

(19)日本国特許庁(JP)

## (12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7002467号

(P7002467)

(45)発行日 令和4年1月20日(2022.1.20)

(24)登録日 令和4年1月4日(2022.1.4)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	Z N A
A 6 1 K	31/407(2006.01)	A 6 1 K	31/407	
A 6 1 K	31/4535(2006.01)	A 6 1 K	31/4535	
A 6 1 K	31/537(2006.01)	A 6 1 K	31/537	
A 6 1 K	31/5517(2006.01)	A 6 1 K	31/5517	

請求項の数 39 (全144頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2018-553996(P2018-553996)

(86)(22)出願日 平成29年4月13日(2017.4.13)

(65)公表番号 特表2019-520308(P2019-520308  
A)

(43)公表日 令和1年7月18日(2019.7.18)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/027317

(87)国際公開番号 WO2017/180813

(87)国際公開日 平成29年10月19日(2017.10.19)

審査請求日 令和2年3月12日(2020.3.12)

(31)優先権主張番号 62/323,228

(32)優先日 平成28年4月15日(2016.4.15)

(33)優先権主張国・地域又は機関  
米国(US)

(31)優先権主張番号 62/432,314

(32)優先日 平成28年12月9日(2016.12.9)

最終頁に続く

(73)特許権者 504438727

マクロジェニクス, インコーポレーテッ  
ドアメリカ合衆国 20850 メリーラン  
ド州、ロックヴィル、メディカル セン  
ター ドライブ 9704

(74)代理人 100123858

弁理士 磯田 志郎

(72)発明者 ルー デリック ティー .

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 94  
402, ベルモント, パイン ノール ド  
ライブ 1509

(72)発明者 ホアン リン

アメリカ合衆国 メリーランド州 208  
17, ベセスダ, ムーアランド レーン

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規の B7 H3 結合分子、その抗体薬物コンジュゲート、及びその使用方法

## (57)【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

単離された B7 - H3 結合分子であって、

前記 B7 - H3 結合分子は、B7 - H3 に結合できる抗体、ダイアボディ、又はそれら  
のエピトープ結合断片を含み、さらに、

(i) 配列番号 20 のアミノ酸配列を含むヒト化可変軽鎖 (VL) ドメイン；及び

(ii) 配列番号 21 のアミノ酸配列を含むヒト化可変重鎖 (VH) ドメイン；

を含む、単離された B7 - H3 結合分子。

## 【請求項2】

前記 B7 H3 結合分子は、ヒト IgG の Fc ドメインを含む、請求項1に記載の単離  
された B7 H3 結合分子。

## 【請求項3】

前記ヒト IgG が、ヒト IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4 である、請求項2  
に記載の単離された B7 H3 結合分子。

## 【請求項4】

前記 Fc ドメインが変異型 Fc ドメインであり、前記変異型 Fc ドメインは：

(a) Fc R に対する前記変異型 Fc ドメインの親和性を低減する1つ若しくは複数の  
のアミノ酸修飾；及び/又は(b) 前記変異型 Fc ドメインの血清半減期を増大させる1つ若しくは複数のアミノ酸  
修飾

を含む、請求項 2 又は 3 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

【請求項 5】

F c R に対する前記変異型 F c ドメインの親和性を低減する前記修飾は：L 2 3 4 A ; L 2 3 5 A ; 又は L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A の置換を含み、この番号付与は、K a b a t におけるものと同様の E U インデックスの番号付与である、請求項 4 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

【請求項 6】

前記変異型 F c ドメインの血清半減期を増大させる前記修飾は：M 2 5 2 Y ; M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T ; M 2 5 2 Y 及び T 2 5 6 E ; M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E ; 又は K 2 8 8 D 及び H 4 3 5 K の置換を含み、この番号付与は、K a b a t におけるものと同様の E U インデックスの番号付与である、請求項 4 又は 5 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

10

【請求項 7】

前記抗体又は前記エピトープ結合断片を含む、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の単離された B 7 - H 3 結合分子。

【請求項 8】

前記 B 7 H 3 結合分子が式：

$$A b ( L M ) m ( D ) n$$

を含む抗 B 7 H 3 抗体薬物コンジュゲート ( B 7 H 3 A D C ) であって：

A b は、前記抗体又は前記エピトープ結合断片であり；

D は、細胞毒性薬物部分であり；

L M は、前記 A b 及び前記 D を共有結合させる少なくとも 1 つの結合又はリンカー分子を含み；

m は 0 ~ n の整数であって、前記 B 7 H 3 A D C の L M の数を表し；

n は 1 ~ 10 の整数であって、前記 B 7 H 3 A D C 分子に共有結合した前記細胞毒性薬物部分の数を表す、請求項 7 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

20

【請求項 9】

前記 L M 部分のうちの少なくとも 1 つがリンカー分子である、請求項 8 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

【請求項 10】

前記リンカー分子は切断可能リンカーを含む、請求項 9 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

30

【請求項 11】

前記切断可能リンカーはペプチドリinkerである、請求項 10 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

【請求項 12】

前記ペプチドリinkerはバリン シトルリンジペプチドリinkerである、請求項 11 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

【請求項 13】

前記リンカー分子は、前記切断可能リンカーと前記 D との間に自壊性リンカーを含む、請求項 10 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

40

【請求項 14】

前記自壊性リンカーはパラアミノベンジルオキシカルボニル部分を含む、請求項 13 に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

【請求項 15】

前記リンカー分子は、前記切断可能リンカーと前記 A b との間にマレイミドリinker部分を含む、請求項 10 ~ 14 のいずれか 1 項に記載の単離された B 7 H 3 結合分子。

【請求項 16】

式：

$$A b [ V ( W ) k ( X ) 1 A ] D$$

50

を含み、ここで：

前記 LM が式：



を含み、

V は切断可能リンカーであり；

$(W)_k (X)_1 A$  は、1, (4 + 2n) 消去によって自己消去する、細長い自己消去性スペーサ系であり；

W 及び X はそれぞれ 1, (4 + 2n) 電子カスケードスペーサであり、同一であるか又は異なっており；

A は、式  $(Y)_m$  (ここで Y は 1, (4 + 2n) 電子カスケードスペーサである) のスペーサ基、又は式 U の基であり、環化除去スペーサであり；

k、1 及び m は独立して、0 ~ 5 (両端を含む) の整数であり；

n は 0 ~ 10 (両端を含む) の整数であり；

ただし：

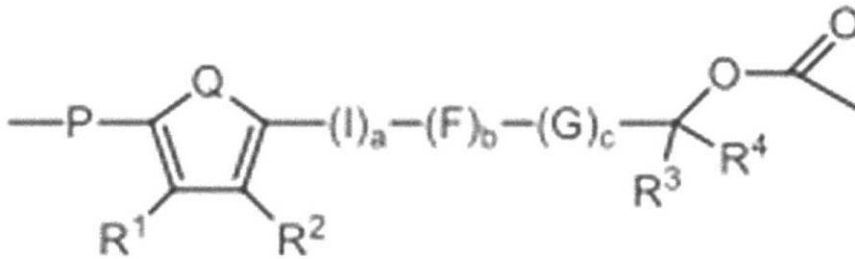
A が  $(Y)_m$  である場合、 $k + 1 + m = 1$  であり；

$k + 1 + m = 1$  である場合、 $n > 1$  であり；

A が U である場合、 $k + 1 = 1$  である。

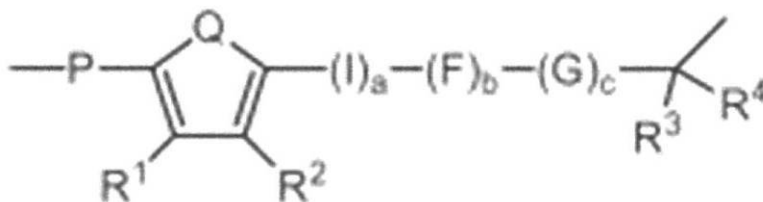
W、X 及び Y は独立して、以下の式：

【化 1】



又は以下の式：

【化 2】



を有する化合物から選択され、ここで：

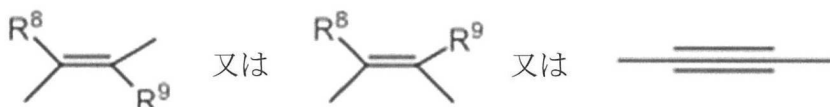
Q は  $R^5C = CR^6$ 、S、O、 $NR^5$ 、 $R^5C = N$  又は  $N = CR^5$  であり；

P は  $NR^7$ 、O 又は S であり；

a、b 及び c は独立して、0 ~ 5 (両端を含む) の整数であり；

I、F 及び G は独立して、式：

【化 3】



10

20

30

40

50

を有する化合物から選択され、ここで：

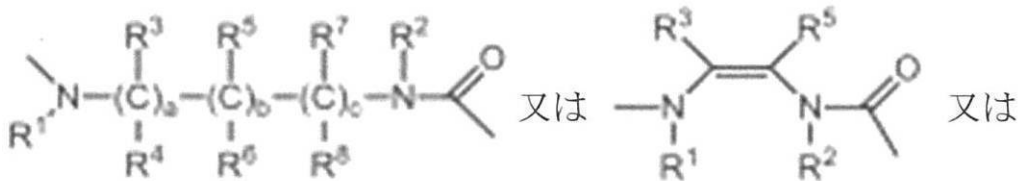
R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は独立して、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル、C<sub>5-20</sub>アリール、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、ヒドロキシ(OH)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1-5</sub>アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1-6</sub>アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、スルホキシ(S(=O)<sub>2</sub>OH)、スルホン酸塩(S(=O)<sub>2</sub>OR<sub>x</sub>)、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>)、スルフィキシ(S(=O)OH)、スルフィン酸塩(S(=O)OR<sub>x</sub>)、スルフィニル(S(=O)R<sub>x</sub>)、ホスホノオキシ(OP(=O)(OH)<sub>2</sub>)及びリン酸塩(OP(=O)(OR<sub>x</sub>)<sub>2</sub>)を表し、ここで：

R<sub>x</sub>、R<sub>x</sub><sup>1</sup>及びR<sub>x</sub><sup>2</sup>は独立して、C<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル基又はC<sub>5-20</sub>アリール基から選択され；

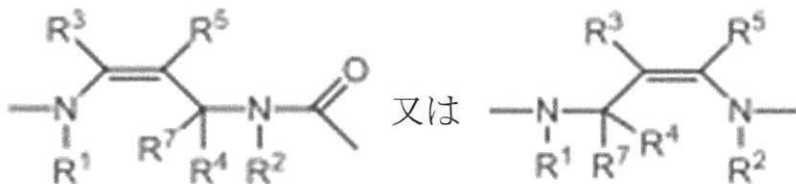
前記置換基R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>又はR<sup>9</sup>のうちの2つ以上は任意に、互いに接続して1つ又は複数の脂肪族又は芳香族環式構造を形成し；

Uは、式：

【化4】



【化5】



を有する化合物から選択され、ここで：

a、b及びcは独立して、0又は1の整数となるよう選択され；

ただしa + b + c = 2又は3であり；

R<sup>1</sup>及び/又はR<sup>2</sup>は独立して、H、C<sub>1-6</sub>アルキルを表し、前記アルキルは任意に

、以下の基：ヒドロキシ(OH)、エーテル(OR<sub>x</sub>)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1-5</sub>アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1-6</sub>アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、スルホキシ(S(=O)<sub>2</sub>OH)、スルホン酸塩(S(=O)<sub>2</sub>OR<sub>x</sub>)、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>)、スルフィキシ(S(=O)OH)、スルフィン酸塩(S(=O)OR<sub>x</sub>)、スルフィニル(S(=O)R<sub>x</sub>)、ホスホノオキシ(OP(=O)(OH)<sub>2</sub>)、及びリン酸塩(OP(=O)(OR<sub>x</sub>)<sub>2</sub>)のうちの1つ又は複数によって置換され、ここでR<sub>x</sub>、R<sub>x</sub><sup>1</sup>及びR<sub>x</sub><sup>2</sup>は、C<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル基又はC<sub>5-20</sub>アリール基から選択され；

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>及びR<sup>8</sup>は独立して、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル、C<sub>5-20</sub>アリール、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、ヒドロキシ(OH)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、

モノ置換アミノ ( $\text{NR}_x\text{H}$ )、ジ置換アミノ ( $\text{NR}_x^1\text{R}_x^2$ )、ニトロ ( $\text{NO}_2$ )、ハロゲン、 $\text{CF}_3$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{CONH}_2$ 、 $\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $\text{CONHMe}$ 、環式 $\text{C}_{1-5}$ アルキルアミノ、イミダゾリル、 $\text{C}_{1-6}$ アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール ( $\text{SH}$ )、チオエーテル ( $\text{SR}_x$ )、テトラゾール、カルボキシ ( $\text{COOH}$ )、カルボン酸塩 ( $\text{COOR}_x$ )、スルホキシ ( $\text{S}(\text{=O})_2\text{OH}$ )、スルホン酸塩 ( $\text{S}(\text{=O})_2\text{OR}_x$ )、スルホニル ( $\text{S}(\text{=O})_2\text{R}_x$ )、スルフィキシ ( $\text{S}(\text{=O})\text{OH}$ )、スルフィン酸塩 ( $\text{S}(\text{=O})\text{OR}_x$ )、スルフィニル ( $\text{S}(\text{=O})\text{R}_x$ )、ホスホノオキシ ( $\text{OP}(\text{=O})(\text{OH})_2$ )、及びリン酸塩 ( $\text{OP}(\text{=O})(\text{OR}_x)_2$ )を表し、ここで $\text{R}_x$ 、 $\text{R}_x^1$ 及び $\text{R}_x^2$ は、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル基

、 $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクリル基又は $\text{C}_{5-20}$ アリール基から選択され、前記置換基 $\text{R}^1$ 、 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}$

3、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、又は $\text{R}^8$ のうち2つ以上は任意に、互いに接続して1つ又は複

数の脂肪族又は芳香族環式構造を形成する、請求項9に記載の単離された $\text{B}^7\text{H}^3$ 結合分子。

【請求項17】

前記 $\text{LM}$ が：

(1) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル；

(2) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル

p アミノベンジルオキシカルボニル；

(3) p アミノシンナミルオキシカルボニル；

(4) p アミノシンナミルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル

；

(5) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシンナミルオキシカルボニル；

(6) p アミノシンナミルオキシカルボニル p アミノシンナミルオキシカルボニル；

(7) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル；

(8) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノシンナミルオキシカルボニル；

(9) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル；

(10) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル；

(11) p アミノベンジルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；

(12) p アミノシンナミルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；

(13) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；

(14) p アミノシンナミルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；

(15) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシンナミルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；

(16) p アミノシンナミルオキシカルボニル p アミノシンナミルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；

(17) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジル；

(18) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジル；

(19) p アミノシンナミル；

10

20

30

40

50

(20) p アミノシンナミルオキシカルボニル p アミノベンジル；  
 (21) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシンナミル；  
 (22) p アミノ シンナミルオキシカルボニル p アミノシンナミル；  
 (23) p アミノフェニルペンタジエニル；  
 (24) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノシンナミル；

(25) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノベンジル；  
 又は

(26) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノフェニルペンタジエニルを含む、請求項 16 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

10

【請求項 18】

前記 LM が前記 Ab のポリペプチド鎖のアミノ酸の側鎖にコンジュゲートされて、前記 Ab を前記細胞毒性薬物部分 D の分子に結合させる、請求項 9 ~ 17 のいずれか 1 項に記載の単離された B7 H3 結合分子。

【請求項 19】

前記細胞毒性薬物部分 D は、細胞毒素、放射性同位元素、免疫調節因子、サイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、成長因子、腫瘍壊死因子、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、siRNA、RNAi、マイクロRNA、光活性治療剤、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、ペプチド、脂質、炭水化物、キレート剤、又はこれらの組み合わせを含む、請求項 8 ~ 18 のいずれか 1 項に記載の単離された B7 H3 結合分子。

20

【請求項 20】

前記細胞毒性薬物部分 D は細胞毒素を含み、ツブリン、オーリスタチン、マイタンシノイド、カリチアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン、デュオカルマイシン、シュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素 A ~ F、リシン、アブリン、サボリン及びこれらの細胞毒性断片からなる群から選択される、請求項 19 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

【請求項 21】

前記細胞毒性薬物部分 D はツブリン細胞毒素を含み、ツブリン A、ツブリン B、ツブリン C 及びツブリン D からなる群から選択される、請求項 19 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

30

【請求項 22】

前記細胞毒性薬物部分 D はオーリスタチン細胞毒素を含み、MMAE (N メチルバリン バリン ドライソロイイン ドラプロイン ノルエフェドリン) 及び MMAF (N メチルバリン バリン ドライソロイイン ドラプロイン フェニルアラニン) からなる群から選択される、請求項 19 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

【請求項 23】

前記細胞毒性薬物部分 D はマイタンシノイド細胞毒素を含み、マイタンシン、DM1 及び DM4 からなる群から選択される、請求項 19 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

40

【請求項 24】

前記細胞毒性薬物部分 D はカリチアマイシン細胞毒素を含み、カリチアマイシン 1、カリチアマイシン 1 Br、カリチアマイシン 1 Br、カリチアマイシン 2 I、カリチアマイシン 3 I、カリチアマイシン 1 I、カリチアマイシン 1 I 及びカリチアマイシン 1 I からなる群から選択される、請求項 19 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

【請求項 25】

前記細胞毒性薬物部分 D はピロロベンゾジアゼピン細胞毒素を含み、バダスツキシマブ・タリリン、SJG 136、SG2000、SG2285 及び SG2274 からなる群から選択される、請求項 19 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

50

## 【請求項 26】

前記細胞毒素はデュオカルマイシン細胞毒素である、請求項 19 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

## 【請求項 27】

前記デュオカルマイシン細胞毒素は、デュオカルマイシン A、デュオカルマイシン B1、デュオカルマイシン B2、デュオカルマイシン C1、デュオカルマイシン C2、デュオカルマイシン D、デュオカルマイシン SA、CC 1065、アドゼレシン、ビゼレシン、カルゼルシン (U 80244)、*seco-DUBA* 及びスピロ デュオカルマイシン (DUBA) からなる群から選択される、請求項 26 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

10

## 【請求項 28】

前記デュオカルマイシン細胞毒素は *seco-DUBA* である、請求項 27 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

## 【請求項 29】

前記 LM は、還元された鎖間ジスルフィドを介して前記 Ab と共有結合する、請求項 28 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

## 【請求項 30】

前記ヒト IgG が、ヒト IgG1 である、請求項 3 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

## 【請求項 31】

前記 B7 - H3 結合分子はヒト IgG CL ドメインを含む、請求項 1 ~ 30 のいずれか 1 項に記載の単離された B7 H3 結合分子。

20

## 【請求項 32】

前記ヒト IgG CL ドメインは配列番号 1 のアミノ酸配列を含む、請求項 31 に記載の単離された B7 H3 結合分子。

## 【請求項 33】

前記 B7 - H3 結合分子は前記抗体を含み、  
前記抗体は、

(i) 配列番号 20 のアミノ酸配列及び配列番号 1 の CL ドメインを含む可変軽鎖 (VL) ドメインを含む軽鎖；及び

30

(ii) 配列番号 21 のアミノ酸配列、配列番号 3 の CH1 ドメイン、配列番号 7 のヒンジドメイン、及び、配列番号 12 の CH2 - CH3 ドメインを含む Fc ドメイン、を含む可変重鎖 (VH) ドメインを含む重鎖；

を含み、

前記 D は、*seco-DUBA* を含み、

前記 LM は、マレイミドリンカー部分、バリン シトルリンジペプチドリンカー、及びパラアミノベンジルオキシカルボニル部分を含むリンカー分子を含む、請求項 8 ~ 15、18 ~ 29、31 及び 32 のいずれか 1 項に記載の単離された B7 H3 結合分子。

## 【請求項 34】

有効量の請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の単離された B7 - H3 結合分子と、薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤又は希釈剤とを含む、医薬組成物。

40

## 【請求項 35】

B7 H3 の発現に関連する又は B7 H3 の発現を特徴とする疾患若しくは状態の治療に使用するための、請求項 1 ~ 33 のいずれか 1 項に記載の単離された B7 - H3 結合分子又は請求項 34 に記載の医薬組成物。

## 【請求項 36】

B7 H3 の発現に関連する又は B7 H3 の発現を特徴とする前記疾患又は前記状態は癌である、請求項 35 に記載の単離された B7 H3 結合分子又は医薬組成物。

## 【請求項 37】

前記癌は：副腎腫瘍；AIDS 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；副腎癌；膀胱

50

癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；B細胞癌；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；消化器癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；グリア芽細胞腫；血液悪性腫瘍；肝細胞癌；膵島細胞腫瘍；カポジ肉腫；腎癌；白血病；急性骨髄性白血病；慢性リンパ球性白血病；慢性骨髄性白血病；毛様細胞白血病；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；パーキットリンパ腫；びまん性大B細胞リンパ腫；濾胞性リンパ腫；マントル細胞リンパ腫；周辺部リンパ腫；非ホジキンリンパ腫；小リンパ球性リンパ腫；肺癌；非小細胞肺癌（NSCLC）；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；中皮腫咽頭癌；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；卵巣癌；膵臓癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；腎転移性癌；腎細胞癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；小児期の小円形青色細胞腫瘍（神経芽細胞腫及び横紋筋肉腫を含む）；軟組織肉腫；扁平上皮癌（例えば頭頸部扁平上皮細胞癌（SCCHN））；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺癌（例えば甲状腺転移癌）；及び子宮癌からなる群から選択される癌細胞の存在を特徴とする、請求項36に記載の単離されたB7 H3結合分子又は医薬組成物。

10

【請求項38】

前記癌は、非小細胞肺癌（NSCLC）、急性骨髄性白血病、前立腺癌、頭頸部扁平上皮癌（SCCHN）、甲状腺転移癌からなる群から選択される、請求項36に記載の単離されたB7 H3結合分子又は医薬組成物。

20

【請求項39】

前記癌は、前立腺癌である、請求項36に記載の単離されたB7 H3結合分子又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

[関連出願の相互参照]

本出願は、米国特許出願第62/432,314号（2016年12月9日出願；係属中）、米国特許出願第62/323,249号（2016年4月15日出願；係属中）、米国特許出願第62/323,228号（2016年4月15日出願；係属中）に対する優先権を主張するものであり、上記特許出願は、参照によりその全体が本出願に援用される。

30

【0002】

[配列表の参照]

本出願は、連邦規則法典第37巻第1.821節以下による1つ又は複数の配列表を含み、これらの配列表は、コンピュータ可読媒体（ファイル名：1301\_0143\_0144\_PCT\_ST25.txt、2017年3月28日作成、サイズ：104,762バイト）において開示されており、上記ファイルは、参照によりその全体が本出願に援用される。

【0003】

本発明は、ヒト及び非ヒトB7 H3に結合できる新規のB7 H3結合分子、並びに特に非ヒト霊長類（例えばカニクイザル）のB7 H3と交差反応する上記分子を対象とする。本発明は更に、レシピエントである被験者への投与時に免疫原性の低減を示すようヒト化及び／又は脱免疫化された可変軽鎖及び／又は可変重鎖（VH）ドメインを含む、B7 H3結合分子に関する。本発明は特に：(i)上記B7 H3結合可変ドメイン；及び(ii)エフェクタ細胞の表面上に存在する分子のエピトープに結合できるドメインを含む、二重特異性ダイアボディ、BiTE、二重特異性抗体、3価結合分子等を含む二重特異性、三重特異性又は多重特異性B7 H3結合分子に関する。本発明はまた、上記B7 H3結合分子のいずれを含有する医薬組成物、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療における上記B7 H3結合分子のいずれの使用を伴う方法も対象とする。本発明はま

40

50

た、少なくとも1つの薬物部分にコンジュゲートしたヒト化抗ヒトB7 H3抗体のヒトB7 H3結合ドメインを含む分子(「B7 H3 ADC」)にも関する。本発明はまた、上記B7 H3 ADCを含有する医薬組成物、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療における上記B7 H3 ADCのいずれの使用を伴う方法も対象とする。

【背景技術】

【0004】

腫瘍の成長及び転移は、これらが宿主の免疫監視機構を回避して宿主の防御を克服する能力に大きく左右される。ほとんどの腫瘍は、宿主の免疫系によって程度が可変であると認識できる抗原を発現するが、多くの場合、エフェクタT細胞の無効な活性化により、不十分な免疫応答が誘発される(非特許文献1)。

10

【0005】

I. B7スーパーファミリー及びB7 H3

B7 H3はB7 CD28スーパーファミリーのメンバーであり、抗原提示細胞上で発現される。これはT細胞に結合するが、上記T細胞の表面上のB7 H3対抗受容体は依然として完全には特性決定されていない。

【0006】

B7 H3は、主要なヒト型が2つの細胞外タンデムIgV IgCドメイン(即ちIgV IgC IgV IgC)を含有する点において独特である(非特許文献2)。4免疫グロブリン細胞外ドメイン変異体(「4Ig B7 H3」)は、最初はIgドメイン(IgV IgC)を2つだけ含むと考えられていたが、上記タンパク質のより一般的なヒト型であることが同定され、発見された(非特許文献3)。しかしながら、天然のマウス型2Ig及びヒト4Ig型は、同様の機能を呈する(非特許文献4)。4Ig B7 H3分子は、癌細胞のNK細胞媒介性溶解を阻害する(非特許文献5)。ヒトB7 H3(2Ig型)は、活性化されるT細胞上の推定受容体に結合することにより、T細胞の活性化及びIFN産生を促進することが報告されている(非特許文献6)が、より最近の研究は、マウス及びヒトB7 H3の阻害的役割を指摘している(非特許文献7~9)。B7 H3 mRNA発現は、心臓、腎臓、精巣、肺、肝臓、膵臓、前立腺、結腸及び骨芽細胞において発見されている(非特許文献2)。タンパク質レベルでは、B7 H3はヒトの肝臓、肺、膀胱、精巣、前立腺、乳房、膵臓及びリンパ器官に見られる(非特許文献4)。

20

30

【0007】

B7 H3は、休止B又はT細胞、単球、又は樹状細胞上では発現されないものの、IFNによって樹状細胞上に、及びGM-CSFによって単球上に誘導される(非特許文献3)。B7 H3の作用モードは複雑であり、このタンパク質は、T細胞共刺激及び共阻害の療法を仲介することが報告されている(非特許文献4、10、11)。B7 H3は、現時点で同定されていない1つ又は複数の受容体に結合して、T細胞の共阻害を仲介する。更にB7 H3は、未知の1つ又は複数の受容体との相互作用によって、NK細胞及び骨芽細胞に対する阻害因子となる(非特許文献4)。この阻害は、T細胞受容体(TCR)が遺伝子転写を制御する主要なシグナリング経路のメンバー(例えばNF- $\kappa$ B、NF- $\kappa$ B又はAP-1因子)との相互作用によって機能し得る。B7 H3はまた、Th1、Th2又はTh17をインビボで阻害すると考えられる(非特許文献7、12、13)。

40

【0008】

II. B7 H3発現性腫瘍

B7 H3はまた、多様な癌(例えば神経芽腫、胃癌、卵巣癌、非小細胞肺癌等、例えば非特許文献14を参照)及び培養された癌幹様細胞上で発現されることが知られている。いくつかの独立した研究は、ヒト悪性腫瘍細胞がB7 H3タンパク質の発現の著しい上昇を呈すること、この著しい発現が、疾患の重篤度の上昇に関連すること(非特許文献15~18)を示しており、これはB7 H3が腫瘍により、免疫回避経路として悪用されていることを示唆している(非特許文献4)。

50

【 0 0 0 9 】

B 7 H 3 タンパク質発現はまた、腫瘍細胞株において免疫組織学的に検出されている（非特許文献 6、19；特許文献 1；非特許文献 5；非特許文献 20）。

【 0 0 1 0 】

免疫系の阻害における B 7 H 3 の役割、及びヒト腫瘍上での B 7 H 3 の発現の増大は、この分子が癌の治療のための治療標的として機能し得ることを示唆している。従って、抗 B 7 H 3 抗体及び B 7 H 3 発現を調節する他の分子を用いて、腫瘍を治療すること、及び/又は免疫応答を上方調節することが提案されている（非特許文献 21～25、14、26、27を参照；また、特許文献 2～22、1、23～30を参照）。

【 0 0 1 1 】

このような過去の全ての成功にもかかわらず、B 7 H 3 を発現する腫瘍細胞を標的として殺滅する更なる治療剤に対する需要が存在し続けている。本発明はこの目標、及び他の目標を対象とする。

【 先行技術文献 】

【 特許文献 】

【 0 0 1 2 】

【 文献 】 国際公開第 2 0 0 4 / 0 0 1 3 8 1 号 ( Mather, J. et al, )

米国特許第 7 , 2 7 9 , 5 6 7 号

米国特許第 7 , 3 5 8 , 3 5 4 号

米国特許第 7 , 3 6 8 , 5 5 4 号

米国特許第 7 , 5 2 7 , 9 6 9 号

米国特許第 7 , 7 1 8 , 7 7 4 号

米国特許第 8 , 2 1 6 , 5 7 0 号

米国特許第 8 , 7 7 9 , 0 9 8 号

米国特許第 8 , 8 0 2 , 0 9 1 号

米国特許第 9 , 1 5 0 , 6 5 6 号

米国公開特許第 2 0 0 2 / 0 1 6 8 7 6 2 号

米国公開特許第 2 0 0 5 / 0 2 0 2 5 3 6 号

米国公開特許第 2 0 0 8 / 0 0 8 1 3 4 6 号

米国公開特許第 2 0 0 8 / 0 1 1 6 2 1 9 号

米国公開特許第 2 0 0 9 / 0 0 1 8 3 1 5 号

米国公開特許第 2 0 0 9 / 0 0 2 2 7 4 7 号

米国公開特許第 2 0 0 9 / 0 0 8 7 4 1 6 号

米国公開特許第 2 0 1 3 / 0 0 7 8 2 3 4 号

米国公開特許第 2 0 1 5 / 0 2 7 4 8 3 8 号

国際公開第 2 0 0 8 / 0 6 6 6 9 1 号

国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 6 2 7 6 号

国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 6 2 1 9 号

国際公開第 2 0 0 1 / 0 9 4 4 1 3 号

国際公開第 2 0 0 2 / 1 0 1 8 7 号

国際公開第 2 0 0 2 / 3 2 3 7 5 号

国際公開第 2 0 0 4 / 0 9 3 8 9 4 号

国際公開第 2 0 0 6 / 0 1 6 2 7 6 号

国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 6 2 1 9 号

国際公開第 2 0 1 1 / 1 0 9 4 0 0 号

欧州特許第 1 2 9 2 6 1 9 B 号

【 非特許文献 】

【 0 0 1 3 】

【 文献 】 Khawli, L.A. et al. (2008) " Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory F usion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors, " Exper. Pharmacol. 1

10

20

30

40

50

81:291-328

Collins, M. et al. (2005) "The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands," *Genome Biol.* 6:223.1-223.7

Sharpe, A.H. et al. (2002) "The B7-CD28 Superfamily," *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126

Hofmeyer, K. et al. (2008) "The Contrasting Role Of B7-H3," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30):10277-10278

Castriconi, R. et al. "Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(34): 12640-12645

10

Chapoval, A. et al. (2001) "B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- Production," *Nature Immunol.* 2:269-274

Prasad, D.V., et al. (2004) "Murine B7-H3 Is A Negative Regulator Of T Cells," *J Immunol.* 173:2500-2506

Leitner, J., et al. (2009) "B7-H3 Is A Potent Inhibitor Of Human T-Cell Activation: No Evidence For B7-H3 And TREML2 Interaction." *Eur. J. Immunol.* 39:1754-1764

Veenstra, R.G., et al. (2015) "B7-H3 expression in Dnor T Cells and Host Cells Negatively Regulates Acute Graft-Versus-Host Disease Lethality," *Blood* 125:3335-3346

20

Martin-Orozco, N. et al. (2007) "Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity," *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298

Subudhi, S.K. et al. (2005) "The Balance Of Immune Responses: Costimulation Versus Coinhibition," *J. Mol. Med.* 83:193-202

Fukushima, A. et al. (2007) "B7-H3 Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice," *Immunol. Lett.* 113:52-57

Yi, K.H. et al. (2009) "Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4," *Immunol. Rev.* 229:145-151

Modak, S., et al. (2001) "Monoclonal antibody 8H9 targets a novel cell surface antigen expressed by a wide spectrum of human solid tumors," *Cancer Res* 61:4048-54

30

Zang, X. et al. (2007) "The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition," *Clin. Cancer Res.* 13:5271-5279

Sun, Y., et al. (2006) "B7-H3 and B7-H4 expression in non-small-cell lung cancer," *Lung Cancer* 53:143-51

Tekle, C., et al. (2012) "B7-H3 Contributes To The Metastatic Capacity Of Melanoma Cells By Modulation Of Known Metastasis-Associated Genes," *Int. J. Cancer* 130:2282-90

Wang, L., et al. (2013) "B7-H3 Mediated Tumor Immunology: Friend Or Foe?," *Int. J. Cancer* 134(12):2764-2771

40

Saatian, B. et al. (2004) "Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation," *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287:L217-L225

Sun, M. et al. (2002) "Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes," *J. Immunol.* 168:6294-6297

Loo, D. et al. (2012) "Development of an Fc-Enhanced Anti-B7-H3 Monoclonal Antibody with Potent Antitumor Activity," *Clin Cancer Res*; 18: 3834-3845

Ahmed, M. et al. (2015) "Humanized Affinity-Matured Monoclonal Antibody 8H9 Has Potent Anti-Tumor Activity and Binds to FG Loop of B7-H3," *J. Biol. Chem.* 290: 30018-30029

50

Nagase-Zembutsu, A. et al. (2016) "Development of DS-5573a: A novel afucosylated monoclonal antibody directed at B7-H3 with potent antitumor activity," *Cancer Sci.* 2016, doi: 10.1111/cas.12915

Modak, S. et al. (March 1999) "Disialoganglioside GD2 And Antigen 8H9: Potential Targets For Antibody-Based Immunotherapy Against Desmoplastic Small Round Cell Tumor (DSRCT) And Rhabdomyosarcoma (RMS)," *Proceedings Of The American Association For Cancer Research Annual Meeting, Vol. 40:474 (90th Annual Meeting Of The American Association For Cancer Research; Philadelphia, Pennsylvania, US; April 10-14, 1999*

Modak, S. et al. (March 2000) "Radioimmunotargeting To Human Rhabdomyosarcoma Using Monoclonal Antibody 8H9," *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 41:724

Steinberger, P. et al. (2004) "Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains," *J. Immunol.* 172(4): 2352-2359

Xu, H. et al. (2009) "MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors," *Cancer Res.* 69(15):5275-6281

【発明の概要】

【0014】

本発明は、ヒト及び非ヒト B7 H3 に結合できる新規の B7 H3 結合分子、並びに特に非ヒト霊長類（例えばカニクイザル）の B7 H3 と交差反応する上記分子を対象とする。本発明は更に、レシピエントである被験者への投与時に免疫原性の低減を示すようヒト化及び/又は脱免疫化された可変軽鎖及び/又は可変重鎖（VH）ドメインを含む、B7 H3 結合分子に関する。本発明は特に：(i) 上記 B7 H3 結合可変ドメイン；及び(ii) エフェクタ細胞の表面上に存在する分子のエピトープに結合できるドメインを含む、二重特異性ダイアボディ、BiTE、二重特異性抗体、3価結合分子等を含む二重特異性、三重特異性又は多重特異性 B7 H3 結合分子に関する。本発明はまた、上記 B7 H3 結合分子のいずれを含有する医薬組成物、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療における上記 B7 H3 結合分子のいずれの使用を伴う方法も対象とする。本発明はまた、少なくとも1つの薬物部分にコンジュゲートしたヒト化抗ヒト B7 H3 抗体のヒト B7 H3 結合ドメインを含む分子（「B7 H3 ADC」）にも関する。本発明はまた、上記 B7 H3 ADC を含有する医薬組成物、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療における上記 B7 H3 ADC のいずれの使用を伴う方法も対象とする。

【0015】

詳細には、本発明の一態様は、可変軽鎖（VL）ドメイン及び可変重鎖（VH）ドメインを含む B7 H3 結合分子を提供し、上記可変重鎖ドメインは、CDRH1 ドメイン、CDRH2 ドメイン及び CDRH3 ドメインを含み、上記可変軽鎖ドメインは、CDRL1 ドメイン、CDRL2 ドメイン及び CDR L3 ドメインを含み、上記ドメインのうち少なくとも3つ、上記ドメインのうち少なくとも4つ、上記ドメインのうち少なくとも5つ、又は上記ドメインの全ては：

- (1) 配列番号 27 のアミノ酸配列を含む CDRH1 ドメイン；
- (2) 配列番号 28 のアミノ酸配列を含む CDRH2 ドメイン；
- (3) 配列番号 29 のアミノ酸配列を含む CDRH3 ドメイン；
- (4) 配列番号 23 のアミノ酸配列を含む CDR L1 ドメイン；
- (5) 配列番号 24 のアミノ酸配列を含む CDR L2 ドメイン；及び
- (6) 配列番号 25 のアミノ酸配列を含む CDR L3 ドメイン；

からなる群から選択される。

【0016】

本発明は更に、CDRL1 ドメイン、CDRL2 ドメイン及び CDR L3 ドメインを含む上記可変軽鎖（VL）ドメインと、CDRH1 ドメイン、CDRH2 ドメイン及び CDRH3

ドメインを含む上記可変重鎖（VH）ドメインとを含む、上記B7 H3結合分子の実施形態であって：

- (1) 上記CDRH1ドメインは配列番号27のアミノ酸配列を含み；
  - (2) 上記CDRH2ドメインは配列番号28のアミノ酸配列を含み；
  - (3) 上記CDRH3ドメインは配列番号29のアミノ酸配列を含む、実施形態に関する。
- 【0017】

本発明は更に、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインを含む上記可変軽鎖（VL）ドメインと、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインを含む上記可変重鎖（VH）ドメインとを含む、上記B7 H3結合分子の実施形態であって：

- (1) 上記CDRL1ドメインは配列番号23のアミノ酸配列を含み；
  - (2) 上記CDRL2ドメインは配列番号24のアミノ酸配列を含み；及び
  - (3) 上記CDRL3ドメインは配列番号25のアミノ酸配列を含む、実施形態に関する。
- 【0018】

本発明は更に、上記可変重鎖（VH）ドメインが配列番号26又は配列番号31のアミノ酸配列を含む、上記B7 H3結合分子の実施形態に関する。

【0019】

本発明は更に、上記可変軽鎖（VL）ドメインが配列番号22又は配列番号30のアミノ酸配列を含む、上記B7 H3結合分子の実施形態に関する。

【0020】

本発明は更に、VLドメイン及びVHドメインを含むB7 H3結合分子であって、上記VLドメインは配列番号20のアミノ酸配列を含む、B7 H3結合分子に関する。

【0021】

本発明は更に、VLドメイン及びVHドメインを含むB7 H3結合分子であって、上記VHドメインは配列番号21のアミノ酸配列を含む、B7 H3結合分子に関する。

【0022】

本発明は更に、VLドメイン及びVHドメインを含むB7 H3結合分子であって、上記VLドメインは配列番号20のアミノ酸配列を含み、上記VHドメインは配列番号21のアミノ酸配列を含む、B7 H3結合分子に関する。

【0023】

本発明は更に、上記B7 H3結合分子の実施形態であって、上記分子は抗体又はそのエピトープ結合断片である、実施形態に関する。本発明はまた、上記B7 H3結合分子の実施形態であって、上記分子は二重特異性抗体若しくはダイアボディ、特にダイアボディ、又はそれぞれN末端及びC末端を有する2つ、3つ、4つ若しくは5つのポリペプチド鎖を含むダイアボディ複合体であり、上記ポリペプチド鎖は1つ又は複数の共有結合、特に1つ又は複数の共有ジスルフィド結合によって結合される、実施形態に関する。本発明は更に、上記B7 H3結合分子の実施形態であって、上記分子は3価結合分子であり、特に上記3価結合分子は3つ、4つ、5つ又は6つ以上のポリペプチド鎖を含む共有結合複合体である、実施形態に関する。本発明は更に、上記B7 H3結合分子の実施形態であって、上記分子はFcドメインを含む、実施形態に関する。本発明は更に、上記B7 H3結合分子の実施形態であって、上記分子はダイアボディであり、アルブミン結合ドメイン及び特に脱免疫化アルブミン結合ドメインを含む、実施形態に関する。

【0024】

本発明は更に、Fcドメインを更に含む全ての上記B7 H3結合分子の実施形態であって、上記Fcドメインは変異型Fcドメインであり、上記変異型Fcドメインは、FcRに対する上記変異型Fcドメインの親和性を低減する、及び/又は上記B7 H3結合分子の血清半減期を増大させる、1つ又は複数のアミノ酸修飾を含み、より詳細には、上記修飾は：

- (a) L234A；
- (b) L235A；

10

20

30

40

50

- ( c ) L 2 3 4 A 及び L 2 3 5 A ;  
 ( d ) M 2 5 2 Y ; M 2 5 2 Y 及び S 2 5 4 T ;  
 ( e ) M 2 5 2 Y 及び T 2 5 6 E ;  
 ( f ) M 2 5 2 Y 、 S 2 5 4 T 及び T 2 5 6 E ; 並びに  
 ( g ) K 2 8 8 D 及び H 4 3 5 K ;

からなる群から選択される少なくとも1つの置換を含み、この番号付与は、K a b a t におけるものと同様のE U インデックスの番号付与である、実施形態に関する。

【 0 0 2 5 】

本発明は更に、上記B 7 H 3 結合分子の実施形態であって、上記分子は二重特異性である、実施形態に関し、特に、上記分子が、B 7 H 3 のエピトープに免疫特異的に結合できる2つのエピトープ結合部位と、エフェクタ細胞の表面上に存在する分子のエピトープに免疫特異的に結合できる2つのエピトープ結合部位とを含む実施形態、又は上記分子が、B 7 H 3 のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位と、エフェクタ細胞の表面上に存在する分子のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位とを含む実施形態に関する。

