

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7606706号  
(P7606706)

(45)発行日 令和6年12月26日(2024.12.26)

(24)登録日 令和6年12月18日(2024.12.18)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63 Z
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
請求項の数 13 (全48頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2021-539922(P2021-539922)	(73)特許権者	504389234
(86)(22)出願日	令和2年1月13日(2020.1.13)		イッサム リサーチ デベロップメント
(65)公表番号	特表2022-519341(P2022-519341 A)		カンパニー オブ ザ ヘプリュー ユニバーシティー オブ エルサレム エルティ
(43)公表日	令和4年3月23日(2022.3.23)		ーディー .
(86)国際出願番号	PCT/IL2020/050047		イスラエル国 エルサレム 9 1 3 9 0
(87)国際公開番号	WO2020/144697		ピーオーボックス 3 9 1 3 5 ギバラム
(87)国際公開日	令和2年7月16日(2020.7.16)		エドモンド ジュー サフラ キャンパス
審査請求日	令和5年1月10日(2023.1.10)		ハイテクパーク
(31)優先権主張番号	62/791,808	(73)特許権者	518064053
(32)優先日	平成31年1月13日(2019.1.13)		ユニバーシティー オブ リエカ ファカ
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		ルティー オブ メディシン
			クロアチア共和国, 5 1 0 0 0 リエカ
			, ビー . ブランチェッタ 2 0
		(74)代理人	100114775
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトネクチン - 2 に特異的な抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ネクチン - 2 に結合する抗体、または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体フラグメントであって、

前記抗体または抗体フラグメントが、

i . H C C D R 1 のアミノ酸配列が R F T M S ( 配列番号 1 ) であり、H C C D R 2 のアミノ酸配列が T I S S G G S Y T Y Y P D S V K G ( 配列番号 2 ) であり、H C C D R 3 のアミノ酸配列が D R D F Y G P Y Y A M D Y ( 配列番号 3 ) であり、L C C D R 1 のアミノ酸配列が K S S Q S L L N S G N Q K N Y L A ( 配列番号 4 ) であり、L C C D R 2 のアミノ酸配列が F A S T R E S ( 配列番号 5 ) であり、かつ L C C D R 3 のアミノ酸配列が Q Q H Y T T P L T ( 配列番号 6 ) である、6 つの C D R のセット ; および

i i . H C C D R 1 のアミノ酸配列が S Y W I H ( 配列番号 1 1 ) であり、H C C D R 2 のアミノ酸配列が A V Y P G N S D S N Y N Q K F K A ( 配列番号 1 2 ) であり、H C C D R 3 のアミノ酸配列が L V G T F D Y ( 配列番号 1 3 ) であり、L C C D R 1 のアミノ酸配列が K A S Q N V G I N V V ( 配列番号 1 4 ) であり、L C C D R 2 のアミノ酸配列が S A S Y R Y S ( 配列番号 1 5 ) であり、かつ L C C D R 3 のアミノ酸配列が Q Q Y N T N P F T ( 配列番号 1 6 ) である、6 つの C D R のセット ; からなる群から選択される C D R セットを含む、抗体または抗体フラグメント。

10

## 【請求項 2】

重鎖および軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号 7 に示されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖が配列番号 8 に示されるアミノ酸配列を含む；または

重鎖および軽鎖を含み、前記重鎖が配列番号 17 に示されるアミノ酸配列を含み、前記軽鎖が配列番号 18 に示されるアミノ酸配列を含む；

請求項 1 に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 3】

請求項 1 ~ 2 のいずれか一項に記載の抗体フラグメントであって、単鎖 Fv ( s c F v ) である、抗体フラグメント。

## 【請求項 4】

請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメントの重鎖および軽鎖領域の配列をコードする、ポリヌクレオチド。

## 【請求項 5】

請求項 4 に記載のポリヌクレオチドを含む、細胞。

## 【請求項 6】

細胞毒性部分、放射性部分、または識別可能な部分に取り付けられた、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメント。

## 【請求項 7】

有効成分として請求項 1 ~ 3 および 6 のいずれか一項に記載の抗体またはそのフラグメントを少なくとも 1 つ含み、薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、塩、または担体を含む、医薬組成物。

## 【請求項 8】

対象における癌の治療に使用するための、あるいはネクチン - 2 の T I G I T または C D 1 1 2 R への結合を阻害することによって免疫系を調節するのに使用するための、あるいは対象におけるウイルス感染を防止または治療するのに使用するための、請求項 7 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 9】

対象における癌の治療における使用のための、請求項 8 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 10】

前記使用が、手術、化学療法、放射線療法、および免疫療法から選択される追加の抗癌療法をさらに含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 11】

前記使用が、追加の免疫調節剤、活性化リンパ球細胞、キナーゼ阻害剤、化学療法剤、または任意の他の抗癌剤を投与することを含む、請求項 9 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 12】

ネクチン - 2 と結合することができる細胞外部分を含む、キメラ抗原受容体 ( C A R ) であって、前記細胞外部分が、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体または抗体フラグメントを少なくとも 1 つ含む、キメラ抗原受容体 ( C A R ) 。

## 【請求項 13】

C D 8 ストードメイン、C D 2 8 T M ドメイン、4 1 B B ドメインおよび C D 3 ドメインを含む請求項 12 に記載の C A R を発現するように操作された、T 細胞または N K 細胞の集団。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は免疫療法の分野にあり、ヒトタンパク質ネクチン - 2 ( C D 1 1 2 ) と結合する抗体およびそのフラグメント、これらの抗体およびフラグメントをコードするポリヌクレオチド配列、ならびにこれらを生産する細胞に関する。本発明はさらに、これらの抗体およびフラグメントを含む治療用および診断用組成物、ならびにこれらを使用して疾患、特に癌を治療および診断する方法に関する。

10

20

30

40

50

## 【背景技術】

## 【0002】

癌免疫療法は、例えば、腫瘍細胞上の抗原に特異的な抗体による、抗原提示細胞と腫瘍細胞との融合による、または抗腫瘍T細胞の特異的活性化による治療によって抗腫瘍免疫応答を生成および増強するために利用される。患者における腫瘍細胞に対して免疫細胞（例えば、T細胞）を動員する能力は、これまで不治であると考えられていた癌の種類および転移と戦う治療法を提供する。

## 【0003】

T細胞仲介免疫応答には、免疫応答の程度を制御する共刺激シグナルと共抑制シグナルとの間のバランスによって調節される複数の連続したステップが含まれる。免疫チェックポイントと呼ばれる抑制性シグナルは、自己寛容の維持および免疫介在性の二次的組織損傷の制限のために重要である。これらの抑制性シグナルは、感染または免疫誘発が解消、悪化、または持続するにつれて変化し、これらの変化はT細胞の応答に影響を及ぼして免疫応答を再形成する。

## 【0004】

免疫チェックポイントタンパク質の発現は腫瘍によって変更される。例えば、癌細胞表面でのプログラム細胞死リガンド1（PD-L1）のアップレギュレーションにより、T細胞で発現するチェックポイント分子PD-1に結合することができる。これは、そうでなければ腫瘍細胞を攻撃し、腫瘍細胞が宿主免疫系を回避することを可能にし得るT細胞の阻害をもたらす。したがって、免疫チェックポイントは、癌に対する機能的な細胞免疫の活性化に対する重大な障壁を示す。したがって、T細胞上の阻害リガンドに特異的な拮抗抗体（例えば、PD-1）は、癌療法で使用されている免疫チェックポイントに対する標的化薬剤の例である（例えば、ニボルマブおよびペムブロリズマブ）。免疫チェックポイント分子に関する別の例は、IgおよびITIMドメインを有するT細胞免疫受容体（TIGIT）である。TIGITは、T細胞およびナチュラルキラー細胞（NK細胞）を含む様々な免疫細胞で発現される共抑制性分子である。TIGITは、ポリオウイルス受容体（PVR）と、およびネクチン-2と高い親和性で結合する。

## 【0005】

ネクチン-2は、ポリオウイルス受容体関連タンパク質2、ポリオウイルス受容体様2、CD112、またはPRR-2とも呼ばれ、2つのIg様C2型ドメインとIg様V型ドメインと、を有する1回膜貫通糖タンパク質である。ネクチン-2は、細胞外マトリックス分子への細胞接着の媒介に関与し、接着結合の原形質膜成分の1つとして機能する。また、ネクチン-2は、単純ヘルペスウイルスおよび仮性狂犬病ウイルスの特定の変異株の侵入受容体としても機能し、これらのウイルスの細胞から細胞への拡散に関与している。この遺伝子の変異は、多発性硬化症の重症度の違いに関連付けられている。重要なことに、ネクチン-2はT細胞シグナル伝達の調節因子としても機能し得る。ネクチン-2は、それが結合する受容体に応じて、T細胞機能の共刺激因子または共阻害因子のいずれかであり得る。CD226（DNAM-1）に結合すると、これは、T細胞増殖と、IL-2、およびIFNを含むサイトカイン産生とを刺激し、PVRIG（CD112R）、および/またはTIGITと相互作用すると、T細胞増殖を阻害する。これらの2つの相反する相互作用は競合的である。

## 【0006】

ネクチン-2は、乳癌および卵巣癌を含む様々な腫瘍で過剰発現していることが示された（Oshima et al. Molecular Cancer 2013）。腫瘍細胞にネクチン-2が存在すると、予後不良およびT細胞の活性の低下をもたらす（Stamm et al. Oncogene 2018）。

## 【0007】

米国特許出願第2017/0037133号は、血液媒介性癌、特に急性骨髄性白血病（AML）の治療法で使用するためのCD112（ネクチン-2、PVR L2）、CD155（PVR）、ガレクチン-9、TIM-3および/またはTIGITに対する阻害剤

10

20

30

40

50

を開示している。この阻害剤は抗体構築物であり得る。

【 0 0 0 8 】

単独で、または他の薬剤と組み合わせて、腫瘍またはウイルス感染細胞を攻撃するために免疫系の細胞を増強し得る、追加のより効果的で、特異的で、安全および/または安定な薬剤を提供するという満たされていない必要性がある。C D 1 1 2 R および T I G I T へのネクチン 2 の結合を阻害するモノクローナル抗体が、そのような薬剤であり得る。

【発明の概要】

【 0 0 0 9 】

本発明は、ネクチン - 2 タンパク質 ( C D 1 1 2 ) を認識し、I g および I T I M ドメインを有する T 細胞免疫受容体 ( T I G I T ) および C D 1 1 2 R ( P V R I G ) とのその結合を防止し、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞および T 細胞などのリンパ球での抑制活性を阻害する抗体およびそのフラグメントを提供する。本明細書に開示される抗ネクチン - 2 抗体は、癌細胞上に存在するネクチン - 2 に結合することができる。これらの抗体およびそのフラグメントは、C D R 配列の独自のセット、ヒトネクチン - 2 に対する高い親和性および高い特異性を有することによって特徴付けられ、単独療法および他の抗癌剤との併用として、腫瘍免疫回避と戦うために癌免疫療法で有用である。抗体はウイルス感染症の治療にも有用であり、癌の診断に使用することができる。本発明は、C A R - T 細胞および養子療法のためのそれらの使用方法をさらに含む。

【 0 0 1 0 】

本明細書に記載の高親和性抗ネクチン - 2 抗体は、T I G I T - および/または C D 1 1 2 R - ネクチン - 2 相互作用を遮断し、その後、T 細胞および N K 細胞の活性を回復することがここで開示される。本発明の抗体は、ヒトネクチン - 2 に非常に特異的である。これらの特性により、本発明のモノクローナル抗体は、癌免疫療法で使用するための貴重な候補となり、より少ない副作用でより低い用量の投与を可能にする。

【 0 0 1 1 】

有利には、本発明による抗ネクチン - 2 m A b は、抗 P D - 1 および抗 C T L A - 4 m A b によって誘導されるのと同様の方法で T 細胞増殖を誘導することが見出された。いくつかの抗ネクチン - 2 m A b と臨床的に承認された治療用抗 P D - 1 および抗 C T L A 4 の m A b との組み合わせは、個々の m A b のいずれかによって誘導される活性レベルを超える活性の有意な増加をもたらした。驚くべきことに、本明細書に記載の抗ネクチン - 2 m A b と抗 P D - 1 との組み合わせのいくつかは、腫瘍細胞の死滅における相乗効果を実証した。誘導効果は、ヒト末梢血単核細胞 ( P B M C ) および主に T 細胞で示された。加えて、ネクチン - 2 m A b は、標的癌細胞の存在下で N K 細胞の活性化を誘導することができた。さらに、いくつかの抗ネクチン - 2 抗体は、D N A M - 1 の共刺激シグナル伝達に対して遮断効果を有さなかったため、免疫誘導シグナルに対して有害な効果を有さなかったことが開示されている。加えて、本明細書に記載される抗体は、ヒトまたはカニクイザルネクチン - 2 タンパク質に対して非常に特異的であることが見出された。

【 0 0 1 2 】

本明細書に開示される抗ネクチン - 2 m A b は、抗癌免疫応答をさらに誘発し得る機能的重鎖 ( F c ) を有し得る。

【 0 0 1 3 】

本明細書に記載の抗ネクチン - 2 m A b のいくつかは、免疫に依存しない方法で腫瘍細胞の生存率を低下させることができる可能性がある。

【 0 0 1 4 】

一態様によれば、本発明は、ヒトネクチン - 2 に特異的に結合し、受容体 T I G I T および C D 1 1 2 R のうちの少なくとも 1 つへのその結合を阻害する抗体、または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体フラグメントを提供し、該抗体は、ヒトネクチン - 2 に対して少なくとも  $10^{-9}$  M の親和性を有する。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、T 細胞リンパ球および/またはナチュラルキラー ( N K ) 細胞とともに

10

20

30

40

50

、癌の治療で使用するため、ヒトネクチン - 2 のヒト T I G I T との、または C D 1 1 2 R との結合を阻害することができる抗体またはその抗体フラグメントを提供し、該抗体は、ヒトネクチン - 2 に対して少なくとも  $10^{-9}$  M の親和性を有する。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態によれば、抗体は、ヒトネクチン - 2 に特異的に結合し、T I G I T および C D 1 1 2 R へのその結合を阻害する。

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、

i . 配列番号 7 を含む重鎖 ( H C ) 可変領域の 3 つの相補性決定領域 ( C D R ) および配列番号 8 を含む軽鎖 ( L C ) 可変領域の 3 つの C D R 、または該抗体もしくはフラグメントの配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体、および

10

i i . 配列番号 1 7 を含む重鎖可変領域の 3 つの C D R および配列番号 1 8 を含む軽鎖可変領域の 3 つの C D R 、または該抗体もしくはフラグメントの配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体からなる群から選択される 6 つの C D R 配列のセットを含む。

【 0 0 1 8 】

所与の抗体分子の C D R 配列を決定するために当技術分野で知られているいくつかの方法があるが、標準的な明確な方法はない。抗体の重鎖および軽鎖可変領域からの C D R 配列の決定は当技術分野で知られている任意の方法に従って行うことができ、限定されないが、K A B A T、C h o t h i a、および I M G T として知られている方法が含まれる。選択された C D R のセットには、2 つ以上の方法で特定される配列を含み得、すなわち、例えば、いくつかの C D R 配列は K A B A T を使用して決定され、いくつかは I M G T を使用する。いくつかの実施形態によれば、m A b 可変領域の C D R 配列は、I M G T 法を使用して決定される。

20

【 0 0 1 9 】

いくつかの実施形態によれば、抗体またはフラグメントは、クローン 7 と示されるモノクローナル抗体の C D R 配列、すなわち、配列番号 7 に示される重鎖可変領域に含まれる 3 つの C D R 配列および配列番号 8 に示される軽鎖可変領域に含まれる 3 つの C D R 配列を含むか、あるいはクローン 1 1 に記載のモノクローナル抗体、すなわち、配列番号 1 7 に示される重鎖可変領域に含まれる 3 つの C D R 配列および配列番号 1 8 に示される軽鎖可変領域に含まれる 3 つの C D R 配列を含む。

30

【 0 0 2 0 】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 R F T M S ( 配列番号 1 ) を含む重鎖 C D R 1 を含む。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 T I S S G G S Y T Y Y P D S V K G ( 配列番号 2 ) を含む重鎖 C D R 2 を含む。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 D R D F Y G P Y Y A M D Y ( 配列番号 3 ) を含む重鎖 C D R 3 を含む。

【 0 0 2 1 】

ある特定の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、( i ) 配列 R F T M S ( 配列番号 1 ) を含む H C C D R 1、( i i ) 配列 T I S S G G S Y T Y Y P D S V K G ( 配列番号 2 ) を含む H C C D R 2、および ( i i i ) 配列 D R D F Y G P Y Y A M D Y ( 配列番号 3 ) を含む H C C D R 3 を含む。

40

【 0 0 2 2 】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 K S S Q S L L N S G N Q K N Y L A ( 配列番号 4 ) を含む軽鎖 C D R 1 を含む。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 F A S T R E S ( 配列番号 5 ) を含む軽鎖 C D R 2 を含む。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 Q Q H Y T T P L T ( 配列番号 6 ) を含む軽鎖 C D R 3 を含む。

【 0 0 2 3 】

ある特定の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、以下を含む：( i ) 配

50

列 K S S Q S L L N S G N Q K N Y L A (配列番号 4) を含む L C C D R 1、( i i ) 配列 F A S T R E S (配列番号 5) を含む L C C D R 2、および ( i i i ) 配列 Q Q H Y T T P L T (配列番号 6) を含む H C C D R 3 を含む。

#### 【 0 0 2 4 】

いくつかの特定の実施形態によれば、抗体またはフラグメントは、配列 R F T M S (配列番号 1) を含む重鎖 C D R 1、配列 T I S S G G S Y T Y P D S V K G (配列番号 2) を含む重鎖 C D R 2、配列 D R D F Y G P Y Y A M D Y (配列番号 3) を含む重鎖 C D R 3、配列 K S S Q S L L N S G N Q K N Y L A (配列番号 4) を含む軽鎖 C D R 1、配列 F A S T R E S (配列番号 5) を含む軽鎖 C D R 2、および配列 Q Q H Y T T P L T (配列番号 6) を含む軽鎖 C D R 3 を含むか、あるいは超可変領域 (H V R) 配列における 5 % 以下のアミノ酸置換、欠失、および / または挿入を含むそれらの類似体を含む。

10

#### 【 0 0 2 5 】

いくつかの特定の実施形態によれば、抗体またはフラグメントは、

- i . 配列番号 1 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、
- i i . 配列番号 2 に示される配列を有する重鎖 C D R 2、
- i i i . 配列番号 3 に示される配列を有する重鎖 C D R 3、
- i v . 配列番号 4 に示される配列を有する軽鎖 C D R 1、
- v . 配列番号 5 に示される配列を有する軽鎖 C D R 2、および
- v i . 配列番号 6 に示される配列を有する軽鎖 C D R 3、

からなる 6 つの C D R 配列のセットを含む。

20

#### 【 0 0 2 6 】

いくつかの実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号 7 に示される重鎖可変領域、あるいは重鎖可変領域配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体または誘導体を含む。

#### 【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号 8 に示される軽鎖可変領域、または軽鎖可変領域配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体を含む。

#### 【 0 0 2 8 】

特定の実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号 7 に示される配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 8 に示される配列を有する軽鎖可変領域、あるいは軽鎖および / または重鎖配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体を含む。

30

#### 【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態によれば、抗体またはフラグメントは、クローン 1 1 に示されるモノクローナル抗体の C D R 配列、すなわち、配列番号 1 7 に示される重鎖可変領域に含まれる 3 つの C D R 配列、および配列番号 1 8 に示される軽鎖可変領域に含まれる 3 つの C D R 配列を含む。

#### 【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 S Y W I H (配列番号 1 1) を含む重鎖 C D R 1 を含む。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 A V Y P G N S D S N Y N Q K F K A (配列番号 1 2) を含む重鎖 C D R 2 を含む。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 L V G T F D Y (配列番号 1 3) を含む重鎖 C D R 3 を含む。

40

#### 【 0 0 3 1 】

ある特定の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、( i ) 配列 S Y W I H (配列番号 1 1) を含む H C C D R 1、( i i ) 配列 A V Y P G N S D S N Y N Q K F K A (配列番号 1 2) を含む H C C D R 2、および ( i i i ) 配列 L V G T F D Y (配列番号 1 3) を含む H C C D R 3 を含む。

#### 【 0 0 3 2 】

50

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 K A S Q N V G I N V V (配列番号 14) を含む軽鎖 C D R 1 を含む。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 S A S Y R Y S (配列番号 15) を含む軽鎖 C D R 2 を含む。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、配列 Q Q Y N T N P F T (配列番号 16) を含む軽鎖 C D R 3 を含む。

