

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7690468号

(P7690468)

(45)発行日 令和7年6月10日(2025.6.10)

(24)登録日 令和7年6月2日(2025.6.2)

(51)国際特許分類

F I

C 0 7 K 16/28 (2006.01)

C 0 7 K

16/28

Z N A

A 6 1 K 9/127(2025.01)

A 6 1 K

9/127

A 6 1 K 9/16 (2006.01)

A 6 1 K

9/16

A 6 1 K 9/51 (2006.01)

A 6 1 K

9/51

A 6 1 K 35/12 (2015.01)

A 6 1 K

35/12

請求項の数 52 (全85頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2022-523456(P2022-523456)

(86)(22)出願日 令和2年10月21日(2020.10.21)

(65)公表番号 特表2022-552875(P2022-552875
A)

(43)公表日 令和4年12月20日(2022.12.20)

(86)国際出願番号 PCT/US2020/056601

(87)国際公開番号 WO2021/081052

(87)国際公開日 令和3年4月29日(2021.4.29)

審査請求日 令和5年9月8日(2023.9.8)

(31)優先権主張番号 62/924,298

(32)優先日 令和1年10月22日(2019.10.22)

(33)優先権主張国・地域又は機関
米国(US)

(73)特許権者 508285606

ザ ユナイテッド ステイツ オブ アメリ
カ、 アズ リプレゼンテッド バイ ザ
セクレタリー、 デパートメント オブ
ヘルス アンド ヒューマン サービスズ
The United States of
America, as represe
nted by the Secreta
ry, Department of He
alth and Human Serv
icesアメリカ合衆国20892-7788メ
リーランド州ベセスダ、ロックレッジ・
ドライブ6701、スウィート700、
エムエスシー7788、ナショナル・イ
最終頁に続く(54)【発明の名称】 多様な固形腫瘍を処置するためのB7H3 (CD276) を標的とする高親和性ナノボデ
イ

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

B7H3を特異的に結合する単ドメインモノクローナル抗体であって、配列番号3の
相補性決定領域1 (CDR1)、CDR2およびCDR3配列を含み、前記CDR配列が
、Kabatt、IMGT、Paratome、もしくはChothia番号付けスキーム
、またはそれらの任意の組合せを使用して規定される、抗体。

【請求項2】

前記CDR1、CDR2およびCDR3配列がそれぞれ、

配列番号3の残基31～35、50～66および97～114；

配列番号3の残基26～33、51～58および97～115；または

配列番号3の残基26～35、50～61および98～114

を含む、請求項1に記載の抗体。

【請求項3】

前記抗体の前記アミノ酸配列が、配列番号3と少なくとも90%同一である、請求項1
または請求項2に記載の抗体。

【請求項4】

前記抗体の前記アミノ酸配列が、配列番号3を含むかまたはそれからなる、請求項1か
ら3のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項5】

ヒト化抗体である、請求項1または請求項2に記載の抗体。

【請求項 6】

キメラ抗体である、請求項 1 または請求項 2 に記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体を含むキメラ抗原受容体（CAR）。

【請求項 8】

ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達部分、シグナル伝達ドメイン、またはこれらの任意の組合せをさらに含む、請求項 7 に記載の CAR。

【請求項 9】

前記ヒンジ領域が CD8 α ヒンジ領域を含み；

前記膜貫通ドメインが CD8 α 膜貫通ドメインを含み；

前記共刺激シグナル伝達部分が 4-1BB シグナル伝達部分を含み；および／または

前記シグナル伝達ドメインが CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、

請求項 8 に記載の CAR。

【請求項 10】

請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の CAR を発現する単離された細胞。

【請求項 11】

細胞傷害性 T リンパ球（CTL）またはナチュラルキラー（NK）細胞である、請求項 10 に記載の単離された細胞。

【請求項 12】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体およびエフェクター分子を含むイムノコンジュゲート。

【請求項 13】

前記エフェクター分子が毒素である、請求項 12 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 14】

前記毒素が シュードモナス（Pseudomonas） 外毒素またはそのバリエーションである、請求項 13 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 15】

前記 シュードモナス（Pseudomonas） 外毒素のバリエーションが PE38 である、請求項 14 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 16】

前記エフェクター分子が光子吸収体である、請求項 12 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 17】

前記エフェクター分子が検出可能な標識である、請求項 12 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 18】

前記検出可能な標識が、フルオロフォア、酵素または放射性同位体を含む、請求項 17 に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項 19】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体にコンジュゲートした薬物を含む抗体-薬物コンジュゲート（ADC）。

【請求項 20】

前記薬物が低分子である、請求項 19 に記載の ADC。

【請求項 21】

前記薬物が、微小管阻害剤、抗有糸分裂剤および／または細胞傷害剤である、請求項 19 または請求項 20 に記載の ADC。

【請求項 22】

請求項 1 から 6 のいずれかに記載の抗体および少なくとも 1 つの追加のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む多特異性抗体。

【請求項 23】

二特異性抗体である、請求項 22 に記載の多特異性抗体。

10

20

30

40

50

【請求項 24】

三特異性抗体である、請求項 22 に記載の多特異性抗体。

【請求項 25】

前記少なくとも 1 つの追加のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、T 細胞受容体またはナチュラルキラー（NK）細胞活性化受容体の構成成分を特異的に結合する、請求項 22 から 24 のいずれか一項に記載の多特異性抗体。

【請求項 26】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体にコンジュゲートしたナノ粒子を含む、抗体－ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 27】

前記ナノ粒子が、ポリマーナノ粒子、ナノスフェア、ナノカプセル、リポソーム、デンドリマー、ポリマーミセル、またはニオソームを含む、請求項 26 に記載の抗体－ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 28】

前記ナノ粒子が細胞傷害剤を含む、請求項 26 または請求項 27 に記載の抗体－ナノ粒子コンジュゲート。

【請求項 29】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、および、異種タンパク質またはペプチドを含む融合タンパク質。

【請求項 30】

前記異種タンパク質が、Fc タンパク質またはロイシンジッパーである、請求項 29 に記載の融合タンパク質。

【請求項 31】

請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の CAR、請求項 12 から 18 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、請求項 22 から 25 のいずれか一項に記載の多特異性抗体または請求項 29 もしくは請求項 30 に記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸分子。

【請求項 32】

プロモーターに作動可能に連結した、請求項 31 に記載の単離された核酸分子。

【請求項 33】

請求項 31 または請求項 32 に記載の核酸分子を含むベクター。

【請求項 34】

請求項 32 に記載の核酸分子または請求項 33 に記載のベクターを含む単離された宿主細胞。

【請求項 35】

薬学的に許容される担体および請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の CAR、請求項 10、11 および 34 のいずれか一項に記載の単離された細胞、請求項 12 から 18 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、請求項 19 から 21 のいずれか一項に記載の ADC、請求項 22 から 25 のいずれか一項に記載の多特異性抗体、請求項 26 から 28 のいずれか一項に記載の抗体－ナノ粒子コンジュゲート、または請求項 29 もしくは請求項 30 に記載の融合タンパク質を含む組成物。

【請求項 36】

試料中の B7H3 の発現を検出する方法であって、

前記試料を、請求項 1 から 6 のいずれかに記載の抗体と接触させることと、

前記抗体の前記試料への結合を検出し、それによって、前記試料中の B7H3 の発現を検出することを含む方法。

【請求項 37】

B7H3 陽性がんを有するものとして対象を診断する方法において使用するための、請

10

20

30

40

50

求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物であって、前記方法は、

前記対象から得られた試料を、前記組成物と接触させることと、

前記抗体の前記試料への結合を検出し、それによって、B 7 H 3 陽性がんを有するものとして前記対象を診断することとを含む、組成物。

【請求項 3 8】

前記抗体が直接的に標識されている、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記方法が、

前記抗体を検出抗体と接触させることと、

前記検出抗体の前記抗体への結合を検出し、それによって、前記試料中の B 7 H 3 の発現を検出することとをさらに含む、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記試料が、B 7 H 3 陽性がんを有すると疑われる対象から得られる、請求項 3 6 および 3 8 から 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 1】

前記試料が腫瘍生検である、請求項 3 6 および 3 8 から 4 0 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 4 2】

前記抗体が直接的に標識されている、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 3】

前記方法が、

前記抗体を検出抗体と接触させることと、

前記検出抗体の前記抗体への結合を検出し、それによって、前記試料中の B 7 H 3 の発現を検出するか、または B 7 H 3 陽性がんを有するものとして前記対象を診断することとをさらに含む、請求項 3 7 に記載の組成物。

【請求項 4 4】

前記試料が、B 7 H 3 陽性がんを有すると疑われる対象から得られる、請求項 3 7 および 4 2 から 4 3 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 5】

前記試料が腫瘍生検である、請求項 3 7 および 4 2 から 4 4 のいずれか一項に記載の組成物。

【請求項 4 6】

対象における B 7 H 3 陽性がんを処置するための、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の C A R、請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の単離された細胞、請求項 1 2 から 1 8 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、請求項 1 9 から 2 1 のいずれか一項に記載の A D C、請求項 2 2 から 2 5 のいずれか一項に記載の多特異性抗体、請求項 2 6 から 2 8 のいずれか一項に記載の抗体－ナノ粒子コンジュゲート、請求項 2 9 もしくは請求項 3 0 に記載の融合タンパク質を含む組成物、または請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

対象における B 7 H 3 陽性がんの腫瘍成長または転移を阻害するための、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の C A R、請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の単離された細胞、請求項 1 2 から 1 8 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、請求項 1 9 から 2 1 のいずれか一項に記載の A D C、請求項 2 2 から 2 5 のいずれか一項に記載の多特異性抗体、請求項 2 6 から 2 8 のいずれか一項に記載の抗体－ナノ粒子コンジュゲート、請求項 2 9 もしくは請求項 3 0 に記載の融合タンパク質を含む組成物、または請求項 3 5 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

前記 B 7 H 3 陽性がんが固形腫瘍である、請求項 4 6 または請求項 4 7 に記載の組成物。

10

20

30

40

50

【請求項 49】

前記固形腫瘍が、肝臓がん、膵臓がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮頸がん、食道がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肺がん、脳がん、小児がん、黒色腫または中皮腫である、請求項 48 に記載の組成物。

【請求項 50】

前記肝臓がんが肝細胞癌である、請求項 49 に記載の組成物。

【請求項 51】

前記脳がんが神経芽腫または神経膠芽腫である、請求項 49 に記載の組成物。

【請求項 52】

前記小児がんが、骨肉腫、神経芽腫、横紋筋肉腫またはユーイング肉腫である、請求項 49 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる 2019 年 10 月 22 日に出願された米国仮出願第 62/924,298 号の利益を主張する。

【0002】

分野

本開示は、高親和性で B7 ホモログ 3 (B7H3) を結合する一本鎖モノクローナル抗体に関する。本開示は、例えば固形腫瘍の処置のための、モノクローナル抗体および抗体コンジュゲートの使用にさらに関する。

【0003】

政府支援の承認

本発明は、国立衛生研究所 (National Institutes of Health) により授与されたプロジェクト番号 Z01 BC010891 の下での政府支援により行われた。政府は、本発明において一定の権利を有する。

【背景技術】

【0004】

背景

ナノボディは、12 kD ~ 15 kD の分子量および約 4 × 2.5 nm のサイズを有するおよそ 120 アミノ酸から形成される、抗体の最も小さな公知の抗原結合断片である (Khodabakhsh et al., Int Rev Immunol, 37, 316-322, 2018)。最もよく研究されたナノボディは、ラクダ科の動物 (V_HH と称される) および軟骨魚類 (V_{NAR}) において天然に存在し得る (Feng et al., Antib Ther, 2, 1-11, 2019)、ならびに in vivo で一部のヒト重鎖病に存在し得る (Prelli and Frangione, J Immunol, 148, 949-952, 1992) 重鎖 (VH) の可変領域に由来する。それらのサイズが小さいこと、高溶解度、優れた熱安定性、可逆的リフォールディング能、および従来の IgG 全体と比較した in vivo での比較的容易な組織浸透により、後天性血栓性血小板減少性紫斑病 (aTTP) および血栓症の処置のためのヒト化ラクダ科 V_HH である最初のナノボディ薬であるカプラシズマブ (Caplacizumab) (CABLIVI (登録商標)) の承認によって証明されるように (Elverd i and Eskazan, Drug Des Devel Ther, 13, 1251-1258, 2019; Scully et al., N Engl J Med, 380, 335-346, 2019)、医学用途で、または研究ツールとして、ナノボディを使用することができる (Khodabakhsh et al., Int Rev Immunol, 37, 316-322, 2018; Wesolowski et al., Med Microbiol Immunol, 198, 157-174, 2009; Ho, Antib Ther, 1, 1-5, 2018)。

10

20

30

40

50

【0005】

歴史的に、ラクダ科V_HHドメイン抗体は、ヒトV_HHドメイン抗体の出現まで、研究の主体であった (Feng et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 110, E1083-1091, 2013; Tang et al., Mol Cancer Ther, 12, 416-426, 2013; Li et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 114, E6623-E6631, 2017)。ラクダ科の血清には、従来のIgGと、特定の種に応じて全血清免疫グロブリンの45%~75%を占めるかなりの量の重鎖のみのIgG (HCAb) との両方が存在する (Khodabakhsh et al., Int Rev Immunol, 37, 316-322, 2018)。HCAbは、V_HH断片、単独の抗原結合ドメイン、その後のCH2およびCH3ドメイン、ならびに従来のIgGにおいてVH-CH1ドメインと対合する軽鎖からなる。組換えV_HHドメインは、活用されている機能的実体である。

10

【0006】

自然に進化したラクダ科V_HHドメインを高度に可溶性かつ安定性にするいくつかの構造的特色が存在する。第1に、ヒトV_HH生殖系列におけるVal37 (Kabab番号付け) は、典型的には、ドメインのよりコンパクトかつ安定な疎水性パッキングを形成するV_HHドメインのPhe37 (またはTyr37) であり (Riechmann and Muyldermans, J Immunol Methods, 231, 25-38, 1999)、これは、おそらく、V_HHを特に安定にする駆動力である (Shinozaki et al., J Biosci Bioeng, 125, 654-661, 2018)。第2に、ヒトV_HH生殖系列における軽鎖に接触する残基、G44、L45およびW47は、V_HHにおけるE44 (またはQ44)、R45 (またはC45) およびG47 (またはSer、Leu、Phe) であり (Holt et al., Trends Biotechnol, 21, 484-490, 2003)、アクセス可能な表面積をより親水性にし、凝集性を低下させる。さらに、V_HHドメインの一部では、W103がR103で置き換えられる場合がある。第3に、V_HHドメインは、通常、ヒト/齧歯類CDR3よりも長いCDR3を有し、これらは典型的には、CDR1の末端 (ラクダ) またはCDR2の開始部位 (ラマ) のCysとのさらなるジスルフィド結合を形成するCDR3のCysを含有する (Wesolowski et al., Med Microbiol Immunol, 198, 157-174, 2009)。さらに、このさらなるCDR3ジスルフィド結合および標準的なC22~C92ジスルフィド結合は、V_HHドメインをより安定にし (60~78℃の範囲のT_m値)、可逆的なアンフォールディング/リフォールディングを可能にする (Holt et al., Trends Biotechnol, 21, 484-490, 2003)。

20

30

【0007】

1989年に、リゾチームおよびキーホールーリンペットヘモシアニンで免疫したマウスの脾臓から作製されたcDNA発現ライブラリーから、第1の非V_HH哺乳動物ドメイン抗体をスクリーニングし、2つのマウスV_HHドメインが、20nM範囲のリゾチームに対する親和性を示し (Ward et al., Nature, 341, 544-546, 1989)、初めて「単ドメイン抗体 (dAb)」という名称が示唆された。その後、ラクダ科V_HHが発見され、医薬および他の適用においてより魅力的であるヒトV_HHドメイン抗体を調査するという考えが高まった。ラクダ科ドメイン抗体とヒトドメイン抗体の両方が広く研究されているが、供給源にアクセスするのに、特に免疫によるドメイン抗体の発見に関していくつかの技術的制限が存在する。供給源へのアクセス可能性の制限を克服するために、いくつかの戦略が開発されて、ヒトまたはヒト化V_HHドメイン抗体を生成した。ナイーブヒトV_HHドメインライブラリーのファージディスプレイは証明された方法であるが (Feng et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 110, E1083-1091, 2013; Tang et al., Mol Cancer Ther, 12, 416-426, 2013; Li et al.

40

50

, Proc Natl Acad Sci U S A, 114, E6623-E6631, 2017)、親和性は、免疫抗体の親和性と常に同程度に高い訳ではない。ヒトドメイン抗体を生成するための別の方法は、ヒトVH生殖系列遺伝子を有するトランスジェニック動物を使用することである (Schusser et al., Eur J Immunol, 46, 2137-2148, 2016; Janssens et al., Proc Natl Acad Sci U S A, 103, 15130-15135, 2006)。ヒトドメイン抗体を直接単離する代わりに、免疫動物のVHドメイン抗体を生成した後にヒト化することも、高親和性を有するヒト様抗体を生成する1つの方法である。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0008】

【文献】Khodabakhsh et al., Int Rev Immunol, 37, 316-322, 2018

【文献】Feng et al., Antib Ther, 2, 1-11, 2019

【文献】Prelli and Frangione, J Immunol, 148, 949-952, 1992

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

概要

本開示は、B7H3 (CD276としても公知) を特異的に結合する10個のラクダ単一ドメインV_HHモノクローナル抗体および2個のウサギVH単一ドメイン抗体について記載する。本明細書において、RWB12 (「B12」)、RWG8 (「G8」)、RWC4 (「C4」)、RWB2、RWH5、RWD5、RWC3、RWG4、RWD9およびRWH1と称されるB7H3特異的ラクダ抗体、ならびに本明細書において、RFA1およびRFB1と称されるB7H3特異的ウサギ抗体は、高親和性でB7H3を結合する。開示されるナノボディから構成されるキメラ抗原受容体 (CAR) T細胞の生成についても開示される。

【0010】

B7H3を結合する、例えば特異的に結合するモノクローナル抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態では、モノクローナル抗体は、ナノボディRWB12、RWG8、RWC4、RWB2、RWH5、RWD5、RWC3、RWG4、RWD9、RWH1、RFA1またはRFB1の相補性決定領域 (CDR) 配列を含む。開示されるモノクローナル抗体を含むコンジュゲートも本明細書において提供される。一部の例では、本明細書において開示されるモノクローナル抗体を含むCAR (ならびにCARを発現するT細胞およびナチュラルキラー細胞)、イムノコンジュゲート (免疫毒素など)、多特異性抗体 (二特異性T細胞エンゲージャー (T-cell engager) など)、抗体-薬物コンジュゲート (ADC)、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、抗体-放射性同位体コンジュゲート (がんの診断およびイムノPETイメージングなどの場合) および融合タンパク質が提供される。

【0011】

B7H3特異的モノクローナル抗体および薬学的に許容される担体を含む組成物も本開示によって提供される。

【0012】

本明細書に開示されるB7H3特異的モノクローナル抗体、CAR、イムノコンジュゲート (免疫毒素など)、多特異性抗体および融合タンパク質をコードする核酸分子およびベクターも本明細書において提供される。B7H3モノクローナル抗体またはCARをコードする核酸またはベクターを含む単離された細胞がさらに提供される。

【0013】

10

20

30

40

50

対象における B 7 H 3 陽性がんを処置する方法、および対象における B 7 H 3 陽性がんの腫瘍成長または転移を阻害する方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、対象に、本明細書に開示されるモノクローナル抗体の治療有効量を投与すること、または対象に、本明細書に開示されるモノクローナル抗体を含む C A R（または C A R T 細胞または C A R N K 細胞）、イムノコンジュゲート（免疫毒素など）、A D C、多特異性抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲートまたは融合タンパク質の治療有効量を投与することを含む。

【0014】

さらに、試料中の B 7 H 3 の発現を検出する方法が本明細書において提供される。一部の実施形態では、方法は、試料を本明細書に開示されるモノクローナル抗体と接触させることと、抗体の試料への結合を検出することを含む。

10

【0015】

対象を、B 7 H 3 陽性がんを有するものとして診断する方法も提供される。一部の実施形態では、方法は、対象から得られた試料を本明細書に開示されるモノクローナル抗体と接触させることと、抗体の試料への結合を検出することを含む。

【0016】

前記のおよび他の目的ならびに本開示の特色は、添付の図面を参照しながら進める、以下の詳細な記載からより明らかとなる。

【図面の簡単な説明】

【0017】

20

【図1】図1A：組換え B 7 H 3 を有するウサギの免疫、V H ドメインファージディスプレイライブラリーの作成、および B 7 H 3 結合剤の選択を示す概略図。

【0018】

図1B：精製された B 7 H 3 - h F c の S D S - P A G E 解析。ベーターメルカプトエタノールによって非還元 (Non.) または還元した (Red.)、1 または 5 マイクログラムの精製された B 7 H 3 - h F c を 8 % の S D S - P A G E ゲル上で分離した。C o m a s s i e ブルー R - 2 5 0 染色によってタンパク質のバンドを可視化した。

【0019】

【図2】図2A～2B：B 7 H 3 - h F c 免疫ウサギ血清の力価測定およびその細胞への結合の確認。(図2A) タンパク質結合 E L I S A による B 7 H 3 - h F c 免疫ウサギ血清の力価測定。メソテリンの N 末端断片に由来する I A B - h F c が、h F c タグ対照としての役割を果たした。R 3 1 M 0、R 3 1 M 1、R 3 1 M 2、および R 3 1 M 3 は、免疫前、1 回目、2 回目、および 3 回目の免疫の血清を表した。(図2B) 免疫血清の細胞結合アッセイ。網掛け区域は、F I T C にコンジュゲートした二次抗体のみ（ヤギ抗ウサギ）で染色した細胞を表す；左の曲線、免疫前の血清で染色した細胞；右の曲線、免疫した血清 R 3 1 M 3 で染色した細胞。

30

【0020】

【図3-1】図3A～3B：B 7 H 3 結合剤の配列および構造モデリング。(図3A) ウサギ抗ハイブシンモノクローナル抗体 (P D B # 5 D U B、配列番号 3 4) 由来の類似する V H に加えて、B 7 H 3 結合剤 (A 1、配列番号 1 1；B 1、配列番号 1 2) の配列アライメント。I M G T 描画システムによって C D R 領域を規定した。(図3B) オンラインソフトウェア S W I S S - M O D E L を使用する A 1 および B 1 結合剤の構造モデリング。5 D U B の結晶構造も比較として示される。

40

【図3-2】同上。

【0021】

【図4-1】図4A～4C：B 7 H 3 結合剤の結合特性。(図4A) E . c o l i 由来の精製された A 1 および B 1 結合剤 (V H - H i s - F L A G 融合体) の S D S - P A G E 解析。β-メルカプトエタノールによって還元していない (Non.) または還元した (Red.)、2 マイクログラムの精製された B 7 H 3 - h F c を、8 % の S D S - P A G E ゲル上で分離した。C o m a s s i e ブルー R - 2 5 0 染色によってタンパク質のバ

50

ンドを可視化した。(図4B) ELISAによるタンパク質結合親和性の測定。5マイクログラムのB7H3-hFcをELISAプレート上にコーティングし、様々な濃度のドメイン抗体をプレートと共にインキュベートし、HRPにコンジュゲートした抗FLAGマウスモノクローナル抗体M2によって結合を検出した。ソフトウェアGraphPad Prismを使用して結合曲線をプロットし、一部位結合の双曲線のソフトウェアのアルゴリズムによってEC50の計算値を決定した。(図4C) フローサイトメトリーによる細胞結合の決定。1mL当たり10マイクログラムのドメイン抗体を100万個の細胞と共に共インキュベートした。APCにコンジュゲートした抗FLAGモノクローナル抗体によって、抗体結合を可視化した。「1」と標識した曲線は、二次抗体のみで染色した細胞を表し；「2」と標識した曲線は、A1またはB1ドメイン抗体で染色した細胞を表す。【図4-2】同上。

10

【0022】

【図5】図5：HEK-293細胞におけるB7H3-Fc融合タンパク質の産生。組換えB7H3-Fc融合タンパク質をHEK-293細胞中で発現させ、AKTA Explorer (GE Healthcare) を使用してプロテインAカラム (GE Healthcare) で精製した。精製されたB7H3-Fc融合タンパク質は、SDA-PAGEゲル上で示されたように純度99%を超えており、非還元条件下で(左) 154 kDaおよび還元条件下で(右) 77 kDaの分子量を有した。B7H3-Fcの収量は2 mg/Lであった。Glypican 2 (GPC2)-Fcを対照タンパク質として使用した。

20

【0023】

【図6】図6：B7H3結合剤に関する8つのラクダV_HHライブラリーでのファージパニング。8個体のラクダ (Camelus dromedaries) から作成された8つのV_HH単ドメイン抗体ライブラリーを使用して、組換えB7H3-Fcタンパク質でのファージパニングを3回行った。各回のファージ力価が図に示される。3回目のファージパニングにおけるファージ力価の増加は、B7H3への高親和性V_HH結合剤の富化を示した。

【0024】

【図7】図7A~7B：RWC4 V_HHナノボディの精製。(図7A) AKTA Explorer (GE Healthcare) から溶出したRWC4 V_HHラクダナノボディ画分のSDS-PAGE。(図7B) AKTA Explorer (GE Healthcare) のニッケルカラム (GE Healthcare) からのナノボディ溶出のクロマトグラフ。RWC4の収量は33.8 mg/Lであった。

30

【0025】

【図8】図8A~8B：RWG8 V_HHナノボディの精製。(図8A) AKTA Explorer (GE Healthcare) から溶出したRWG8 V_HHラクダナノボディ画分のSDS-PAGE。(図8B) AKTA Explorer (GE Healthcare) のニッケルカラム (GE Healthcare) からのRWG8ナノボディ溶出のクロマトグラフ。RWG8の収量は50 mg/Lであった。

【0026】

40

【図9】図9A~9B：RWB12 V_HHナノボディの精製。(図8A) AKTA Explorer (GE Healthcare) から溶出したRWB12 V_HHラクダナノボディ画分のSDS-PAGE。(図9B) AKTA Explorer (GE Healthcare) のニッケルカラム (GE Healthcare) からのRWB12ナノボディ溶出のクロマトグラフ。RWB12の収量は132 mg/Lであった。

【0027】

【図10】図10：選択B7H3標的化 (targeted) V_HHナノボディのNBEB神経芽腫細胞への結合。B7H3特異的ナノボディの結合をFACS解析によって評価した。試験抗体 (RWC4、RWB12、RWG8、RWA12、RWG4およびRWD5) のうちの6つはNBEB細胞を結合することが可能であった。

50

【0028】

【図11】図11：選択B7H3標的化(tarageted) V_HHナノボディのA431類表皮癌細胞への結合。B7H3特異的ナノボディの結合をFACS解析によって評価した。試験抗体(RWC4、RWB12、RWG8、RWA12、RWG4およびRWD5)のうちの6つはA431細胞を結合することが可能であった。

【0029】

【図12】図12：ヒトB7H3-Fcに関するRWC4の動態。RWC4の会合／解離特性を組換えヒトB7H3-Fcタンパク質を使用して、Octetシステム(Creative Biolabs)で測定した。RWC4のK_D=3.8 nM、RWC4のK_{on}=2.65×10⁴、およびRWC4のK_{dis}=1.01×10⁻⁴。

10

【0030】

【図13】図13：ヒトB7H3-Fcに関するRWG4の動態。RWG4の会合／解離特性を組換えヒトB7H3-Fcタンパク質を使用して、Octetシステム(Creative Biolabs)で測定した。RWG4のK_D=6.94 nM、RWG4のK_{on}=9.13×10³、およびRWG4のK_{dis}=6.34×10⁻⁵。

【0031】

【図14】図14：B7H3標的化CARを発現するレンチウイルスのT細胞トランスフェクション効率。トランスフェクション効率をFACSによって測定した。

【0032】

【図15-1】図15A～図15D：B7H3陽性細胞におけるB7H3を標的とするCAR-T細胞の細胞傷害性。(図15A)ヒト神経芽腫NBEB細胞。(図15B)ヒト神経芽腫LAN-1細胞。(図15C)ヒト腺癌BXP-3細胞。(図15D)ヒト膀胱癌MiacaPa2細胞。RWB12、RWG8およびRWC4 CAR-T細胞は、特異的溶解を誘導するのに最も有効であった。

20

【図15-2】同上。

【図15-3】同上。

【図15-4】同上。

【0033】

【図16-1】図16A～16D：B7H3陽性およびB7H3ノックアウト細胞におけるB7H3を標的とするCAR-T細胞の細胞傷害性。(図16A)ヒト神経芽腫IMR32細胞。(図16B)マウス結腸腺癌MC38-CD276⁺細胞。(図16C)ヒト神経芽腫IMR32-CD276^{-/-}細胞。(図16D)マウス結腸腺癌MC38-CD276^{-/-}細胞。CAR-T細胞のうちの3つ(RWB12、RWG8およびRWC4)は、B7H3陽性細胞への強力な細胞傷害性を示したが、B7H3陰性細胞には示さなかった。

30

【図16-2】同上。

【図16-3】同上。

【図16-4】同上。

【0034】

【図17-1】図17A～17C：膀胱がん細胞に対するB7H3 CAR T細胞の細胞傷害性。ヒトB7H3標的化ナノボディ由来のCAR T細胞(B12、G8、およびC4)の細胞傷害性を、ルシフェラーゼを発現する2つのB7H3陽性膀胱がん細胞系Panc-1 GFP-Luc(GL)およびBXP-3 GLを使用して評価した。(図17A)フローサイトメトリーは、Panc-1とBXP-3の両方がB7H3陽性細胞系であることを示す。(図17B)G8、C4およびB12 CARによるT細胞形質導入効率は、それぞれ、60.4%、58.6%、および68.4%であった。無関係のCAR(CD19)によるT細胞の形質導入効率は、32%であった。(図17C)B7H3標的化CAR(G8/B12/C4)T細胞および無関係の対照CAR(CD19)T細胞を、Panc-1 GL細胞またはBXP-3 GL細胞と共に、様々なエフェクター：標的(E:T)比で24時間インキュベートした。Panc-1 GL細胞とBXP-3

40

50

GL細胞の両方が、3つすべてのB7H3標的化CAR T細胞によって用量依存的に効果的に溶解された一方、最小限の殺滅は、対照CAR T細胞から観察された。

【図17-2】同上。

【0035】

【図18-1】図18A~18D：高用量のヒトB7H3特異的CAR T細胞で処置したPanc-1マウスモデル。1000万個のB7H3標的化CAR T細胞の注入後のPanc-1異種移植マウスモデルにおける腫瘍退縮を評価した。(図18A) Panc-1異種移植研究の概略図。100万個のPanc-1 GFP/Luc腫瘍細胞をNSGマウスにi.v.移植して、腫瘍モデルを確立した。20日後(0日目)に、マウスに、1000万個のC4、G8またはB12 CAR T細胞(または対照CD19 CAR T細胞)をi.v.注入した。イメージングを毎週実施した。(図18B) CAR T細胞で処置したマウスにおけるPanc-1腫瘍成長の代表的なバイオルミネセンスイメージ。1000万個のB7H3標的化CAR T細胞(C4、G8またはB12)で処置したマウスは、対照CAR T細胞の注入と比較して、有意に低下した腫瘍成長を示した。

(図18C)図18Bに示されるマウスの1秒当たりの光子としての腫瘍バイオルミネセンスの定量。(図18D)1000万個のC4、G8またはB12 CAR T細胞による処置後の腫瘍保有マウスのKaplan-Meier生存曲線。結果は、C4 CAR T細胞が、高用量(1000万個)で投与された場合に、G8またはB12 CAR T細胞よりもマウスの生存を促進するのに有力であることを実証し、1000万個のCAR T細胞の投与がマウスにとって安全であることを示す。

【図18-2】同上。

【0036】

【図19-1】図19A~19D：低用量のヒトB7H3特異的CAR T細胞で処置したPanc-1マウスモデル。500万個のB7H3標的化CAR T細胞の注入後のPanc-1異種移植マウスモデルにおける腫瘍退縮を、腫瘍再負荷後に測定した。(図19A)実験の概略図。100万個のPanc-1-Luc細胞の接種の20日後(0日目)に、Panc-1異種移植マウスに、500万個のC4 CAR T細胞、B12 CAR T細胞、形質導入されていないT細胞(モック)またはPBSをi.v.注入した。検出可能な腫瘍を示さなかったC4 CAR T細胞およびB12 CAR T細胞で処置したマウスに、35日目に、100万個のPanc-1細胞をi.v.移植した。対照として、ナイーブマウスにPanc-1細胞を移植した。イメージングを毎週実施した。

(図19B)CAR T細胞で処置したマウスにおけるPanc-1腫瘍成長の代表的なバイオルミネセンスイメージ。500万個のC4 CAR T細胞またはB12 CAR T細胞で処置したマウスは、モックT細胞またはPBSを投与したマウスと比較して有意に低下した腫瘍成長を示した。対照マウスでは腫瘍が急速に成長したが、C4 CAR T細胞で以前に処置したマウスの100%は、Panc-1腫瘍を再負荷した後も腫瘍を有さないままであり、B12 CAR T細胞で以前に処置したマウスの60%は、処置の10週間後まで腫瘍を有さないままであった。(図19C)図19Bに示されるマウスにおける1秒当たりの光子としての腫瘍バイオルミネセンスの定量。(図19D)500万個のC4またはB12 CAR T細胞を受けたマウスが70日目にも依然として生存していたことを示す、処置後の腫瘍保有マウスのKaplan-Meier生存曲線。対照的に、PBSやモックT細胞で処置したマウスは、注入後30日を超えて生存しなかった。

【図19-2】同上。

【0037】

【図20-1】図20A~20D：IMR5神経芽腫マウスモデルにおけるB7H3標的化CAR T細胞の試験。(図20A)B7H3標的化CAR T細胞を使用する神経芽腫細胞系IMR5のin vitroでの殺滅を評価した。B7H3標的化G8、B12またはC4 CAR T細胞、および市販の抗ヒトB7H3ハイブリドーマ抗体376.96ベースのCAR T細胞を、IMR5 GL細胞と共に、様々なエフェクター：標的(E:T)比で24時間インキュベートした。すべてのCAR T細胞は、モックT細胞と比較

して、用量依存的にIMR5腫瘍細胞を効果的に溶解したが、B12 CAR T細胞は、試験した他のCAR T細胞よりもわずかに効果的であった。(図20B) *in vivo* 研究の実験の概略図。IMR5異種移植マウスに、腫瘍接種の35日後に、500万個のC4 CAR T細胞、B12 CAR T細胞、G8 CAR T細胞、376.96 CAR T細胞または形質導入されていないT細胞(モック)を*i.v.*注入した。(図20C) 異種移植モデルにおけるIMR5腫瘍成長の代表的なバイオルミネセンスイメージ。500万個のB12 CAR T細胞で処置したマウスは、376.96 CAR T細胞およびモックT細胞と比較して有意に低下した腫瘍成長を示した。C4 CAR T細胞も中程度の抗腫瘍活性を示した。(図20D) 処置したマウスにおける1秒当たりの光子としての腫瘍バイオルミネセンス。

