシン合成類似体を含む）、クリプトフィシン（特にクリプトフィシン1およびクリプトフィシン8）、ドラスタチン、デュオカルマイシン（合成類似体KW-2189およびCBI-TMIを含む）、エリユテロピン、パンクラチスタチン、サルコジクチン、スポンジスタチン、クロラムブシル、クオルナファジン、コロホスファミド、エストラムスチン、イホスファミド、メクロレタミン、メクロレタミンオキシド塩酸塩、メルファラン、ノベムピシン、フェネステリン、ブレドニムスチン、トロホスファミド、ウラシルマスタードなどのナイトロジェンマスタード、カルムスチン、クロロゾトシン、フォテムスチン、ロムスチン、ニムスチン、ラニムスチンなどのニトロソウレア、エネジイン抗生物質（たとえばカリチアマイシン、特にカリチアマイシンガンマ1IおよびカリチアマイシンファイI1、たとえばAgnew, Chem. Intl. Ed. Engl., 33: 183~186 (1994)を参照、ダイネミシンAを含むダイネミシン、クロドロネートなどのビスホスホネート、エスペラミシン、ならびにネオカルジノスタチン発色団および関連色素タンパク質エネジイン抗生物質発色団）、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、オースラマイシン、アザセリン、プレオマイシン、カクチノマイシン、カラピシン、カミノマイシン、カルジノフィリン、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、デトルピシン、6-ジアゾ-5-オキソ-L-ノルロイシン、ドキシソルピシン（モルホリノ-ドキシソルピシン、シアノモルホリノ-ドキシソルピシン、2-ピロリノ-ドキシソルピシン、およびデオキシドキシソルピシンを含む）、peg化リポソームドキシソルピシン、エピルピシン、エソルピシン、イダルピシン、マルセロマイシン、マイトマイシンCなどのマイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリボマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン、ピューロマイシン、クエラマイシン、ロドルピシン、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメックス、ジノスタチン、ゾルピシンなどの抗生物質、メトトレキサートおよび5-フルオロウラシル（5-FU）などの代謝拮抗剤、デノプテリン、メトトレキサート、プテロプテリン、トリメトトレキサートなどの葉酸類似体、フルダラビン、6-メルカプトプリン、チアミプリン、チオグアニンなどのプリン類似体、アンシタピン、アザシチジン、6-アザウリジン、カルモフル、シタラビン、ジデオキシウリジン、ドキシフルリジン、エノシタピン、フロキシウリジンなどのピリミジン類似体、カルステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、エピチオスタノール、メピチオスタノール、テストラクトンなどのアンドロゲン、アミノグルテチミド、ミトタン、トリロスタンなどの抗副腎剤、フォリン酸などの葉酸補充液、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド、アミノレプリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル、ピサントレン、エダトラキセート、デフォファミン、デメコルシン、ジアジコン、エルフォミチン、酢酸エリプチニウム、エポチロン、エトグルシド、硝酸ガリウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン、メイタンシンおよびアンサミトシンなどのメイタンシノイド、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダモール、ニトラクリン、ペントスタチン、フェナメット、ピラルピシン、ロソキサントロン、ポドフィリン酸、2-エチルヒドラジド、プロカルバジン

10

20

30

40

50

、ラゾキサソ、リゾキサソ、シゾフィラン、スピロゲルマニウム、テヌアゾン酸、トリアジコン、2、2'、2''-トリクロロトリエチルアミン、トリコテセン（特にT-2毒素、ベラキュリンA、ロリジンA、およびアングイジン）、ウレタン、ビンデシン、ダカルバジン、マンノムスチン、ミトブロニトール、ミトラクトール、ピポプロマン、ガシトシン、アラビノシド（「Ara-C」）、シクロホスファミド、チオテパ、タキソイド、たとえばバクリタキセルおよびドキセタキセル、クロラムブシル、ゲムシタピン、6-チオグアニン、メルカプトプリン、メトトレキサート、シスプラチンおよびカルボプラチンなどの白金類似体、ビンブラスチン、白金、エトポシド（VP-16）、イホスファミド、ミトキサントロン、ピンクリスチン、ピノレルピン、ノバントロン、テニポシド、エダトレキサート、ダウノマイシン、アミノプテリン、ゼローダ、イバンドロネート、CPT-11、トポイソメラーゼ阻害剤RFS 2000、ジフルオロメチルオルニチン（DMFO）、レチノイン酸などのレチノイド、カペシタピン、ならびに上記のうちの任意のものの薬学的に許容できる塩、酸、または誘導体が挙げられる。また、たとえば、タモキシフェン、ラロキシフェン、ドロロキシフェン、4-ヒドロキシタモキシフェン、トリオキシフェン、ケオキシフェン、LY117018、オナプリストン、およびトレミフェン（Fareston）を含む、抗エストロゲンおよび選択的エストロゲン受容体モジュレーター（SERM）などの腫瘍に対するホルモン作用を調節または阻害するように作用する抗ホルモン剤、たとえば、4（5）-イミダゾール、アミノグルテチミド、酢酸メゲストロール、エキセメスタン、フォルメスタン、ファドロゾール、ポロゾール、レトロゾール、およびアナストロゾールなどの、副腎中のエストロゲン産生を調節する酵素アロマターゼを阻害するアロマターゼ阻害剤、フルタミド、ニルタミド、ピカルタミド、ロイプロリド、およびゴセレリンなどの抗アンドロゲン、KRAS阻害剤、MCT4阻害剤、MAT2a阻害剤、スニチニブ、アキシチニブなどのチロシンキナーゼ阻害剤、クリゾチニブ、ロルラチニブなどのalk/c-Met/ROS阻害剤、テムシロリムス、ゲダトリシブなどのmTOR阻害剤、ボスチニブなどのsrc/abl阻害剤、パルボシクリブ、PF-06873600などのサイクリン依存性キナーゼ（CDK）阻害剤、ダコミチニブなどのerb阻害剤、タラゾパリブなどのPARP阻害剤、グラスデギブ、PF-5274857などのSMO阻害剤、PF-06747775などのEGFR T790M阻害剤、PF-06821497などのEZH2阻害剤、PF-06939999などのPRMT5阻害剤、PF-06952229などのTGFR r1阻害剤、ならびに上記のうちの任意のものの薬学的に許容できる塩、酸、または誘導体も挙げられる。具体的な実施形態では、そのような追加の治療剤は、ベパシズマブ、セツキシマブ、シロリムス、パニツマブ、5-フルオロウラシル（5-FU）、カペシタピン、チボザニブ、イリノテカン、オキサリプラチン、シスプラチン、トリフルリジン、チピラシル、ロイコポリン、ゲムシタピン、レゴラフェニブ、または塩酸エルロチニブである。

10

20

30

【0295】

一部の実施形態では、抗CD47、抗PD-L1、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体療法は、他の薬剤の処置と同時投与し得る、または数分間から数週間までの範囲の間隔によって他の薬剤の処置の前もしくは後に順次投与し得る。他の薬剤および/またはタンパク質もしくはポリヌクレオチドを別々に投与する実施形態では、薬剤および本発明の組成物が、対象に対して有利に組み合わせられた効果を依然として発揮することができるように、それぞれの送達間で長い期間が経過しないことを一般的に確実にするであろう。そのような事例では、両方のモダリティを互いに約12~24時間以内、より好ましくは互いに約6~12時間以内に投与し得ることが企図される。しかし、一部の状況では、それぞれの投与の間に数日間（2、3、4、5、6、または7）から数週間（1、2、3、4、5、6、7、または8）が経過する、投与の期間の顕著な延長が望ましい場合がある。

40

【0296】

一部の実施形態では、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体療法組成物を、手術、放射線療法、化学療法、標的化治療、免疫療法、

50

ホルモン療法、血管形成阻害、および緩和ケアからなる群から選択される従来の治療をさらに含む治療レジメンと組み合わせる。

【0297】

キット

本発明のさらなる態様は、本明細書中で上記開示した抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体と、本明細書中に記載の本発明の方法のうちの任意のものに従った使用説明書とを含むキットである。一般的に、これらの指示は、上述した治療処置のための、抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体の投与の説明を含む。本キットは、本明細書中に開示した任意の医薬組成物を含む。医薬組成物および他の試薬は、たとえば液剤または粉末の形態などの任意の好都合な形態でキット中に存在し得る。

10

【0298】

別の態様では、キットは、癌の処置に有用な1つまたは複数の他の予防剤または治療剤を、1つまたは複数の容器中にさらに含む。一実施形態では、他の予防剤または治療剤は化学療法剤である。他の態様では、予防剤または治療剤は生物学的またはホルモン治療剤である。

【0299】

本発明の医薬組成物、予防剤、または治療剤の一部の態様は、好ましくは、ヒトにおける使用の前に、*in vitro*、細胞培養系中、およびげっ歯動物の動物モデル系などの動物モデル生物中で、所望の治療活性のために試験する。

20

【0300】

本発明の予防的および/または治療的プロトコルの毒性および有効性は、たとえばLD₅₀（集団の50%に致死的な用量）およびED₅₀（集団の50%に治療上有効な用量）を決定するための、細胞培養物または実験動物における標準の医薬的手順によって決定し得る。毒性効果と治療効果との間の用量比が治療指数であり、比LD₅₀/ED₅₀として表し得る。高い治療指数を示す予防剤および/または治療剤が好ましい。

【0301】

さらに、当業者に知られている任意のアッセイを使用して、癌を処置または防止するための本明細書中に開示した治療またはコンビナトリアル治療の予防的および/または治療的有用性を評価し得る。

30

【0302】

本明細書中に記載の抗CD47抗体、抗PD-L1抗体、またはCD47/PD-L1二重特異性抗体の使用に関する指示は、一般的に、意図する処置の投与量、投薬スケジュール、および投与経路に関する情報を含む。容器は、単位用量、バルクパッケージ（たとえば複数用量パッケージ）または部分単位用量であり得る。本発明のキット中に供給する指示は、典型的には標識または添付文書（たとえばキットに含まれる紙シート）上の書面の指示であるが、機械で読取り可能な指示（たとえば磁気または光学的記憶ディスク上に保持される指示）も許容される。

【0303】

本発明のキットは適切なパッケージング中に存在する。適切なパッケージングとしては、それぞれの医薬組成物および医薬組成物を対象に投与することにおいて使用するのための他の含まれる試薬、たとえば緩衝剤、平衡塩類溶液などについて、それだけには限定されないが、バイアル、アンプル、チューブ、ボトル、瓶、ソフトパッケージング（たとえば密封したマイラーまたはプラスチックバッグ）などが挙げられる。また、吸入器、経鼻投与装置（たとえば噴霧器）、またはミニポンプなどの輸液装置などの特定の装置と組み合わせるためのパッケージングも企図される。キットは無菌的なアクセスポートを有し得る（たとえば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内液剤バッグまたはバイアルであり得る）。容器も無菌的なアクセスポートを有し得る（たとえば、容器は、皮下注射針によって貫通可能なストッパーを有する静脈内液剤バッグまたはバイアルであり得る）。組成物中の少なくとも1つの活性薬剤は抗CD47抗体、抗PD

40

50

- L 1 抗体、または C D 4 7 / P D - L 1 二重特異性抗体である。容器は、第 2 の医薬的に活性のある薬剤をさらに含み得る。

【 0 3 0 4 】

通常、キットは、容器と容器上またはそれに関連付けられた標識または添付文書とを含む。

【 0 3 0 5 】

米国仮特許出願第 6 2 / 9 4 9 , 1 2 0 号 (2 0 1 9 年 1 2 月 1 7 日に出願) および第 6 3 / 1 1 0 , 6 9 3 号 (2 0 2 0 年 1 1 月 6 日に出願) の内容が、すべての目的のために本明細書中に参考として組み込まれている。

【 0 3 0 6 】

生物学的受託

本発明の代表的な材料は、アメリカ培養細胞系統保存機関、米国バージニア州 M a n a s s a s , U n i v e r s i t y B o u l e v a r d 1 0 8 0 1 , 2 0 1 1 0 - 2 2 0 9 に、2 0 2 0 年 1 2 月 8 日に受託した。A T C C 受託番号 P T A - 1 2 6 9 1 0 を有するベクター「C D 4 7 _ P 0 1 A 1 1 _ 7 5 重鎖」は、「C D 4 7 _ P 0 1 A 1 1 _ 7 5 重鎖」と命名した抗 C D 4 7 重鎖をコードしている D N A 挿入物を含み、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 6 9 1 1 を有するベクター「P D L 1 _ P 0 6 B 0 5 _ 2 4 5 重鎖」は、「P D L 1 _ P 0 6 B 0 5 _ 2 4 5 重鎖」と命名した抗 P D - L 1 重鎖をコードしている D N A 挿入物を含み、A T C C 受託番号 P T A - 1 2 6 9 1 2 を有するベクター「共通軽鎖 1 完全軽鎖」は、「共通軽鎖 1 完全軽鎖」と命名した抗 C D 4 7 および抗 P D - L 1 共通軽鎖をコードしている D N A 挿入物を含む。

【 0 3 0 7 】

受託は、特許手続きのための微生物寄託の国際認識に関するブダペスト条約およびそれに従う規制 (ブダペスト条約) の規定の下で行った。これは、受託日から 3 0 年間の間、受託物の生存可能な培養物の維持を保証する。受託物はブダペスト条約の条件下で A T C C によって入手可能となり、P f i z e r I n c . および A T C C との間の合意に従い、これは、関連する米国特許の発行の際または任意の米国もしくは外国特許出願の公共への公開の際のいずれか早い方に、受託物の培養物の子孫の、公共への永久的かつ無制限の利用可能性を保証し、また、米国特許法第 1 2 2 条およびそれに関連する長官の規則 (米国特許法施行規則 1 . 1 4 を含み、8 8 6 O G 6 3 8 に具体的に言及) に従って、米

【 0 3 0 8 】

本出願の譲受人は、受託されている材料の培養物が適切な条件下で培養された際に死滅または喪失または破壊された場合は、通知された際に材料を別の同じものと即座に交換することに同意している。受託された材料の利用可能性は、任意の政府の権限下で、その特許法に従って与えられた権利に違反して本発明を実施する許可として解釈されるべきでない。

【 0 3 0 9 】

本発明を実施するための具体的な態様の以下の実施例は、例示目的のみで提供し、いかなる様式でも本発明の範囲を限定することを意図しない。

【 実施例 】

【 0 3 1 0 】

(実施例 1)

