(19)日本国特許庁(JP)　　(12)公表特許公報(A)　　(11)公表番号
特表2025-517737
(P2025-517737A)
(43)公表日　令和7年6月10日(2025.6.10)

(51)国際特許分類			FI			テーマコード（参考）	
C07K	*16/28*	*(2006.01)*	C07K	16/28	ZNA	4B064	
C12N	*15/13*	*(2006.01)*	C12N	15/13		4B065	
C12N	*15/63*	*(2006.01)*	C12N	15/63	Z	4C084	
C12N	*1/15*	*(2006.01)*	C12N	1/15		4C085	
C12N	*1/19*	*(2006.01)*	C12N	1/19		4H045	

審査請求　未請求　予備審査請求　未請求　（全65頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2024-568258(P2024-568258)
(86)(22)出願日　令和5年5月17日(2023.5.17)
(85)翻訳文提出日　令和7年1月8日(2025.1.8)
(86)国際出願番号　PCT/CN2023/094711
(87)国際公開番号　WO2023/222017
(87)国際公開日　令和5年11月23日(2023.11.23)
(31)優先権主張番号　PCT/CN2022/093524
(32)優先日　令和4年5月18日(2022.5.18)
(33)優先権主張国・地域又は機関
中国(CN)
(81)指定国・地域　AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV
最終頁に続く

(71)出願人　518330176
ウーシー バイオロジクス アイルランド リミテッド
アイルランド、エイ９１・エックス５６ エフ、カウンティ・ラウス、ダンドーク、マラガーリン
(74)代理人　100107984
弁理士　廣田 雅紀
(74)代理人　100182305
弁理士　廣田 鉄平
(74)代理人　100096482
弁理士　東海 裕作
(74)代理人　100131093
弁理士　堀内 真
(74)代理人　100150902
最終頁に続く

(54)【発明の名称】　抗Ｂ７Ｈ３抗体及びその使用

(57)【要約】
Ｂ７Ｈ３に結合する抗体又はその抗原結合部分、かかる抗体を生成する方法、かかる抗体又はその抗原結合部分を使用してＢ７Ｈ３と関連する障害を治療する方法を提供する。

10

20

【特許請求の範囲】
【請求項１】
Ｂ７Ｈ３に結合する抗体又はその抗原結合部分であって、以下のＣＤＲを含む、前記抗体又はその抗原結合部分。
配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１（ＨＣＤＲ１）、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３；並びに
配列番号４又は７のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１（ＬＣＤＲ１）、配列番号５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び配列番号６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３；
【請求項２】
重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）を含む、請求項１に記載の抗体又はその抗原結合部分であって、
前記ＶＨが、
（Ａ）配列番号８若しくは１０に記載のアミノ酸配列；
（Ｂ）配列番号８若しくは１０に対して少なくとも８５％、少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一のアミノ酸配列；又は
（Ｃ）配列番号８若しくは１０と比較してフレームワーク領域に１若しくは２以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９若しくは１０）のアミノ酸の付加、欠失、及び／若しくは置換を有するアミノ酸配列；
を含み、並びに／あるいは
前記ＶＬが、
（Ａ）配列番号９若しくは１１に記載のアミノ酸配列；
（Ｂ）配列番号９若しくは１１に対して少なくとも８５％、少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列；又は
（Ｃ）配列番号９若しくは１１と比較してフレームワーク領域に１若しくは２以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９若しくは１０）のアミノ酸の付加、欠失、及び／若しくは置換を有するアミノ酸配列；
を含む、前記抗体又はその抗原結合部分。
【請求項３】
ＶＨ及び／又はＶＬが、フレームワーク領域に１又は２以上のアミノ酸の置換を含む、請求項２に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項４】
アミノ酸の置換の少なくとも１つが、ヒト生殖系列配列由来のアミノ酸が親抗体の対応する位置において異なるアミノ酸により置換される、復帰変異である、請求項３に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項５】
アミノ酸の置換の少なくとも１つが、潜在的な翻訳後修飾部位を除去する、請求項３に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項６】
Ｂ７Ｈ３が、ヒトＢ７Ｈ３タンパク質、マウスＢ７Ｈ３タンパク質、カニクイザルＢ７Ｈ３タンパク質又はそれらの細胞外ドメインである、請求項１～５のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項７】
Ｂ７Ｈ３が、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３タンパク質又はその細胞外ドメインである、請求項６に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項８】
完全抗体、ｓｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２又はＦｖ断片である、請求項１～７のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項９】
抗体が、免疫グロブリン定常領域、例えば、ヒトＩｇＧ定常領域を含む、請求項１～８のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分。

【請求項１０】
免疫グロブリン定常領域が、１又は２以上の修飾、例えば、Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ（ＬＡＬＡ）変異を含んでいてもよい、ヒトＩｇＧ１定常領域である、請求項９に記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項１１】
キメラ抗体又はヒト化抗体である、請求項１～１０のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項１２】
（ａ）配列番号１２の重鎖のアミノ酸配列及び配列番号１３の軽鎖のアミノ酸配列；並びに／又は
（ｂ）配列番号１４の重鎖のアミノ酸配列及び配列番号１５の軽鎖のアミノ酸配列；
を含む、請求項１～１１のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項１３】
請求項１～１２のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分のＶＨ領域及び／又はＶＬ領域をコードする核酸配列を含む、単離核酸分子。
【請求項１４】
配列番号１６及び／又は配列番号１７に記載の核酸配列を含む、請求項１３に記載の単離核酸分子。
【請求項１５】
請求項１３又は１４に記載の核酸分子を含む、ベクター。
【請求項１６】
請求項１３若しくは請求項１４に記載の核酸分子又は請求項１５に記載のベクターを含む、宿主細胞。
【請求項１７】
請求項１～１２のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。
【請求項１８】
抗体又はその抗原結合部分を生成するための方法であって、
請求項１６に記載の宿主細胞を、抗体又はその抗原結合部分の発現に適する条件下で培養するステップと、
前記宿主細胞から前記抗体又はその抗原結合部分を単離するステップと
を含む、前記方法。
【請求項１９】
対象においてＢ７Ｈ３に関連する免疫応答を調節するための方法であって、請求項１～１２のいずれかに記載の抗体若しくはその抗原結合部分又は請求項１７に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、前記方法。
【請求項２０】
対象においてＢ７Ｈ３と関連する障害を予防又は治療するための方法であって、有効量の請求項１～１２のいずれかに記載の抗体若しくはその抗原結合部分又は請求項１５に記載の医薬組成物を前記対象に投与するステップを含む、前記方法。
【請求項２１】
Ｂ７Ｈ３と関連する障害が、がん、自己免疫疾患、及び感染性疾患から選択される、請求項２０に記載の方法。
【請求項２２】
がんが、乳がん、神経性腫瘍、メラノーマ、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、神経膠芽腫、食道がん、膀胱がん、腎細胞癌、子宮内膜がん、皮膚がん、精巣がん、甲状腺がん、尿路上皮がん、リンパ腫、例えば、非ホジキンリンパ腫及びびまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、白血病、例えば、慢性リンパ球性白血病、並びに多発性骨髄腫から選択される、請求項２１に記載の方法。

【請求項２３】
抗体又はその抗原結合部分が、細胞免疫療法、化学療法、放射線療法、標的療法、及び／又はがん免疫療法における使用のための他の物質と組み合わせて投与される、請求項２１又は２２に記載の方法。
【請求項２４】
対象におけるＢ７Ｈ３と関連する障害の治療又は予防における使用のための、請求項１～１２のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分。
【請求項２５】
対象においてＢ７Ｈ３と関連する障害を診断、治療又は予防するための医薬の製造における、請求項１～１２のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分の使用。
【請求項２６】
請求項１～１２のいずれかに記載の抗体又はその抗原結合部分を含む、キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
相互参照
この出願では、２０２２年５月１８日申請の国際特許出願ＰＣＴ／ＣＮ２０２２／０９３５２４の利点を主張し、その全体を参照により本明細書に組み込む。
【０００２】
配列表
本出願は、電子書式で配列表とともに提出される。この配列表の内容全体は、参照により本明細書に組み込む。
【０００３】
本開示は概して、抗Ｂ７Ｈ３抗体又はその抗原結合部分、それを調製するための方法、及びその使用に関する。
【背景技術】
【０００４】
ＣＤ２７６及びＢ７ＲＰ－２としても知られるＢ７Ｈ３は、Ｂ７ファミリーメンバーであり、他のＢ７ファミリーメンバーと２０％～２７％のアミノ酸同一性を共有する。Ｂ７Ｈ３転写物は遍在性に発現するが、正常組織及び免疫細胞上での発現が低レベルに制限及び維持され、メラノーマ、乳がん、前立腺がん等を含む複数のヒト悪性腫瘍において高発現した。Ｂ７－Ｈ３が膜上、細胞質内又はがん細胞の核内のいずれかだけでなく、腫瘍関連脈管構造上でも発現することが報告された。Ｂ７Ｈ３はＴ細胞、ＮＫ細胞、並びにＤＣ及びマクロファージを含むＡＰＣ上では構成的に発現しなかったが、この発現はＡＰＣ上でＧＭ－ＣＳＦ、ＩＦＮγ等により誘導され得る。
【０００５】
Ｂ７－Ｈ３は、有望な抗がん標的である。Ｔ細胞増殖の刺激、阻害、及びＮＫ細胞機能の阻害を含む種々の免疫機能が実証されているが、Ｂ７－Ｈ３の詳細な機能は、不明なままである。腫瘍上でのＢ７Ｈ３への結合に競合し得る種々の受容体が免疫細胞上に存在することが想定された。この免疫チェックポイント機能に加えて、高レベルのＢ７Ｈ３発現ががんにおける予後不良と相関し、細胞の増殖、遊走、浸潤、血管新生、転移能、及び抗がん薬物耐性をも増強することが報告された。
【０００６】
他のＢ７ファミリー分子と同様に、Ｂ７Ｈ３は、外部ドメインがＩｇＶ－ＩｇＣドメイン対を含有する１型膜貫通糖タンパク質である。ＩｇＶ－ＩｇＣドメイン対の単一コピーのみを有するマウスＢ７Ｈ３遺伝子とは異なり、ヒトＢ７Ｈ３は、２つのアイソフォームを有することが見出された。一方のアイソフォームは、単一コピー（２ＩｇＢ７Ｈ３と名付けられる）を含有し、他方のアイソフォームは、遺伝子重複及び差次的スプライシングから生じる２つのＩｇＶ－ＩｇＣドメイン対（４ＩｇＢ７Ｈ３と名付けられる）を有する。２ＩｇＢ７Ｈ３ではなく４ＩｇＢ７Ｈ３は、免疫細胞だけでなく悪性細胞上に発現する

主要なアイソフォームであり、このことは、４ＩｇＢ７Ｈ３が腫瘍形成及びがん免疫において特徴的に重要な役割を果たし得ることを示す。

【０００７】

Ｂ７Ｈ３が多くの腫瘍細胞上で高発現するため、Ｂ７Ｈ３を標的とする治療用分子が、関連する適応症を治療するために開発されている。しかし、新規の抗Ｂ７Ｈ３抗体の開発は、改善の余地及び臨床的必要性をなお有する。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【０００８】

これら及びその他の目的は、抗体の有効性を向上させる化合物、方法、組成物、及び製造品を広義において対象とする本開示により提供される。本開示により提供される利点は、抗体による治療及び診断の分野において広範に適用可能であり、多様な標的と反応する抗体と組み合わせて使用し得ることである。

【課題を解決するための手段】

【０００９】

一態様では、Ｂ７Ｈ３抗原に特異的に結合する抗体又はその抗原結合部分を本開示により提供する。Ｂ７Ｈ３抗原は、ヒトＢ７Ｈ３、マウスＢ７Ｈ３、及び／若しくはカニクイザルＢ７Ｈ３又はその断片（例えば、細胞外ドメイン）であり得る。好ましくは、Ｂ７Ｈ３抗原は、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３タンパク質又はその細胞外ドメインである。

【００１０】

一部の実施形態では、本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、
配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１（ＨＣＤＲ１）、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３、並びに
配列番号４又は７のアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１（ＬＣＤＲ１）、配列番号５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び配列番号６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３を含む。

【００１１】

一部の実施形態では、本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、
配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１（ＨＣＤＲ１）、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３、並びに
ＫＳＳＱＳＬＬX_1ＳＳＮＱＫＮＹＬＡのアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１（ＬＣＤＲ１）であって、X_1が、Ｎ以外の任意のアミノ酸であり得る、ＬＣＤＲ１、配列番号５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び配列番号６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３を含む。

【００１２】

好ましくは、上記のX_1は、Ｑであり、ＬＣＤＲ１は、配列番号４のアミノ酸配列を含む。

【００１３】

一部の実施形態では、本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、
配列番号１のアミノ酸配列を含む重鎖ＣＤＲ１（ＨＣＤＲ１）、配列番号２のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ２、及び配列番号３のアミノ酸配列を含むＨＣＤＲ３、並びに
ＫＳＳＱＳＬＬＮX_2ＳＮＱＫＮＹＬＡのアミノ酸配列を含む軽鎖ＣＤＲ１（ＬＣＤＲ１）であって、Ｘが、Ｓ以外の任意のアミノ酸であり得る、ＬＣＤＲ１、配列番号５のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ２、及び配列番号６のアミノ酸配列を含むＬＣＤＲ３を含む。

【００１４】

好ましくは、上記のX_2は、Ｐであり、ＬＣＤＲ１は、配列番号１８のアミノ酸配列を含む。

【００１５】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、このＶＨは、
（Ａ）配列番号８若しくは１０に記載のアミノ酸配列、
（Ｂ）配列番号８若しくは１０に対して少なくとも８５％、少なくとも９０％若しくは少

なくとも９５％同一のアミノ酸配列、又は
（Ｃ）配列番号８若しくは１０と比較してフレームワーク領域に１若しくは２以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９若しくは１０）のアミノ酸の付加、欠失、及び／若しくは置換を有するアミノ酸配列を含み、並びに／或いは
ＶＬは、
（Ａ）配列番号９若しくは１１に記載のアミノ酸配列、
（Ｂ）配列番号９若しくは１１に対して少なくとも８５％、少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一であるアミノ酸配列、又は
（Ｃ）配列番号９若しくは１１と比較してフレームワーク領域に１若しくは２以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９若しくは１０）のアミノ酸の付加、欠失、及び／若しくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

【００１６】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、フレームワーク領域に１又は２以上のアミノ酸の置換を含む、ＶＨ及び／又はＶＬを含む。一部の実施形態では、アミノ酸の置換の少なくとも１つは、ヒト生殖系列配列由来のアミノ酸が親抗体の対応する位置において異なるアミノ酸により置換される、復帰変異（back mutation）である。

【００１７】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、潜在的な翻訳後修飾部位又はグリコシル化部位が除去される、少なくとも１つのアミノ酸の修飾（例えば、アミノ酸の置換）を含む。このようなアミノ酸の修飾は、ＣＤＲ領域又はフレームワーク領域に存在し得る。

【００１８】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、完全長抗体、ＳｃＦｖ、Ｆａｂ、Ｆ（ａｂ’）２又はＦｖ断片である。

【００１９】

一部の実施形態では、抗体は、免疫グロブリン定常領域、例えば、ヒトＩｇＧ定常領域を更に含み、ヒトＩｇＧ１定常領域を含んでいてもよい。一部の実施形態では、ＩｇＧ１定常領域は、１又は２以上の修飾、例えば、ＬＡＬＡ変異を含む。

【００２０】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、キメラ抗体又はヒト化抗体である。

【００２１】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、
（ａ）配列番号１２の重鎖のアミノ酸配列及び配列番号１３の軽鎖のアミノ酸配列、又は
（ｂ）配列番号１４の重鎖のアミノ酸配列及び配列番号１５の軽鎖のアミノ酸配列を含む。

【００２２】

一態様では、上に定義の抗体又はその抗原結合部分をコードする核酸配列を含む、単離核酸分子を本開示により提供する。

【００２３】

一態様では、上に定義の核酸分子を含む、ベクターを本開示により提供する。

【００２４】

一態様では、上に定義の核酸分子又はベクターを含む、宿主細胞を本開示により提供する。

【００２５】

一態様では、上に定義の抗体又はその抗原結合部分及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物を本開示により提供する。

【００２６】

上に定義の抗体又はその抗原結合部分を生成するための方法であって、
一態様では、

－ 宿主細胞を、抗体又はその抗原結合部分の発現に適する条件下で培養するステップと、
－ 宿主細胞から抗体又はその抗原結合部分を単離するステップと
を含む、方法を本開示により提供する。

【００２７】

一態様では、対象においてＢ７Ｈ３に関連する免疫応答を調節するための方法であって、上に定義の抗体若しくはその抗原結合部分又は医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を本開示により提供する。

【００２８】

一態様では、対象においてＢ７Ｈ３と関連する障害を予防又は治療するための方法であって、有効量の上に定義の抗体若しくはその抗原結合部分又は医薬組成物を対象に投与するステップを含む、方法を本開示により提供する。

【００２９】

一部の実施形態では、Ｂ７Ｈ３と関連する障害は、がん、自己免疫疾患、及び感染性疾患から選択される。このがんは、乳がん、神経性腫瘍、メラノーマ、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、神経膠芽腫、食道がん、膀胱がん、腎細胞癌、子宮内膜がん、皮膚がん、精巣がん、甲状腺がん、尿路上皮がん、リンパ腫、例えば、非ホジキンリンパ腫、慢性リンパ球性白血病、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、及び多発性骨髄腫から選択され得る。

【００３０】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、細胞免疫療法、化学療法薬、放射線療法、標的療法、及び／又はがん免疫療法における使用のための他の物質と組み合わせて投与する。

【００３１】

一態様では、対象におけるＢ７Ｈ３と関連する障害の治療又は予防における使用のための、上に定義の抗体又はその抗原結合部分を本開示により提供する。

【００３２】

一態様では、対象においてＢ７Ｈ３と関連する障害を治療又は予防するための医薬の製造における、上に定義の抗体又はその抗原結合部分の使用を本開示により提供する。

【００３３】

一態様では、上に定義の抗体又はその抗原結合部分を含む、キットを本開示により提供する。

【００３４】

前述は要約であり、このため必要に応じて、詳細の単純化、一般化、及び省略を含む。結果的に当業者は、要約が単に説明的であり、制限は決して意図しないことを理解する。この要約は、主張する主題の鍵となる特徴及び本質的特徴を同定することも意図せず、主張する主題の範囲の決定における助けとして使用されることも意図しない。

【図面の簡単な説明】

【００３５】

【図１】Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のＳＤＳ－ＰＡＧＥ結果を示す図である。Ｍ：PageRuler（商標）Unstained Proteinラダー；レーン１：Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０、非還元；レーン２：Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０、還元；ゲル情報：NuPAGE, Novex 4-12% Bis-Trisゲル。

【図２】Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のＨＬＰＣ－ＳＥＣ結果を示す図である。

【図３】Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のＤＳＦプロファイルを示す図である。

【図４】Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のＨＩＣ－ＨＰＬＣプロファイルを示す図である。

【図５】Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のＤＬ

Ｓ－ｋ$_D$プロファイルを示す図である。
【図６】ヒトＢ７Ｈ３発現細胞ＭＣＦ－７に対する抗体のＦＡＣＳ結合結果を示す図である。
【図７】カニクイザルＢ７Ｈ３トランスフェクト細胞に対する抗体のＦＡＣＳ結合結果を示す図である。
【図８Ａ－８Ｃ】ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に対するＷ３０１０８８－１．１４５．１６－ｘＩｇＧ１ＫＶ３２０（Ａ）、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０（Ｂ）、及びMacroGenics社のエノブリツズマブ（Ｃ）の結合を示す図である。
【図９Ａ－９Ｃ】ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に対するＷ３０１０８８－１．１４５．１６－ｘＩｇＧ１ＫＶ３２０（Ａ）、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０（Ｂ）、及びMacroGenics社のエノブリツズマブ（Ｃ）の結合を示す図である。
【図１０Ａ－１０Ｃ】カニクイザルＢ７Ｈ３に対するＷ３０１０８８－１．１４５．１６－ｘＩｇＧ１ＫＶ３２０（Ａ）、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０（Ｂ）、及びMacroGenics社のエノブリツズマブ（Ｃ）の結合を示す図である。
【図１１】種々の抗体によるヒトＢ７Ｈ３発現細胞ＭＣＦ－７に対する内部移行を示す図である。
【図１２Ａ－１２Ｂ】Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｘＩｇＧ１ＫＶ３２０及びＷ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０の間のＶＨ領域及びＶＬ領域のアラインメントを示す図である。
【発明を実施するための形態】
【００３６】
本開示は多くの異なる形態で実施し得るが、本開示の原理を例証する、その特定の例示的実施形態を本明細書において開示する。本開示が、例示する特定の実施形態に制限されないことが強調されるべきである。その上、本明細書において使用する任意の節見出しは、単なる組織化目的のためであり、記載の主題を制限するものとして解釈されるべきではない。
【００３７】
本明細書において他に定義しない限り、本開示と関連して使用する科学的及び技術的用語は、当業者により一般に理解される意味を有するものとする。更に、文脈上他に必要としない限り、単数の用語は、複数を含むものとし、複数の用語は、単数を含むものとする。より詳細には、本明細書及び添付の特許請求の範囲において使用する場合、「a」、「an」、及び「the」の単数形は、文脈上明白に他に指示しない限り、複数の参照対象を含む。したがって、例えば、「a protein」を参照する場合、複数のタンパク質を含み、例えば、「a cell」を参照する場合、細胞の混合物を含む。本出願では、「又は」を使用する場合、他に述べない限り、「及び／又は」を意味する。その上、「comprising（含む）」の用語、並びに他の形態、例えば、「comprises」及び「comprised」の使用は、制限されない。加えて、明細書及び添付の特許請求の範囲において提示する範囲は、両終点及び両終点間の全ての点を含む。
【００３８】
本開示の文脈では、「約」の用語は、問題の特徴の技術作用がなお保証されると当業者により理解される精度の区間を表す。この用語は、指示する数値からの偏差を±５％、例えば、±４％、±３％、±２％、±１％、±０．９％、±０．８％、±０．７％、±０．６％、±０．５％、±０．４％、±０．３％、±０．２％、±０．１％、±０．０５％、及び例えば、±０．０１％により典型的に示す。当業者により理解されるように、所与の技術作用についての数値におけるこのような特定の偏差は、技術作用の性質に依存する。例えば、天然又は生物学的技術作用は、人工又は工学的技術作用についての偏差よりも大きいこのような偏差を一般に有し得る。

【００３９】
一般に、本明細書に記載の細胞培養及び組織培養、分子生物学、免疫学、微生物学、遺伝学、並びにタンパク質化学及び核酸化学、ハイブリダイゼーションと関連して使用する命名法及びこれらの技術は、当技術分野において周知であり、一般に使用される命名法及び技術である。本開示の方法及び技術は、他に指示しない限り、本明細書を通して引用及び考察する種々の一般的かつより特異的な参考文献に記載のように、当技術分野において周知の従来方法に従って、一般に実施する。例えば、Abbas et al., Cellular and Molecular Immunology, 6th ed., W.B. Saunders Company (2010)；Sambrook J. & Russell D. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000)；Ausubelet al., Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology, Wiley, John & Sons, Inc. (2002)；Harlow and Lane Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998)；及びColiganet al., Short Protocols in Protein Science, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)を参照されたい。本明細書に記載の分析化学、有機合成化学、並びに医薬品化学及び製薬化学と関連して使用する命名法、並びにこれらの検査法及び検査技術は、当技術分野において周知であり、一般に使用される命名法及び技術である。更に、本出願を通して引用する全ての参考文献、特許、及び特許出願公開の内容は、全体を参照により本明細書に組み込む。

【００４０】
定義
本開示のより良い理解のために、関連用語の定義及び説明を次のように提示する。

【００４１】
本明細書における「抗体」又は「Ａｂ」の用語は、広義において使用し、ポリクローナル抗体、単一特異性抗体及び多特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）を含む種々の抗体構造を包含する。天然のインタクトな抗体は一般に、２つの重ポリペプチド鎖（Ｈ）及び２つの軽ポリペプチド鎖（Ｌ）が共有ジスルフィド結合及び非共有相互作用により結合したＹ字型の四量体タンパク質である。抗体の軽鎖は、κ軽鎖及びλ軽鎖に分類し得る。重鎖は、μ、δ、γ、α、及びεに分類することができ、これにより抗体のアイソタイプがＩｇＭ、ＩｇＤ、ＩｇＧ、ＩｇＡ、及びＩｇＥとしてそれぞれ定義される。軽鎖及び重鎖では、可変領域が、約１２以上のアミノ酸の「Ｊ」領域を介して定常領域に連結されており、重鎖は、約３以上のアミノ酸の「Ｄ」領域を更に含む。各重鎖は、重鎖可変領域（V_H）及び重鎖定常領域（C_H）からなる。重鎖定常領域は、３つのドメイン（C_H1、C_H2、及びC_H3）からなる。各軽鎖は、軽鎖可変領域（V_L）及び軽鎖定常領域（C_L）からなる。V_H領域及びV_L領域は、高頻度可変領域（相補性決定領域（ＣＤＲ）と呼ばれる）に更に分離することができ、この間には、相対的に保存的な領域（フレームワーク領域（ＦＲ）と呼ばれる）が配置される。V_H及びV_Lはそれぞれ、Ｎ末端からＣ末端に次の順序で３つのＣＤＲ及び４つのＦＲからなる：ＦＲ１、ＣＤＲ１、ＦＲ２、ＣＤＲ２、ＦＲ３、ＣＤＲ３、ＦＲ４。各重／軽鎖対の可変領域（V_H及びV_L）は、抗原結合部位をそれぞれ形成する。フレームワーク領域及びＣＤＲの範囲は、当技術分野において公知の方法を使用して、例えば、Kabatの定義、Dr. Martinによるウェブサイトの定義、Chothiaの定義、ＡｂＭの定義、ＥＵの定義、及び接触定義（contact definition）により、詳細に同定することができ、これらは全て、当技術分野において周知である。例えば、Kabat, E.A., et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242；Martin A. "Antibody bioinformatics website of Dr. Andrew Martin's lab at UCL," last updated on 31 July 2018; Chothia et al., (1989) Nature 342:877；Chothia, C. et al. (1987) J. Mol. Biol. 196:901-917；Al-lazikani et al (1997) J. Molec. Biol. 273:927-948

；Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A. 1969 May;63(1):78-85；及びAlmagro, J. Mol. Recognit. 17:132-143 (2004)を参照されたい。また、hgmp.mrc.ac.uk及びbioinf.org.uk/absを参照されたい。種々の定義による付番間の対応関係又はアラインメントは、例えば、http://www.imgt.org/に見出すことができる（また、Giudicelli V et al. . IMGT, the international ImMunoGeneTics database. Nucleic Acids Res. (1997) 25:206-11；Lefranc MP et al. Unique database numbering system for immunogenetic analysis. Immunol Today (1997) 18:509；及びLefranc MP et al., IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains. Dev Comp Immunol. (2003) 27:55-77)を参照）。抗体は、種々の抗体アイソタイプの抗体、例えば、ＩｇＧ（例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３若しくはＩｇＧ４サブタイプ）、ＩｇＡ１、ＩｇＡ２、ＩｇＤ、ＩｇＥ又はＩｇＭ抗体であり得る。

【００４２】

抗体の「抗原結合部分」又は「抗原結合断片」の用語は、本出願の文脈において互換的に使用可能であるが、完全長抗体の断片を含むポリペプチドを指し、完全長抗体が特異的に結合する抗原に特異的に結合する能力を保持し、及び／又は同じ抗原への結合が完全長抗体と競合する。一般には、Fundamental Immunology, Ch. 7 (Paul, W., ed., the second edition, Raven Press, N.Y. (1989)を参照されたく、これは、あらゆる目的において参照により本明細書に組み込む。抗体の抗原結合断片は、例えば、適する任意の標準技術、例えば、タンパク質分解技術、又は抗体可変ドメイン及び任意の定常ドメインをコードするＤＮＡの操作及び発現を含む組換え遺伝子改変技術を使用して、完全抗体（full antibody）分子から得られ得る。このようなＤＮＡは、公知であり、及び／若しくは例えば、商業的ソース、ＤＮＡライブラリー（例えば、ファージ－抗体ライブラリーを含む）から容易に入手可能であるか、又は合成することができる。ＤＮＡは、シーケンシングし、化学的に又は分子生物学的技術を使用することにより操作して、例えば、１若しくは２以上の可変ドメイン及び／若しくは定常ドメインを適する立体構造に配置するか、又はコドンの導入、システイン残基の生成、アミノ酸の修飾、付加若しくは欠失等を行い得る。

【００４３】

抗原結合断片の非制限的な例としては、（ｉ）Ｆａｂ断片、（ii）Ｆ（ａｂ’）２断片、（iii）Ｆｄ断片、（iv）Ｆｖ断片、（ｖ）一本鎖Ｆｖ（ｓｃＦｖ）分子、（vi）ｄＡｂ断片、及び（vii）抗体の高頻度可変領域（例えば、単離した相補性決定領域（ＣＤＲ）例えば、ＣＤＲ３ペプチド）又はＦＲ３－ＣＤＲ３－ＦＲ４制限ペプチドを模倣するアミノ酸残基からなる最小認識単位が挙げられる。また、他の改変分子、例えば、ドメイン特異的抗体、単一ドメイン抗体、ドメイン欠失抗体、キメラ抗体、ＣＤＲ移植抗体、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、ナノボディ（例えば、一価ナノボディ、二価ナノボディ等）、小型モジュール免疫医薬品（small modular immunopharmaceuticals，ＳＭＩＰ）、及びサメＩｇＮＡＲ可変ドメインを、本明細書において使用する「抗原結合断片」の表現に包含する。特定の実施形態では、抗体の抗原結合断片は、少なくとも１つの定常ドメインに共有結合する少なくとも１つの可変ドメインを含有し得る。可変ドメイン及び定常ドメインは、相互に直接連結するか、又は完全若しくは部分的ヒンジ若しくはリンカー領域により連結するかのいずれかであり得る。ヒンジ領域は、少なくとも２つ（例えば、５、１０、１５、２０、４０、６０以上）のアミノ酸からなってもよく、これにより、単一ポリペプチド分子において隣接する可変ドメイン及び／又は定常ドメイン間に可動性又は半可動性結合が生じる。

【００４４】

抗体に関する「可変領域」又は「可変ドメイン」の用語は、本明細書において使用する場合、１又は２以上のＣＤＲを含む抗体可変領域又はこの断片を指す。可変ドメインは、インタクトな可変領域（例えば、ＨＣＶＲ又はＬＣＶＲ）を含み得るが、抗原に結合する

か又は抗原結合部位を形成する能力をなお保持するにもかかわらず、インタクトな可変領域さえも含まない可能性も有する。

【００４５】

「定常領域」の用語は、本明細書において使用する場合、免疫グロブリン定常領域を指し、これは、重鎖にＣＨ１ドメイン、ＣＨ２ドメイン、ＣＨ３ドメイン（及び任意のヒンジ領域）を、軽鎖に定常ドメインを含む。抗体の重鎖定常領域及び軽鎖定常領域は、当技術分野において周知であり、例えば、ＩＭＧＴデータベース（ｗｗｗ.imgt.org）又はｗｗｗ.vbase2.org/vbstat.php.において提供されているものが挙げられ、これらの両方は、参照により本明細書に組み込む。抗体に関する「Ｆｃ」は、第１の重鎖の第２の定常領域（ＣＨ２）及び第３の定常領域（ＣＨ３）を含み、第２の重鎖の第２の定常領域及び第３の定常領域にジスルフィド結合を介して結合する、抗体の部分を指す。また、Ｆｃ領域は、ヒンジ領域の部分又は全体を含み得る。抗体のＦｃ領域は、種々のエフェクター機能、例えば、ＡＤＣＣ及びＣＤＣを司るが、抗原結合においては機能しない。Ｆｃドメインを介してエフェクター機能を開始し調節する抗体の能力は、インビボでの防御活性の鍵となる成分である。抗体の中和活性は、Ｆａｂ－抗原相互作用の単なる結果であるとこれまでに考えられてきたが、これらのインビボでの活性が、ＩｇＧ　Ｆｃドメインと、この同族受容体でありエフェクター白血球の表面上に発現するＦｃγ受容体（ＦｃγＲ）との相互作用に高度に依存することが明らかとなった。

【００４６】

ＣＤ２７６抗原としても知られる「Ｂ７Ｈ３」の用語は、Ｂ７ファミリーのメンバーであり、単一のＩｇＶ－ＩｇＣドメイン対で構成される外部ドメインを有する、１型膜貫通タンパク質を指す。Ｂ７ファミリータンパク質は、細胞外ＩｇＶ様ドメイン及びＩｇＣ様ドメインを短い細胞質尾部とともに含有する。Ｂ７Ｈ３は、免疫チェックポイント分子であり、多くの種類のがんにおいて異常に高発現する。Ｂ７Ｈ３タンパク質のアミノ酸配列に言及する場合、完全長Ｂ７Ｈ３タンパク質（例えば、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３タンパク質若しくはヒト２ＩｇＢ７Ｈ３タンパク質）又はＢ７Ｈ３の細胞外ドメイン（Ｂ７Ｈ３　ＥＣＤ）若しくはＢ７Ｈ３　ＥＣＤを含む断片；Ｂ７Ｈ３　ＥＣＤの融合タンパク質を含む。Ｂ７Ｈ３タンパク質の例となる配列は、ＵｎｉｐｒｏｔＩＤ：Ｑ５ＺＰＲ３（ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３）、Ｇｅｎｅｂａｎｋ受託番号ＮＰ＿００１０１９９０７（ヒト）、ＮＰ＿００１３１６５５７（ヒト）、ＮＰ＿００１３１６５５８（ヒト）、ＮＰ＿０７９５１６（ヒト）、及びＮＰ＿５９８７４４（マウス）に見出すことができる。カニクイザルＢ７Ｈ３は、ヒト及びマウスのＢ７Ｈ３とおよそ９７％及び８８％のアミノ酸配列同一性をそれぞれ共有する。

【００４７】

「Ｂ７Ｈ３に結合する抗体」又は「抗Ｂ７Ｈ３抗体」の用語は、本明細書において使用する場合、Ｂ７Ｈ３タンパク質を特異的に認識する抗体及びこの抗原結合断片、並びにＢ７Ｈ３タンパク質に特異的に結合する抗体及びこの抗原結合断片を含む。本明細書において使用する場合、「抗Ｂ７Ｈ３抗体」の表現は、単一特異性を有する一価抗体と、Ｂ７Ｈ３に結合する第１の抗原結合部位及び第２の（標的）抗原に結合する第２の抗原結合部位を含む二重特異性抗体との両方を含む。

【００４８】

「モノクローナル抗体」又は「ｍＡｂ」の用語は、本明細書において使用する場合、単一分子組成の抗体分子の調製物を指す。モノクローナル抗体は、特定のエピトープに対する単一の結合特異性及び結合親和性を呈する。

【００４９】

「キメラ抗体」の用語は、本明細書において使用する場合、抗体の元来の抗原結合可変ドメイン（例えば、マウス）を、異なる種（例えば、ヒト）由来の定常ドメインとともに含むか又はこれらからなる抗体を指す。好ましくは、「キメラ抗体」の用語は、本明細書において使用する場合、抗体の元来の抗原結合可変ドメイン（例えば、マウス）と、異なる種（例えば、ヒト）由来の定常ドメインとからなる抗体を指す。

【００５０】
「ヒト化抗体」の用語は、別の哺乳動物種、例えば、ラット／マウスの生殖系列に由来するＣＤＲ配列を、ヒトフレームワーク配列上に移植した抗体を指すことを意図する。フレームワーク領域内の更なる修飾は、ヒトフレームワーク配列内で行い得る。例えば、フレームワーク領域の特定の残基を元来の配列に復帰変異させて、親和性を維持し得る。
【００５１】
「動作可能に連結」の用語は、意図するように機能することが可能となる関係性にあるように、目的の２つ以上の生物学的配列がスペーサー又はリンカー有り無しで近傍に位置することを指す。ポリペプチドに関して使用する場合では、連結した生成物が意図する生物学的機能を有することが可能となるように、ポリペプチド配列が連結することを意味することを意図する。例えば、抗体可変領域は、抗原結合活性を有する安定な生成物をもたらすように、定常領域に動作可能に連結させ得る。この用語は、ポリヌクレオチドに関しても使用し得る。ある場合では、ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが調節配列（例えば、プロモーター、エンハンサー、サイレンサー配列等）に動作可能に連結するとき、ポリヌクレオチドからのポリペプチド発現の調節が可能となるように、ポリヌクレオチド配列が連結することを意味することを意図する。
【００５２】
「K_D」の用語は、本明細書において使用する場合、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を指すことを意図し、これは、k_dのk_aに対する比率（即ち、k_d／k_a）から得られ、モル濃度（Ｍ）として表す。「k_a」の用語は、本明細書において使用する場合、特定の抗体－抗原相互作用の会合速度を指すことを意図し、一方、「k_d」の用語は、本明細書において使用する場合、特定の抗体－抗原相互作用の解離速度を指すことを意図する。抗体のK_D値は、当技術分野において充分に確立された方法を使用して決定することができる。抗体のK_Dの決定に好ましい方法は、表面プラズモン共鳴を使用し、好ましくは、バイオセンサーシステム、例えば、Biacore（登録商標）システムを使用することによる方法である。
【００５３】
ＩｇＧ抗体に関する「高親和性」の用語は、本明細書において使用する場合、抗原と抗体との間の結合相互作用の強度を指す。親和性の測定では、当技術分野において種々の方法が確立されており、例えば、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ，surface plasmon resonance）、ＦＡＣＳ親和性検査、ＦＡＣＳ結合検査、及びＥＬＩＳＡ結合が挙げられる。一部の実施形態では、本明細書に開示の抗体は、ＳＰＲにより決定した場合、標的抗原に対して1×10^{-9}Ｍ以下、より好ましくは、5×10^{-10}Ｍ以下、更により好ましくは、1×10^{-10}Ｍ以下、更により好ましくは、9×10^{-11}Ｍ以下、及び更により好ましくは、8×10^{-11}Ｍ以下のK_Dを有する。
【００５４】
「EC_{50}」の用語は、本明細書において使用する場合、「半数最大有効濃度」とも呼ばれるが、特定の曝露時間後にベースライン値と最大値との間の半分の応答を誘導する薬物、抗体又は毒物の濃度を指す。本出願の文脈では、EC_{50}は、「ｎＭ」の単位により表す。
【００５５】
「単離」の用語は、本明細書において使用する場合、天然状態から人工的手段により得られた状態を指す。特定の「単離」物質又は成分が天然に存在する場合、この単離は、天然環境が変化するか、若しくは天然環境から物質を単離するか、又はこの両方により可能である。例えば、特定の未単離ポリヌクレオチド又はポリペプチドは、特定の生きている動物体内で天然に存在しており、このような天然状態から単離した高純度の同じポリヌクレオチド又はポリペプチドは、単離ポリヌクレオチド又はポリペプチドと呼ばれる。「単離」の用語は、人工又は合成物質の混合物も、単離物質の活性に影響しない他の不純物質も除外しない。
【００５６】

「単離抗体」の用語は、本明細書において使用する場合、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体を指すことを意図する（例えば、Ｂ７Ｈ３タンパク質に特異的に結合する単離抗体は、Ｂ７Ｈ３タンパク質以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。しかし、ヒトＢ７Ｈ３タンパク質に特異的に結合する単離抗体は、他の抗原、例えば、他の種由来のＢ７Ｈ３タンパク質に対する交差反応性を有し得る。その上、単離抗体は、他の細胞材料及び／又は化学物質を実質的に含まないことがあり得る。

【００５７】

「ベクター」の用語は、本明細書において使用する場合、ポリヌクレオチドを挿入可能な核酸媒体を指す。挿入されたポリヌクレオチドによりコードされたタンパク質の発現をベクターが可能とする場合、ベクターは、発現ベクターと呼ばれる。ベクターは、宿主細胞への形質転換、形質導入又はトランスフェクションにより宿主細胞において発現する遺伝子材料エレメントを保有し得る。ベクターは、当業者に周知であり、プラスミド、ファージ、コスミド、人工染色体、例えば、酵母人工染色体（ＹＡＣ，yeast artificial chromosome）、細菌人工染色体（ＢＡＣ，bacterial artificial chromosome）又はＰ１由来人工染色体（ＰＡＣ，P1-derived artificial chromosome）；ファージ、例えば、λファージ又はＭ１３ファージ、及び動物ウイルスを含むが、これらに制限されない。ベクターとして使用可能な動物ウイルスとしては、レトロウイルス（レンチウイルスを含む）、アデノウイルス、アデノ随伴ウイルス、ヘルペスウイルス（例えば、単純ヘルペスウイルス）、ポックスウイルス、バキュロウイルス、パピローマウイルス、パポバウイルス（例えば、ＳＶ４０）が挙げられるが、これらに制限されない。ベクターは、発現を制御するための複数のエレメントを含んでもよく、これらには、プロモーター配列、転写開始配列、エンハンサー配列、選択エレメント、及びレポーター遺伝子が挙げられるが、これらに制限されない。加えて、ベクターは、複製起点を含み得る。

【００５８】

「宿主細胞」の用語は、本明細書において使用する場合、目的のタンパク質、タンパク質断片又はペプチドを生成するように改変可能な細胞系を指す。宿主細胞は、培養細胞、例えば、齧歯動物（ラット、マウス、モルモット若しくはハムスター）由来の哺乳動物培養細胞、例えば、ＣＨＯ、ＢＨＫ、ＮＳＯ、ＳＰ２／０、ＹＢ２／０；又はヒト組織若しくはハイブリドーマ細胞、酵母細胞及び昆虫細胞、並びに遺伝子導入動物若しくは培養組織に含まれる細胞を含むが、これらに制限されない。この用語は、特定の対象細胞だけでなく、このような細胞の後代をも包含する。変異又は環境による影響のいずれかにより後継世代に特定の修飾が生じ得るため、このような後代は、親細胞と同一ではない可能性を有するが、「宿主細胞」の用語の範囲になお含まれる。

【００５９】

「同一性」の用語は、本明細書において使用する場合、配列のアラインメント及び比較により決定した場合の２つ以上のポリペプチド分子又は２つ以上の核酸分子の配列間の関係性を指す。「パーセント同一性」は、比較分子におけるアミノ酸又はヌクレオチド間の同一残基のパーセントを意味し、比較する最小分子のサイズに基づいて算出する。このような算出では、アラインメントのギャップ（存在する場合）は、好ましくは、特定の数理モデル又はコンピュータープログラム（即ち、「アルゴリズム」）により指定される。アラインメントした核酸又はポリペプチドの同一性の算出に使用可能な方法としては、Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press；Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York: Academic Press；Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press；von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press；Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press；及びCarillo et al, 1988, SIAMJ. Applied Math. 48:1073に記載の方法が挙げられる。

【００６０】
「免疫原性」の用語は、本明細書において使用する場合、生体において特異的抗体又は感作リンパ球の形成を刺激する能力を指す。これは、特定の免疫細胞を刺激して活性化、増殖、及び分化させることにより免疫エフェクター物質、例えば、抗体及び感作リンパ球を最終的に生成する抗原の特性を指すだけでなく、抗原による生体の刺激後に生体の免疫系において抗体又は感作Ｔリンパ球が形成され得る特定の免疫応答をも指す。免疫原性は、抗原の最も重要な特性である。抗原が宿主における免疫応答生成の誘導に成功し得るかどうかは、抗原の特性、宿主の反応性、及び免疫手段の３つの因子に依存する。
【００６１】
「トランスフェクション」の用語は、本明細書において使用する場合、真核細胞、特には、哺乳動物細胞に核酸を導入するプロセスを指す。トランスフェクションのプロトコル及び技術としては、脂質トランスフェクション、並びに化学的及び物理的方法、例えば、エレクトロポレーションが挙げられるが、これらに制限されない。多数のトランスフェクション技術が、当技術分野において周知であり、本明細書にも開示する。例えば、Graham et al., 1973, Virology 52:456；Sambrook et al., 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, supra；Davis et al., 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier；Chu et al, 1981, Gene 13:197を参照されたい。本開示の特定の実施形態では、ヒトＢ７Ｈ３遺伝子を２９３Ｆ又はＣＨＯ細胞にトランスフェクトし得る。
【００６２】
「ＳＰＲ」又は「表面プラズモン共鳴」の用語は、本明細書において使用する場合、例えば、ＢＩＡｃｏｒｅシステム（Pharmacia Biosensor AB社、Uppsala, スウェーデン、及びPiscataway, N.J.）を使用する、バイオセンサーマトリックスにおけるタンパク質濃度の変化の検出により生体分子特異的相互作用の解析がリアルタイムで可能となる光学現象を指し、これを含む。更なる説明については、Jonsson, U., et al. (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26；Jonsson, U., et al. (1991) Biotechniques 11:620-627；Johnsson, B., et al. (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131；及びJohnnson, B., et al. (1991) Anal. Biochem. 198:268-277を参照されたい。
【００６３】
「蛍光活性化細胞選別」又は「ＦＡＣＳ」の用語は、本明細書において使用する場合、特殊化した種類のフローサイトメトリーを指す。これにより、生体細胞の異種性混合物を２つ以上の容器に、一度に一細胞ずつ、各細胞の特定の光散乱特性及び蛍光特性に基づいて選別するための方法がもたらされる（FlowMetric. "Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting". Retrieved 2017-11-09）。ＦＡＣＳを実行するための装置は、当業者に公知であり、一般に市販されている。このような装置の例としては、Becton Dickinson社（Foster City, Calif.）のFACS Star Plus、FACScan及びFACSort装置、Coulter Epics Division社（Hialeah, Fla.）のEpics C、及びCytomation社（Colorado Springs, Colo.）のMoFloが挙げられる。
【００６４】
「対象」の用語は、任意のヒト又は非ヒト動物を含む。一部の実施形態では、対象は、好ましくは、ヒトである。
【００６５】
「Ｂ７Ｈ３と関連する障害」の用語は、本明細書において使用する場合、Ｂ７Ｈ３（例えば、ヒトＢ７Ｈ３）により生じるか、これにより増悪するか、さもなければこの発現又は活性の上昇又は低下（一般には、上昇）と関連する、任意の症状又は疾患を指す。
【００６６】
「がん」の用語は、本明細書において使用する場合、任意の腫瘍又は悪性細胞の成長、増殖又は転移により媒介される、固形腫瘍、及び非固形腫瘍、例えば、白血病を指す。
【００６７】
「治療（treatment）」、「治療（treating）」又は「治療（treated）」の用語は

、症状を治療する文脈により本明細書において使用する場合、ヒトか動物かにかかわらず、一部の所望の治療作用、例えば、症状の進行の阻害が達成される、治療及び療法に概して関係し、進行速度の低減、進行速度の抑止、症状の退縮、症状の回復、及び症状の治癒を含む。発症予防的手段（即ち、発症予防、予防）としての治療をも含む。がんでは、「治療（treating）」は、腫瘍若しくは悪性細胞の成長、増殖若しくは転移の減衰若しくは緩徐化、又はこれらの一部の組合せを指し得る。腫瘍では、「治療（treatment）」は、腫瘍の全て若しくは部分の除去、腫瘍の成長及び転移の阻害若しくは緩徐化、腫瘍発生の予防若しくは遅延、又はこれらの一部の組合せを含む。

【００６８】

「有効量」の用語は、本明細書において使用する場合、所望の治療レジメンに従って投与すると、一部の所望の治療作用の生成に有効であり、合理的なベネフィット・リスク比に見合った、活性化合物、又は活性化合物を含む材料、組成物若しくは剤形の量に関係する。例として、「有効量」は、Ｂ７Ｈ３と関連する疾患又は症状の治療と関連して使用した場合、この疾患又は症状を治療又は予防するのに有効な量又は濃度の抗体又はその抗原結合部分を指す。

【００６９】

「予防（prevent）」、「予防（prevention）」又は「予防（preventing）」の用語は、哺乳動物における特定の病状に関して本明細書において使用する場合、疾患の発症を予防若しくは遅延させること、又はこの臨床的若しくは亜臨床的症候の発現を予防することを指す。

【００７０】

「薬学的に許容される」の用語は、本明細書において使用する場合、媒体、希釈剤、賦形剤、及び／又はこれらの塩が、製剤中の他の成分と化学的及び／又は物理的に適合し、レシピエントと生理学的に適合することを意味する。

【００７１】

本明細書において使用する場合、「薬学的に許容される担体及び／又は賦形剤」の用語は、対象及び活性物質と薬理学的及び／又は生理学的に適合する担体及び／又は賦形剤を指す。これは当技術分野において周知であり（例えば、Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995を参照）、ｐＨ調整剤、界面活性剤、アジュバント、及びイオン強度増強剤が挙げられるが、これらに制限されない。例えば、ｐＨ調整剤としては、リン酸緩衝液が挙げられ得るが、これに制限されず、界面活性剤としては、カチオン性、アニオン性又は非イオン性界面活性剤、例えば、Tween-80が挙げられ得るが、これに制限されず、イオン強度増強剤としては、塩化ナトリウムが挙げられ得るが、これに制限されない。

【００７２】

本明細書において使用する場合、「アジュバント」の用語は、抗原とともに生体に送達されるか又は先に生体に送達される場合、抗原に対する免疫応答を増強するか又は生体における免疫応答の種類を変化させることが可能な、非特異的免疫賦活剤を指す。多様なアジュバントが存在し、アルミニウムアジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）、フロイントアジュバント（例えば、フロイント完全アジュバント及びフロイント不完全アジュバント）、コリネバクテリウム・パルバム（coryne bacterium parvum）、リポ多糖、サイトカイン等が挙げられるが、これらに制限されない。フロイントアジュバントは現在、動物実験において最も一般的に使用されるアジュバントである。水酸化アルミニウムアジュバントは、臨床試験において、より一般的に使用される。

【００７３】

Ｂ７Ｈ３に特異的に結合する抗体

本開示では、Ｂ７Ｈ３、例えば、ヒトＢ７Ｈ３、マウスＢ７Ｈ３、カニクイザルＢ７Ｈ３、及びこれらのＥＣＤドメインに特異的に結合する抗体を提供する。「抗体」の用語は、本明細書において使用する場合、完全長免疫グロブリンと、同じ抗原に結合するこの抗

体部分との両方を含む。抗体は、例えば、モノクローナル、ポリクローナル、キメラ、ヒト化又は一本鎖抗体であり得る。一部の実施形態では、抗体部分は、Ｆａｂ断片又はＦ（ａｂ’）２断片である。一部の実施形態では、抗体部分は、Ｂ７Ｈ３に特異的に結合する能力を保持する。

【００７４】

組換え抗Ｂ７Ｈ３抗体、例えば、ヒト及び非ヒトの両部分を含む、キメラ抗体及びヒト化モノクローナル抗体は、標準的組換えＤＮＡ技術を使用して作製可能であるが、本開示の範囲内に存在する。このようなキメラ抗体及びヒト化モノクローナル抗体は、組換えＤＮＡ技術、例えば、米国特許第７，１１２，４２１号；Better et al. (1988) Science 240:1041-1043；又はLiu et ai. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443に記載の方法により生成することができる。例えば、親和性成熟、復帰変異、及び翻訳後修飾部位の除去により、更に修飾／最適化したヒト化モノクローナル抗体をも本開示に含む。

【００７５】

好ましくは、本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に高親和性で結合し得る。本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に、はるかに低い親和性で結合し得る。本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３には高親和性で結合するが、ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３には、はるかに低い親和性で結合し得る。