10

【図20-2】同上。

【図20-3】同上。

【0038】

【図21-1】図21A~21C: G8は、マウスB7H3と交差反応し、マウスがん細胞を死滅させる。(図21A) フローサイトメトリーによって検出された抗B7H3ナノボディのマウス抗原への結合活性。G8は、3つのKPC細胞系(CREP128096、CREP133239、およびPDA95775)およびマウス黒色腫細胞系B16で発現したマウスB7H3に対する正の結合を示したが、C4またはB12は示さなかった。(図21B) G8 CAR T細胞のみが、マウスB7H3陽性B16細胞系の特異的殺滅を示した。(図21C)。抗B7H3ナノボディおよび市販の抗体376.96のエピトープマッピング。ヒトB7H3タンパク質から合計48個のペプチドを設計し、合成した。各ペプチドは、18個のアミノ酸からなり、9個のアミノ酸で隣接するペプチドと重複していた。ELISA技術を使用して、抗体の各ペプチドへの結合能力を試験した。数字はOD₄₅₀値を示す。G8と376.96の両方がペプチド10、11、および15(配列番号35~37)に結合し、これらが類似するエピトープを結合することを示した。ペプチド配列を表の下に示す。C4およびB12は、直鎖化されたペプチドのライブラリーによって予測することができなかった立体構造エピトープを有し得る。

20

【図21-2】同上。

【図21-3】同上。

【0039】

【図22】図22: ELISAによるB7H3特異的抗体B12、C4、G8および376.96のB7H3タンパク質への結合。

30

【発明を実施するための形態】

【0040】

配列表

添付の配列表に列挙された核酸およびアミノ酸配列は、37 C.F.R. 1.822に規定されるヌクレオチド塩基に関する標準的な文字の略語、およびアミノ酸に関する3文字コードを使用して示される。各核酸配列の一本の鎖のみが示されるが、表示された鎖のいずれかを参照して相補鎖が含まれるものと理解される。配列表は、参照により本明細書に組み込まれる、2020年10月19日に作成された27.8KBのASCIIテキストファイルとして提出される。添付の配列表では:

40

【0041】

配列番号1はラクダ抗体RWB12のアミノ酸配列である。

【0042】

配列番号2はラクダ抗体RWG8のアミノ酸配列である。

【0043】

配列番号3はラクダ抗体RWC4のアミノ酸配列である。

【0044】

配列番号4はラクダ抗体RWB2のアミノ酸配列である。

【0045】

50

配列番号 5 はラクダ抗体 RWH 5 のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 6 】

配列番号 6 はラクダ抗体 RWD 5 のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 7 】

配列番号 7 はラクダ抗体 RWC 3 のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 8 】

配列番号 8 はラクダ抗体 RWG 4 のアミノ酸配列である。

【 0 0 4 9 】

配列番号 9 はラクダ抗体 RWD 9 のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 0 】

配列番号 10 はラクダ抗体 RWH 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 1 】

配列番号 11 はウサギ抗体 RFA 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 2 】

配列番号 12 はウサギ抗体 RFB 1 のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 3 】

配列番号 13 は B7H3 の細胞外ドメインのアミノ酸配列である。

【 0 0 5 4 】

配列番号 14 ～ 26 はプライマー配列である。

【 0 0 5 5 】

配列番号 27 は GMCSFRss のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 6 】

配列番号 28 は CD8 α ヒンジ領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 7 】

配列番号 29 は CD8 α 膜貫通領域のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 8 】

配列番号 30 は 4-1BB のアミノ酸配列である。

【 0 0 5 9 】

配列番号 31 は CD3 ζ のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 0 】

配列番号 32 は自己切断 T2A ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 6 1 】

配列番号 33 は huEGFRt のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 2 】

配列番号 34 はウサギ VH ドメイン抗体 5DUB のアミノ酸配列である。

【 0 0 6 3 】

配列番号 35 ～ 37 は B7H3 ペプチドのアミノ酸配列である。

【 0 0 6 4 】

詳細な説明

I. 略語

ADC 抗体-薬物コンジュゲート

ADCC 抗体依存性細胞媒介性細胞傷害

B7H3 B7 ホモログ 3

BBIR ビオチン結合免疫受容体

CAR キメラ抗原受容体

CDR 相補性決定領域

CTL 細胞傷害性 T リンパ球

ECD 細胞外ドメイン

EGF 表皮成長因子

EGFR 表皮成長因子受容体

10

20

30

40

50

E L I S A 酵素結合免疫吸着検定法
 E M エフェクター部分
 F A C S 蛍光活性化細胞分取
 G M C S F R s s 顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子受容体シグナル配列
 h F c ヒト F c
 h u E G F R t ヒト切断型表皮成長因子受容体
 I C 5 0 阻害濃度 5 0
 I g 免疫グロブリン
 K O ノックアウト
 N K ナチュラルキラー
 P B D ピロロベンゾジアゼピン
 P E P s e u d o m o n a s 外毒素
 P E T 陽電子放出断層撮影
 T M 膜貫通
 V H 可変重
 V L 可変軽

10

II. 用語および方法

【0065】

別段に注記されていなければ、技術用語は従来の使用法に従って使用される。分子生物学における一般用語の定義は、Jones & Bartlett Publishers によって2009年に公表されたBenjamin Lewin, Genes X; およびWiley-VCHによって2008年に16巻で公表されたMeyers et al. (eds.), The Encyclopedia of Cell Biology and Molecular Medicine; および他の類似する参考文献に見出され得る。

20

【0066】

本明細書で使用される場合、単数形「1つの(a)」、「1つの(an)」、および「その(the)」は、別段に文脈が明確に指摘していなければ、単数と複数の両方を指す。例えば、「抗原(an antigen)」という用語は、単一の抗原も複数の抗原も含み、「少なくとも1つの抗原(at least one antigen)」という語句と等しいと考えることができる。本明細書で使用される場合、「含む(comprises)」という用語は「含む(includes)」を意味する。別段に指摘されていなければ、核酸またはポリペプチドについて与えられるありとあらゆる塩基サイズまたはアミノ酸サイズ、およびすべての分子量または分子質量値はおよその値であり、便宜的に与えられるものであることがさらに理解されるべきである。本明細書に記載の方法および材料に類似するかまたはそれに等しい多くの方法および材料を使用することができるが、特に好適な方法および材料が本明細書に記載されている。矛盾する場合、用語の説明を含む本明細書が支配することになる。さらに、材料、方法、および例は、例証に過ぎず、限定されることを意図するものではない。様々な実施形態の精査を容易にするために、以下の用語の説明が与えられる：

30

【0067】

4-1BB: T細胞受容体(TCR)活性化リンパ球によって、およびナチュラルキラー細胞を含む他の細胞によって発現される共刺激分子。4-1BBのライゲーションは、サイトカイン産生、抗アポトーシス分子の発現および免疫応答の増強をもたらすシグナル伝達カスケードを誘導する。4-1BBの例示的なアミノ酸配列は、本明細書において、配列番号30として示されている。

40

【0068】

投与: 任意の効果的な経路によって、本明細書において提供されるモノクローナル抗体、CARまたはCARを発現する細胞などの薬剤を対象に提供または与えること。例示的な投与経路としては、以下に限定されないが、経口、注射(皮下、筋肉内、皮内、腹腔内

50

、静脈内、前立腺内、および腫瘍内など）、舌下、直腸、経皮、鼻腔内、膈および吸入経路が挙げられる。

【0069】

抗体：抗原のエピトープを認識し、結合する（例えば、特異的に認識し、特異的に結合する）少なくとも1つの可変領域を含むポリペプチドリガンド。哺乳動物の免疫グロブリン分子は、重（H）鎖および軽（L）鎖（そのそれぞれが、それぞれ、可変重（V_H）領域および可変軽（V_L）領域と称される可変領域を有する）から構成される。合わせて、V_H領域およびV_L領域は、抗体によって認識される抗原の結合を担っている。哺乳動物の免疫グロブリンには5つの主要な重鎖の分類（またはアイソタイプ）が存在し、これらは、抗体分子：IgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEの機能的活性を決定する。哺乳動物に見られない抗体アイソタイプには、IgX、IgY、IgWおよびIgNARが含まれる。IgYは、鳥類および爬虫類によって産生される一次抗体であり、哺乳動物のIgGおよびIgEに機能的に類似する。IgWおよびIgNAR抗体は、軟骨魚類によって産生される一方、IgX抗体は両生類に見られる。

【0070】

抗体可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」として公知の「フレームワーク」領域および超可変領域を含有する。CDRは、抗原のエピトープへの結合を主に担っている。抗体のフレームワーク領域は、三次元空間においてCDRを位置付け、アラインメントする役割を果たす。所与のCDRのアミノ酸配列の境界は、Kabatら（Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Department of Health and Human Services, 1991; 「Kabat」の番号付けスキーム）、Chothiaら（Chothia and Lesk, J Mol Biol 196:901-917, 1987; Chothia et al., Nature 342:877, 1989; およびAl-Lazikani et al., JMB 273, 927-948, 1997; 「Chothia」番号付けスキームを参照されたい）、Kunikら（Kunik et al., PLoS Comput Biol 8:e1002388, 2012; およびKunik et al., Nucleic Acids Res 40 (Web Server issue):W521-524, 2012; 「Paratome CDRs」を参照されたい）およびIMMUNOGENETICS (IMGT) データベース（Lefranc, Nucleic Acids Res 29:207-9, 2001; 「IMGT」番号付けスキームを参照されたい）によって記載されたスキームを含む、いくつかの周知の番号付けスキームのいずれかを使用して、容易に決定することができる。Kabat、ParatomeおよびIMGTのデータベースはオンラインで維持されている。

【0071】

「単ドメイン抗体」は、さらなる抗体ドメインの非存在下で、抗原、または抗原のエピトープを特異的に結合することが可能である単ドメイン（可変ドメイン）を有する抗体を指す。単ドメイン抗体には、例えば、V_Hドメイン抗体、V_{NAR}抗体、ラクダ科V_HH抗体、およびV_Lドメイン抗体が含まれる。V_{NAR}抗体は、コモリザメ、ウォビゴンザメ、ツノザメおよびテンジクザメなどの軟骨魚類によって産生される。ラクダ科V_HH抗体は、天然で軽鎖が欠けている重鎖抗体を産生する、ラクダ、ラマ、アルパカ、ヒトコブラクダ、およびグアナコを含むいくつかの種によって産生される。

【0072】

「モノクローナル抗体」は、リンパ球の単一のクローンによって、または単一抗体のコード配列がトランスフェクトされた細胞によって産生された抗体である。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法によって産生される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

【0073】

「キメラ抗体」は、ヒトなどの1つの種に由来するフレームワーク残基、および別の種

に由来するCDR（一般に、抗原結合を付与する）を有する。

【0074】

「ヒト化」抗体は、ヒトフレームワーク領域および非ヒト（例えば、マウス、ウサギ、ラット、サメまたは合成の）免疫グロブリン由来の1つまたは複数のCDRを含む免疫グロブリンである。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。一実施形態では、すべてのCDRは、ヒト化免疫グロブリンのドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域は存在する必要はないが、これらが存在する場合、これらは、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち、少なくとも約85～90%、例えば、約95%またはそれより高い割合で同一でなければならない。したがって、おそらくCDRは除いて、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化または他のモノクローナル抗体は、抗原結合や他の免疫グロブリン機能に対して実質的に効果を有さないさらなる保存的アミノ酸置換を有し得る。

【0075】

抗体-薬物コンジュゲート（ADC）：細胞傷害剤などの薬物にコンジュゲートした抗体（または抗体の抗原結合断片）を含む分子。ADCを使用して、細胞表面で発現される腫瘍抗原への抗体の特異的結合によって、薬物をがん細胞に特異的に標的化することができる。ADCと共に使用するための例示的な薬物には、微小管阻害剤（メイタンシノイド、オーリスタチンEおよびオーリスタチンFなど）および鎖間架橋剤（例えば、ピロロペンゾジアゼピン；PBD）が含まれる。一部の場合には、ADCは二特異性ADCであり、薬物にコンジュゲートした、それぞれが異なる抗原またはエピトープに向けられる2つのモノクローナル抗体またはその抗原断片から構成される。一例では、抗体に結合した薬剤は、IRDye（登録商標）700 DX（IR700、Licoor、Lincoln、NE）であり、これは、その後、抗体が結合するがん細胞を死滅させるために、近赤外光NIR光と共に使用され得る（光免疫療法；例えば、US8,524,239および10,538,590を参照されたい）。例えば、アミノ反応性IR700は、IR700のNHSエステルを使用して抗体に共有結合によりコンジュゲートされ得る。

【0076】

微小管阻害剤：有糸分裂を停止させることによって細胞成長をブロックする薬物の種類。「抗有糸分裂剤」とも称される微小管阻害剤を使用してがんを処置する。

【0077】

B7ホモログ3（B7H3）：いくつかの種類の固形腫瘍によって発現される免疫チェックポイント分子。このタンパク質は、B7スーパーファミリーの共刺激分子のメンバーである。B7H3は、CD276としても公知である。

【0078】

B7H3陽性がん：B7H3を発現または過剰発現するがん。B7H3陽性がんの例としては、以下に限定されないが、肝臓がん（肝細胞癌など）、膵臓がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮頸がん、食道がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肺がん、脳がん（神経芽腫または神経膠芽腫など）、小児がん（骨肉腫、神経芽腫、横紋筋肉腫またはユーイング肉腫など）、黒色腫および中皮腫（例えば、Seaman et al., Cancer Cell 31(4):501-505, 2017を参照されたい）が挙げられる。

【0079】

結合親和性：抗体の抗原に対する親和性。一実施形態では、親和性は、Frankel et al., Mol. Immunol., 16:101-106, 1979により記載されたScatchard法の修正によって計算される。別の実施形態では、結合親和性は、抗原/抗体解離速度によって測定される。別の実施形態では、高結合親和性は、競合ラジオイムノアッセイによって測定される。別の実施形態では、結合親和性は、ELISAによって測定される。他の実施形態では、抗体親和性は、フローサイトメトリー

によって、または表面プラズモン共鳴 (surface plasmon resonance) によって測定される。抗原 (B7H3 など) を「特異的に結合する」抗体は、高親和性で抗原を結合し、他の無関係の抗原を有意に結合しない抗体である。

【0080】

一部の例では、モノクローナル抗体 (本明細書において提供される抗B7H3単ドメイン抗体など) は、試料または対象における他の分子に関する結合定数よりも少なくとも 10^3 M^{-1} 高いか、 10^4 M^{-1} 高いか、または 10^5 M^{-1} 高い結合定数で、標的 (B7H3 など) に特異的に結合する。一部の例では、抗体 (例えば、モノクローナル抗体) は、 $1 \mu\text{M}$ もしくはそれより小さい、例えば、 900 nM もしくはそれより小さい、 500 nM もしくはそれより小さい、 250 nM もしくはそれより小さい、 100 nM もしくはそれより小さい、 50 nM もしくはそれより小さい、 10 nM もしくはそれより小さい、 5 nM もしくはそれより小さい、または 1 nM もしくはそれより小さい平衡定数 (K_d) を有する。例えば、単ドメインモノクローナル抗体は、少なくとも約 $1 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、少なくとも約 $0.5 \times 10^{-6} \text{ M}$ 、少なくとも約 $1 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、少なくとも約 $0.5 \times 10^{-7} \text{ M}$ 、少なくとも約 $1 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $0.5 \times 10^{-8} \text{ M}$ 、少なくとも約 $1 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、少なくとも約 $0.5 \times 10^{-9} \text{ M}$ 、または少なくとも約 0.1×10^{-9} の結合親和性で、B7H3などの標的に結合する。ある特定の実施形態では、その標的に結合する特異的結合剤は、 $\leq 1000 \text{ nM}$ 、 $\leq 750 \text{ nM}$ 、 500 nM 、 $\leq 250 \text{ nM}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 50 \text{ nM}$ 、 $\leq 25 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 5 \text{ nM}$ 、 $\leq 2.5 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.5 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.25 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 、または $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例えば、 10^{-6} M またはそれより小さい、例えば $10^{-6} \text{ M} \sim 10^{-10} \text{ M}$ 、例えば $10^{-7} \text{ M} \sim 10^{-9} \text{ M}$) の解離定数 (K_d) を有する。一部の例では、結合親和性は、バイオレイヤーインターフェロメトリー (BLI) 技術に基づくOctetシステム (Creative Biolabs) を使用して測定される。一部の例では、 K_d は、BIAcore ES-2000 または BIAcore ES-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, N. J.) を使用して、表面プラズモン共鳴アッセイを使用して測定される。

【0081】

二特異性抗体：2つの異なるモノクローナル抗体の抗原結合断片を含み、それによって、2つの異なる抗原を結合することが可能である組換えタンパク質。一部の実施形態では、二特異性抗体は、例えば、CTL (CD3などのCTL受容体構成成分など) またはエフェクターナチュラルキラー (NK) 細胞と、腫瘍抗原 (B7H3 など) との両方を同時に標的とすることによって、がん免疫療法のために使用される。同様に、多特異性抗体は、2、3または4つの異なるモノクローナル抗体などの少なくとも2つの異なるモノクローナル抗体の抗原結合断片を含む組換えタンパク質である。

【0082】

脳がんまたは腫瘍：脳組織から発症するがんまたは腫瘍の種類。脳がんとしては、以下に限定されないが、神経芽腫、髄芽腫、神経膠腫、神経膠芽腫、髄膜腫、下垂体腺腫、星状細胞腫、脈絡叢癌、上衣腫および松果体芽腫が挙げられる。

【0083】

乳がん：乳房の組織、通常は乳管および小葉において形成するがんの種類。乳がんの種類としては、例えば、非浸潤性乳管癌、侵襲性乳管癌、トリプルネガティブ乳がん、炎症性乳がん、転移性乳がん、髄様癌、管状癌および粘液癌が挙げられる。トリプルネガティブ乳がんは、がん細胞が、エストロゲン受容体、プロゲステロン受容体や有意なレベルのHER2/neuタンパク質を発現しない乳がんの種類を指す。トリプルネガティブ乳がんは、ER陰性PR陰性HER2/neu陰性乳がんとも呼ばれる。

【0084】

化学療法剤：異常な細胞成長によって特徴付けられる疾患の処置において治療有用性を有する任意の化学薬剤。このような疾患としては、腫瘍、新生物、およびがんならびに乾癬などの肥厚成長によって特徴付けられる疾患が挙げられる。一実施形態では、化学療法

10

20

30

40

50

剤は、B7H3陽性腫瘍を処置する際に使用する薬剤である。一実施形態では、化学療法剤は放射性化合物である。当業者であれば、使用する化学療法剤を容易に特定することができる（例えば、Slapak and Kufe, Principles of Cancer Therapy, Chapter 86 in Harrison's Principles of Internal Medicine, 14th edition; Perry et al., Chemotherapy, Ch. 17 in Abeloff, Clinical Oncology 2nd ed., (著作権) 2000 Churchill Livingstone, Inc; Baltzer, L., Berkery, R. (eds.): Oncology Pocket Guide to Chemotherapy, 2nd ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1995; Fischer, D.S., Knobf, M.F., Durivage, H.J. (eds): The Cancer Chemotherapy Handbook, 4th ed. St. Louis, Mosby-Year Book, 1993を参照されたい）。併用化学療法は、がんを処置するための1つよりも多い薬剤の投与である。一例は、放射性または化学化合物と組み合わせて使用されるB7H3を結合する抗体の投与である。一例では、化学療法剤は、生物製剤、例えば、本明細書において提供される抗B7H3抗体などの治療用抗体（例えば、治療用モノクローナル抗体）、および抗PD1もしくは抗PDL1（例えば、ペンブロリズマブおよびニボルマブ）、抗CTLA4（例えば、イピリムマブ）、抗EGFR（例えば、セツキシマブ）、抗VEGF（例えば、ベバシズマブ）、またはそれらの組合せ（例えば、抗PD-1および抗CTLA-4）などの他の抗がん抗体である。

【0085】

キメラ抗原受容体（CAR）：抗原結合部分（scFvまたは単一ドメイン抗体など）およびシグナル伝達ドメイン、例えば、T細胞受容体由来のシグナル伝達ドメイン（例えば、CD3ζ）を含むキメラ分子。典型的には、CARは、抗原結合部分、膜貫通ドメインおよびエンドドメインから構成される。エンドドメインは、典型的には、CD3ζまたはFcεRIγなどの免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を有するシグナル伝達鎖を含む。一部の事例では、エンドドメインは、CD28、4-1BB（CD137）、ICOS、OX40（CD134）、CD27および／またはDAP10などの少なくとも1つのさらなる共刺激ドメインの細胞内部分をさらに含む。一部の例では、CARは多特異性（二特異性など）またはバイシストロニックである。多特異性CARは、異なる抗原または同じ抗原上の異なるエピトープをそれぞれ結合する少なくとも2つの抗原結合ドメイン（scFvおよび／または単一ドメイン抗体など）から構成される単一のCAR分子である（例えば、US2018/0230225を参照されたい）。例えば、二特異性CARは、異なる抗原をそれぞれ結合する2つの抗原結合ドメインを有する単一のCAR分子を指す。バイシストロニックCARは、異なる抗原を結合する抗原結合部分をそれぞれ含有する2つの完全なCAR分子を指す。一部の場合には、バイシストロニックCAR構築物は、切断リンカーによって連結された2つの完全なCAR分子を発現する。二特異性またはバイシストロニックCARを発現するT細胞またはNK細胞は、結合性部分が向けられる抗原の両方を発現する細胞を結合することができる（例えば、Qin et al., Blood 130:810, 2017; およびWO/2018/213337を参照されたい）。

【0086】

結腸がん：結腸または直腸において発症するがんの種類。結腸がん（「結腸直腸がん」としても公知）の最も一般的な種類は、結腸直腸腺癌であり、すべての結腸がんのおよそ95%を占める。腺癌は、結腸および／または直腸の内側を覆う細胞で発症する。結腸直腸がんの他の種類としては、消化管カルチノイド腫瘍、転移性結腸直腸がん、原発性結腸直腸リンパ腫（非ホジキンリンパ腫の一種）、消化管間質腫瘍（肉腫として分類され、カハールの介在細胞から生じる）、平滑筋肉腫（平滑筋細胞から生じる）および結腸直腸黒色腫が挙げられる。

【0087】

相補性決定領域（CDR）：抗体の結合親和性および特異性を規定する超可変性アミノ酸配列の領域。哺乳動物の免疫グロブリンの軽鎖および重鎖はそれぞれ、それぞれL-CDR1、L-CDR2、L-CDR3およびH-CDR1、H-CDR2、H-CDR3と名付けられた3つのCDRを有する。単ドメイン抗体は、本明細書においてCDR1、CDR2およびCDR3と称される3つのCDRを含有する。

【0088】

コンジュゲート：本開示の文脈では、「コンジュゲート」は、エフェクター分子または第2のタンパク質（第2の抗体など）に共有結合により連結した抗体または抗体断片（例えば、抗原結合断片）である。エフェクター分子は、例えば、薬物、毒素、治療剤、検出可能な標識、タンパク質、核酸、脂質、ナノ粒子、光子吸収体、炭水化物または組換えウイルスであり得る。抗体コンジュゲートは、「イムノコンジュゲート」と称されることが多い。コンジュゲートが薬物（細胞傷害剤など）に連結した抗体を含む場合、コンジュゲートは、「抗体-薬物コンジュゲート」または「ADC」と称されることが多い。他の抗体コンジュゲートとしては、例えば、多特異性（二特異性または三特異性など）抗体およびキメラ抗原受容体（CAR）が挙げられる。

【0089】

保存的バリエーション：B7H3に対する抗体などの、タンパク質の親和性に実質的に影響を及ぼしも、それを低下させもしない保存的アミノ酸置換を含有するタンパク質。例えば、B7H3を特異的に結合するモノクローナル抗体は、多くて約1、多くて約2、多くて約5、および多くて約10、または多くて約15個の保存的置換を含み、B7H3ポリペプチドを特異的に結合することができる。「保存的バリエーション」という用語は、抗体がB7H3を特異的に結合する限り、置換されていない親アミノ酸の代わりに置換されたアミノ酸の使用も含む。非保存的置換は、B7H3に対する活性または結合を低下させる置換である。

【0090】

機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的アミノ酸置換の表は、当業者にとって周知である。以下の6つの群は、互いに保存的置換であると考えられるアミノ酸の例である：

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

【0091】

接触させること：直接的な物理的会合状態に置くこと；固体形態と液体形態の両方を含む。

【0092】

細胞傷害剤：細胞を死滅させる任意の薬物または化合物。

【0093】

細胞傷害性：生物の残りの部分の細胞とは対照的に、標的とされることが意図される細胞に対する、免疫毒素などの分子の毒性。対照的に、「毒性」という用語は、免疫毒素の標的化部分によって標的とされることを意図された細胞であるもの以外の細胞に対する免疫毒素の毒性を指し、「動物毒性」という用語は、免疫毒素によって標的とされることを意図された細胞以外の細胞への免疫毒素の毒性による、動物への免疫毒素の毒性を指す。

【0094】

縮重バリエーション：遺伝暗号の結果として、縮重である配列を含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド。20種の天然アミノ酸が存在し、そのほとんどが1つよりも多いコドンによって指定される。したがって、ポリペプチドのアミノ酸配列が変更されない限り、すべての縮重ヌクレオチド配列が含まれる。

10

20

30

40

50

【0095】

診断：B7H3陽性がんなどの病態の存在または性質を特定すること。診断方法はその感度および特異度において異なる。診断アッセイの「感度」は、試験で陽性である罹患した個体のパーセンテージ（真陽性のパーセント）である。診断アッセイの「特異度」は、1マイナス偽陽性率であり、ここで、偽陽性率は、試験陽性である疾患を有さないものの比率として定義される。特定の診断方法は、状態の確定診断を提供することできないとしても、その方法が診断を助ける正の指標を提供するならば十分である。「予後」は、がんなどの病態の発症の確率（重症度など）である。

【0096】

診断腫瘍イメージング：陽電子放出断層撮影（PET）のための陽電子放出放射性核種を有するカップリング抗体およびそれらの誘導体は、イムノPETと称されることの多いプロセスである。全長抗体によって良好なイムノPET剤が作製され得るが、これらの生物学的半減期によって、イメージングの前に数日待つことが必要となり、非標的放射線量の増加がもたらされる。より小さい単ドメイン抗体、またはナノボディは、同日イメージングに適している生物学的半減期を有する。

【0097】

薬物：対象における疾患または状態を処置、緩和または防止するために使用される任意の化合物。本明細書における一部の実施形態では、薬物は、抗がん剤、例えば、細胞傷害剤、例えば、抗有糸分裂剤または微小管阻害剤である。

【0098】

エフェクター分子：キメラ分子に標的とされる細胞に対して所望の効果を有することが意図されるキメラ分子の部分。エフェクター分子は、エフェクター部分（EM）、治療剤、診断剤、または類似の用語としても公知である。治療剤（または薬物）は、核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸もしくは誘導体などの化合物、糖タンパク質、放射性同位体、光子吸収体、脂質、炭水化物、または組換えウイルスを含む。核酸治療および診断部分は、アンチセンス核酸、一重鎖または二重鎖DNAと共有結合により架橋するための誘導体化オリゴヌクレオチド、および三重鎖形成オリゴヌクレオチドを含む。あるいは、抗B7H3抗体などの標的化部分に連結した分子は、薬物、核酸（アンチセンス核酸など）、または循環系への直接的曝露から遮蔽され得る別の治療成分（therapeutic moiety）などの治療用組成物を含有するリポソームまたはミセルなどの封入系であってもよい。抗体に結合したリポソームを調製する手段は、当業者に周知である（例えば、米国特許第4,957,735号；およびConnor et al., Pharm Ther 28:341-365, 1985を参照されたい）。診断剤または部分は、放射性同位体および他の検出可能な標識を含む。このような目的に対して有用な検出可能な標識はまた、当技術分野で周知であり、 ^{35}S 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In および ^{125}I などの放射性同位体、フルオロフォア、化学発光剤、ならびに酵素を含む。

【0099】

エピトープ：抗原決定基。これらは、抗原性である（特定の免疫応答を誘発する）分子上の特定の化学基またはペプチド配列である。抗体は、B7H3などのポリペプチド上の特定の抗原エピトープを特異的に結合する。

【0100】

フレームワーク領域：CDR間に挿入されたアミノ酸配列。免疫グロブリン分子のフレームワーク領域は、可変軽および可変重フレームワーク領域を含む。

【0101】

融合タンパク質：2つの異なる（異種の）タンパク質の少なくとも一部を含むタンパク質。

【0102】

異種：別個の遺伝源または種に由来すること。

【0103】

10

20

30

40

50

免疫応答：刺激に対する、B細胞、T細胞、または単球などの免疫系の細胞の応答。一実施形態では、応答は、特定の抗原に特異的である（「抗原特異的応答」）。一実施形態では、免疫応答は、 $CD4^+$ 応答または $CD8^+$ 応答などのT細胞応答である。別の実施形態では、応答はB細胞応答であり、特異的抗体の産生をもたらす。

【0104】

イムノコンジュゲート：エフェクター分子の抗体またはその機能的断片への共有結合による連結。エフェクター分子は、例えば、検出可能な標識、光子吸収体（IR700など）、または毒素（*Pseudomonas* 外毒素またはそのバリエーションを含む免疫毒素などの免疫毒素を形成するための）であってもよい。毒素の具体的な非限定的な例としては、以下に限定されないが、アブリン、リシン、*Pseudomonas* 外毒素（PE、例えば、PE35、PE37、PE38、およびPE40）、ジフテリア毒素（DT）、ボツリヌス毒素、もしくはこれらの改変毒素、または直接的もしくは間接的に、細胞成長を阻害するかもしれない細胞を死滅させる他の毒性剤が挙げられる。例えば、PEおよびDTは、典型的には肝毒性によって死をもたらす毒性の高い化合物である。しかし、PEおよびDTは、毒素の本来の標的化構成成分（例えば、PEのドメインIaおよびDTのB鎖）を除去し、それを異なる標的化部分、例えば、抗体で置き換えることによって、免疫毒素として使用するための形態へと改変され得る。一実施形態では、抗体をエフェクター分子に結合させる。別の実施形態では、エフェクター分子に結合させた抗体は、例えば、体内でのその半減期を増加させるために、脂質または他の分子にさらに結合させる。連結は、化学的手段によるものであっても、組換え手段によるものであってもよい。一実施形態では、連結は化学的であり、抗体部分とエフェクター分子の間の反応は、2つの分子間に形成された共有結合を生じさせて、1つの分子を形成する。ペプチドリinker（短いペプチド配列）は、抗体とエフェクター分子の間に必要に応じて含まれてもよい。イムノコンジュゲートは、もともと、抗体およびエフェクター分子などの別々の官能基を有する2つの分子から調製されたため、これらは、「キメラ分子」と称されることもある。したがって、「キメラ分子」という用語は、本明細書で使用される場合、エフェクター分子にコンジュゲートした（カップリングした）リガンドまたは抗体などの標的化部分を指す。「コンジュゲートした」または「連結した」という用語は、2つのポリペプチドを1つの連続したポリペプチド分子にすることを指す。

【0105】

イムノリポソーム：その表面にコンジュゲートした抗体または抗体断片を有するリポソーム。イムノリポソームは、腫瘍細胞などの抗体によって標的とされる細胞に対する細胞傷害剤または他の薬物を有し得る。

【0106】

鎖間架橋剤：DNAの2本の鎖の間で共有結合し、それによって、DNA複製および／または転写を防止することが可能な細胞傷害性薬物の種類。

【0107】

単離された：核酸、タンパク質（抗体を含む）またはオルガネラなどの「単離された」生物学的構成成分は、構成成分が天然に存在する環境（細胞など）における他の生物学的構成成分、例えば、他の染色体および染色体外のDNAおよびRNA、タンパク質ならびにオルガネラから実質的に分離または精製されている。「単離された」核酸およびタンパク質は、標準的な精製方法によって精製された核酸およびタンパク質を含む。用語は、宿主細胞における組換え発現によって調製された核酸およびタンパク質、ならびに化学合成された核酸も包含する。

【0108】

標識：抗体またはタンパク質などの別の分子の検出を容易にするために、この分子に直接的または間接的にコンジュゲートした検出可能な化合物または組成物。標識の具体的な非限定的な例としては、蛍光タグ、酵素結合、および放射性同位体が挙げられる。一例では、「標識された抗体」は、抗体における別の分子の組み込みを指す。例えば、標識は、放射標識されたアミノ酸の組み込み、またはマークされたアビジン（例えば、光学的方法

10

20

30

40

50

または比色分析方法によって検出され得る蛍光マーカ―または酵素活性を含有するストレプトアビジン)によって検出され得るビオチニル部分のポリペプチドへの結合などの、検出可能なマーカ―である。ポリペプチドおよび糖タンパク質を標識する様々な方法は、当技術分野で公知であり、使用することができる。ポリペプチドに対する標識の例としては、以下に限定されないが、以下：放射性同位体または放射性ヌクレオチド(例えば、 ^{35}S 、 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{19}F 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 、 ^{131}I 、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In および ^{125}I)、蛍光標識(例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン(FITC)、ローダミン、ランタニド蛍光体)、酵素標識(例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、ペーターガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ)、化学発光マーカ―、ビオチニル基、二次リポーターによって認識される所定のポリペプチドエピトープ(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)、またはガドリニウムキレートなどの磁性剤が挙げられる。一部の実施形態では、標識を、潜在的な立体障害を低減するために様々な長さのスペーサーアームによって結合する。

【0109】

リンカー：一部の場合には、リンカーは、可変重鎖を可変軽鎖に間接的に結合する役割を果たす、抗体結合断片(Fv断片など)内のペプチドである。「リンカー」は、抗体などの標的化部分を細胞毒素または検出可能な標識などのエフェクター分子に連結させる役割を果たすペプチドも指し得る。「コンジュゲートさせること」、「結合させること(joining)」、「結合すること(bonding)」または「連結すること(linking)」という用語は、2つのポリペプチドを1つの連続的なポリペプチド分子にすること、または放射性核種もしくは他の分子を抗体などのポリペプチドに共有結合によって付着させることを指す。連結は、化学的手段によるものであっても、組換え手段によるものであってもよい。「化学的手段」は、1つの分子を形成するために、2つの分子間に形成された共有結合が存在するような、抗体部分とエフェクター分子の間の反応を指す。

【0110】

肝臓がん：肝臓組織において生じるがんの任意の種類。肝臓がんの最も一般的な種類は、肝細胞癌(HCC)であり、これは肝細胞内で発症する。他の種類の肝臓がんとしては、胆管で発症する胆管癌；肝臓の血管内で開始する肝臓がんの稀な形態である肝臓血管肉腫；およびほとんどの場合小児において見られる肝臓がんの非常に稀な種類である肝芽腫が挙げられる。

【0111】

肺がん：肺において形成する任意のがん。肺において開始するほとんどのがんは癌である。肺癌の2つの主要な種類は、小細胞肺癌(SCLC)および非小細胞肺癌(NSCLC)である。NSCLCのサブクラスは、腺癌、扁平上皮癌および大細胞癌を含む。

