

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2023-543493

(P2023-543493A)

(43)公表日 令和5年10月16日(2023.10.16)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード(参考)	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A	4 B 0 6 5
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	C 0 7 K	16/46		4 C 0 8 4
C 1 2 N	15/62 (2006.01)	C 1 2 N	15/62	Z	4 C 0 8 5
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 H 0 4 5
C 0 7 K	19/00 (2006.01)	C 0 7 K	19/00		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全43頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2023-519819(P2023-519819)	(71)出願人	519241381
(86)(22)出願日	令和3年9月29日(2021.9.29)		ナンジン、ジェンスクリプト、バイオテック、カンパニー、リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和5年3月30日(2023.3.30)		NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.
(86)国際出願番号	PCT/CN2021/121585		中華人民共和国 211100 チャンスー、ナンジン、ジャンニンサイエンスパーク、ヨンシーロード28
(87)国際公開番号	WO2022/068854		28 Yongxi Road, Jiangning Science Park, Nanjing, Jiangsu 211100 China
(87)国際公開日	令和4年4月7日(2022.4.7)	(74)代理人	100123788
(31)優先権主張番号	PCT/CN2020/119648		弁理士 宮崎 昭夫
(32)優先日	令和2年9月30日(2020.9.30)	(74)代理人	100127454
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		
(31)優先権主張番号	PCT/CN2021/072534		
(32)優先日	令和3年1月18日(2021.1.18)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)		
(81)指定国・地域	AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA)		
	最終頁に続く		最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ヒトクローニン18.2を標的とする抗体及びその使用

(57)【要約】

クローニン18.2を標的とする、単離された抗体又はその抗原結合性部分。抗体は、単ドメイン抗体であり得るか、又はその単量体可変ドメインは、ヒトIgG1 Fcなどの重鎖定常領域に融合され得る。抗体を含む医薬組成物及び疾患の処置での医薬組成物の使用方法も提供される。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域であって、

(1) それぞれ配列番号 5 2、5 3 及び 5 4、

(2) それぞれ配列番号 5 5、5 6 及び 5 7、

(3) それぞれ配列番号 5 8、5 9 及び 6 0、

(4) それぞれ配列番号 6 1、6 2 及び 6 3、

(5) それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、

(6) それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、

(7) それぞれ配列番号 8 2、8 3 及び 8 4、

10

(8) それぞれ配列番号 8 5、8 6 及び 8 7、

(9) それぞれ配列番号 8 8、8 9 及び 9 0、

(1 0) それぞれ配列番号 9 1、9 2 及び 9 3、

(1 1) それぞれ配列番号 9 4、9 5 及び 9 6、

(1 2) それぞれ配列番号 1 0 3、1 0 4 及び 1 0 5、

(1 3) それぞれ配列番号 1 0 6、1 0 7 及び 1 0 8、

(1 4) それぞれ配列番号 1 1 2、1 1 3 及び 1 1 4、

(1 5) それぞれ配列番号 1 1 5、1 1 6 及び 1 1 7、

(1 6) それぞれ配列番号 1 2 1、1 2 2 及び 1 2 3、

(1 7) それぞれ配列番号 1 2 4、1 2 5 及び 1 2 6、

20

(1 8) それぞれ配列番号 1 2 7、1 2 8 及び 1 2 9、

(1 9) それぞれ配列番号 1 3 3、1 3 4 及び 1 3 5、

(2 0) それぞれ配列番号 1 3 6、1 3 7 及び 1 3 8、

(2 1) それぞれ配列番号 1 3 9、1 4 0 及び 1 4 1、

(2 2) それぞれ配列番号 1 4 2、1 4 3 及び 1 4 4、

(2 3) それぞれ配列番号 1 4 5、1 4 6 及び 1 4 7、

(2 4) それぞれ配列番号 1 4 8、1 4 9 及び 1 5 0、

(2 5) それぞれ配列番号 1 5 1、1 5 2 及び 1 5 3、

(2 6) それぞれ配列番号 1 5 4、1 5 5 及び 1 5 6、

(2 7) それぞれ配列番号 1 5 7、1 5 8 及び 1 5 9、

30

(2 8) それぞれ配列番号 1 6 0、1 6 1 及び 1 6 2、

(2 9) それぞれ配列番号 1 6 3、1 6 4 及び 1 6 5、

(3 0) それぞれ配列番号 1 6 9、1 7 0 及び 1 7 1、

(3 1) それぞれ配列番号 1 7 2、1 7 3 及び 1 7 4、

(3 2) それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7、

(3 3) それぞれ配列番号 1 7 8、1 7 9 及び 1 8 0、

(3 4) それぞれ配列番号 1 8 1、1 8 2 及び 1 8 3、

(3 5) それぞれ配列番号 1 8 4、1 8 5 及び 1 8 6、

(3 6) それぞれ配列番号 1 9 0、1 9 1 及び 1 9 2、

(3 7) それぞれ配列番号 1 9 3、1 9 4 及び 1 9 5、

40

(3 8) それぞれ配列番号 1 9 6、1 9 7 及び 1 9 8、

(3 9) それぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1、又は

前記 C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のいずれか 1 つ以上に最大で約 3 アミノ酸置換を含むそのバリエーション

のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む単量体可変ドメインを含む、単離された抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 2】

前記 C D R 1 領域、前記 C D R 2 領域及び前記 C D R 3 領域は、

それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、

それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、

50

それぞれ配列番号 124、125 及び 126、
 それぞれ配列番号 136、137 及び 138、
 それぞれ配列番号 145、146 及び 147、
 それぞれ配列番号 175、176 及び 177、
 それぞれ配列番号 199、200 及び 201、又は

前記 CDR1、CDR2 及び CDR3 のいずれかが 1 つ以上に最大で約 3 アミノ酸置換を含む、上記のいずれかのパリアント

のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 3】

前記 CDR1 領域、前記 CDR2 領域及び前記 CDR3 領域は、

10

それぞれ配列番号 64、65 及び 66、
 それぞれ配列番号 76、77 及び 78、
 それぞれ配列番号 124、125 及び 126、
 それぞれ配列番号 136、137 及び 138、
 それぞれ配列番号 145、146 及び 147、
 それぞれ配列番号 175、176 及び 177、又は
 それぞれ配列番号 199、200 及び 201

のアミノ酸配列を含む、請求項 1 又は 2 に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 4】

クローニン 18.2、好ましくはヒトクローニン 18.2 に特異的に結合する、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

20

【請求項 5】

単ドメイン抗体 (sdAb) 又は V_HH ドメインである、請求項 1～4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 6】

ラクダ科、キメラ、ヒト又はヒト化のものである、請求項 1～5 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 7】

前記単量体可変ドメインは、配列番号 1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50 及び 202～213 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

30

【請求項 8】

前記単量体可変ドメインは、配列番号 1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50 及び 202～213 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 7 に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

40

【請求項 9】

前記単量体可変ドメインは、配列番号 5、9、25、29、32、42、50 及び 202～213 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1～8 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 10】

前記単量体可変ドメインは、配列番号 5、9、25、29、32、42、50 及び 202～213 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 9 に記載の抗体又はそ

50

の抗原結合性部分。

【請求項 1 1】

配列番号 1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50 及び 202 ~ 213 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単量体可変ドメインを含む抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 1 2】

前記単量体可変ドメインは、配列番号 5、9、25、29、32、42、50 及び 202 ~ 213 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 1 に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

10

【請求項 1 3】

前記単量体可変ドメインに融合された I g G F c 領域をさらに含む、請求項 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 1 4】

前記 I g G F c 領域は、配列番号 5 1 のアミノ酸配列を含むヒト I g G 1 F c 領域である、請求項 1 3 に記載の抗体又はその抗原結合性部分。

【請求項 1 5】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体又はその抗原結合性部分を含む、二重特異的分子、イムノコンジュゲート又はキメラ抗原受容体。

20

【請求項 1 6】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合性部分又は請求項 1 5 に記載の二重特異的分子、イムノコンジュゲート若しくはキメラ抗原受容体をコードする核酸分子。

【請求項 1 7】

請求項 1 6 に記載の核酸分子を含有する発現ベクター。

【請求項 1 8】

請求項 1 7 に記載の発現ベクターを含有する宿主細胞。

【請求項 1 9】

請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体若しくはその抗原結合性部分又は請求項 1 5 に記載の二重特異的分子、イムノコンジュゲート若しくはキメラ抗原受容体と、薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物。

30

【請求項 2 0】

細胞傷害剤をさらに含む、請求項 1 9 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 1】

対象における癌疾患を処置する方法であって、治療有効量の、請求項 1 9 又は 2 0 に記載の医薬組成物を前記対象に投与することを含む方法。

【請求項 2 2】

前記癌疾患は、胃癌、膵癌、結腸癌、食道癌、肝癌、卵巣癌、肺癌及び膀胱癌からなる群から選択される、請求項 2 1 に記載の方法。

40

【発明の詳細な説明】

【背景技術】

【0001】

抗体療法は、広範な癌を処置するために各種の法域で承認されており、患者アウトカムを有意に改善してきた (K o m e e v e t a l . , (2 0 1 7) C y t o k i n e 8 9 : 1 2 7 - 1 3 5) 。 癌抗原に結合すると、抗体は、抗体依存細胞媒介細胞傷害性の誘発、補体系の活性化又は受容体とそのリガンドとの相互作用の防止を行い得ると共に、それらは、すべて癌細胞死を誘導し得る。米国 F D A 承認抗体薬剤としては、アレムツズマブ、ニボルマブ、リツキシマブ及びデュルバルマブが挙げられる。

【0002】

50

クローディン (CLDN) は、傍細胞バリアを形成する表面タンパク質ファミリーであり、細胞間の分子のフローを制御する。これまで、哺乳動物で 24 種のクローディンメンバーが報告されている。異なる組織で異なるクローディンメンバーが発現され、それらの発現レベル及び機能は、癌に関連付けられてきた。

【0003】

クローディン 18 は、2つのアイソフォームを有する。クローディン 18 . 1 タンパク質 (又は単にクローディン 18 . 1 又はクローディン 18 . 1) は、正常な肺上皮及び胃上皮で選択的に発現される。クローディン 18 . 2 タンパク質 (又は単にクローディン 18 . 2 又はクローディン 18 . 2) は、正常な組織できわめて制限された発現パターンを有する。クローディン 18 . 2 の高レベル発現は、胃腺癌及び膵腺癌の有意な割合で観察されているため、クローディン 18 . 2 は、胃腺癌及び膵腺癌の処置のための療法戦略の有望な標的になっている。

10

【0004】

抗クローディン 18 . 2 抗体は、特定の癌の処置で試験されてきた。例えば、Gany med Pharmaceuticals AG により開発されたキメラ抗クローディン 18 . 2 IgG1 抗体のクラウディキシマブ (IMAB362) は、進行胃食道癌及び膵癌を処置するための臨床トライアルで治験が行われてきた。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0005】

望ましい治療効能を有するさらなる抗クローディン 18 . 2 抗体の必要性が存在する。

20

【課題を解決するための手段】

【0006】

一態様では、本開示は、CDR 1 領域、CDR 2 領域及び CDR 3 領域であって、

- (1) それぞれ配列番号 52、53 及び 54、
- (2) それぞれ配列番号 55、56 及び 57、
- (3) それぞれ配列番号 58、59 及び 60、
- (4) それぞれ配列番号 61、62 及び 63、
- (5) それぞれ配列番号 64、65 及び 66、
- (6) それぞれ配列番号 76、77 及び 78、
- (7) それぞれ配列番号 82、83 及び 84、
- (8) それぞれ配列番号 85、86 及び 87、
- (9) それぞれ配列番号 88、89 及び 90、
- (10) それぞれ配列番号 91、92 及び 93、
- (11) それぞれ配列番号 94、95 及び 96、
- (12) それぞれ配列番号 103、104 及び 105、
- (13) それぞれ配列番号 106、107 及び 108、
- (14) それぞれ配列番号 112、113 及び 114、
- (15) それぞれ配列番号 115、116 及び 117、
- (16) それぞれ配列番号 121、122 及び 123、
- (17) それぞれ配列番号 124、125 及び 126、
- (18) それぞれ配列番号 127、128 及び 129、
- (19) それぞれ配列番号 133、134 及び 135、
- (20) それぞれ配列番号 136、137 及び 138、
- (21) それぞれ配列番号 139、140 及び 141、
- (22) それぞれ配列番号 142、143 及び 144、
- (23) それぞれ配列番号 145、146 及び 147、
- (24) それぞれ配列番号 148、149 及び 150、
- (25) それぞれ配列番号 151、152 及び 153、
- (26) それぞれ配列番号 154、155 及び 156、

30

40

50

(2 7) それぞれ配列番号 1 5 7、1 5 8 及び 1 5 9、
 (2 8) それぞれ配列番号 1 6 0、1 6 1 及び 1 6 2、
 (2 9) それぞれ配列番号 1 6 3、1 6 4 及び 1 6 5、
 (3 0) それぞれ配列番号 1 6 9、1 7 0 及び 1 7 1、
 (3 1) それぞれ配列番号 1 7 2、1 7 3 及び 1 7 4、
 (3 2) それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7、
 (3 3) それぞれ配列番号 1 7 8、1 7 9 及び 1 8 0、
 (3 4) それぞれ配列番号 1 8 1、1 8 2 及び 1 8 3、
 (3 5) それぞれ配列番号 1 8 4、1 8 5 及び 1 8 6、
 (3 6) それぞれ配列番号 1 9 0、1 9 1 及び 1 9 2、
 (3 7) それぞれ配列番号 1 9 3、1 9 4 及び 1 9 5、
 (3 8) それぞれ配列番号 1 9 6、1 9 7 及び 1 9 8、若しくは
 (3 9) それぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1、又は

10

C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のいずれか 1 つ以上に最大で約 3 アミノ酸置換（例えば、1、2 又は 3 アミノ酸置換）を含む、上記のいずれかのバリエーションのアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む単量体可変ドメインを含む、単離された抗体又はその抗原結合性部分を提供する。

【 0 0 0 7 】

抗体又はその抗原結合性部分のいくつかの実施形態では、
 それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、
 それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、
 それぞれ配列番号 1 2 4、1 2 5 及び 1 2 6、
 それぞれ配列番号 1 3 6、1 3 7 及び 1 3 8、
 それぞれ配列番号 1 4 5、1 4 6 及び 1 4 7、
 それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7、若しくは
 それぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1、又は

20

C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のいずれか 1 つ以上に最大で約 3 アミノ酸置換（例えば、1、2 又は 3 アミノ酸置換）を含む、上記のいずれかのバリエーションのアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び及び C D R 3 領域である。

