

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6636016号  
(P6636016)

(45) 発行日 令和2年1月29日 (2020.1.29)

(24) 登録日 令和1年12月27日 (2019.12.27)

(51) Int. Cl.	F I
<b>C O 7 K</b> 16/28 (2006.01)	C O 7 K 16/28 Z N A
<b>C 1 2 Q</b> 1/04 (2006.01)	C 1 2 Q 1/04
<b>G O 1 N</b> 33/574 (2006.01)	G O 1 N 33/574 A
<b>C 1 2 N</b> 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13

請求項の数 12 (全 43 頁)

(21) 出願番号	特願2017-514958 (P2017-514958)	(73) 特許権者	516357063
(86) (22) 出願日	平成27年5月28日 (2015.5.28)		スプリング バイオサイエンス コーポレ ーション
(65) 公表番号	特表2017-524725 (P2017-524725A)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 945 88, プレザントン, ハシエンダ ド ライブ 4300
(43) 公表日	平成29年8月31日 (2017.8.31)		
(86) 国際出願番号	PCT/EP2015/061777	(74) 代理人	110002077
(87) 国際公開番号	W02015/181267		園田・小林特許業務法人
(87) 国際公開日	平成27年12月3日 (2015.12.3)	(72) 発明者	チュー, イーフェイ
審査請求日	平成30年5月24日 (2018.5.24)		アメリカ合衆国 カリフォルニア 951 31, サン ノゼ, マックスウェル ウェイ 1408
(31) 優先権主張番号	62/004,605		
(32) 優先日	平成26年5月29日 (2014.5.29)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		
(31) 優先権主張番号	62/082,681		
(32) 優先日	平成26年11月21日 (2014.11.21)		
(33) 優先権主張国・地域又は機関	米国 (US)		

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗 B7-H3 抗体及びその診断用途

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

重鎖 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列と軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含む単離された抗体であって、アミノ酸配列 K H S D S K E D D G Q E I A (配列番号 1) を含むヒト B7-H3 のエピトープに結合し、かつ / 又は当該エピトープについて少なくとも  $6.7 \times 10^{-11}$  M の半数効果濃度 (EC<sub>50</sub>) を有し、

H C が

(a) アミノ酸配列 S Y G V S (配列番号 2) を含む H C C D R 1 ; 及び

(b) アミノ酸配列 G S G K R G N P Y Y A S W A K S (配列番号 3) を含む H C C D R 2 ; 及び

(c) アミノ酸配列 R A P V V S T S M T F N I (配列番号 4) を含む H C C D R 3

を含み ; かつ

L C が

(a) アミノ酸配列 Q A S Q S V Y N N K N L S (配列番号 5) を含む L C C D R 1 ; 及び

(b) アミノ酸配列 E A S T L A S (配列番号 6) を含む L C C D R 2 ; 及び

(c) アミノ酸配列 Q G E F T C S G A D C G A (配列番号 7) を含む L C C D R 3

を含む、

抗体。

【請求項 2】

H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 1 1 のアミノ酸配列を含み、かつ / 又は

L C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が配列番号 1 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

抗体がモノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体からなる群より選択される、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体の抗原結合断片であって、抗原結合断片が F a b、F ( a b ' ) 2、F a b '、s c F<sub>v</sub>、及び F<sub>v</sub> からなる群より選択される、抗原結合断片。

【請求項 5】

生物学的試料中の B 7 - H 3 を検出する方法であって、試料を請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 4 に記載の抗原結合断片と接触させることと、抗体又は抗原結合断片の B 7 - H 3 への結合により形成される複合体を検出することとを含み、任意で、試料が細胞試料又は組織試料を含む、方法。

【請求項 6】

試料ががん罹患していると診断されるか、罹患していることが疑われるか、又はがん罹患するリスクがある対象から得られており、がんが膀胱移行上皮細胞癌、腎細胞癌、及び肺扁平上皮癌からなる群より選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 7】

対象から単離された試料中の病的細胞を検出する方法であって、

( a ) 生物学的試料中の B 7 - H 3 に結合する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 4 に記載の抗原結合断片により形成された複合体を検出することによって、対象からの生物学的試料中の B 7 - H 3 のレベルを検出すること；及び

( b ) 工程 ( a ) で観察された B 7 - H 3 のレベルを対照生物学的試料中で観察された B 7 - H 3 のレベルと比較すること

を含み、

B 7 - H 3 のレベルが対照生物学的試料中で観察されるレベルと比較して上昇する場合に病的細胞が検出される、方法。

【請求項 8】

対象の生物学的試料が膀胱、腎臓又は肺から単離された一又は複数の試料を含む、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

検出が免疫細胞化学 ( I C C )、免疫組織化学 ( I H C )、ウェスタンブロッティング又は E L I S A のうちの一又は複数を含む、請求項 5 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

対象が哺乳動物であり、任意で、哺乳動物がネズミ、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウシ、サル、及びヒトの群から選択される、請求項 7 から 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 11】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体又は請求項 4 に記載の抗原結合断片、及び使用説明書を含む、B 7 - H 3 を検出するためのキット。

【請求項 12】

腫瘍試料中の B 7 - H 3 を検出する方法であって、

( a ) 重鎖 ( H C ) 免疫グロブリン可変ドメイン配列及び軽鎖 ( L C ) 免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む抗体又は抗体の抗原結合断片と試料を接触させることであって、ここで抗体はアミノ酸配列 K H S D S K E D D G Q E I A ( 配列番号 1 ) を含むヒト B

10

20

30

40

50

7 - H 3 のエピトープに結合し、かつ / 又は 当該エピトープについて少なくとも  $6 \cdot 7 \times 10^{-11}$  M の半数効果濃度 (  $EC_{50}$  ) を有し、

H C は

( i ) アミノ酸配列 S Y G V S ( 配列番号 2 ) を含む H C C D R 1 ;

( i i ) アミノ酸配列 G S G K R G N P Y Y A S W A K S ( 配列番号 3 ) を含む H C C D R 2 ; 及び

( i i i ) アミノ酸配列 R A P V V S T S M T F N I ( 配列番号 4 ) を含む H C C D R 3

を含み ; かつ

L C は

( i ) アミノ酸配列 Q A S Q S V Y N N K N L S ( 配列番号 5 ) を含む L C C D R 1 ;

( i i ) アミノ酸配列 E A S T L A S ( 配列番号 6 ) を含む L C C D R 2 ; 及び

( i i i ) アミノ酸配列 Q G E F T C S G A D C G A ( 配列番号 7 ) を含む L C C D R 3 ;

を含むこと ; 並びに

( b ) 抗体又は抗原結合断片の B 7 - H 3 への結合により形成された複合体を検出すること

を含む、方法。

10

20

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

関連出願の相互参照

本出願は、内容全体が参照により本明細書に援用される、2014年5月29日出願の米国特許出願公開第62/004605号及び2014年11月21日出願の米国特許出願公開第62/082681号の利益を主張する。

【0002】

発明の背景

発明の分野

30

本開示は、新規の B 7 - H 3 抗体、それを含む組成物、及び腫瘍を含めた組織中の B 7 - H 3 を検出するための、その使用方法に関する。前記 B 7 - H 3 抗体の免疫原決定基を含む単離されたペプチド及び融合タンパク質も本明細書で提供される。

【0003】

関連技術の記載

以下の説明は、読者の理解を助けるために提供される。提供されている情報又は引用参照文献のいずれも、先行技術とは認められない。

【0004】

B 7 - H 3 は、他の B 7 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 I 型膜貫通タンパク質である。ネズミ B 7 - H 3 は単一の細胞外可変型免疫グロブリン ( I g ) V - I g C ドメインおよびシグネチャー細胞内ドメイン ( signature intracellular domain ) ( 2 I g B 7 - H 3 ) からなるが、ヒト B 7 - H 3 は、付加アイソフォーム、いわゆる 4 I g B 7 - H 3 を有し、これは I g V - I g C ドメインのほぼ正確なタンデム複製を含む。4 I g 転写物は、ヒト組織において支配的な形態である。

40

【0005】

今のところ、転写物 2 ( T L T - 2 ) のような骨髓細胞 ( T R E M - ) 上に発現されるトリガー受容体と呼ばれるネズミ B 7 - H 3 の潜在的受容体の一つだけが同定されている。T L T - 2 は T R E M 受容体ファミリーに属し、細胞応答のモジュレーターとして機能し、自然免疫及び適応免疫の両方において重要な役割を果たす。T L T - 2 タンパク質の発現は、恒常的に C D 8 <sup>+</sup> T 細胞上に示され、活性化 C D 4 <sup>+</sup> T 細胞上に誘導される。

50

## 【0006】

アクセサリ共刺激分子として、B7-H3タンパク質は、T細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、及びAPC上に恒常的に発現されるわけではないが、その発現はこれらの細胞型に誘導され得る。B7-H3タンパク質は、骨芽細胞、線維芽細胞、線維芽細胞様滑膜細胞、及び上皮細胞並びにヒト肝臓、肺、膀胱、精巣、前立腺、胸部、胎盤及びリンパ器官においても見られる。この広い発現パターンは、特に末梢組織におけるB7-H3の比較的多様な免疫学的及びおそらくは非免疫学的機能を示唆している。

## 【0007】

B7-H3発現は、前立腺癌、腎明細胞癌（ccRCC）、非小細胞肺癌（NSCLC）、脾臓がん、胃がん、卵巣がん、結腸直腸がん（CRC）、及び尿路上皮細胞癌を含む様々な異なるヒトのがんにおいても見出されている。前立腺がんでは、B7-H3の発現の強さは、腫瘍体積、前立腺外の浸潤又はグリーソンスコアなどの臨床病理学的な悪性度と正の相関を持ち、またがんの進行とも相関する。さらに、卵巣がんにおいて、B7-H3の発現は、リンパ節転移及び病理学的進行と相関する。したがって、生物学的試料のB7-H3タンパク質の量を測定することは、がん病態の早期発見を助け、B7-H3タンパク質の結合を阻害する治療薬の有効性及び持続性を評価するのに役立つ。

10

## 【0008】

しかし、がんの、及び/又は抗B7-H3標的療法の有効性の正確な予測因子としてのB7-H3タンパク質発現の使用は、依然として課題である。M3.2D7のようなB7-H3に対する多くの市販の抗体は、B7-H3-Igタンパク質に特異的に結合せず、それゆえに信頼性の低い診断試薬となっている。Yan et. al., Hybridoma 31(4): 267-271 (2012)を参照のこと。

20

## 【発明の概要】

## 【0009】

一態様では、本開示は、重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列と軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含む単離された抗体であって、アミノ酸配列KHSDSKEDDGQEI A（配列番号1）を含むヒトB7-H3のエピトープに結合し、かつ/又は少なくとも $6.7 \times 10^{-11}$  Mの半数効果濃度（EC<sub>50</sub>）を有する抗体を提供する。

## 【0010】

30

さらなる態様では、（a）HCがRAPVVSTSMTFNI（配列番号4）又はTVVGWGYALDL（配列番号10）のCDR3配列を含むか；あるいは（b）LCがQGEFTCSGADCGA（配列番号7）のCDR3配列を含むか；あるいは（c）HCがRAPVVSTSMTFNI（配列番号4）又はTVVGWGYALDL（配列番号10）のCDR3配列を含み、ここでLCはQGEFTCSGADCGA（配列番号7）のCDR3配列を含む。

## 【0011】

追加的又は代替的に、該抗体のいくつかの態様では、HCは、GSGKRGNPYYASWAKS（配列番号3）又はCIYAGSSLNTYYAPWAKG（配列番号9）のCDR2配列をさらに含む。

40

## 【0012】

追加的又は代替的に、該抗体のいくつかの態様では、HCは、SYGVS（配列番号2）又はSSYWIC（配列番号8）のCDR1配列をさらに含む。

## 【0013】

追加的又は代替的に、該抗体のいくつかの態様では、LCは、CDR2配列EASTLAS（配列番号6）をさらに含む。

## 【0014】

追加的又は代替的に、該抗体のいくつかの態様では、LCは、CDR1配列QASQSVYNNKNLS（配列番号5）をさらに含む。

## 【0015】

50

該抗体のいくつかの態様では、H C は、( a ) アミノ酸配列 S Y G V S ( 配列番号 2 ) を含む H C C D R 1 ; 及び / 又は ( b ) アミノ酸配列 G S G K R G N P Y Y A S W A K S ( 配列番号 3 ) を含む H C C D R 2 ; 及び / 又は ( c ) アミノ酸配列 R A P V V S T S M T F N I ( 配列番号 4 ) を含む H C C D R 3 を含む ; かつ / あるいは L C は、( a ) アミノ酸配列 Q A S Q S V Y N N K N L S ( 配列番号 5 ) を含む L C C D R 1 ; 及び / 又は ( b ) アミノ酸配列 E A S T L A S ( 配列番号 6 ) を含む L C C D R 2 ; 及び / 又は ( c ) アミノ酸配列 Q G E F T C S G A D C G A ( 配列番号 7 ) を含む L C C D R 3 を含む。

【 0 0 1 6 】

該抗体のいくつかの態様では、H C は、( a ) アミノ酸配列 S S Y W I C ( 配列番号 8 ) を含む H C C D R 1 ; 及び / 又は ( b ) アミノ酸配列 C I Y A G S S L N T Y Y A P W A K G ( 配列番号 9 ) を含む H C C D R 2 ; 及び / 又は ( c ) アミノ酸配列 T V V G G W G Y A L D L ( 配列番号 1 0 ) を含む H C C D R 3 を含む ; かつ / あるいは L C は、( a ) アミノ酸配列 Q A S Q S V Y N N K N L S ( 配列番号 5 ) を含む L C C D R 1 ; 及び / 又は ( b ) アミノ酸配列 E A S T L A S ( 配列番号 6 ) を含む L C C D R 2 ; 及び / 又は ( c ) アミノ酸配列 Q G E F T C S G A D C G A ( 配列番号 7 ) を含む L C C D R 3 を含む。

【 0 0 1 7 】

該抗体のいくつかの態様では、H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号 1 1 又は 1 3 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 8 】

該抗体のいくつかの態様では、L C 免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号 1 2 又は 1 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 1 9 】

該抗体のいくつかの態様では、H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列は、配列番号 1 1 又は 1 3 のアミノ酸配列を含み、ここで L C 免疫グロブリン可変ドメイン配列は配列番号 1 2 又は 1 4 のアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 0 】

該抗体のいくつかの態様において、該抗体は、モノクローナル抗体、キメラ抗体又はヒト化抗体の群から選択される。

【 0 0 2 1 】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、本明細書で開示される抗体の抗原結合断片であり、該抗原結合断片は F a b、F ( a b ' ) 2、F a b '、s c F<sub>v</sub>、及び F<sub>v</sub> からなる群から選択される。

【 0 0 2 2 】

本明細書ではまた、ヒト B 7 - H 3 への結合について S P 2 6 5 又は S 1 0 - H 5 0 L 5 8 と競合する B 7 - H 3 特異的抗体も提供する。

【 0 0 2 3 】

また、本明細書に開示の抗体、その断片又は等価物及び担体を含むか、又は本質的にそれらからなるか、又はさらにそれらからなる組成物も提供される。例示的な担体は、例えば薬学的に許容される担体、長期間保存溶液、抗体希釈剤、凍結乾燥成分などを含む。

【 0 0 2 4 】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、配列番号 1 を含むペプチドに結合する、本明細書に開示の抗体又は抗原結合断片、例えばヒト B 7 - H 3 タンパク質又はその断片を含む組成物である。一態様において、配列番号 1 を含むペプチドは、細胞と結合している。例えば、該組成物は、本明細書に開示の抗体又は抗体断片で標識された脱凝集細胞試料を含んでもよく、また、例えば細胞を単離するため又はフローサイトメトリーに基づく細胞分析若しくは細胞選別のためのアフィニティークロマトグラフィー法において有用である。別の例として、該組成物は、本明細書に開示の抗体又は抗体断片で標識された固定組織試料若しくは細胞塗抹標本を含んでもよく、また、例えば免疫組織化学的又は細胞

10

20

30

40

50

学的分析において有用である。別の態様において、該抗体又は抗体断片は、B 7 - H 3 タンパク質若しくはその断片、B 7 - H 3 陽性細胞又は B 7 - H 3 と他の細胞成分とを含有する複合体を単離するための例えば E L I S A、アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降法において有用である固体支持体に結合している。別の態様において、配列番号 1 を含むペプチドは、固体支持体に結合している。例えば、該ペプチドは、サンドイッチ E L I S A などにおいて有用である、ペプチドに特異的な二次抗体を介して固体支持体に結合していてもよい。別の例として、該ペプチドは、例えば本技術の抗体の単離又は精製において有用であるクロマトグラフィーカラムに結合していてもよい。別の態様において、該ペプチドは、B 7 - H 3 タンパク質若しくはその断片、又は B 7 - H 3 と他の細胞成分とを含有する複合体を単離するための、例えば E L I S A 及びアフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降法において有用な溶液、例えば分画した細胞の亜細胞画分を含有する溶液又は溶解液中などの溶液中に配置される。別の態様において、該ペプチドは、例えばゲル電気泳動ゲルなどのマトリックス、又はウェスタンブロットティングのために一般的に使用されるマトリックス（ニトロセルローズ又はフッ化ポリビニリデンから形成された膜など）と結合し、そのマトリックスの組成物は、電気泳動法及び／又は免疫ブロットティング（例えばウェスタンブロットティング）に有用である。

10

**【 0 0 2 5 】**

別の態様において、本明細書で提供されるのは、生物学的試料中の B 7 - H 3 を検出する方法であって、該方法は該試料と本明細書に開示の抗体又は抗原結合断片とを接触させることと、該抗体又は抗原結合断片の B 7 - H 3 への結合により形成された複合体を検出することとを含むか、又はそれらのことから本質的になるか、又はそれらのことからさらになる。一態様において、該方法は、試料と抗体又は抗原結合断片とを接触させる前に試料を単離することをさらに含むか、又はそのことから本質的になるか、又はそのことからさらになる。

20

**【 0 0 2 6 】**

該方法のいくつかの態様において、該試料は、細胞又は組織試料を含む。

**【 0 0 2 7 】**

該方法のいくつかの態様において、該試料は、がん罹患していると診断されるか、罹患していることが疑われるか、又はがん罹患するリスクがある対象から得られる。

**【 0 0 2 8 】**

該方法のいくつかの態様において、がんは、膀胱移行細胞癌、腎細胞癌、及び肺扁平上皮癌からなる群より選択される。

30

**【 0 0 2 9 】**

該方法のいくつかの態様において、検出は、免疫細胞化学（I C C）、免疫組織化学（I H C）、ウェスタンブロットティング、フローサイトメトリー又は E L I S A のうちのー又は複数を含む。