例示的な抗 C D 4 7 抗体

抗 C D 4 7 共通軽鎖 (C L C) 抗体 P 1 4 D 0 4 , P 0 1 A 1 1 , P 0 1 A 0 8 , およびその変異体に関する情報を以下に提供する。P 1 4 D 0 4 は配列番号 6 に示す軽鎖アミノ酸配列を有する。P 0 1 A 1 1 および P 0 1 A 0 8 は配列番号 2 に示す軽鎖アミノ酸配列を有する。

【 0 3 1 1 】

10

20

30

40

50

【表 9】

表 9:例示的な抗 CD47 CLC 抗体の配列特性の要約

| 抗体 | 生殖 系列 VH | 生殖 系列 VL | 配列 | | | |
|--------|----------------|----------------|--------------------------------|---|---|------------------|
| | | | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | VH CDR3 長さ |
| P14D04 | IGHV3-23 | IGKV1 -39 | GFSFSTF TMN (配列番号 33) | TISGTGG NTYYADS VKG (配列番号 35) | RRSTVGS NGHSYWF DY (配列番号 36) | 16 |
| P01A11 | IGHV1-69 | IGLV1 -47 | GYTFTN YAIS (配列番号 27) | GISPLFGT ANYAQKF QG (配列番号 29) | DGGRSSD VGWYVGA MDV (配列番号 30) | 17 |
| P01A08 | IGHV1-69 | IGLV1 -47 | GYTFSN YAIT (配列番号 39) | GISPIFGT ANYAQKF QG (配列番号 17) | DGGRSSD GGWRGAG MDY (配列番号 40) | 17 |

10

20

【 0 3 1 2 】

【表 1 0】

表 10 例示的な抗 CD47 CLC 抗体の結合特性の要約

| 抗体 | K_D (ヒト)、 nM | $T_{1/2}$ (ヒト)、分 | K_D (カニクイ ザル)、 nM | $T_{1/2}$ (カニクイ ザル)、 分 | マウスとの 交叉反応 | SIRP α 遮断 |
|--------|----------------------|---------------------|------------------------------|---------------------------------|-----------------------|---------------------|
| P14D04 | 6.39 | 3.6 | 9.7 | 2.52 | なし | あり |
| P01A11 | 0.817 | 24.1 | 1.02 | 21.15 | あり (> 6.8 μ M) | あり |
| P01A08 | 1.72 | 21.31 | 2.08 | 20.16 | なし | あり |

30

40

【 0 3 1 3 】

以下の表 1 1 A は、2つの追加の抗 CD47 CLC 抗体の特性を要約する。

【 0 3 1 4 】

50

【表 1 1】

表 11A:例示的な抗 CD47 CLC 抗体の特性の要約

| 試料 | CDR H1 | CDR H2 | CDR H3 | T _{1/2} ヒト、分 | K _D ヒト、nM | T _{1/2} カニクイザル、分 | K _D カニクイザル、nM |
|------------|-----------------------------|--|------------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|
| P01A11_497 | GGTFT SYAIS (配列番号 23) | GISPIFG TANYAQ KFQG (配列番号 17) | DAGRSSDVG WYVGALDV (配列番号 24) | NA | 497.0 | NA | 704.0 |
| P01A11_75 | GYTFS SYAIS (配列番号 15) | GISPIFG TANYAQ KFQG (配列番号 17) | DAGRSSDVG WYVGAIDV (配列番号 18) | 0.49 | 75.0 | 0.48 | 104.8 |

10

20

【0 3 1 5】

表 1 1 B は、親 P 0 1 A 1 1 抗体の変異体、ならびに変異体とヒト CD 4 7 (「h CD 4 7」) およびカニクイザル CD 4 7 (「cy CD 4 7」) タンパク質との結合の K_D データを提供する。表 1 1 B 中のアミノ酸の付番は、CD 4 7 _ P 0 1 A 1 1 _ 親 V H アミノ酸配列 (配列番号 7) を参照したものである。たとえば、「Y 2 7 G」とは配列番号 7 の位置 2 7 の「Y」残基を指し、Y 残基が「G」残基へと突然変異していることを示す。表 1 1 B に示すように、位置 2 7、3 0、3 1、5 3、5 4、5 5、1 0 0、1 0 5、1 0 8 に突然変異を有する P 0 1 A 1 1 の様々な変異体は、5 0 nM 未満の K_D で h CD 4 7 と結合し、複数位置での突然変異を組み合わせたこともできる。位置 2 7、3 0、および 3 1 は C D R 1 中にあり、位置 5 0、5 2、5 3、5 4、および 5 5 は C D R 2 中にあり、位置 9 9、1 0 0、1 0 5、1 0 8、1 1 3、および 1 1 4 は C D R 3 中にある。

30

【0 3 1 6】

40

50

【表 1 2】

表 11B:P01A11 の突然変異タンパク質

| 抗 CD47 抗体変異体 | hCD47 K _D (nM) | cyCD47 K _D (nM) |
|---|------------------------------|-------------------------------|
| P01A11_wt | 1.3 | 1.3 |
| P1A11_Y27G | 20 | 23 |
| P1A11_T30S | 1.8 | 2.5 |
| P1A11_N31S | 7.0 | 9.3 |
| P1A11_G50R | > 1500 | > 1500 |
| P1A11_S52I | 1311 | > 1500 |
| P01A11_P53G | 5.6 | 7.6 |
| P1A11_L54I | 0.69 | 1.3 |
| P1A11_F55L | 2.7 | 3.3 |
| P1A11_D99E | 1196 | > 1500 |
| P1A11_G100A | 8.5 | 11 |
| P1A11_G100S | 28 | 36 |
| P1A11_G100Q | > 1500 | > 1500 |
| P01A11_G100V | > 1500 | > 1500 |
| P01A11_D105E | 48 | 62 |
| P1A11_W108Y | 25 | 32 |
| P1A11_W108F | 103 | 117 |
| P01A11_W108A | 608 | 773 |
| P1A11_M113L | 0.86 | 1.2 |
| P1A11_M113I | 2.9 | 3.7 |
| 変異体の組合せを有する抗 CD47 抗体変異体 | | |
| P01A11_P53G_D105E | 241.0 | 351.0 |
| P01A11_P53G_D114E | 300 | 520 |
| P01A11_L54A_D114E | 31 | 46 |
| P01A11_L54A_R102A | 38 | 45 |
| P01A11_L54A_S104E | 19 | 16 |
| P01A11_Y27G_L54I_G100A | 132 | 180 |
| P01A11_Y27G_L54I_G100A_M113L | 154 | 198 |
| P01A11_Y27G_L54I_G100A_M113I | 263 | 371 |
| P01A11_Y27G_N31S_L54I_G100A_M113L | 497 | 704 |
| P01A11_T30S_N31S_L54I_G100A | 97 | 138 |
| P01A11_T30S_N31S_L54I_G100A_M113L | 106 | 120 |
| P01A11_T30S_N31S_L54I_G100A_M113I | 75 | 105 |
| P01A11_T30S_N31S_L54I_G100A_W108Y_M113L | >1500 | >1500 |

10

20

30

【0317】

(実施例 2)

例示的な抗 PD-L1 抗体

抗 PD-L1 共通軽鎖 (CLC) 抗体 P04D09、P06B05、および P06A09、ならびにその変異体に関する情報を以下に提供する。P04D09 は配列番号 6 に示す軽鎖アミノ酸配列を有する。P06B05 および P06A09 は配列番号 2 に示す軽鎖アミノ酸配列を有する。

40

【0318】

50

【表 1 3】

表 13:例示的な抗 PD-L1 CLC 抗体の配列特性の要約

| 抗体 | 生殖 系列 VH | 生殖 系列 VL | 配列 | | | |
|--------|----------------|----------------|--------------------------------|---|--|------------------|
| | | | VH CDR1 | VH CDR2 | VH CDR3 | VH CDR3 長さ |
| P04D09 | IGHV3 -23 | IGKV1 -39 | GFTFSS YAMS (配列番号 49) | AIGVRGG ITYYADS VKG (配列番号 51) | ERSVGE LVGIDW MDH (配列番号 56) | 15 |
| P06B05 | IGHV3 -15 | IGLV1- 47 | GFTFSN AWMN (配列番号 43) | RIKTKAD GGTTDYA APVKG (配列番号 45) | DPGSY WDSVY GGMDY (配列番号 57) | 15 |
| P06A09 | IGHV3 -15 | IGLV1- 47 | GFTFSN AWMN (配列番号 43) | RIKSESD GGTTDYA APVKG (配列番号 59) | DYRIDD WGYPY PGMDY (配列番号 60) | 16 |

10

20

【0 3 1 9】

30

【表 1 4】

表 14:例示的な抗 PD-L1 CLC 抗体の結合特性の要約

| 抗体 | K_D (ヒト)、 nM | $T_{1/2}$ (ヒト)、分 | K_D (カニクイ ザル)、 nM | $T_{1/2}$ (カニクイ ザル)、分 | マウスとの 交叉? | PD-1 遮断? |
|--------|----------------------|---------------------|------------------------------|-----------------------------|--------------|-------------|
| P04D09 | 0.56 | 43.6 | 1.15 | 20.1 | Y (20.4 nM) | あり |
| P06B05 | 4.42 | 28.2 | 8.07 | 10.2 | Y (207 nM) | あり |
| P06A09 | 2.97 | 5.13 | 5.75 | 2.79 | Y (113 nM) | あり |

40

【0 3 2 0】

2つの追加の抗PD-L1抗体、P04D09__113およびP06B05__245の特性を以下の表15A中に要約する。

【0 3 2 1】

50

【表 15】

表 15A:例示的な抗 PD-L1 CLC 抗体の特性の要約

| 試料 | CDR H1 | CDR H2 | CDR H3 | T _{1/2} ヒト、分 | K _D ヒト、nM | T _{1/2} カニクイザル、分 | K _D カニクイザル、nM |
|------------|---------------------------------|--|--------------------------------------|-----------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|
| P04D09_113 | GFTFS SYAMS (配列番号 49) | AIGVRG GITYYA DSVKG (配列番号 51) | ERSVGE LVGI DWMDH (配列番号 56) | 22.2 | 1.7 | 23.4 | 1.7 |
| P06B05_245 | GFTFS NAWM N (配列番号 43) | RIKTKA DGGTTD YAAPVK G (配列番号 45) | DPGEY WDSV YGGMDY (配列番号 46) | 23.4 | 1.6 | 23.7 | 1.6 |

10

20

【0322】

表 15 B は、親 P 0 6 B 0 5 クローンのさらなる変異体、突然変異体タンパク質とヒト PD - L 1 (「h PD - L 1」)、カニクイザル PD - L 1 (「cy PD - L 1」)、およびマウス PD - L 1 (「m PD - L 1」) タンパク質との結合の K_D データを提供する。表 15 B 中のアミノ酸の付番は P D L 1 _ P 0 6 B 0 5 _ 親 V H アミノ酸配列 (配列番号 11) を参照したものである。たとえば、「S 1 0 4 A」とは、配列番号 11 の位置 1 0 4 の「S」残基を指し、「S」残基が「A」残基へと突然変異していることを示す。表 15 B に示すように、位置 1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 7、1 1 2、1 1 3、6 1、および 6 2 に突然変異を有する P 0 6 B 0 5 の様々な変異体は、5 0 nM 未満の K_D で h P D - L 1 と結合し、複数位置での突然変異を組み合わせることもできる。位置 5 6、5 7、6 1、および 6 2 は C D R 2 中にあり、位置 1 0 3、1 0 4、1 0 5、1 0 7、1 0 9、1 1 2、および 1 1 3 は C D R 3 中にある。

30

【0323】

40

50

【表 1 6】

| 抗 PD-L1 抗体 変異体 | hPD-L1 K _D (nM) | cyPD-L1 K _D (nM) | mPD-L1 K _D (nM) |
|-------------------|-------------------------------|--------------------------------|-------------------------------|
| P06B05_親 | 2.36 | 3.11 | ND |
| P06B05_G103I | 8.06 | 8.11 | ND |
| P06B05_S104A | 3.50 | 3.93 | ND |
| P06B05_S104H | 7.90 | 6.11 | ND |
| P06B05_S104Y | 9.75 | 5.79 | ND |
| P06B05_S104E | 0.80 | 0.45 | 23.1 |
| P06B05_S104I | <0.74 | 0.99 | ND |
| P06B05_Y105H | 12.8 | 6.58 | ND |
| P06B05_D107S | 23.9 | 26.3 | ND |
| P06B05_D107L | 90.2 | 83.0 | ND |
| P06B05_D107Y | 3.03 | 3.23 | ND |
| P06B05_V109S | 76.5 | >100 | ND |
| P06B05_G112A | 3.71 | 3.72 | 131 |
| P06B05_G112S | 1.69 | 1.74 | 77.7 |
| P06B05_M113L | 6.82 | 6.55 | ND |
| P06B05_D56E_G57E | 69.7 | 60.6 | ND |
| P06B05_D56E_G57A | 95.5 | 92.2 | >1500 |
| P06B05_D61Q_Y62E | 5.81 | 4.43 | ND |
| P06B05_D61Q_Y62S | 5.02 | 5.54 | ND |
| P06B05_D61E_Y62E | 9.49 | 8.39 | ND |
| P06B05_D61A_Y62Q | 5.97 | 4.96 | ND |
| P06B05_D61A_Y62E | 3.28 | 3.17 | ND |
| P06B05_D61A_Y62A | 4.01 | 3.67 | ND |
| P06B05_D61A_Y62S | 5.37 | 2.75 | ND |
| P06B05_D61S_Y62Q | 5.98 | 3.73 | ND |
| P06B05_D61S_Y62A | 6.71 | <1.19 | ND |
| P06B05_D61S_Y62S | 6.10 | 2.15 | ND |

10

20

30

【0324】

(実施例3)