【0112】

作動可能に連結した：第1の核酸配列は、第1の核酸配列が第2の核酸配列と機能的関係に置かれた場合に、第2の核酸配列と作動可能に連結されている。例えば、プロモーターは、プロモーターがコード配列の転写または発現に影響を及ぼす場合に、コード配列に作動可能に連結されている。一般に、作動可能に連結したDNA配列は、近接しており、かつ、2つのタンパク質コード領域を結合させるのに必要である場合、同じリーディングフレーム内に存在する。

【0113】

卵巣がん：卵巣の組織において形成するがん。ほとんどの卵巣がんは、卵巣上皮癌(卵巣の表面の細胞内で開始するがん)または悪性生殖細胞腫瘍(卵細胞内で開始するがん)のいずれかである。別の種類の卵巣がんは、ホルモンを放出し、卵巣の様々な構造に接続する細胞を起源とする間質細胞がんである。

【0114】

膵臓がん：悪性細胞が膵臓の組織内に見られる疾患。膵腫瘍は、がんの細胞起源に基づいて、外分泌腫瘍または神経内分泌腫瘍のいずれかであり得る。膵臓がんの大多数(約9

10

20

30

40

50

4%)は外分泌腫瘍である。外分泌がんとしては、例えば、腺癌(最も一般的な種類の外分泌腫瘍)、腺房細胞癌、膵管内乳頭粘液性腫瘍(IPMN)、および粘液性嚢胞腺癌が挙げられる。一部の例では、膵臓がんは、膵管腺癌(PDAC)である。膵臓神経内分泌腫瘍は、膵島細胞腫瘍とも称され、それらが産生するホルモンの種類によって分類される。例示的な神経内分泌腫瘍としては、ガストリン産生腫瘍、グルカゴン産生腫瘍(glucagonoma)、インスリン産生腫瘍、ソマトスタチン産生腫瘍、VIP産生腫瘍(血管作動性腸管ペプチド)および非機能性膵島細胞腫瘍が挙げられる。

【0115】

小児がん：0~14歳の小児において発症するがん。主要な種類の小児がんとしては、例えば、神経芽腫、急性リンパ芽球性白血病(ALL)、胎児性横紋筋肉腫(ERMS)、胞巣状横紋筋肉腫(ARMS)、ユーイング肉腫、線維形成性小円形細胞腫瘍(DRCT)、骨肉腫、脳および他のCNS腫瘍(神経芽腫および髄芽腫など)、ウィルムス腫瘍、非ホジキンリンパ腫および網膜芽細胞腫が挙げられる。

【0116】

薬学的に許容される担体：使用する薬学的に許容される担体は従来通りである。Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005)は、本明細書に開示される抗体および他の組成物の医薬品送達に好適な組成物および製剤について記載する。一般に、担体の性質は、用いられる特定の投与方式に依存する。例えば、非経口製剤は、通常、ビヒクルとしての水、生理食塩水、平衡塩類溶液、水性デキストロース、グリセロールなどのような薬学的および生理学的に許容される流体を含む注射用流体を含む。固体組成物(散剤、丸剤、錠剤、またはカプセル剤形態など)では、従来の非毒性の固体担体としては、例えば、医薬品グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、またはステアリン酸マグネシウムを挙げることができる。生物学的に中性の担体に加えて、投与される医薬組成物は、湿潤剤または乳化剤、保存剤、およびpH緩衝剤などのような微量の非毒性補助物質、例えば、酢酸ナトリウムまたはモノラウリン酸ソルビタンを含有してもよい。

【0117】

光免疫療法：標的とした細胞を死滅させるために、近赤外光によって活性化され得る抗原特異的抗体-光吸収体コンジュゲートを利用する標的がん治療。光吸収体は、典型的には、近赤外(NIR)フタロシアニン色素(例えば、IR700としても公知のIRDye(登録商標)700DX)などのフタロシアニン色素をベースとする。抗体(例えば、B7H3特異的抗体)は、適切な細胞表面抗原(例えば、B7H3)に結合し、光活性化色素は、NIR光への曝露後に細胞膜に致命的な損傷を誘導する。NIR光曝露(例えば、690nm)は、隣接する細胞に損傷を与えることなく、数分以内に選択的に高い、壊死性のがん細胞死を誘導する(例えば、米国出願第2018/0236076号を参照されたい)。

【0118】

疾患を防止、処置または緩和すること：疾患を「防止すること」は、疾患の完全な発症を阻害することを指す。「処置すること」は、疾患または病態が発症し始めた後に、腫瘍負荷の軽減または転移の数もしくはサイズ(the number of size of metastases)の低下などの、疾患または病態の兆候または症状を緩和する治療介入を指す。「緩和すること」は、がんなどの疾患の兆候または症状の数または重症度の低減を指す。

【0119】

精製された：精製されたという用語は、絶対純度を必要とせず、むしろ相対的用語として意図される。よって、例えば、精製されたペプチド調製物は、ペプチドまたはタンパク質が、そのペプチドまたはタンパク質が細胞内の自然環境内に存在するよりも富化されて

10

20

30

40

50

いる調製物である。一実施形態では、調製物は、タンパク質またはペプチドが、調製物の総ペプチドまたはタンパク質含量が少なくとも50%に相当するように精製される。実質的な精製は、他のタンパク質または細胞構成成分からの精製を示す。実質的に精製されたタンパク質は、少なくとも60%、70%、80%、90%、95%または98%純粋である。よって、具体的な非限定的な一例では、実質的に精製されたタンパク質は、他のタンパク質または細胞構成成分を90%含まない。

【0120】

ピロロベンゾジアゼピン (PBD) : *Streptomyces* 種でもともと発見された配列選択的DNA副溝結合架橋剤の分類。PBDは、合成化学療法薬よりも有意に強力である。PBDの作用機序は、DNAの副溝に付加物を形成し、それによって、DNAプロセッシングを妨害するそれらの能力に関連している。本開示の文脈では、PBDは、天然で生成され単離されたPBD、化学的に合成された天然に存在するPBD、および化学的に合成された天然に存在しないPBDを含む。PBDは、単量体、二量体およびハイブリッドのPBDも含む(精査のために、*Gerratana, Med Res Rev* 32(2):254-293, 2012を参照されたい)。

【0121】

組換え体：組換え核酸またはタンパク質は、天然に存在しない配列を有するか、または配列の2つの別の方法で分離されたセグメントの人工的組合せによって作製される配列を有するものである。この人工的組合せは、化学合成によって、または核酸の単離されたセグメントの人工的操作によって、例えば、遺伝子操作技法によって、達成されることが多い。

【0122】

試料(または生体試料)：対象から得られたゲノムDNA、RNA(mRNAを含む)、タンパク質、またはそれらの組合せを含有する生物学的検体。例としては、以下に限定されないが、末梢血、組織、細胞、尿、唾液、組織生検、微細針吸引液、外科的検体および剖検材料が挙げられる。一例では、試料は腫瘍生検を含む。

【0123】

配列同一性：アミノ酸配列または核酸配列間の類似性は、配列間の類似性に関して表現され、別途、配列同一性と称される。配列同一性は、同一性パーセンテージ(または類似性もしくは相同性)に関して測定されることが多く、パーセンテージが高いほど、2つの配列の類似性も高い。ポリペプチドまたは核酸分子のホモログまたはバリエーションは、標準的方法を使用してアライメントされた場合に、比較的高い度合いの配列同一性を有する。

【0124】

比較のための配列のアライメント方法は、当技術分野で周知である。様々なプログラムおよびアライメントアルゴリズムが以下に記載されている：*Smith and Waterman, Adv. Appl. Math.* 2:482, 1981; *Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol.* 48:443, 1970; *Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988; *Higgins and Sharp, Gene* 73:237, 1988; *Higgins and Sharp, CABI OS* 5:151, 1989; *Corpet et al., Nucleic Acid Research* 16:10881, 1988; および *Pearson and Lipman, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 85:2444, 1988。 *Altschul et al., Nature Genet.* 6:119, 1994は、配列アライメント方法および相同性の計算について詳細な考察を提示している。

【0125】

NCBI Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (*Altschul et al., J. Mol. Biol.* 215:403, 1990)は、配列解析プログラムblastp、blastn、blastx

、`tblastn`および`tblastx`と併せて使用するために、国立バイオテクノロジー情報センター（National Center for Biotechnology Information）（NCBI、Bethesda、MD）およびインターネットを含むいくつかの供給源から利用可能である。このプログラムを使用して配列同一性を決定する方法についての説明は、インターネットのNCBIウェブサイトを利用可能である。
【0126】

B7H3ポリペプチドを特異的に結合する抗体のホモログおよびバリエーションは、典型的には、デフォルトパラメーターに設定した`gapped blastp`であるNCBI `Blast 2.0`を使用して、抗体のアミノ酸配列との完全長アライメントに対して計数した少なくとも約75%、例えば、少なくとも約80%、90%、95%、96%、97%、98%または99%の配列同一性の占有によって特徴付けられる。約30個よりも多いアミノ酸のアミノ酸配列の比較では、デフォルトパラメーター（ギャップ存在コスト11、および1残基当りのギャップコスト1）に設定したデフォルトBLOSUM62マトリックスを使用して、`Blast 2`配列関数を用いる。短いペプチド（およそ30個よりも少ないアミノ酸）をアライメントする場合、アライメントは、`Blast 2`配列関数を使用し、デフォルトパラメーター（オープンギャップ9、エクステンションギャップ1ペナルティ）に設定したPAM30マトリックスを用いて実施されるべきである。参照配列に対してさらに高い類似性を有するタンパク質は、本方法で評価した場合に、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性などの同一性のパーセンテージの増加を示す。全配列より少ない配列を配列同一性について比較する場合、ホモログおよびバリエーションは、10～20個のアミノ酸のショートウィンドウに対して典型的には少なくとも80%の配列同一性を有し、それらの参照配列との類似性に依拠して少なくとも85%または少なくとも90%もしくは95%、の配列同一性を有し得る。このようなショートウィンドウに対する配列同一性を決定するための方法は、インターネットのNCBIウェブサイトを利用可能である。当業者は、これらの配列同一性の範囲がガイダンスのみのために提供されるものであり、提供された範囲外にある非常に重要なホモログを得ることができる可能性が十分にあることを理解するであろう。

【0127】

低分子：典型的には、約1000ダルトン未満、または一部の実施形態では、約500ダルトン未満の分子量を有する分子であって、ある程度測定可能に、標的分子の活性をモジュレートすることが可能な分子。

【0128】

対象：ヒトおよび非ヒト哺乳動物を含む、ヒト対象と獣医学対象の両方を含むカテゴリーの生きている多細胞脊椎動物。

【0129】

合成：実験室で人工的手段によって生成されること、例えば、合成核酸またはタンパク質（例えば、抗体）は、実験室で化学的に合成され得る。

【0130】

治療有効量：処置される対象において所望の効果を達成するのに十分な特定物質の量。例えば、これは、腫瘍の成長を阻害または抑制するのに必要な量であってもよい。一実施形態では、治療有効量は、腫瘍を排除する、腫瘍のサイズを低減する、または腫瘍の転移を防止、例えば、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくはさらには100%まで腫瘍サイズおよび／もしくは体積を低減する、ならびに／または、例えば、処置前のサイズ／体積／数と比較して、少なくとも10%、少なくとも20%、少なくとも50%、少なくとも75%、少なくとも80%、少なくとも90%、少なくとも95%、もしくはさらには100%まで転移の数および／もしくはサイズ／体積を低減するのに必要な量である。対象に投与される場合、所望の*in vitro*効果を達成することが示された標的組織濃度（例えば、腫瘍中の）を達成する投薬量が、一般に使用される。

【0131】

毒素：細胞に対して細胞傷害性である分子。毒素には、アブリン、リシン、Pseudomonas外毒素（PE）、ジフテリア毒素（DT）、ボツリヌス毒素、サボリン、レストリクトシンもしくはゲロニン、またはその改変毒素が含まれる。例えば、PEおよびDTは、典型的には肝毒性によって死をもたらす毒性の高い化合物である。しかし、PEおよびDTは、毒素の本来の標的構成成分（PEのドメインIaまたはDTのB鎖など）を除去し、それを抗体などの異なる標的化部分で置き換えることによって、免疫毒素として使用するための形態へと改変され得る。

【0132】

ベクター：宿主細胞中に導入され、それによって形質転換された宿主細胞を生成する核酸分子。ベクターは、複製起点などの、宿主細胞中での複製を可能にする核酸配列を含んでもよい。ベクターは、1つまたは複数の選択可能なマーカー遺伝子および当技術分野で公知の他の遺伝エレメントも含んでもよい。一部の実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターなどのウイルスベクターである。

III. B7H3に特異的な単ドメインモノクローナル抗体（「ナノボディ」）

【0133】

ナノボディは、ラクダ科V_HH、軟骨魚類V_{NAR}、およびヒトV_H単ドメイン抗体を含む。ウサギモノクローナル抗体は、マウスおよびヒトにおいて免疫原性の乏しいものを含む多様なエピトープを認識することができる。本開示は、組換えB7H3タンパク質を有するウサギの免疫およびファージディスプレイしたV_H単ドメインライブラリーの作成について記載する。3回のファージパニング後に、2つの結合剤（RFA1およびRFB1と称される）を選択した。いずれの結合剤もE. coliで十分に発現し、2mg/L（RFA1）と10mg/L（RFB1）の収量であった。ウサギナノボディは、B7H3陽性腫瘍細胞系（IMR32、MC38-B7H3+、A431、およびNBEB）に対する抗原依存性の結合を示したが、B7H3ノックアウト細胞系（IMR32-B7H3 KO、MC38-B7H3 KO）には示さなかった。本開示は、8つの異なるラクダV_HHライブラリーから単離された10個のB7H3特異的ラクダV_HHナノボディについても記載する。選択されたナノボディは、神経芽腫細胞、類表皮癌細胞および脾腫瘍細胞などのB7H3発現細胞を結合することが可能である。

【0134】

10個のラクダ単ドメイン抗体および2つのウサギ単ドメイン抗体のアミノ酸配列を以下に提供する。Kabatt、IMGTおよびParatomeの方法を使用して決定したCDR配列を、それぞれ、下線、太字およびイタリック体で示す。表は、Kabatt、IMGTまたはParatomeのいずれかを使用して決定した各抗体のCDR1、CDR2およびCDR3のアミノ酸位置を列挙する。当業者であれば、Chothia番号付けスキームなどの代替の番号付けスキームを使用して、CDR境界を容易に決定することができる。

【0135】

RWB12（配列番号1）

【化1】

QVQLVESGGGSGVQVGGSLRLSCAASGFTYNSYSVGWFRQAPGKEREGVAAINSGGSSTYYA
 ASVKGRFTISRDNKNTVYQLQMNSLKPEDTAMYYCAAARSPSPLTFQTRTLREDSYNYWG
 QGTQVTVSSS

【表 A - 1】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-66	97-118
IMGT	26-33	51-58	97-119
Paratome	27-35	47-62	98-118

【0136】

RWG8 (配列番号2)

10

【化2】

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMGWFRQAPGKGVEWVSTINSGGGSTYY
ADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQLNNLKTEDTAMYYCAKEOWRTGSRGQGQTQVTVSSS

【表 A - 2】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-66	97-105
IMGT	26-33	51-58	97-106
Paratome	27-35	47-61	97-106

20

【0137】

RWC4 (配列番号3)

【化3】

EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCVASEDSTSAMCMMGWFRQAPGKEREGVACINPTGEVTW
YGDSVKGRFTISRDTVKKIVYLQMNSLKPEDTAMYYCAARVTYGGDWSTDTDYEYWGQG
TQVTVSSS

30

【表 A - 3】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-66	97-114
IMGT	26-33	51-58	97-115
Paratome	26-35	50-61	98-114

【0138】

RWB2 (配列番号4)

40

【化4】

AVQLVDSGGGSVQAGGSLRLSCVVSGYAFSTYDMAWFRQAPGEKCEWVSTVTNNGRTFYA
DSVKGRFIISRDNAKNILYLQMNSLKPEDTAVYSCAAGVRWRCASGGNEGTQVTVSSS

50

【表 A - 4】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-110
IMGT	26-33	51-57	96-110
Paratome	27-35	47-60	96-109

【0139】

RWH 5 (配列番号 5)

10

【化 5】

AVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCKASGYCMGWFRQAPGKEREGVAALNTEGGVTTYADSV
KGRFSISRDNTNLYLQMNSLKPEDTAIYYCAADDRPTRCAVGSLYLPYTYRGQGTQVTVSS
 S

【表 A - 5】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	27-30	45-61	90-109
IMGT	26-28	46-53	90-110
Paratome	27-30	43-55	90-110

20

【0140】

RWD 5 (配列番号 6)

【化 6】

AVQLVESGGGLVQPGGSLSVSCAASGFTFSVYWFWYWVRQAPRQGLEWVSTIASNGSTYYSD
SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCVSDPDYYSDYEREYKFWAQGTQVTV
 SSS

30

【表 A - 6】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-111
IMGT	26-33	51-57	96-112
Paratome	27-35	47-60	96-111

40

【0141】

RWC 3 (配列番号 7)

【化 7】

QVQLVESGGGLVQPGGSLSVSCAASGFTFSVYWFWYWVRQAPRQGLEWVSTIASNGSTYYSD
SVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCVSDPDYYSDYERAYKFWAQGTQVTV
 SSS

50

【表 A - 7】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-111
IMGT	26-33	51-57	96-112
Paratome	27-35	47-60	96-111

【0142】

RWG 4 (配列番号 8)

10

【化 8】

QVQLVQSGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSVYWFYWVRQAPRQGLEWVSTIASNGSTYYSDSVKGRFTISRDNANKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCVDPDYYS DYERAYKFWAQGTQVT VSSS

【表 A - 8】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-111
IMGT	26-33	51-57	96-112
Paratome	27-35	47-60	96-111

20

【0143】

RWD 9 (配列番号 9)

【化 9】

EVQLVESGGGLVQPGGSLVSCAASGFTFSVYWFYWVRQAPRQGLEWVSTIASNGSTYYSDSVKGRFTISRDNANKNTVY LQMNSLKPEDTAVYYCVSDPDYYS DYERAYKFWAQGTQVT VSSS

30

【表 A - 9】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-111
IMGT	26-33	51-57	96-112
Paratome	27-35	47-60	96-111

40

【0144】

RWH 1 (配列番号 10)

【化 10】

AVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGMNLDNYVRGWLRQAPGSKCEFVSIIRRDGTTDYGDSVKGRFTISRDNANKNTVY LQMNSLKPDDTAVYYCAAIVVPRAAEYACDGLPYRGQGTQ VTVSSS

50

【表 A - 1 0】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	31-35	50-65	96-113
IMGT	26-33	51-57	96-114
Paratome	27-35	47-60	97-114

【0145】

R F A 1 (配列番号 1 1)

10

【化 1 1】

QSLEESGGGLVTPGGTLTLTCTVSGFSLSYGMSWVRQAPGKGLEWIGSMMANNGDPPYYAS
WAKGRFTISKSTTTVDLKITSPTTEDTATYFCVRAPWGSHSMWGPGLVTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSDPVLQTAGGGTNVEIK

【表 A - 1 1】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	30-34	50-64	93-105
IMGT	25-32	50-56	93-104
Paratome	26-34	46-59	93-105

20

【0146】

R F B 1 (配列番号 1 2)

【化 1 2】

QEQLKESGGRLVTPGTPLTLTCTVSGFSPNNYGVSWVRQPPGKGLEWIGMSSTAGATYYAN
WAKGRFTISKSTTTVDLEITSPTTEDTATYFCAKGTPSLSYGNIWGPGTLVTVSSGGGGSGG
GGSGGGGSAQGPTQTPGGGGSGTEVVVK

30

【表 A - 1 2】

	CDR1	CDR2	CDR3
Kabat	32-35	51-65	94-107
IMGT	26-33	51-57	94-107
Paratome	27-35	47-60	94-108

40

【0147】

細胞表面または可溶性 B 7 H 3 などの B 7 H 3 を結合する（例えば、特異的に結合する）モノクローナル抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態では、モノクローナル抗体は、V H 単ドメイン抗体などの単ドメイン抗体である。

【0148】

一部の実施形態では、単ドメインモノクローナル抗体は、I M G T、K a b a t、P a r a t o m e もしくは C h o t h i a、またはこれらの任意の組合せなどの任意の番号付けスキームによって決定した、抗体 R W B 1 2 (配列番号 1)、R W G 8 (配列番号 2)、R W C 4 (配列番号 3)、R W B 2 (配列番号 4)、R W H 5 (配列番号 5)、R W D 5 (配列番号 6)、R W C 3 (配列番号 7)、R W G 4 (配列番号 8)、R W D 9 (配

50

列番号 9)、RWH 1 (配列番号 10)、RFA 1 (配列番号 11) および RFB 1 (配列番号 12) のいずれか 1 つに由来する 1 つまたは複数の (3 つすべてなどの) CDR 配列などの配列番号 1 ~ 12 のいずれか 1 つ、として本明細書において示されるアミノ酸配列の少なくとも一部を含む。一部の例では、単一ドメイン抗体は、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 3、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 または配列番号 12 の CDR 1、CDR 2 および CDR 3 配列を含む。特定の例では、CDR 配列は、Kabat、IMGT もしくは Paratome 番号付けスキーム、または Kabat、IMGT および Paratome 番号付けスキームの組合せを使用して決定される。

【0149】

一部の実施形態では、抗体の CDR 1、CDR 2 および CDR 3 配列はそれぞれ、配列番号 1 の残基 31 ~ 35、50 ~ 66 および 97 ~ 118 ; 配列番号 1 の残基 26 ~ 33、51 ~ 58 および 97 ~ 119 ; または配列番号 1 の残基 27 ~ 35、47 ~ 62 および 98 ~ 118 を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 1 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 1 を含むかまたはそれからなる。

【0150】

一部の実施形態では、抗体の CDR 1、CDR 2 および CDR 3 配列はそれぞれ、配列番号 2 の残基 31 ~ 35、50 ~ 66 および 97 ~ 105 ; 配列番号 2 の残基 26 ~ 33、51 ~ 58 および 97 ~ 106 ; または配列番号 2 の残基 27 ~ 35、47 ~ 61 および 97 ~ 106 を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 2 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 2 を含むかまたはそれからなる。

【0151】

一部の実施形態では、抗体の CDR 1、CDR 2 および CDR 3 配列はそれぞれ、配列番号 3 の残基 31 ~ 35、50 ~ 66 および 97 ~ 114 ; 配列番号 3 の残基 26 ~ 33、51 ~ 58 および 97 ~ 115 ; または配列番号 3 の残基 26 ~ 35、50 ~ 61 および 98 ~ 114 を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 3 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 3 を含むかまたはそれからなる。

【0152】

一部の実施形態では、抗体の CDR 1、CDR 2 および CDR 3 配列はそれぞれ、配列番号 4 の残基 31 ~ 35、50 ~ 65 および 96 ~ 110 ; 配列番号 4 の残基 26 ~ 33、51 ~ 57 および 96 ~ 110 ; または配列番号 4 の残基 27 ~ 35、47 ~ 60 および 96 ~ 109 を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 4 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 4 を含むかまたはそれからなる。

【0153】

一部の実施形態では、抗体の CDR 1、CDR 2 および CDR 3 配列はそれぞれ、配列番号 5 の残基 27 ~ 30、45 ~ 61 および 90 ~ 109 ; 配列番号 5 の残基 26 ~ 28、46 ~ 53 および 90 ~ 110 ; または配列番号 5 の残基 27 ~ 30、43 ~ 55 および 90 ~ 110 を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 5 と少なくとも 80 %、少なくとも 85 %、少なくとも 90 %、少なくとも 95 %、少なくとも 96 %、少なくとも 97 %、少なくとも 98 % または少なくとも 99 % 同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号 5 を含むかまたはそれからなる。

【0154】

一部の実施形態では、抗体のCDR1、CDR2およびCD3配列はそれぞれ、配列番号6の残基31～35、50～65、および96～111；配列番号6の残基26～33、51～57および96～112；または配列番号6の残基27～35、47～60および96～111を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号6と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号6を含むかまたはそれからなる。

【0155】

一部の実施形態では、抗体のCDR1、CDR2およびCD3配列はそれぞれ、配列番号7の残基31～35、50～65、および96～111；配列番号7の残基26～33、51～57および96～112；または配列番号7の残基27～35、47～60および96～111を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号7と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号7を含むかまたはそれからなる。

10

【0156】

一部の実施形態では、抗体のCDR1、CDR2およびCD3配列はそれぞれ、配列番号8の残基31～35、50～65、および96～111；配列番号8の残基26～33、51～57および96～112；または配列番号8の残基27～35、47～60および96～111を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号8と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号8を含むかまたはそれからなる。

20

【0157】

一部の実施形態では、抗体のCDR1、CDR2およびCD3配列はそれぞれ、配列番号9の残基31～35、50～65、および96～111；配列番号9の残基26～33、51～57および96～112；または配列番号9の残基27～35、47～60および96～111を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号9と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号9を含むかまたはそれからなる。

30

【0158】

一部の実施形態では、抗体のCDR1、CDR2およびCD3配列はそれぞれ、配列番号10の残基31～35、50～65、および96～113；配列番号10の残基26～33、51～57および96～114；または配列番号10の残基27～35、47～60および97～114を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号10と少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号10を含むかまたはそれからなる。

【0159】

一部の実施形態では、抗体のCDR1、CDR2およびCD3配列はそれぞれ、配列番号11の残基30～34、50～64および93～105；配列番号11の残基25～32、50～56および93～104；または配列番号11の残基26～34、46～59および93～105を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号11と、または配列番号11の残基1～113と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号11を含むかまたはそれからなる。他の具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号11の残基1～113を含むかまたはそれからなる。

40

【0160】

50

一部の実施形態では、抗体のCDR1、CDR2およびCD3配列はそれぞれ、配列番号12の残基32～35、51～65および94～107；配列番号12の残基26～33、51～57および94～107；または配列番号12の残基27～35、47～60および94～108を含む。一部の例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号12と、または配列番号12の残基1～116と、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%または少なくとも99%同一である。具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号12を含むかまたはそれからなる。他の具体的な例では、抗体のアミノ酸配列は、配列番号12の残基1～116を含むかまたはそれからなる。

【0161】

一部の実施形態では、抗体は、ヒト化抗体またはキメラ抗体である。

【0162】

本明細書に開示される単ドメインモノクローナル抗体を含むキメラ抗原受容体（CAR）も本明細書において提供される。一部の実施形態では、CARは、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達部分、シグナル伝達ドメイン、またはこれらの任意の組合せをさらに含む。具体的な非限定的な例では、ヒンジ領域はCD8αヒンジ領域を含み、膜貫通ドメインはCD8α膜貫通ドメインを含み、共刺激シグナル伝達部分は4-1BBシグナル伝達部分を含み、および／またはシグナル伝達ドメインはCD3ζシグナル伝達ドメインを含む。

【0163】

ユニバーサルCAR系でのそれらの使用が可能になるように改変されたB7H3特異的抗体も本明細書において提供される。一部の実施形態では、B7H3特異的抗体は、特異的結合対の1つの構成成分に融合される。一部の例では、抗体は、ロイシンジッパーまたはビオチンに融合される。

【0164】

B7H3特異的CARを発現する細胞がさらに提供される。一部の例では、細胞は、Tリンパ球、例えばCTL、またはナチュラルキラー細胞である。CARおよびCAR発現細胞は、項目IVにおいてさらに記載される。

【0165】

本明細書に開示される単ドメイン抗体およびエフェクター分子を含むイムノコンジュゲートも本明細書において提供される。一部の実施形態では、エフェクター分子は、以下に限定されないが、Pseudomonas外毒素またはそのバリエーション、例えばPE38などの毒素である。他の実施形態では、エフェクター分子は、検出可能な標識、例えば以下に限定されないが、フルオロフォア、酵素または放射性同位体である。他の実施形態では、エフェクター分子は、光子吸収体、例えばIR700である。光子吸収体を含むイムノコンジュゲートは、光免疫療法のために使用され得る。イムノコンジュゲートは、項目Vにおいてさらに記載される。

【0166】

本明細書に開示される単ドメイン抗体にコンジュゲートした薬物を含む抗体-薬物コンジュゲート（ADC）が本明細書においてさらに提供される。一部の実施形態では、薬物は、低分子、例えば微小管阻害剤、抗有糸分裂剤および／または細胞傷害剤である。ADCは、項目VIにおいてさらに記載される。

【0167】

本明細書に開示される単ドメイン抗体および少なくとも1つの追加のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む多特異性抗体も本明細書において提供される。一部の実施形態では、多特異性抗体は二特異性抗体である。他の実施形態では、多特異性抗体は三特異性抗体である。一部の実施形態では、少なくとも1つの追加のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、T細胞受容体またはナチュラルキラー（NK）細胞活性化受容体の構成成分を特異的に結合する。多特異性抗体は、項目VIIにおいてさらに記載される。

10

20

30

40

50

【0168】

本明細書に開示される単ドメイン抗体にコンジュゲートしたナノ粒子を含む抗体-ナノ粒子コンジュゲートが本明細書においてさらに提供される。一部の実施形態では、ナノ粒子は、ポリマーナノ粒子、ナノスフェア、ナノカプセル、リボソーム、デンドリマー、ポリマーミセル、またはニオソームを含む。一部の実施形態では、ナノ粒子は細胞傷害剤を含む。抗体-ナノ粒子コンジュゲートは、項目VII Iにおいてさらに記載される。

【0169】

本明細書に開示される単ドメイン抗体および異種タンパク質またはペプチドを含む融合タンパク質も本明細書において提供される。一部の実施形態では、異種タンパク質は、Fcタンパク質またはロイシンジッパーである。

【0170】

本明細書に開示される抗体、CAR、イムノコンジュゲート、多特異性抗体または融合タンパク質をコードする核酸分子が本明細書においてさらに提供される。一部の実施形態では、核酸分子は、プロモーターに作動可能に連結されている。開示される核酸分子を含むベクターも提供される。本明細書に開示される核酸分子または(are)ベクターを含む単離された細胞がさらに提供される。

【0171】

CARおよび切断型ヒトEGFR(huEGFRt)を発現する核酸構築物も本明細書において提供される。一部の実施形態では、核酸は、5'から3'の方向に：第1の顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子受容体シグナル配列(GMCSFRss)をコードする核酸；本明細書に開示されるB7H3特異的単ドメインモノクローナル抗体をコードする核酸；細胞外ヒンジ領域をコードする核酸；膜貫通ドメインをコードする核酸；細胞内共刺激ドメインをコードする核酸；細胞内シグナル伝達ドメインをコードする核酸；自己切断2Aペプチドをコードする核酸；第2のGMCSFRssをコードする核酸；および切断型ヒト表皮成長因子受容体(huEGFRt)をコードする核酸を含む。一部の例では、核酸は、第1のGMCSFRssをコードする核酸の5'にヒト伸長因子1α(EF1α)プロモーター配列をさらに含む。一部の例では、ヒンジ領域は、CD8αヒンジ領域を含む。一部の例では、膜貫通ドメインは、CD8α膜貫通ドメインを含む。一部の例では、共刺激シグナル伝達部分は、4-1BBシグナル伝達部分を含む。一部の例では、シグナル伝達ドメインは、CD3ζシグナル伝達ドメインを含む。一部の例では、B7H3特異的抗体のアミノ酸配列は、配列番号1~12のいずれか1つを含む。核酸構築物を含むベクターも提供される。一部の実施形態では、ベクターはレンチウイルスベクターである。

【0172】

本明細書に開示されるB7H3特異的CARおよびhuEGFRtを共発現する単離された細胞がさらに提供される。一部の例では、細胞は、CTLまたはNK細胞である。

【0173】

薬学的に許容される担体、および本明細書に開示される単ドメインモノクローナル抗体、CAR、単離された細胞(CARを発現する細胞、例えばCAR-T細胞またはCAR-NK細胞など)、イムノコンジュゲート、ADC、多特異性抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、または融合タンパク質を含む組成物が、本開示によってさらに提供される。組成物およびそれらの使用は、項目IXにおいてさらに記載される。

IV. キメラ抗原受容体(CAR)

【0174】

開示されるナノボディは、CARを発現するように操作されたCAR(キメラT細胞受容体、人工T細胞受容体またはキメラ免疫受容体としても公知)および/または細胞傷害性Tリンパ球(CTL)もしくはナチュラルキラー(NK)細胞を生成するためにも使用され得る。一般に、CARは、結合部分、細胞外ヒンジおよびスペーサーエレメント、膜貫通領域およびシグナル伝達機能を果たすエンドドメインを含む(Cartellier et al., J Biomed Biotechnol 2010:956304,

10

20

30

40

50

2010; Dai et al., J Natl Cancer Inst 108 (7): djv439, 2016)。多くの事例では、結合部分は、scFvなどのモノクローナル抗体、または単ドメイン抗体の抗原結合断片である。スペーサー／ヒンジ領域は、典型的には、IgG1、IgG4、IgDおよびCD8ドメインなどのIgGサブクラス由来の配列を含む。膜貫通ドメインは、種々の異なるT細胞タンパク質、例えば、CD3ζ、CD4、CD8またはCD28に由来し得る。いくつかの異なるエンドドメインは、CARを生成するために使用されている。例えば、エンドドメインは、CD3ζまたはFcεRIγなどのITAMを有するシグナル伝達鎖からなってもよい。一部の事例では、エンドドメインは、少なくとも1つの追加の共刺激ドメインの細胞内部分、例えば、CD28、4-1BB (CD137、TNFRSF9)、OX-40 (CD134)、ICOS、CD27および／またはDAP10をさらに含む。

10

【0175】

CARを発現するCTL、NK細胞（または他の免疫細胞）を使用して、B7H3陽性腫瘍細胞などの特定の細胞型を標的とすることができる。よって、本明細書に開示されるナノボディを使用して、B7H3特異的モノクローナル抗体を含有するCARを発現するCTLまたはNK細胞を操作し、それによって、操作されたCTLまたはNK細胞はB7H3を発現する腫瘍細胞を標的とすることができる。操作されたT細胞は、いくつかの種類のがんに対する養子療法のために以前から使用されている（例えば、Park et al., Mol Ther 15 (4): 825-833, 2007を参照されたい）。CARを発現するT細胞の使用は、CARを発現するCTLがHLAに限定されないため、標準的なCTLベースの免疫療法よりも一般的であり、したがって、標的抗原を発現する腫瘍を有する任意の患者に対して使用することができる。

20

【0176】

多特異性（二特異性など）またはバイシストロニックCARもまた、本開示によって企図される。一部の実施形態では、多特異性または二特異性のCARは、B7H3に対して特異的なナノボディ（RWB12、RWG8、RWC4、RWB2、RWH5、RWD5、RWC3、RWG4、RWD9、RWH1、RFA1、およびRFB1のうちのいずれか1つなど）および異なる抗原、例えばT細胞抗原に対して特異的なモノクローナル抗体を含む。同様に、バイシストロニックCARは、1つのCAR分子が、B7H3標的化CARであり、第2のCARが第2の抗原を標的とする、同じ構築物から発現される2つのCAR分子を含む。例えば、Qin et al., Blood 130: 810, 2017; およびWO/2018/213337を参照されたい。