【００７６】

本開示の抗体のＢ７Ｈ３への結合は、当技術分野において充分に確立された１又は２以上の技術、例として、ＥＬＩＳＡ又はフローサイトメトリーを使用して評価することができる。一部の実施形態では、抗体は、ヒトＢ７Ｈ３を発現する細胞株、例えば、Ｂ７Ｈ３を細胞表面上に発現するようにトランスフェクトしたＭＣＦ－７がん細胞又はＣＨＯＫ１細胞と抗体を反応させる、フローサイトメトリーアッセイにより検査することができる。加えて又は或いは、結合動態（例えば、K_D値）を含む抗体の結合は、ＢＩＡｃｏｒｅ結合アッセイにより検査することができる。一部の他の実施形態では、抗体を可溶性Ｂ７Ｈ３タンパク質と反応させるＥＬＩＳＡにより、抗体を検査する。

【００７７】

本開示では、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により測定した場合、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３タンパク質に1×10^{-8}Ｍ以下のK_D、1×10^{-9}Ｍ以下のK_D、5×10^{-10}Ｍ以下のK_D、1×10^{-10}Ｍ以下のK_D、9×10^{-11}Ｍ以下のK_D、8×10^{-11}Ｍ以下のK_D又は7×10^{-11}Ｍ以下のK_Dで結合する抗体を提供する。また、本明細書に開示の抗体は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により測定した場合、ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３タンパク質に5×10^{-9}Ｍ以上のK_D、1×10^{-8}Ｍ以上のK_D、2×10^{-8}Ｍ以上のK_D、3×10^{-8}Ｍ以上のK_D又は4×10^{-8}Ｍ以上のK_Dで結合し得る。一部の実施形態では、本明細書の抗体は、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に、ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に対する結合の値の５００分の１未満、１００分の１未満又は５０分の１未満のK_D値で結合する。比較のためのこのようなK_D値は、表面プラズモン共鳴（ＳＰＲ）により測定し得る。

【００７８】

一部の実施形態では、本開示の抗体は、ＦＡＣＳにより決定した場合、ヒト又はカニクイザルＢ７Ｈ３発現細胞株に５ｎＭ未満、４ｎＭ未満、３ｎＭ未満又は２ｎＭ未満のEC_{50}で結合可能である。

【００７９】

抗体可変ドメイン及びＣＤＲ

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、Ｂ７Ｈ３、好ましくは、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に特異的に結合するキメラ抗体又はマウス抗体である。一部の更なる実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、Ｂ７Ｈ３、好ましくは、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に特異的に結合するヒト化抗体である。一部のなお更なる実施形態では、ヒト化抗体又はその抗

原結合部分は、フレームワーク領域に１又は２以上の復帰変異を含む。一部のなお更なる実施形態では、ヒト化抗体又はその抗原結合部分は、例えば、ＣＤＲにおけるＮＧ、ＮＳ、及びＤＧ、全長におけるＮＸＳ及びＮＸＴ（ＸはＰを除く任意のアミノ酸であり得る）を除去するように、潜在的翻訳後修飾（ＰＴＭ，post-translational modification）部位に１又は２以上の修飾を含む。

【００８０】

一部の実施形態では、本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、

（ｉ）配列番号１を含むＨＣＤＲ１、又は配列番号１由来のアミノ酸配列においてアミノ酸の付加、欠失若しくは置換が２アミノ酸以下（例えば、２アミノ酸若しくは１アミノ酸）異なるＨＣＤＲ１、

（ii）配列番号２を含むＨＣＤＲ２、又は配列番号２由来のアミノ酸配列においてアミノ酸の付加、欠失若しくは置換が２アミノ酸以下（例えば、２アミノ酸若しくは１アミノ酸）異なるＨＣＤＲ２、及び

（iii）配列番号３を含むＨＣＤＲ３、又は配列番号３由来のアミノ酸配列においてアミノ酸の付加、欠失若しくは置換が２アミノ酸以下（例えば、２アミノ酸若しくは１アミノ酸）異なるＨＣＤＲ３

からなる群の少なくとも１つから選択される１又は２以上の重鎖ＣＤＲ（ＨＣＤＲ）、並びに／或いは

（ｉ）配列番号４、７若しくは１８を含むＬＣＤＲ１、又は配列番号４、７若しくは１８由来のアミノ酸配列においてアミノ酸の付加、欠失若しくは置換が２アミノ酸以下（例えば、２アミノ酸若しくは１アミノ酸）異なるＬＣＤＲ１、

（ii）配列番号５を含むＬＣＤＲ２、又は配列番号５由来のアミノ酸配列においてアミノ酸の付加、欠失若しくは置換が２アミノ酸以下（例えば、２アミノ酸若しくは１アミノ酸）異なるＬＣＤＲ２、及び

（iii）配列番号６を含むＬＣＤＲ３、又は配列番号６由来のアミノ酸配列においてアミノ酸の付加、欠失若しくは置換が２アミノ酸以下（例えば、２アミノ酸若しくは１アミノ酸）異なるＬＣＤＲ３

からなる群の少なくとも１つから選択される１又は２以上の軽鎖ＣＤＲ（ＬＣＤＲ）を含む。

【００８１】

一部の実施形態では、ＣＤＲにおけるアミノ酸の置換は、保存的置換である。一部の実施形態では、上記の抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１を含むか又はこれからなるＨＣＤＲ１、配列番号２を含むか又はこれからなるＨＣＤＲ２、配列番号３を含むか又はこれからなるＨＣＤＲ３、配列番号７を含むか又はこれからなるＬＣＤＲ１、配列番号５を含むか又はこれからなるＬＣＤＲ２、及び配列番号６を含むか又はこれからなるＬＣＤＲ３を含み得る。詳細には、抗体は、潜在的ＰＴＭ部位を除去するように、ＣＤＲにおいて１又は２以上の修飾を更に含み得る。一部の実施形態では、抗体は、配列内の潜在的ＰＴＭ部位である「ＮＳ」を除去するように、配列番号７（「ＫＳＳＱＳＬＬＮＳＳＮＱＫＮＹＬＡ」）に示すＬＣＤＲ１と比較して、ＬＣＤＲ１において１又は２以上の修飾を含む。一部の好ましい実施形態では、抗体は、配列番号７（「ＫＳＳＱＳＬＬＮＳＳＮＱＫＮＹＬＡ」）に示すＬＣＤＲ１と比較して、ＬＣＤＲ１のアミノ酸配列の８又は９番目に１つの置換を含む。一部のより好ましい実施形態では、抗体は、ＬＣＤＲ１のアミノ酸配列（即ち、配列番号４、「ＫＳＳＱＳＬＬＱＳＳＮＱＫＮＹＬＡ」）の８番目にＮからＱへの置換を含む。一部の他の実施形態では、抗体は、ＬＣＤＲ１のアミノ酸配列（即ち、配列番号１８、「ＫＳＳＱＳＬＬＮＰＳＮＱＫＮＹＬＡ」）の９番目にＳからＰへの置換を含む。当業者は、Ｂ７Ｈ３に対する結合親和性が実質的に保持される限り、他の種類の置換を選択可能であることを理解するであろう。

【００８２】

一部の実施形態では、本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、配列番号１を含むか又はこれからなるＨＣＤＲ１、配列番号２を含むか又はこれからなるＨＣＤＲ２、配

列番号３を含むか又はこれからなるＨＣＤＲ３、配列番号４を含むか又はこれからなるＬＣＤＲ１、配列番号５を含むか又はこれからなるＬＣＤＲ２、及び配列番号６を含むか又はこれからなるＬＣＤＲ３を含み得る。

【００８３】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、これらの重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、上記のＨＣＤＲ１～３及びＬＣＤＲ１～３をそれぞれ含む。

【００８４】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分の重鎖可変領域は、
（ｉ）配列番号８若しくは１０のアミノ酸配列、（ii）配列番号８若しくは１０に対して少なくとも８５％、９０％若しくは９５％同一のアミノ酸配列、又は（iii）配列番号８若しくは１０と比較して１若しくは２以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０若しくはこれ以上）のアミノ酸の付加、欠失、及び／若しくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

【００８５】

一部の実施形態では、アミノ酸の置換は、保存的置換であり得る。

【００８６】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分の軽鎖可変領域は、
（ｉ）配列番号９若しくは１１のアミノ酸配列、（ii）配列番号９若しくは１１に対して少なくとも８５％、少なくとも９０％若しくは少なくとも９５％同一のアミノ酸配列、又は（iii）配列番号９若しくは１１と比較して１若しくは２以上（例えば、１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０若しくはこれ以上）のアミノ酸の付加、欠失、及び／若しくは置換を有するアミノ酸配列を含む。

【００８７】

一部の実施形態では、アミノ酸の置換は、保存的置換であり得る。

【００８８】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、重鎖可変領域（ＶＨ）及び軽鎖可変領域（ＶＬ）を含み、このＶＨは、
（ｉ）配列番号８若しくは１０のアミノ酸配列、又は（ii）配列番号８若しくは１０と比較してフレームワーク領域に１若しくは２以上（例えば、１、２、３、４、５若しくはこれ以上）のアミノ酸の置換を有するアミノ酸配列を含み、及び／或いは
このＶＬは、
（ｉ）配列番号９若しくは１１のアミノ酸配列、又は（ii）配列番号９若しくは１１と比較してフレームワーク領域に１若しくは２以上（例えば、１、２、３、４、５若しくはこれ以上）のアミノ酸の置換を有するアミノ酸配列を含む。

【００８９】

一部の実施形態では、アミノ酸の置換は、保存的置換であり得る。

【００９０】

一部の実施形態では、抗体又はその抗原結合部分は、配列番号８又は１０に示すＶＨ領域のＨＣＤＲ１、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３、並びに配列番号９又は１１に示すＶＬ領域のＬＣＤＲ１、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３を含む。

【００９１】

当業者に理解されるように、ＣＤＲの正確な付番及び配置は、種々の付番方式間で異なり得る。しかし、重可変配列及び／又は軽可変配列の開示が、関連する（固有の）ＣＤＲの開示を含むことが理解されるべきである。したがって、各重可変領域の開示は、重鎖ＣＤＲ（例えば、ＨＣＤＲｌ、ＨＣＤＲ２、及びＨＣＤＲ３）の開示であり、各軽可変領域の開示は、軽鎖ＣＤＲ（例えば、ＬＣＤＲｌ、ＬＣＤＲ２、及びＬＣＤＲ３）の開示である。ＣＤＲ付番の有用な比較は、下記のとおりであり、Lafranc et al., Dev. Comp. Immunol. 27(1):55-77 (2003)を参照されたい。

【表１】

CDR	Kabat	IMGT	Chothia	AbM	Kabat+ Chothia	Dr. Martin (詳細は上記の Martin, 2018 を参照)
HCDR1	31-35	27-38	26-32	26-35	26-35	CXXX+HCDR1+W
HCDR2	50-65	56-65	52-56	50-58	50-65	LEWG+HCDR2
HCDR3	95-102	105-117	95-102	95-102	95-102	CAR+HCDR3+WGXG
LCDR1	24-34	27-38	24-34	24-34	24-34	C+LCDR1+W
LCDR2	50-56	56-65	50-56	50-56	50-56	LCDR1 後 16 残基
LCDR3	89-97	105-117	89-97	89-97	89-97	C+LCDR3+ FGXG

【００９２】
各ＣＤＲへのアミノ酸の割当ては、上に提示の付番規定のうちの１つ又は組合せに従ってもよく、これらは全て、当技術分野において周知である。Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th Ed.), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242；Chothia et al., 1987, PMID: 3681981；Martin A. "Antibody bioinformatics website of Dr. Andrew Martin's lab at UCL," last updated on 31 July 2018；Chothia et al., 1989, PMID: 2687698；MacCallum et al.,1996, PMID: 8876650; Dubel, Ed. (2007) Handbook of Therapeutic Antibodies, 3rd Ed., Wily-VCH Verlag GmbH and Co；及びhttp://www.imgt.org/を参照されたい。

【００９３】
抗体配列の可変領域及びＣＤＲは、当技術分野において開発された通則（上に提示する、例えば、Kabat付番方式、Martin付番方式、及びＩＭＧＴ付番方式）に従って、又は配列を公知の可変領域のデータベースに対してアラインメントすることにより、同定することができる。このような領域同定するための方法は、Kontermann and Dubel, eds., Antibody Engineering, Springer, New York, NY, 2001及びDinarelloet al., Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000に記載されている。抗体配列の例となるデータベースは、Retteret al., Nucl. Acids Res., 33 (Database issue): D671 -D674 (2005)に記載のように、www.bioinf.org.uk/absの「Abysis」ウェブサイト（Department of Biochemistry & Molecular Biology University College London、London、英国のA.C. Martinにより維持）及びwww.vbase2.orgのVBASE2ウェブサイトに記載されており、これらによりアクセスすることができる。例えば、配列は、Abysisデータベースを使用して解析してもよく、これによりKabat、ＩＭＧＴ、及びタンパク質構造データバンク（Protein Data Bank、ＰＤＢ）の配列データを、ＰＤＢの構造データと統合させる。Dr. Andrew C. R. Martin's book chapter Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547、ウェブサイトbioinforg.uk/abs上でも入手可能）を参照されたい。Abysisデータベースのウェブサイトは、ＣＤＲを同定するために開発された通則を更に含み、これは、本明細書の教示に従って使用することができる。同じＶＨＣＤＲ及び／又はＶＬ　ＣＤＲを有する２つの抗体は、同じ手法（例えば、当技術分野において公知のKabatの手法、Dr Martinの手法、Chothiaの手法又はＩＭＧＴ付番）により決定した場合、これらのＣＤＲが同一であることを意味する。

【００９４】
２つのアミノ酸配列間のパーセント同一性は、ALIGNプログラム（バージョン２．０）に組み込まれているE. Meyers及びW. Miller（Comput. Appl. Biosci., 4:11-17 (1988)）のアルゴリズムを使用し、PAM120重み残基表（weight residue table

）、ギャップ長ペナルティ（gap length penalty）１２、及びギャップペナルティ（gap penalty）４を使用して決定することができる。加えて、２つのアミノ酸配列間の同一性のパーセンテージは、GCGソフトウェアパッケージのGAPプログラム（http://www.gcg.comで入手可能）に組み込まれているNeedleman及びWunsch（J. Mol. Biol. 48:444-453 (1970)）のアルゴリズムにより、Blossum62マトリックス又はPAM250マトリックスのいずれか、並びにギャップ重み（gap weight）１６、１４、１２、１０、８、６又は４及び長さ重み（length weight）１、２、３、４、５又は６を使用して決定することができる。

【００９５】

加えて又は或いは、本開示のタンパク質配列は、公開データベースに対する検索を実施するための「クエリ配列」として更に使用して、例えば、関連配列を同定することができる。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のXBLASTプログラム（バージョン２．０）を使用して実施することができる。BLASTタンパク質検索は、XBLASTプログラム、score = 50、wordlength = 3により実施して、本開示の抗体分子に対して相同のアミノ酸配列を得ることができる。比較目的でギャップアラインメントを得るために、Altschul et al, (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載のようにGapped BLASTを利用することができる。BLASTプログラム及びGapped BLASTプログラムを利用する場合、それぞれのプログラムのデフォルトパラメーター（例えば、XBLAST及びNBLAST）を使用することができる。www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい。

【００９６】

他の実施形態では、ＣＤＲアミノ酸配列は、上記のそれぞれの配列に対して少なくとも８０％、８１％、８２％、８３％、８４％、８５％、８６％、８７％、８８％、８９％、９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％同一であり得る。他の実施形態では、可変領域のアミノ酸配列は、上記のそれぞれの配列に対して少なくとも９０％、９１％、９２％、９３％、９４％、９５％、９６％、９７％、９８％又は９９％同一であり得る。

【００９７】

上述のように、ＶＨ又はＶＬ領域のアミノ酸の少なくとも１つの付加、欠失、及び／又は置換は、いずれかのＣＤＲ配列内ではなく、フレームワーク（ＦＲＷ）配列内であり得る。例えば、単離抗体又はその抗原結合部分は、フレームワーク配列内のアミノ酸、例えば、ＶＨ又はＶＬ領域のＦＲＷ１、ＦＲＷ２、ＦＲＷ３、及び／又はＦＲＷ４の１又は２以上の置換を含み得る。一部の実施形態では、ＶＨ領域のフレームワーク領域は、次の置換：Ｓ０２５Ｔ、Ｖ０７１Ｒ、Ｙ０９１Ｆ、Ｖ０８９Ｔの１又は２以上を含む。

【００９８】

一部の実施形態では、６つのＣＤＲのセットは、フレームワーク（ＣＤＲを除く）が親抗体（例えば、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６）に対する少なくとも約８０％、８５％又は９０％の同一性を保持する限り、合計で０、１、２、３、４又は５からのアミノ酸の修飾（好ましくは、アミノ酸の置換）、並びに重可変領域及び軽可変領域のフレームワーク領域における変化を有し得る。したがって、例えば、同一の本明細書に記載のＣＤＲは、フレームワーク領域がヒト生殖系列配列に対する少なくとも８０％、８５％又は９０％の同一性を保持する限り、ヒト生殖系列配列由来の種々のフレームワーク配列と組み合わせることができる。

【００９９】

特定の実施形態では、本明細書において提供する単離抗体又はその抗原結合部分は、抗原結合ドメインがＢ７Ｈ３、好ましくは、ヒトＩｇ４Ｂ７Ｈ３に特異的に結合可能である限り、適する任意のフレームワーク領域（ＦＲ）配列を含む。

【０１００】

単離抗体又はその抗原結合部分のフレームワーク領域は、１又は２以上の復帰変異を含んでもよく、ヒト生殖系列由来のこのフレームワークアミノ酸は、対応する位置において

元来のマウスアミノ酸により置き換える。また、単離抗体又はその抗原結合部分のフレームワーク領域は、１又は２以上の保存的置換を含み得る。「保存的置換」の用語は、本明細書において使用する場合、アミノ酸配列を含むタンパク質／ポリペプチドの必須特性に不利に影響もせず、この変化もさせない、アミノ酸の置換を指す。例えば、保存的置換は、当技術分野において公知の標準技術、例えば、部位特異的変異誘発及びＰＣＲ媒介変異誘発により導入し得る。アミノ酸の保存的置換は、アミノ酸残基を、類似の側鎖を有する別のアミノ酸残基、例えば、対応するアミノ酸残基と物理的又は機能的に類似する（例えば、類似のサイズ、形、電荷、共有結合又は水素結合を形成する能力を含む化学特性等を有する）残基と置換する置換を含む。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野において定義されている。このようなファミリーとしては、アルカリ性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リジン、アルギニン、及びヒスチジン）、酸性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アスパラギン酸及びグルタミン酸）、非荷電の極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖を有するアミノ酸（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、β分枝側鎖を有するアミノ酸（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）、及び芳香族側鎖を有するアミノ酸（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）が挙げられる。したがって、対応するアミノ酸残基は、好ましくは、同じ側鎖ファミリーの別のアミノ酸残基と置換する。アミノ酸の保存的置換を同定するための方法は、当技術分野において周知である（例えば、Brummell et al., Biochem. 32: 1180-1187 (1993)；Kobayashi et al., Protein Eng. 12(10): 879-884 (1999)；及びBurks et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 412-417 (1997)を参照、これらは参照により本明細書に組み込む）。

【０１０１】

ＩｇＧ定常領域

一部の実施形態では、抗体は、免疫グロブリン定常領域、例えば、ヒトＩｇＧ、ＩｇＡ、ＩｇＭ、ＩｇＥ又はＩｇＤ定常領域を更に含む。本明細書に開示の抗体は、種々のＩｇＧアイソタイプ、例えば、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、及びＩｇＧ４の抗体であり得る。好ましくは、抗体は、ＩｇＧ１アイソタイプであり、ヒトＩｇＧ１定常領域を含む。本明細書に記載のＩｇＧ定常領域は、Ｆｃ領域を含み、ＩｇＧ分子のヒンジ領域の部分又は全部を含んでいてもよい。

【０１０２】

Ｆｃ領域は、所望の機能性を変化させることなく野生型Ｆｃ領域と比較して１又は２以上のアミノ酸の変化（例えば、挿入、欠失又は置換）を含み得る。例えば、本開示は、ＦｃとＦｃＲｎとの間に結合相互作用の修飾（例えば、増強又は減弱）を有し得るような、Ｆｃ領域における１又は２以上の修飾を含む、抗体を含む。また、Ｆｃ修飾の非制限的な例としては、例えば、抗体依存性細胞傷害（ＡＤＣＣ，antibody-dependent cellular cytotoxicity）又は他のエフェクター機能を変化させるようなＩｇＧ１　Ｆｃ領域におけるＬｅｕ２３４Ａｌａ／Ｌｅｕ２３５Ａｌａ（又はＬＡＬＡ）のアミノ酸の修飾、ヒトＩｇＧ４　Ｆｃ領域のアミノ酸配列の２２８番目におけるセリン（「Ｓ」）のプロリン（「Ｐ」）変異が挙げられる。Ｓ２２８Ｐ変異は、ＩｇＧ４分子のコアヒンジにおけるジスルフィドを安定化することによってＦａｂアーム交換を低減させ、このため、半抗体形成の防止に役立つＩｇＧ４安定化変異に属する。ＦｃγＲＩＩＩａへの結合の増加により、ＡＤＣＣの増加が一般に生じることが知られている。同様に、ＦｃγＲＩＩｂ（阻害性受容体）への結合の減少も、一部の状況において有益であり得る。主題の抗体に利用されるアミノ酸の置換としては、米国特許第８，１８８，３２１号（特には、図４１）及び第８，０８４，５８２号、並びに米国特許出願公開第２００６０２３５２０８号及び同第２００７０１４８１７０号に列挙するものが挙げられ、これらは全て、全体を参照により明示的に本明細書に組み込む。利用される特定のバリアントとしては、２３６Ａ、２３９Ｄ、２３９Ｅ、３３２Ｅ、３３２Ｄ、２３９Ｄ／３３２Ｅ、２６７Ｄ、２６７Ｅ、３２８Ｆ、２

６７Ｅ／３２８Ｆ、２３６Ａ／３３２Ｅ、２３９Ｄ／３３２Ｅ／３３０Ｙ、２３９Ｄ、３３２Ｅ／３３０Ｌ、２４３Ａ、２４３Ｌ、２６４Ａ、２６４Ｖ、及び２９９Ｔが挙げられるが、これらに制限されない。このような修飾は、本明細書に開示の抗体の一方又は両方のＦｃドメインに含み得る。

【０１０３】

可変領域は、重鎖及び軽鎖におけるＩｇＧ定常領域にそれぞれ動作可能に結合する。一部の実施形態では、可変領域は、ＩｇＧ定常領域に直接連結する。一部の他の実施形態では、可変領域は、わずか１つのアミノ酸を含み得るリンカーを介してＩｇＧ定常領域に連結する。ポリペプチド配列を構築するためのペプチドリンカーは、当技術分野において充分に確立されている。例えば、（ＧＳ）ｎ、（ＧＳＧＧＳ）ｎ、（ＧＧＧＧＳ）ｎ、及び（ＧＧＧＳ）ｎのリンカーが挙げられ、このｎは、少なくとも１つ（一般には、３～４又は５）の整数である。或いは、免疫グロブリン重鎖又は軽鎖に由来するリンカー（例えば、ヒンジ領域由来配列）、並びに可変領域の定常領域での組換え結合を可能とし、各領域が生物学的機能を果たすことを可能とするのに充分な長さ及び可動性を有する、任意のペプチド配列が挙げられる。

【０１０４】

他に特定しない限り、本明細書の抗体の定常領域の付番は、Kabatと同様に、ＥＵ付番に基づく。したがって、ＩｇＧの文脈における「ＣＨ」ドメインは、次のとおりである：「ＣＨ１」は、Kabatと同様に、ＥＵ指標に従って１１８～２１５番目を指し、「ヒンジ」は、Kabatと同様に、ＥＵ指標に従って２１６～２３０番目を指し、「ＣＨ２」は、Kabatと同様に、ＥＵ指標に従って２３１～３４０番目を指し、「ＣＨ３」は、Kabatと同様に、ＥＵ指標に従って３４１～４４７番目を指す。

【０１０５】

抗Ｂ７Ｈ３抗体の機能性

本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分は、特定の機能的特徴又は特性により特徴づけられる。一部の実施形態では、抗体（キメラ抗体及びヒト化抗体の両方を含む）は、次の特性の１又は２以上を有する。

（ａ）ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３発現細胞に高親和性（例えば、ＦＡＣＳで測定した場合、２ｎＭ未満）で特異的に結合する。

（ｂ）ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３の親和性と比較して顕著に低い親和性で結合し、２ＩｇＢ７Ｈ３に結合する抗体と４ＩｇＢ７Ｈ３に結合する抗体との間の差異は、顕著である。

（ｃ）カニクイザルＢ７Ｈ３に高親和性（例えば、ＦＡＣＳで測定した場合、５ｎＭ未満）で、基準抗体よりも良好に、特異的に結合する。及び

（ｄ）Ｂ７Ｈ３発現がん細胞に対する良好な内部移行能を示す。

【０１０６】

本開示の抗体をコードする核酸分子

一部の態様では、本開示は、本明細書に開示の単離抗体の重鎖可変領域及び／又は軽鎖可変領域をコードする核酸配列を含む、単離核酸分子を対象とする。一部の実施形態では、本明細書に開示の単離核酸分子は、配列番号１６に記載する核酸配列を含む。一部の実施形態では、本明細書に開示の単離核酸分子は、配列番号１７に記載する核酸配列を含む。

【０１０７】

本開示の核酸は、標準的分子生物学的技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ（例えば、下に更に記載の、ヒト免疫グロブリン遺伝子を保有する遺伝子導入マウスから調製するハイブリドーマ）により発現する抗体では、ハイブリドーマにより作製された抗体の軽鎖及び重鎖をコードするｃＤＮＡを、標準的ＰＣＲ増幅又はｃＤＮＡクローニング技術により得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから得られる（例えば、ファージディスプレイ技術を使用して）抗体では、このような抗体をコードする核酸を、遺伝子ライブラリーから回収することができる。