【 0 0 0 8 】

いくつかの実施形態では、それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、それぞれ配列番号 1 2 4、1 2 5 及び 1 2 6、それぞれ配列番号 1 3 6、1 3 7 及び 1 3 8、それぞれ配列番号 1 4 5、1 4 6 及び 1 4 7、それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7 又はそれぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1 の 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域である。

30

【 0 0 0 9 】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、配列番号 1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49 及び 50 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する単量体可変ドメイン内に C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 1 0 】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、クローニン 1 8 . 2、好ましくはヒトクローニン 1 8 . 2 に特異的に結合する。

【 0 0 1 1 】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、単一ドメイン抗体（s d A b）又は V_HH ドメインである。

【 0 0 1 2 】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、ラクダ科、キメラ、ヒト又はヒト化のものである。

50

【 0 0 1 3 】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号 1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50 及び 202 ~ 213 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 4 】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号 1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50 及び 202 ~ 213 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

10

【 0 0 1 5 】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号 5、9、25、29、32、42、50 及び 202 ~ 213 からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98% 又は 99% の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 6 】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号 5、9、25、29、32、42、50 及び 202 ~ 213 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

20

【 0 0 1 7 】

他の一態様では、本開示は、配列番号 1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50 及び 202 ~ 213 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単量体可変ドメインを含む抗体又はその抗原結合性部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号 5、9、25、29、32、42、50 及び 202 ~ 213 からなる群から選択される。

【 0 0 1 8 】

さらなる態様では、本開示は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合性部分のいずれかの抗体又はその抗原結合性部分を含む、二重特異的分子、イムノコンジュゲート又はキメラ抗原受容体を提供する。

30

【 0 0 1 9 】

なおもさらなる態様では、本開示は、本明細書に記載の抗体（若しくはその抗原結合性部分）のいずれかの抗体若しくはその抗原結合性部分又は二重特異的分子、イムノコンジュゲート若しくはキメラ抗原受容体をコードする核酸分子を提供する。この核酸分子を含有する発現ベクター及びこの発現ベクターを含有する宿主細胞も提供される。

【 0 0 2 0 】

なおもさらなる態様では、本開示は、(1) 本明細書に記載の抗体若しくはその抗原結合性部分又は本明細書に記載の二重特異的分子、イムノコンジュゲート若しくはキメラ抗原受容体と、(2) 薬学的に許容可能な担体とを含む医薬組成物を提供する。医薬組成物は、細胞傷害剤をさらに含み得る。

40

【 0 0 2 1 】

なおもさらなる態様では、本開示は、対象における癌疾患を処置する方法であって、治療有効量の、本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。癌疾患は、胃癌、膵癌、結腸癌、食道癌、肝癌、卵巣癌、肺癌及び膀胱癌からなる群から選択され得る。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 2 】

50

【図 1】コントロール抗体及び陰性コントロールと比較して、ヒトクローディング 18.2 又はクローディング 18.1 過剰発現性 HEK 293 細胞での本開示の抗体の特定の実施形態の FACS 結合曲線を示す。A ~ D は、本開示の抗体例からの結果を示す。E 及び F : I M A B 3 6 2 抗体は、陽性コントロールとして使用され、及び P B S は、陰性コントロールとして使用される。

【図 2】ヒトクローディング 18.1 過剰発現性 HEK 293 細胞に対する本開示の抗体の特定の実施形態の FACS 結合アッセイでの用量 - 反応曲線を示す。

【図 3】ヒトクローディング 18.2 過剰発現性 HEK 293 細胞に対する本開示の抗体の特定の実施形態の FACS 結合アッセイデータでの用量 - 反応曲線を示す。

【図 4】マウスクローディング 18.2 過剰発現性 HEK 293 細胞に対する本開示の抗体の特定の実施形態の FACS 結合アッセイデータでの用量 - 反応曲線を示す。 10

【図 5】本開示の抗体の特定の実施形態の CDC アッセイ結果を示す。

【図 6】本開示の抗体の特定の実施形態の ADCC アッセイ結果を示す。

【図 7】ヒトクローディング 18.2 過剰発現性 HEK 293 細胞に対する本開示の抗体の特定の実施形態の FACS 結合アッセイデータでの用量 - 反応曲線を示す。

【図 8】ヒトクローディング 18.1 過剰発現性 HEK 293 細胞に対する本開示の抗体の特定の実施形態の FACS 結合アッセイでの用量 - 反応曲線を示す。

【図 9】本開示の抗体の特定の実施形態の ADCC アッセイ結果を示す。

【図 10】本開示の抗体の特定の実施形態の CDC アッセイ結果を示す。

【図 11】本開示の抗体の特定の実施形態の ADCC アッセイ結果を示す。 20

【図 12】ヒトクローディング 18.2 過剰発現性 CHO - K 1 細胞に対する本開示の抗体の特定の実施形態の FACS 結合アッセイデータでの用量 - 反応曲線を示す。

【発明を実施するための形態】

【0023】

本明細書で用いられる抗体の「抗原結合性部分」という用語は、抗原（例えば、クローディング 18.2 タンパク質）への結合能を保持する 1 種以上の抗体フラグメントを意味する。これは、単一可変ドメインを含有する重鎖可変領域及びかかるドメインとそれに化学的に連結された別のポリペプチドセグメントとを含むより大きい分子を含み得る。かかる一本鎖抗体は、「抗原結合性部分」という用語にも包含されることが意図される。

【0024】

本明細書で用いられる「単離された抗体」とは、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意味する。クローディング 18.2 タンパク質に特異的に結合する単離された抗体は、クローディング 18.2 タンパク質に結合しない抗体を実質的に含まない。ヒトクローディング 18.2 に特異的に結合する単離された抗体は、ヒトクローディング 18.1 タンパク質又は他の種由来のクローディング 18.2 タンパク質などの他の抗原にも特異的に結合し得る。単離された抗体は、他の細胞物質及び / 又は化学物質を実質的に含まなくてもよい。 30

【0025】

本明細書で用いられる「モノクローナル抗体」という用語は、単一分子組成の抗体分子の調製物を意味する。 40

【0026】

「単一ドメイン抗体」又は「sdAb」という用語は、対応する CDR 含有ポリペプチドとの対合を伴うことなく抗原に結合する能力のある、3 つの相補性決定領域 (CDR) を有する単一単量体可変抗体ドメインを含む単一抗原結合性ポリペプチドを意味する。いくつかの場合、単一ドメイン抗体は、ラクダ科重鎖抗体 (HCAb) から工学操作され、HCAb の V_HH ドメイン又はフラグメントとも呼ばれる。単一ドメイン抗体は、重鎖のみ抗体の抗原結合性部分の 1 種である。V_HH は、ナノボディとしても知られ得る。ラクダ科 sdAb は、最小級の既知の抗原結合性抗体フラグメントの 1 つである (例えば、Hamers - Casterman et al., Nature 363 : 446 - 8 (1993)、Greenberg et al., Nature 374 : 168 - 7 50

3 (1995)、Hassanzadeh - Ghassabeh et al., Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013)を参照されたい)。例として、配列番号1~50のアミノ酸配列を有する本開示の実施例中の特定の単ドメイン抗体は、sdAb-1 (又はsdab-1)、sdAb-2 (又はsdab-2)、sdAb-3 (又はsdab-3)、...、sdAb-50 (又はsdab-50)に対して参照される。

【0027】

本明細書で用いられる場合、「ヒトクローニン18.2に特異的に結合する」抗体又は分子とは、ヒトクローニン18.2タンパク質に結合するが、非クローニン18.2タンパク質に実質的に結合しない抗体又はポリペプチド分子を意味する。

10

【0028】

本明細書で用いられる場合、「融合されたタンパク質」、「融合タンパク質」、「融合抗体」又は「融合された抗体」という用語は、単ドメイン抗体 (例えば、V_HH)部分とIgG定常領域Fc (例えば、IgG1 Fc領域)との両方を含む抗体分子を意味する。ただし、2つの部分は、組換え法などにより化学的に連結される。例えば、sdAbは、IgGのネイティブヒンジ領域でIgG Fc領域に直接融合可能である。sdAbは、融合抗体中ではIgG Fcの上流、すなわちN末端のより近くに位置し、この場合、sdAb及びIgG Fc領域には、ヒンジ領域が介在する。融合抗体タンパク質は、本明細書では成分部分として参照され得、例えば、sdab-1-hIgG1Fcは、ヒトIgG1 Fc領域 (配列番号51のアミノ酸配列を有する)に融合されたsdab-2により構成される融合タンパク質又は抗体を意味し、sdab-2-hIgG1Fcは、ヒトIgG1 Fc領域に融合されたsdab-2により構成される融合タンパク質又は抗体を意味し、以下同様である。

20

【0029】

本明細書で用いられる「ラクダ科抗体」という用語は、フレームワーク領域及びCDR領域の両方がラクダ科生殖系重鎖のみ抗体配列に由来する可変領域を有する抗体 (又はより具体的には単ドメイン抗体若しくはV_HHフラグメント)を含むことを意図される。さらに、抗体が定常領域を含有する場合、定常領域もラクダ科生殖系抗体配列に由来し得る。本発明のラクダ科抗体は、ラクダ科生殖系抗体配列によりコードされないアミノ酸残基 (例えば、インビトロでランダム若しくは部位特異的変異誘発により又はインビボで体細胞変異により導入された変異)を含み得る。しかしながら、本明細書で用いられる「ラクダ科抗体」という用語は、別の哺乳動物種の生殖系に由来するCDR配列がラクダ科フレームワーク配列上に移植された抗体を含むことを意図されない。

30

【0030】

「キメラ抗体」という用語は、非ヒト (例えば、ラクダ科動物)源由来の遺伝物質と、ヒト由来の遺伝物質とを組み合わせることにより作製された抗体を意味する。又は、より一般的には、キメラ抗体は、異なる種の遺伝物質から生成された異なる部分を有する抗体である。

【0031】

本明細書で用いられる「ヒト化抗体」という用語は、ヒトにおいて天然に生成される抗体バリエーションとの類似性を増加させるようにタンパク質配列が修飾された非ヒト (例えば、ラクダ科動物)種由来の抗体を意味する。

40

【0032】

2つ以上の核酸又はタンパク質/ペプチドに関連して本明細書で用いられるパーセント「同一性」という用語は、配列同一性の部分としていずれの保存的アミノ酸置換も考慮せずに最大の対応が得られるように比較及びアライメントしたとき (必要に応じてギャップを導入して)、特定のパーセントの同一のヌクレオチド又はアミノ酸残基を有する2つ以上の配列又はサブ配列を意味する。パーセント同一性は、配列比較ソフトウェア若しくはアルゴリズムを用いて又は目視検査により測定され得る。アミノ酸配列又はヌクレオチド配列のアライメントを得るために使用可能な各種のアルゴリズム及びソフトウェアは、当

50

技術分野で周知である。こうしたものとしては、限定されないが、BLAST、ALIGN、Megalign、BestFit、GCG Wisconsin Package 及びそれらの変法が挙げられる。

【0033】

本明細書で用いられる場合、「対象」という用語は、いずれのヒト又は非ヒト動物も含む。「非ヒト動物」という用語は、すべての脊椎動物、例えば哺乳動物及び非哺乳動物を含む。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0034】

抗体のCDRは、様々な方法/システムを用いて当業者により定義される。これらのシステム及び/又は定義は、長年にわたり開発及び精緻化されており、Kabata、Chothia、IMGT、AbM及びContactを含む。Kabata定義は、配列可変性に基づいており、通常使用される。Chothia定義は、構造ループ領域の位置に基づく。IMGTシステムは、配列可変性及び可変ドメイン構造内の位置に基づく。AbM定義は、KabataとChothiaとの折衷案である。Contact定義は、利用可能な抗体結晶構造の解析に基づく。例示的なシステムは、KabataとChothiaとの組合せである。別の例示的なシステムは、Kabataである。

【0035】

本明細書で用いられる場合、「CDR」又は「相補性決定領域」という用語は、重鎖及び軽鎖ポリペプチドの両方の可変領域内に見出される非連続抗原結合性部位を意味することが意図される。これらの特定の領域は、Kabata et al., J. Biol. Chem. 252: 6609 - 6616 (1977)、Kabata et al., U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of proteins of immunological interest" (1991)、Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)、Al-Lazikani B. et al., J. Mol. Biol., 273: 927 - 948 (1997)、MacCallum et al., J. Mol. Biol. 262: 732 - 745 (1996)、Abhinandan and Martin, Mol. Immunol., 45: 3832 - 3839 (2008)、Lefranc M. P. et al., Dev. Comp. Immunol., 27: 55 - 77 (2003) 及び Honegger and Plueckthun, J. Mol. Biol., 309: 657 - 670 (2001) に記載されており、定義には、互いに比較されるときのアミノ酸残基のオーバーラッピング又はサブセットが含まれる。それにも関わらず、抗体若しくは移植抗体のCDR又はそのバリエーションを意味するいずれの定義の適用も、本明細書で定義され、用いられる用語の範囲内にあることが意図される。以上で引用された参考文献の各々により定義されるCDRを包含するアミノ酸残基は、比較として以下の表1に示される。CDR予測アルゴリズム及びインターフェースは、例えば、Abhinandan and Martin, Mol. Immunol., 45: 3832 - 3839 (2008)、Ehrenmann F. et al., Nucleic Acids Res., 38: D301 - D307 (2010) 及び Adolf-Bryfogle J. et al., Nucleic Acids Res., 43: D432 - D438 (2015) を含めて当技術分野で公知である。この段落で引用された参考文献の内容は、本願での使用のため及び本明細書の1つ以上の請求項への包含を可能にするために、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0036】

10

20

30

40

【表 1】

表 1: CDR 定義

	Kabat ¹	Chothia ²	MacCallum ³	IMGT ⁴	AHo ⁵	
V _H CDR1	31-35	26-32	30-35	27-38	25-40	
V _H CDR2	50-65	53-55	47-58	56-65	58-77	
V _H CDR3	95-102	96-101	93-101	105-117	109-137	
V _L CDR1	24-34	26-32	30-36	27-38	25-40	10
V _L CDR2	50-56	50-52	46-55	56-65	58-77	
V _L CDR3	89-97	91-96	89-96	105-117	109-137	

¹残基番号付けは以上のKabatらの命名法に従う

²残基番号付けは以上のChothiaらの命名法に従う

³残基番号付けは以上のMacCallumらの命名法に従う

⁴残基番号付けは以上のLefrancらの命名法に従う

⁵残基番号付けは以上の Honegger 及び Plückthun の命名法に従う

20

【 0 0 3 7 】

ヒトクローニン 1 8 . 2 を標的とする抗体（又は抗ヒトクローニン 1 8 . 2 抗体）
一態様では、本開示は、CDR 1 領域、CDR 2 領域及び CDR 3 領域であって、