【0033】

ある特定の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、(i) 配列 K A S Q N V G I N V V (配列番号 14) を含む L C C D R 1、(i i) 配列 S A S Y R Y S (配列番号 15) を含む L C C D R 2、および (i i i) 配列 Q Q Y N T N P F T (配列番号 16) を含む H C C D R 3 を含む。

10

【0034】

いくつかの特定の実施形態によれば、抗体またはフラグメントは、配列 S Y W I H (配列番号 11) を含む重鎖 C D R 1、配列 A V Y P G N S D S N Y N Q K F K A (配列番号 12) を含む重鎖 C D R 2、配列 L V G T F D Y (配列番号 13) を含む重鎖 C D R 3、配列 K A S Q N V G I N V V (配列番号 14) を含む軽鎖 C D R 1、配列 S A S Y R Y S (配列番号 15) を含む軽鎖 C D R 2、および配列 Q Q Y N T N P F T (配列番号 16) を含む軽鎖 C D R 3 を含むか、あるいは超可変領域 (H V R) 配列における 5 % 以下のアミノ酸置換、欠失、および / または挿入を含むそれらの類似体を含む。

【0035】

いくつかの特定の実施形態によれば、抗体またはフラグメントは、  
i . 配列番号 11 に示される配列を有する重鎖 C D R 1、  
i i . 配列番号 12 に示される配列を有する重鎖 C D R 2、  
i i i . 配列番号 13 に示される配列を有する重鎖 C D R 3、  
i v . 配列番号 14 で示される配列を有する軽鎖 C D R 1、  
v . 配列番号 15 で示される配列を有する軽鎖 C D R 2、および  
v i . 配列番号 16 に示される配列を有する軽鎖 C D R 3、からなる 6 つの C D R 配列のセットを含む。

20

【0036】

いくつかの実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号 17 に示される重鎖可変領域、あるいは重鎖可変領域配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有するその類似体または誘導体を含む。

30

【0037】

いくつかの実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号 18 に示される軽鎖可変領域、または軽鎖可変領域配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有するその類似体を含む。

【0038】

特定の実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、配列番号 17 に示される配列を有する重鎖可変領域、および配列番号 18 に示される配列を有する軽鎖可変領域、あるいは軽鎖および / または重鎖配列と少なくとも 90 % の配列同一性を有するその類似体を含む。

40

【0039】

いくつかの実施形態によれば、抗体は、単離されたモノクローナル抗体である。

【0040】

いくつかの実施形態によれば、抗体またはそのフラグメントは、少なくとも  $5 \times 10^{-9}$  M の親和性でヒトネクチン - 2 を認識する。他の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、 $5 \times 10^{-9}$  M、 $10^{-9}$  M、 $5 \times 10^{-10}$  M、 $10^{-10}$  M、 $5 \times 10^{-11}$  M、またはさらにはより高い親和性でヒトネクチン - 2 と結合する。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、 $10^{-9}$  M ~  $10^{-11}$  M の親和性でヒトネクチン - 2 と結合する。いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、 $10^{-9}$  M ~  $10^{-10}$  M の親和性でヒトネクチン - 2 と結合する。いくつかの実施形態に

50

よれば、抗体または抗体フラグメントは、 $10^{-10} \text{ M} \sim 10^{-11} \text{ M}$ の親和性でヒトネクチン - 2 と結合する。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0041】

上記の単離された抗体およびフラグメントの類似体ならびに誘導体もまた、本発明の範囲内である。

【0042】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメント類似体は、参照抗体の配列の超可変領域と少なくとも90%の配列同一性を有する。

【0043】

ある特定の実施形態によれば、単離された抗体またはそのフラグメントの類似体または誘導体は、参照抗体の配列の可変領域と少なくとも91、92、93、94、95、96、97、98、または99%の配列同一性を有する。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

10

【0044】

いくつかの実施形態によれば、本発明による抗体または抗体フラグメントは、配列番号7または配列番号17に示される重鎖可変領域、または該配列と少なくとも95%の配列類似性を有する類似体を含む。

【0045】

いくつかの実施形態によれば、本発明による抗体または抗体フラグメントは、配列番号8または配列番号18に示される軽鎖可変領域、または該配列と少なくとも95%の配列類似性を有する類似体を含む。

20

【0046】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは重鎖および軽鎖を含み、ここでは(i)重鎖は配列番号7を含み、軽鎖は配列番号8を含むか、または(ii)重鎖は配列番号17を含み、軽鎖は配列番号18を含む。当該重鎖または軽鎖と少なくとも95%の配列類似性を有する抗体またはフラグメントの類似体も含まれる。

【0047】

いくつかの実施形態によれば、類似体は上記の抗体軽鎖または重鎖可変領域と少なくとも96、97、98、または99%の配列類似性を有する。いくつかの実施形態によれば、類似体は超可変領域のうちの1つ以上のCDR配列、すなわち、配列番号1、2、3、4、5、6、11、12、13、14、15、および16に示されるCDR配列のいずれか1つに、1つだけのアミノ酸置換、欠失、または付加を含む。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。いくつかの実施形態によれば、アミノ酸置換は保存的置換である。

30

【0048】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、上記で定められる軽鎖および重鎖領域を有する超可変領域(HVR)を含み、1、2、3、4、または5個のアミノ酸が置換、欠失、および/または付加された。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0049】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、上記で定められる軽鎖および重鎖領域を有するHVRを含み、1個のアミノ酸が置換された。特定の実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、上記で定められるCDRを含み、1個のアミノ酸が置換された。

40

【0050】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、  
i. HC CDR1がRFTMS(配列番号1)であり、HC CDR2がTISSSGSYTTYYPDSVKG(配列番号2)であり、HC CDR3がDRDFYGPYYAMDY(配列番号3)であり、LC CDR1がKSSQSL LNSGNQKNYLA(配列番号4)であり、LC CDR2がFASTRES(配列番号5)であり、かつLC CDR3がQQHYTTPLT(配列番号6)である、6つのCDRのセット、および

50



i i . H C C D R 1 配列が S Y W I H ( 配列番号 1 1 ) であり、H C C D R 2 が A V Y P G N S D S N Y N Q K F K A ( 配列番号 1 2 ) であり、H C C D R 3 が L V G T F D Y ( 配列番号 1 3 ) であり、L C C D R 1 が K A S Q N V G I N V V ( 配列番号 1 4 ) であり、L C C D R 2 が S A S Y R Y S ( 配列番号 1 5 ) であり、かつ L C C D R 3 が Q Q Y N T N P F T ( 配列番号 1 6 ) である、6 つの C D R のセット、からなる群から選択される C D R のセットを含む。

【 0 0 5 1 】

本発明はまた、重鎖および軽鎖を含む、抗体またはその結合フラグメントを提供し、該鎖は、重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列のセット含み、該セットは

i . 配列番号 7 および 8、ならびに

i i . 配列番号 1 7 および 1 8、からなる群から選択される。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、ヒトネクチン - 2 が T 細胞または NK 細胞で発現される T I G I T または C D 1 1 2 R と結合することを阻害することができる。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、ヒトネクチン - 2 が T 細胞または NK 細胞で発現される T I G I T または C D 1 1 2 R と結合することを阻害することができる。

【 0 0 5 4 】

特定の実施形態によれば、抗体は、キメラ抗体および少なくとも抗体の抗原結合部分を含む抗体フラグメントからなる群から選択される。特定の実施形態によれば、抗体はキメラ抗体である。さらに他の実施形態によれば、キメラ抗体はヒト定常領域を含んだ。特定の実施形態によれば、抗体フラグメントは、F a b、F a b'、F ( a b' 2)、F d、F d'、F v、d A b、単離された C D R 領域、単鎖可変領域 ( s c F V)、単鎖抗体 ( s c a b)、二重特異的抗体 ( d i a b o d i e s)、および「線状抗体」からなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【 0 0 5 5 】

いくつかの実施形態によれば、抗体または抗体フラグメントは、マウス I g G 1、マウス I g G 2 a、マウス I g G 2 b、マウス I g G 3、ヒト I g G 1、ヒト I g G 2、ヒト I g G 3、およびヒト I g G 4 からなる群から選択される定常領域を含む。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【 0 0 5 6 】

いくつかの特定の実施形態によれば、モノクローナル抗体は、キメラモノクローナル抗体である。

【 0 0 5 7 】

いくつかの実施形態によれば、キメラ抗体は、ヒト由来の定常領域を含む。

【 0 0 5 8 】

いくつかの実施形態によれば、キメラ抗体のヒト定常領域は、ヒト I g G 1、ヒト I g G 2、ヒト I g G 3、およびヒト I g G 4 からなる群から選択される。

【 0 0 5 9 】

いくつかの実施形態によれば、キメラ抗体のヒト定常領域は、ヒト I g G 1 およびヒト I g G 2 からなる群から選択される。

【 0 0 6 0 】

いくつかの実施形態によれば、上記で説明される抗体またはそのフラグメントを含むコンジュゲートが提供される。

【 0 0 6 1 】

本発明による抗体またはそのフラグメントは、細胞毒性部分、放射性部分、または識別可能な部分に結合され得る。

【 0 0 6 2 】

10

20

30

40

50

ヒトネクチン - 2 に対して高い親和性および特異性を有する抗体をコードするポリヌクレオチド配列、ならびにこれらのポリヌクレオチド配列を有するベクターおよび宿主細胞が、本発明の別の態様に従って提供される。

【 0 0 6 3 】

いくつかの実施形態によれば、上記の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列が提供される。

【 0 0 6 4 】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列は、( i ) 配列番号 7 の重鎖可変領域および配列番号 8 の軽鎖可変領域を有する抗体 ( 本明細書ではクローン 7 として識別される ) か、または ( i i ) 配列番号 1 7 の重鎖可変領域および配列番号 1 8 の軽鎖可変領域を有する抗体 ( 本明細書ではクローン 1 1 として識別される ) と結合するヒトネクチン - 2 タンパク質内のエピトープと結合することができる抗体または抗体フラグメントもしくは鎖をコードする。

10

【 0 0 6 5 】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列は、( i ) 配列番号 7 および配列番号 8 と、( i i ) 配列番号 1 7 および配列番号 1 8 と、からなる群から選択される配列に示される配列を含む抗体または抗体フラグメントもしくは鎖をコードする。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【 0 0 6 6 】

さらにいくつかの実施形態によれば、本発明によるポリヌクレオチド配列は、

20

i . H C C D R 1 が R F T M S ( 配列番号 1 ) であり、H C C D R 2 が T I S S G G S Y T Y Y P D S V K G ( 配列番号 2 ) であり、H C C D R 3 が D R D F Y G P Y Y A M D Y ( 配列番号 3 ) であり、L C C D R 1 が K S S Q S L L N S G N Q K N Y L A ( 配列番号 4 ) であり、L C C D R 2 が F A S T R E S ( 配列番号 5 ) であり、かつ L C C D R 3 が Q Q H Y T T P L T ( 配列番号 6 ) である、6 つの C D R のセットであるか、または

i i . H C C D R 1 配列が S Y W I H ( 配列番号 1 1 ) であり、H C C D R 2 が A V Y P G N S D S N Y N Q K F K A ( 配列番号 1 2 ) であり、H C C D R 3 が L V G T F D Y ( 配列番号 1 3 ) であり、L C C D R 1 が K A S Q N V G I N V V ( 配列番号 1 4 ) であり、L C C D R 2 が S A S Y R Y S ( 配列番号 1 5 ) であり、かつ L C C D R 3 が Q Q Y N T N P F T ( 配列番号 1 6 ) である、6 つの C D R のセットを含む、抗体または抗体フラグメントもしくは鎖をコードする。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

30

【 0 0 6 7 】

いくつかの実施形態によれば、上記で定められるポリヌクレオチド配列は、抗体、少なくとも抗原結合部分を含む抗体フラグメント、および当該抗体または抗体フラグメントを含む抗体コンジュゲートからなる群から選択される分子をコードする。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

【 0 0 6 8 】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列は、配列番号 7 に示される配列、または少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその変異体を含むモノクローナル抗体重鎖可変領域をコードする。

40

【 0 0 6 9 】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 7 に示される配列、または少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその変異体を含むモノクローナル抗体重鎖可変領域をコードする。

【 0 0 7 0 】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列は、配列番号 8 に示される配列、または少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその変異体を含むモノクローナル抗体軽鎖可変領域をコードする。

50

## 【 0 0 7 1 】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列は、配列番号 1 8 に示される配列、または少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその変異体を含むモノクローナル抗体軽鎖可変領域をコードする。

## 【 0 0 7 2 】

本発明は、いくつかの実施形態によれば、上記に開示された少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列によってコードされる少なくとも 1 つの配列を含むポリペプチドを提供する。

## 【 0 0 7 3 】

さらなる態様では、本発明は、本発明による少なくとも 1 つの抗体鎖またはそのフラグメントをコードする核酸分子を含む核酸構築体を提供する。いくつかの実施形態によれば、核酸構築体はプラスミドである。

10

## 【 0 0 7 4 】

いくつかの実施形態によれば、プラスミドは、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番号 1 9 および配列番号 2 0 からなる群から選択される配列に示される、少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列を含む。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

## 【 0 0 7 5 】

さらに別の態様では、本発明は、上記で定められる特定の C D R 配列および / または特定の重鎖および軽鎖可変領域を含む抗体または抗体フラグメントを産生することができる細胞を提供する。

## 【 0 0 7 6 】

20

いくつかの実施形態によれば、細胞が提供され、上記で開示される少なくとも 1 つのポリヌクレオチド配列を含む。

## 【 0 0 7 7 】

いくつかの実施形態によれば、細胞はハイブリドーマ細胞においてモノクローナル抗体を産生する。

## 【 0 0 7 8 】

本発明は、別の態様によれば、有効成分として、ヒトネクチン - 2 を高い親和性および特異性で認識する少なくとも 1 つの抗体、抗体フラグメント、またはそのコンジュゲート、および任意に少なくとも 1 つの薬学的に許容される賦形剤、希釈剤、塩、または担体を含む医薬組成物を提供し、該少なくとも 1 つの抗体または抗体フラグメントは、ヒトネクチン - 2 のヒト T I G I T および / または C D 1 1 2 R との結合を阻害することができる。

30

## 【 0 0 7 9 】

いくつかの実施形態によれば、本医薬組成物は、上記に開示された可変領域および C D R 配列を有するクローン 7 およびクローン 1 1 からなる群から選択されるモノクローナル抗体に結合するヒトネクチン - 2 タンパク質内のエピトープと結合することができるモノクローナル抗体またはそのフラグメントを含む。

## 【 0 0 8 0 】

いくつかの実施形態によれば、本医薬組成物は、

i . H C C D R 1 が配列番号 1 であり、H C C D R 2 が配列番号 2 であり、H C C D R 3 が配列番号 3 であり、L C C D R 1 が配列番号 4 であり、L C C D R 2 が配列番号 5 であり、かつ L C C D R 3 が配列番号 6 である、6 つの C D R のセット、または

40

i i . H C C D R 1 が ( 配列番号 1 1 ) であり、H C C D R 2 が ( 配列番号 1 2 ) であり、H C C D R 3 が ( 配列番号 1 3 ) であり、L C C D R 1 が ( 配列番号 1 4 ) であり、L C C D R 2 が ( 配列番号 1 5 ) であり、かつ L C C D R 3 が ( 配列番号 1 6 ) である、6 つの C D R のセット、を含む、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体を含む。

## 【 0 0 8 1 】

各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

## 【 0 0 8 2 】

いくつかの実施形態によれば、本医薬組成物は、配列番号 7、および配列番号 1 7 からなる群から選択される配列を有する重鎖可変領域を含む抗体またはそのフラグメントを含

50

む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【 0 0 8 3 】

いくつかの実施形態によれば、本医薬組成物は、配列番号 8、および配列番号 1 8 からなる群から選択される配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体またはそのフラグメントを含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【 0 0 8 4 】

特定の実施形態によれば、本医薬組成物は、配列番号 7 に示される配列を有する重鎖可変領域および配列番号 8 で示される配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体またはそのフラグメントを含む。

【 0 0 8 5 】

特定の実施形態によれば、本医薬組成物は、配列番号 1 7 に示される配列を有する重鎖可変領域および配列番号 1 8 で示される配列を有する軽鎖可変領域を含む抗体またはそのフラグメントを含む。

【 0 0 8 6 】

本発明の抗体の単鎖可変領域 ( s c F v ) 分子も提供される。 s c F v 分子は、1つのポリペプチド鎖で発現される抗体の抗原結合部位を含む。いくつかの実施形態によれば、本発明は、抗ネクチン - 2 抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む s c F v 分子を提供する。ある特定の実施形態によれば、 s c F v は、2つの可変領域の間にヒンジ領域を含む。

【 0 0 8 7 】

いくつかの実施形態によれば、 s c F V 配列は、配列番号 2 2、配列番号 2 4 に示されるか、または該配列と少なくとも 8 5 % の配列類似性を有するそれらの類似体である。いくつかの実施形態によれば、 s c F v 類似体は、配列番号 2 2 および配列番号 2 4 から選択される配列に対して少なくとも 9 0 % の配列同一性を有する。

【 0 0 8 8 】

ネクチン - 2 と結合することができる細胞外部分 ( 結合ドメイン ) を含むキメラ抗原受容体 ( C A R ) が本発明の別の態様に従って提供される。

【 0 0 8 9 】

いくつかの実施形態によれば、 C A R は、本明細書で説明された提供される抗体またはそのフラグメントのいずれかを含む細胞外部分を含む。

【 0 0 9 0 】

いくつかの実施形態によれば、 C A R は、  
 i . 配列番号 7 を含む重鎖 ( H C ) 可変領域の 3 つの相補性決定領域 ( C D R ) および配列番号 8 を含む軽鎖 ( L C ) 可変領域の 3 つの C D R、または該抗体もしくはフラグメントの配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体、および  
 i i . 配列番号 1 7 を含む重鎖可変領域の 3 つの C D R および配列番号 1 8 を含む軽鎖可変領域の 3 つの C D R、または該抗体もしくはフラグメントの配列と少なくとも 9 0 % の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体、からなる群から選択される 6 つの C D R 配列のセットを含む、ネクチン - 2 結合部位を含む。

【 0 0 9 1 】

いくつかの実施形態によれば、 C A R は、  
 i . H C C D R 1 が R F T M S ( 配列番号 1 ) であり、 H C C D R 2 が T I S S G G S Y T Y Y P D S V K G ( 配列番号 2 ) であり、 H C C D R 3 が D R D F Y G P Y Y A M D Y ( 配列番号 3 ) であり、 L C C D R 1 が K S S Q S L L N S G N Q K N Y L A ( 配列番号 4 ) であり、 L C C D R 2 が F A S T R E S ( 配列番号 5 ) であり、かつ L C C D R 3 が Q Q H Y T T P L T ( 配列番号 6 ) である、6 つの C D R のセット、および  
 i i . H C C D R 1 配列が S Y W I H ( 配列番号 1 1 ) であり、 H C C D R 2 が A V Y P G N S D S N Y N Q K F K A ( 配列番号 1 2 ) であり、 H C C D R 3 が L V G T F D Y ( 配列番号 1 3 ) であり、 L C C D R 1 が K A S Q N V G I N V V ( 配列番号 1 4 ) であり、 L C C D R 2 が S A S Y R Y S ( 配列番号 1 5 ) であり、かつ L C C D R 3

10

20

30

40

50

が Q Q Y N T N P F T (配列番号 16) である、6つの C D R のセット、からなる群から選択される C D R セットを含むネクチン - 2 結合部位を含む。

【0092】

いくつかの実施形態によれば、C A R は、配列番号 22 または 24 を含む抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞内 T 細胞シグナル伝達ドメインを含む。

【0093】

いくつかの実施形態によれば、本明細書で説明される C A R を発現するように操作されたリンパ球が提供される。

【0094】

いくつかの実施形態によれば、本明細書で説明される C A R を発現するように操作された T 細胞が提供され、C A R - T と表示される。ある特定の実施形態によれば、本明細書で説明される C A R を発現するように操作された N K 細胞が提供され、C A R - N K と表示される。

10

【0095】

いくつかの実施形態によれば、本明細書で説明される C A R を発現するように操作されたリンパ球の集団が提供される。特定の実施形態によれば、本明細書に記載の C A R を発現するように操作された T 細胞または N K 細胞の集団が提供される。

【0096】

いくつかの実施形態によれば、C A R は、本明細書で説明される抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単鎖可変領域 ( s c F V ) を含む。