【０１０８】
ＶＨ領域をコードする単離核酸は、ＶＨをコードする核酸を、重鎖定常領域（ＣＨ１、ＣＨ２、及びＣＨ３）をコードする別のＤＮＡ分子に動作可能に結合させることにより、完全長重鎖遺伝子に変換することができる。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において公知であり（例えば、上記のKabat et al. (1991)を参照）、このような領域を包含するＤＮＡ断片は、標準的ＰＣＲ増幅により得ることができる。重鎖定常領域は、ＩｇＧ１、ＩｇＧ２、ＩｇＧ３、ＩｇＧ４、ＩｇＡ、ＩｇＥ、ＩｇＭ又はＩｇＤ定常領域であり得るが、より好ましくは、ＩｇＧ１又はＩｇＧ４定常領域である。
【０１０９】
ＶＬ領域をコードする単離核酸は、ＶＬをコードするＤＮＡを、軽鎖定常領域、ＣＬをコードする別のＤＮＡ分子に動作可能に結合させることにより、完全長軽鎖遺伝子（並びにＦａｂ軽鎖遺伝子）に変換することができる。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野において公知であり（例えば、上記のKabat et al.を参照）、このような領域を包含するＤＮＡ断片は、標準的ＰＣＲ増幅により得ることができる。好ましい実施形態では、軽鎖定常領域は、カッパ又はラムダ定常領域であり得る。
【０１１０】
ＶＨ及びＶＬのセグメントをコードするＤＮＡ断片が得られると、このようなＤＮＡ断片を、標準的組換えＤＮＡ技術により更に操作して、例えば、可変領域遺伝子を完全長抗体鎖遺伝子、Ｆａｂ断片遺伝子又はｓｃＦｖ遺伝子に変換し得る。このような操作では、ＶＬ又はＶＨをコードするＤＮＡ断片は、別のタンパク質、例えば、抗体定常領域又は可動性リンカーをコードする別のＤＮＡ断片に動作可能に結合させる。「動作可能に結合」の用語は、この文脈において使用する場合、２つのＤＮＡ断片が、２つのＤＮＡ断片によりコードされるアミノ酸配列がインフレームに維持されるように連結することを意味することを意図する。
【０１１１】
一部の態様では、本開示は、本明細書に開示の核酸配列を含むベクターを対象とする。ベクターは、本開示の文脈において、適する任意のベクターであってもよく、染色体ベクター、非染色体ベクター、及び合成核酸ベクター（発現制御エレメントの適するセットを含む核酸配列）を含む。このようなベクターの例としては、ＳＶ４０の誘導体、細菌プラスミド、ファージＤＮＡ、バキュロウイルス、酵母プラスミド、プラスミドとファージＤＮＡとの組合せから得られるベクター、及びウイルス核酸（ＲＮＡ又はＤＮＡ）ベクターが挙げられる。一部の実施形態では、Ｂ７Ｈ３抗体をコードする核酸は、裸のＤＮＡ又はＲＮＡベクターに含まれ、これは例えば、直鎖状発現エレメント（例として、Sykes and Johnston, Nat Biotech 17, 355-59 (1997)に記載）、小型の核酸ベクター（例として、米国特許第６，０７７，８３５号及び／若しくは国際公開第００／７００８７号に記載）、プラスミドベクター、例えば、ｐＢＲ３２２、ｐＵＣ１９／１８又はｐＵＣ１１８／１１９、「ミジ（midge）」の最小サイズの核酸ベクター（例として、Schakowski et al., Mol Ther 3, 793-800 (2001)に記載）又は沈殿核酸ベクターコンストラクト、例えば、ＣａＰ０４沈殿コンストラクト（例として、国際公開第２０００４６１４７号、Benvenisty and Reshef, PNAS USA 83, 9551-55 (1986)、Wigler et al., Cell 14, 725 (1978)、及びCoraro and Pearson, Somatic Cell Genetics 7, 603 (1981)に記載）を含む。このような核酸ベクター及びこの用法は、当技術分野において周知である（例として、米国特許第５，５８９，４６６号及び米国特許第５，９７３，９７２号を参照）。
【０１１２】
一実施形態では、ベクターは、細菌細胞における抗体の発現に適する。このようなベクターの例としては、発現ベクター、例えば、BlueScript（Stratagene社）、ｐＩＮベクター（Van Heeke& Schuster, J Biol Chem 264, 5503-5509 (1989)）、ｐＥＴベクター（Novagen社、Madison WI等）が挙げられる。更に又は或いは、ベクターは、酵母系における発現に適するベクターであり得る。酵母系における発現に適する任

意のベクターを利用し得る。適するベクターとしては、例えば、構成的又は誘導性プロモーター、例えば、アルファ因子、アルコールオキシダーゼ、及びＰＧＨを含む、ベクターが挙げられる（F. Ausubel et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley InterScience New York (1987)及びGrant et al., Methods in Enzymol 153, 516-544 (1987)に総説が記載）。

【０１１３】

更に又は或いは、ベクターは、哺乳動物細胞における発現に適するベクター、例えば、グルタミンシンセターゼを選択可能性マーカーとして含むベクター、例えば、Bebbington (1992) Biotechnology (NY) 10: 169-175に記載のベクターであり得る。

【０１１４】

また、核酸及び／又はベクターは、ポリペプチド、例えば、新生ポリペプチド鎖を標的とし得る、細胞膜周辺腔又は細胞培養培地内への分泌／局在配列をコードする核酸配列を含み得る。このような配列は、当技術分野において公知であり、分泌リーダー又はシグナルペプチドを含む。

【０１１５】

ベクターは、適する任意のプロモーター、エンハンサー、及び他の発現促進エレメントを含むか又はこれと会合し得る。このようなエレメントの例としては、強力な発現プロモーター（例えば、ヒトＣＭＶ　ＩＥプロモーター／エンハンサー、並びにＲＳＶプロモーター、ＳＶ４０プロモーター、ＳＬ３－３プロモーター、ＭＭＴＶプロモーター、及びＨＩＶ　ＬＴＲプロモーター）、有効なポリ（Ａ）終止配列、大腸菌（E. coli）におけるプラスミド産物の複製起点、選択可能性マーカーとしての抗生剤耐性遺伝子、及び／又は簡便性クローニング部位（例えば、ポリリンカー）が挙げられる。また、核酸は、構成的プロモーターに対して、誘導性プロモーター、例えば、ＣＭＶ　ＩＥを含み得る。

【０１１６】

一部の態様では、本開示は、本明細書において上に特定するベクターを含む宿主細胞に関する。

【０１１７】

したがって、本開示は、本開示の抗体を産生する組換え真核又は原核宿主細胞、例えば、トランスフェクトーマ（transfectoma）にも関する。抗体は、組換え真核又は原核宿主細胞において発現して本開示の抗体を産生し得る。

【０１１８】

宿主細胞の例としては、酵母、細菌、植物細胞及び哺乳動物細胞が挙げられる。本開示の抗体を発現させるための哺乳動物宿主細胞としては、チャイニーズハムスター卵巣（ＣＨＯ，Chinese Hamster Ovary）細胞（Urlaub and Chasin, (1980) Proc. Natl. Acad. ScL USA 77:4216-4220に記載され、例えば、R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) J. Mol. Biol. 159:601-621に記載のようにＤＨＦＲ選択可能性マーカーとともに使用される、ｄｈｆｒ　ＣＨＯ細胞を含む）、ＣＯＳ細胞、及びＳＰ２細胞が挙げられる。特には、ＮＳＯ骨髄腫細胞による使用では、別の発現系は、国際公開第８７／０４４６２号、国際公開第８９／０１０３６号、及び欧州特許第３３８，８４１号に開示のＧＳ遺伝子発現系である。また、ＳＶ４０により形質転換したサル腎臓ＣＶ１株（ＣＯＳ－７、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６５１）；ヒト胚性腎臓株（サブクローニングして懸濁培養により増殖させた２９３又は２９３細胞、Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)）；ベビーハムスター腎臓細胞（ＢＨＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１０）；チャイニーズハムスター卵巣細胞／－ＤＨＦＲ（ＣＨＯ、Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216）；マウスセルトリ細胞（ＴＭ４、Mather, 1980, Biol. Reprod. 23:243-251）；サル腎臓細胞（ＣＶ１　ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７０）；アフリカミドリザル腎臓細胞（ＶＥＲＯ－７６、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７）；ヒト子宮頸癌細胞（ＨＥＬＡ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ２）；イヌ腎臓細胞（ＭＤＣＫ、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ３４）；バッファローラット肝臓細胞（ＢＲＬ　３Ａ、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１４４２）；ヒト肺細胞（Ｗ１３８、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７５）；ヒト肝臓細胞（ＨｅｐＧ２、ＨＢ８０６５）

；マウス乳房腫瘍（ＭＭＴ０６０５６２、ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１）；ＴＲＩ細胞（Mather et al., 1982, Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68）；ＭＲＣ５細胞；ＦＳ４細胞；マウス骨髄腫細胞、例えば、ＮＳＯ（例えば、ＲＣＢ０２１３、1992, Bio/Technology 10:169）及びＳＰ２／０細胞（例えば、ＳＰ２／０－Ａｇ１４細胞、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１５８１）；ラット骨髄腫細胞、例えば、ＹＢ２／０細胞（例えば、ＹＢ２／３ＨＬ．Ｐ２．Ｇ１１．１６Ａｇ．２０細胞、ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６６２）；ＰＥＲ．Ｃ６細胞；並びにヒト肝細胞腫株（ＨｅｐＧ２）も挙げられる。ＣＨＯ細胞は、本明細書において使用可能な細胞株のうちの１つであり、ＣＨＯ－Ｋ１、ＤＵＫ－Ｂ１１、ＣＨＯ－ＤＰ１２、ＣＨＯ－ＤＧ４４（Somatic Cell and Molecular Genetics 12:555 (1986)）、及びＬｅｃ１３は、例となる宿主細胞株である。ＣＨＯ－Ｋ１、ＤＵＫ－Ｂ１１、ＤＧ４４又はＣＨＯ－ＤＰ１２宿主細胞の場合では、これらにおいて発現するタンパク質をフコシル化する能力が欠損するように変更し得る。一部の実施形態では、本明細書の宿主細胞は、ＣＨＯ、ＣＨＯ－Ｓ、ＨＥＫ、ＨＥＫ２９３、ＨＥＫ－２９３Ｆ、Ｅｘｐｉ２９３Ｆ、ＰＥＲ．Ｃ６若しくはＮＳＯ細胞又はリンパ球細胞から選択される。

【０１１９】

この目的に適する原核生物としては、真正細菌、例えば、グラム陰性又はグラム陽性生物、例えば、腸内細菌科（Enterobacteriaceae）、例えば、エシェリキア（Escherichia）、例えば、大腸菌、エンテロバクター（Enterobacter）、エルウィニア（Erwinia）、クレブシエラ（Klebsiella）、プロテウス（Proteus）、サルモネラ（Salmonella）、例えば、ネズミチフス菌（Salmonella typhimurium）、セラチア（Serratia）、例えば、霊菌（Serratia marcescans）、及び赤痢菌（Shigella）、並びに桿菌（Bacilli）、例えば、枯草菌（B. subtilis）及びＢ．リケニフォルミス（B. licheniformis）、シュードモナス（Pseudomonas）、例えば、緑膿菌（P. aeruginosa）及びストレプトマイセス（Streptomyces）が挙げられる。

【０１２０】

原核生物に加えて、真核微生物、例えば、糸状菌又は酵母は、二重特異性抗体をコードするベクターに適するクローニング又は発現宿主である。サッカロマイセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）又は一般的パン酵母は、下等な真核宿主微生物の間で最も一般的に使用される。しかし、多数の他の属、種、及び株が、一般に入手可能であり、本明細書において有用である。例えば、分裂酵母（Schizosaccharomyces pombe）；クリベロマイセス（Kluyveromyces）宿主、例えば、Ｋ．ラクチス（K. lactis）、Ｋ．フラジリス（K. fragilis、ＡＴＣＣ　１２，４２４）、Ｋ．ブルガリカス（K. bulgaricus、ＡＴＣＣ　１６，０４５）、Ｋ．ウィケラミー（K. wickeramii、ＡＴＣＣ　２４，１７８）、Ｋ．ワルティー（K. waltii、ＡＴＣＣ　５６，５００）、Ｋ．ドロソフィララム（K. drosophilarum、ＡＴＣＣ　３６，９０６）、Ｋ．サーモトレランス（K. thermotolerans）、及びＫ．マルシアナス（K. marxianus）等；ヤロウイア（yarrowia、欧州特許第４０２，２２６号）；ピキア・パストリス（Pichia pastoris、欧州特許第１８３，０７０号）；カンジダ（Candida）；トリコデルマ・リーゼイ（Trichoderma reesia、欧州特許第２４４，２３４号）；アカパンカビ（Neurospora crassa）；シュワンニオマイセス（Schwanniomyces）、例えば、シュワンニオマイセス・オシデンタリス（Schwanniomyces occidentalis）；並びに糸状菌、例えば、ニューロスポラ（Neurospora）、ペニシリウム（Penicillium）、トリポクラジウム（Tolypocladium）、及びアスペルギルス（Aspergillus）宿主、例えば、偽巣性コウジ菌（A. nidulans）及びクロコウジカビ（A. niger）等が挙げられる。

【０１２１】

一部の実施形態では、宿主細胞は、細胞ゲノムに安定に組み込んだ第１の核酸コンストラクト及び第２の核酸コンストラクトを含み得る。別の実施形態では、上に特定する第１の核酸コンストラクト及び第２の核酸コンストラクトを含む組み込まない核酸、例えば、プラスミド、コスミド、ファージミド又は直鎖状発現エレメントを含む、細胞を本開示により提供する。

【０１２２】
なお更なる態様では、本開示は、ヒト重鎖及びヒト軽鎖の１又は２以上のセットをコードする核酸を含む、遺伝子導入非ヒト動物又は植物に関し、この動物又は植物は、本開示の抗体を産生する。
【０１２３】
更なる態様では、本開示は、本明細書において定義する本開示の抗体を産生するハイブリドーマに関する。なお更なる態様では、本開示は、ヒト重鎖及びヒト軽鎖の１又は２以上のセットをコードする核酸を含む、遺伝子導入非ヒト動物又は植物に関し、この動物又は植物は、本開示の抗体を産生する。
【０１２４】
一態様では、本開示は、
（ｉ）抗体若しくはその抗原結合部分をコードする核酸配列、又は本明細書に開示の実施形態のいずれか１つによる抗体のＶＨ若しくはＶＬドメイン、
（ii）重鎖又は軽鎖のアミノ酸配列をコードする核酸配列、
（iii）定常領域のアミノ酸配列をコードする核酸配列、或いは
（iv）上記の２つ以上の組合せ
を含む、発現ベクターに関する。
【０１２５】
一態様では、本開示は、配列表に提示する１又は２以上のアミノ酸配列をコードする核酸コンストラクトに関する。
【０１２６】
一態様では、本開示は、本明細書に開示の１又は２以上の発現ベクターを含む宿主細胞を培養するステップと、抗体を発現させるステップと、培養培地からこの抗体を精製するステップとを含む、本明細書に開示の実施形態のいずれか１つによる抗体を産生するための方法に関する。一態様では、本開示は、上に定義の発現ベクターを含む宿主細胞に関する。一実施形態では、宿主細胞は、組換え真核、組換え原核又は組換え微生物宿主細胞である。
【０１２７】
医薬組成物
一態様では、本開示は、本明細書に開示の少なくとも１つの抗体又はその抗原結合部分及び薬学的に許容される担体を含む、医薬組成物を対象とする。
【０１２８】
組成物の成分
医薬組成物は、１又は２以上の更なる薬学的活性成分、例えば、別の抗体又は薬物を含んでいてもよい。また、本開示の医薬組成物は、併用療法において、例えば、別の免疫刺激物質、抗がん物質、抗ウイルス物質又はワクチンとともに投与可能であって、付加的又は相乗的作用を達成し得る。薬学的に許容される担体としては、例えば、薬学的に許容される液体、ゲル若しくは固体担体、水性培地、非水性培地、抗菌物質、等張物質、緩衝液、抗酸化剤、麻酔剤、懸濁／分散物質、キレート物質、希釈剤、アジュバント、賦形剤又は無毒性補助物質、並びに当技術分野において公知の成分の種々の組合せが挙げられ得る。
【０１２９】
適する成分としては、例えば、抗酸化剤、増量剤、結合剤、崩壊物質、緩衝液、保存剤、潤滑剤、香味剤、増粘物質、着色物質、乳化剤又は安定剤、例えば、糖及びシクロデキストリンが挙げられ得る。適する抗酸化剤としては、例えば、メチオニン、アスコルビン酸、ＥＤＴＡ、チオ硫酸ナトリウム、白金、カタラーゼ、クエン酸、システイン、メルカプトグリセロール、チオグリコール酸、メルカプトソルビトール、ブチルメチルアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、及び／又はプロピルガラクト（propylgalacte）が挙げられ得る。本開示によれば、本開示の抗体又は抗原結合断片を含む溶媒は、抗体又はその抗原結合断片の酸化を還元する１又は２以上の抗酸化剤、例えば、メチオニンを含み

得る。酸化還元により、結合親和性の低下を防止又は低減させ、これにより抗体安定性を増強し、保存可能期間を延長し得る。したがって、一部の実施形態では、１又は２以上の抗体又はその抗原結合断片及び１又は２以上の抗酸化剤、例えば、メチオニンを含む組成物を本開示により提供する。本開示では、抗体又はその抗原結合断片の酸化を防止可能であるように、抗体又はその抗原結合断片を１又は２以上の抗酸化剤、例えば、メチオニンと混合して、保存可能期間を延長し、及び／又は活性を高める、多様な方法を更に提供する。

【０１３０】

更に例示するために、薬学的に許容される担体、例えば、水性媒体、例えば、塩化ナトリウム注射液、リンゲル注射液、等張ブドウ糖注射液、滅菌水注射液若しくはブドウ糖及び乳酸リンゲル注射液、非水性媒体、例えば、植物由来の固定油、綿実油、トウモロコシ油、ゴマ油若しくはピーナツ油、静菌若しくは静真菌濃度の抗菌物質、等張物質、例えば、塩化ナトリウム若しくはブドウ糖、緩衝液、例えば、リン酸若しくはクエン酸緩衝液、抗酸化剤、例えば、重硫酸ナトリウム、局所麻酔剤、例えば、プロカイン塩酸塩、懸濁物質及び分散物質、例えば、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ヒドロキシプロピルメチルセルロース若しくはポリビニルピロリドン、乳化物質、例えば、ポリソルベート８０（ＴＷＥＥＮ-８０）、封鎖若しくはキレート物質、例えば、ＥＤＴＡ（エチレンジアミン四酢酸）若しくはＥＧＴＡ（エチレングリコール四酢酸）、エチルアルコール、ポリエチレングリコール、プロピレングリコール、水酸化ナトリウム、塩酸、クエン酸又は乳酸を含み得る。担体として利用する抗菌物質を複数回用量の容器内の医薬組成物に加えてもよく、フェノール又はクレゾール、水銀剤、ベンジルアルコール、クロロブタノール、メチルｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル及びプロピルｐ－ヒドロキシ安息香酸エステル、チメロサール、塩化ベンザルコニウム、並びに塩化ベンゼトニウムが挙げられる。適する賦形剤としては、例えば、水、生理食塩水、ブドウ糖、グリセロール又はエタノールが挙げられ得る。適する無毒性補助物質としては、例えば、湿潤若しくは乳化物質、ｐＨ緩衝物質、安定剤、溶解性増強剤、又は酢酸ナトリウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレエート若しくはシクロデキストリンのような物質が挙げられ得る。

【０１３１】

投与、製剤、及び投与量

本開示の医薬組成物は、インビボで必要とする対象に種々の経路により投与してもよく、これには経口経路、静脈内経路、動脈内経路、皮下経路、非経口経路、鼻腔内経路、筋肉内経路、頭蓋内経路、心臓内経路、脳室内経路、気管内経路、頬側経路、直腸経路、腹腔内経路、皮内経路、局所経路、経皮経路、及びくも膜下腔内経路、さもなければ移植又は吸入が挙げられるが、これらに制限されない。主題の組成物は、固体、半固体、液体又は気体の形態の調製物に製剤化してもよく、これには錠剤、カプセル、散剤、粒剤、軟膏、溶液、坐剤、浣腸、注射剤、吸入剤、及びエアロゾルが挙げられるが、これらに制限されない。適切な製剤及び投与経路は、意図する適用及び治療レジメンに従って選択され得る。

【０１３２】

腸内投与に適する製剤としては、硬性又は軟性ゼラチンカプセル、丸剤、コーティングした錠剤を含む錠剤、エリキシル剤、懸濁剤、シロップ又は吸入剤、及びこれらの放出制御形態が挙げられる。

【０１３３】

非経口投与（例えば、注射による）に適する製剤としては、水性若しくは非水性で等張性の発熱物質を含まない滅菌液（例えば、溶液、懸濁剤）が挙げられ、これにより活性成分を溶解、懸濁、さもなければ生成する（例えば、リポソーム又は他の微粒子内に）。加えて、このような液体は、他の薬学的に許容される成分、例えば、抗酸化剤、緩衝液、保存剤、安定剤、静菌剤、懸濁物質、増粘物質、及び製剤を意図するレシピエントの血液（又は他の関連する体液）により等張性とする溶質を含有し得る。賦形剤の例としては、例えば、水、アルコール、ポリオール、グリセロール、植物油等が挙げられる。このような

製剤における使用に適する等張性担体の例としては、塩化ナトリウム注射液、リンゲル液又は乳酸リンゲル注射液が挙げられる。同様に、用量、タイミング、及び反復を含む特定の投薬レジメンは、特定の個人及び個人の病歴、並びに経験的考察、例えば、薬物動態（例えば、半減期、クリアランス速度等）に依存する。

【０１３４】

投与頻度は、療法の過程を通じて決定及び調整してもよく、増殖又は腫瘍原性細胞数の低減、このような腫瘍性細胞低減の維持、腫瘍性細胞増殖の低減又は転移発生の遅延に基づく。一部の実施形態では、投与量は、潜在的副作用及び／又は毒性を管理するように調整又は減弱し得る。或いは、主題の治療組成物の持続的連続放出製剤が、適切であり得る。

【０１３５】

適切な投与量は、患者に応じて異なり得ることが当業者に理解される。最適投与量の決定では、任意のリスク又は有害な副作用に対する治療的利点のレベルのバランスをとることを一般に含む。選択される投与量レベルは多様な因子に依存し、これらには特定の化合物の活性、投与経路、投与時間、化合物の排泄速度、治療期間、他の薬物、化合物、及び／又は併用する材料、症状の重症度、並びに患者の種、性別、年齢、体重、症状、全身の健康状態、及びそれまでの病歴が挙げられるが、これらに制限されない。投与量は、実質的に悪影響又は有害な副作用を生じることなく所望の作用を達成する局所濃度を作用部位において達成するように一般に選択されるが、化合物の量及び投与経路は、最終的に医師、獣医師又は臨床医の判断による。

【０１３６】

一般には、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、種々の範囲で投与し得る。このような範囲は、単回用量当たり約５μｇ／ｋｇ体重～約１００ｍｇ／ｋｇ体重；単回用量当たり約５０μｇ／ｋｇ体重～約５ｍｇ／ｋｇ体重；単回用量当たり約１００μｇ／ｋｇ体重～約１０ｍｇ／ｋｇ体重を含む。他の範囲は、単回用量当たり約１００μｇ／ｋｇ体重～約２０ｍｇ／ｋｇ体重及び単回用量当たり約０．５ｍｇ／ｋｇ体重～約２０ｍｇ／ｋｇ体重を含む。特定の実施形態では、投与量は、単回用量当たり少なくとも約１００μｇ／ｋｇ体重、少なくとも約２５０μｇ／ｋｇ体重、少なくとも約７５０μｇ／ｋｇ体重、少なくとも約３ｍｇ／ｋｇ体重、少なくとも約５ｍｇ／ｋｇ体重、少なくとも約１０ｍｇ／ｋｇ体重である。

【０１３７】

いずれにしても、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、好ましくは、随時、必要とする対象に投与する。投与頻度は、当業者、例えば、主治医により、治療する症状、治療する対象の年齢、治療する症状の重症度、治療する対象の全身の健康状態等の考察に基づいて決定され得る。

【０１３８】

特定の好ましい実施形態では、本開示の抗体又はその抗原結合部分を含む治療の経過は、数週間又は数カ月の期間にわたる選択された薬物製品の複数回用量を含む。より詳細には、本開示の抗体又はその抗原結合部分は、１日、２日、４日、１週間、１０日、２週間、３週間、１カ月、６週間、２カ月、１０週間、３カ月以下に１回の頻度で投与し得る。これに関しては、患者の応答及び臨床診療に基づいて、投与量を変更し得るか又は間隔を調整し得ることが理解される。

【０１３９】

また、１又は２回以上の投与を受けている個人における開示の治療組成物の投与量及びレジメンは、経験的に決定し得る。例えば、個人には、本明細書に記載のように生成した治療組成物を増加的投与量で与え得る。選択された実施形態では、投与量は、副作用又は毒性の経験的決定又は知見にそれぞれ基づいて漸進的に増加又は低減又は減弱し得る。選択された組成物の有効性を評価するために、特定の疾患、障害又は症状のマーカーを、これまでに記載されているように追跡し得る。がんでは、このようなマーカーは、触診若しくは視覚的知見による腫瘍サイズの直接的測定、ｘ線若しくは他のイメージング技術によ