30

【0177】

したがって、本明細書に開示されるナノボディのいずれか1つなどの、B7H3に特異的な抗体を含むCARが本明細書において提供される。CAR（二特異性およびバイシストロニックCARを含む）をコードする単離された核酸分子およびベクター、ならびにCAR、二特異性CARまたはバイシストロニックCARを発現するCTLまたはNK細胞などの宿主細胞も提供される。B7H3特異的モノクローナル抗体から構成されるCARを発現するCTLまたはNK細胞は、B7H3を発現するがんの処置のために使用することができる。本明細書における一部の実施形態では、CARは二特異性CARである。本明細書における他の実施形態では、CARはバイシストロニックCARである。

40

【0178】

一部の実施形態では、CARは、例えば、抗原結合ドメインに対してN末端にシグナルペプチド配列を含む。シグナルペプチド配列は、顆粒球-マクロファージコロニー刺激因子受容体（GMCSFR）、免疫グロブリン軽鎖カップ、またはIL-2由来のシグナル配列などの任意の好適なシグナルペプチド配列であってもよい。シグナルペプチド配列は、細胞表面のCARの発現を容易にすることができるが、発現されたCARにおけるシグナルペプチド配列の存在は、CARが機能するために必ずしも必要ではない。細胞表面でのCARの発現の際に、シグナルペプチド配列は、CARから切断されて取り除かれてもよい。したがって、一部の実施形態では、CARはシグナルペプチド配列を欠いている。

50

【0179】

一部の実施形態では、本明細書に開示されるCARは、ヒトEGFRの切断型バージョン(huEGFRt)も発現する構築物から(例えば、レンチウイルスベクターから)発現される。CARおよびhuEGFRtは、自己切断ペプチド配列(T2Aなど)によって分離され、その結果、形質導入された細胞における発現の際に、CARはhuEGFRtから切断される。

【0180】

本明細書に開示される一部の実施形態では、CAR構築物は、N末端からC末端の方向に、以下のアミノ酸配列をコードする。

【化13】

GMCSFRss: MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (配列番号: 27)

NdeI: HM

抗原結合: B7H3特異的抗体(本明細書に開示されるナノボディなど)

SpeI: TS

CD8αヒンジ: TTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD

(配列番号: 28)

CD8α TM: IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT (配列番号: 29)

4-1BB: KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL (配列番号: 30)

CD3ζ:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLY
NELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

(配列番号: 31)

T2A: EGRGSLLTCGDVEENPGP (配列番号: 32)

GMCSFRss: MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP (配列番号: 27)

huEGFRt:

RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRGDSFTHTPPLDPQELDILKT
VKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGRTKQHGGQFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGD
VIISGNKNLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPR
DCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPREFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQC
AHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGCTGPGLEGCPNG
PKIPSIATGMVGALLLLLVVALGIGLFM (配列番号: 33)

【0181】

ヒト表皮成長因子受容体は、4つの細胞外ドメイン、1つの膜貫通ドメインおよび3つの細胞内ドメインから構成される。EGFRドメインは、以下のN末端からC末端の順に見出される: ドメインIードメインIIードメインIIIードメインIVー膜貫通(TM)ドメインー膜近傍ドメインーチロシンキナーゼドメインーC末端テール。ドメインIおよびドメインIIIは、リガンド結合に関与するロイシンリッチドメインである。ドメインIIおよびドメインIVは、システインリッチドメインであり、EGFRリガンドと接触しない。ドメインIIは、他のEGFRファミリーのメンバーに由来する類似ドメインとのホモまたはヘテロ二量体の形成を媒介し、ドメインIVは、ドメインIIとのジスルフィド結合を形成し得る。EGFR TMドメインは、細胞膜を1回通過し通る単一のパスを作製し、タンパク質二量体化の役割を果たし得る。細胞内ドメインは、膜近傍ドメイ

10

20

30

40

50

ン、チロシンキナーゼドメインおよびC末端テールを含み、これらは、EGFRシグナル形質導入を媒介する(Wee and Wang, *Cancers* 9(52), doi:10.3390/cancers9050052; Ferguson, *Annu Rev Biophys* 37:353-373, 2008; Wang et al., *Blood* 118(5):1255-1263, 2011)。

【0182】

本明細書において「huEGFRt」と称される、ヒトEGFRの切断型バージョンは、ドメインIII、ドメインIVおよびTMドメインのみを含む。よって、huEGFRtは、ドメインI、ドメインII、および3つすべての細胞内ドメインを欠いている。huEGFRtは、EGFを結合することができず、シグナル伝達活性を欠いている。しかし、この分子は、FDAに認可されたセツキシマブなどの特定のEGFR特異的モノクローナル抗体を結合する能力を保持する(参照により本明細書に組み込まれる、PCT公開第WO2011/056894号)。

【0183】

本明細書に開示されるhuEGFRtと腫瘍抗原特異的CARの両方をコードする構築物(レンチウイルスベクターなど)でのT細胞(またはNK細胞)の形質導入により、標識されたEGFRモノクローナル抗体であるセツキシマブ(ERBITUX(商標))を使用する形質導入されたT細胞の選択が可能になる。例えば、セツキシマブをビオチンで標識することができ、形質導入されたT細胞は、市販されている(例えば、Miltenyi Biotecから)抗ビオチン磁気ビーズを使用して選択することができる。huEGFRtの共発現によっても養子移入されたCARを発現するT細胞(またはNK細胞)のin vivoでの追跡が可能になる。さらに、セツキシマブのhuEGFRtを発現するT細胞への結合によって、ADCCエフェクター細胞の細胞傷害性が誘導され、それによって、治療の終了時などに、形質導入されたT細胞をin vivoで排除するメカニズムが提供される(Wang et al., *Blood* 118(5):1255-1263, 2011)。

【0184】

ユニバーサルCAR系でそれらの使用が可能になるように改変されたB7H3特異的モノクローナル抗体(本明細書に開示されるナノボディなど)も本明細書において提供される。ユニバーサルCAR系は、CARの柔軟性を増大させ、さらなる抗原へとそれらの使用を拡大するために開発されている。現在、CAR T細胞療法を受ける各患者のために、自己T細胞を培養、拡大、および改変して、抗原特異的CARを発現させなければならない。このプロセスは、長時間にわたり、かつ費用がかかり、その使用が限定される。ユニバーサルCARは、CARのシグナル伝達構成成分が分子の抗原結合部分から分割される系に基づくが、「ロッカーキー」系を使用して一体となる。例えば、ビオチン結合免疫受容体(BBIR)CARは、アビジンを含む細胞外ドメインに融合した細胞内T細胞シグナル伝達ドメインから構成される。次いで、ビオチン化抗原特異的(B7H3特異的など)モノクローナル抗体は、BBIRを結合して、T細胞を腫瘍抗原発現細胞へと向かわせることができる。別の例は、分割、ユニバーサルかつプログラム可能な(split, universal and programmable)(SUPRA)CAR系である。SUPRA系では、CARは、同族のロイシンジッパーに融合した抗原特異的モノクローナル抗体と対合する、細胞外ロイシンジッパーに融合した細胞内シグナル伝達ドメインを含む。ユニバーサルCAR系の精査のために、例えば、Zhao et al., *J Hematol Oncol* 11(1):132, 2018; およびCho et al., *Cell* 173:1426-1438, 2018を参照されたい。本明細書における一部の実施形態では、B7H3特異的モノクローナル抗体は、特異的結合対の1つの構成成分に融合される。一部の例では、モノクローナル抗体は、ロイシンジッパーまたはビオチンに融合される。

【0185】

別の種類のユニバーサルCARは、ソルターゼ酵素を使用して生成することができる。

ソルターゼは、カルボキシル末端選別シグナルを認識および切断することによって、表面タンパク質を改変する原核生物の酵素である。ソルターゼは、ソルターゼ認識モチーフとソルターゼアクセプターモチーフの間のペプチド転移を触媒する。よって、抗原特異的 C A R は、ソルターゼ認識モチーフに融合した抗原特異的抗体を細胞内シグナル伝達ドメイン、膜貫通領域およびソルターゼアクセプターモチーフを含む細胞外部分を含む C A R 分子の一部と接触させることによって生成することができる。ソルターゼ酵素の存在下で、2つの構成成分は共有結合によって付着して、完全な抗原特異的 C A R を形成する。したがって、本明細書における一部の実施形態では、B 7 H 3 特異的モノクローナル抗体は、ソルターゼ認識モチーフを含むように改変される（例えば、P C T 公開第 W O 2 0 1 6 / 0 1 4 5 5 3 号を参照されたい）。

10

V. イムノコンジュゲート

【0186】

開示される単一ドメインモノクローナル抗体は、治療剤またはエフェクター分子にコンジュゲートされ得る。イムノコンジュゲートは、以下に限定されないが、治療剤の抗体への共有結合による連結が存在する分子を含む。治療剤は、特定の標的分子または標的分子を有する細胞を対象とする特定の生物活性を有する薬剤である。当業者であれば、治療剤が、ビンブラスチン、ダウノマイシンなどの様々な薬物、天然または改変された P s e u d o m o n a s 外毒素またはジフテリア毒素などの細胞毒素、薬理組成物を含有する封入剤（リポソームなど）、¹²⁵I、³²P、¹⁴C、³H および ³⁵S などの放射性剤、I R 7 0 0 などの光子吸収体、ならびに他の標識、標的部分およびリガンドを含んでもよいことを認識するであろう。

20

【0187】

特定の治療剤の選択は、特定の標的分子または細胞、および所望の生物学的効果に依存する。よって、例えば、治療剤は、特定の標的細胞（腫瘍細胞など）の死をもたらすために使用される細胞毒素であってもよい。逆に、致命的な生物学的応答をもたらさないことが望まれる場合には、治療剤は、致死性のない薬理作用のある物質または致死性のない薬理作用のある物質を含有するリポソームにコンジュゲートされてもよい。

【0188】

本明細書に記載の治療剤および抗体によって、当業者は、配列が異なるが、同じエフェクター部分または抗体配列をコードする核酸などの機能的に均等な核酸を含有する種々のクローンを容易に構築することができる。よって、本開示は、抗体ならびにそのコンジュゲートおよび融合タンパク質をコードする核酸を提供する。

30

【0189】

エフェクター分子は、当業者に公知の任意の数の手段を使用して目的の抗体に連結され得る。共有結合および非共有結合による付着手段の両方が使用されてもよい。エフェクター分子を抗体に結合させるための手順は、エフェクターの化学構造によって様々である。ポリペプチドは、典型的には；カルボン酸（C O O H）、遊離アミン（- N H ₂）またはスルフヒドリル（- S H）基などの種々の官能基を含有し、これらは、抗体における好適な官能基との反応に利用可能であり、エフェクター分子の結合をもたらす。あるいは、抗体は、さらなる反応性官能基に曝露または結合させるために誘導体化される。誘導体化は、いくつかの公知のリンカー分子のいずれかの結合に関与し得る。リンカーは、抗体をエフェクター分子に結合させるために使用される任意の分子であり得る。リンカーは、抗体とエフェクター分子の両方に対する共有結合を形成することが可能である。好適なリンカーは、当業者に周知であり、以下に限定されないが、直鎖または分岐鎖炭素リンカー、複素環式炭素リンカー、またはペプチドリリンカーを含む。抗体およびエフェクター分子がポリペプチドである場合、リンカーを、その側鎖基によって構成アミノ酸に（例えば、ジスルフィド連結によってシステインに）、または末端アミノ酸のアルファ炭素アミノ基およびカルボキシル基に結合させてもよい。

40

【0190】

一部の状況では、イムノコンジュゲートがその標的部位に到達した際に、エフェクター

50

分子を抗体から遊離させるのが望ましい。したがって、これらの状況において、イムノコンジュゲートは、標的部位の近傍で切断可能である連結を含む。エフェクター分子を抗体から放出させるためのリンカーの切断は、イムノコンジュゲートが、標的細胞内または標的部位の近傍のいずれかで供される酵素活性または条件によって促されてもよい。

【0191】

種々の放射線診断化合物、放射線治療化合物、標識（酵素または蛍光分子など）、薬物、毒素、および他の剤を抗体に結合させるために報告されてきた多数の方法を考慮して、当業者は、抗体または他のポリペプチドに所与の剤を結合させるための好適な方法を決定することができる。

【0192】

本明細書に開示される抗体は、誘導体化されるか、または他の分子（別のペプチドまたはタンパク質など）に連結されてもよい。一般に、抗体またはその部分は、標的抗原への結合が、誘導体化または標識することによって有害な影響を受けないように誘導体化される。例えば、抗体は、1つまたは他の分子の実体、例えば、別の抗体（例えば、二特異性抗体またはダイアボディ）、検出剤、光子吸収体、医薬剤、および／または抗体もしくは抗体部分の別の分子（例えば、ストレプトアビジンコア領域またはポリヒスチジンタグ）との会合を媒介し得るタンパク質もしくはペプチドに機能的に連結され得る（化学的カップリング、遺伝子融合、非共有結合による会合またはそれ以外の方法によって）。

【0193】

誘導体化された抗体の1つの種類は、2つまたはそれより多い抗体（例えば、二特異性抗体を作出するために、同一の種類または異なる種類の）を架橋させることによって産生される。好適な架橋剤としては、適切なスペーサー（*m*-マレイミドベンゾイル-*N*-ヒドロキシスクシンイミドエステルなど）によって分離された2つの異なる反応基を有するヘテロ二官能、またはホモ二官能（スベリン酸ジスクシンイミジルなど）であるものが挙げられる。このようなリンカーは市販されている。

【0194】

抗体は、検出可能なマーカー、例えば、ELISA、分光光度法、フローサイトメトリー、顕微鏡法または診断イメージング技法（コンピューター断層撮影（CT）、コンピューターx線体軸断層撮影（CAT）法、磁気共鳴画像法（MRI）、核磁気共鳴画像法（NMRI）、磁気共鳴断層撮影（MTR）、超音波、光ファイバー検査、および腹腔鏡検査など）による検出が可能な検出可能なマーカーとコンジュゲートされ得る。検出可能なマーカーの具体的な、非限定的な例には、フルオロフォア、化学発光剤、酵素結合、放射性同位体および重金属または化合物（例えば、MRIによる検出のための超常磁性酸化鉄ナノ結晶）が含まれる。例えば、有用な検出可能なマーカーには、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、5-ジメチルアミン-1-ナフタレンスルホンクロリド、フィコエリトリン、ランタニド蛍光体などを含む蛍光化合物が含まれる。ルシフェラーゼ、緑色蛍光タンパク質（GFP）および黄色蛍光タンパク質（YFP）などの生物発光マーカーも使用される。抗体または抗原結合断片は、検出に有用である酵素、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アルカリホスファターゼ、グルコースオキシダーゼなどともコンジュゲートされ得る。抗体または抗原結合断片が検出可能な酵素とコンジュゲートされる場合、これは、識別することができる反応生成物を生成するために酵素が使用するさらなる試薬を追加することによって検出することができる。例えば、作用物質である西洋ワサビペルオキシダーゼが存在する場合、過酸化水素およびジアミノベンジジンの添加によって、視覚的に検出可能である着色した反応生成物がもたらされる。抗体または抗原結合断片はビオチンともコンジュゲートされ、アビジンまたはストレプトアビジン結合の間接的測定によって検出することができる。アビジン自体が酵素または蛍光標識とコンジュゲートされ得ることが留意されるべきである。

【0195】

抗体は、ガドリニウムなどの磁性剤で標識されてもよい。抗体はまた、ランタニド（ユ

10

20

30

40

50

ーロピウムおよびジスプロシウム)、およびマンガンで標識されてもよい。超常磁性酸化鉄などの常磁性粒子も標識として使用される。抗体はまた、二次リポーター(例えば、ロイシンジッパー対配列、二次抗体の結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグ)によって認識される所定のポリペプチドエピトープで標識されてもよい。一部の実施形態では、標識は、潜在的な立体障害を低減するために様々な長さのスペーサーアームによって結合される。

【0196】

抗体はまた、放射標識されたアミノ酸で標識されてもよい。放射標識は、診断目的と治療目的の両方で使用され得る。例えば、放射標識を使用して、x線、発光スペクトル、または他の診断技法によって標的抗原の発現を検出することができる。ポリペプチドに対する標識の例としては、以下に限定されないが、以下の放射性同位体または放射性ヌクレオチド： ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I が挙げられる。

【0197】

本明細書に開示される抗体はまた、光子吸収体にコンジュゲートされ得る。一部の実施形態では、光子吸収体は、フタロシアニン色素、例えば、以下に限定されないが、IRDye(登録商標)700DX(「IR700」としても公知)である。抗体-光子吸収体コンジュゲートは、光免疫療法に使用することができる。

【0198】

抗体はまた、ポリエチレングリコール(PEG)、メチルもしくはエチル基、または炭水化物基などの化学基で誘導体化され得る。これらの基は、血清半減期を増加させる、または組織への結合を増加させるなど、抗体の生物学的特徴を改善するのに有用であり得る。

【0199】

毒素を本明細書に記載のモノクローナル抗体と共に用いて、免疫毒素を生成することができる。例示的な毒素としては、リシン、アブリン、ジフテリア毒素およびそれらのサブユニット、ならびにボツリヌス毒素AからFが挙げられる。これらの毒素は、商業的供給源(例えば、Sigma Chemical Company、St. Louis、MO)から容易に入手可能である。企図された毒素は、本明細書に記載の毒素のバリエーションも含む(例えば、米国特許第5,079,163号および同第4,689,401号を参照されたい、参照されたい)。一実施形態では、毒素はPseudomonas外毒素(PE)である(米国特許第5,602,095号)。本明細書で使用される場合、「Pseudomonas外毒素」は、完全長の天然の(天然に存在する)PEまたは改変されたPEを指す。このような改変には、以下に限定されないが、ドメインIaの排除、ドメインIb、IIおよびIIIにおける種々のアミノ酸欠失、単一アミノ酸置換ならびにカルボキシル末端における1つまたは複数の配列の付加が含まれ得る(例えば、Siegal et al., J. Biol. Chem. 264:14256-14261, 1989を参照されたい)。

【0200】

本明細書に記載のモノクローナル抗体と共に用いられるPEには、天然の配列、天然の配列の細胞傷害性断片、ならびに天然のPEの保存的に改変されたバリエーションおよびその細胞傷害性断片が含まれ得る。PEの細胞傷害性断片には、次のタンパク質分解または標的細胞における他のプロセッシングにより、またはそれによらないで、細胞傷害性であるものが含まれる。PEの細胞傷害性断片は、PE40、PE38、およびPE35を含む。PEおよびそのバリエーションについてのさらなる説明については、例えば、米国特許第4,892,827号;同第5,512,658号;同第5,602,095号;同第5,608,039号;同第5,821,238号;および同第5,854,044号;米国特許出願公開第2015/0099707号;PCT公開第WO99/51643号および同第WO2014/052064号;Pai et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:3358-3362, 1991;Kondo et al., J. Biol. Chem. 263:9470-9475, 1988;P

astan et al., Biochim. Biophys. Acta 1333: C1-C6, 1997を参照されたい。

【0201】

プロテアーゼ耐性PEバリエントならびに以下に限定されないが、PE-LR、PE-6X、PE-8X、PE-LR/6XおよびPE-LR/8Xなどの免疫原性が低減したPEバリエントも本明細書において企図される（例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Weldon et al., Blood 113(16):3792-3800, 2009; Onda et al., Proc Natl Acad Sci USA 105(32):11311-11316, 2008; ならびにPCT公開第WO2007/016150号、同第WO2009/032954号および同第WO2011/032022号を参照されたい）。

10

【0202】

一部の例では、PEは、PE-LRなどのリソソーム分解に対して耐性であるバリエントである（Weldon et al., Blood 113(16):3792-3800, 2009; PCT公開第WO2009/032954号）。他の例では、PEは、PE-LR/6Xと名付けられたバリエントである（PCT公開第WO2011/032022号）。他の例では、PEバリエントは、免疫原性が低減したPEである。さらに他の例では、PEは、PE-LR/8Mと名付けられたバリエントである（PCT公開第WO2011/032022号）。

【0203】

20

PEの改変は、PEの細胞傷害性断片（例えば、PE38、PE-LRおよびPE-LR/8M）を含む、任意の以前に記載したバリエントにおいて生じ得る。改変されたPEは、例えばPEの1つもしくは複数のT細胞エピトープおよび/もしくはB細胞エピトープ内の1つもしくは複数のアミノ酸残基に対する任意の置換（複数可）、または1つもしくは複数のT細胞および/もしくはB細胞エピトープの欠失を含んでもよい（例えば、米国特許出願公開第2015/0099707号を参照されたい）。

【0204】

PEの企図された形態は、PEの脱免疫形態、例えば、ドメインIIが欠失したバージョン（例えば、PE24）も含む。PEの脱免疫形態は、例えば、PCT公開第WO2005/052006号、同第WO2007/016150号、同第WO2007/014743号、同第WO2007/031741号、同第WO2009/32954号、同第WO2011/32022号、同第WO2012/154530号、および同第WO2012/170617号に記載される。

30

【0205】

本明細書に記載の抗体を使用して、任意の数の様々な診断用または治療用化合物を、表面にB7H3を発現する細胞に対して標的とすることもできる。よって、本開示の抗体は、細胞表面にB7H3を発現する細胞に直接的に送達される薬物に、直接的にまたはリンカーを介して、結合され得る。これは、治療、診断または調査目的でなされ得る。治療剤は、核酸、タンパク質、ペプチド、アミノ酸もしくは誘導体、糖タンパク質、放射性同位体、光子吸収体、脂質、炭水化物、または組換えウイルスなどの化合物を含む。核酸治療薬および診断部分は、アンチセンス核酸、一重鎖または二重鎖DNAと共有結合により架橋するための誘導体化オリゴヌクレオチド、および三重鎖形成オリゴヌクレオチドを含む。

40

【0206】

あるいは、抗体に連結した分子は、好ましくは循環系への直接的曝露から遮蔽される薬物、核酸（例えば、アンチセンス核酸）、または別の治療成分などの治療用組成物を含有するナノ粒子、リポソームまたはミセルなどの封入系であってもよい。抗体に結合したりリポソームを調製する手段は当業者に周知である（例えば、米国特許第4,957,735号; Connor et al., Pharm. Ther. 28:341-365, 1985を参照されたい）。

【0207】

50

本明細書に記載の抗体は、検出可能な標識に共有結合により連結されても、非共有結合により連結されてもよい。このような使用に好適な検出可能な標識は、分光法、光化学、生化学、免疫化学、電気、光学または化学による手段によって検出可能な任意の組成物を含む。有用な標識としては、磁気ビーズ、蛍光色素（例えば、イソチオシアン酸フルオレセイン、テキサスレッド、ローダミン、緑色蛍光タンパク質など）、放射標識（例えば、 ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^{32}P ）、酵素（西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼおよびELISAにおいて一般的に使用されるその他のものなど）、およびコロイド金もしくは着色ガラスなどの比色標識またはプラスチック（ポリスチレン、ポリプロピレン、ラテックスなど）ビーズが挙げられる。

【0208】

このような標識を検出する手段は、当業者に周知である。よって、例えば、放射標識は、写真フィルムまたはシンチレーションカウンターを使用して検出されてもよく、蛍光マーカーは、照射された照明を検出するために光検出器を使用して検出されてもよい。酵素標識は、典型的には、酵素に基質を提供し、基質上で酵素の作用によって生成した反応生成物を検出することによって検出され、比色標識は、着色した標識を単に可視化することによって検出される。

VI. 抗体-薬物コンジュゲート (ADC)

【0209】

ADCは、腫瘍抗原特異的抗体（単ドメイン抗体または免疫グロブリンの抗原結合断片など）および薬物、典型的には微小管阻害剤または架橋剤などの細胞傷害剤から構成される化合物である。ADCは、がん細胞を特異的に標的とすることが可能であるため、薬物は、標準的化学療法に使用される薬剤よりもはるかに強力であり得る。現在、ADCと共に使用される最も一般的な細胞傷害性薬物は、従来の化学療法剤よりも100~1000倍強力であるIC₅₀を有する。一般的な細胞傷害性薬物には、微小管阻害剤、例えば、メイタンシノイドおよびオーリスタチン（オーリスタチンEおよびオーリスタチンFなど）が含まれる。ADCと共に使用するための他の細胞毒素には、DNAの副溝に共有結合により結合して、鎖間架橋を形成するピロロベンゾジアゼピン (PBD) が含まれる。多くの事例では、ADCは、抗体の薬物に対する1:2~1:4の比を構成する (Bander, Clinical Advances in Hematology & Oncology 10 (8; suppl 10): 3-7, 2012)。

【0210】

抗体と薬物は、切断性または非切断性リンカーによって連結されてもよい。しかし、一部の事例では、循環中で安定であり、重大なオフターゲット毒性をもたらし得る細胞傷害性薬物の全身放出を防止するリンカーを有することが望ましい。非切断性リンカーは、ADCが標的細胞によって内部移行する前に、細胞傷害剤の放出を防止する。一旦リソソームに入ると、リソソームプロテアーゼによる抗体の消化によって細胞傷害剤の放出がもたらされる (Bander, Clinical Advances in Hematology & Oncology 10 (8; suppl 10): 3-7, 2012)。

【0211】

薬物のモノクローナル抗体への部位特異的かつ安定なコンジュゲーションのための一方法は、グリカン操作によるものである。モノクローナル抗体は、各重鎖のCH2ドメインにおけるAsn297残基に1つの保存されたN結合型オリゴ糖鎖を有する (Qasba et al., Biotechnol Prog 24: 520-526, 2008)。変異体β1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素 (Y289L-Gal-T1; 参照により本明細書に組み込まれる、米国特許出願公開第2007/0258986号および同第2006/0084162号) を使用することにより、2-ケトーガラクトースを抗体重鎖の遊離GlcNAc残基に転移させて、コンジュゲーションのためのケミカルハンドルをもたらす。

【0212】

モノクローナル抗体に結合したオリゴ糖鎖は、末端のガラクトース残基-完全にガラク

10

20

30

40

50

トシル化された（２つのガラクトース残基；I g G－G 2）、１つのガラクトース残基（I g G－G 1）または完全に脱ガラクトシル化された（I g G－G 0）残基に基づいて、３つの群に分類することができる。モノクローナル抗体のβ 1，４－ガラクトシダーゼによる処置により、抗体がI g G－G 0グリコフォームに変換される。変異体β 1，４－ガラクトシルトランスフェラーゼ酵素は、２－ケトーガラクトースまたは２－アジドーガラクトースをそれらのそれぞれのUDP誘導体からI g G－G 1およびI g G－G 0グリコフォームにおけるG l c N A c残基に転移させることが可能である。転移した糖に関するケミカルハンドルにより、グリカン残基による種々の分子のモノクローナル抗体へのコンジュゲーションが可能になる（Q a s b a e t a l. , B i o t e c h n o l P r o g 24:520-526, 2008）。

10

【0213】

B 7 H 3を結合する（例えば、特異的に結合する）モノクローナル抗体にコンジュゲートした薬物（細胞傷害剤など）を含むADCが本明細書において提供される。一部の実施形態では、薬物は低分子である。一部の例では、薬物は、架橋剤、微小管阻害剤および／もしくは抗有糸分裂剤、または腫瘍細胞の殺滅を媒介するのに好適な任意の細胞傷害剤である。例示的な細胞傷害剤としては、以下に限定されないが、P B D、オーリスタチン、メイタンシノイド、ドラスタチン、カリケアマイシン、ネモルピシンおよびその誘導体、P N U－159682、アントラサイクリン、ピンカアルカロイド、タキサン、トリコテセン、C C 1065、カンプトテシン、エリナフィド、コンブレタスタチン（c o m b r e t a s t a i n）、ドラスタチン、デュオカルマイシン、エンジイン、ゲルダナマイシン、インドリノーベンゾジアゼピン二量体、ピューロマイシン、ツブリシン、ヘミアステリン、スプリセオスタチン、またはブラジエノライド、ならびに細胞傷害活性を有するその立体異性体、同配体、アナログ、および誘導体が挙げられる。

20

【0214】

一部の実施形態では、ADCはピロロベンゾジアゼピン（P B D）を含む。天然物であるアントラマイシン（P B D）は、1965年に最初に報告された（L e i m g r u b e r e t a l. , J A m C h e m S o c, 87:5793-5795, 1965; L e i m g r u b e r e t a l. , J A m C h e m S o c, 87:5791-5793, 1965）。それ以来、天然に存在するものと合成による類似物の両方のいくつかのP B Dが報告されている（G e r r a t a n a, M e d R e s R e v 32(2):254-293, 2012;ならびに米国特許第6,884,799号;同第7,049,311号;同第7,067,511号;同第7,265,105号;同第7,511,032号;同第7,528,126号;および同第7,557,099号）。一例として、P B D二量体は、特異的DNA配列を認識し、それに結合し、細胞傷害剤として有用であることが示されている。P B D二量体は抗体にコンジュゲートされ、得られたADCは抗がん特性を有することが示された（例えば、U S 2010/0203007を参照されたい）。P B D二量体における例示的な連結部位として、5員のピロロ環、P B D単位間のテザー、およびN10-C11イミン基が挙げられる（W O 2009/016516; U S 2009/304710; U S 2010/047257; U S 2009/036431; U S 2011/0256157; およびW O 2011/130598を参照されたい）。

30

40

【0215】

一部の実施形態では、ADCは、１つまたは複数のメイタンシノイド分子にコンジュゲートした抗体を含む。メイタンシノイドはメイタンシンの誘導体であり、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、東アフリカの低木M a y t e n u s s e r r a t aから最初に単離された（米国特許第3,896,111号）。次に、ある特定の微生物も、メイタンシノールおよびC-3メイタンシノールエステルなどのメイタンシノイドを生成することが発見された（米国特許第4,151,042号）。合成のメイタンシノイドは、例えば、米国特許第4,137,230号;同第4,248,870号;同第4,256,746号;同第4,260,608号;

50

同第4, 265, 814号;同第4, 294, 757号;同第4, 307, 016号;同第4, 308, 268号;同第4, 308, 269号;同第4, 309, 428号;同第4, 313, 946号;同第4, 315, 929号;同第4, 317, 821号;同第4, 322, 348号;同第4, 331, 598号;同第4, 361, 650号;同第4, 364, 866号;同第4, 424, 219号;同第4, 450, 254号;同第4, 362, 663号;および同第4, 371, 533号に開示される。

【0216】

一部の実施形態では、ADCは、ドラスタチンもしくはオーリスタチン、またはそのアナログもしくは誘導体にコンジュゲートした抗体を含む(米国特許第5, 635, 483号;同第5, 780, 588号;同第5, 767, 237号;および同第6, 124, 431号を参照されたい)。オーリスタチンは、海生軟体動物の化合物ドラスタチン-10の誘導体である。ドラスタチンおよびオーリスタチンは、微小管動態、GTP加水分解、ならびに核および細胞の分裂を妨害し(Woyke et al., *Antimicrob Agents and Chemother* 45(12):3580-3584, 2001)、抗がん(米国特許第5, 663, 149号)および抗真菌活性(Pettit et al., *Antimicrob Agents Chemother* 42:2961-2965, 1998)を有することが示されている。例示的なドラスタチンおよびオーリスタチンとしては、以下に限定されないが、ドラスタチン10、オーリスタチンE、オーリスタチンF、オーリスタチンEB(AEB)、オーリスタチンEFP(AEFP)、MMAD(モノメチルオーリスタチンDまたはモノメチルドラスタチン10)、MMAF(モノメチルオーリスタチンFまたはN-メチルバリリン-バリンドライソロイイン-ドラプロイン-フェニルアラニン)、MMAE(モノメチルオーリスタチンEまたはN-メチルバリリン-バリンドライソロイイン-ドラプロイン-ノルエフェドリン)、5-ベンゾイル吉草酸-AEエステル(AEVB)、および他のオーリスタチン(例えば、米国公開第2013/0129753号を参照されたい)が挙げられる。

【0217】

一部の実施形態では、ADCは、1つまたは複数のカリケアマイシン分子にコンジュゲートした抗体を含む。カリケアマイシンファミリーの抗生物質、およびその類似物は、ピコモル濃度以下の濃度で二本鎖DNA切断を生じることが可能である(Hinman et al., *Cancer Res* 53:3336-3342, 1993;Lode et al., *Cancer Res* 58:2925-2928, 1998)。カリケアマイシン薬物部分を含むADCを調製するための例示的な方法は、米国特許第5, 712, 374号;同第5, 714, 586号;同第5, 739, 116号;および同第5, 767, 285号に記載されている。

【0218】

一部の実施形態では、ADCはアントラサイクリンを含む。アントラサイクリンは、細胞傷害活性を示す抗生物質化合物である。アントラサイクリンが、薬物分子の、細胞のDNAへのインターカレーションと、それによるDNA依存性核酸合成の阻害;後に細胞高分子と反応して、細胞に損傷をもたらす、フリーラジカル生成の誘導;および/または薬物分子の細胞膜との相互作用を含むいくつかの異なるメカニズムによって細胞を死滅させるよう作用し得ると考えられる。非限定的な例示的アントラサイクリンとしては、ドキソルビシン、エピルビシン、イダルビシン、ダウノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ネモルビシン、バルルビシンおよびミトキサントロン、ならびにそれらの誘導体が挙げられる。例えば、PNU-159682は、ネモルビシンの有力な代謝物(または誘導体)である(Quintieri et al., *Clin Cancer Res* 11(4):1608-1617, 2005)。ネモルビシンは、ドキソルビシンのグリコシドアミノにおいて2-メトキシモルホリノ基を有するドキソルビシンの半合成アナログである(Grandi et al., *Cancer Treat Rev* 17:133, 1990;Ripamonti et al., *Br J Cancer* 65:703-707, 1992)。

10

20

30

40

50

【0219】

一部の実施形態では、ADCはリンカーをさらに含んでもよい。一部の例では、リンカーは、1つまたは複数の薬物部分を抗体に連結させて、ADCを形成するために使用することができる二官能または多官能の部分である。一部の実施形態では、ADCは、薬物および抗体に共有結合により付着するための反応性官能基を有するリンカーを使用して調製される。例えば、抗体のシステインチオールは、リンカーまたは薬物-リンカー中間体の反応性官能基と結合を形成して、ADCを作製することができる。

【0220】

一部の例では、リンカーは、抗体上に存在する遊離システインと反応して、共有結合を形成することが可能である官能基を有する。このような反応性官能基を有する例示的なリンカーとしては、マレイミド、ハロアセトアミド、 α -ハロアセチル、スクシンイミドエステルなどの活性化エステル、4-ニトロフェニルエステル、ペンタフルオロフェニルエステル、テトラフルオロフェニルエステル、無水物、酸塩化物、塩化スルホニル、イソシアネート、およびイソチオシアネートが挙げられる。

【0221】

一部の例では、リンカーは、抗体上に存在する求電子基と反応することが可能である官能基を有する。このような求電子基の例としては、以下に限定されないが、アルデヒドおよびケトンカルボニル基が挙げられる。一部の場合には、リンカーの反応性官能基のヘテロ原子は、抗体上の求電子基と反応し、抗体単位との共有結合を形成することができる。非限定的な例としては、ヒドラジド、オキシム、アミノ、ヒドラジン、チオセミカルバゾン、カルボン酸ヒドラジンおよびアリールヒドラジドが挙げられる。