20

【0097】

本明細書で説明される抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む単鎖可変領域 ( s c F V ) もまた、本発明に従って提供される。ある特定の実施形態によれば、可変領域の間にヒンジ領域がある。

【0098】

いくつかの実施形態によれば、s c F V 配列は、配列番号 22、配列番号 24 に示されるか、または該配列と少なくとも 85% の配列類似性を有するそれらの類似体である。

【0099】

本発明はさらに、いくつかの実施形態において、配列番号 21 または配列番号 23 に示される配列を含む C A R をコードするポリヌクレオチドを提供する。

30

【0100】

いくつかの実施形態によれば、C A R は、s c F v 配列、C D 8 ストードメイン、C D 28 T M ドメイン、41 B B ドメイン、および C D 3 ( C D 3 Z、Z e t t a ) ドメインからなる群から選択される少なくとも 1 つのタンパク質ドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、C A R は、s c F v ドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、C A R は、C D 8 ストードメインを含む。いくつかの実施形態によれば、C A R は、C D 28 T M ドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、C A R は、C D 3 Z ドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、C A R は、41 B B ドメインを含む。特定の実施形態によれば、C A R は、C D 8 ストードメイン、C D 28 T M ドメイン、41 B B ドメイン、および C D 3 Z ドメインを含む。

40

【0101】

いくつかの実施形態によれば、C A R は、本明細書に開示される抗体のネクチン - 2 結合部位を含む s c F v 配列と、C D 8 ストードメイン、C D 28 T M ドメイン、41 B B ドメイン、および C D 3 Z ドメインからなる群から選択される少なくとも 1 つのドメインと、を含む。特定の実施形態によれば、C A R は、本明細書に開示される抗体のネクチン - 2 結合部位を含む s c F v 配列、C D 8 ストードメイン、C D 28 T M ドメイン、41 B B ドメイン、および C D 3 Z ドメインを含む。

【0102】

特定の実施形態によれば、配列番号 22、配列番号 24 からなる群から選択される s c F v 配列、または該配列のいずれかと少なくとも 85% の配列類似性を有するその類似体

50

、ＣＤ８ストロークドメイン、ＣＤ２８ ＴＭドメイン、４１ＢＢドメイン、およびＣＤ３Ｚドメインを発現する操作されたＴ細胞が提供される。

【０１０３】

いくつかの実施形態によれば、配列番号２２、配列番号２４からなる群から選択されるｓｃＦｖ配列、または該配列のいずれかと少なくとも８５％の配列類似性を有するその類似体、ＣＤ８ストロークドメイン、ＣＤ２８ ＴＭドメイン、４１ＢＢドメイン、およびＣＤ３Ｚドメインを発現するＴ細胞を含むＴ細胞の集団が提供される。

【０１０４】

一態様によれば、本発明は、本明細書に記載のＣＡＲを含む治療有効量の少なくとも１つのリンパ球を対象に投与することを含む、該対象における癌を治療する方法を提供する。

10

【０１０５】

また、ＮＫ細胞上に発現されるＴＩＧＩＴおよび／またはＣＤ１１２Ｒとのネクチン－２の結合を阻害することによってＮＫ細胞毒性を回復することに使用するために、本発明による少なくとも１つの抗体、抗体フラグメント、または抗体コンジュゲートを含む医薬組成物が提供される。

【０１０６】

他の実施形態によれば、抗体、抗体フラグメント、または抗体コンジュゲートは、Ｔ細胞上に発現されるＴＩＧＩＴおよび／またはＣＤ１１２Ｒとのヒトネクチン－２の結合を阻害することができる。

【０１０７】

20

いくつかの実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、癌免疫療法で、または免疫応答を増強することに使用するためのものである。

【０１０８】

いくつかの実施形態によれば、本医薬組成物はさらにＴＩＧＩＴおよび／またはＣＤ１１２Ｒを発現するヒトリンパ球をさらに含む。

【０１０９】

いくつかの実施形態によれば、ヒトリンパ球は、Ｔ細胞、ＮＫ細胞、およびナチュラルキラーＴ（ＮＫＴ細胞）からなる群から選択されるキラー細胞である。

【０１１０】

いくつかの実施形態によれば、キラー細胞は自己または同種異系である。

30

【０１１１】

いくつかの実施形態によれば、本医薬組成物は、ＴＩＧＩＴおよび／またはＣＤ１１２Ｒを発現する自己または同種異系ＮＫ細胞を含む。

【０１１２】

本発明による組成物によって治療可能な癌は、ネクチン－２を発現する任意の癌であり得る。いくつかの実施形態によれば、癌はネクチン－２を過剰発現する。本発明のいくつかの実施形態によれば、癌は転移性癌である。いくつかの実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、転移の形成または分布を阻害すること、または対象における転移の総数を減少させることに使用するためのものである。

【０１１３】

40

本発明のいくつかの実施形態によれば、癌は、黒色腫、乳癌、卵巣癌、膵臓癌、結腸直腸癌、結腸癌、子宮頸癌、腎臓癌、肺癌、甲状腺癌、前立腺癌、脳癌、腎癌、喉癌、喉頭癌、膀胱癌、肝癌、線維肉腫、子宮内膜細胞癌、神経膠芽細胞腫、肉腫、骨髄性、白血病、およびリンパ腫からなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【０１１４】

いくつかの実施形態によれば、癌は固形癌である。いくつかの特定の実施形態によれば、固形癌は、乳癌、肺癌、膀胱癌、膵臓癌、および卵巣癌からなる群から選択される。

【０１１５】

いくつかの実施形態によれば、固形腫瘍は、ＣＡＲ－ＴまたはＣＡＲ－ＮＫによって治

50

療される。特定の実施形態によれば、固形腫瘍は、CAR-Tによって治療される。追加の実施形態によれば、血液癌は、CAR-NKまたはCAR-T細胞で治療される。特定の実施形態によれば、血液癌は、CAR-NK細胞で治療される。

【0116】

いくつかの実施形態によれば、癌は低悪性度神経膠腫である。いくつかの実施形態によれば、癌は腎臓腎明細胞癌(KIRC)である。いくつかの実施形態によれば、癌は肺腺癌である。

【0117】

ある特定の実施形態によれば、癌は、黒色腫、乳癌、大腸直腸癌、腎臓癌、肺癌、前立腺癌、および脳癌からなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

10

【0118】

他の実施形態によれば、癌は血液癌である。いくつかの実施形態によれば、本医薬組成物は癌の治療に使用する場合、ヒトリンパ球を伴う。

【0119】

いくつかの実施形態によれば、ヒトリンパ球は、T細胞、NK細胞、およびNKT細胞からなる群から選択されるキラー細胞である。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0120】

いくつかの実施形態によれば、キラー細胞は自己または同種異系である。

20

【0121】

いくつかの実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、ウイルス感染を防止または治療するために使用するためのものである。

【0122】

さらに別の態様によれば、本発明は、本明細書で定められるモノクローナル抗体または抗体フラグメントを使用することによって、ヒトネクチン-2のTIGITまたはCD112Rとの結合を阻害する方法を提供する。

【0123】

追加の態様によれば、本発明は、免疫応答を増強するための方法を、それを必要とする対象において提供し、該対象に、治療有効量の、本明細書に記載される抗体、抗体フラグメント、または抗体コンジュゲートを投与することを含む。

30

【0124】

さらに別の態様によれば、本発明は、癌を治療する方法を提供し、それを必要とする対象に、ヒトネクチン-2を高い親和性および特異性で認識してそのリガンドとの結合を阻害することができる、少なくとも1つの抗体、その抗体フラグメントまたはコンジュゲートを治療有効量含む医薬組成物を投与することを含む。

【0125】

本発明のいくつかの実施形態によれば、治療有効量は、対象における腫瘍サイズまたは転移数の減少をもたらす。

【0126】

40

いくつかの実施形態によれば、癌を治療する方法は、少なくとも1つの追加の抗癌療法を投与または実施することを含む。ある特定の実施形態によれば、追加の抗癌療法は、手術、化学療法、放射線療法、または免疫療法である。

【0127】

いくつかの実施形態によれば、癌を治療する方法は、ヒトネクチン-2を高い親和性および特異性で認識する抗体および追加の抗癌剤の投与を含む。いくつかの実施形態によれば、追加の抗癌剤は、免疫調節剤、活性化リンパ球細胞、キナーゼ阻害剤、および化学療法剤からなる群から選択される。

【0128】

他の実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、ヒトネクチン-2以外の抗原と結合する

50

抗体、抗体フラグメント、または抗体コンジュゲートである。

【0129】

いくつかの実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、免疫チェックポイント分子に対する抗体である。いくつかの実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、ヒトプログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、PD-L1、およびPD-L2、癌胚性抗原関連細胞接着分子1 (CEACAM1)、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、CD137、OX40 (CD134とも呼ばれる)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、TIGIT、PVR、CTLA-4、NKG2A、GITR、ならびにその他のチェックポイント分子またはそれらの組み合わせからなる群から選択される免疫チェックポイント分子に対する抗体である。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。ある特定の実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、PD-1に対する抗体である。いくつかの実施形態によれば、追加の免疫調節因子は、CTLA-4に対する抗体である。

10

【0130】

いくつかの実施形態によれば、抗癌剤は、アービタックス (erbitux)、シタラピン、フルダラピン、フルオロウラシル、メルカプトプリン、メトトレキサート、チオグアニン、ゲムシタピン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビノレルビン、カルムスチン、ロムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シスプラチン、カルボプラチン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、チオテパ、ダカルバジン、プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、イダルピシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、エトポシド、テニポシド、およびそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

20

【0131】

いくつかの実施形態によれば、抗癌剤は上皮成長因子受容体 (EGFR) 阻害剤である。いくつかの実施形態によれば、EGFR阻害剤は、セツキシマブ (Erbitux (登録商標))、パニツムマブ (Vectibix (登録商標))、およびネシツムマブ (Portrazza (登録商標)) からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、EGFR阻害剤はセツキシマブ (Erbitux (登録商標)) である。

【0132】

本発明のいくつかの実施形態によれば、対象はヒト対象である。

【0133】

本発明のいくつかの実施形態によれば、本使用はさらに、免疫共阻害受容体の活性または発現を下方調節する薬剤の使用を含む。

30

【0134】

本発明のいくつかの実施形態によれば、免疫細胞はT細胞である。

【0135】

本発明のいくつかの実施形態によれば、免疫共阻害受容体は、PD-1、TIGIT、PVR、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、VISTA、B7H4、CD96、BY55 (CD160)、LAIR1、SIGLEC10、および2B4からなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0136】

一態様によれば、本発明は、免疫系の機能および/または活性を調節するための方法を提供し、ネクチン-2のTIGITおよび/またはCD112Rとの結合を本発明による抗体を使用して調節することを含む。

40

【0137】

いくつかの実施形態によれば、癌を治療する方法は、対象における転移の形成、増殖、または拡散を防止または低減することを含む。

【0138】

いくつかの実施形態によれば、癌を治療する方法は、それを必要とする対象に、ヒトネクチン-2のヒトTIGITおよび/またはCD112Rとの結合を阻害することができる抗体またはその抗体フラグメントを含む医薬組成物を投与し、さらに該対象のヒトリン

50



パ球を投与することを含む。

【0139】

いくつかの実施形態によれば、ヒトリンパ球は、T細胞、NK細胞、およびNK T細胞からなる群から選択されるキラー細胞である。

【0140】

いくつかの実施形態によれば、キラー細胞は自己または同種異系である。

【0141】

本発明はまた、ウイルス感染を防止または治療する方法を提供し、対象にヒトネクチン - 2 に特異的な少なくとも1つの抗体、または少なくとも抗原結合ドメインを含むそのフラグメントを投与することを含み、該mAbまたはそのフラグメントはネクチン - 2 のTIGITまたはCD112Rとの結合を阻害することができる。

10

【0142】

一態様によれば、本発明は、対象における癌を診断または予後診断する方法を提供し、本方法は、該対象の生物学的試料におけるネクチン - 2 の発現レベルを、本明細書で説明される少なくとも1つの抗体を使用して決定することを含む。

【0143】

本発明はさらに、別の態様によれば、試料中のネクチン - 2 を決定または定量化する方法を含み、本方法は生物学的試料を抗体または抗体フラグメントと接触させることと、複合体形成のレベルを測定することと、を含み、抗体または抗体フラグメントは、

i . HC CDR1 が配列番号1であり、HC CDR2 が配列番号2であり、HC CDR3 が配列番号3であり、LC CDR1 が配列番号4であり、LC CDR2 が配列番号5であり、かつLC CDR3 が配列番号6である、6つのCDRのセット、または

20

ii . HC CDR1 が (配列番号11) であり、HC CDR2 が (配列番号12) であり、HC CDR3 が (配列番号13) であり、LC CDR1 が (配列番号14) であり、LC CDR2 が (配列番号15) であり、かつLC CDR3 が (配列番号16) である、6つのCDRのセット、を含む。

【0144】

決定および定量化する方法は、いくつかの実施形態に従ってインビトロまたはエクスピボで実施され得るか、またはネクチン - 2 の発現と関連する状態を診断することに使用され得る。本発明による抗体はまた、スクリーニング方法を構成するために使用され得る。例えば、酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)、またはラジオイムノアッセイ (RIA)、ならびにIHCまたはFACSなどの方法は、本抗体および当技術分野で知られている方法を使用して分泌性または細胞関連ポリペプチドのレベルを測定するために構築することができる。

30

【0145】

いくつかの実施形態によれば、細胞で発現されるか、または生体媒質に分泌されるネクチン - 2 の存在を検出または定量化するための方法は、

i . 試料をヒトネクチン - 2 に特異的な抗体または少なくとも抗原結合部分を含むその抗体フラグメントとともにインキュベーションする工程と、

ii . 結合したネクチン - 2 を検出可能なプローブを使用して検出する工程と、を含む。

40

【0146】

いくつかの実施形態によれば、本方法はさらに、

iii . (ii) の量を、ネクチン - 2 の既知量を含む参照試料から得られる標準曲線と比較する工程と、

iv . 試料中のネクチン - 2 の量を標準曲線から計算する工程と、を含む。

【0147】

いくつかの特定の実施形態によれば、試料は体液である。

【0148】

いくつかの実施形態によれば、本方法はインビトロまたはエクスピボで実施される。

【0149】

50

生物学的試料におけるネクチン - 2 の発現または存在を測定するためのキットもまた提供され、本発明による少なくとも 1 つの抗体または抗体フラグメントを含む。いくつかの実施形態によれば、本キットは、

i . H C C D R 1 が配列番号 1 であり、H C C D R 2 が配列番号 2 であり、H C C D R 3 が配列番号 3 であり、L C C D R 1 が配列番号 4 であり、L C C D R 2 が配列番号 5 であり、かつ L C C D R 3 が配列番号 6 である、6 つの C D R のセット、または

i i . H C C D R 1 が ( 配列番号 1 1 ) であり、H C C D R 2 が ( 配列番号 1 2 ) であり、H C C D R 3 が ( 配列番号 1 3 ) であり、L C C D R 1 が ( 配列番号 1 4 ) であり、L C C D R 2 が ( 配列番号 1 5 ) であり、かつ L C C D R 3 が ( 配列番号 1 6 ) である、6 つの C D R のセット、を含む、抗体または抗体フラグメントを含む。

10

【 0 1 5 0 】

一態様によれば、本発明は癌を検出するためのキットを提供し、診断キットは本明細書で開示される抗体またはその抗体フラグメントを含む。

【 0 1 5 1 】

いくつかの実施形態によれば、本発明は免疫関連疾患または増殖性疾患を診断、早期検出、重症度を評価、または病期分類する方法を提供し、本発明による抗体あるいはそのフラグメントまたはコンジュゲートを使用して、対象に由来する試料におけるネクチン - 2 の発現、濃度、または活性を決定すること、およびネクチン - 2 の発現または活性を、ネクチン - 2 の発現、濃度、または活性の参照量と比較することを含む。当該参照量は、正常な対象から、その疾患の異なる病期にある際に同一対象から採取された試料から得ることができ、または対象の大集団の臨床データから決定される。

20

【 0 1 5 2 】

本発明のさらなる実施形態および適用可能性の全範囲は、以下に与えられる詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、本発明の趣旨および範囲内での様々な変更および修正は、この詳細な説明から当業者に明らかになるであろうから、詳細な説明および具体的な実施例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、単に例示として与えられているにすぎないことは理解されたい。

【図面の簡単な説明】

【 0 1 5 3 】

【図 1 A】ネクチン - 2 発現レベル ( 示されているように高いまたは低い ) と低悪性度神経膠腫 ( A ) 、腎腎明細胞癌 ( B ) および肺腺癌 ( C ) 患者の生存確率との相関を示す。データセットは T C G A サイトから取得し、oncolnc.org サイト ( <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67> ) を使用して分析した。

30

【図 1 B】ネクチン - 2 発現レベル ( 示されているように高いまたは低い ) と低悪性度神経膠腫 ( A ) 、腎腎明細胞癌 ( B ) および肺腺癌 ( C ) 患者の生存確率との相関を示す。データセットは T C G A サイトから取得し、oncolnc.org サイト ( <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67> ) を使用して分析した。

【図 1 C】ネクチン - 2 発現レベル ( 示されているように高いまたは低い ) と低悪性度神経膠腫 ( A ) 、腎腎明細胞癌 ( B ) および肺腺癌 ( C ) 患者の生存確率との相関を示す。データセットは T C G A サイトから取得し、oncolnc.org サイト ( <https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67> ) を使用して分析した。

40

【図 2】免疫細胞で発現する受容体と、腫瘍または抗原提示細胞 ( A P C ) で発現するネクチン - 2 に対するそれぞれの親和性の模式図である。T I G I T は、多くの免疫細胞 ( 例えば、T 細胞または N K 細胞 ) の共抑制受容体であり、D N A M - 1 ( C D 2 2 6 と呼ばれる ) は、多くの免疫細胞 ( 例えば、T 細胞 ) の活性化受容体であり、C D 1 1 2 R ( P V R I G と呼ばれる ) はリンパ系免疫細胞 ( 例えば、T 細胞および N K 細胞 ) の共抑制受容体であり、ネクチン - 2 ( C D 1 1 2 ) は、表示されている親和性に基づいて、

50

主にCD112Rへの結合を介した免疫細胞の抑制性リガンドである。

【図3A】生成された抗ネクチン-2 mAbの結合および遮断特性の分析である。図3Aは、内因的にネクチン-2を発現するMDA-231細胞またはネクチン-2を過剰発現する8866-hネクチン-2細胞への抗ネクチン-2クローンの結合を示している。

【図3B】生成された抗ネクチン-2 mAbの結合および遮断特性の分析である。図3Bは、8866-hネクチン2細胞に結合するCD112R-FcのFACS分析の結果を示している。生成された抗体のうち、3つのクローン(#9、11、および13)がこれらの相互作用を部分的に遮断し、1つのクローン(#7)がそれらを完全に遮断した。

【図3C】生成された抗ネクチン-2 mAbの結合および遮断特性の分析である。図3Cは、8866-hネクチン2細胞に結合するDNAM-1-FcのFACS分析の結果を示している。クローン15を除いて、他のクローン(#7~13)はどれも活性化受容体DNAM-1のネクチン-2への結合を遮断しなかった。

10

【図3D】生成された抗ネクチン-2 mAbの結合および遮断特性の分析である。図3Dは、抗ネクチン-2クローン7および11の存在下でCHOK1-hネクチン2細胞に結合するTIGIT-FcのFACS分析の結果を示している。両方のクローンがTIGIT-Fc結合の>66%を遮断している。

【図4A】抗ネクチン-2 mAb(X軸に表示)によるネクチン-2の遮断がNK細胞の活性化を増強することを示す。NK活性化は、CD107aの表面発現の誘導によって測定され、対照IgGに対する倍数変化として表される(Y軸)。結果は、ヒト癌細胞株A549(肺腺癌)(図4A)およびMDA-MB-231(乳腺癌)(図4B)について示されている。最も重要な効果は、クローン#3、7、および11で認められた。 $* = P < 0.04$ 、 $** p < 0.02$ 、 $*** p < 0.002$ (両側スチューデントのt検定による)。5人のドナーのうちの1人についての代表的なデータが示されている。クローン7および11のヒトIgG1キメラ変異体は、脱顆粒をさらに増加させ(図4C)、アイソタイプコントロールと比較して>200%の脱顆粒をもたらした。 $*** p < 0.002$ 。2人のドナーのうち1人についての代表的なデータが示されている。