- (1) それぞれ配列番号 5 2、5 3 及び 5 4、
- (2) それぞれ配列番号 5 5、5 6 及び 5 7、
- (3) それぞれ配列番号 5 8、5 9 及び 6 0、
- (4) それぞれ配列番号 6 1、6 2 及び 6 3、
- (5) それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、
- (6) それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、
- (7) それぞれ配列番号 8 2、8 3 及び 8 4、
- (8) それぞれ配列番号 8 5、8 6 及び 8 7、
- (9) それぞれ配列番号 8 8、8 9 及び 9 0、
- (1 0) それぞれ配列番号 9 1、9 2 及び 9 3、
- (1 1) それぞれ配列番号 9 4、9 5 及び 9 6、
- (1 2) それぞれ配列番号 1 0 3、1 0 4 及び 1 0 5、
- (1 3) それぞれ配列番号 1 0 6、1 0 7 及び 1 0 8、
- (1 4) それぞれ配列番号 1 1 2、1 1 3 及び 1 1 4、
- (1 5) それぞれ配列番号 1 1 5、1 1 6 及び 1 1 7、
- (1 6) それぞれ配列番号 1 2 1、1 2 2 及び 1 2 3、
- (1 7) それぞれ配列番号 1 2 4、1 2 5 及び 1 2 6、
- (1 8) それぞれ配列番号 1 2 7、1 2 8 及び 1 2 9、
- (1 9) それぞれ配列番号 1 3 3、1 3 4 及び 1 3 5、
- (2 0) それぞれ配列番号 1 3 6、1 3 7 及び 1 3 8、
- (2 1) それぞれ配列番号 1 3 9、1 4 0 及び 1 4 1、
- (2 2) それぞれ配列番号 1 4 2、1 4 3 及び 1 4 4、
- (2 3) それぞれ配列番号 1 4 5、1 4 6 及び 1 4 7、
- (2 4) それぞれ配列番号 1 4 8、1 4 9 及び 1 5 0、
- (2 5) それぞれ配列番号 1 5 1、1 5 2 及び 1 5 3、
- (2 6) それぞれ配列番号 1 5 4、1 5 5 及び 1 5 6、

30

40

50

- (2 7) それぞれ配列番号 1 5 7、1 5 8 及び 1 5 9、
 (2 8) それぞれ配列番号 1 6 0、1 6 1 及び 1 6 2、
 (2 9) それぞれ配列番号 1 6 3、1 6 4 及び 1 6 5、
 (3 0) それぞれ配列番号 1 6 9、1 7 0 及び 1 7 1、
 (3 1) それぞれ配列番号 1 7 2、1 7 3 及び 1 7 4、
 (3 2) それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7、
 (3 3) それぞれ配列番号 1 7 8、1 7 9 及び 1 8 0、
 (3 4) それぞれ配列番号 1 8 1、1 8 2 及び 1 8 3、
 (3 5) それぞれ配列番号 1 8 4、1 8 5 及び 1 8 6、
 (3 6) それぞれ配列番号 1 9 0、1 9 1 及び 1 9 2、
 (3 7) それぞれ配列番号 1 9 3、1 9 4 及び 1 9 5、
 (3 8) それぞれ配列番号 1 9 6、1 9 7 及び 1 9 8、若しくは
 (3 9) それぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1、又は

10

C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のいずれか 1 つ以上に最大で約 3 アミノ酸置換（例えば、1、2 又は 3 アミノ酸置換）を含む、上記のいずれかのバリエーションのアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む単量体可変ドメインを含む、単離された抗体又はその抗原結合性部分を提供する。

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態では、

- (1) それぞれ配列番号 5 2、5 3 及び 5 4、
 (2) それぞれ配列番号 5 5、5 6 及び 5 7、
 (3) それぞれ配列番号 5 8、5 9 及び 6 0、
 (4) それぞれ配列番号 6 1、6 2 及び 6 3、
 (5) それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、
 (6) それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、
 (7) それぞれ配列番号 8 2、8 3 及び 8 4、
 (8) それぞれ配列番号 8 5、8 6 及び 8 7、
 (9) それぞれ配列番号 8 8、8 9 及び 9 0、
 (1 0) それぞれ配列番号 9 1、9 2 及び 9 3、
 (1 1) それぞれ配列番号 9 4、9 5 及び 9 6、
 (1 2) それぞれ配列番号 1 0 3、1 0 4 及び 1 0 5、
 (1 3) それぞれ配列番号 1 0 6、1 0 7 及び 1 0 8、
 (1 4) それぞれ配列番号 1 1 2、1 1 3 及び 1 1 4、
 (1 5) それぞれ配列番号 1 1 5、1 1 6 及び 1 1 7、
 (1 6) それぞれ配列番号 1 2 1、1 2 2 及び 1 2 3、
 (1 7) それぞれ配列番号 1 2 4、1 2 5 及び 1 2 6、
 (1 8) それぞれ配列番号 1 2 7、1 2 8 及び 1 2 9、
 (1 9) それぞれ配列番号 1 3 3、1 3 4 及び 1 3 5、
 (2 0) それぞれ配列番号 1 3 6、1 3 7 及び 1 3 8、
 (2 1) それぞれ配列番号 1 3 9、1 4 0 及び 1 4 1、
 (2 2) それぞれ配列番号 1 4 2、1 4 3 及び 1 4 4、
 (2 3) それぞれ配列番号 1 4 5、1 4 6 及び 1 4 7、
 (2 4) それぞれ配列番号 1 4 8、1 4 9 及び 1 5 0、
 (2 5) それぞれ配列番号 1 5 1、1 5 2 及び 1 5 3、
 (2 6) それぞれ配列番号 1 5 4、1 5 5 及び 1 5 6、
 (2 7) それぞれ配列番号 1 5 7、1 5 8 及び 1 5 9、
 (2 8) それぞれ配列番号 1 6 0、1 6 1 及び 1 6 2、
 (2 9) それぞれ配列番号 1 6 3、1 6 4 及び 1 6 5、
 (3 0) それぞれ配列番号 1 6 9、1 7 0 及び 1 7 1、
 (3 1) それぞれ配列番号 1 7 2、1 7 3 及び 1 7 4、

20

30

40

50

- (3 2) それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7、
- (3 3) それぞれ配列番号 1 7 8、1 7 9 及び 1 8 0、
- (3 4) それぞれ配列番号 1 8 1、1 8 2 及び 1 8 3、
- (3 5) それぞれ配列番号 1 8 4、1 8 5 及び 1 8 6、
- (3 6) それぞれ配列番号 1 9 0、1 9 1 及び 1 9 2、
- (3 7) それぞれ配列番号 1 9 3、1 9 4 及び 1 9 5、
- (3 8) それぞれ配列番号 1 9 6、1 9 7 及び 1 9 8、又は
- (3 9) それぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1

のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域を含む単量体可変ドメインを含む、単離された抗体又はその抗原結合性部分である。

10

【 0 0 3 9 】

抗体又はその抗原結合性部分のいくつかの実施形態では、

- それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、
- それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、
- それぞれ配列番号 1 2 4、1 2 5 及び 1 2 6、
- それぞれ配列番号 1 3 6、1 3 7 及び 1 3 8、
- それぞれ配列番号 1 4 5、1 4 6 及び 1 4 7、
- それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7、若しくは
- それぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1、又は

C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のいずれか 1 つ以上に最大で約 3 アミノ酸置換（例えば、1、2 又は 3 アミノ酸置換）を含む、上記のいずれかのバリエーションのアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域である。

20

【 0 0 4 0 】

抗体又はその抗原結合性部分のいくつかの実施形態では、

- それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、
- それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、
- それぞれ配列番号 1 2 4、1 2 5 及び 1 2 6、
- それぞれ配列番号 1 3 6、1 3 7 及び 1 3 8、
- それぞれ配列番号 1 4 5、1 4 6 及び 1 4 7、
- それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7、又は
- それぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1

のアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域である。

30

【 0 0 4 1 】

いくつかの実施形態では、それぞれ配列番号 6 4、6 5 及び 6 6、それぞれ配列番号 7 6、7 7 及び 7 8、それぞれ配列番号 1 2 4、1 2 5 及び 1 2 6、それぞれ配列番号 1 3 6、1 3 7 及び 1 3 8、それぞれ配列番号 1 4 5、1 4 6 及び 1 4 7、それぞれ配列番号 1 7 5、1 7 6 及び 1 7 7 又はそれぞれ配列番号 1 9 9、2 0 0 及び 2 0 1 の 1 つのアミノ酸配列を含む C D R 1 領域、C D R 2 領域及び C D R 3 領域である。

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、配列番号 1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49 及び 50 のいずれかに示されるアミノ酸配列を有する単量体可変ドメイン内に C D R 1、C D R 2 及び C D R 3 のアミノ酸配列を含む。

40

【 0 0 4 3 】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、クローニン 1 8 . 2、好ましくはヒトクローニン 1 8 . 2 に特異的に結合する。

【 0 0 4 4 】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、単一ドメイン抗体 (s d A b) 又は V_HH ドメイン、すなわち従来の重鎖定常領域を含まないものである。いくつか

50

の実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は単ドメイン抗体である。

【0045】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、ラクダ科、キメラ、ヒト又はヒト化のものである。

【0046】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号1～50及び202～213からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0047】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号1～50及び202～213からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0048】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50及び202～213からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0049】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50及び202～213からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0050】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号5、9、25、29、32、42、50及び202～213からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む。

【0051】

いくつかの実施形態では、単量体可変ドメインは、配列番号5、9、25、29、32、42、50及び202～213からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0052】

他の一態様では、本開示は、配列番号1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50及び202～213からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む単量体可変ドメインを含む抗体又はその抗原結合性部分を提供する。いくつかの実施形態では、アミノ酸配列は、配列番号5、9、25、29、32、42、50及び202～213からなる群から選択される。

【0053】

他の一態様では、本開示は、配列番号1、2、3、4、5、9、11、12、13、14、15、18、19、21、22、24、25、26、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、40、41、42、43、44、45、47、48、49、50及び202～213からなる群から選択されるアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む単量体可変ドメインを含む抗体又はその抗原結合性部分を提供する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、配列番号5、9、25、29、32、42、50及び202～213からなる群から選択さ

10

20

30

40

50

れるアミノ酸配列に対して少なくとも80%、85%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の同一性を有するアミノ酸配列を含む単量体可変ドメインを含む。

【0054】

細胞表面上のFc受容体への抗体の結合は、抗体被覆粒子の貪食及び破壊、免疫複合体のクリアランス、キラー細胞による抗体被覆標的細胞の溶解（抗体依存細胞傷害性又はADCCと呼ばれる）、炎症性メディエーターの放出、胎盤通過及びイムノグロブリン産生の制御をはじめとするいくつかの重要な様々な生物学的反応をトリガーする。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合性部分は、Fc領域を含む。ヒトIgG1、IgG2、IgG3及びIgG4のFc領域のアミノ酸配列は、当業者に公知である。いくつかの場合、アミノ酸バリエーションを有するFc領域がネイティブ抗体で同定されている。いくつかの実施形態では、修飾抗体（例えば、修飾Fc領域）は、改変エフェクター機能を提供し、したがって抗体の生物学的プロファイルに影響を及ぼす。いくつかの実施形態では、定常領域修飾は、抗体の血清中半減期を増加させる。いくつかの実施形態では、定常領域修飾は、抗体のADCC及び/又は補体依存細胞傷害性（CDC）を増加又は増強する。

10

【0055】

本明細書に記載の抗体又はその抗原結合性部分は、単量体可変ドメインに融合されたIgGFc領域をさらに含み得る。例えば、配列番号51のアミノ酸配列を含むIgGFc領域は、ヒトIgG1Fc領域であり得る。いくつかの実施形態では、ヒトIgG1Fc領域のN末端に融合された抗体又はその抗原結合性部分（例えば、sdAb）である。

20

【0056】

さらなる態様では、本開示は、本明細書に記載の抗体又はその抗原結合性部分を含む、二重特異的分子、イムノコンジュゲート（若しくは抗体薬剤コンジュゲート）又はキメラ抗原受容体を提供する。

【0057】

「二重特異的分子」という用語は、少なくとも1つの他の機能性分子、例えば別のペプチド又はタンパク質（例えば、別の抗体又は受容体に対するリガンド）に連結された本開示の抗体を意味する。二重特異的分子は、少なくとも2つの異なる結合性部位又は標的分子を有し得、且つ3特異性以上を有する分子を含み得る。

30

【0058】

「イムノコンジュゲート」という用語は、治療剤、例えば細胞毒素、アルキル化剤、DNAマイナーグループバインダー、DNAインターカレーター、DNAクロスリンカー、ヒストンデアセチラーゼ阻害剤、核エクスポート阻害剤、プロテアソーム阻害剤、トポイソメラーゼI又はII阻害剤などにコンジュゲートされた本開示の抗体を意味する。ADCCでは、抗体及び治療剤は、ペプチジル、ジスルフィドなどの切断性リンカーを介してコンジュゲートされ得る。

【0059】

「キメラ抗原受容体」又は「CAR」という用語は、免疫エフェクター細胞、典型的にはT細胞上に規定の特異性を移植してT細胞機能を拡張する工学操作された受容体を意味する。新世代CARは、単ドメイン抗体を含む細胞外結合性ドメイン、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン及び細胞内シグナリングドメイン（主にT細胞活性化シグナルの主トランスミッターであるCD3ゼータ細胞質ドメイン、さらに1つ以上の共刺激性ドメイン）を含む。CARは、T細胞拡大、持続及び抗腫瘍活性を増強する因子、例えばサイトカイン及び共刺激性リガンドをさらに有し得る。

40

【0060】

なおもさらなる態様では、本開示は、本明細書に記載の抗体（若しくはその抗原結合性部分）のいずれかの抗体若しくはその抗原結合性部分又は二重特異的分子、イムノコンジュゲート若しくはキメラ抗原受容体をコードする核酸分子を提供する。この核酸分子を含

50

有する発現ベクターを含有する宿主細胞（例えば、CHO細胞若しくはリンパ球細胞又は微生物、例えば大腸菌（*E. coli*）及び真菌、例えば酵母）は、本開示の抗体、好ましくはモノクローナル抗体を産生するために使用され得る。