例示的なCD47/PD-L1二重特異性抗体の調製

様々なCD47/PD-L1二重特異性抗体を、上述の特定の抗CD47および抗PD-L1抗体を二重特異性形式へと組み合わせることによって調製した。

【0325】

CD47/PD-L1二重特異性抗体1(本明細書中で「BsAb1」とも呼ぶ)を、抗CD47抗体P01A11_75(VHアミノ酸配列は配列番号1に示す)を抗PD-L1抗体P06B05_245(VHアミノ酸配列は配列番号4に示す)と二重特異性抗体形式で組み合わせることによって調製した。これら2つの抗体は、どちらも同じ軽鎖VLアミノ酸配列(配列番号2に示す)を有しており、したがって、抗CD47/抗PD-L1 BsAb1は、抗CD47可変領域および抗PD-L1可変領域の両方について同じ軽鎖アミノ酸配列を有する(すなわち共通軽鎖)。BsAb1は、ノブ-イン-ホール突然変異を有するヒトIgG1Fcドメインを有する。IgG1は、(先天性および適応チェックポイント遮断に加えて)抗腫瘍有効性を駆動する抗体の作用機構の一部としてADCPおよびADCCを含むロバストなエフェクター機能のために選択された。抗CD47重鎖のアミノ酸配列、抗PD-L1重鎖、およびBsAb1の共通軽鎖を以下の表16に示す。「ノブ」または「ホール」構造のどちらかを生じるための、それぞれの鎖中のFc鎖中の突然変異に下線が引いてある。

40

【0326】

50

ノブ抗PD-L1重鎖(「GGGGSHHHHHH」)(配列番号76)のC末端への「GGGS」(配列番号75)リンカー、次いで6×ヒスチジntagの付加以外はBsAb1と同一であるCD47/PD-L1二重特異性抗体も調製した。この抗体は、BsAb1のtag付けされていないバージョンと本質的に同じ、CD47およびPD-L1に対する結合親和性ならびに他の特性を有しており、本明細書中で提供するBsAb1に関する実験のほとんどにおいて使用した。

【0327】

【表17】

表 16:BsAb1 のアミノ酸配列

| ポリペプチド | アミノ酸配列 |
|---------------------------------|---|
| 抗CD47重鎖 (Fc鎖中に「ホール」突然変異を有する) | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGYTFSSYAISWVRQAPGQGL EWMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDAGRSSDVGWYVGAIWVWGQGLVTVSSASTKGPSVFP APSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEM TKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 61) |
| 抗PD-L1重鎖 (Fc鎖中に「ノブ」突然変異を有する) | EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWRQAPGK LEWVGRIKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCTTDPGEYWDSVYGGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSV PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEPKS CDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREE MTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 64) |
| 共通軽鎖 | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPK LLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYCAAW DDSLSGVVFGGGKTLTVLGGPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号 62) |

10

20

30

40

【0328】

CD47/PD-L1二重特異性抗体2(本明細書中で「BsAb2」とも呼ぶ)を、抗CD47抗体P01A11_497(VHアミノ酸配列は配列番号3に示す)を抗PD-L1抗体P06B05_245(VHアミノ酸配列は配列番号4に示す)と組み合わせることによって調製した。これら2つの抗体は、どちらも同じ軽鎖VLアミノ酸配列(配列番号2に示す)を有しており、したがって、BsAb2は、抗CD47可変領域および抗PD-L1可変領域の両方について同じ軽鎖アミノ酸配列を有する(すなわち共通軽鎖)。BsAb2は、ノブ-イン-ホール突然変異を有するヒトIgG1Fcドメインを

50

有する。抗CD47重鎖のアミノ酸配列、抗PD-L1重鎖、およびBsAb2の共通軽鎖を以下の表17に示す。「ノブ」または「ホール」構造のどちらかを生じるためのFc鎖中の突然変異に下線が引いてある。

【0329】

ノブ抗PD-L1重鎖(「GGGGSHHHHHH」)(配列番号76)のC末端への「GGGGS」(配列番号75)リンカー、次いで6×ヒスチジンタグの付加以外はBsAb2と同一であるCD47/PD-L1二重特異性抗体も調製した。この抗体は、BsAb2のタグ付けされていないバージョンと本質的に同じ、CD47およびPD-L1に対する結合親和性ならびに他の特性を有しており、本明細書中で提供するBsAb2に関する実験のほとんどにおいて使用した。

【0330】

【表18】

表 17:BsAb2 のアミノ酸配列

| ポリペプチド | アミノ酸配列 |
|---|--|
| 抗CD47重鎖 (Fc鎖中に 「ホール」 突然変異を 有する) | QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCSKASGGTFTSYAISWVRQAPGQGL EWMGGISPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTA VYYCARDAGRSSDVGWYVGALDVGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISR TPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 63) |
| 抗PD-L1重鎖 (Fc鎖中に 「ノブ」 突然変異を 有する) | EVQLVESGGGLVKGPGSLRLSCAASGFTFSNAWMNWVRQAPGKG LEWVGRIKTKADGGTTDYAAPVKGRFTISRDDSKNTLYLQMNSLKTE DTAVYYCTTDPGEYWDSVYGGMDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFP LAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSC DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMT KNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (配列番号 64) |
| 共通軽鎖 | QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCSGSSSNIGSNYVYWYQQLPGTAPK LLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYYCAAW DDSLSGVVFVGGGKTLTVLGGPKAAPSIVLTPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTP EQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (配列番号 62) |

【0331】

CD47/PD-L1二重特異性抗体BsAb1およびBsAb2は、CHO細胞に、3つの別々のポリペプチド、すなわち、それぞれの抗CD47重鎖、抗PD-L1重鎖、および共通軽鎖をコードしている核酸配列を含有するポリヌクレオチドをトランスフェクトすることによって、それぞれ調製した。それぞれのCD47/PD-L1二重特異性抗体がこれらの細胞中で発現され、カラムクロマトグラフィーを介して精製した。したがっ

10

20

30

40

50

て、注目すべきことに、本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性抗体は標準のIgG mAbと同様の様式で産生および精製することができるため、CD47/PD-L1二重特異性抗体は、二重特異性抗体の多くの他の種類および形式よりも産生は顕著に容易である。標準のIgG mAbと比較した本明細書中で提供する二重特異性抗体での主な相違は、標準のIgG mAbでは、宿主細胞に、2本のポリペプチド鎖[すなわちi)mAb重鎖およびii)mAb軽鎖]をコードしているポリヌクレオチドをトランスフェクトするが、本明細書中で提供するCD47/PD-L1二重特異性mAbでは、宿主細胞に、3本のポリペプチド鎖[すなわち、i)抗CD47重鎖、ii)抗PD-L1重鎖、およびiii)共通軽鎖]をコードしているポリヌクレオチドをトランスフェクトすることである。

10

【0332】

マウス代用CD47/PD-L1二重特異性抗体は、マウスCD47およびマウスPD-L1タンパク質との結合について選択された抗体を使用して調製し、本明細書中で「BsAb3」と呼ぶ。

【0333】

(実施例4)

CD47およびPD-L1タンパク質に対するCD47/PD-L1二重特異性抗体の結合親和性

CD47/PD-L1 BsAb1、BsAb2、およびBsAb3(上記実施例3中に記載)を、ヒト、カニクイザル、およびマウスのCD47およびPD-L1タンパク質に対する結合親和性について評価した。親和性を以下の表18中に要約する。

20

【0334】

【表19】

表18:BsAb1、BsAb2、およびBsAb3の様々なタンパク質に対する結合親和性

| 抗CD47/ 抗PD-L1 二重 特異性 mAb: | ヒト CD47 K _D (nM) | カニ クイ ザル CD47 K _D (nM) | マウ ス CD47 K _D (nM) | ヒト PD- L1 K _D (nM) | カニ クイ ザル PD- L1 K _D (nM) | マウス PD-L1 K _D (nM) |
|---------------------------------------|--------------------------------------|--|---|---|---|--|
| BsAb1 | 75, 82* | 99 | >6800 | 0.21 | 0.21 | ND |
| BsAb2 | 496 | 638 | >6800 | 0.21 | 0.21 | ND |
| BsAb3 | ND | ND | 14 | ND | ND | 1.84 |

30

*=2回の独立した測定、「ND」=データなし。

40

【0335】

BsAb1、BsAb2、陽性対照抗体(抗CD47抗体P01A11_75)、および陰性対照抗体(抗PD-L1抗体P06B05_245)と細胞表面上のヒトCD47との結合は、ヒトCD47を安定して過剰発現するように作製されたCHO細胞を使用したフローサイトメトリーによって評価した。生じたEC50値(すなわちCD47タンパク質の50%に抗体が結合する濃度)は、BsAb1:11.8nM、BsAb2:101.2nM、抗体P01A11_75:0.98nM、および抗体P06B05_245:該当なし(N/A)であった。

【0336】

BsAb1およびBsAb2と細胞表面上のヒトPD-L1との結合は、ヒトPD-L

50

1を異所的に過剰発現するように作製されたCHO細胞を使用したフローサイトメトリーによって評価した。生じたEC50値(すなわちPD-L1タンパク質の50%に抗体が結合する濃度)はBsAb1:0.38nMおよびBsAb2:0.24nMであった。

【0337】

(実施例5)

CD47/PD-L1二重特異性抗体と腫瘍細胞および赤血球との結合

抗CD47単一特異性抗体と比較したCD47/PD-L1二重特異性抗体の潜在的な利点は、CD47/PD-L1二重特異性抗体が、CD47のみを発現する血液細胞(たとえば赤血球)と比較して腫瘍微小環境中の腫瘍細胞および/または免疫細胞(どちらもCD47およびPD-L1を同時発現し得る)に対してより高い選択性を潜在的に有することである。腫瘍微小環境中の細胞に対して抗CD47単一特異性抗体よりも高い選択性を潜在的に有することによって、CD47/PD-L1二重特異性抗体は、抗CD47単一特異性抗体と比較して低下した毒性を潜在的に有する。

10

【0338】

1:10の比の腫瘍細胞(すなわちCD47およびPD-L1の発現をどちらも有するHT1080細胞)と赤血球(RBC)(CD47の発現のみ)とからなる混合物において、BsAb1およびBsAb2とヒトCD47との結合を、単一特異性抗CD47 mAb 5F9[Liu, Jら、PLOS One.、2015、10(9)]および2A1(米国公開第20140140989号)とのそれと比較した。抗CD47 5F9および2A1の腫瘍およびRBCとの結合のEC50はどちらも0.1nM未満であり、選択性がない。対照的に、BsAb1およびBsAb2はどちらも腫瘍細胞の100%と<0.1nMで結合したが、RBC結合のEC50は>10nMであり、これは腫瘍細胞対RBCについて少なくとも100倍の選択性を示唆している。

20

【0339】

(実施例6)

CD47-SIRPaおよびPD-L1-PD-1相互作用に対するCD47/PD-L1二重特異性抗体の遮断活性

本実施例はBsAb1およびBsAb2の遮断能力を例示する。

【0340】

SIRPaタンパク質とCHO細胞によって過剰発現されたヒトCD47(「CHO-hCD47」)との結合に対するBsAb1およびBsAb2の影響を試験するための、細胞に基づくSIRPa遮断IC50アッセイを実施した。同様に、SIRPaタンパク質とCHO細胞によって過剰発現されたマウスCD47(「CHO-マウスCD47」)との結合に対するBsAb3の影響を試験するための、細胞に基づくSIRPa遮断IC50アッセイを実施した。本アッセイの結果を以下の表19に示す。

30

【0341】

さらに、PD-1タンパク質とCHO細胞によって過剰発現されたヒトPD-L1(「CHO-hPD-L1」)との結合に対するBsAb1およびBsAb2の影響を試験するための、細胞に基づくPD-1遮断IC50アッセイを実施した。具体的には、PD-L1遮断活性では、PD-1/PD-L1の相互作用は、キット(Promega #J1250)を介してPD-L1 aAPC/CHO-K1をPD-1エフェクター細胞と同時培養した際にTCR媒介性ルミネセンスを阻害する。PD-1/PD-L1の相互作用はPD-1遮断mAbによって乱され、TCRの活性化はNFAT経路の活性化を介してルミネセンスを誘導する。PD-1タンパク質とCHO細胞によって過剰発現されたマウスPD-L1(「CHO-マウスPD-L1」)との結合に対する二重特異性BsAb3の影響を試験するための、同様の細胞に基づくPD-1遮断IC50アッセイも実施した。本アッセイの結果も以下の表19に示す。

40

【0342】

【表 2 0】

表 19:CD47/PD-L1 二重特異性抗体の遮断活性

| 抗 CD47/ 抗 PD- L1 二重 特異性 mAb: | 遮断/ 非遮断 SIRPa | 遮断/ 非遮断 PD-1 |
|--|-------------------------|--------------------|
| BsAb1 | 遮断、 IC50=114 nM | 遮断 |
| BsAb2 | 遮断、 IC50=3693 nM | 遮断 |
| BsAb3 | 遮断、 IC50=115.2 nM | 遮断 |

10

20

【0343】

30

表 19 に示すように、BsAb1、BsAb2、およびBsAb3のそれぞれは、SIRPa とCD47との間の相互作用を遮断した。さらに、BsAb1、BsAb2、およびBsAb3のそれぞれは、PD-1とPD-L1との間の相互作用を遮断した。

【0344】

(実施例7)

CD47/PD-L1二重特異性抗体の抗体依存性細胞貪食(ADCP)増強活性
ADCPアッセイ

抗体依存性細胞貪食(ADCP)活性を試験するために、ヒトマクロファージを、2人のドナー由来のPBMCから単離した単球から分化させ、二重特異性CD47/PD-L1 BsAb1の存在下で、CD47およびPD-L1をどちらも発現する腫瘍細胞(NCI-H292細胞、肺気管支粘表皮癌)と共に同時培養した。図1に示すように、BsAb1を用いた処置は、CD47およびPD-L1の発現をどちらも有するヒト標的細胞NCI-H292のマクロファージ貪食を増強させる。さらに、図1に示すように、BsAb1は、腫瘍細胞の貪食を増強させることにおいて、抗CD47単一特異性抗体(P01A11_75)または抗PD-L1単一特異性抗体(P06B05_245)のいずれかよりも有効である。たとえば、0.32nMの濃度で、BsAb1の全腫瘍細胞の貪食%は約60%である一方で、抗CD47単一特異性抗体(P01A11_75)および抗PD-L1単一特異性抗体(P06B05_245)の両方では、これは約30%ではない(図1)。

40

【0345】

50

(実施例 8)

マウス代用 CD 47 / PD - L 1 二重特異性抗体の *in vivo* 有効性研究

本実施例は、3つの同系マウス腫瘍モデル [CT 26 - 強度 (hot) 腫瘍モデル (マウス結腸癌細胞)、MC 38 - 中度 (warm) 腫瘍モデル (マウス結腸癌細胞)、B 16 F 10 - 軽度 (cold) 腫瘍モデル (マウス黒色腫細胞)] における CD 47 / PD - L 1 二重特異性抗体の抗腫瘍有効性を例示する。