る腫瘍サイズの間接的測定；直接的腫瘍生検及び腫瘍試料の顕微鏡検査により評価した場合の改善；間接的腫瘍マーカー（例えば、前立腺がんに対するＰＳＡ）若しくは本明細書に記載の方法に従って同定された腫瘍原性抗原の測定、疼痛若しくは麻痺の減少；発話、視力、呼吸若しくは腫瘍と関連する他の障害の改善；食欲改善；又は承認された検査により測定した場合の生活の質の向上若しくは生存の延長を含む。個人、腫瘍性症状の種類、腫瘍性症状のステージ、腫瘍性症状が個人における他の部位に転移を開始したかどうか、並びに使用された過去の治療及び併用治療に応じて、投与量が異なることは、当業者に明らかである。

【０１４０】

非経口投与（例えば、静脈内注射）に適合する製剤は、本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分を約１０μｇ／ｍＬ～約１００ｍｇ／ｍＬの濃度で含む。特定の選択された実施形態では、抗体又はその抗原結合部分の濃度は、約２０μｇ／ｍＬ、４０μｇ／ｍＬ、６０μｇ／ｍＬ、８０μｇ／ｍＬ、１００μｇ／ｍＬ、２００μｇ／ｍＬ、３００μｇ／ｍＬ、４００μｇ／ｍＬ、５００μｇ／ｍＬ、６００μｇ／ｍＬ、７００μｇ／ｍＬ、８００μｇ／ｍＬ、９００μｇ／ｍＬ又は１ｍｇ／ｍＬを含む。他の好ましい実施形態では、抗体又はその抗原結合部分の濃度は、約２ｍｇ／ｍＬ、３ｍｇ／ｍＬ、４ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、６ｍｇ／ｍＬ、８ｍｇ／ｍＬ、１０ｍｇ／ｍＬ、１２ｍｇ／ｍＬ、１４ｍｇ／ｍＬ、１６ｍｇ／ｍＬ、１８ｍｇ／ｍＬ、２０ｍｇ／ｍＬ、２５ｍｇ／ｍＬ、３０ｍｇ／ｍＬ、３５ｍｇ／ｍＬ、４０ｍｇ／ｍＬ、４５ｍｇ／ｍＬ、５０ｍｇ／ｍＬ、６０ｍｇ／ｍＬ、７０ｍｇ／ｍＬ、８０ｍｇ／ｍＬ、９０ｍｇ／ｍＬ又は１００ｍｇ／ｍＬを含む。

【０１４１】

本開示の適用

一部の態様では、治療を必要とする対象（例えば、ヒト）に治療有効量の本明細書に開示の抗体を投与するステップを含む、対象においてＢ７Ｈ３と関連する疾患、障害又は症状を予防又は治療する方法を本開示により提供する。疾患又は症状は、がん、自己免疫疾患又は感染性疾患であり得る。

【０１４２】

悪性か良性か及び原発性か続発性かにかかわらず、Ｂ７Ｈ３が関係づけられる多様ながんを、本開示により提供する方法によって治療又は予防し得る。がんは、固形がん又は血液系悪性腫瘍であり得る。このようながんの例としては、肺がん、例えば、気管支原性肺癌（例えば、扁平上皮癌、小細胞癌、大細胞癌、及び腺癌）、肺胞細胞癌、気管支腺腫、軟骨性過誤腫（非癌性）、及び肉腫（癌性）；心臓がん、例えば、粘液腫、線維腫、及び横紋筋腫；骨がん、例えば、骨軟骨腫、軟骨腫、軟骨芽細胞腫、軟骨粘液線維腫、類骨腫、巨細胞腫、軟骨肉腫、多発性骨髄腫、骨肉腫、線維肉腫、悪性線維性組織球腫、ユーイング腫瘍（ユーイング肉腫）、及び細網肉腫；脳がん、例えば、神経膠腫（例えば、多形神経膠芽腫）、未分化星状細胞腫、星状細胞腫、乏突起神経膠腫、髄芽腫、脊索腫、シュワン腫、上衣腫、髄膜腫、下垂体腺腫、松果体腫、骨腫、血管芽腫、頭蓋咽頭腫、胚細胞腫、奇形腫、類皮嚢胞、及び血管腫；消化器系のがん、例えば、結腸がん、平滑筋腫、類表皮癌、腺癌、平滑筋肉腫、胃腺癌、腸脂肪腫、腸神経線維腫、腸線維腫、大腸ポリープ、及び結腸直腸がん；肝臓がん、例えば、肝細胞腺腫、血管腫、肝細胞癌、線維層板状癌、胆管細胞癌、肝芽腫、及び血管肉腫；腎臓がん、例えば、腎腺癌、腎細胞癌、副腎腫、及び腎盂移行上皮癌；膀胱がん；血液がん、例えば、急性リンパ球性（リンパ芽球性）白血病、急性骨髄系（骨髄球性、骨髄性、骨髄芽球性、骨髄単球性）白血病、慢性リンパ球性白血病（例えば、セザリー症候群及びヘアリー細胞白血病）、慢性骨髄球性（骨髄系、骨髄性、顆粒球性）白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、Ｂ細胞リンパ腫、菌状息肉腫、及び骨髄増殖性障害（真性赤血球増加症、骨髄線維症、血小板血症、及び慢性骨髄性白血病のような骨髄増殖性障害を含む）；皮膚がん、例えば、基底細胞癌、扁平上皮癌、メラノーマ、カポジ肉腫、及びパジェット病；頭頸部がん；眼関連がん、例えば、網膜芽細胞腫及び眼球内黒色腫；男性生殖器系がん、例えば、良性前立腺肥大、前立腺

がん、及び精巣がん（例えば、セミノーマ、奇形腫、胚性癌腫、及び絨毛癌）；乳がん；女性生殖器系がん、例えば、子宮がん（子宮内膜癌）、子宮頸がん（子宮頸癌）、卵巣がん（卵巣癌）、外陰癌、膣癌、卵管がん、及び胞状奇胎；甲状腺がん（乳頭、濾胞性、未分化又は髄様がんを含む）；褐色細胞腫（副腎）；副甲状腺非癌性増殖；膵臓がん；並びに血液がん、例えば、白血病、骨髄腫、非ホジキンリンパ腫、及びホジキンリンパ腫が挙げられる。一部の特定の実施形態では、がんは、神経性腫瘍、メラノーマ、肺がん、頭頸部がん、結腸直腸がん、膵臓がん、胃がん、腎臓がん、膀胱がん、前立腺がん、乳がん、及び卵巣がんから選択される。

【０１４３】

一部の実施形態では、がんの例としては、低悪性度／濾胞性非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ，non-Hodgkin's lymphoma）；小リンパ球性（ＳＬ，small lymphocytic）ＮＨＬ；中悪性度／濾胞性ＮＨＬ；中悪性度びまん性ＮＨＬ；高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ；高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ；高悪性度小型非切れ込み核細胞性ＮＨＬ；バルキー病変ＮＨＬ；マントル細胞リンパ腫；ＡＩＤＳ関連リンパ腫；ワルデンストレームマクログロブリン血症；慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ，chronic lymphocytic leukemia）；急性リンパ芽球性白血病（ＡＬＬ，chronic lymphocytic leukemia）；ヘアリー細胞白血病；慢性骨髄芽球性白血病；及び移植後リンパ増殖性障害（ＰＴＬＤ，post-transplant lymphoproliierative disorder）、並びに母斑症と関連する血管増殖異常、浮腫（例えば、脳腫瘍と関連する浮腫）、Ｂ細胞増殖性障害、及びメージュ症候群を含む、Ｂ細胞リンパ腫を含む、Ｂ細胞がんが挙げられるが、これらに制限されない。より詳細な例としては、再発性又は難治性ＮＨＬ、フロントライン低悪性度ＮＨＬ、ステージIII／IVのＮＨＬ、化学療法耐性ＮＨＬ、前駆Ｂリンパ芽球性白血病及び／又はリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、Ｂ細胞慢性リンパ球性白血病及び／又は前リンパ球性白血病及び／又は小リンパ球性リンパ腫、Ｂ細胞前リンパ球性リンパ腫、免疫細胞腫及び／又はリンパ形質細胞性リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、脾臓辺縁帯リンパ腫、節外性辺縁帯ＭＡＬＴリンパ腫、結節性辺縁帯リンパ腫、ヘアリー細胞白血病、形質細胞腫及び／又は形質細胞性骨髄腫、低悪性度／濾胞性リンパ腫、中悪性度／濾胞性ＮＨＬ、マントル細胞リンパ腫、濾胞中心リンパ腫（濾胞性）、中悪性度びまん性ＮＨＬ、びまん性大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、中悪性度ＮＨＬ（中悪性度フロントラインＮＨＬ及び中悪性度再発性ＮＨＬを含む）、自家幹細胞移植後再発性又は難治性ＮＨＬ、原発性縦隔大細胞型Ｂ細胞リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、高悪性度免疫芽球性ＮＨＬ、高悪性度リンパ芽球性ＮＨＬ、高悪性度小型非切れ込み核細胞性ＮＨＬ、バルキー病変ＮＨＬ、バーキットリンパ腫、前駆（末梢性）大顆粒リンパ球性白血病、菌状息肉腫及び／又はセザリー症候群、皮膚（皮膚性）リンパ腫、未分化大細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫が挙げられるが、これらに制限されない。

【０１４４】

一部の実施形態では、がんの例としては、制限されないが、リンパ腫（例えば、Ｂ細胞非ホジキンリンパ腫（ＮＨＬ））及びリンパ球性白血病を更に含む、Ｂ細胞増殖性障害が挙げられるが、これらに制限されない。このようなリンパ腫及びリンパ球性白血病としては、例えば、ａ）濾胞性リンパ腫、ｂ）小型非切れ込み核細胞性リンパ腫／バーキットリンパ腫（地方病性バーキットリンパ腫、散発性バーキットリンパ腫、及び非バーキットリンパ腫を含む）、ｃ）辺縁帯リンパ腫（節外性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫（粘膜関連リンパ組織リンパ腫、ＭＡＬＴ）、結節性辺縁帯Ｂ細胞リンパ腫、及び脾臓辺縁帯リンパ腫を含む）、ｄ）マントル細胞リンパ腫（ＭＣＬ，Mantle cell lymphoma）、ｅ）大細胞リンパ腫（Ｂ細胞びまん性大細胞リンパ腫（ＤＬＣＬ，diffuse large cell lymphoma）、びまん性混合細胞リンパ腫、免疫芽球性リンパ腫、原発性縦隔Ｂ細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、肺Ｂ細胞リンパ腫を含む）、ｆ）ヘアリー細胞白血病、ｇ）リンパ球性リンパ腫、ワルデンストレームマクログロブリン血症、ｈ）急性リンパ球性白血病（ＡＬＬ）、慢性リンパ球性白血病（ＣＬＬ）／小リンパ球性リンパ腫（ＳＬＬ）、Ｂ細胞前リンパ球性白血病、ｉ）形質細胞性腫瘍、形質細胞性骨髄腫、多発性骨髄腫、形質細胞腫、

並びに／又はｊ）ホジキン病が挙げられる。
【０１４５】
一部の他の実施形態では、疾患又は症状は、自己免疫疾患である。本明細書に開示の抗体又はその抗原結合部分により治療し得る自己免疫疾患の例としては、とりわけ、自己免疫性脳脊髄炎、エリテマトーデス、及び関節リウマチが挙げられる。また、抗体又はその抗原結合部分は、感染性疾患、炎症性疾患（例えば、アレルギー性喘息）、及び慢性移植片対宿主病を治療又は予防するために使用し得る。
【０１４６】
併用
抗体は、種々の抗がん物質、細胞傷害性物質、化学療法物質又は細胞免疫療法と組み合わせて使用し得る。例えば、本開示の抗体は、抗ＰＤ－１／ＰＤ－Ｌ１抗体と組み合わせて投与し得る。また、本開示の抗体は、ＣＡＲ－Ｔ療法と組み合わせて投与し得る。
【０１４７】
細胞免疫療法
一部の実施形態では、本明細書に開示の抗体は、養子細胞療法としても知られる細胞免疫療法と組み合わせて使用し得る。一般に知られるように、細胞免疫療法は、人体の免疫系の細胞を使用して、がんを取り除く治療の形態である。このような手法は、独自の免疫細胞を直接的に単離するステップと、これらの数を単純に増やす（例えば、患者の免疫細胞を体外で活性化及び増やし、患者に注入することにより実施する）ステップとを含むものもあれば、免疫細胞を遺伝子改変して（遺伝子療法により）、これらの抗がん能を増強するステップを含むものもある。細胞免疫療法は、種々の方法により展開してもよく、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ，tumor-infiltrating lymphocyte）療法、改変Ｔ細胞受容体（ＴＣＲ－Ｔ，Ｔ cell receptor Ｔ cell）療法、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞療法、ＣＡＲ　ＮＫ細胞療法、ナチュラルキラー（ＮＫ，Natural Killer）細胞療法が挙げられるが、これらに制限されない。
【０１４８】
一部の実施形態では、抗体は、更なる抗腫瘍療法、例えば、腫瘍浸潤リンパ球（ＴＩＬ）療法、Ｔ細胞受容体Ｔ細胞（ＴＣＲ－Ｔ）療法、キメラ抗原受容体（ＣＡＲ）Ｔ細胞療法、及びＮＫ細胞療法、並びに標的療法及び化学療法と組み合わせて使用し得る。更なる抗腫瘍療法の投与は、本明細書に開示の抗体又は医薬組成物の投与の前、後又は同時に実施し得る。
【０１４９】
化学療法
「抗がん物質」又は「抗増殖物質」の用語は、細胞増殖性障害、例えば、がんの治療に使用し得る任意の物質を意味し、これには細胞傷害性物質、細胞分裂阻害物質、抗血管新生物質、デバルキング物質、化学療法物質、放射線療法及び放射線療法物質、標的抗がん物質、ＢＲＭ、治療抗体、がんワクチン、サイトカイン、ホルモン療法、放射線療法、並びに抗転移物質及び免疫療法物質が挙げられるが、これらに制限されない。上に考察する選択された実施形態では、このような抗がん物質が、コンジュゲートを含んでもよく、投与前に開示の部位特異的抗体と会合させ得ることが理解される。より詳細には、特定の実施形態では、選択された抗がん物質は、改変抗体の不対システインと連結させて、本明細書に記載の改変コンジュゲートを生成する。したがって、このような改変コンジュゲートは、本開示の範囲内に存在するものとして明示的に検討する。他の実施形態では、開示の抗がん物質は、上に記載の種々の治療物質を含む部位特異的コンジュゲートと組み合わせて与えられる。
【０１５０】
本明細書において使用する場合、「細胞傷害性物質」の用語は、細胞に対して有毒であり、細胞の機能を低下若しくは阻害し、及び／又は細胞の破壊を生じる物質を意味する。特定の実施形態では、この物質は、生体に由来する天然に存在する分子である。細胞傷害性物質の例としては、細菌（例えば、ジフテリア毒素、シュードモナス内毒素及び外毒素

、ブドウ球菌（Staphylococcal）エンテロトキシンＡ）、真菌（例えば、αサルシン（sarcin）、リストリクトシン（restrictocin））、植物（例えば、アブリン、リシン、モデシン（modeccin）、ビスクミン（viscumin）、ヤマゴボウ抗ウイルスタンパク質、サポリン、ゲロニン、モモリジン（momoridin）、トリコサンチン、オオムギ毒素、シナアブラギリ（Aleuritesfordii）タンパク質、ジアンチン（dianthin）タンパク質、ヨウシュヤマゴボウ（Phytolaccamericana）タンパク質（ＰＡＰＩ、ＰＡＰII、及びＰＡＰ－Ｓ）、ツルレイシ（Momordica charantia）阻害剤、クルシン（curcin）、クロチン（crotin）、クロラムブ・オフィシナリス（chlorambu officinalis）阻害剤、ゲロニン、ミテゲリン（mitegellin）、リストリクトシン、フェノマイシン（phenomycin）、ネオマイシン、及びトリコテセン）又は動物（例えば、断片及び／若しくはこのバリアントを含む、細胞傷害性Ｒｎａｓｅ、例えば、細胞外膵臓Ｒｎａｓｅ；Ｄｎａｓｅ　Ｉ）の低分子毒素又は酵素的に活性な毒素が挙げられるが、これらに制限されない。

【０１５１】

本開示の目的では、「化学療法物質」は、がん細胞の成長、増殖、及び／又は生存を非特異的に低下又は阻害する化合物（例えば、細胞傷害性又は細胞分裂阻害物質）を含む。このような化学物質は、細胞の増殖又は分裂に必要な細胞内プロセスに対するものであることが多いため、一般に急速に増殖及び分裂する癌細胞に対して特に有効である。例えば、ビンクリスチンは、微小管を脱重合するため、細胞が有糸分裂に入るのを阻害する。一般には、化学療法物質は、癌細胞又は癌となるか若しくは腫瘍原性後代を生成する可能性を有する細胞（例えば、ＴＩＣ）を阻害するか又はこれを阻害するように設計した、任意の化学物質を含み得る。このような物質は、例えば、ＣＨＯＰ又はＦＯＬＦＩＲＩのようなレジメンにおいて、併用により投与することが多く、最も有効であることが多い。

【０１５２】

本開示の部位特異的コンストラクトと組み合わせて使用し得る（部位特異的コンジュゲートの成分として又は非コンジュゲート状態でのいずれかにより）抗がん物質の例としては、アルキル化物質、スルホン酸アルキル、アジリジン、エチレンイミン及びメチルアメラミン（methylamelamine）、アセトゲニン、カンプトテシン、ブリオスタチン、カリスタチン（callystatin）、ＣＣ－１０６５、クリプトフィシン、ドラスタチン、デュオカルマイシン、エリュテロビン、パンクラチスタチン（pancratistatin）、サルコジクチン（sarcodictyin）、スポンジスタチン（spongistatin）、ナイトロジェンマスタード、抗生剤、エンジイン抗生剤、ダインマイシン（dynemicin）、ビスホスホン酸、エスペラミシン、色素タンパク質エンジイン抗生発色団、アクラシノマイシン、アクチノマイシン、アントラマイシン、アザセリン、ブレオマイシン、カクチノマイシン（cactinomycin）、カラビシン（carabicin）、カルミノマイシン（carminomycin）、カルチノフィリン（carzinophilin）、クロモマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、デトルビシン（detorubicin）、６－ジアゾ－５－オキソ－Ｌ－ノルロイシン、アドリアマイシン（ADRIAMYCIN、登録商標）ドキソルビシン、エピルビシン、エソルビシン（esorubicin）、イダルビシン、マルセロマイシン（marcellomycin）、マイトマイシン、ミコフェノール酸、ノガラマイシン、オリゴマイシン、ペプロマイシン、ポトフィロマイシン（potfiromycin）、ピューロマイシン、ケラマイシン（quelamycin）、ロドルビシン（rodorubicin）、ストレプトニグリン、ストレプトゾシン、ツベルシジン、ウベニメクス、ジノスタチン、ゾルビシン；抗代謝剤、エルロチニブ、ベムラフェニブ、クリゾチニブ、ソラフェニブ、イブルチニブ、エンザルタミド、葉酸類似体、プリン類似体、アンドロゲン、抗副腎剤（anti-adrenal）、葉酸補充剤、例えば、フォリン酸、アセグラトン、アルドホスファミドグリコシド（aldophosphamide glycoside）、アミノレブリン酸、エニルウラシル、アムサクリン、ベストラブシル（bestrabucil）、ビサントレン（bisantrene）、エダトラキセート（edatraxate）、デホファミン（defofamine）、デメコルチン、ジアジコン（diaziquone）、エフロルニチン、酢酸エリプチニウム（elliptinium acetate）、エポチロン、エトグルシド、硝酸ガ

リウム、ヒドロキシ尿素、レンチナン、ロニダミン、マイタンシノイド、ミトグアゾン、ミトキサントロン、モピダンモール（mopidanmol）、ニトレリン（nitraerine）、ペントスタチン、フェナメット（phenamet）、ピラルビシン、ロソキサントロン（losoxantrone）、ポドフィリン酸（podophyllinic acid）、２－エチルヒドラジド、プロカルバジン、ＰＳＫ（登録商標）多糖類複合体（JHS Natural Products社、Eugene, OR）、ラゾキサン；リゾキシン（rhizoxin）；シゾフィラン；スピロゲルマニウム（spirogermanium）；テヌアゾン酸；トリアジコン；２，２’，２”－トリクロロトリエチルアミン；トリコテセン（特には、Ｔ－２毒素、ベラクリン（verracurin）Ａ、ロリジンＡ、及びアングイジン（anguidine））；ウレタン；ビンデシン；ダカルバジン；マンノムスチン；ミトプロニトール；ミトラクトール；ピポブロマン；ガシトシン（gacytosine）；アラビノシド（「Ａｒａ－Ｃ」）；シクロホスファミド；チオテパ；タキソイド、クロラムブシル；ジェムザール（GEMZAR、登録商標）ゲムシタビン；６－チオグアニン；メルカプトプリン；メトトレキセート；白金類似体、ビンブラスチン；白金；エトポシド（ＶＰ－１６）；イホスファミド；ミトキサントロン；ビンクリスチン；ナベルビン（NAVELBINE、登録商標）ビノレルビン；ノバントロン（novantrone）；テニポシド；エダトレキセート；ダウノマイシン；アミノプテリン；ゼローダ；イバンドロン酸；イリノテカン（カンプトサール（Camptosar）、ＣＰＴ－１１）、トポイソメラーゼ阻害剤ＲＦＳ２０００；ジフルオロメチルオルニチン；レチノイド；カペシタビン；コンブレタスタチン；ロイコボリン；オキサリプラチン；細胞増殖を低減させるＰＫＣ－アルファ、Ｒａｆ、Ｈ－Ｒａｓ、ＥＧＦＲ、及びＶＥＧＦ－Ａの阻害剤、並びに上記いずれかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体が挙げられるが、これらに制限されない。この定義には、腫瘍に対するホルモンの作用を調節又は阻害するように作用する抗ホルモン物質、例えば、抗エストロゲン及び選択的エストロゲン受容体調節剤、副腎におけるエストロゲンの産生を調節するアロマターゼ酵素を阻害するアロマターゼ阻害剤、抗アンドロゲン；並びにトロキサシタビン（１，３－ジオキソランヌクレオシドシトシン類似体）；アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、例えば、ＶＥＧＦ発現阻害剤及びＨＥＲ２発現阻害剤；ワクチン、プロロイキン（PROLEUKIN、登録商標）ｒＩＬ－２；ルートテカン（LURTOTECAN、登録商標）トポイソメラーゼ１阻害剤；アバレリックス（ABARELIX、登録商標）ｒｍＲＨ；ビノレルビン及びエスペラミシン、並びに上記いずれかの薬学的に許容される塩、酸又は誘導体も挙げられる。

【０１５３】

放射線療法との併用

また、本開示では、抗体と放射線療法（即ち、腫瘍細胞におけるＤＮＡ損傷を局所的に誘導するための任意の機構、例えば、ガンマ線照射、Ｘ線、ＵＶ照射、マイクロ波、電子放出等）との組合せを提供する。また、放射性同位元素の腫瘍細胞への特異的送達を使用する併用療法が検討され、開示の抗体を、標的抗がん物質又は他の標的化手段と関連させて使用し得る。典型的には、放射線療法は、約１～約２週間の期間にわたってパルスにより投与する。放射線療法は、頭頸部がんを有する対象に約６～７週間投与し得る。放射線療法は、単回用量として又は複数回の逐次用量として投与してもよい。

【０１５４】

医薬パック及び医薬キット

また、１又は２回用量以上の抗体又はその抗原結合部分を含む１又は２以上の容器、を含む医薬パック及び医薬キットを提供する。特定の実施形態では、単位投与量を提供し、この単位投与量は、例えば、抗体又はその抗原結合部分を含む、所定量の組成物を、１又は２以上の更なる物質有り無しで含む。他の実施形態では、このような単位投与量は、予め充填された使い捨ての注射用シリンジにより供給する。なお他の実施形態では、単位投与量に含有される組成物は、生理食塩水、スクロース等；緩衝液、例えば、リン酸等を含んでもよく、及び／又は安定かつ有効なｐＨ範囲内で製剤化する。或いは、特定の実施形態では、組成物は、適切な液体、例えば、滅菌水又は生理食塩液の追加時に再構成し得る凍結乾燥粉末として提供し得る。特定の好ましい実施形態では、組成物は、タンパク質の

凝集を阻害する１又は２以上の物質を含み、これにはスクロース及びアルギニンが挙げられるが、これらに制限されない。任意のラベルを容器上に貼付するか又はこれに付随させることにより、封入した組成物が最適な腫瘍性病状の治療に使用されることを示す。

【０１５５】

また、本開示では、単回用量又は複数回用量投与単位の抗体、及び１又は２以上の任意の抗がん物質を生成するためのキットを提供する。キットは、容器と、容器上の又はこれに付随するラベル又は添付文書とを含む。適する容器としては、例えば、ビン、バイアル、シリンジ等が挙げられる。容器は、多様な材料、例えば、ガラス又はプラスチックから形成してもよく、薬学的有効量の開示の抗体又はその抗原結合部分を含有する。他の好ましい実施形態では、容器は、無菌の接続口を含む（例えば、容器は、静脈内注射用溶液バッグ又は皮下注射針により穴を開けることが可能な栓を有するバイアルであり得る）。このようなキットは、適する容器に抗体の薬学的に許容される製剤を一般に含有し、同じ又は異なる容器に１又は２以上の抗がん物質を含んでいてもよい。また、キットは、診断又は併用療法のいずれかのための薬学的に許容される他の製剤を含有し得る。例えば、本開示の抗体又はその抗原結合部分に加えて、このようなキットは、様々な抗がん物質、例えば、化学療法又は放射線療法薬；抗血管新生物質；抗転移物質；標的抗がん物質；細胞傷害性物質；及び／又は他の抗がん物質のいずれか１つ又は２以上を含有し得る。