10

【 0 0 2 6 】

本発明は更に、上記B 7 H 3 結合分子の実施形態であって、上記分子は3価結合分子である、実施形態に関し、特に、上記分子が、B 7 H 3 のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位と、エフェクタ細胞の表面上に存在する第1の分子のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位と、エフェクタ細胞の表面上に存在する第2の分子のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位とを含み、上記第1の分子及び上記第2の分子はB 7 H 3 ではない、実施形態に関する。

20

【 0 0 2 7 】

本発明は更に、上記B 7 H 3 結合分子の実施形態であって、上記分子はB 7 H 3 及び第2のエピトープに同時に結合できる、実施形態に関し、特に上記第2のエピトープがエフェクタ細胞の表面上に存在する第2の分子のエピトープである（特に上記第2のエピトープがC D 2、C D 3、C D 8、C D 1 6、T C R 又はN K G 2 D のエピトープである、及び最も詳細には上記第2のエピトープがC D 3 のエピトープである）実施形態に関する。本発明は更に、上記B 7 H 3 結合分子の実施形態であって、上記エフェクタ細胞が細胞毒性T細胞又はナチュラルキラー（NK）細胞である、実施形態に関する。本発明は更に、上記B 7 H 3 結合分子の実施形態であって、上記分子が第3のエピトープにも結合できる、実施形態に関し、特に上記第3のエピトープがC D 8 のエピトープである実施形態に関する。本発明は更に、上記B 7 H 3 結合分子の実施形態であって、上記分子がB 7 H 3 を発現する細胞及び細胞毒性T細胞の配位結合を仲介する、実施形態に関する。

30

【 0 0 2 8 】

本発明は更に、有効量の上述のB 7 H 3 結合分子のうちのいずれと、薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤又は希釈剤とを含む、医薬組成物を提供する。

【 0 0 2 9 】

本発明は更に、B 7 H 3 の発現に関連する若しくはB 7 H 3 の発現を特徴とする疾患若しくは状態の治療における、又はB 7 H 3 の発現を特徴とする疾患若しくは状態の治療方法における、上述のB 7 H 3 結合分子のうちのいずれの使用を対象とし、B 7 H 3 の発現に関連する又はB 7 H 3 の発現を特徴とする上記疾患又は上記状態は癌であり、より詳細には、上記癌は：副腎癌；A I D S 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星細胞腫瘍；副腎癌；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄癌；転移性脳腫瘍；B細胞癌；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；発色性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成症；胆嚢若しくは胆管癌；消化器癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；脾島細胞腫；カボジ肉腫；腎臓癌；白血病；脂肪肉腫／悪性リポソーム腫瘍、肝臓癌；リンパ腫；肺癌；髄芽腫；黒色腫；髄膜

40

50

腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；卵巣癌；膵臓癌；乳頭状甲状腺癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；軟組織肉腫；扁平上皮細胞癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移性癌；及び子宮癌からなる群から選択される。

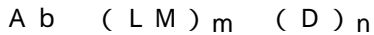
【0030】

本発明の第2の態様は、少なくとも1つの薬物部分にコンジュゲートしたヒト化抗ヒトB7 H3抗体のヒトB7 H3結合ドメインを含む分子（「B7 H3 ADC」）を対象とする。本発明はまた、上記B7 H3 ADCを含有する医薬組成物、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療における上記B7 H3 ADCの使用を伴う方法に関する。

10

【0031】

詳細には、本発明は、式：



を含む抗B7 H3抗体薬物コンジュゲート（B7 H3 ADC）を提供し：

A bは、ヒト化可変重鎖（VH）ドメイン及びヒト化可変軽鎖（VL）ドメインを含むB7 H3に結合する抗体、又はそのB7 H3結合断片であり；

Dは、細胞毒性薬物部分であり；

LMは、上記A b及び上記Dを共有結合させるリンカー分子であり；

mは0～nの整数であって、上記B7 H3 ADCのリンカー分子の数を表し；

nは1～10の整数であって、上記ADCに共有結合した上記細胞毒性薬物部分の数を表す。

20

【0032】

本発明は更に、上記リンカー分子LMが不在である（即ちm=0である）上記B7 H3 ADC、並びに2つ以上の上記リンカー分子LMを有し（即ちmが2～nの整数であり）、各上記リンカー分子LMは、上記B7 H3 ADCの細胞毒性薬物部分D及び上記A bを共有結合させる、B7 H3 ADCを提供する。本発明は更に、上記A bが2つ以上の上記リンカー分子LMと共有結合し、上記リンカー分子が全て同一である、上記B7 H3 ADCを提供する。上記B7 H3 ADCの上記A bと共有結合する上記細胞毒性薬物部分Dは、全て同一であってよく、又は2つ、3つ、4つ若しくは5つ以上の同一でない上記細胞毒性薬物部分Dを含んでよい。本発明は更に、上記A bが2つ以上の上記リンカー分子LMと共有結合し、上記リンカー分子が全て同一でない、上記B7 H3 ADCを提供する。上記B7 H3 ADCの上記A bと共有結合する上記細胞毒性薬物部分Dは、全て同一であってよく、又は2つ、3つ、4つ若しくは5つ以上の同一でない上記細胞毒性薬物部分Dを含んでよい。

30

【0033】

本発明は更に：

(A) (i) 上記ヒト化VLドメインが配列番号99のアミノ酸配列を含み；且つ

(ii) 上記ヒト化VHドメインが配列番号104のアミノ酸配列を含むか；又は

(B) (i) 上記ヒト化VLドメインが配列番号20のアミノ酸配列を含み；且つ

(ii) 上記ヒト化VHドメインが配列番号21のアミノ酸配列を含むか；又は

(C) (i) 上記ヒト化VLドメインが配列番号30のアミノ酸配列を含み；且つ

(ii) 上記ヒト化VHドメインが配列番号31のアミノ酸配列を含む、上記B7 H3 ADCを提供する。

40

【0034】

本発明は更に、上記ヒト化VLドメインが配列番号99のアミノ酸配列を含み、上記ヒト化VHドメインが配列番号104のアミノ酸配列を含む、上記B7 H3 ADCを提供する。

【0035】

本発明は更に、上記ヒト化VLドメインが配列番号20のアミノ酸配列を含み、上記ヒト化VHドメインが配列番号21のアミノ酸配列を含む、上記B7 H3 ADCを提供す

50

る。

【0036】

本発明は更に、上記ヒト化VLDドメインが配列番号30のアミノ酸配列を含み、上記ヒト化VHドメインが配列番号31のアミノ酸配列を含む、上記B7 H3 ADCを提供する。

【0037】

本発明は更に、上記Abが抗体又は抗体の抗原結合断片である、上記B7 H3 ADCを提供する。

【0038】

本発明は更に、上記B7 H3 ADCが、ヒトIgG(特にヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4)のFcドメインを含む、上記B7 H3 ADCを提供する。

10

【0039】

本発明は更に、上記B7 H3 ADCが変異型Fcドメインを含み、上記変異型Fcドメインは：

(a) Fc Rに対する上記変異型Fcドメインの親和性を低減する1つ若しくは複数のアミノ酸修飾：及び/又は

(b) 上記変異型Fcドメインの血清半減期を増大させる1つ若しくは複数のアミノ酸修飾を含む、上記B7 H3 ADCを提供する。

【0040】

本発明は更に、変異型Fcドメインを含む上記B7 H3 ADCであって、Fc Rに対する上記変異型Fcドメインの親和性を低減する上記修飾は：L234A；L235A；又はL234A及びL235Aの置換を含み、この番号付与は、Kabataにおけるものと同様のEUIンデックスの番号付与である、上記B7 H3 ADCを提供する。

20

【0041】

本発明は更に、変異型Fcドメインを含む上記B7 H3 ADCであって、上記変異型Fcドメインの血清半減期を増大させる上記修飾は：M252Y；M252Y及びS254T；M252Y及びT256E；M252Y、S254T及びT256E；又はK288D及びH435Kの置換を含み、この番号付与は、Kabataにおけるものと同様のEUIンデックスの番号付与である、上記B7 H3 ADCを提供する。

【0042】

本発明は更に、上記LMのうちの少なくとも1つがリンカー分子であり、特に上記LMリンカー分子はペプチドリンカー及び/又は切断可能リンカーである、上記B7 H3 ADCを提供する。

30

【0043】

本発明は更に、上記B7 H3 ADCであって、上記分子が式：

$$Ab [V (W)_k (X)_1 A]_D$$

を含み、ここで：

Vは上記切断可能LMリンカー分子であり；

(W)<sub>k</sub> (X)<sub>1</sub> Aは、1, (4 + 2n) 消去によって自己消去する、細長い自己消去性スペーサ系であり；

W及びXはそれぞれ1, (4 + 2n) 電子カスケードスペーサであり、同一であるか又は異なっており；

Aは、式(Y)<sub>m</sub> (ここでYは1, (4 + 2n) 電子カスケードスペーサである) のスペーサ基、又は式Uの基であり、環化除去スペーサであり；

k、1及びmは独立して、0 ~ 5 (両端を含む) の整数であり；

nは0 ~ 10 (両端を含む) の整数であり；

ただし：

Aが(Y)<sub>m</sub>である場合、k + 1 + m = 1であり；

k + 1 + m = 1である場合、n > 1であり；

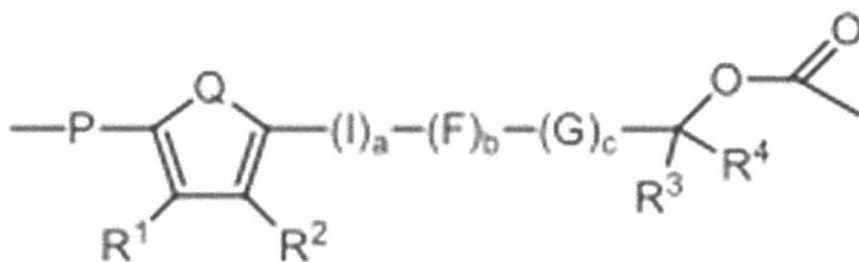
AがUである場合、k + 1 = 1である。

40

50

W、X及びYは独立して、以下の式：

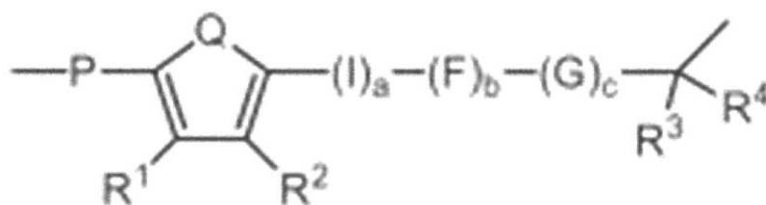
【化1】



10

又は以下の式：

【化2】



20

を有する化合物から選択され、ここで：

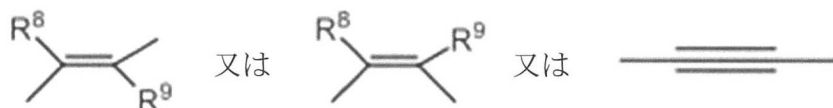
Qは  $R^5C=CR^6$ 、S、O、 $NR^5$ 、 $R^5C=N$  又は  $N=CR^5$  であり；

Pは $NR^7$ 、O又はSであり；

a、b及びcは独立して、0～5（両端を含む）の整数であり；

I、F及びGは独立して、式：

【化3】



30

を有する化合物から選択され、ここで：

$R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 及び $R^9$ は独立して、H、 $C_{1-6}$ アルキル、 $C_{3-20}$ ヘテロシクリル、 $C_{5-20}$ アリール、 $C_{1-6}$ アルコキシ、ヒドロキシ(OH)、アミノ( $NH_2$ )、モノ置換アミノ( $NR_xH$ )、ジ置換アミノ( $NR_x^1R_x^2$ )、ニトロ( $NO_2$ )、ハロゲン、 $CF_3$ 、CN、 $CONH_2$ 、 $SO_2Me$ 、 $CONHMe$ 、環式 $C_{1-5}$ アルキルアミノ、イミダゾリル、 $C_{1-6}$ アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル( $SR_x$ )、テトラゾール、カルボキシ( $COOH$ )、カルボン酸塩( $COOR_x$ )、スルホキシ( $S(=O)_2OH$ )、スルホン酸塩( $S(=O)_2OR_x$ )、スルホニル( $S(=O)_2R_x$ )、スルフィキシ( $S(=O)OH$ )、スルフィン酸塩( $S(=O)OR_x$ )、スルフィニル( $S(=O)R_x$ )、ホスホノオキシ( $OP(=O)(OH)_2$ )及びリン酸塩( $OP(=O)(OR_x)_2$ )を表し、ここで：

40

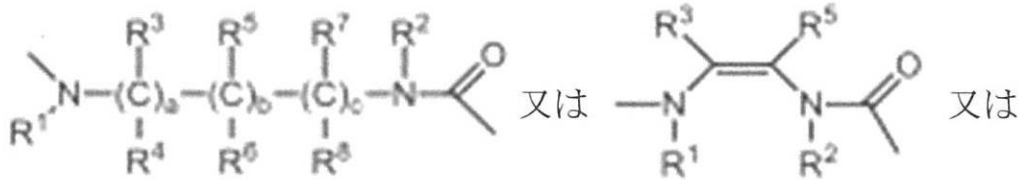
$R_x$ 、 $R_x^1$ 及び $R_x^2$ は独立して、 $C_{1-6}$ アルキル基、 $C_{3-20}$ ヘテロシクリル基又は $C_{5-20}$ アリール基から選択され；

上記置換基 $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、 $R^8$ 又は $R^9$ のうちの2つ以上は任意に、互いに接続して1つ又は複数の脂肪族又は芳香族環式構造を形成し；

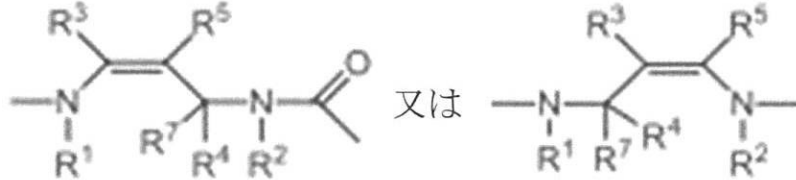
Uは、式：

50

## 【化4】



## 【化5】



を有する化合物から選択され、ここで：

a、b及びcは独立して、0又は1の整数となるよう選択され；

ただし  $a + b + c = 2$  又は  $3$  であり；

R<sup>1</sup>及び/又はR<sup>2</sup>は独立して、H、C<sub>1-6</sub>アルキルを表し、上記アルキルは任意に、以下の基：ヒドロキシ(OH)、エーテル(OR<sub>x</sub>)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1-5</sub>アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1-6</sub>アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、スルホキシ(S(=O)<sub>2</sub>OH)、スルホン酸塩(S(=O)<sub>2</sub>OR<sub>x</sub>)、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>)、スルフィキシ(S(=O)OH)、スルフィン酸塩(S(=O)OR<sub>x</sub>)、スルフィニル(S(=O)R<sub>x</sub>)、ホスホノオキシ(OP(=O)(OH)<sub>2</sub>)、及びリン酸塩(OP(=O)(OR<sub>x</sub>)<sub>2</sub>)のうちの1つ又は複数によって置換され、ここでR<sub>x</sub>、R<sub>x</sub><sup>1</sup>及びR<sub>x</sub><sup>2</sup>は、C<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル基又はC<sub>5-20</sub>アリール基から選択され；

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>及びR<sup>8</sup>は独立して、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル、C<sub>5-20</sub>アリール、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、ヒドロキシ(OH)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1-5</sub>アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1-6</sub>アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、スルホキシ(S(=O)<sub>2</sub>OH)、スルホン酸塩(S(=O)<sub>2</sub>OR<sub>x</sub>)、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>)、スルフィキシ(S(=O)OH)、スルフィン酸塩(S(=O)OR<sub>x</sub>)、スルフィニル(S(=O)R<sub>x</sub>)、ホスホノオキシ(OP(=O)(OH)<sub>2</sub>)、及びリン酸塩(OP(=O)(OR<sub>x</sub>)<sub>2</sub>)を表し、ここでR<sub>x</sub>、R<sub>x</sub><sup>1</sup>及びR<sub>x</sub><sup>2</sup>は、C<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル基又はC<sub>5-20</sub>アリール基から選択され、上記置換基R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、又はR<sup>8</sup>のうちの2つ以上は任意に、互いに接続して1つ又は複数の脂肪族又は芳香族環式構造を形成する、上記B7 H3 ADCを提供する。

## 【0044】

本発明は更に、上記B7 H3 ADCであって、上記LMリンカー分子が：

(1) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル；

(2) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル；

10

20

30

40

50

- ( 3 ) p アミノシナミルオキシカルボニル ;
- ( 4 ) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル ;
- ( 5 ) p アミノ ベンジルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル ;
- ( 6 ) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル ;
- ( 7 ) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル ;
- ( 8 ) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル ;
- ( 9 ) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル ;
- ( 10 ) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル ; 10
- ( 11 ) p アミノベンジルオキシカルボニル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル ;
- ( 12 ) p アミノシナミルオキシカルボニル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル ;
- ( 13 ) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル ;
- ( 14 ) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル ;
- ( 15 ) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル ; 20
- ( 16 ) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル ;
- ( 17 ) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジル ;
- ( 18 ) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジル ;
- ( 19 ) p アミノシナミル ;
- ( 20 ) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノベンジル ;
- ( 21 ) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシナミル ;
- ( 22 ) p アミノ シナミルオキシカルボニル p アミノシナミル ; 30
- ( 23 ) p アミノフェニルペンタジエニル ;
- ( 24 ) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノシナミル ;
- ( 25 ) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノベンジル ; 又は
- ( 26 ) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノフェニルペンタジエニルを含む、上記 B 7 H 3 A D C を提供する。

【 0 0 4 5 】

本発明は更に、上記 B 7 H 3 A D C であって、上記 L M リンカー分子が上記 A b のポリペプチド鎖のアミノ酸の側鎖にコンジュゲートされて、上記 A b を上記細胞毒性薬物部分 D の分子に結合させ、また特に、上記細胞毒性薬物部分 D は、細胞毒素、放射性同位元素、免疫調節因子、サイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、成長因子、腫瘍壊死因子、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、siRNA、RNAi、マイクロRNA、光活性治療剤、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、ペプチド、脂質、炭水化物、キレート剤、又はこれらの組み合わせを含む、上記 B 7 H 3 A D C を提供する。 40

【 0 0 4 6 】

本発明は更に、上記 B 7 H 3 A D C であって、上記 L M リンカー分子が上記 A b のポリペプチド鎖のアミノ酸の側鎖にコンジュゲートされて、上記 A b を上記細胞毒性薬物部分 D の分子に結合させ、また特に、上記細胞毒性薬物部分 D は：ツブリン (特にツブリン A、ツブリン B、ツブリン C 及びツブリン D からなる群から選択されるツブリン細胞毒素) ; オーリスタチン (特に MMAE (N メチルバリン バリン ドライソ 50

ロイイン ドラプロイン ノルエフェドリン)及びMMAF(N-メチルバリン-バリン-  
 ドライソロイイン ドラプロイン フェニルアラニン)からなる群から選択されるオー  
 リスタチン細胞毒素);マイタンシノイド(特にマイタンシン、DM1及びDM4からな  
 る群から選択されるマイタンシノイド細胞毒素);カリケアミシン(特にカリケアミシン  
 1、カリケアミシン 1Br、カリケアミシン 1Br、カリケアミシン 2I、カリ  
 ケアミシン 3I、カリケアミシン 1I、カリケアミシン 1I及びカリケアミシン  
 1Iからなる群から選択されるカリケアミシン細胞毒素);ピロロベンゾジアゼピン(特  
 にバダスツキシマブ・タリリン、SJG 136、SG2000、SG2285及びSG  
 2274からなる群から選択されるピロロベンゾジアゼピン細胞毒素);並びにデュオカル  
 ルマイシン(特にデュオカルマイシンA、デュオカルマイシンB1、デュオカルマイシン  
 B2、デュオカルマイシンC1、デュオカルマイシンC2、デュオカルマイシンD、デュ  
 オカルマイシンSA、CC 1065、アドゼレシン、ピゼレシン、カルゼルシン(U  
 80244)及びスピロ-デュオカルマイシン(DUBA)からなる群から選択されるデュ  
 オカルマイシン細胞毒素)からなる群から選択される、細胞毒素を含む、上記B7-H  
 3-ADCを提供する。

10

#### 【0047】

本発明は更に、有効量の上述のB7-H3-ADCのうちのいずれと、薬学的に許容可能  
 なキャリア、賦形剤又は希釈剤とを含む、医薬組成物を提供する。

#### 【0048】

本発明は更に、B7-H3の発現に関連する若しくはB7-H3の発現を特徴とする疾患  
 若しくは状態の治療における、又はB7-H3の発現を特徴とする疾患若しくは状態の治  
 療方法における、上述のB7-H3-ADCのうちのいずれの使用を対象とし、B7-H  
 3の発現に関連する又はB7-H3の発現を特徴とする上記疾患又は上記状態は癌であり  
 、より詳細には、上記癌は：急性骨髄性白血病；副腎癌；AIDS関連癌；胞巣状軟部肉  
 腫；星細胞腫瘍；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄癌；転移性脳腫瘍；乳癌；頸動脈球腫瘍；子  
 宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；発色性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚良性  
 線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟  
 骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成症；胆嚢若しくは胆管癌；消化器癌；妊娠  
 性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；肝細胞癌；神経膠芽細胞腫；膵島細胞腫；カボジ  
 肉腫；腎臓癌；白血病；脂肪肉腫/悪性リポソーム腫瘍；肝臓癌；リンパ腫；肺癌；髓芽  
 腫；黒色腫；髄膜腫；悪性中皮腫；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群  
 ；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；非小細胞肺癌；卵巣癌；膵臓癌；咽頭癌；乳頭状甲状  
 腺癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後  
 部ブドウ膜黒色腫；腎細胞癌；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌  
 ；軟組織肉腫；扁平上皮細胞癌；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺転移  
 性癌；及び子宮癌からなる群から選択される。

20

30

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0049】

【図1】図1は、それぞれEコイル又はKコイルヘテロ二量体促進ドメイン(選択できる  
 ヘテロ二量体促進ドメインは以下で提示する)を有する2つのポリペプチド鎖からなる2  
 つのエピトープ結合部位を有する、代表的な共有結合ダイアボディの概略図である。図3  
 Bに示すように、システイン残基がリンカー中及び/又はヘテロ二量体促進ドメイン中に  
 存在してよい。同一のエピトープを認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗  
 り潰しパターンを用いて示される。

40

【図2】図2は、連結した鎖がFcドメインの全体又は一部を形成するように、それぞれ  
 CH2及びCH3ドメインを有する2つのポリペプチド鎖からなる2つのエピトープ結合  
 部位を有する、代表的な共有結合ダイアボディ分子の概略図である。同一のエピトープを  
 認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗り潰しパターンを用いて示される。

【図3A-3C】図3A~3Cは、2ペアのポリペプチド鎖(即ち合計4つのポリペプチ  
 ド鎖)からなる4つのエピトープ結合部位を有する、代表的な共有結合した4価ダイアボ

50

ディの概略図である。各ペアのうちの1つのポリペプチドは、連結した鎖がFcドメインの全体又は一部を形成するように、CH2及びCH3ドメインを有する。同一のエピトープを認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗り潰しパターンを用いて示される。上記2ペアのポリペプチド鎖は、同一であってよい。(図3A~3Bに示すように)2ペアのポリペプチド鎖が同一であり、かつVL及びVHドメインが異なるエピトープを認識する実施形態では、得られた分子は4つのエピトープ結合部位を有し、二重特異性であり、結合する各エピトープに対して2価である。VL及びVHドメインが同一のエピトープを認識する(例えば同一のVLドメインCDR及び同一のVHドメインCDRを両方の鎖に対して使用する)実施形態では、得られた分子は4つのエピトープ結合部位を有し、単一特異性であり、単一のエピトープに対して4価である。あるいは、上記2ペアのポリペプチドは異なっていてよい。(図3Cにおいて様々な陰影及びパターンで示すように)ポリペプチドの各ペアのVL及びVHドメインが異なるエピトープを認識する実施形態では、得られた分子は4つのエピトープ結合部位を有し、四重特異性であり、結合する各エピトープに対して1価である。図3Aは、システイン残基を含むペプチドヘテロ二量体促進ドメインを含有するFcドメイン含有ダイアボディを示す。図3BはFcドメイン含有ダイアボディを示し、これは、システイン残基及び(任意のシステイン残基を有する)リンカーを含む、Eコイル及びKコイルヘテロ二量体促進ドメインを含有する。図3Cは、抗体CH1及びCLドメインを含有するFc領域含有ダイアボディを示す。

10

【図4A-4B】図4A及び4Bは、3つのポリペプチド鎖からなる2つのエピトープ結合部位を有する、代表的な共有結合ダイアボディ分子の概略図である。上記ポリペプチド鎖のうち2つは、連結した鎖がFcドメインの全体又は一部を形成するように、CH2及びCH3ドメインを有する。VL及びVHドメインを含むポリペプチド鎖は、ヘテロ二量体促進ドメインを更に含む。同一のエピトープを認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗り潰しパターンを用いて示される。

20

【図5】図5は、5つのポリペプチド鎖からなる4つのエピトープ結合部位を有する、代表的な共有結合ダイアボディの概略図である。上記ポリペプチド鎖のうち2つは、連結した鎖がFcドメインの全体又は一部を含むFcドメインを形成するように、CH2及びCH3ドメインを有する。VL及びVHドメインを含むポリペプチド鎖は、ヘテロ二量体促進ドメインを更に含む。同一のエピトープを認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗り潰しパターンを用いて示される。

30

【図6A-6F】図6A~6Fは、3つのエピトープ結合部位を有する、代表的なFcドメイン含有3価結合分子の概略図である。図6A及び6Bはそれぞれ、ダイアボディ型結合ドメインがFcドメインに対するN末端又はC末端となる異なるドメイン配向を有する、2つのダイアボディ型結合ドメイン及びFab型結合ドメインを含む3価結合分子のドメインを示す。図6A及び6Bの分子は4つの鎖を含む。図6C及び6Dはそれぞれ、FcドメインのN末端に2つのダイアボディ型結合ドメインと、軽鎖及び重鎖がポリペプチドスペーサを介して連結されたFab型結合ドメイン、又はscFv型結合ドメインとを含む、3価結合分子のドメインを示す。図6E及び6Fの3価結合分子はそれぞれ、FcドメインのC末端に2つのダイアボディ型結合ドメインと、軽鎖及び重鎖がポリペプチドスペーサを介して連結されたFab型結合ドメイン、又はscFv型結合ドメインとを含む、3価結合分子のドメインを、概略的に示す。図6C~6Fの3価結合分子は、3つの鎖を含む。同一のエピトープを認識するVL及びVHドメインは、同一の陰影又は塗り潰しパターンを用いて示される。

40

【図7】図7は、Hs700T膵臓癌細胞内へと内在化できる抗B7H3抗体に関するスクリーンの結果を示す。

【図8A-8J】図8A~8Jは、B7H3発現性JIMT-1乳癌細胞(図8A)、MDA-MB-468乳癌細胞(図8B)、A375.52黒色腫細胞(図8C)、Calu-6非小細胞肺癌細胞(図8D)、NCI-H1703非小細胞肺癌細胞(図8E)、NCI-H1975非小細胞肺癌細胞(図8F)、PA-1卵巣癌細胞(図8G)、Hs700T膵臓癌細胞(図8H)、DU145前立腺癌細胞(図8I)、及びB7H3

50

陰性 R a j i B 細胞リンパ腫細胞 ( 図 8 J ) に対するインビトロ細胞毒性を仲介する、本発明の B 7 H 3 A D C の能力の研究の結果を示す。

【 図 9 】 図 9 は、 C D 1 ノードマウスモデルの乳房脂肪体に移植した M D A M B 4 6 8 乳癌腫瘍細胞に対するインビボ細胞毒性を仲介する、本発明の B 7 H 3 A D C の能力の研究の結果を示す。 c h m A b B v c M M A E、 c h m A b C v c M M A E、及び c h m A b D v c M M A E、又はビヒクル単独を用いて 2 5 日目 ( 矢印で示す ) に腹腔内治療されたマウスに関して、腫瘍成長曲線を提示する。

【 図 1 0 A - 1 0 C 】 図 1 0 A ~ 1 0 C は、 C D 1 ノードマウスモデルの皮下に移植した N C I H 1 7 0 3 非小細胞肺癌腫瘍細胞に対するインビボ細胞毒性を仲介する、本発明の B 7 H 3 A D C の能力の研究の結果を示す。 1 0 m g / k g ( 図 1 0 A )、 3 m g / k g ( 図 1 0 B )、 1 m g / k g ( 図 1 0 C ) の c h m A b B v c M M A E、 c h m A b C v c M M A E、及び c h m A b D v c M M A E、又はビヒクル単独を用いて 5 2 日目 ( 矢印で示す ) に腹腔内治療されたマウスに関して、腫瘍成長曲線を提示する。

10

【 図 1 1 A - 1 1 C 】 図 1 1 A ~ 1 1 C は、 C D 1 ノードマウスモデルの皮下に移植した P A 1 卵巣癌腫瘍細胞に対するインビボ細胞毒性を仲介する、本発明の B 7 H 3 A D C の能力の研究の結果を示す。 1 0 m g / k g ( 図 1 1 A )、 3 m g / k g ( 図 1 1 B )、 1 m g / k g ( 図 1 1 C ) の c h m A b B v c M M A E、 c h m A b C v c M M A E、及び c h m A b D v c M M A E、又はビヒクル単独を用いて 4 2 日目 ( 矢印で示す ) に腹腔内治療されたマウスに関して、腫瘍成長曲線を提示する。

20

【 図 1 2 A - 1 2 C 】 図 1 2 A ~ 1 2 C は、 C D 1 ノードマウスモデルの皮下に移植した C a l u 6 非小細胞肺癌腫瘍細胞に対するインビボ細胞毒性を仲介する、本発明の B 7 H 3 A D C の能力の研究の結果を示す。 1 0 m g / k g ( 図 1 2 A )、 3 m g / k g ( 図 1 2 B )、 1 m g / k g ( 図 1 2 C ) の c h m A b B v c M M A E、 c h m A b C v c M M A E、及び c h m A b D v c M M A E、又はビヒクル単独を用いて 2 0 日目 ( 矢印で示す ) に腹腔内治療されたマウスに関して、腫瘍成長曲線を提示する。

【 図 1 3 A - 1 3 C 】 図 1 3 A ~ 1 3 C は、 C D 1 ノードマウスモデルの皮下に移植した A 3 7 5 . S 2 黒色腫瘍細胞に対するインビボ細胞毒性を仲介する、本発明の B 7 H 3 A D C の能力の研究の結果を示す。 1 0 m g / k g ( 図 1 3 A )、 3 m g / k g ( 図 1 3 B )、 1 m g / k g ( 図 1 3 C ) の c h m A b B v c M M A E、 c h m A b C v c M M A E、及び c h m A b D v c M M A E、又はビヒクル単独を用いて 3 0 日目 ( 矢印で示す ) に腹腔内治療されたマウスに関して、腫瘍成長曲線を提示する。

30

【 図 1 4 A - 1 4 C 】 図 1 4 A ~ 1 4 C は、 B 7 H 3 A D C 分子の薬物動態安定性の研究の結果を示す。全抗体 ( 円 )、並びに c h m A b B ( 図 1 4 A )、 c h m A b C ( 図 1 4 B ) 及び c h m A b D ( 図 1 4 C ) 由来の完全な B 7 H 3 A D C ( 正方形 ) に関して、血清抗体濃度曲線を提示する。

【 図 1 5 A - 1 5 C 】 図 1 5 A ~ 1 5 C は、切断可能リンカーを介してその A b 部分のアミノ酸残基に連結された例示的なデュオカルマイシン部分 ( D U B A ) を有する h m A b C B 7 H 3 A D C ( 「 h m A b C D U B A 」 ) による、生物活性の保持を示す。図 1 5 A、 C a l u 6 細胞 ; 図 1 5 B、 N C I H 1 7 0 3 細胞 ; 図 1 5 C、 H s 7 0 0 T 細胞。対照分子は C D 2 0 に結合し、 D U B A にコンジュゲートされる ( 「 C t r l D U B A 」 ) 。

40

【 図 1 6 】 図 1 6 は、 C a l u 6 非小細胞肺癌細胞に対する h m A b C D U B A の効力のインビボ研究の結果を示す。 h m A b C D U B A を、 C a l u 6 非小細胞肺癌細胞を皮下接種したマウスの群 ( n = 5 ) に導入した。複数用量の h m A b C D U B A ( 1 m g / k g x 3、 3 m g / k g x 3、又は 6 m g / k g x 3 ) を、接種後 2 4、 3 1、 3 8 及び 4 5 日目 ( 矢印で示す ) にマウスに腹腔内投与し、これらの動物を最大 6 2 日間、腫瘍体積に関して評価した。

【 図 1 7 】 図 1 7 は、 C a l u 6 非小細胞肺癌細胞に対する h m A b C D U B A の

50

効力のインビボ研究の結果を示す。h m A b C D U B A を、C a l u 6 非小細胞肺癌細胞を皮下接種したマウスの群 ( n = 7 ) に導入した。ある用量の h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A ( 3 m g / k g 、 又は 1 0 m g / k g ) を、接種後 2 0 日目 ( 矢印で示す ) にマウスに投与し、これらの動物を最大 5 5 日間、腫瘍体積に関して評価した。

【図 1 8】図 1 8 は、P A 1 卵巣癌細胞に対する h m A b C D U B A の効力のインビボ研究の結果を示す。h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A を、P A 1 卵巣癌細胞を皮下接種したマウスの群 ( n = 7 ) に導入した。ある用量の h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A ( 3 m g / k g 、 6 m g / k g 、 又は 1 0 m g / k g ) を、接種後 2 5 日目 ( 矢印で示す ) にマウスに投与し、これらの動物を最大 6 0 日間、腫瘍体積に関して評価した。

10

【図 1 9】図 1 9 は、A 3 7 5 . S 2 黒色腫細胞に対する h m A b C D U B A の効力のインビボ研究の結果を示す。h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A を、A 3 7 5 . S 2 黒色腫細胞を皮下接種したマウスの群 ( n = 6 ) に導入した。ある用量の h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A ( 1 m g / k g 、 又は 3 m g / k g ) を、接種後 2 5 日目 ( 矢印で示す ) にマウスに投与し、これらの動物を最大 6 0 日間、腫瘍体積に関して評価した。

【図 2 0 A - 2 0 D】図 2 0 A ~ 2 0 D は、M D A M B 4 6 8 乳癌細胞の脂肪体異種移植片に対する h m A b C D U B A の効力のインビボ研究の結果を示す。乳房脂肪体に M D A M B 4 6 8 乳癌細胞を接種した後 7 0 、 7 4 及び 7 8 日目に、h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A をマウスの群に腹腔内投与した。接種後 7 0 日目にある用量の h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A ( 3 m g / k g 又は 6 m g / k g の単回用量 ) を、そして 7 0 、 7 4 及び 7 8 日目に 3 m g / k g を 3 用量投与し、これらの動物を最大 1 1 0 日間、腫瘍体積に関して評価した。図 2 0 A は、6 m g / k g ( 単回用量 ) でのビヒクル、h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A に関する結果を示す。図 2 0 B は、3 m g / k g ( 単回用量 ) でのビヒクル、h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A に関する結果を示す。図 2 0 C は、3 m g / k g ( 3 用量 ) でのビヒクル、h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A に関する結果を示す。図 2 0 D は、全ての結果を単一のグラフ上に示す。

20

【図 2 1 A - 2 1 D】図 2 1 A ~ 2 1 D は、P A 1 卵巣細胞の脂肪体皮下移植された異種移植片に対する h m A b C D U B A の効力のインビボ研究の結果を示す。h m A b C D U B A 若しくは C t r l D U B A ( 3 m g / k g 、 6 m g / k g 若しくは 1 0 m g / k g の単回用量 ) を接種後 2 4 日目に、又は 1 0 m g / k g の h m A b C D U B A 若しくは C t r l D U B A を ( 接種後 2 4 及び 2 8 日目に ) 2 用量、又は 6 m g / k g の h m A b C D U B A 若しくは C t r l D U B A を ( 接種後 2 4 、 2 8 、 3 1 及び 3 5 日目に ) 4 用量、腹腔内投与した。これらの動物を最大 7 0 日間、腫瘍体積に関して評価した。図 2 1 A は、1 0 m g / k g ( 単回用量又は 2 回用量 ) でのビヒクル、h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A に関する結果を示す。図 2 1 B は、6 m g / k g ( 単回用量又は 4 回用量 ) でのビヒクル、h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A に関する結果を示す。図 2 1 C は、3 m g / k g ( 単回用量 ) でのビヒクル、h m A b C D U B A 又は C t r l D U B A に関する結果を示す。図 2 1 D は、全ての結果を単一のグラフ上に示す。

30

40

【図 2 2】図 2 2 は、マウスにおける c h m A b C D U B A 投与の薬物動態を示す。この図は、全ヒト I g G と、3 m g / k g の c h m A b C D U B A の完全な A D C ( n = 3 ) とを示す。

【図 2 3 A - 2 3 B】図 2 3 A ~ 2 3 B は、カニクイザルにおける h m A b C D U B A 投与の薬物動態を示す。これらの図は、全ヒト I g G ( 図 2 3 A ) と、1 m g / k g ( オス 1 頭 ; メス 1 頭 ) 、 3 m g / k g ( オス 1 頭 ; メス 1 頭 ) 、 1 0 m g / k g ( オス 1 頭 ; メス 1 頭 ) 、 又は 2 7 m g / k g ( オス 2 頭 ; メス 2 頭 ) の h m A b C D U B A の完全な A D C ( 図 2 3 B ) とを示す。

50

## 【発明を実施するための形態】

## 【0050】

本発明は、ヒト及び非ヒト B7 H3 に結合できる新規の B7 H3 結合分子、並びに特に非ヒト霊長類（例えばカニクイザル）の B7 H3 と交差反応する上記分子を対象とする。本発明は更に、レシピエントである被験者への投与時に免疫原性の低減を示すようヒト化及び/又は脱免疫化された可変軽鎖及び/又は可変重鎖（VH）ドメインを含む、B7 H3 結合分子に関する。本発明は特に：(i) 上記 B7 H3 結合可変ドメイン；及び(ii) エフェクタ細胞の表面上に存在する分子のエピトープに結合できるドメインを含む、二重特異性ダイアポディ、BiTE、二重特異性抗体、3価結合分子等を含む二重特異性、三重特異性又は多重特異性 B7 H3 結合分子に関する。本発明はまた、上記 B7 H3 結合分子のいずれを含有する医薬組成物、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療における上記 B7 H3 結合分子のいずれの使用を伴う方法も対象とする。本発明はまた、少なくとも1つの薬物部分にコンジュゲートしたヒト化抗ヒト B7 H3 抗体のヒト B7 H3 結合ドメインを含む分子（「B7 H3 ADC」）にも関する。本発明はまた、上記 B7 H3 ADC を含有する医薬組成物、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療における上記 B7 H3 ADC のいずれの使用を伴う方法も対象とする。

10

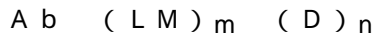
## 【0051】

本発明はまた、少なくとも1つの薬物部分にコンジュゲートしたヒト化抗ヒト B7 H3 抗体のヒト B7 H3 結合ドメインを含む分子（「B7 H3 ADC」）を対象とする。本発明はまた、上記 B7 H3 ADC を含有する医薬組成物、並びに癌並びに他の疾患及び状態の治療における上記 B7 H3 ADC の使用を伴う方法に関する。

20

## 【0052】

本発明の B7 H3 ADC 分子は、式：



を含み：

A b は、ヒト化可変重鎖（VH）ドメイン及びヒト化可変軽鎖（VL）ドメインを含む B7 H3 に結合する抗体、又はその B7 H3 結合断片であり；

D は、細胞毒性薬物部分であり；

L M は、上記 A b 及び上記 D を共有結合させる結合又はリンカー分子であり；

m は 0 ~ n の整数であって、上記 B7 H3 ADC のリンカー分子の数を表し；

n は 1 ~ 10 の整数であって、上記 B7 H3 ADC 分子に共有結合した上記細胞毒性薬物部分の数を表す。

30

## 【0053】

## I. 抗体及びその結合ドメイン

本発明の抗体は、当該免疫グロブリン分子の可変ドメインに位置する少なくとも1つの抗原認識部位によって、炭水化物、ポリヌクレオチド、脂質、ポリペプチド等の標的に特異的に結合できる、免疫グロブリン分子である。従って本発明の B7 H3 ADC 分子は、B7 H3 又はその B7 H3 結合断片に結合する抗体を含む。本明細書において使用される場合、用語「抗体 (antibody 及び antibodies)」は、モノクローナル抗体、多重特異性抗体、ヒト抗体、ヒト化抗体、合成抗体、キメラ抗体、ポリクローナル抗体、ラクダ化抗体、単鎖 Fv (scFv)、単鎖抗体、Fab 断片、F(ab') 断片、ジスルフィド結合二重特異性 Fv (sdFv)、細胞内抗体、及び以上のうちのいずれかのエピトープ結合断片を包含する。特に、用語「抗体」は、免疫グロブリン分子及び免疫グロブリン分子の免疫学的に活性の断片、即ちエピトープ結合部位を含有する分子を含む。免疫グロブリン分子は、いずれのタイプ（例えば IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 及び IgY）、クラス（例えば IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及び IgA2）又はサブクラスのものとする事ができる。抗体は、ポリペプチド又はタンパク質又は非タンパク質分子に「免疫特異的に結合 (immunospecifically binding)」(又はこれらの分子に「免疫特異的な様式 (immunospecific manner)」で結合) できる。というのは、このような分子上に特定のドメイン又は部分又は形態（「エピトープ (epitope