**【 0 0 3 0 】**

別の態様において、本明細書で提供されるのは、（ a ）対象からの生物学的試料中の B 7 - H 3 に結合する本開示の抗体又は抗原結合断片により形成された複合体を検出することにより、該試料中の B 7 - H 3 のレベルを検出すること；及び（ b ）工程（ a ）で観察された B 7 - H 3 のレベルと、対照生物学的試料中で観察された B 7 - H 3 のレベルとを比較することを含むか、又はそれらから本質的になるか、又はそれらからさらになる、対象から単離された試料中の病的細胞を検出する方法であって、ここで病的細胞は、B 7 - H 3 のレベルが対照生物学的試料中で観察されたものと比較して高い場合に検出され、B 7 - H 3 のレベルが対照生物学的試料中で観察されたものと比較して高くない場合には検出されない。

40

**【 0 0 3 1 】**

該方法のいくつかの態様において、対象の生物学的試料は、膀胱、腎臓又は肺から単離されたー又は複数の試料を含む。

**【 0 0 3 2 】**

50

該方法のいくつかの態様において、検出は、免疫細胞化学（ICC）、免疫組織化学（IHC）、ウェスタンブロッティング、フローサイトメトリー又はELISAのうちの又は複数を含む。

【0033】

追加的に又は代替的に、いくつかの態様において、本明細書に開示の方法は、該方法の実施の前に対象からの生物学的試料を単離することをさらに含む。

【0034】

追加的に又は代替的に、該方法のいくつかの態様において、対象は哺乳動物である。いくつかの態様において、対象は、マウス、ネコ、イヌ、ヒツジ、ウシ、サル、及びヒトからなる群より選択される。

【0035】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、本明細書に開示の抗体と同じエピトープ特異性有するB7-H3特異的抗体又はその抗原結合断片である。

【0036】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、任意選択的に使用説明書を含めた、本明細書に開示の抗体又は抗原結合断片を含む、B7-H3を検出するためのキットである。

【0037】

また、腫瘍試料中のB7-H3を検出する方法であって、(a)該試料を抗体又は抗体の抗原結合断片と接触させることであって、該抗体は本明細書に開示の通り、例えば重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列及び軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含み、アミノ酸配列KHSDSKEDDGQEIA（配列番号1）を含むヒトB7-H3のエピトープに結合し、かつ/又は少なくとも $6.7 \times 10^{-11}$  Mの半数効果濃度（EC<sub>50</sub>）を有し、HCは(i)アミノ酸配列SYGVS（配列番号2）を含むHC CDR1；(ii)アミノ酸配列GSGKRGNPYYASWAKS（配列番号3）を含むHC CDR2；及び(iii)アミノ酸配列RAPVVSTSMTFNI（配列番号4）を含むHC CDR3を含み、かつLCは(i)アミノ酸配列QASQSVYNNKNLS（配列番号5）を含むLC CDR1；(ii)アミノ酸配列EASTLAS（配列番号6）を含むLC CDR2；及び(iii)アミノ酸配列QGEFTCSGADC GA（配列番号7）を含むLC CDR3を含むこと；並びに(b)抗体又は抗原結合断片のB7-H3への結合により形成された複合体を検出することを含む方法も提供される。

【0038】

さらに提供されるのは、アミノ酸配列KHSDSKEDDGQEIA（配列番号1）を含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからさらになる、B7-H3に結合する抗体を生成するのに有用な単離されたポリペプチド及びそれらをコードする単離されたポリヌクレオチドである。一態様において、単離されたポリペプチド又はポリヌクレオチドは、アミノ末端又はカルボキシル末端に作動的に連結された標識及び/又は連続したポリペプチド配列（例えば、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）担体タンパク質）をさらに含む。ポリペプチドは、種々の担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水と組み合わせることができ、本開示の抗体を生成するために有用である。したがって、本開示はまた、本明細書に記載の特性を有する抗体を生成する方法及び、組換え細胞系の使用など従来のかつ周知の技術を用いて、ポリペプチド又はポリヌクレオチドを複製する方法も提供する。

【0039】

単離されたペプチドが全長B7-H3タンパク質ではないという条件で、配列番号1を含む単離されたペプチドもまた本明細書において提供される。別の態様では、本開示は、担体タンパク質に結合された配列番号1を含むヒトB7-H3の断片を含む融合タンパク質を提供する。融合タンパク質のいくつかの態様において、ヒトB7-H3の断片は、14から50アミノ酸長である。融合タンパク質のいくつかの態様において、ヒトB7-H

10

20

30

40

50

3の断片は、14から40アミノ酸長である。融合タンパク質のいくつかの態様において、ヒトB7-H3の断片は、14から30アミノ酸長である。融合タンパク質のいくつかの態様において、ヒトB7-H3の断片は、14から25アミノ酸長である。融合タンパク質のいくつかの態様において、ヒトB7-H3の断片は、14から20アミノ酸長である。融合タンパク質のいくつかの態様において、ヒトB7-H3の断片は、配列番号1から本質的になる。融合タンパク質のいくつかの態様において、ヒトB7-H3の断片は、配列番号1からなる。追加的に又は代替的に、融合タンパク質のいくつかの態様において、担体タンパク質はキーホールリンペットヘモシアニン(KLH)である。別の態様では、単離されたペプチド又は融合タンパク質で免疫化された動物(マウス、ラット、ウサギ又はヤギなど)が提供される。別の態様では、前記免疫化された動物から得られる単離されたB細胞が提供され、前記単離されたB細胞は配列番号1を含むヒトB7-H3のエピトープに特異的に結合することができる抗体を産生し、かつ少なくとも $6.7 \times 10^{-11}$  Mの半数効果濃度(EC<sub>50</sub>)を有する。別の態様では、このような単離されたB細胞から産生されたハイブリドーマが提供される。

10

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図1】本明細書に開示のモノクローナルB7-H3抗体を生成するための全体的な手順を示す。

【図2】抗B7-H3抗体SP265を用いて染色された種々のスライドの画像を示す。A行は、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)HS700t細胞に対する免疫染色の結果を示す。B行は、FFPE MDA-MB-231細胞に対する免疫染色の結果を示す。C行は、FFPE PC3細胞に対する免疫染色の結果を示す。D行は、FFPE ラージ細胞に対する免疫染色の結果を示す。左の列は、抗体染色が褐色に見えるカラー画像を含む。中央と右の列は、カラー画像のグレースケール画像を含む。中央の列はグレースケール画像であり、右の列は抗体染色を示すために矢印を重ねた同じグレースケール画像である。

20

【図3】抗B7-H3抗体SP265を使用した、様々なホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織:(A)膀胱移行細胞癌;(B)正常な膀胱(urinal bladder);(C)腎細胞癌;(D)正常な腎臓;(E)肺扁平上皮癌;(F)正常な肺に対する免疫組織化学(IHC)の結果を示す画像である。左の列は、抗体染色が褐色に見えるカラー画像を含む。中央と右の列は、カラー画像のグレースケール画像を含む。中央の列はグレースケール画像であり、右の列は抗体染色を示すために矢印を重ねた同じグレースケール画像である。特定の抗体染色が全体にわたって見られるので、(A)及び(E)に矢印はない。

30

【図4】IHC試験のためのウサギ抗ヒトB7-H3モノクローナル抗体SP265とS10H50L58のクローン比較を示す。(A)及び(D)はHS700t腫瘍細胞である。(B)及び(E)は正常腎臓組織である。(C)及び(F)は腎細胞癌組織切片である。各抗体の左列はカラー画像である。右の列はカラー画像のグレースケールである。

【図5】抗B7-H3抗体SP265を用いる、HS700t細胞株(高発現)、MDA-MB-231細胞株(弱発現)、PC3細胞株(弱発現)、及びラージ細胞株(無発現)からの細胞溶解物におけるB7-H3発現を示すウェスタンブロットである。

40

【図6】固定化されたペプチド免疫原(aa 521-534)に結合しているSP265を伴うELISAアッセイの結果を示す。

【発明を実施するための形態】

【0041】

本開示は、特定の態様に限定されず、当然ながら変化しうる。また、本開示の範囲は添付の特許請求の範囲によってのみ限定されるため、本明細書で用いる用語は、特定の態様のみを説明するためのものであり、限定することを目的としていないことを理解されたい。

【0042】

特に定義しない限り、本明細書で使用される技術用語及び科学用語は、本技術が属する

50



技術分野の当業者によって通常理解されるのと同じ意味を有する。本明細書に記載のものと類似又は同等の任意の方法及び物質を本技術の実施又は試験に用いることができるが、好ましい方法、装置、及び物質を以下に記載する。本明細書で引用するすべての技術及び特許刊行物は、それらの全容を参照により本明細書に援用するものである。本明細書の何も、技術が先行発明によって、かかる開示に先行する資格がないという承認として解釈されるべきではない。

#### 【 0 0 4 3 】

本技術の実施は、特に明記しない限り、当業者の技術範囲内の組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、及び組換えDNAの従来技術を用いることとなる。例えば、次を参照のこと：Sambrook及びRussell編(2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual 第3版；the series Ausubelら編(2007) Current Protocols in Molecular Biologyのシリーズ<sup>\*</sup>；Methods in Enzymology (Academic Press, Inc., N.Y.)のシリーズ<sup>\*</sup>；MacPhersonら (1991) PCR 1: A Practical Approach (IRL Press at Oxford University Press)；MacPhersonら(1995) PCR 2: A Practical Approach；Harlow及びLane編(1999) Antibodies, A Laboratory Manual；Freshney(2005) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique 第5版；Gait編(1984) Oligonucleotide Synthesis；米国特許第4683195号；Hames及びHiggins編(1984) Nucleic Acid Hybridization；Anderson (1999) Nucleic Acid Hybridization；Hames 及びHiggins編(1984) Transcription and Translation；Immobilized Cells and Enzymes (IRL Press (1986))；Perbal (1984) A Practical Guide to Molecular Cloning；Miller及びCalos編 (1987) Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Cold Spring Harbor Laboratory)；Makrides編 (2003) Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells；Mayer及びWalker編(1987) Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology (Academic Press, London)；及びHerzenbergら編(1996) Weir's Handbook of Experimental Immunology。

#### 【 0 0 4 4 】

すべての数値表示（例えばpH、温度、時間、濃度、及び分子量）は、範囲も含め、1.0又は0.1の増分だけ、あるいは+/-15%、又は10%、又は5%、又は2%の変動分だけ、（+）又は（-）に適宜変動する近似値である。常に明示されるというわけではないが、すべての数値表示の前には、用語「約」が置かれる。また、常に明示されるわけではないが、本明細書に記載の試薬は単なる例示であり、その等価物は当該技術分野で知られている。

#### 【 0 0 4 5 】

本技術がポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド又は抗体に関する場合、そのようなものの等価物又は生物学的等価物が本開示の範囲内であることが意図されることは、明示的な記述なしに、また、そうでないことを意図していない限り、推測される。

#### 【 0 0 4 6 】

本明細書及び特許請求の範囲において使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、文脈が明らかにそうでない場合を指さない限り複数形の言及を含む。例えば、用語「細胞」は、細胞（その混合物を含む）の複数形iを含む。

#### 【 0 0 4 7 】

本明細書で使用する場合、対象（単数又は複数）への作用剤又は薬物の「投与」は、その意図された機能を実現するために、対象に化合物を導入するか又は送達する任意の経路を含む。適切な投与製剤及び作用剤の投与方法は、当該技術分野で知られている。投与経路も決定することができ、最も効果的な投与の経路を決定する方法は、当業者に知られており、また、治療のために使用される組成物、治療の目的、治療される対象の健康状態又は疾患の病期、及び標的細胞又は組織によって異なる。投与経路の非限定的例は、経口投与、腔内投与、鼻腔投与、注射、局所投与、及び坐剤よるものを含む。投与は、自己投与及び他者による投与を含む。記載されているように、医学的状態の治療又は予防の様々な様式は、総治療又は予防であるが、それ未満も含む「実質的」を意味し、いくつかの生物学的又は医学的に重要な結果が達成される。

## 【 0 0 4 8 】

投与は、治療の過程を通して連続的又は断続的に、単回投与で効果を発しうる。最も効果的な投与手段及び用量の決定方法は、当業者に知られており、また、治療のために使用される組成物、治療の目的、治療される標的細胞及び治療される対象によって異なる。単回又は複数回投与は、治療する医師により選択された用量レベル及びパターンで実施される。

## 【 0 0 4 9 】

本明細書で使用する場合、用語「動物」は、例えば哺乳動物及び鳥類を含むカテゴリーである、生きた多細胞脊椎生物を指す。用語「哺乳動物」は、ヒト及び非ヒト哺乳動物を含む。同様に、用語「対象」又は「患者」は、ヒトと獣医学的対象の両方、例えばヒト、

10

## 【 0 0 5 0 】

本明細書で使用する場合、用語「抗体」は、免疫グロブリン又は免疫グロブリン様分子をまとめて指し、非限定的な例としては、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、及びIg M、それらの組み合わせ、並びに任意の脊椎動物（例えばヤギ、ウサギ、及びマウス、並びにサメ免疫グロブリンなどの非哺乳動物種）における免疫応答の間に産生される類似の分子を含む。「抗体」という用語は、例えば、インタクトな免疫グロブリン及び「抗体断片」、又は他の分子との結合を実質的に排除するほどに目的の分子（又は目的の分子に高度に類似している分子の群）に特異的に結合する「抗原結合断片」を含む（例えば、生物学的試料中で、他の分子の結合定数よりも少なくとも  $10^3 \text{ M}^{-1}$ 、少なくとも  $10^4 \text{ M}^{-1}$  又は少なくとも  $10^5 \text{ M}^{-1}$  大きい、目的分子の結合定数を有する抗体及び抗断片）。用語「抗体」はまた、キメラ抗体（例えばヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（例えば二重特異性抗体）など、遺伝的に操作された形態も含む。Pierce Catalog and Handbook, 1994-1995 (Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 第3版, W.H. Freeman & Co., New York, 1997も参照のこと。

20

## 【 0 0 5 1 】

より具体的には、「抗体」は、抗原のエピトープを特異的に認識してそれに結合する、少なくとも一の軽鎖又は重鎖免疫グロブリン可変領域を含むポリペプチドリガンドを指す。抗体は重及び軽鎖から構成され、その各々は、可変重 ( $V_H$ ) 領域及び可変軽 ( $V_L$ ) 領域と呼ばれる可変領域を有する。 $V_H$  領域及び  $V_L$  領域は組み合わさって、抗体により

30

## 【 0 0 5 2 】

通常、免疫グロブリンは、ジスルフィド結合によって相互接続された重 ( $H$ ) 鎖及び軽 ( $L$ ) 鎖を有する。軽鎖には、ラムダと ( $\kappa$ ) カップ ( $k$ ) の二種類がある。抗体分子の機能活性を決定する5つの主要な重鎖クラス（又はアイソタイプ）、すなわちIg M、Ig D、Ig G、Ig A、及びIg Eが存在する。各重鎖及び軽鎖は、定常領域及び可変領域を含んでいる（領域は「ドメイン」としても知られている）。重鎖及び軽鎖可変領域は、組み合わさって、抗原に特異的に結合する。軽鎖及び重鎖可変領域は、「相補性決定領域」又は「CDR」と呼ばれる三つの超可変領域によって中断される「フレームワーク」領域を含んでいる。フレームワーク領域及びCDRの範囲は規定されている（本明細書により参照によって援用されるKabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Health and Human Services, 1991を参照）。Kabatデータベースは、現在、オンラインで維持されている。異なる軽鎖又は重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。構成成分である軽鎖及び重鎖の組み合わせられたフレームワーク領域である抗体のフレームワーク領域は、主に  $\beta$ -シートコンフォメーションを採り、またCDRは、 $\beta$ -シート構造を接続するループを形成し、場合によっては  $\beta$ -シート構造の一部を形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖内非共有相互作用によって正しい配向でのCDRの位置決めを提供する足場を形成するように作用する。

40

## 【 0 0 5 3 】

50

C D R は、抗原のエピトープへの結合を主に担う。各鎖の C D R は、典型的には、N 末端から順に番号が付けられ、C D R 1、C D R 2、及び C D R 3 と呼ばれ、また、典型的には、特定の C D R が位置する鎖によって同定される。したがって、 $V_H$  C D R 3 は、それが見出される抗体の重鎖の可変ドメインに位置し、一方、 $V_L$  C D R 1 は、それが見出される抗体の軽鎖の可変ドメインの C D R 1 である。B 7 - H 3 に結合する抗体は、特異的な  $V_H$  領域及び  $V_L$  領域配列、したがって特異的 C D R 配列を有するであろう。異なる特異性を有する（すなわち異なる抗原に対する異なる結合部位）抗体は、異なる C D R を有する。抗体に応じて変化するのが C D R であるが、C D R 内の限られた数のアミノ酸位置だけが、抗原結合に直接関与している。C D R 内のこのような位置は、特異性決定残基（S D R）と呼ばれる。

10

#### 【 0 0 5 4 】

「抗体」という用語はさらに、その消化断片、特異的部分、誘導体及び変異体を包含することが意図され、これには抗体模倣物を含むか、あるいは抗体又はその特異的断片若しくは部分（例えば短鎖抗体及びその断片）の構造及び／又は機能を模倣する抗体の部分を含む。抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲に包含される結合断片の例は、 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 、及び  $C_H$  ドメインからなる一価の断片である F a b 断片；ヒンジ領域でジスルフィド架橋により連結された二つの F a b 断片を含む二価の断片である  $F(a b')_2$  断片； $V_H$  及び  $C_H$  ドメインからなる  $F_d$  断片；抗体の単一アームの  $V_L$  及び  $V_H$  ドメインからなる  $F_v$  断片、 $V_H$  ドメインからなる d A b 断片（Ward et al. (1989) Nature 341: 544-546）；及び単離された相補性決定領域（C D R）を含む。さらに、 $F_v$  断片の二つのドメインである  $V_L$  及び  $V_H$  は別々の遺伝子によりコードされるが、組換え法を用い、これらを  $V_L$  及び  $V_H$  領域が対になって一価分子を形成する一本のタンパク質鎖（一本鎖  $F_v(s c F_v)$ ）として知られる）とさせることのできる合成リンカーにより、つながることができる。Bird et al. (1988) Science 242:423-426 及び Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883。一本鎖抗体も、「抗体の断片」という用語の範囲に包含されることが意図される。上記抗体断片のいずれも、当業者に既知の従来の技術を用いて得られ、該断片は、インタクトな抗体と同じ方法で結合特異性及び中和活性についてスクリーニングされる。