【０１５６】

より詳細には、キットは、開示の抗体若しくはその抗原結合部分を含有する単一の容器を、更なる成分有り無しで有し得るか、又は所望の各物質について別個の容器を有し得る。或いは、キットの抗体及び任意の抗がん物質は、患者への投与前に別個の容器内に別々に維持し得る。また、キットは、滅菌の薬学的に許容される緩衝液又は他の希釈剤、例えば、静菌注射用水（ＢＷＦＩ，bacteriostatic water for injection）、リン酸緩衝生理食塩水（ＰＢＳ，phosphate-buffered saline）、リンゲル液、及びブドウ糖液を含有する手段として第２／第３の容器を含み得る。

【０１５７】

キットの成分を１又は２以上の溶液で提供する場合、溶液は、好ましくは、水溶液であり、滅菌水又は生理食塩液が特に好ましい。しかし、キットの成分は、乾燥粉末として提供し得る。試薬又は成分を乾燥粉末として提供する場合、粉末は、適する溶媒を追加することにより再構成し得る。溶媒を別の容器で提供し得ることも想定される。

【０１５８】

上に簡潔に示すように、キットはまた、抗体又はその抗原結合部分及び任意の成分を患者に投与するための手段、例えば、１若しくは２以上の針、Ｉ．Ｖ．バッグ若しくはシリンジ、又は点眼器、ピペット、或いは、製剤を動物に注射若しくは導入するか又は体の患部に適用し得る他の器具をも含有し得る。また、本開示のキットは、バイアル等を含有するための手段、及び商用販売について厳重な制限を有する他の成分、例えば、注射器又は所望のバイアル及び他の器具を配置及び維持するブロー成形プラスチック容器等を典型的に含む。

【０１５９】

配列表の要約

多数のアミノ酸配列及びヌクレオチド配列を含む配列表を、本出願に添付する。次の表Ａ、Ｂ、及びＣでは、本明細書において例証するＷ３０１０８８抗体の配列の要約を提示し、これにはＷ３０１０８８－１．１４５．１６、このキメラバージョンＷ３０１０８８－１．１４５．１６－ｘＩｇＧ１ＫＶ３２０、及びヒト化バージョンＷ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０を含む。Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｘＩｇＧ１ＫＶ３２０は、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６の親マウスクローンと同じ可変領域を有する。

【表２】

表 A. CDR 部分に下線を引いた W301088-1.145.16-xIgG1KV320 (即ち、キメラ抗体) のアミノ酸配列

VH 配列番号 8	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGN KLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSE DTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA
VL 配列番号 9	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDL TDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK
重鎖 配列番号 14	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGN KLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSE DTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
軽鎖 配列番号 15	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQ QKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDL TDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVD NALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【表３】

表 B. CDR 部分に下線を引いた W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 (即ち、最終的リードの抗体)のアミノ酸配列

VH 配列番号 10	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPG KGLEWIGYISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSS
VL 配列番号 11	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHYSAPWTFGGGTKVEIK
重鎖 配列番号 12	QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQHPG KGLEWIGYISYSGSTSYNPSLQSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTA ADTAVYFCARSLGRRWYFVVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLA PSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAV LQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEP KSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK
軽鎖 配列番号 13	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLQSSNQKNYLAWYQQ KPGQPPKLLIYFASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVA VYYCQQHYSAPWTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSG TASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

【表４】

表 C. W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 の VH 領域及び VL 領域をコードするヌクレオチド配列

VH 配列番号 16	CAGGTGCAGCTCCAGGAGTCTGGCCCTGGCCTGGTGAAGCCATCTCAGAC ACTGAGCCTGACATGTACCGTGACCGATTATAGCATCACCGGCGACTACG CTTGGAATTGGATCAGACAGCACCCTGGAAAGGGCCTGGAGTGGATTGGA TACATCAGCTATTCTGGCAGCACATCTTATAATCCTAGCCTGCAGTCTAGG GTGACAATTTCAAGAGATACCAGCAAAAATCAGTTTAGCCTGAAACTGAG CTCTGTGACCGCCGCCGATACAGCCGTGTATTTTTGTGCCAGAAGCCTGGG AAGAAGATGGTATTTTGTGGTGTGGGGACAGGGCACAACAGTGACCGTGT CTAGC
VL 配列番号 17	GATATTGTGATGACCCAGTCTCCTGATAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGA GAGAGCCACAATCAATTGTAAGTCTAGCCAGTCTCTGCTGCAGAGCTCTA ATCAGAAAAATTACCTGGCCTGGTATCAGCAGAAGCCTGGCCAGCCTCCT AAGCTGCTGATCTACTTTGCCAGCACAAGGGAATCTGGAGTGCCTGATAG GTTTAGCGGCAGCGGCTCTGGCACAGATTTTACACTGACAATCTCTAGCCT GCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTATTATTGTCAGCAGCACTATTCTGCCCC TTGGACATTTGGCGGCGGCACCAAAGTGGAGATTAAG

【０１６０】

［実施例］

このように概して記載する本開示は、次の実施例への参照によって、より容易に理解され、この実施例は、例示目的のために提供し、本開示を制限することは意図しない。この実施例は、下記の実験が全てであることも、単に実施した実験であることも、表すことを意図しない。

【実施例１】

【０１６１】

抗原、基準抗体、及び細胞株の調製

１．１　市販材料の調製

【表５】

表 1.市販材料の情報

材料	供給元	Cat.
MCF7	ATCC	HTB-22
CHOK1	ATCC	CTL-61
Expi293(商標)発現システムキット	Invitrogen 社	A14635
Expi293F(商標)発現培地	Invitrogen 社	A1435101
Flp-In(商標)-CHO 細胞株	Invitrogen 社	R75807
TMB シングル溶液	Invitrogen 社	002023
リポフェクタミン(商標)2000 トランスフェクション試薬	Invitrogen 社	11668027
FreeStyle(商標)CHO 発現培地	Gibco 社	12651014
ヘキスト 33342	Invitrogen 社	H3570
カルセイン AM	Invitrogen 社	C3099
pHrodo iFL Red STP	Invitrogen 社	P36011
NuPAGE4%-12% Bis-Tris ゲル	Invitrogen 社	NP0322BOX
10×PBS	Invitrogen 社	AM9624
RPMI 培地 1640 (1X)	Gibco 社	22400089
0.25%トリプシン-EDTA (1x)	Gibco 社	25200072
FBS	ExCell Bio 社	FND500
4% PFA	DING GUO 社	AR-0211
BSA	BOVOGEN 社	BSAS 1.0
DPBS	CORNING 社	21-031-CVC
Ni-カラム	Cytiva 社	173712
プロテイン A カラム	Cytiva 社	175438
TSKgel G3000SWXL カラム	Tosoh 社	0008541
ヤギ抗ヒト IgG-Fc-HRP	Bethyl 社	A80-304P
ヤギ抗マウス IgG-Fc-HRP	Bethyl 社	A90-231P
ヤギ抗マウス IgG1	Bethyl 社	A90-205A
ヤギ抗マウス IgG2a	Bethyl 社	A90-207A
ヤギ抗マウス IgG2b	Bethyl 社	A90-209A
ヤギ抗マウス IgG3	Bethyl 社	A90-211A
ヤギ抗マウス IgG-Fc Alexa 647	Jackson ImmunoResearch 社	115-605-164
Alexa 647 ヤギ抗ヒト抗体	Jackson ImmunoResearch 社	109-605-098
ヤギ抗マウス IgG Fc PE	Jackson ImmunoResearch 社	115-115-164
ヤギ抗ヒト IgG Fc PE	Jackson ImmunoResearch 社	109-115-098
抗ヒト Fc IgG	Jackson ImmunoResearch 社	109-005-098

抗マウス Fc IgG	SouthernBiotech 社	1013-01
ヤギ抗マウスカッパ軽鎖 HRP	Southern Biotech 社	A90-119P
ヤギ抗マウスラムダ軽鎖 HRP	Southern Biotech 社	A90-121P
F(ab')2-ヤギ抗ヒト-IgG-Fc	Jackson ImmunoResearch 社	109-006-098
F(ab')2-ヤギ抗マウス-IgG-Fc	Jackson ImmunoResearch 社	115-005-064
ヒト B7-H3 / CD276 タンパク質, his タグ(2IgB7H3)	ACROBiosystems 社	B73-H52E2
カニクイザル B7-H3 / CD276 タンパク質, His タグ	ACROBiosystems 社	B73-C52Ha
シリーズ S センサーチップ CM5	Cytiva 社	29-1496-03
アミンカップリングキット	Cytiva 社	BR100050
10xHBS-EP+	Cytiva 社	BR100669

【０１６２】

１．２　抗原の生成

ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３（ＵｎｉｐｒｏｔＩＤ：Ｑ５ＺＰＲ３、アミノ酸２９～４６１）の細胞外ドメインをコードするアミノ酸配列を、はじめに哺乳動物細胞発現に対してコドン最適化し、次いで、Sangon Biotech社（Shanghai、中国）によって合成した。このＤＮＡセグメントを、Ｃ末端に６ｘＨｉｓを有するpcDNA3.3発現ベクター内にサブクローニングし、次いで、これをＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞（Invitrogen社、A14635）内にトランスフェクトした。インキュベーションから５日後に、Ｎｉ－カラム（Cytiva社、173712）を使用して上清を精製した。溶出したタンパク質を透析バッグ（Spectrum社、888-10987、ＭＷＣＯ　３．５ｋＤａ）を介してＰＢＳ中に透析した。タンパク質濃度は、２８０ｎｍの吸光度によりNanoDropデバイス上で決定した。精製タンパク質２μｇの電気泳動をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Invitrogen社）上で還元試薬有り無しにより実行した。精製タンパク質の純度は、TSKgel G3000SWXLサイズ排除カラム（Tosoh社、008541）を用いたＨＰＬＣ－ＳＥＣにより定量した。精製タンパク質は、－８０℃で保存した。ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３及びカニクイザルＢ７Ｈ３をACRO社（Cat. B73-H52E2）及びACRO社（Cat. B73-C52Ha）から購入した。

【０１６３】

１．３　基準抗体（ＢＭＫ）の生成

抗Ｂ７Ｈ３抗体エノブリツズマブ（MacroGenics社、米国特許出願公開第２０１２０２９４７９６号明細書：Seq 117, 119）を基準抗体として使用した。この抗体の可変ドメインをコードする核酸配列を、はじめに哺乳動物細胞発現に対してコドン最適化し、次いで、Sangon Biotech社（Shanghai、中国）によって合成した。次いで、このＤＮＡセグメントを、ヒトＩｇＧ１の定常領域を有する修飾pcDNA3.4発現ベクター内にサブクローニングした。ＶＨ遺伝子及びＶＬ遺伝子を含有するプラスミドをＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞（Invitrogen社、A14635）内に同時トランスフェクトした。インキュベーションから５日後に、プロテインＡカラム（Cytiva社、175438）を使用して上清を精製した。溶出したタンパク質を透析バッグ（Spectrum社、888-10987）を介してＰＢＳ中に透析した。タンパク質濃度は、２８０ｎｍの吸光度によりNanoDropデバイス上で決定した。精製抗体２μｇの電気泳動をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Invitrogen社）上で還元試薬有り無しにより実行した。精製抗体の純度は、TSKgel G3000SWXLサイズ排除カラム（Tosoh社、008541）を用いたＨＰＬＣ－ＳＥＣにより定量した。精製抗体は、－８０℃で保存した。

【０１６４】
１．４　安定な細胞株／細胞プールの確立
ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３発現細胞株を生成した。簡潔には、ＣＨＯＫ１細胞に、完全長の４ＩｇＢ７Ｈ３を含有するpcDNA3.3発現ベクターを、リポフェクタミン２０００トランスフェクションキット（Invitrogen社、11668027）を製造者のプロトコルに従って使用してトランスフェクトした。トランスフェクション後４８ｈに、細胞をＴ７５フラスコの選択培地（１０％のＦＢＳ及び１５μｇ／ｍＬのブラストサイジンを加えたＦ１２－Ｋ）に継代培養した。２又は３継代の選択後、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３発現安定細胞株（ＷＸＸ０８８－ＣＨＯＫ１．ｈＰｒｏ１．２Ａ５）をブラストサイジン選択及び限界希釈により得、発現レベルを、抗Ｂ７Ｈ３抗体を使用したＦＡＣＳにより決定した。
【０１６５】
カニクイザルＢ７Ｈ３発現細胞プールを生成した。簡潔には、ＦｌｉｐｉｎＣＨＯ細胞に、完全長のカニクイザルＢ７Ｈ３を含有するpcDNA5/pOG44発現ベクターを、リポフェクタミン２０００トランスフェクションキット（Invitrogen社、11668027）を製造者のプロトコルに従って使用してトランスフェクトした。トランスフェクション後４８ｈに、細胞をＴ７５フラスコの選択培地（１０％のＦＢＳ及び６００μｇ／ｍＬのハイグロマイシンＢを加えたＦ１２）に継代培養した。２又は３継代の選択後、高発現安定細胞プール（ＷＢＰ３ＸＸ０８８－ＦｌｐｉｎＣＨＯ．ｃＰｒｏ１．ｐｏｏｌ）をハイグロマイシンＢ選択及びBD FACSMelody（商標）細胞選別により得た。
【実施例２】
【０１６６】
ＷＢＰ３０１０８８抗体の含有
２．１　動物の免疫化
６～８週齢のＢａｌｂ／ｃマウス４匹を、動物１匹当たりヒト４ＩｇＢ７Ｈ３コードＤＮＡプラスミド２００～４００μｇにより免疫化した。アジュバント混合物は、Ａｄｊｕ－Ｐｈｏｓ、ＣｐＧ－ＯＤＮ、及びＧＭ－ＣＳＦを含む。動物には、１週間おきに１回、皮下注射、筋肉内注射、及び流体力学的尾静脈注射を行った。３回の注射（第１の放血）及び５回の注射（第２の放血）後にマウスから血液を採取した。血清力価をＥＬＩＳＡ及びＦＡＣＳにより測定した。
【０１６７】
ＥＬＩＳＡアッセイを使用して４ＩｇＢ７Ｈ３抗原に対する血清抗体価を測定した。プレート（Nunc社）を０．５μｇ／ｍＬのｈｉｓタグ１００μＬにより４℃で一晩コーティングし、次いで、ブロッキング緩衝液（ＰＢＳ中２％のＢＳＡ）により環境温度で１時間ブロッキングした。次いで、プレートを洗浄し、１μｇ／ｍＬの抗原とともに環境温度で１時間インキュベートした。洗浄後、マウス血清は、ブロッキング緩衝液により１：１００希釈から開始して１：３の段階希釈を行い、環境温度で２時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄した後、二次抗体のヤギ抗マウスＩｇＧ－Ｆｃ－ＨＲＰ（Bethyl社、A90-231P）とともに１時間インキュベートした。洗浄後、ＴＭＢ基質を加え、２ＭのＨＣｌにより相互作用を停止させた。４５０ｎｍの吸光度を、マイクロプレートリーダー（Molecular Device社）を使用して読み取った。血清力価は、２倍のバックグラウンドにより決定した。
【表６】

表 2. ELISA によるヒト 4IgB7H3 結合に対する血清力価検査の要約

力価	マウス#1	マウス#2	マウス#3	マウス#4
第 2 の放血	218700	1968300	656100	1968300
第 1 の放血	218700	218700	656100	218700
放血前	<100	<100	<100	<100

【０１６８】
ＦＡＣＳアッセイを使用して４ＩｇＢ７Ｈ３抗原に対する血清抗体価を測定した。簡潔には、改変Ｂ７Ｈ３発現細胞を密度１×１０^{5}細胞／ウェルで９６ウェルのＵ底プレート内に播種し、１５００ｒｐｍにより４℃で４分間、遠心分離した後、上清を除去した。１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡにより１：１００希釈から開始して１：３の段階希釈を行ったマウス血清を加えて細胞を再懸濁し、４℃で１時間インキュベートした。細胞を１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡ　１８０μＬで２回洗浄した。二次抗体のヤギ抗マウスＩｇＧ－ＦｃAlexa 647（Jackson社、109-605-098）を加えて細胞を再懸濁し、４℃の暗所で３０分間インキュベートした後、１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡ　１８０μＬで洗浄した。最後に、細胞を１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡ　１００μＬに再懸濁し、蛍光強度をＦＡＣＳ（BD Canto II）により測定し、FlowJo Versionソフトウェアにより解析した。血清力価は、２倍のバックグラウンドにより決定した。

【表７】

表 3. FACS によるヒト 4IgB7H3 細胞株に対する血清力価検査の要約

力価	マウス#1	マウス#2	マウス#3	マウス#4
第 2 の放血	218700	1968300	1968300	ほぼ 1968300

【０１６９】
血清力価が充分に高かった場合、流体力学的尾静脈注射によるＤＮＡ　４００μｇ及び足蹠注射及び皮下注射による４×１０^{6}のＭＣＦ－７細胞の最終ブースターを接種した後、融合させた。リンパ節及び脾臓を使用して細胞融合を行った。

【０１７０】
２．２　ハイブリドーマの含有
免疫化マウスのリンパ節及び脾臓をホモジナイズし、濾過して血餅及び細胞デブリを除去した。対数増殖期のＳｐ２／０骨髄腫細胞を採取し、遠心分離した。一般的電気融合手順に従って、Ｂ細胞をＳｐ２／０骨髄腫細胞と電気融合溶液中１：１の比で融合させた。融合細胞は、２０％ＦＢＳ及び１×ＨＡＴを添加したＤＭＥＭ培地に懸濁し、次いで、９６ウェルプレート（CORNING社）内に移した。融合細胞を３７℃、５％CO_2に設定したインキュベーターで１０～１４日間培養した。

【０１７１】
２．３　抗体のスクリーニング
第１のスクリーニング：細胞に基づくＥＬＩＳＡアッセイを第１のスクリーニングとして使用して、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に対するハイブリドーマ上清の結合を検査した。簡潔には、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３をトランスフェクトしたＣＨＯＫ１細胞株を密度５×１０^{3}細胞／ウェルで９６ウェルプレート（CORNING社）に播種し、次いで、３７℃、５％CO_2に設定したインキュベーターに２日間維持した。次いで、プレートを洗浄し、ハイブリドーマ上清とともに環境温度で１時間インキュベートした。次いで、プレートを洗浄した後、二次抗体のヤギ抗マウスＩｇＧ－Ｆｃ－ＨＲＰ（Bethyl社、A90-231P）とともに１時間インキュベートした。洗浄後、ＴＭＢ基質を加え、２ＭのＨＣｌにより相互作用を停止させた。４５０ｎｍの吸光度を、マイクロプレートリーダー（Molecular Device社）を使用して読み取った。

【０１７２】
第２のスクリーニング：ヒト抗原及びカニクイザル抗原に対するハイブリドーマ上清の結合を確認するために、ＦＡＣＳを実施した。親ＣＨＯＫ１細胞株及び４ＩｇＢ７Ｈ３トランスフェクトＣＨＯＫ１細胞株は、CellTrace色素（それぞれ、Violet及びFarRed）で染色し、一方、Ｂ７Ｈ３トランスフェクトＦｌｉｐｉｎ ＣＨＯ細胞プールは、色素を用いずに作製した。環境温度による１５分間のインキュベーション及び洗浄の後、３種の細胞を１×１０^{6}細胞／ｍＬに当量で混合した。３種の細胞混合物は、密度１×１０^{5}細胞／ウェルで９６ウェルのＵ底プレート（BD社）内に移した。次いで、ハイブリドーマ

上清をプレートに移し、４℃で１時間インキュベートした。洗浄後、二次抗体のヤギ抗マウスＩｇＧ　Ｆｃ　ＰＥ（Jackson社、115-115-164）を加え、細胞とともに４℃の暗所で０．５時間インキュベートした。次いで、細胞を洗浄し、１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡに再懸濁した後、フローサイトメトリーにより解析した。

【０１７３】

ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に対するハイブリドーマ上清の結合を検査するために、従来のＥＬＩＳＡアッセイを使用した。プレートを１００μＬ／ウェルのヒト２ＩｇＢ７Ｈ３（０．２μｇ／ｍＬ）により環境温度で１時間、予めコーティングした。２００μＬ／ウェルの１×ＰＢＳ／２％ＢＳＡによる１時間のブロッキング後、プレートを１×ＰＢＳＴで３回洗浄した。ハイブリドーマ上清を容量１００μＬ／ウェルでプレート内に加え、環境温度で２時間インキュベートした。１×ＰＢＳＴによる３回のプレート洗浄後、１００μＬ／ウェルのヤギ抗マウスＩｇＧ－Ｆｃ　ＨＲＰ（Bethyl社、A90-231P）をプレート内に加え、環境温度で１時間インキュベートした。６回の洗浄後、１００μＬ／ウェルのＴＭＢ基質を５～１０分間分注することにより発色させ、次いで、１００μＬ／ウェルの２ＭＨＣｌを加えることにより反応を停止させた。４５０ｎｍの吸光度を、マイクロプレートリーダーを使用して読み取った。

【０１７４】

ＦＡＣＳによりスクリーニングした選択陽性株をＳＰＲ（表面プラズモン共鳴）により更に確認した。ＳＰＲにより、生体分子相互作用のリアルタイムでの無標識検出が可能となる。ＳＰＲは、偏光を導電性表面の２つの培地間の界面に投じる場合に生じる。これによりプラズモンと呼ばれる電荷密度波が生成され、共鳴角として知られる特定の角度における反射光の強度を、センサー表面上の質量に比例して低減させる。

【０１７５】

Biacore 8Kを使用してヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に対する上清の結合を順位付けした。４００ｍＭのＥＤＣ及び１００ｍＭのＮＨＳ（GE社）を混合することにより、注射直前に活性化剤を調製した。ＣＭ５センサーチップを、この活性化剤により４２０秒間活性化した。次いで、ヤギ抗マウスＦｃ　ＩｇＧ（１０ｍＭのＮａＡｃ、ｐＨ４．５中３０μｇ／ｍＬ）をチャンネルに１０μＬ／ｍｉｎの流量で４２０秒間注射した。チップを１Ｍのエタノールアミン－ＨＣｌにより非活性化した。上清をチャンネルに１０μＬ／ｍｉｎの流量で３０秒間注射した。ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３の２００ｎＭ解析物をチャンネルに３０μＬ／ｍｉｎの流量で１２０秒の会合相の後３００秒の解離相の間注射した。グリシン（１０ｍＭ、ｐＨ１．５）を再生緩衝液として、解離相の後に注射した。センサーグラムは、参照チャンネル（reference channel）及び緩衝チャンネル（buffer channel）を減算する。次いで、データに１：１ラングミュア結合モデルをフィッティングする。

【０１７６】

pHrodo iFL色素は、抗体のような生体分子にコンジュゲートし、酸性環境、例えば、細胞リソソーム及び細胞エンドソームの環境に見出される場合にのみ高度に蛍光性となり得る。これは、生細胞アッセイにおいて、コンジュゲートした生体分子の検出を可能とする。AffiniPure F(ab')2断片ヤギ抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃγ及び抗マウスＩｇＧ　Ｆｃγを、pHrodo iFL Red STPエステルアミン反応性色素で標識し、zebaスピン脱塩カラムを製造者の指示に従って用いて精製した。ヒト完全長Ｂ７Ｈ３を発現するＭＣＦ－７細胞（２×１０^{4}細胞／ウェル）を、８μｇ／ｍＬのポリ－Ｄ－リジンで予めコーティングした９６ウェル透明底黒色プレート内に播種した。細胞は、３７℃、５％CO_2に設定したインキュベーターで一晩増殖させた。翌日、ＷＢＰ３０１０８８－１陽性株上清を容量１００μＬで対応するウェル内に加えた。細胞は、３７℃、５％CO_2に設定したインキュベーターで０．５時間インキュベートした。ヒト及びマウスのＩｇＧ１アイソタイプ抗体を陰性対照として使用した。５０ｎＭのpHrodo iFL Red/F(ab')^{2}ヤギ抗マウス又は抗ヒトＩｇＧ　Ｆｃγコンジュゲートを容量１００μＬ／ウェル（完全培養培地で希釈）で加えた。次いで、プレートを３７℃、５％CO_2に設定した暗所のインキュベーターで５時間インキュベートした。インキュベーション後、上清を廃棄した。プレートを完全培

養培地で洗浄した。混合色素溶液（ＤＰＢＳ中に希釈した１μｇ／ｍＬのヘキスト33342及び０．５μｇ／ｍＬのカルセインAM）を容量１００μＬ／ウェルでプレート内に加え、環境温度で１５分間維持した。インキュベーション後、色素溶液を廃棄し、プレートを１×ＰＢＳ／１％ＢＳＡで１回洗浄した。ＭＣＦ－７細胞の蛍光強度を読み取り、Perkin Elmer社のOperetta CLSハイコンテント解析システムにより解析した。

【０１７７】

一次スクリーニングでは、総計８４６０ウェルを検査し、２７９のハイブリドーマを選択し、２４ウェルプレートにおいて増やした。二次スクリーニングでは、２４ウェルプレートの上清を使用して、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３及びカニクイザルＢ７Ｈ３に対する強力な結合、ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に対する弱い結合、並びにＭＣＦ－７に対する強力な内部移行活性を確認した。二次スクリーニング結果に基づいて、ＷＢＰ３０１０８８－１．１４５ハイブリドーマをサブクローニングに選択した。

【０１７８】

２．４　抗体のサブクローニング

選択された陽性ハイブリドーマ細胞をサブクローニングに使用した。対数増殖期の細胞を計数し、半固形ＨＡＴ培地１．５ｍＬに加えた。細胞をボルテックスオシレーターで５～１０秒間穏やかに混合し、次いで、６ウェルプレート（CORNING社）に播種した。プレートは、３７℃、５％CO_2に設定したインキュベーターで７～８日間維持した。可視の各単一コロニーを、１０％のＦＢＳを添加したＤＭＥＭ培地を有する９６ウェルプレート（CORNING社）内に選定した。２～３日後、細胞上清を採取し、細胞に基づくＥＬＩＳＡ（ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３）、従来のＥＬＩＳＡ（ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３）により、上記の抗体スクリーニングとして記載のプロトコルを使用してスクリーニングした。ＦＡＣＳによるヒト４ＩｇＢ７Ｈ３及びカニクイザルＢ７Ｈ３に対するサブクローニング確認スクリーニング後、選択された単一陽性クローンの培養上清を採取し、抗体を精製して更なる特性決定を行った。サブクローンスクリーニング及び確認スクリーニングの後にＷＢＰ３０１０８８－１．１４５．１６を得た。