20

【図4B】抗ネクチン-2 mAb(X軸に表示)によるネクチン-2の遮断がNK細胞の活性化を増強することを示す。NK活性化は、CD107aの表面発現の誘導によって測定され、対照IgGに対する倍数変化として表される(Y軸)。結果は、ヒト癌細胞株A549(肺腺癌)(図4A)およびMDA-MB-231(乳腺癌)(図4B)について示されている。最も重要な効果は、クローン#3、7、および11で認められた。 $* = P < 0.04$ 、 $** p < 0.02$ 、 $*** p < 0.002$ (両側スチューデントのt検定による)。5人のドナーのうちの1人についての代表的なデータが示されている。クローン7および11のヒトIgG1キメラ変異体は、脱顆粒をさらに増加させ(図4C)、アイソタイプコントロールと比較して>200%の脱顆粒をもたらした。 $*** p < 0.002$ 。2人のドナーのうち1人についての代表的なデータが示されている。

30

【図4C】抗ネクチン-2 mAb(X軸に表示)によるネクチン-2の遮断がNK細胞の活性化を増強することを示す。NK活性化は、CD107aの表面発現の誘導によって測定され、対照IgGに対する倍数変化として表される(Y軸)。結果は、ヒト癌細胞株A549(肺腺癌)(図4A)およびMDA-MB-231(乳腺癌)(図4B)について示されている。最も重要な効果は、クローン#3、7、および11で認められた。 $* = P < 0.04$ 、 $** p < 0.02$ 、 $*** p < 0.002$ (両側スチューデントのt検定による)。5人のドナーのうちの1人についての代表的なデータが示されている。クローン7および11のヒトIgG1キメラ変異体は、脱顆粒をさらに増加させ(図4C)、アイソタイプコントロールと比較して>200%の脱顆粒をもたらした。 $*** p < 0.002$ 。2人のドナーのうち1人についての代表的なデータが示されている。

40

【図5A】mAb、クローン7および11のヒトおよびサルネクチン-2への結合が類似していることを実証する。図5Aは、ヒトまたはカニクイザル(Cyno)(macaca fascicularis)ネクチン-2(タンパク質id:XP\_005589607.1)を発現するCHO細胞に一連の3倍希釈で13.3nM~0.02nMの範

50

図で添加された両方のmAbのオーバーレイ結合曲線を示している。このアッセイのFACS分析の結果は、100%に設定された最大結合と比較した相対結合強度として表される。検出には、ヤギ抗マウス-647 Abを1:250希釈で使用した。このアッセイのデータ分析の要約も同様に示されており、両方のmAbがヒトおよびカニクイザル(Cyno)(macaca fascicularis)ネクチン-2(タンパク質ID:XP\_005589607.1)に高い類似の親和性で結合することをさらに示している。抗ネクチン-2 mAbの結合は、Chlorocebus(アフリカミドリザル)ネクチン-2(ベロ細胞によって発現されるXP\_007995342.1)を使用して調べた。

【図5B】mAb、クローン7および11のヒトおよびサルネクチン-2への結合が類似していることを実証する。図5Bは、図5Aで記載したFACS分析によってテストされた内因性ヒトネクチン-2(293T細胞で発現)および内因性アフリカミドリザルネクチン-2(ベロ細胞で発現)への抗ネクチン-2 mAbの結合を示している(Ab範囲:20~0.0003 nM)。この分析は、両方の抗ネクチン-2クローンについて、高い親和性で、ヒトおよびサルの両方のネクチン-2標的への同様のAb結合を明らかにし、これは要約表でも明らかである。

10

【図6A】T細胞増殖に対する抗hネクチン-2抗体の効果を示す。ヒトPBMCをCFSE標識し、PHA-Lおよび示された抗体の存在下で標的細胞MDA-MB-231(6A)またはA549(6B)とインキュベートした。結果は、対照と比較して増殖が倍増したものとして示されている。示されているのは、試験された7人を代表する1人のPBMCドナーの結果である。

20

【図6B】T細胞増殖に対する抗hネクチン-2抗体の効果を示す。ヒトPBMCをCFSE標識し、PHA-Lおよび示された抗体の存在下で標的細胞MDA-MB-231(6A)またはA549(6B)とインキュベートした。結果は、対照と比較して増殖が倍増したものとして示されている。示されているのは、試験された7人を代表する1人のPBMCドナーの結果である。

【図7A】抗hネクチン-2抗体単独または既知のチェックポイント遮断薬との併用によるCD8+T細胞増殖への影響を示す。ヒトPBMCをCFSE標識し、PHA-Lおよび示された抗体の存在下で標的細胞RKO(7A)またはA549(図7B)とインキュベートした。結果は、対照と比較して増殖が倍増したものとして示されている。試験されたすべての組み合わせにより、個々の治療でCD8+T細胞の増殖が大幅に増加した。試験された2人のドナーのうち1人のPBMCドナーの結果が示されている。

30

【図7B】抗hネクチン-2抗体単独または既知のチェックポイント遮断薬との併用によるCD8+T細胞増殖への影響を示す。ヒトPBMCをCFSE標識し、PHA-Lおよび示された抗体の存在下で標的細胞RKO(7A)またはA549(図7B)とインキュベートした。結果は、対照と比較して増殖が倍増したものとして示されている。試験されたすべての組み合わせにより、個々の治療でCD8+T細胞の増殖が大幅に増加した。試験された2人のドナーのうち1人のPBMCドナーの結果が示されている。

【図8A】IFN $\gamma$ の分泌に対する抗hネクチン-2抗体の効果を示す。図7で説明したように、ヒトPBMCを標的細胞とともにインキュベートした。96時間後、プレートを遠心分離し、上清を回収した。IFN $\gamma$ の定量化は、Biolegend製のHuman IFN $\gamma$ -ELISA MAX(商標)Deluxeを使用して、製造元のプロトコルに従って行った。試験された5人のドナーのうち1人のPBMCドナーについての結果が示されている。

40

【図8B】IFN $\gamma$ の分泌に対する抗hネクチン-2抗体の効果を示す。図7で説明したように、ヒトPBMCを標的細胞とともにインキュベートした。96時間後、プレートを遠心分離し、上清を回収した。IFN $\gamma$ の定量化は、Biolegend製のHuman IFN $\gamma$ -ELISA MAX(商標)Deluxeを使用して、製造元のプロトコルに従って行った。試験された5人のドナーのうち1人のPBMCドナーについての結果が示されている。

50

【図9A】抗hネクチン-2抗体単独または既知のチェックポイント遮断薬との併用によるhPBMCによる腫瘍細胞の死滅に対する影響を示す。図7に記載されているようにアッセイを行った。96~120時間後、免疫細胞を除去し、腫瘍細胞を徹底的に洗浄し、Cell Titer-Glo（登録商標）を使用して、製造元のプロトコルに従って付着性腫瘍細胞の生存率を確立した。すべての結果はキットの線形範囲内であった。結果は、対照と比較して腫瘍細胞の死滅が倍増したものとして示されている。試験されたすべての組み合わせにより、個々の治療と比べて腫瘍細胞の死滅が有意に増加した。試験された2人のドナーのうち1人のPBMCドナーの結果が示されている。

【図9B】抗hネクチン-2抗体単独または既知のチェックポイント遮断薬との併用によるhPBMCによる腫瘍細胞の死滅に対する影響を示す。図7に記載されているようにアッセイを行った。96~120時間後、免疫細胞を除去し、腫瘍細胞を徹底的に洗浄し、Cell Titer-Glo（登録商標）を使用して、製造元のプロトコルに従って付着性腫瘍細胞の生存率を確立した。すべての結果はキットの線形範囲内であった。結果は、対照と比較して腫瘍細胞の死滅が倍増したものとして示されている。試験されたすべての組み合わせにより、個々の治療と比べて腫瘍細胞の死滅が有意に増加した。試験された2人のドナーのうち1人のPBMCドナーの結果が示されている。

【図10】インビボでの腫瘍発生に対するネクチン-2mAbの効果を示している。Scid雌マウス（ $n=33$ ）に、マトリゲル中 $5 \times 10^6$ MDA-MB-231細胞を皮下注射した。腫瘍が $80 \sim 120 \text{ mm}^3$ に達したら、マウスをランダムに3つの群に分け、PBS（薄い灰色のひし形）、hIgG1対照Ab（灰色の四角）、またはクローン-7-ヒトIgG1（2.7.1）（黒丸）（両方とも $3 \text{ mg/kg}$ で）のいずれかを静脈内（i.v.）注射することにより、盲検法で週2回処置した。 $* p < 0.04$ 、 $** p < 0.02$ 、 $*** p < 0.008$ 。

【図11A】腫瘍細胞死滅およびPBMC増殖に対する、hIgG2Fcを伴うネクチン-2mAbの単独またはPD-1との併用のいずれかの効果を示す。A549細胞は、Abなし、またはクローン-11-ヒトIgG2（2.11.2）、Keytruda（商標）（両方とも $3.5 \text{ ug/ml}$ で）、またはそれらの組み合わせ（それぞれ $3.5 \text{ ug/ml}$ ）のいずれかを使用して、 $4 \text{ ug/ml}$ のPHA-Lの存在下で、E:T比7:1でPBMCと96時間共インキュベートした。腫瘍細胞の死滅（図11A）およびPBMC（T細胞）の増殖（図11B）が示されている。 $* p < 0.01$ 、 $** p < 0.002$ 、 $*** p < 0.0008$ 。

【図11B】腫瘍細胞死滅およびPBMC増殖に対する、hIgG2Fcを伴うネクチン-2mAbの単独またはPD-1との併用のいずれかの効果を示す。A549細胞は、Abなし、またはクローン-11-ヒトIgG2（2.11.2）、Keytruda（商標）（両方とも $3.5 \text{ ug/ml}$ で）、またはそれらの組み合わせ（それぞれ $3.5 \text{ ug/ml}$ ）のいずれかを使用して、 $4 \text{ ug/ml}$ のPHA-Lの存在下で、E:T比7:1でPBMCと96時間共インキュベートした。腫瘍細胞の死滅（図11A）およびPBMC（T細胞）の増殖（図11B）が示されている。 $* p < 0.01$ 、 $** p < 0.002$ 、 $*** p < 0.0008$ 。

【図12A】ネクチン-2を発現する腫瘍細胞の存在下での特異的T細胞活性化に対するクローン7およびクローン11抗体（それぞれCAR-T2.07およびCAR-T2.11）に由来するscFvを発現するCAR-Tの効果を示す。健康なドナーからのPBMCを、CAR-T構築物で形質導入した。これらの構築物の一般的な概略図を図12Aに示し、ここで、scFvは本明細書に記載のネクチン-2mAbの単鎖を表す。ネクチン-2CAR-TPBMCを、様々なE:T比でU937またはBT-474標的細胞とインキュベートした。標的細胞の死滅（図12Bおよび12D）、ならびに活性化されたPBMCによるIFN分泌（図12Cおよび12E、 $p < 0.03$ ）が示されている。図12B~Eは、各細胞株に対して実施された3つの実験のうちの代表的な実験を示している（CAR-T2.07灰色のバー、CAR-T2.11黒いバー）。

【図12B】ネクチン-2を発現する腫瘍細胞の存在下での特異的T細胞活性化に対する

10

20

30

40

50

クローン 7 およびクローン 11 抗体 (それぞれ CAR-T2.07 および CAR-T2.11) に由来する scFv を発現する CAR-T の効果を示す。健康なドナーからの PBMC を、CAR-T 構築物で形質導入した。これらの構築物の一般的な概略図を図 12A に示し、ここで、scFv は本明細書に記載のネクチン-2 mAb の単鎖を表す。ネクチン-2 CAR-T PBMC を、様々な E:T 比で U937 または BT-474 標的細胞とインキュベートした。標的細胞の死滅 (図 12B および 12D)、ならびに活性化された PBMC による IFN 分泌 (図 12C および 12E、 $p < 0.03$ ) が示されている。図 12B~E は、各細胞株に対して実施された 3 つの実験のうちの代表的な実験を示している (CAR-T2.07 灰色のバー、CAR-T2.11 黒いバー)。

【図 12C】ネクチン-2 を発現する腫瘍細胞の存在下での特異的 T 細胞活性化に対するクローン 7 およびクローン 11 抗体 (それぞれ CAR-T2.07 および CAR-T2.11) に由来する scFv を発現する CAR-T の効果を示す。健康なドナーからの PBMC を、CAR-T 構築物で形質導入した。これらの構築物の一般的な概略図を図 12A に示し、ここで、scFv は本明細書に記載のネクチン-2 mAb の単鎖を表す。ネクチン-2 CAR-T PBMC を、様々な E:T 比で U937 または BT-474 標的細胞とインキュベートした。標的細胞の死滅 (図 12B および 12D)、ならびに活性化された PBMC による IFN 分泌 (図 12C および 12E、 $p < 0.03$ ) が示されている。図 12B~E は、各細胞株に対して実施された 3 つの実験のうちの代表的な実験を示している (CAR-T2.07 灰色のバー、CAR-T2.11 黒いバー)。

【図 12D】ネクチン-2 を発現する腫瘍細胞の存在下での特異的 T 細胞活性化に対するクローン 7 およびクローン 11 抗体 (それぞれ CAR-T2.07 および CAR-T2.11) に由来する scFv を発現する CAR-T の効果を示す。健康なドナーからの PBMC を、CAR-T 構築物で形質導入した。これらの構築物の一般的な概略図を図 12A に示し、ここで、scFv は本明細書に記載のネクチン-2 mAb の単鎖を表す。ネクチン-2 CAR-T PBMC を、様々な E:T 比で U937 または BT-474 標的細胞とインキュベートした。標的細胞の死滅 (図 12B および 12D)、ならびに活性化された PBMC による IFN 分泌 (図 12C および 12E、 $p < 0.03$ ) が示されている。図 12B~E は、各細胞株に対して実施された 3 つの実験のうちの代表的な実験を示している (CAR-T2.07 灰色のバー、CAR-T2.11 黒いバー)。

【図 12E】ネクチン-2 を発現する腫瘍細胞の存在下での特異的 T 細胞活性化に対するクローン 7 およびクローン 11 抗体 (それぞれ CAR-T2.07 および CAR-T2.11) に由来する scFv を発現する CAR-T の効果を示す。健康なドナーからの PBMC を、CAR-T 構築物で形質導入した。これらの構築物の一般的な概略図を図 12A に示し、ここで、scFv は本明細書に記載のネクチン-2 mAb の単鎖を表す。ネクチン-2 CAR-T PBMC を、様々な E:T 比で U937 または BT-474 標的細胞とインキュベートした。標的細胞の死滅 (図 12B および 12D)、ならびに活性化された PBMC による IFN 分泌 (図 12C および 12E、 $p < 0.03$ ) が示されている。図 12B~E は、各細胞株に対して実施された 3 つの実験のうちの代表的な実験を示している (CAR-T2.07 灰色のバー、CAR-T2.11 黒いバー)。

【発明を実施するための形態】

【0154】

本発明は、ヒトネクチン-2 に特異的である有効な抗体を提供する。本発明はまた、抗体の治療剤としての製造および使用を提供する。特に、本発明の mAb は、抗腫瘍殺活性を増強するため、そして診断用試薬として使用され得る。いくつかの実施形態では、本発明は、ネクチン-2 を過剰発現する癌細胞に対する免疫活性の効率的な回復のために、ネクチン-2 に特異的な抗体を提供する。他の実施形態では、本明細書に記載の抗体は、ウイルス感染の治療に使用するためのものである。抗体は、ネクチン-2 を遮断することにより、ヘルペスウイルスの細胞への侵入を防ぐ。

【0155】

本明細書で使用される「抗原」という用語は、抗体形成を誘発することができ、抗体に

10

20

30

40

50

よって特異的に結合されることが出来る分子または分子の一部を指す。抗原は、1つまたは2つ以上のエピトープを有し得る。上記で言及される特異的結合は、抗原が高度に選択的な方式で対応する抗体と反応するが、他の抗原によって誘発され得る他の多数の抗体とは反応しないことを示すことを意味する。本発明のいくつかの実施形態による抗原は、ネクチン - 2 タンパク質である。

#### 【0156】

本明細書で使用される「ネクチン - 2」または「ネクチン細胞接着分子2」という用語は、CD112およびPVRL2としても知られるヒト原形質膜糖タンパク質を指す。ネクチン - 2 タンパク質は、2つのIg様C2型ドメインとIg様V型ドメインとを有する1回膜貫通糖タンパク質である。このタンパク質は、接着結合の原形質膜成分の1つである。また、ネクチン - 2 は、単純ヘルペスウイルスおよび仮性狂犬病ウイルスの特定の変異株の侵入体としても機能し、これらのウイルスの細胞から細胞への拡散に関与している。本発明による例示的なネクチン - 2 は、SwissPort、UniPortおよびGenBankの記号またはアクセッション番号に記載されている：遺伝子ID: 5819、Q92692、I68093、NP\_001036189.1、NP\_002847.1、および#Q92692。

#### 【0157】

本発明による抗体またはそのフラグメントは、ネクチン - 2 のエピトープに結合する。具体的には、抗体はネクチン - 2 タンパク質の外部ドメイン（細胞外部分）内のエピトープと結合する。

#### 【0158】

本明細書で使用される「抗原決定基」または「エピトープ」という用語は、特定の抗体と特異的に反応する抗原分子の領域を指す。エピトープに由来するペプチド配列は、単独で、または担体部分と結合して使用され、当技術分野で知られている方法を適用して、動物を免疫して、追加のポリクローナルまたはモノクローナル抗体を生成することができる。エピトープに由来する単離されたペプチドは、抗体を検出する診断方法で使用され得る。

#### 【0159】

親和性は、表面プラズモン共鳴（SPR）（Scarano S, Mascini M, Turner AP, Minunni M. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. Biosens Bioelectron. 2010, 25: 957 - 66に記載されている）などの既知の方法を使用して定量化することができ、例えば、解離定数Kdを使用して計算することができ、Kdが低いほど高い親和性を反映することに留意すべきである。

#### 【0160】

抗体、または免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によってともに連結された2つの重鎖および2つの軽鎖を含み、各軽鎖はそれぞれの重鎖とジスルフィド結合によって「Y」字型形状で結合される。抗体のタンパク質分解消化は、Fv（可変フラグメント）およびFc（結晶性フラグメント）ドメインを生じる。抗原結合ドメインであるFabには、ポリペプチド配列が変化する領域が含まれる。F(ab')<sub>2</sub>という用語は、ジスルフィド結合によってともに結合された2つのFab'アームを表す。各重鎖は、一端に可変ドメイン（V<sub>H</sub>）を有し、いくつかの定常ドメイン（C<sub>H</sub>）が続く。各軽鎖は、一端に可変ドメイン（V<sub>L</sub>）、およびその他端に定常ドメイン（C<sub>L</sub>）を有し、軽鎖可変ドメインは重鎖の可変ドメインと整列され、軽鎖定常ドメインは重鎖の最初の定常ドメイン（CH1）と整列される。軽鎖と重鎖の各対の可変ドメインが抗原結合部位を形成する。軽鎖と重鎖のドメインは同じ全体構造を有し、各ドメインは4つのフレームワーク領域を含み、それらの配列は比較的保存されており、相補性決定領域（CDR1~3）として知られる3つの超可変ドメインによって結合されている。これらのドメインは、抗原結合部位の特異性および親和性に寄与する。

#### 【0161】

10

20

30

40

50

所与の重鎖または軽鎖可変配列からのCDRの識別または決定は、通常、当技術分野で知られている数少ない方法のうちの1つを使用して行われる。たとえば、そのような決定は、Kabat (Wu T. T. and Kabat E. A., J. Exp. Med., 1970; 132: 211-50) およびIMGT (LeFranc M. P., et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27: 55-77) に従ってなされる。

【0162】

「配列を有するCDR」という用語または同様な用語が使用されるとき、それはCDRが特定された配列を含むという選択肢、およびCDRが特定された配列からなるという選択肢も含む。

【0163】

抗体の抗原特異性は、超可変領域(HVR)、つまり、抗原結合部位をともに形成する軽鎖および重鎖の両方の特有のCDR配列に基づいている。

【0164】

重鎖のアイソタイプ(ガンマ、アルファ、デルタ、イプシロン、またはミュー)は、免疫グロブリンクラス(それぞれ、IgG、IgA、IgD、IgE、またはIgM)を決定する。軽鎖は2つのアイソタイプ(カッパ、またはラムダ、)のいずれかである。両アイソトープはすべての抗体クラスに認められる。

【0165】

「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、モノクローナル抗体(全長またはインタクトのモノクローナル抗体を含む)、ポリクローナル抗体、多価抗体、および所望の生物学的活性、すなわちヒトネクチン-2との結合を示すのに十分な長さの抗体フラグメントを含む。