【0061】

一実施形態では、本開示の部分長又は全長抗体をコードするDNAは、標準的分子生物学技術によって得て、遺伝子が転写及び翻訳調節配列に作動的に連結されるように1つ以上の発現ベクターに挿入することができる。「作動的に連結される」という用語は、ベクター内の転写及び翻訳制御配列が抗体遺伝子の転写及び翻訳をレギュレートするその意図された機能を果たすように、抗体遺伝子がベクターにライゲートされることを意味することが意図される。「調節配列」という用語は、抗体遺伝子の転写又は翻訳を制御するプロモーター、エンハンサー及び他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むことが意図される。かかる調節配列は、例えば、Goeddel (*Gene Expression Technology. Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))に記載されている。哺乳動物宿主細胞発現に好ましい調節配列としては、哺乳動物細胞で高レベルのタンパク質発現を指令するウイルスエレメント、例えばサイトメガロウイルス（CMV）シミアンウイルス40（SV40）、アデノウイルス（例えば、アデノウイルスメジャー後期プロモーター（AdMLP））並びにポリオーマに由来するプロモーター及び/又はエンハンサーが挙げられる。代替的に、ユビキチンプロモーター又は - グロビンプロモーターなどの非ウイルス調節配列を使用し得る。なおもさらに、異なる源由来の配列で構成された調節エレメント、例えばSV40初期プロモーター及びヒトT細胞白血病ウイルス1型の長末端リピート由来の配列を含有するSRプロモーターシステム（Takebe et al., (1988) *Mol. Cell. Biol.* 8: 466 - 472）である。発現ベクター及び発現制御配列は、使用される発現宿主細胞に適合可能であるように選択される。

10

20

【0062】

抗体をコードするDNAは、発現ベクターに挿入され得る。組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。抗体をコードするDNAは、抗体をコードするDNAのアミノ末端にシグナルペプチドがインフレームで連結されるようにベクター中にクローニングされ得る。シグナルペプチドは、イムノグロブリンシグナルペプチド又は異種シグナルペプチド（すなわち非イムノグロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。

30

【0063】

s d A b（又はs d A b - I g G F c）の発現のために、抗体鎖をコードする発現ベクターは、標準的技術により宿主細胞中にトランスフェクトされる。「トランスフェクション」という用語の各種の形態は、原核又は真核宿主細胞中への外因性DNAの導入に通常使用される多様な技術、例えばエレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE-デキストラントランスフェクションなどを包含することが意図される。本開示の抗体を発現するための哺乳動物宿主細胞としては、HEK293細胞、チャイニーズハムスター卵巣（CHO細胞）、NSO骨髄腫細胞、COS細胞及びSP2細胞が挙げられる。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターが哺乳動物宿主細胞中に導入されたとき、抗体は、宿主細胞中での抗体の発現、より好ましくは宿主細胞が成長する培養培地中への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間にわたり宿主細胞を培養することにより産生される。抗体は、標準的タンパク質精製法を用いて培養培地から回収され得る。

40

【0064】

最大半量有効濃度としても知られる「EC₅₀」という用語は、特定の暴露時間後に最大半量反応を与える抗クローディング18.2 s d A b - F c融合タンパク質若しくは抗クローディング18.2 s d A bなどの抗体又はその抗原結合性部分の濃度を意味する。

【0065】

いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分（例えば、s d A b又はs d A

50

b - F c 融合タンパク質)は、約 1 nM 以下、約 100 nM 以下、約 40 nM 以下、約 20 nM 以下、約 10 nM 以下、約 1 nM 以下又は約 0.1 nM 以下の最大半量有効濃度 (EC50) でクローディン 18.2 (例えば、ヒトクローディン 18.2) に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、約 1 nM 以下、約 100 nM 以下、約 40 nM 以下、約 20 nM 以下、約 10 nM 以下、約 1 nM 以下又は約 0.1 nM 以下の EC50 でヒトクローディン 18.2 に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、約 40 nM 以下の EC50 でヒトクローディン 18.2 に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、約 20 nM 以下の EC50 でヒトクローディン 18.2 に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、約 10 nM 以下の EC50 でヒトクローディン 18.2 に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、約 1 nM 以下の EC50 でヒトクローディン 18.2 に結合する。いくつかの実施形態では、抗体又はその抗原結合性部分は、約 0.1 nM 以下の EC50 でヒトクローディン 18.2 に結合する。

10

【0066】

医薬組成物及び処置方法

他の一態様では、本開示は、従来技術に係る薬学的に許容可能な担体と共に本発明の 1 種以上の抗体又は本明細書に記載の二重特異的分子、イムノコンジュゲート若しくはキメラ抗原受容体を含む医薬組成物を提供する。

【0067】

組成物は、1 種以上の追加の医薬活性成分、例えば別の抗体、薬剤、例えば細胞傷害剤又は抗腫瘍剤を含み得る。本発明の医薬組成物は、例えば、別の抗癌剤、別の抗炎症剤などとの組合せ療法でも投与され得る。本明細書で用いられる場合、「薬学的に許容可能な担体」は、薬学的に許容可能な担体、賦形剤又は安定化剤を含む。こうしたものとしては、限定されないが、生理学的に適合可能な溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤及び抗真菌剤、等張化剤及び吸収遅延剤、界面活性剤、増粘剤又は乳化剤、固形結合剤、ディスページョン又はサスペンション助剤、可溶化剤、着色剤、風味剤、コーティング剤、崩壊剤、滑沢剤、甘味剤、保存剤、等張化剤などが挙げられる。好適な担体の選択は、当業者の知識の範囲内にある。

20

【0068】

医薬組成物は、静脈内、筋肉内、皮下、腸管外、表皮及び他の投与経路に好適であり得る。投与経路に依存して、活性成分は、それを不活性化するおそれのある酸及び他の自然条件の作用からそれを保護するための材料で被覆され得るか、又はさもなければそうした材料若しくは構造体にロードされ得る。本明細書で用いられる「腸管外投与」という語句は、経腸投与及び局所投与以外の投与モード、通常、注射によるものを意味し、こうしたものとしては、限定されないが、静脈内、筋肉内、動脈内、髄腔内、嚢内、眼窩内、心内、皮内、腹腔内、経気管、皮下、角質下、関節内、嚢下、クモ膜下、脊髄内、硬膜外及び胸骨内の注射及び注入が挙げられる。代替的に、本発明の抗体は、非腸管外経路、例えば局所、表皮又は粘膜投与経路を介して、例えば鼻内、経口、膺、直腸、舌下又は局所で投与され得る。

30

【0069】

他の一態様では、本開示は、対象、例えばヒト又は非ヒト哺乳動物における疾患を処置する方法であって、治療有効量の、本明細書に記載の医薬組成物を対象に投与することを含む方法を提供する。疾患は、胃癌、膵癌、結腸癌、食道癌、肝癌、卵巣癌、肺癌及び膀胱癌からなる群から選択される癌であり得る。特定の実施形態では、癌は、胃癌である。特定の実施形態では、癌は、膵癌である。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

40

【0070】

対象への組成物の投与では、最適な所望の反応 (例えば、治療反応) を提供するように投与レジメンを調整し得る。対象、処置される疾患などに基づいて単一ポータル又は分割用量を投与し得る。本明細書で用いられるユニット製剤は、処置される対象に対するユニット投与量として適切な物理的に個別のユニットを意味する。各ユニットは、所要の医薬

50

担体に関連して所望の治療効果を生じるように計算される、あらかじめ決められた量の活性成分を含有する。それほど頻繁でない投与が必要とされる場合、持続放出製剤を使用することができる。

【0071】

本開示の抗体の投与では、投与量は、対象の体重基準で約0.0001~100mg/kg、より一般的には0.01~5mg/kgの範囲内であり得る。例えば、投与量は、0.3mg/kg体重、1mg/kg体重、3mg/kg体重、5mg/kg体重若しくは10mg/kg体重又は1~10mg/kgの範囲内であり得る。好適な処置レジームは、週1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、月1回などであり得る。本発明の抗クローディン18.2抗体に対する投与レジメン例は、静脈内投与を介して1mg/kg体重又は3mg/kg体重を含み得る。

10

【0072】

「治療有効量」又は「治療有効量」の、本発明のクローディン18.2を標的とする抗体は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、疾患無症状期間の頻度及び/若しくは持続期間の増加、疾患罹患に起因する機能障害若しくは能力障害の可能性の予防若しくは低減又は疾患進行の阻害若しくは遅延をもたらす。例えば、腫瘍保有対象の処置では、「治療有効量」の抗体組成物は、未処置対象と比べて腫瘍成長を少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約40%、さらにより好ましくは少なくとも約60%、またさらにより好ましくは少なくとも約80%阻害する。

【実施例】

20

【0073】

以下の実施例は、単に本発明の例示であることが意図されるため、決して本発明を限定するものとみなされるべきでない。

【0074】

実施例1：抗クローディン18.2 s d A b の発生
動物免疫化

現在の動物福祉規則に従って組換えヒトクローディン18.2-Hisタンパク質(GenScript)でラマを免疫した。免疫化では、CFA(完全フロイントアジュバント、一次免疫化)又はIFA(不完全フロイントアジュバント、ブースト免疫化)と共に抗原をPBS溶液中に投与したか又はエマルジョンとして配合した。抗原は、頸部の皮下に投与した。各動物は、CFAエマルジョン中の200µgの抗原による一次免疫化、1週間のインターバルでIFAエマルジョン中の100µgの抗原による3回の後続ブースト及び1週間のインターバルでIFAエマルジョン中の50µgの抗原による続く2回の注射を含めて、エマルジョンの注射を6回受けた。複数ラウンドの免疫化後、200mlの血液サンプルを採取した。ラマ重鎖抗体(HCAb)の遺伝源として末梢血リンパ球(PBL)を勾配遠心分離により血液サンプルから単離した。

30

【0075】

ファージディスプレイライブラリー構築

製造業者のプロトコルに従ってTRIZOL試薬(Thermo Fisher Scientific、カタログ番号15596026)を用いて、以上に記載の全RNAを単離されたリンパ球から抽出し、これをs d A bコード遺伝子断片の増幅のためにRT-PCRのための出発材料として使用した。遺伝子増幅では、製造業者のプロトコルに従ってPRIMESCRIP T第一鎖cDNA合成キット(Takara、カタログ番号6110A)を用いて、単離されたRNAをオリゴ(dT)₂₀プライマーでcDNAに逆転写した。V_HHフラグメントを増幅するために、6つのフォワード及び2つのリバース特異的縮重プライマーを設計した。

40

【0076】

2工程PCR法によりV_HHフラグメントの可変領域を増幅した。第2のPCRの鋳型として第1のPCRのDNA産物を使用した。V_HH PCRフラグメントを含有する増幅された第2のPCR産物をゲル精製し、酵素消化し、続いてファージミドプラスミド中

50

に挿入した。組換えプラスミドをエレクトロポレーションにより大腸菌 (*E. coli*) 細胞中に移し、 1×10^9 超のサイズでファージディスプレイライブラリーを生成した。標準的プロトコルに従ってライブラリーファージを調製し、濾過滅菌後にストックとして -80°C で貯蔵した。

【0077】

ファージディスプレイパニング

GenScriptにより開発された標準的手順を用いて、最初に、構築されたファージライブラリーを、ヒトクローニン18.1を過剰発現するCHO-K1細胞でカウンタースクリーニングし、続いてヒトクローニン18.2を過剰発現するCHO-K1細胞でパニングした。2ラウンドの選択を実施し、富化係数(コントロールと比べて溶出液中に存在するファージの数)、多様性及びクローニン18.2陽性クローンのパーセンテージに関して各選択アウトプットを解析した(FACS)。これらのパラメーターに基づいて、さらなるスクリーニングのために最良クラスの選択肢を選択し、ハイスループットスクリーニングのためにプールとして可溶性発現ベクター中にサブクローニングした。sdAbコード配列とインフレームで、ベクターは、C末端Hisタグをコードした。コロニーを取り出して96ディープウェルプレート(1mlの体積)中で成長させ、上清中のsdAb発現のためにIPTG及び0.1%Tritonの添加により誘導した。

10

【0078】

FACSによる抗クローニン18.2特異的sdAbリード同定

sdAbの細胞表面抗原結合を検証するために、クローニン18.2発現性HEK293細胞への結合能に関して上清中の発現sdAbをFACSにより解析した。クローニン18.1発現性HEK293細胞への結合もFACSにより評価した。ヒトクローニン18.2を発現するHEK293細胞を採取し、本明細書に記載の抗クローニン18.2sdAb、続いてFITC標識抗Hisタグ抗体(GenScript、カタログ番号A01620)と共にインキュベートした。次いで、サンプルをフローサイトメトリーで解析した。典型的結合図を図1に示した。抗クローニン18.2mAbは、クローニン18.1タンパク質発現性細胞(点線)ではなく、ヒトクローニン18.2発現性細胞(実線)に特異的に結合する。陰性結合は、工学操作なしの親HEK293細胞のバックグラウンド灰色曲線と実線とをマージしたものとして表された。標的結合パターンは、陽性コントロール抗体IMAB362(クラウディキシマブ)及びPBSコントロールにより明確化され、IMAB362結合親和性は、フルオロフォア(iFluor647)標識ヤギ抗ヒトIgG Fc二次抗体(Jackson、カタログ番号109-605-098)により検出された。これらのsdAbをシーケンスし、さらなる特徴付けのためにユニーククローンを選択した。同定/試験されたsdAb(又はクローン)の配列は、本明細書に添付の配列リストに示される。

20

30

【0079】

sdAb-Fc融合タンパク質の産生

抗クローニン18.2sdAbとヒトIgG1 Fc領域(ネイティブIgG1ヒンジ領域を含む)との融合により、抗クローニン18.2sdAb-Fc融合タンパク質構築物を発生させた。CHO-3E7細胞一過性発現で構築物のマキシプレップを調製した。プロテインAアガロース樹脂を含有するカラムを介して、クロマトグラフィーにより発現抗クローニン18.2sdAb-Fc融合タンパク質を精製した。

40

【0080】

実施例2: インビトロでの抗クローニン18.2sdAbの特徴付け

FACSアッセイによるヒトクローニン18.1細胞結合

sdAb-hIgG-Fc融合タンパク質の構築後、クローニン18.1に結合せずにクローニン18.2にのみ結合する抗体結合特異性をさらに調べるために、300nMの濃度から始めて3x段階希釈で100 μl の抗クローニン18.2sdAbと共に、ヒトクローニン18.1を発現するHEK293細胞をインキュベートし、続いてフルオロフォア(iFluor647)標識ヤギ抗ヒトIgG Fc二次抗体(Jack