【0222】

一部の例では、リンカーは、薬物の放出を容易にする切断性リンカーである。切断性リンカーの例としては、酸不安定リンカー（例えば、ヒドラゾンを含む）、プロテアーゼ感受性リンカー（例えば、ペプチダーゼ感受性）、光分解性リンカー、およびジスルフィド含有リンカーが挙げられる（Chariet al., Cancer Res 52: 127-131, 1992; 米国特許第5,208,020号）。

【0223】

本明細書に開示されるADCは、単独もしくは別の治療剤と組み合わせて、および／またはがんの処置のための任意の標準的治療（腫瘍の外科的切除、化学療法または放射線治療など）と組み合わせて、B7H3陽性がんの処置のために使用することができる。

VII. 多特異性抗体

【0224】

多特異性抗体は、2つもしくはそれより多くのモノクローナル抗体（単ドメイン抗体など）または2つもしくはそれより多くの異なるモノクローナル抗体の抗原結合断片から構成される組換えタンパク質である。例えば、二特異性抗体は、2つの異なるモノクローナル抗体の抗原結合断片から構成される。よって、二特異性抗体は2つの異なる抗原を結合し、三特異性抗体は3つの異なる抗原を結合する。多特異性抗体は、例えば、CTL（CD3などのCTL受容体構成成分など）またはエフェクターナチュラルキラー（NK）細胞と、少なくとも1つの腫瘍抗原の両方を同時に標的とすることによって、がん免疫療法のために使用することができる。本明細書に開示されるB7H3特異的単ドメインモノクローナル抗体を使用して、B7H3とCTLの両方を標的とするか、またはB7H3とNK細胞の両方を標的とする多特異性（例えば、二特異性または三特異性）抗体を生成し、それによって、B7H3を発現するがんを処置する手段を提供することができる。

【0225】

二特異性T細胞エンゲージャー（BiTE）は、腫瘍抗原（B7H3など）を標的とする第1のモノクローナル抗体（scFvまたは単ドメイン抗体など）と、T細胞、例えばT細胞上のCD3を結合する第2の抗体との融合体である一種の二特異性モノクローナル抗体である。本明細書における一部の実施形態では、BiTEの結合部分のうちの1つは、B7H3に対して特異的である。

【0226】

二特異性キラー細胞エンゲージャー（B i K E）は、腫瘍抗原（B 7 H 3 など）を標的とする第1のモノクローナル抗体（s c F v または単ドメイン抗体など）と、NK細胞活性化受容体、例えばC D 1 6 を結合する第2のs c F v との融合体である一種の二特異性モノクローナル抗体である。

【0227】

B 7 H 3 特異的モノクローナル抗体を含む多特異性、例えば三特異性または二特異性のモノクローナル抗体が本明細書において提供される。一部の実施形態では、多特異性モノクローナル抗体は、T細胞受容体の構成成分、例えばC D 3 を特異的に結合するモノクローナル抗体をさらに含む。他の実施形態では、多特異性モノクローナル抗体は、NK細胞活性化受容体、例えばC D 1 6、L y 4 9、またはC D 9 4 を特異的に結合するモノクローナル抗体をさらに含む。多特異性抗体をコードする単離された核酸分子およびベクター、ならびに核酸分子またはベクターを含む宿主細胞も提供される。B 7 H 3 特異的抗体を含む多特異性抗体は、B 7 H 3 を発現するがんの処置のために使用することができる。よって、B 7 H 3 を発現するがんを有する対象を選択し、対象に、B 7 H 3 を標的とする多特異性抗体の治療有効量を投与することによって、がんを有する対象を処置する方法が本明細書において提供される。

V I I I . 抗体-ナノ粒子コンジュゲート

【0228】

本明細書に開示されるモノクローナル抗体は、種々の異なる種類のナノ粒子にコンジュゲートされて、細胞傷害剤または他の抗がん剤を、抗体を腫瘍細胞の表面で発現されるB 7 H 3 に結合させることによって、腫瘍細胞に直接的に送達され得る。ナノ粒子の使用によってオフターゲット副作用が低減され、薬物のバイオアベイラビリティも改善され、治療効果を達成するために必要とされる薬物の用量も低減され得る。ナノ粒子製剤は、ナノ粒子内に保有または封入される薬物に好適であるように適合され得る。例えば、疎水性分子はナノ粒子のコア内に組み込まれてもよく、一方、親水性の薬物はポリマーシェルまたは脂質シェルによって保護された水性コア内に保有されてもよい。ナノ粒子の例としては、以下に限定されないが、ナノスフェア、ナノカプセル、リボソーム、デンドリマー、ポリマーミセル、ニオソーム、およびポリマーナノ粒子が挙げられる（F a y a n d S c o t t , I m m u n o t h e r a p y 3 (3) : 3 8 1 - 3 9 4 , 2 0 1 1）。

【0229】

リボソームは、薬物送達に使用される一般的な種類のナノ粒子である。リボソームにコンジュゲートした抗体は、「イムノリボソーム」と称されることが多い。イムノリボソームのリボソーム構成成分は、典型的には、1つまたは複数の同心性リン脂質二重層の脂質ベシクルである。一部の場合には、リン脂質は、疎水性薬物と親水性薬物の両方の封入を可能にする、親水性の頭部基および2つの疎水性の鎖から構成される。従来のリボソームは、細網内皮系（R E S）のマクロファージによって循環から迅速に除去される。長期循環するリボソームを生成するために、リボソームの組成、サイズおよび電荷がモジュレートされ得る。リボソームの表面はまた、例えば、糖脂質またはシアル酸で改変されてもよい。例えば、ポリエチレングリコール（P E G）を含むことにより、循環半減期が有意に増加する。イムノリボソームの調製のためを含め、薬物送達剤としての使用のためのリボソームについては、当技術分野において説明されている（例えば、P a s z k o a n d S e n g e , C u r r M e d C h e m 1 9 (3 1) 5 2 3 9 - 5 2 7 7 , 2 0 1 2 ; I m m o r d i n o e t a l . , I n t J N a n o m e d i c i n e 1 (3) : 2 9 7 - 3 1 5 , 2 0 0 6 ; 米国特許出願公開第2011/0268655号；同第2010/00329981号を参照されたい）。

【0230】

ニオソームは、リボソームに類似する構造を有する非イオン性界面活性剤をベースとするベシクルである。ニオソームの膜は、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリグリセリル-アルキルエーテルまたはN-パルミトイルグルコサミンのみから構成される。ニオソー

ムは、小さな単層の粒子から大きな多層の粒子まで多岐にわたる。これらのナノ粒子は、単分散性で、水溶性で、化学的に安定であり、毒性が低く、生分解性かつ非免疫原性であり、封入された薬物のバイオアベイラビリティを増加させる。

【0231】

デンドリマーは、様々な分岐ポリマー複合体を含む。これらのナノ粒子は、水溶性で、生体適合性であり、ヒトへの使用に関して十分に非免疫原性である。一般に、デンドリマーは、分岐した巨大分子複合体を形成するイニシエーターコア (i n i t i a t o r c o r e) (コアに移植された選択されたポリマーの層によって囲まれている) からなる。デンドリマーは、典型的には、ポリ (アミドアミン) またはポリ (L-リジン) などのポリマーを使用して生成される。デンドリマーは、DNA、RNA、生体イメージング造影剤および化学療法剤の送達のためを含め、種々の治療適用および診断適用のために使用されている。

10

【0232】

ポリマーミセルは、水性環境に曝露された親水性ポリマー鎖の輪 (c o r o n a) によって囲まれた、疎水性コア中にアSEMBルされた両親媒性コポリマー (親水性モノマー単位と疎水性モノマー単位の両方からなる) の凝集物から構成されている。多くの場合には、ポリマーミセルを調製するために使用されるポリマーは、PEG、ポリ (ビニルピロリドン) の親水性ブロックおよび粒子コアを形成する疎水性ポリ (L-ラクチド) またはポリ (L-リジン) から構成されたヘテロ二官能コポリマーである。ポリマーミセルは、可溶性に乏しい薬物を保有するために使用することができる。これらのナノ粒子は、ドキソルビシンおよびカンプトテシンを含むいくつかの抗がん薬を封入するために使用されている。カチオン性ミセルも、DNAまたはRNA分子を保有するために開発されている。

20

【0233】

ポリマーナノ粒子は、ナノスフェアとナノカプセルの両方を含む。ナノスフェアはポリマーの固体マトリックスからなる一方、ナノカプセルは水性コアを含有する。選択される製剤は、典型的には、保有/封入される治療剤の溶解度に依存し; 水溶性に乏しい薬物はナノスフェア内により容易に封入される一方、水溶性で不安定な薬物、例えばDNAおよびタンパク質は、ナノカプセル内により容易に封入される。これらのナノ粒子を生成するために使用されるポリマーとしては、例えば、ポリ (アクリルアミド)、ポリ (エステル)、ポリ (アルキルシアノアクリレート)、ポリ (乳酸) (PLA)、ポリ (グリコール酸) (PGA)、およびポリ (D, L-乳酸-co-グリコール酸) (PLGA) が挙げられる。

30

【0234】

抗体は、当技術分野で公知の標準的な方法に従って、好適なナノ粒子にコンジュゲートされ得る。例えば、コンジュゲーションは、共有結合であっても非共有結合であってもよい。ナノ粒子がリポソームである一部の実施形態では、抗体は、PEG鎖によって、立体的に安定化された、長期循環リポソームに結合される。抗体または抗体断片のリポソームへのカップリングはまた、例えば、チオールとマレイミド基の反応によるチオエステル結合にも関与し得る。架橋剤を使用して、抗体のナノ粒子への結合のためのスルフヒドリル基を作出することができる (P a s z k o a n d S e n g e , C u r r M e d C h e m 19 (31) 5239-5277, 2012)。

40

IX. 組成物および使用方法

【0235】

担体中で、B7H3を結合する (例えば、特異的に結合する) 開示されるモノクローナル抗体のうちの1つまたは複数を含む組成物が提供される。ADC、CAR (およびCARを含むCTLまたは他の細胞)、多特異性 (二特異性または三特異性など) 抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、イムノリポソームおよびイムノコンジュゲートを含む組成物も提供される。組成物は、対象への投与のための単位剤形で調製することができる。投与の量およびタイミングは、所望の転帰を達成するために処置を行う医師の裁量である。抗体、ADC、CAR、CARを発現する細胞、多特異性抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲ

50

ート、イムノリポソームまたはイムノコンジュゲートは、全身または局所（腫瘍内など）投与のために製剤化され得る。一例では、抗体は、静脈内投与などの非経口投与のために製剤化される。

【0236】

投与のための組成物は、水性担体などの薬学的に許容される担体中に、抗体、ADC、CAR、CARを発現する細胞（CTLなど）、多特異性（二特異性または三特異性など）抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、イムノリポソームまたはイムノコンジュゲートの溶液を含んでもよい。種々の水性担体、例えば、緩衝食塩水などが使用されてもよい。これらの溶液は、無菌であり、一般に望ましくない物質を含まない。これらの組成物は、従来の周知の滅菌技法によって滅菌されてもよい。組成物は、生理的条件に近付くために必要とされる薬学的に許容される補助物質、例えば、pH調整および緩衝剤、毒性調整剤など、例えば、酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウムなどを含有してもよい。これらの製剤中の抗体の濃度は、広範囲で変化してもよく、選択される特定の投与方式および対象のニーズに従って、流体の体積、粘度、体重などに基づいて主に選択される。

【0237】

静脈内投与のための典型的な医薬組成物は、1日当たり対象当たり約0.1～10mgの抗体（またはADC、CAR、多特異性抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、もしくはイムノコンジュゲート）を含む。特に、薬剤が隔離された部位に投与され、体腔中または器官の内腔中などの循環またはリンパ系へと投与されない場合には、1日当たり対象当たり0.1～最大約100mgの投薬量で使用されてもよい。投与可能な組成物を調製するための実際の方法は、当業者にとって公知であるかまたは明らかであり、Remington: The Science and Practice of Pharmacy, The University of the Sciences in Philadelphia, Editor, Lippincott, Williams, & Wilkins, Philadelphia, PA, 21st Edition (2005)などの刊行物により詳細に記載されている。

【0238】

本明細書に開示されるモノクローナル抗体はまた、吸入、経口、局所または眼内を介することを含む他の経路によって投与されてもよい。一部の例では、モノクローナル抗体（またはそのコンジュゲート）は、微細針によって投与される。

【0239】

抗体（または他の治療用分子）は、凍結乾燥形態で提供され、投与前に滅菌水で再水合されてもよいが、これらは公知の濃度の滅菌溶液中でも提供される。次いで、抗体溶液を0.9%の塩化ナトリウム、USPを含有する注入バッグに添加し、一部の場合には、0.5～15mg/kg体重の投薬量で投与する。1997年のRITUXAN（商標）の承認以来、米国で市販されている抗体薬物の投与では、当技術分野でかなりの経験が得られている。抗体、ADC、CAR（またはCARを発現する細胞）、多特異性（二特異性または三特異性など）抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、イムノリポソームまたはイムノコンジュゲートは、静注またはボラスではなく、ゆっくりとした注入によって投与されてもよい。一例では、より多量の負荷用量が投与され、次に、より低いレベルの維持用量が投与される。例えば、約90分の期間にわたり、4mg/kgの初期負荷用量が注入され、その後、以前の用量が十分に忍容性であった場合、30分の期間にわたり、2mg/kgの維持用量が4～8週間毎週注入されてもよい。

【0240】

制御放出非経口製剤は、埋め込み剤、油性注射剤として、または微粒子系としてなされてもよい。タンパク質送達系の概要については、Banga, A. J., Therapeutic Peptides and Proteins: Formulation, Processing, and Delivery Systems, Technomic Publishing Company, Inc., Lancaster, P

A, (1995)を参照されたい。微粒子系には、例えば、ミクロスフェア、マイクロ粒子、マイクロカプセル、ナノカプセル、ナノスフェア、およびナノ粒子が含まれる。マイクロカプセルは、セントラルコアとして、細胞毒素または薬物などの治療用タンパク質を含有する。ミクロスフェアにおいて、治療薬は粒子全体に分散される。約1 μm よりも小さい粒子、ミクロスフェア、およびマイクロカプセルは、一般に、それぞれ、ナノ粒子、ナノスフェア、およびナノカプセルと称される。毛細管は、およそ5 μm の直径を有するため、ナノ粒子のみが静脈内に投与される。マイクロ粒子は、典型的には、およそ100 μm の直径であり、皮下または筋肉内に投与される。例えば、Kreuter, J., Colloidal Drug Delivery Systems, J. Kreuter, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, NY, pp. 219-342 (1994); および Tice & Tabibi, Treatise on Controlled Drug Delivery, A. Kydonieus, ed., Marcel Dekker, Inc. New York, NY, pp. 315-339, (1992)を参照されたい。

【0241】

ポリマーは、本明細書に開示される抗体ベースの組成物のイオン制御放出のために使用され得る。制御された薬物送達において使用するための種々の分解性および非分解性ポリマーマトリックスは当技術分野において公知である (Langer, Accounts Chem. Res. 26:537-542, 1993)。例えば、ブロックコポリマーであるポロキサマー (poloxamer) 407は、低温度で粘性であるが流動性の液体として存在するが、体温では半固体ゲルを形成する。これは、製剤化および組換えインターロイキン-2およびウレアーゼの持続送達に有効なビヒクルであることが示されている (Johnston et al., Pharm. Res. 9:425-434, 1992; および Pec et al., J. Parent. Sci. Tech. 44(2):58-65, 1990)。あるいは、ヒドロキシアパタイトは、タンパク質の制御放出のためのマイクロキャリアとして使用されている (Ijntema et al., Int. J. Pharm. 112:215-224, 1994)。さらに別の態様では、リポソームは、制御放出および脂質でカプセル化された薬物の薬物標的化のために使用される (Betageri et al., Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, PA (1993))。治療用タンパク質の制御送達のための多数の追加の系が公知である (米国特許第5,055,303号; 同第5,188,837号; 同第4,235,871号; 同第4,501,728号; 同第4,837,028号; 同第4,957,735号; 同第5,019,369号; 同第5,055,303号; 同第5,514,670号; 同第5,413,797号; 同第5,268,164号; 同第5,004,697号; 同第4,902,505号; 同第5,506,206号; 同第5,271,961号; 同第5,254,342号および同第5,534,496号を参照されたい)。

A. 治療方法

【0242】

本明細書に開示される抗体、組成物、CAR (およびCARを発現するCTLなどの細胞)、ADC、多特異性 (二特異性または三特異性など) 抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、イムノリポソームおよびイムノコンジュゲートは、B7H3陽性固形腫瘍などの、腫瘍細胞の成長を遅延させるかもしくは阻害する、または腫瘍細胞の転移を阻害するために投与され得る。これらの適用において、組成物の治療有効量は、がん細胞の成長、複製もしくは転移を阻害するか、またはがんの兆候もしくは症状を阻害するのに十分な量で対象に投与される。好適な対象は、以下に限定されないが、肝臓がん (肝細胞癌など)、膵臓がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮頸がん、食道がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肺がん、脳がん (神経芽腫または神経膠芽腫など)、小児がん (骨肉腫、神経芽腫、横紋筋肉腫またはユーイング肉腫など)、黒色腫または中皮腫などのB7H3を

発現する固形腫瘍を有すると診断されたものを含んでもよい。

【0243】

対象に、本明細書に開示されるB7H3特異的抗体、イムノコンジュゲート、CAR（またはCARを発現する細胞）、ADC、多特異性（二特異性または三特異性など）抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、イムノリポソームまたは組成物の治療有効量を投与することによって、対象におけるB7H3陽性がんを処置する方法が本明細書において提供される。対象に、本明細書に開示されるB7H3特異的抗体、イムノコンジュゲート、CAR（CARを発現する細胞など）、ADC、多特異性（二特異性または三特異性など）抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、イムノリポソームまたは組成物の治療有効量を投与することによって、対象におけるB7H3陽性がんの腫瘍成長または転移を阻害する方法も本明細書において提供される。一部の実施形態では、B7H3陽性がんは、肝臓がん（肝細胞癌など）、膵臓がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮頸がん、食道がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肺がん、脳がん（神経芽腫または神経膠芽腫など）、小児がん（骨肉腫、神経芽腫、横紋筋肉腫またはユーイング肉腫など）、黒色腫または中皮腫である。

10

【0244】

本明細書に開示されるB7H3特異的モノクローナル抗体、ADC、CAR（例えばCARを発現するCTL）、多特異性（二特異性または三特異性など）抗体、イムノコンジュゲート、イムノリポソームまたは組成物の治療有効量は、疾患の重症度、疾患の種類、および患者の健康の全身状態に応じて変わる。抗体ベースの組成物の治療有効量は、症状（複数可）の主観的軽減または医師もしくは他の資格のあるオブザーバーによって言及されるとおりの客観的に特定可能な改善を提供する量である。

20

【0245】

一例では、本明細書において提供されるB7H3特異的抗体は、IR700にコンジュゲートされ、B7H3陽性がんを処置するために光免疫療法が使用される。例えば、このような方法は、B7H3陽性がんを有する対象に、1つまたは複数のB7H3特異的抗体-IR700コンジュゲートの治療有効量を投与することであって、B7H3特異的抗体が、がん細胞上のB7H3に特異的に結合する、投与することを含み得る。コンジュゲートの投与後に、がんは、660~740nm（例えば、660~710nm、例えば680nm）の波長および少なくとも 1 J cm^{-2} の線量で照射され、それによって、対象におけるB7H3陽性がんを処置する。一部の例では、B7H3陽性がんは、少なくとも 1 J cm^{-2} （例えば、少なくとも 1 J cm^{-2} 、少なくとも 4 J cm^{-2} 、少なくとも 10 J cm^{-2} 、少なくとも 50 J cm^{-2} 、または少なくとも 100 J cm^{-2} ）の線量で、660~740nm（例えば、660~710nm、例えば680nm）の波長で照射され、それによって、対象における腫瘍を処置する。一部の例では、2、3、4、5、6、7、8、9または10回の処置サイクルなどの複数回の処置が実施される。特定の例では、B7H3特異的抗体-IR700コンジュゲートの治療有効用量は、例えば、iv投与される場合、60キログラム当たり少なくとも0.5ミリグラム（mg/kg）、少なくとも5mg/60kg、少なくとも10mg/60kg、少なくとも20mg/60kg、少なくとも30mg/60kg、少なくとも50mg/60kg、例えば、0.5~50mg/60kg、例えば、1mg/60kg、2mg/60kg、5mg/60kg、20mg/60kg、または50mg/60kgの用量である。別の例では、B7H3特異的抗体-IR700コンジュゲートの治療有効用量は、例えば、腫瘍内またはi.p.投与される場合、少なくとも $10\mu\text{g/kg}$ 、例えば少なくとも $100\mu\text{g/kg}$ 、少なくとも $500\mu\text{g/kg}$ 、または少なくとも $500\mu\text{g/kg}$ 、例えば、 $10\mu\text{g/kg}$ ~ $1000\mu\text{g/kg}$ 、例えば $100\mu\text{g/kg}$ 、 $250\mu\text{g/kg}$ 、約 $500\mu\text{g/kg}$ 、 $750\mu\text{g/kg}$ 、または $1000\mu\text{g/kg}$ の用量である。一例では、B7H3特異的抗体-IR700コンジュゲートの治療有効用量は、局所溶液中で投与されると、少なくとも $1\mu\text{g/ml}$ 、例えば少なくとも $500\mu\text{g/ml}$ 、例えば $20\mu\text{g/ml}$ ~ $100\mu\text{g/ml}$ の間、例えば $10\mu\text{g/ml}$ 、 $20\mu\text{g/ml}$ 、 $30\mu\text{g/ml}$ 、 40μ

30

40

50

g/ml、50 µg/ml、60 µg/ml、70 µg/ml、80 µg/ml、90 µg/mlまたは100 µg/mlである。

【0246】

本明細書に開示されるB7H3特異的抗体、ADC、CAR（またはCARを発現する細胞）、イムノコンジュゲート、多特異性抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、イムノリポソームおよび組成物の投与はまた、他の抗がん剤の投与または治療処置（例えば、腫瘍の外科的切除）を伴っていてもよい。任意の好適な抗がん剤は、本明細書に開示される抗体、組成物およびイムノコンジュゲートと組み合わせて投与され得る。例示的な抗がん剤としては、以下に限定されないが、化学療法剤、例えば、有糸分裂阻害剤、アルキル化剤、抗代謝薬、挿入抗生物質、成長因子阻害剤、細胞周期阻害剤、酵素、トポイソメラーゼ阻害剤、抗生存剤、生体応答調節剤、抗ホルモン薬（例えば、抗アンドロゲン薬）および抗血管新生剤などが挙げられる。他の抗がん処置には、放射線治療およびがん細胞を特異的に標的とする他の抗体（例えば、生物製剤）が含まれる。

10

【0247】

アルキル化剤の非限定的な例としては、ナイトロジェンマスタード（メクロレタミン、シクロホスファミド、メルファラン、ウラシルマスタードまたはクロラムブシルなど）、アルキルスルホネート（ブスルファンなど）、ニトロソ尿素（カルムスチン、ロムスチン、セムスチン、ストレプトゾシン、またはダカルバジンなど）が挙げられる。

【0248】

抗代謝薬の非限定的な例としては、葉酸アナログ（メトトレキサートなど）、ピリミジンアナログ（5-FUまたはシタラビンなど）、およびプリンアナログ、例えばメルカプトプリンまたはチオグアニンが挙げられる。

20

【0249】

天然物の非限定的な例としては、ピンカアルカロイド（ビンブラスチン、ビンクリスチン、またはビンデシンなど）、エポドフィロトキシン（エトポシドまたはテニポシドなど）、抗生物質（ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、ブレオマイシン、プリカマイシン、またはマイトマイシンCなど）、および酵素（L-アスパラギナーゼなど）が挙げられる。

【0250】

各種の薬剤の非限定的な例としては、白金配位錯体（シスプラチンとしても公知のシス-ジアミン-ジクロロ白金IIなど）、置換尿素（ヒドロキシ尿素など）、メチルヒドラジン誘導体（プロカルバジンなど）、および副腎皮質抑制剤（ミトタンおよびアミノグルテチミドなど）が挙げられる。

30

【0251】

ホルモンおよびアンタゴニストの非限定的な例としては、副腎皮質ステロイド（プレドニゾンなど）、プロゲステロン（カプロン酸ヒドロキシプロゲステロン、酢酸メドロキシプロゲステロン、および酢酸メゲストロール（mestrol acetate）など）、エストロゲン（ジエチルスチルベストロールおよびエチニルエストラジオールなど）、抗エストロゲン薬（タモキシフェンなど）、ならびにアンドロゲン（プロピオン酸テストロン（testosterone propionate）およびフルオキシメステロンなど）が挙げられる。最も一般的に使用されている化学療法薬の例としては、アドリアマイシン、アルケラン、Ara-C、BicNU、ブスルファン、CCNU、カルボプラチナム、シスプラチナム、シトキサン、ダウノルビシン、DTIC、5-FU、フルダラビン、ハイドレア、イダルビシン、イホスファミド、メトトレキサート、ミトラマイシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ナイトロジェンマスタード、タキソール（または他のタキサン類、例えば、ドセタキセル）、ベルバン、ビンクリスチン、VP-16が挙げられるが、いくつかのより新しい薬物としては、ゲムシタビン（Gemzar）、ハーセプチン、イリノテカン（Campthosar、CPT-11）、ロイスタチン、ナベルピン、リツキサンSTI-571、タキソテル、トポテカン（ハイカムチン）、ゼローダ（カペシタビン）、ゼベリン（Zevalin）およびカルチトリオールが挙げられる。

40

50

【0252】

使用することができるイムノモジュレーターの非限定的な例としては、AS-101 (Wyeth-Ayerst Labs.)、ブロピリミン (Upjohn)、ガンマインターフェロン (Genentech)、GM-CSF (顆粒球マクロファージコロニー刺激因子; Genetics Institute)、IL-2 (CetusまたはHoffman-LaRoche)、ヒト免疫グロブリン (Cutter Biological)、IMREG (New Orleans, La. のImregより)、SK&F 106528、およびTNF (腫瘍壊死因子; Genentech) が挙げられる。

【0253】

開示されるB7H3特異的抗体、ADC、CAR (またはCARを発現する細胞)、イムノコンジュゲート、多特異性抗体、抗体-ナノ粒子コンジュゲート、イムノリポソームと組み合わせて使用することができる生物製剤の非限定的な例としては、治療用モノクローナル抗体、例えば、3F8、アバゴボマブ、アデカツムマブ、アフツズマブ、アラシズマブ、アレムツズマブ、アルツモマブペンテテート、アナツモマブマフェナトクス、アポリズマブ、アルシツモマブ、バビツキシマブ、ベクツモマブ、ベリムマブ、ベジレソマブ、ベバシズマブ、ビバツズマブメルタンシン、ブリナツモマブ、ブレンツキシマブベドチン、カンツズマブメルタンシン、カプロマブペンデチド、カツマキシマブ、CC49、セツキシマブ、シタツズマブボガトクス、シクスツムマブ、クリバツズマブテトラキセタン、コナツムマブ、ダセツズマブ、デツモマブ、エクロメキシマブ、エクリズマブ、エドレコロマブ、エブラツズマブ、エルツマキシマブ、エタラシズマブ、ファルレツズマブ、フィギツムマブ、ガリキシマブ、ゲムツズマブオゾガマイシン、ギレンツキシマブ、グレムバツムマブベドチン、イブリツモマブチウキセタン、イゴボマブ、イムシロマブ、インテツムマブ、イノツズマブオゾガマイシン、イピリムマブ、イラツムマブ、ラベツズマブ、レクサツムマブ、リンツズマブ、ロルボツズマブメルタンシン、ルカツムマブ、ルミリキシマブ、マパツムマブ、マツズマブ、メポリズマブ、メテリムマブ、ミラツズマブ、ミツモマブ、モロリムマブ、ナコロマブタフェナトクス、ナプツモマブエスタフェナトクス、ネシツムマブ、ニモツズマブ、ノフェツモマブメルペンタン、オフアツムマブ、オララツマブ、オポルツズマブモナトクス、オレゴボマブ、パニツムマブ、ペムツモマブ、ペルツズマブ、ピンツモマブ、プリツムマブ、ラムシルマブ、リロツムマブ、リツキシマブ、ロバツムマブ、サツモマブペンデチド、シブロツズマブ、ソネブシズマブ、タカツズマブテトラキセタン、タブリツモマブパプトクス、テナツモマブ、TGN1412、チシリムマブ (トレメリムマブ)、チガツズマブ、TNX-650、トラスツズマブ、トレメリムマブ、ツコツズマブセルモロイキン、ベルツズマブ、ボロシキシマブ、ボツムマブ、およびザルツムマブのうちの1つまたは複数が挙げられる。一部の例では、治療用抗体は、アテゾリズマブ、MPDL3280A、BNS-936558 (ニボルマブ)、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、CT011、AMP-224、AMP-514、MEDI-0680、BMS-936559、BMS935559、MEDI-4736、MPDL-3280A、MSB-0010718C、MGA-271、Indoximod、Epacadostat、BMS-986016、MEDI-4736、MEDI-4737、MK-4166、BMS-663513、PF-05082566 (PF-2566)、リリルマブ、およびデュルバルマブのうちの1つまたは複数などのPD-1またはPD-L1を特異的に結合し、アンタゴナイズする。

【0254】

一部の例では、投与される追加の治療剤は、T細胞アゴニスト、例えば4-1BB (CD137)、OX40、および/またはGITRのアゴニストである。一例では、投与される追加の治療剤は、OX40アゴニスト、例えばモノクローナル抗体 (mAb) (例えば、PF-04518600、MEDI-6469、MEDI-0562、MEDI-6383、MOXR-0916、BMS 986178、またはGSK3174998) などの抗体である。一部の例では、投与される追加の治療剤は、4-1BBアゴニスト、例えば、mAbなどの4-1BBアゴニスト抗体である。開示される方法を用いて使用する

10

20

30

40

50

ことができる具体的なアゴニストmAbとしては、PF-05082566（ウトミルマブ）、およびBMS-663513（ウレルマブ）が挙げられる。一例では、4-1BBアゴニストは、4-1BBリガンド（4-1BBL）、例えば天然の4-1BBL（ヒト4-1BBLなど）またはストレプトアビジン化4-1BBL（SA-4-1BBL）複合体である。一部の例では、投与される追加の治療剤は、GITR（グルココルチコイドに誘導される腫瘍壊死因子（TNF）受容体、またはTNFRSF18）アゴニスト、例えばmAbなどのGITRアゴニスト抗体である。開示される方法を用いて使用することができる具体的なGITRアゴニストmAbとしては、DTA-1、TRX518、MK-4166、MK-1248、AMG 228、INCAGN01876、GWN323（Novartisより）、CK-302（Checkpoint Therapeuticsより）およびBMS-986156が挙げられる。一例では、GITRアゴニストは、GITRリガンド（GITRL）、例えば天然のGITRLまたは多価GITRリガンド融合タンパク質である。一例では、GITRアゴニストは、ヒトIgG1 Fcドメインを有する六量体のGITRL分子であるMEDI1873である。一部の例では、投与される追加の治療剤は、免疫治療薬である。使用することができるイムノモジュレーターの非限定的な例としては、AS-101（Wyeth-Ayerst Labs.）、プロピリミン（Upjohn）、ガンマインターフェロン（Genentech）、GM-CSF（顆粒球マクロファージコロニー刺激因子；Genetics Institute）、IL-2（CetusまたはHoffman-La Roche）、ヒト免疫グロブリン（Cutter Biological）、IMREG（New Orleans、La. のImregより）、SK&F 106528、およびTNF（腫瘍壊死因子；Genentech）が挙げられる。

【0255】

一例では、追加の治療は、外科的処置、例えば、がんまたはその一部の外科的切除である。処置の別の例は、放射線療法、例えば、外科的切除の前に、腫瘍を根絶するかまたは腫瘍を退縮させる助けとなるための、腫瘍部位への放射性物質またはエネルギー（外部ビーム治療など）の投与である。

B. 診断および検出のための方法

【0256】

*in vitro*または*in vivo*でB7H3タンパク質を検出するための方法が、本明細書において提供される。例えば、開示されるモノクローナル抗体は、*in vivo*での腫瘍イメージングに使用することができる。*in vivo*で診断試薬として開示される抗体を使用するために、抗体は、検出可能な部分、例えば、放射性同位体、蛍光標識、または陽電子放出放射性核種で標識される。一例として、本明細書に開示されるモノクローナル抗体は、陽電子放出断層撮影（PET）において使用するために、陽電子放出放射性核種にコンジュゲートされ得る；この診断プロセスは、イムノPETと称されることが多い。全長抗体は、良好なイムノPET剤を作製し得るが、これらの生物学的半減期は、イメージングの前に数日間待つ必要があり、関連する非標的放射線量を増加させる。より小さい単ドメイン抗体／ナノボディは、同日イメージングに適した生物学的半減期を有する。

【0257】

他の事例では、B7H3発現は生体試料中で検出される。試料は、以下に限定されないが、生検、剖検および病理検体由来の組織を含む任意の試料であってもよい。生体試料は、組織の切片、例えば、組織学的な目的で採取された凍結切片も含む。生体試料は、血液、血清、血漿、痰、脊髄液または尿などの体液をさらに含む。一部の例では、試料はエキソソームを含有する血清試料である。生体試料は、典型的には、ヒトまたは非ヒト霊長類などの哺乳動物から得られる。

【0258】

対象由来の試料を本明細書に開示されるB7H3特異的モノクローナル抗体と接触させ、抗体の試料への結合を検出することによって、対象がB7H3陽性がんを有するかどうか

10

20

30

40

50

かを決定する方法が本明細書において提供される。抗体の対照試料への結合と比較した、抗体の試料への結合の増加によって、対象がB7H3陽性がんを有するものとして特定される。

【0259】

別の実施形態では、B7H3陽性がんを有すると診断された対象由来の試料を本明細書に開示されるB7H3特異的モノクローナル抗体と接触させ、抗体の試料への結合を検出することによって、対象におけるB7H3陽性がんの診断を確認する方法が提供される。抗体の対照試料への結合と比較した、抗体の試料への結合の増加によって、対象におけるB7H3陽性がんの診断が確認される。

【0260】

開示される方法の一部の例では、モノクローナル抗体は直接的に標識される。

【0261】

他の例では、方法は、モノクローナル抗体を特異的に結合する第2の抗体（検出抗体）を試料と接触させ、第2の抗体の結合を検出することをさらに含む。第2の抗体の対照試料への結合と比較した、第2の抗体の試料への結合の増加によって、対象におけるB7H3陽性がんが検出されるか、または対象におけるB7H3陽性がんの診断が確認される。

【0262】

一部の場合には、がんは、肝臓がん（肝細胞癌など）、膵臓がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮頸がん、食道がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肺がん、脳がん（神経芽腫または神経膠芽腫など）、小児がん（骨肉腫、神経芽腫、横紋筋肉腫またはユーイング肉腫など）、黒色腫または中皮腫である。