【0346】

CT 26 腫瘍モデルでは、CD 47 / PD - L 1 二重特異性抗体 Bs Ab 3 を用いた処置後の有効性および体重の変化を、単一特異性抗 m CD 47 および単一特異性抗 m PD - L 1 m Ab の単独および組合せと比較した (図 2 A、2 B、および 2 C)。さらに、Bs Ab 3 10
 10
 20
 30
 40
 50
 60
 70
 80
 90
 100
 110
 120
 130
 140
 150
 160
 170
 180
 190
 200
 210
 220
 230
 240
 250
 260
 270
 280
 290
 300
 310
 320
 330
 340
 350
 360
 370
 380
 390
 400
 410
 420
 430
 440
 450
 460
 470
 480
 490
 500
 510
 520
 530
 540
 550
 560
 570
 580
 590
 600
 610
 620
 630
 640
 650
 660
 670
 680
 690
 700
 710
 720
 730
 740
 750
 760
 770
 780
 790
 800
 810
 820
 830
 840
 850
 860
 870
 880
 890
 900
 910
 920
 930
 940
 950
 960
 970
 980
 990
 1000
 1010
 1020
 1030
 1040
 1050
 1060
 1070
 1080
 1090
 1100
 1110
 1120
 1130
 1140
 1150
 1160
 1170
 1180
 1190
 1200
 1210
 1220
 1230
 1240
 1250
 1260
 1270
 1280
 1290
 1300
 1310
 1320
 1330
 1340
 1350
 1360
 1370
 1380
 1390
 1400
 1410
 1420
 1430
 1440
 1450
 1460
 1470
 1480
 1490
 1500
 1510
 1520
 1530
 1540
 1550
 1560
 1570
 1580
 1590
 1600
 1610
 1620
 1630
 1640
 1650
 1660
 1670
 1680
 1690
 1700
 1710
 1720
 1730
 1740
 1750
 1760
 1770
 1780
 1790
 1800
 1810
 1820
 1830
 1840
 1850
 1860
 1870
 1880
 1890
 1900
 1910
 1920
 1930
 1940
 1950
 1960
 1970
 1980
 1990
 2000
 2010
 2020
 2030
 2040
 2050
 2060
 2070
 2080
 2090
 2100
 2110
 2120
 2130
 2140
 2150
 2160
 2170
 2180
 2190
 2200
 2210
 2220
 2230
 2240
 2250
 2260
 2270
 2280
 2290
 2300
 2310
 2320
 2330
 2340
 2350
 2360
 2370
 2380
 2390
 2400
 2410
 2420
 2430
 2440
 2450
 2460
 2470
 2480
 2490
 2500
 2510
 2520
 2530
 2540
 2550
 2560
 2570
 2580
 2590
 2600
 2610
 2620
 2630
 2640
 2650
 2660
 2670
 2680
 2690
 2700
 2710
 2720
 2730
 2740
 2750
 2760
 2770
 2780
 2790
 2800
 2810
 2820
 2830
 2840
 2850
 2860
 2870
 2880
 2890
 2900
 2910
 2920
 2930
 2940
 2950
 2960
 2970
 2980
 2990
 3000
 3010
 3020
 3030
 3040
 3050
 3060
 3070
 3080
 3090
 3100
 3110
 3120
 3130
 3140
 3150
 3160
 3170
 3180
 3190
 3200
 3210
 3220
 3230
 3240
 3250
 3260
 3270
 3280
 3290
 3300
 3310
 3320
 3330
 3340
 3350
 3360
 3370
 3380
 3390
 3400
 3410
 3420
 3430
 3440
 3450
 3460
 3470
 3480
 3490
 3500
 3510
 3520
 3530
 3540
 3550
 3560
 3570
 3580
 3590
 3600
 3610
 3620
 3630
 3640
 3650
 3660
 3670
 3680
 3690
 3700
 3710
 3720
 3730
 3740
 3750
 3760
 3770
 3780
 3790
 3800
 3810
 3820
 3830
 3840
 3850
 3860
 3870
 3880
 3890
 3900
 3910
 3920
 3930
 3940
 3950
 3960
 3970
 3980
 3990
 4000
 4010
 4020
 4030
 4040
 4050
 4060
 4070
 4080
 4090
 4100
 4110
 4120
 4130
 4140
 4150
 4160
 4170
 4180
 4190
 4200
 4210
 4220
 4230
 4240
 4250
 4260
 4270
 4280
 4290
 4300
 4310
 4320
 4330
 4340
 4350
 4360
 4370
 4380
 4390
 4400
 4410
 4420
 4430
 4440
 4450
 4460
 4470
 4480
 4490
 4500
 4510
 4520
 4530
 4540
 4550
 4560
 4570
 4580
 4590
 4600
 4610
 4620
 4630
 4640
 4650
 4660
 4670
 4680
 4690
 4700
 4710
 4720
 4730
 4740
 4750
 4760
 4770
 4780
 4790
 4800
 4810
 4820
 4830
 4840
 4850
 4860
 4870
 4880
 4890
 4900
 4910
 4920
 4930
 4940
 4950
 4960
 4970
 4980
 4990
 5000
 5010
 5020
 5030
 5040
 5050
 5060
 5070
 5080
 5090
 5100
 5110
 5120
 5130
 5140
 5150
 5160
 5170
 5180
 5190
 5200
 5210
 5220
 5230
 5240
 5250
 5260
 5270
 5280
 5290
 5300
 5310
 5320
 5330
 5340
 5350
 5360
 5370
 5380
 5390
 5400
 5410
 5420
 5430
 5440
 5450
 5460
 5470
 5480
 5490
 5500
 5510
 5520
 5530
 5540
 5550
 5560
 5570
 5580
 5590
 5600
 5610
 5620
 5630
 5640
 5650
 5660
 5670
 5680
 5690
 5700
 5710
 5720
 5730
 5740
 5750
 5760
 5770
 5780
 5790
 5800
 5810
 5820
 5830
 5840
 5850
 5860
 5870
 5880
 5890
 5900
 5910
 5920
 5930
 5940
 5950
 5960
 5970
 5980
 5990
 6000
 6010
 6020
 6030
 6040
 6050
 6060
 6070
 6080
 6090
 6100
 6110
 6120
 6130
 6140
 6150
 6160
 6170
 6180
 6190
 6200
 6210
 6220
 6230
 6240
 6250
 6260
 6270
 6280
 6290
 6300
 6310
 6320
 6330
 6340
 6350
 6360
 6370
 6380
 6390
 6400
 6410
 6420
 6430
 6440
 6450
 6460
 6470
 6480
 6490
 6500
 6510
 6520
 6530
 6540
 6550
 6560
 6570
 6580
 6590
 6600
 6610
 6620
 6630
 6640
 6650
 6660
 6670
 6680
 6690
 6700
 6710
 6720
 6730
 6740
 6750
 6760
 6770
 6780
 6790
 6800
 6810
 6820
 6830
 6840
 6850
 6860
 6870
 6880
 6890
 6900
 6910
 6920
 6930
 6940
 6950
 6960
 6970
 6980
 6990
 7000
 7010
 7020
 7030
 7040
 7050
 7060
 7070
 7080
 7090
 7100
 7110
 7120
 7130
 7140
 7150
 7160
 7170
 7180
 7190
 7200
 7210
 7220
 7230
 7240
 7250
 7260
 7270
 7280
 7290
 7300
 7310
 7320
 7330
 7340
 7350
 7360
 7370
 7380
 7390
 7400
 7410
 7420
 7430
 7440
 7450
 7460
 7470
 7480
 7490
 7500
 7510
 7520
 7530
 7540
 7550
 7560
 7570
 7580
 7590
 7600
 7610
 7620
 7630
 7640
 7650
 7660
 7670
 7680
 7690
 7700
 7710
 7720
 7730
 7740
 7750
 7760
 7770
 7780
 7790
 7800
 7810
 7820
 7830
 7840
 7850
 7860
 7870
 7880
 7890
 7900
 7910
 7920
 7930
 7940
 7950
 7960
 7970
 7980
 7990
 8000
 8010
 8020
 8030
 8040
 8050
 8060
 8070
 8080
 8090
 8100
 8110
 8120
 8130
 8140
 8150
 8160
 8170
 8180
 8190
 8200
 8210
 8220
 8230
 8240
 8250
 8260
 8270
 8280
 8290
 8300
 8310
 8320
 8330
 8340
 8350
 8360
 8370
 8380
 8390
 8400
 8410
 8420
 8430
 8440
 8450
 8460
 8470
 8480
 8490
 8500
 8510
 8520
 8530
 8540
 8550
 8560
 8570
 8580
 8590
 8600
 8610
 8620
 8630
 8640
 8650
 8660
 8670
 8680
 8690
 8700
 8710
 8720
 8730
 8740
 8750
 8760
 8770
 8780
 8790
 8800
 8810
 8820
 8830
 8840
 8850
 8860
 8870
 8880
 8890
 8900
 8910
 8920
 8930
 8940
 8950
 8960
 8970
 8980
 8990
 9000
 9010
 9020
 9030
 9040
 9050
 9060
 9070
 9080
 9090
 9100
 9110
 9120
 9130
 9140
 9150
 9160
 9170
 9180
 9190
 9200
 9210
 9220
 9230
 9240
 9250
 9260
 9270
 9280
 9290
 9300
 9310
 9320
 9330
 9340
 9350
 9360
 9370
 9380
 9390
 9400
 9410
 9420
 9430
 9440
 9450
 9460
 9470
 9480
 9490
 9500
 9510
 9520
 9530
 9540
 9550
 9560
 9570
 9580
 9590
 9600
 9610
 9620
 9630
 9640
 9650
 9660
 9670
 9680
 9690
 9700
 9710
 9720
 9730
 9740
 9750
 9760
 9770
 9780
 9790
 9800
 9810
 9820
 9830
 9840
 9850
 9860
 9870
 9880
 9890
 9900
 9910
 9920
 9930
 9940
 9950
 9960
 9970
 9980
 9990
 10000

【0347】

MC 38 腫瘍モデルでは、様々な用量の二重特異性 Bs Ab 3 を、腫瘍の成長を阻害することにおける有効性について評価した。MC 38 腫瘍を保有するマウスを、10、20、または 40 mg / kg の Bs Ab 3 を用いて、週に 2 回を 3 週間、合計 6 用量、腹腔内処置した。このモデルでは、10、20、または 40 mg / kg の処置の観察された有効性は、それぞれ約 25.7%、52.6%、および 75.8% の腫瘍成長阻害であった (すなわちアイソタイプ対照抗体と比較した) (図 3 A)。これらの用量はすべて、体重減少なしで良好に許容された (図 3 B)。

【0348】

B 16 F 19 腫瘍モデルでは、20 mg / kg の Bs Ab 3 を抗腫瘍有効性について評価した。B 16 F 19 腫瘍を保有するマウスを、20 mg / kg の二重特異性 Bs Ab 3 を用いて、週に 3 回を 3 週間、合計 9 用量、腹腔内処置した。このモデルでは、20 mg / kg の処置の観察された有効性は約 68% の腫瘍成長阻害であった (すなわちアイソタイプ対照抗体と比較した) (図 4 A)。この用量は、体重の実質的な減少なしで良好に許容された (図 4 B)。

【0349】

(実施例 9)

マウス代用 CD 47 / PD - L 1 二重特異性抗体の作用機構の研究

本実験では、どの免疫細胞種がマウス代用 CD 47 / PD - L 1 二重特異性抗体の抗腫瘍有効性に必要かを決定するためにアッセイを行った。

【0350】

CD 8 T細胞を枯渇させることが知られている抗体(抗 CD 8、抗体: 2.43)、CD 4 T細胞(抗 CD 4、抗体: GK 1.5)、NK細胞(抗 NK 1.1、抗体: PK 136)、および腫瘍関連マクロファージ(抗 CSF 1R)を、MC 38腫瘍を保有するマウスに、マウス CD 47 / PD - L 1 二重特異性 Bs Ab 3 (40 mg / kg、週に 2 回を 3 週間)と共に同時投与した。図 5 A、5 C、および 5 D に示すように、データは、有効性が、CD 8 T細胞単独の非存在下(図 5 A)および CD 8 + CD 4 T細胞の組合せ(図 5 A)では損なわれていたが、CD 4 T細胞単独の非存在下(図 5 A)、NK細胞の非存在下(図 5 D)、または腫瘍関連マクロファージの非存在下(図 5 C)においては損なわれていなかったことを示唆している。さらに、この研究を、野生型 C 57 BL / 6 マウスと比較して古典的 1 型樹状細胞(DC 1)の部分組(CD 8 + および CD 103 +)を欠く B A T F 3 - / - マウスにおいても行った(Hildner, K.ら、Science、2008、322(5904): ページ 1097 ~ 100。)。図 5 B に示すように、有効性は、c DC 1 の非存在下では失われていた。[図 5 B では、対照抗体で処置した野生型マウス(黒丸)、対照抗体で処置した B A T F 3 - / - マウス(白四角)、および Bs Ab 3 で処置した B A T F 3 - / - マウス(黒三角形)のデータ点が、特に 25 日目に密に重複している。]

10

20

【0351】

(実施例 10)

CD 47 / PD - L 1 二重特異性抗体の薬力学的効果

本実験の目的は、CD 47 / PD - L 1 二重特異性抗体の *in vivo* の薬力学的効果を理解することであった。

【0352】

MC 38 腫瘍を保有するマウスを、5 mg / kg、10 mg / kg、または 20 mg / kg の二重特異性 Bs Ab 3 を用いて、腫瘍移植後 11、14、および 18 日目に処置した。腫瘍移植の 3 週間後、腫瘍および脾臓をマウスから収穫し、様々な細胞種について分析した。表 20 a ~ 20 e に示すように、CD 8 + CD 11c + DC などの一部の脾臓樹状細胞(DC)の部分組において用量依存的な増加が存在した(表 20 a)。さらに、CD 11c + 間の DEC 205 + CD 8 + CD 103 + DC の百分率は、脾臓中で有意に増加していた(表 20 b)。腫瘍に関しては、T細胞(Thy 1.2+) (表 20 c) および CD 8 + T細胞(表 20 d) の増加はあったが、CD 4 + T細胞(表 20 e) の増加はなく、これは、先天性および適応の免疫細胞の両方が、二重特異性 Bs Ab 3 を用いて処置の後にモジュレートされたことを示唆している。