50

on、カタログ番号109-605-098)インキュベーションを行った。次いで、サンプルをフローサイトメトリーで解析した。幾何平均値で抗体-抗原結合曲線を作成した。EC₅₀を解析するために、4パラメーター、最良当てはめ値プログラムを用いて、GraphPad Prism v6.02ソフトウェアにより生のデータをプロットした。
【0081】

図2に示されるように、これらの抗クロードイン18.2 sdAb-Fc融合タンパク質のうち、sdab-6-hIgG1Fc、sdab-10-hIgG1Fc、sdab-16-hIgG1Fc、sdab-20-hIgG1Fc、sdab-23-hIgG1Fc及びsdab-46-hIgG1Fcを含む6種のタンパク質のみがヒトクロードイン18.1への高い結合親和性を示した。他のsdAb-Fc融合タンパク質は、ヒトクロードイン18.1への結合親和性を示さなかったか又は弱い結合親和性を示した。ヒトクロードイン18.1とのそれらの結合特異性をさらに同定するために、ヒトクロードイン18.1との結合親和性を有しないか又は弱い結合親和性を有するsdAb-Fc融合タンパク質のすべてを、フローサイトメトリーによる第2ラウンドの結合アッセイのために選択した。図8に示されるように、それらのいずれもヒトクロードイン18.1に結合しない。

10

【0082】

FACSアッセイによるヒトクロードイン18.2細胞結合

ヒトクロードイン18.1への非特異的結合の解析後、クロードイン18.1結合親和性を有しない/弱い結合親和性を有するこれらの候補を選択して、ヒトクロードイン18.2へのそれらの結合親和性を確認した。抗体産物の細胞表面クロードイン18.2抗原結合を検証するために、300nMの濃度から始めて3x段階希釈で100µlの抗クロードイン18.2 sdAb-Fc融合タンパク質と共に、ヒトクロードイン18.2を発現するHEK293細胞をインキュベートし、続いてフルオロフォア(iFluor647)標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)二次抗体インキュベーションを行った。次いで、サンプルをフローサイトメトリーで解析した。幾何平均値で抗体-抗原結合曲線を作成した。EC₅₀を解析するために、4パラメーター、最良当てはめ値プログラムを用いて、GraphPad Prism v6.02ソフトウェアにより生のデータをプロットした。

20

【0083】

図3に示されるように、これらの抗クロードイン18.2 sdAb-Fc融合タンパク質のうち、sdab-7-hIgG1Fc、sdab-17-hIgG1Fc及びsdab-39-hIgG1Fcを除いて、抗クロードイン18.2 sdAb-Fc融合タンパク質のほとんどは、高親和性でヒトクロードイン18.2発現性細胞に結合する。ヒトクロードイン18.2とのそれらの結合親和性をさらに同定するために、高結合親和性のsdAb-Fc融合タンパク質のすべてを、フローサイトメトリーによる第2ラウンドの結合アッセイのために選択した。図7に示されるように、IMAB362の参照mAbと比較したとき、sdab-45-hIgG1Fcを除いて、それらのすべてが類似の又はより高い結合親和性を有することが確認された。

30

【0084】

FACSアッセイによるマウスクロードイン18.2細胞結合

マウスクロードイン18.2へのこれらの融合タンパク質の結合親和性を確認するために、マウスクロードイン18.2を発現するCHO-K1細胞を採取し、300nMの濃度から始めて3x段階希釈で100µlの抗クロードイン18.2 sdAb-Fc融合タンパク質と共にインキュベートし、続いてフルオロフォア(iFluor647)標識ヤギ抗ヒトIgG Fc二次抗体(Jackson、カタログ番号109-605-098)インキュベーションを行った。次いで、サンプルをフローサイトメトリーで解析した。幾何平均値で抗体-抗原結合曲線を作成した。EC₅₀を解析するために、4パラメーター、最良当てはめ値プログラムを用いて、GraphPad Prism v6.02ソフトウェアにより生のデータをプロットした。

40

50

【0085】

図4に示されるように、本開示の抗クロードイン18.2sdAb-Fc融合タンパク質のうち、sdab-17-hIgG1Fcを除いて、抗クロードイン18.2sdAb-Fc融合タンパク質のほとんどは、高親和性でマウスクロードイン18.2発現性細胞に結合する。

【0086】

抗クロードイン18.2抗体で誘導される補体依存細胞傷害性(CDC)アッセイ

抗体依存細胞性細胞傷害性(ADCC)及び補体依存細胞傷害性(CDC)作用は、ヒト胃癌又は胃食道癌に対する抗ヒトクロードイン18.2治療用抗体の主要な作用機序である。候補抗クロードイン18.2sdAb-Fc融合タンパク質は、CDCアッセイを用いて機能的にアセスされた。簡潔に述べると、ヒトクロードイン18.2を過剰発現する標的細胞系CHO-K1を培養して採取し、それを96ウェルプレートに播種した。それに応じて抗体サンプルをプレートに添加し、37/5%CO₂でプレートを30分インキュベートした。次いで、精製正常ヒト血清をプレートに添加し、プレートをさらに4時間インキュベートした。インキュベーターからプレートを取り出して上清を採取し、Cell Titer-Glo(登録商標)アッセイキット(Promega、カタログ番号G7573)で分析した。細胞生存能分析のためにPheraStar(AMG)により発光データをキャプチャーした。IMAB362(ゾルベツキシマブ)及び370E2B12C3(国際公開第202013567A1号パンフレットに開示される)を含む2つの陽性コントロールを比較用に使用した。候補抗体濃度に対する%標的細胞溶解によるCDCアッセイ結果は、図5に示される。sdab-17-hIgG1Fc及びsdab-27-hIgG1Fcを除いて、sdAb-Fc融合タンパク質のすべてがIMAB362の参照mAbよりも良好なCDC活性を示した。370E2B12C3と比較したとき、sdab-2-hIgG1Fc、sdab-4-hIgG1Fc、sdab-9-hIgG1Fc、sdab-25-hIgG1Fc、sdab-29-hIgG1Fc、sdab-32-hIgG1Fc、sdab-33-hIgG1Fc、sdab-35-hIgG1Fc、sdab-36-hIgG1Fc、sdab-38-hIgG1Fc、sdab-40-hIgG1Fc、sdab-42-hIgG1Fc、sdab-43-hIgG1Fc、sdab-44-hIgG1Fc、sdab-45-hIgG1Fc、sdab-48-hIgG1Fc及びsdab-50-hIgG1Fcを含めて、多くのsdAb-Fc融合タンパク質は、同程度の活性を呈した。

【0087】

抗クロードイン18.2抗体で誘導されるADCCアッセイ

抗クロードイン18.2sdAb-Fc融合タンパク質のADCC作用を比較した。候補抗体濃度に対する%標的細胞溶解によるADCCアッセイ結果は、図6に示される。アッセイ手順では、ヒトクロードイン18.2を過剰発現する標的細胞系CHO-K1を培養して採取し、96ウェルプレート中に播種した。サンプル又はIMAB362(ゾルベツキシマブ)の同一アミノ酸配列でインハウスにおいて合成された陽性コントロールをプレートに添加し、37/5%CO₂でプレートを30分インキュベートした。エフェクター細胞としてNK92細胞を使用してプレートに添加し、同一条件で6時間インキュベートした。アッセイプレートを取り出して、短時間遠心分離した。上清を採取して、製造業者の説明書(Roche)に従ってLDH活性アッセイのために新しいプレートに移した。FlexStation3により吸光度データをキャプチャーして、GraphPad Prism 6.0により分析した。IMAB362(ゾルベツキシマブ)及び370E2B12C3(国際公開第202013567A1号パンフレット)を含む2つの陽性コントロールを比較用に使用した。候補抗体濃度に対する%標的細胞溶解によるADCCアッセイ結果は、図6に示される。sdAb-Fc融合タンパク質のすべてがIMAB362の参照mAbよりも良好なADCC活性を示した。

【0088】

実施例3：抗体ヒト化及び分析

10

20

30

40

50

抗体ヒト化及び特徴付け

抗体可変ドメイン配列に基づいてCDR及びFRを分析し、相同性モデリングを実施してsdab-09、sdab-25、sdab-29、sdab-32、sdab-42及びsdab-50の親ラマ抗体のモデル構造を得た。以下の方法を介して抗体ヒト化を実施した。1) フレームワーク残基の溶媒アクセス可能表面積を計算する。2) 結果に基づいて、埋め込まれたフレームワーク残基を同定する(すなわち溶媒アクセス可能表面積<15%)。3) sdAbカウンターパートに対して高い配列同一性を共有するsdAbでヒトアクセプターを選択する。4) 復帰変異を伴うことなく移植抗体の配列が得られるようにラマsdAbのCDRをヒトアクセプターフレームワークに直接移植する。5) 開発性アセスメントを介して、脱アミド化、異性化、酸化、グリコシル化などをはじめとする移植配列の翻訳後修飾及び化学分解を分析する。6) 移植抗体の結合活性及び生産性に影響を及ぼし得るN-グリコシル化部位、異常プロリン残基、脱アミド化部位、異性化部位、酸化部位、不対システイン残基などのようなPTMホットスポットを同定する。

10

【0089】

sdAb-Fc融合タンパク質構築では、抗クローディン18.2ヒト化sdAbをヒトIgG1Fc領域のN末端に融合した。これらのヒト化抗体融合タンパク質をCHO-3E7細胞中で発現させた。24時間後、トリプトンN-1サプリメントで発現/分泌をブーストした。37及び5%CO₂で6日間の振盪培養後、上清を採取し、以上に記載のようにプロテインAビーズでヒト化抗体を精製した。分析のためにヒト化抗体をPBS中に保存した。

20

【0090】

抗クローディン18.2抗体で誘導されるADCCアッセイ

すべてのヒト化抗体のADCC作用を比較した。アッセイ手順では、ヒトクローディン18.2を過剰発現する標的細胞系CHO-K1又はKATO I I Iを培養して採取し、96ウェルプレート中に1×10⁴細胞で播種した。ヒト化抗体サンプル又はIMAB362(ゾルベツキシマブ)の同一アミノ酸配列でインハウスにおいて合成された陽性コントロールをプレートに添加し、37/5%CO₂でプレートを30分インキュベートした。エフェクター細胞としてNK92細胞を使用してプレートに添加し、同一条件で6時間インキュベートした。アッセイプレートを取り出して、短時間遠心分離した。上清を採取して、製造業者の説明書(Roche)に従ってLDH活性アッセイのために新しいプレートに移した。FlexStation3により吸光度データをキャプチャーして、GraphPad Prism 6.0により分析した。図9に示されるように、ヒトクローディン18.2を過剰発現するCHO-K1の標的細胞系をADCCバイオアッセイに利用したとき、CLDN18.2-vhh50-1.1、CLDN18.2-vhh50-2.1、CLDN18.2-vhh29-3.1、CLDN18.2-vhh32-1.2及びCLDN18.2-vhh25-1.1のヒト化sdAbリードは、IMAB362の参照抗体よりもかなり良好なADCC活性を呈した。また、CLDN18.2-vhh09-1.3、CLDN18.2-vhh42-1.1、CLDN18.2-vhh42-2.2、CLDN18.2-vhh29-1.1、CLDN18.2-vhh29-2.1、CLDN18.2-vhh29-2.3、CLDN18.2-vhh50-2.3及びCLDN18.2-vhh25-2.1のヒト化sdAbリードは、IMAB362の参照抗体よりもわずかに高いADCC活性を示した。図11に示されるように、ヒトクローディン18.2を過剰発現するKATO I I Iの標的細胞系をADCCバイオアッセイに利用したとき、CLDN18.2-vhh50-1.1、CLDN18.2-vhh50-2.1、CLDN18.2-vhh29-3.1、CLDN18.2-vhh32-1.2、CLDN18.2-vhh09-1.3及びCLDN18.2-vhh25-1.1のヒト化sdAbリードは、IMAB362の参照抗体よりもかなり良好なADCC活性を呈した。

30

40

【0091】

抗クローディン18.2抗体で誘導される補体依存細胞傷害性(CDC)アッセイ

50

抗クロードイン18.2 s d A b - F c 融合タンパク質のヒト化候補は、C D C アッセイを用いて機能的にアセスされた。簡潔に述べると、ヒトクロードイン18.2を過剰発現する標的細胞系の5000 CHO - K 1細胞を培養して採取し、それを96ウェルプレートに播種した。50 μ g / m l の濃度から始めて5 × 段階希釈で抗体サンプルをプレートに添加し、37 / 5 % C O 2 でプレートを30分インキュベートした。次いで、精製正常ヒト血清をプレートに添加し、プレートをさらに4時間インキュベートした。インキュベーターからプレートを取り出して上清を採取し、C e l l T i t e r - G l o (登録商標)アッセイキット(P r o m e g a、カタログ番号G 7 5 7 3)で分析した。細胞生存能分析のためにP h e r a S t a r (A M G)により発光データをキャプチャーした。参照抗体としてI M A B 3 6 2 (ゾルベツキシマブ)を比較用に使用した。図10にC D C アッセイ結果を示した。ヒト化s d A b - F c 融合タンパク質のすべては、I M A B 3 6 2 の参照m A b よりもかなり高いC D C 活性を示した。

10

【0092】

F A C S によるヒトクロードイン18.2発現性細胞結合アッセイ

抗体産物の細胞表面クロードイン18.2抗原結合を検証するために、300 n M の濃度から始めて3 × 段階希釈で100 μ l のヒト化抗クロードイン18.2 s d A b - F c 融合タンパク質と共に、ヒトクロードイン18.2を発現するC H O - K 1細胞をインキュベートし、続いてフルオロフォア(i F l u o r 6 4 7)標識ヤギ抗マウスI g G (H + L)二次抗体インキュベーションを行った。次いで、サンプルをフローサイトメトリーで解析した。幾何平均値で抗体 - 抗原結合曲線を作成した。E C 5 0 を解析するために、4パラメーター、最良当てはめ値プログラムを用いて、G r a p h P a d P r i s m v 6 . 0 2 ソフトウェアにより生のデータをプロットした。

20

【0093】

図12に示されるように、ヒト化s d A b リードのすべては、I M A B 3 6 2 の参照抗体よりも高い結合親和性を呈した。

【0094】

配列リスト

実施例中のクローンの全アミノ酸配列が以下に示される。下線付きアミノ酸配列は、それぞれ所与のクローンのC D R 1、C D R 2、C D R 3の指標となる。

> s d a b - 1 (配列番号1)

30

【化1】

QVKLEESGGGLAQAGGSLRLSCAASGRILNIAVMAWYRQTPGRQRELVAAITFGGSTDY
ADAVKGRFTISRDSAKNTVYVLQMNDLKSEDTAVYYCNADVVTGLMRRDVYWGQGTQ
 VTVSS