【0263】

一部の例では、対照試料は、がんを有さない対象由来の試料である。特定の例では、試料は血液または組織試料である。

【0264】

診断および検出の方法の一部の実施形態では、B7H3を結合する（例えば、特異的に結合する）抗体は、検出可能な標識で直接的に標識される。別の実施形態では、B7H3（第1の抗体）を結合する（例えば、特異的に結合する）抗体は標識されず、第2の抗体またはB7H3を特異的に結合する抗体を結合することができる他の分子が標識される。当業者にとって周知であるように、第1の抗体の特定の種および分類を特異的に結合することができる第2の抗体が選択される。例えば、第1の抗体がヒトIgGである場合には、二次抗体は抗ヒトIgGであってもよい。抗体に結合することができる他の分子としては、限定されないが、その両方が市販されているプロテインAおよびプロテインGが挙げられる。

【0265】

抗体または二次抗体に対して好適な標識としては、種々の酵素、補欠分子団、蛍光物質、発光物質、磁性剤および放射性物質が挙げられる。好適な酵素の非限定的な例としては、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、ペーターガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられる。好適な補欠分子団複合体の非限定的な例としては、ストレプトアビジン／ビオチンおよびアビジン／ビオチンが挙げられる。好適な蛍光物質の非限定的な例としては、ウンベリフェロン、フルオレセイン、イソチオシアン酸フルオレセイン、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシルまたはフィコエリトリンが挙げられる。非限定的な例示的発光物質はルミノールであり、非限定的な例示的磁性剤はガドリニウムであり、非限定的な例示的放射性標識は、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S または ^3H を含む。

【0266】

代替の実施形態では、B7H3は、検出可能な物質で標識されたB7H3タンパク質標準物質およびB7H3を特異的に結合する未標識抗体を利用する競合イムノアッセイによって、生体試料中でアッセイされ得る。このアッセイでは、生体試料、標識されたB7H3タンパク質標準物質およびB7H3を特異的に結合する抗体が組み合わされ、未標識抗

10

20

30

40

50

体に結合した標識された B 7 H 3 タンパク質標準物質の量が決定される。生体試料中の B 7 H 3 の量は、B 7 H 3 を特異的に結合する抗体に結合した標識された B 7 H 3 タンパク質標準物質の量に反比例する。

【0267】

本明細書に開示されるイムノアッセイおよび方法は、いくつかの目的で使用する事ができる。一実施形態では、特異的に結合する抗体を使用して、細胞培養物中の細胞における B 7 H 3 の生成を検出することができる。別の実施形態では、抗体を使用して、生体試料、例えば、組織試料、または血液もしくは血清試料中の B 7 H 3 の量を検出することができる。一部の例では、B 7 H 3 は細胞表面の B 7 H 3 である。他の例では、B 7 H 3 タンパク質は可溶性である（例えば、細胞培養上清中、または体液試料、例えば血液もしくは血清試料中）。

10

【0268】

一実施形態では、生体試料、例えば血液試料または組織試料中の B 7 H 3 を検出するためのキットが提供される。例えば、対象におけるがんの診断を確認するために、生検を実施して、組織学的調査のための組織試料を得ることができる。ポリペプチドを検出するためのキットは、典型的には、本明細書に開示されるモノクローナル抗体のいずれかなどの、B 7 H 3 を特異的に結合するモノクローナル抗体を含む。さらなる実施形態では、抗体は標識されている（例えば、蛍光、放射性、または酵素標識で）。

【0269】

一実施形態では、キットは、B 7 H 3 を結合する抗体の使用手段を開示する指示資料を含む。指示資料は、書面であっても、電子形態（フロッピー（登録商標）ディスクまたはコンパクトディスクなど）であってもよく、または映像（ビデオファイルなど）であってもよい。キットは、キットが設計される特定の適用を容易にするためにさらなる構成成分も含んでもよい。よって、例えば、キットは、標識を検出する手段をさらに含有してもよい（例えば、酵素標識のための酵素基質、蛍光標識を検出するためのフィルターセット、二次抗体などの適切な二次標識など）。キットは、特定の方法の実践のために日常的に使用されるバッファーおよび他の試薬をさらに含んでもよい。このようなキットおよび適切な内容物は当業者に周知である。

20

【0270】

一実施形態では、診断キットはイムノアッセイを含む。イムノアッセイの詳細は、用いられる特定の形式によって変更され得るが、生体試料中の B 7 H 3 を検出する方法は、一般に、生体試料を、免疫学的に反応性の条件下で、B 7 H 3 と特異的に反応する抗体と接触させるステップを含む。抗体は、免疫学的に反応性の条件下で、免疫複合体を形成するために特異的に結合することが可能であり、免疫複合体（結合した抗体）の存在は直接的または間接的に検出される。

30

【0271】

本明細書に開示される抗体を、以下に限定されないが、ラジオイムノアッセイ（RIA）、ELISA、または免疫組織化学アッセイなどのイムノアッセイにおいて利用することもできる。抗体はまた、蛍光活性化細胞分取（FACS）に使用されてもよい。FACSは、他のより洗練されたレベルの検出の中でも、複数のカラーチャネル、低アングルおよび鈍角の光散乱検出チャネル、ならびにインピーダンスチャネルを用いて、細胞を分離または選別する（米国特許第5,061,620号を参照されたい）。本明細書に開示される、B 7 H 3 を結合するモノクローナル抗体のいずれかをこれらのアッセイにおいて使用することができる。よって、限定されないが、ELISA、RIA、FACS、組織の免疫組織化学、ウエスタンブロットまたは免疫沈降を含む従来のイムノアッセイにおいて抗体を使用することができる。

40

【0272】

以下の実施例は、ある種の特定の特色および／または実施形態を例示するために提供される。これらの実施例は、本開示に記載された特定の特色や実施形態に限定するものと解釈されるべきではない。

50

【実施例】

【0273】

(実施例1)

材料および方法

この実施例は、実施例2において記載される研究に使用される材料および実験手順について記載する。

細胞系

【0274】

8つの癌細胞系（Hep3B、HepG2、IMR32、MC38-B7H3+、A431、IMR32-B7H3 KO、およびMC38-B7H3 KO）を10%のウシ胎仔血清（HyClone、Logan、UT）、1%のL-グルタミン、および1%のペニシリン-ストレプトマイシン（Invitrogen）を補充したDMEM培地（Invitrogen、Carlsbad、CA）中で培養し、残部が空気の5%CO₂中で37℃にてインキュベートした。神経芽腫細胞系NBEBを、DMEMと同じ補充物を含むRPMI-1640培地中で培養した。培地は週に2回新しくした。

タンパク質の発現および精製

【0275】

B7H3の細胞外ドメイン（GenBank受託番号NP_001019907、アミノ酸29～466；配列番号13）をhFcタグと融合させた。B7H3-hFcを293F細胞中で発現させた。hFcタグ対照であるIAB-hFc（Kaneko et al., J Biol Chem, 284, 3739-3749, 2009）を同じ方法で生成した。タンパク質精製は、プロテインAカラム（GE Healthcare）を使用して実現した。ウサギVHドメイン抗体をVH-His-FLAG融合様式においてE. coliで発現させた。6×HisタグをNickelカラム（GE Healthcare）による親和性精製に使用し、FLAGタグをELISAによるタンパク質結合アッセイおよびフローサイトメトリーによる細胞結合アッセイに使用した。

DNAオリゴおよびウサギVHファージライブラリーの構築

【0276】

ウサギVH cDNA断片を増幅させるために、VH cDNAの5'末端と3'末端にアニーリングするフォワードプライマーとリバースプライマーを文献（Peng et al., J Mol Biol, 429, 2954-2973, 2017）に従って合成した。プライマーを表1に列挙し、下線を付したヌクレオチドはSfiI制限酵素部位に対応する。

表1：ウサギVHファージライブラリーの構築のためのプライマー

【表1-1】

プライマー	配列	配列番号：
VH-F1	gaggagtt <u>GGCCCAGGCGGCC</u> CAGTCGGTGGAGGAGTCCRGG	14
VH-F2	gaggagtt <u>GGCCCAGGCGGCC</u> CAGTCAGTGAAGGAGTCCGAG	15
VH-F3	gaggagtt <u>GGCCCAGGCGGCC</u> CAGTCGYTGGAGGAGTCCGGG	16

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

プライマー	配列	配列番号:
VH-F4	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCCAGGAGCAGCTGGAGGAGTCCGGG	17
VH-F5	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCCAGGAGCAGCTGAAGGAGTCCGG	18
VH-F6	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCCAGRAGCAGCTGGTGGAGTCCGG	19
VH-F7	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCCAGGAGCAGCAGAAGGAGTCCGGG	20
VH-F8	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCCAGTCGCTGGAGGAGTCCAGG	21
VH-F9	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCCAGTCGCTGGGGGAGTCCAGG	22
VH-F10	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCCAGACAGTGAAGGAGTCCGAG	23
VH-F11	gaggagttGGCCCAGGCGGCCCCAGTCGCTGGAGGAATTCGGG	24
VH-R1	gaggagttTGGCCGGCCTGGCCTGARGAGAYGGTGACCAGGGTGCC	25
VH-R2	gaggagttTGGCCGGCCTGGCCTGAAGAGACGGTGACGAGGGTCCC	26

10

【0277】

ウサギVH cDNAを、製造業者の指示（ThermoFisher、カタログ#18091050）に従ってInvitrogen（商標）SuperScript（商標）IV First-Strand Synthesisキットを使用して、免疫した脾臓から単離した総RNAから合成した。各フォワードプライマーを2つのリバースプライマー（R1またはR2）のうちの1つと対合させ、22個の組合せのフォワード／リバースプライマーを使用して、VH cDNA断片を増幅させた。PCR産物をゲル精製し、制限酵素SfiI（NEB、カタログ#R0123S）で消化し、その後、同じ酵素で予め消化させたpComb3xプラスミドとライゲーションさせた。10マイクログラムのライゲーション産物を使用して、製造業者の指示に従って、電気穿孔によって、0.6mlのE. coli TG1コンピテントセル（Lucigen、カタログ#60502-2）を形質転換させた。形質転換されたTG1細胞を、150rpmで振盪しながら、37℃で45分間回収し、次いで1Lの2XYT培地中に接種し、250rpmで振盪しながら、37℃でさらに1時間培養した。その後、 1×10^{10} 個のヘルパーファージM13KO7（NEB、カタログ#N0315S）を細胞培養物に添加し、37℃で4時間インキュベーションを継続した。細胞培養物を3300gで30分間遠心分離して、細胞デブリをペレット化させ、ファージ粒子を含有した上清を採取し、3/10体積のPEG8000／NaCl溶液（使用前にオートクレーブした2.5MのNaCl溶液中の20%のPEG）と混合した。ファージ／PEG溶液混合物を氷上で4時間インキュベートし、3300gで30分間遠心分離した。最終のファージペレットを20%のグリセロールを含有するPBS緩衝液100ml中に再懸濁させ、1ml体積のサイズにアリコートし、-80℃で保存した。

20

30

40

ファージパニング方法

【0278】

固定したB7H3-hFcタンパク質を使用して、ファージパニングを行った。hFcタグ結合剤を排除するために、IAB-hFc対照も並行して固定した。ELISAプレート（96ウェル）にB7H3-hFcおよびIAB-hFcタンパク質（PBS中100μg/ml）を50μl／ウェルでコーティングし、37℃で1時間インキュベートした。コーティングしたタンパク質溶液を廃棄した後、プレートおよびファージ溶液を、2%のBSAを含有するPBS緩衝液と混合することによって予めブロッキングし、37℃で30分間インキュベートした。ブロッキング緩衝液を廃棄した後に、予めブロッキングしたファージ溶液をIAB-hFcプレートに添加して、37℃で1時間インキュベート

50

することによってhFc結合剤を枯渇させた。その後、未結合ファージ溶液をB7H3-hFcプレートに移し、37℃で1時間インキュベートした。B7H3特異的ファージ結合剤を、pH2.0のクエン酸緩衝液でインキュベートすることによってプレートから溶出し、pH8.0のTris-HCl緩衝液で直ちに中和した。溶出したアウトプットファージを新鮮なTG1細胞の再感染によって再増幅させ、再増幅されたファージを次の回のパニングのためのインプットとして使用した。3回のパニング後に、単一のコロニーをアウトプットファージに感染したTG1細胞から無作為に選び、モノクローナルファージELISAを行って、B7H3特異的結合剤を同定した。

ファージELISA

【0279】

ELISAプレート(96ウェル)をB7H3-hFcおよびIAB-hFcタグ対照でコーティングした。2%のBSAを含有するPBS緩衝液でブロッキングした後、50マイクロリットルの予めブロッキングしたファージ溶液をプレートに添加し、37℃で30分間インキュベートした。0.05%のTween(登録商標)20を含有するPBS緩衝液でプレートを2回洗浄した後に、HRPにコンジュゲートした抗M13抗体(Sinobiological、カタログ#11973-MM05T-H)によってファージ結合を検出した。

【0280】

抗体結合ELISAのために、様々な濃度の抗体(100μg/mLから開始して1:2の段階希釈)を上記のようにB7H3-hFcでコーティングしたプレート上でインキュベートし、HRPにコンジュゲートした抗FLAGマウスモノクローナル抗体M2(Sigma、カタログ#A8592)によって抗体結合を検出した。

フローサイトメトリー方法

【0281】

トリプシン-EDTA(ThermoFisher、カタログ#25200114)で剥離することによって細胞を回収し、遠心分離してペレットを形成し、氷冷したPBS中に再懸濁させた。1mL当たり100万個の細胞を10μg/mLのB7H3ドメイン抗体と共にインキュベートした。APCにコンジュゲートした抗FLAGマウスモノクローナル抗体(Biolegend、カタログ637308)によって、抗体結合を検出した。生細胞に関連する蛍光をFACS Calibur(BD Biosciences、Franklin Lakes、NJ)を使用して測定した。

統計分析

【0282】

GraphPad Prism(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA)を使用してすべての統計分析を行った。

(実施例2)

タンパク質免疫およびファージディスプレイによるB7H3に対するウサギナノボディの生成

【0283】

この実施例は、2つのB7H3特異的ウサギ単ドメインVHモノクローナル抗体の選択および特徴付けについて記載する。

組換えB7H3タンパク質の調製

【0284】

B7H3の細胞外ドメイン(ECD)(NP_001019907、アミノ酸29~466;配列番号13)をヒトIgG1Fcと融合させ、分泌によってHEK293細胞において発現させた。プロテインAカラムで精製した後、SDS-PAGEでランすることによって純度をチェックした(図1)。還元B7H3-hFcの理論的サイズは約75kDであり、B7H3が6つのN-グリコシル化部位を有するため、おそらくグリコシル化に起因して、ゲル上での見かけの移動位置は約100kDである。B7H3-hFcの一過性の発現レベルは極端に低く、約0.5mg/Lである。

組換え B7H3-hFc によるウサギの免疫

【0285】

PBS 緩衝液中 100 マイクログラムの B7H3-hFc を等しい体積のフロイントアジュバントと混合し、雌のニュージーランド白色家兎に筋肉内注射した。14 日間の間隔を空けた 3 回の免疫後に、hFc 対照として IAB-hFc を使用して、抗 B7H3-hFc の力価を ELISA によって測定した (図 2A)。IAB はメソテリン (Q13421、アミノ酸 296~359) の断片である (Kaneko et al., J Biol Chem, 284, 3739-3749, 2009)。2 回目 (M2) および 3 回目 (M3) の免疫の血清は、IAB-hFc タグ対照と比較して増加した B7H3-hFc への結合をはっきりと示した。ポリクローナル血清の細胞結合活性をフローサイトメトリーによってチェックした (図 2B)。最終免疫のポリクローナル血清は、B7H3 陽性である肝細胞癌細胞系 Hep3B および HepG2 への明確な細胞結合を示し (Wang et al., Cancer Invest, 32, 262-271, 2014; Qiu et al., Clin Chim Acta, 485, 103-105, 2018)、一方、免疫前の血清は極端に低いバックグラウンド結合を有した。ELISA とフローサイトメトリーの両方の結果は、このタンパク質が特にヒトとウサギの間で高度に保存的であるにもかかわらず、B7H3 がウサギにおいて良好な免疫原性を有することを示した。

10

B7H3 特異的結合剤のスクリーニング

【0286】

免疫の成功の確認後に、免疫されたウサギの脾臓を回収し、縮重プライマーを使用して VH 遺伝子断片をクローニングし (Peng et al., J Mol Biol, 429, 2954-2973, 2017)、その後、ファージディスプレイベクター pComb3x でライゲーションした。10 マイクログラムのライゲーションを使用して、電気穿孔によって TG1 コンピテントセルを形質転換し、 7×10^9 個のサイズの個々のクローンにより VH ライブラリーを作製した。ライブラリーファージ生成とその後の抗原パニングの両方を 37°C で行った。

20

【0287】

パニングを固定した B7H3-hFc 上で実施した。B7-H6-hFc と IAB-hFc の両方を 96 ウェル ELISA プレート上にコーティングし、B7H3 特異的ファージ粒子を、IAB-hFc をコーティングしたプレート上に予め吸収させることによって富化し、次いで、B7H3-hFc をコーティングしたプレート上で捕捉した。3 回のパニング後に、モノクローナルファージ ELISA を実施して、B7H3 特異的結合剤を同定した。96 個の無作為に選んだクローンのうち、41 個が B7H3 特異的結合剤であり、シーケンシング分析によって、RFA1 および RFB1 という名称の 2 つの代表的な結合剤を同定した (図 3A)。これら 2 つの結合剤は、ウサギ抗ハイプシン mAb (Gen Bank 構造データベースに寄託された、PDB # 5DUB) 由来の VH と類似している、非常に類似する生殖系列配列を共有した。

30

【0288】

オンラインツールを使用する A1 および B1 の構造モデリングは、それらが、ウサギ抗ハイプシン VH (PDB # 5DUB) の結晶構造にも類似している、類似する CDR1 および CDR2 ループ立体構造を有し得ることを示したが、それらの CDR3 ループは異なっているように見えた (図 3B)。

40

B7H3 結合剤の結合特性

【0289】

結合剤 A1 および B1 の VH コード配列を、それらの C 末端で His-FLAG タグと融合させ、E.coli 発現ベクターにクローニングした。可溶性 VH ドメインを、研究室のプロトコールに従って、ワンステップ Ni-親和性クロマトグラフィーによって精製した (Feng et al., Antib Ther, 2, 1-11, 2019)。精製収量は、それぞれ、2 mg/L (A1) および 10 mg/L の発酵 (B1) であっ

50

た。純度は、SDS-PAGEで分離したとおり、高かった（図4A）。RFA1およびRFB1のタンパク質結合親和性をELISAによって測定し、EC50の計算値は、403 nM（A1）および189 nM（B1）であり（図4B）、これらは比較的低い、VHのみのドメイン抗体について共通している。細胞結合能もまた、フローサイトメトリーによって試験し（図4C）、A1およびB1結合剤が、B7H3陽性細胞系（IMR32、MC38-B7H3+、A431、およびNBEB）に対して良好な細胞結合を有するが、B7H3ノックアウト細胞系IMR32-B7H3 KO、MC38-B7H3 KOには有さなかったことを示した。

治療適用

【0290】

ウサギは、研究ツールとして、診断、および治療目的で使用される優れたモノクローナル抗体を生成するための傑出した供給源である（Weber et al., Exp Mol Med, 49, e305, 2017）。ウサギ抗体を使用するためのいくつかの主要な利点が存在する。第1に、ウサギは、系統発生的に、マウスよりもヒトからより離れており、したがって、マウスにおいて免疫原性に乏しい保存タンパク質は、ウサギにおいてより良好な免疫原性を有し得る（Popkov et al., J Mol Biol, 325, 325-335, 2003）。第2に、ウサギモノクローナル抗体は、一般に、高親和性、具体的には20~200 pMの親和性範囲を有する（Weber et al., Exp Mol Med, 49, e305, 2017; Landry et al., J Immunol Methods, 417, 86-96, 2015）。第3に、ウサギモノクローナル抗体は上手くヒト化することができ（Zhang and Ho, MAbs, 9, 419-429, 2017）、したがって、免疫原性は、その治療適用に対する障壁であるべきではない。多くの利点にもかかわらず、わずかなウサギモノクローナル抗体しか、臨床適用に関して調査されていない。

【0291】

ウサギモノクローナル抗体全体は、優れた研究試薬として長年にわたり広く使用されているが、ウサギVHドメイン抗体の潜在的利点は活用されていない。最近、あるグループが、高親和性ウサギVHドメイン抗体が低温（すなわち、16℃）のファージディスプレイ方法によって生成され得ることを実証し（Shinozaki et al., Sci Rep, 7, 5794, 2017）、このことは、ウサギVHドメイン抗体の研究を大いに加速させるであろう。しかし、低温ファージディスプレイ方法は、不安定かつ発現しにくい結合剤のかなりの部分を富化する傾向があり、このことは、物理化学特性、特に発現および熱安定性を改善するのにかなりの努力を必要とするかもしれない（Shinozaki et al., J Biosci Bioeng, 125, 654-661, 2018）。現在の研究は、高温ファージディスプレイ方法を使用して、熱安定性で十分に発現される結合剤をスクリーニングする可能性を調査した。

【0292】

概念実証として、B7H3を標的として選択した。B7H3は多くのがん型で過剰発現され、これはT細胞活性化を阻害し得るため、B7H3は、B7およびCD28ファミリーの重要な免疫チェックポイントのメンバーとみなされる（Picarda et al., Clin Cancer Res, 22, 3425-3431, 2016）。B7H3はまた、多くの固形腫瘍においても広範囲にわたって過剰発現され、治療標的とされる（Seaman et al., Cancer Cell, 31, 501-515 e508, 2017）。B7H3の細胞外ドメインは293F細胞において発現されたが、発現レベルは非常に低かった（<0.5 mg/L）。B7H3は、ヒト、マウス、およびウサギの間で高度に保存されているが、組換えB7H3-hFcタンパク質は、組換えタンパク質とB7H3陽性細胞の両方を結合することができる免疫ポリクローナル血清によって示されるように、ウサギにおいて適当な免疫原性を有した。高温（37℃）ファージディスプレイ方法を使用して、ウサギVHファージライブラリー粒子を作製し、パニングを実施した。B7H3タンパク質およびB7H3陽性がん細胞に対して中程度の親和

10

20

30

40

50

性を有する2つの代表的な結合剤を得た。RFA1およびRFB1結合剤は、B7H3陽性細胞に対して良好な細胞結合を有するが、B7H3ノックアウト細胞には有さない。この研究は、中程度の親和性および発現レベルを有するウサギVHドメイン抗体が通常温度（37℃）でのファージディスプレイによって生成され得ることを実証した。T細胞機能を調節する際のB7H3の重要な役割を考慮すると、生成した2つのB7H3ドメイン抗体をがん免疫療法適用に使用することができる。

（実施例3）

ファージディスプレイによるB7H3を標的とするラクダナノボディ（CD276）の単離【0293】

この実施例は、ファージディスプレイライブラリーからの10個のラクダV_HHナノボディの選択およびそれらの結合特性の特徴付けについて記載する。V_HHナノボディから構成されるキメラ抗原受容体についても記載される。

B7H3結合剤に関する8つのラクダV_HHライブラリーでのファージパニング【0294】

B7H3-Fc融合タンパク質を生成して、B7H3結合剤のために選択した。組換えB7H3-Fc融合タンパク質をHEK-293細胞中で発現させ、AKTA Explorer（GE Healthcare）を使用してプロテインAカラム（GE Healthcare）で精製した。精製したB7H3-Fc融合タンパク質は、SDA-PAGEゲル上で示されるように99%を超える純度であり、非還元条件下で154kDaおよび還元条件下で77kDaの分子量を有した（図5）。B7H3-Fcの収量は2mg/Lであった。

【0295】

8個体のラクダ（Camelus dromedaries）から作製された8つのV_HH単ドメイン抗体ライブラリーを使用して、組換えB7H3-Fcタンパク質でのファージパニングを3回行った。各回のファージ力価を図6に示す。3回目のファージパニングにおけるファージ力価の増加は、B7H3への高親和性V_HH結合剤の富化を示した。B7H3-Fcでのファージ結合もELISAによって評価した；結果を表2に示す。選択したファージのすべては、B7H3-Fcに結合することができたが、IgG対照には結合できなかった。

表2： ELISAによるB7H3-Fcでの選択されたファージ結合

【表2-1】

ファージ	B7H3-Fc	IgG
RWA12	2.50985	0.1147
RWB2	2.54615	0.0777
RWH5	2.88595	0.06665
RWB12	2.4812	0.1637
RWG8	2.5186	0.10125
RWD5	2.4972	0.0685
RWC3	2.422	0.08885
RWG4	2.1349	0.10345
RWD9	2.43255	0.07875
RWC4	2.6597	0.07775

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

ファージ	B7H3-Fc	IgG
RWH1	2.75015	0.13615

【0296】

サル、マウス、ラットおよびヒト B 7 H 3 への選択した B 7 H 3 特異的ファージの結合を E L I S A によって試験した。表 3 に示されるように、選択したファージのうちの 9 つがサル B 7 H 3 に結合することができ、5 つのファージがマウス B 7 H 3 に結合することができ、9 つのファージがラット B 7 H 3 に結合することができ、8 つのファージがヒト B 7 H 3 に結合することができた（太字の数は正の結合を示す）。

表 3： E L I S A による選択した B 7 H 3 ファージの異種間の結合

【表 3】

ナノボディ	サル	マウス	ラット	ヒト	非関連抗原
RWA12	2.4321	0.0693	2.5233	2.4312	0.132866667
RWB2	0.5782	1.0528	0.9811	2.5281	0.068366667
RWH5	2.2212	1.8958	2.3675	2.6701	0.057433333
RWB12	2.3071	1.7129	2.0702	2.7355	0.059666667
RWG8	2.4277	2.4724	2.4365	2.6674	0.0659
RWD5	0.2668	0.0819	0.8712	2.1256	0.0583
RWC3	0.2278	0.0759	0.7381	2.1403	0.065433333
RWG4	0.1904	0.0665	0.2924	1.7249	0.1396
RWD9	0.2366	0.0782	0.7776	2.2122	0.1126
RWC4	1.5397	0.3663	0.7968	2.4956	0.0764
RWH1	0.0706	0.0738	0.0951	2.0343	0.0608
PBS	0.0633	0.085	0.0927	0.0485	0.072966667

V_HH の精製および結合

【0297】

V_HH ナノボディを選択したファージから精製した。RWC 4、RWG 8 および RWB 12 ナノボディの精製を図 7～9 に示す。AKTA Explorer (GE Healthcare) から溶出した V_HH ラクダナノボディ画分を SDS-PAGE に供した（図 7 A、8 A および 9 A を参照されたい）。AKTA Explorer (GE Healthcare) 上のニッケルカラム (GE Healthcare) から溶出したナノボディのクロマトグラフを図 7 B、8 B および 9 B に示す。RWC 4、RWG 8 および RWB 12 の収量は、それぞれ、33.8 mg/L、50 mg/L および 132 mg/L であった。

【0298】

hB7H3-Fc、hB7H3-His、マウス B7H3-His、サル B7H3-His およびラット B7H3-His 融合タンパク質での選択した V_HH ナノボディの結合を E L I S A によって測定した。結果を表 4 および図 22 に示す。RWB 2 を除いて、V_HH は、B7H3-Fc および B7H3-His 融合タンパク質に結合することが可能であった。RWG 8 は、マウス B7H3 への交差反応性を示した（図 22）。さらに、RWA 12 は、PBS および PDL 1 との交差反応性を示し、残りの V_HH は、PDL 1 と交差反応しなかった（表 5）。

表 4 : E L I S A による B 7 H 3 融合タンパク質での選択した V_HH の結合
【表 4】

V _H H	hB7H3-Fc	hB7H3-His	サル B7H3-His	ラット B7H3-His	非関連抗原
RWH1	2.594	2.6469	1.2967	0.1341	0.1309
RWH5	0.2128	0.3736	0.09795	0.30495	0.07635
RWG8	0.6408	1.03935	0.117	0.06955	0.0562
RWB12	0.56795	0.6859	0.1644	0.0574	0.04945
RWC4	2.0192	2.4388	0.28845	0.158	0.0719
RWA12	2.1821	2.40585	2.02145	1.99375	1.42755
RWG4	2.5413	2.55455	1.8126	1.49675	0.0541
RWB2	0.0884	0.152	0.07985	0.0986	0.11535
RWC3	2.34075	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RWD5	2.3737	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
RWD9	0.49865	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PBS	0.064	0.0697	0.07795	0.13435	0.08595

10

20

表 5 : E L I S A による P D - L 1 での選択した B 7 H 3 結合剤の交差反応
【表 5】

V _H H	PD-L1	PBS
RWA12	0.9937	0.444
RWH1	0.0753	0.04645
RWH5	0.08255	0.0478
RWG8	0.0715	0.05055
RWB2	0.0522	0.0423
RWG4	0.0614	0.0474
RWC4	0.04305	0.04855
RWB12	0.04545	0.0475
RWC3	0.0454	0.04985
RWD9	0.0438	0.05345
RWD5	0.04705	0.0585
PBS	0.04565	0.07345

30

40

B 7 H 3 発現細胞への選択した B 7 H 3 標的化 V_HH の結合
【 0 2 9 9 】

選択 B 7 H 3 標的化 (t a r a g e t e d) V_HH ナノボディの N B E B 神経芽腫細胞への結合を F A C S 解析によって評価した (図 1 0) 。試験抗体 (R W C 4 、 R W B 1 2 、 R W G 8 、 R W A 1 2 、 R W G 4 および R W D 5) のうちの 6 つは N B E B 細胞を結合することが可能であった。

50

【0300】

選択B7H3標的化 (targeted) V_HHナノボディのA431類表皮癌細胞への結合をFACS解析によって評価した (図11)。試験抗体 (RWC4、RWB12、RWG8、RWA12、RWG4およびRWD5) のうちの6つはA431細胞を結合することが可能であった。

【0301】

B7H3標的化抗体 (RWC4、RWB12、RWG8、RWG4およびRWD5) のうちの5つを、MC38-CD276+およびMC38-CD276KO細胞を結合するそれらの能力についても評価した。すべての試験抗体は、B7H3陽性細胞に結合したが、B7H3陰性細胞には結合しなかった (表6を参照されたい)。

表6：5つのV_HHの細胞結合能の概要

【表6】

MC38- CD276+	陽性率			
	50 μg/ml	10 μg/ml	2 μg/ml	0.5 μg/ml
RWC4	98.80%	98.30%	84.70%	14.40%
RWB12	12%	4.16%	0.18%	0.23%
RWG8	26.50%	4.68%	0.31%	0.10%
RWG4	91.50%	85.80%	23.40%	1.25%
RWD5	88.90%	44.90%	1.44%	0.19%

MC38- CD276KO	陽性率	
	50 μg/ml	10 μg/ml
RWC4	0.17%	0.24%
RWB12	0.37%	0.19%
RWG8	0.76%	0.25%
RWG4	0.13%	0.06%
RWD5	0.56%	0.12%

結合動態

【0302】

RWC4およびRWG4の会合／解離特性を、組換えヒトB7H3-Fcタンパク質または組換えマウスB7H3-Hisタンパク質のいずれかを使用して、Octetシステム (Creative Biolabs) で測定した。

【0303】

ヒトB7H3-FcへのRWC4の結合の動態を図12に示し、表7にまとめる。ヒトB7H3-Fcに関するRWC4のK_Dは 3.8×10^{-9} であった。

表7：ヒトB7H3-Fcに関するRWC4の動態

【表7】

nM	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
660	3.8×10^{-9}	2.65×10^4	1.01×10^{-4}
132	3.8×10^{-9}	2.65×10^4	1.01×10^{-4}
26.4	3.8×10^{-9}	2.65×10^4	1.01×10^{-4}

【0304】

ヒトB7H3-Fcに関するRWG4の動態を図13に示し、表8にまとめる。ヒトB7H3-Fcに関するRWG4のK_Dは 6.94×10^{-9} であった。

表8：ヒトB7H3-Fcに関するRWG4の動態

10

20

30

40

50

【表 8】

nM	K _D (M)	k _{on} (1/Ms)	k _{dis} (1/s)
660	6.94 x 10 ⁻⁹	9.13 x 10 ³	6.34 x 10 ⁻⁵
528	6.94 x 10 ⁻⁹	9.13 x 10 ³	6.34 x 10 ⁻⁵
264	6.94 x 10 ⁻⁹	9.13 x 10 ³	6.34 x 10 ⁻⁵
198	6.94 x 10 ⁻⁹	9.13 x 10 ³	6.34 x 10 ⁻⁵
66	6.94 x 10 ⁻⁹	9.13 x 10 ³	6.34 x 10 ⁻⁵
33	6.94 x 10 ⁻⁹	9.13 x 10 ³	6.34 x 10 ⁻⁵

10

種々のがん細胞系での B 7 H 3 の発現

【 0 3 0 5 】

FACSによって、B 7 H 3 の発現に関して、いくつかのがん細胞系を評価した。14種の細胞系では発現を検出したが、B 7 H 3 (C D 2 7 6) をノックアウトされた2種の細胞系では検出されなかった(表 9 を参照されたい)。

表 9 : B 7 H 3 発現細胞の概要

【表 9 - 1】

細胞系(がん型)	B7H3 発現
A431(ヒト類表皮癌)	+
NBEB(ヒト神経芽腫)	+
IMR5(ヒト神経芽腫)	+
MC-38-CD276+(マウス結腸腺癌細胞)	+
MC-38-CD276KO(マウス結腸腺癌細胞)	-
IMR32(ヒト神経芽腫)	+
IMR32-CD276KO(ヒト神経芽腫)	-
H9(ヒト皮膚Tリンパ球)	+
EKVX(ヒト肺腺癌)	+
LAN-1(ヒト神経芽腫)	+
H2269(ヒト黒色腫)	+
C55	+
Miaca2	+

20

30

40

【表 9 - 2】

細胞系(がん型)	B7H3 発現
OVCAR8(ヒト卵巣がん)	+
BXPC-3(腺癌)	+

B 7 H 3 標的化 C A R の生成

50

【0306】

第1に、PCRを実施してナノボディ配列を増幅し、プラスミドPwptの骨格およびPCR産物をそれぞれ、NdeIおよびSpeIで消化し、消化した骨格を消化したPCR産物とライゲーションした。形質転換後に、アンピシリンプレート上で細菌を選択した。

【0307】

B7H3標的化CARを発現するレンチウイルスのT細胞トランスフェクション効率をFACSによって測定した。結果を図14および表10に示す。

表10： CAR-T細胞のトランスフェクション効率

【表10】

CAR-T	トランスフェクション効率
モック	0.15%
RWH5	87.2%
RWB2	71%
RWC3	73%
RWD9	48.3%
RWH1	56.7%
RWB12	88.8%
RWG8	78.6%
RWD5	69.5%
RWC4	83.3%
RWG4	64.2%

10

20

B7H3を標的とするCAR-T細胞の細胞傷害性

【0308】

B7H3標的CAR-T細胞を、B7H3陽性およびB7H3ノックアウト細胞に対する細胞傷害性について試験した。図15は、B7H3陽性ヒト神経芽腫NBE細胞（図15A）、ヒト神経芽腫LAN-1細胞（図15B）、ヒト腺癌BXP-3細胞（図15C）、およびヒト膵癌MiacaPa2細胞（図15D）を使用する細胞傷害性アッセイの結果を示す。このアッセイでは、RWB12、RWG8およびRWC4のCAR-T細胞は、特異的溶解を誘導するのに最も効果的であった。