40

50

」)が存在するためである。エピトープ含有分子は、免疫学的活性を有することができ、これにより、動物における抗体産生応答を誘発する。このような分子を「抗原 (antigen)」と呼ぶ。この数十年、抗体の治療的潜在能力に対する関心が再び高まっており、抗体は、生命工学由来の薬剤の筆頭となるクラスの1つとなっている (Chan, C.E. et al. (2009) "The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases," Singapore Med. J. 50(7):663-666)。200を超える抗体系薬剤が使用認可済み、又は開発中である。

#### 【0054】

本明細書において使用される場合、抗体、ダイアボディ又は他のエピトープ結合分子は、代替的なエピトープに比べて、より頻繁に、より迅速に、より長期間、及び/又はより高い親和性で当該エピトープと反応又は連結する場合、別の分子のある領域 (即ちエピトープ) に「免疫特異的に (immunospecifically)」結合する、と言い表される。例えば、あるウイルスエピトープに免疫特異的に結合する抗体は、他のウイルスエピトープ又は非ウイルスエピトープに免疫特異的に結合するよりも、より高い親和性、結合活性で、より容易に、及び/又はより長い期間、当該ウイルスエピトープに結合する抗体である。この定義を読めば、例えば第1の標的に免疫特異的に結合する抗体 (又は部分若しくはエピトープ) は、第2の標的に特異的又は優先的に結合してもしなくてもよいことも理解される。従って「免疫特異的結合 (immunospecific binding)」は、排他的結合を必ずしも必要としない (ただし含むことはできる)。一般に、ただし必ずしもそうではないが、結合に関する言及は「免疫特異的」結合を意味する。2つの分子は、これらの結合が、これら2つの分子それぞれのリガンドに受容体が結合する特異性を呈する場合に、「生理学的に特異的な (physiospecific)」様式で互いに結合できると言い表される。

#### 【0055】

用語「モノクローナル抗体 (monoclonal antibody)」は均質な抗体の集団を指し、上記モノクローナル抗体は、抗原の選択的結合に関わる (自然に発生する、又は自然に発生しない) アミノ酸から構成される。モノクローナル抗体は特異性が高く、単一のエピトープ (又は抗原部位) に対して指向性を有する。用語「モノクローナル抗体」は、完全なモノクローナル抗体及び全長モノクローナル抗体だけでなく、これらの断片 (Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv等)、単鎖 (scFv) 結合分子、その突然変異体、抗体部分を含む融合タンパク質、ヒト化モノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体、及び必要な特異性及び抗原への結合能力を有する抗原認識部位を含む免疫グロブリン分子の他のいずれの修飾構成を包含する。抗原の源又は抗原を作製する方法 (例えば、ハイブリドーマ、ファージ選択、組み換え発現、遺伝子導入動物等による) に関して、限定は意図されていない。この用語は、免疫グロブリン全体、及び「抗体」の定義において上述した断片等を含む。モノクローナル抗体の作製方法は当該技術分野において公知である。採用してよい1つの方法は、Kohler, G. et al. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity," Nature 256:495-497の方法又はその修正例である。典型的には、モノクローナル抗体はマウス、ラット又はウサギにおいて発現する。上記抗体は、動物を、所望のエピトープを含有する免疫原性量の細胞、細胞抽出物又はタンパク質で免疫化することによって産生される。免疫原は、一次細胞、培養された細胞株、癌細胞、タンパク質、ペプチド、核酸又は組織とすることができるが、これらに限定されない。免疫化に使用してよい細胞は、これらを免疫原として使用するよりもある期間 (例えば少なくとも24時間) だけ前に、培養してよい。細胞は単独で、又はRib i等の非変性アジュバントと組み合わせて、免疫原として使用してよい (Jennings, V.M. (1995) "Review of Selected Adjuvants Used in Antibody Production," ILAR J. 37(3):119-125を参照)。一般に細胞は、免疫原として使用される際、完全な状態、及び好ましくは生存できる状態に維持しなければならない。完全な細胞は、破裂した細胞よりも、免疫性を与えられた動物が抗原をより良好に検出できるようにすることができる。変性又は強いアジュバント、例えばフロイントアジュバントの使用は、細胞を破裂させる場合があり、従って推奨されない。免疫原は、2週間に1回若しくは1週間に1回等

10

20

30

40

50

、周期的な間隔で複数回投与してよく、又は動物中（例えば組織組み換え中）に生存能力を維持できるように投与してよい。あるいは、所望の病原性エピトープに対する免疫特異性を有する既存のモノクローナル抗体及び他の同等の抗体は、当該技術分野で公知のいずれの手段によって、組み換え配列及び産生できる。一実施形態では、このような抗体を配列し、続いてポリヌクレオチド配列を発現又は繁殖のためのベクターにクローン化する。関心対象の抗体をエンコードする配列は、宿主細胞中のベクター中に保持され、続いて上記宿主細胞を、将来使用するために膨張させて冷凍できる。このような抗体のポリヌクレオチド配列は、本発明の単一特異性又は多重特異性（例えば二重特異性、三重特異性及び四重特異性）分子、並びに親和性最適化済み、キメラ抗体、ヒト化抗体及び/又はイヌ化抗体を生成することによって、抗体の親和性又は他の特徴を改善するための、遺伝子操作のために使用してよい。抗体をヒト化する際の一般原理は、抗体の抗原結合部分の塩基配列を保持しながら、抗体の非ヒト残部をヒト抗体配列と交換するステップを伴う。

10

## 【0056】

天然抗体（IgG抗体等）は、2つの「重鎖（heavy chain）」と複合体化した2つの「軽鎖（light chain）」からなる。各軽鎖は、可変ドメイン（「VL」）及び定常ドメイン（「CL」）を含有する。各重鎖は、可変ドメイン（「VH」）、3つの定常ドメイン（「CH1」、「CH2」及び「CH3」）、並びにCH1ドメインとCH2ドメインとの間に位置する「ヒンジ」領域（「H」）を含有する。従って、自然に発生する免疫グロブリン（例えばIgG）の基本構造単位は、通常は約150,000Daの糖タンパク質として発現される、軽鎖及び2つの重鎖を有する三量体である。各鎖のアミノ末端（「N末端」）部分は、抗原認識に主要な役割を果たす約100～110個の可変ドメインを含む。各鎖のカルボキシ末端（「C末端」）部分は定常領域を画定し、軽鎖は単一の定常ドメインを有し、重鎖は通常3つの定常ドメイン及び1つのヒンジドメインを有する。従って、IgG分子の軽鎖の構造はn VL CL cであり、IgG重鎖の構造はn VH CH1 H CH2 CH3 cである（ここでn及びcはそれぞれ、ポリペプチドのN末端及びC末端を表す）。

20

## 【0057】

## A．抗体可変ドメインの特性決定

IgG分子の可変ドメインは、エピトープと接触した残基を含有する複数の相補性決定領域（「CDR」）、及びフレームワークセグメント（「FR」）と呼ばれる非CDRセグメントからなり、上記フレームワークセグメントは、一般にCDRループの構造を維持してCDRの位置を決定することにより、このような接触を可能とする（ただし特定のフレームワーク残基も抗原に接触し得る）。従って、VL及びVHドメインは、構造n FR1 CDR1 FR2 CDR2 FR3 CDR3 FR4 cを有する。抗体の軽鎖の第1、第2及び第3のCDRである（又は第1、第2及び第3のCDRとして機能し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれCDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインと呼ばれる。同様に、抗体の重鎖の第1、第2及び第3のCDRである（又は第1、第2及び第3のCDRとして機能し得る）ポリペプチドは、本明細書ではそれぞれCDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインと呼ばれる。よって、CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン、CDRL3ドメイン、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン、及びCDRH3ドメインという用語は、あるタンパク質に組み込まれた場合に、当該タンパク質が、軽鎖及び重鎖若しくはダイアボディ若しくは単鎖結合分子（例えばscFv、BiTe等）を有する抗体であるか、又は別のタイプのタンパク質であるかにかかわらず、当該タンパク質を、特定のエピトープに結合できるようにする、ポリペプチドを対象としている。従って本明細書中で使用される場合、用語「エピトープ結合断片（epitope-binding fragment）」は、あるエピトープに免疫特異的に結合できる分子の断片を指す。エピトープ結合断片は、この抗体の1、2、3、4若しくは5個のCDRドメインを含有してよく、又は抗体の6個全てのCDRドメインを含有してよく、このようなエピトープに免疫特異的に結合できるものの、このような抗体のエピトープとは異なるエピトープに対する免疫特異性、親和性又は選択性を呈してもよい。しかしなが

30

40

50

ら好ましくは、エピトープ結合断片は、このような抗体のCDRドメインのうちの6個全てを含有することになる。ある抗体のエピトープ結合断片は、単一のポリペプチド鎖（例えばscFv）であってよく、又はそれぞれがアミノ末端及びカルボキシ末端を有する2つ以上のポリペプチド鎖（例えばダイアボディ、Fab断片、Fab<sub>2</sub>断片等）を含んでよい。明記されていない場合、本明細書に記載のタンパク質分子のドメインの順序は、「N末端からC末端への(N-terminal to C-Terminal)」方向である。

#### 【0058】

本発明は特に、本発明のヒト化抗B7 H3 VL及び/又はVHドメインを含む単鎖可変ドメイン断片(scFv)、並びにこれを含む多重特異性結合分子を包含する。単鎖可変ドメイン断片は、短い「リンカー(linker)」ペプチドを用いて一体に連結されたVL及びVHドメインを含む。このようなリンカーは、固体支持体への薬剤の取り付けを可能とする、又はアタッチメントの取り付けを可能とする等の更なる機能を提供するために修飾できる。単鎖変異型は、組み換え又は合成によって産生できる。scFvの合成産生のために、自動合成器を使用できる。scFvの組み換え産生のためには、scFvをエンコードするポリヌクレオチドを含有する好適なプラスミドを、酵母、植物、昆虫又は哺乳類細胞等の真核細胞又は大腸菌等の原核細胞といった、好適な宿主細胞に導入できる。関心対象のscFvをエンコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのライゲーションといった慣用の操作によって作製できる。得られたscFvは、当該技術分野において公知の標準的なタンパク質精製技法を用いて単離できる。

#### 【0059】

本発明はまた、本発明のB7 H3抗体のヒト化変異型のCDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2、CDRL3又はVLドメイン及び/若しくはVHドメイン、並びにこれを含む多重特異性結合分子を特に包含する。用語「ヒト化(humanized)」抗体は、キメラ分子であって、一般に組み換え技術を用いて調製され、非ヒト種からの免疫グロブリンのエピトープ結合部位と、残りの、ヒト免疫グロブリンの構造及び/又は配列に基づく分子の免疫グロブリン構造とを有する、キメラ分子を指す。本発明の抗B7 H3抗体は特に、抗体mAb A、mAb B、mAb C又はmAb Dのヒト化、キメラ又はイヌ化変異型を含む。本発明の抗ヒトPD 1抗体は、抗体PD 1 mAb 1、PD 1 mAb 2、PD 1 mAb 3、PD 1 mAb 4、PD 1 mAb 5、PD 1 mAb 6、PD 1 mAb 7、PD 1 mAb 8、PD 1 mAb 9、PD 1 mAb 10、PD 1 mAb 11、PD 1 mAb 12、PD 1 mAb 13、PD 1 mAb 14又はPD 1 mAb 15の、ヒト化、キメラ又はイヌ化変異体を含む。このような抗体の可変ドメインのポリヌクレオチド配列は、上記誘導体を生成するため及び上記抗体の親和性又は他の特徴を改善するための遺伝子操作のために使用できる。抗体をヒト化する際の一般原理は、抗体のエピトープ結合部分の塩基配列を保持しながら、抗体の非ヒト残部をヒト抗体配列と交換するステップを伴う。モノクローナル抗体をヒト化するためには、4つの一般的なステップが存在する。上記ステップは以下の通りである：(1)開始抗体の軽鎖及び重鎖可変ドメインのヌクレオチド及び予測されるアミノ酸配列を決定するステップ；(2)ヒト化抗体又はイヌ化抗体を設計するステップ、即ちヒト化又はイヌ化プロセス中に使用する抗体フレームワーク領域を決定するステップ；(3)実際のヒト化又はイヌ化法/技術；並びに(4)ヒト化抗体のトランスフェクション及び発現。例えば米国特許第4,816,567号；米国特許第5,807,715号；米国特許第5,866,692号；及び米国特許第6,331,415号を参照。

#### 【0060】

エピトープ結合部位は、定常ドメインに融合する完全可変ドメイン、又は適切なフレームワーク領域にグラフトされたこのような可変ドメインの相補性決定領域(CDR)のみを含んでよい。エピトープ結合ドメインは野生型であってよく、又は1つ若しくは複数のアミノ酸置換によって修飾してよい。これにより、ヒト個体の免疫原である定常領域が排除されるが、外来可変ドメインの可能性は残る(LoBuglio, A.F. et al. (1989) "Mouse/H

10

20

30

40

50

uman Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224)。別のアプローチは、ヒト由来定常領域を提供することだけでなく、上記可変ドメインをヒト形態に可能な限り近くなるように変形させるために上記可変ドメインを修飾することにも、焦点を当てている。重鎖及び軽鎖両方の可変ドメインは、問題となる抗原に応答して変化して結合能力を決定する、4つのフレームワーク領域(FR)が隣接する3つの相補性決定領域(CDR)を内包することが知られており、上記フレームワーク領域は、ある所与の種において相対的に保存され、またCDRのための足場を提供するものと推定される。ある特定の抗原に対して非ヒト抗体を調製する際、非ヒト抗体由来のCDRを、修飾されるヒト抗体内に存在するFRに移植することによって、可変ドメインを「再成形」又は「ヒト化」できる。様々な抗体に対するこのアプローチの適用は、Sato, K. et al. (1993) “Reshaping A Human Antibody To Inhibit The Interleukin 6-Dependent Tumor Cell Growth,” Cancer Res 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) “Reshaping Human Antibodies for Therapy,” Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) “Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,” Science 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) “Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework残基 On Loop Conformation,” Protein Engineering 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) “Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,” Human Antibodies Hybridoma 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) “Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) “Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,” Bio/Technology 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) “Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) “Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 89:4285-4289; 及びCo, M.S. et al. (1992) “Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen,” J. Immunol. 148:1149-1154によって報告されている。いくつかの実施形態では、ヒト化抗体は全てのCDR配列を保存する(例えば、マウス抗体からの6つのCDR全てを含有するヒト化マウス抗体)。他の実施形態では、ヒト化抗体は、オリジナルの抗体に対して配列が異なる改変された1つ又は複数のCDR(1つ、2つ、3つ、4つ、5つ又は6つ)を有する。

#### 【0061】

非ヒト免疫グロブリン由来のエピトープ結合部位を含む多数の「ヒト化(humanized)」抗体分子が説明されており、これらは、げっ歯類又は修飾げっ歯類可変ドメインと、ヒト定常ドメインに融合した、これらに関連する相補性決定領域(CDR)とを有するキメラ抗体を含む(例えばWinter et al. (1991) “Man-made Antibodies,” Nature 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) “Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response,” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224 (1989); Shaw et al. (1987) “Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen,” J. Immunol. 138:4534-4538;及びBrown et al. (1987) “Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody,” Cancer Res. 47:3577-3583を参照)。他の参照文献は、適切なヒト抗体定常ドメインと融合する前にヒト支持性フレームワーク領域(FR)にグラフと重合される、げっ歯類CDRについて説明している(例えば、Riechmann, L. et al. (1988) “Reshaping Human Antibodies for Therapy,” Nature 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) “Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,” Science 239:1534-1536;及びJones et al. (1986) “Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse,” Nature 321:522-52

10

20

30

40

50

5を参照)。別の参照文献は、組み換えによってペニアリングされたげっ歯類フレームワーク領域によって支持されたげっ歯類CDRについて説明している。例えば欧州公開特許第519,596号を参照。これらの「ヒト化」分子は、ヒトレシピエントのこれらの部分の治療的応用の期間及び効果を制限する、げっ歯類抗ヒト抗体分子に対する望ましくない免疫学的応答を最小化するように設計される。抗体をヒト化するために利用してよい他の方法は、Daugherty et al. (1991) "Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Mouse Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins," Nucl. Acids Res. 19:2471-2476並びに米国特許第6,180,377号;米国特許第6,054,297号;米国特許第5,997,867号;及び米国特許第5,866,692号によって開示されている。

10

## 【0062】

B. 抗体定常ドメインの特性決定

## 1. 軽鎖の定常ドメイン

上述のように、抗体の各軽鎖は、可変ドメイン(「VL」)と定常ドメイン(「CL」)とを含有する。

## 【0063】

好ましくは、CLドメインはヒトIgG CLドメイン。例示的なヒトCLドメインのアミノ酸配列は、(配列番号1):

```
RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG
NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK
SFNRGEC
```

20

である。

## 【0064】

あるいは、例示的なCLドメインはヒトIgG CLドメインである。例示的なヒトCLドメインのアミノ酸配列は、(配列番号2):

```
QPKAAPSVTL FPPSSEELQA NKATLVCLIS DFYPGAVTVA WKADSSPVKA
GVETTPSKQS NNKYAASSYL SLTPEQWKSH RSYSCQVTHE GSTVEKTVPAP
TECS
```

30

である。

## 【0065】

## 2. 重鎖の定常ドメイン

上述のように、抗体の重鎖は、CH1、ヒンジドメイン、CH2及びCH3定常ドメインを含み得る。抗体の2つの重鎖のCH1ドメインは、抗体の軽鎖の「CL」定常ドメインと複合体化し、介在ヒンジドメインを介して重鎖CHドメインに付着する。

## 【0066】

例示的なCH1ドメインは、ヒトIgG1 CH1ドメインである。例示的なヒトIgG1 CH1ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号3):

```
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRV
```

40

である。

## 【0067】

例示的なCH1ドメインは、ヒトIgG2 CH1ドメインである。例示的なヒトIgG2 CH1ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号4):

```
ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSKV
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSNFGTQT YTCNVNHNKPS NTKVDKTV
```

である。

## 【0068】

例示的なCH1ドメインは、ヒトIgG3 CH1ドメインである。例示的なヒトIgG3 CH1ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号5):

50

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YTCNVNHKPS NTKVDKRV

である。

【 0 0 6 9 】

例示的な C H 1 ドメインは、ヒト I g G 4 C H 1 ドメインである。例示的なヒト I g G 4 C H 1 ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 6) :

ASTKGPSVFP LAPCSRSTSE STAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV  
HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTKT YTCNVDHKPS NTKVDKRV

である。

【 0 0 7 0 】

例示的なヒンジドメインは、ヒト I g G 1 ヒンジドメインである。例示的なヒト I g G 1 ヒンジドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 7) : EPKSCDKTHTCPPCPである。

【 0 0 7 1 】

別の例示的なヒンジドメインは、ヒト I g G 2 ヒンジドメインである。例示的なヒト I g G 2 ヒンジドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 8) : ERKCCVECPPEPである。

【 0 0 7 2 】

別の例示的なヒンジドメインは、ヒト I g G 3 ヒンジドメインである。例示的なヒト I g G 3 ヒンジドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 9) :

ELKTPLGDTT HTCPRCPEPK SCDTPPPCPR CPEPKSCDTP PPCPRCPEPK  
SCDTPPPCPR CP

である。

【 0 0 7 3 】

別の例示的なヒンジドメインは、ヒト I g G 4 ヒンジドメインである。例示的なヒト I g G 4 ヒンジドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 10) : ESKYGPPCPSCPである。本明細書に記載されているように、I g G 4 ヒンジドメインは、S 2 2 8 P置換等の安定化性の突然変異を含んでよい。例示的な S 2 2 8 P安定化ヒト I g G 4 ヒンジドメインのアミノ酸配列は、(配列番号 11) : ESKYGPPCPPCPである。

【 0 0 7 4 】

抗体の2つの重鎖の C H 2 及び C H 3 ドメインは相互作用して「F c ドメイン (Fc Domain)」を形成し、この F c 領域は、F c 受容体 (F c R) を含むがこれに限定されない細胞 F c 受容体によって認識されるドメインである。本明細書において使用される場合、用語「F c ドメイン」は、I g G 重鎖の C 末端領域を定義するために使用される。F c ドメインは、そのアミノ酸配列が、他の I g G アイソタイプに比べてある特定の I g G アイソタイプと最も一致する場合に、当該 I g G アイソタイプ、クラス又はサブクラスの F c ドメインと呼ばれる。抗体は、診断学におけるその公知の使用法に加えて、治療剤として有用であることが示されている。

【 0 0 7 5 】

本明細書全体を通して、I g G 重鎖の定常領域の残基の番号付与は、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed. Public Health Service, NH1, MD (1991) (「K a b a t」、これは参照により明示的に本明細書に援用される) による E U インデックスの番号付与である。用語「K a b a t におけるような E U インデックス (EU index as in Kabat)」は、ヒト I g G 1 E U 抗体の番号付与を指す。免疫グロブリンの成熟重鎖及び軽鎖の可変ドメインからのアミノ酸は、鎖内のアミノ酸の位置によって指定される。K a b a t は、抗体に関する多数のアミノ酸配列を記載し、各サブグループに関するアミノ酸コンセンサス配列を識別し、また各アミノ酸に残基番号を割り当てており、C D R は K a b a t によって定義されているように識別される (Chothia, C. & Lesk, A. M. ((1987) "Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins," J. Mol. Biol. 196:901-917) によって定義される C D R<sub>H</sub> 1 は、5 残基前から始まることを理解されたい)。K a b a t の番号付与スキームは、保存されたアミノ酸を参照して、問題となる抗体を、K a b a t 中のコンセンサス配列のうちの

10

20

30

40

50

1つと整列させることによって、K a b a tの概要に含まれていない抗体にまで拡張可能である。残基番号を割り当てるための上記方法は、当該技術分野において標準的なものとなっており、キメラ又はヒト化変異体を含む異なる抗体中の同等の位置のアミノ酸を容易に識別する。例えば、ヒト抗体軽鎖の50位のアミノ酸は、マウス抗体軽鎖の50位のアミノ酸と同等の位置を占有する。

## 【0076】

例示的なヒトIgG1のCH2 CH3ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号12)：

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVKFNWYVD	
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTY	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	
340	350	360	370	380	
PIEKTISKAK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
390	400	410	420	430	
WESNGQPENN	YKTPPVVLD	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
440	447				
ALHNHYTQKS	LSLSPGX				

であり、これはK a b a tにおけるようなE Uインデックスによって番号付与されており、Xはリシン(K)であるか、又は不在である。

## 【0077】

例示的なヒトIgG2のCH2 CH3ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号13)：

231	240	250	260	270	280
APPVA-GPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFNWYVD	
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK	PREEQFNSTF	RVVSVLTVVH	QDWLNGKEYK	CKVSNKGLPA	
340	350	360	370	380	
PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDISVE	
390	400	410	420	430	
WESNGQPENN	YKTPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NVFSCSVMHE	
440	447				
ALHNHYTQKS	LSLSPGX				

であり、これはK a b a tにおけるようなE Uインデックスによって番号付与されており、Xはリシン(K)であるか、又は不在である。

## 【0078】

例示的なヒトIgG3のCH2 CH3ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号14)：

231	240	250	260	270	280
APELLGGPSV	FLFPPKPKDT	LMISRTPEVT	CVVVDVSHED	PEVQFKWYVD	
290	300	310	320	330	
GVEVHNAKTK	PREEQYNSTF	RVVSVLTVLH	QDWLNGKEYK	CKVSNKALPA	
340	350	360	370	380	
PIEKTISKTK	GQPREPQVYT	LPPSREEMTK	NQVSLTCLVK	GFYPSDIAVE	
390	400	410	420	430	
WESSGQPENN	YNTTPPMLDS	DGSFFLYSKL	TVDKSRWQQG	NIFSCSVMHE	
440	447				
ALHNRFTQKS	LSLSPGX				

であり、これはK a b a tにおけるようなE Uインデックスによって番号付与されており、Xはリシン(K)であるか、又は不在である。

## 【0079】

例示的なヒトIgG4のCH2 CH3ドメインのアミノ酸配列は、(配列番号15)：

231	240	250	260	270	280

APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD  
 290 300 310 320 330  
 GVEVHNAKTK PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS  
 340 350 360 370 380  
 SIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE  
 390 400 410 420 430  
 WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSRL TVDKSRWQEG NVFSCSVMHE  
 440 447  
 ALHNHYTQKS LSLSLGX

であり、これは K a b a t におけるような E U インデックスによって番号付与されており、X はリシン ( K ) であるか、又は不在である。

10

## 【 0 0 8 0 】

多型は、抗体定常領域内の多数の異なる位置 (例えば K a b a t におけるような E U インデックスによる番号付与で 270 位、272 位、312 位、315 位、356 位及び 358 位を含むがこれらに限定されない F c 位置) において観察されており、従ってここで提示される配列と従来技術の配列との間にはわずかな差異が存在し得る。ヒト免疫グロブリンの多型形態は、十分に特性決定されている。現在、18 個の G m アロタイプが公知である: G 1 m ( 1 , 2 , 3 , 17 ) 又は G 1 m ( a , x , f , z )、G 2 m ( 23 ) 又は G 2 m ( n )、G 3 m ( 5 , 6 , 10 , 11 , 13 , 14 , 15 , 16 , 21 , 24 , 26 , 27 , 28 ) 又は G 3 m ( b 1 , c 3 , b 3 , b 0 , b 3 , b 4 , s , t , g 1 , c 5 , u , v , g 5 ) (Lefranc, et al., The human IgG subclasses: molecular analysis of structure, function and regulation. Pergamon, Oxford, pp. 43-78 (1990); Lefranc, G. et al., 1979, Hum. Genet.: 50, 199-211)。特に、本発明の抗体が、いずれの免疫グロブリン遺伝子のいずれのアロタイプ、アイソアロタイプ又はハプロタイプを組み込むことができ、本明細書中で提示される配列のアロタイプ、アイソアロタイプ又はハプロタイプに限定されないと考えられる。更に、発現系によっては、C H 3 ドメインの C 末端アミノ酸残基 (上記太字) は、翻訳後に除去できる。従って C H 3 ドメインの C 末端残基は、本発明の ( B 7 H 3 A D C 分子を含む ) B 7 H 3 結合分子の任意のアミノ酸残基である。本発明によって具体的に包含されるのは、C H 3 ドメインの C 末端残基が欠けた ( B 7 H 3 A D C 分子を含む ) B 7 H 3 結合分子である。また本発明によって具体的に包含されるのは、C H 3 ドメインの C 末端リシン残基を含む構造である。

20

30

## 【 0 0 8 1 】

従来の免疫機能では、抗体 抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用は、抗体依存性細胞毒性、肥満細胞の脱顆粒化及び食作用といったエフェクタ機能から、リンパ球増殖及び抗体分泌の調節といった免疫調節シグナルまでの、幅広い応答をもたらす。これらの全ての相互作用は、造血細胞上の特別な細胞表面、特に複数のタイプの免疫系細胞 (例えば B リンパ球、濾胞性樹状細胞、ナチュラルキラー細胞、マクロファージ、好中球、好酸球、好塩基球及び肥満細胞) の表面上に見られる受容体 (単独では「 F c 受容体 ( Fc gamma receptor )」、 「 F c R」、まとめて「 F c R s」と呼ばれる) に結合することによって開始される。このような受容体は、「細胞外 (extracellular)」部分 (従ってこれは F c ドメインに結紮できる)、「膜貫通 (transmembrane)」部分 (これは細胞膜を貫通して延在する) 及び「細胞質 (cytoplasmic)」部分 (細胞の内部に位置する) を有する。

40

## 【 0 0 8 2 】

抗体及び免疫複合体によってトリガされる細胞応答の多様性は、3つの F c 受容体: F c R I ( C D 6 4 )、C D 3 2 A ( F c R I I A )、F c R I I B ( C D 3 2 B )、C D 1 6 A ( F c R I I I A ) 及び C D 1 6 B ( F c R I I I B ) の構造的異質性に由来する。F c R I ( C D 6 4 )、F c R I I A ( C D 3 2 A ) 及び F c R I I I ( C D 1 6 ) は活性化性受容体であり、従って、F c ドメインへの結紮によって免疫系を活性化するか又は免疫応答を増強する。対照的に、F c R I I B ( C D 3 2 B ) は阻害

50

性受容体であり、Fcドメインへの結紮によって免疫応答を阻害するか、又は既存の免疫応答を弱化する。更に、Fcドメインと新生児Fc受容体(FcRn)との相互作用は、エンドソームから細胞表面へのIgG分子の再循環及び血中への放出を仲介する。IgG1(配列番号12)、IgG2(配列番号13)、IgG3(配列番号14)、及びIgG4(配列番号15)の例示的な野生型Fcドメインのアミノ酸配列は、既に提示されている。

#### 【0083】

CD16は、活性化性Fc受容体FcRIIA(CD16A)及びFcRIIB(CD16B)の一般名である。CD16は、好中球、好酸球、ナチュラルキラー(NK)細胞、及び凝集しているもののモノマー性ではないヒトIgGに結合する組織マクロファージによって発現される(Peltz, G.A. et al. (1989) "Human Fc Gamma RIII: Cloning, Expression, And Identification Of The Chromosomal Locus Of Two Fc Receptors For IgG," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86(3):1013-1017; Bachanova, V. et al. (2014) "NK Cells In Therapy Of Cancer," Crit. Rev. Oncog. 19(1-2):133-141; Miller, J.S. (2013) "Therapeutic Applications: Natural Killer Cells In The Clinic," Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2013:247-253; Youinou, P. et al. (2002) "Pathogenic Effects Of Anti-Fc Gamma Receptor IIIB (CD16) On Polymorphonuclear Neutrophils In Non-Organ-Specific Autoimmune Diseases," Autoimmun Rev. 1(1-2):13-19; Peipp, M. et al. (2002) "Bispecific Antibodies Targeting Cancer Cells," Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-511)。これらの受容体は、IgG抗体のFc部分に結合することによって、サイトカインの放出をトリガする。このような抗体が外来細胞(例えば腫瘍細胞)の抗原に結合すると、上記放出により、この腫瘍細胞の殺滅が仲介される。このような殺滅は抗体依存性であるため、抗体依存性細胞仲介型細胞毒性(antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC))と呼ばれる。

#### 【0084】

CD32A(FcRIIA)(Brandsma, A.M. (2015) "Fc Receptor Inside-Out Signaling And Possible Impact On Antibody Therapy," Immunol Rev. 268(1):74-87; van Sorge, N.M. et al. (2003) "Fcgamma Polymorphisms: Implications For Function, Disease Susceptibility And Immunotherapy," Tissue Antigens 61(3):189-202; Selvaraj, P. et al. (2004) "Functional Regulation Of Human Neutrophil Fc Gamma Receptors," Immunol. Res. 29(1-3):219-230)及びCD64(FcRI)(Lu, S. et al. (2015) "Structural Mechanism Of High Affinity FcRI Recognition Of Immunoglobulin G," Immunol. Rev. 268(1):192-200; Swisher, J. F. et al. (2015) "The Many Faces Of FcRI: Implications For Therapeutic Antibody Function," Immunol. Rev. 268(1):160-174; Thepen, T. et al. (2009) "Fcgamma Receptor 1 (CD64), A Target Beyond Cancer," Curr. Pharm. Des. 15(23):2712-2718; Rouard, H. et al. (1997) "Fc Receptors As Targets For Immunotherapy," Int. Rev. Immunol. 16(1-2):147-185)は、マクロファージ、好中球、好酸球及び樹状細胞上(並びにCD32Aに関しては血小板及びランゲルハンス細胞上)に発現される活性化性Fc受容体である。対照的に、CD32B(FcRIIB)は、Bリンパ球(マクロファージ、好中球及び好酸球)上の阻害性Fc受容体である(Stopforth, R. J. et al. (2016) "Regulation of Monoclonal Antibody Immunotherapy by FcRIIB," J. Clin. Immunol. [2016 Feb 27 Epub], pp. 1-7; Bruhns, P. et al. (2009) "Specificity And Affinity Of Human Fcgamma Receptors And Their Polymorphic Variants For Human IgG Subclasses," Blood. 113(16):3716-3725; White, A.L. et al. (2014) "FcRIIB As A Key Determinant Of Agonistic Antibody Efficacy," Curr. Top. Microbiol. Immunol. 382:355-372; Selvaraj, P. et al. (2004) "Functional Regulation Of Human Neutrophil Fc Gamma Receptors," Immunol. Res. 29(1-3):219-230)。

10

20

30

40

50

## 【 0 0 8 5 】

異なる複数の Fc R の、正反対の機能を仲介する能力は、これらの構造的差異、特に、Fc R が、免疫受容体チロシン系活性化モチーフ（「ITAM」）又は免疫受容体チロシン系阻害モチーフ（「ITIM」）のいずれを有しているかを反映する。これらの構造に対する異なる細胞質酵素の補充は、Fc R 仲介細胞応答の結果を決定づける。ITAM 含有 Fc R は、Fc RI、Fc RIIA、Fc RIIIA を含み、Fc ドメイン（例えば免疫複合体中に存在する凝集した Fc ドメイン）に結合した場合に免疫系を活性化させる。Fc R IIB は、現在知られている唯一の、天然 ITIM 含有 Fc R であり、これは凝集した Fc ドメインに結合した場合に、免疫系を減衰させる又は阻害する役割を果たす。ヒト好中球は、Fc RIIA 遺伝子を発現する。免疫複合体又は特異性抗体架橋による Fc RIIA のクラスターリングは、ITAM を、ITAM リン酸化を促進する受容体関連キナーゼと凝集させる役割を果たす。ITAM リン酸化は、Syk キナーゼのドッキング部位として役立ち、その活性化は、下流基質（例えば PI3K）の活性化をもたらす。細胞活性化は、炎症促進性メディエータの放出につながる。Fc R IIB 遺伝子は、B リンパ球上で発現し、その細胞外ドメインは Fc RIIA と 96% 同一であり、また IgG 複合体に、区別できない様式で結合する。Fc R IIB の細胞質ドメイン中の ITIM の存在は、Fc R の上述の阻害型サブクラスを定義する。最近、この阻害の分子的基础が確率された。活性化 Fc R と共同結紮すると、Fc R IIB 中の ITIM はリン酸化され、ポリリン酸イノシトール 5' ホスファターゼ（SHIP）の SH2 ドメインを誘引し、これは、ITAM 含有 Fc R 仲介チロシンキナーゼ活性化の結果として放出されたホスホイノシトールを加水分解し、その結果、細胞内 Ca<sup>++</sup> の流入を防止する。従って、Fc R IIB の架橋は、Fc R 結紮に対する活性化応答を弱め、細胞応答性を阻害し、これによって B 細胞活性化、B 細胞増殖及び抗体分泌を中断させる。

10

20

## 【 0 0 8 6 】

II. 二重特異性抗体、多重特異性ダイアボディ及び DART（登録商標）ダイアボディ抗体が抗原のエピトープに結合する能力は、抗体の VL 及び VH ドメインの存在並びにアミノ酸配列に依存する。抗体軽鎖と重鎖との相互作用、特にその VL ドメインと VH ドメインとの相互作用は、IgG 等の天然抗体の 2 つのエピトープ結合部位のうちの 1 つを形成する。天然抗体は、1 つのエピトープ種にのみ結合できる（即ちこれらは単一特異性である）が、これらは上記種の複数の複製に結合できる（即ち 2 価性又は多価性を示す）。

30

## 【 0 0 8 7 】

抗体の機能は、2 つの分離した別個の抗原（若しくは同一の抗原の異なるエピトープ）に同時に結合できる多重特異性抗体ベースの分子を生成することによって、並びに / 又は同一のエピトープ及び / 若しくは抗原に対して高い価数（即ち 3 つ以上の結合部位）を有する抗体ベースの分子を生成することによって、増強できる。

## 【 0 0 8 8 】

天然抗体より高い能力を有する分子を提供するために、幅広い組み換え二重特異性抗体フォーマットが開発されており（例えば国際公開第 2008/003116 号；国際公開第 2009/132876 号；国際公開第 2008/003103 号；国際公開第 2007/146968 号；国際公開第 2009/018386 号；国際公開第 2012/009544 号；国際公開第 2013/070565 号を参照）、その殆どは、更なるエピトープ結合断片（例えば scFv、VL、VH 等）を抗体コア（IgA、IgD、IgE、IgG 若しくは IgM）へ若しくは上記抗体コア内に融合させるため、又は複数のエピトープ結合断片（例えば 2 つの Fab 断片若しくは scFv）を融合させるために、リンカーペプチドを使用する。代替的なフォーマットは、エピトープ結合断片（例えば scFv、VL、VH 等）を、CH2 CH3 ドメイン又は代替となるポリペプチド等の二量体化ドメインに融合させるために、リンカーペプチドを使用する（国際公開第 2005/070966 号；国際公開第 2006/107786A 号；国際公開第 2006/107617A 号；国際公開第 2007/046893 号）。国際公開第 2013/174873 号；

40

50

国際公開第 2011/133886 号；及び国際公開第 2010/136172 号は、2 つ以上の抗原に結合できるように、C L 及び C H 1 ドメインがそれぞれの自然位置から切り替わり、かつ V L 及び V H ドメインが多様化されている、三重特異性抗体を開示している（国際公開第 2008/027236 号；国際公開第 2010/108127 号）。国際公開第 2013/163427 号、及び国際公開第 2013/119903 号は、C H 2 ドメインを修飾して、結合ドメインを含む融合タンパク付加物を含有させるステップを開示している。国際公開第 2010/028797 号；国際公開第 2010028796 号；及び国際公開第 2010/028795 号は、F c ドメインが追加の V L 及び V H ドメインで置換されて、3 価結合分子を形成している、組み換え抗体を開示している。国際公開第 2003/025018 号；及び国際公開第 2003012069 号は、個々の鎖が s c F v ドメインを含有する組み換えダイアボディを開示している。国際公開第 2013/006544 号は、単一のポリペプチド鎖として合成された後、タンパク質分解に供されることによってヘテロ二量体構造が得られる、多価 f a b 分子を開示している。国際公開第 2014/022540 号；国際公開第 2013/003652 号；国際公開第 2012/162583 号；国際公開第 2012/156430 号；国際公開第 2011/086091 号；国際公開第 2008/024188 号；国際公開第 2007/024715 号；国際公開第 2007/075270 号；国際公開第 1998/002463 号；国際公開第 1992/022583 号；及び国際公開第 1991/003493 号は、追加の結合ドメイン又は官能基を抗体又は抗体部分に付加するステップ（例えば抗体の軽鎖にダイアボディを付加するステップ、又は抗体の軽鎖及び重鎖に追加の V L 及び V H ドメインを付加するステップ、又は異種融合タンパク質を互いに対して付加するステップ若しくは複数の F a b ドメインを互いに対して連鎖させるステップ）を開示している。

10

20

#### 【0089】

本技術分野は更に、2 つ以上の異なるエピトープ種と結合できる（即ち 2 価性又は多価性に加えて二重特異性又は多重特異性を呈することができる）という点でこのような天然抗体とは異なるダイアボディを産生できる可能性に注目している（例えば Holliger et al. (1993) “ ‘ Diabodies ’ : Small Bivalent And Bispecific Antibody Fragments, ” Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 90:6444-6448; 米国特許第 2004/0058400 号 (Hollinger et al.); 米国特許第 2004/0220388 号；国際公開第 02/02781 号 (Mertens et al.) ; Alt et al. (1999) FEBS Lett. 454(1-2):90-94; Lu, D. et al. (2005) “ A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity, ” J. Biol. Chem. 280(20):19665-19672 ; 国際公開第 02/02781 号 (Mertens et al.) ; Olafsen, T. et al. (2004) “ Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications, ” Protein Eng. Des. Sel. 17(1):21-27; Wu, A. et al. (2001) “ Multimerization Of A Chimeric Anti-CD20 Single Chain Fv-Fv Fusion Protein Is Mediated Through Variable Domain Exchange, ” Protein Engineering 14(2):1025-1033; Asano et al.(2004) “ A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain, ” Abstract 3P-683, J. Biochem. 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) “ Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System, ” Protein Eng. 13(8):583-588; Baeuerle, P.A. et al. (2009) “ Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy, ” Cancer Res. 69(12):4941-4944 を参照)。

30

40

#### 【0090】

ダイアボディの設計は、単鎖可変ドメイン断片 (s c F v) として公知の抗体誘導体に基づく。このような分子は、軽鎖及び/又は重鎖可変ドメインを、短い連鎖ペプチドを用いて連結することによって作製される。Bird et al. (1988) (“ Single-Chain Antigen-Binding Proteins, ” Science 242:423-426) は、一方の可変ドメインのカルボキシ末端と他

50

方の可変ドメインのアミノ末端との間の約 3 . 5 nm を埋める連結ペプチドの例を記載している。他の配列のリンカーも設計及び使用されている (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins," *Science* 242:423-426)。リンカーは、薬剤の付着又は剛性支持体の付着といった追加の機能のために修飾できる。単鎖変異体は、組み換えによって又は合成によって産生できる。s c F v の合成産生に関しては、自動化されたシンセサイザを使用できる。s c F v の組み換え産生に関しては、s c F v をエンコードするポリヌクレオチドを含有する好適なプラスミドを、酵母、植物、昆虫若しくは哺乳類細胞等の真核細胞又は大腸菌等の原核細胞である好適な宿主細胞に導入できる。関心対象の s c F v をエンコードするポリヌクレオチドは、ポリヌクレオチドのライゲーション等の従来の操作によって作製できる。得られた s c F v は、当該技術分野で公知の標準的なタンパク質精製技術を用いて単離できる。