20

#### 【 0 0 5 5 】

「抗体断片」又は「抗原結合断片」は、タンパク質分解抗体断片（当該技術分野で既知の  $F(a b')_2$  断片、F a b' 断片、F a b' - S H 断片、及び F a b 断片など）、組換え抗体断片（当該技術分野で既知の  $s F_v$  断片、 $d s F_v$  断片、二重特異性  $s F_v$  断片、二重特異性  $d s F_v$  断片、 $F(a b')'_2$  断片、一本鎖  $F_v$  タンパク質（「 $s c F_v$ 」）、ジスルフィド安定化  $F_v$  タンパク質（「 $d s F_v$ 」）、ダイアボディ及びトリアボディなど）、及びラグダ科の抗体（例えば米国特許第 6 0 1 5 6 9 5 号；6 0 0 5 0 7 9 号；5 8 7 4 5 4 1 号；5 8 4 0 5 2 6 号；5 8 0 0 9 8 8 号；及び 5 7 5 9 8 0 8 号参照）を含む。 $s c F_v$  タンパク質は、免疫グロブリンの軽鎖可変領域と免疫グロブリンの重鎖可変領域がリンカーにより結合されている融合タンパク質であるが、 $d s F_v$  では、ジスルフィド結合を導入して鎖の結合を安定化するように鎖が変異されている。

30

#### 【 0 0 5 6 】

本明細書で使用する場合、用語「抗体誘導体」は、本明細書に定義されているエピトープに結合し、本技術の単離された B 7 - H 3 抗体の一時的変異又は誘導体である分子を包含することが意図される。誘導体は、限定されないが、例えば二重特異性、異種特異性、三重特異性、四重特異性、多重特異性抗体、ダイアボディ、キメラ、組換え、及びヒト化を含む。本明細書で使用する場合、用語「二重特異性分子」は、二の異なる結合特異性を有する任意の作用剤、例えばタンパク質、ペプチド又はタンパク質若しくはペプチド複合体を含むことが意図される。本明細書で使用する場合、用語「多重特異性分子」又は「異種特異性分子」は、二より多い異なる結合特異性を有する任意の作用剤、例えばタンパク質、ペプチド又はタンパク質若しくはペプチド複合体を含むことが意図される。本明細書で使用する場合、用語「異種抗体」は、二種以上の抗体、その抗体結合断片（例えば F a

40

50

b)、誘導体、又は連結された複数の抗原結合領域であって、少なくともそのうちの二つの領域が異なる特異性を有するものを指す。

【0057】

用語「抗体変異体」は、ウサギ以外の種で産生された抗体を含むことが意図される。それはまた、抗体又は断片の線状ポリペプチド配列への翻訳後修飾を含む抗体を含む。それは、完全なヒト抗体をさらに包含する。

【0058】

本明細書で使用する場合、用語「抗原」は、抗体分子又はT細胞受容体などの特定の液性又は細胞性免疫の産物によって特異的に結合しうる化合物、組成物又は物質を指す。抗原は、例えばハプテン、単純な中間代謝物、糖類（例えばオリゴ糖）、脂質、及びホルモン、並びに複合炭水化物（例えば多糖）、リン脂質、及びタンパク質などの高分子を含む、任意のタイプの分子でありうる。抗原の一般的な種類は、限定されないが、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原虫抗原及び他の寄生虫抗原、腫瘍抗原、自己免疫疾患、アレルギー、及び移植片拒絶に關与する抗原、毒素、並びにその他の抗原を含む。

【0059】

本明細書で使用する場合、「結合親和性」とは、特定の結合対の一方のメンバーの、特定の結合対のもう一方のメンバーに対する傾向のような、ある分子が別の分子と（典型的には非共有結合的に）結合する傾向を指す。結合親和性は、結合定数として測定することができ、特定の結合対（例えば抗体/抗原対）の結合親和性は、少なくとも  $1 \times 10^{-5}$  M、少なくとも  $1 \times 10^{-6}$  M、少なくとも  $1 \times 10^{-7}$  M、少なくとも  $1 \times 10^{-8}$  M、少なくとも  $1 \times 10^{-9}$  M、少なくとも  $1 \times 10^{-10}$  M、少なくとも  $1 \times 10^{-11}$  M 又は少なくとも  $1 \times 10^{-12}$  M でありうる。一態様では、結合親和性は、FrankelらのMol. Immunol., 16:101-106, 1979に記載のスキャッチャード法の修正形態によって計算される。別の態様では、結合親和性は抗原/抗体解離速度によって測定される。さらに別の態様では、高結合親和性は、競合ラジオイムノアッセイによって測定される。いくつかの実施例では、抗体/抗原対の高結合親和性は、少なくとも約  $1 \times 10^{-8}$  Mである。他の態様では、高結合親和性は、少なくとも約  $1.5 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約  $2.0 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約  $2.5 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約  $3.0 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約  $3.5 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約  $4.0 \times 10^{-8}$  M、少なくとも約  $4.5 \times 10^{-8}$  M 又は少なくとも約  $5.0 \times 10^{-8}$  M である。

【0060】

本明細書で使用する場合、用語「その生物学的等価物」は、基準のタンパク質、抗体、ポリペプチド、ポリヌクレオチド又は核酸に言及する場合、「その等価物」と同義であると意図され、所望の構造又は機能性を維持しながら最小限の相同性を有するものを意味する。本明細書で具体的に列挙しない限り、本明細書で言及されるあらゆる核酸、ポリヌクレオチド、ポリペプチド、タンパク質又は抗体は、その等価物も含むと考えられる。例えば、等価物は、少なくとも約80%相同又は同一、あるいは少なくとも約85%、若しくは少なくとも約90%、若しくは少なくとも約95%、若しくは98%のパーセント相同性又は同一性を意味し、基準のタンパク質、ポリペプチド、抗体又は核酸と実質的に等しい生物活性を示す。

【0061】

「組成物」は、典型的には、例えば化合物又は組成物のような活性剤と、担体、すなわち（例えば検出可能な作用剤又は標識などの）不活性担体、又は例えばアジュバント、希釈剤、結合剤、安定化剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、防腐剤、アジュバント等の活性担体との組み合わせを意味し、薬学的に許容される担体を含む。担体はまた、薬学的に許容される賦形剤及び添加剤、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、及び炭水化物（例えば単糖、二糖、三糖、四糖、及びオリゴ糖；アルジトール、アルドン酸、エステル化糖等の誘導体化された糖；並びに多糖又は糖ポリマーを含む糖類）も含み、これらは単独又は組み合わせて存在することができ、単独で又は組み合わせて1~99.99重量%又は体積%を構成する。例示的なタンパク質賦形剤は、ヒト血清アルブミン（HSA）、組換えヒ

トアルブミン ( r H A )、ゼラチン、カゼイン等の血清アルブミンを含む。緩衝能において機能し得る代表的なアミノ酸 / 抗体成分は、アラニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アスパルテーム等を含む。炭水化物賦形剤はまた、本技術の範囲内で意図され、その例は、限定されないが、果糖、マルトース、ガラクトース、グルコース、D - マンノース、ソルボース等の単糖 ; ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオース等の二糖 ; ラフィノース、メレチトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプン等の多糖 ; マンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトールソルビトール ( グルシトール ) 及びミオイノシトール等のアルジトールを含む。

10

#### 【 0 0 6 2 】

担体という用語は、緩衝剤又は pH 調整剤をさらに含み、典型的に緩衝液は、一態様において、貯蔵のために製剤中で抗体を安定させるのに役立つ有機酸又は塩基から調製される塩である。代表的な緩衝剤は、クエン酸、アスコルビン酸、グルコン酸、炭酸、酒石酸、コハク酸、酢酸又はフタル酸の塩のような有機酸塩 ; トリス、塩酸トロメタミン又はリン酸緩衝液を含む。追加の担体は、ポリビニルピロリドン、フィコール ( ポリマー糖 )、デキストレート ( d e x t r a t e ) ( 例えば 2 - ヒドロキシプロピル - . クワドラチャ . - シクロデキストリン ( 2 - h y d r o x y p r o p y l - . q u a d r a t u r e . - c y c l o d e x t r i n ) などのシクロデキストリン)、ポリエチレングリコール、抗菌剤、酸化防止剤、帯電防止剤、界面活性剤 ( 例えば「T W E E N 2 0」及び「T W E E N 8 0」などのポリソルベート)、脂質 ( 例えばリン脂質、脂肪酸)、ステロイド ( 例えばコレステロール)、及びキレート剤 ( 例えば E D T A ) を含む。

20

#### 【 0 0 6 3 】

本明細書で使用する場合、担体という用語は、典型的な薬学的に許容される担体、例えば、リン酸緩衝生理食塩水、水溶液、水、及び油 / 水又は水 / 油エマルジョンなどのエマルジョン、並びに様々なタイプの湿潤剤を含む。薬学的に許容される担体の例は、イオン交換体、アルミナ、ステアリン酸アルミニウム、レシチン、ヒト血清アルブミンなどの血清タンパク質、リン酸塩、グリシン、ソルビン酸、ソルビン酸カリウムなどの緩衝物質、飽和植物脂肪酸の部分グリセリド混合物、水、塩又はプロタミン硫酸塩などの電解質、リン酸水素二ナトリウム、リン酸水素カリウム、塩化ナトリウム、亜鉛塩、コロイドシリカ、三ケイ酸マグネシウム、ポリビニルピロリドン、セルロースベースの物質、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロースナトリウム、ポリアクリレート、ロウ、ポリエチレン - ポリオキシプロピレン - ブロックポリマー、ポリエチレングリコール、及び羊毛脂を含む。担体、安定化剤、及びアジュバントの例については、Martin REMINGTON ' S PHARM. SCI., 15th Ed. (Mack Publ. Co., Easton (1975) and Williams & Williams, (1995)、及び「PHYSICIAN ' -S DESK REFERENCE」、52版、Medical Economics, Montvale, N .J. (1998)を参照。

30

#### 【 0 0 6 4 】

一態様では、抗体の「等価物」又は「生物学的等価物」という用語は、E L I S A、I H C 又は他の適切な方法によって測定した場合、抗体の、そのエピトープタンパク質又はその断片に選択的に結合する能力を意味する。生物学的に等価な抗体は、限定されないが、基準抗体と同じエピトープに結合する抗体、ペプチド、抗体断片、抗体変異体、抗体誘導体、及び抗体模倣物を含む。当業者は、部位特異的突然変異誘発を用いて抗体に適切な変異を導入することにより、本開示の抗体と機能的に等価な抗体を調製することができる ( Hashimoto-Gotoh, T. et al., Gene 152, 271-275 (1995); Zoller & Smith, Methods Enzymol. 100, 468-500 (1983); Kramer, W. et al., Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456 (1984); Kramer W. & Fritz H J., Methods. Enzymol. 154, 350-367 (1987); Kunkel, T A., Proc Natl Acad Sci USA. 82, 488-492 (1985); 及び Kunkel Methods Enzymol. 85, 2763-2766 (1988) ) 。

40

#### 【 0 0 6 5 】

50

本明細書に開示の抗体と機能的に等価であり、本開示の抗体のアミノ酸配列において一又は複数のアミノ酸の変異を含むアミノ酸配列を含む抗体も、本開示の抗体に含まれる。このような変異体において、変異されるアミノ酸の数は、通常50個以下のアミノ酸、好ましくは30個以下、より好ましくは10個以下（例えば5個以下のアミノ酸）である。アミノ酸残基は、好ましくはアミノ酸側鎖の性質を保存するものに変異される。例えば、アミノ酸は、その側鎖の性質に基づいて以下のように分類される。

【0066】

疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、及びV）；

【0067】

親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、及びT）；

10

【0068】

脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、及びP）；

【0069】

水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、及びY）；

【0070】

硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C及びM）；

【0071】

カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、及びQ）；

【0072】

塩基含有側鎖（R、K、及びH）；及び

20

【0073】

芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、及びW）

【0074】

（括弧内の文字はアミノ酸の一文字コードを表す）

【0075】

本明細書で使用する場合、用語「生物学的試料」は、生細胞に由来するか又は生細胞により接触された試料物質を意味する。用語「生物学的試料」は、対象から単離された組織、細胞、及び生物学的流体、並びに対象内に存在する組織、細胞、及び流体を含むことが意図される。本開示の生物学的試料は、限定されないが、例えば全血、血漿、精液、唾液、涙、尿、糞便物質、汗、頬部、皮膚、脳脊髄液、及び毛髪を含む。生物学的試料は、内臓の生検から又はがんからも得ることができる。生物学的試料は、基礎研究のための対照として、診断又は研究の対象から得ることができ、又は健康な個体からも得ることができる。

30

【0076】

本明細書で使用する場合、「B7-H3」は、T細胞応答のアクセサリーモジュレーターとして働く共刺激分子のB7/CD28スーパーファミリーのメンバーである。B7-H3は、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I型膜貫通タンパク質である。ネズミB7-H3は単一の細胞外可変型免疫グロブリン（Ig）V-IgCドメイン及びシグネチャー細胞内ドメイン（signature intracellular domain）（2Ig B7-H3）からなるが、ヒトB7-H3は、付加アイソフォーム、いわゆる4Ig B7-H3を有し、これはIgV-IgCドメインのほぼ正確なタンデム複製を含む。（Entrez Gene ID: 80381, UniProtKB: Q5ZPR3 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 直近アクセス日 2014年10月20日）。

40

【0077】

「がん」、「新生物」、及び「腫瘍」という用語は、互換的に、また単数形又は複数形のいずれでも用いられ、宿主生物にとって病的な細胞にする悪性形質転換を受けた細胞を指し、膀胱移行細胞癌、腎細胞癌、乳管癌、ホジキンリンパ腫、膵臓腺癌、前立腺腺癌、及び肺扁平上皮癌からなる群より選択される。

【0078】

原発がん細胞（すなわち悪性形質転換の部位の近くから得られた細胞）は、十分に確立

50

された技術、特に組織学的検査により、非癌性細胞から容易に識別できる。本明細書において使用されるがん細胞の定義は、原発がん細胞だけでなく、がん細胞の原型に由来するあらゆる細胞も含む。これには、転移したがん細胞、並びにがん細胞に由来するインビトロの培養物及び細胞株が含まれる。固形腫瘍として通常表れるタイプのがんに言及すると、「臨床的に検出可能な」腫瘍とは、腫瘍塊をもとに、例えばC A Tスキャン、磁気共鳴画像（M R I）、X線、超音波又は触診などの手法により検出可能なものである。生化学的又は免疫学的所見だけでは、この定義を満たすには不十分でありうる。

#### 【 0 0 7 9 】

新生物は、比較的自律的な組織の腫瘍によって生成される細胞の異常な塊又はコロニーである。ほとんどの新生物は悪性形質転換を受けた単一細胞のクローン増殖から生じる。正常細胞から腫瘍性細胞への転換は、直接かつ不可逆的に細胞ゲノムを変化させる、化学的、物理的又は生物学的因子（又はイベント）によって引き起こされうる。腫瘍性細胞は、いくつかの特殊機能の喪失及び新たな生物学的特性（何より、比較的自律的（制御不能）な増殖という特性）の取得により特徴付けられる。腫瘍性細胞は、自らの遺伝性の生物学的特性を子孫細胞に伝える。

#### 【 0 0 8 0 】

新生物の過去、現在、及び未来の予測される生物学的挙動又は臨床経過は、診断、治療、及び予後において非常に重要な区別である、良性又は悪性にさらに分類される。悪性新生物は、より高い自律性を示し、浸潤及び転移拡散することができ、治療に耐性であり得、死を引き起こしうる。良性新生物は、比較的低い自律性を有し、通常は浸潤性ではなく、転移せず、また、適切に治療されれば、一般的には大した害は生じない。

#### 【 0 0 8 1 】

がんは、悪性腫瘍の総称である。退形成は、がん細胞の特徴的な性質であり、正常な構造特性及び機能特性の欠如（未分化）を表す。

#### 【 0 0 8 2 】

腫瘍は、文字通りには炎症性又はその他の腫張など、任意のタイプの腫脹であるが、現代の用法は、一般に新生物を表す。

#### 【 0 0 8 3 】

組織形成は、組織の起源であり、また、起始組織細胞に基づいて新生物を分類する方法である。腺腫は、腺上皮の良性新生物である。癌腫は、上皮の悪性腫瘍である。肉腫は、間葉組織の悪性腫瘍である。良性か悪性か、新生物を分類するための一体系は、生物学的（臨床的）挙動、並びに組織形成、組織学的及び細胞学的検査によって決定される新生物の起始組織又は細胞を利用する。新生物は、有糸分裂が可能な細胞を含むほぼすべての組織に由来しうる。新生物の組織学的分類は、組織学的及び細胞学的検査によって決定される起始組織（又は細胞）に基づく。

#### 【 0 0 8 4 】

本明細書で使用する場合、用語「キメラ抗体」は、一つの種からのモノクローナル抗体のF c定常領域（例えばマウスF c定常領域）が、組換えD N A技術を用いて、別の種の抗体からのF c定常領域（例えばヒトF c定常領域）で置き換えられている抗体を意味する。概しては、Robinson et al., P C T出願 / 米国特許出願公開第 8 6 / 0 2 2 6 9 号 ; Akira et al., 欧州特許出願公開第 1 8 4 1 8 7 号 ; Taniguchi, 欧州特許出願公開第 1 7 1 4 9 6 号 ; Morrison et al., 欧州特許出願公開第 173494号 ; Neuberger et al., 国際公開第 86/01533号 ; Cabilly et al. 米国特許第 4816567号 ; Cabilly et al., 欧州特許出願公開第 125023号 ; Better et al., Science 240: 1041-1043, 1988; Liu et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 3439-3443, 1987; Liu et al., J. Immunol. 139: 3521-3526, 1987; Sun et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 214-218, 1987; Nishimura et al., Cancer Res 47: 999-1005, 1987; Wood et al., Nature 314: 446-449, 1985; 及び Shaw et al., J. Natl. Cancer Inst. 80: 1553-1559, 1988を参照のこと。特定の態様では、標的結合領域又は部位は、非ヒト供給源（例えばマウス又は霊長類）由来であろうし、定常領域はヒトである。