30

【0309】

第2のアッセイでは、B7H3陽性およびB7H3ノックアウト細胞におけるB7H3を標的とするCAR-T細胞の細胞傷害性を評価した。図16は、ヒト神経芽腫IMR32細胞（図16A）、マウス結腸腺癌MC38-CD276⁺細胞（図16B）、ヒト神経芽腫IMR32-CD276^{-/-}細胞（図16C）、およびマウス結腸腺癌MC38-CD276^{-/-}細胞（図16D）を使用する細胞傷害性アッセイの結果を示す。CAR-T細胞のうちの3つ（RWB12、RWG8およびRWC4）は、B7H3陽性細胞での強力な細胞傷害性を示したが、B7H3陰性細胞では示さなかった。

40

（実施例4）

B7H3標的化CAR-T細胞は*in vitro*および*in vivo*で膵腫瘍細胞を死滅させる

【0310】

ヒトB7H3標的化ナノボディ由来のCAR-T細胞（本明細書においてB12、G8、およびC4と短縮したRWB12、RWG8、およびRWC4）の*in vitro*での細胞傷害性を、ルシフェラーゼを発現する2種のB7H3陽性膵臓がん細胞系：Pan

50

c-1 GFP-Luc (GL) および BxPC-3 GL を使用して評価した。第1に、フローサイトメトリーを実施して、Panc-1 細胞と BxPC-1 細胞の両方が B7H3 を発現することを確認した (図17A)。それぞれ B7H3 標的化 CAR、および CD19 を標的とする CAR を発現するレンチウイルス構築物の形質導入効率もまた、フローサイトメトリーによって決定した。図17B に示されるように、G8、C4 および B12 CAR の形質導入効率は、それぞれ、60.4%、58.6%、および 68.4% であったが、無関係の CAR (CD19) を有する T 細胞の形質導入効率は 32% であった。細胞傷害性を評価するために、B7H3 標的化 (C4、G8 および B12) CAR T 細胞 および 対照 (CD19) CAR T 細胞を、様々なエフェクター：標的 (E:T) 比で 24 時間、Panc-1 GL 細胞または BxPC-3 GL 細胞と共にインキュベートした。Panc-1 GL 細胞と BxPC-3 GL 細胞の両方は、3 種の B7H3 標的化 CAR T 細胞のすべてによって、用量依存的に効果的に溶解された一方、対照 CAR T 細胞から最小限の殺滅が観察された。これらの結果は、B7H3 標的化ナノボディベースの CAR T 細胞が、*in vitro* で、B7H3 陽性膵臓がんの細胞系を効率的に溶解させることができたことを実証する。

【0311】

B7H3 標的化 CAR T 細胞を、Panc-1 マウス異種移植モデルにおいてさらに評価した。1つの研究は高用量の CAR T 細胞 (1000 万個) を利用し、第2の研究はより低用量 (500 万個の CAR T 細胞) を利用した。高用量研究に関する実験設計の概略図を図18A に示す。100 万個の Panc-1 GFP/Luc 腫瘍細胞を NSG マウスに *i.v.* 移植して、腫瘍モデルを確立した。20 日後 (0 日目) に、マウスに 1000 万個の C4、G8 または B12 CAR T 細胞 (または対照の CD19 CAR T 細胞) を *i.v.* 注入し、イメージングを毎週実施した。Panc-1 腫瘍成長の代表的なバイオルミネセンスイメージを図18B に示す。1000 万個の B7H3 標的化 CAR T 細胞 (C4、G8 または B12) で処置したマウスは、CAR T 細胞で処置したマウスにおいて 1 秒当たりの光子として測定した、腫瘍バイオルミネセンスの低下によって証明されるように、対照 CAR T 細胞の注入と比較して、腫瘍成長の有意な低下を示した (図18C)。B7H3 標的化 CAR T 細胞で処置したマウスの生存期間も決定した。図18D は、1000 万個の C4、G8 または B12 CAR T 細胞による処置後の腫瘍保有マウスの Kaplan-Meier 生存曲線を示す。結果は、C4 CAR T 細胞が、高用量 (1000 万個) で投与された場合に、G8 または B12 CAR T 細胞よりもマウスの生存を促進するのに有力であることを実証し、1000 万個の CAR T 細胞の投与がマウスにとって安全であることを示す。

【0312】

第2の *in vivo* 研究は、腫瘍再負荷後に注入したより低用量の B7H3 特異的 CAR T 細胞による Panc-1 腫瘍保有マウスの処置について評価した。この研究の実験設計の概略図を図19A に示す。Panc-1 異種移植マウスに、100 万個の Panc-1-Luc 細胞の接種の 20 日後 (0 日目) に、500 万個の C4 CAR T 細胞、500 万個の B12 CAR T 細胞、500 万個の形質導入されていない T 細胞 (モック) または PBS を *i.v.* 注入した。検出可能な腫瘍を示さなかった C4 CAR T 細胞 および B12 CAR T 細胞で処置したマウスに、35 日目に、100 万個の Panc-1 細胞を *i.v.* 移植した。対照として、ナイーブマウスに Panc-1 細胞を移植した。イメージングを毎週実施した。CAR T 細胞で処置したマウスにおける Panc-1 腫瘍成長の代表的なバイオルミネセンスイメージを図19B に示す。500 万個の C4 CAR T 細胞または 500 万個の B12 CAR T 細胞で処置したマウスは、モック T 細胞または PBS を投与したマウスと比較して、有意に低下した腫瘍成長を示した。対照マウスでは腫瘍が急速に成長したが、C4 CAR T 細胞で以前に処置したマウスの 100% は、Panc-1 腫瘍を再負荷した後も腫瘍を有さないままであり、B12 CAR T 細胞で以前に処置したマウスの 60% は、処置の 10 週間後まで腫瘍を有さないままであった。腫瘍バイオルミネセンスの定量を図19C に示す。B7H3 標的化 CAR T 細胞

胞で処置したマウスの生存期間も決定した。図19Dは、処置後の腫瘍保有マウスのKaplan-Meier生存曲線を示す。500万個のC4またはB12 CAR T細胞を受けたマウスは、70日目にも依然として生存していた。対照的に、PBSまたはモックT細胞で処置したマウスは、注入後30日を超えて生存しなかった。

(実施例5)

B7H3標的化CAR T細胞は、*in vitro*および*in vivo*で神経芽腫腫瘍細胞を死滅させる

【0313】

神経芽腫細胞系IMR5に対するB7H3標的化CAR T細胞の*in vitro*での細胞傷害性について試験した。この研究は、本明細書に開示されるB7H3標的化ナノボディを使用して生成したCAR T細胞を、市販の抗ヒトB7H3ハイブリドーマ抗体376.96に基づくCAR T細胞(Duet al., Cancer Cell 35(2): 221-237, 2019)と比較した。G8、B12、C4および376.96 CAR T細胞をIMR5 GL細胞と共に、様々なエフェクター：標的(E:T)比で24時間インキュベートした。すべてのCAR T細胞が、モックT細胞と比較して、用量依存的にIMR5腫瘍細胞を効果的に溶解させたが、B12 CAR T細胞は、試験した他のCAR T細胞よりもわずかに効果的であった(図20A)。

【0314】

次に、CAR T細胞をIMR5異種移植モデルにおいて評価した(図20Bの概略図を参照されたい)。IMR5異種移植マウスに、腫瘍接種の35日後(0日目)に、500万個のC4 CAR T細胞、B12 CAR T細胞、G8 CAR T細胞、376.96 CAR T細胞または形質導入されていないT細胞(モック)を*i.v.*注入した。異種移植モデルにおけるIMR5腫瘍成長の代表的なバイオルミネセンスイメージを図20Cに示し、腫瘍バイオルミネセンスの定量を図20Dに示す。500万個のB12 CAR T細胞で処置したマウスは、376.96 CAR T細胞およびモックT細胞と比較して有意に低下した腫瘍成長を示した。C4 CAR T細胞も中程度の抗腫瘍活性を示した。

(実施例6)

G8のマウスB7H3に対する交差反応性

【0315】

抗B7H3ナノボディG8、C4およびB12のマウスB7H3への結合活性をフローサイトメトリーによって測定した。G8は、3つのKPC細胞系(CREP128096、CREP133239、およびPDA95775；膵管腺癌細胞)およびマウス黒色腫細胞系B16で発現されるマウスB7H3への正の結合を示したが、C4もB12も示さなかった。B7H3標的化CARの*in vitro*での細胞傷害性を、B16黒色腫細胞およびB7H3(CD276)ノックアウト細胞を使用して評価した。G8 CAR T細胞のみが、マウスB7H3陽性B16細胞の特異的殺滅を示した(図21B)。

(実施例7)

B7H3ナノボディのエピトープマッピング

【0316】

抗B7H3ナノボディおよび市販の抗体376.96のエピトープマッピングを実施した。ヒトB7H3タンパク質由来の合計48個のペプチドを設計し、合成した。各ペプチドは、18個のアミノ酸からなり、隣接するペプチドと9アミノ酸重複していた。ELISA技術を使用して、抗体の各ペプチドへの結合能を試験した(図21C)。結果は、G8および376.96が、いずれもペプチド10、11、および15(配列番号35~37)を結合したため、類似するエピトープを結合することを実証する。C4およびB12は、直鎖化されたペプチドのライブラリーによって予測することができなかった立体構造エピトープを有し得る。

【0317】

開示される主題の原理が適用され得る多くの可能な実施形態を考慮して、例示された実

10

20

30

40

50

施形態が本開示の例に過ぎず、本開示の範囲の限定と解釈されるべきではないことが認識されるべきである。むしろ、本開示の範囲は、以下の特許請求の範囲によって規定される。したがって、本発明者らは、これらの特許請求の範囲および趣旨の範囲内にあるすべてについて権利を主張する。

特定の実施形態では、例えば以下の項目が提供される。

(項目 1)

B 7 H 3 を特異的に結合する単ドメインモノクローナル抗体であって、配列番号 3、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 10、配列番号 11 または配列番号 12 の相補性決定領域 1 (CDR1)、CDR2 および CDR3 配列を含む、抗体。

10

(項目 2)

前記 CDR 配列が、Kabat、IMGT もしくは Paratome 番号付けスキーム、または前記 Kabat、IMGT および Paratome 番号付けスキームの組合せを使用して規定される、項目 1 に記載の抗体。

(項目 3)

前記 CDR1、CDR2 および CDR3 配列がそれぞれ、
配列番号 3 の残基 31～35、50～66 および 97～114；
配列番号 3 の残基 26～33、51～58 および 97～115；または
配列番号 3 の残基 26～35、50～61 および 98～114
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

20

(項目 4)

前記 CDR1、CDR2 および CDR3 配列がそれぞれ、
配列番号 1 の残基 31～35、50～66 および 97～118；
配列番号 1 の残基 26～33、51～58 および 97～119；または
配列番号 1 の残基 27～35、47～62 および 98～118
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

(項目 5)

前記 CDR1、CDR2 および CDR3 配列がそれぞれ、
配列番号 2 の残基 31～35、50～66 および 97～105；
配列番号 2 の残基 26～33、51～58 および 97～106；または
配列番号 2 の残基 27～35、47～61 および 97～106
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

30

(項目 6)

前記 CDR1、CDR2 および CDR3 配列がそれぞれ、
配列番号 4 の残基 31～35、50～65 および 96～110；
配列番号 4 の残基 26～33、51～57 および 96～110；または
配列番号 4 の残基 27～35、47～60 および 96～109
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

(項目 7)

前記 CDR1、CDR2 および CDR3 配列がそれぞれ、
配列番号 5 の残基 27～30、45～61 および 90～109；
配列番号 5 の残基 26～28、46～53 および 90～110；または
配列番号 5 の残基 27～30、43～55 および 90～110
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

40

(項目 8)

前記 CDR1、CDR2 および CDR3 配列がそれぞれ、
配列番号 6 の残基 31～35、50～65 および 96～111；
配列番号 6 の残基 26～33、51～57 および 96～112；または
配列番号 6 の残基 27～35、47～60 および 96～111
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

50

(項目 9)

前記 C D R 1、C D R 2 および C D 3 配列がそれぞれ、
配列番号 7 の残基 3 1 ～ 3 5、5 0 ～ 6 5 および 9 6 ～ 1 1 1 ；
配列番号 7 の残基 2 6 ～ 3 3、5 1 ～ 5 7 および 9 6 ～ 1 1 2 ；または
配列番号 7 の残基 2 7 ～ 3 5、4 7 ～ 6 0 および 9 6 ～ 1 1 1
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

(項目 1 0)

前記 C D R 1、C D R 2 および C D 3 配列がそれぞれ、
配列番号 8 の残基 3 1 ～ 3 5、5 0 ～ 6 5 および 9 6 ～ 1 1 1 ；
配列番号 8 の残基 2 6 ～ 3 3、5 1 ～ 5 7 および 9 6 ～ 1 1 2 ；または
配列番号 8 の残基 2 7 ～ 3 5、4 7 ～ 6 0 および 9 6 ～ 1 1 1
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

10

(項目 1 1)

前記 C D R 1、C D R 2 および C D 3 配列がそれぞれ、
配列番号 9 の残基 3 1 ～ 3 5、5 0 ～ 6 5 および 9 6 ～ 1 1 1 ；
配列番号 9 の残基 2 6 ～ 3 3、5 1 ～ 5 7 および 9 6 ～ 1 1 2 ；または
配列番号 9 の残基 2 7 ～ 3 5、4 7 ～ 6 0 および 9 6 ～ 1 1 1
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

(項目 1 2)

前記 C D R 1、C D R 2 および C D 3 配列がそれぞれ、
配列番号 1 0 の残基 3 1 ～ 3 5、5 0 ～ 6 5 および 9 6 ～ 1 1 3 ；
配列番号 1 0 の残基 2 6 ～ 3 3、5 1 ～ 5 7 および 9 6 ～ 1 1 4 ；または
配列番号 1 0 の残基 2 7 ～ 3 5、4 7 ～ 6 0 および 9 7 ～ 1 1 4
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

20

(項目 1 3)

前記 C D R 1、C D R 2 および C D 3 配列がそれぞれ、
配列番号 1 1 の残基 3 0 ～ 3 4、5 0 ～ 6 4 および 9 3 ～ 1 0 5 ；
配列番号 1 1 の残基 2 5 ～ 3 2、5 0 ～ 5 6 および 9 3 ～ 1 0 4 ；または
配列番号 1 1 の残基 2 6 ～ 3 4、4 6 ～ 5 9 および 9 3 ～ 1 0 5
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

30

(項目 1 4)

前記 C D R 1、C D R 2 および C D 3 配列がそれぞれ、
配列番号 1 2 の残基 3 2 ～ 3 5、5 1 ～ 6 5 および 9 4 ～ 1 0 7 ；
配列番号 1 2 の残基 2 6 ～ 3 3、5 1 ～ 5 7 および 9 4 ～ 1 0 7 ；または
配列番号 1 2 の残基 2 7 ～ 3 5、4 7 ～ 6 0 および 9 4 ～ 1 0 8
を含む、項目 1 または項目 2 に記載の抗体。

(項目 1 5)

前記抗体の前記アミノ酸配列が、配列番号 3、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、
配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番
号 1 1 または配列番号 1 2 と少なくとも 9 0 % 同一である、項目 1 から 1 4 のいずれか一
項に記載の抗体。

40

(項目 1 6)

前記抗体の前記アミノ酸配列が、配列番号 3、配列番号 1、配列番号 2、配列番号 4、
配列番号 5、配列番号 6、配列番号 7、配列番号 8、配列番号 9、配列番号 1 0、配列番
号 1 1 または配列番号 1 2 を含むかまたはそれからなる、項目 1 から 1 5 のいずれか一項
に記載の抗体。

(項目 1 7)

ヒト化抗体である、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体。

(項目 1 8)

キメラ抗体である、項目 1 から 1 4 のいずれか一項に記載の抗体。

50

(項目 19)

項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の抗体を含むキメラ抗原受容体 (CAR)。

(項目 20)

ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、共刺激シグナル伝達部分、シグナル伝達ドメイン、またはこれらの任意の組合せをさらに含む、項目 19 に記載の CAR。

(項目 21)

前記ヒンジ領域が CD8 α ヒンジ領域を含み；

前記膜貫通ドメインが CD8 α 膜貫通ドメインを含み；

前記共刺激シグナル伝達部分が 4-1BB シグナル伝達部分を含み；および／または

前記シグナル伝達ドメインが CD3 ζ シグナル伝達ドメインを含む、

項目 20 に記載の CAR。

(項目 22)

項目 19 から 21 のいずれか一項に記載の CAR を発現する単離された細胞。

(項目 23)

細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) またはナチュラルキラー (NK) 細胞である、項目 22 に記載の単離された細胞。

(項目 24)

項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の抗体およびエフェクター分子を含むイムノコンジュゲート。

(項目 25)

前記エフェクター分子が毒素である、項目 24 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 26)

前記毒素が *Pseudomonas* 外毒素またはそのバリエーションである、項目 25 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 27)

前記 *Pseudomonas* 外毒素のバリエーションが PE38 である、項目 26 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 28)

前記エフェクター分子が光子吸収体である、項目 24 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 29)

前記エフェクター分子が検出可能な標識である、項目 24 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 30)

前記検出可能な標識が、フルオロフォア、酵素または放射性同位体を含む、項目 29 に記載のイムノコンジュゲート。

(項目 31)

項目 1 から 18 のいずれか一項に記載の抗体にコンジュゲートした薬物を含む抗体-薬物コンジュゲート (ADC)。

(項目 32)

前記薬物が低分子である、項目 31 に記載の ADC。

(項目 33)

前記薬物が、微小管阻害剤、抗有糸分裂剤および／または細胞傷害剤である、項目 31 または項目 32 に記載の ADC。

(項目 34)

項目 1 から 18 のいずれかに記載の抗体および少なくとも 1 つの追加のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む多特異性抗体。

(項目 35)

二特異性抗体である、項目 34 に記載の多特異性抗体。

(項目 36)

三特異性抗体である、項目 34 に記載の多特異性抗体。

10

20

30

40

50

(項目 3 7)

前記少なくとも 1 つの追加のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、T 細胞受容体またはナチュラルキラー (NK) 細胞活性化受容体の構成成分を特異的に結合する、項目 3 4 から 3 6 のいずれか一項に記載の多特異性抗体。

(項目 3 8)

項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の抗体にコンジュゲートしたナノ粒子を含む、抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

(項目 3 9)

前記ナノ粒子が、ポリマーナノ粒子、ナノスフェア、ナノカプセル、リポソーム、デンドリマー、ポリマーミセル、またはニオソームを含む、項目 3 8 に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

10

(項目 4 0)

前記ナノ粒子が細胞傷害剤を含む、項目 3 8 または項目 3 9 に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート。

(項目 4 1)

項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の抗体および異種タンパク質またはペプチドを含む融合タンパク質。

(項目 4 2)

前記異種タンパク質が、Fc タンパク質またはロイシンジッパーである、項目 4 1 に記載の融合タンパク質。

20

(項目 4 3)

項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の抗体、項目 1 9 から 2 1 のいずれか一項に記載の CAR、項目 2 4 から 3 0 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、項目 3 4 から 3 7 のいずれか一項に記載の多特異性抗体または項目 4 1 もしくは項目 4 2 に記載の融合タンパク質をコードする単離された核酸分子。

(項目 4 4)

プロモーターに作動可能に連結した、項目 4 3 に記載の単離された核酸分子。

(項目 4 5)

項目 4 3 または項目 4 4 に記載の核酸分子を含むベクター。

(項目 4 6)

項目 4 4 に記載の核酸分子または項目 4 5 に記載のベクターを含む単離された宿主細胞。

30

(項目 4 7)

薬学的に許容される担体および項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の抗体、項目 1 9 から 2 1 のいずれか一項に記載の CAR、項目 2 2、2 3 および 4 6 のいずれか一項に記載の単離された細胞、項目 2 4 から 3 0 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、項目 3 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の ADC、項目 3 4 から 3 7 のいずれか一項に記載の多特異性抗体、項目 3 8 から 4 0 のいずれか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート、または項目 4 1 もしくは項目 4 2 に記載の融合タンパク質を含む組成物。

(項目 4 8)

試料中の B 7 H 3 の発現を検出する方法であって、

40

前記試料を、項目 1 から 1 8 のいずれかに記載の抗体と接触させることと、

前記抗体の前記試料への結合を検出し、それによって、前記試料中の B 7 H 3 の発現を検出することと

を含む方法。

(項目 4 9)

B 7 H 3 陽性がんを有するものとして対象を診断する方法であって、

前記対象から得られた試料を、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の抗体と接触させることと、

前記抗体の前記試料への結合を検出し、それによって、B 7 H 3 陽性がんを有するものとして前記対象を診断することと

50

を含む方法。

(項目 5 0)

前記抗体が直接的に標識されている、項目 4 8 または項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 1)

前記抗体を検出抗体と接触させることと、

前記検出抗体の前記抗体への結合を検出し、それによって、前記試料中の B 7 H 3 の発現を検出するか、または B 7 H 3 陽性がんを有するものとして前記対象を診断することとをさらに含む、項目 4 8 または項目 4 9 に記載の方法。

(項目 5 2)

前記試料が、B 7 H 3 陽性がんを有すると疑われる対象から得られる、項目 4 8 から 5 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 3)

前記試料が腫瘍生検である、項目 4 8 から 5 2 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 4)

対象における B 7 H 3 陽性がんを処置する方法であって、前記対象に、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の抗体、項目 1 9 から 2 1 のいずれか一項に記載の C A R、項目 2 2 から 2 3 のいずれか一項に記載の単離された細胞、項目 2 4 から 3 0 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、項目 3 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の A D C、項目 3 4 から 3 7 のいずれか一項に記載の多特異性抗体、項目 3 8 から 4 0 のいずれか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート、項目 4 1 もしくは項目 4 2 に記載の融合タンパク質、または項目 4 7 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

(項目 5 5)

対象における B 7 H 3 陽性がんの腫瘍成長または転移を阻害する方法であって、前記対象に、項目 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の抗体、項目 1 9 から 2 1 のいずれか一項に記載の C A R、項目 2 2 から 2 3 のいずれか一項に記載の単離された細胞、項目 2 4 から 3 0 のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、項目 3 1 から 3 3 のいずれか一項に記載の A D C、項目 3 4 から 3 7 のいずれか一項に記載の多特異性抗体、項目 3 8 から 4 0 のいずれか一項に記載の抗体-ナノ粒子コンジュゲート、項目 4 1 もしくは項目 4 2 に記載の融合タンパク質、または項目 4 7 に記載の組成物を投与することを含む、方法。

(項目 5 6)

前記 B 7 H 3 陽性がんが固形腫瘍である、項目 5 4 または項目 5 5 に記載の方法。

(項目 5 7)

前記固形腫瘍が、肝臓がん、膵臓がん、腎臓がん、膀胱がん、子宮頸がん、食道がん、前立腺がん、乳がん、卵巣がん、結腸がん、肺がん、脳がん、小児がん、黒色腫または中皮腫である、項目 5 6 に記載の方法。

(項目 5 8)

前記肝臓がんが肝細胞癌である、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 5 9)

前記脳がんが神経芽腫または神経膠芽腫である、項目 5 7 に記載の方法。

(項目 6 0)

前記小児がんが、骨肉腫、神経芽腫、横紋筋肉腫またはユーイング肉腫である、項目 5 7 に記載の方法。

10

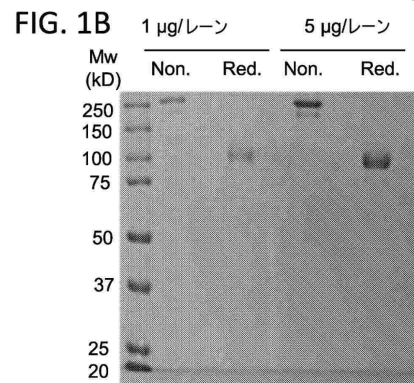
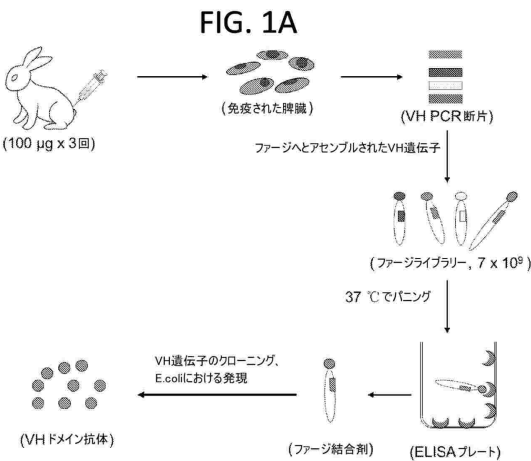
20

30

40

50

【図面】
【図 1】



【図 2】

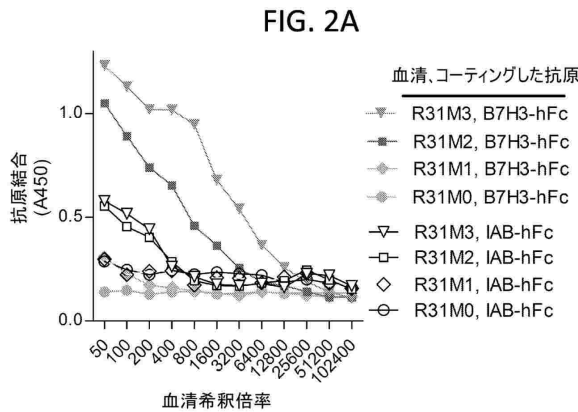
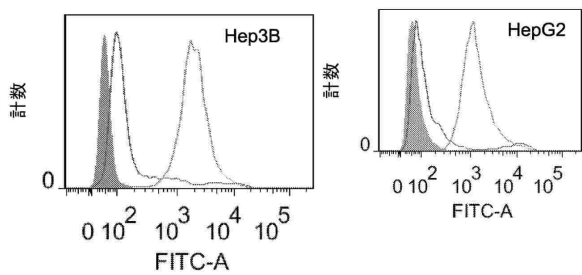
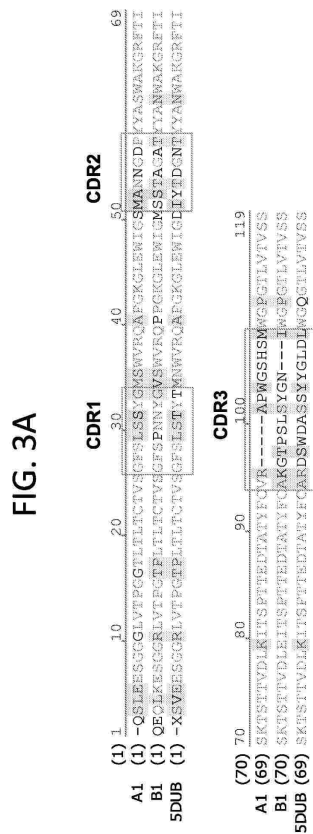


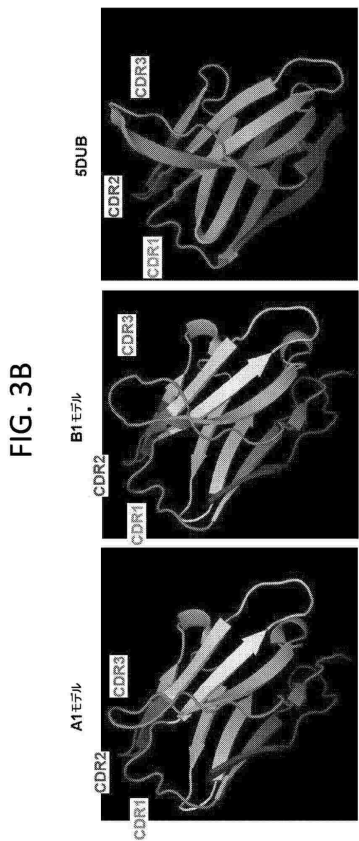
FIG. 2B



【図 3 - 1】



【図 3 - 2】



10

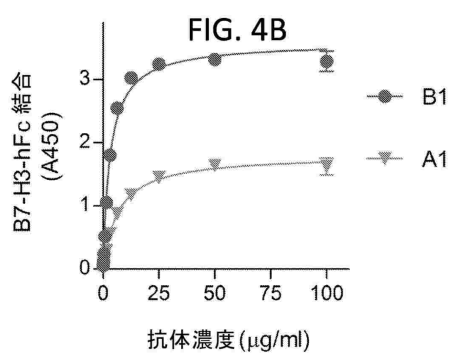
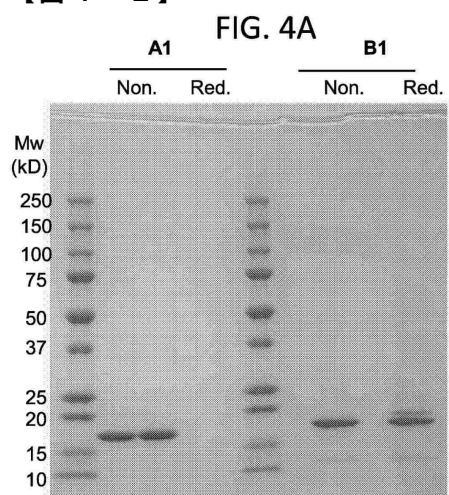
20

30

40

50

【圖 4-1】



【圖 4-2】



【図 5】



【図 6】



【図 7】

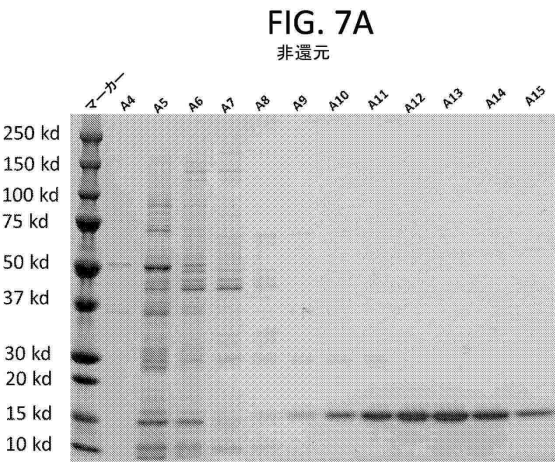
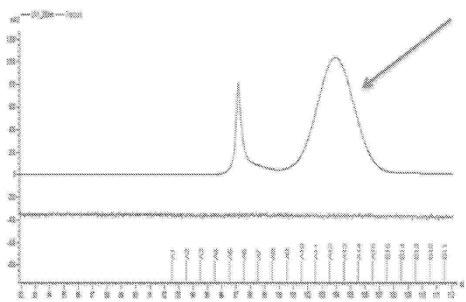


FIG. 7B 33.8mg/L



【図 8】

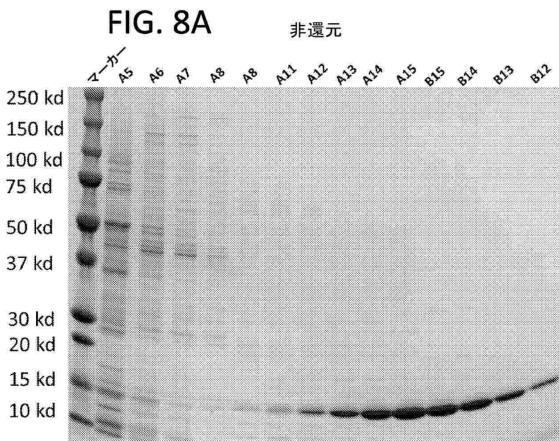
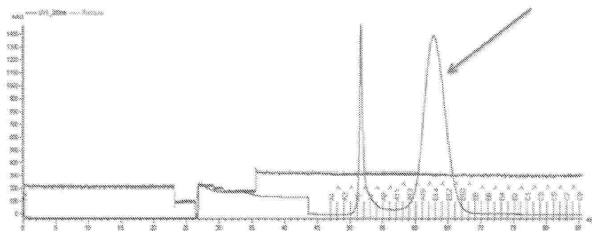


FIG. 8B 50mg/L



【図 9】

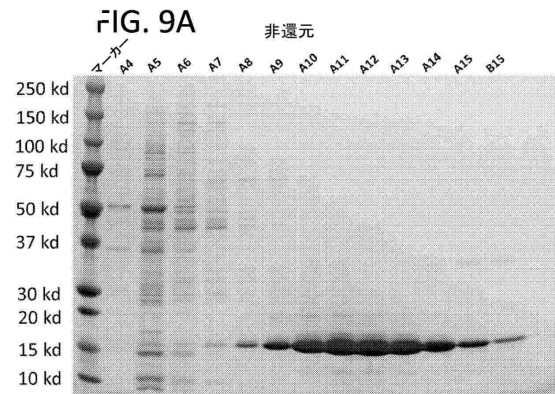
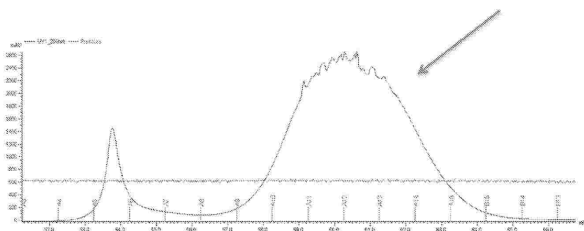
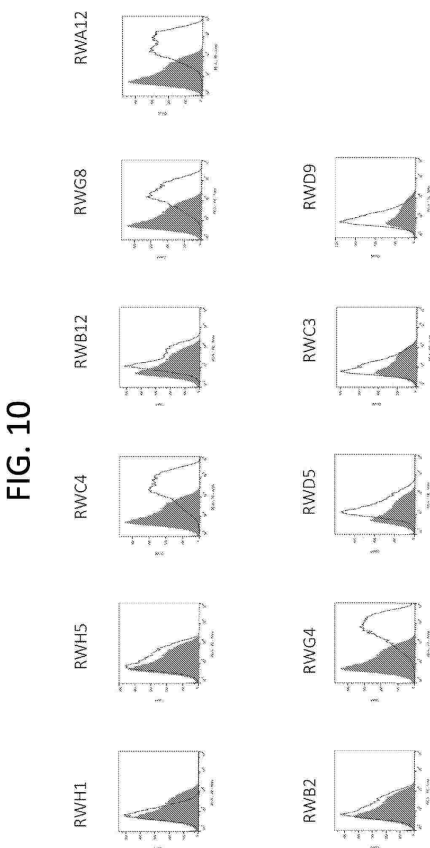