10

## 【 0 0 9 1 】

二重特異性結合分子 (例えば非単一特異性ダイアボディ) の提供は、異なるエピトープを発現する異なる複数の細胞を共連結及び / 若しくは共存させるために十分な「トランス ( t r a n s ) 」結合能力、並びに / 又は同一の細胞が発現する異なる複数の分子を共連結及び / 又は共存させるために十分な「シス ( c i s ) 」結合能力を含むがこれに限定されない、抗体を上回る有意な利点を提供する。従って二重特異性結合分子 (例えば非単一特異性ダイアボディ) は、療法及び免疫診断を含む広範な用途を有する。二重特異性は、様々な用途におけるダイアボディの設計及び加工の大幅な柔軟性を可能とし、これにより、多量体抗原の結合活性の上昇、異なる複数の抗原の架橋、及び両標的抗原の存在に基づく特定の細胞タイプに対する指向性標的化を提供する。当該技術分野において公知のダイアボディ分子は、( ~ 5 0 k D a 以下の小さいサイズのダイアボディに関して) その高い結合価、低い解離率及び循環からの迅速な排除により、腫瘍撮像の分野での特定の使用も示している (Fitzgerald et al. (1997) "Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*," *Protein Eng.* 10:1221-1225)。

20

## 【 0 0 9 2 】

二重特異性ダイアボディを産生する能力により、異なる細胞上に存在する受容体の共連結 (例えば細胞毒性 T 細胞と腫瘍細胞との架橋) によって、2 つの細胞を共連結するために、上記ダイアボディを (「トランス」として) 使用できるようになる (Staerz et al. (1985) "Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells," *Nature* 314:628-631, and Holliger et al. (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," *Protein Eng.* 9:299-305; Marvin et al. (2005) "Recombinant Approaches To IgG-Like Bispecific Antibodies," *Acta Pharmacol. Sin.* 26:649-658)。あるいは又は更に、二重特異性ダイアボディを (「シス」として) 用いて、同一の細胞の表面上に存在する受容体等の分子を共連結できる。異なる細胞及び / 又は受容体の共連結は、エフェクタ機能及び / 又は免疫細胞シグナリングを変調するために有用である。エピトープ結合部位を含む多重特異性分子 (例えば二重特異性ダイアボディ) は、T リンパ球、ナチュラルキラー (NK) 細胞、抗原提示細胞又は他の単核細胞上で発現される、CD 2、CD 3、CD 8、CD 16、T 細胞受容体 (T C R)、N K G 2 D 等のいずれの免疫細胞の表面決定因子を対象としてよい。特に、免疫エフェクタ細胞上に存在する細胞表面受容体を対象とするエピトープ結合部位は、標的転換細胞殺滅を仲介できる多重特異性結合分子の生成において有用である。

30

40

## 【 0 0 9 3 】

しかしながら、上述の利点は顕著なコストにつながる。このような非単一特異性ダイアボディの形成は、2 つ以上の別個の異なるポリペプチドの良好な集合を必要とする (即ち上記形成は、ダイアボディが、異なるポリペプチド鎖種のヘテロ二量体形成によって形成されることを必要とする)。この事実は、同一のポリペプチド鎖のホモ二量体形成によって形成される単一特異性ダイアボディとは対照的である。非単一特異性ダイアボディを形成するために少なくとも 2 つの異なるポリペプチド (即ち 2 つのポリペプチド種) を提供し

50

なければならないため、及びこのようなポリペプチドのホモ二量体形成は不活性分子をもたらす (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588) ため、このようなポリペプチドの産生は、同一種のポリペプチド間での共有結合を防止する (即ちホモ二量体化を防止する) ような方法で達成しなければならない (Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588)。従って本技術分野は、このようなポリペプチドの非共有結合的連結を教示している (例えばOlafsen et al. (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano et al. (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76(8):992; Takemura, S. et al. (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13(8):583-588; Lu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672を参照)。

#### 【 0 0 9 4 】

しかしながら、本技術分野は、非共有結合的に連結したポリペプチドで構成される二重特異性ダイアボディが不安定であり、非機能性モノマーへと容易に分解することを認識している (例えばLu, D. et al. (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem.* 280(20):19665-19672を参照)。

#### 【 0 0 9 5 】

この課題をものともせず、本技術分野は、DART (登録商標) ダイアボディと呼ばれる、安定した共有結合ヘテロ二量体性非単一特異性ダイアボディの開発に成功した (例えば米国公開特許第 2 0 1 3 0 2 9 5 1 2 1 号; 米国公開特許第 2 0 1 0 0 1 7 4 0 5 3 号; 及び米国公開特許第 2 0 0 9 0 0 6 0 9 1 0 号; 欧州公開特許第 2 7 1 4 0 7 9 号; 欧州公開特許第 2 6 0 1 2 1 6 号; 欧州公開特許第 2 3 7 6 1 0 9 号; 欧州公開特許第 2 1 5 8 2 2 1 号; 並びに国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 2 0 6 8 号; 国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 8 6 8 7 号; 国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 0 5 3 8 号、並びにSloan, D.D. et al. (2015) "Targeting HIV Reservoir in Infected CD4 T Cells by Dual-Affinity Retargeting Molecules (DARTs) that Bind HIV Envelope and Recruit Cytotoxic T Cells," *PLoS Pathog.* 11(11):e1005233. doi: 10.1371/journal.ppat.1005233; Al Husaini, M. et al. (2015) "Targeting CD123 In AML Using A T-Cell Directed Dual-Affinity Re-Targeting (DART(R)) Platform," *Blood pii: blood-2014-05-575704*; Chichili, G.R. et al. (2015) "A CD3xCD123 Bispecific DART For Redirecting Host T Cells To Myelogenous Leukemia: Preclinical Activity And Safety In Nonhuman Primates," *Sci. Transl. Med.* 7(289):289ra82; Moore, P.A. et al. (2011) "Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma," *Blood* 117(17):4542-4551; Veri, M. C. et al. (2010) "Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb (CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold," *Arthritis Rheum.* 62(7):1933-1943; Johnson, S. et al. (2010) "Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion," *J. Mol. Biol.* 399(3):436-449を参照)。このようなダイアボディは、2つ以上の共有結合的に複合体化したポリペプチドを含み、1つ又は複数のシステイン残基を、ジスルフィド結

10

20

30

40

50

合を形成でき、これによってこのようなポリペプチド鎖の1つ又は複数のペアを互いに共有結合させる、採用したポリペプチド種それぞれの中へと加工するステップを伴う。例えば、このような構造のC末端へのシステイン残基の追加は、関与するポリペプチド鎖間のジスルフィド結合を可能とすることが分かっており、これは、ダイアボディの結合特性に干渉することなく、得られるダイアボディを安定化させる。

【0096】

このような分子の多数の変異型が記載されており（例えば、米国公開特許第2015/0175697号；米国公開特許第2014/0255407号；米国公開特許第2014/0099318号；米国公開特許第2013/0295121号；米国公開特許第2010/0174053号；米国公開特許第2009/0060910号；米国公開特許第2007 0004909号；欧州公開特許第2714079号；欧州公開特許第2601216号；欧州公開特許第2376109号；欧州公開特許第2158221号；欧州公開特許第1868650号；及び国際公開第2012/162068号；国際公開第2012/018687号；国際公開第2010/080538号；国際公開第2006/113665号を参照）、また本明細書中で提供される。

10

【0097】

4価分子が望ましいもののFcは必要ない場合の用途のために、代替的な構成が当該技術分野において公知であり、これは、VH1、VL2、VH2、及びVL2ドメインをそれぞれ有する2つの同一のポリペプチド鎖のホモ二量体化によって形成される「TandAb」とも呼ばれる4価タンデム抗体を含むが、これに限定されない（例えば米国公開特許第2005-0079170号；米国公開特許第2007-0031436号；米国公開特許第2010-0099853号；米国公開特許第2011-020667号；米国公開特許第2013-0189263号；欧州公開特許第1078004号；欧州公開特許第2371866号；欧州公開特許第2361936号；及び欧州公開特許第1293514号；国際公開第1999/057150号；国際公開第2003/025018号；及び国際公開第2013/013700号を参照）。

20

【0098】

最近では、2つのダイアボディ型結合ドメインと、1つの非ダイアボディ型ドメインと、Fcドメインとが組み込まれた3価構造体が記述されている（例えば国際公開第2015/184207号及び国際公開第2015/184203号を参照）。このような3価結合分子を利用して、単一特異性、二重特異性又は三重特異性分子を生成できる。3つの異なるエピトープに結合できることにより能力が増強される。

30

【0099】

III. ヒトB7 H3

ヒトB7 H3は「4Ig」形態として、及び「2Ig」形態として存在する。ヒトB7 H3の代表的な「4Ig」形態のアミノ酸配列（下線を付して示されている29アミノ酸残基シグナル配列を含む）は、NCBI配列NP\_001019907（配列番号16、上記29アミノ酸残基シグナル配列は下線を付して示されている）：

MLRRRGSPGM GVHVGAAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC  
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL  
AQGNASLRLQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE  
PNKDLRPGDT VTITCSSYQG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG  
LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ RSPTGAVEVQ  
VPEDPVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT KQLVHSFTEG  
RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC FVSIRDFGSA  
AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDVT ITCSSYRGYP EAEVFWQDQG  
GVPLTGNVTT SQMANEQGLF DVHSLRVVL GANGTYSCLV RNPVLQQDAH  
GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR KIKQSCEEN  
AGAEDQDGE EGSKTALQPL KHSDSKEDDG QEIA

40

によって提供される。

50

## 【0100】

ヒトB7 H3の「2 Ig」形態のアミノ酸配列は、ヒトB7 H3の「4 Ig」形態内に完全に包含される。ヒトB7 H3の代表的な「2 Ig」形態のアミノ酸配列（下線を付して示されている29アミノ酸残基シグナル配列を含む）は、NCBI配列NP\_079516（配列番号17）：

MLRRRGSPGM GVHVGAAALGA LWFCLTGALE VQVPEDPVVA LVGTDATLCC  
SFSPEPGFSL AQLNLIWQLT DTKQLVHSFA EGQDQGSAYA NRTALFPDLL  
AQGNASRLRQ RVRVADEGSF TCFVSIRDFG SAAVSLQVAA PYSKPSMTLE  
PNKDLRPGDT VTITCSSYRG YPEAEVFWQD GQGVPLTGNV TTSQMANEQG  
LFDVHSLRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHGSVTITGQ PMTFPPEALW  
VTVGLSVCLI ALLVALAFVC WRKIKQSCEE ENAGAEDQDG EGEKSKTALQ  
PLKHSDSKED DGQEIA

10

によって提供される。

## 【0101】

特定の実施形態では、本発明のB7 H3結合分子（例えばscFvs、抗体、二重特異性ダイアポディ等）は、以下の基準のうちのいずれの1つ、2つ、3つ、4つ、5つ、6つ、7つ、8つ又は9つを特徴とする：

- (1) ヒトB7 H3が癌細胞の表面上に内因的に発現した際に、これに免疫特異的に結合する能力；
- (2) 非ヒト霊長類B7 H3（例えばカニクイザルのB7 H3）に特異的に結合すること；
- (3) 平衡結合定数（ $K_D$ ）1 nM以下でヒトB7 H3に特異的に結合すること；
- (4) 平衡結合定数（ $K_D$ ）1 nM以下で非ヒト霊長類B7 H3に特異的に結合すること；
- (5) オンレート（ $k_a$ ） $1 \times 10^6 M^{-1} min^{-1}$ 以上でヒトB7 H3に特異的に結合すること；
- (6) オンレート（ $k_a$ ） $1 \times 10^6 M^{-1} min^{-1}$ 以上で非ヒト霊長類B7 H3に特異的に結合すること；
- (7) オフレート（ $k_d$ ） $15 \times 10^{-4} min^{-1}$ 以下でヒトB7 H3に特異的に結合すること；
- (8) オフレート（ $k_d$ ） $15 \times 10^{-4} min^{-1}$ 以下で非ヒト霊長類B7 H3に特異的に結合すること；
- (9) 標的転換細胞殺滅（例えばB7 H3を発現する癌細胞の殺滅）を仲介する能力。

20

30

## 【0102】

本明細書中の他の箇所に記載されているように、B7 H3結合分子の結合定数は、例えばBIACORE（登録商標）分析によって、表面プラズモン共鳴を用いて決定してよい。表面プラズモン共鳴データを、1:1ラングミュア結合モデル（同時 $k_a$   $k_d$ ）及び速度定数の比 $k_d / k_a$ から算出した平衡結合定数 $K_D$ に対してフィッティングしてよい。このような結合定数は、1価B7 H3結合分子（即ち単一のB7 H3エピトープ結合部位を含む分子）、2価B7 H3結合分子（即ち2つのB7 H3エピトープ結合部位を含む分子）、又は価数が更に高いB7 H3結合分子（即ち3つ、4つ若しくは5つ以上のB7 H3エピトープ結合部位を含む分子）に関して決定してよい。

40

## 【0103】

本明細書中で使用される場合、用語「標的転換細胞殺滅（redirected cell killing）」は、免疫エフェクタ細胞（例えばT細胞、NK細胞等）及び標的細胞（例えば癌細胞）の表面上に存在するエピトープを結合させることによって、上記エフェクタ細胞を上記標的細胞の位置に局在化して、標的細胞の殺滅をもたらすことにより、標的細胞の殺滅を仲介する、分子の能力を指す。B7 H3結合分子（例えば二重特異性B7 H3 x CD3結合分子）の、標的転換細胞殺滅活性を仲介する能力は、細胞毒性Tリンパ球（cytotoxic T lymphocyte: CTL）アッセイを用いて決定してよい。このようなアッセイは当該技術分

50

野では公知であり、以下に説明される。

【0104】

本発明は特に、ヒトB7 H3ポリペプチドのエピトープに免疫特異的に結合する抗B7 H3可変ドメイン（即ちVL及び/又はVHドメイン）を含む、B7 H3結合分子（例えば抗体、ダイアボディ、3価結合分子等）を包含する。特段の記載がない限り、このようなB7 H3結合分子は全て、ヒトB7 H3に免疫特異的に結合できる。本明細書中で使用される場合、上記B7 H3可変ドメインは、「抗B7 H3 VL」及び「抗B7 H3 VH」のそれぞれを指す。

【0105】

IV. マウス抗ヒトB7 H3抗体及びそのヒト化誘導体

10

「mAb A」、「mAb B」、「mAb C」及び「mAb D」と称される4つの抗B7 H3抗体を、ヒトB7 H3を発現する細胞、そのB7 H3ポリペプチド又はペプチドエピトープを用いた免疫化によって生成されたハイブリドーマ細胞から単離した。抗体「mAb B」、「mAb C」及び「mAb D」はヒト化された。

【0106】

抗体「mAb C」及び「mAb D」は、カニクイザルのB7 H3に対して交差反応性であることが分かった。mAb C及びmAb DのVL及びVHドメインのアミノ酸配列を以下に提供する。一実施形態では、本発明の好ましい抗ヒトB7 H3結合分子は、VHドメインのCDRHのうちの1つ、2つ若しくは3つ全て、及び/又はVLドメインのCDRLのうちの1つ、2つ若しくは3つ全てを有し、上記VH及び/又はVLドメインは、マウス抗B7 H3モノクローナル抗体mAb Dの、キメラモノクローナル抗体mAb D（「chmAb D」）の、又はヒト化モノクローナル抗体抗体mAb C若しくはmAb D（「hmAb C」若しくは「hmAb D」）のVH及び/又はVLドメインである。このような好ましい抗ヒトB7 H3結合分子は、二重特異性（若しくは多重特異性）抗体、キメラ又はヒト化抗体、BiTE、ダイアボディ等を含み、またこのような結合分子は変異型Fcドメインを有する。本発明は、B7 H3結合分子、特にB7 H3 ADCを形成するための、mAb A、mAb B、mAb C又はmAb Dのうちのいずれの使用を包含する。

20

【0107】

A. マウス抗ヒトB7 H3抗体mAb A

30

「mAb A」と称されるマウス抗ヒトB7 H3抗体のVLドメインのアミノ酸配列（配列番号95）を以下に示す（CDRL残基は下線を付して示されている）：

DIAMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVDTNVAWYQQKP GQSPKALIYS  
ASYRYS~~GV~~PD RFTGSGSGTD FTLTINNVQS EDLAEYFCQQYNNYPFTFGS  
GTKLEIK

【0108】

mAb AのVHドメインのアミノ酸配列（配列番号96）を以下に示す（CDRH残基は下線を付して示されている）：

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS ~~SFG~~MHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSDSSAIYYADTVKGRFTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED TAMYYCGRGR  
ENIYYGSRLDYWGQGTTTLTV SS

40

【0109】

B. マウス抗ヒトB7 H3抗体mAb B

「mAb B」と称されるマウス抗ヒトB7 H3抗体のVLドメインのアミノ酸配列（配列番号97）を以下に示す（CDRL残基は下線を付して示されている）：

DIQMTQTTSS LSASLGDRVT ISCRASQDISNYLNWYQQKP DGTVKLLIYY  
TSRLHSGVPS RFGSGSGTD YSLTIDNLEQ EDIATYFCQQGNTLPPTFGG  
GTKLEIK

【0110】

mAb BのVHドメインのアミノ酸配列（配列番号98）を以下に示す（CDRH残基

50

は下線を付して示されている) :

QVQLQQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT SYWMQWVKQR PGQGLEWIGT  
IYPGDGDTRYTQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLASED SAVYYCARRG  
IPRLWYFDVW GAGTTVTVSS

【0111】

C . ヒト化抗ヒトB7 H3抗体hmAb B

hmAb BのVLドメインのアミノ酸配列(配列番号99)を以下に示す(CDR<sub>L</sub>残基は下線を付して示されている) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQDISNYLNWYQQKP GKAPKLLIYY  
TSRLHSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDIATYYCQQGNTLPPTFGG  
GTKLEIK

10

【0112】

いくつかの実施形態では、hmAb BのCDR<sub>L</sub>1のアミノ酸配列(RASQDISNYLN)(配列番号100)を、アミノ酸配列RASQSISSYLN(配列番号101)を有する代替的なCDR<sub>L</sub>1で置換してよい。同様に、hmAb BのCDR<sub>L</sub>2のアミノ酸配列(YTSRLHS)(配列番号102)を、アミノ酸配列YTSRLQS(配列番号103)を有する代替的なCDR<sub>L</sub>2で置換してよい。

【0113】

hmAb BのVHドメインのアミノ酸配列(配列番号104)を以下に示す(CDR<sub>H</sub>残基は下線を付して示されている) :

20

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT SYWMQWVRQA PGQGLEWMGT  
IYPGDGDTRYTQKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARRG  
IPRLWYFDVW GQGTTVTVSS

【0114】

いくつかの実施形態では、hmAb BのCDR<sub>H</sub>2のアミノ酸配列(TIYPGDGDTRYTQKFKG)(配列番号105)を、アミノ酸配列TIYPGGDTRYTQKFQG(配列番号106)を有する代替的なCDR<sub>H</sub>2で置換してよい。

【0115】

D . マウス抗ヒトB7 H3抗体mAb C

「mAb C」と称されるマウス抗B7 H3抗体のVLドメインのアミノ酸配列(配列番号18)を以下に示す(CDR<sub>L</sub>残基は下線を付して示されている) :

30

dDIQMTQSPAS LSVSVGETVT ITCRASESIYSYLAWYQQKQ GKSPQLLVYN  
TKTLPEGVPS RFSGSGSGTQ FSLKINSLQP EDFGRYYCQHYYGTPPWTFG  
GGTNLEIK

【0116】

mAb CのVHドメインのアミノ酸配列(配列番号19)を以下に示す(CDR<sub>H</sub>残基は下線を付して示されている) :

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT PDKRLEWVAI  
INSGGSNTYYPDSLKGRFTI SRDNAKNTLY LQMRSLSKSED TAMYYCARHD  
GGAMDYWGQG TSVTVSS

40

【0117】

E . ヒト化抗ヒトB7 H3抗体hmAb C

抗B7 H3抗体mAb Cの可変ドメインをヒト化した。いくつかの例では、結合活性を最適化するため、及び/又は抗原性エピトープを除去するため、及び/又は潜在的に不安定なアミノ酸残基を除去するために、代替的なヒト化可変ドメインを生成してよい。

【0118】

hmAb CのVLドメインのアミノ酸配列(配列番号20)を以下に示す(CDR<sub>L</sub>残基は下線を付して示されている) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASESIYSYLAWYQQKP GKAPKLLVYN  
TKTLPEGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQHYYGTPPWTFG

50

QGTRLEIK

【 0 1 1 9 】

h m A b C の V H ドメインのアミノ酸配列（配列番号 2 1 ）を以下に示す（ C D R H 残基は下線を付して示されている）：

EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMSWVRQA PGKGLEWVAT  
INSGGSNTYYPDSLKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHD  
 GGAMDYWGQG TTVTVSS

【 0 1 2 0 】

F . マウス抗ヒト B 7 H 3 抗体 m A b D

「 m A b D 」と称されるマウス抗 B 7 H 3 抗体の V L ドメインのアミノ酸配列（配列番号 2 2 ）を以下に示す（ C D R L 残基は下線を付して示されている）：

DIVMTQSQKF MSTSVGDRVS VTCKASQNVD TNVAWYQQKQ GHSPEALIYS  
ASYRYSGVPA RFTGSGSGTD FTLTISNVQS EDLAEYFCQQ YNNYPFTFGG  
 GTKLEIK

【 0 1 2 1 】

m A b D の C D R L 1 ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号 2 3 ）：KASQNVDTNVA である。

【 0 1 2 2 】

m A b D の C D R L 2 ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号 2 4 ）：SASYRS である。

【 0 1 2 3 】

m A b D の C D R L 3 ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号 2 5 ）：QQYNNYPFT である。

【 0 1 2 4 】

m A b D の V H ドメインのアミノ酸配列（配列番号 2 6 ）を以下に示す（ C D R H 残基は下線を付して示されている）：

DVQLAESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PEKGLEWVAY  
ISSGSGTIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNLSLF LQMTSLRSED TAMYYCARHG  
 YRYEGFDYWG QGTTTLTVSS

【 0 1 2 5 】

m A b D の C D R H 1 ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号 2 7 ）：SFGMH である。

【 0 1 2 6 】

m A b D の C D R H 2 ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号 2 8 ）：YISSGSGTIYYA DTVKG である。

【 0 1 2 7 】

m A b D の C D R H 3 ドメインのアミノ酸配列は、（配列番号 2 9 ）：HGYRYEGFDY である。

【 0 1 2 8 】

G . ヒト化抗ヒト B 7 H 3 抗体 m A b D

抗 B 7 H 3 抗体 m A b D の可変ドメインをヒト化した。いくつかの例では、結合活性を最適化するため、及び/又は抗原性エピトープを除去するため、及び/又は潜在的に不安定なアミノ酸残基を除去するために、代替的なヒト化可変ドメインを生成してよい。

【 0 1 2 9 】

h m A b D の V L ドメインのアミノ酸配列（配列番号 3 0 ）を以下に示す（ C D R L 残基は下線を付して示されている）：

DIQMTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP GKAPKALIYS  
ASYRYSGVPS RFTGSGSGTD FTLTISSLQP EDFAEYFCQQ YNNYPFTFGG  
 GTKLEIK

【 0 1 3 0 】

h m A b D の V H ドメインのアミノ酸配列（配列番号 3 1 ）を以下に示す（ C D R H 残

10

20

30

40

50

基は下線を付して示されている) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA PGKGLEWVAY  
ISSGSGTIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARHG  
YRYEGFDYWG QGTTVTVSS

【0131】

V. キメラ抗原受容体

本発明の B7 H3 結合分子は、単鎖可変断片(「抗 B7 H3 scFv」)又はキメラ抗原受容体(「抗 B7 H3 CAR」)等の単一特異性単鎖分子であってよい。上述のように、scFvは、短い連結ペプチドを介して軽鎖可変ドメインと重鎖可変ドメインとを一体に連結することによって作製される。第1世代CARは典型的には、内因性TCRからのシグナルの一時トランスミッタであるCD3 鎖からの細胞内ドメインを有していた。第2世代CARは、T細胞に更なるシグナルを提供するために、様々な共刺激性タンパク質受容体(例えばCD28、41BB、ICOS等)から、CARの細胞質尾部への、追加の細胞内シグナリングドメインを有していた。第3世代のCARは、CD3z CD28 41BB又はCD3z CD28 OX40といった複数のシグナリングドメインを組み合わせることによって、効力を更に増強する(Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor," Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells," Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia," Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leukemia Cells in vivo," Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62)。

【0132】

本発明の抗 B7 H3 CARは、受容体の細胞内ドメインに融合した抗 B7 H3 scFvを含む。抗 B7 H3 scFvの可変軽鎖及び可変重鎖ドメインは好ましくは hmAb CVL(配列番号20)及びhmAb CVH(配列番号21)であるか、又は好ましくはhmAb DVL(配列番号30)及びhmAb DVH(配列番号31)である。

【0133】

本発明の抗 B7 H3 CARの細胞内ドメインは好ましくは: 41BB CD3、b2c CD3、CD28、CD28 41BB CD3、CD28 CD3、CD28 FcRI、CD28mut CD3、CD28 OX40 CD3、CD28 OX40 CD3、CD3、CD4 CD3、CD4 FcRI、CD8 CD3、FceRI、FcRI CAIX、ヘレグリン CD3、IL13 CD3 又はLy49H CD3 のうちのいずれの細胞内ドメインから選択される(Tettamanti, S. et al. (2013) "Targeting Of Acute Myeloid Leukaemia By Cytokine-Induced Killer Cells Redirected With A Novel CD123-Specific Chimeric Antigen Receptor," Br. J. Haematol. 161:389-401; Gill, S. et al. (2014) "Efficacy Against Human Acute Myeloid Leukemia And Myeloablation Of Normal Hematopoiesis In A Mouse Model Using Chimeric Antigen Receptor-Modified T Cells," Blood 123(15): 2343-2354; Mardiros, A. et al. (2013) "T Cells Expressing CD123-Specific Chimeric Antigen Receptors Exhibit Specific Cytolytic Effector Functions And Antitumor Effects Against Human Acute Myeloid Leukemia," Blood 122:3138-3148; Pizzitola, I. et al. (2014) "Chimeric Antigen Receptors Against CD33/CD123 Antigens Efficiently Target Primary Acute Myeloid Leuk

emia Cells in vivo,” Leukemia doi:10.1038/leu.2014.62)。

【0134】

VI. 多重特異性 B7 H3 結合分子

本発明はまた、エピトープ結合部位を含み（好ましくは、本発明の抗 B7 H3 VHドメインの CDR<sub>H</sub>のうちの1つ、2つ若しくは3つ全て、及び/又は本発明の本発明の抗 B7 H3 VLドメインの CDR<sub>L</sub>のうちの1つ、2つ若しくは3つ全て、又は上記抗 B7 H3 VHドメイン及び/若しくは上記抗 B7 H3 VLドメインを含み）、更に、第2のエピトープに免疫特異的に結合する第2のエピトープ結合部位を含み、上記第2のエピトープは、(i) B7 H3の異なるエピトープ、又は(ii) B7 H3ではない分子のエピトープである、多重特異性（例えば二重特異性、三重特異性等）B7 H3結合分子を対象とする。このような多重特異性 B7 H3 結合分子は好ましくは、標的細胞又は組織タイプに対して一意である抗原のセットを認識するエピトープ結合部位の組み合わせを含む。特に本発明は、B7 H3のエピトープと、エフェクタ細胞、特にTリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞又は他の単核細胞の表面上に存在する分子のエピトープとに結合できる、多重特異性 B7 H3 結合分子に関する。例えば本発明のこのような B7 H3 結合分子は、CD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体（TCR）又はNKGD2に免疫特異的に結合するエピトープ結合部位を含むように構成してよい。

10

【0135】

本発明の一実施形態は、「第1のエピトープ」及び「第2のエピトープ」に結合できる B7 H3 結合分子に関し、これらのエピトープは互いに同一ではない。このような二重特異性分子は、第1のエピトープに結合できる「VL1」/「VH1」ドメイン、及び第2のエピトープに結合できる「VL2」/「VH2」ドメインを含む。表記法「VL1」及び「VH1」はそれぞれ、このような二重特異性分子の「第1の」エピトープに結合する可変軽鎖ドメイン及び可変重鎖ドメインを指す。同様に、表記法「VL2」及び「VH2」はそれぞれ、このような二重特異性分子の「第2の」エピトープに結合する軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインを指す。ある特定のエピトープが第1のエピトープ又は第2のエピトープのいずれとして指定されるかは無関係であり、このような表記法は、本発明の結合分子のポリペプチド鎖のドメインの存在又は配向のみに関連する。一実施形態では、このようなエピトープのうち的一方はヒト B7 H3のエピトープであり、他方は B7 H3の異なるエピトープであるか、又は B7 H3ではない分子のエピトープである。特定の実施形態では、このようなエピトープのうち的一方はヒト B7 H3のエピトープであり、他方は、Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞又は他の単核細胞といったエフェクタ細胞の表面上に存在する分子（例えばCD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体（TCR）、NKGD2等）のエピトープである。特定の実施形態では、二重特異性分子は、3つ以上のエピトープ結合部位を含む。このような二重特異性分子は、少なくとも1つの B7 H3のエピトープ及び少なくとも1つの B7 H3ではない分子のエピトープに結合することになり、更に B7 H3の追加のエピトープ及び/又は B7 H3ではない分子の追加のエピトープに結合してよい。

20

30

【0136】

本発明は特に、二重特異性、三重特異性及び多重特異性 B7 H3 結合分子（例えば二重特異性抗体、二重特異性ダイアボディ、3価結合分子等）であって、上記分子は、上記分子を、B7 H3の少なくとも1つのエピトープと、B7 H3ではない第2の分子の少なくとも1つのエピトープとに配位結合できるようにすることができる、抗体のエピトープ結合断片（例えばVL及びVHドメイン）を有する、二重特異性、三重特異性及び多重特異性 B7 H3 結合分子に関する。上記分子のポリペプチドドメインのVL及びVHドメインの選択は、このような多重特異性 B7 H3 結合分子を構成するポリペプチド鎖が集合して、B7 H3の少なくとも1つのエピトープに対して特異的な少なくとも1つの官能性エピトープ結合部位と、B7 H3ではない分子の少なくとも1つのエピトープに対して特異的な少なくとも1つの官能性エピトープ結合部位とを形成するように、調整される。好ましくは、多重特異性 B7 H3 結合分子は、上述のように、本発明の抗 B7

40

50

H3 VHドメインのCDRHのうちの1つ、2つ若しくは3つ全て、及び/又は本発明の本発明の抗B7 H3 VLドメインのCDRLのうちの1つ、2つ若しくは3つ全て、又は上記抗B7 H3 VHドメイン及び/若しくは上記抗B7 H3 VLドメインを含む。

【0137】

A. 二重特異性抗体

本発明は、B7 H3のエピトープ及びB7 H3ではない分子のエピトープに同時に結合できる二重特異性抗体を包含する。いくつかの実施形態では、B7 H3及びB7 H3ではない第2の分子に同時に結合できる上記二重特異性抗体は、国際公開第1998/002463号、国際公開第2005/070966号、国際公開第2006/107786号、国際公開第2007/024715号、国際公開第2007/075270号、国際公開第2006/107617号、国際公開第2007/046893号、国際公開第2007/146968号、国際公開第2008/003103号、国際公開第2008/003116号、国際公開第2008/027236号、国際公開第2008/024188号、国際公開第2009/132876号、国際公開第2009/018386号、国際公開第2010/028797、国際公開第2010028796号、国際公開第2010/028795号、国際公開第2010/108127号、国際公開第2010/136172号、国際公開第2011/086091号、国際公開第2011/133886号、国際公開第2012/009544号、国際公開第2013/003652号、国際公開第2013/070565号、国際公開第2012/162583号、国際公開第2012/156430号、国際公開第2013/174873号、及び国際公開第2014/022540号に記載の方法のうちのいずれを用いて産生され、上記文献はそれぞれ、参照によりその全体が本出願に援用される。

10

20

【0138】

B. Fcドメインを有しない二重特異性ダイアボディ

本発明の一実施形態は、第1のエピトープ及び第2のエピトープに結合できる二重特異性ダイアボディであって、上記第1のエピトープはヒトB7 H3のエピトープであり、第2のエピトープは、B7 H3ではない分子、好ましくはTリンパ球、ナチュラルキラー(NK)細胞又は他の単核細胞といったエフェクタ細胞の表面上に存在する分子(例えばCD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体(TCR)、NKGD2等)のエピトープである。このようなダイアボディは、第1のポリペプチド鎖及び第2のポリペプチド鎖を含み、最も好ましくは上記第1のポリペプチド鎖及び第2のポリペプチド鎖から構成され、その配列は、上記ポリペプチド鎖が互いに対して共有結合して、B7 H3のエピトープ及び第2のエピトープに同時に結合できる共有結合ダイアボディを形成することを可能とする。

30

【0139】

二重特異性ダイアボディのこのような実施形態の第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に：N末端；第1又は第2のエピトープに結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン(即ちVL抗B7-H3-VL又はVLEピトープ<sup>2</sup>)；第1の介在スペーサペプチド(リンカー1)；(上記第1のポリペプチド鎖がVL抗B7-H3-VLを含有する場合は)第2のエピトープ又は(上記第1のポリペプチド鎖がVLEピトープ<sup>2</sup>を含有する場合は)B7 H3に結合できるモノクローナル抗体のVHドメイン；任意にシステイン残基を含有する第2の介在スペーサペプチド(リンカー2)；ヘテロ二量体促進ドメイン；及びC末端を含む(図1)。

40

【0140】

二重特異性ダイアボディのこの実施形態の第2のポリペプチド鎖は、N末端からC末端への方向に：N末端；第1又は第2のエピトープに結合できるモノクローナル抗体のVLドメイン(即ちVL抗B7-H3-VL又はVLEピトープ<sup>2</sup>；及び上記VLドメインは上記ダイアボディの上記第1のポリペプチド鎖に含まれないよう選択される)；介在スペーサペプチド(リンカー1)；(上記第2のポリペプチド鎖がVL抗B7-H3-VLを含有する場合

50

は)第2のエピトープ又は(上記第2のポリペプチド鎖がV Lエピトープ<sup>2</sup>を含有する場合は)B7 H3に結合できるモノクローナル抗体のV Hドメイン;任意にシステイン残基を含有する第2の介在スペーサペプチド(リンカー2);ヘテロ二量体促進ドメイン;及びC末端を含む(図1)。

【0141】

第1のポリペプチド鎖のV Lドメインは、第2のポリペプチド鎖のV Hドメインと相互作用して、第1の抗原(即ちB7 H3又は第2のエピトープを含有する分子)に対して特異的な第1の官能性エピトープ結合部位を形成する。同様に、第2のポリペプチド鎖のV Lドメインは、第1のポリペプチド鎖のV Hドメインと相互作用して、第2の抗原(即ち第2のエピトープを含有する分子又はB7 H3)に対して特異的な第2の機能性抗原結合部位を形成する。よって、第1及び第2のポリペプチド鎖のV L及びV Hドメインの選択は、ダイアボディのこれら2つのポリペプチド鎖が合わせて、B7 H3のエピトープ及び第2のエピトープの両方に結合できるV L及びV Hドメインを含む(即ちこれらが合わせて、V L抗B7-H3-VL/V H抗B7-H3-VH及びV Lエピトープ<sup>2</sup>/V Hエピトープ<sup>2</sup>を含む)ように、調整される。

10

【0142】

最も好ましくは、介在スペーサペプチド(即ち上述のV LドメインとV Hドメインとを隔てる「リンカー1(Linker 1)」)の長さは、上記ポリペプチド鎖の上記V L及びV Hドメインが互いに対して結合する(例えば0、1、2、3、4、5、6、7、8又は9個の介在リンカーアミノ酸残基からなる)のを実質的に又は完全に防止するよう選択される。従って第1のポリペプチド鎖のV L及びV Hドメインは、互いに対して結合することが実質的に又は全くできない。同様に、第2のポリペプチド鎖のV L及びV Hドメインは、互いに対して結合することが実質的に又は全くできない。好ましい介在スペーサペプチド(リンカー1)は、配列(配列番号32):GGGSGGGGを有する。

20

【0143】

上記第2の介在スペーサペプチド(リンカー2)の長さ及び組成は、上述のような二量体化を促進する1つ又は複数のポリペプチドドメイン(即ち「ヘテロ二量体促進ドメイン」)の選択に基づいて選択される。典型的には、上記第2の介在スペーサペプチド(リンカー2)は、3~20個のアミノ酸残基を含む。特に、採用した1つ以上のヘテロ二量体促進ドメインがシステイン残基を含まない場合、システイン含有第2の介在スペーサペプチド(リンカー2)が利用される。システイン含有第2の介在スペーサペプチド(リンカー2)は、1つ、2つ、3つ又は4つ以上のシステインを含有する。好ましいシステイン含有スペーサペプチド(リンカー2)は、配列GGCGGG(配列番号33)を有する。あるいは、リンカー2はシステインを含まず(例えば、GGG、GGGS(配列番号34)、LGGSGG(配列番号35)、GGGSGGGSGGG(配列番号36)、ASTKG(配列番号37)、LEPKSS(配列番号38)、APSSS(配列番号39)等)、以下で説明されるシステイン含有ヘテロ二量体促進ドメインが使用される。任意に、システイン含有リンカー2及びシステイン含有ヘテロ二量体促進ドメインの両方が使用される。

30

【0144】

ヘテロ二量体促進ドメインは、一方のポリペプチド鎖におけるGVEPKSC(配列番号40)又はVEPKSC(配列番号41)又はAEPKSC(配列番号42)、及び他方のポリペプチド鎖におけるGFNRGEC(配列番号43)又はFNRGEC(配列番号44)であってもよい(米国特許第2007/0004909号)。

40

【0145】

ある好ましい実施形態では、ヘテロ二量体促進ドメインは、対向する電荷のタンデム反復コイルドメイン、例えば、グルタミン酸残基がpH7において負の電荷を形成する「Eコイル」螺旋ドメイン(配列番号45:EVAALEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK)と、リシン残基がpH7において正の電荷形成する「Kコイル」ドメイン(配列番号46:KVAALKE KVAALKE KVAALKE KVAALKE)とを含む。このような荷電ドメインの存在により、第1のポリペプチドと第2のポリペプチドとの間の関連付けが促進され、

50

従ってヘテロ二量体形成が促進される。上述のEコイル及びKコイルの配列の、1つ又は複数のシステイン残基を含むような修飾を含む、ヘテロ二量体促進ドメインを利用してよい。このようなシステイン残基の存在により、一方のポリペプチド鎖に存在するコイルが、他方のポリペプチド鎖に存在する相補的なコイルと共有結合し、これにより上記ポリペプチド鎖を互いに共有結合させて、ダイアボディの安定性を向上できる。特に好ましい例は、アミノ酸配列EVAACEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK (配列番号47)を有する修飾されたEコイルと、アミノ酸配列KVAACKK KVAALKE KVAALKE KVAALK E (配列番号48)を有する修飾されたKコイルとを含む、ヘテロ二量体促進ドメインである。

【0146】

国際公開第2012/018687号に開示されているように、ダイアボディのインビボ薬物動態特性を改善するために、ダイアボディを、ダイアボディの末端のうちの1つ又は複数に血清結合タンパク質のポリペプチド部分を含有するように修飾してよい。最も好ましくは、このような血清結合タンパク質のポリペプチド部分は、ダイアボディのポリペプチド鎖のC末端に配置されることになる。アルブミンは、血漿中に最も豊富なタンパク質であり、ヒトにおいて19日の半減期を有する。アルブミンは複数の小さな分子結合部位を有し、これによりアルブミンは他のタンパク質に非共有結合して血清半減期を延長できる。連鎖球菌株G148のタンパク質Gのアルブミン結合ドメイン3(ABD3)は、安定した3重螺旋束を形成する46個のアミノ酸残基からなり、広範なアルブミン結合特異性を有する(Johansson, M.U. et al. (2002) "Structure, Specificity, And Mode Of Interaction For Bacterial Albumin-Binding Modules," J. Biol. Chem. 277(10):8114-8120)。従って、ダイアボディのインビボ薬物動態特性を改善するための、血清結合タンパク質の特に好ましいポリペプチド部分は、連鎖球菌タンパク質Gからのアルブミン結合ドメイン(ABD)、及びより好ましくは、連鎖球菌株G148のタンパク質Gのアルブミン結合ドメイン3(ABD3)(配列番号49): LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLIDNAKS AEGVKALIDE ILAALPである。

【0147】

国際公開第2012/162068号(参照により本出願に援用される)に開示されているように、配列番号49の「脱免疫化(deimmunized)」変異型は、MHCクラスII結合を減衰させる又は排除する能力を有する。組み合わせさせた突然変異の結果に基づいて、以下の置換の組み合わせが、このような脱免疫化ABDを形成するための好ましい置換であると考えられる: 66D/70S+71A; 66S/70S+71A; 66S/70S+79A; 64A/65A/71A; 64A/65A/71A+66S; 64A/65A/71A+66D; 64A/65A/71A+66E; 64A/65A/79A+66S; 64A/65A/79A+66D; 64A/65A/79A+66E。修飾L64A、I65A及びD79A、又は修飾N66S、T70S及びD79Aを有する変異型ABD。アミノ酸配列:

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLID<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub>A<sub>71</sub>EGVKALIDE ILAALP (配列番号50)

又はアミノ酸配列:

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNA<sub>64</sub>A<sub>65</sub>NNAKT VEGVKALIA<sub>79</sub>E ILAALP (配列番号51)

又はアミノ酸配列:

LAEAKVLANR ELDKYGVS DY YKNLIS<sub>66</sub>NAKS<sub>70</sub> VEGVKALIA<sub>79</sub>E ILAALP (配列番号52)

を有する、変異型脱免疫化ABDが特に好ましい。というのは、このような脱免疫化ABDは、MHCクラスII結合の減衰を提供しながら、略野生型の結合を呈するためである。従って、ABDを有するこのようなダイアボディの上記第1のポリペプチド鎖は、好ましくはこのようなポリペプチド鎖のEコイル(又はKコイル)ドメインに対してC末端に位置決めされることによって、上記Eコイル(又はKコイル)ドメインとABD(これは