## 【 0 0 8 5 】

本明細書で使用する場合、用語「含む(こと)」は、組成物及び方法が、列挙された要素を含むがそれ以外を排除するものではないと意図される。組成物及び方法を定義するのに用いられる場合の「～から本質的になる」は、意図された使用のための組み合わせに何らかの本質的な意義がある他の要素は排除することを意味するものとする。例えば、本明細書で定義される要素から本質的になる組成物は、単離及び精製方法からの微量混入物、並びにリン酸緩衝生理食塩水、保存剤などの薬学上許容される担体を排除しない。「～からなる」は、微量要素以上の他の成分及び本開示の組成物を投与するための実質的な方法工程以上のものは排除することを意味するものとする。これらの各移行句(transition term)により定義される態様は、本開示の範囲内である。

10

## 【 0 0 8 6 】

「対照」生物学的試料は、比較目的の実験で使用される代替試料である。「対照」は、「陽性」又は「陰性」とすることができる。例えば、実験の目的が特定の種類のがんの治療のための治療剤の有効性の相関を決定するためである場合、陽性対照(所望の治療効果を示すことが知られている化合物又は組成物)と陰性対照(治療を受けないか、又はプラセボを受ける対象若しくは試料)とを用いることが一般的に好ましい。

## 【 0 0 8 7 】

本明細書で使用する場合、用語「検出可能な標識」は、試料中の標識の存在及び/又は濃度を示す、(例えば視覚的に、電子的に又は他の方法で)検出可能なシグナルを生成することができる分子又は物質を指す。特異的な結合分子にコンジュゲートすると、検出可能な標識は、特異的な結合分子が向かう標的の位置を突き止め、かつ/又は定量化するのに使用されうる。したがって、試料中の標的の存在及び/又は濃度は、検出可能な標識に生成されたシグナルを検出することにより検出されうる。検出可能な標識は、直接又は間接的に検出することができ、異なる特異的な結合分子にコンジュゲートした複数の異なる検出可能な標識は、一又は複数の標的を検出するのに組み合わせて使用されうる。例えば、ある標的に特異的な抗体にコンジュゲートした第一の検出可能な標識は、第一の検出可能な標識に特異的に結合する分子にコンジュゲートしている第二の検出可能な標識の使用によって、間接的に検出されうる。個別に検出されうる複数の検出可能な標識は、異なる標的に特異的に結合する異なる特異的な結合分子にコンジュゲートされ得、試料中の複数の標的の同時検出を提供できる多重アッセイを提供することができる。検出可能なシグナルは、光子(無線周波数、マイクロ波周波数、赤外線周波数、可視周波数、及び紫外線周波数の光子を含む)の吸収、発光、及び/又は散乱を含む任意のメカニズムによって生成されうる。検出可能な標識は、着色、蛍光、リン光、及び発光性分子並びに物質、(例えば、無色の物質を着色物質に変換するか又はその逆によって、あるいは沈殿物を生成するか又は試料の濁度を上昇させることによって)一の物質を別の物質に変換して検出可能な相違をもたらす触媒(例えば酵素)、追加の検出可能な標識化抗体コンジュゲートを使用し、抗体-ハプテン結合相互作用によって検出できるハプテン、並びに常磁性及び磁性分子又は物質を含む。検出可能な標識の特定の例は、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、酸性ホスファターゼ、グルコースオキシダーゼ、B-ガラクトシダーゼ又はB-グルクロニダーゼ等の酵素、フルオレセイン、発光団、クマリン、BODIPY染料、レゾルフィン、及びローダミン等のフルオロフォア(蛍光分子の多くの追加例は、The Handbook--A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies, Molecular Probes(オレゴン州ユージーン)において見出すことができる)、量子ドット等のナノ粒子(例えば、カリフォルニア州ハイワードのQuantum Dot Corp, Invitrogen Nanocrystal Technologiesから取得;それぞれ参照により本明細書に援用される米国特許第6815064号、第6682596号及び第6649138号も参照されたい);金属キレート、例えばGd<sup>3+</sup>のような放射性又は常磁性金属イオンのDOTA及びDPTAキレート、並びにリポソーム、例えば捕捉された蛍光分子を含有するリポソームを含む。検出可能な標識が酵素を含む場合、色原体等の検出可能な基質、蛍光性化合物又は発光性化合物を該酵素と組み合わせ

20

30

40

50



て使用し、検出可能なシグナルを生成することができる（多種多様な該化合物は、例えばオレゴン州ユージーンのInvitrogen Corporationから市販されている）。発色性化合物の特定の例は、ジアミノベンジジン（DAB）、4-ニトロフェニルリン酸（pNPP）、ファストレッド、プロモクロロインドリルリン酸（BCIP）、ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）、BCIP/NBT、ファストレッド、APオレンジ、APブルー、テトラメチルベンジジン（TMB）、2,2'-アジノ-ジ-[3-エチルベンゾチアゾリンスルホン酸]（ABTS）、o-ジアニシジン、4-クロロナフトール（4-CN）、ニトロフェニル-B-D-ガラクトピラノシド（ONPG）、o-フェニレンジアミン（OPD）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-B-ガラクトピラノシド（X-Gal）、メチルウンベリフェリル-B-D-ガラクトピラノシド（MU-Gal）、p-ニトロフェニル-B-D-ガラクトピラノシド（PNP）、5-プロモ-4-クロロ-3-インドリル-B-D-グルクロニド（X-Gluc）、3-アミノ-9-エチルカルバゾル（AEC）、フクシン、ヨードニトロテトラゾリウム（INT）、テトラゾリウムブルー、及びテトラゾリウムバイオレットを含む。あるいは、酵素を金属組織学的検出方式で用いることもできる。金属組織学的検出方法は、アルカリホスファターゼ等の酵素を水溶性金属イオン及び該酵素の酸化還元の不活性な基質と組み合わせて使用することを含む。該基質は、酵素によって酸化還元活性な作用剤に変換され、この酸化還元活性な作用剤は、金属イオンを還元し、検出可能な沈殿物を形成する。（例えば、2004年12月20日出願された同時係属中の米国特許出願第11/015646号、PCT出願公開第2005/003777号、及び米国特許出願公開第2004/0265922号（これらはそれぞれ参照により本明細書に援用される）を参照されたい）。金属組織学的検出方法は、検出可能な沈殿物を再形成するために、酸化還元酵素（例えばホースラディッシュペルオキシダーゼ）を水溶性金属イオン、酸化剤、及び還元剤と併せて使用することを含む。（例えば、参照により本明細書に援用される米国特許第6670113号を参照のこと）。ハプテンは、抗体によって特異的に結合される小分子であるが、それ自体は動物において免疫応答を惹起せず、免疫応答を生成するには、最初にタンパク質等のより大きい担体分子に結合されなければならない。ハプテンの例は、ジニトロフェニル、ピオチン、ジゴキシゲニン、及びフルオレセインを含む。オキサゾール、ピラゾール、チアゾール、ニトロアリール、ベンゾフラン、トリペルペン、尿素、チオ尿素、ロテノイド、クマリン、及びシクロリグナンハプテンの追加の例は、参照により本明細書に援用される2006年11月1日出願された米国仮特許出願第60/856133号に開示されている。

#### 【0088】

本明細書で使用する場合、「エピトープ」又は「抗原決定基」とは、抗原性である、すなわち特異的免疫応答を誘発する、特定の化学基又は分子の連続的な若しくは非連続的なペプチド配列を指す。抗体は、特定の抗原エピトープに結合する。エピトープは、通常、アミノ酸又は糖側鎖などの分子の化学的に活性な表面基からなり、通常は特有の三次元構造的特徴、並びに特有の電荷的特徴を有する。立体構造エピトープ及び非立体構造エピトープは、変性溶媒の存在下で、前者との結合は失われるが、後者との結合は失われない点において区別される。

#### 【0089】

本明細書で使用する場合、「発現」は、それによりポリヌクレオチドがmRNAに転写されるプロセス及び/又はそれにより転写されたmRNAが続いてペプチド、ポリペプチド又はタンパク質に翻訳されるプロセスを指す。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、発現は、真核細胞におけるmRNAのスプライシングを含みうる。遺伝子の発現レベルは、細胞又は組織試料中のmRNA又はタンパク質の量を測定することによって決定されうる。一態様では、一つの試料からの遺伝子の発現レベルは、対照又は基準試料からの遺伝子の発現レベルと直接比較されうる。別の態様では、一つの試料からの遺伝子の発現レベルは、化合物の投与後の同じ試料からの遺伝子の発現レベルと直接比較されうる。

## 【0090】

本明細書で使用する場合、「相同（性）」又は「同一」、パーセント「同一性」又は「類似性」は、二以上の核酸又はポリペプチド配列の文脈で使用する場合、同じである二以上の配列又はサブ配列、あるいは特定の領域にわたって同じであるヌクレオチド又はアミノ酸残基を特定のパーセント有する、例えば少なくとも60%同一性、好ましくは少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%又はそれ以上の同一性を有する二以上の配列又はサブ配列を指す（例えば本明細書に記載の抗体をコードするヌクレオチド配列又は本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列）。比較の目的のために配列を整列させることができ、その各配列における位置を比較することによって相同性が決定されうる。比較される配列における位置が同じ塩基又はアミノ酸で占められる場合、分子はその位置で相同である。配列間の相同性の程度は、配列により共有される一致又は相同な位置の数の関数である。アラインメント及びパーセント相同性又は配列同一性は、当該技術分野で知られているソフトウェアプログラム、例えばCurrent Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1987)補遺30、7.7.18節、表7.7.1に記載のものを使用して決定することができる。好ましくは、アラインメントのためにデフォルトパラメーターが使用される。好ましいアラインメントプログラムは、デフォルトパラメーターを用いるBLASTである。特に好ましいプログラムは、次のデフォルトパラメーターを用いるBLASTN及びBLASTPである：遺伝子コード＝標準；フィルター＝無；鎖＝両方；カットオフ値＝60；期待値＝10；マトリックス＝BLOSUM62；記載＝50配列；分類手段＝HIGH SCORE；データベース＝非重複、GenBank＋EMBL＋DDBJ＋PDB＋GenBank CDS翻訳＋Swiss Protein＋SPupdate＋PIR。これらプログラムの詳細は、次のインターネットアドレスで見ることができる：ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST。用語「相同（性）」又は「同一」、パーセント「同一性」又は「類似性」はまた、試験配列の相補体を指し、又はそれに適用することができる。この用語はまた、欠失及び／又は付加を有する配列、並びに置換を有するものも含む。本明細書に記載の通り、好ましいアルゴリズムはギャップなどを説明することができる。好ましくは、同一性は、少なくとも約25アミノ酸長又はヌクレオチド長である領域にわたって、より好ましくは少なくとも50～100アミノ酸長又はヌクレオチド長である領域にわたって存在する。「無関係な」又は「非相同の」配列は、本明細書に開示の配列の一つと40%未満の同一性又は25%未満の同一性を共有する。

## 【0091】

用語「ヒト抗体」は、本明細書で使用する場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域及び定常領域を有する抗体を含むことが意図される。本技術のヒト抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基を含んでいてもよい（例えばインビトロでのランダム若しくは部位特異的突然変異誘発によって、又はインビボでの体細胞変異によって導入された変異）。しかしながら、本明細書で使用する用語「ヒト抗体」は、例えばウサギなどの別の哺乳動物種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列に移植されている抗体を含むことは意図されない。したがって、本明細書で使用する場合、用語「ヒト抗体」は、タンパク質の実質的にすべての部分（例えばCDR、フレームワーク、 $C_L$ 、 $C_H$ ドメイン（例えば $C_{H1}$ 、 $C_{H2}$ 、 $C_{H3}$ ）、ヒンジ、 $V_L$ 、 $V_H$ ）がヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、配列変化又は変異はわずかである抗体を指す。同様に、霊長類（サル、ヒヒ、チンパンジー等）、げっ歯類（マウス、ラット、ウサギ、モルモット、ハムスター等）、及び他の乳類を示す抗体は、このような種、亜属、属、亜科、及び科に特異的な抗体を指す。さらに、キメラ抗体は上記のいかなる組み合わせをも含む。このような変化又は変異は、任意選択的に且つ好ましくは、非修飾抗体に比べて、ヒト又は他の種における免疫原性を保持又は低下させる。したがって、ヒト抗体は、キメラ又はヒト化抗体とは違う。ヒト抗体は、再編成ヒト免疫グロブリン（例えば重鎖及び／又は軽鎖）遺伝子を機能的に発現することができる非ヒト動物又は原核若しくは真核細胞によって産生されることが指摘されている。さらに、ヒト

抗体が単鎖抗体である場合、それは、天然のヒト抗体においては見出されないリンカーペプチドを含むことができる。例えば、F<sub>v</sub>は、重鎖の可変領域及び軽鎖の可変領域を連結するリンカーペプチド、例えば2から約8個のグリシン又は他のアミノ酸残基を含むことができる。このようなリンカーペプチドは、ヒト起源であると考えられている。

#### 【0092】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト化抗体」は、ヒト化軽鎖及びヒト化重鎖免疫グロブリンを含む抗体を指す。ヒト化抗体は、CDRを提供するドナー抗体と同じ抗原に結合する。ヒト化免疫グロブリン又は抗体のアクセプターフレームワークは、ドナーフレームワークから採取したアミノ酸による限られた数の置換を有することができる。ヒト化又は他のモノクローナル抗体は、抗原結合又は他の免疫グロブリン機能に実質的に何の影響も及ぼさない、追加の保存的アミノ酸置換を有することができる。ヒト化免疫グロブリンは、遺伝子工学によって作成することができる（例えば米国特許第5585089号を参照）。

10

#### 【0093】

本明細書で使用する場合、用語「ヒト化免疫グロブリン」は、ヒトフレームワーク領域及び非ヒト（例えばマウス、ラット、ウサギ又は合成の）免疫グロブリンからの一又は複数のCDRを含む免疫グロブリンを指す。CDRを提供する非ヒト免疫グロブリンは「ドナー」と呼ばれ、フレームワークを提供するヒト免疫グロブリンは「アクセプター」と呼ばれる。一態様では、全CDRはヒト化免疫グロブリン中のドナー免疫グロブリンに由来する。定常領域が存在する必要はないが、存在する場合、定常領域は、ヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に同一、すなわち少なくとも約85 - 90%又は少なくとも約95%以上同一でなければならない。それ故、ヒト化免疫グロブリンのすべての部分は、おそらくはCDRを除いて、天然のヒト免疫グロブリン配列の対応する部分と実質的に同一である。

20

#### 【0094】

本明細書で使用する「単離（された）」という用語は、他の物質を実質的に含まない分子又は生物学的物質又は細胞形質成分を指す。一態様において、「単離（された）」という用語は、DNA若しくはRNAなどの核酸、又はタンパク質若しくはポリペプチド（例えば抗体又はその誘導体）、又は細胞若しくは細胞小器官、又は組織若しくは器官であって、それぞれ天然源に存在している他のDNA若しくはRNA、又はタンパク質若しくはポリペプチド、又は細胞若しくは細胞小器官、又は組織若しくは器官から分離されているものを指す。「単離（された）」という用語はまた、組換えDNA技術により生成された場合には細胞形質成分、ウイルス性物質又は培地を、あるいは化学的に合成された場合には化学的前駆体又は他の化学物質を実質的に含まない核酸又はペプチドを指す。さらに、「単離された核酸」は、断片として天然に存在しない、自然状態では見られないような核酸断片を含むことも意味する。用語「単離（された）」はまた、他の細胞たんぱく質から単離されているポリペプチドを指すために本明細書で用いられており、精製されたポリペプチドと組換えポリペプチドの双方を包含することを意味する。「単離（された）」という用語はまた、他の細胞又は組織から単離されている細胞又は組織を指すために本明細書で用いられており、培養された細胞又は組織及び操作された細胞又は組織の双方を包含することを意味する。

30

40

#### 【0095】

本明細書で使用する場合、用語「モノクローナル抗体」は、Bリンパ球の単一クローンにより、又は単一の抗体の軽鎖及び重鎖遺伝子がトランスフェクトされている細胞により産生される抗体を指す。モノクローナル抗体は、当業者に既知の方法により、例えば免疫脾臓細胞と骨髓腫細胞との融合からハイブリッド抗体形成細胞を作製することにより製造される。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

#### 【0096】

本明細書で使用する場合、「病的細胞」は、疾患に関係する細胞、又は疾患から生じる細胞である。病的細胞は、過剰増殖することができる。「過剰増殖細胞」は、正常又は健

50

康な状態にあるときよりも速い速度で分裂及び増殖している細胞又は組織を意味する。このようなものの例は、限定されないが、前がん性細胞（すなわち上皮性異形成）及びがん細胞を含む。過剰増殖細胞はまた、脱分化、不死化、腫瘍性、悪性、転移性細胞、及び肉腫細胞、白血病細胞、癌腫細胞又は腺癌細胞などのがん細胞も含む。

#### 【0097】

用語「タンパク質」、「ペプチド」、及び「ポリペプチド」は、互換的に使用され、その最も広い意味では、二個以上のサブユニットアミノ酸、アミノ酸類似体又はペプチド模倣物の化合物を指す。サブユニットは、ペプチド結合により結合されうる。別の態様では、サブユニットは、他の結合、例えばエステル結合、エーテル結合などによって結合されうる。タンパク質又はペプチドは少なくとも二個のアミノ酸を含んでいなければならず、タンパク質の配列又はペプチドの配列を含むアミノ酸の数に上限はない。本明細書で使用する場合、用語「アミノ酸」は、グリシン、並びにD及びL光学異性体の両方、アミノ酸類似体及びペプチド模倣物を含めた、天然及び/又は非天然すなわち合成アミノ酸のいずれも指す。

10

#### 【0098】

用語「ポリヌクレオチド」及び「オリゴヌクレオチド」は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチド又はリボヌクレオチドのいずれか、あるいはその類似体である、任意の長さのヌクレオチドの重合体形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元 - 構造を有することができ、既知又は未知の任意の機能を果たしうる。次に挙げるのは、ポリヌクレオチドの非 - 限定的な例である：遺伝子又は遺伝子断片（例えばプローブ、プライマー、EST又はSAGEタグ）、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA（mRNA）、転移RNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分岐ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ及びプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドなどの修飾されたヌクレオチド及びヌクレオチド類似体を含みうる。ヌクレオチド構造に対する修飾は、存在するならば、ポリヌクレオチドのアセンブリの前又は後に付与されてよい。ヌクレオチドの配列は、非 - ヌクレオチド成分により中断されてもよい。ポリヌクレオチドは、重合後に例えば標識成分とのコンジュゲーションにより、さらに修飾されてもよい。該用語はまた、二重 - 及び一本鎖 - 分子の両方を指す。別段の定め又は求めがない限り、ポリヌクレオチドである本技術の任意の態様は、二本 - 鎖形態と、二本 - 鎖形態を構成することが既知であるか又は予測される二の相補的一本 - 鎖形態の各々との両方を包含する。