> s d a b - 2 (配列番号2)

【化2】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASVEIFMMGWYRQAPGKQRELVATISSSGRTNYAD
SVKGRFTISGDNSKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYCHYWRDYWGRGTQVTVSS

40

> s d a b - 3 (配列番号3)

【化3】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSYRINNMAWYRQAPGKQRELVAEITSSDNTY
YADSVKGRFTISRDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYSCNAFIPSVGVFSSRTYWGRGTQ
 VTVSS

> s d a b - 4 (配列番号4)

50

【化 4】

QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIFQINTMGWYRQAPGKQRELVAAITGGSTKY
SDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCNADLKTNSNVFTWYEYWGQGT
QVTVSS

> s d a b - 5 (配列番号 5)

【化 5】

DVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASVGIEMGGWYRQAPGKQRELVATISSSGRTNYAD
SVKGRFTISGDNSMNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCYAHYWRDYWGRGTQVTVSS

10

> s d a b - 6 (配列番号 6)

【化 6】

AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAPSGKIFSIHNMGWYRQAPGKQRELVASTTNDGTTT
YADSVKGRFIISRDIAKNTVYLQMQSLKPEDTAVYYCNAFIVTGFMASGDYWGQGTQV
TVSS

> s d a b - 7 (配列番号 7)

20

【化 7】

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMSWVRQAPGKGLEWVSSTSSSGRTT
SYSDSVKGRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYCAKAGAYSGTDYTLVRYDY
WGQGTPTVSS

> s d a b - 8 (配列番号 8)

【化 8】

DVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDDYGMSWVRQAPGKGLEWVSGISWRGGS
TYAESIKGRFTASRDNAKDTVYLQMNSLKPEDTAVYYCVRGSYYYNSRGYDYWGQG
TPVTVSS

30

> s d a b - 9 (配列番号 9)

【化 9】

DVQLVESGGGLVQAGGSLTLSCAASRSDLFISIMGWYRQAPGKQRELVADISRGGKTNY
ADAVKARATISRDNAKNTMYLQMNNVKPEDTAVYYCYAQISNPFWGDYWGRGTQVT
VSS

40

> s d a b - 10 (配列番号 10)

【化 10】

QVKLEESGGGFVQAGGSLRLSCSASGSIFGITGMAWYRQAPGKERELIAAIGSGSAGNT
KYAESVKGRFTIFGDYAKKTLYLQMNSLKPEDTGVYYCNAGLMTSQSSYSKPYWGLG
TQVTVSA

> s d a b - 11 (配列番号 11)

50

【化 1 1】

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGTLNIPLMAWFRQTPGKQRELVAGITGGTTNY
ADSAKGRFTISRDNAKNTIYLQMDSLKPEDTAVYYCNADVVTGLMRRNVYWGQGTQV
TVSS

> s d a b - 1 2 (配列番号 1 2)

【化 1 2】

QVKLEESGGGLVQAGGSLTLSCAASRSIFSIDVMAWYRQAPGKQRELVARIWADGSTT
YADSMKGRFAISRDTAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYYCNAVGTIADGAFRPYNNWGQG
TQVTVSS

10

> s d a b - 1 3 (配列番号 1 3)

【化 1 3】

AVQLVESGGGLAQAGGSLRLSCAASGRILNMASMAWFRQTPGKQRESVALITFGGTTN
YADSVKGRFTISRDNAKNTVYVLQMNDLKSEDTAVYYCNADVVTGLMRRDVYWGQGT
QVIVSS

20

> s d a b - 1 4 (配列番号 1 4)

【化 1 4】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIYRINMAWYRQAPGKQRELVAEITSSGNTD
YADSVKGRFTISRDNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYSCNAFIIPSVGVFTSRTYWGRGTQ
VTVSS

> s d a b - 1 5 (配列番号 1 5)

【化 1 5】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSILNINSMSWYRQAPGKQRELVATITVGGSTNY
ADSVKGRFTISRYNANMMYLQMNSLKPDDTGVYSCNARIVSGFELRGPDDYWGQGTQ
VTVSS

30

> s d a b - 1 6 (配列番号 1 6)

【化 1 6】

QVQLVESGGQSAQAGGSLRLSCTASGSIFGISGMGWYRQAPGKERELIAAIGSGGDGDT
KYAESVKGRFTISGDYAKKTLYLQMNSLKPEDSGVYYCNAGFMTSRNYYNGDYWGQG
TQVTVAA

40

> s d a b - 1 7 (配列番号 1 7)

【化 1 7】

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVWSGSFDDIGTMGWYRQAPGKQRELVAIAINGAIQN
YAESVKGRFTVSRDNAKNTLYLQMNNLKPEDTAVYYCKMDSOFGPWLROYEYWGQG
TQVTVSP

> s d a b - 1 8 (配列番号 1 8)

50

【化 1 8】

AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIFMINAMGWYRQAPGKQRELVADISRGGSTY
YADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMNSLKPEDTAAYYCHAHDVPPFVPGGKSYWGQGT
QVTVSS

> s d a b - 1 9 (配 列 番 号 1 9)

【化 1 9】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASVSIDGILAMGWYRQAPGKQRELVA TIHSRGNTN
YADSVKGRFTVSR ENNKNTMYLQMNSLKPEDTAVYYCYVHFWIDYWGQGTQVTVSS

10

> s d a b - 2 0 (配 列 番 号 2 0)

【化 2 0】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSFLHIAVMGWYRQAPGKQRELVA TITRGGATH
YADSTKGRFSISSDNAKNAVALQMNSLQPDDTAVYFCNVRALIKVFHPPNDYWGQGTQ
VTVSS

> s d a b - 2 1 (配 列 番 号 2 1)

20

【化 2 1】

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRILNLNDMGWYRQTPGKQRELVA SIFSSGTTN
YADSAKGRFTISRDN AKKMIY LQMNSLKPEDTAVYYCNADVVTGLLQRNVYWGQGTQ
VTVSS

> s d a b - 2 2 (配 列 番 号 2 2)

【化 2 2】

AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSWFRIQTMGWYRQTPGKQRELVA DITTGGGST
YYVDSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMINLKPEDTAAYYCQANVLEALFRPNLEVWGQGT
LVTVSS

30

> s d a b - 2 3 (配 列 番 号 2 3)

【化 2 3】

AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAASGIWLHMVTMGWYRQAPGKQRELVA IITSGGSA
DYADSVKGRFAISRDN TKNTVTLQMNSLKPDDTAVYFCNARVVAD FQKVL DVWGQGT
LVTVSS

40

> s d a b - 2 4 (配 列 番 号 2 4)

【化 2 4】

QVKLEESGGGLVEAGGSLRLSCVASGSILNLMTMGWYRQAPGKQRELVA TATPGGTTN
YADSVKGRFTISRDN AKNTVYLQMNTLRPGDTAVYYCNADV VYGLARQGN YWGPGT
QVTVSS

> s d a b - 2 5 (配 列 番 号 2 5)

50

【化 2 5】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIYRINMAWYRQAPGKQRELVAESTSGGNFIY
ADSVKGRFAISRDNAKNTVYVLQMNSLOPEDTAVYSCNAFIIPSVGVFASRTYWGRGTQV
TVSS

> s d a b - 2 6 (配列番号 2 6)

【化 2 6】

DVQLVESGGGPVQAGGSLRLSCVASGSIYRINEMAWYRQAPGKQRELVAVAPNSVNP
YADSVKGRFTISRGNAKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYSCNAFIIPSVGVFTSRVYWGRGTQ
VTVSS

10

> s d a b - 2 7 (配列番号 2 7)

【化 2 7】

AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAVSGSFLNIVTMGWYRQAPGKQRELVATTTRGGSTN
YADSVKGRFTIARDNAKNTVYVYHMDALKPEDTAVYCYCNAEIIPGFLOQLTLYWGGGTQ
VTVSA

20

> s d a b - 2 8 (配列番号 2 8)

【化 2 8】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSSNADIRFMGWYRQAPGNQRNNQREPVAMVD
TTGRINYADSVKGRFTISRDNKNTVSLQMNSLKPEDTALYYCTAVLWPRGAISAMTV
WGQGTQVTVSS

> s d a b - 2 9 (配列番号 2 9)

【化 2 9】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIYRINMAWYRQIPGKQRELVAEITSSGNTLY
ADSVKGRFTISMDNKNTAYLQMNSLKPEDTAVYSCNAFIIPSVGVFISRTFWGRGTQV
TVSS

30

> s d a b - 3 0 (配列番号 3 0)

【化 3 0】

QVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIYRINMAWYRQAPGKQRELVAEITSSGNTL
YADSVKGRFTISSDGARNTVYVLQMNSLKPEDTAVYSCNAFIIPSVGVFTSRAYWGRGTQ
VTVSS

40

> s d a b - 3 1 (配列番号 3 1)

【化 3 1】

AVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCAASGSIFGFVVMGWYRQAPGNQRELVAMLTSSGTTN
YADSVKGRFTLFRENNKNTVHLMNSLKPEDTGVYYCRAVIRSDSSWRADANEYWGQ
GTHVTVSS

> s d a b - 3 2 (配列番号 3 2)

50

【化 3 2】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAIPGSIVGSTYMGWFRQAPGKQRELVARIAGGGQINY
ADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQMNSLTPEDTAVYYCYVHYWMDYWGQGTQVTVSS

> s d a b - 3 3 (配列番号 3 3)

【化 3 3】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSYRINNMAWYRQAPGKQRELVAEITNSGNTL
YTDSVKGRFTISMDGAKNAVYLYQMNSLKPEDTAVYSCNAFIIPSVGVFTRAYWGRGT
 QVTVSS

10

> s d a b - 3 4 (配列番号 3 4)

【化 3 4】

QVKLEESGGGLVQTGGSLSLSCVASGSGISINTMGWYRQGPBKQRELVAVGKYGETNY
ADSVKGRFTISRDDAKKTVYLRMNSLKPEDTAVYYCNADVLAAGWWSGRVVLWGQGT
 QVTVSS

> s d a b - 3 5 (配列番号 3 5)

【化 3 5】

AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIFQINTMGWYRQAPGKQREWVTGITGGTTR
YADSVKGRFTISRDNANKNTVYLYQMNSLKPEDTAVYYCNSDLKTTSNVFWYEWYWGQG
 TQVTVSA

20

> s d a b - 3 6 (配列番号 3 6)

【化 3 6】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAISGSIFSNTYMGWYRQAPGRQRELVARISGGGSVHY
LDSVKGRFTISRDNANKNTLNLQMNSLTPEDTAIYYCYAHYWMDYWGQGTQVTVSS

30

> s d a b - 3 7 (配列番号 3 7)

【化 3 7】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNFLNIVTMGWYRQAPGKQRELVATITRGGSTS
YSDSVKGRFTISRDNANKSTVYLYQMNSLKPEDTAVYYCNADIIPGFLOQLTVHWGQGT
 VTVSS

> s d a b - 3 8 (配列番号 3 8)

【化 3 8】

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCVASGSIFHIPIMSWYRRAPGKQRELVAGISTGGSTNYA
DSVKGRFTISRDNANKNTVYLYQMNSLKPDDTAVYYCNSLIKEEAWGTFGDYWGQGTQV
 TVSS

40

> s d a b - 3 9 (配列番号 3 9)

50

【化 3 9】

QVKLEESGGGLAEAGGSLRLSCVASGSIFMIVTMGWYRQAPGKQRELVASITRGGSTNY
ADFVKGRFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYFCNADDVPPLTLTRVIYWGGGTQV
TVSS

> s d a b - 4 0 (配列番号 4 0)

【化 4 0】

QVQLVESGGGLVQAGGSLRVSCAASGRTSSIIDMAWYRQAPGNREFVARIVWRSSGS
TSYADSVKGRFTISRNTAKNTVYVLQMNSLKPEDTAMYYCRAFEFPLOIGGQNVYYWGQ
GTQVTVSS

10

> s d a b - 4 1 (配列番号 4 1)

【化 4 1】

QVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCAASGSPFGFVVMGWYRQAPGKQRDMVATLTSSGAT
TYADSVKGRFTLSRENAKNTIHLQMNSLKPEDTAVYYCRAVLRSGDNWMAAANEYW
GQGHVTVSS

20

> s d a b - 4 2 (配列番号 4 2)

【化 4 2】

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLACAASGRAIGTYDINWYRQAPGQREFVAFINYRGGGA
TYADSVKDRFTISRDNAAANTVYVLQMNSLKPEDTAIYLCNAHERFPMGRPPYDYWGQGT
QVTVTS

> s d a b - 4 3 (配列番号 4 3)

【化 4 3】

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCEASGPARNNYMGMWFRQAPGKERELVARINLSGSSI
YYADSVKGRFTISRDNKNTMSLQMNSLKPGDAAARYYCHARDIVPGAQDYWGQGTQV
TVSA

30

> s d a b - 4 4 (配列番号 4 4)

【化 4 4】

EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIYRINTVAWYRQAPGKQRELVAEITSSGNRDY
ADSVKGRFTISRDNKNTVYVLQMNSLKPEDTAVYSCNAFIIPSVGLFTSRTYWGRGTQV
TVSS

40

> s d a b - 4 5 (配列番号 4 5)

【化 4 5】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSISGINYMAWYRQAPGKQRDLVARAWTTGPPT
YAESVKGRFTISRDNKNTVYVLQMNNLKPEDTGVYYCTANTLTSGYWGGQIQVTVSS

> s d a b - 4 6 (配列番号 4 6)

50

【化 4 6】

AVQLVDSGGGLVQAGGSLRLSCAASPTIFVTDVMAWYRQAPGNQRELVATLLGRSTTN
YADSVKGRFTISRDNANTVYQLQMNTLKPEDTAVYYCNLHRNLFNKIDNYWGQGTQV
TVSS

> s d a b - 4 7 (配列番号 4 7)

【化 4 7】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAVSGNFLNIVTMGWYRQAPGKQRELVATITRGGITN
YSDSVKGRFTISRDNANTVYQLQMNSLKPEDTAVYYCNADIHPGFLOQLTVHWGQGAQ
VTVSS

10

> s d a b - 4 8 (配列番号 4 8)

【化 4 8】

QVKLEESGGGLVQAGGSLGLSCAASGTILHYMVMGWYRQAPGKQRELVATITIGGTT
NYADSVKGRFTISRDNANTVYQLQMNTLTPGDTAVYYCNADVYGLARSGNYWGPPT
QVTVSS

20

> s d a b - 4 9 (配列番号 4 9)