【0166】

本発明による抗体または複数の抗体には、ポリクローナル抗体またはモノクローナル抗体(mAb)などのインタクト抗体、ならびにFabまたはF(ab')<sub>2</sub>フラグメントなどのそのタンパク質分解フラグメントが含まれる。単鎖抗体も本発明の範囲内に含まれる。

【0167】

抗体フラグメント

「抗体フラグメント」は、インタクト抗体の一部分のみを含み、一般的に、インタクト抗体の抗原結合部位を含み、したがって抗原と結合する能力を保持する。本定義によって包含される抗体フラグメントの例には、(i)VL、CL、VH、およびCH1ドメインを有するFabフラグメント、(ii)CH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を有するFabフラグメントであるFab'フラグメント、(iii)VHおよびCH1ドメインを有するFdフラグメント、(iv)VHおよびCH1ドメインならびにCH1ドメインのC末端に1つ以上のシステイン残基を有するFd'フラグメント、(v)抗体の単一アームのVLおよびVHドメインを有するFvフラグメント、(vi)VHドメインからなるdAbフラグメント(Ward et al., Nature 1989, 341, 544-546)、(vii)単離されたCDR領域、(viii)ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab'フラグメントを含む二価フラグメントであるF(ab')<sub>2</sub>フラグメント、(ix)単鎖抗体分子(例えば、単鎖Fv、scFv)(Bird et al., Science 1988, 242, 423-426、およびHouston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1988, 85, 5879-5883)、(x)2つの抗原結合部位を有し、同一ポリペプチド鎖に軽鎖可変ドメイン(VL)と結合された重鎖可変ドメイン(VH)を含む「二重特異的抗体」(例えば、EP404,097、WO93/11161、およびHollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448)、(xi)相補的な軽鎖ポリペプチドとともに抗原結合領域の対を形成するタンデムFdセグメントの対(VH-CH1-VH-CH1)を含む「線状抗体」(Zapata et al. Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062、および米国特許第5,641,870号)が含まれる。

10

20

30

40

50



## 【0168】

様々な技術が抗体フラグメントの生成のために開発されている。伝統的に、これらのフラグメントは、インタクト抗体のタンパク質分解消化を介して派生された（例えば、Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992) および Brennan et al., Science, 229:81 (1985) を参照）。しかし、これらのフラグメントは現在、組換え宿主細胞によって直接的に生成することができる。例えば、抗体フラグメントは、抗体ファージライブラリーから単離することができる。あるいは、Fab'-SHフラグメントを大腸菌から直接的に回収し、化学的に結合してF(ab')<sub>2</sub>フラグメントを生成することができる（Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)）。別の取り組みによれば、F(ab')<sub>2</sub>フラグメントは組換え宿主細胞培養から直接的に単離することができる。抗体フラグメントの生成のための他の技術は、当業者には明らかであろう。他の実施形態では、選択される抗体は単鎖Fvフラグメント（scFv）である。

10

## 【0169】

単鎖抗体は、抗原結合能力を有し、免疫グロブリン軽鎖および重鎖の可変領域と相等的または類似的であるアミノ酸配列を含む単鎖複合ポリペプチド、すなわち連結されたV<sub>H</sub>-V<sub>L</sub>または単鎖Fv（scFv）であることができる。単鎖抗体（米国特許第4,946,778号）を生成するための技術は、ネクチン-2に対する単鎖抗体を生成するために適応することができる。

20

## 【0170】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」（mAb）という用語は、ほとんど均一な抗体の集団から得られる抗体を指し、すなわち、集団を構成する個々の抗体は、少量で存在し得る自然発生的な変異の可能性以外は同一である。モノクローナル抗体は高度に特異的であり、単一抗原に対して向けられる。さらに、異なる決定基（エピトープ）に対して向けられた異なる抗体を通常含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、各モノクローナル抗体は抗原の単一の決定基に対して向けられる。修飾語句「モノクローナル」は、いずれかの特定の方法によって抗体の生成を必要とすると解釈されるべきではない。mAbは、当業者に知られている方法によって得ることができる。例えば、本発明に従って使用されるモノクローナル抗体は、Kohler et al., Nature 1975、256、495によって最初に記載されたハイブリドーマ法によって生成され得、または組換えDNA法（例えば、米国特許第4,816,567号）によって生成され得る。モノクローナル抗体はまた、例えば、Clackson et al., Nature 1991、352、624-628またはMarks et al., J. Mol. Biol., 1991、222:581-597に記載されている技術を使用してファージ抗体ライブラリーから単離され得る。

30

## 【0171】

機能的可変重鎖（V<sub>H</sub>）および可変軽鎖（V<sub>L</sub>）遺伝子の迅速な識別およびクローニングを通じたモノクローナル抗体に由来する組換え一価抗原結合分子の設計および開発、ならびに組換え細菌における発現に最適化された合成DNA配列の設計およびクローニングは、Fields et al., 2013、8(6):1125-48に記載されている。

40

## 【0172】

本発明のmAbは、IgG、IgM、IgE、IgA、およびIgDを含む任意の免疫グロブリンクラスのものであり得る。mAbを産生するハイブリドーマは、インビトロまたはインビボで培養することができる。高力価のmAbはインビボ産生によって得ることができ、個々のハイブリドーマからの細胞を末処置の準備したBalb/cマウスに腹腔内注入して、高濃度で所望のmAbを含む腹水を生成する。mAbは、当業者によく知られている方法を使用して、そのような腹水から、または培養上清から精製され得る。

## 【0173】

本発明の抗体の超可変領域と特異的に免疫反応性である抗イディオタイプ抗体もまた含

50

まれる。

【 0 1 7 4 】

本発明は、軽鎖の 3 つの C D R および重鎖の 3 つの C D R を含む抗原結合ドメイン ( A B D ) を含むモノクローナル抗体または抗体フラグメントを提供し、当該 A B D は、( i ) 配列番号 7 のアミノ酸配列を含む重可変鎖および配列番号 8 のアミノ酸配列を含む軽可変鎖 ( 本明細書ではクローン 7 として識別される )、または ( i i ) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列を含む重可変鎖および配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含む軽可変鎖 ( 本明細書ではクローン 1 1 として識別される ) を含むモノクローナルマウス抗体の A B D と少なくとも 9 0 % の配列同一性または類似性を有する。そのような抗体は、抗体クローン 7、またはクローン 1 1 の対応する A B D と少なくとも 9 3 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6、少なくとも 9 7、少なくとも 9 8、少なくとも 9 9 % の配列同一性または類似性、あるいは 1 0 0 % の配列同一性を有する A B D ドメインを有し得る。

10

【 0 1 7 5 】

配列同一性は、2 つの異なる配列間で正確に一致するアミノ酸またはヌクレオチドの量である。配列類似性によって、アミノ酸の保存的置換を同一のアミノ酸として決定することができる。本明細書に記載のポリヌクレオチド配列は、ヒト細胞などの特定の細胞での発現のためにコドン最適化され得る。コドン最適化は、抗体の鎖のコードされたアミノ酸配列を変更しないが、例えば、細胞での発現を増加させる可能性がある。

【 0 1 7 6 】

本発明はまた、本発明による抗体分子の保存的アミノ酸変異体を提供する。本発明による変異体はまた、コードされたタンパク質の全分子構造を保存するものとして生成され得る。開示されるタンパク質生成物を構成する個々のアミノ酸の特性を考えると、いくつかの合理的な置換が当業者によって認識されるであろう。アミノ酸置換、すなわち「保存的置換」は、例えば、極性、電荷、溶解性、疎水性、親水性、および/または含まれる残基の両親媒性の性質における類似性に基づいてなされ得る。本明細書で使用される「抗体類似体」という用語は、別の抗体から 1 つ以上の保存的アミノ酸置換によって派生される抗体を指す。

20

【 0 1 7 7 】

本明細書で使用される「抗体変異体」という用語は、本発明の抗体を含む任意の分子を指す。例えば、抗体またはその抗原結合フラグメントが別の化学的実体と結合されている融合タンパク質は、抗体変異体とみなされる。

30

【 0 1 7 8 】

抗体の配列の類似体および変異体もまた、本出願の範囲内である。これらには、限定されないが、配列内のアミノ酸の保存的および非保存的な置換、挿入、および欠失が含まれる。そのような改変および得られる抗体類似体または変異体は、それらがヒトネクチン - 2 との抗体の結合を付与する、または改善さえする限り、本発明の範囲内にある。

【 0 1 7 9 】

当業者に知られているアミノ酸の保存的置換は、本発明の範囲内である。保存的アミノ酸置換には、1 つのアミノ酸を同じタイプの官能基または側鎖、例えば、脂肪族、芳香族、正電荷、負電荷を有する別のものによって交換することを含む。これらの置換は、経口生物学的利用能、浸透、および特定の細胞集団への標的化、免疫原性などを増強し得る。当業者は、コードされた配列中の単一のアミノ酸または小さい割合のアミノ酸を変更、追加、または削除する、ペプチド、ポリペプチド、またはタンパク質配列への個々の置換、欠失、または付加が、「保存的に改変された変異体」であり、変更が化学的に類似したアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらすことを認識するであろう。機能的に類似したアミノ酸をもたらす保存的置換リストは、当技術分野でよく知られている。例えば、当技術分野で知られている 1 つのリストにより、以下の 6 つの群は各々、互いが保存的置換であるアミノ酸を含む。

40

- 1 ) アラニン ( A )、セリン ( S )、スレオニン ( T )、
- 2 ) アスパラギン酸 ( D )、グルタミン酸 ( E )、

50

- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)、
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)、
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)、および
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)。

**【0180】**

変異鎖配列は、特定のプライマーを使用したシーケンシング法によって決定されることが強調されるべきである。同じ配列で使用する異なるシーケンシング法は、技術的な問題および異なるプライマーにより、特に配列末端で、わずかに異なる配列をもたらす得る。

**【0181】**

本明細書で使用される「抗体の抗原結合部分を有する分子」および「抗原結合フラグメント」という用語は、任意のアイソタイプで任意の動物細胞株または微生物によって生成されるインタクト免疫グロブリン分子だけでなく、その抗原結合反応性画分、限定されないが、例えば Fab フラグメント、Fab' フラグメント、F(ab')<sub>2</sub> フラグメント、その重鎖および/または軽鎖の可変部分、Fab ミニ抗体 (例えば、WO 93/15210、米国特許出願第 08/256,790 号、同第 WO 96/13583、米国特許出願第 08/817,788 号、同第 WO 96/37621、米国特許出願第 08/999,554 号を参照)、およびそのような反応性画分を組み込む単鎖抗体、ならびに抗体反応性画分が物理的に挿入されている任意の他のタイプの分子を含むことが意図されている。そのような分子は任意の既知の技術によって提供され得、限定されないが、酵素的切断、ペプチド合成、または組換え技術が含まれる。

**【0182】**

本明細書における抗体は特に「キメラ」抗体を含み、重鎖および/または軽鎖の一部が特定の種に由来する、または特定の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同一または相同であり、一方、鎖 (複数可) の残りの部分は、別の種に由来する、または別の抗体クラスまたはサブクラスに属する抗体、ならびにそれらが所望の生物学的活性を示す限り、そのような抗体のフラグメントにおける対応する配列と同一または相同的である (米国特許第 4,816,567 号、および Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851-6855 (1984))。加えて、相補性決定領域 (CDR) グラフト化を実施して、親和性または特異性を含む抗体分子の特定の特性を変更し得る。CDR グラフトの非限定的な例は、米国特許第 5,225,539 号に開示されている。

**【0183】**

キメラ抗体は、ネズミ mAb に由来する可変領域およびヒト免疫グロブリン定常領域を有するものなど、異なる部分が異なる動物種に由来する分子である。ヒト抗体 (アクセプター抗体と呼ばれる) にほとんど由来する可変領域フレームワーク残基およびマウス抗体 (ドナー抗体と呼ばれる) にほとんど由来する CDR を有する抗体は、ヒト化抗体とも呼ばれる。キメラ抗体は主に、適用において免疫原性を低減し、産生における収量を増加するために使用され、例えば、ネズミ mAb はハイブリドーマから高い収量を有するが、ヒトにおいて高い免疫原性を有し、そのためヒト/ネズミキメラ mAb が使用される。キメラ抗体およびそれらの生成方法は当技術分野で知られている (例えば、PCT 特許出願 WO 86/01533、同第 WO 97/02671、同第 WO 90/07861、同第 WO 92/22653、ならびに米国特許第 5,693,762 号、同第 5,693,761 号、同第 5,585,089 号、同第 5,530,101 号、および同第 5,225,539 号)。

**【0184】**

いくつかの実施形態によれば、抗体は、モノクローナル抗体である。

**【0185】**

いくつかの特定の実施形態によれば、モノクローナル抗体は、キメラモノクローナル抗体である。

10

20

30

40

50

## 【0186】

いくつかの実施形態によれば、キメラ抗体は、ヒト由来の定常領域を含む。

## 【0187】

いくつかの実施形態によれば、キメラ抗体のヒト定常領域は、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4からなる群から選択される。

## 【0188】

いくつかの実施形態によれば、キメラ抗体のヒト定常領域は、ヒトIgG1およびヒトIgG2からなる群から選択される。

## 【0189】

特定の実施形態によれば、ヒトネクチン-2を認識するキメラモノクローナル抗体が提供され、これは、

i. HC CDR1が配列番号1であり、HC CDR2が配列番号2であり、HC CDR3が配列番号3であり、LC CDR1が配列番号4であり、LC CDR2が配列番号5であり、かつLC CDR3が配列番号6である、6つのCDRのセット、または

ii. HC CDR1が(配列番号11)であり、HC CDR2が(配列番号12)であり、HC CDR3が(配列番号13)であり、LC CDR1が(配列番号14)であり、LC CDR2が(配列番号15)であり、かつLC CDR3が(配列番号16)である、6つのCDRのセット、を含む、抗体または抗体フラグメントを含む。

## 【0190】

## 薬理学

医薬品および薬剤の製剤において、活性剤は、好ましくは、1つ以上の薬学的に許容される担体(複数可)および任意にいずれかの他の治療成分とともに利用される。担体(複数可)は、製剤の他の成分と適合性があり、その受容者に対して過度に有害でないという観点において、薬学的に許容されなければならない。活性剤は、上記のように、所望の薬理学的効果を達成するのに有効な量で、そして所望の曝露を達成するのに適切な量で提供される。

## 【0191】

典型的には、抗体の抗原結合部分を含む、またはペプチド模倣物を含む別のポリペプチドを含む本発明の抗体ならびにそのフラグメントおよびコンジュゲートは、治療使用のために無菌の生理食塩水に懸濁される。あるいは、本医薬組成物は、有効成分(抗体の抗原結合部分を含む分子)の放出を制御するために、または患者の系におけるその存在を延長するために製剤化され得る。多数の好適な薬物送達システムが知られており、例えば、埋め込み可能な薬物放出システム、ヒドロゲル、ヒドロキシメチルセルロース、マイクロカプセル、リボソーム、マイクロエマルジョン、マイクロスフェアなどが含まれる。制御放出調製物は、本発明による分子を複合体化または吸着するためにポリマーの使用を通して調製することができる。例えば、生体適合性ポリマーには、ポリ(エチレン-コ-酢酸ビニル)のマトリックス、およびステアリン酸ダイマーとセバリン酸のポリ無水物コポリマーのマトリックスが含まれる。そのようなマトリックスからの本発明による分子、すなわち抗体または抗体フラグメントの放出速度は、分子の分子量、マトリックス内の分子の量、および分散される粒子のサイズに依存する。

## 【0192】

本発明の医薬組成物は、経口、局所、鼻腔内、皮下、筋肉内、静脈内、動脈内、関節内、病変内、腫瘍内、または非経口などの任意の好適な手段によって投与され得る。通常、静脈内(i.v.)投与が抗体を送達するために使用される。

## 【0193】

本発明による分子の治療有効量が、とりわけ、投与スケジュール、投与される分子の単位用量、分子が他の治療薬と組み合わせて投与されるか、患者の免疫状態および健康、投与される分子の治療的活性、血液循環におけるその持続性、ならびに治療する医師の判断に依存することは、当業者には明らかであろう。

## 【0194】

本明細書で使用されるとき、「治療有効量」という用語は、哺乳動物における疾患または障害を治療するのに有効である薬剤の量を指す。癌の場合、薬剤の治療有効量は、癌細胞の数を低減し、腫瘍サイズを低減し、末梢器官への癌細胞浸潤を阻害し（すなわち、ある程度遅延させ、好ましくは停止する）、腫瘍転移を阻害し（すなわち、ある程度遅延させ、好ましくは停止する）、腫瘍の成長をある程度阻害し、かつ／または障害と関連する症状の1つ以上をある程度緩和し得る。薬剤が成長を妨げ、かつ／または既存の癌細胞を死滅し得る範囲まで、それは細胞増殖抑制性および／または細胞毒性であり得る。癌治療のため、インビボでの効能は、例えば、生存期間、疾患進行までの時間（TTP）、奏効率（RR）、奏効期間、および／または生活の質を評価することによって判断することができる。

10

#### 【0195】

本発明による治療にとって修正可能な癌には、限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病またはリンパ系悪性腫瘍が含まれる。そのような癌のより具体的な例には、扁平上皮癌、肺癌（小細胞肺癌、非小細胞肺癌、肺の腺癌、および肺の扁平上皮癌を含む）、腹膜癌、肝細胞癌、胃（gastric）または胃（stomach）癌（胃腸癌を含む）、膵臓癌、神経膠芽細胞腫、子宮頸癌、卵巣癌、肝臓癌、膀胱癌、肝腫、乳癌、結腸癌、結腸直腸癌、子宮内膜または子宮癌、唾液腺癌、腎臓癌または腎癌、肝臓癌、前立腺癌、外陰癌、甲状腺癌、肝癌腫、様々なタイプの頭頸部癌、およびB細胞リンパ腫（低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（NHL）、小リンパ球性（SL）NHL、中等度／濾胞性NHL、中等度びまん性NHL、高悪性度免疫芽球性NHL、高悪性度リンパ芽球性NHL、高悪性度小非切断細胞NHL、巨大腫瘍病変NHL、マントル細胞リンパ腫、エイズ関連リンパ腫、およびワルデンストレームマクログロブリン血症を含む）、慢性リンパ性白血病（CLL）、急性リンパ芽球性白血病（ALL）、有毛細胞白血病、慢性骨髄芽球性白血病、および移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）、ならびに母斑症、浮腫（脳腫瘍と関連するものなど）、およびメグス症候群と関連する異常な血管増殖が含まれる。好ましくは、癌は、乳癌、結腸直腸癌、直腸癌、非小細胞肺癌、非ホジキンリンパ腫（NHL）、腎細胞癌、前立腺癌、肝臓癌、膵臓癌、軟組織肉腫、カボシ肉腫、カルシノイド腫、頭頸部癌、黒色腫、卵巣癌、中皮腫、および多発性骨髄腫からなる群から選択される。本発明の治療にとって修正可能な癌性状態には、転移性癌が含まれる。

20

#### 【0196】

他の実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、ネクチン - 2 の過剰発現を特徴とする癌の治療に使用するためのものである。ネクチン - 2 の過剰発現と関連する癌のタイプは、The Cancer Genome Atlas（TCGA）などの既知のデータベースを使用して特定することができる。ある特定の実施形態によれば、本発明による組成物によって治療可能である癌は、副腎皮質癌（ACC）、嫌色素細胞性腎癌（KICH）、肝臓肝細胞癌（LIHC）、結腸および直腸腺癌（COAD、READ）、膵管腺癌（PAAD）、褐色細胞腫および傍神経節腫（PCPG）、乳頭状腎癌（KIRP）、肺腺癌（LUAD）、頭頸部扁平細胞癌（HNSC）、前立腺腺癌（PRAD）、子宮体子宮内膜癌（UCEC）、子宮頸癌（CESC）、皮膚黒色腫（SKCM）、中皮腫（MESO）、尿路上皮膀胱癌（BLCA）、明細胞腎臓癌（KIRC）、肺扁平細胞癌（LUSC）、子宮癌肉腫（UCS）、肉腫（SARC）、卵巣漿液性嚢胞腺癌（OV）、乳頭状甲状腺癌（THCA）、多形性神経膠芽細胞腫（GBM）、乳癌（BRCA）、低悪性度神経膠腫（LGG）、およびびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBC）からなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

30

40

#### 【0197】

有効成分としての本発明の分子は、よく知られているように、薬学的に許容され、有効成分と適合性のある賦形剤に溶解、分散、または混合される。好適な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝化生理食塩水（PBS）、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、およびそれらの組み合わせである。他の好適な担体は当業者によく知られている。加えて、必要に応じて、本組成物は、湿潤剤または乳化剤、pH緩衝剤などの