20

30

#### 【0099】

ポリヌクレオチドは、次の4種のヌクレオチド塩基の特定の配列で構成される：アデニン（A）；シトシン（C）；グアニン（G）；チミン（T）；及びポリヌクレオチドがRNAの場合はチミンの代わりにウラシル（U）。したがって、用語「ポリヌクレオチド配列」は、ポリヌクレオチド分子のアルファベット表示である。このアルファベット表示は、中央処理装置を有するコンピューター内のデータベースに入力して、バイオインフォマティクス用途、例えば機能性ゲノミクス及び相同性調査などに使用することができる。

#### 【0100】

本明細書で使用する場合、「精製された」という用語は絶対的な純度を必要としない。むしろ、それは相対的な用語として意図されている。したがって、例えば、精製された核酸、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体又は他の活性化合物は、タンパク質又は他の混入物から全体的又は部分的に単離されているものである。一般に、本開示内での使用のための実質的に精製されたペプチド、タンパク質、生物学的複合体又は他の活性化合物は、調製物中に存在するすべての巨大分子種の80%超を、該ペプチド、タンパク質、生物学的複合体又は他の活性化合物の混合若しくは形成の前に、薬学的担体、賦形剤、緩衝剤、吸収促進剤、安定化剤、防腐剤、アジュバント又は他の共成分と共に治療的投与のための完全な医薬製剤中に含む。より典型的には、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体又は他の活性化合物は、他の製剤成分と混合する前に、精製調製物中に存在するすべての巨

40

50

大分子種の90%超、多くの場合95%超を占めるように精製される。他の場合には、精製された調製物は本質的に均質であってもよく、この場合、他の巨大分子種は従来の技術によって検出可能ではない。

#### 【0101】

本明細書で使用する場合、「特異的結合」は、少なくとも $10^{-6}$  Mの結合親和性を有する抗体と抗原との間の接触を意味する。特定の態様において、抗体は、少なくとも約 $10^{-7}$  M、好ましくは $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M又は $10^{-12}$  Mの親和性で結合する。

#### 【0102】

本明細書で使用する場合、用語「組換えタンパク質」は、一般にポリペプチドをコードするDNAを適切な発現ベクターに挿入し、結果として宿主細胞が形質転換して異種タンパク質を生成するために使用される組換えDNA技術により製造されるポリペプチドを指す。

#### 【0103】

本明細書で使用する場合、「治療(すること)」又は対象における疾患の「治療」は、(1)疾患の素因があるか又は症状がまだ現れていない対象において、症状又は疾患が発生しないようにすること；(2)疾患を阻止するか又はその進行を阻止すること；あるいは(3)疾患又は疾患の症状を改善すること若しくは後退を起こすことを指す。当該技術分野で理解されているように、「治療」は、臨床結果を含む有益な又は所望の結果を得るための手法である。本技術において、有益な又は所望の臨床結果は、検出可能であるか否かを問わず、一又は複数の症状の軽減若しくは改善、(疾患を含む)状態の範囲の縮小、(疾患を含む)状態の安定化状態(すなわち悪化ではない)、(疾患を含む)状態進行の遅延又は速度低下、(疾患を含む)状態の改善又は緩和及び寛解(部分的であれ全体的であれ)のうちの一又は複数を含むがこれらに限定されない。効能があつて、非常に低用量で局所的に投与することができ、したがって全身性副作用を最小にする化合物が好ましい。

#### 【0104】

「組織化学」及び「細胞化学」は、顕微鏡での視覚化ができるような方法でバイオマーカーに特異的に結合する分子で試料を標識することにより、インタクトな細胞の状況でバイオマーカーを同定するためにしばしば用いられる技術である。免疫組織化学(ICH)及び免疫細胞化学(ICC)は、抗体を用いてバイオマーカーを標識する組織化学及び細胞化学の種類である。組織環境又は細胞環境においてバイオマーカーを同定することにより、細胞又は組織試料のバイオマーカーと他の形態学的若しくは分子的特徴との間の空間的關係が解明され得、これは他の分子又は細胞技術からは分からない情報を明らかにする。

#### 【0105】

本開示を実施するための形態  
組成物

抗体の一般的な構造は、当該技術分野で知られており、ここでは簡単に要約する。免疫グロブリンモノマーは、ジスルフィド結合で連結された二の重鎖と二の軽鎖とを含む。各重鎖は、それがジスルフィド結合を介して直接結合している軽鎖の一つと対になっている。各重鎖は、定常領域(抗体のアイソタイプによって異なる)と可変領域とを含む。可変領域は、CDRH1、CDRH2、及びCDRH3と称され、フレームワーク領域内に維持される三つの超可変領域(すなわち相補性決定領域)を含む。各軽鎖は、定常領域と可変領域とを含み、可変領域は重鎖の可変領域に類似の様式でフレームワーク領域によって維持される三つの超可変領域(CDR L1、CDR L2、及びCDR L3と称される)を含む。

#### 【0106】

重鎖及び軽鎖の各対の超可変領域は、互いに協働して、標的抗原に結合することができる抗原結合部位を提供する。重鎖及び軽鎖の対の結合特異性は、重鎖並びに軽鎖のCDR

1、C D R 2、及びC D R 3の配列によって既定される。したがって、特定の結合特異性を生じる一組のC D R配列（すなわち重鎖並びに軽鎖のC D R 1、C D R 2、及びC D R 3の配列）が決定されると、その一組のC D R配列は、原則として、同一の抗原結合特異性を有する異なる抗体を提供するために、任意の抗体定常領域と連結された任意の他の抗体フレームワーク領域内の適切な位置に挿入されうる。

【0107】

一態様において、本開示で提供されるのは、重鎖（H C）免疫グロブリン可変ドメイン配列及び軽鎖（L C）免疫グロブリン可変ドメイン配列を含む単離抗体であり、ここで重鎖及び軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列は、アミノ酸配列K H S D S K E D D G Q E I A（配列番号1）を含むヒトB 7 - H 3のエピトープに結合する結合部位を形成し、かつ/又は少なくとも $6.7 \times 10^{-11}$  Mの半数効果濃度（E C<sub>50</sub>）を有する。

10

【0108】

一態様では、本開示のB 7 - H 3抗体の重鎖及び軽鎖のC D R 3の配列は、それぞれ配列番号4又は10及び配列番号7のアミノ酸配列を含む。

【0109】

一態様では、本開示のB 7 - H 3抗体の重鎖及び軽鎖のC D R 1及びC D R 2の配列は、それぞれ配列番号2又は8及び配列番号3又は9のアミノ酸配列を含む。

【0110】

一態様では、本開示のB 7 - H 3抗体の軽鎖のC D R 1の配列は、配列番号5のアミノ酸配列を含む。

20

【0111】

一態様では、本開示のB 7 - H 3抗体の軽鎖のC D R 2の配列は、配列番号6のアミノ酸配列を含む。

【0112】

別の態様では、本開示のB 7 - H 3抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖のC D R 3配列と、配列番号4のアミノ酸配列を含む重鎖のC D R 3配列とを有する。

【0113】

別の態様では、本開示のB 7 - H 3抗体は、配列番号7のアミノ酸配列を含む軽鎖のC D R 3配列と、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖のC D R 3配列とを有する。

【0114】

好ましい抗体（S P 2 6 5及びS 1 0 - H 5 0 L 5 8）からの特異的なC D R 1、C D R 2、及びC D R 3配列を表1に示す。したがって、本開示は、これらの好ましい抗体からの配列を有するC D R 1から3を含む抗体を提供する。

30

【0115】

本技術の別の態様では、単離抗体は、以下の特徴の一又は複数を含む。

【0116】

（a） L C免疫グロブリン可変ドメイン配列は、S P 2 6 5及びS 1 0 - H 5 0 L 5 8のL C可変ドメインのC D Rと少なくとも85%同一である一又は複数のC D Rを含む；

【0117】

（b） H C免疫グロブリン可変ドメイン配列は、S P 2 6 5及びS 1 0 - H 5 0 L 5 8のH C可変ドメインのC D Rと少なくとも85%同一である一又は複数のC D Rを含む；

40

【0118】

（c） L C免疫グロブリン可変ドメイン配列は、S P 2 6 5及びS 1 0 - H 5 0 L 5 8のL C可変ドメインと少なくとも85%同一である；

【0119】

（d） H C免疫グロブリン可変ドメイン配列は、S P 2 6 5及びS 1 0 - H 5 0 L 5 8のH C可変ドメインと少なくとも85%同一である；並びに

【0120】

50

(e) 抗体は、S P 2 6 5 及び S 1 0 - H 5 0 L 5 8 によって結合されたエピトープと重複するエピトープに結合する。

【 0 1 2 1 】

一態様では、本開示は、S P 2 6 5 及び S 1 0 - H 5 0 L 5 8 からなる群より選択される抗体と少なくとも 8 5 % 同一である単離抗体を提供する。一態様では、本開示は、S P 2 6 5 及び S 1 0 - H 5 0 L 5 8 からなる群より選択される単離抗体を提供する。

【 0 1 2 2 】

一態様では、本開示は、S P 2 6 5 の C D R を含む単離抗体を提供する。一態様では、本開示は、S P 2 6 5 に少なくとも 8 5 % 同一である単離抗体を提供する。S P 2 6 5 の C D R を表 1 に示す。

10

【 0 1 2 3 】

一態様では、本開示は、S 1 0 - H 5 0 L 5 8 の C D R を含む単離抗体を提供する。一態様では、本開示は、S 1 0 - H 5 0 L 5 8 に少なくとも 8 5 % 同一である単離抗体を提供する。S 1 0 - H 5 0 L 5 8 の C D R を表 1 に示す。

【 0 1 2 4 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、H C 可変ドメイン配列は、S P 2 6 5 の可変ドメイン配列を含み、L C 可変ドメイン配列は、S P 2 6 5 の可変ドメイン配列を含む。

【 0 1 2 5 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、H C 可変ドメイン配列は、S 1 0 - H 5 0 L 5 8 の可変ドメイン配列を含み、L C 可変ドメイン配列は、S 1 0 - H 5 0 L 5 8 の可変ドメイン配列を含む。

20

【 0 1 2 6 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、抗体は、 $10^{-4}$  M、 $10^{-5}$  M、 $10^{-6}$  M、 $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  M、 $10^{-10}$  M、 $10^{-11}$  M 又は  $10^{-12}$  M 未満の解離定数 ( $K_D$ ) でヒト B 7 - H 3 と結合する。本明細書で提供される抗体のいくつかの態様では、抗原結合部位は、ヒト B 7 - H 3 に特異的に結合する。

【 0 1 2 7 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は可溶性 F a b である。

【 0 1 2 8 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、H C 及び L C 可変ドメイン配列は、同じポリペプチド鎖の構成要素である。本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、H C 及び L C 可変ドメイン配列は、異なるポリペプチド鎖の構成要素である。

30

【 0 1 2 9 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は完全長抗体である。

【 0 1 3 0 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体はモノクローナル抗体である。

【 0 1 3 1 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、キメラであるか又はヒト化されている。

40

【 0 1 3 2 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、F a b、F ( a b ) '、 $2$ 、F a b '、s c F<sub>v</sub>、及び F<sub>v</sub> からなる群より選択される。

【 0 1 3 3 】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、F c ドメインを含む。本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、ウサギ抗体である。本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、ヒト若しくはヒト化抗体であるか、又はヒトにおいて非免疫原性である。

【 0 1 3 4 】

50

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、ヒト抗体フレームワーク領域を含む。

【0135】

他の態様において、本明細書で提供される抗体のCDRにおける一又は複数のアミノ酸残基は、別のアミノ酸で置換されている。置換は、アミノ酸の同じファミリー内の置換であるという意味において、「保存的」でありうる。天然に存在するアミノ酸は、以下の4つのファミリーに分けることができ、それらのファミリー内で保存的置換が起こる。

【0136】

1) 塩基性側鎖を有するアミノ酸：リジン、アルギニン、ヒスチジン

【0137】

2) 酸性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸

【0138】

3) 非荷電極性側鎖を有するアミノ酸：アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン

【0139】

4) 非極性側鎖を有するアミノ酸：グリシン、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、トリプトファン、システイン

【0140】

別の態様では、一又は複数のアミノ酸残基が、抗体の一又は複数のCDRに付加又はそのCDRから欠失している。そのような付加又は欠失は、CDRのN若しくはC末端又はCDR内のある位置で起こる。

【0141】

アミノ酸の付加、欠失又は置換によって抗体のCDRのアミノ酸配列を変化させることにより、標的抗原に対する結合親和性の増加などの様々な効果を得ることができる。

【0142】

そのような様々なCDR配列を含む本開示の抗体は、SP265と類似の特異性及び感受性プロファイルを有するB7-H3にさらに結合することが理解されるべきである。これは、本明細書に記載の実施例に開示される結合アッセイにより試験することができる。

【0143】

抗体の定常領域はまた、抗体SP265について具体的に開示されているものから変動し得る。例えば、任意のアイソタイプ：IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)又はIgMのFc領域を抗体に提供することができる、定常領域配列の非限定的な例は、以下を含む：

【0144】

ヒトIgD定常領域、UniProt: P01880 配列番号15

A P T K A P D V F P I I S G C R H P K D N S P V V L A C L I T G Y H P T S V T V  
T W Y M G T Q S Q P Q R T F P E I Q R R D S Y Y M T S S Q L S T P L Q Q W R Q G  
E Y K C V V Q H T A S K S K K E I F R W P E S P K A Q A S S V P T A Q P Q A E G  
S L A K A T T A P A T T R N T G R G G E E K K K E K E K E E Q E E R E T K T P E  
C P S H T Q P L G V Y L L T P A V Q D L W L R D K A T F T C F V V G S D L K D A  
H L T W E V A G K V P T G G V E E G L L E R H S N G S Q S Q H S R L T L P R S L  
W N A G T S V T C T L N H P S L P P Q R L M A L R E P A A Q A P V K L S L N L L  
A S S D P P E A A S W L L C E V S G F S P P N I L L M W L E D Q R E V N T S G F  
A P A R P P P Q P G S T T F W A W S V L R V P A P P S P Q P A T Y T C V V S H E  
D S R T L L N A S R S L E V S Y V T D H G P M K

【0145】

ヒトIgG1定常領域、UniProt: P01857 配列番号16

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T  
Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G



P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W  
Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K  
E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E  
L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V  
L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T  
Q K S L S L S P G K

【0146】

ヒトIgG2定常領域、Uniprot:P01859 配列番号17

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S N F G T Q T  
Y T C N V D H K P S N T K V D K T V E R K C C V E C P P C P A P P V A G P S V F  
L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V Q F N W Y V D G  
V E V H N A K T K P R E E Q F N S T F R V V S V L T V V H Q D W L N G K E Y K C  
K V S N K G L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N  
Q V S L T C L V K G F Y P S D I S V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P M L D S D  
G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L  
S L S P G K

10

【0147】

ヒトIgG3定常領域、Uniprot:P01860 配列番号18

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T Q T  
Y T C N V N H K P S N T K V D K R V E L K T P L G D T T H T C P R C P E P K S C  
D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P E P K S C D T P P P C P R C P  
A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D  
P E V Q F K W Y V D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T F R V V S V L T V L H  
Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K T K G Q P R E P Q V Y T  
L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S S G Q P E N N  
Y N T T P P M L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N I F S C S V M H E  
A L H N R F T Q K S L S L S P G K

20

【0148】

ヒトIgM定常領域、Uniprot:P01871 配列番号19

G S A S A P T L F P L V S C E N S P S D T S S V A V G C L A Q D F L P D S I T L  
S W K Y K N N S D I S S T R G F P S V L R G G K Y A A T S Q V L L P S K D V M Q  
G T D E H V V C K V Q H P N G N K E K N V P L P V I A E L P P K V S V F V P P R  
D G F F G N P R K S K L I C Q A T G F S P R Q I Q V S W L R E G K Q V G S G V T  
T D Q V Q A E A K E S G P T T Y K V T S T L T I K E S D W L G Q S M F T C R V D  
H R G L T F Q Q N A S S M C V P D Q D T A I R V F A I P P S F A S I F L T K S T  
K L T C L V T D L T T Y D S V T I S W T R Q N G E A V K T H T N I S E S H P N A  
T F S A V G E A S I C E D D W N S G E R F T C T V T H T D L P S P L K Q T I S R  
P K G V A L H R P D V Y L L P P A R E Q L N L R E S A T I T C L V T G F S P A D  
V F V Q W M Q R G Q P L S P E K Y V T S A P M P E P Q A P G R Y F A H S I L T V  
S E E E W N T G E T Y T C V A H E A L P N R V T E R T V D K S T G K P T L Y N V  
S L V M S D T A G T C Y

30

40

【0149】

ヒトIgG4定常領域、Uniprot:P01861 配列番号20

A S T K G P S V F P L A P C S R S T S E S T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S  
W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V V T V P S S S L G T K T  
Y T C N V D H K P S N T K V D K R V E S K Y G P P C P S C P A P E F L G G P S V  
F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S Q E D P E V Q F N W Y V D  
G V E V H N A K T K P R E E Q F N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K

50

CKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTK  
 NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSD  
 DGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS  
 LSLSLGK

【0150】

ヒトIgA1定常領域、Uniprot:P01876 配列番号21

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVT  
 WSESGQGVTARNFPSPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAG  
 KSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPCVPSTPTPTPSPSTPTPTSP  
 SCCHPRLSLHRLPALEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGVTF  
 TWTTPSSGKSAVQGPPEERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGK  
 TFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVHLLPPPSEEL  
 ALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREKYLTWA  
 SRQEPSQGTTTFAVTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEAL  
 PLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

10

【0151】

ヒトIgA2定常領域、Uniprot:P01877 配列番号22

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVT  
 WSESGQNVVTARNFPSPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDG  
 KSVTCHVKHYTNPSQDVTVPVPPPPPCCHPRLSLHRLPA  
 LEDLLLGSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTTPSSGKSAVQG  
 PPERDLCGCYSVSSVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKT  
 PLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNELVTLTCLAR  
 GFSKDVLRWLQGSQELPREKYLTWASRQEPSQGTTTFA  
 VTSILRVAAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMA  
 GKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