10

20

30

40

50

好ましくは脱免疫化 A B D である)との間に介在する、第 3 のリンカー (リンカー 3) を含有する。このようなリンカー 3 の好ましい配列は、配列番号 3 4 : GGGG である。

【 0 1 4 8 】

C . F c ドメインを含有する多重特異性ダイアボディ

本発明の一実施形態は、B 7 H 3 のエピトープ及び第 2 のエピトープ (即ち B 7 H 3 の異なるエピトープ、又は B 7 H 3 ではない分子のエピトープ) に結合できる、F c ドメインを含む多重特異性ダイアボディに関する。上記ダイアボディポリペプチド鎖のうち一方又は両方に I g G C H 2 C H 3 ドメインを追加して、上記ダイアボディ鎖の複合体化によって F c 領域が形成されるようにすると、上記ダイアボディの生物学的半減期が増大し、及び / 又は価数が変化する。このようなダイアボディは、互いに共有結合することによって、B 7 H 3 のエピトープ及び第 2 のエピトープに同時に結合できる共有結合したダイアボディを形成できる配列を有する、2 つ以上のポリペプチド鎖を含む。上記ダイアボディポリペプチドの両方に I g G C H 2 C H 3 ドメインを組み込むと、2 鎖二重特異性 F c 領域含有ダイアボディの形成が可能となる (図 2)。

10

【 0 1 4 9 】

あるいは、上記ダイアボディポリペプチドのうち一方に I g G C H 2 C H 3 ドメインを組み込むと、より複雑な 4 鎖二重特異性 F c ドメイン含有ダイアボディの形成が可能となる (図 3 A ~ 3 C)。図 3 C は、定常軽鎖 (C L) ドメイン及び定常重鎖 C H 1 ドメインを有する代表的な 4 鎖ダイアボディを示すが、このようなドメインの断片及び他のポリペプチドを代わりに採用してもよい (例えば図 3 A 及び 3 B、米国公開特許第 2 0 1 3 0 2 9 5 1 2 1 号; 米国公開特許第 2 0 1 0 0 1 7 4 0 5 3 号及び米国公開特許第 2 0 0 9 0 0 6 0 9 1 0 号; 欧州公開特許第 2 7 1 4 0 7 9 号; 欧州公開特許第 2 6 0 1 2 1 6 号; 欧州公開特許第 2 3 7 6 1 0 9 号; 欧州公開特許第 2 1 5 8 2 2 1 号、及び国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 2 0 6 8 号; 国際公開第 2 0 1 2 / 0 1 8 6 8 7 号; 国際公開第 2 0 1 0 / 0 8 0 5 3 8 号を参照)。従って例えば、C H 1 ドメインの代わりに、ヒト I g G のヒンジドメイン由来のアミノ酸配列 GVEPKSC (配列番号 4 0)、VEPKSC (配列番号 4 1) 又は AEPKSC (配列番号 4 2) を有するペプチドを採用してよく、また C L ドメインの代わりに、ヒト 軽鎖の C 末端 6 アミノ酸、GFNRGEC (配列番号 4 3) 又は FNREGC (配列番号 4 4) を採用してよい。4 鎖ダイアボディを含有する代表的なペプチドを図 3 A に示す。あるいは、又は更に、対向する電荷のタンデムコイルドメイン、例えば「E コイル」螺旋ドメイン (配列番号 4 5 : EVAALEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK 又は配列番号 4 7 : EVAACEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK); 及び「K コイル」ドメイン (配列番号 4 6 : KVAAALKE KVAAALKE KVAAALKE KVAAALKE 又は配列番号 4 8 : KVAACKE KVAAALKE KVAAALKE KVAAALKE) を含むペプチドを採用してよい。4 鎖ダイアボディを含有する代表的なコイルドメインを図 3 B に示す。

20

30

【 0 1 5 0 】

本発明の二 F c ドメイン含有分子は、更なる介在スペーサペプチド (リンカー) を含んでよく、このようなリンカーは一般に、ヘテロ二量体促進ドメイン (例えば E コイル若しくは K コイル) と C H 2 C H 3 ドメインとの間、及び / 又は C H 2 C H 3 ドメインと可変ドメイン (即ち V H 若しくは V L) との間に組み込まれる。典型的には、この追加のリンカーは 3 ~ 2 0 個のアミノ酸残基を含み、また任意に I g G ヒンジドメインの全体又は一部分 (好ましくは I g G ヒンジドメインのシステイン含有部分) を含有してよい。本発明の二重特異性 F c ドメイン含有ダイアボディ分子において採用できるリンカーとしては : GGGG (配列番号 3 4)、LGGGSG (配列番号 3 5)、GGGSGGGSGGG (配列番号 3 6)、ASTKG (配列番号 3 7)、LEPKSS (配列番号 3 8)、APSSS (配列番号 3 9)、APSSSPME (配列番号 5 3)、VEPKSADKTHTCPPCP (配列番号 5 4)、LEPKSADKTHTCPPC (配列番号 5 5)、DKTHTCPPCP (配列番号 5 6)、GGC、及び GGG が挙げられる。クローニングを容易にするために、GGG 又は GGC の代わりに LEPKSS (配列番号 3 8) を使用してよい。更に、アミノ酸 G G G 又は LEPKSS (配列番号 3 8) の直後に DKTHTCPPCP (配列番号 5 6) を続けることによって、代替リンカー : GGGDKTHTCPPCP (配

40

50

列番号 57) ; 及び LEPKSSDKTHTCPPCP ( 配列番号 58 ) を形成してよい。本発明の二重特異性 Fc ドメイン含有分子は、リンカーに加えて又はリンカーに代えて、IgG ヒンジドメインを組み込んでよい。例示的なヒンジドメインとしては : IgG1 からの EPKSCDKTHTCPPCP ( 配列番号 7 ) ; IgG2 からの ERKCCVECPPCP ( 配列番号 8 ) ; IgG4 からの ESKYGPPCPCSP ( 配列番号 10 ) ; 及び鎖交換を低減するための安定化 S228P 置換を含む IgG4 ヒンジ変異型からの ESKYGPPCPPCP ( 配列番号 11 ) が挙げられる ( Kabat に記載の EU インデックスに従って番号付与 ) 。

【 0151 】

図 3A ~ 3C に提示されているように、本発明の Fc ドメイン含有ダイアボディは 4 つの鎖を含んでよい。このようなダイアボディの第 1 及び第 3 のポリペプチド鎖は、3 つのドメイン : ( i ) VL1 含有ドメイン ; ( ii ) VH2 含有ドメイン ; ( iii ) ヘテロ二量体促進ドメイン ; 及び ( iv ) CH2 - CH3 配列を含有するドメインを含有する。第 2 及び第 4 のポリペプチド鎖は : ( i ) VL2 含有ドメイン ; ( ii ) VH1 含有ドメイン ; 及び ( iii ) ヘテロ二量体促進ドメインを含有し、上記ヘテロ二量体促進ドメインは、第 1 / 第 3 のポリペプチド鎖と第 2 / 第 4 のポリペプチド鎖との二量体化を促進する。第 3 及び第 4 のポリペプチド鎖の VL 及び / 又は VH ドメイン、並びに第 1 及び第 2 のポリペプチド鎖の VL 及び / 又は VH ドメインは、同一であっても異なってもよく、これにより、単一特異性、二重特異性又は四重特異性の 4 価結合が可能となる。表記法「VL3」及び「VH3」はそれぞれ、このようなダイアボディの「第 3 の」エピトープに結合する軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインを指す。同様に、表記法「VL4」及び「VH4」はそれぞれ、このようなダイアボディの「第 4 の」エピトープに結合する軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインを指す。本発明の代表的な 4 鎖二重特異性 Fc ドメイン含有ダイアボディのポリペプチド鎖の一般構造を表 1 に提示する。

【表 1】

表 1		
二重特異性	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - VH2 - HPD - CH2 - CH3 - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - VH2 - HPD - CH2 - CH3 - COOH
	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
四重特異性	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - VH2 - HPD - CH2 - CH3 - COOH
	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL3 - VH4 - HPD - CH2 - CH3 - COOH
	第 4 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL4 - VH3 - HPD - COOH

HPD = ヘテロ二量体促進ドメイン

【 0152 】

ある具体的実施形態では、本発明のダイアボディは、合計 4 つのポリペプチド鎖からなる、二重特異性、4 価 ( 即ち 4 つのエピトープ結合部位を有する )、Fc 含有ダイアボディである ( 図 3A ~ 3C ) 。本発明の二重特異性、4 価、Fc 含有ダイアボディは、B7H3 に免疫特異的な 2 つのエピトープ結合部位 ( これらは B7H3 の同一のエピトープ又は B7H3 の異なるエピトープに結合できる )、及び第 2 の分子に対して免疫特異的な 2 つのエピトープ結合部位 ( これらは第 2 の分子の同一のエピトープ又は第 2 の分子の異なるエピトープに結合できる ) を含む。好ましくは、第 2 の分子は、Tリンパ球、ナチュラルキラー ( NK ) 細胞又は他の単核細胞といったエフェクタ細胞の表面上に存在する分子 ( 例えば CD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体 ( TCR )、NKGD2 等 ) である。

【 0 1 5 3 】

更なる実施形態では、本発明のFcドメイン含有ダイアボディは、3つのポリペプチド鎖を含んでよい。このようなダイアボディの第1のポリペプチドは、3つのドメイン：(i) VL1含有ドメイン；(ii) VH2含有ドメイン；及び(iii) CH2 CH3配列を含有するドメインを含有する。このようなダイアボディの第2のポリペプチドは：(i) VL2含有ドメイン；(ii) VH1含有ドメイン；並びに(iii)上記ダイアボディの第1のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化及び共有結合を促進するドメインを含有する。このようなダイアボディの第3のポリペプチドは、CH2 CH3配列を含む。従ってこのようなダイアボディの上記第1及び第2のポリペプチド鎖は、一体に連結して、上記第1の抗原（即ちB7 H3又は第2のエピトープを含む分子）に結合できるVL1 / VH1エピトープ結合部位、及び上記第2の抗原（即ち第2のエピトープを含む分子又はB7 H3）に結合できるVL2 / VH2エピトープ結合部位を形成する。上記第1及び第2のポリペプチドは、それぞれの第3のドメインのシステイン残基が関わるジスルフィド結合によって、互いに結合する。特に上記第1及び第3のポリペプチド鎖は、互いに複合体化して、ジスルフィド結合によって安定化されたFcドメインを形成する。このような二重特異性ダイアボディは、強度が増強されている。図4A及び4Bは、このようなダイアボディの構造を示す。このようなFc領域含有ダイアボディは、2つの配向（表2）のうちのいずれを有してよい。

10

【表2】

表2		
第1の配向	第3の鎖	NH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> - COOH
	第1の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - VH2 - HPD - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> - COOH
	第2の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
第2の配向	第3の鎖	NH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> - COOH
	第1の鎖	NH <sub>2</sub> - CH <sub>2</sub> - CH <sub>3</sub> - VL1 - VH2 - HPD - COOH
	第2の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH

20

HPD=ヘテロ二量体促進ドメイン

30

【 0 1 5 4 】

ある具体的実施形態では、本発明のダイアボディは、合計3つのポリペプチド鎖からなる、二重特異性、2価（即ち2つのエピトープ結合部位を有する）、Fc含有ダイアボディである（図4A～4B）。本発明の二重特異性、2価Fc含有ダイアボディは、B7 H3に免疫特異的な1つのエピトープ結合部位、及び第2の分子に特異的な1つのエピトープ結合部位を含む。好ましくは、この第2の分子は、Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞又は他の単核細胞といったエフェクタ細胞の表面上に存在する分子（例えばCD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体（TCR）、NKGD2等）である。

40

【 0 1 5 5 】

更なる実施形態では、上記Fcドメイン含有ダイアボディは、合計5つのポリペプチド鎖を含んでよい。ある特定の実施形態では、上記5つのポリペプチド鎖のうち2つは、同一のアミノ酸配列を有する。このようなダイアボディの第1のポリペプチド鎖は：(i) VH1含有ドメイン；(ii) CH1含有ドメイン；及び(iii) CH2 CH3配列を含有するドメインを含有する。上記第1のポリペプチド鎖は、VH1及び重鎖定常領域を含有する抗体の重鎖であってよい。このようなダイアボディの第2及び第5のポリペプチド鎖は：(i) VL1含有ドメイン；及び(ii) CL含有ドメインを含有する。この

50

ようなダイアボディの上記第2及び/又は第5のポリペプチド鎖は、上記第1/第3のポリペプチド鎖のVH1に対して相補的なVL1を含有する抗体の軽鎖であってよい。上記第1、第2及び/又は第5のポリペプチド鎖は、自然に発生する抗体から単離できる。あるいはこれらは、組み換えによって構成できる。このようなダイアボディの第3のポリペプチド鎖は：(i) VH1含有ドメイン；(ii) CH1含有ドメイン；(iii) CH2 CH3配列を含有するドメイン；(iv) VL2含有ドメイン；(v) VH3含有ドメイン；及び(vi)ヘテロ二量体促進ドメインを含有し、上記ヘテロ二量体促進ドメインは、上記第3の鎖と上記第4の鎖との二量体化を促進する。このようなダイアボディの第4のポリペプチドは：(i) VL3含有ドメイン；(ii) VH2含有ドメイン；並びに(iii)上記ダイアボディの第3のポリペプチド鎖とのヘテロ二量体化及び共有結合を促進するドメインを含有する。

10

【0156】

従って、このようなダイアボディの上記第1及び第2のポリペプチド鎖と上記第3及び第5のポリペプチド鎖とは、互いに連結して、第1のエピトープに結合できる2つのVL1/VH1エピトープ結合部位を形成する。このようなダイアボディの上記第3及び第4のポリペプチド鎖は、互いに連結して、第2のエピトープに結合できるVL2/VH2エピトープ結合部位、及び第3のエピトープに結合できるVL3/VH3結合部位を形成する。上記第1及び第3のポリペプチドは、それぞれの定常領域のシステイン残基が関わるジスルフィド結合によって、互いに結合する。特に上記第1及び第3のポリペプチド鎖は、互いに複合体化して、Fcドメインを形成する。このような多重特異性ダイアボディは、強度が増強されている。図5は、このようなダイアボディの構造を示す。VL1/VH1、VL2/VH2及びVL3/VH3ドメインは、同一であっても異なってもよく、これにより、単一特異性、二重特異性又は三重特異性である結合が可能となることが理解されるだろう。本明細書において提示されるように、これらのドメインは好ましくは、B7 H3のエピトープ、第2の分子のエピトープ、及び任意に第3の分子のエピトープに結合するように選択される。

20

【0157】

上記ポリペプチド鎖のVL及びVHドメインは、所望のエピトープに特異的なVL/VH結合部位を形成するよう選択される。上記ポリペプチド鎖の連結によって形成されるVL/VH結合部位は、同一であっても異なってもよく、これにより、単一特異性、二重特異性、三重特異性又は四重特異性である4価結合が可能となる。特に上記VL及びVHドメインは、多重特異性ダイアボディが、第1のエピトープに関する2つの結合部位及び第2のエピトープに関する2つの結合部位、又は第1のエピトープに関する3つの結合部位及び第2のエピトープに関する1つの結合部位、又は(図5に示すように)第1のエピトープに関する2つの結合部位、第2のエピトープに関する1つの結合部位及び第3のエピトープに関する1つの結合部位を含むように選択してよい。本発明の代表的な5鎖Fcドメイン含有ダイアボディのポリペプチド鎖の一般構造を表3に示す。

30

40

50

【表 3】

表 3		
二重特異性 (2x2)	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - CL - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VH1 - CH1 - CH2 - CH3 - COOH
	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - VH1 - CH1 - CH2 - CH3 - VL2 - VH2 - HPD - COOH
	第 5 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - CL - COOH
	第 4 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH2 - HPD - COOH
二重特異性 (3x1)	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - CL - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VH1 - CH1 - CH2 - CH3 - COOH
	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - VH1 - CH1 - CH2 - CH3 - VL1 - VH2 - HPD - COOH
	第 5 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - CL - COOH
	第 4 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
三重特異性 (2x1x1)	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - CL - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VH1 - CH1 - CH2 - CH3 - COOH
	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - VH1 - CH1 - CH2 - CH3 - VL2 - VH3 - HPD - COOH
	第 5 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - CL - COOH
	第 4 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL3 - VH2 - HPD - COOH

HPD=ヘテロ二量体促進ドメイン

## 【 0 1 5 8 】

ある具体的実施形態では、本発明のダイアボディは、B7 H3に免疫特異的な2つのエピトープ結合部位（これらはB7 H3の同一のエピトープ又はB7 H3の異なるエピトープに結合してよい）、及び第2の分子に特異的な2つのエピトープ結合部位（これらは第2の分子の同一のエピトープ又は第2の分子の異なるエピトープに結合してよい）を有する、合計5つのポリペプチド鎖からなる、二重特異性、4価（即ち4つのエピトープ結合部位を有する）、Fc含有ダイアボディである。別の実施形態では、本発明の二重特異性、4価、Fc含有ダイアボディは、B7 H3に免疫特異的な3つのエピトープ結合部位（これらはB7 H3の同一のエピトープ又はB7 H3の2つ若しくは3つの異なるエピトープに結合してよい）、及び第2の分子に特異的な1つのエピトープ結合部位を含む。別の実施形態では、本発明の二重特異性、4価、Fc含有ダイアボディは、B7 H3に免疫特異的な1つのエピトープ結合部位、及び第2の分子に特異的な3つのエピトープ結合部位（これらは第2の分子同一のエピトープ又は第2の分子の2つ若しくは3つの異なるエピトープに結合してよい）を含む。上述のように、VL及びVHドメインは、三重特異性結合を可能とするように選択してよい。従って本発明は、三重特異性4価Fc含有ダイアボディも包含する。本発明の三重特異性4価Fc含有ダイアボディは、B7 H3に対して免疫特異的な2つのエピトープ結合部位、第2の分子に対して免疫特異的な1つのエピトープ結合部位、及び第3の分子に対して免疫特異的な1つのエピトープ結合部位を含む。特定の実施形態では、第2の分子は、Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞又は他の単核細胞といったエフェクタ細胞の表面上に存在する分子（例えばCD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体（TCR）、NKG2D等）である。特定の実施形態では、第2の分子はCD3であり、第3の分子はCD8である。

## 【 0 1 5 9 】

## D．Fcドメインを含有する3価結合分子

本発明の更なる実施形態は、第1のエピトープ、第2のエピトープ及び第3のエピトープに同時に結合できるFcドメインを含み、上記エピトープのうちの少なくとも1つは別のものとは同一ではない、3価結合分子に関する。このような二重特異性3価結合性分子は3つのエピトープ結合部位を含み、そのうちの2つは、結合部位A及び結合部位Bを提供するダイアボディ型結合ドメインであり、1つは、結合部位Cを提供するFab型結合ドメイン（又はscFv型結合ドメイン）である（例えば図6A～6F、並びにPCT出願第PCT/US15/33081号及びPCT出願第PCT/US15/33076号を参照）。このような3価結合分子は従って、第1のエピトープに結合できる「VL1」/「VH1」ドメイン、並びに第2のエピトープに結合できる「VL2」/「VH2」ドメイン、並びに上記3価結合分子の「第3の」エピトープに結合できる「VL3」及び「VH3」ドメインを含む。「ダイアボディ型結合ドメイン」は、ダイアボディ、特に上述のようなDART（登録商標）ダイアボディ中に存在するエピトープ結合のタイプである。「Fab型結合ドメイン」及び「scFv型結合ドメイン」はそれぞれ、イムノグロブリン軽鎖のVLドメインと、相補的なイムノグロブリン重鎖のVHドメインとの相互作用によって形成される、エピトープ結合部位である。Fab型結合ドメインは、Fab型結合ドメインを形成する2つのポリペプチド鎖が単一のエピトープ結合部位しか含まないが、ダイアボディ型結合ドメインを形成する2つのポリペプチド鎖は少なくとも2つのエピトープ結合部位を含むという点で、ダイアボディ型結合ドメインとは異なる。同様に、scFv型結合ドメインも、これらが単一のエピトープ結合部位しか含まないという点で、ダイアボディ型結合ドメインとは異なる。よって本明細書において使用される場合、Fab型及びscFv型結合ドメインは、ダイアボディ型結合ドメインとは別個である。

## 【0160】

典型的には、本発明の3価結合分子は、4つの異なるポリペプチド鎖を含む（図6A～6Bを参照）が、上記分子は、例えばこれらのポリペプチド鎖を（例えばペプチド結合によって）互いに融合させることによって、又はこれらのポリペプチドを「分割（dividing）」して追加のポリペプチド鎖を形成することによって、又はより少数若しくは追加のポリペプチド鎖をジスルフィド結合によって連結することによって、より少数又はより多数のポリペプチド鎖を含むことができる。図6C～6Fは、3つのポリペプチド鎖を有する分子を概略的に示すことによって、本発明のこの態様を図示している。図6A～6Fに提示されているように、本発明の3価結合分子は、上記ダイアボディ型結合ドメインがFcドメインに対するN末端（図6A、6C及び6D）又はC末端（図6B、6E及び6F）となる交互の配向を有してよい。

## 【0161】

特定の実施形態では、本発明のこのような3価結合分子の第1のポリペプチド鎖は：(i) VL1含有ドメイン；(ii) VH2含有ドメイン；(iii) ヘテロ二量体促進ドメイン；及び(iv) CH2 CH3配列を含有するドメインを含有する。上記VL1及びVL2ドメインは、表3（図6A及び6Bも参照）に提示されるように、上記CH2 CH3含有ドメインに対してN末端又はC末端に位置する。このような実施形態の第2のポリペプチド鎖は：(i) VL2含有ドメイン；(ii) VH1含有ドメイン；及び(iii) ヘテロ二量体促進ドメインを含有する。このような実施形態の第3のポリペプチド鎖は：(i) VH3含有ドメイン；(ii) CH1含有ドメイン；及び(iii) CH2 CH3配列を含有するドメインを含有する。上記第3のポリペプチド鎖は、VH3及び重鎖定常領域を含有する抗体、又は上記ドメインを含有するポリペプチドの、重鎖であってよい。このような実施形態の第4のポリペプチドは：(i) VL3含有ドメイン；及び(ii) CL含有ドメインを含有する。上記第4のポリペプチド鎖は、上記第3のポリペプチド鎖のVH3に対して相補的なVL3を含有する抗体、又は上記ドメインを含有するポリペプチドの、軽鎖であってよい。上記第3又は第4のポリペプチド鎖は、自然に発生する抗体から単離できる。あるいはこれらは、組み換えによって、合成によって、又は他の手段によって構成できる。

10

20

30

40

50

## 【0162】

上記第1及び第2のポリペプチド鎖の軽鎖可変ドメインは、介在スペーサペプチドによって、このようなポリペプチド鎖の重鎖可変ドメインから隔てられ、上記介在スペーサリンカーは、これらのVL1/VH2（又はこれらのVL2/VH1）ドメインを一体に連結して、第1又は第2のエピトープに結合できるエピトープ結合部位を形成することを可能にするには短すぎる長さを有する。この目的のために好ましい介在スペーサペプチド（リンカー1）は、配列（配列番号32）：GGGSGGGGを有する。上記3価結合分子の他のドメインは、任意にシステイン残基を含む、1つ又は複数の介在スペーサペプチド（リンカー）によって隔てられてよい。特に上述のように、このようなリンカーは典型的には可変ドメイン（即ちVH又はVL）とペプチドヘテロ二量体促進ドメイン（例えばEコイル又はKコイル）との間、及び上記ペプチドヘテロ二量体促進ドメイン（例えばEコイル又はKコイル）とCH2 CH3ドメインとの間に組み込まれる。3価結合分子の生成に有用な例示的なリンカーは上で提示されており、またPCT出願第PCT/US15/33081号；及びPCT出願第PCT/US15/33076号にも提示されている。従ってこのような3価結合分子の第1及び第2のポリペプチド鎖は、一体に連結して、第1のエピトープに結合できるVL1/VH1結合部位、及び第2のエピトープに結合できるVL2/VH2結合部位を形成する。このような3価結合分子の第3及び第4のポリペプチド鎖は、一体に連結して、第3のエピトープに結合できるVL3/VH3結合部位を形成する。

10

## 【0163】

上述のように、本発明の3価結合分子は、3つのポリペプチドを含んでよい。3つのポリペプチド鎖を含む3価結合分子は、（例えば介在スペーサペプチド（リンカー4）を用いて）第4のポリペプチドN末端のドメインを第3のポリペプチドのVH3含有ドメインに連結することによって得ることができる。あるいは、以下の3つのドメイン：（i）VL3含有ドメイン；（ii）VH3含有ドメイン；及び（iii）CH2 CH3配列を含有するドメインを含有する本発明の3価結合分子の第3のポリペプチド鎖が利用され、ここでVL3及びVH3は、これらのドメインが連結してエピトープ結合部位を形成できるようにするために十分な長さ（少なくとも9以上のアミノ酸残基）を有する介在スペーサペプチドによって、互いから隔てられる。この目的に関して好ましい1つの介在スペーサペプチドは、配列：GGGGSGGGSGGGGS（配列番号59）を有する。

20

30

## 【0164】

このような3価結合性分子のVL1/VH1、VL2/VH2及びVL3/VH3ドメインは異なっていてよく、それによって単一特異性、二重特異性又は三重特異性の結合が可能となることが理解されるだろう。特に、VL及びVHドメインは、3価結合分子が、第1のエピトープに対する2つの結合部位及び第2のエピトープに対する1つの結合部位、又は第1のエピトープに対する1つの結合部位及び第2のエピトープに対する2つの結合部位、又は第1のエピトープに対する1つの結合部位、第2のエピトープに対する1つの結合部位及び第3のエピトープに対する1つの結合部位を含むように、選択してよい。

## 【0165】

しかしながら本明細書に記載されているように、これらのドメインは好ましくは、B7H3のエピトープ、第2の分子のエピトープ及び第3の分子のエピトープに結合するよう選択される。特定の実施形態では、第2の分子は、Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞又は他の単核細胞といったエフェクタ細胞の表面上に存在する分子（例えばCD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体（TCR）、NKG2D等）である。特定の実施形態では、第3の分子はCD8である。

40

## 【0166】

本発明の代表的な3価結合性分子のポリペプチド鎖の一般構造を、図6A～6F及び表4で提供する。

50

【表 4】

表 4		
4 鎖 第 1 の配向	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - VH2 - HPD - CH2 - CH3 - COOH
	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - VH3 - CH1 - CH2 - CH3 - COOH
	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL3 - CL - COOH
4 鎖 第 2 の配向	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - CH2 - CH3 - VL1 - VH2 - HPD - COOH
	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - VH3 - CH1 - CH2 - CH3 - COOH
	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL3 - CL - COOH
3 鎖 第 1 の配向	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL1 - VH2 - HPD - CH2 - CH3 - COOH
	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL3 - VH3 - HPD - CH2 - CH3 - COOH
3 鎖 第 2 の配向	第 2 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL2 - VH1 - HPD - COOH
	第 1 の鎖	NH <sub>2</sub> - CH2 - CH3 - VL1 - VH2 - HPD - COOH
	第 3 の鎖	NH <sub>2</sub> - VL3 - VH3 - HPD - CH2 - CH3 - COOH

HPD=ヘテロ二量体促進ドメイン

## 【 0 1 6 7 】

本発明の一実施形態は、B7 H3に関する2つのエピトープ結合部位、及び第2の分子に関する1つのエピトープ結合部位を含む、3価結合分子に関する。B7 H3に関する2つのエピトープ結合部位は、同一のエピトープ又は異なるエピトープに結合してよい。本発明の別の実施形態は、B7 H3に関する1つのエピトープ結合部位、及び第2の分子に関する2つのエピトープ結合部位を含む、二重特異性3価結合分子に関する。第2の分子に関する2つのエピトープ結合部位は、第2の分子の同一のエピトープ又は異なるエピトープに結合してよい。本発明の更なる実施形態は、B7 H3に対する1つのエピトープ結合部位、第2の分子に対する1つのエピトープ結合部位及び第3の分子に対する1つのエピトープ結合部位を含む、三重特異性3価結合分子に関する。特定の実施形態では、第2の分子は、Tリンパ球、ナチュラルキラー(NK)細胞又は他の単核細胞といったエフェクタ細胞の表面上に存在する分子(例えばCD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体(TCR)、NKGD2等)である。特定の実施形態では、第2の分子はCD3であり、第3の分子はCD8である。上述のように、このような3価結合分子は、3つ、4つ、5つ又は6つ以上のポリペプチド鎖を含んでよい。

## 【 0 1 6 8 】

## V I I . F cドメインの修飾

本発明のFcドメイン含有分子(例えば抗体、ダイアボディ、3価結合分子)のFcドメインは、完全なFcドメイン(例えば完全IgGFcドメイン)、又は単にFcドメインの断片であってよい。任意に、本発明のFcドメイン含有分子のFcドメインは、C末端リシンアミノ酸残基を含まない。

## 【 0 1 6 9 】

従来の免疫機能では、抗体-抗原複合体と免疫系の細胞との相互作用は、抗体依存性細胞毒性、肥満細胞脱顆粒及び食作用等のエフェクタ機能から、リンパ球増殖及び抗体分泌を制御するもの等の免疫調節性シグナルにまで及ぶ、広範な応答をもたらす。これらの相互作用は全て、抗体又は免疫複合体のFcドメインの、造血細胞上の特殊化された細胞表面

受容体への結合によって開始される。抗体及び免疫複合体によってトリガされる細胞応答の多様性は、3つのFc受容体：FcRI(CD64)、FcRII(CD32)及びFcRIII(CD16)の構造不均質性によって得られる。FcRI(CD64)、FcRIIA(CD32A)及びFcRIII(CD16)は活性化(即ち免疫系増強)受容体であり；FcRIIB(CD32B)は阻害性(即ち免疫系減衰)受容体である。更に、新生児Fc受容体(FcRn)との相互作用は、エンドソームから細胞表面へのIgG分子の再循環及び血中への放出を仲介する。例示的な野生型IgG1(配列番号12)、IgG2(配列番号13)、IgG3(配列番号14)及びIgG4(配列番号15)のアミノ酸配列は、既に提示されている。

#### 【0170】

Fcドメインの修飾は、表現型の変化、例えば血清半減期の変化、安定性の変化、細胞酵素に対する感受性の変化、又はエフェクタ機能の変化につながり得る。従って、本発明のFcドメイン含有B7H3結合分子をエフェクタ機能に関して修飾して、例えば癌の治療におけるこのような分子の有効性を増強することが望ましい場合がある。例えば、作用機序が、標的抗原を担持する細胞の殺滅ではなく遮断又は拮抗作用を伴う抗体の場合といった、特定の場合においては、エフェクタ機能の低減又は削減が望ましい。エフェクタ機能の上昇は、FcRが低いレベルで発現する腫瘍及び外来細胞、例えばFcRIIBのレベルが低い腫瘍特異性B細胞(例えば非ホジキンリンパ腫、CLL及びパーキットリンパ腫)といった、望ましくない細胞を対象とする場合に一般に望ましい。エフェクタ機能活性が与えられた又は変更された本発明のこのような分子は、エフェクタ機能活性の効率の増強が望ましい疾患、障害又は感染の治療及び/又は予防のために有用である。

#### 【0171】

従って特定の実施形態では、本発明のFcドメイン含有分子のFcドメインは、操作された可変Fcドメインであってよい。本発明の二重特異性Fcドメイン含有分子のFcドメインは、1つ又は複数のFc受容体(例えば1つ又は複数のFcR)に結合できる能力を有してよいが、より好ましくは、上記変異型Fcドメインは、(野生型Fcドメインが呈する結合に対して)FcRIA(CD64)、FcRIIA(CD32A)、FcRIIB(CD32B)、FcRIIIA(CD16a)若しくはFcRIIIB(CD16b)への結合が変化しており、例えばある活性化受容体への結合が増強されており、及び/又は1つ若しくは複数の阻害性受容体に結合する能力が低下しているか若しくは上記能力を有しない。従って、本発明の二重特異性Fcドメイン含有分子のFcドメインは、完全FcドメインのCH2ドメインのうちのある程度若しくは全体及び/若しくはCH3ドメインのうちのある程度若しくは全体を含んでよく、又は(例えば完全FcドメインのCH2若しくはCH3ドメインに対する1つ若しくは複数の挿入及び/若しくは1つ若しくは複数の欠失を含んでよい)変異型CH2及び/若しくは変異型CH3配列を含んでよい。このようなFcドメインは、非Fcポリペプチド部分を含んでよく、又は自然に発生しない完全Fcドメインの部分を含んでよく、又はCH2及び/若しくはCH3ドメインの自然に発生しない配向を含んでよい(例えば2つのCH2ドメイン若しくは2つのCH3領域、若しくはN末端からC末端への方向において、CH3ドメインと、これが連結したCH2ドメイン、等)。

#### 【0172】

変化したエフェクタ機能として表されるFcドメイン修飾は当該技術分野において公知であり、活性化型受容体に対する結合を増大させる修飾(例えばFcRIIA(CD16A))、及び阻害型受容体に対する結合を低下させる修飾(例えばFcRIIB(CD32B))が含まれる(例えばStavenhagen, J.B. et al. (2007) "Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fcγ R Receptors," *Cancer Res.* 57(18):8882-8890を参照)。表5は、活性化受容体への結合を増大させる、及び/又は阻害性受容体への結合を低下させる例示的な修飾の、(番号付与及び置換は配列番号12のアミノ酸配列に対するものである)単一、二重、三重、四重

10

20

30

40

50

及び五重置換のリストを示す。

【表 5】

表 5 好ましい活性化Fcドメインの変異			
単一部位変異			
F243L	R292G	D270E	R292P
Y300L	P396L		
2 部位変異			
F243L 及び R292P	F243L 及び Y300L	F243L 及び P396L	R292P 及び Y300L
D270E 及び P396L	R292P 及び V305I	P396L 及び Q419H	P247L 及び N421K
R292P 及び P396L	Y300L 及び P396L	R255L 及び P396L	R292P 及び P305I
K392T 及び P396L			
3 部位変異			
F243L、P247L 及び N421K		P247L、D270E 及び N421K	
F243L、R292P 及び Y300L		R255L、D270E 及び P396L	
F243L、R292P 及び V305I		D270E、G316D 及び R416G	
F243L、R292P 及び P396L		D270E、K392T 及び P396L	
F243L、Y300L 及び P396L		D270E、P396L 及び Q419H	
V284M、R292L 及び K370N		R292P、Y300L 及び P396L	
4 部位変異			
L234F、F243L、R292P 及び Y300L		F243L、P247L、D270E 及び N421K	
L234F、F243L、R292P 及び Y300L		F243L、R255L、D270E 及び P396L	
L235I、F243L、R292P 及び Y300L		F243L、D270E、G316D 及び R416G	
L235Q、F243L、R292P 及び Y300L		F243L、D270E、K392T 及び P396L	
P247L、D270E、Y300L 及び N421K		F243L、R292P、Y300L 及び P396L	
R255L、D270E、R292G 及び P396L		F243L、R292P、V305I 及び P396L	
R255L、D270E、Y300L 及び P396L		F243L、D270E、P396L 及び Q419H	
D270E、G316D、P396L 及び R416G			
5 部位変異			
L235V、F243L、R292P、Y300L 及び P396L		F243L、R292P、V305I、Y300L 及び P396L	
L235P、F243L、R292P、Y300L 及び P396L			

【0173】

CD32Bへの結合が低下した、及び/又はCD16Aへの結合が増大した、ヒトIgG1 Fcドメインの例示的な変異型は、F243L、R292P、Y300L、V305I又はP296L置換を含有する。これらのアミノ酸置換は、いずれの組み合わせで、ヒトIgG1 Fcドメイン内に存在してよい。一実施形態では、上記変異型ヒトIgG1 Fcドメインは、F243L、R292P及びY300L置換を含有する。別の実施形態では、上記変異型ヒトIgG1 Fcドメインは、F243L、R292P、Y300L、V305I及びP296L置換を含有する。

【0174】

10

20

30

40

50

特定の実施形態では、本発明の B7 H3 結合分子の Fc ドメインに関して、(野生型 IgG1 Fc ドメイン(配列番号 12)が呈する結合に対して) Fc RIA(CD64)、Fc RIIA(CD32A)、Fc RIIB(CD32B)、Fc RIIIA(CD16a)又はFc RIIIB(CD16b)への結合が低下している(又はこれらに略結合しない)ことが好ましい。ある具体的実施形態では、本発明の B7 H3 結合分子は、ADCCエフェクタ機能が低下したIgG Fc ドメインを含む。ある好ましい実施形態では、このような B7 H3 結合分子の CH2 CH3 ドメインは、以下の置換: L234A、L235A、D265A、N297Q、及びN297Gのうちのいずれの1つ、2つ又は3つを含む。別の実施形態では、CH2 CH3 ドメインは、N297Q置換、N297G置換、L234A及びL235A置換又はD265A置換を含有するが、それはこれらの突然変異がFcR結合を消失させるためである。あるいは、(野生型IgG1 Fc ドメイン(配列番号 12)が呈する結合及びエフェクタ機能に対して)Fc RIIIA(CD16a)に対する結合が元来低い(又は略結合しない)、及び/又はエフェクタ機能が元来低い、天然のFcドメインのCH2 CH3 ドメインを利用する。ある具体的実施形態では、本発明の B7 H3 結合分子は、IgG2 Fc ドメイン(配列番号 13)又はIgG4 Fc ドメイン(配列番号 4)を含む。IgG4 Fc ドメインを利用する場合、本発明は、上述のヒンジドメインS228P置換(例えば配列番号 11を参照)等の安定化突然変異の導入も包含する。N297G、N297Q、L234A、L235A及びD265A置換はエフェクタ機能を消失させるため、エフェクタ機能が望まれる状況下では、これらの置換は採用しないことが好ましい。

10

20

## 【0175】

エフェクタ機能が低下したか又は消失した、本発明のFcドメイン含有分子のCH2及びCH3ドメインに関する好ましいIgG1配列は、L234A/L235Aの置換を含む(配列番号60):

```
APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGX
```

ここでXはリシン(K)であるか、又は不在である。

30

## 【0176】

Fcドメインを含むタンパク質の血清半減期は、FcRnに関するFcドメインの結合親和性を増大させることによって増大させることができる。本明細書において使用される場合、用語「半減期(half-life)」は、投与後の分子の平均生存時間の尺度となる、分子の薬物動態特性を意味する。半減期は、血清中で(即ち循環半減期)又は他の組織中で測定した場合に、分子の既知の量の50パーセント(50%)が被検体の身体(例えばヒト患者若しくは他の哺乳類)又はその特定の体腔から排除されるために必要な時間として表すことができる。一般に、半減期の増大は、投与される分子の循環における平均滞留時間(MRT)の増大につながる。

## 【0177】

いくつかの実施形態では、本発明の B7 H3 結合分子は、変異型Fcドメインを含み、上記変異型Fcドメインは、野生型Fcドメインに対して少なくとも1つのアミノ酸修飾を含み、従って上記分子は、(野生型Fcドメインを含む分子に対して)増大した半減期を有する。いくつかの実施形態では、本発明の B7 H3 結合分子は、変異型IgG Fcドメインを含み、上記変異型Fcドメインは、238、250、252、254、256、257、256、265、272、286、288、303、305、307、308、309、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424、428、433、434、435及び436からなる群から選択される1つ又は複数の位置に半減期延長アミノ酸置換を含む。Fcドメイン含有分子の半減期を増大させることができる多数の突然変異が当該技術分野において公

40

50

知であり、例えばM 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5 6 E及びこれらの組み合わせが挙げられる。例えば：米国特許第6, 277, 375号；米国特許第7, 083, 784号；米国特許第7, 217, 797号；米国特許第8, 088, 376号；米国公開特許第2002/0147311号；米国公開特許第2007/0148164号；並びに国際公開第98/23289号；国際公開第2009/058492号；及び国際公開第2010/033279号（これらは参照によりその全体が本出願に援用される）に記載されている突然変異を参照。半減期が増強されたB7 H3結合分子としては、Fcドメイン残基250、252、254、256、257、288、307、308、309、311、378、428、433、434、435及び436のうち2つ以上における置換、特にT 2 5 0 Q、M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T、T 2 5 6 E、K 2 8 8 D、T 3 0 7 Q、V 3 0 8 P、A 3 7 8 V、M 4 2 8 L、N 4 3 4 A、H 4 3 5 K及びY 4 3 6 Iから選択される2つ以上の置換を含む変異型Fcドメインを有するものも挙げられる。

10

## 【0178】

ある具体的実施形態では、本発明のB7 H3結合分子は：

- (A) M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T及びT 2 5 6 E；
- (B) M 2 5 2 Y及びS 2 5 4 T；
- (C) M 2 5 2 Y及びT 2 5 6 E；
- (D) T 2 5 0 Q及びM 4 2 8 L；
- (E) T 3 0 7 Q及びN 4 3 4 A；
- (F) A 3 7 8 V及びN 4 3 4 A；
- (G) N 4 3 4 A及びY 4 3 6 I；
- (H) V 3 0 8 P及びN 4 3 4 A；又は
- (I) K 2 8 8 D及びH 4 3 5 K

20

の置換を含む変異型IgG Fcドメインを有する。

## 【0179】

ある好ましい実施形態では、本発明のB7 H3結合分子は、置換：M 2 5 2 Y、S 2 5 4 T及びT 2 5 6 Eのうちいずれの1つ、2つ又は3つを含む変異型IgG Fcドメインを有する。本発明は更に：

- (A) エフェクタ機能及び/又はFc Rを変化させる、1つ又は複数の突然変異；並びに
  - (B) 血清半減期を延長させる、1つ又は複数の突然変異
- を含む可変Fcドメインを有するB7 H3結合分子を包含する。