FIG. 9B 132 mg/L

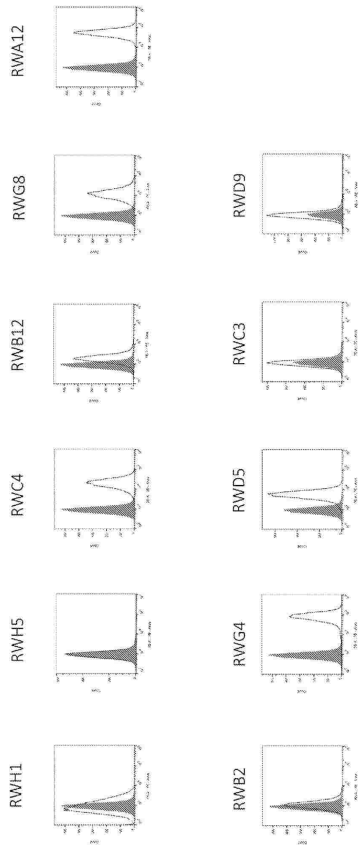


【図 10】



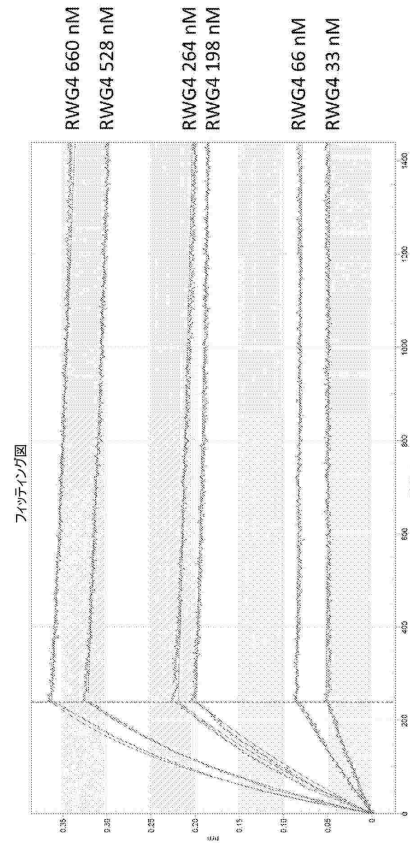
【図 1 1】

FIG. 11



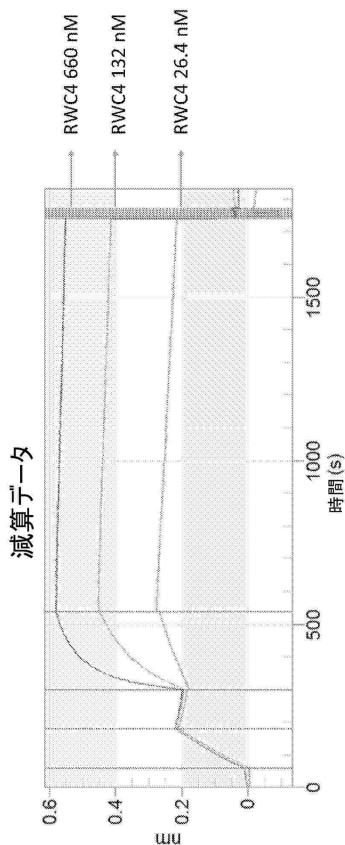
【図 1 3】

FIG. 13



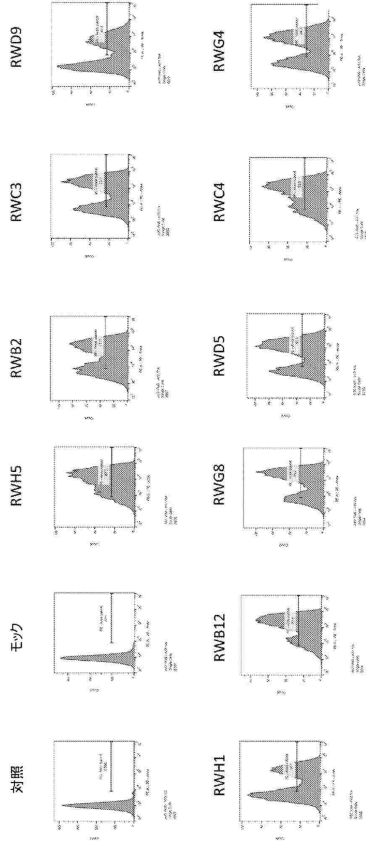
【図 1 2】

FIG. 12



【図 1 4】

FIG. 14



10

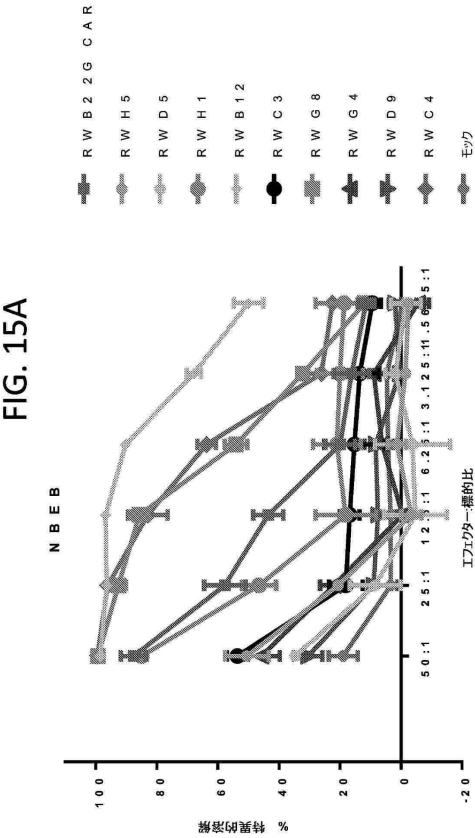
20

30

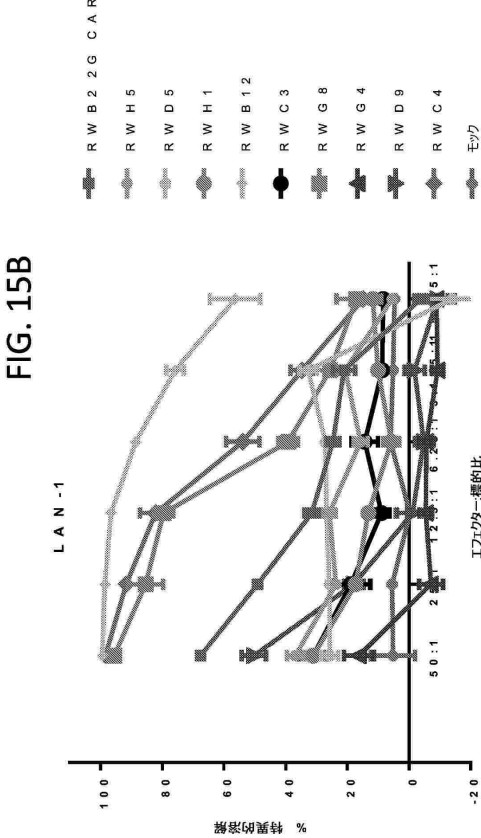
40

50

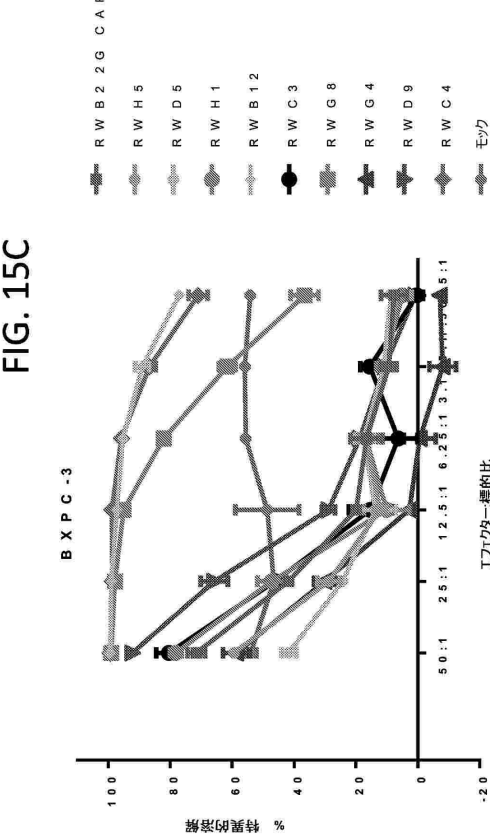
【図 15 - 1】



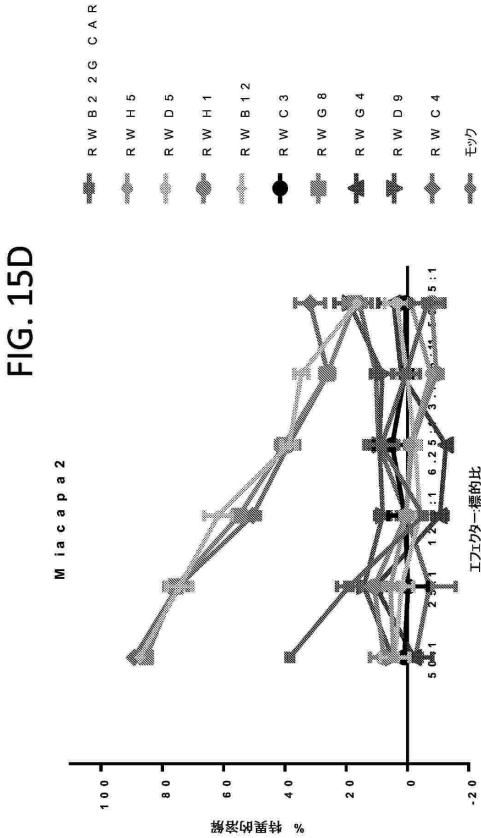
【図 15 - 2】



【図 15 - 3】



【図 15 - 4】



10

20

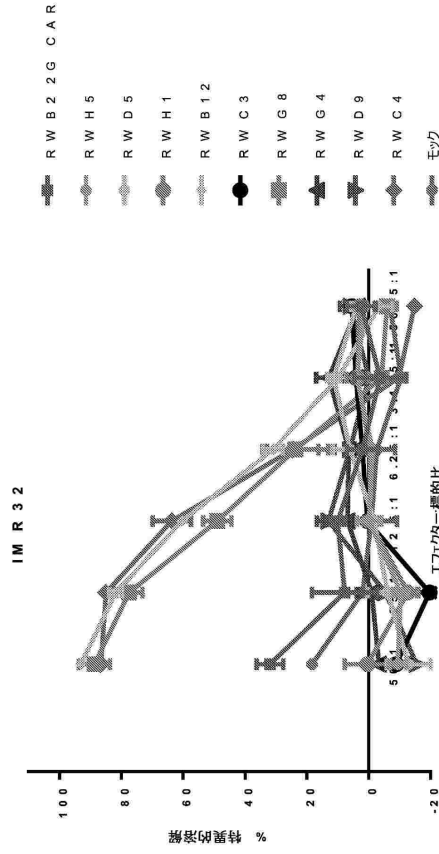
30

40

50

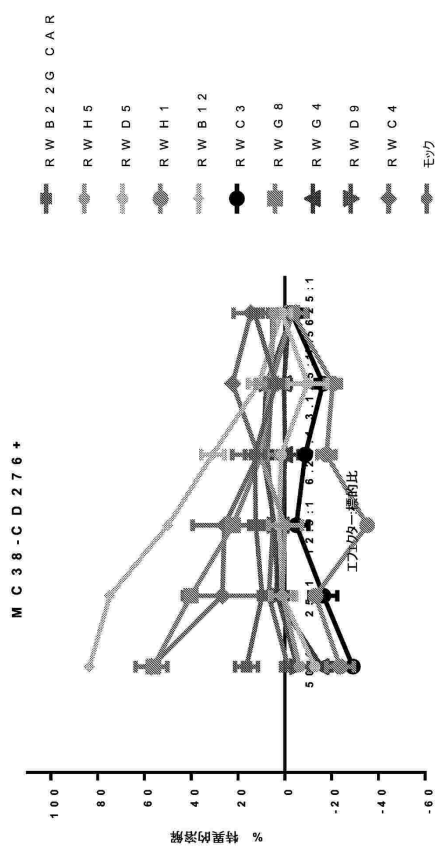
【図 16 - 1】

FIG. 16A



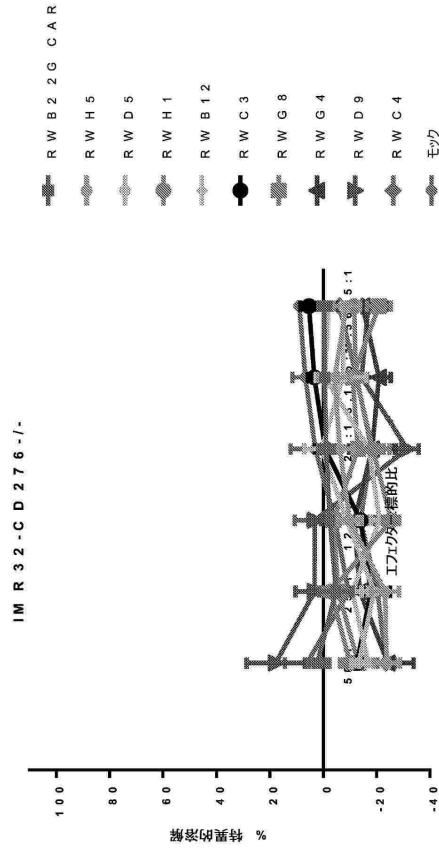
【図 16 - 2】

FIG. 16B



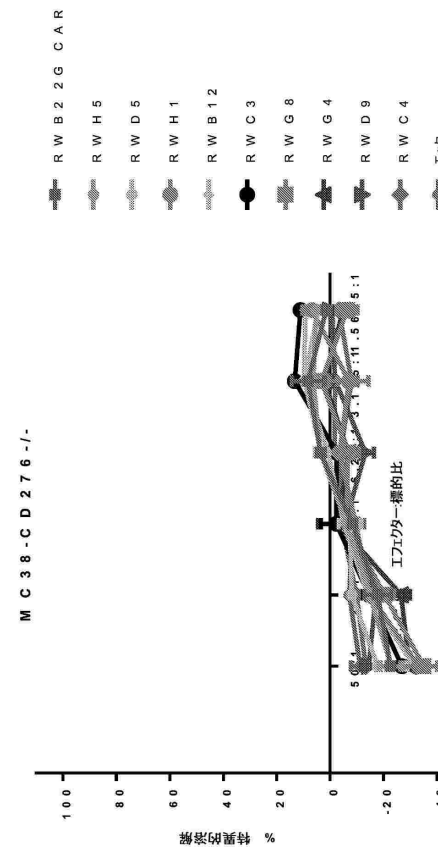
【図 16 - 3】

FIG. 16C



【図 16 - 4】

FIG. 16D



10

20

30

40

50

【図 17-1】

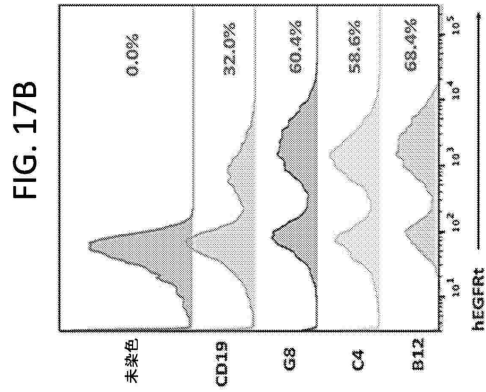
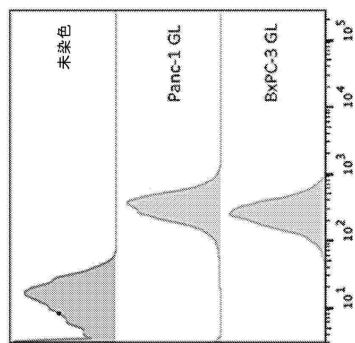
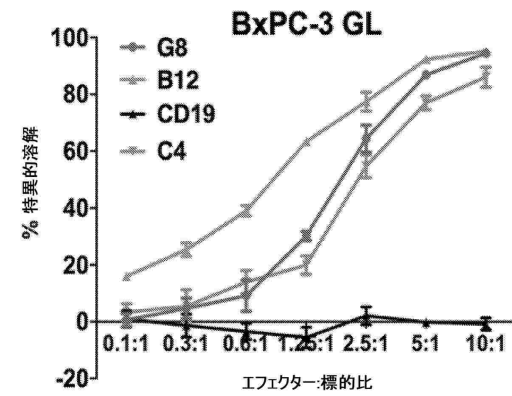
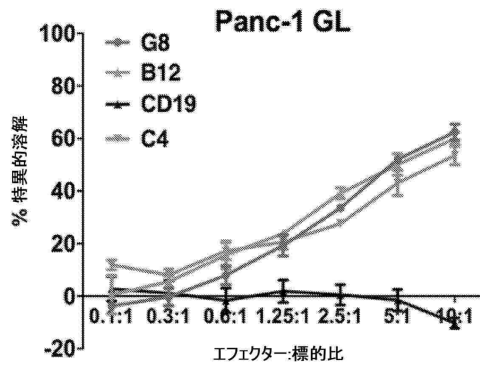


FIG. 17A

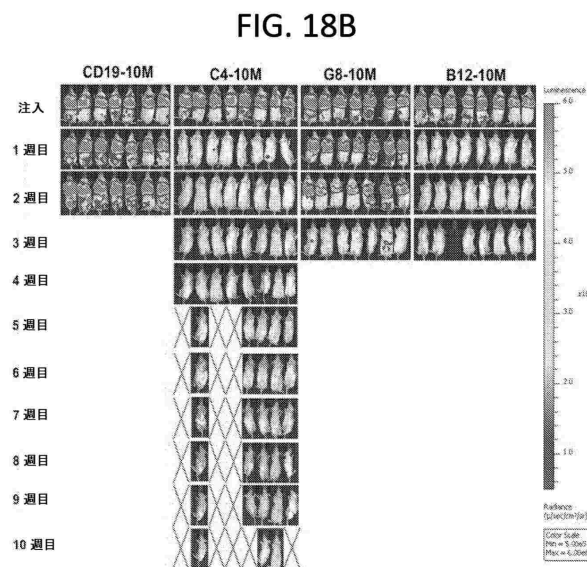
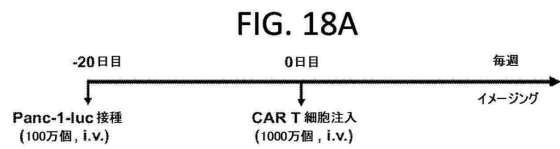


【図 17-2】

FIG. 17C

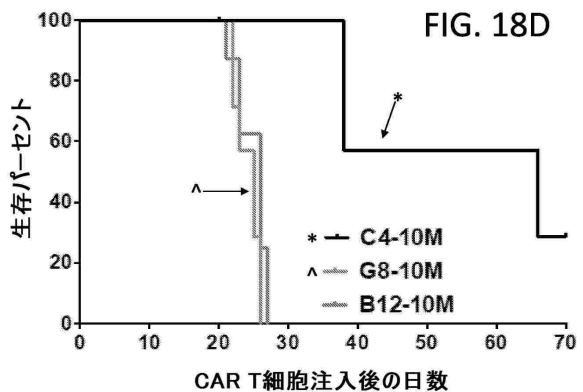
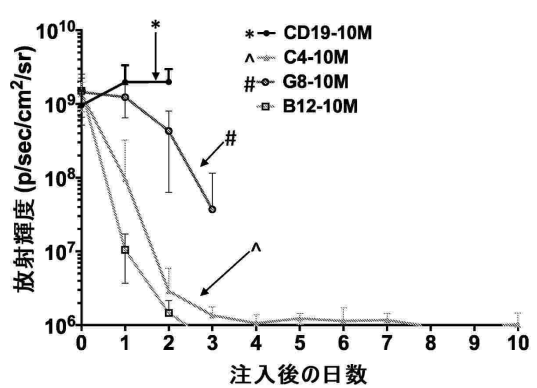


【図 18-1】



【図 18-2】

FIG. 18C



10

20

30

40

50

【図 19-1】

FIG. 19A

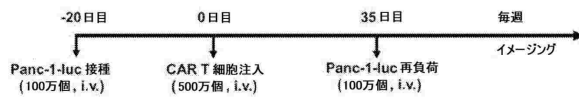
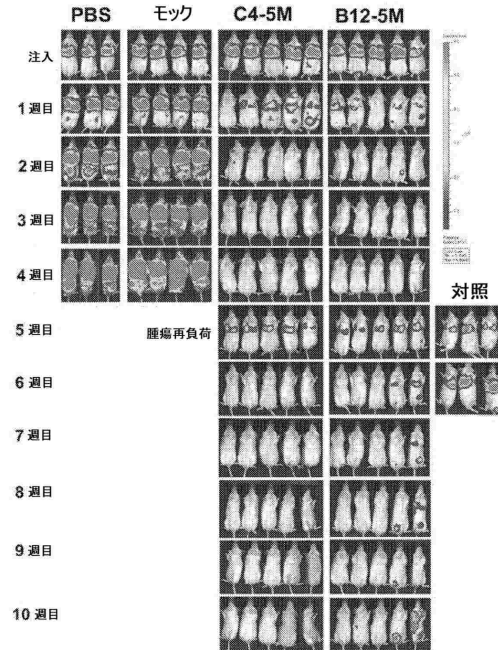


FIG. 19B



【図 19-2】

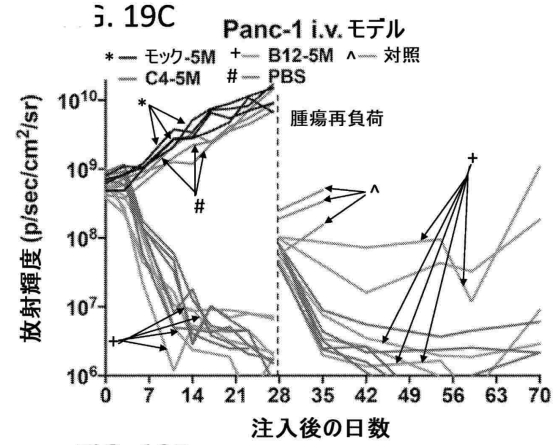
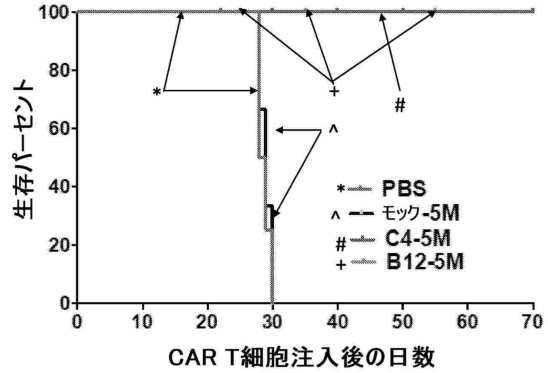


FIG. 19D



【図 20-1】

FIG. 20A

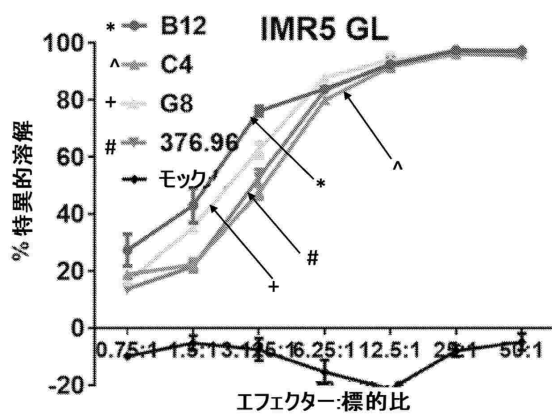
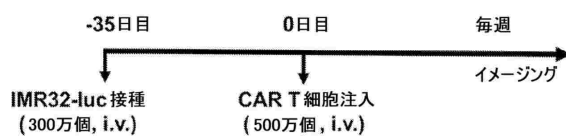


FIG. 20B



【図 20-2】

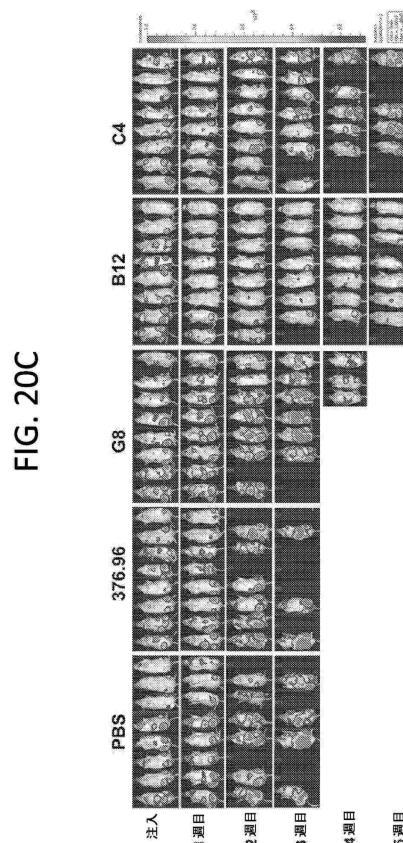


FIG. 20C

10

20

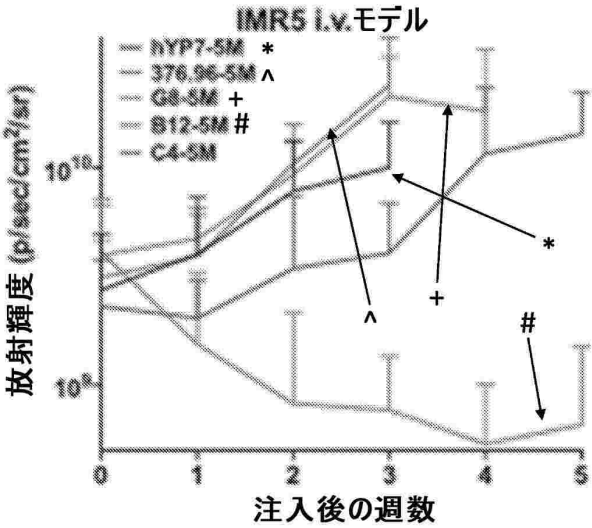
30

40

50

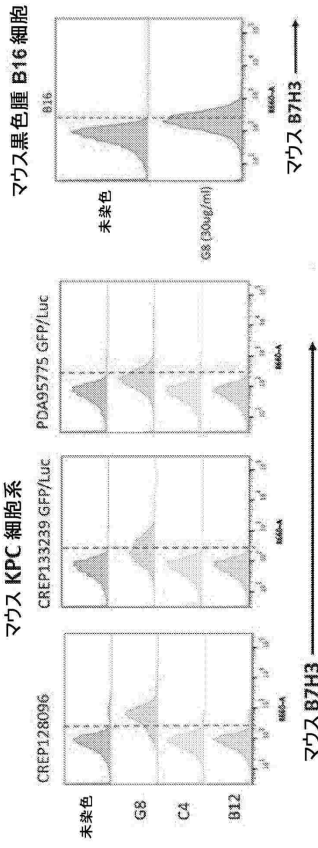
【図 20-3】

FIG. 20D

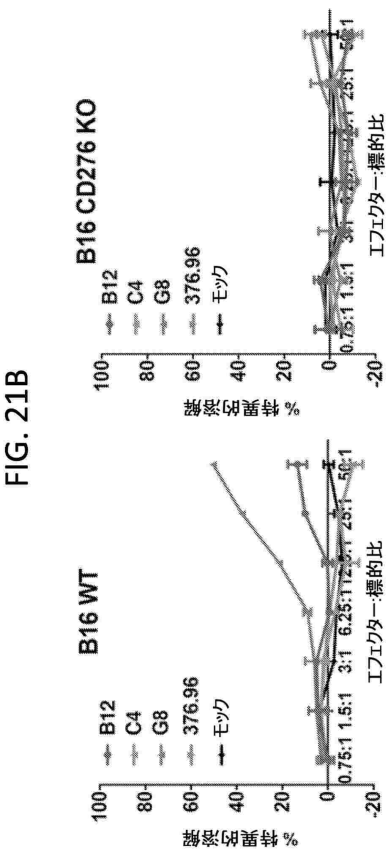


【図 21-1】

FIG. 21A



【図 21-2】



【図 21-3】

FIG. 21C

ペプチド	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G8	0.0622	0.0566	0.0623	0.0592	0.0541	0.0574	0.0564	0.0578	0.0512	0.0481	0.0476	0.0438
B12	0.0489	0.0558	0.0553	0.0481	0.0466	0.0465	0.0519	0.0487	0.0481	0.0546	0.0548	0.0545
C4	0.0484	0.0449	0.0469	0.0444	0.0431	0.0436	0.0436	0.0436	0.0422	0.0527	0.0533	0.0511
376.96	0.0453	0.0487	0.0487	0.0466	0.0431	0.0439	0.0427	0.0475	0.0461	0.0546	0.0552	0.0533
モック	0.0461	0.0454	0.041	0.0397	0.0384	0.0428	0.0622	0.043	0.0376	0.0434	0.0428	0.0446
B12	0.0515	0.0449	0.0435	0.0416	0.042	0.0417	0.0415	0.0417	0.0417	0.0477	0.0468	0.0485
C4	0.0525	0.0481	0.0488	0.0495	0.0467	0.0462	0.0467	0.0468	0.0465	0.0526	0.0513	0.0477
376.96	0.0533	0.0489	0.0493	0.049	0.0494	0.0561	0.0479	0.0477	0.0464	0.0515	0.0517	0.0505

ペプチド	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G8	0.0717	0.0673	0.0681	0.0672	0.06	0.0588	0.0588	0.0601	0.0619	0.0706	0.0682	0.0669
B12	0.0709	0.0673	0.0678	0.0657	0.0639	0.0633	0.0637	0.0616	0.0616	0.0638	0.0638	0.0639
C4	0.0604	0.0598	0.0591	0.0582	0.0588	0.0589	0.0591	0.0589	0.0587	0.0582	0.0586	0.0586
376.96	0.0572	0.0577	0.0593	0.0437	0.0455	0.0572	0.0438	0.0452	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453
モック	0.0486	0.0477	0.0461	0.0398	0.0418	0.0391	0.0384	0.0394	0.0372	0.0461	0.0438	0.0477
B12	0.0628	0.051	0.0516	0.0414	0.0444	0.0414	0.0414	0.0425	0.0418	0.0508	0.0511	0.0519
C4	0.0537	0.0505	0.0512	0.0483	0.0472	0.0509	0.0472	0.0501	0.0499	0.0503	0.0505	0.0505
376.96	0.0516	0.0507	0.0503	0.0475	0.0475	0.047	0.0476	0.0506	0.0507	0.0527	0.0527	0.0523

ペプチド	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G8	0.0891	0.0889	0.0827	0.0576	0.0784	0.0596	0.0594	0.0418	0.0638	0.0794	0.08	0.0835
B12	0.0818	0.08	0.0635	0.0496	0.0472	0.0479	0.0466	0.0485	0.047	0.05	0.0659	0.058
C4	0.0608	0.0561	0.0637	0.0432	0.0471	0.0436	0.0571	0.0434	0.0423	0.0569	0.0565	0.0571
376.96	0.0574	0.05	0.0511	0.0434	0.0509	0.0479	0.0588	0.0433	0.0423	0.0501	0.0497	0.0516
モック	0.0456	0.0434	0.0446	0.0397	0.0409	0.0386	0.0385	0.0378	0.0411	0.0451	0.0451	0.0416
B12	0.0486	0.0489	0.0435	0.0418	0.0425	0.0414	0.0415	0.0415	0.0416	0.0488	0.0487	0.0479
C4	0.0467	0.0469	0.0461	0.0469	0.0469	0.0469	0.0469	0.0469	0.0469	0.0469	0.0469	0.0469
376.96	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453	0.0453

ペプチド	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
G8	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519
B12	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519
C4	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519
376.96	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519
モック	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519	0.0519

ペプチド#10: QRRVADGSGFTCFVSIR
ペプチド#11: SFTCFVSIRDFGSAVSL
ペプチド#15: LRPGDTVTITCSSYQGY

【図 2 2】

FIG. 22

	B12			C4			G8			376.96		
	0.371	0.407	0.359	0.068	0.068	0.068	1.683	1.740	0.981	1.011	1.056	
ラット	8	5	4	3	8	5	8	2	4	1	5	
ヒト	0.180	0.210	0.199		0.979	0.937	0.136	0.147	1.482	1.565	1.441	
	7	4	1	0.976	1	7	2	3	8	3	9	4
サル	0.187	0.200	0.178	1.001	1.002	1.041	0.197	0.198	1.589	1.586	1.653	
	5	6	4	9	3	4	1	4	1	8	6	
マウス-1 (msB7H3)	0.071	0.068	0.070	0.061	0.053	0.048	0.236	0.232	0.224	0.140	0.156	0.133
	4	3	2	6	3	8	1	7	2	2	2	
マウス-2 (mB7H3)	0.074	0.077	0.076		0.049	0.046	0.316		0.294	0.157	0.145	0.183
	2	1	4	0.079	8	8	8	0.332	5	4	1	7
B7H3 R&D	0.058	0.055	0.095	0.131	0.151	0.156	0.069	0.063	0.064	0.990	1.068	
	2	9	5	5	3	3	6	2	6	9	4	9
B7H3-Fc	0.878		0.952	2.006		1.950	1.965	2.007	1.871	1.605	1.590	
	5	2	3	3	1.987	4	4	3	5	1	1.587	3
B7H3-His 無副体の 抗原	0.060	0.059	0.094	0.114	0.087	0.081	0.069	0.068	0.063	0.811	0.812	0.813
	3	5	6	4	9	1	3	6	6	1	5	3
	0.08		0.086	0.084	0.088	0.102	0.104		0.053	0.053	0.062	
		4	3	5	8	3	4	0.098	0.114	1	4	4
PDL1-Fc	0.063	0.068	0.062	0.062	0.062	0.061	0.065	0.063	0.099	0.065	0.074	
	9	5	4	5	7	3	3	3	9	2	9	
HN3-Fc	0.053	0.061		0.080		0.046	0.05	0.051	0.053	0.054	0.052	
	3	6	0.048	1	0.046	7	0.05	4	5	5	1	1

【配列表】

0007690468000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	35/17 (2025.01)	A 6 1 K	35/17	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	39/44 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 K	47/56 (2017.01)	A 6 1 K	39/395	Y
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	39/44	
A 6 1 K	47/69 (2017.01)	A 6 1 K	47/56	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/68	
C 0 7 K	14/705 (2006.01)	A 6 1 K	47/69	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	14/705	
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 0 7 K	19/00	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	5/0783 (2010.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	15/12 (2006.01)	C 1 2 N	5/0783	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/12	
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
G 0 1 N	33/574 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z
C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 N	15/63	Z
		G 0 1 N	33/574	A
		C 1 2 P	21/08	

ンスティテュート・オブ・ヘルス、オフィス・オブ・テクノロジー・トランスファー

(74)代理人 100078282

弁理士 山本 秀策

(74)代理人 100113413

弁理士 森下 夏樹

(74)代理人 100181674

弁理士 飯田 貴敏

(74)代理人 100181641

弁理士 石川 大輔

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ホー, ミッチェル

アメリカ合衆国 メリーランド 20892, ベセスダ, ビルディング 37, ルーム 5002
, ナショナル キャンサー インスティテュート 気付

(72)発明者 ワン, ルイシュエ

アメリカ合衆国 メリーランド 20892, ベセスダ, ビルディング 37, ルーム 5002
, ナショナル キャンサー インスティテュート 気付

(72)発明者 セント クロイ, ブラッドリー

アメリカ合衆国 メリーランド 21702, フレデリック, ビルディング 560, ルーム 3
2-34, エヌシーアイ フレデリック 気付

(72)発明者 リー, ダン

アメリカ合衆国 メリーランド 20892, ベセスダ, ビルディング 37, ルーム 5002
, ナショナル キャンサー インスティテュート 気付

審査官 山▲崎▼ 慈恵

(56)参考文献 国際公開第2019/200022 (WO, A1)

国際公開第2017/180813 (WO, A1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C12N 15/00-15/90

C07K 1/00-19/00
JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)
CAplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (ST
N)
PubMed