【化 4 9】

QVQLVESGGDLVQAGGSLRLSCAASGSPFGFVVMGWHRQAPGKQRELVAMLTSSGTT
NYADSVKGRFTLSRENTKNTVHLQMNLKLPEDTAVYYCRAVLRSGSDWRAAANEYW
GQGTHTVTVSS

> s d a b - 5 0 (配列番号 5 0)

【化 5 0】

QVKLEESGGGLVQAGGSLRLSCAASGSIYRINAMAWYRQAPGKQREYVAEITSTGNTD
YADSVKGRFTISRDNANTVYQLQMNSLKPEDTAVYSCNAFIIPSVGMFTSRTYWGRTQ
VTVSS

30

ヒト I g G 1 F c 領域 : (配列番号 5 1)

【化 5 1】

EPKSGDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI
EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY
KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFNCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

下記タンパク質配列は、ヒト化 s d A b 配列である。

> C L D N 1 8 . 2 - v h h 0 9 - 1 . 3 (配列番号 2 0 2)

【化 5 2】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRSDLFISIMGWYRQAPGKGREWVSDISRGGKTNY
ADAVKARFTISRDNANTVYQLQMNSLRAEDTAVYYCAAQISNPFWGDYWGQGTILTV
SS

> C L D N 1 8 . 2 - v h h 4 2 - 1 . 1 (配列番号 2 0 3)

50

【化 5 3】

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGRAIGTYDTNWYRQAPGKGREFVAFINYRGGGA
TYADSVKDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHERFPMGRPPYDYWGQ
TLVTVSS

> CLDN18.2-vhh42-2.2 (配列番号 204)

【化 5 4】

QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYDTNWYRQAPGKGREFVAFINYRGGGA
TYADSVKDRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHERFPMGRPPYDYWGQ
TLVTVSS

10

> CLDN18.2-vhh50-1.1 及び CLDN18.2-vhh50-2.1 (配列番号 205) それらは、同一タンパク質配列を共有する。

【化 5 5】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIYRINAMAWYRQAPGKGREYVSEITSTGNTDY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAFIPSVGMFTSRTYWGQGLV
TVSS

> CLDN18.2-vhh50-2.3 (配列番号 206)

【化 5 6】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIYRINAMAWYRQAPGKGREWVSEITSTGNTD
YADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAFIPSVGMFTSRTYWGQGL
VTVSS

20

> CLDN18.2-vhh29-1.1 (配列番号 207)

【化 5 7】

EVQLVESGGGLIQPGGSLRLSCAASGSIYRINNMAWYRQAPGKGRELVSEITSSGNTLYA
DSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAFIPSVGVFISRTFWGQGTTVTV
SS

30

> CLDN18.2-vhh29-2.1 (配列番号 208)

【化 5 8】

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGSIYRINNMAWYRQAPGKGRELVSEITSSGNTLY
ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAFIPSVGVFISRTFWGQGLTV
VSS

> CLDN18.2-vhh29-2.3 (配列番号 209)

【化 5 9】

QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGSIYRINNMAWYRQAPGKGREWVSEITSSGNTL
YADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAFIPSVGVFISRTFWGQGL
VTVSS

40

> CLDN18.2-vhh29-3.1 (配列番号 210)

【化 6 0】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIYRINNMAWYRQAPGKGRELVSEITSSGNTLY
ADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAFIPSVGVFISRTFWGQGLTV
VSS

> CLDN18.2-vhh32-1.2 (配列番号 211)

50

【化61】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTVSSITYMGWFRQAPGKGRELVSRIAGGGQIN
YADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAHYWMDYWGQGLVTVSS

> CLDN18.2-vhh25-1.1 (配列番号212)

【化62】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIYRINNMAWYRQAPGKGRELVSESTSGGNFIY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAFIIPSVGVFASRTYWGQGLV
 TVSS

10

> CLDN18.2-vhh25-2.1 (配列番号213)

【化63】

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSIYRINNMAWYRQAPGKGRELVSESTSGGNFIY
ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAFIIPSVGVFASRTYWGQGLV
 TVSS

【0095】

下記の表は、それぞれのクローンのCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列を示す。

【0096】

20

【表2】

クローン	CDR1	配列番号	CDR2	配列番号	CDR3	配列番号
sdab-1	IAVMA	52	AITFGGSTDYADAVKG	53	DVVTGLMRRDVY	54
sdab-2	FMMG	55	TISSSGRTNYADSVKG	56	HYWRDY	57
sdab-3	INNMA	58	ETSSDNTYYADSVKG	59	FHPSVGVFSSRTY	60
sdab-4	INTMG	61	AITGGSTKYSDSVKG	62	DLKTNSNVFTWYDY	63
sdab-5	FMGG	64	TISSSGRTNYADSVKG	65	HYWRDY	66
sdab-6	IHNMG	67	STNDGTTTYADSVKG	68	FIVTGFMASGDY	69
sdab-7	TYAMS	70	STSSSGRTTYSYSDSVKG	71	AGAYSGTDYYTLVRYDY	72
sdab-8	DYGMS	73	GISWRGGSTYYAESIKG	74	GSYYNSRGYDY	75
sdab-9	ISIMG	76	DISRGGKTYADAVKA	77	QISNPFWDY	78

30

【0097】

40

50

【表 3】

sdab-10	ITGMA	79	AIGSGSAGNTKYAESVKG	80	GLMTSQSYYSKPY	81
sdab-11	IPLMA	82	GITTGGTTNYADSAKG	83	DVVTGLMRRNVY	84
sdab-12	IDVMA	85	RIWADGSTTYADSMKG	86	VGTIADGAFRPYNN	87
sdab-13	MASMA	88	LITFGGTTNYADSVKG	89	DVVTGLMRRDVY	90
sdab-14	INNMA	91	EITSSGNTDYADSVKG	92	FIIPSVGVFTSRTY	93
sdab-15	INSMS	94	TTTVGGSTNYADSVKG	95	RIVSGFLRGPDDY	96
sdab-16	ISGMG	97	AIGSGGDGDTKYAESVKG	98	GFMTSRNYNGDY	99
sdab-17	IGTMG	100	IATNGAIQNYAESVKG	101	DSQFGPWLRQYFY	102
sdab-18	INAMG	103	DISRGGSTYYADSVKG	104	HDVPPFVPGGKSY	105
sdab-19	ILAMG	106	TIHSRGNTNYADSVKG	107	HFWDY	108
sdab-20	IAVMG	109	TTTRGGATHYADSTKG	110	RALIKVFHPPNDY	111
sdab-21	LNDMG	112	SIFSSGTTNYADSAKG	113	DVVTGLLQRNVY	114
sdab-22	IQTMG	115	DITGGGGSTYYVDSVKG	116	NVLEALFRPNLEV	117
sdab-23	MVTMG	118	IITSGGSADYADSVKG	119	RVVADFQKVLVDV	120
sdab-24	LMTMG	121	TATPGGTTNYADSVKG	122	DVVYGLARQGNV	123
sdab-25	INNMA	124	ESTSGGNFIYADSVKG	125	FIIPSVGVFASRTY	126
sdab-26	INEMA	127	VAPNSVNPNYADSVKG	128	FIIPSVGVFTSRVY	129
sdab-27	IVTMG	130	TTTRGGSTNYADSVKG	131	EHPGFLQQLTLY	132
sdab-28	DIRFMG	133	MVDTTGRINYADSVKG	134	VLWPRGAISAMTV	135
sdab-29	INNMA	136	EITSSGNTLYADSVKG	137	FIIPSVGVFISRTF	138
sdab-30	INNMA	139	EITSSGNTLYADSVKG	140	FIIPSVGVFTSRAY	141
sdab-31	FVVMG	142	MLTSSGTTNYADSVKG	143	VIRSDSSWRADANEY	144
sdab-32	STYMG	145	RIAGGGQINYADSVKG	146	HYWMDY	147
sdab-33	INNMA	148	EITNSGNTLYTDSVKG	149	FIIPSVGVFTSRAY	150
sdab-34	INTMG	151	IVGKYGETNYADSVKG	152	DVLAAGWWSGRVL	153
sdab-35	INTMG	154	GITTGGTTRYADSVKG	155	DLKTTSNVFQWYFY	156
sdab-36	NTYMG	157	RISGGGSVHYLDSVKG	158	HYWMDY	159

【 0 0 9 8 】

10

20

30

40

50

【表 4】

sdab-37	IVTMG	160	TTTRGGSTSYSDSVKG	161	DIIPGFLQQLTVH	162
sdab-38	IPIMS	163	GISTGGSTNYADSVKG	164	LIKEEAWGTFGDY	165
sdab-39	IVTMG	166	SITRGGSTNYADSVKG	167	DDVPPLTLTRVIY	168
sdab-40	IYDMA	169	RIVWRSGGSTSYADSVKG	170	FEFPLQIGGQNVYY	171
sdab-41	FVVMG	172	TLTSSGATTYADSVKG	173	VLRSGDNWMAAAANEY	174
sdab-42	TYDIN	175	FINYRGGGATYADSVKD	176	HERFPMGRPPYDY	177
sdab-43	NYVMG	178	RINLSGSSYYADSVKG	179	RDIVPGAQDY	180
sdab-44	INTVA	181	EITSSGNRDYADSVKG	182	FIIPSVGLFTSRTY	183
sdab-45	INYMA	184	RAWTTGPPTYAESVKG	185	NLTLSGY	186
sdab-46	TDVMA	187	TLLGRSTTNYADSVKG	188	HRNLFNKIDNY	189
sdab-47	IVTMG	190	TTTRGGTTNYSDSVKG	191	DIIPGFLQQLTVH	192
sdab-48	VMVMG	193	TQTIGGTTNYADSVKG	194	DVVYGLARSGNY	195
sdab-49	FVVMG	196	MLTSSGTTNYADSVKG	197	VLRSGSDWRAAAANEY	198
sdab-50	INAMA	199	EITSTGNTDYADSVKG	200	FIIPSVGMFTSRTY	201

10

20

【0099】

1つ以上の実施形態に関連して本発明を以上で説明したが、本発明は、それらの実施形態に限定されず、記載内容は、添付の請求項の趣旨及び範囲に含まれ得るすべての代替形態、修正形態及び均等物を包含することが意図されることが理解されるべきである。

【0100】

本明細書で引用した参照文献は、すべてその全体が参照により組み込まれる。

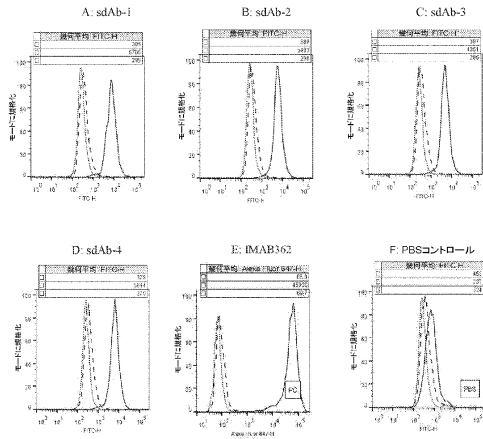
30

40

50

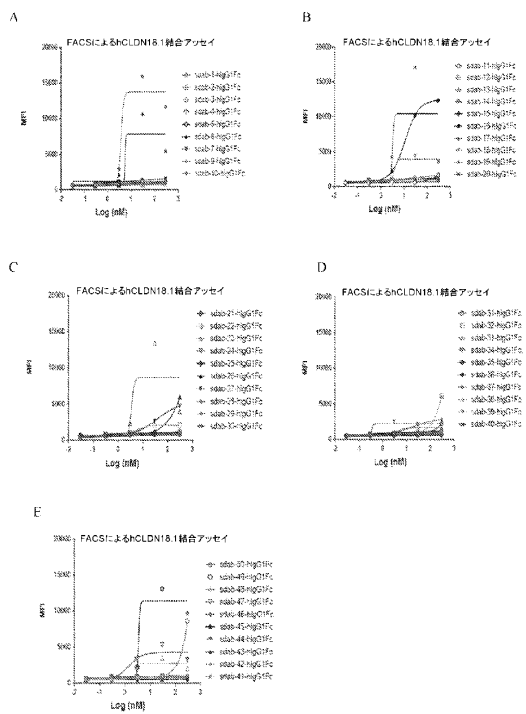
【 図面 】

【 図 1 】



(.....) HEK293 WT細胞系 + サンプル
 (.....) ヒトクローニン18.2+ HEK293細胞 + サンプル
 (.....) ヒトクローニン18.1+ HEK293細胞 + サンプル