30

## 【0180】

Fcドメイン含有第1及び第3のポリペプチド鎖が同一ではない特定の抗体、ダイアボディ及び3価結合分子に関して、2つの第1のポリペプチド鎖のCH2 CH3のドメイン間、又は2つの第3のポリペプチド鎖のCH2 CH3ドメイン間でのホモ二量体化の発生を低減又は防止することが望ましい。このようなポリペプチド鎖のCH2及び/又はCH3ドメインは配列において同一である必要はなく、有利には2つのポリペプチド鎖間の複合体形成を促進するために修飾される。例えば、CH2又はCH3ドメインにアミノ酸置換（好ましくは「ノブ(knob)」を形成する嵩高な側鎖基、例えばトリプトファンを含むアミノ酸による置換）を導入して、立体障害により、同様に変異させたドメインとの相互作用を防止し、上記変異させたドメインを、相補的な又は適応した変異（例えばグリシンによる置換）を施されたドメイン、即ち「ホール(hole)」と対合させて、ヘテロ二量体化を促進できる。このような一連の突然変異は、Fcドメインを形成するCH2 CH3ドメインを含むポリペプチドのいずれのペアに施すことができる。ホモ二量体化を抑えてヘテロ二量体化を促進するためのタンパク質加工の方法は、特に免疫グロブリン様分子の加工に関して当該技術分野で公知であり、本明細書に包含される（例えばRidgway et al. (1996) “ ‘Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,” Protein Engr. 9:617-621; Atwell et al. (1997) “ Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” J. Mol. Biol. 270: 26-35;及びXie et al. (2005)

40

50

“ A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis, ” J. Immunol. Methods 296:95-101を参照（これらはそれぞれ参照によりその全体が本明細書に援用される）。

【 0 1 8 1 】

好ましいノブは、I g G F cドメインを修飾して修飾基T 3 6 6 Wを含有させることによって生成される。好ましいホールは、I g G F cドメインを修飾して修飾基T 3 6 6 S、L 3 6 8 A及びY 4 0 7 Vを含有させることによって生成される。ホール担持第3のポリペプチド鎖ホモ二量体を、二重特異性ヘテロ二量体F cドメイン含有分子から精製するのを補助するために、好ましくは、第3のポリペプチド鎖のホール担持C H 2及びC H 3ドメインのタンパク質A結合部位を、位置4 3 5（H 4 3 5 R）におけるアミノ酸置換によって変異させる。このようにして、ホール担持第3のポリペプチド鎖ホモ二量体はタンパク質Aに結合せず、その一方で二重特異性ヘテロ二量体は、第1のポリペプチド鎖のタンパク質A結合部位を介してタンパク質Aに結合する能力を有したままとなる。代替実施形態では、ホール担持第3のポリペプチド鎖は、4 3 4位及び4 3 5位にアミノ酸置換を組み込んでよい（N 4 3 4 A / N 4 3 5 K）。

10

【 0 1 8 2 】

本発明のF cドメイン含有分子の第1のポリペプチド鎖のC H 2及びC H 3ドメインに関する好ましいI g Gアミノ酸配列は、「ノブ担持」配列（配列番号6 1）：

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNHYTQKS LSLSPGX

20

を有し、ここでXはリシン（K）であるか又は不在である。

【 0 1 8 3 】

2つのポリペプチド鎖（又は3つ、4つ若しくは5つのポリペプチド鎖を有するF cドメイン含有分子の第3のポリペプチド鎖）を有する、本発明のF cドメイン含有分子の第2のポリペプチド鎖のC H 2及びC H 3ドメインに関する好ましいI g Gアミノ酸配列は、「ホール担持」配列（配列番号6 2）：

APEAAGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD  
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA  
PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE  
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLVSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE  
ALHNRYTQKS LSLSPGX

30

を有し、ここでXはリシン（K）であるか又は不在である。

【 0 1 8 4 】

上述のように、配列番号6 1及び配列番号6 2のC H 2 C H 3ドメインは、アラニンによる2 3 4位の置換及びアラニンによる2 3 5位の置換を含み、従って、（野生型F cドメイン（配列番号1 2）が示す結合と比べて）F c R I A（C D 6 4）、F c R I I A（C D 3 2 A）、F c R I I B（C D 3 2 B）、F c R I I I A（C D 1 6 a）又はF c R I I I B（C D 1 6 b）への結合が低下した（又は結合を実質的に示さない）F cドメインを形成する。本発明はまた、野生型アラニン残基、F cドメインのエフェクタ機能及び/又はF R結合活性を修正する代替的な及び/又は更なる置換を含む、このようなC H 2 C H 3ドメインも包含する。本発明はまた、1つ又は複数の半減期延長アミノ酸置換を更にも含む、このようなC H 2 C H 3ドメインも包含する。特に本発明は、M 2 5 2 Y / S 2 5 4 T / T 2 5 6 Eを更にも含む、このようなホール担持及びノブ担持C H 2 C H 3ドメインを包含する。

40

【 0 1 8 5 】

第1のポリペプチド鎖が、配列番号6 1のもの等の「ノブ担持」C H 2 C H 3配列を有することが好ましい。しかしながら、理解されるように、第1のポリペプチド鎖中に「ホ

50

ール担持」C H 2 C H 3ドメイン（例えば配列番号62）を採用でき、この場合「ノブ担持」C H 2 C H 3ドメイン（例えば配列番号61）は、2つのポリペプチド鎖を有する本発明のFcドメイン含有分子の第2のポリペプチド鎖中（又は3つ、4つ若しくは5つのポリペプチド鎖を有するFcドメイン含有分子の第3のポリペプチド鎖中）に採用される。

#### 【0186】

他の実施形態では、本発明は、国際公開第2007/110205号；国際公開第2011/143545号；国際公開第2012/058768号；国際公開第2013/06867号（これらは全て、参照によりその全体が本出願に援用される）において開示されているもの等の当該技術分野で公知の突然変異を用いて、ホモ二量体化よりもヘテロ二量体化を指向するよう操作されたC H 2及び/又はC H 3ドメインを含む、B 7 H 3結合分子を包含する。

10

#### 【0187】

##### V I I I . エフェクタ細胞結合能力

本明細書に記載されているように、B 7 H 3 A D C分子を含む本発明のB 7 H 3結合分子は、標的細胞又は組織タイプに対して一意である抗原のセットを認識するエピトープ結合部位の組み合わせを含むように操作できる。特に本発明は、B 7 H 3のエピトープと、Tリンパ球、ナチュラルキラー（NK）細胞又は他の単核細胞といったエフェクタ細胞の表面上に存在する分子のエピトープとに結合できる、多重特異性B 7 H 3結合分子に関する。例えば本発明のB 7 H 3結合分子は、C D 2、C D 3、C D 8、C D 16、T細胞受容体（TCR）又はNK G 2 Dに免疫特異的に結合するエピトープ部位を含むよう構成してよい。本発明はまた、C D 3のエピトープ及びC D 8のエピトープに結合できる三重特異性B 7 H 3結合分子にも関する（例えば国際公開第2015/026894号を参照）。

20

#### 【0188】

##### A . C D 2 結合能力

一実施形態では、本発明の二重特異性、三重特異性又は多重特異性B 7 H 3結合分子は、B 7 H 3のエピトープ及びC D 2のエピトープに結合できる。C D 2は、T細胞及びナチュラルキラー（NK）細胞の表面上に見られる細胞接着分子である。C D 2は、恐らくNK細胞ナノチューブ形成の促進因子として、NK細胞の細胞毒性を増強する（Mace, E.M. et al. (2014) " Cell Biological Steps and Checkpoints in Accessing NK Cell Cytotoxicity, " Immunol. Cell. Biol. 92(3):245-255; Comerchi, C.J. et al. (2012) " CD2 Promotes Human Natural Killer Cell Membrane Nanotube Formation, " PLoS One 7(10):e47664:1-12）。C D 2に特異的に結合する分子は、抗C D 2抗体「L o C D 2 a」を含む。

30

#### 【0189】

L o C D 2 aのV Hドメインのアミノ酸配列（A T C C受託番号：11423；配列番号63）を以下に示す（C D R<sub>H</sub>残基は下線を付して示されている）；

EVQLQQSGPE LQRP GASV KL SCKASGYIFT EYYMYWVKQR PKQGLELVGR  
IDPEDGSIDYVEKFKKKATL TADTSSNTAY MQLSSLTSED TATYFCARGK  
 FNYRFAYWGQ GTLVTVSS

40

#### 【0190】

L o C D 2 aのV Lドメインのアミノ酸配列（A T C C受託番号：11423；配列番号64）を以下に示す（C D R<sub>L</sub>残基は下線を付して示されている）；

DVVL TQT PPT LLATIGQSVS ISCRSSQSLLHSSGNTYLNW LLQRTGQSPQ  
 PLIYL VSKLESGVPNRFSGS GSGTDFTLKI SGVEAEDLGV YYCMQFTHYP  
YTFGAGTKLE LK

#### 【0191】

##### B . C D 3 結合能力

一実施形態では、本発明の二重特異性、三重特異性又は多重特異性B 7 H 3結合分子は

50

、 B 7 H 3 のエピトープ及び C D 3 のエピトープに結合できる。 C D 3 は、 4 つの別個の鎖で構成された T 細胞共受容体である ( Wucherpfennig, K.W. et al. (2010) “ Structural Biology Of The T-Cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling, ” Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2 (4):a005140; pages 1-14 )。哺乳類では、この複合体は 1 つの C D 3 鎖、 1 つの C D 3 鎖及び 2 つの C D 3 鎖を含有する。これらの鎖は、 T 細胞受容体 ( T C R ) として知られる分子と会合して、 T リンパ球において活性化シグナルを生成する。 C D 3 の不在時、 T C R は適切に集合せず崩壊する ( Thomas, S. et al. (2010) “ Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer, ” Immunology 129(2):170-177)。 CD3 is found bound to the membranes of all mature T-cells, and in virtually no other cell type (see, Janeway, C.A. et al. (2005) In: Immunobiology: The Immune System In Health And Disease, ” 6th ed. Garland Science Publishing, NY, pp. 214- 216; Sun, Z. J. et al. (2001) “ Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3 : Heterodimer, ” Cell 105(7):913-923; Kuhns, M.S. et al. (2006) “ Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex, ” Immunity. 2006 Feb;24(2):133-139 )。 C D 3 に特異的に結合する分子としては、抗 C D 3 抗体「 C D 3 m A b 1 」及び「 O K T 3 」が挙げられる。抗 C D 3 抗体 C D 3 m A b 1 は、非ヒト霊長類 (例えばカニクイザル) に結合できる。

10

20

## 【 0 1 9 2 】

C D 3 m A b 1 の V H ドメイン V H ( 1 ) のアミノ酸配列 ( 配列番号 6 5 ) を以下に示す ( C D R H 残基は下線を付して示されている ) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR  
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

## 【 0 1 9 3 】

C D 3 m A b 1 の代替的な V H ドメイン V H ( 2 ) のアミノ酸配列 ( 配列番号 6 6 ) を以下に示す ( C D R H 残基は下線を付して示されており、 C D 3 m A b 1 の V H ドメイン V H ( 1 ) との差異は二重下線を付して示されている ) :

30

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFNTTYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSS

## 【 0 1 9 4 】

C D 3 m A b 1 の V L ドメインのアミノ酸配列 ( 配列番号 6 7 ) を以下に示す ( C D R L 残基は下線を付して示されている ) :

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
GGGTKLTVLG

## 【 0 1 9 5 】

40

C D 3 m A b 1 の V H ドメイン V H ( 1 ) ( 配列番号 6 5 ) を C D 3 m A b 1 の V L ドメイン ( 配列番号 6 7 ) と共に用いて、本発明による官能性 C D 3 結合分子を形成できる。同様に、 C D 3 m A b 1 の V H ドメイン V H ( 2 ) ( 配列番号 6 6 ) を C D 3 m A b 1 の V L ドメイン ( 配列番号 6 7 ) と共に用いて、本発明による官能性 C D 3 結合分子を形成できる。

## 【 0 1 9 6 】

以下に記載されるように、本発明をより良好に説明するために、二重特異性 B 7 H 3 × C D 3 結合分子を生成した。 B 7 H 3 × C D 3 構造のうちいくつかでは、 C D 3 m A b 1 の変異型を採用した。変異型「 C D 3 m A b 1 ( D 6 5 G ) 」は、 C D 3 m A b 1 の V L ドメイン ( 配列番号 6 7 ) と、 D 6 5 G 置換 ( K a b a t 位置 6 5、配列

50

番号65の残基68に対応)を有するCD3 mAb 1のVHドメインとを含む。CD3 mAb 1 (D65G)のVHドメインのアミノ酸配列(配列番号68)を以下に示す(CDR<sub>H</sub>残基は下線を付して示されており、置換位置(D65G)は二重下線を付して示されている) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR  
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVS WFAYWGQGT L VTVSS

【0197】

あるいは、CD3 mAb 1の親和性変異型を組み込んでよい。変異型としては、「CD3 mAb 1 Low」と称される低親和性変異型、及び「CD3 mAb 1 Fast」と称される、より速いオフレートを有する変異型が挙げられる。CD3 mAb 1のVLドメイン(配列番号67)は、CD3 mAb 1 Low及びCD3 mAb 1 Fastに共通であり、上で提示されている。CD3 mAb 1 Low及びCD3 mAb 1 FastそれぞれのVHドメインのアミノ酸配列を以下に提示する。

【0198】

抗ヒトCD3 mAb 1 LowのVHドメインのアミノ酸配列(配列番号69)を以下に示す(CDR<sub>H</sub>残基は下線を付して示されており、CD3 mAb 1のVHドメインVH(1)(配列番号65)との差異は二重下線を付して示されている) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR  
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HGNFGNSYVT WFAYWGQGT L VTVSS

【0199】

抗ヒトCD3 mAb 1 FastのVH鎖ドメインのアミノ酸配列(配列番号70)を以下に示す(CDR<sub>H</sub>残基は下線を付して示されており、CD3 mAb 1のVHドメインVH(1)(配列番号65)との差異は二重下線を付して示されている) :

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR  
IRSKYNNYAT YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR  
HKNFGNSYVT WFAYWGQGT L VTVSS

【0200】

利用できる別の抗CD3抗体は、抗体ムロモナブ CD3である(Xu et al. (2000) "In Vitro Characterization Of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies," Cell. Immunol. 200:16-26); Norman, D.J. (1995) "Mechanisms Of Action And Overview Of OKT3," Ther. Drug Monit. 17(6):615-620; Canafax, D.M. et al. (1987) "Monoclonal Antilymphocyte Antibody (OKT3) Treatment Of Acute Renal Allograft Rejection," Pharmacotherapy 7(4):121-124; Swinnen, L.J. et al. (1993) "OKT3 Monoclonal Antibodies Induce Interleukin-6 And Interleukin-10: A Possible Cause Of Lymphoproliferative Disorders Associated With Transplantation," Curr. Opin. Nephrol. Hypertens. 2(4):670-678)。

【0201】

OKT3のVHドメインのアミノ酸配列(配列番号71)を以下に示す(CDR<sub>H</sub>残基は下線を付して示されている) :

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY  
INPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYY  
DDHYCLDYWG QGTTLTVSS

【0202】

OKT3のVLドメインのアミノ酸配列(配列番号72)を以下に示す(CDR<sub>L</sub>残基は下線を付して示されている) :

QIVLTQSPAI MSASPGKVT MTCSASSSVSYMNWYQQKSG TSPKRWIYDT  
SKLASGVPAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQWSSNPFTFGSG  
TKLEINR

10

20

30

40

50

## 【 0 2 0 3 】

利用できる更なる抗 C D 3 抗体としては、国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 6 号及び国際公開第 2 0 0 5 / 1 1 8 6 3 5 号に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【 0 2 0 4 】

## C . C D 8 結合能力

一実施形態では、本発明の二重特異性、三重特異性又は多重特異性 B 7 H 3 結合分子は、B 7 H 3 のエピトープ及び C D 8 のエピトープに結合できる。C D 8 は、細胞毒性 T 細胞上に発現される、2 つの別個の鎖で構成された T 細胞共受容体である (Leahy, D.J., (1995) "A Structural View of CD4 and CD8," FASEB J., 9:17-25)。C D 8 T 細胞の活性化は、抗原：標的細胞の表面上に配置された主要組織適合性クラス I (major histocompatibility class I: M H C I) 分子複合体と、C D 8 + T 細胞の表面上に配置された C D 8 及び T 細胞受容体の複合体との間の、共刺激性相互作用によって仲介されることが分かっている (Gao, G., and Jakobsen, B., (2000). "Molecular interaction s of coreceptor CD8 and MHC class I: the molecular basis for functional coordination with the T-Cell Receptor". Immunol Today 21: 630-636)。特定の免疫系細胞のみによって発現される M H C I I 分子とは異なり、M H C I 分子は極めて広範に発現される。よって細胞毒性 T 細胞は、極めて多様な細胞タイプに結合できる。活性化された細胞毒性 T 細胞は、細胞毒素パーフォリン、グランザイム及びグラヌリシンを放出することにより、細胞殺滅を仲介する。C D 8 に特異的に結合する抗体としては、抗 C D 8 抗体「O K T 8」及び「T R X 2」が挙げられる。

## 【 0 2 0 5 】

O K T 8 の V H ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 7 3) を以下に示す (C D R H 残基は下線を付して示されている) :

QVQLLESGPE LLKPGASVKM SCKASGYTFTDYNMHWVKQS HGKSLEWIGY  
IYPYTGGTGYNQKFKNKATL TVDSSSTAY MELRSLTSED SAVYYCARNF  
RYTYWYFDVW GQGTTVTVSS

## 【 0 2 0 6 】

O K T 8 の V L ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 7 4) を以下に示す (C D R L 残基は下線を付して示されている) :

DIVMTQSPAS LAVSLGQRAT ISCRASESVD SYDNSLMHWY QQKPGQPPKV  
LIYLASNLES GVPARFSGSG SRTDFTLTID PVEADDAATY YCQQNNEDPY  
IFGGGKLEI KR

## 【 0 2 0 7 】

T R X 2 の V H ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 7 5) を以下に示す (C D R H 残基は下線を付して示されている) :

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DFGMNVWRQA PGKGLEWVAL  
IYYDGSNKFYADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH  
YDGYHFFDS WGQGTLVTVS S

## 【 0 2 0 8 】

T R X 2 の V L ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 7 6) を以下に示す (C D R L 残基は下線を付して示されている) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDINNYLAWYQQKP GKAPKLLIYN  
TDILHTGVPS RFGSGSGGTD FTFTISLQP EDIATYYCYQ YNNGYTFGGG  
TKVEIK

## 【 0 2 0 9 】

## D . C D 1 6 結合能力

一実施形態では、本発明の多重特異性 B 7 H 3 結合分子は、B 7 H 3 のエピトープ及び C D 1 6 のエピトープに結合できる。C D 1 6 は F c R I I I A 受容体である。C D 1 6 は、好中球、好酸球、ナチュラルキラー (N K) 細胞、及び凝集しているもののモノ

マー性ではない組織マクロファージによって発現される (Peltz, G.A. et al. (1989) " Human Fc Gamma RIII: Cloning, Expression, And Identification Of The Chromosomal Locus Of Two Fc Receptors For IgG," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86(3): 1013-1017; Bachanova, V. et al. (2014) " NK Cells In Therapy Of Cancer," Crit. Rev. Oncog. 19(1-2):133-141; Miller, J.S. (2013) " Therapeutic Applications: Natural Killer Cells In The Clinic," Hematology Am. Soc. Hematol. Educ. Progr am. 2013:247-253; Youinou, P. et al. (2002) " Pathogenic Effects Of Anti-Fc Gamma Receptor IIIB (CD16) On Polymorphonuclear Neutrophils In Non-Organ-Specific Autoimmune Diseases," Autoimmun Rev. 1(1-2):13-19; Peipp, M. et al. (2002) " Bispecific Antibodies Targeting Cancer Cells," Biochem. Soc. Trans. 30(4):507-511)。CD 16 に特異的に結合する分子としては、抗 CD 16 抗体「3 G 8」及び「A 9」が挙げられる。ヒト化 A 9 抗体は、国際公開第 03 / 101485 号に記載されている。

## 【0210】

3 G 8 の V H ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 77) を以下に示す (CDRH 残基は下線を付して示されている) :

QVTLKESGPG ILQPSQTLSL TCSFSGFSLR TSGMGVGVWIR QPSGKGLEWL  
 AHIWWDDDKRYNPALKSRLT ISKDTSSNQV FLKIASVDTA DTATYYCAQI  
 NPAWFAYWGQ GTLVTVSA

## 【0211】

3 G 8 の V L ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 78) を以下に示す (CDRL 残基は下線を付して示されている) :

DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVDFDGDSEFMNWY QQKPGQPPKL  
 LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQQSNEDPY  
 IFGGGKLEI K

## 【0212】

A 9 の V H ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 79) を以下に示す (CDRH 残基は下線を付して示されている) :

QVQLQQSGAE LVRPGTSVKI SCKASGYTFT NYWLGWVKQR PGHGLEWIGD  
 IYPGGGYTNYNEKFKGKATV TADTSSRTAY VQVRSLTSED SAVYFCARSA  
 SWYFDVWGAR TTVTSS

## 【0213】

A 9 の V L ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 80) を以下に示す (CDRL 残基は下線を付して示されている) :

DIQAVVTQES ALTTSPGETV TLTCRSNTGIVTTSNYANWV QEKPDHLFTG  
 LIGHTNNRAP GVPARFSGSL IGDKAALTIT GAQTEDEAIY FCALWYNNHW  
 VFGGGKLTV L

## 【0214】

利用できる更なる抗 CD 19 抗体としては、国際公開第 03 / 101485 号及び国際公開第 2006 / 125668 号に記載されているものが挙げられるが、これらに限定されない。

## 【0215】

## E . TCR 結合能力

一実施形態では、本発明の二重特異性、三重特異性又は多重特異性 B7 H3 結合分子は、B7 H3 のエピトープ及び T 細胞受容体 (TCR) のエピトープに結合できる。T 細胞受容体は、CD4 + 又は CD8 + T 細胞によって天然で発現され、上記細胞が、抗原提示細胞のクラス I 又はクラス II MHC タンパク質によって結合及び提示される抗原性ペプチドを認識できるようにする。TCR による pMHC (ペプチド MHC) 複合体の認識により細胞免疫応答の伝播が開始され、これは抗原提示細胞のサイトカイン産生及び溶解につながる (例えば Armstrong, K.M. et al. (2008) " Conformational Changes

And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide-MHC Complexes, " *Biochem. J.* 415(Pt 2):183-196; Willemsen, R. (2008) " Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy, " *Cytometry A.* 73(11):1093-1099; Beier, K.C. et al. (2007) " Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation, " *Eur. Respir. J.* 29:804-812; Mallone, R. et al. (2005) " Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes, " *Am. J. Ther.* 12(6):534-550を参照)。CD3はTCRに結合する受容体である(Thomas, S. et al. (2010) " Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer, " *Immunology* 129(2):170-177; Guy, C.S. et al. (2009) " Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex, " *Immunol. Rev.* 232(1):7-21; St. Clair, E. W. (Epub 2009 Oct 12) " Novel Targeted Therapies For Autoimmunity, " *Curr. Opin. Immunol.* 21(6):648-657; Baeuerle, P.A. et al. (Epub 2009 Jun 9) " Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy, " *Cancer Res.* 69(12):4941-4944; Smith-Garvin, J.E. et al. (2009) " T Cell Activation, " *Annu. Rev. Immunol.* 27:591-619; Renders, L. et al. (2003) " Engineered CD3 Antibodies For Immunosuppression, " *Clin. Exp. Immunol.* 133(3):307-309)。

【0216】

T細胞受容体に特異的に結合する分子としては、抗TCR抗体「BMA031」が挙げられる(欧州特許第0403156号; Kurrle, R. et al. (1989) " BMA 031 - A TCR-Specific Monoclonal Antibody For Clinical Application, " *Transplant Proc.* 21(1 Pt 1):1017-1019; Nashan, B. et al. (1987) " Fine Specificity Of A Panel Of Antibodies Against The TCR/CD3 Complex, " *Transplant Proc.* 19(5):4270-4272; Shearman, C.W. et al. (1991) " Construction, Expression, And Biologic Activity Of Murine/Human Chimeric Antibodies With Specificity For The Human / T Cell, " *J. Immunol.* 146(3):928-935; Shearman, C.W. et al. (1991) " Construction, Expression And Characterization of Humanized Antibodies Directed Against The Human / T Cell Receptor, " *J. Immunol.* 147(12):4366-4373)。

【0217】

BMA031のVHドメインのアミノ酸配列(配列番号81)を以下に示す(CDRH残基は下線を付して示されている):

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYKFT SYVMHWVRQA PGQGLEWIGY  
INPYNDVTKY NEKFKGRVTI TADKSTSTAY LQMNSLRSED TAVHYCARGS  
YYDYDGFVYW GQGTLVTVSS

【0218】

BMA031のVLドメインのアミノ酸配列(配列番号82)を以下に示す(CDRL残基は下線を付して示されている):

EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCSATSSVS YMHWYQQKPG KAPKRWIYDT  
SKLASGVPSR FSGSGSGTEF TLTISLQPE DFATYYCQQW SSNPLTFGQG  
 TKLEIK

【0219】

F . NKG2D結合能力

一実施形態では、本発明の多重特異性 B7 H3 結合分子は、B7 H3のエピトープ及びNKG2D受容体のエピトープに結合できる。NKG2D受容体は全てのヒト(及び他の哺乳類)ナチュラルキラー細胞上(Bauer, S. et al. (1999) " Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA, " *Science* 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. et al. (2002) " The Role Of The NKG2D Immune Receptor In Immune Cell Activation And Natural Killing, " *Immunity* 17(1):19-29)、及び全てのCD8+ T細胞上(Groh, V. et al. (2001) " Costimulation Of CD8 T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC Induced On Virus-Infected

10

20

30

40

50

Cells,” Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. et al. (2002) “The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing,” Immunity 17(1):19-29) で発現される。このような結合リガンド、及び特に正常な細胞上に発現されるものとしては、組織適合性 60 (H60) 分子、レチノイン酸初期誘導性遺伝子 1 (retinoic acid early inducible gene-1: RAE 1) の産物、及びマウス UL16 結合タンパク質様転写物 1 (MUL T 1) が挙げられる (Raulet D.H. (2003) “Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands,” Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. et al. (2005) “Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells,” Blood 106:1711-1717)。NKG2D 受容体に特異的に結合する分子としては、抗 NKG2D 抗体「KYK 1.0」及び「KYK 2.0」が挙げられる (Kwong, KY et al. (2008) “Generation, Affinity Maturation, And Characterization Of A Human Anti-Human NKG2D Monoclonal Antibody With Dual Antagonistic And Agonistic Activity,” J. Mol. Biol. 384:1143-1156; 及び国際公開 PCT/US09/54911 号)。

## 【0220】

KYK 1.0 の VH ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 83) を以下に示す (CDRH 残基は下線を付して示されている) :

EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAE  
IRYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTKY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR  
EGYYLDYWGQ GTLVTVSS

## 【0221】

KYK 1.0 の VL ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 84) を以下に示す (CDRL 残基は下線を付して示されている) :

QPVLTPQSSV SVAPGETARI PCGGDDIETKSVHWYQQKPG QAPVLVIYDD  
DDRPSGIPER FFGSNSGNTA TLSISRVEAG DEADYYCQVWDDNNDDEWVFG  
GGTQLTVL

## 【0222】

KYK 2.0 の VH ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 85) を以下に示す (CDRH 残基は下線を付して示されている) :

QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAE  
IRYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR  
GLGDGTYFDYWGQGTTVTVS S

## 【0223】

KYK 2.0 の VL ドメインのアミノ酸配列 (配列番号 86) を以下に示す (CDRL 残基は下線を付して示されている) :

QSALTQPASV SGSPGQSITI SCSSSSNIGNNAVNWYQQL PGKAPKLLIY  
YDLLPSGVS DRFSGSKSGT SAFLAISGLQ SEDEADYYCAAWDDSLNGPV  
FGGGTKLTVL

## 【0224】

IX. 多重特異性 B7 H3 結合分子

A. B7 H3 × CD3 二重特異性 2 鎖ダイアボディ

上述の B7 H3 結合分子の VL 及び VH ドメインを用いて、2 つの共有結合したポリペプチド鎖からなる B7 H3 × CD3 二重特異性ダイアボディを構成してよい。本発明のこの態様を例示するために、上述の抗 B7 H3 mAb D 抗体の VL 及び VH ドメインを用いて、2 つの共有結合したポリペプチド鎖からなり、かつ mAb D の上述のマウス又はヒト化 VL 及び VH ドメインを含む、B7 H3 × CD3 二重特異性ダイアボディを構成する。このような B7 H3 × CD3 二重特異性ダイアボディの一般構造及びアミノ酸配列を以下に提示する。

## 【0225】

10

20

30

40

50

ある例示的な B7 H3 x CD3 二重特異性 2 鎖ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端へ方向に：N 末端；抗 B7 H3 抗体の VL ドメイン（例えば mA b D VL（配列番号 22）又は h mA b D VL（配列番号 30））；介在スペーサペプチド（リンカー 1：GGGSGGGG（配列番号 32））；抗 CD3 抗体の VH ドメイン（例えば CD3 mA b 1（D65G）（配列番号 68））；システイン含有介在スペーサペプチド（リンカー 2：GGCGGG（配列番号 33））；ヘテロ二量体促進（例えば E コイル）ドメイン（EVAALEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK（配列番号 45））；及び C 末端を含む。

【0226】

このような例示的な B7 H3 x CD3 二重特異性 2 鎖ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端へ方向に：N 末端；対応する抗 CD3 抗体の VL ドメイン（例えば第 1 のポリペプチド鎖の VH ドメインと会合して CD3 結合部位を形成する VL ドメイン、例えば CD3 mA b 1 の VL ドメイン（配列番号 67））；介在スペーサペプチド（リンカー 1：GGGSGGGG（配列番号 32））；対応する抗 B7 H3 抗体の VH ドメイン（例えば第 1 のポリペプチド鎖の VL ドメインと会合して B7 H3 結合部位を形成する VH ドメイン、例えば mA b D VH（配列番号 26）又は h mA b D VH（配列番号 31））；システイン含有介在スペーサペプチド（リンカー 2：GGCGGG（配列番号 33））；ヘテロ二量体促進（例えば K コイル）ドメイン（KVAALKE KVAALKE KVAALKE KVAALKE（配列番号 46））；及び C 末端を含む。

【0227】

本明細書中に記載されているように、代替的なリンカー及び/又は代替的なヘテロ二量体促進ドメインは、このようなダイアボディの生成に利用できる。例えば、代替的な例示的な B7 H3 x CD3 二重特異性 2 鎖ダイアボディの第 1 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端へ方向に：N 末端；抗 B7 H3 抗体の VL ドメイン；介在スペーサペプチド（リンカー 1：GGGSGGGG（配列番号 32））；抗 CD3 抗体の、又は対応する抗 CD3 抗体の VH ドメイン；介在スペーサペプチド（リンカー 2：（配列番号 37））；システイン含有ヘテロ二量体促進（例えば K コイル）ドメイン（KVAACKK KVAALKE KVAALKE KVAALKE（配列番号 46））；及び C 末端を含んでよい。このような代替的な例示的なダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端へ方向に：N 末端；対応する抗 CD3 抗体の VL ドメイン；介在スペーサペプチド（リンカー 1：GGGSGGGG（配列番号 32））；対応する抗 B7 H3 抗体の VH ドメイン（例えば mA b D VH（配列番号 26）又は h mA b D VH（配列番号 31））；介在スペーサペプチド（リンカー 2：ASTKG（配列番号 37））；システイン含有ヘテロ二量体促進（例えば E コイル）ドメイン（EVAACEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK（配列番号 47））；及び C 末端を含んでよい。

【0228】

1. DART D1

h mA b C の VH 及び VL ドメインを含む代表的な B7 H3 x CD3 二重特異性 2 鎖ダイアボディ（「DART D1」）を構成する。

【0229】

DART D1 の第 1 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号 87）を以下に示す（h mA b C VL ドメインの配列（配列番号 20）には下線が付されている）：

DIQMTQSPSS LSASVGRVT ITCRASESIY SYLAWYQQKP GKAPKLLVYN  
TKTLPEGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQH HYGTPPWTFG  
QGTRLEIKGG GSGGGGEVQL VESGGGLVQP GGSRLSCAA SGFTFSTYAM  
 NWVRQAPGKG LEWVGRIRSK YNNYATYYAD SVKGRFTISR DDSKNSLYLQ  
 MNSLKTEDTA VYYCVRHGNF GNSYVSWFAY WGQGLVTVS SGGCGGGEVA  
 ALEKEVAALE KEVAALEKEV AALEK

【0230】

DART D1 の第 2 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号 88）を以下に示す（

h m A b C V Hドメインの配列（配列番号21）には下線が付されている）：  
 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLV KPGGSLRLSC AASGFTFSSY  
GMSWVRQAPG KGLEWVATIN SGGSNYYPD SLKGRFTISR DNAKNSLYLQ  
MNSLRAEDTA VYYCARHDGG AMDYWGGQTT VTVSSGGCGG GKVAALKEKV  
 AALKEKVAAL KEKVAALKE

【0231】

2. DART D2

h m A b DのVH及びVLドメインを含む代表的なB7 H3 × CD3二重特異性2鎖ダイアボディ（「DART D2」）を構成する。

【0232】

DART D2の第1のポリペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号89）を以下に示す（h m A b D VLドメインの配列（配列番号30）には下線が付されている）：

DIQMTQSPSFLSASVGRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALISY  
ASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFLTITSSLPEDFAEYFCQQYNNYPFTFGQ  
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN  
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM  
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS ASTKGEVAAC  
 EKEVAALKE VAALEKEVAA LEK

【0233】

DART D2の第2のポリペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号90）を以下に示す（h m A b D VHドメインの配列（配列番号31）には下線が付されている）：

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
 GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV QLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF  
GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSGTIYYADTVKGRFTISR DNAKNSLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCARHGYRYEGFDYWGGQTTVTVSSAST KGKVAACKEK  
 VAALKEKVAAL LKEKVAALKE

【0234】

本明細書で提示された教示に鑑みて、異なるドメイン配向、VHドメイン、VLドメイン、リンカー、及び/又はヘテロ二量体促進ドメインを利用して、代替的なB7 H3 × CD3二重特異性2鎖ダイアボディを生成できることが理解されるだろう。

【0235】

B. B7 H3 × CD3二重特異性3鎖ダイアボディ

3つの鎖を有し、かつFcドメインを有するB7 H3 × CD3ダイアボディを生成する。これは、（h m A b Dのヒト化VH及びVLドメインを含む）B7 H3に対して特異的な1つの結合部位と、（CD3 m A b 1（D65G）のVH及びVLドメインを含む）CD3に対して特異的な1つの結合部位とを含む。このダイアボディは「DART D3」と称される。

【0236】

例示的なB7 H3 × CD3二重特異性3鎖DART D3ダイアボディの第1のポリペプチド鎖は、N末端からC末端へ方向に：N末端；抗B7 H3抗体のVLドメイン（h m A b D VL（配列番号30））；介在スペーサペプチド（リンカー1：GGGSGGGG（配列番号32））；CD3 m A b 1（D65G）のVHドメイン（配列番号68）；介在スペーサペプチド（リンカー2：ASTKG（配列番号37））；システイン含有ヘテロ二量体促進（Eコイル）ドメイン（EVAACEK EVAALEK EVAALEK EVAALEK（配列番号47））；介在スペーサペプチド（リンカー3：GGGDKTHTCPPCP（配列番号57））；ノブ担持IgG1 CH2 CH3ドメイン（配列番号61）；及びC末端を含む。このポリペプチド鎖をエンコードするポリヌクレオチドは、配列番号61のC末端

10

20

30

40

50

リシン残基（即ち配列番号 61 の X）をエンコードし得るが、上述のようにこのリシン残基は、一部の発現系では翻訳後に除去され得る。従って本発明は、上記リシン残基を含有する上記第 1 のポリペプチド鎖（即ち X がリシンである配列番号 61）、及び上記リシン残基を含まない第 1 のポリペプチド鎖（即ち X が不在である配列番号 61）を包含する。このような第 1 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号 91）を以下に提示する（h m A b D V L ドメインの配列（配列番号 30）には下線が付されている）：

DIQMTQSPSFLSASVGDRTITCKASQNVDTNVAWYQQKPKGKAPKALIYS  
ASYRYSQVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFAEYFCQQYNNYPFTFGQ  
GTKLEIKGGG SGGGGEVQLV ESGGLVQPG GSLRLSCAAS GFTFSTYAMN  
 WVRQAPGKGL EWVGRIRSKY NNYATYYADS VKGRFTISR DSKNSLYLQM  
 NSLKTEDTAV YYCVRHGNFG NSYVSWFAYW GQGTLVTVSS ASTKGEVAAC  
 EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEKGGGDKTH TCPPCPAPEA AGGPSVFLFP  
 PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE  
 QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR  
 EPQVYTLPPS REEMTKNQVS LWCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT  
 PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSL  
 SLS  
 PGX

10

ここで X はリシン（K）であるか、又は不在である。

【0237】

この例示的な B7 H3 × CD3 二重特異性 3 鎖 DART D3 ダイアボディの第 2 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；CD3 mAb 1 の VLD 領域（配列番号 67）；介在スペーサペプチド（リンカー 1：GGGSGGGG（配列番号 32））；抗 B7 H3 抗体の VH ドメイン（h m A b D V H（配列番号 31））；介在スペーサペプチド（リンカー 2：ASTKG（配列番号 37））；システイン含有ヘテロ二量体促進（K コイル）ドメイン（KVAACKE KVAALKE KVAALKE KVAALKE（配列番号 48））；及び C 末端を含む。このような第 2 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号 92）を以下に提示する（h m A b D V H ドメインの配列（配列番号 31）には下線が付されている）：

20

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI  
GGTNKRAPWT PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF  
GGGTKLTVLG GGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSF  
GMHWVRQAPGKGLEWVAYISSGSGTIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQ  
MNSLRAEDTAVYYCARHGYRYEGFDYWGQGTTVTVSSAST KGKVAACKEK  
 VAALKEKVAA LKEKVAALKE

30

【0238】

この例示的な B7 H3 × CD3 二重特異性 3 鎖 DART D3 ダイアボディの第 3 のポリペプチド鎖は、N 末端から C 末端への方に：N 末端；スペーサペプチド（DKTHTCPP CP（配列番号 56））；ホール担持 IgG1 CH2 CH3 ドメイン（配列番号 62）；及び C 末端を含む。このポリペプチド鎖をエンコードするポリヌクレオチドは、配列番号 62 の C 末端リシン残基（即ち配列番号 62 の X）をエンコードし得るが、上述のようにこのリシン残基は、一部の発現系では翻訳後に除去され得る。従って本発明は、上記リシン残基を含有する上記第 3 のポリペプチド鎖（即ち X がリシンである配列番号 62）、及び上記リシン残基を含まない第 3 のポリペプチド鎖（即ち X が不在である配列番号 62）を包含する。このような第 3 のポリペプチド鎖のアミノ酸配列（配列番号 93）を以下に提示する：

40

DKTHTCPPCP APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED  
 PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK  
 CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSREEMTK NQVLSLCAVK  
 GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKL TVDKSRWQQG  
 NVFSCSVMHE ALHNRYSYQKS LSLSPGX

50

ここでXはリシン(K)であるか、又は不在である。

【0239】

本明細書で提示された教示に鑑みて、異なるドメイン配向、VHドメイン、VLドメイン、リンカー、及びノ又はヘテロ二量体促進ドメインを利用して、代替的なB7 H3 x CD3二重特異性3鎖ダイアボディを生成できることが理解されるだろう。特にh m A b CのVHドメイン及びVLドメイン(配列番号20~21)を利用できる。

【0240】

C . B7 H3 x CD3 x CD8 3価結合分子

例示的な3価「B7 H3 x CD3 x CD8」結合分子は、(上述のように親及びノ又はヒト化抗B7 H3 VLドメイン並びに対応する抗B7 H3 VHドメインを含む) B7 H3に対して特異的な1つの結合部位と、(例えばCD3 m A b 1のVLドメイン(配列番号67)及び抗CD3抗体のVHドメイン(例えばCD3 m A b 1(D65G)(配列番号68))を含む)CD3に対して特異的な1つの結合部位と、(例えばTRX2のVH及びVLドメイン(それぞれ配列番号75及び76)を含む)CD8に対して特異的な1つの結合部位を有する。このような3価結合分子は、2つのポリペプチド鎖(例えば図6E及び図6Fを参照)、3つのポリペプチド鎖(例えば図6C及び図6Dを参照)、4つのポリペプチド鎖(例えば図6A及び図6Bを参照)、又は5つのポリペプチド鎖(例えば図5を参照)を有してよい。

【0241】

X . 産生方法

最も好ましくは、本発明のB7 H3結合分子は、当該技術分野において公知であるように、上記ポリペプチドをエンコードする核酸分子の組み換え発現によって産生される。

【0242】

本発明のポリペプチドは、固相ペプチド合成を用いて便利に調製できる(Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis," Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15): 5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century," Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10)。

【0243】

ある代替案では、当該技術分野において公知の方法を用いて、抗体を組み換えによって作製し、発現させてよい。抗体は、まず宿主動物から作製された抗体を単離し、遺伝子配列を取得し、上記遺伝子配列を使用して宿主細胞(例えばCHO細胞)内で抗体を組み換え発現させることによって作製できる。採用できる別の方法は、植物(例えばタバコ)又はトランスジェニックミルク中で抗体配列を発現させることである。植物又はミルク中で抗体を組み換え発現させるための好適な方法は、開示されている(例えばPeeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants," Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice," Int. Rev. Immunol 13:65-93; and Pollock et al. (1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies," J. Immunol Methods 231: 147-157を参照)。例えばヒト化、単鎖等の抗体の誘導体を作製するための好適な方法は、当該技術分野において公知であり、また上述されている。別の代替案では、抗体はファージディスプレイ技術によって、組み換えによって作製できる(例えば米国特許第5,565,332号;米国特許第5,580,717号;米国特許第5,733,743号;米国特許第6,265,150号;及びWinter, G. et al. (1994) "Making Antibodies By Phage Display Technology," Annu. Rev. Immunol. 12:433-455を参照)。