30

【0353】

40

50

【表 2 1 - 1】

表 20a:

| 脾臓中の CD8+ DCs (CD11c の%) | | |
|--------------------------|-------|------|
| 群 | 平均 | SEM |
| 対照 | 29.84 | 4.80 |
| BsAb3_5 mg/kg | 26.32 | 3.50 |
| BsAb3_10 mg/kg | 52.50 | 4.02 |
| BsAb3_20 mg/kg | 60.80 | 1.53 |

10

表 20b:

| 脾臓中の CD103+ DCs (CD11c の%) | | |
|----------------------------|-------|------|
| 群 | 平均 | SEM |
| 対照 | 8.76 | 3.21 |
| BsAb3_5 mg/kg | 9.17 | 2.09 |
| BsAb3_10 mg/kg | 17.23 | 5.22 |
| BsAb3_20 mg/kg | 31.16 | 1.69 |

20

表 20c:

| 腫瘍中の T 細胞(CD45 の%) | | |
|--------------------|-------|------|
| 群 | 平均 | SEM |
| 対照 | 19.08 | 2.49 |
| BsAb3_5 mg/kg | 33.02 | 2.57 |
| BsAb3_10 mg/kg | 39.12 | 3.83 |
| BsAb3_20 mg/kg | 41.02 | 3.19 |

30

40

【 0 3 5 4 】

50

【表 2 1 - 2】

表 20d:

| 腫瘍中の CD8 T 細胞(CD45 の%) | | |
|------------------------|-------|------|
| 群 | 平均 | SEM |
| 対照 | 6.44 | 0.77 |
| BsAb3_5 mg/kg | 14.48 | 1.68 |
| BsAb3_10 mg/kg | 19.52 | 1.71 |
| BsAb3_20 mg/kg | 19.40 | 1.61 |

10

20

表 20e:

| 腫瘍中の CD4 T 細胞(CD45 の%) | | |
|------------------------|-------|------|
| 群 | 平均 | SEM |
| 対照 | 8.79 | 1.46 |
| BsAb3_5 mg/kg | 14.00 | 0.78 |
| BsAb3_10 mg/kg | 14.61 | 2.63 |
| BsAb3_20 mg/kg | 15.15 | 1.90 |

30

40

【 0 3 5 5 】

(実施例 1 1)

CD 4 7 / P D - L 1 B s A b 1 の i n v i v o 有効性研究

本実験の目的は、CD 4 7 / P D - L 1 B s A b 1 および B s A b 2 の i n v i v o 有効性を試験することであった。

【 0 3 5 6 】

NSG 免疫不全マウスを、 2×10^6 個の M D A - M B - 2 3 1 トリプルネガティブヒト乳癌細胞を用いて右脇腹に皮下接種した。これらの細胞は、CD 4 7 および P D - L 1 をどちらも内在的に過剰発現する。腫瘍が標的サイズに達した際、マウスを処置群へとラ

50

ランダム化した。処置はランダム化と同じ日に開始した。マウスを、10 mg / kg の h i g G 1 アイソタイプ m A b (対照)、または 1、5、もしくは 10 mg / kg の C D 4 7 / P D - L 1 B s A b 1 または B s A b 2 を用いて、週に 1 回、6 週間の間処置した。腫瘍サイズはカリパスを使用して二次元において様々な間隔で測定し、体積は以下の式を使用して立方ミリメートルで計算した： $V = 0.5 L \times W^2$ [式中、L は腫瘍の最長直径であり、W は L に垂直な直径である]。

【0357】

結果を図 6 に示す。図 6 に示すように、5 または 10 mg / kg の h i s タグ付けした C D 4 7 / P D - L 1 B s A b 1 または B s A b 2 を用いた処置は、アイソタイプ対照と比較して M D A - M B - 2 3 1 腫瘍成長を実質的に遅延させた。具体的には、B s A b 1 10 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108 109 110 111 112 113 114 115 116 117 118 119 120 121 122 123 124 125 126 127 128 129 130 131 132 133 134 135 136 137 138 139 140 141 142 143 144 145 146 147 148 149 150 151 152 153 154 155 156 157 158 159 160 161 162 163 164 165 166 167 168 169 170 171 172 173 174 175 176 177 178 179 180 181 182 183 184 185 186 187 188 189 190 191 192 193 194 195 196 197 198 199 200 201 202 203 204 205 206 207 208 209 210 211 212 213 214 215 216 217 218 219 220 221 222 223 224 225 226 227 228 229 230 231 232 233 234 235 236 237 238 239 240 241 242 243 244 245 246 247 248 249 250 251 252 253 254 255 256 257 258 259 260 261 262 263 264 265 266 267 268 269 270 271 272 273 274 275 276 277 278 279 280 281 282 283 284 285 286 287 288 289 290 291 292 293 294 295 296 297 298 299 300 301 302 303 304 305 306 307 308 309 310 311 312 313 314 315 316 317 318 319 320 321 322 323 324 325 326 327 328 329 330 331 332 333 334 335 336 337 338 339 340 341 342 343 344 345 346 347 348 349 350 351 352 353 354 355 356 357 358 359 360 361 362 363 364 365 366 367 368 369 370 371 372 373 374 375 376 377 378 379 380 381 382 383 384 385 386 387 388 389 390 391 392 393 394 395 396 397 398 399 400 401 402 403 404 405 406 407 408 409 410 411 412 413 414 415 416 417 418 419 420 421 422 423 424 425 426 427 428 429 430 431 432 433 434 435 436 437 438 439 440 441 442 443 444 445 446 447 448 449 450 451 452 453 454 455 456 457 458 459 460 461 462 463 464 465 466 467 468 469 470 471 472 473 474 475 476 477 478 479 480 481 482 483 484 485 486 487 488 489 490 491 492 493 494 495 496 497 498 499 500 501 502 503 504 505 506 507 508 509 510 511 512 513 514 515 516 517 518 519 520 521 522 523 524 525 526 527 528 529 530 531 532 533 534 535 536 537 538 539 540 541 542 543 544 545 546 547 548 549 550 551 552 553 554 555 556 557 558 559 560 561 562 563 564 565 566 567 568 569 570 571 572 573 574 575 576 577 578 579 580 581 582 583 584 585 586 587 588 589 590 591 592 593 594 595 596 597 598 599 600 601 602 603 604 605 606 607 608 609 610 611 612 613 614 615 616 617 618 619 620 621 622 623 624 625 626 627 628 629 630 631 632 633 634 635 636 637 638 639 640 641 642 643 644 645 646 647 648 649 650 651 652 653 654 655 656 657 658 659 660 661 662 663 664 665 666 667 668 669 670 671 672 673 674 675 676 677 678 679 680 681 682 683 684 685 686 687 688 689 690 691 692 693 694 695 696 697 698 699 700 701 702 703 704 705 706 707 708 709 710 711 712 713 714 715 716 717 718 719 720 721 722 723 724 725 726 727 728 729 730 731 732 733 734 735 736 737 738 739 740 741 742 743 744 745 746 747 748 749 750 751 752 753 754 755 756 757 758 759 760 761 762 763 764 765 766 767 768 769 770 771 772 773 774 775 776 777 778 779 780 781 782 783 784 785 786 787 788 789 790 791 792 793 794 795 796 797 798 799 800 801 802 803 804 805 806 807 808 809 810 811 812 813 814 815 816 817 818 819 820 821 822 823 824 825 826 827 828 829 830 831 832 833 834 835 836 837 838 839 840 841 842 843 844 845 846 847 848 849 850 851 852 853 854 855 856 857 858 859 860 861 862 863 864 865 866 867 868 869 870 871 872 873 874 875 876 877 878 879 880 881 882 883 884 885 886 887 888 889 890 891 892 893 894 895 896 897 898 899 900 901 902 903 904 905 906 907 908 909 910 911 912 913 914 915 916 917 918 919 920 921 922 923 924 925 926 927 928 929 930 931 932 933 934 935 936 937 938 939 940 941 942 943 944 945 946 947 948 949 950 951 952 953 954 955 956 957 958 959 960 961 962 963 964 965 966 967 968 969 970 971 972 973 974 975 976 977 978 979 980 981 982 983 984 985 986 987 988 989 990 991 992 993 994 995 996 997 998 999 1000

【0358】

(実施例 12)

カニクイザルにおける抗 C D 4 7 / 抗 P D - L 1 B s A b 1 および B s A b 2 の毒性研究
本実験の目的は、カニクイザルにおいて h i s タグ付けした B s A b 1 および h i s タグ付けした B s A b 2 を用いた探索毒性研究 (E T S) を行うことであった。B s A b 1 および B s A b 2 は、ヒトおよびカニクイザルの C D 4 7 および P D - L 1 部分に対して同様の結合親和性を有しており、ヒト赤血球および血小板と同様の親和性でカニクイザル赤血球および血小板と結合する。したがって、これらのデータは、C D 4 7 / P D - L 1 B s A b 1 および B s A b 2 の毒性評価のための関連種としてのカニクイザルの使用を支持する。

【0359】

B s A b 1 および B s A b 2 のそれぞれについて、1 匹のサルに 10 mg / kg の用量を投与し、1 匹のサルに 30 mg / kg の用量を投与し、3 匹のサルに 100 mg / kg の用量を投与した。m A b は 1 および 8 日目に静脈内投与した。15 日目に、それぞれのサルからの試料を、様々な免疫細胞部分組およびサイトカインについて分析し、以下の表 2 1 ~ 2 4 に示す。表 2 1 および 2 3 は、様々な用量の B s A b 1 または B s A b 2 をサルに投与した後の様々な免疫細胞部分組の活性化および / または増殖に関するデータを提供する。表 2 2 および 2 4 は、様々な用量の B s A b 1 または B s A b 2 をサルに投与した後の様々なサイトカインの増加に関するデータを提供する。

【0360】

以下の表中で、N C = 変化なし、I L = インターロイキン、I F N = インターフェロン、M C P = 単球化学誘引物質タンパク質、I P = インターフェロン誘導タンパク質である。比 (たとえば「1 / 1」または「2 / 3」) は、処置群中のサルの合計数を超えるパラメータの変化を経験したサルの数を指す。たとえば、「2 / 3」は、処置中の 3 匹うち 2 匹のサルが関連パラメータの変化を有していたことを示す。括弧内に提供した値 [たとえば「(4.9x)」] はベースラインと比較した変化の倍数を提供し、2 つ以上のサルからのデータがある場合は括弧内に値の範囲を提供する [たとえば「(4.0x ~ 9.2x)」]。

【0361】

10

20

30

40

50

【表 2 2】

表 21:CD47/PD-L1 BsAb1 を用いた免疫細胞の活性化/増殖

| | ビヒクル | 10 mg/kg/用量 | 30 mg/kg/用量 | 100 mg/kg/用量 | |
|------------------------------|---------------|----------------|-----------------|-----------------------|----|
| %活性化 (CD69+) CD4+ T細胞 | (0.42x-1.63x) | 1/1 (2.64x) | 1/1 (3.20x) | 2/3 (2.86x-3.07x) | 10 |
| %活性化 (CD25+) CD8+ T細胞 | (0.52x-1.96x) | NC | 1/1 (3.61x) | 2/3 (4.01x-6.47x) | |
| %増殖中 (Ki-67+) CD4+ T細胞 | (1.00x-1.76x) | NC | NC | 3/3 (2.56x-3.28x) | 20 |
| %増殖中 (Ki-67+) CD8+ T細胞 | (0.62x-2.94x) | NC | NC | 1/3 (6.46x) | |
| %活性化 (CD83+) 単球 | (0.36x-1.82x) | NC | 1/1 (21.94x) | 3/3 (4.40x-39.40x) | 30 |

【 0 3 6 2 】

【表 2 3】

表 22: サイトカインレベルに対する CD47/PD-L1 BsAb1 の効果

| | ビヒクル | 10 mg/kg/用量 | 30 mg/kg/用量 | 100 mg/kg/用量 |
|---------------|--------------|----------------|----------------|--------------------|
| IL-6 | (<1.0x-1.9x) | NC | 1/1 (4.9x) | 3/3 (4.0x-9.2x) |
| IFN- γ | (<1.0) | NC | NC | 1/3 (4.9x) |
| MCP-1/CCL2 | (0.9x-2.7x) | NC | 1/1 (>4.8x) | 3/3 (4.4x-5.6x) |
| IP-10/CXCL10 | (0.4x-1.0x) | NC | 1/1 (5.6x) | 2/3 (5.7x-7.2x) |

10

【 0 3 6 3 】

【表 2 4】

表 23: CD47/PD-L1 BsAb2 を用いた免疫細胞の活性化/増殖

| | ビヒクル | 10 mg/kg/用量 | 30 mg/kg/用量 | 100 mg/kg/用量 |
|------------------------------|---------------|----------------|-----------------|----------------------|
| %活性化 (CD69+) CD4+ T細胞 | (0.42x-1.63x) | 1/1 (4.07x) | NC | 3/3 (2.44x-6.21x) |
| %活性化 (CD25+) CD8+ T細胞 | (0.52x-1.96x) | NC | 1/1 (3.40x) | 1/3 (12.75x) |
| %増殖中 (Ki-67+) CD4+ T細胞 | (1.00x-1.76x) | NC | 1/1 (3.29x) | 2/3 (2.26x-4.23x) |
| %増殖中 (Ki-67+) CD8+ T細胞 | (0.62x-2.94x) | NC | 1/1 (4.68x) | NC |
| %活性化 (CD83+) 単球 | (0.36x-1.82x) | 1/1 (4.58x) | 1/1 (12.80x) | 2/3 (4.66x-6.80x) |

20

30

40

50

【 0 3 6 4 】

【 表 2 5 】

表 24: サイトカインレベルに対する CD47/PD-L1 BsAb2 の効果

| | ビヒクル | 10 mg/kg/用量 | 30 mg/kg/用量 | 100 mg/kg/用量 |
|--------------|--------------|----------------|----------------|---------------------|
| IL-6 | (<1.0x-1.9x) | NC | 1/1 (4.4x) | 2/3 (7.8x-13.3x) |
| MCP-1/CCL2 | (0.9x-2.7x) | NC | 1/1 (>3.6x) | 3/3 (3.3x->7.1x) |
| IP-10/CXCL10 | (0.4x-1.0x) | NC | 1/1 (4.4x) | 1/3 (9.8x) |