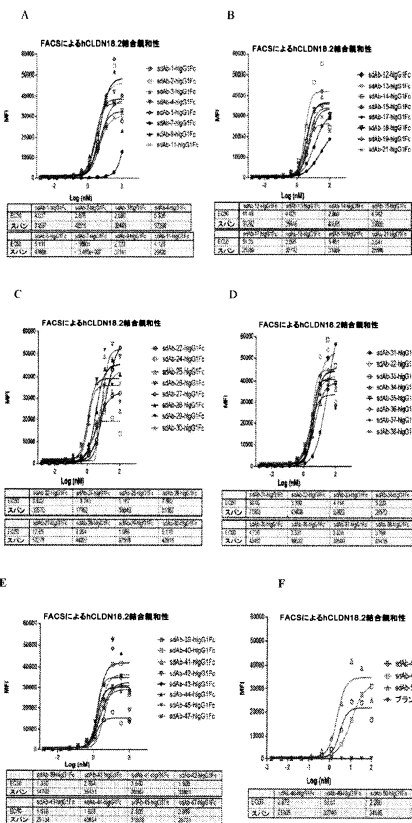
【 図 2 】



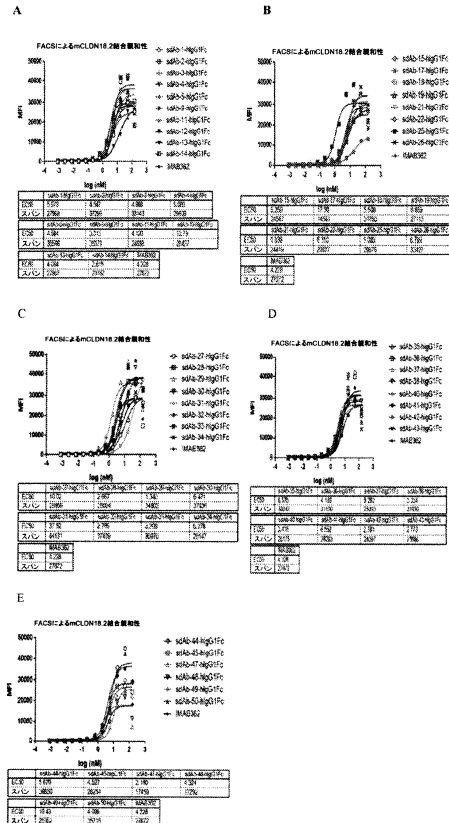
10

20

【 図 3 】



【 図 4 】

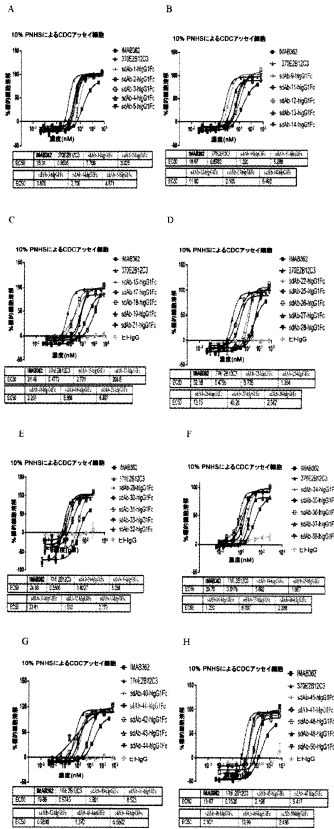


30

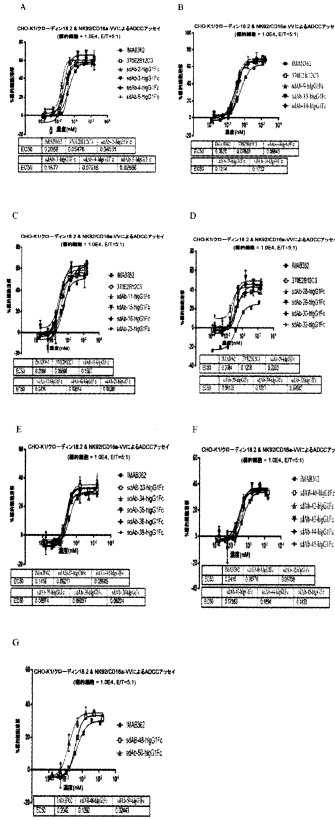
40

50

【 図 5 】



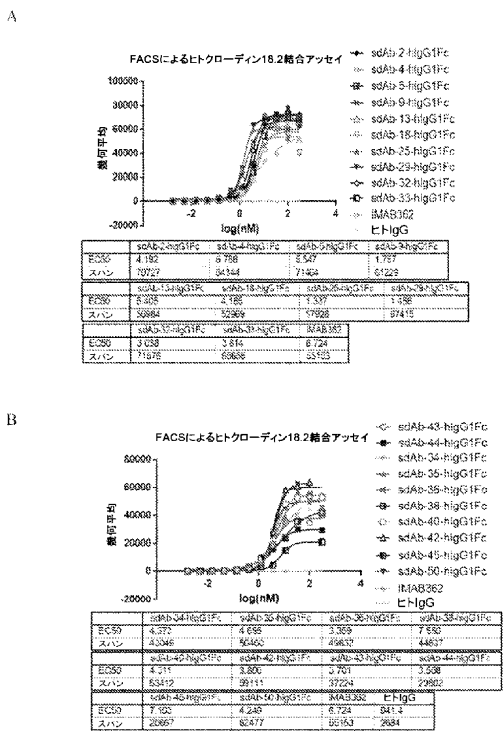
【 図 6 】



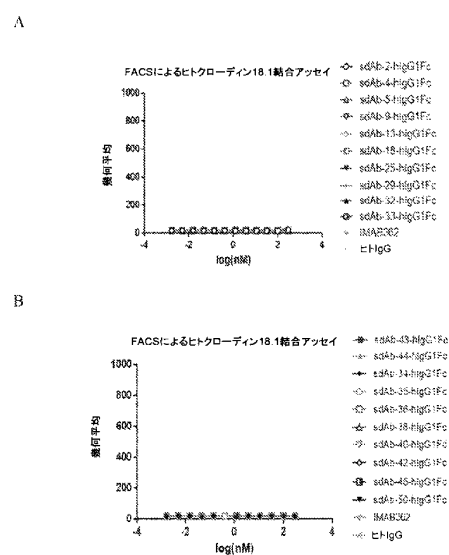
10

20

【 図 7 】



【 図 8 】



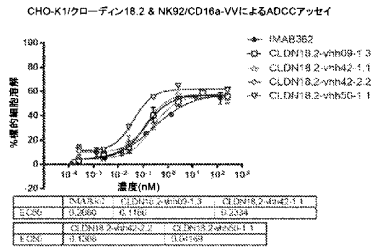
30

40

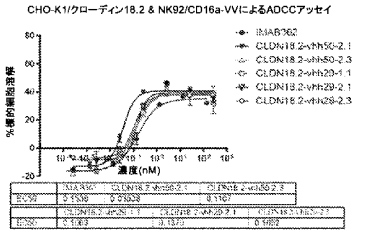
50

【 図 9 】

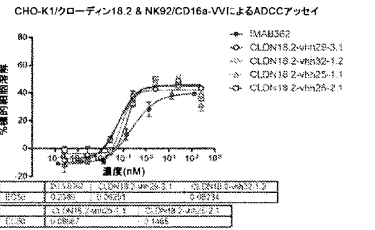
A



B

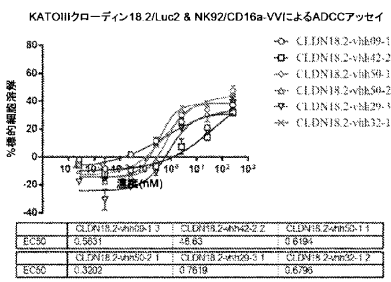


C

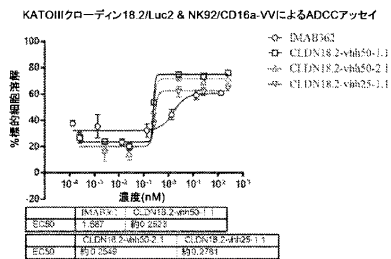


【 図 11 】

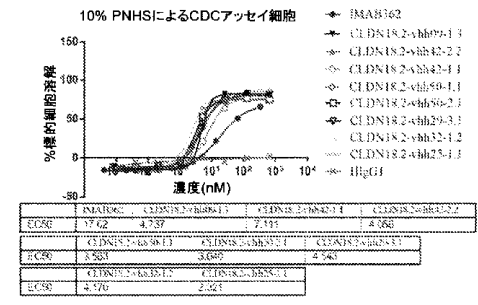
A



B



【 図 10 】

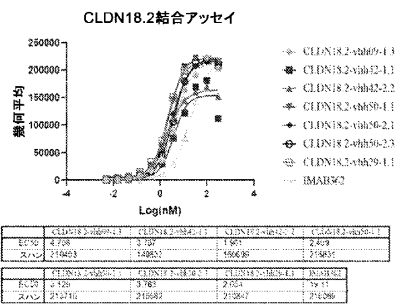


10

20

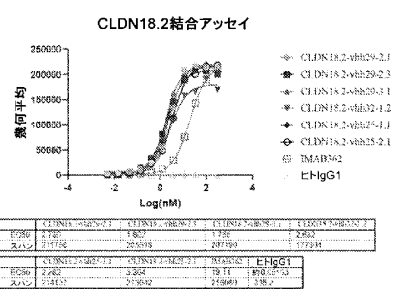
【 図 12 】

A



30

B



40

【 配列表 】

202354349300001.app

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2021/121585
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K 16/30(2006.01)i; C07K 19/00(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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) 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) DWPI; SIPOABS; CNABS; CNKI; NCBI; ISI Web of knowledge; ELSEVIER and keywords: Claudin 18.2 , CLD18A2, CLDN18.2, antibody, sdAb, nanobody, VHH, single domain antibody, , etc.; GenBank; EMBL; Retrieving System for Biological Sequence of Chinese Patent and searched sequences: SEQ ID NOS: 1, 52, 53, 54		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111434692 A (ZHEJIANG DOER BIOLOGICS CORPORATION) 21 July 2020 (2020-07-21) the abstract, claims 1-20	1, 4-8 and 11-20 (all partially)
A	WO 2020114480 A1 (ZAILAB SHANGHAI CO LTD) 11 June 2020 (2020-06-11) the abstract, claims 1-97	1, 4-8 and 11-20 (all partially)
A	CN 109762067 A (BEIJING MABWORKS BIOTECH CO., LTD.) 17 May 2019 (2019-05-17) the abstract, claims 1-18	1, 4-8 and 11-20 (all partially)
A	CN 110606891 A (L&L BIOPHARMA, CO., LTD.) 24 December 2019 (2019-12-24) the whole document	1, 4-8 and 11-20 (all partially)
A	WO 2018006882 A1 (CARSGEN THERAPEUTICS CO LTD) 11 January 2018 (2018-01-11) the whole document	1, 4-8 and 11-20 (all partially)
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 15 December 2021		Date of mailing of the international search report 31 December 2021
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer YANG, Zhenyu
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. 86-(10)-62412204

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (January 2015)

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121585

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)	
	<p>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:</p> <p>a. <input checked="" type="checkbox"/> forming part of the international application as filed:</p> <p style="padding-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p style="padding-left: 20px;"><input checked="" type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file.</p> <p>b. <input type="checkbox"/> furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.</p> <p>c. <input type="checkbox"/> furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).</p> <p style="padding-left: 20px;"><input type="checkbox"/> on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).</p> <p>2. <input type="checkbox"/> In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.</p> <p>3. Additional comments:</p> <p>[1] Where the international application contains disclosure of one or more nucleotide and/or amino acid sequences, the description does not contain a separate sequence listing part complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions. Therefore, the international application does not meet the requirements of PCT Rule 5.2 (a).</p>	10
		20
		30
		40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121585

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.: 21,22
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1(iv) - Method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
- 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).

10

20

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

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

- [1] Invention 1, claims 1, 4-8, 11 and 13-20 (all partially), directed to an isolated antibody comprising a monomeric variable domain comprising CDR1, CDR2 and CDR3 defined in claim 1 (1), and corresponding bispecific molecule, nucleic acid molecule, expression vector, host cell and pharmaceutical composition;
- [2] inventions 2-32, claims 1, 4-8, 11 and 13-20 (all partially), respectively, directed to an isolated antibody comprising a monomeric variable domain comprising CDR1, CDR2 and CDR3 defined in claim 1 (2)-(4), (7)-(16), (18), (19), (21), (22), (24)-(31) and (33)-(38), and corresponding bispecific molecule, nucleic acid molecule, expression vector, host cell and pharmaceutical composition;
- [3] inventions 33-39, claims 1-20 (all partially), respectively, respectively, directed to an isolated antibody comprising a monomeric variable domain comprising CDR1, CDR2 and CDR3 defined in claim 1 (5), (6), (17), (20), (23), (32) and (39), and corresponding bispecific molecule, nucleic acid molecule, expression vector, host cell and pharmaceutical composition.
- [4] The same or corresponding technical feature of inventions 1-39 is an isolated anti-Claudin 18.2 antibody comprising a monomeric variable domain. Such a technical feature has been disclosed by the prior art (e.g. WO2020114480A1, see claims 1 and 23). It follows that the same or corresponding technical feature of inventions 1-39 does not make a contribution over the prior art and cannot be considered as a special technical feature within the meaning of PCT Rule 13.2. The application, hence does not meet the requirements of unity of invention as defined in PCT Rules 13.1.

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/121585

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

- 1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
- 2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
- 3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
- 4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **claims 1, 4-8, 11 and 13-20 (all partially)**

10

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

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/121585

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	111434692	A	21 July 2020	EP	3913001	A1	24 November 2021
				WO	2020147451	A1	23 July 2020
				AU	2019422629	A1	02 September 2021
WO	2020114480	A1	11 June 2020	KR	20210100655	A	17 August 2021
				IL	283754	D0	29 July 2021
				AU	2019391204	A1	24 June 2021
				SG	11202105885W	A	29 July 2021
				CA	3122135	A1	11 June 2020
				EP	3891183	A1	13 October 2021
CN	109762067	A	17 May 2019	CA	3104383	A1	23 July 2020
				AU	2019422603	A1	07 January 2021
				CN	112399974	A	23 February 2021
				WO	2020147321	A1	23 July 2020
				KR	20210116207	A	27 September 2021
				US	10421817	B1	24 September 2019
				EP	3683239	A1	22 July 2020
				JP	2021509889	A	08 April 2021
			JP	6927639	B2	01 September 2021	
CN	110606891	A	24 December 2019	None			
WO	2018006882	A1	11 January 2018	CL	2019000061	A1	03 May 2019
				JP	2019531084	A	31 October 2019
				CA	3030257	A1	11 January 2018
				EP	3483182	A1	15 May 2019
				EP	3483182	A4	29 July 2020
				RU	2019101430	A	10 August 2020
				RU	2019101430	A3	17 May 2021
				CN	109790222	A	21 May 2019
				IL	264144	D0	28 February 2019
				US	2019233511	A1	01 August 2019
				US	11111295	B2	07 September 2021
				KR	20190038564	A	08 April 2019
				BR	112019000327	A2	13 August 2019
AU	2017294276	A1	28 February 2019				
			SG	11201900171Q	A	27 February 2019	

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2015)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
C 0 7 K 14/725 (2006.01)	C 0 7 K 14/725	
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
C 1 2 N 1/15 (2006.01)	C 1 2 N 1/15	
C 1 2 N 1/19 (2006.01)	C 1 2 N 1/19	
C 1 2 N 1/21 (2006.01)	C 1 2 N 1/21	
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 2 1
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
	A 6 1 K 39/395	T

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

(特許庁注：以下のものは登録商標)

1. TRITON

弁理士 緒方 雅昭

(72)発明者 イン、リュウソン

中華人民共和国 2 1 1 1 0 0 チアンス ナンキン ジャンニン ディストリクト シャンユエン ス
トリート 8 8 ルーム 5 5 - 2 0 3

(72)発明者 リ、チョンダオ

中華人民共和国 2 1 1 1 0 0 チアンス ナンキン ジャンニン サイエンス パーク ヨンシー ロ
ード 2 8

(72)発明者 チャオ、チーフイ

中華人民共和国 2 1 1 1 0 0 チアンス ナンキン ジャンニン サイエンス パーク ヨンシー ロ
ード 2 8

Fターム (参考) 4B065 AA01X AA57X AA72 AA87X AA92Y AA94Y AB01 AC14 BA02 CA25
CA44
4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZC751
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB36 BB42 CC01 CC08 CC21 EE01
EE03
4H045 AA11 AA30 DA76 EA28 FA74