【0244】

関心対象のポリヌクレオチドを含有するベクター(例えば本発明のB7 H3結合分子のポリペプチドをエンコードするポリヌクレオチド)は:電気穿孔;塩化カルシウム、塩化

10

20

30

40

50

ルビジウム、リン酸カルシウム、D E A E デキストラン又は他の物質を使用したトランスフェクション；微粒子銃；リポフェクション；及び感染（例えばベクターがワクシニアウイルス等の感染性因子である場合）を含む多数の適切な手段のうちのいずれによって、宿主細胞に導入できる。ベクター又はポリヌクレオチドの導入の選択は、宿主細胞の特徴に左右される場合が多い。

【0245】

ポリペプチド、又はタンパク質を発現する目的で、異種DNAを過剰発現できるいずれの宿主細胞を使用できる。好適な哺乳類宿主細胞の非限定的な例としては、COS、HeLa及びCHO細胞が挙げられるが、これらに限定されない。

【0246】

本発明は、本発明のB7 H3結合分子のアミノ酸配列を含むポリペプチドを含む。本発明のポリペプチドは、当該技術分野において公知の手順で産生できる。上記ポリペプチドは、抗体のタンパク質分解若しくは他の分解によって、上述のような組み換え法（即ち単一若しくは融合ポリペプチド）によって、又は化学的合成によって産生できる。上記抗体のポリペプチド、特にアミノ酸最高約50個分の比較的短いポリペプチドは、化学的合成によって便利に作製される。化学的合成方法は当該技術分野において公知であり、市販されている。

【0247】

本発明は、B7 H3結合分子（上記分子の特性に有意な影響を及ぼさない、機能的に同等のポリペプチド、及び活性が増強した又は低下した変異型を含む）を含んでよい。ポリペプチドの修飾は、当該技術分野において慣用的に実践されており、本明細書で詳細に説明する必要はない。修飾されたポリペプチドの例としては、アミノ酸残基の保存的置換を有するポリペプチド、機能的活性を大きく劣化するように変化させない1つ若しくは複数の欠失若しくは追加、又は化学的類似体の使用が挙げられる。互いを保存的に置換できるアミノ酸残基としては：グリシン/アラニン；セリン/トレオニン；バリン/イソロイシン/ロイシン；アスパラギン/グルタミン；アスパラギン酸/グルタミン酸；リシン/アルギニン；及びフェニルアラニン/チロシンが挙げられるが、これらに限定されない。これらのポリペプチドとしては、グリコシル化及び非グリコシル化ポリペプチド、並びに例えば異なる複数の糖によるグリコシル化、アセチル化及びリン酸化といった、その他の変換後修飾を有するポリペプチドも挙げられる。好ましくは、アミノ酸置換は保存的であり、即ち置換されたアミノ酸は、オリジナルのアミノ酸と同様の化学的特性を有する。このような保存的置換は当該技術分野において公知であり、その例は上述されている。アミノ酸修飾は、1つ又は複数のアミノ酸を変化させるか又は修飾することから、可変ドメイン等の領域の完全な再設計にまで及んでよい。可変ドメインの変化は、結合親和性及び/又は特異性を変化させる。他の修飾方法としては、酵素的手段、酸化置換及びキレート化を含むがこれらに限定されない、当該技術分野において公知の連結技術の使用が挙げられる。修飾は例えば、イムノアッセイのための標識の付与、例えばラジオイムノアッセイのための放射性部分の付与等のために使用できる。修飾されたポリペプチドは、当該技術分野において確立された手順を用いて作製され、また当該技術分野において公知の標準的なアッセイを用いてスクリーニングできる。

【0248】

本発明は、本発明の抗B7 H3 VL及び/又はVHのうちの1つ又は複数を含む融合タンパク質も包含する。一実施形態では、軽鎖、重鎖又は軽鎖及び重鎖の両方を含む、融合ポリペプチドが提供される。別の実施形態では、融合ポリペプチドは、異種免疫グロブリン定常領域を含有する。別の実施形態では、融合ポリペプチドは、公的に寄託されたハイブリドーマから産生された抗体の軽鎖可変ドメイン及び重鎖可変ドメインを含有する。本発明の目的のために、抗体融合タンパク質は、B7 H3と、ネイティブ分子内では上記抗体融合タンパク質が付着しない別のアミノ酸配列、例えば別の領域からの異種配列又は同種配列とに特異的に結合する、1つ又は複数のポリペプチドドメインを含有する。

【0249】

10

20

30

40

50

本発明は特に、診断用又は治療用部分にコンジュゲートした B7 H3 結合分子（例えば抗体、ダイアボディ、3 価結合分子等）を包含する。診断目的のために、本発明の B7 H3 結合分子を、検出可能な物質と結合させてよい。このような B7 H3 結合分子は、ある特定の療法の効力の決定等、臨床試験手順の一部としての疾患の発現又は進行の監視及び/又は予後判定に有用である。検出可能な物質の例としては、様々な酵素（例えば西洋ワサビペルオキシダーゼ、ガラクトシダーゼ等）、補綴基（例えばアビジン/ビオチン）、蛍光材料（例えばウンベリフェロン、フルオレセイン又はフィコエリトリン）、ルミネッセンス材料（例えばルミノール）、生物発光物質（例えばルシフェラーゼ又はエクオリン）、放射性物質（例えば炭素 14、マンガン 54、ストロンチウム 85 又は亜鉛 65）、陽電子放出金属、及び非放射性常磁性金属イオンが挙げられる。検出可能な物質は、当該技術分野で公知の技法を用いて、B7 H3 結合分子に直接、又は仲介物（例えばリンカー）を介して間接的に、結合又はコンジュゲートしてよい。

10

#### 【0250】

治療目的のために、本発明の B7 H3 結合分子を、細胞毒素（例えば細胞常食抑制剤若しくは細胞破壊剤）、治療剤又は例えば エミッタである放射性金属イオンといった、治療用部分にコンジュゲートしてよい。細胞毒素又は細胞毒性剤としては、例えばシュードモナス外毒素、ジフテリア毒素、ボツリヌス毒素 A ~ F、リシン、アブリン、サボリン及びこれらの作用剤の細胞毒性断片といった、細胞に対して有害ないずれの作用剤が挙げられる。治療剤としては、障害を予防的又は治療的に処置する治療効果を有するいずれの作用剤が挙げられる。このような治療剤は、化学療法剤、タンパク質又はポリペプチド治療剤であってよく、所望の生物活性を有する、及び/又は所与の生物学的応答を修飾する、治療剤を含んでよい。治療剤の例としては、アルキル化剤、血管新生阻害剤、抗有糸分裂剤、ホルモン療法剤、及び細胞増殖性障害の治療に有用な抗体が挙げられる。上記治療用部分は、当該技術分野で公知の技法を用いて、B7 H3 結合分子に直接、又は仲介物（例えばリンカー）を介して間接的に、結合又はコンジュゲートしてよい。

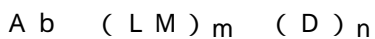
20

#### 【0251】

##### XI. 抗体薬物コンジュゲート

本発明は、治療用抗ヒト B7 H3 抗体（又はその B7 H3 結合ドメイン）に関し、特に薬物にコンジュゲートされた上述の抗ヒト B7 H3 抗体又はその B7 H3 結合ドメイン（「B7 H3 ADC」分子）のうちのいずれに関する。このような B7 H3 ADC は、特に癌の治療において、抗ヒト B7 H3 療法の細胞毒性を増強する。上述のように、本発明の B7 H3 ADC 分子は、式：

30



を含み：

Ab は、ヒト化可変重鎖 (VH) ドメイン及びヒト化可変軽鎖 (VL) ドメインを含む B7 H3 に結合する抗体、又はその B7 H3 結合断片であり；

D は、細胞毒性薬物部分であり；

LM は、上記 Ab 及び上記 D を共有結合させる結合又はリンカー分子であり；

m は 0 ~ n の整数であって、上記 B7 H3 ADC のリンカー分子の数を表し；

n は 1 ~ 10 の整数であって、B7 H3 ADC 分子に共有結合した上記細胞毒性薬物部分の数を表す。

40

#### 【0252】

好ましい実施形態では、B7 H3 ADC は、B7 H3 を発現する腫瘍細胞に結合して、受容体仲介型エンドサイトーシスによって上記細胞内に内在化される。B7 H3 ADC はリソソーム内に入ると、好ましくは崩壊して、上記細胞内で細胞毒性薬物部分の放出を引き起こし、細胞死をもたらす。理解されるように、この細胞死の作用の機序は、使用される細胞毒性薬物のクラス（例えばマイタンシン及びオーリスタチンといったチューブリン重合阻害剤による細胞質分裂の中断、カリケアミシン及びデュオカルマイシンといった DNA 相互作用剤による DNA 損傷）等に基づいて変化し得る。バイスタンダー効果 (bystander effect) として公知のプロセスにおいて、遊離薬物が死細胞によって腫瘍

50

環境に放出されると、隣接する癌細胞も死滅し得る (Panowski, S. et al. (2014) "Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy," mAbs 6(1):34-45; Kovtun, Y.V. et al. (2006) "Antibody-Drug Conjugates Designed To Eradicate Tumors With Homogeneous And Heterogeneous Expression Of The Target Antigen," Cancer Res. 66:3214-3221)。

【0253】

本発明の B7 H3 ADC は Fc ドメインを含んでよく、これは天然発生の Fc ドメインであってよく、又は天然発生の Fc ドメインとは1つ又は複数の差異がある配列を有してよく、また完全 Fc ドメイン (例えば完全 IgG Fc ドメイン) 又は完全 Fc ドメインの一部分のみであってよい。このような Fc ドメインは、いずれのアイソタイプのもの (例えば IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4) であってよい。このような Fc ドメインは、CH3 ドメインの C 末端リシン残基を含んでも含まなくてもよい。本発明の B7 H3 ADC は更に、CH1 ドメイン及び/又はヒンジドメインを含んでよい。CH1 ドメイン及び/又はヒンジドメインが存在する場合、これはいずれのアイソタイプのもの (例えば IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4) であってよく、好ましくは所望の Fc ドメインと同一のアイソタイプのものとする。

10

【0254】

A. 例示的な本発明のリンカー分子

よって本発明は特に、上記リンカー分子 LM が不在である (即ち  $m = 0$  である) 上記 B7 H3 ADC、並びに2つ以上の上記リンカー分子 LM を有し (即ち  $m$  が  $2 \sim n$  の整数であり、 $n$  が  $2 \sim 10$  の整数であり)、各上記リンカー分子 LM は、上記 B7 H3 ADC の上記細胞毒性薬物部分 D 及び上記 Ab を共有結合させる、上記 B7 H3 ADC について考察する。

20

【0255】

本発明は更に、上記 Ab が2つ以上の上記リンカー分子 LM と共有結合し、上記リンカー分子が全て同一である、B7 H3 ADC を提供する。上記 B7 H3 ADC の上記 Ab と共有結合する上記細胞毒性薬物部分 D は、全て同一であってよく、又は2つ、3つ、4つ若しくは5つ以上の、個々に異なる上記細胞毒性薬物部分 D を含んでよい。

【0256】

本発明は更に、上記 Ab が2つ以上の上記リンカー分子 LM と共有結合し、上記リンカー分子が個々に異なってよい、上記 B7 H3 ADC を提供する。上記 B7 H3 ADC の上記 Ab と共有結合する上記細胞毒性薬物部分 D は、全て同一であってよく、又は2つ、3つ、4つ若しくは5つ以上の、個々に異なる上記細胞毒性薬物部分 D を含んでよい。

30

【0257】

ヒト B7 H3 に結合する抗体の例示的なヒト化 VH 及び VL ドメイン、並びに本発明の B7 H3 ADC に含まれ得る例示的なヒト抗体定常ドメインは、既に提示されている。上述のように、本発明の B7 H3 ADC は更に、少なくとも1つの細胞毒性薬物部分を含み、これは好ましくは、上記 VH ドメイン若しくは VL ドメイン及び/又は定常ドメインのアミノ酸残基の側鎖の原子と、直接、又は上記側鎖原子と薬物部分との間に挿入されたリンカー分子を介して、共有結合する。このリンカー分子は、非ペプチド分子、又は非ペプチド部分及びペプチド部分を含む分子であってよく、又は上記リンカー分子は、アミノ酸残基のみからなる分子であってよい。いずれのこのようなリンカー分子のアミノ酸残基は、天然発生アミノ酸残基の D バージョン、p アセチルフェニルアラニン、セレノシステイン等を含む、天然発生の又は天然発生でないアミノ酸残基を含有してよい。任意に、又は更に、所望の側鎖 (例えば CH<sub>2</sub> SH 側鎖、CH<sub>2</sub> OH 側鎖、CH(CH<sub>2</sub>) SH 側鎖、CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> S CH<sub>3</sub> 側鎖、CH<sub>2</sub> C(O) NH<sub>2</sub> 側鎖、CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> C(O) NH<sub>2</sub> 側鎖、CH<sub>2</sub> C(O) OH 側鎖、CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> C(O) OH 側鎖、CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> NH<sub>2</sub> 側鎖、CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> CH<sub>2</sub> NH C(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub> 側鎖、イミダゾール側鎖、ベンジル側鎖、フェノール側鎖、インドール側鎖等) を有する特定の残基を、本発明の B7 H3 ADC に組み込んで

40

50

よい。

【0258】

リンカー分子は、生理学的条件下で切断不可能であってよく、例えば、チオエーテルリンカー又はヒンダードジスルフィドリンカーを例とする加水分解安定性部分からなつてよい。加水分解安定性リンカーは、水中で略安定であり、長期間にわたる生理学的条件下を含むがこれに限定されない、有用なpH値の水と反応しない。対照的に、加水分解不安定性又は崩壊性リンカーは、水中、又は例えば血液を含む水溶液中で崩壊する。

【0259】

あるいはリンカー分子は切断可能であってよく、又は切断可能部分を含有してよい。このような切断可能部分の例としては、酸不安定性リンカー（例えばヒドラジン結合を形成する4-(4'-アセチルフェノキシ)ブタン酸リンカー）、切断可能ジスルフィドリンカー（還元性細胞内環境で切断される）、及びプロテアーゼ切断可能リンカーが挙げられる。酸不安定性リンカーは、血中で遭遇するpHレベルにおいて安定であるものの、リソソーム中の低いpH環境に遭遇すると不安定となり崩壊することを意味する。またプロテアーゼ切断可能リンカーは、血液/血漿中で安定であるものの、リソソーム酵素による切断時に癌細胞中のリソソーム内において遊離薬物を迅速に放出することを意味する（Panowski, S. et al. (2014) "Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy," *mAbs* 6(1):34-45）。あるいは、リンカー分子は、切断可能ペプチド（例えばリソソーム酵素によって選択的に切断されるバリン-シトルリンジペプチドパラアミノベンジルアルコールリンカー（cAC10-mcvc-PABA））のような、酵素切断可能基質であってよく、又は酵素切断可能基質を含有してよい。好適な切断可能リンカーは当該技術分野で公知であり、例えばde Groot, Franciscus M.H., et al. (2002) "Design, Synthesis, and Biological Evaluation of a Dual Tumor-Specific Motive Containing Integrin-Targeted Plasmin-Cleavable Doxorubicin Prodrug," *Molecular Cancer Therapeutics*, 1: 901-911; Dubowchik et al., (2002) "Doxorubicin Immunoconjugates Containing Bivalent, Lysosomally-Cleavable Dipeptide Linkages." *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 12:1529-1532; 米国特許第5,547,667号; 米国特許第6,214,345号; 米国特許第7,585,491号; 米国特許第7,754,681号; 米国特許第8,080,250号; 米国特許第8,461,117号; 及び国際公開第02/083180号を参照されたい。

【0260】

酵素不安定性又は崩壊性リンカーを採用できる。このようなリンカーは、1つ又は複数の酵素によって崩壊する。単なる例として、PEG及び関連するポリマーは、ポリマー骨格内又はポリマー骨格とポリマー分子の末端官能基のうちの1つ若しくは複数との間のリンカー基内に、1つ又は複数の崩壊性リンカー分子を含むことができる。このような1つ又は複数の崩壊性リンカー分子としては、限定するものではないが、PEGカルボン酸又は活性化されたPEGカルボン酸と生物活性剤上のアルコール基との反応によって形成されるエステル結合が挙げられ、このようなエステル基は一般に、生理学的条件下において加水分解して、生物活性剤を放出する。他の加水分解崩壊性リンカー分子としては、限定するものではないが：炭酸塩結合；アミンとアルデヒドとの反応から生じるイミン結合；アルコールとリン酸塩基との反応によって形成されるリン酸エステル結合；ヒドラジンとアルデヒドとの反応産物であるヒドラゾン結合；アルデヒドとアルコールとの反応産物であるアセタール結合；ギ酸とアルコールとの反応産物であるオルトエステル結合；PEG等のポリマーの末端のものを含むがこれに限定されないアミン基、及びペプチドのカルボキシル基によって形成される、ペプチド結合；並びにポリマーの末端のものを含むがこれに限定されないホスホラミダイト基、及びオリゴヌクレオチドの5'-ヒドロキシル基によって形成される、オリゴヌクレオチド結合が挙げられる。

【0261】

一実施形態では、本発明のリンカー分子は、国際公開第02/083180号で開示されているような切断可能リンカー分子であるV(W)<sub>k</sub>(X)<sub>1</sub>Aであってよく、又は

これを含んでよく、上記リンカー分子は、以下の式：



を含み、ここで：

Vは任意の切断可能部分であり；

(W)<sub>k</sub> (X)<sub>1</sub> Aは、1, (4 + 2n) 消去によって自己消去する、細長い自己消去性スペーサ系であり；

W及びXはそれぞれ1, (4 + 2n) 電子カスケードスペーサであり、同一であるか又は異なっており；

Aは、式(Y)<sub>m</sub> (ここでYは1, (4 + 2n) 電子カスケードスペーサである) のスペーサ基、又は式Uの基であり、環化除去スペーサであり；

k、1及びmは独立して、0 ~ 5 (両端を含む) の整数であり；

nは0 ~ 10 (両端を含む) の整数であり；

ただし：

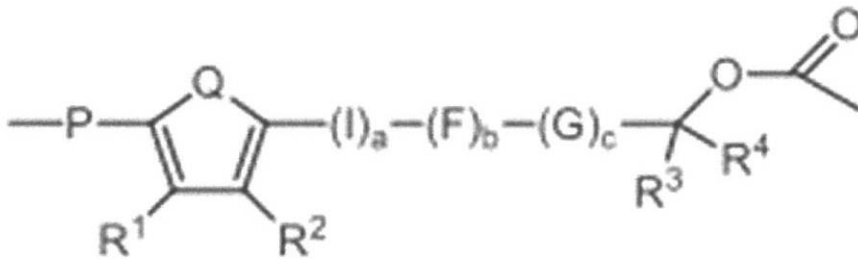
Aが(Y)<sub>m</sub>である場合、k + 1 + m = 1であり；

k + 1 + m = 1である場合、n > 1であり；

AがUである場合、k + 1 = 1である。

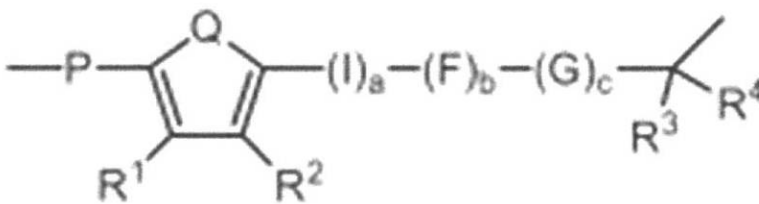
W、X及びYは独立して、以下の式：

【化6】



又は以下の式：

【化7】



を有する化合物から選択され、ここで：

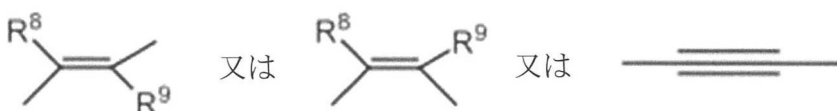
Qは R<sup>5</sup>C = CR<sup>6</sup>、S、O、NR<sup>5</sup>、R<sup>5</sup>C = N 又は N = CR<sup>5</sup> であり；

PはNR<sup>7</sup>、O又はSであり；

a、b及びcは独立して、0 ~ 5 (両端を含む) の整数であり；

I、F及びGは独立して、式：

【化8】



を有する化合物から選択され、ここで：

R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は独立して、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C

10

20

30

40

50

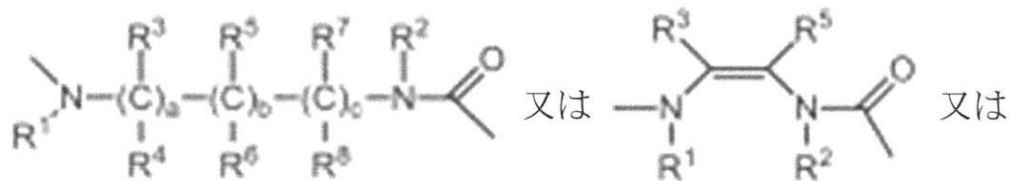
3-20ヘテロシクリル、C<sub>5</sub>-20アリール、C<sub>1</sub>-6アルコキシ、ヒドロキシ(OH)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1</sub>-5アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1</sub>-6アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、スルホキシ(S(=O)<sub>2</sub>OH)、スルホン酸塩(S(=O)<sub>2</sub>OR<sub>x</sub>)、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>)、スルフィキシ(S(=O)OH)、スルフィン酸塩(S(=O)OR<sub>x</sub>)、スルフィニル(S(=O)R<sub>x</sub>)、ホスホノオキシ(OP(=O)(OH)<sub>2</sub>)及びリン酸塩(OP(=O)(OR<sub>x</sub>)<sub>2</sub>)を表し、ここで：

R<sub>x</sub>、R<sub>x</sub><sup>1</sup>及びR<sub>x</sub><sup>2</sup>は独立して、C<sub>1</sub>-6アルキル基、C<sub>3</sub>-20ヘテロシクリル基又はC<sub>5</sub>-20アリール基から選択され；

上記置換基R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>又はR<sup>9</sup>のうち2つ以上は任意に、互いに接続して1つ又は複数の脂肪族又は芳香族環式構造を形成し；

Uは、式：

【化9】



【化10】



を有する化合物から選択され、ここで：

a、b及びcは独立して、0又は1の整数となるよう選択され；

ただし a + b + c = 2 又は 3 であり；

R<sup>1</sup>及び/又はR<sup>2</sup>は独立して、H、C<sub>1</sub>-6アルキルを表し、上記アルキルは任意に、以下の基：ヒドロキシ(OH)、エーテル(OR<sub>x</sub>)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1</sub>-5アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1</sub>-6アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、スルホキシ(S(=O)<sub>2</sub>OH)、スルホン酸塩(S(=O)<sub>2</sub>OR<sub>x</sub>)、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>)、スルフィキシ(S(=O)OH)、スルフィン酸塩(S(=O)OR<sub>x</sub>)、スルフィニル(S(=O)R<sub>x</sub>)、ホスホノオキシ(OP(=O)(OH)<sub>2</sub>)、及びリン酸塩(OP(=O)(OR<sub>x</sub>)<sub>2</sub>)のうち1つ又は複数によって置換され、ここでR<sub>x</sub>、R<sub>x</sub><sup>1</sup>及びR<sub>x</sub><sup>2</sup>は、C<sub>1</sub>-6アルキル基、C<sub>3</sub>-20ヘテロシクリル基又はC<sub>5</sub>-20アリール基から選択され；

R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>及びR<sup>8</sup>は独立して、H、C<sub>1</sub>-6アルキル、C<sub>3</sub>-20ヘテロシクリル、C<sub>5</sub>-20アリール、C<sub>1</sub>-6アルコキシ、ヒドロキシ(OH)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1</sub>-5アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1</sub>-6アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、ス

10

20

30

40

50

ルホキシ ( $S(=O)_2OH$ )、スルホン酸塩 ( $S(=O)_2OR_x$ )、スルホニル ( $S(=O)_2R_x$ )、スルフィキシ ( $S(=O)OH$ )、スルフィン酸塩 ( $S(=O)OR_x$ )、スルフィニル ( $S(=O)R_x$ )、ホスホノオキシ ( $OP(=O)(OH)_2$ )、及びリン酸塩 ( $OP(=O)(OR_x)_2$ )を表し、ここで  $R_x$ 、 $R_x^1$ 及び $R_x^2$ は、 $C_{1-6}$ アルキル基、 $C_{3-20}$ ヘテロシクリル基又は $C_{5-20}$ アリール基から選択され、上記置換基  $R^1$ 、 $R^2$ 、 $R^3$ 、 $R^4$ 、 $R^5$ 、 $R^6$ 、 $R^7$ 、又は $R^8$ のうちの2つ以上は任意に、互いに接続して1つ又は複数の脂肪族又は芳香族環式構造を形成する。

## 【0262】

例示的な分子としては：

- p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル； 10  
 p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル；  
 p アミノシナミルオキシカルボニル；  
 p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル；  
 p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル；  
 p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル；  
 p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル；  
 p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル；  
 p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル； 20  
 p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル；  
 p アミノベンジルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；  
 p アミノシナミルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；  
 p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；  
 p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル； 30  
 p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；  
 p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル(メチルアミノ)エチル(メチルアミノ)カルボニル；  
 p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジル；  
 p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジル；  
 p アミノシナミル；  
 p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノベンジル； 40  
 p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシナミル；  
 p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノシナミル；  
 p アミノフェニルペンタジエニル；  
 p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノシナミル；  
 p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノベンジル；及び  
 p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノフェニルペンタジエニルが挙げられる。

## 【0263】

いくつかの実施形態では、本発明の B7 H3 ADC は、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個又は10個の細胞毒性薬物部分を含み、これらは同一であってよく 50

、又は個々に、このB7 H3 ADCの別の細胞毒性薬物部分と同一であってよく、若しくは異なっていてよい。一実施形態では、このような細胞毒性薬物部分はそれぞれ、別個のリンカー分子を介して、本発明のB7 H3 ADCのAbにコンジュゲートする。あるいは2つ以上の細胞毒性薬物部分が、同一のリンカー分子を介して、本発明のB7 H3 ADCのAbに付着してよい。

#### 【0264】

細胞毒性薬物部分は、当該技術分野で公知の手段によって、本発明のB7 H3 ADCのAbにコンジュゲートしてよい(例えばYao, H. et al. (2016) "Methods to Design and Synthesize Antibody-Drug Conjugates (ADC)," *Intl. J. Molec. Sci.* 17(194): 1-16); Behrens, C. R. et al. (2014) "Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies," *mAbs* 6(1):46-53; Bouchard, H. et al. (2014) "Antibody-Drug Conjugates - A New Wave Of Cancer Drugs," *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett* 24:5357-5363を参照)。システインのチオール基、リシン、グルタミン若しくはアルギニンのアミノ側基、又はグルタミン酸若しくはアスパラギン酸のカルボキシル基を用いて、リンカー分子 細胞毒性薬物部分(LM D)を本発明のB7 H3 ADCのAbにコンジュゲートさせることができる。ネイティブの抗体は、多数のリシンコンジュゲート部位を含有し、従って抗体1つあたり複数の被コンジュゲート分子に連結できる。実際には、コンジュゲーションが、およそ20個の異なるリシン残基において、重鎖及び軽鎖の両方に発生する(mAbひとつあたり40個のリシン)、ペプチドマッピングが決定されている。従って、100万を超える異なるADC種を生成できる。システインコンジュゲーションは、1~4つの鎖間ジスルフィド結合の還元後に発生するため、このコンジュゲーションは、ネイティブVL及びVHドメインにおいて、8つの露出されたスルフヒドリル基に限定される。しかしながら、望ましい場合には、更なる反応性(例えばリシン、システイン、セレノシステイン等)残基を、抗体に(例えばVLドメイン及び/若しくはVHドメイン並びに/又は定常ドメイン内に)組み込んでよい。例えば1つ又は複数のネイティブアミノ酸残基を、システイン残基で置換してよい。アンバー終止コドン抑制因子tRNA<sup>aa</sup>RSペアを用いて、非天然アミノ酸(例えばp-アセチルフェニルアラニン)を抗体に遺伝的に組み込んでよい(例えばBehrens CR, and Liu B. (2014) "Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies," *mAbs* 6(1):46-53. doi:10.4161/mabs.26632; Panowksi, S., et al. (2014) "Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy," *mAbs*, 6(1), 34-45, doi:10.4161/mabs.27022; 及び国際公開第2008/070593号を参照)。あるいは、又は更に、酵素(例えばグリコトランスフェラーゼ)を用いて、本発明のB7 H3 ADCのAbにコンジュゲートさせてよい。グリコトランスフェラーゼプラットフォームは、糖部分を抗体上のグリコシル化部位(例えばヒトIgG抗体のFcドメインのN297位置)に付着させ、これは、本発明のリンカー分子として機能して、細胞毒性薬物部分(D)を本発明のB7 H3 ADCのAbにコンジュゲートさせることができる。あるいは、トランスグルタミナーゼを用いて、遊離アミノ基とグルタミン側鎖との間の共有結合の形成を触媒してよい。

#### 【0265】

このような目的のために好ましいのは、*Streptovercillium mobaraense*由来の市販のトランスグルタミナーゼ(mTG)である(Pasternack, R. et al. (1998) "Bacterial Pro-Transglutaminase From *Streptovercillium mobaraense* - Purification, Characterisation And Sequence Of The Zymogen," *Eur. J. Biochem.* 257(3):570-576; Yokoyama, K. et al. (2004) "Properties And Applications Of Microbial Transglutaminase," *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64:447-454)。この酵素は、グリコシル化抗体のFcドメイン中の天然発生グルタミン残基をいずれも認識しないが、VLドメイン及び/若しくはVHドメイン並びに/又は定常ドメインに組み込むことができるテトラペプチドLLQL(配列番号94)を認識する(Jeger, S. et al. (2010) "Site-Specific And Stoichiometric Modification Of Antibodies By Bacterial Transglutam

10

20

30

40

50

inase,” *Angew Chem. Int. Ed. Engl.* 49:9995-9997)。このような考察は、Panowski, S. et al. (2014) “Site-Specific Antibody Drug Conjugates For Cancer Therapy,” *mAbs* 6(1):34-45によって吟味されている。

【0266】

B. 本発明の例示的な細胞毒性薬物部分

いくつかの実施形態では、本発明のB7 H3 ADCの細胞毒性薬物部分は、細胞毒素、放射性同位元素、免疫調節因子、サイトカイン、リンホカイン、ケモカイン、成長因子、腫瘍壊死因子、ホルモン、ホルモンアンタゴニスト、酵素、オリゴヌクレオチド、DNA分子、RNA分子、siRNA分子、RNAi分子、マイクロRNA分子、光活性治療剤、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、ペプチド、脂質、炭水化物、キレート剤又はこれらの組み合わせを含む。

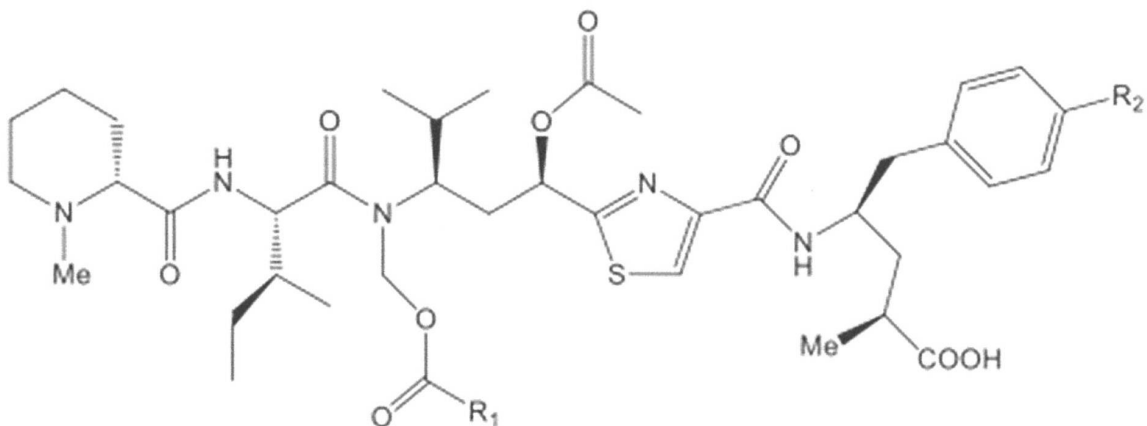
10

【0267】

1. ツブリン細胞毒性薬物部分

本発明のB7 H3 ADCは、ツブリン薬物部分を含んでよい：

【化11】



20

【表6】

ツブリン誘導体	R 1	R 2
ツブリンA	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH
ツブリンB	CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	OH
ツブリンC	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	OH
ツブリンD	CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	H

30

【0268】

ツブリンは、マイコバクテリア種から単離された天然産物のあるクラスのメンバーである (Sasse et al. (2000) “Tubulysins, New Cytostatic Peptides From Myxobacteria Acting On Microtubuli. Production, Isolation, Physico-Chemical And Biological Properties,” *J. Antibiot.* 53:879-885)。細胞骨格相互作用剤として、ツブリンは、チューブリン重合を阻害して細胞周期の停止及びアポトーシスをもたらす有糸分裂毒素である (Steinmetz et al. (2004) “Isolation, Crystal And Solution Structure Determination, And Biosynthesis Of Tubulysins--Powerful Inhibitors Of Tubulin Polymerization From Myxobacteria,” *Chem. Int. Ed.* 43:4888-4892; Khalil et al. (2006) “Mechanism Of Action Of Tubulysin, An Antimitotic Peptide From Myxobacteria,” *ChemBioChem.* 7:678-683; Kaur et al. (2006) “Biological Evaluation Of Tubulysin A: A Potential Anticancer And Antiangiogenic Natural P

40

50

product,” *Biochem. J.* 396: 235-242)。ツブリシンは、極めて強力な細胞毒性分子であり、いずれの臨床的に関連のある従来化学療法剤、例えばエポチロン、パクリタキセル及びビンブラスチンの細胞成長阻害を超える。更にこれらは、多剤耐性細胞株に対して強力である (Domling, A. et al. (2005) “ Myxobacterial Epothilones And Tubulysin As Promising Anticancer Agents,” *Mol. Diversity* 9:141-147)。これらの化合物は、低ピコモル範囲の  $IC_{50}$  値を有する癌細胞株のパネルに対して試験された、高い細胞毒性を示すため、抗癌治療剤として関心を集めている。例えば国際公開第 2012/019123 号、国際公開第 2015/157594 号を参照されたい。ツブリシンコンジュゲートは、例えば米国特許第 7,776,814 号に開示されている。いくつかの実施形態では、ツブリシン分子又はその誘導体はプロドラッグである。

10

【0269】

## 2. オーリスタチン細胞毒性薬物部分

あるいは、又は更に、本発明の B7 H3 ADC は、オーリスタチン細胞毒性薬物部分 (例えば MMAE (N-メチルバリンバリンドライソロイインドラプロインノルエフェドリン) 及び MMAF (N-メチルバリンバリンドライソロイインドラプロインフェニルアラニン)) を含んでよい。ドラスタチンは元々、アメフラシ科の *Dolabella auricularia* の成分として発見され、改変されて、オーリスタチンとしても知られる誘導体 (例えばモノメチルオーリスタチン E 及び F) が生成された。ドラスタチン及びオーリスタチンは、チューブリン上のピンカアルカロイド結合部位と相互作用して、その重合をブロックする。ドラスタチン及びオーリスタチンは、微小管動態、GTP 加水分解並びに核及び細胞分裂を妨害することが示されており (Woyke et al., *Antimicrob. Agents and Chemother.* 45:3580-3584 (2001))、抗癌活性を有する (米国特許第 5,663,149 号、米国特許第 6,884,869 号、米国特許第 7,964,566 号)。オーリスタチン薬物部分は、ペプチド性薬物部分の N (アミノ) 末端又は C (カルボキシル) 末端を通して、抗体に付着させることができる (例えば国際公開第 2002/088172 号を参照)。いくつかの実施形態では、オーリスタチン若しくはドラスタチン分子、その変異型又は誘導体はプロドラッグである。MMAE は、ネイティブシステイン側鎖チオールの修飾によってタンパク質にコンジュゲートさせることができる (Senter, P. D. et al. (2012) “ The Discovery And Development Of Brentuximab Vedotin For Use In Relapsed Hodgkin Lymphoma And Systemic Anaplastic Large Cell Lymphoma,” *Nat. Biotechnol.* 30:631-637; van de Donk, N.W. et al. (2012) “ Brentuximab vedotin,” *MAbs* 4:458-465)。本方法は、システイン残基の、1つ又は複数の溶媒に曝露されたジスルフィド結合を、還元剤 (例えばジチオスレイトール (DTT) 又はトリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン (TCEP)) で還元した後、得られたチオールをマレイミド含有薬物で修飾することを伴う (Behrens, C. R. et al. (2014) “ Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies,” *mAbs* 6(1):46-53 を参照)。

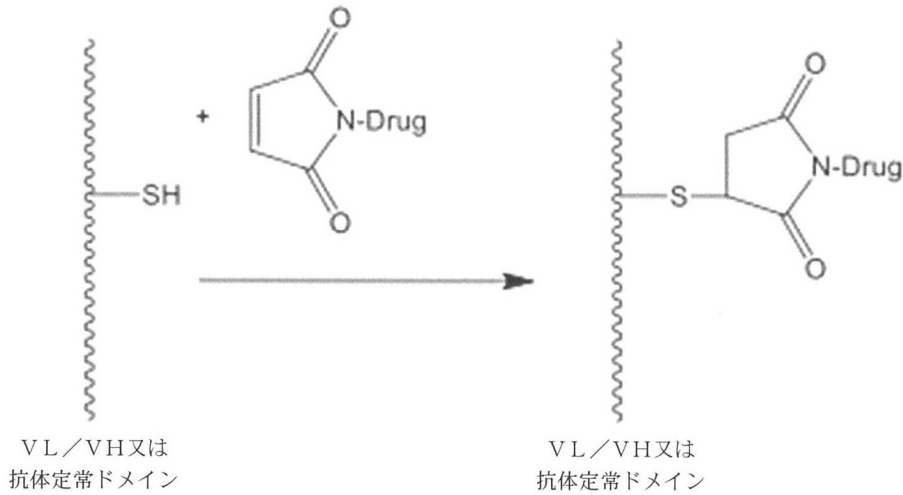
20

30

40

50

【化 1 2】



10

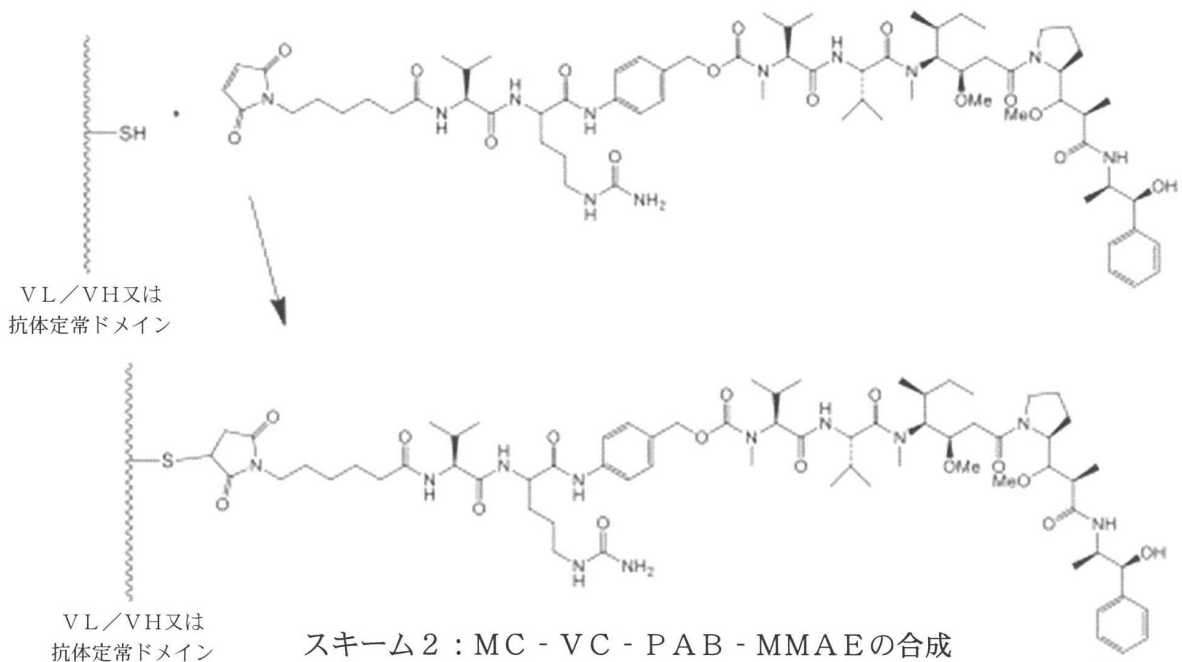
スキーム 1

【 0 2 7 0】

この方法でコンジュゲートできる例示的な細胞毒性薬物は、カテプシン B プロテアーゼ切断部位 25 (VC : バリン、シトルリン) 及び自壊性リンカー (PAB : パラミノベンジルオキシカルボニル) を、マレイミド基 (MC : マレイミドカプロイル) と細胞毒性薬物 (MMAE) との間に組み込む (Doronina, S.O. et al. (2003) "Development Of Potent Monoclonal Antibody Auristatin Conjugates For Cancer Therapy," Nat. Biotechnol. 21:778-784)。