20

【0152】

ヒトIgカッパ定常領域、Uniprot:P01834 配列番号23

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW  
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK  
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

30

【0153】

いくつかの態様において、SP265及びS10-H50L58抗体は、配列番号15～21又は22と少なくとも80%同一である重鎖定常領域を含む。

【0154】

いくつかの態様において、SP265及びS10-H50L58抗体は、配列番号23と少なくとも80%同一である軽鎖定常領域を含む。

【0155】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、SP265及びS10-H50L58抗体で結合されるエピトープに結合する。

40

【0156】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、B7-H3特異的抗体は、ヒトB7-H3への結合に関してSP265又はS10-H50L58と競合する。

【0157】

本明細書で提供される抗体のいくつかの態様において、抗体は、迅速な結合並びに細胞摂取及び/又は持続放出を促進するための構造的修飾を含む。いくつかの態様において、B7-H3抗体は、迅速な結合並びに細胞摂取及び/又は持続放出を促進するために、抗体のCH2定常重鎖領域に欠失を含む。いくつかの態様において、Fab断片は、迅速な結合並びに細胞摂取及び/又は持続放出を促進するために使用される。いくつかの態様において、F(ab)'2断片は、迅速な結合並びに細胞摂取及び/又は持続放出を促進す

50

るために使用される。

【0158】

抗体、その断片及び等価物は、担体（例えば薬学的に許容される担体）又は他の作用剤と組み合わせて、使用及び／又は保存のための製剤を提供することができる。

【0159】

さらに提供されるのは、アミノ酸配列 K H S D S K E D D G Q E I A（配列番号1）を含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからさらになる、B7-H3に結合する抗体を生成するのに有用な単離されたポリペプチド及び該抗体をコードする単離されたポリヌクレオチドである。一態様において、単離されたポリペプチド又はポリヌクレオチドは、標識及び／又は連続したポリペプチド配列（例えばキーホールリンペットヘモシアニン（K L H）担体タンパク質）を、あるいは、ポリヌクレオチドの場合には、ポリペプチド又はポリヌクレオチドに作動的に連結された、K L Hをコードするポリヌクレオチドをさらに含む。ポリペプチド又はポリヌクレオチドは、種々の担体、例えばリン酸緩衝生理食塩水と組み合わせることができる。さらに提供されるのは、単離されたポリペプチド又はポリヌクレオチドを含む、原核又は真核細胞、例えば細菌、酵母、哺乳動物（ラット、サル、ハムスター又はヒト）等の宿主細胞である。宿主細胞は、担体と組み合わせることができる。

10

【0160】

組成物を調製する方法

抗体、その製造及び使用は、よく知られており、例えばHarlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1999に開示されている。抗体は、当該技術分野で既知の標準的な方法を用いて生成されうる。抗体の例は、抗体のモノクローナル、一本鎖、及び機能的断片を含む（ただしこれらに限定されない）。

20

【0161】

抗体は、様々な宿主、例えばヤギ、ウサギ、ラット、マウス、及びその他において産生されうる。宿主は、B7-H3のC末端断片などの免疫原性特性を有する標的抗原又はその断片若しくはオリゴペプチド、あるいはアミノ酸配列 K H S D S K E D D G Q E I A（配列番号1）を含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからさらになる単離されたポリペプチドの注射により免疫化されうる。宿主種に応じて種々のアジュバントを加え、それらを用いて免疫学的応答を増加させることができる。そのようなアジュバントは、限定されないが、フロイント、水酸化アルミニウムなどの鉱物ゲル、リゾレシチン、ブルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、キーホールリンペットヘモシアニン、及びジニトロフェノールなどの表面界面活性物質を含む。ヒトにおいて使用されるアジュバントの中で、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）及びコリネバクテリウム属パルバム（*Corynebacterium parvum*）が特に有用である。この本開示はまた、単離ポリペプチド及びアジュバントも提供する。

30

【0162】

特定の態様において、本開示の抗体は、ポリクローナル、すなわち異なるアミノ酸配列を有する複数の型の抗B7-H3抗体の混合物である。一態様において、ポリクローナル抗体は、異なるCDRを有する複数の型の抗B7-H3抗体の混合物を含む。このように、異なる抗体を産生する細胞の混合物を培養し、得られた培養物から精製された抗体を使用することができる（国際公開第2004/061104号を参照）。

40

【0163】

モノクローナル抗体製造B7-H3に対するモノクローナル抗体は、培養液中で連続細胞株による抗体分子の産生をもたらす任意の技術を用いて調製することができる。このような技術は、限定されないが、ハイブリドーマ技術（例えばKohler & Milstein, *Nature* 256: 495-497 (1975)参照）；トリオーマ技術；ヒトB細胞ハイブリドーマ技術（例えばKozbor, et al., *Immunol. Today* 4: 72 (1983)参照）及びヒトモノクローナル抗体を産生させるためのEBVハイブリドーマ技術（例えばCole, et al., *MONOCLONAL ANTIBODIES*

50

AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)参照)を含む。ヒトモノクローナル抗体は、本技術の実施において利用することができ、ヒトハイブリドーマを用いることにより(例えばCote, et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 80: 2026-2030 (1983)参照)、又はヒトB細胞をインビトロでエプスタイン・バーウイルスで形質転換することにより(例えばCole, et al., MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96 (1985)参照)産生されうる。例えば、抗体の領域をコードする核酸集団を単離することができる。抗体の保存領域をコードする配列に由来するプライマーを利用するPCRを用いて、集団から抗体の一部をコードする配列を増幅し、次いで増幅された配列から抗体又はその断片、例えば可変ドメインをコードするDNAを再構築する。このような増幅された配列はまた、ファージ又はバクテリア上の融合ポリペプチドの発現及び提示のために、他のタンパク質、例えばバクテリオファージコート又は細菌細胞表面タンパク質をコードするDNAと融合させることができる。次いで、例えばB7-H3ポリペプチド上に存在する抗原又はエピトープに対する発現された抗体若しくはその断片の親和性に基づいて、増幅された配列を発現させ、さらに選別又は単離することができる。あるいは、抗B7-H3モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマは、例えばアミノ酸配列KHS DSKEDDGQEI A(配列番号1)を含むか、又はそれから本質的になるか、又はそれからさらになる単離ポリペプチドで対象を免疫化し、次いで常套的方法を用いて対象の脾臓からハイブリドーマを単離することによって調製することができる。例えば、Milstein et al., (Galfre and Milstein, Methods Enzymol73: 3-46 (1981))を参照のこと。標準的な方法を用いてハイブリドーマをスクリーニングすることは、様々な特異性(すなわち異なるエピトープに対する)及び親和性のモノクローナル抗体を産生させるであろう。所望の特性、例えばB7-H3結合を有する選択されたモノクローナル抗体は、(i)ハイブリドーマにより発現されたままで使用することができ、(ii)ポリエチレングリコール(PEG)のような分子に結合してその特性を変えることができ、又は(iii)モノクローナル抗体をコードするcDNAを単離し、配列決定し、種々の方法で操作することができる。一態様では、抗B7-H3モノクローナル抗体は、不死化細胞と融合した、ヒト重鎖導入遺伝子及び軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えばトランスジェニックマウスから得られるB細胞を含むハイブリドーマにより産生される。ハイブリドーマ技術は、当該技術分野で知られているもの、及びHarlow et al., Antibodies: A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y., 349 (1988); Hammerling et al., Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas, 563-681 (1981)で教示されているものを含む。

#### 【0164】

ファージディスプレイ技術上記のように、本開示の抗体は、組換えDNA及びファージディスプレイ技術の適用によって産生され得る。例えば、抗B7-H3抗体は、当該技術分野で既知の様々なファージディスプレイ法を用いて調製することができる。ファージディスプレイ法では、機能的抗体ドメインが、それらをコードするポリヌクレオチド配列を有するファージ粒子の表面上に提示される。所望の結合特性を有するファージは、抗原、典型的には固体表面又はビーズに結合又は捕捉された抗原を用いて直接選択することにより、レパートリー又はコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えばヒト又はマウス)から選択される。これらの方法で使用されるファージは、典型的にはファージ遺伝子III又は遺伝子VIIタンパク質のいずれかと組み換え融合しているFab、Fv又はジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを有するfd及びM13を含む糸状ファージである。さらに、方法は、B7-H3ポリペプチド、例えばポリペプチド又はその誘導体、断片、類似体若しくはホモログに対する所望の特異性を有するモノクローナルFab断片の迅速かつ効果的な同定を可能にするように、Fab発現ライブラリー(例えばHuse, et al., Science 246: 1275-1281, 1989参照)の構築のために適合されうる。本開示の単離抗体を作製するために使用されうるファージディスプレイ法の他の例は、Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 85: 5879-5883 (1988); Chaudhary et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 87: 1066-1070 (1990); Brinkman et al., J. Immunol. Methods 182: 41-5

0 (1995); Ames et al., J. Immunol. Methods 184: 177-186 (1995); Kettleborough et al., Eur. J. Immunol. 24 952-958 (1994); Persic et al., Gene 187: 9-18 (1997); Burton et al., Advances in Immunology 57: 191-280 (1994); P C T / G B 第 9 1 / 0 1 1 3 4 号; 国際公開第 9 0 / 0 2 8 0 9 号; 国際公開第 9 1 / 1 0 7 3 7 号; 国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号; 国際公開第 9 2 / 1 8 6 1 9 号; 国際公開第 9 3 / 1 1 2 3 6 号; 国際公開第 9 5 / 1 5 9 8 2 号; 国際公開第 9 5 / 2 0 4 0 1 号; 国際公開第 9 6 / 0 6 2 1 3 号; 国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号(Medical Research Council et al.); 国際公開第 9 7 / 0 8 3 2 0 号(M o r p h o s y s); 国際公開第 9 2 / 0 1 0 4 7 号(C A T / M R C); 国際公開第 9 1 / 1 7 2 7 1 号(A f f y m a x); 及び米国特許第 5 6 9 8 4 2 6 号、第 5 2 2 3 4 0 9 号、第 5 4 0 3 4 8 4 号、第 5 5 8 0 7 1 7 号、第 5 4 2 7 9 0 8 号、第 5 7 5 0 7 5 3 号、第 5 8 2 1 0 4 7 号、第 5 5 7 1 6 9 8 号、第 5 4 2 7 9 0 8 号、第 5 5 1 6 6 3 7 号、第 5 7 8 0 2 2 5 号、第 5 6 5 8 7 2 7、及び第 5 7 3 3 7 4 3 号に開示されているものを含む。

#### 【0165】

ポリペプチドをジスルフィド結合を介して結合させることによってバクテリオファージ粒子の表面にポリペプチドを提示するのに有用な方法は、L o h n i n g による米国特許第 6 7 5 3 1 3 6 号で説明されている。上記の参考文献において説明されているように、ファージ選択後、ファージ由来の抗体コード領域は、単離し、ヒト抗体を含む完全抗体又は任意の他の所望の抗原結合断片を生成するのに使用し、かつ哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、及び細菌を含む任意の所望の宿主において発現させることができる。また、例えば F a b、F a b<sub>2</sub>、及び F ( a b )<sub>2</sub> 断片を組換えで生成するための技術も、国際公開第 9 2 / 2 2 3 2 4 号; Mullinax et al., BioTechniques 12: 864-869 (1992); Sawai et al., AJRI 34: 26-34 (1995); 及び Better et al., Science 240: 1041-1043 (1988)に開示されているもののような当該技術分野で既知の方法を用いて使用することができる。

#### 【0166】

一般に、抗体又は抗体断片がファージ又はファージミド粒子の表面に存在することから、良好な結合活性を維持する変異体を同定するために、ディスプレイベクターにクローニングされるハイブリッド抗体又はハイブリッド抗体断片を適切な抗原に対して選択することができる。例えば、Barbas III et al., Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 2001)を参照のこと。ただし、選択及び/又はスクリーニングのために抗体断片ライブラリーを溶菌ファージベクター(修飾 T7 又はラムダ Z a p 系)にクローニングするなど、本方法には他のベクターフォーマットを使用することができる。

#### 【0167】

抗体製造の代替方法抗体はまた、リンパ球集団におけるインビボ産生を誘導することによって、又は組換え免疫グロブリンライブラリー若しくは高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることによっても産生されうる(Orlandi et al., PNAS 86: 3833-3837 (1989); Winter, G. et al., Nature, 349: 293-299 (1991))。

#### 【0168】

あるいは、一本鎖抗体の産生のための技術を使用することができる。一本鎖抗体(s c F v s)は、リンカーペプチド(典型的には長さが約5から25アミノ酸長)と連結された重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。s c F v において、重鎖及び軽鎖の可変領域は、同じ抗体又は異なる抗体に由来しうる。s c F v s は、組換え技術を用いて、例えば大腸菌などの宿主生物における s c F v をコードするベクターの発現によって合成されうる。s c F v をコードする D N A は、上記抗体の重鎖又は重鎖の可変領域をコードする D N A 及び上記抗体の軽鎖又は軽鎖の可変領域をコードする D N A から選択される D N A のアミノ酸配列のうちの全部又は所望の配列をコードする部分的な D N A を鋳型として用い、その両端を規定するプライマー対を用いる P C R 法により増幅を実施することによって、さらにポリペプチドリンカー部分をコードする D N A とその両端を既定するプライマー対

10

20

30

40

50

とを、リンカーの両端がそれぞれ重鎖及び軽鎖と連結するように組み合わせて増幅を実施することにより得ることができる。s c F vをコードするDNAを含む発現ベクター及び発現ベクターによって形質転換された宿主は、当該技術分野で既知の一般的な方法に従って得ることができる。

#### 【0169】

抗原結合断片、例えば抗体分子のペプシン処理により産生されうるF(a b')<sub>2</sub>断片及びF(a b')<sub>2</sub>断片のジスルフィド架橋を還元することにより生成されうるFab断片も生成されうる。あるいは、Fab発現ライブラリーを構築して、所望の特異性を有するモノクローナルFab断片を迅速かつ容易に同定することができる(Huse et al., Science, 256: 1275-1281 (1989))。

10

#### 【0170】

抗体修飾本開示の抗体は、抗原に対する親和性を増加させるために多量体化することができる。多量化する抗体としては、一種類の抗体であっても、同一の抗原の複数のエピトープを認識する複数の抗体であってもよい。抗体の多量体化の方法としては、IgG C H3ドメインの二のs c F v分子との結合、ストレプトアビジンとの結合、ヘリックス・ターン・ヘリックス・モチーフの導入等が例として挙げられる。

#### 【0171】

本明細書に開示の抗体組成物は、これらの抗体のいずれかと別の作用剤との間で形成されるコンジュゲートの形態(イムノコンジュゲート)であってもよい。一態様において、本明細書に開示の抗体は、放射性物質にコンジュゲートされている。別の態様では、本明細書に開示の抗体は、ポリエチレングリコール(PEG)などの様々な種類の分子に結合されうる。

20

#### 【0172】

抗体スクリーニング種々のイムノアッセイが、所望の特異性を有する抗体を同定するためのスクリーニングに用いられうる。確立された特異性を有するポリクローナル抗体又はモノクローナル抗体のいずれかを用いる競合結合又はイムノラジオメトリックアッセイのための多数のプロトコールが当該技術分野で周知である。そのようなイムノアッセイは、典型的には、B7-H3又はその任意の断片若しくはオリゴペプチドと、その特異的抗体との間の複合体形成の測定を伴う。二の非干渉性B7-H3エピトープに特異的なモノクローナル抗体を利用する、モノクローナルベースの2部位イムノアッセイを使用することができ、競合結合アッセイを用いることもできる(Maddox et al., J. Exp. Med., 158: 1211-1216 (1983))。

30

#### 【0173】

可能性の高い抗B7-H3抗体の自動免疫組織化学(IHC)スクリーニングは、Ventana Medical Systems, Inc (VMSI) Discovery XT及びホルマリン固定パラフィン包埋ヒト組織を用いてスライドガラス上で実施することができる。組織試料は、最初に脱パラフィンされ、抗原回収、続いて可能性の高い抗B7-H3抗体及び検出抗体の添加を経る。検出抗体は、VMSIの色素原検出試薬を用いて視覚化される。染色されたスライドを顕微鏡下で手動でスクリーニングする。正しい一次抗体染色パターンを有する試料は、可能性の高い抗B7-H3候補として選択される。

40

#### 【0174】

抗体精製本明細書に開示の抗体は、均一性まで精製することができる。抗体の分離及び精製は、従来のタンパク質分離及び精製方法を用いて実施することができる。

#### 【0175】

ほんの一例として、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、分取ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動等の使用を適切に選択し組み合わせることによって、抗体を分離及び精製することができる。Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual, Daniel R. Marshakら編., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1996); Antibodies: A Laboratory Manual

50

. Ed Harlow及びDavid Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988)。

【 0 1 7 6 】

クロマトグラフィーの例は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、及び吸着クロマトグラフィーを含む。一態様において、クロマトグラフィーは、HPLC又はFPLCなどの液体クロマトグラフィーを使用することにより実施される。

【 0 1 7 7 】

一態様では、プロテインAカラム又はプロテインGカラムをアフィニティークロマトグラフィーに使用することができる。他の例示的なカラムは、プロテインAカラム、Hyper D、POROS、Sephacrose F.F. (Pharmacia) 等を含む。

【 0 1 7 8 】

使用方法

概略本明細書に開示の抗体は、B7-H3ポリペプチドの局在化及び/又は定量化に関する当該技術分野で既知の方法において(例えば適切な生理学的試料中のB7-H3ポリペプチドのレベルの測定における使用のため、診断方法における使用のため、ポリペプチドの画像化における使用のため等)有用である。本明細書に開示の抗体は、アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降などの標準的な技術によってB7-H3ポリペプチドを単離する際に有用である。本明細書に開示のB7-H3抗体は、生物学的試料、例えば哺乳動物の血清又は細胞及び宿主系において発現される組換え産生B7-H3ポリペプチド由来の天然B7-H3ポリペプチドの精製を容易にすることができる。さらに、ポリペプチドの発現の量及びパターンを評価するために、B7-H3抗体を用いて(例えば、血漿、細胞溶解物又は細胞上清中の)B7-H3ポリペプチドを検出することができる。例えば所与の治療レジメンの有効性を決定するために、臨床試験手順の一部として本明細書に開示のB7-H3抗体を用いて、組織中のB7-H3レベルを診断的にモニターすることができる。検出は、本明細書に開示のB7-H3抗体を検出可能な物質とカップリング(すなわち物理的に連結)させることにより促進される。