10

【 0 3 6 5 】

表 2 1 および 2 3 に示すように、BsAb 1 および BsAb 2 を投与したカニクイザルにおいて T 細胞の活性化および / または増殖ならびに単球の活性化の証拠が存在していた。さらに、表 2 2 および 2 4 に示すように、IL 6、INF g、CCL 2、CXCL 1 0 を含む単球 / マクロファージ / DC または T 細胞関連サイトカインの緩和な一過的増加の証拠が存在していた。合わせて、このデータは、カニクイザルにおける抗 CD 4 7 / 抗 PD - L 1 BsAb 1 および BsAb 2 の投与での、薬理活性および免疫系の活性化を支持する。

20

【 0 3 6 6 】

(実施例 1 3)

組合せ処置 : CD 4 7 / PD - L 1 二重特異性 mAb と TLR 9 作用剤

本実施例は、TLR 9 作用剤と組み合わせた抗 CD 4 7 / 抗 PD - L 1 mAb の治療活性を例示する。

30

【 0 3 6 7 】

マウス代用 CD 4 7 / PD - L 1 二重特異性 BsAb 3 は上述されている。二重特異性 BsAb 3 は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の 10 mg / kg の有効量未満の用量を週に 2 回、2 週間投与した (4 回の合計用量)。

【 0 3 6 8 】

TLR 9 作用剤は CpG 2 4 5 5 5 であり、これはクラス B CpG オリゴヌクレオチド (ODN) である。CpG ODN は、特定の配列構成の非メチル化 CpG ジヌクレオチド (CpG モチーフ) を含有する合成 ODN である。CpG 2 4 5 5 5 は、たとえば、すべての目的のために本明細書中に組み込まれている米国特許第 8 5 5 2 1 6 5 号中に記載されている。CpG 2 4 5 5 5 は、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) (Life Technologies) 中の 5 mg / kg、腫瘍内 (it)、1 回用量で、腫瘍接種の 1 1 日後に投薬した。

40

【 0 3 6 9 】

6 ~ 8 週齢の雌の C57BL / 6 マウスは Jackson Laboratories から購入した。すべての動物は Pfizer の無病原体動物施設に収容し、実験は施設動物実験委員会 (Institutional Animal Care and Use Committee、IACUC) 指針に従ったプロトコルに従って実施した。

【 0 3 7 0 】

MC 3 8 結腸癌細胞系はアメリカ培養細胞系統保存機関 (ATCC) から購入した。指

50

数増殖期で増殖中の無病原体細胞を収穫して腫瘍接種に使用した。

【0371】

C57BL/6マウスを、0.1mLのPBS中の 0.5×10^5 個のMC38細胞を用いて、右脇腹に皮下接種した。腫瘍が標的サイズに達した際、マウスを処置群へとランダム化した。処置はランダム化と同じ日に開始した。腫瘍サイズはカリパスを使用して二次元において様々な間隔で測定し、体積は以下の式を使用して立方ミリメートルで計算した： $V = 0.5 L \times W^2$ [式中、Lは腫瘍の最長直径であり、WはLに垂直な直径である]。体重も記録した。

【0372】

結果を図7に示す。図7に示すように、CD47/PD-L1二重特異性BsAb3（白四角）およびTLR9作用剤（黒逆三角形）の処置はどちらも、アイソタイプ対照（黒丸）と比較してMC38結腸癌腫瘍成長を遅延させ、CD47/PD-L1二重特異性BsAb3+TLR9作用剤（白三角形）の組合せは、CD47/PD-L1二重特異性BsAb3およびTLR9の薬剤の個々よりも高い有効性を有していた。[図7では、CD47/PD-L1二重特異性BsAb3（白四角）およびTLR9作用剤（黒逆三角形）のデータ点は大部分が重複する。]

10

【0373】

CD47/PD-L1二重特異性mAbとTLR9作用剤との組合せ処置で観察された有効性の増加は、TLR3、TLR7/8、TLR9、またはSTING作用剤の腫瘍内投与に応答した、B16F10腫瘍細胞中におけるCD47およびPD-L1の発現の増加を示したバルク腫瘍RNAシーケンシングデータと一致している（データ示さず）。

20

【0374】

（実施例14）

組合せ処置：CD47/PD-L1二重特異性mAbとCDK2/4/6阻害剤

本実施例は、サイクリン依存性キナーゼ（CDK）2/4/6阻害剤と組み合わせたCD47/PD-L1 mAbの治療活性を例示する。

【0375】

マウス代用CD47/PD-L1二重特異性BsAb3は上述されている。二重特異性BsAb3は、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）中の20mg/kgを週に3回、3週間投薬した。

30

【0376】

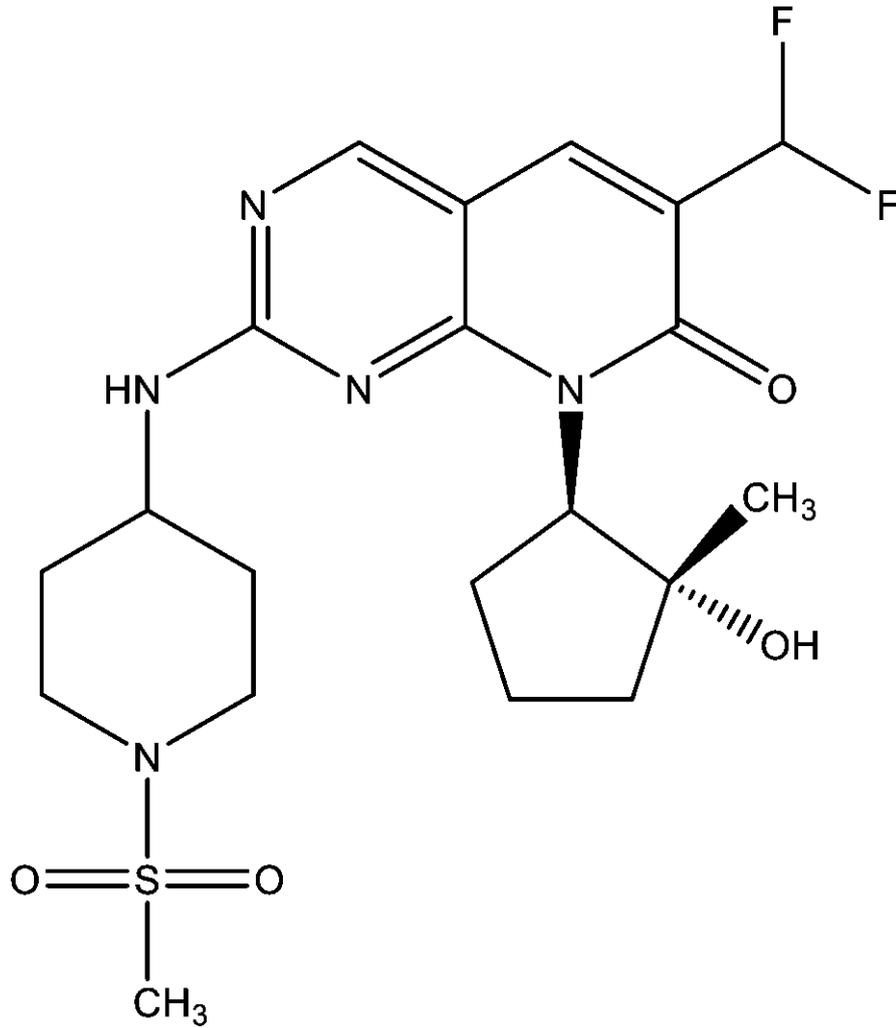
CDK2/4/6阻害剤はPF-06873600であった。PF-06873600、すなわち6-(ジフルオロメチル)-8-((1R,2R)-2-ヒドロキシ-2-メチルシクロペンチル)-2-(1-(メチルスルホニル)ピペリジン-4-イルアミノ)ピリド[2,3-d]ピリミジン-7(8H)-オンは、CDK2、CDK4、およびCDK6の強力かつ選択的な阻害剤であり、以下の構造を有する。

【0377】

40

50

【化 1】



10

20

30

【0378】

PF-06873600および薬学的に許容できるその塩は、2018年2月22日に公開の国際公開WO2018/033815号中に開示されている。この参考文献の内容は、その全体が本明細書中に参考として組み込まれている。

【0379】

6~8週齢の雌のC57BL/6マウスはJackson Laboratoriesから購入した。すべての動物はPfizerの無病原体動物施設に収容し、実験は施設動物実験委員会(IACUC)指針に従ったプロトコルに従って実施した。

【0380】

B16F10黒色腫細胞系はアメリカ培養細胞系統保存機関(ATCC)から購入した。指数増殖期で増殖中の無病原体細胞を収穫して腫瘍接種に使用した。

40

【0381】

C57BL/6マウスを、0.1mLのPBS中の 0.5×10^5 個のB16F10細胞を用いて、右脇腹に皮下接種した。腫瘍が標的サイズに達した際、マウスを処置群へとランダム化した。処置はランダム化と同じ日に開始した。腫瘍サイズはカリパスを使用して二次元において様々な間隔で測定し、体積は以下の式を使用して立方ミリメートルで計算した： $V = 0.5 L \times W^2$ [式中、Lは腫瘍の最長直径であり、WはLに垂直な直径である]。体重も記録した。

【0382】

結果を図8に示す。図8に示すように、CD47/PD-L1二重特異性BsAb3(

50

黒三角形)およびCDK2/4/6阻害剤PF-06873600(白四角)の処置はどちらも、アイソタイプ対照(黒丸)と比較してB16F10黒色腫瘍成長を遅延させ、CD47/PD-L1二重特異性mAbとPF-06873600(白菱形)との組合せは、CD47/PD-L1二重特異性mAbおよびPF-06873600の薬剤の個々よりも高い有効性を有していた。

【0383】

CD47/PD-L1二重特異性mAbとCDK2/4/6阻害剤との組合せ処置で観察された有効性の増加は、PF-06873600の投与に応答した、フローサイトメトリーによってB16F10腫瘍細胞上のCD47およびPD-L1の発現の増加を示したデータと一致している(データ示さず)。

10

【0384】

開示した教示は様々な応用、方法、キット、および組成物を参照して記載されているが、本明細書および以下の特許請求した発明の教示から逸脱せずに様々な変化および改変を行うことができることが理解されよう。前述の実施例は、開示した教示をより良好に例示するために提供し、本明細書中に提示する教示の範囲を制限することを意図しない。本教示をこれらの例示的な実施形態の観点から記載したが、当業者は、これらの例示的な実施形態の数々の変形および改変が必要以上の実験を行わずに可能であることを容易に理解するであろう。すべてのそのような変形および改変が本教示の範囲内にある。

【0385】

特許、特許出願、論文、教科書など、およびそれ中に引用されている参考文献を含む、本明細書中に引用したすべての参考文献は、既に組み込まれていない場合に限り、その全体が本明細書中に参考として組み込まれている。それだけには限定されないが定義した用語、用語の用法、記載した技法などを含めた、組み込まれた文献および同様の資料のうちの1つまたは複数が本出願とは異なるまたは矛盾する場合は、本出願が支配する。

20

【0386】

前述の説明および実施例は本発明の特定の具体的な実施形態を詳述し、本発明者らによって企図される最良の形態を記載する。しかし、前述の説明が文面上はいかに詳細であるように見えようとも、本発明を多数の方法で実施してよく、本発明は添付の特許請求の範囲およびその任意の均等物に従って解釈されるべきであることが理解されたい。

【0387】

実施形態が言葉「含む(comprising)」を用いて本明細書中に記載されている場合はいつでも、「からなる(consisting of)」および/または「から本質的になる」に関して記載されるその他の類似の実施形態も提供されることを理解されよう。

30

【0388】

本発明の態様または実施形態がマーカッシュ群または他の代替物の群分けの観点から記載されている場合、本発明は、全体として列挙される群全体だけでなく、群のそれぞれのメンバー個々および主群のすべての可能な部分群、および群メンバーのうちの1つまたは複数が存在しない主群も包含する。本発明はまた、特許請求した発明中の群メンバーの任意の1つまたは複数の明確な排除も想定する。

40

【0389】

本明細書中に記載の処置の方法に言及する実施形態では、そのような実施形態は、その処置において使用するため、またはその処置において使用するための医薬品の製造のための更なる実施形態でもある。

【0390】

別段に定義しない限りは、本明細書中で使用するすべての技術用語および科学用語は、本発明が属する分野の技術者によって一般的に理解されているものと同じ意味を有する。矛盾する場合は、定義を含めて本明細書が支配する。本明細書および特許請求の範囲全体にわたって、単語「含む(comprise)」、または「含む(comprises)」もしくは「含むこと(comprising)」などの変形は、記述した整数または整

50

数群の包含を暗示するが、任意の他の整数または整数群の排除を暗示しないことを理解されたい。内容によりそうでないことが必要でない限りは、単数形の用語は複数形を含み、複数形の用語は単数形を含む。用語「たとえば(e.g.)」または「たとえば(for example)」に続く任意の例は、網羅的または限定的であることを意味しない。複数の選択肢の列挙(たとえば「A、B、またはC」)のコンテキストにおいて使用する場合の用語「または」は、内容により明らかにそうでないと指示されない限りは、選択肢のうちの任意の1つまたは複数を含むと解釈されるべきである。

【0391】

例示的な方法および材料を本明細書中に記載するが、本明細書中に記載のものに類似または等価な方法および材料も、本発明の実施または試験において使用することができる。材料、方法、および実施例は例示的のみであり、限定することを意図しない。

10

【受託番号】

【0392】

ATCC PTA - 126910
 ATCC PTA - 126911
 ATCC PTA - 126912

【図面】

【図1】

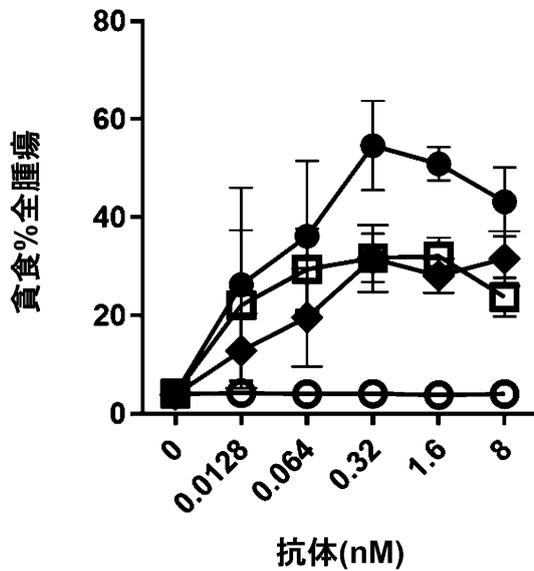
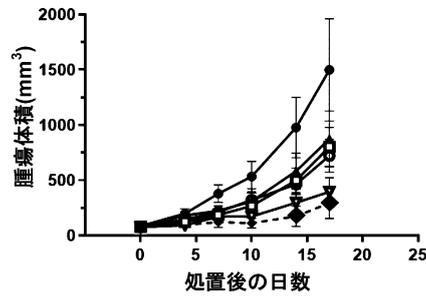