50

少量の補助物質を含むことができる。

【0198】

本発明による医薬組成物は、抗新生物組成物とともに投与され得る。

【0199】

本明細書で使用される「治療」という用語は、治療的治療および予防的または防止的手段の両方を指す。治療を必要とするものには、すでに障害を有するもの、ならびに障害が防止されるべきものが含まれる。

【0200】

「癌」という用語は、一般的に、制御されない細胞増殖を特徴とする哺乳動物における生理学的状態を指す、または説明する。癌の例には、限定されないが、癌腫、リンパ腫、芽細胞腫、肉腫、および白血病が含まれる。そのような癌のより具体的な例には、黒色腫、肺、甲状腺、乳房、結腸、前立腺、肝臓、膀胱、腎臓、子宮頸部、膵臓、白血病、リンパ腫、骨髄性、卵巣、子宮、肉腫、胆管、または子宮内膜の癌が含まれる。

10

【0201】

いくつかの実施形態によれば、癌を治療する方法は、本医薬組成物を、少なくとも1つの追加の抗癌剤の投与を含む治療投与計画の一部として投与することを含む。

【0202】

いくつかの実施形態によれば、抗癌剤は、代謝拮抗剤、有糸分裂阻害剤、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、アスパラギナーゼ、アルキル化剤、抗腫瘍抗生物質、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

20

【0203】

いくつかの実施形態によれば、代謝拮抗剤は、シタラビン、フルダラビン、フルオロウラシル、メルカプトプリン、メトトレキサート、チオグアニン、ゲムシタビン、およびヒドロキシウレアからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、有糸分裂阻害剤は、ビンクリスチン、ビンブラスチン、およびビノレルビンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、トポイソメラーゼ阻害剤は、トポテカンおよびイレノテカンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、アルキル化剤は、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シスプラチン、カルボプラチン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、チオテパ、ダカルバジン、およびプロカルバジンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、抗腫瘍抗生物質は、ブレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、イダルビシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、およびプリカマイシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、トポイソメラーゼIIは、エトポシドおよびテニポシドからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

30

【0204】

いくつかの特定の実施形態によれば、追加の抗癌剤は、ペバシズマブ、カルボプラチン、シクロホスファミド、ドキソルビシン塩酸塩、ゲムシタビン塩酸塩、トポテカン塩酸塩、チオテパ、およびそれらの組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。

40

【0205】

本発明によるモノクローナル抗体は、少なくとも1つの抗癌剤との併用療法の一部として使用され得る。いくつかの実施形態によれば、追加の抗癌剤は、免疫調節剤、活性化リンパ球細胞、キナーゼ阻害剤、または化学療法剤である。

【0206】

いくつかの実施形態によれば、抗癌剤は、作用剤または拮抗剤に関わらず、免疫チェックポイント分子に対する抗体などの免疫調節剤である。

【0207】

チェックポイント免疫療法による遮断は、癌治療の刺激的な新しい場であることを証明

50

している。免疫チェックポイント経路は、自己寛容を維持し、生理学的条件下で免疫系による損傷から組織を保護するために協調して機能する一連の共刺激および阻害分子からなる。腫瘍は、特定のチェックポイント経路を利用して免疫系を回避する。したがって、そのような経路の阻害は、有望な抗癌治療戦略として浮上している。

#### 【0208】

抗細胞毒性Tリンパ球4 (CTLA-4) 抗体イピリムマブ (2011年に承認) は、癌患者の治療に有益性を示した最初の免疫療法剤だった。抗体は、T細胞への抗原提示の際に抑制性シグナルを妨害する。抗プログラム細胞死1 (PD-1) 抗体ペンブロリズマブ (2014年に承認) は、T細胞によって発現されるPD-1受容体の負の免疫調節シグナル伝達を遮断する。追加の抗PD-1剤が、非小細胞肺癌 (NSCLC) の治療用に2014年に規制当局の承認のために提出された。現在、活発な研究が他の多くの免疫チェックポイント、とりわけ、CEACAM1、NKG2A、B7-H3、B7-H4、VISTA、CD112R、リンパ球活性化遺伝子3 (LAG3)、CD137、OX40 (CD134とも呼ばれる)、およびキラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) を探求している。

#### 【0209】

いくつかの特定の実施形態によれば、免疫調節剤は、CTLA-4を阻害する抗体、抗ヒトプログラム細胞死タンパク質1 (PD-1)、PD-L1、およびPD-L2抗体、活性化細胞毒性リンパ球細胞、リンパ球活性化剤、CEACAMに対する抗体、TIGITに対する抗体、ならびにRAF/MEK経路阻害剤からなる群から選択される。各可能性は、本発明の個別の実施形態を表す。いくつかの特定の実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、PD-1に対するmAb、PD-L1に対するmAb、PD-L2に対するmAb、CEACAM1に対するmAb、CTLA-4に対するmAb、TIGITに対するmAb、PVR、インターロイキン2 (IL-2)、またはリンホカイン活性化キラー (LAK) 細胞から選択される。

#### 【0210】

他の実施形態によれば、追加の抗癌剤は化学療法剤である。本発明による抗体とともに、または別々に投与することができる化学療法剤は、抗癌活性を示す当技術分野で知られているようないずれかの薬剤を含み得、限定されないが、ミトキサントロン、トポイソメラーゼ阻害剤、紡錘体毒ピンカ類であるビンブラスチン、ビンクリスチン、ビノレルビン (タキソール)、パクリタキセル、ドセタキセル; アルキル化剤系であるメクロレタミン、クロラムブシル、シクロホスファミド、メルファラン、イホスファミド; メトトレキサート、6-メルカプトプリン、5-フルオロウラシル、シタラビン、ゲムシタビン、ポドフィロトキシン系であるエトポシド、イリノテカン、トポテカン、ダカルバジン; 抗生物質であるドキソルビシン (アドリアマイシン)、ブレオマイシン、マイトマイシン; ニトロソウレア系であるカルムスチン (BCNU)、ロムスチン、エピルピシン、イダルピシン、ダウノルビシン、無機イオン系であるシスプラチン、カルボプラチン; インターフェロン、アスパラギナーゼ、ホルモン系であるタモキシフェン、リュープロリド、フルタミド、および酢酸メゲストロールが含まれる。

#### 【0211】

いくつかの実施形態によれば、化学療法剤は、アルキル化剤、代謝拮抗剤、葉酸類似体、ピリミジン類似体、プリン類似体および関連阻害剤、ピンカアルカロイド、エピドポフィロトキシン、抗生物質、L-アスパラギナーゼ、トポイソメラーゼ阻害剤、インターフェロン、白金配位錯体、アントラセンジオン置換尿素、メチルヒドラジン誘導体、副腎皮質抑制剤、副腎皮質ステロイド、プロゲスチン、エストロゲン、抗エストロゲン、アンドロゲン、抗アンドロゲン、およびゴナドトロピン放出ホルモン類似体から選択される。別の実施形態によれば、化学療法剤は、5-フルオロウラシル (5-FU)、ロイコボリン (LV)、イリノテカン、オキサリプラチン、カペシタビン、パクリタキセル、およびドセタキセルからなる群から選択される。1つ以上の化学療法剤を使用することができる。

#### 【0212】

いくつかの実施形態では、本発明による医薬組成物は、癌の治療に使用するため、または免疫応答の増強に使用するためのものである。

【0213】

「免疫応答の増強する」という用語は、免疫系の応答性を増加し、その記憶を誘発または延長することを指す。本発明による医薬組成物は、ワクチン接種時に免疫系を刺激するために使用され得る。したがって、一実施形態では、本医薬組成物は、ワクチン接種を改善するために使用することができる。

【0214】

ある特定の実施形態において、癌は、肺、甲状腺、乳房、結腸、黒色腫、前立腺、肝臓、膀胱、腎、子宮頸部、膵臓、白血病、リンパ腫、骨髄性、卵巣、子宮、肉腫、胆管、および子宮内膜細胞の癌から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

10

【0215】

いくつかの実施形態によれば、本発明による少なくとも1つの抗体またはそのフラグメントを含む医薬組成物、および追加の免疫調節剤またはキナーゼ阻害剤を含む医薬組成物は、別々の投与によって癌の治療に使用される。

【0216】

さらに別の態様によれば、本発明は、癌を治療する方法をそれを必要とする対象において提供し、当該対象に本発明によるモノクローナル抗体または抗体フラグメントの治療有効量を投与することを含む。

【0217】

20

本明細書で使用される「有効量」という用語は、対象に投与されたときに意図された治療効果を有する抗体フラグメントのモノクローナル抗体の十分な量を指す。治療の最終結果を達成するために必要とされる有効量は、例えば、腫瘍の特定のタイプおよび患者の状態の重症度、ならびに併用がさらに放射線と同時投与されるかを含む多くの要因に依存し得る。本発明の文脈における活性剤の有効量（用量）は、期間にわたって対象における有益な治療応答に影響を及ぼすのに十分なものであるべきであり、限定されないが、腫瘍増殖の阻害、腫瘍増殖速度の低減、腫瘍および転移の成長の防止、ならびに生存率の向上が含まれる。

【0218】

本明細書で説明される組成物の毒性および治療効能は、細胞培養または実験動物における標準的な薬学的手順によって、例えば、対象化合物についてIC<sub>50</sub>（50%阻害をもたらす濃度）および最大耐量を決定することによって、決定することができる。これらの細胞培養アッセイ、および動物試験から得られるデータは、ヒトにおける使用のための投与量の範囲を製剤化するために使用することができる。投与量は、とりわけ、他の関連要因の中でも、使用される投与剤形、選択される投与計画、治療のために使用される薬剤の組成、および利用される投与経路に応じて変化し得る。正確な処方、投与経路、および投薬量は、患者の状態を考慮して個々の医師によって選択され得る。治療される状態の重症度および応答性に応じて、投与はまた、徐放性組成物の単回投与であり得、治療過程は、数日から数週間、または治癒に影響が及ぶ、または病状の減少が達成されるまで継続する。投与される組成物の量は、もちろん、治療される対象、病状の重症度、投与の手段、処方する医師の判断、および他のすべての関連する要因に依存するであろう。

30

40

【0219】

対象に物質、化合物、または薬剤「を投与する」または「の投与」という用語は、当業者に知られている様々な方法のうちの1つを使用して実行することができる。例えば、化合物または薬剤は、経腸的または非経口的に投与することができる。経腸的は、経口、舌下、または直腸を含む胃腸管を介した投与を指す。非経口投与には、静脈内、皮内、筋肉内、腹腔内、皮下、眼、舌下、鼻腔内、吸入、脊髄内、脳内、および経皮（例えば、皮膚管を介した吸収による）による投与が含まれる。化合物または薬剤はまた、再充電可能または生体分解性ポリマーデバイスあるいは他のデバイス、例えば、パッチおよびポンプ、あるいは製剤によって適切に導入することができ、化合物または薬剤の持続放出、徐放、

50



または制御放出をもたらす。投与はまた、例えば、1回、複数回、および/または1回以上の延長した期間で実施することができる。いくつかの実施形態では、投与は、自己投与を含む直接投与、および薬物を処方する行為を含む間接投与の両方を含む。例えば、本明細書で使用する場合、患者に薬物を自己投与するように、または他の人に薬物を投与させるように指示し、かつ/または患者に薬物の処方箋を提供する医師が、その薬物を患者に投与する。

【0220】

抗体は、一般に、約0.1~約20mg/kg患者の体重、一般に約0.5~約10mg/kg、そしてしばしば約1~約5mg/kgの範囲で投与される。これに関連して、少なくとも12時間、好ましくは少なくとも4日、より好ましくは21日までの循環半減期を有する抗体を使用することが好ましい。キメラ抗体は、14~21日までの循環半減期を有すると予想される。いくつかの例では、大量の負荷用量を投与した後、治療期間にわたって間欠的な（例えば、毎週）維持用量を投与することが有効であり得る。抗体はまた、徐放性送達システム、ポンプ、および連続注入のための他の既知の送達システムによって送達することができる。

10

【0221】

本発明の抗体は、癌を治療するためにCARを含む操作されたリンパ球を利用するCARベースの養子免疫療法でを使用することができる。CAR-T系は、非限定的な例として本明細書に記載されている。

【0222】

20

T細胞療法は、癌または腫瘍の治療にキメラ抗原受容体（CAR）を利用する（すなわち、CAR-T細胞療法）。CAR-T細胞療法は、腫瘍細胞に作用して腫瘍細胞のアポトーシスを引き起こす遺伝子操作されたT細胞を癌患者に投与することを伴う細胞免疫療法である。遺伝子操作されたT細胞は、遺伝子導入技術を使用して、CD3鎖配列のフラグメントなどの細胞内ドメインと結合した抗体の可変領域（VLおよびVH）を有するCARをT細胞上で発現させることによって調製される。CARは、腫瘍抗原に特異的なモノクローナル抗体の可変領域の軽鎖と重鎖とが互いに結合し、次にC末端側においてT細胞受容体（TCR）に結合するキメラタンパク質の総称である。

【0223】

いくつかの実施形態によれば、CARは、CD8ストロークドメイン、CD28 TMDメイン、41BBドメイン、およびCD3ドメインからなる群から選択される少なくとも1つのタンパク質ドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、CARは、CD8ストロークドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、CARは、CD28 TMDメインを含む。いくつかの実施形態によれば、CARは、CD3シグナル伝達ドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、CARは、41BBドメインを含む。特定の実施形態によれば、CARは、CD8ストロークドメイン、CD28 TMDメイン、41BBドメイン、およびCD3ドメインを含む。

30

【0224】

いくつかの実施形態によれば、CARは、4-1BB（または41BBまたはCD137）、ICOS、OX40、CD27、KIR2DS2、MYD88-CD40、またはCD28に由来する共刺激ドメインを含む。いくつかの実施形態では、CARは、CD3、41BBおよびCD28のシグナル伝達ドメインを含む。

40

【0225】

いくつかの実施形態によれば、CARは、CD28 TM、DAP12 TM、CD8 TM、CD3 TM、DAP10 TM、およびICOS TMから選択される膜貫通ドメイン（TM）を含む。

【0226】

いくつかの実施形態によれば、CARは、ヒンジ領域配列を含む。いくつかの実施形態によれば、ヒンジ領域配列は、CD8、CD28、またはIgG4ヒンジに由来する。

【0227】

50

いくつかの実施形態によれば、本発明による重鎖可変領域（VH）および軽鎖可変領域（VL）を含むキメラ抗原受容体（CAR）が提供される。ある特定の実施形態によれば、その表面に発現されているCARを有する遺伝子改変リンパ球が提供される。いくつかの実施形態によれば、その表面に発現されているCARを有する遺伝子改変T細胞（CAR-T細胞）が提供される。

【0228】

いくつかの実施形態によれば、CARは、

i. 配列番号7を含む重鎖（HC）可変領域の3つの相補性決定領域（CDR）および配列番号8を含む軽鎖（LC）可変領域の3つのCDR、または該抗体もしくはフラグメントの配列と少なくとも90%の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体、ならびに

10

ii. 配列番号17を含む重鎖可変領域の3つのCDRおよび配列番号18を含む軽鎖可変領域の3つのCDR、または該抗体もしくはフラグメントの配列と少なくとも90%の配列同一性を有するその類似体もしくは誘導体、からなる群から選択される6つのCDR配列のセットを含む、ネクチン-2結合部位を含む。

【0229】

いくつかの実施形態によれば、類似体または誘導体は、該抗体またはフラグメント配列と少なくとも91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の配列同一性を有する。

【0230】

いくつかの実施形態によれば、CARは、

20

i. 配列番号7を含む重鎖（HC）可変領域の3つの相補性決定領域（CDR）および配列番号8を含む軽鎖（LC）可変領域の3つのCDR、ならびに

ii. 配列番号17を含む重鎖可変領域の3つのCDRおよび配列番号18を含む軽鎖可変領域の3つのCDR、からなる群から選択される6つのCDR配列のセットを含む、ネクチン-2結合部位を含む。

【0231】

いくつかの実施形態によれば、CARは、

i. HC CDR1がRFTMS（配列番号1）であり、HC CDR2がTISSSGGSYTYYPDSVKG（配列番号2）であり、HC CDR3がDRDFYGPYYAMDY（配列番号3）であり、LC CDR1がKSSQSL LNSGNQKNYLA（配列番号4）であり、LC CDR2がFASTRES（配列番号5）であり、かつLC CDR3がQQHYTTPLT（配列番号6）である、6つのCDRのセット、および

30

ii. HC CDR1配列がSYWIH（配列番号11）であり、HC CDR2がAVYPGNSDSNYNQKFKA（配列番号12）であり、HC CDR3がLVGTFDY（配列番号13）であり、LC CDR1がKASQNVGINVV（配列番号14）であり、LC CDR2がSASYRYS（配列番号15）であり、かつLC CDR3がQQYNTNPF T（配列番号16）である、6つのCDRのセット、からなる群から選択されるCDRセットを含むネクチン-2結合部位を含む。

【0232】

いくつかの実施形態によれば、CARは、配列番号20または22を含む抗原結合ドメイン、もしくは配列番号20または22と少なくとも85%の同一性を有する同類体と、膜貫通ドメインと、細胞内T細胞シグナル伝達ドメインと、を含む。

40

【0233】

ある特定の態様によれば、本発明は、本明細書に記載のCARを含む細胞を提供する。いくつかの実施形態によれば、細胞は、本発明のCARを発現するか、または発現することができる。いくつかの実施形態によれば、細胞はリンパ球である。いくつかの実施形態によれば、細胞は、T細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞から選択される。

【0234】

いくつかの実施形態によれば、T細胞などの細胞は、本発明のCARをコードする核酸分子を含む。他の実施形態によれば、T細胞などの細胞は、本発明のCARをコードする

50

核酸分子を含む核酸構築物を含む。さらなる実施形態によれば、本発明は、本発明のCARをコードする核酸構築物または分子を含むベクターを提供する。そのような実施形態によれば、T細胞は、本発明のCARを発現または発現することができる。

【0235】

いくつかの実施形態によれば、本明細書で説明されるCARを発現するように操作されたリンパ球が提供される。いくつかの実施形態によれば、本明細書で説明されるCARを発現するように操作されたT細胞が提供される。

【0236】

追加の実施形態によれば、本明細書で説明されるCARを発現するように操作されたNK細胞が提供される。

【0237】

本発明のCARは、膜貫通ドメイン(TMDドメイン)、共刺激ドメイン、および活性化ドメインを含む。いくつかの実施形態によれば、TMDドメインは、CD4、CD3、CD28およびCD8、または元の配列に対して少なくとも85%のアミノ酸同一性を有するその類似体から選択される受容体のTMDドメインであり、および/または共刺激ドメインは、CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CD27、CD80、およびCD70、元の配列に対して少なくとも85%のアミノ酸同一性を有するその類似体ならびにこれらの任意の組み合わせから選択されるタンパク質の共刺激ドメインから選択され、および/または活性化ドメインは、FcRおよびCD3-活性化ドメインから選択される。いくつかの実施形態によれば、CARは、主要なペプチドを含む。

【0238】

いくつかの実施形態によれば、本発明は、本発明の複数の細胞、例えば、CAR表示細胞を含む細胞組成物を提供する。

【0239】

「約」という用語は、特定の値について許容可能なエラー範囲、たとえば5%または10%までが想定させるべきであることを意味する。

【0240】

診断

本発明はさらに、癌を診断および予後診断するための方法を開示する。

【0241】

一態様によれば、本発明は、対象における癌または感染症の診断的および/または予後診断的方法を提供し、本方法は、当該対象の生物学的試料におけるネクチン-2の発現レベルを本明細書で説明される少なくとも1つの抗体を使用して決定する工程を含む。

【0242】

「生物学的試料」という用語は、診断またはモニタリングアッセイで使用され得る生物から得られる様々な試料タイプを包含する。本用語は、生物学的起源の血液および他の液体試料、生検標本などの固体組織試料、あるいは組織培養またはそれらに由来する細胞およびその子孫を包含する。さらに、本用語は、循環性腫瘍または他の細胞を包含し得る。本用語は、具体的には臨床試料を包含し、さらに細胞培養中の細胞、細胞上清、細胞溶解物、血清、血漿、尿、羊水、眼試料のための眼房水および硝子体水を含む生物学的液体、ならびに組織試料を含む。本用語はまた、試薬による処理、可溶化、または特定成分の豊富化などの達成後に任意の方法で操作されている試料を包含する。

【0243】

ネクチン-2の発現レベルの決定は、本明細書で説明される標識された抗ネクチン-2抗体によって実施することができる。発現の決定は、例えば、ELISAによって実施することができる。