【０１７９】

２．５　抗体アイソタイプ決定

アイソタイプ決定ＥＬＩＳＡを９６ウェル高結合プレート（Nunc社）により実施した。各ウェルを２μｇ／ｍＬの捕捉抗体、ヤギ抗マウスＩｇＧ１（Bethyl社、A90-205A）、ヤギ抗マウスＩｇＧ２ａ（Bethyl社、A90-207A）、ヤギ抗マウスＩｇＧ２ｂ（Bethyl社、A90-209A）、ヤギ抗マウスＩｇＧ３（Bethyl社、A90-211A）によりそれぞれ４℃で一晩コーティングし、１×ＰＢＳ／２％ＢＳＡでブロッキングした。ハイブリドーマ上清をコーティングしたウェルでインキュベートし、プレート上に固定化した捕捉抗体に対する抗体の特異的結合を、ペルオキシダーゼコンジュゲートヤギ抗マウスカッパ／ラムダ軽鎖抗体を使用して測定した。ＴＭＢ基質を加えることによりＨＲＰシグナルを検出し、１２分後に２ＭのＨＣｌを使用して反応を停止させた。全てのインキュベーションステップは、環境温度で実施し、ステップ間に、プレートをＰＢＳで洗浄した。４５０ｎｍの吸光度を、マイクロプレートリーダー（Molecular Device社）を使用して読み取った。

【０１８０】

ＷＢＰ３０１０８８－１．１４５．１６のアイソタイプ決定結果は、下記の表に示した（表４）。

【表８】

表 4. WBP301088-1.145.16 のアイソタイプ決定結果

クローン番号	アイソタイプ
WBP301088-1.145.16	IgG2b, カッパ

【０１８１】

２．６　抗体の生成

少量の精製抗体を必要とする場合、Ｔ７５フラスコ（CORNING社）を一般に使用してハイブリドーマ細胞培養のスケールアップを行う。モノクローナルハイブリドーマ細胞を５×１０^{6}～１×１０^{7}細胞／Ｔ７５フラスコでフラスコに播種した。細胞は、細胞生存率が約３０～４０％に達するまで約７～１０日、持続的に増殖させた。培養上清を回収し、細胞デブリを遠心分離により除去した。上清は、滅菌濾過し、抗体精製用に保存した。

【０１８２】

２．７　ハイブリドーマのシーケンシング

ハイブリドーマ細胞試料の全ＲＮＡを、TaKaRa社のMiniBEST Universal RNA抽出キットの指示に従って、はじめに抽出した。次いで、Clonetech社のSMART RACE cDNA増幅キットを使用してＲＮＡをｃＤＮＡに変換した。次いで、ＶＨドメインＤＮＡ配列及びＶＬドメインＤＮＡ配列をｃＤＮＡから３０サイクルのＰＣＲにより増幅し、それぞれ９４℃で３０秒間の変性、６０℃で３０秒間のアニーリング、次いで、７２℃で３０秒間の伸長を行った。次いで、ＰＣＲ産物をＴＡクローニングベクターにサブクローニングし、次いで、Biosune Biotech社（Shanghai、中国）に送付してシーケンシングを行った。

【０１８３】

シーケンシングデータによりハイブリドーマ細胞試料の単クローン性が確認されると、ＶＨドメイン及びＶＬドメインのＤＮＡ配列をＰＣＲにより増幅した。プライマーは、Sangon Biotech社（Shanghai、中国）によって合成した。次いで、ＤＮＡセグメントを、ＬＡＬＡ変異を有するヒトＩｇＧ１の定常領域を有するpcDNA3.4発現ベクター内にサブクローニングし、次いで、Tsingke Biotechnology社（Beijing、中国）によってシーケンシングした。

【０１８４】

２．８　ＩｇＧの変換

シーケンシングデータによりハイブリドーマ細胞試料の単クローン性が確認されると、ＶＨドメイン及びＶＬドメインのアミノ酸配列を哺乳動物細胞発現に対してコドン最適化し、次いで、Sangon Biotech社（Shanghai、中国）によって合成した。次いで、ＤＮＡセグメントを、Ｌ２３４Ａ／Ｌ２３５Ａ（ＬＡＬＡ）変異を有するヒトＩｇＧ１の定常領域を有するpcDNA3.4発現ベクター内にサブクローニングした。

【０１８５】

この方法では、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６を、ＬＡＬＡ変異フォーマットを有するヒトＩｇＧ１に変換して、キメラ抗体Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｘＩｇＧ１ＫＶ３２０を得た。プロテインＡ精製及び緩衝液交換の後、これをＳＤＳ－ＰＡＧＥ及びＳＥＣ－ＨＰＬＣにより特性決定した。タンパク質は、還元条件下のＳＤＳ－ＰＡＧＥでは、見かけの分子量５０ｋＤａ及び２５ｋＤａで遊走し、ＩｇＧの重鎖及び軽鎖に対応する（データ不提示）。純度は、９９％を超える高純度であった（ＳＥＣ－ＨＰＬＣ）。

【表９】

表 5.キメラ抗体産生の要約

タンパク質名	濃度 (mg/mL)	緩衝液	SEC-HPLC による純度(%)	理論 M.W.
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	2.50	PBS	99.64%	147 kDa

【０１８６】

２．９　ヒト化

オープンソースソフトウェアANARCI（Dunbar J, Deane CM. ANARCI: antigen receptor numbering and receptor classification. Bioinformatics, 2015; 32 (5): 298-300）のローカルコピーを実行して、Kabat付番をＷ３０１０８８－１．１４５．１６に割り当てた。ＣＤＲをDr. Martinのウェブサイトの定義（Martin, 2018、上記）に従って同定し、表６に示した。

【表１０】

表 6. Dr. Martin の抗体情報科学ウェブサイトによる CDR 範囲の定義

CDR	Kabat	前残基	後残基	長さ
L1	L24-L34	常に C	常に W	10～17 残基
L2	L50-L56	L1 後 16 残基	/	7 残基
L3	L89-L97	常に C	常に F-G-X-G	7～11 残基
H1	H31-H35b	常に C-X-X-X	常に W	10～12 残基
H2	H50-H65	典型的に L-E-W-G	K/R-L/I/V/F/T/A-T/S/I/A	16～19 残基
H3	H95-H102	典型的に C-A-R	常に W-G-X-G	3～25 残基

【表１１】

表 7. CDR 配列に下線を引いた W301088-1.145.16 の VH アミノ酸配列及び VL アミノ酸配列

クローン番号		アミノ酸配列
W301088-1.145.16	VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTDYSITGDYAWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGSTSYNPSLQSRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYFCARSLGRRWYFVVWGAGTTVTVSA
	VL	DIVMTQSPSSLAMSVGQKVTMSCKSSQSLLNSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYFASTRESGVPDRFIGSGSGTDFTLTISSVQAEDLTDYFCQQHYSAPWTFGGGTKLEIK

【表１２】

表 8. 同定した W301088-1.145.16 の重鎖 CDR 配列及び軽鎖 CDR 配列

抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
W301088-1.145.16	配列番号 1	配列番号 2	配列番号 3	配列番号 7	配列番号 5	配列番号 6
	DYSITGDYAWN	YISYSGSTSYNPSLQS	SLGRRWYFVV	KSSQSLLNSSNQKNYLA	FASTRES	QQHYSAPWT

【０１８７】
マウス抗体Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６のＶＨドメイン配列及びＶＬドメイン配列を、ＩＭＧＴのＶＨドメイン及びＶＬドメインのヒト生殖系列配列レパートリーに対してそれぞれアラインメントした。Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６のＶＨ／ＶＬドメイン配列に関してフレームワーク内に最小数のアミノ酸の差を有するＶＨ／ＶＬドメインのヒト生殖系列配列を、ＶＨ／ＶＬドメインのヒト化鋳型として選択した。ＩＧＨＪ６＊０１と混合したＩＧＨＶ４－３１＊０２及びＩＧＫＪ４＊０１と混合したＩＧＫＶ４－１＊０１は、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６のＶＨドメイン配列及びＶＬドメイン配列に対してそれぞれ最も相同のヒト生殖系列配列であった。Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６のＣＤＲを、このような２つのヒト生殖系列鋳型のフレームワーク内に移植して、生殖系列配列を構成した。

【０１８８】
フレームワーク内のいくつかの「復帰変異」位置を、経験的に選択して、生殖系列配列内のアミノ酸を元来のマウス配列内のこれらの対応アミノ酸に変換した。ヒト化バリアントのセットを経験的に設計して、このように選択された復帰変異部位の種々の組合せを探索した。生殖系列配列は、元来のマウスＷ３０１０８８－１．１４５．１６配列とＶＬドメインでは１６位置及びＶＨドメインでは２０位置が異なった。総計３６の異なる部位の中でも１４部位が復帰変異用に考慮された：ＶＨ：Ｑ００１Ｄ、Ｓ０２５Ｔ、Ｈ０４０Ｆ、Ｋ０４３Ｎ、Ｇ０４４Ｋ、Ｉ０４８Ｍ、Ｖ０６７Ｉ、Ｖ０７１Ｒ、Ａ０８５Ｅ、Ｖ０８９Ｔ、Ｙ０９１Ｆ、ＶＬ：Ｉ０２１Ｍ、Ｐ０４３Ｓ、Ｙ０８７Ｆ。ヒト化バリアントのセットを経験的に設計して、このような復帰変異の種々の組合せを検査した。

【０１８９】
２．１１　ＰＴＭの除去
ヒト化バリアントのＶＨドメイン配列及びＶＬドメイン配列をいくつかの種類の重要な翻訳後修飾（ＰＴＭ）部位：ＣＤＲにおけるアスパラギン脱アミノ化部位（Ｎ－Ｇ及びＮ－Ｓ）、ＣＤＲにおけるアスパラギン酸異性化部位（Ｄ－Ｇ）、全長における不対Ｃ部位、及び全長におけるＮ結合グリコシル化部位（Ｎ－Ｘ－Ｓ／Ｔ、このＸは、Ｐを除く任意のアミノ酸であり得る）についてスキャンした。点変異を経験的に設計することにより、ヒト化バリアントにおけるこのような重要なＰＴＭ部位を除去してＰＴＭ修飾の潜在的リスクを回避した。最終的には、親抗体と比較して発現、結合、及び熱安定性に影響しないＰＴＭ除去抗体を選択した。

【０１９０】
マウス抗体Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６のＶＬドメイン配列がＮ－Ｓ－Ｓ　Ｎ結合グリコシル化部位を含有するため、３つの点変異ＶＬ：Ｎ０２７ｄＱ、ＶＬ：Ｓ０２７ｅＰ、及びＶＬ：Ｓ０２７ｆＡ（Kabat付番による）を設計して、重要なＰＴＭ部位を除去した。これらをヒト化バリアントと組み合わせてｋｏｆｆ順位付けを行うことにより、更に特性決定した。

【０１９１】
２．１２　ＳＰＲによるｋｏｆｆ順位付け
濾過した上清のｋｏｆｆ順位付けをBiacore 8K機器上で実施した。ＣＭ５センサーチップは、４００ｍＭのＥＤＣ及び１００ｍＭのＮＨＳ（GE社）により１０μＬ／ｍｉｎの流量で４２０秒間、はじめに活性化した。次いで、１０ｍＭのＮａＡｃ（ｐＨ４．５）中３０μｇ／ｍＬの抗ヒトＦｃ　ＩｇＧ（Jackson社）をチャンネル１～８に１０μＬ／ｍｉｎの流量で４２０秒間注射した。次いで、チップは、１Ｍのエタノールアミン－ＨＣｌ（GE社）により１０μＬ／ｍｉｎの流量で４２０秒間非活性化した。希釈した抗体上清をチャンネルのＦｃ２に１０μＬ／ｍｉｎの流量で注射した。プラスミドによるトランスフェクションを行わない細胞培養物の上清を陰性対照として使用し、チャンネルのＦｃ１に１０μＬ／ｍｉｎの流量で注射した。１００ｎＭのヒト４ＩｇＢ７Ｈ３及び泳動用緩衝液をチャンネルのＦｃ１－Ｆｃ２に３０μＬ／ｍｉｎの流量で１８０秒の会合相の後３６００秒の解離相の間規則的に注射した。各実行後に１０ｍＭのグリシン（ｐＨ１．５

）を注射してチップを再生した。センサーグラムは、Biacore 8K機器に添付のソフトウェアにより解析した。試料のセンサーグラムは、参照チャンネル及び緩衝チャンネルを減算した。次いで、データに１：１ラングミュア結合モデルをフィッティングした。

【０１９２】

２．１３　ＰＴＭ除去変異のヒト化バリアントとの組合せ

最良のｋｏｆｆ率を示すＰＴＭ除去点変異を、点変異誘発により、最も有望なｋｏｆｆ率を有するヒト化バリアントに組み合わせ、最終的コンストラクトを構成して親和性の検証を行った。

【０１９３】

ｋｏｆｆ率から、ＶＬ：Ｎ０２７ｄＱのＰＴＭ除去変異を、選択された４つのヒト化変異アミノ酸Ｓ０２５Ｔ、Ｖ０７１Ｒ、Ｙ０９１Ｆ、Ｖ０８９Ｔと組み合わせて、最終的リードを構成した。最終的リードは、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０と名付けた。

【表１３】

表 9. W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 の重鎖 CDR 配列及び軽鎖 CDR 配列

抗体	HCDR1	HCDR2	HCDR3	LCDR1	LCDR2	LCDR3
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	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
	DYSITGDYAWN	**YISYSGSTSYNPSLQS**	**SLGRRWYFVV**	**KSSQSLLQSSNQKNYLA**	**FASTRES**	**QQHYSAPWT**

【０１９４】

２．１４　生成規模の一過性トランスフェクション及び精製

最終濃度１μｇ／ｍＬの各プラスミドを、密度３．０×１０^{6}細胞／ｍＬ及び細胞生存率９５％超のＥｘｐｉ２９３Ｆ細胞２０ｍＬに、ExpiFectamine（商標）一過性トランスフェクションキットを使用して一過性にトランスフェクトした。細胞培養物を加湿したプラットフォーム振盪機で回転率１５０ｒｐｍにより増殖させた。温度を３７℃に維持すると同時に、ＣＯ$_{2}$レベルを８％に維持した。

【０１９５】

細胞培養物のインキュベーションから５日後に、標的抗体を発現する上清を採取し、GE MabSelect SuREプロテインＡカラム（Cytiva社、175438）を使用して濾過して精製した。溶出した抗体は、D-Tube Dialyzer Maxi（EMD Millipore社、71508、ＭＷＣＯ　３．５ｋＤａ）を介してＰＢＳ中に透析した。抗体濃度は、２８０ｎｍの吸光度によりNanoDropデバイス上で決定した。精製抗体試料２μｇの電気泳動をＳＤＳ－ＰＡＧＥゲル（Invitrogen社NuPAGE（商標）4-12% Bis-Tris Protein Gel）上で還元試薬有り無しにより実行した。精製抗体試料の純度は、TSKgel G3000SWXLサイズ排除カラム（Tosoh社、008541）を用いたＨＰＬＣ－ＳＥＣにより定量した。精製抗体は、－８０℃で保存する。

【実施例３】

【０１９６】

ＷＢＰ３０１０８８抗体のインビトロでの特性決定

３．１　ＳＤＳ－ＰＡＧＥ、及びＳＥＣ－ＨＰＬＣによる純度の検出

試料を添加緩衝液と混合し、ドライバスを使用して７５℃で１０分間加熱した。試料の添加後、ＳＤＳ－ＰＡＧＥを定電圧（２００Ｖ）で３５分間実行した。eStain（商標）L1によりゲルを染色及び脱染した。ＳＤＳ－ＰＡＧＥ結果は、BIO-RADイメージングシステムを使用して得た。

【０１９７】
結果は、下記の表１０に要約する。タンパク質は、還元条件下でのＳＤＳ－ＰＡＧＥでは、見かけの分子量５０ｋＤａ及び２５ｋＤａで遊走し、ＩｇＧの重鎖及び軽鎖に対応する一方、非還元条件下では、予想された約１５０ｋＤａのバンドで遊走する（図１）。
【０１９８】
３．２　ＳＥＣ－ＨＰＬＣによる純度の検出
各抗体の純度を、Agilent 1260 Infinity IIシステム（Agilent Technologics（商標）社）によりTSKgel G3000SWXLカラム（Tosoh Bioscience社、0008541）を用いて検出した。適切な容量（５～１００μＬ）の試料をカラム内に注射し、１ｍＬ／ｍｉｎの流量で２０分間分離した。泳動用緩衝液は、５０ｍＭのリン酸ナトリウム、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ７．０である。保持ピークは、波長２８０ｎｍのＵＶ光により検出された。各抗体の純度をＳＥＣ－ＨＰＬＣ解析方法により解析して、４．５分～１０．５分の全てのピーク面積を統合した。演算及び解析用ソフトウェアは、OpenLab CDS Workstation（v2.3.0.443又はv2.2.0.484）である。
【０１９９】
結果は、下記の表１０に要約する。最終的リードの純度は、９９％を超える高純度であった（ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、図２）。
【０２００】
３．３　ＤＳＦによる熱安定性（T_m）
各抗体のT_m（融解温度）をQuantStudio（登録商標）7 Flex Real-Time PCRシステム（Applied Biosystems社）を使用して調査した。抗体溶液１９μＬをSYPRO Orange溶液（Invitrogen社）１μＬと混合し、９６ウェルプレート（Applied Biosystems社）に移した。プレートをOptical Adhesive Film（Applied Biosystems社）で密封し、３，０００ｒｐｍで５分間遠心分離して任意の気泡を除去した。プレートを２６℃～９５℃で速度０．９℃／ｍｉｎにより加熱し、生成した蛍光データを収集した。種々の温度に関する蛍光変化の負の微分係数を算出し、最大値を融解温度T_mとして定義した。タンパク質が複数のアンフォールディング遷移を有する場合、第１のT_mを報告し、T_m1と名付けた。データ収集及びT_m算出をQuantStudio（登録商標）Real Time PCRソフトウェア（v1.3）により自動的に行った。
【０２０１】
タンパク質Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のT_m値を、種々の温度に関する蛍光変化の負の微分係数の最大値として、下記の表１０に列挙するように定義した。データプロファイルを図３に示した。この破線は、蛍光曲線におけるT_m1値の位置を示す。Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のT_m1は７０．１℃であり、良好な熱安定性を有することを示した。
【０２０２】
３．４　ＨＩＣ－ＨＰＬＣによる疎水性の検出
抗体の疎水特性を、HPLC 1260 Infinity IIシステム（Agilent Technologics（商標）社）によりTSKgel butyl-NPRカラム（Tosoh社、0042168）を用いて検出した。各試料をＰＢＳ緩衝液で０．５ｍｇ／ｍＬに希釈し、希釈した試料２０μＬをカラム内に注射し、０．５ｍＬ／ｍｉｎの流量で６１分間分離した。泳動用緩衝液は、２５ｍＭのリン酸ナトリウム、ｐＨ７．０（緩衝液Ａ）、及び２５ｍＭのリン酸ナトリウム、１．５Ｍの$(NH_4)_2SO_4$、ｐＨ７．０（緩衝液Ｄ）である。泳動勾配は、３～５３分間による０％～１００％の緩衝液Ｄであった。保持ピークは、波長２８０ｎｍ及び２３０ｎｍのＵＶ光により検出された。保持時間をＨＩＣ－ＨＰＬＣ解析方法により解析して、２０～４０分の全てのピーク面積を統合した。演算及び解析用ソフトウェアは、OpenLab CDS Workstation（v2.6.0.691）である。
【０２０３】
タンパク質Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のＨＩＣ保持時間は、２３．５２分であり（表１０及び図４）、このタンパク質が良好な疎

水性を有する抗体であることを示した。

【０２０４】

３．５　ＤＬＳによる拡散相互作用パラメーター（k_D）

ＤＬＳ－k_D測定を、DynaProプレートリーダーIII（Wyatt Technology社）を使用して調査した。試料調製プロセス中、試料の外観を解凍、濾過、及び濃縮時に記録した。試料は、２０ｍｇ／ｍＬを超えて濃縮し、次いで、ＰＢＳ緩衝液により最終濃度２．５ｍｇ／ｍＬ、５ｍｇ／ｍＬ、１０ｍｇ／ｍＬ、１５ｍｇ／ｍＬ、及び２０ｍｇ／ｍＬに希釈した。次いで、試料溶液７．５μＬを1536ウェルマイクロプレート（Aurora社、ABI1-00110A）に加えた。プレートをClearSeal Film（Hampton Research社、HR4-521）で密封し、３，０００ｒｐｍで５分間遠心分離して試料をウェルの底に沈降させた。各試料は、二つ組のウェルで検査した。プレートを対応する位置に置き、DYNAMICSオペレーションソフトウェア（v7.8.1.3）によりデータ収集を実施した。各タンパク質試料について５つの取得データを収集し、その間の各取得時間は５秒であった。各測定について、拡散係数を決定し、タンパク質濃度に対してプロットした。k_D値は、表１０に列挙するように、ソフトウェア（v7.8.1.3）により自動的に算出した。データプロファイルは、図５に示した。ＰＢＳ中のタンパク質Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０のk_Dは－５．１７ｍＬ／ｇであり、このタンパク質が、高い溶解性を有する抗体であることを表す。アッセイプロセス中、タンパク質の外観も記録したところ、解凍及び穏やかな振盪後に少量の粒子が観察された。緩衝液を２０ｍＭのＨｉｓ、８％のスクロース、０．０２％のＰＳ８０、ｐＨ６．５に交換した場合、粒子は観察されなかった。

【０２０５】

上記のＳＤＳ－ＰＡＧＥ、ＳＥＣ－ＨＰＬＣ、ＨＩＣ－ＨＰＬＣ、ＤＳＦ、及びＤＬＳの結果は、表１０に要約した。

【表１４】

表 10. W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320 の解析データ要約

抗体名	SEC-HPLC による純度	収率 (mg/L)	分子量	pI	HIC 保持時間 (min)	T_m (°C)	DLS-k_D (mL/g)
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	99.26 %	416.0	147 kDa	8.54	23.52	70.1	-5.17

【０２０６】

３．６　ヒトＢ７Ｈ３の結合（ＦＡＣＳ）

ＦＡＣＳを使用して、ヒトＢ７Ｈ３に対する抗体の結合を検出した。この方法では、生細胞の表面上に発現する特定の分子を定量的に解析し、同定することができる。非標識細胞を対照として使用して、検出前に閾値を設定し、蛍光強度閾値を上回る各群のパーセンテージ変化を解析した。ヒト完全長Ｂ７Ｈ３を発現するＭＣＦ－７細胞（１×10^5細胞／ウェル）を、容量１００μＬ／ウェルの種々の濃度の抗体（１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡにより５０ｎＭ～０．０００５ｎＭの３．１６倍段階希釈）とともに４℃に設定した冷蔵庫で１時間インキュベートした。抗ヒトＢ７Ｈ３参照抗体エノブリツズマブ（MacroGenics社）を陽性対照として使用した。ヒトＩｇＧ１アイソタイプ抗体を陰性対照として使用した。１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡによる細胞の洗浄後、Alexa 647ヤギ抗ヒト抗体（１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡ中１：５００希釈）を加えた。細胞を４℃に設定した暗所の冷蔵庫で０．５時間インキュベートした。細胞の蛍光強度平均値（ＭＦＩ，mean fluorescence intensity）をフローサイトメーターにより測定し、FlowJoにより解析した。EC_{50}値を４パラメーター非線形回帰分析により、GraphPad Prism 7ソフトウェ

アを使用して算出した。

【０２０７】

Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０は、Ｂ７Ｈ３発現ＭＣＦ－７細胞に対する良好な結合を示し、EC_{50}は１．０８ｎＭ及び最大ＭＦＩは１９９００であった。これは、キメラ抗体に匹敵し、参照抗体エノブリツズマブ（MacroGenics社）よりも良好であった（表１１、図６）。

【表１５】

表 11. ヒト B7H3 発現細胞 MCF-7 に対する FACS 結合データ

試料	MCF-7	
	EC_{50} (nM)	最大 MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	1.16	19800
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	1.08	19900
エノブリツズマブ(MacroGenics 社)	2.49	4644
hIgG1 アイソタイプ	N.A.	47.8

注記: N.A.は取得不能を意味する。

【０２０８】

３．７　カニクイザルＢ７Ｈ３の結合（ＦＡＣＳ）

ＦＡＣＳを使用してカニクイザルＢ７Ｈ３に対する抗体の結合を検出した。ＦｌｐｉｎＣＨＯ細胞にカニクイザルＢ７Ｈ３をトランスフェクトし（Ｗ３ＸＸ０８８－ＦｌｐｉｎＣＨＯ．ｃＰｒｏｌ．ｐｏｏｌ）（１×１０^{5}細胞／ウェル）、容量１００μＬ／ウェルの種々の濃度の抗体（１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡにより５０ｎＭ～０．０００５ｎＭの３．１６倍段階希釈）とともに４℃に設定した冷蔵庫で１時間インキュベートした。抗ヒトＢ７Ｈ３参照抗体エノブリツズマブ（MacroGenics社）を陽性対照として使用した。ヒトＩｇＧ１アイソタイプ抗体を陰性対照として使用した。１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡによる細胞の洗浄後、Alexa 647ヤギ抗ヒト抗体（１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡ中１：５００希釈）を加えた。細胞を４℃に設定した暗所の冷蔵庫で０．５時間インキュベートした。細胞の蛍光強度平均値（ＭＦＩ）をフローサイトメーターにより測定し、FlowJoにより解析した。EC_{50}値を４パラメーター非線形回帰分析により、GraphPad Prism 7ソフトウェアを使用して算出した。