【 0 1 7 9 】

別の態様において、本明細書で提供されるのは、配列番号1を含むペプチドに結合する、本明細書に開示の抗体又は抗原結合断片、例えばヒトB7-H3タンパク質又はその断片を含む組成物である。一態様において、配列番号1を含むペプチドは、細胞と結合している。例えば、組成物は、本明細書に開示の抗体又は抗体断片で標識された脱凝集細胞試料を含んでもよく、またその組成物は、例えば細胞を単離するため又はフローサイトメトリーに基づく細胞分析若しくは細胞選別のためのアフィニティークロマトグラフィー法において有用である。別の例として、組成物は、本明細書に開示の抗体又は抗体断片で標識された固定組織試料若しくは細胞塗抹標本を含んでもよく、またその組成物は、例えば免疫組織化学的又は細胞学的分析において有用である。別の態様において、抗体又は抗体断片は、B7-H3タンパク質若しくはその断片、B7-H3陽性細胞又はB7-H3と他の細胞成分とを含有する複合体を単離するための例えばELISA、アフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降法において有用である固体支持体に結合している。別の態様において、配列番号1を含むペプチドは、固体支持体に結合している。例えば、該ペプチドは、サンドイッチELISAなどにおいて有用である、ペプチドに特異的な二次抗体を介して固体支持体に結合していてもよい。別の例として、該ペプチドは、例えば本技術による抗体の単離又は精製において有用であるクロマトグラフィーカラムに結合していてもよい。別の態様において、該ペプチドは、B7-H3タンパク質若しくはその断片、又はB7-H3と他の細胞成分とを含有する複合体を単離するための、例えばELISA及びアフィニティークロマトグラフィー又は免疫沈降法において有用な溶液、例えば分画した細胞の亜細胞画分を含有する溶解液又は溶液中に配置される。別の態様において、該ペプチドは、例えばゲル電気泳動ゲルなどのマトリックス、又はウェスタンブロットティングの

ために一般的に使用されるマトリックス（ニトロセルローズ又はフッ化ポリビニリデンから形成された膜など）と結合し、その組成物は、電気泳動法及び／又は免疫プロットティング（例えばウェスタンブロットティング）に有用である。

#### 【0180】

B7-H3ポリペプチドの検出生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドのレベルを検出するための例示的な方法は、対象から生物学的試料を得ることと、B7-H3ポリペプチドを検出することができる本明細書に開示のB7-H3抗体と生物学的試料を接触させることとを含む。

#### 【0181】

一態様では、B7-H3抗体SP265及びS10H50L58又はその断片は、検出可能に標識される。抗体に関して「標識された」という用語は、抗体に検出可能な物質をカップリング（すなわち物理的に結合）させることによる、抗体の直接的な標識化、及び直接的に標識化される別の化合物との反応による、抗体の間接的な標識化を含むことが意図される。間接的な標識化の非限定的な例は、蛍光標識二次抗体を用いた一次抗体の検出、及び蛍光標識ストレプトアビジンで検出できるようなビオチンによるDNAプローブの末端標識化を含む。

#### 【0182】

本開示の検出方法は、インビトロ及びインビボで生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドの発現レベルを検出するために使用されうる。B7-H3ポリペプチドの検出のためのインビトロ技術は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウェスタンブロット、フローサイトメトリー、免疫沈降法、ラジオイムノアッセイ、及び免疫蛍光法（例えばIHC）を含む。さらに、B7-H3ポリペプチドの検出のためのインビボ技術は、標識された抗B7-H3抗体を対象に導入することを含む。ほんの一例として、抗体は放射性マーカーで標識することができ、対象におけるその存在及び位置が標準的な画像化技術により検出されうる。一態様において、生物学的試料は、試験対象からのポリペプチド分子を含む。

#### 【0183】

イムノアッセイ及び画像化抗体に基づく技術を用いて生物学的試料（例えばヒト血漿）中のB7-H3ポリペプチドレベルをアッセイするために、本明細書に開示のB7-H3抗体を使用することができる。例えば、組織におけるタンパク質発現は、古典的な免疫組織化学（IHC）染色法で調べることができる。Jalkanen, M. et al., J. Cell. Biol. 101: 976-985 (1985); Jalkanen, M. et al., J. Cell. Biol. 105: 3087-3096 (1987)。タンパク質遺伝子発現を検出するのに有用な他の抗体に基づく方法は、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）及びラジオイムノアッセイ（RIA）などのイムノアッセイを含む。適切な抗体アッセイ標識は、当該技術分野で既知であり、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識と、ヨウ素（ $^{125}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ 、 $^{131}\text{I}$ ）、炭素（ $^{14}\text{C}$ ）、硫黄（ $^{35}\text{S}$ ）、トリチウム（ $^3\text{H}$ ）、インジウム（ $^{112}\text{In}$ ）、及びテクネチウム（ $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）などの放射性同位体又は他の放射性剤と、フルオレセイン及びローダミンなどの蛍光標識、並びにビオチンを含む。

#### 【0184】

生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドレベルをアッセイすることに加えて、B7-H3ポリペプチドレベルは、画像化によってインビボで検出することもできる。B7-H3ポリペプチドレベルのインビボ画像化のために抗B7-H3抗体と組み合わせることができる標識は、X線撮影、NMR又はESRによって検出可能なものを含む。X線撮影の場合、適切な標識は、検出可能な放射線を放出するが対象にとって明らかに有害でない、バリウム又はセシウムなどの放射性同位体を含む。NMR及びESRのための適切なマーカーは、関連のscFvクローンに対する栄養素の標識化によりB7-H3抗体に組み込まれうる、重水素などの検出可能で特徴的なスピンを有するものを含む。

#### 【0185】

放射性同位体（例えば $^{131}\text{I}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ ）、放射線不透過性物質、

10

20

30

40

50



又は核磁気共鳴により検出可能な物質などの検出可能で適切な画像化部分で標識されている B 7 - H 3 抗体が対象に（例えば非経口的に、皮下又は腹腔内に）導入される。対象の大きさ及び使用される画像化システムが診断画像を生成するために必要な画像化部分の量を決定するであろうことは、当技術分野において理解されるであろう。放射性同位体部分の場合、ヒトの対象に対して注入される放射能の量は、通常約 5 から 20 ミリキュリー の範囲の  $^{99}\text{mTc}$  であろう。次いで、標識された B 7 - H 3 抗体は、特異的標的ポリペプチドを含む細胞の位置に優先的に蓄積するであろう。インビボ腫瘍画像化は、例えば S. W. Burchiel et al., Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer 13 (1982) で説明されている。

#### 【0186】

いくつかの態様において、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進する構造修飾を含む B 7 - H 3 抗体は、インビボ画像化検出方法において有用である。いくつかの態様において、B 7 - H 3 抗体は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために、抗体の C H 2 定常重鎖領域に欠失を含む。いくつかの態様において、F a b 断片は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために使用される。いくつかの態様において、F ( a b ) ' 2 断片は、迅速な結合並びに細胞摂取及び／又は持続放出を促進するために使用される。

#### 【0187】

B 7 - H 3 抗体の診断用途本明細書に開示の B 7 - H 3 抗体組成物は、診断及び予後の方法において有用である。このため、本開示は、対象における B 7 - H 3 関連の医学的状態の診断において本明細書に開示の抗体を使用するための方法を提供する。本明細書に開示の抗体は、それらが高レベルのエピトープ結合特異性及び B 7 - H 3 ポリペプチドに対する高い結合親和性を有するように選択することができる。一般に、抗体の結合親和性が高ければ高いほど、よりストリンジェントな洗浄条件をイムノアッセイにおいて実施し、標的ポリペプチドを除去することなく非特異的に結合した物質を除去することができる。したがって、診断アッセイに有用な本技術の B 7 - H 3 抗体は通常、少なくとも  $10^{-6}$ 、 $10^{-7}$ 、 $10^{-8}$ 、 $10^{-9}$ 、 $10^{-10}$ 、 $10^{-11}$  又は  $10^{-12}$  M の結合親和性を有する。特定の態様では、診断試薬として使用される B 7 - H 3 抗体は、少なくとも 12 時間、少なくとも 5 時間、少なくとも 1 時間又は少なくとも 30 分以内に標準条件下で平衡に達するのに十分な動的会合速度(kinetic on-rate)を有する。

#### 【0188】

本開示のいくつかの方法は、診断用試薬として抗 B 7 - H 3 抗体及びポリクローナル抗 B 7 - H 3 抗体組成物のポリクローナル調製物を用い、他の方法はモノクローナル単離物を用いる。上述の方法に従って調製されたポリクローナルヒト抗 B 7 - H 3 抗体を用いる方法において、調製物は通常、各種の B 7 - H 3 抗体、例えば標的ポリペプチドに対して異なるエピトープ特異性を有する抗体を含む。本開示のモノクローナル抗 B 7 - H 3 抗体は、密接に関連する抗原の存在下又は存在の可能性下で単一の抗原の検出に有用である。

#### 【0189】

本開示の B 7 - H 3 抗体は、いずれの種類 of 生物学的試料に対しても診断試薬として使用することができる。一態様では、本明細書に開示の B 7 - H 3 抗体は、ヒト生物学的試料に対する診断試薬として有用である。B 7 - H 3 抗体を使用して、様々な標準アッセイフォーマットで B 7 - H 3 ポリペプチドを検出することができる。そのようなフォーマットは、免疫沈降、ウェスタンブロッティング、E L I S A、ラジオイムノアッセイ、フローサイトメトリー、I H C、及び免疫測定を含む。Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988); 米国特許第 3 7 9 1 9 3 2 号; 第 3 8 3 9 1 5 3 号; 第 3 8 5 0 7 5 2 号; 第 3 8 7 9 2 6 2 号; 第 4 0 3 4 0 7 4 号; 第 3 7 9 1 9 3 2 号; 第 3 8 1 7 8 3 7 号; 第 3 8 3 9 1 5 3 号; 第 3 8 5 0 7 5 2 号; 第 3 8 5 0 5 7 8 号; 第 3 8 5 3 9 8 7 号; 第 3 8 6 7 5 1 7 号; 第 3 8 7 9 2 6 2 号; 第 3 9 0 1 6 5 4 号; 第 3 9 3 5 0 7 4 号; 第 3 9 8 4 5 3 3 号; 第 3 9 9 6 3 4 5 号; 第 4 0 3 4 0 7 4 号; 及び第 4 0 9 8 8 7 6 号を参照のこと。生物学的試料は

、対象の任意の組織（生検を含む）、細胞又は体液から得ることができる。

【0190】

B7-H3抗体の予後用途本開示はまた、対象が、B7-H3ポリペプチドの発現又は活性の増加に関連する医学的疾患又は状態を発症するリスクがあるかどうかを判定するための予後（又は予測）アッセイ（例えば前がん細胞の検出）を提供する。そのようなアッセイは、予後又は予測目的で用いられ、それによりB7-H3ポリペプチド発現によって特徴付けられるか又はそれに関連する医学的疾患若しくは症状の発症前に個体を予防的に治療することができる。

【0191】

本開示の別の態様は、対象におけるB7-H3発現を判定し、それによりその対象に適した治療化合物又は予防化合物を選択するための方法を提供する。

10

【0192】

あるいは、予後アッセイを利用して、膀胱移行細胞癌、腎細胞癌、及び肺扁平上皮癌を有するか又は発症するリスクのある対象を同定することができる。したがって、本開示は、対照試料と比較したB7-H3ポリペプチドのレベルの増加の存在がB7-H3ポリペプチド発現レベルの増加に関連する疾患若しくは状態を有するか又は発症するリスクのある対象に対する予測である、B7-H3ポリペプチド発現レベルの増加に関連する疾患又は状態を同定するための方法（ここで試験試料は対象から得られ、かつB7-H3ポリペプチドが検出される）を提供する。いくつかの態様において、増加したB7-H3ポリペプチド発現レベルに関連する疾患又は状態は、膀胱移行細胞癌、腎細胞癌、及び肺扁平上皮癌からなる群より選択される。

20

【0193】

別の態様では、本開示は、増加したB7-H3ポリペプチド発現に関連する疾患又は状態のための化合物で対象を効果的に治療することができるかどうかを判定する方法（ここで生物学的試料は対象から得られ、かつB7-H3抗体を用いてB7-H3ポリペプチドが検出される）を提供する。対象から得られた生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドの発現レベルを決定し、該疾患を有しない対象から得られた生物学的試料中に見出されるB7-H3発現レベルと比較する。健康な対象から得られた試料と比較した、該疾患又は状態を有すると疑われる対象から得られた試料中のB7-H3ポリペプチドのレベルの上昇は、治療される対象におけるB7-H3関連疾患又は状態を示す。

30

【0194】

B7-H3ポリペプチドの発現レベルの上昇が疾患を有する対象が特定のタイプの療法又は治療に応答する可能性が高いかどうかを示すことが知られているような疾患状態は、多く存在する。したがって、生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドを検出する方法は、例えば対象が療法又は治療に応答する可能性を評価するために、予後の方法として用いることができる。対象からの適切な組織又は体液試料中のB7-H3ポリペプチドのレベルを決定し、適切な対照、例えば同じ疾患を有するが治療に対しすでに好ましい応答をした対象におけるレベルと比較する。

【0195】

一態様では、本開示は、B7-H3ポリペプチドの発現への作用剤（例えば薬物、化合物又小分子）の影響をモニターする方法を提供する。そのようなアッセイは、基本的な薬物スクリーニング及び臨床試験に適用することができる。例えば、B7-H3ポリペプチドレベルを低下させる作用剤の有効性は、B7-H3の発現上昇を示す対象、例えばがんと診断された患者の臨床試験においてモニターすることができる。B7-H3ポリペプチドの発現に影響を及ぼす作用剤は、その作用剤を投与し、応答を観察することにより同定することができる。このようにして、B7-H3ポリペプチドの発現パターンは、作用剤に対する対象の生理的応答を示すマーカーとしての役割を果たしうる。したがって、この応答状態は、作用剤による対象の治療の前及び治療中の様々な時点で決定されうる。

40

【0196】

自動化実施態様当業者であれば、本明細書に開示のB7-H3抗体を使用するための方

50

法の態様が自動化されうることを理解するであろう。Ventana Medical Systems, Inc は、自動分析を実施するためのシステム及び方法を開示している、米国特許第5650327号、第5654200号、第6296809号、第6352861号、第6827901号、及び第6943029号、並びに米国特許出願公開第20030211630号及び第20040052685（これらは各々参照により本明細書に援用される）を含めた多くの米国特許の譲渡人である。B7-H3染色手順の特定の態様は、様々な自動化手順を用いて実施することができる。

#### 【0197】

##### キット

本明細書に記載されるように、本開示は、B7-H3の発現レベルを決定するための診断方法を提供する。一つ特定の態様において、本開示は、このような方法を実施するためのキット、並びに組織の収集及び/又はスクリーニングの実施及び/又は結果の分析などの本開示の方法を実施するための説明書を提供する。

#### 【0198】

キットは、本明細書に開示のB7-H3抗体組成物（例えばモノクローナル抗体）及び使用説明書を含むか、又はそれらから本質的になるか、又はそれらからさらになる。キットは、例えば痰、血清、血漿、リンパ液、囊胞液、尿、便、脳脊髄液、腹水(acitic fluid)又は血液を含むがこれらに限定されない任意の体液及び身体組織の生検試料を含めた生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドの存在を検出するのに有用である。試験試料は、腫瘍細胞、腫瘍に隣接する正常細胞、腫瘍の組織型に相当する正常細胞、血液細胞、末梢血リンパ球又はそれらの組み合わせであってもよい。上記の方法で使用される試験試料は、アッセイフォーマット、検出方法の性質、及びアッセイ試料として使用される組織、細胞又は抽出物によって異なるであろう。細胞のタンパク質抽出物又は膜抽出物を調製するための方法は、当該分野で既知であり、利用される系と適合性の試料を得るために容易に適合させることができる。

#### 【0199】

いくつかの態様では、キットは、生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドに結合することができる一又は複数のB7-H3抗体（例えばB7-H3抗体SP265の同じ抗原結合特異性を有する抗体又はその抗原結合断片）；試料中のB7-H3ポリペプチドの量を決定するための手段；及び試料中のB7-H3ポリペプチドの量を標準と比較する手段を含む。一又は複数のB7-H3抗体は、標識されていてもよい。キット構成要素（例えば試薬）は、適切な容器に入れることができる。キットは、キットを使用してB7-H3ポリペプチドを検出するための説明書をさらに含むことができる。特定の態様において、キットは、B7-H3ポリペプチドに結合する第一の抗体、例えば固体支持体に結合したもの；及び任意選択的に；2）B7-H3ポリペプチド又は第一の抗体のいずれかに結合し、かつ検出可能な標識にコンジュゲートしている第二の異なる抗体を含む。

#### 【0200】

キットはまた、例えば緩衝剤、防腐剤又はタンパク質安定化剤も含むことができる。キットは、検出可能な標識、例えば、酵素又は基質を検出するために必要な構成要素をさらに含むことができる。キットはまた、対照試料又は一連の対照試料を含んでもよく、それをアッセイして試験試料と比較することができる。キットの各構成要素は、個々の容器に入れられていてもよく、様々な容器はすべて、キットを用いて実施されたアッセイの結果を解釈するための説明書とともに一つに梱包されていてもよい。本開示のキットは、キット容器の表面又は中に書面による製品を含んでいてもよい。書面による製品は、キットに含まれている試薬の使用方法を説明する。

#### 【0201】

したがって、これらの示唆されたキットの構成要素は、当業者が使用するために慣例的な様式で梱包することができる。例えば、これらの示唆されたキットの構成要素は、溶液中又は液体分散物などとして提供されうる。

#### 【実施例】

## 【 0 2 0 2 】

## 実施例 1 ウサギモノクローナル抗体生成

図 1 は、ウサギ宿主を使用して B 7 - H 3 モノクローナル抗体を作製するために用られる全体的な手順を示す。抗 B 7 - H 3 ウサギモノクローナル一次抗体は、ヒト B 7 - H 3 のアミノ酸残基 5 2 1 ~ 5 3 4 に相当する配列 K H S D S K E D D G Q E I A ( 配列番号 1 ) に対して向けられた。したがって、得られた抗体は、ヒト B 7 - H 3 の C 末端領域を標的とするであろう。