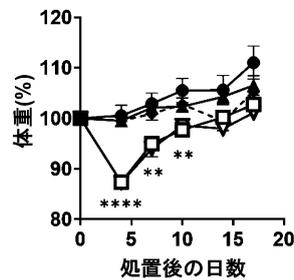
図1

【図2-1】



20

図2A



30

図2B

40

【 図 2 - 2 】

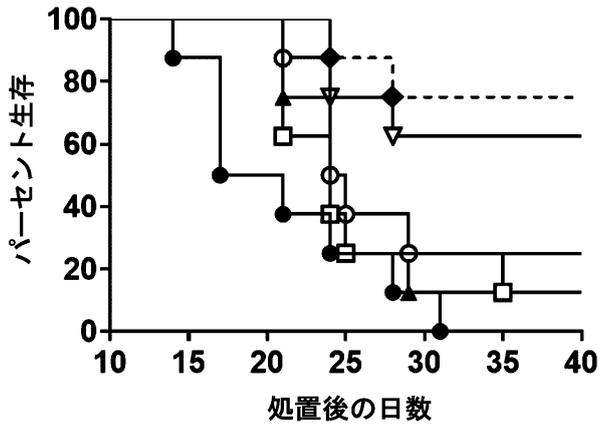


図 2C

【 図 3 】

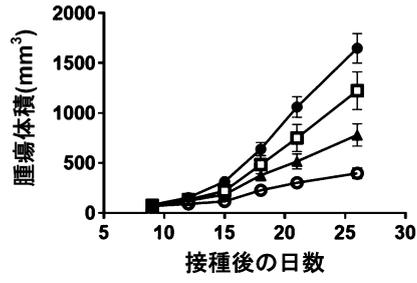


図 3A

10

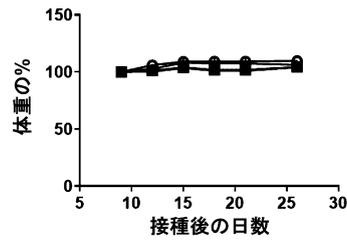


図 3B

20

【 図 4 】

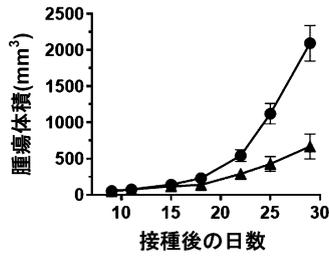


図 4A

【 図 5 - 1 】

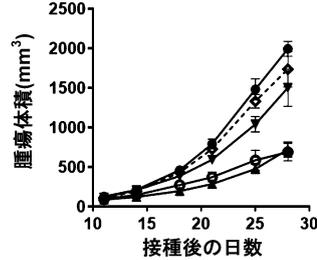


図 5A

30

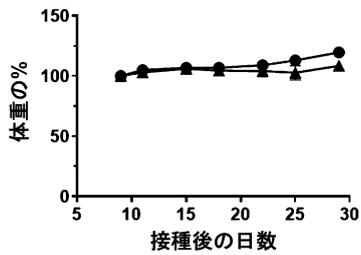


図 4B

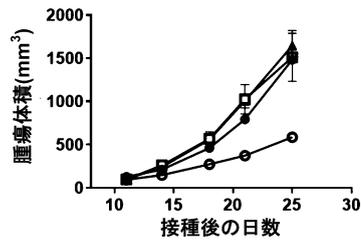


図 5B

40

50

【 図 5 - 2 】

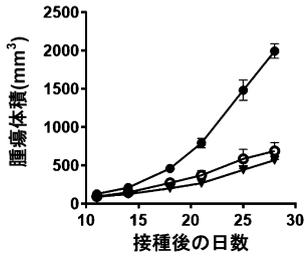


図 5C

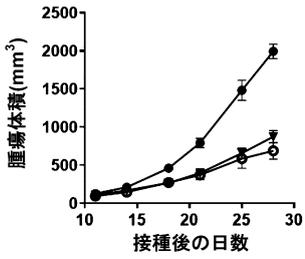


図 5D

【 図 7 】

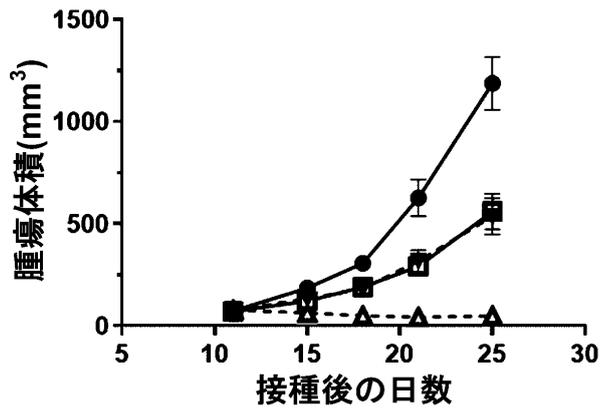


図 7

【 図 6 】

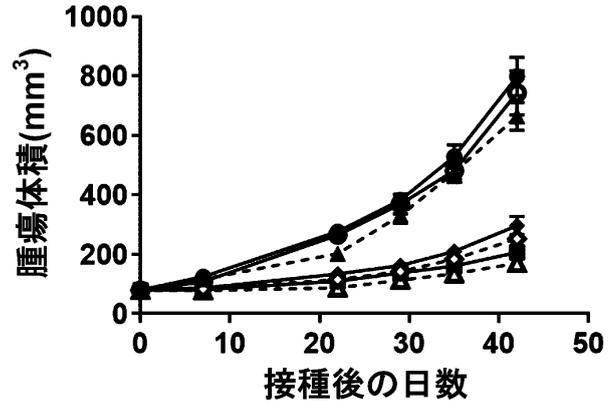


図 6

【 図 8 】

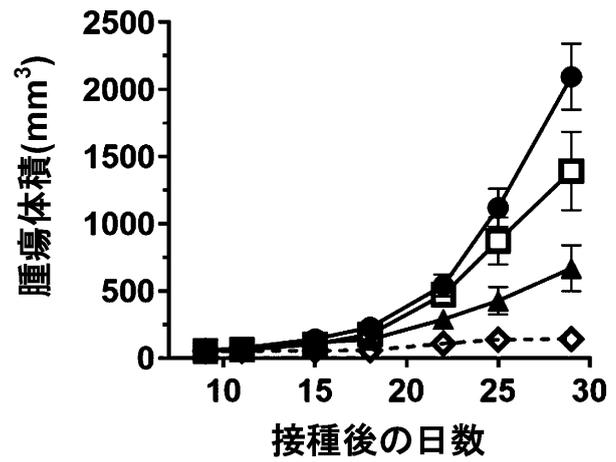


図 8

10

20

30

40

50

【配列表】

2022551345000001.app

10

20

30

40

50

【手続補正書】

【提出日】令和4年10月4日(2022.10.4)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

CD47と特異的に結合し、重鎖可変領域(VH)および軽鎖可変領域(VL)を含む単離抗体であって、VHが、(i)配列番号13、14、または15のアミノ酸配列を含むVH相補性決定領域(CDR)1、(ii)配列番号16または17のアミノ酸配列を含むVH CDR2、(iii)配列番号18のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含み、VLが、(iv)配列番号19のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(v)配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(vi)配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含む、単離抗体。

【請求項2】

VHが配列番号1のアミノ酸配列を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

VLが配列番号2のアミノ酸配列を含む、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】

配列番号1に示すアミノ酸配列を含む重鎖可変領域(VH)および配列番号2に示すアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域(VL)を含む、CD47と特異的に結合する単離抗体。

【請求項5】

二重特異性抗体である、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項6】

二重特異性抗体がCD47およびPD-L1と特異的に結合する、請求項5に記載の抗体。

【請求項7】

第1の抗原結合部分および第2の抗原結合部分を含み、第1の抗原結合部分がCD47と特異的に結合し、第2の抗原結合部分がPD-L1と特異的に結合し、第1の抗原結合部分がVHおよびVLを含み、第2の抗原結合部分がVHおよびVLを含み、第1の抗原結合部分のVLのアミノ酸配列および第2の抗原結合部分のVLのアミノ酸配列が同じアミノ酸配列を有する、請求項6に記載の抗体。

【請求項8】

第1の抗原結合部分のVLのアミノ酸配列および第2の抗原結合部分のVLのアミノ酸配列が配列番号2に示すアミノ酸配列を含む、請求項7に記載の抗体。

【請求項9】

CD47と特異的に結合する第1の抗原結合部分およびPD-L1と特異的に結合する第2の抗原結合部分を含む単離二重特異性抗体であって、第1の抗原結合部分がVHおよびVLを含み、第2の抗原結合部分がVHおよびVLを含み、

a)第1の抗原結合部分VHが、(i)配列番号13、14、または15のアミノ酸配列を含むVH CDR1、(ii)配列番号16または17のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および(iii)配列番号18のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含む、

b)第1の抗原結合部分VLが、(i)配列番号19のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含む、

c)第2の抗原結合部分VHが、(i)配列番号41、42、または43のアミノ酸配列を含むVH CDR1、(ii)配列番号44または45のアミノ酸配列を含むVH CDR2、および(iii)配列番号46のアミノ酸配列を含むVH CDR3を含む、

10

20

30

40

50

ならびに

d) 第2の抗原結合部分VLが、(i)配列番号19のアミノ酸配列を含むVL CDR1、(ii)配列番号20のアミノ酸配列を含むVL CDR2、および(iii)配列番号21のアミノ酸配列を含むVL CDR3を含む単離二重特異性抗体。

【請求項10】

CD47と特異的に結合する第1の抗原結合部分およびPD-L1と特異的に結合する第2の抗原結合部分を含む単離二重特異性抗体であって、配列番号1に示すアミノ酸配列を含む第1の抗原結合部分VH、配列番号2に示すアミノ酸配列を含む第1の抗原結合部分VL、配列番号4に示すアミノ酸配列を含む第2の抗原結合部分VH、および配列番号2に示すアミノ酸配列を含む第2の抗原結合部分VLを含む、単離二重特異性抗体。

10

【請求項11】

Fcドメインを含む、請求項5から10のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項12】

FcドメインがIgG1 Fcドメイン、IgG2 Fcドメイン、またはIgG4 Fcドメインである、請求項11に記載の二重特異性抗体。

【請求項13】

Fcドメインの第1のFc鎖および第2のFc鎖が、第1のFc鎖と第2のFc鎖の会合を促進する1つまたは複数の修飾を含有する、請求項11または12に記載の二重特異性抗体。

20

【請求項14】

配列番号61のアミノ酸配列を含む抗CD47重鎖を含み、配列番号64のアミノ酸配列を含む抗PD-L1重鎖を含む、請求項11から13のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項15】

配列番号62のアミノ酸配列を含む抗CD47軽鎖および配列番号62のアミノ酸配列を含む抗PD-L1軽鎖をさらに含む、請求項11から14のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項16】

第1の抗体重鎖、第2の抗体重鎖、第1の抗体軽鎖、および第2の抗体軽鎖を含み、第1の抗体重鎖が配列番号61のアミノ酸配列を含み、第2の抗体重鎖が配列番号64のアミノ酸配列を含み、第1の抗体軽鎖および第2の抗体軽鎖がどちらも配列番号62のアミノ酸配列を含む、CD47およびPD-L1と特異的に結合する単離二重特異性抗体。

30

【請求項17】

PD-L1に対する抗PD-L1抗原結合部分の親和性がCD47に対する抗CD47抗原結合部分の親和性よりも高い、請求項5から16のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項18】

治療上有効な量の請求項1から4のいずれか一項に記載の抗体または請求項5から17のいずれか一項に記載の二重特異性抗体と、薬学的に許容できる担体とを含む医薬組成物。

40

【請求項19】

請求項1から16のいずれか一項に記載のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を含む単離ポリヌクレオチド。

【請求項20】

請求項19に記載のポリヌクレオチドを含むベクター。

【請求項21】

請求項1から16のいずれか一項に記載のアミノ酸配列をコードしているヌクレオチド配列を含む組換えポリヌクレオチドを含む宿主細胞。

50

【請求項 2 2】

請求項 2 1 に記載の宿主細胞を、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体または請求項 5 から 1 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の産生をもたらす条件下で培養することと、産生された抗体または二重特異性抗体を精製することを含む、抗体または二重特異性抗体を産生させる方法。

【請求項 2 3】

癌の処置において使用するための医薬品の製造における、請求項 1 から 4 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 5 から 1 7 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、請求項 1 8 に記載の医薬組成物、請求項 1 9 に記載のポリヌクレオチド、請求項 2 0 に記載のベクター、または請求項 2 1 に記載の宿主細胞の使用。

10

【請求項 2 4】

癌の処置のための、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 5】

第 2 の治療剤と組み合わせて使用するための、請求項 1 8 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 6】

癌が、胃癌、肉腫、リンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、頭頸部癌、胸腺癌、上皮癌、唾液癌、肝臓癌、胃癌、甲状腺癌、肺癌（たとえば非小細胞肺癌を含む）、卵巣癌、乳癌、前立腺癌、食道癌、膀胱癌、神経膠腫、白血病、多発性骨髄腫、腎細胞癌、膀胱癌、子宮頸癌、絨毛癌、結腸癌、口腔癌、膠芽細胞腫、皮膚癌、または黒色腫である、請求項 2 4 に記載の医薬組成物。