【0244】

本発明の方法はさらに、当該発現レベルをコントロールレベルと比較するステップを含むことができる。

【0245】

10

20

30

40

50

以下の実施例は、本発明のいくつかの実施形態をさらに詳しく示すために提示される。それらは決して本発明の範囲を限定するものとして解釈されるべきではない。

【実施例】

【0246】

ここで、上記の説明とともに本発明を非限定的に説明する以下の実施例を参照する。

【0247】

一般に、本明細書で使用される命名法および本発明で利用される実験手順には、分子的、生化学的、微生物学的、免疫学的、および組換えDNA技術が含まれる。そのような技術は当技術分野でよく知られている。よく知られている手順に言及している他の全般的な参考が、読者の便宜のためにこの文書全体を通して提供される。

10

【0248】

実施例1．ネクチン-2 mRNAの高発現は、様々な癌患者の生存確率の低さと相関している。

ネクチン-2 mRNA発現と生存確率との間の相関関係をTCGAサイトからのデータで調べ、oncolnc.orgサイト(<https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67>)を使用して分析した。この相関関係は、低悪性度神経腫(図1A;  $p = 5.22 \times 10^{-5}$ )、腎臓の腎明細胞癌(図1B;  $p = 0.00037$ )、および肺腺癌(図1C;  $p = 0.0319$ )の患者について、図1の矢印で示されている。

【0249】

20

実施例2．ネクチン-2は特定の受容体を介して免疫細胞に結合して影響を及ぼす。

免疫細胞で発現する受容体と、腫瘍または抗原提示細胞(APC)で発現するネクチン-2に対するそれぞれの親和性の模式図(図2)である。TIGITは、T細胞またはNK細胞などの免疫細胞の共抑制受容体に関連し、DNAM-1(CD226とも呼ばれる)は、免疫細胞(例えば、T細胞)の活性化受容体に関連し、CD112R(PVRIGとも呼ばれる)はリンパ系免疫細胞(例えば、T細胞およびNK細胞)の共抑制受容体に関連し、ネクチン-2(CD112)は、主にCD112Rへの結合を介した免疫細胞の抑制性リガンドである。本発明によれば、抗ネクチン-2 mAbは、ネクチン-2とそのリガンドCD112Rおよび/またはTIGITとの相互作用を遮断し、免疫細胞の活性化を増加させることができる。

30

【0250】

実施例3．抗ネクチン-2 mAbの結合および遮断特性の分析。

ネクチン-2クローンは、ネクチン-2を発現しない親の8866細胞(EBV陽性バーキットリンパ腫)に結合しなかった。図3Aは、内因的にネクチン-2を発現するMDA-MB-231(乳腺癌)細胞(黒色バー)への、またはネクチン-2を過剰発現する8866-hネクチン-2細胞(灰色バー)への抗ネクチン-2クローンの結合を示している。mAbのすべては、ハイブリドーマ上清から30  $\mu$ l/ウェルで使用した。検出には、ヤギ抗マウス-647 Abを1:250希釈で使用した。図3Bは、8866-hネクチン2細胞に結合するCD112R-Fc(IgG1のヒトFc領域に融合したCD112Rの細胞外ドメイン)のFACS分析の結果を示している。生成された抗体のうち、3つのクローン(#9、11、および13)がこれらの相互作用を部分的に遮断し、1つのクローン(#7)がそれらを完全に遮断した。図3Cは、8866-hネクチン2細胞に結合するDNAM-1-FcのFACS分析の結果を示している。クローン15を除いて、他のクローン(#7~13)はどれも活性化受容体DNAM-1のネクチン-2への結合を遮断しなかった。図3Dは、抗ネクチン-2クローン7および11の存在下でCHO-K1-hネクチン2細胞に結合するTIGIT-FcのFACS分析の結果を示している。両方のクローンがTIGIT-Fc結合の>66%を遮断している。Fcタンパク質のすべてを20  $\mu$ g/mlで使用し、30  $\mu$ l/ウェルの示されたmAb上清と共インキュベートした。検出には、抗ヒト-APC Abを1:200希釈で使用した(Jackson immunoresearch AB\_2340526)。これらの結果は、ク

40

50

ローンのいくつかは、活性化受容体の結合にいかなる干渉もすることなく、抑制性受容体の結合を防ぐことができることを示唆している。

#### 【0251】

実施例4．抗ネクチン2 mAbによるネクチン-2の遮断は、NK細胞の活性化を促進する。

健康なドナーからのNK細胞を、異なるmAbおよび標的細胞株の存在下で2:1のE:T比で37℃で2時間インキュベートした。NK細胞活性化は、CD107aの表面発現の誘導によって測定され、対照IgGに対する倍数変化として表示される(Y軸)。すべてのmAbは、5 µg/mlで使用された。ヒト癌細胞株A549(図4Aおよび4C、肺癌)およびMDA-MB-231(図4B、乳腺癌)の結果を図4に示す。最も重要な効果は、クローン#3、7、および11で認められた。 $* = P < 0.04$ 、 $** p < 0.02$ 、 $*** p < 0.002$ (両側スチューデントのt検定による)。5人のドナーのうちの1人についての代表的なデータが示されている。クローン7および11のヒトIgG1キメラ変異体は、脱顆粒をさらに増加させ(図4C)、アソタイプコントロールと比較して>200%の脱顆粒をもたらした。 $*** p < 0.002$ 。2人のドナーのうち1人についての代表的なデータが示されている。このデータは、特定のクローンによるネクチン-2の遮断が、多くの標的に対するNK細胞の活性を増加させることを示唆している。さらに、エフェクターFcを有することが、NK活性がさらに増加させ、mAbに対する別の可能な作用様式を示唆している。

#### 【0252】

実施例5．ネクチン-2は様々な癌細胞で発現される。

様々なヒト腫瘍細胞株におけるネクチン-2およびPVRの発現をFACSによって分析した。分析は、黒色腫細胞、乳癌細胞、大腸直腸癌(CRC)細胞、腎臓細胞(HEK)、肺癌細胞、前立腺癌細胞、および脳腫瘍細胞(GBM)に対して行われ、すべてPVRおよびネクチン-2を発現する。市販の抗ネクチン-2(クローンTx31)および社内の抗PVR mAbを使用した。すべてのmAbは、2 µg/mlで使用された。検出には、ヤギ抗マウス-647を1:250希釈で使用した。ネクチン-2は様々な癌細胞で高度に発現していることが判明した。

#### 【0253】

実施例6．ヒトおよびカニクイザルのネクチン-2への抗ネクチン-2 mAbの同様の結合。

ヒトのネクチン-2(タンパク質id:Q92692)およびカニクイザル(Cyno)(macaca fascicularis、タンパク質id:XP\_005589607.1)のネクチン-2に結合する抗ネクチン-2 mAb(クローン7および11)を調べた。カニクイザルとヒトネクチン-2との間のタンパク質ブラストは、成熟タンパク質の細胞外ドメインが種間で14アミノ酸の違いを有していることを明らかにした。図5Aは、ヒトまたはCynoのネクチン-2のいずれかを発現するCHO細胞に一連の3倍希釈で13.3 nM ~ 0.02 nMの範囲で添加された両方のmAbのオーバーレイ結合曲線を示している。このアッセイのFACS分析の結果は、100%に設定された最大結合と比較した相対結合強度として表される。検出には、ヤギ抗マウス-647 Ab(Jackson immunoresearch AB\_2338910)を1:250希釈で使用した。このアッセイのデータ分析の要約も同様に示されており、両方のmAbがヒトおよびCynoのネクチン-2に高い類似の親和性で結合することをさらに示している。

#### 【0254】

抗ネクチン-2 mAbの結合も、Chlorocebus(アフリカミドリザル)由来のベロ細胞を使用して調べた。この種は、ヒトネクチン-2と97%の類似性でネクチン-2タンパク質(XP\_007995342.1)を発現する。図5Bは、図5Aで記載したFACS分析によってテストされた内因性ヒトネクチン-2(293T細胞で発現)および内因性アフリカミドリザル-ネクチン-2(ベロ細胞で発現)への抗ネクチン-2 mAbの結合を示している(Ab範囲:20 ~ 0.0003 nM)。この分析は、両方の

抗ネクチン - 2 クローンについて、高い親和性で、ヒトおよびサル両方のネクチン - 2 標的への同様の A b 結合を明らかにし、これは要約表でも明らかである。

【 0 2 5 5 】

実施例 7 . 抗 h ネクチン - 2 m A b は T 細胞の増殖に影響を及ぼす。

ヒト P B M C を C F S E ( C 3 4 5 5 4、T h e r m o F i s c h e r ) 標識し、0 . 2 u g / m l の P H A - L および示された抗体 2 u g / m l の存在下で標的細胞 M D A - M B - 2 3 1 ( 図 6 A ) または A 5 4 9 ( 図 6 B ) とインキュベートした。インキュベーション後、免疫細胞を収集し、抗ヒト C D 8 で染色した。C D 8 + T 細胞の細胞増殖は、C F S E シグナル強度によって評価された。m I g G 処理細胞の C F S E レベルを 1 に設定した。結果は、この対照と比較して増殖が倍増したものとして示されている。実験は 4 回行った ; すべての p 値は両側スチューデントの t 検定で 0 . 0 2 未満であった。示されているのは、試験された 7 人を代表する 1 人の P B M C ドナーの結果である。データは、示されたクローンによるネクチン - 2 の遮断が、様々な起源からの腫瘍細胞の存在下で C D 8 + T 細胞の増殖を増加させることを示唆している。

10

【 0 2 5 6 】

実施例 8 . 抗 h ネクチン - 2 m A b は、単独で、または既知のチェックポイント遮断薬と組み合わせて、C D 8 + T 細胞の増殖に影響を及ぼす。

T 細胞増殖に対する m A b の効果を調べるために、ヒト P B M C を C F S E 標識し、0 . 2 u g / m l の P H A - L および示された m A b の 2 u g / m l の存在下で、標的 R K O ( ヒト大腸癌細胞 ; 図 7 A ) または A 5 4 9 ( 図 7 B ) 細胞とインキュベートした。併用治療では、各 m A b を 2 u g / m l で添加した。インキュベーション後、免疫細胞を収集し、抗ヒト C D 8 で染色した。全集団および C D 8 増殖細胞を分析し、m I g G 処理細胞の C F S E レベルを 1 に設定した。実験は 4 回行った ; すべての p 値は両側スチューデントの t 検定で 0 . 0 2 未満であった。結果は、対照と比較して増殖が倍増したものとして示されている。試験された 2 人のドナーのうち 1 人の P B M C ドナーの結果が示されている。試験されたすべての組み合わせにより、個々の治療で C D 8 + T 細胞の増殖が大幅に増加した。

20

【 0 2 5 7 】

実施例 9 . 抗 h ネクチン - 2 抗体は I F N の分泌に影響を及ぼす。

ヒト P B M C を C F S E 標識し、0 . 2 u g / m l の P H A - L および示された抗体の 2 u g / m l の存在下で、標的細胞 R K O ( 図 8 A ) または A 5 4 9 ( 図 8 B ) とインキュベートした。併用治療では、各 m A b を 2 u g / m l で添加した。9 6 時間後、プレートを遠心分離し、上清を回収した。I F N の定量化は、B i o l e g e n d 製の H u m a n I F N - E L I S A M A X ( 商標 ) D e l u x e を使用して、製造元のプロトコルに従って行った。試験された 5 人のドナーのうち 1 人の P B M C ドナーについての結果が示されている。治療のすべては、I F N 分泌の有意な増加をもたらした ( p < 0 . 0 0 1 両側スチューデントの t 検定 ) 。

30

【 0 2 5 8 】

実施例 1 0 . 抗 h ネクチン - 2 抗体単独または既知のチェックポイント遮断薬との併用は、h P B M C による腫瘍細胞の死滅に影響を及ぼす。

40

実施例 8 に記載のようにアッセイを実施した。9 6 ~ 1 2 0 時間後、免疫細胞を除去し、腫瘍細胞を徹底的に洗浄し、C e l l T i t e r - G l o ( 登録商標 ) を使用して、製造元のプロトコルに従って付着性腫瘍細胞の生存率を確立した。すべての結果はキットの線形範囲内であった。m I g G で処理したウェルの腫瘍細胞の死滅を 1 に設定した。すべての個別の治療は、腫瘍細胞の死滅を有意に増加させた ( p < 0 . 0 1 両側 t 検定 ) ( 図 9 A、R K O ; 図 9 B、A 5 4 9 ) 。試験された 2 人のドナーのうち 1 人の P B M C ドナーの結果が示されている。試験されたほとんどの組み合わせは、個々の治療と比べて腫瘍細胞の死滅を有意に増加させた。

【 0 2 5 9 】

実施例 1 1 . ネクチン - 2 m A b はインビボで腫瘍の発生を有意に阻害する。

50

S c i d 雌マウス (  $n = 33$  ) に、マトリゲル中  $5 \times 10^6$  M D A - M B - 231 細胞を皮下注射した。腫瘍が  $80 \sim 120 \text{ mm}^3$  に達したら、マウスをランダムに3つの群に分け、P B S ( 薄い灰色のひし形 ; 図 10 )、h I g G 1 対照 A b ( 灰色の四角 )、またはクローン - 7 - ヒト I g G 1 ( 2 . 7 . 1 ) ( 黒丸 ) ( 両方とも  $3 \text{ mg} / \text{kg}$  で ) のいずれかを静脈内 ( i . v . ) 注射することにより、盲検法で週2回処置した。図 10 に示すように、クローン 2 . 7 . 1 では、治療後7日目から有意な腫瘍増殖阻害 ( T G I ) が観察され、試験終了時に 54 % に達した。\*  $p < 0.04$ 、\*\*  $p < 0.02$ 、\*\*\*  $p < 0.008$ 。

#### 【0260】

実施例 12 . ヒト I g G 2 F c を含むキメラネクチン - 2 m A b は、抗 P D - 1 m A b との相乗効果で、腫瘍細胞の死滅および P B M C 増殖の増加をもたらす。

10

A 549 細胞は、A b なし、またはクローン - 11 - h I g G 2 ( 2 . 11 . 2 )、K e y t r u d a ( 両方とも  $3.5 \text{ ug} / \text{ml}$  で )、またはそれらの組み合わせ ( それぞれ  $3.5 \text{ ug} / \text{ml}$  ) のいずれかを使用して、 $4 \text{ ug} / \text{ml}$  の P H A - L の存在下で、E : T 比 7 : 1 で P B M C と 96 時間共インキュベートした。2 . 11 . 2 治療群では、腫瘍細胞死滅 ( 図 11 A ) および P B M C ( T 細胞 ) 増殖 ( 図 11 B ) の有意な増加が見られ、抗 P D - 1 A b K e y t r u d a と組み合わせるとさらに増加した。\*  $p < 0.01$ 、\*\*  $p < 0.002$ 、\*\*\*  $p < 0.0008$ 。

#### 【0261】

実施例 13 . クローン 7 および 11 に由来する s c F v を発現する C A R - T 細胞は、ネクチン - 2 を発現する腫瘍細胞の存在下で特異的に活性化される。

20

健康なドナーからの P B M C を、本発明による s c F v 分子および少なくとも1つの調節、膜貫通および / または刺激領域を含む異なる C A R - T 構築物で形質導入した。図 12 A に示す概略図では、C A R - T は、s c F v と、4つの領域 ; C D 8 ストーク、C D 28 T M、4 - 1 B B、および C D 3 と、を含む。ネクチン - 2 C A R - T 2 . 07 ( クローン 7 に由来する結合部位 ) または C A R - T 2 . 11 ( クローン 11 に由来する結合部位 ) P B M C を、U 937 または B T - 474 標的細胞と様々な E : T 比でインキュベートした。標的細胞の死滅 ( 図 12 B および 12 D ) は、試験された E : T 比の大部分で有意であって ( N S で示された場合を除いて  $p < 0.005$  ) ならびに活性化 P B M C による I F N 分泌で有意であった ( 図 12 C および 12 E、 $p < 0.03$  )。図 12 B ~ E は、各細胞株に対して実施された3つの実験のうちの代表的な実験を示している ( C A R - T 2 . 07 灰色のバー、C A R - T 2 . 11 黒いバー )。

30

#### 【0262】

実施例 14 . 抗体配列

表 1 は、本発明の抗体配列のいくつかを詳述している。

40

50

## 【表 1】

表 1.

配列番号	詳細	タイプ	リーダーペプチドを含む配列番号*
1	クローン 7 HC CDR1	アミノ酸	
2	クローン 7 HC CDR2	アミノ酸	
3	クローン 7 HC CDR3	アミノ酸	
4	クローン 7 LC CDR1	アミノ酸	
5	クローン 7 LC CDR2	アミノ酸	
6	クローン 7 LC CDR3	アミノ酸	
7	クローン 7 HC	アミノ酸	25
8	クローン 7 LC	アミノ酸	26
9	クローン 7 HC	核酸	27
10	クローン 7 LC	核酸	28
11	クローン 11 HC CDR 1	アミノ酸	
12	クローン 11 HC CDR 2	アミノ酸	
13	クローン 11 HC CDR 3	アミノ酸	
14	クローン 11 LC CDR 1	アミノ酸	
15	クローン 11 LC CDR 2	アミノ酸	
16	クローン 11 LC CDR 3	アミノ酸	
17	クローン 11 HC	アミノ酸	29
18	クローン 11 LC	アミノ酸	30
19	クローン 11 HC	核酸	31
20	クローン 11 LC	核酸	32
21	scFv クローン 7	核酸	
22	scFv クローン 7	アミノ酸	
23	scFv クローン 11	核酸	
24	scFv クローン 11	アミノ酸	

\*配列番号 25～28 および 29～32 は、リーダーペプチドが付加されていることを除けば、それぞれ配列 7～10 および 17～20 に対応している。

## 【 0 2 6 3 】

前述の特定の実施形態の説明は、本発明の一般的な性質を完全に明らかにするので、他の人は、現在の知識を適用することによって、過度の実験なしに、および一般的な概念から逸脱することなく、かかる特定の実施形態の様々な用途に容易に修正および/または適合することができ、したがって、かかる適合および変更は、本開示の実施形態の均等物の意味および範囲内で理解されるべきであり、そのように意図されている。本明細書で使用する表現または用語は、説明を目的としたものであり、限定を目的としたものではないことを理解されたい。