## 【 0 2 0 3 】

キーホールリンペットヘモシアニン ( K L H ) 担体タンパク質へのコンジュゲーションを促進するために、14 アミノ酸ペプチドを合成し、合成中に配列の N 末端に追加の 2 つのアミノ酸 ( C y s - G l y ) を付加した。ニュージーランド白色ウサギを、完全フロイントアジュバントで乳化させた K L H コンジュゲートペプチドで免疫化し、これに不完全フロイントアジュバントで乳化させた一連の追加免疫用量の免疫原が続いた。I H C 陽性ポリクローナル抗体を生成したウサギをさらなるモノクローナル開発のために選択した。抗体発現細胞を単離し、配列 K H S D S K E D D G Q E I A ( 配列番号 1 ) に対する反応性についての酵素結合免疫吸着アッセイ ( E L I S A ) ( Antibodies: A Laboratory Manual, 第 2 版, 661 頁参照 ) により、及び対照 H s 7 0 0 t 異種移植片ブロックでの I H C アッセイ ( 図 2 A ) によりスクリーニングした。I H C 陽性抗体産生細胞が同定された時点で、抗体重鎖及び軽鎖をコードする c D N A を単離し、標準的な組換え技術を用いてクローニングした。次に、クローン化された重鎖及び軽鎖 c D N A を共トランスフェクションすることによりモノクローナル抗体を産生させ、得られた抗体の機能性を I H C によって確認した。最大の特異性を有するウサギ抗ヒト B 7 - H 3 モノクローナル抗体、すなわち S P 2 6 5 及び S 1 0 - H 5 0 L 5 8 を選択し、次にプロテイン A カラムにより精製した。S P 2 6 5 及び S 1 0 - H 5 0 L 5 8 抗体の C D R 領域を表 1 に示す。

10

20

表1

抗体	HC		
	CDR1	CDR2	CDR3
SP265	SYGVS (配列番号2)	GSGKRGNPYYASW AKS (配列番号3)	RAPVVSTSM T FNI(配列番号4)
S10-H5 OL58	SSYWIC (配列番号8)	CIYAGSSLNTYYAPW AKG (配列番号9)	TVVGGWGYAL DL (配列番号10)

10

抗体	LC		
	CDR1	CDR2	CDR3
SP265	QASQSVYNNK NLS(配列番号 5)	EASTLAS (配列番号6)	QGEFTCSGAD CGA(配列番号 7)
S10-H5OL58	QASQSVYNNK NLS (配列番号5)	EASTLAS (配列番号6)	QGEFTCSGAD CGA (配列番号7)

20

30

## 【0204】

SP265のHC免疫グロブリン可変ドメイン配列及びLC免疫グロブリン可変ドメイン配列を以下に示す。

## 【0205】

SP265 HC免疫グロブリン可変ドメイン配列：

Q S V E E S R G G L I K P T D T L T L T C T V S G F S L G S Y G V S W V R Q A P  
G N G L E W I G G S G K R G N P Y Y A S W A K S R S T I T R N T N L N T V T L K  
M T S L T A A D T A T Y F C A S R A P V V S T S M T F N I W G P G T L V T V S S  
(配列番号11)

## 【0206】

SP265 LC免疫グロブリン可変ドメイン配列：

A Q V P T Q T P S P V S A A V G G T V T I N C Q A S Q S V Y N N K N L S W Y Q Q  
K P G Q P P K L L I Y E A S T L A S G V P S R F S G S G S G T Q F A L T I S G V  
Q C E D A A T Y Y C Q G E F T C S G A D C G A F G G G T E V V V K (配列番号12)

40

## 【0207】

S10-H5OL58のHC免疫グロブリン可変ドメイン配列及びLC免疫グロブリン可変ドメイン配列を以下に示す。

## 【0208】

S10-H5OL58 HC免疫グロブリン可変ドメイン配列：

50

Q E Q L E E S G G D L V K P G A S L T L T C T A S G F S F S S S Y W I C W V R Q  
A P G K G L E W I A C I Y A G S S L N T Y Y A P W A K G R F T I S K T S S A T V  
T L Q M T S L T A A D T A T Y S C A R T V V G G W G Y A L D L W G P G T L V T V  
S S ( 配列番号 1 3 )

【 0 2 0 9 】

S 1 0 - H 5 0 L 5 8 L C 免疫グロブリン可変ドメイン配列 :

Q V L T Q T P S P V S A A V G G T V T I N C Q A S Q S V Y N N K N L S W Y Q Q  
K P G Q P P K L L I Y E A S T L A S G V P S R F S G S G S G T Q F A L T I S G  
V Q C E D A A T Y Y C Q G E F T C S G A D C G A F G G G T E V V V K ( 配列番号  
1 4 )

10

【 0 2 1 0 】

実施例 2 : 抗 B 7 - H 3 抗体の標的特異性

ウサギ抗ヒト B 7 - H 3 モノクローナル抗体 S P 2 6 5 及び S 1 0 H 5 0 L 5 8 をホルマリン固定パラフィン包埋 ( F F P E ) 組織試料に適用し、これらの抗体の染色パターンを評価した。組織試料は、H s 7 0 0 t ( 陽性対照 )、腎臓 ( 陰性対照 )、及び腎細胞癌 ( 陽性対照 ) を含む。I H C を、O p t i V i e w 検出キットとともにマイルド C C 1 細胞コンディショニングを用い、B e n c h M a r k U l t r a ( V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m ) で実施した。

【 0 2 1 1 】

図 4 A 及び 4 C に示すように、S P 2 6 5 抗 B 7 - H 3 抗体は、H s 7 0 0 t 腫瘍細胞及び腎細胞癌の血管系において強い膜染色を示し、正常腎臓組織では染色されなかった ( 図 4 B )。対照的に、S 1 0 H 5 0 L 5 8 抗 B 7 - H 3 抗体で染色した場合、H s 7 0 0 t 細胞 ( 図 4 D ) 及び腎細胞癌 ( 図 4 F ) では特異的な膜染色は観察されなかった。さらに、S 1 0 H 5 0 L 5 8 抗 B 7 - H 3 抗体は、正常な腎尿細管において非特異的な細胞質染色を生じた ( 図 4 E )。S P 2 6 5 抗 B 7 - H 3 抗体を、その好ましい免疫染色特性に照らして、さらなる特徴付けのために選択した。

20

【 0 2 1 2 】

実施例 3 : S P 2 6 5 抗ヒト B 7 - H 3 抗体の特徴付け

ウェスタンブロット分析を用いて、生物学的試料中の S P 2 6 5 抗 B 7 - H 3 抗体の結合特異性を評価した。H s 7 0 0 t 細胞株 ( 陽性対照 )、M D A - M B - 2 3 1 細胞株、P C 3 細胞株、及びラージ細胞株 ( 陰性対照 ) 由来の細胞溶解物を S D S - P A G E により分画し、標準的技術を用いて S P 2 6 5 抗 B 7 - H 3 抗体でのウェスタンブロッティングに供した。

30

【 0 2 1 3 】

図 5 に示すように、S P 2 6 5 はウェスタンブロッティングにより 1 1 0 k D a のバンドを検出した。本バンドは、H s 7 0 0 t 膵臓がん鎖細胞 ( B 7 - H 3 のレベル上昇を示すことが知られている ) において検出され、陰性対照のラージ細胞においては存在しなかった。 ( 図 5 )

【 0 2 1 4 】

インタクトな細胞における B 7 - H 3 ポリペプチドレベルを検出するための S P 2 6 5 抗 B 7 - H 3 抗体の能力を評価するために、I H C 実験を行った。ウサギ抗ヒト B 7 - H 3 モノクローナル抗体 ( S P 2 6 5 ) を、H s 7 0 0 t、M D A - M B - 2 3 1、P C 3、及びラージ細胞を含むホルマリン固定パラフィン包埋 ( F F P E ) 細胞スライドに適用した。免疫組織化学を、O p t i V i e w 検出キットとともにマイルド C C 1 細胞コンディショニングを用い、B e n c h M a r k U l t r a ( V e n t a n a M e d i c a l S y s t e m ) で実施した。一次抗体を 0 . 3  $\mu$  g / m l で 1 6 分間インキュベートした。

40

【 0 2 1 5 】

図 2 A に示すように、S P 2 6 5 抗体は、H s 7 0 0 t 細胞において強いシグナルを生じさせ、陰性対照ラージ細胞においてはバックグラウンド染色をもたらさなかった ( 図 2

50

D)。したがって、図5に示すウエスタンブロットデータと一致する。さらにIHCを介して、低レベルのB7-H3を発現することが知られているMDA-MB-231及びPC3細胞系において弱いB7-H3発現が検出された。(図2B及び2C参照。これらの結果は、本開示のB7-H3抗体がインタクトな細胞において低レベルのB7-H3を検出することができることを実証する。

#### 【0216】

固定化ペプチド免疫原(ヒトB7-H3 aa 521-534)への結合を評価するために、SP265抗体でELISA試験を実施した。結果の要約を図6に示す。SP265抗体のEC<sub>50</sub>は $6.7 \times 10^{-11}$  Mであり、したがってB7-H3エピトープへの結合に関して抗体の高い能力を実証している。

10

#### 【0217】

したがって、本開示のB7-H3抗体は、生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドレベルを検出するための方法において有用である。

#### 【0218】

実施例4：SP265抗ヒトB7-H3抗体は、癌組織におけるB7-H3レベルの上昇を検出する

FFPE膀胱移行細胞癌、腎細胞癌、及び肺扁平上皮癌組織試料に、SP265 B7-H3抗体を適用した。これら癌腫の各々は、高レベルのB7-H3発現を示すことが知られている。健康な対象から単離した膀胱、腎臓、及び肺組織試料を陰性対照として使用した。免疫組織化学を、Optiview検出キットとともにマイルドCC1細胞コンディショニングを用い、Benchmark Ultra (Ventana Medical System)で実施した。一次抗体を0.3 µg/mlで16分間インキュベートした。

20

#### 【0219】

図3Aに示すように、膀胱移行細胞癌試料におけるB7-H3発現のレベルは、正常な膀胱組織で観察されたレベルと比較して有意に増加した(図3B参照)。同様に、SP265抗B7-H3抗体は、腎細胞癌(図3C)及び肺扁平上皮細胞癌(図3E)組織試料において強いシグナルを生成し、組織の一致した陰性対照ではバックグラウンド染色がほとんどないから全くないの間であった(図3D及び3F)。

#### 【0220】

これらの結果は、本開示のB7-H3抗体が生物学的試料中のB7-H3ポリペプチドレベルを検出するための方法において有用であることを実証する。

30

#### 【0221】

等価物

特に定義がない限り、本明細書で使用されるすべての技術用語及び科学用語は、本技術が属する分野の当業者によって一般に理解されるものと同一の意味を持つ。

#### 【0222】

本明細書に例示的に記載されている本技術は、本明細書に具体的に開示されていない要素、制限(単数又は複数)の非存在下で適切に実施することができる。したがって、例えば「含む」(「comprising」、「including」、「containing」)等の用語は、広範かつ制限なしに解されるものとする。さらに、本明細書で使用される用語及び表現は、限定ではない説明の用語として使用されており、そのような用語及び表現の使用には、示され説明されている特徴又はその一部の等価物を排除する意図はなく、特許請求されている本技術の範囲内で様々な変更が可能であることは認識されている。

40

#### 【0223】

したがって、本明細書で提供される物質、方法、及び例は、好ましい態様の代表例であり、例示であり、本技術の範囲の限定として意図されるものではないことを理解されたい。

#### 【0224】

本技術は、本明細書において広く一般的に記載されてきた。一般的な本開示の範囲に入

50

る、より狭い種及び亜属群の各々もまた本技術の一部を形成する。これは、排除される物質が本明細書に具体的に列挙されているか否かによらず、属から任意の対象を除くという但し書き又は否定的な限定を伴う、本技術の一般的記述を含む。

【 0 2 2 5 】

さらに、本技術の特徴又は態様がマーカッシュグループで説明されている場合、それにより本技術が当該マーカッシュグループの任意の個々の要素又は要素のサブグループによっても説明されることを当業者は理解するであろう。

【 0 2 2 6 】

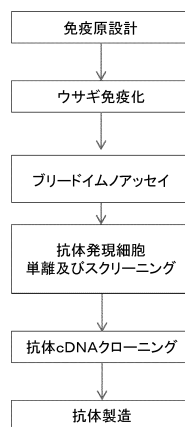
本明細書で言及されるすべての刊行物、特許出願、特許、及び他の参考文献は、あたかもそれぞれが個々に参照により援用されるのと同程度に、その全文が出典明示により援用される。矛盾する場合、定義を含み、本明細書が支配する。

【 0 2 2 7 】

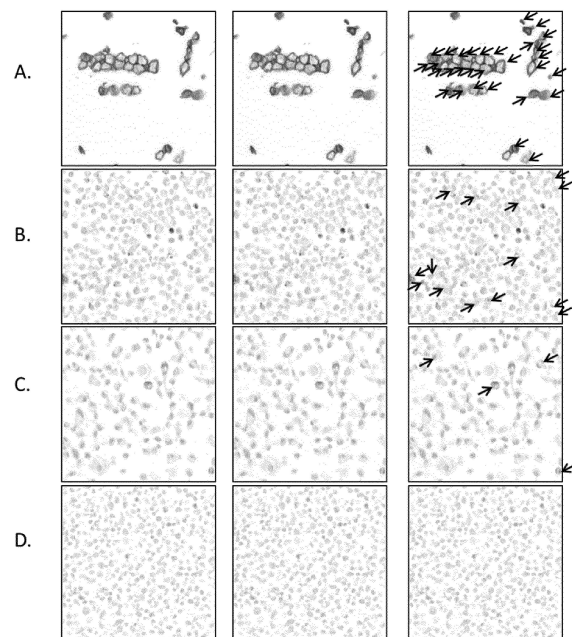
他の態様は、以下の特許請求の範囲に記載されている。

10

【 図 1 】

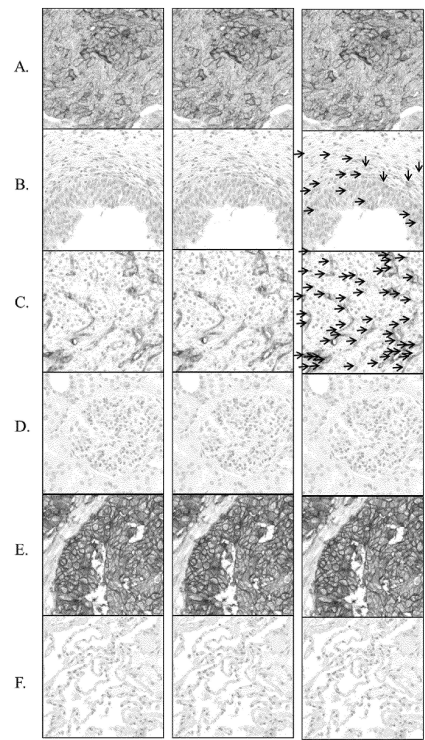


【 図 2 】

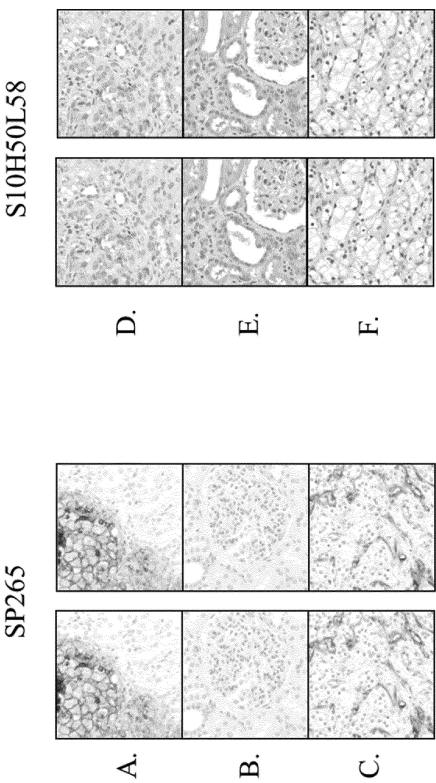




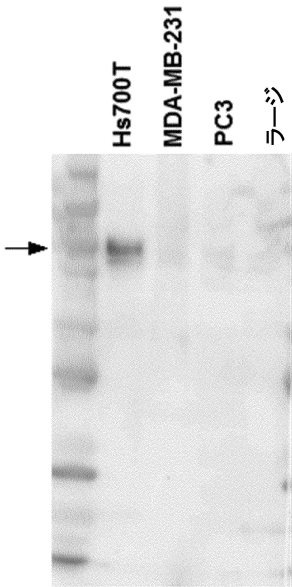
【図 3】



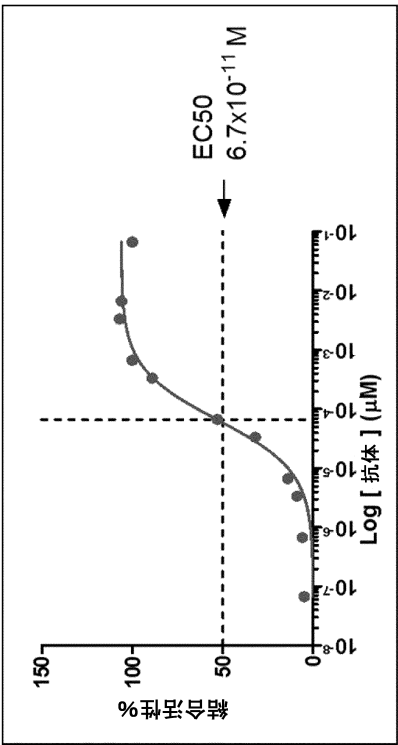
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【配列表】

0006636016000001.app

---

フロントページの続き

(72)発明者 リャオ, チミン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94550, リバモア, メディナ ストリート 175

(72)発明者 コウト, フェルナンド

アメリカ合衆国 カリフォルニア 94588, プレザントン, オーク クリーク ドライブ  
7814

審査官 竹内 祐樹

(56)参考文献 国際公開第2011/109400(WO, A1)

特表2013-520994(JP, A)

国際公開第2012/024543(WO, A1)

特表2013-540995(JP, A)

国際公開第2010/096734(WO, A1)

国際公開第2012/147713(WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C12N 15/00 - 15/90

C07K 16/00 - 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

CAPLUS/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS/WPIDS  
(STN)