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IB2020/061896

| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61P35/00 A61K31/00 ADD. | | |
|--|---|--|
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61P A61K | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, WPI Data | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | WO 2019/109876 A1 (BEIJING HANMI PHARMACEUTICAL CO LTD [CN]) 13 June 2019 (2019-06-13) The whole document, in particular the antibodies of the examples ----- | 1-4,9-34 |
| X | WO 2019/179434 A1 (WUXI BIOLOGICS SHANGHAI CO LTD [CN]; WUXI BIOLOGICS IRELAND LTD [IE]) 26 September 2019 (2019-09-26) The whole document, in particular, the examples of bispecific CD47/PD-L1 antibodies ----- -/-- | 1-4,9-34 |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | |
| * Special categories of cited documents : | | |
| *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier application or patent but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art *&* document member of the same patent family |
| Date of the actual completion of the international search 25 February 2021 | | Date of mailing of the international search report 29/04/2021 |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | | Authorized officer Chapman, Rob |

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

| |
|---|
| International application No PCT/IB2020/061896 |
|---|

| C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT | | |
|--|--|-----------------------|
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
| X | XIAOJUAN LIU ET AL: "Dual Targeting of Innate and Adaptive Checkpoints on Tumor Cells Limits Immune Evasion", CELL REPORTS, vol. 24, no. 8, 21 August 2018 (2018-08-21), pages 2101-2111, XP055593953, US ISSN: 2211-1247, DOI: 10.1016/j.celrep.2018.07.062 The whole document, in particular, the results.; figure 3 ----- | 1-4,9-34 |
| A | CAMILLA DE NARDIS ET AL: "A new approach for generating bispecific antibodies based on a common light chain format and the stable architecture of human immunoglobulin G 1", JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 292, no. 35, 1 September 2017 (2017-09-01), pages 14706-14717, XP055403663, ISSN: 0021-9258, DOI: 10.1074/jbc.M117.793497 the whole document ----- | 1-4,9-24 |
| A | SUURS FRANS V ET AL: "A review of bispecific antibodies and antibody constructs in oncology and clinical challenges", PHARMACOLOGY AND THERAPEUTICS, ELSEVIER, GB, vol. 201, 24 April 2019 (2019-04-24), pages 103-119, XP085764019, ISSN: 0163-7258, DOI: 10.1016/J.PHARMTHERA.2019.04.006 [retrieved on 2019-04-24] cited in the application the whole document ----- | 1-4,9-24 |
| A | WO 2010/032060 A1 (MEDIMMUNE LLC [US]; MEDIMMUNE LTD [GB] ET AL.) 25 March 2010 (2010-03-25) sequences 64,66 ----- | 1 |
| A | US 2019/359705 A1 (CHI ELLEN [US] ET AL) 28 November 2019 (2019-11-28) sequence 29 ----- | 1 |

1

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

page 2 of 2

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2020/061896

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

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

a. forming part of the international application as filed:

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

on paper or in the form of an image file.

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

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

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

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

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

3. Additional comments:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/IB2020/061896

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

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

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

- 2. Claims Nos.: **1-3, 9-34(all partially)**
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210

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

10

20

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

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

see additional sheet

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

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

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

- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:
4(completely); 1-3, 9-34(partially)

30

40

Remark on Protest

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

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

10

- 1. claims: 4(completely); 1-3, 9-34(partially)

An anti-CD47 antibody (CD47 P01A11 75VH) according to SEQ ID NO: (HCDR1) 13,14,15; (HCDR2) 16,17; (HCDR3) 18, and related subject-matter

- 2. claims: 1-3, 9-34(all partially)

An anti-CD47 antibody (CD47 P01A11 479VH) according to SEQ ID NO: (HCDR1) 14,22,23; (HCDR2) 16,17; (HCDR3) 24, and related subject-matter

20

- 3. claims: 1-3, 9-34(all partially)

An anti-CD47 antibody (CD47 P01A11 parentVH) according to SEQ ID NO: (HCDR1) 25,26,27; (HCDR2) 28,29; (HCDR3) 30, and related subject-matter

- 4. claims: 1-3, 9-34(all partially)

An anti-CD47 antibody (CD47 P14D04 parentVH) according to SEQ ID NO: (HCDR1) 31,32,33; (HCDR2) 34,35 (HCDR3) 36, and related subject-matter

- 5. claims: 1-3, 9-34(all partially)

An anti-CD47 antibody (CD47 P01A08 parentVH) according to SEQ ID NO: (HCDR1) 37,38,39; (HCDR2) 16,17 (HCDR3) 40, and related subject-matter

30

- 6-10. claims: 5-34(partially)

An isolated antibody that specifically binds to PD-L1 and comprises a heavy chain variable region (VH) and a light chain variable region (VL), wherein the VH comprises (i) a VH complementarity determining region (CDR) 1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 41, 42, 43, 47, 48, or 49; (ii) a VH CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 44, 45, 50, 51, 58, or 59; and (iii) a VH CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 46, 52, 56, 57, or 60; (iv) a VL CDR1 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 19 or 53; (v) a VL CDR2 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 20 or 54; and (vi) a VL CDR3 comprising the amino acid sequence of SEQ ID NO: 21 or 55.

40

50

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box II.2

10

Claims Nos.: 1-3, 9-34(all partially)

Present claim 1 relates to an extremely large number of possible compounds (3360 combinations of CDRs). Support and disclosure in the sense of Article 6 and 5 PCT is to be found however for only a very small proportion of the compounds claimed, see Tables 1 and 2.

The non-compliance with the substantive provisions is to such an extent, that the search was performed taking into consideration the non-compliance in determining the extent of the search of claim 1 (PCT Guidelines 9.19 and 9.23).

The search of claim 1 was restricted to those claimed compounds which appear to be supported by nature of their CDRs calculated by different methods (Chothia, Kabat etc).

20

The inventions have also been formulated according to Table 2.

The applicant/representative was informed that the search is the responsibility of the ISA under Chapter I of the PCT, the procedure before the ISA is closed and that there is no provision in the PCT for a review of or an appeal against the findings of the ISA by the IPEA.

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

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IB2020/061896

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2019109876 A1 | 13-06-2019 | AU 2018378529 A1 | 18-06-2020 |
| | | BR 112020011295 A2 | 24-11-2020 |
| | | CA 3084626 A1 | 13-06-2019 |
| | | CN 111615521 A | 01-09-2020 |
| | | EA 202091364 A1 | 13-10-2020 |
| | | EP 3722322 A1 | 14-10-2020 |
| | | JP 2021505195 A | 18-02-2021 |
| | | KR 20200093639 A | 05-08-2020 |
| | | SG 11202005216X A | 29-07-2020 |
| | | WO 2019109876 A1 | 13-06-2019 |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO 2019179434 A1 | 26-09-2019 | NONE | |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| WO 2010032060 A1 | 25-03-2010 | AU 2009294415 A1 | 25-03-2010 |
| | | CA 2735900 A1 | 25-03-2010 |
| | | CN 102264763 A | 30-11-2011 |
| | | EP 2344536 A1 | 20-07-2011 |
| | | EP 2927244 A1 | 07-10-2015 |
| | | HK 1216028 A1 | 07-10-2016 |
| | | JP 5778577 B2 | 16-09-2015 |
| | | JP 2012502650 A | 02-02-2012 |
| | | KR 20110057244 A | 31-05-2011 |
| | | RU 2011115117 A | 27-10-2012 |
| | | US 2010196385 A1 | 05-08-2010 |
| | | US 2012195905 A1 | 02-08-2012 |
| | | US 2014206853 A1 | 24-07-2014 |
| WO 2010032060 A1 | 25-03-2010 | | |
| ----- | ----- | ----- | ----- |
| US 2019359705 A1 | 28-11-2019 | AR 100944 A1 | 09-11-2016 |
| | | AU 2015280275 A1 | 05-01-2017 |
| | | BR 112016030202 A2 | 14-11-2017 |
| | | CA 2952965 A1 | 30-12-2015 |
| | | CL 2016003291 A1 | 08-09-2017 |
| | | CN 106573053 A | 19-04-2017 |
| | | CR 20160593 A | 21-02-2017 |
| | | DO P2016000334 A | 15-09-2017 |
| | | EA 201790057 A1 | 31-05-2017 |
| | | EC SP17003946 A | 30-04-2018 |
| | | EP 3157564 A1 | 26-04-2017 |
| | | IL 249477 A | 30-09-2020 |
| | | JO 3607 B1 | 27-08-2020 |
| | | JP 6756625 B2 | 16-09-2020 |
| | | JP 2017528118 A | 28-09-2017 |
| | | JP 2020073499 A | 14-05-2020 |
| | | KR 20170020477 A | 22-02-2017 |
| | | PE 20170519 A1 | 11-05-2017 |
| | | PH 12016502535 A1 | 10-04-2017 |
| | | SG 11201610497R A | 27-01-2017 |
| | | SV 2016005352 A | 03-05-2017 |
| | | TW 201613967 A | 16-04-2016 |
| | | US 2015368338 A1 | 24-12-2015 |
| | | US 2019106489 A1 | 11-04-2019 |
| | | US 2019359705 A1 | 28-11-2019 |
| | | UY 36187 A | 08-01-2016 |
| | | WO 2015200165 A1 | 30-12-2015 |
| ZA 201700483 B | 19-12-2018 | | |
| ----- | ----- | ----- | ----- |

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

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 P 21/08 (2006.01)
 A 6 1 K 39/395 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 K 31/7088(2006.01)
 A 6 1 K 35/76 (2015.01)
 A 6 1 K 35/12 (2015.01)
 A 6 1 K 45/00 (2006.01)

F I

C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/10
 C 1 2 P 21/08
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 K 39/395
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 K 31/7088
 A 6 1 K 35/76
 A 6 1 K 35/12
 A 6 1 K 45/00

テーマコード (参考)

4 C 0 8 7
 4 H 0 4 5

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

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ市 サイエンス・センター・ドライブ
 1 0 7 7 7 ファイザー・インク内

(72)発明者

シー シュン チェン

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ市 サイエンス・センター・ドライブ
 1 0 7 7 7 ファイザー・インク内

(72)発明者

シェン デイン

アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州 フォスター・シティ市 チェサピーク・アヴェニ
 ュー 3 6 2

(72)発明者

パウエル カミール ドミニク

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ市 サイエンス・センター・ドライブ
 1 0 7 7 7 ファイザー・インク内

(72)発明者

シャーラム サレク アーダカニ

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ市 サイエンス・センター・ドライブ
 1 0 7 7 7 ファイザー・インク内

(72)発明者

ジェシカ リン スタンフィールド

アメリカ合衆国 9 2 1 2 1 カリフォルニア州 サンディエゴ市 サイエンス・センター・ドライブ
 1 0 7 7 7 ファイザー・インク内

(72)発明者

トーマス ジョン ヴァン ブラーコム

アメリカ合衆国 9 4 6 1 1 カリフォルニア州 オークランド市 シェルトン・ドライブ 6 4 1 5

F ターム (参考)

4B064 AG27 CA02 CA05 CA06 CA08 CA10 CA19 CC24 DA01
 4B065 AA01X AA01Y AA57X AA57Y AA72X AA72Y AA83X AA83Y AA90X AA90Y
 AB01 AC14 BA02 CA25 CA44
 4C084 AA19 NA05 NA14 ZB26 ZB27
 4C085 AA13 AA14 CC22 CC23 DD62 EE01 EE03 GG01
 4C086 AA01 AA02 EA16 MA01 MA04 NA05 NA14 ZB26 ZB27
 4C087 AA01 AA02 BB65 BC83 MA02 NA05 NA14 ZB26 ZB27
 4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 FA72 FA74

【要約の続き】

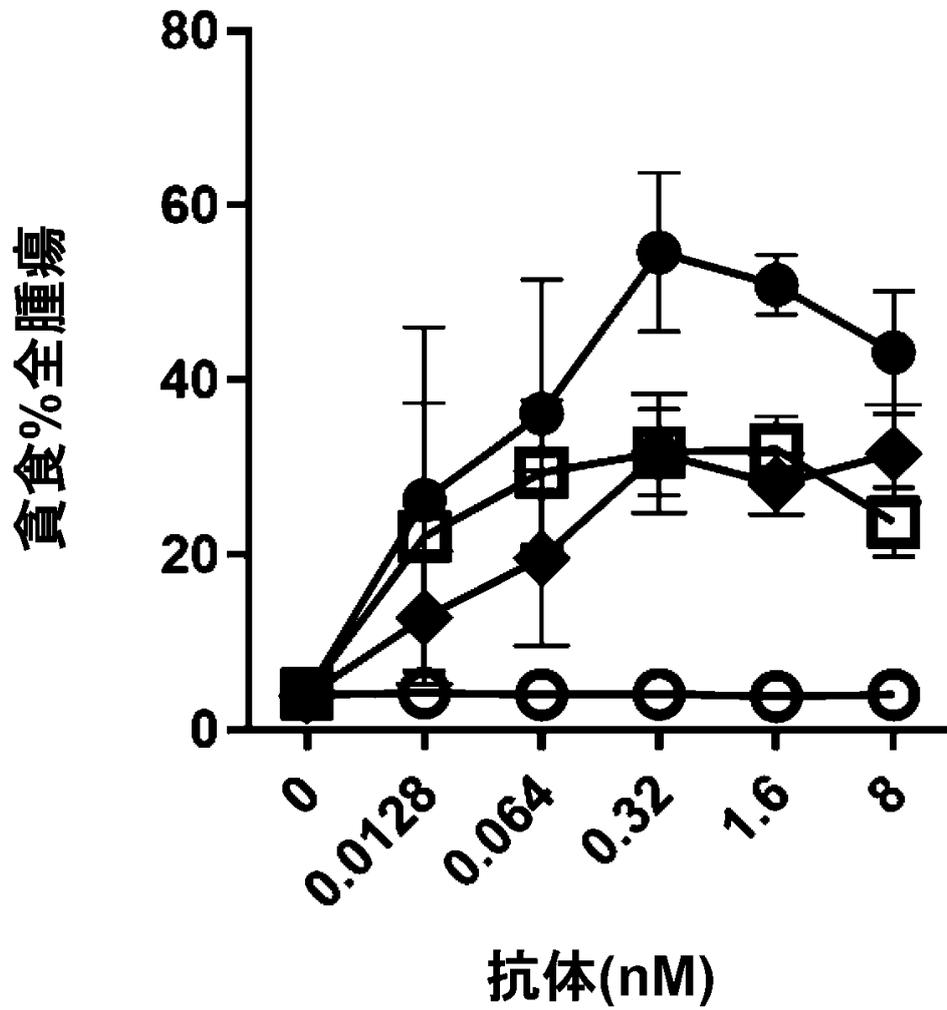


図1