10

20

30

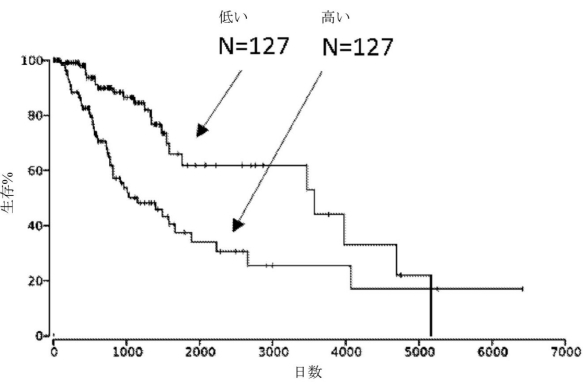
40

50

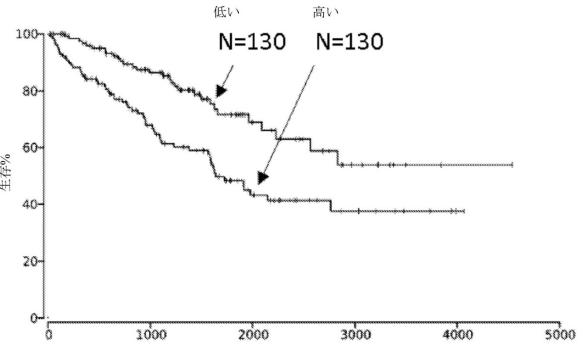


【図面】

【図 1 A】

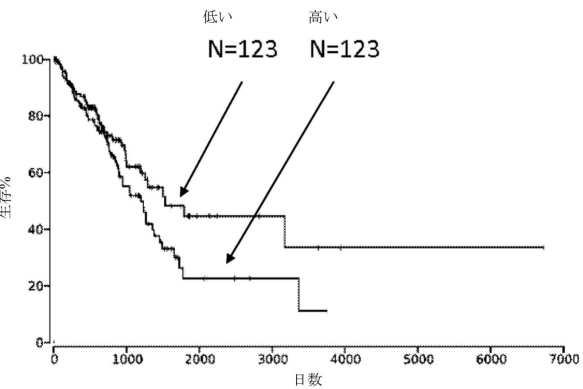


【図 1 B】

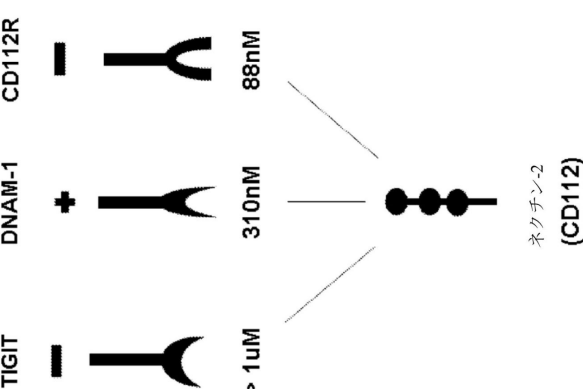


10

【図 1 C】



【図 2】



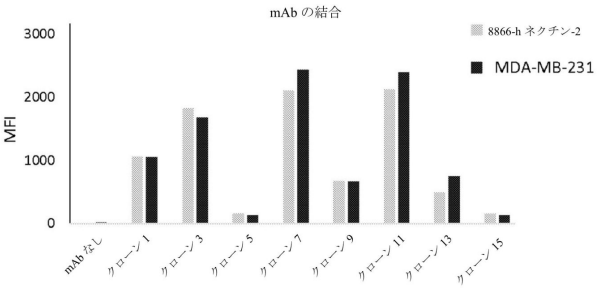
20

30

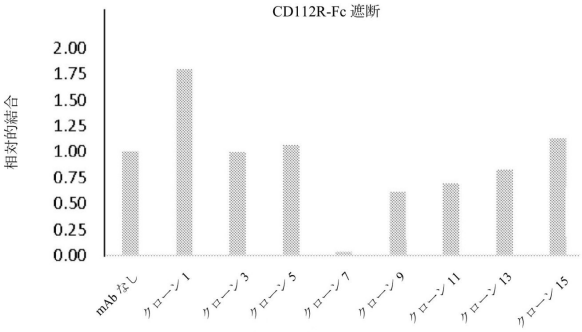
40

50

【図 3 A】

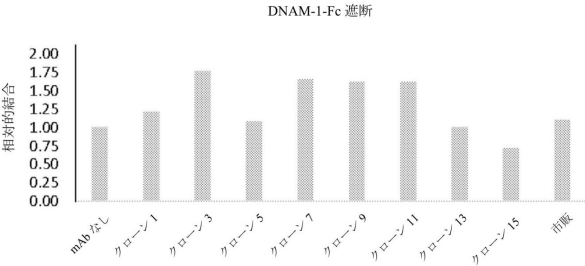


【図 3 B】

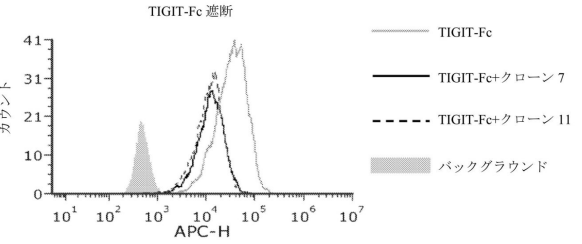


10

【図 3 C】

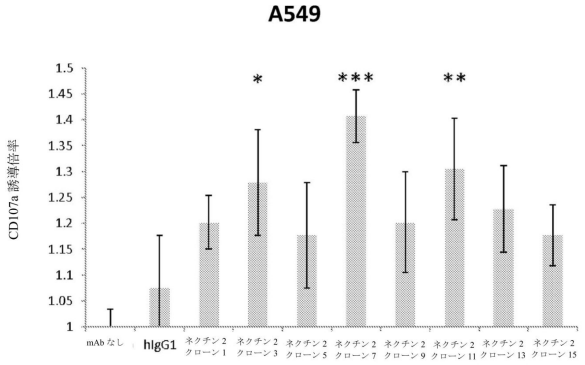


【図 3 D】

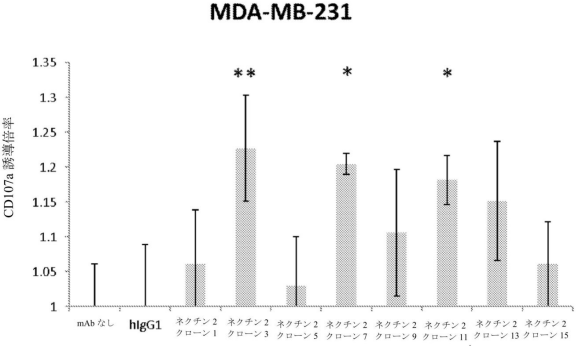


20

【図 4 A】



【図 4 B】

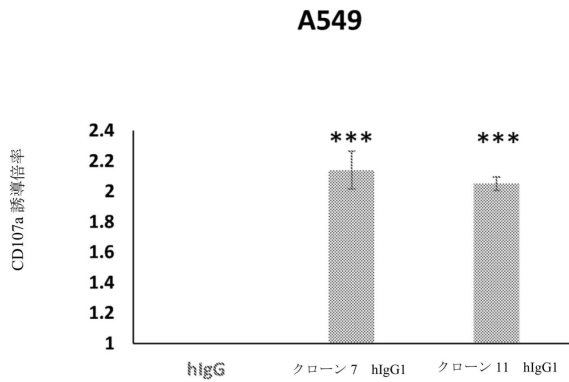


30

40

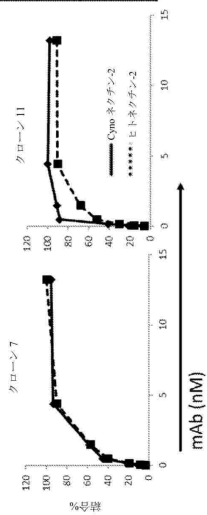
50

【 図 4 C 】



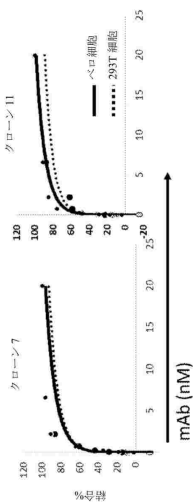
【 図 5 A 】

クローン 7	クローン 11
0.64nM	0.5nM
0.66nM	0.2nM
0.96	2.5
1590	1485
849	696
1.88	2.14

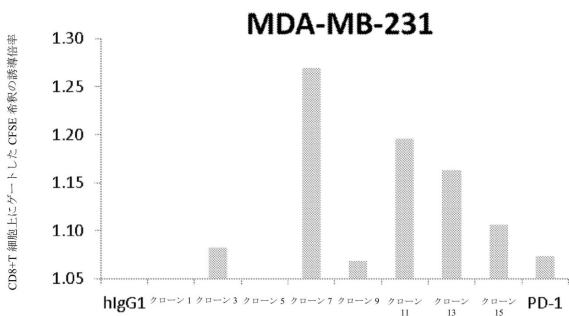


【 図 5 B 】

クローン 7	クローン 11
0.25nM	0.23nM
0.25nM	0.16nM
1.06	1.45
9.313	10.633
15.036	14.199
0.62	0.75



【 図 6 A 】



10

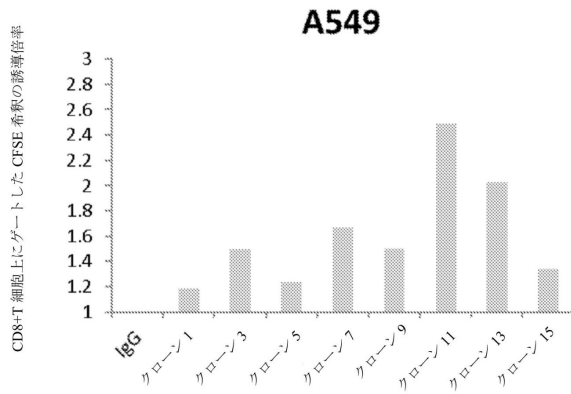
20

30

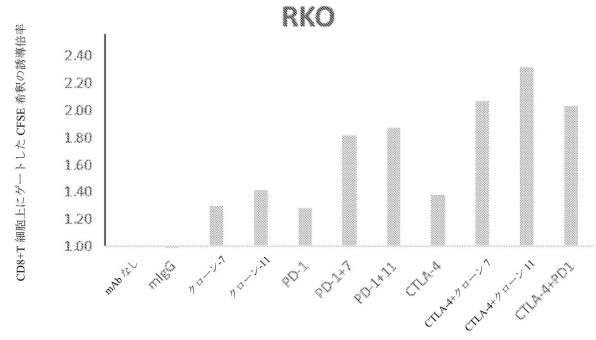
40

50

【図 6 B】

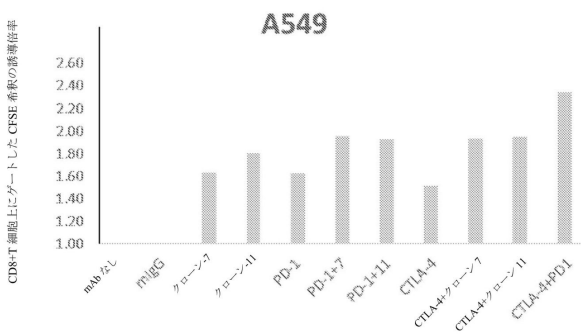


【図 7 A】

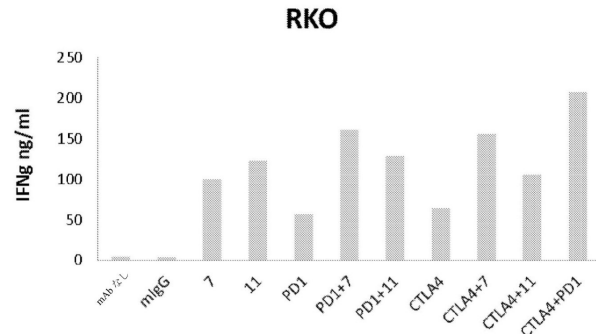


10

【図 7 B】

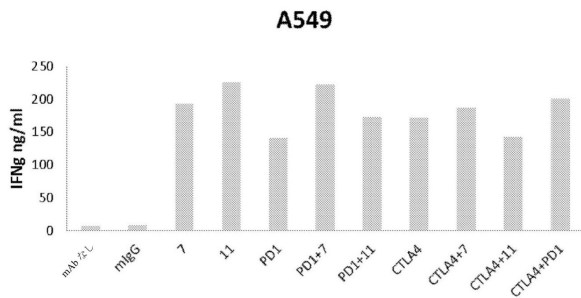


【図 8 A】

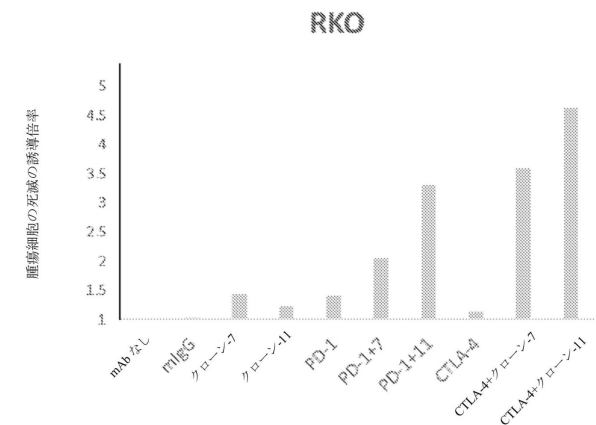


20

【図 8 B】



【図 9 A】

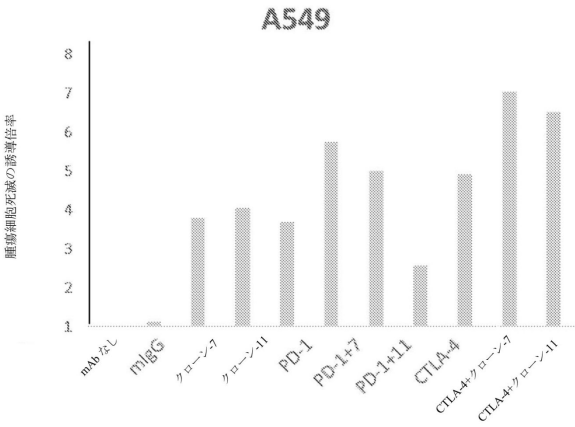


30

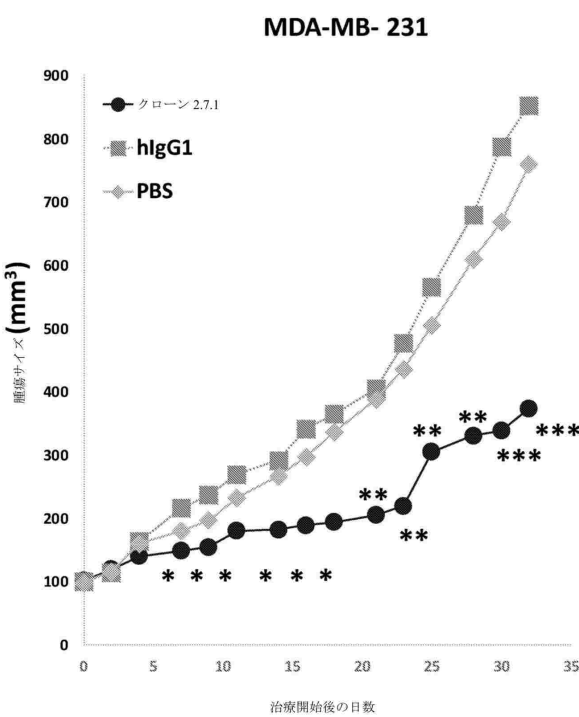
40

50

【図 9 B】



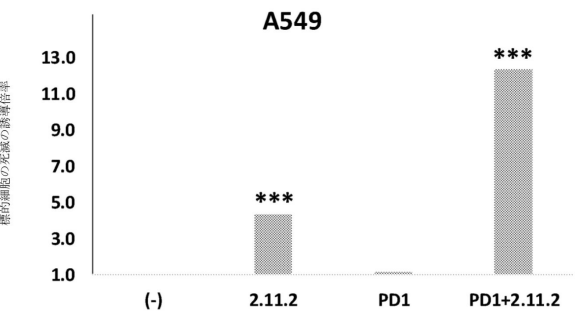
【図 10】



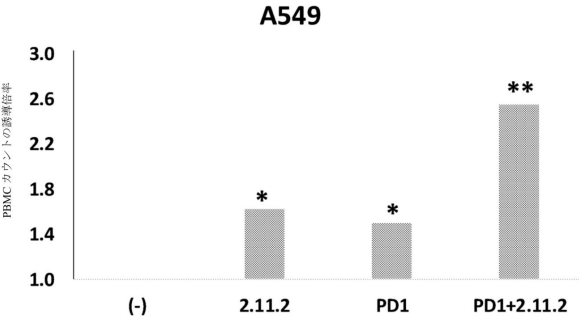
10

20

【図 11 A】



【図 11 B】



30

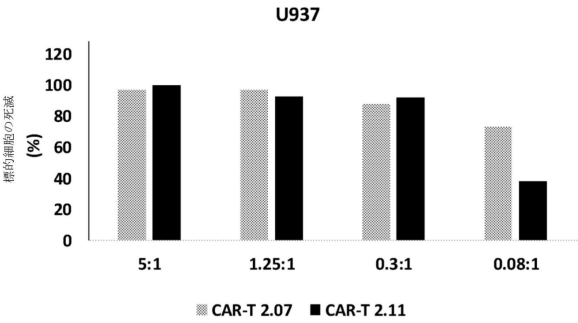
40

50

【 1 2 A 】



【 1 2 B 】



10

【 1 2 C 】

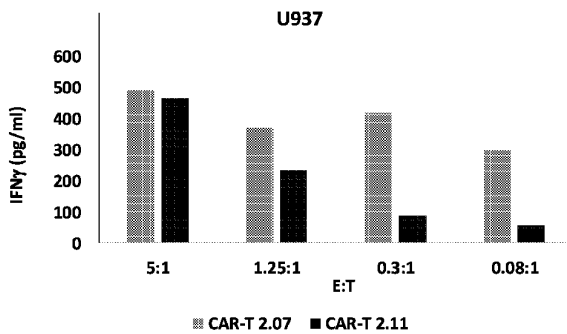
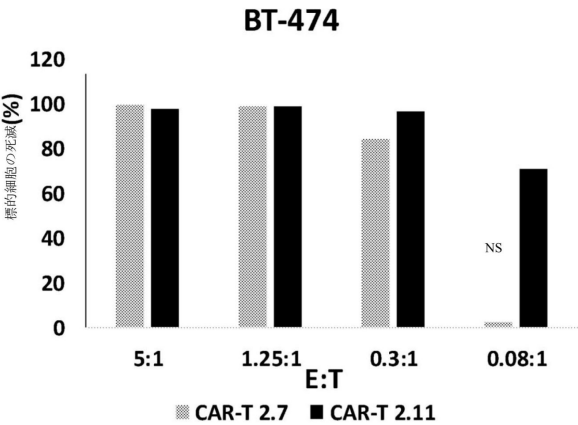


Figure 12C

【 1 2 D 】



20

【 1 2 E 】

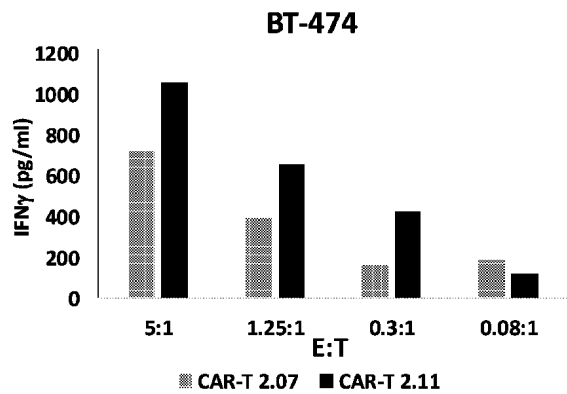


Figure 12E

30

【 配列表 】

0007606706000001.app

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

## F I

C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21		
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T	
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	L	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/68		
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		
A 6 1 P	37/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/00		
A 6 1 P	31/12 (2006.01)	A 6 1 P	37/02		
A 6 1 P	43/00 (2006.01)	A 6 1 P	31/12		
A 6 1 K	35/17 (2015.01)	A 6 1 P	43/00	1 1 1	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 K	35/17		
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	A 6 1 P	35/02		
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	G 0 1 N	33/574	A	
		C 1 2 N	15/13	Z N A	

弁理士 高岡 亮一

(74)代理人 100121511

弁理士 小田 直

(74)代理人 100202751

弁理士 岩堀 明代

(74)代理人 100208580

弁理士 三好 玲奈

(74)代理人 100191086

弁理士 高橋 香元

(72)発明者 マンデルボイム, オフェル

イスラエル国, 6 0 8 0 8 5 8 ショハム, 5 8 ハ=ヤーデン・ストリート

(72)発明者 ブーカマン ピンカス

イスラエル国, 9 6 4 1 2 0 3 エルサレム, 6 シュマエル・ナタン・ストリート, アパートメント 4

(72)発明者 ヨニッチ, スティパン

クロアチア共和国, 5 1 0 0 0 リエカ, フラナ クレスニカ 1 4

(72)発明者 レナック ロビス, ティハナ

クロアチア共和国, 5 1 2 1 5 カスタヴ, スポロヴァ ジャマ 1 3

(72)発明者 クカン プルリック, パオラ

クロアチア共和国, 5 1 0 0 0 リエカ, ヴィディコバック 2 6

審査官 井関 めぐみ

(56)参考文献 国際公開第 2 0 0 7 / 0 4 3 6 3 5 (WO, A 1)

Tsutomu OSHIMA et al., " Nectin-2 is a potential target for antibody therapy of breast and ovarian cancers ", Molecular Cancer, 2013年06月12日, Vol. 12, No. 1, DOI: 10.1186/1476-4598-12-60

Tsutomu OSHIMA et al., " Fc engineering of anti-Nectin-2 antibody improved thrombocytopenic adverse event in monkey ", PLOS ONE, 2018年05月03日, Vol. 13, No. 5, p.e0196422, DOI: 10.1371/journal.pone.0196422

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 1 3

C 1 2 N 1 5 / 6 3

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

---

C 1 2 N    5 / 1 0  
A 6 1 K    3 9 / 3 9 5  
A 6 1 K    4 7 / 6 8  
A 6 1 K    4 5 / 0 0  
A 6 1 P    3 5 / 0 0  
A 6 1 P    3 7 / 0 2  
A 6 1 P    3 1 / 1 2  
A 6 1 P    4 3 / 0 0  
A 6 1 K    3 5 / 1 7  
A 6 1 P    3 5 / 0 2  
G 0 1 N    3 3 / 5 7 4

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S ( S T  
N )

U n i P r o t / G e n e S e q