【０２０９】

Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０は、カニクイザルトランスフェクト細胞に対する良好な結合を示し、EC_{50}は４．６８ｎＭであった。これは、キメラ抗体に匹敵し、エノブリツズマブ（MacroGenics社）よりも良好であった（表１２、図７）。

【表１６】

表 12. カニクイザル B7H3 トランスフェクト安定細胞プールに対する FACS 結合データ

試料	カニクイザル B7H3 トランスフェクト安定細胞プール	
	EC_{50} (nM)	最大 MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	5.25	67100
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	4.68	63600
エノブリツズマブ(MacroGenics 社)	9.58	19700
hIgG1 アイソタイプ	N.A.	6.67

注記: N.A.は取得不能を意味する。

【０２１０】

３．８　ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３の結合（ＳＰＲ）

ＳＰＲを使用してヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に対する抗体の親和性を決定した。ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に対する抗体の親和性をBiacore 8Kにより検査した。４００ｍＭのＥＤＣ及び１００ｍＭのＮＨＳ（GE社）を混合することにより、注射直前に活性化剤を調製した。ＣＭ５センサーチップを、この活性化剤により４２０秒間活性化した。次いで、ヤギ抗ヒトＦｃ　ＩｇＧ（１０ｍＭのＮａＡｃ、ｐＨ４．５中３０μｇ／ｍＬ）をチャンネルに１０μＬ／ｍｉｎの流量で４２０秒間注射した。チップを１Ｍの塩酸エタノールアミンにより非活性化した。泳動用緩衝液（１×ＨＢＳ－ＥＰ＋）により希釈した抗体をチャンネルに１０μＬ／ｍｉｎの流量で３０秒間注射した。７濃度（１００ｎＭ、５０ｎＭ、２５ｎＭ、１２．５ｎＭ、６．２５ｎＭ、２．１２５ｎＭ、及び１．５６３ｎＭ）の解析物ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３をチャンネルに３０μＬ／ｍｉｎの流量で１８０秒の会合相の後３６００秒の解離相の間規則的に注射した。グリシン（１０ｍＭ、ｐＨ１．５）を再生緩衝液として、解離相の後に注射した。

【０２１１】

参照チャンネル及び緩衝チャンネルのセンサーグラムは、検査センサーグラムから減算した。実験データは、１：１結合モデルをフィッティングした。算出に使用したヒト４ＩｇＢ７Ｈ３の分子量は、４７．８ｋＤａであった。

【０２１２】

実験データは、Biacore 8K評価ソフトウェアに添付の１：１結合モデルによりフィッティングした。表１３及び図８Ａ～８Ｃに示すように、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０は、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に対する高い結合親和性を示した。K_D値は７．０８Ｅ－１１Ｍであり、エノブリツズマブ（MacroGenics社）よりも良好であった。

【表１７】

表 13.ヒト 4IgB7H3 に対する抗体結合の親和性結果

解析物	リガンド	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
ヒト 4IgB7H3	W301088-1.145.16 - xIgG1KV320	6.57E+05	3.39E-05	5.15E-11
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	6.57E+05	4.65E-05	7.08E-11
	エノブリツズマブ (MacroGenics 社)	1.24E+05	1.26E-04	1.02E-09

【０２１３】

３．９　ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３の結合（ＳＰＲ）

ＳＰＲを使用してヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に対する抗体の親和性を決定した。ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に対する抗体の親和性をBiacore 8Kにより検査した。４００ｍＭのＥＤＣ及び１００ｍＭのＮＨＳ（GE社）を混合することにより、注射直前に活性化剤を調製した。ＣＭ５センサーチップを、この活性化剤により４２０秒間活性化した。次いで、ヤギ抗ヒトＦｃ　ＩｇＧ（１０ｍＭのＮａＡｃ、ｐＨ４．５中３０μｇ／ｍＬ）をチャンネルに１０μＬ／ｍｉｎの流量で４２０秒間注射した。チップを１Ｍの塩酸エタノールアミンにより非活性化した。泳動用緩衝液（１×ＨＢＳ－ＥＰ＋）により希釈した抗体をチャンネルに１０μＬ／ｍｉｎの流量で３０秒間注射した。７濃度（５００ｎＭ、２５０ｎＭ、１２５ｎＭ、６２．５ｎＭ、３１．２５ｎＭ、１５．６２５ｎＭ、及び７．８１３ｎＭ）の解析物ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３をチャンネルに３０μＬ／ｍｉｎの流量で１２０秒の会合相の後３００秒の解離相の間規則的に注射した。グリシン（１０ｍＭ、ｐＨ１．５）を再生緩衝液として、解離相の後に注射した。

【０２１４】

参照チャンネル及び緩衝チャンネルのセンサーグラムは、検査センサーグラムから減算した。実験データは、１：１結合モデルをフィッティングした。算出に使用したヒト２Ｉ

ｇＢ７Ｈ３の分子量は、２５．２ｋＤａであった。

【０２１５】

実験データは、Biacore 8K評価ソフトウェアに添付の１：１結合モデルによりフィッティングした。表１４及び図９Ａ～９Ｃに示すように、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０は、ヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に対する結合と比較して、ヒト２ＩｇＢ７Ｈ３に対して弱い結合親和性を示した。K_D値は４．６４Ｅ－０８Ｍであった。

【表１８】

表 14.ヒト 2IgB7H3 に対する抗体結合の親和性結果

解析物	リガンド	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
ヒト 2IgB7H3	W301088-1.145.16 - xIgG1KV320	2.35E+05	1.36E-02	5.77E-08
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	3.03E+05	1.41E-02	4.64E-08
	エノブリツズマブ (MacroGenics 社)	6.44E+04	1.68E-02	2.61E-07

【０２１６】

３．１０　カニクイザルＢ７Ｈ３の結合（ＳＰＲ）

ＳＰＲを使用してカニクイザルＢ７Ｈ３に対する抗体の親和性を決定した。カニクイザルＢ７Ｈ３に対する抗体の親和性をBiacore 8Kにより検査した。４００ｍＭのＥＤＣ及び１００ｍＭのＮＨＳ（GE社）を混合することにより、注射直前に活性化剤を調製した。ＣＭ５センサーチップを、この活性化剤により４２０秒間活性化した。次いで、ヤギ抗ヒトＦｃ　ＩｇＧ（１０ｍＭのＮａＡｃ、ｐＨ４．５中３０μｇ／ｍＬ）をチャンネルに１０μＬ／ｍｉｎの流量で４２０秒間注射した。チップを１Ｍの塩酸エタノールアミンにより非活性化した。泳動用緩衝液（１×ＨＢＳ－ＥＰ＋）により希釈した抗体をチャンネルに１０μＬ／ｍｉｎの流量で３０秒間注射した。９濃度（５０ｎＭ、２５ｎＭ、１２．５ｎＭ、６．２５ｎＭ、３．１２５ｎＭ、１．５６３ｎＭ、０．７８１ｎＭ、０．３９１ｎＭ、及び０．１９６ｎＭ）の解析物カニクイザルＢ７Ｈ３をチャンネルに３０μＬ／ｍｉｎの流量で１８０秒の会合相の後３６００秒の解離相の間規則的に注射した。グリシン（１０ｍＭ、ｐＨ１．５）を再生緩衝液として、解離相の後に注射した。

【０２１７】

参照チャンネル及び緩衝チャンネルのセンサーグラムは、検査センサーグラムから減算した。６解析物濃度（５０ｎＭ、２５ｎＭ、１２．５ｎＭ、６．２５ｎＭ、３．１２５ｎＭ、及び１．５６３ｎＭ）の実験データは、１：１結合モデルをフィッティングした。算出に使用したカニクイザルＢ７Ｈ３の分子量は、４９ｋＤａであった。

【０２１８】

実験データは、Biacore 8K評価ソフトウェアに添付の１：１結合モデルによりフィッティングした。表１５及び図１０Ａ～１０Ｃに示すように、Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０は、カニクイザルＢ７Ｈ３に対して高い結合親和性を示し、これはヒト４ＩｇＢ７Ｈ３に対する結合に匹敵した。K_D値は５．７４Ｅ－１１Ｍであり、エノブリツズマブ（MacroGenics社）よりも良好であった。

【表１９】

表 15.カニクイザル B7H3 に対する抗体結合の親和性結果

解析物	リガンド	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)
カニクイザル B7H3	W301088-1.145.16-xIgG1KV320	5.21E+05	2.94E-05	5.64E-11
	W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	5.27E+05	3.02E-05	5.74E-11
	エノブリツズマブ (MacroGenics 社)	1.85E+05	8.14E-05	4.41E-10

【０２１９】

３．１１　内部移行検査（ＨＣＳ）

抗体の内部移行をハイコンテントイメージング及び解析システムであるoperetta CLS（PerkinElmer社）により決定した。これにより試料の画像を高速かつ高感度で収集及び解析することができる。ヒト完全長Ｂ７Ｈ３を発現するＭＣＦ－７細胞（１．５×１０^{4}細胞／ウェル）を、８μｇ／ｍＬのポリ－Ｄ－リジンで予めコーティングした９６ウェル透明底黒色プレート内に播種した。３７℃、５％CO_2に設定したインキュベーターでの一晩のインキュベート後、容量１００μＬ／ウェルの種々の濃度の抗体（１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡにより５０ｎＭ～０．０００５ｎＭの３．１６倍段階希釈）とともに４℃に設定した冷蔵庫で２時間インキュベートした。抗ヒトＢ７Ｈ３参照抗体エノブリツズマブ（MacroGenics社）を陽性対照として使用した。ヒトＩｇＧ１アイソタイプ抗体を陰性対照として使用した。１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡによる細胞の洗浄後、Alexa 647ヤギ抗ヒト抗体（１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡ中１：５００希釈）を加えた。細胞を４℃に設定した暗所の冷蔵庫で１時間インキュベートした。次いで、細胞を１回洗浄し、１×ＤＰＢＳ／１％ＢＳＡに３７℃で２時間再懸濁した。インキュベーション後、上清を廃棄し、１００μＬ／ウェルのヘキスト33342（１×ＤＰＢＳ中１：５０００希釈）を加え、環境温度で１５分間インキュベートした。１×ＤＰＢＳによる細胞の洗浄後、１００μＬ／ウェルの酸洗浄緩衝液（１００ｍＭのグリシン、１５０ｍＭのＮａＣｌ、ｐＨ２．５）を加え、４℃に設定した冷蔵庫で５分間インキュベートした。細胞を１×ＤＰＢＳで１回洗浄し、４％のＰＦＡ　６０μＬで固定した。細胞の蛍光強度平均値（ＭＦＩ）を測定し、operetta CLSにより解析した。EC_{50}値を４パラメーター非線形回帰分析により、GraphPad Prism 7ソフトウェアを使用して算出した。

【０２２０】

Ｗ３０１０８８－１．１４５．１６－ｚ３－ｐ１－ｕＩｇＧ１ＫＶ３２０は、Ｂ７Ｈ３発現ＭＣＦ－７細胞に対する良好な内部移行能を示し、EC_{50}は０．５１ｎＭであった。これは、キメラ抗体に匹敵し、参照抗体エノブリツズマブ（MacroGenics社）よりも良好であった（表１６、図１１）。

【表２０】

表 16.ヒト B7H3 発現細胞 MCF-7 に対する内部移行

試料	MCF-7 に対する内部移行	
	EC_{50} (nM)	最大 MFI
W301088-1.145.16-xIgG1KV320	0.51	57180
W301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320	0.44	52315
エノブリツズマブ(MacroGenics 社)	1.95	39777
hIgG1 アイソタイプ	N.A.	21

注記: N.A.は取得不能を意味する。

【０２２１】

当業者は、本開示が、その趣旨又は中心的特質から逸脱することなく、他の特定の形態により実施され得ることを更に理解するであろう。前述の本開示の説明により、単にその

例となる実施形態が開示されるという点において、他の変形形態が、本開示の範囲内に存するものとして検討されることが理解されるべきである。したがって、本開示は、本明細書に詳細に記載されている特定の実施形態に制限されない。むしろ、本開示の範囲及び内容を示すものとして添付の特許請求の範囲を参照すべきである。

【受託番号】

【０２２２】

ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６５１
ＡＴＣＣ　ＣＣＬ１０
ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７０
ＡＴＣＣ　ＣＲＬ－１５８７
ＡＴＣＣ　ＣＣＬ２
ＡＴＣＣ　ＣＣＬ３４
ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１４４２
ＡＴＣＣ　ＣＣＬ７５
ＨＢ８０６５
ＡＴＣＣ　ＣＣＬ５１
ＲＣＢ０２１３
ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１５８１
ＡＴＣＣ　ＣＲＬ１６６２
ＡＴＣＣ　１２，４２４
ＡＴＣＣ　１６，０４５
ＡＴＣＣ　２４，１７８
ＡＴＣＣ　５６，５００
ＡＴＣＣ　３６，９０６

【図面】

【図１】

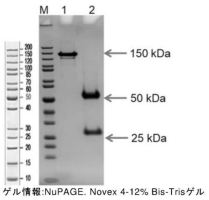


Figure 1

【図２】

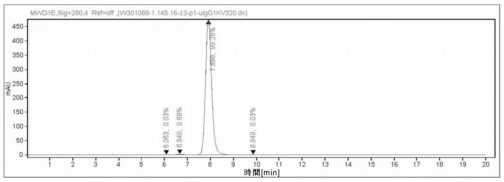


Figure 2

【図３】

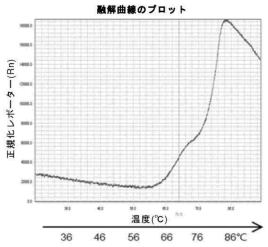


Figure 3

【図４】

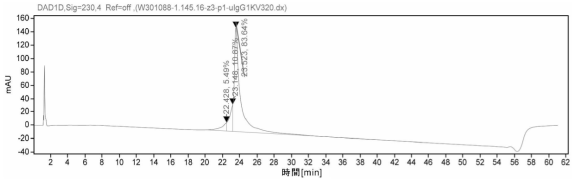


Figure 4

【図５】

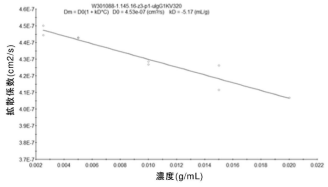


Figure 5

【図６】

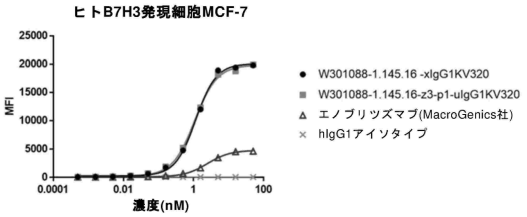


Figure 6

【図７】

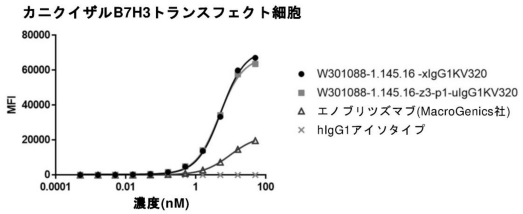


Figure 7

【図８Ａ－８Ｃ】

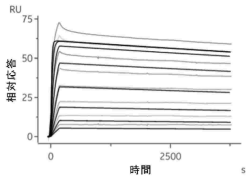


Figure 8A

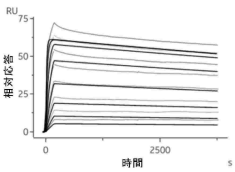


Figure 8B

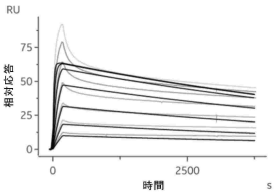


Figure 8C

【図９Ａ－９Ｃ】

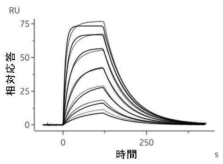


Figure 9A

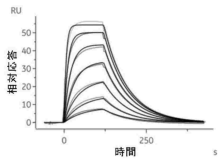


Figure 9B

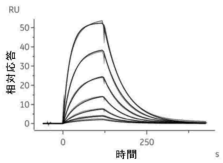


Figure 9C

【図１０Ａ－１０Ｃ】

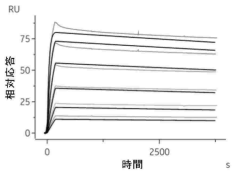


Figure 10A

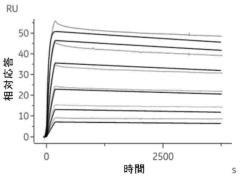


Figure 10B

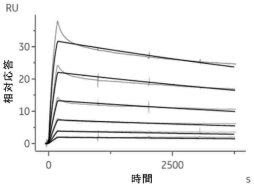


Figure 10C

【図１１】

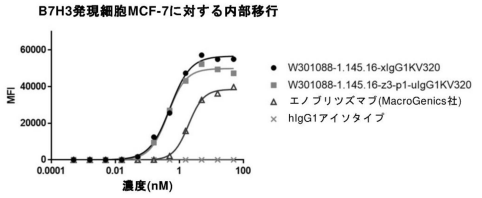


Figure 11

【図１２Ａ－１２Ｂ】

W301088-1.145.16-xIgG1KV320(「1」)及びW301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(「2」)のVH領域

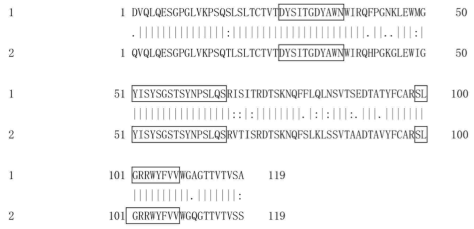


Figure 12A

W301088-1.145.16-xIgG1KV320(「1」)及びW301088-1.145.16-z3-p1-uIgG1KV320(「2」)のVL領域



Figure 12B

【配列表】

<u>20255177370000001.xml</u>

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/094711

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K16/28(2006.01)i; C12N15/13(2006.01)i; A61K39/395(2006.01)i; A61K47/68(2017.01)i; A61P35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:C07K,C12N,A61K,A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CJFD,CNTXT,DWPI,ENTXT,ENTXTC,OETXT,VEN,WPABS,WPABSC,CNKI,WANFANG,Genbank,STN on the web, Pubmed, ISI web of Science: antibody,antigen,B7H3,CD276,B7RP-2,SEQ ID NOs:1-7

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 114096563 A (Y-BIOLOGICS INC.) 25 February 2022 (2022-02-25) claims 1-16, description,examples 1-2	1-26
A	CN 109937212 A (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO.,LTD.et al.) 25 June 2019 (2019-06-25) claims 1-20	1-26
A	US 2012294796 A1 (MACROGENICS,INC.) 22 November 2012 (2012-11-22) claims 1-23	1-26
A	CN 111662384 A (GUANGZHOU BIO-GENE TECHNOLOGY CO., LTD) 15 September 2020 (2020-09-15) claims 1-10	1-26
A	CN 106715469 A (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 24 May 2017 (2017-05-24) claims 1-88,description, paragraphs 356-357	1-26
A	CN 113336851 A (XUZHOU MEDICAL UNIVERSITY) 03 September 2021 (2021-09-03) claims1,4-10	1-26

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"D" document cited by the applicant in the international application
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
01 August 2023	**11 September 2023**
Name and mailing address of the ISA/CN **CHINA NATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY ADMINISTRATION** **6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China**	Authorized officer **MAO,Ying** Telephone No. **(+86) 010-53961979**

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/094711

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 113402610 A (DONGDA BIOTECHNOLOGY (SUZHOU) CO., LTD.) 17 September 2021 (2021-09-17) claims1-8	1-26
A	KONTOS,F. et al. "B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy" *CLINICAL CANCER RESEARCH*, Vol. 27, No. 5, 01 March 2021 (2021-03-01), pages1227-1235	1-26

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/094711

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

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed.
   b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13*ter*.1(a)),
      ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.

2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/094711

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

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

1. ☑ Claims Nos.: **19-23**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Claims 19-23 relate to a method for modulating a B7H3-related immune response in a subject, or a method for preventing or treating a B7H3-related disorder in a subject, and therefore do not warrant an international search according to the criteria set out in PCT Rule 39.1(iv). An international search is still carried out on the basis of the B7H3 antibody or antigen-binding portion thereof in the manufacture of a medicament for treating a subject.

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/094711

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	114096563	A	25 February 2022	US	2022348663	A1	03 November 2022
				JP	2022530435	A	29 June 2022
				JP	7247368	B2	28 March 2023
				EP	3998283	A1	18 May 2022
				EP	3998283	A4	11 January 2023
				KR	20210006637	A	19 January 2021
				WO	2021006619	A1	14 January 2021
CN	109937212	A	25 June 2019	US	2020031934	A1	30 January 2020
				US	10899837	B2	26 January 2021
				BR	112019019111	A2	05 May 2020
				US	2021101984	A1	08 April 2021
				US	11680100	B2	20 June 2023
				WO	2018177393	A1	04 October 2018
				KR	20190134614	A	04 December 2019
				RU	2019132843	A	30 April 2021
				RU	2019132843	A3	16 August 2021
				RU	2765306	C2	28 January 2022
				TW	201837056	A	16 October 2018
				TWI	796328	B	21 March 2023
				EP	3604337	A1	05 February 2020
				EP	3604337	A4	10 March 2021
				CA	3056474	A1	04 October 2018
				AU	2018243123	A1	26 September 2019
				MX	2019011117	A	05 November 2019
				JP	2020515251	A	28 May 2020
				JP	7158403	B2	21 October 2022
				UA	125593	C2	27 April 2022
US	2012294796	A1	22 November 2012	US	2018134790	A1	17 May 2018
				US	10730945	B2	04 August 2020
				US	2014328750	A1	06 November 2014
				US	9441049	B2	13 September 2016
				US	2016264672	A1	15 September 2016
				US	9896508	B2	20 February 2018
				US	8802091	B2	12 August 2014
CN	111662384	A	15 September 2020	CN	111662384	B	09 April 2021
CN	106715469	A	24 May 2017	ES	2838750	T3	02 July 2021
				BR	112017003582	A2	27 February 2018
				EA	201790465	A1	31 July 2017
				EA	038798	B1	21 October 2021
				WO	2016033225	A2	03 March 2016
				WO	2016033225	A3	21 April 2016
				US	2017240637	A1	24 August 2017
				US	10316093	B2	11 June 2019
				CA	2959356	A1	03 March 2016
				JP	2017532952	A	09 November 2017
				JP	6925264	B2	25 August 2021
				ZA	201701168	B	26 May 2021
				AU	2015306621	A1	16 March 2017
				AU	2015306621	B2	06 May 2021

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2023/094711

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				KR	20170042786	A	19 April 2017
				KR	102485788	B1	09 January 2023
				EP	3186277	A2	05 July 2017
				EP	3186277	A4	17 January 2018
				EP	3186277	B1	07 October 2020
CN	113336851	A	03 September 2021	CN	113336851	B	24 December 2021
CN	113402610	A	17 September 2021	CN	113402610	B	24 February 2023

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 2022)

フロントページの続き

(51)国際特許分類		FI		テーマコード（参考）
C12N 1/21 (2006.01)		C12N	1/21	
C12N 5/10 (2006.01)		C12N	5/10	
C12P 21/08 (2006.01)		C12P	21/08	
A61K 39/395 (2006.01)		A61K	39/395	N
A61P 43/00 (2006.01)		A61P	43/00	111
A61P 35/00 (2006.01)		A61P	35/00	
A61P 37/06 (2006.01)		A61P	37/06	
A61P 31/00 (2006.01)		A61P	31/00	
A61P 15/00 (2006.01)		A61P	15/00	
A61P 25/00 (2006.01)		A61P	25/00	
A61P 17/00 (2006.01)		A61P	17/00	
A61P 11/00 (2006.01)		A61P	11/00	
A61P 11/02 (2006.01)		A61P	11/02	
A61P 11/04 (2006.01)		A61P	11/04	
A61P 1/02 (2006.01)		A61P	1/02	
A61P 1/04 (2006.01)		A61P	1/04	
A61P 1/18 (2006.01)		A61P	1/18	
A61P 13/12 (2006.01)		A61P	13/12	
A61P 13/10 (2006.01)		A61P	13/10	
A61P 13/08 (2006.01)		A61P	13/08	
A61P 5/14 (2006.01)		A61P	43/00	105
A61P 13/02 (2006.01)		A61P	5/14	
A61P 35/02 (2006.01)		A61P	13/02	
A61K 45/00 (2006.01)		A61P	35/02	
A61K 51/00 (2006.01)		A61K	45/00	
		A61K	51/00	100

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

（特許庁注：以下のものは登録商標）

1．TWEEN

弁理士　山内 正子
(74)代理人　100141391
弁理士　園元 修一
(74)代理人　100221958
弁理士　篠田 真希恵
(74)代理人　100192441
弁理士　渡辺 仁
(72)発明者　ロン ナイヤン
中華人民共和国 201401 シャンハイ フォンシャン ディストリクト フイフォン ウエスト ロード ナンバー 1951
(72)発明者　ワン ジュオジ
中華人民共和国 201401 シャンハイ フォンシャン ディストリクト フイフォン ウエスト ロード ナンバー 1951
(72)発明者　リ ジエ
中華人民共和国 201401 シャンハイ フォンシャン ディストリクト フイフォン ウエスト ロード ナンバー 1951
(72)発明者　グ ジジエ

中華人民共和国 ２０１４０１ シャンハイ フォンシャン ディストリクト フイフォン ウエスト ロード ナンバー １９５１

Ｆターム（参考） 4B064 AG27 CA19 CC24 CE12 DA01
4B065 AA01X AA57X AA72X AA88X AA90X AA90Y AB01 AC14 BA02 CA25
4C084 AA12 AA19 NA05 ZB072 ZB212 ZB262 ZC712
4C085 AA14 AA16 BB36 BB41 BB43 CC23 DD62 EE01
4H045 AA10 AA11 AA20 AA30 CA40 DA76 EA20 FA74 GA26