20

【化 1 3】



30

40

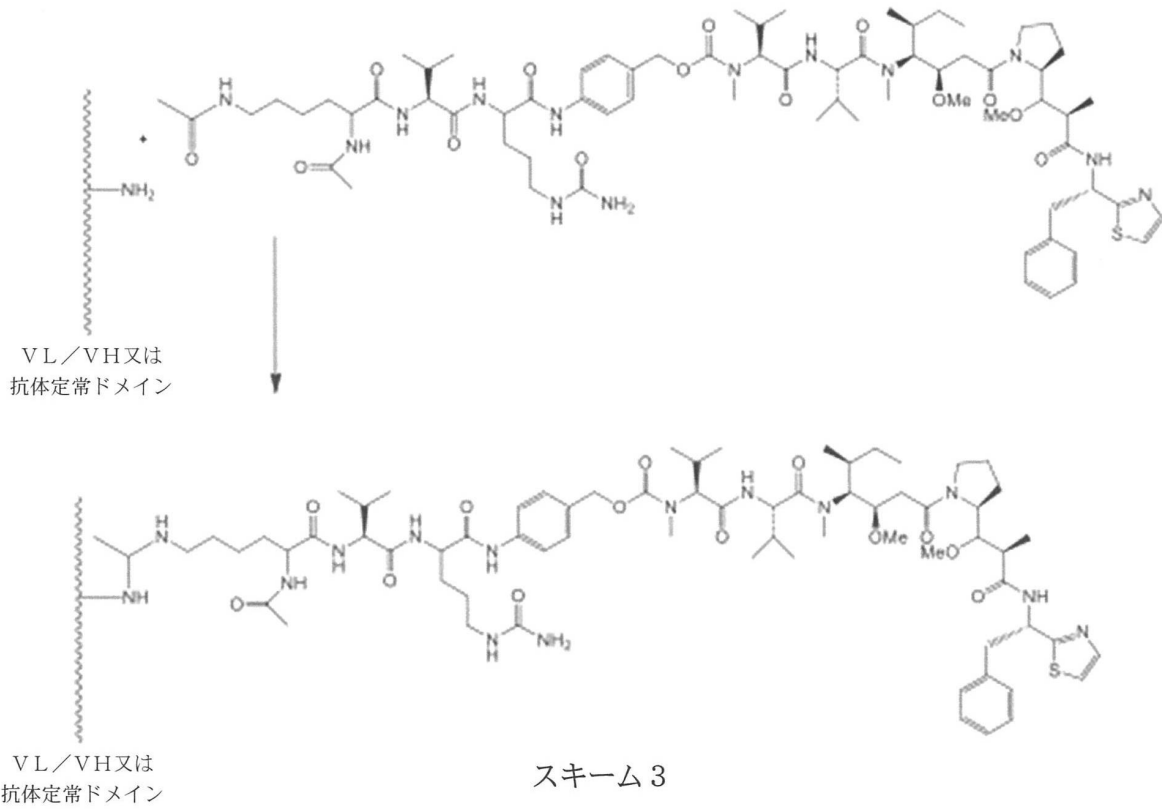
【 0 2 7 1】

あるいは、オーリスタチン細胞毒性薬物部分は、AcLys VC PAB MMAD (アセチルリシンバリンシトルリン p アミノベンジルオキシカルボニル モノメチルドラスタチン) であってよく、これは、アセチル化リシン残基の側鎖とグルタミン側鎖との間の部位特異的の反応を触媒するために、酵素微生物トランスグルタミナーゼを用いて、本発明の B7 H3 ADC の Ab 部分の VL ドメイン及び / 若しくは VH ドメイン並びに

50

ノ又は定常ドメインのグルタミン残基のNH<sub>2</sub>側鎖基にコンジュゲートできる。

【化14】



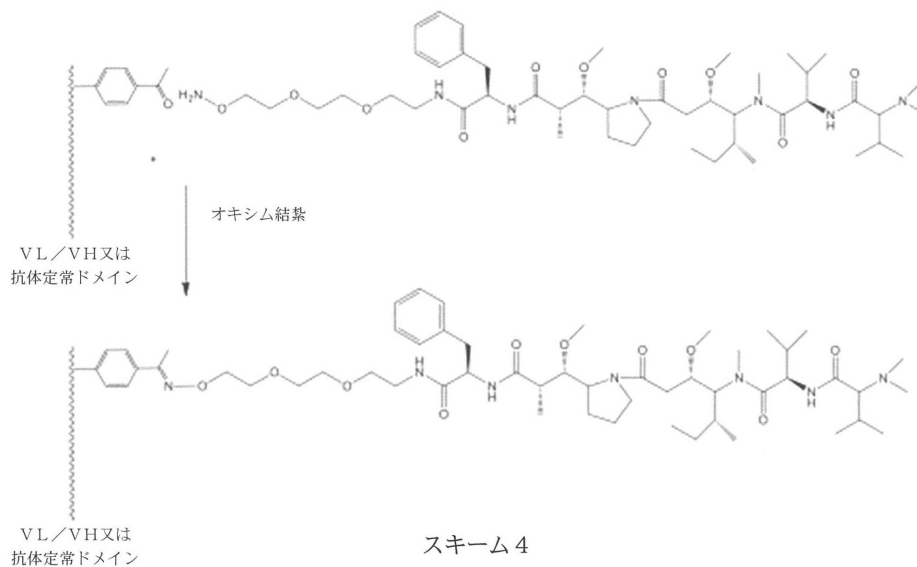
10

20

【0272】

あるいは、p アセチルフェニルアラニン、本発明のB7 H3 ADCのAb部分のVLドメイン及びノ若しくはVHドメイン並びにノ又は定常ドメインに組み込んでよく、これを用いて、オリスタチンF オキシアミンを、オキシム結紮を介して上記ドメインにコンジュゲートさせてよい。

【化15】



30

40

【0273】

3. マイタンシノイド細胞毒性薬物部分

あるいは、又は更に、本発明のB7 H3 ADCは、マイタンシノイド細胞毒性薬物部

50

分、例えば塩素化ベンゼン環発色団に付着した19員アンサマクロリド構造を特徴とするアンサマイシン抗生物質を含んでよい。マイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することによって作用する有糸分裂阻害剤である。マイタンシンは初め、東アフリカの低木である *Maytenus serrata* から単離された（米国特許第3,896,111号）。その後、特定の微生物もマイタンシノール及びC-3マイタンシノールエステル等のマイタンシノイドを生成することが発見された（米国特許第4,151,042号）。合成マイタンシノール並びにその誘導体及び類似体は、例えば米国特許第4,137,230号及び米国特許第4,248,870号に開示されている。マイタンシノイド薬物部分は、抗体薬物コンジュゲートにおける魅力的な薬物部分である。というのはこれらは：(i)発酵又は化学修飾、発酵産物の誘導体化による調製が比較的容易であり；(ii)非ジスルフィドリンカーを介した抗体へのコンジュゲートに好適な官能基での誘導体化に適しており；(iii)プラズマ中で安定しており；(iv)様々な腫瘍細胞株に対して有効であるためである。マイタンシノイドを含有する免疫コンジュゲート、その作製方法及びその治療的使用は、例えば米国特許第5,208,020号及び米国特許第5,416,064号並びに欧州特許第0425235B1号；Liu, C. et al. (1996) "Eradication Of Large Colon Tumor Xenografts By Targeted Delivery Of Maytansinoids," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 93:8618-8623 (described immunoconjugates comprising a maytansinoid designated DM1) and Chari, R.V. et al. (1992) "Immunoconjugates Containing Novel Maytansinoids: Promising Anticancer Drugs," *Cancer Research* 52:127-131で開示されている。

10

20

**【0274】**

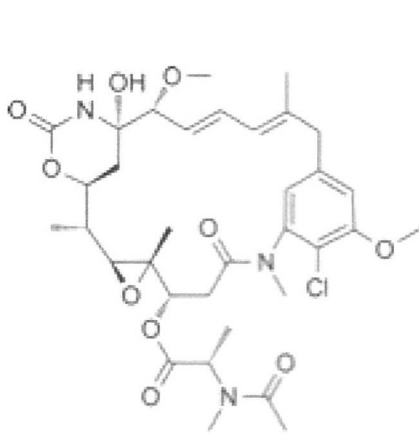
マイタンシン、DM1及びDM4は、例示的なマイタンシノイド細胞毒性薬物部分である：

30

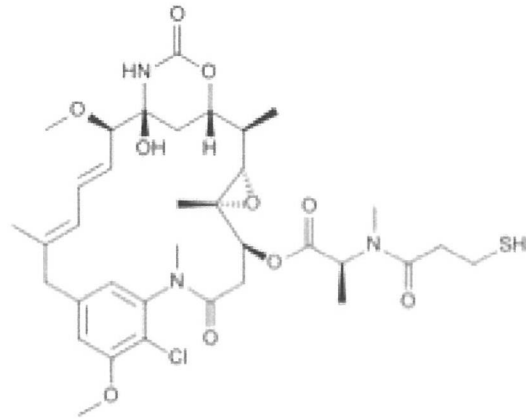
40

50

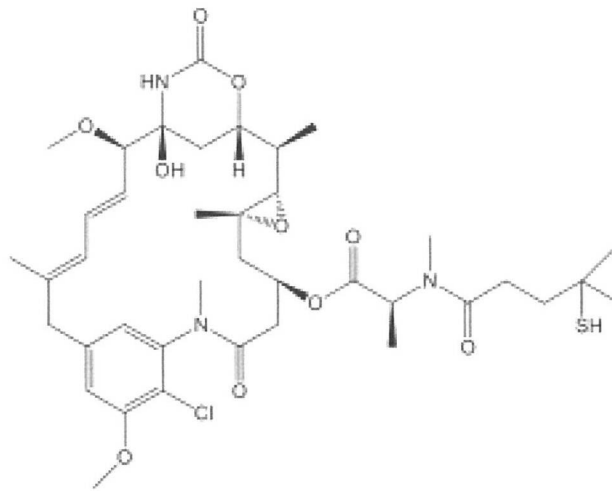
## 【化 1 6】



マイタンシン



DM1



DM4

## 【 0 2 7 5】

マイタンシンを、リシン又はグルタミン側鎖との反応によって、本発明の B7 H3 ADC の A b 部分にコンジュゲートさせてよい。DM1 及び DM4 は、本発明の B7 H3 ADC の A b 部分の VL ドメイン及び / 若しくは VH ドメイン並びに / 又は定常ドメインのグルタミン酸又はアスパラギン酸残基の COOH 側鎖にコンジュゲートさせてよい (Behrens, C. R. et al. (2014) "Methods For Site-Specific Drug Conjugation To Antibodies," mAbs 6(1):46-53; Bouchard, H. et al. (2014) "Antibody-Drug Conjugates - A New Wave Of Cancer Drugs," Bioorganic & Medicinal Chem. Lett 24: 5357-5363 を参照):

10

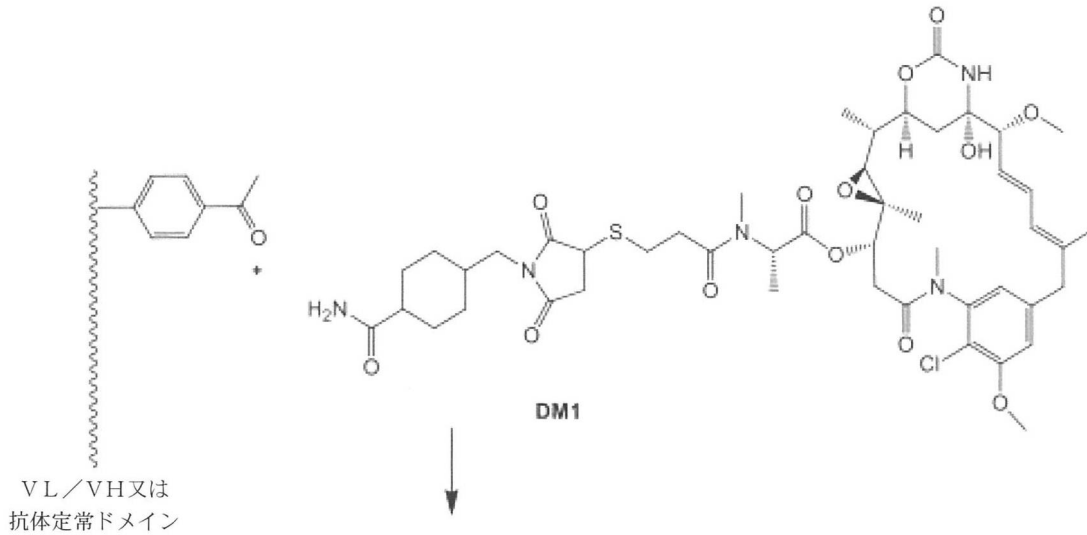
20

30

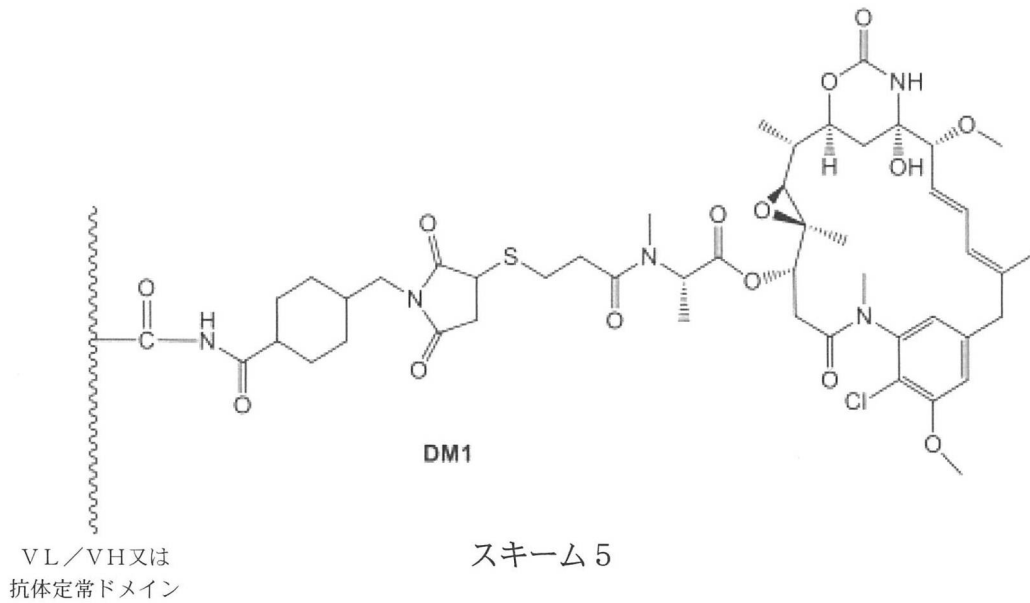
40

50

## 【化 1 7】



10



20

30

## 【 0 2 7 6】

トラスツズマブエムタンシン（アド トラスツズマブエムタンシン、T DM1、商標名 KADCYLA（登録商標））は、マイタンシノイドであるメルタンシン（DM1）にコンジュゲートしたモノクローナル抗体トラスツズマブ（HERCEPTIN（登録商標））からなる、薬物コンジュゲートである。例えばLoRusso et al. (2011) “Trastuzumab Emtansine: A Unique Antibody-Drug Conjugate In Development For Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Cancer,” Clin. Cancer Res. 20:6437-6447. An engineered thio-Trastuzumab-DM1 ADC has also been described in Junutual et al. (2010) “Engineered Thio-Trastuzumab-DM1 Conjugate With An Improved Therapeutic Index To Target Human Epidermal Growth Factor Receptor 2-Positive Breast Cancer,” Clin. Cancer Res. 16:4769-4778を参照。いくつかの実施形態では、マイタンシノイド分子、その変異型又は誘導体はプロドラッグである。

40

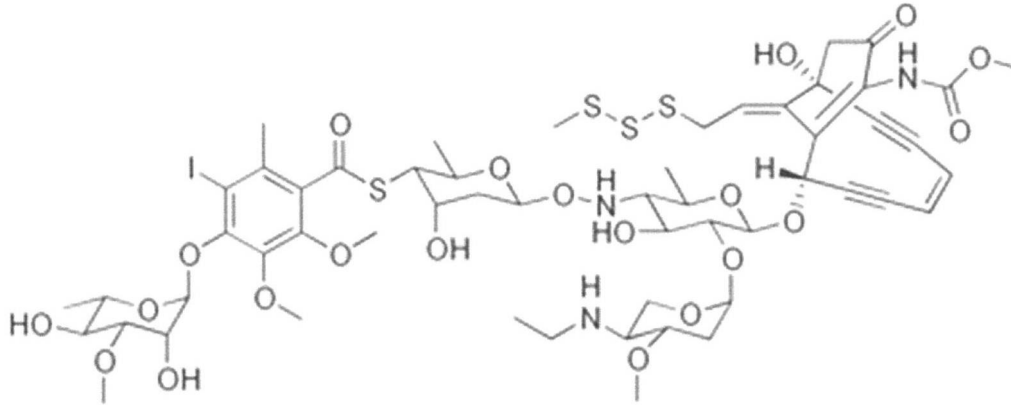
## 【 0 2 7 7】

## 4. カリケアミシン細胞毒性薬物部分

あるいは、又は更に、本発明の B7 H3 ADC は、カリケアミシン細胞毒性薬物部分を含んでよい：

50

## 【化 1 8】



10

## 【0278】

上述のカリケアミシン系抗体コンジュゲートは、トリスルフィド親化合物のジスルフィドバージョンである。現在のところ、N アセチル c カリケアミシンジメチルヒドラジド (CalichDMH) との2つの結合方法が報告されている (Bouchard, H. et al. (2014) "Antibody-Drug Conjugates - A New Wave Of Cancer Drugs," *Bioorganic & Medicinal Chem. Lett* 24:5357-5363)。

20

## 【0279】

エンジン抗腫瘍抗生物質のカリケアミシンファミリーは、サブピコモル濃度で二本鎖 DNA 切断を生成できる。カリケアミシンは、微生物 *Micromonospora echinospora* 由来のエンジン抗生物質のクラスであり、カリケアミシン 1 が最も有名である。他のカリケアミシンは、1 Br、1 Br、2 I、3 I、1 I、1 I、及び 1 I である (Lee, M.D. et al. (1989) "Calicheamicins, A Novel Family Of Antitumor Antibiotics. 3. Isolation, Purification And Characterization Of Calicheamicins Beta 1Br, Gamma 1Br, Alpha 2I, Alpha 3I, Beta 1I, Gamma 1I And Delta 1I., " *J. Antibiotics* 42(7):1070-1087を参照)。カリケアミシンファミリーのコンジュゲートの調製に関しては、米国特許第 5, 712, 374号、米国特許第 5, 714, 586号、米国特許第 5, 739, 116号、米国特許第 5, 767, 285号、米国特許第 5, 770, 701号、米国特許第 5, 770, 710号、米国特許第 5, 773, 001号、及び米国特許第 5, 877, 296号を参照されたい。使用できるカリケアミシンの構造的類似体としては、限定するものではないが、1 I、2 I、3 I、N アセチル 1 I、PSAG及び 11が挙げられる (Hinman et al. (1993) "Preparation And Characterization Of Monoclonal Antibody Conjugates Of The Calicheamicins: A Novel And Potent Family Of Antitumor Antibiotics," *Cancer Research* 53:3336-3342 (1993), Lode et al. (1998) "Targeted Therapy With A Novel Enediene Antibiotic Calicheamicin Theta(I)1 Effectively Suppresses Growth And Dissemination Of Liver Metastases In A Syngeneic Model Of Murine Neuroblastoma," *Cancer Research* 58:2925-2928 (1998))。いくつかの実施形態では、カリケアミシン分子、その変異型又は誘導体はプロドラッグである。

30

40

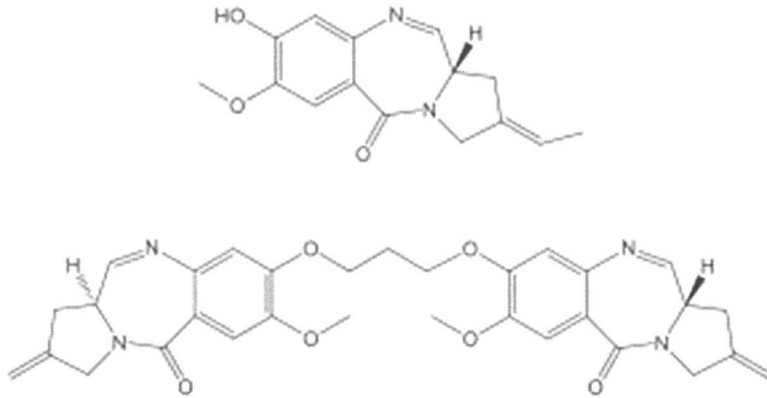
## 【0280】

## 5. ピロロベンゾジアゼピン細胞毒性薬物部分

あるいは、又は更に、本発明の B7 H3 ADC は、ピロロベンゾジアゼピン薬物部分 (例えば天然ピロロベンゾジアゼピン及び S J G 136、その誘導体) を含んでよい:

50

## 【化 1 9】

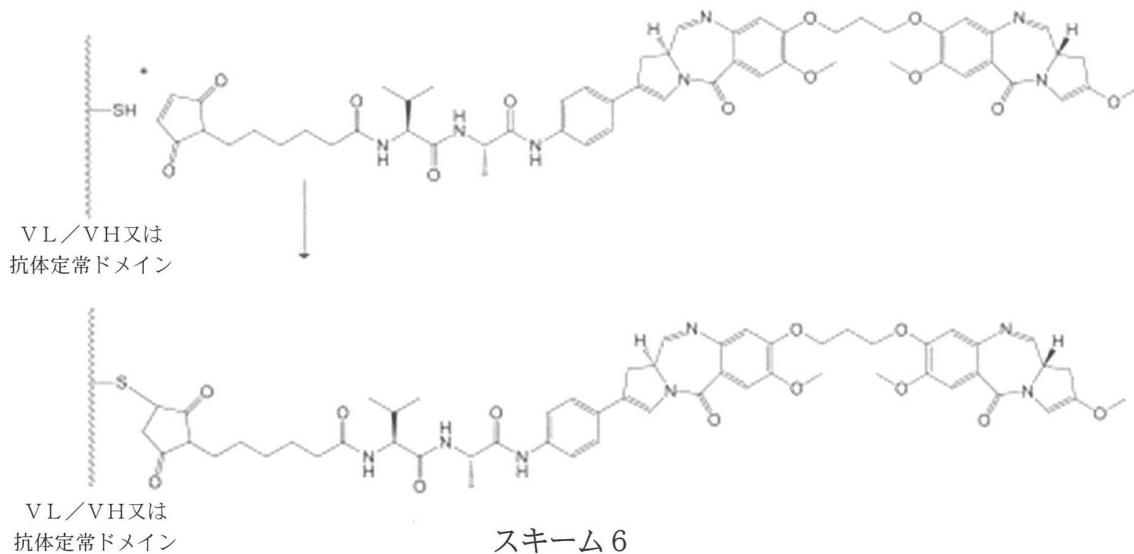


10

## 【 0 2 8 1】

好ましいピロロベンゾジアゼピン薬物部分は、バダスツキシマブ・タリリン (SGN C D 3 3 A ; Seattle Genetics) である :

## 【化 2 0】



20

30

## 【 0 2 8 2】

ピロロベンゾジアゼピン (PBD) は、抗生物質又は抗腫瘍活性を有する天然産物のクラスである。これらは放線菌によって天然で生産される。これらはDNAアルキル化合物であり、一部は配列選択性である。多数のPBD及びその誘導体、例えば：PBD二量体 (例えばS J G 1 3 6 又はS G 2 0 0 0) ; C 2 不飽和PBD二量体 ; C 2 アリール置換基を担持するピロロベンゾジアゼピン二量体 (例えばS G 2 2 8 5) ; 加水分解によって活性化するPBD二量体プロドラッグ (例えばS G 2 2 8 5) ; 及びポリピロロールPBD (例えばS G 2 2 7 4) が当該技術分野で公知である。PBDは更に、国際公開第2000/012507号、国際公開第2007/039752号、国際公開第2005/110423号、国際公開第2005/085251号、国際公開第2005/040170号、及び国際公開第2014/057119号に記載されている。いくつかの実施形態では、PBD分子、その変異型又は誘導体はプロドラッグである。

40

## 【 0 2 8 3】

6. デュオカルマイシン細胞毒性薬物部分

あるいは、又は更に、本発明のB 7 H 3 A D Cは、デュオカルマイシン薬物部分を含

50

んでよい。デュオカルマイシンは、初めはストレプトマイセス属の微生物から単離された一連の関連天然産物のメンバーであり、強力な抗腫瘍抗生物質である (Dokter, W. et al. (2014) " Preclinical Profile of the HER2-Targeting ADC SYD983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform," *Mol. Cancer Ther.* 13(11):2618-2629; Boger, D.L. et al. (1991). " Duocarmycins - A New Class Of Sequence Selective DNA Minor Groove Alkylating Agents," *Chemtracts: Organic Chemistry* 4 (5): 329-349 (1991); Tercel et al. (2013) " The Cytotoxicity Of Duocarmycin Analogues Is Mediated Through Alkylation Of DNA, Not Aldehyde Dehydrogenase 1: A Comment," *Chem. Int. Ed. Engl.* 52(21):5442-5446; Boger, D.L. et al. (1995) " CC-1065 And The Duocarmycins: Unraveling The Keys To A New Class Of Naturally Derived DNA Alkylating Agents," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 92(9):3642-3649; Cacciari, B. et al. (2000) " CC-1065 And The Duocarmycins: Recent Developments," *Expert Opinion on Therapeutic Patents* 10(12):1853-1871を参照)。

【 0 2 8 4 】

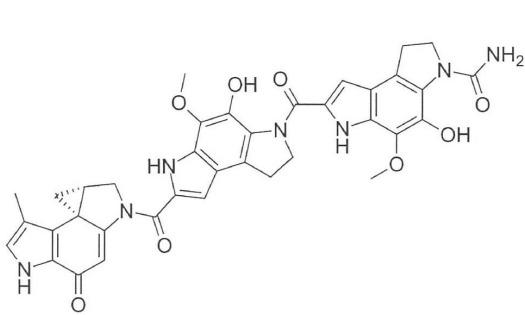
天然のデュオカルマイシンとしては、デュオカルマイシン A、デュオカルマイシン B 1、デュオカルマイシン B 2、デュオカルマイシン C 1、デュオカルマイシン C 2、デュオカルマイシン D、デュオカルマイシン S A、及び C C 1 0 6 5 が挙げられる (国際公開第 2 0 1 0 / 0 6 2 1 7 1 号 ; Martin, D.G. et al. (1980) " Structure Of CC-1065 (NSC 298223), A New Antitumor Antibiotic," *J. Antibiotics* 33:902-903; Boger, D. L. et al. (1995) " CC-1065 And The Duocarmycins: Unraveling The Keys To A New Class Of Naturally Derived DNA Alkylating Agents," *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 92:3642-3649)。

30

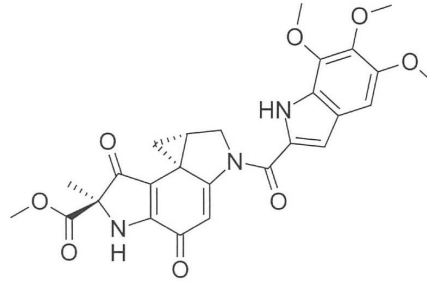
40

50

## 【化 2 1】

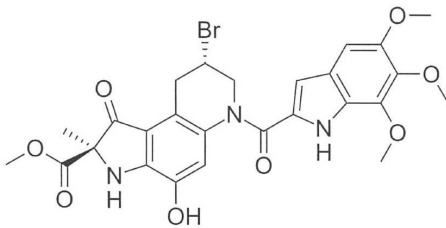


CC-1065

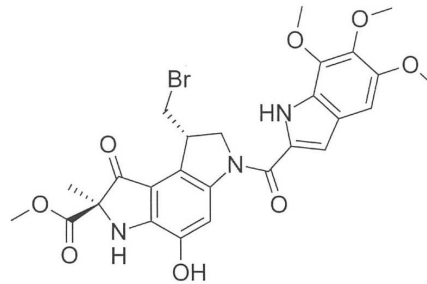


デュオカルマイシンA

10

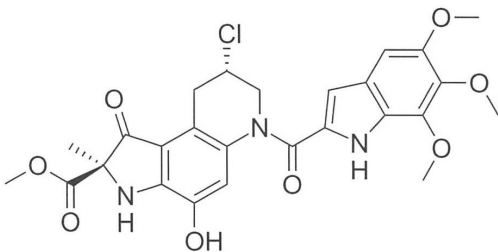


デュオカルマイシンB 1

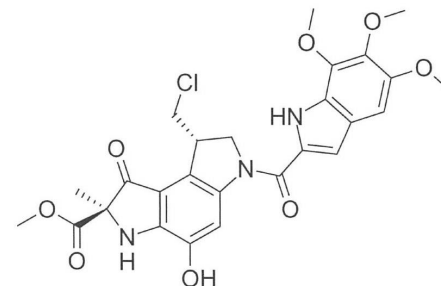


デュオカルマイシンB 2

20

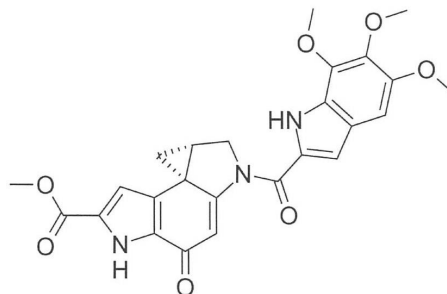


デュオカルマイシンC 1



デュオカルマイシンC 2

30



デュオカルマイシンSA

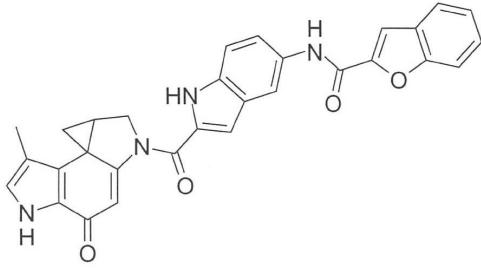
40

## 【 0 2 8 5】

好適な合成デュオカルマイシン類似体としては、アドゼレシン、ピゼレシン、カルゼルシン（U 80244）及びスピロデュオカルマイシン（DUBA）が挙げられる（Dokter, W. et al. (2014) “Preclinical Profile of the HER2-Targeting ADC SYD983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform,” Mol. Cancer Ther. 13(11):2618-2629; Elgersma, R.C. et al. (2014) “Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985,” Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835）：

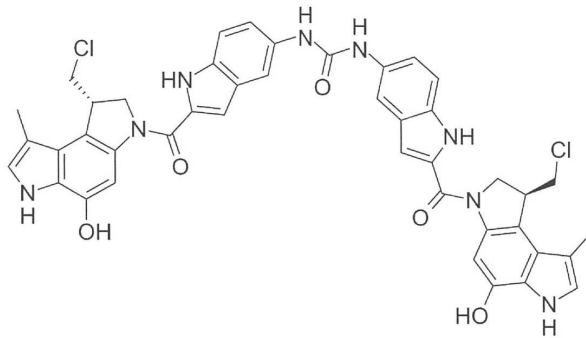
50

## 【化 2 2】



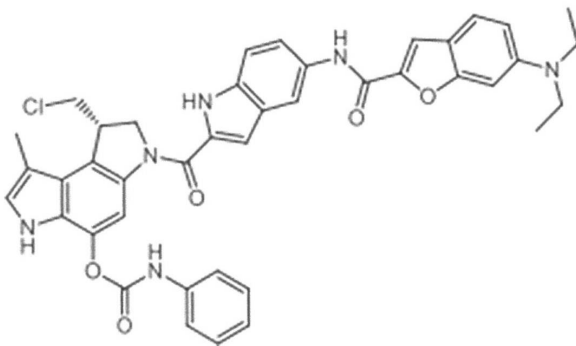
アドゼレシン

10



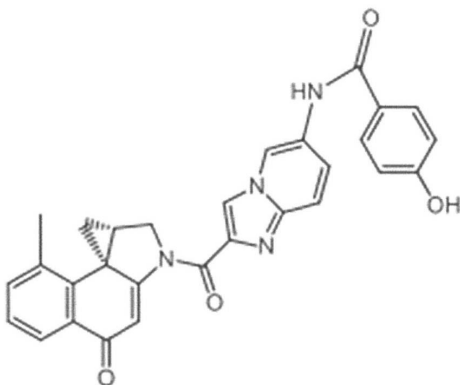
ビゼレシン

20



カルゼレシン

30

DUBA  
(スピロデュオカルマイシン)

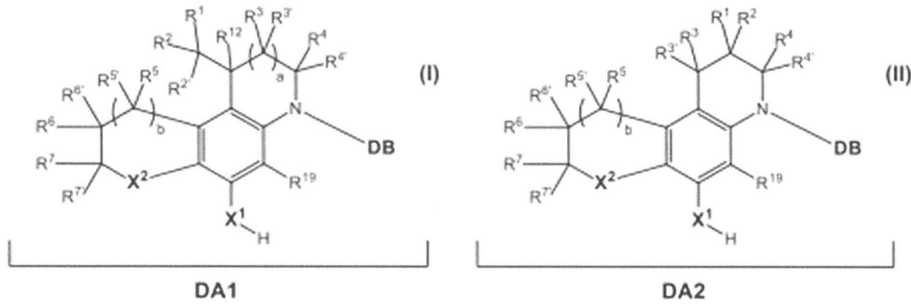
40

## 【 0 2 8 6 】

更なる合成デュオカルマイシン類似体としては、国際公開第 2 0 1 0 / 0 6 2 1 7 1 号に  
開示されているもの、及び特に式：

50

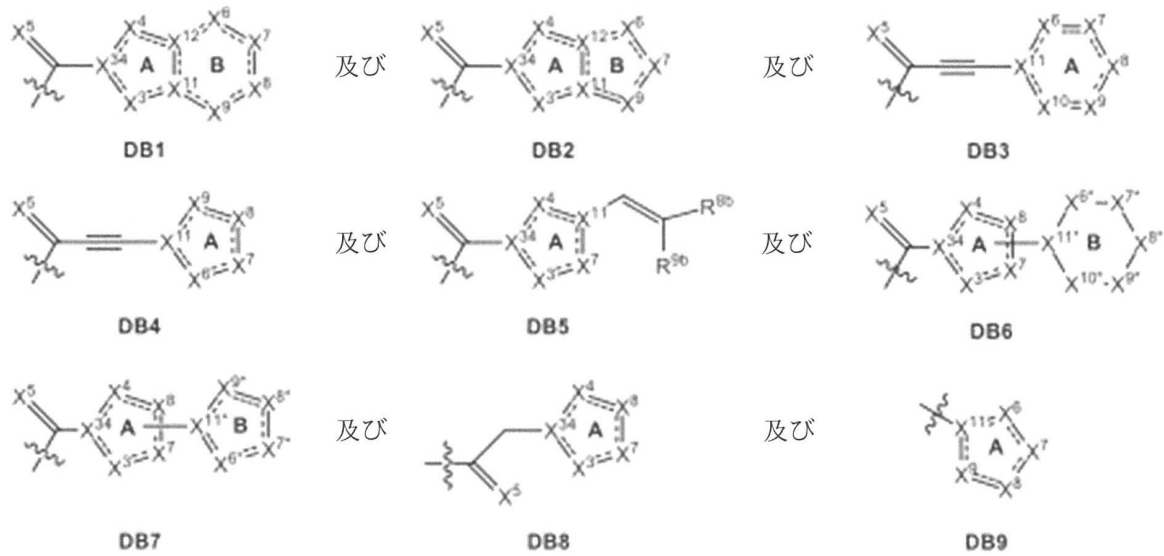
## 【化 2 3】



10

を有する類似体、又はその薬学的に許容可能な塩、水和物若しくは溶媒和物が挙げられ、ここでDBはDNA結合部分であり：

## 【化 2 4】



20

からなる基から選択され、ここで：

30

Rは脱離基であり；

R<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>'、R<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>'、R<sub>4</sub>、R<sub>4</sub>'、R<sub>12</sub>及びR<sub>19</sub>は独立して、H、OH、SH、NH<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NO<sub>2</sub>、NO、CF<sub>3</sub>、CN、C(O)NH<sub>2</sub>、C(O)H、C(O)OH、八口ゲン、Ra、SRa、S(O)Ra、S(O)<sub>2</sub>Ra、S(O)ORa、S(O)<sub>2</sub>ORa、OS(O)Ra、OS(O)<sub>2</sub>Ra、OS(O)ORa、OS(O)<sub>2</sub>ORa、ORa、NHRa、N(Ra)Rb、+N(Ra)(Rb)Rc、P(O)(ORa)(ORb)、OP(O)(ORa)(ORb)、SiR<sub>a</sub>R<sub>b</sub>R<sub>c</sub>、C(O)Ra、C(O)ORa、C(O)N(Ra)Rb、OC(O)Ra、OC(O)ORa、OC(O)N(Ra)Rb、N(Ra)C(O)Rb、N(Ra)C(O)ORb及びN(Ra)C(O)N(Rb)Rcから選択され、ここでRa、Rb及びRcは独立して、H及び任意に置換されたC<sub>1-3</sub>アルキル若しくはC<sub>1-3</sub>ヘテロアルキルから選択され、又はR<sub>3</sub>+R<sub>3</sub>'及び/若しくはR<sub>4</sub>+R<sub>4</sub>'は独立して、=O、=S、=NOR<sub>18</sub>、=C(R<sub>18</sub>)R<sub>18</sub>'及び=NR<sub>18</sub>から選択され、R<sub>18</sub>及びR<sub>18</sub>'は独立して、H及び任意に置換されたC<sub>1-3</sub>アルキルから選択され、R<sub>2</sub>、R<sub>2</sub>'、R<sub>3</sub>、R<sub>3</sub>'、R<sub>4</sub>、R<sub>4</sub>'及びR<sub>12</sub>のうち2つ以上は、1つ又は複数の結合によって連結されて、1つ又は複数の任意に置換された炭素環及び/又は複素環を形成し；

40

X<sub>2</sub>はO、C(R<sub>14</sub>)(R<sub>14</sub>')及びNR<sub>14</sub>'から選択され、ここでR<sub>14</sub>及びR<sub>14</sub>'は、R<sub>7</sub>に関して定義されたもの同一の意味を有し、かつ独立して選択され、又はR<sub>14</sub>'及びR<sub>7</sub>'は不在であり、これによってR<sub>7</sub>'及びR<sub>14</sub>'を担持するよう指定された原子間に二重結合がもたらされ；

R<sub>5</sub>、R<sub>5</sub>'、R<sub>6</sub>、R<sub>6</sub>'、R<sub>7</sub>及びR<sub>7</sub>'は独立して、H、OH、SH、NH<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NO<sub>2</sub>

50

、NO、CF<sub>3</sub>、CN、C(O)NH<sub>2</sub>、C(O)H、C(O)OH、ハロゲン、Re、S  
Re、S(O)Re、S(O)<sub>2</sub>Re、S(O)ORe、S(O)<sub>2</sub>ORe、OS(O)Re、  
OS(O)<sub>2</sub>Re、OS(O)ORe、OS(O)<sub>2</sub>ORe、ORe、NHR<sup>e</sup>、N(Re)R<sup>f</sup>  
、+N(Re)(R<sup>f</sup>)R<sup>g</sup>、P(O)(OR<sup>e</sup>)(OR<sup>f</sup>)、OP(O)(OR<sup>e</sup>)(OR<sup>f</sup>)  
、SiReR<sup>f</sup>R<sup>g</sup>、C(O)Re、C(O)ORe、C(O)N(Re)R<sup>f</sup>、OC(O)Re  
、OC(O)ORe、OC(O)N(Re)R<sup>f</sup>、N(Re)C(O)R<sup>f</sup>、N(Re)C(O)  
)OR<sup>f</sup>、N(Re)C(O)N(R<sup>f</sup>)R<sup>g</sup>及び水溶性基から選択され、ここで

Re、R<sup>f</sup>及びR<sup>g</sup>は独立して、H及び任意に置換された(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>ee</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sup>13</sup>Re<sup>1</sup>、C<sub>1-15</sub>アルキル、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキル、C<sub>3-15</sub>シクロアルキル、C<sub>1-15</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>5-15</sub>アリール又はC<sub>1-15</sub>ヘテロアリールから選択され、ここで  
eeは1~1000から選択され、X<sup>13</sup>はO、S及びNR<sup>f1</sup>から選択され、またR<sup>f1</sup>及び  
Re<sup>1</sup>は独立して、H及びC<sub>1-3</sub>アルキルから選択され、Re、R<sup>f</sup>、及び/又はR<sup>g</sup>の任意の  
置換基のうちの一つ又は複数は、任意に水溶性基であり、Re、R<sup>f</sup>及びR<sup>g</sup>のうちの一つ以上は任意に、一つ又は複数の結合によって連結されて一つ又は複数の任意に置換された炭素環及び/又は複素環を形成し；

あるいはR<sup>5</sup>+R<sup>5'</sup>及び/若しくはR<sup>6</sup>+R<sup>6'</sup>及び/若しくはR<sup>7</sup>+R<sup>7'</sup>は独立して、=O  
、=S、=NOR<sup>e3</sup>、=C(Re<sup>3</sup>)Re<sup>4</sup>及び=NRe<sup>3</sup>、Re<sup>3</sup>から選択され、またRe<sup>4</sup>は  
独立して、H及び任意に置換されたC<sub>1-3</sub>アルキルから選択されるか、又はR<sup>5'</sup>+R<sup>6'</sup>及  
び/若しくはR<sup>6'</sup>+R<sup>7'</sup>及び/若しくはR<sup>7'</sup>+R<sup>14'</sup>は不在であり、これによってR<sup>5'</sup>+R<sup>6'</sup>  
及び/若しくはR<sup>6'</sup>+R<sup>7'</sup>及び/若しくはR<sup>7'</sup>+R<sup>14'</sup>それぞれを担持するよう指定され  
た原子間に二重結合がもたらされ、R<sup>5</sup>、R<sup>5'</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>6'</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>7'</sup>、R<sup>14</sup>及びR<sup>14'</sup>  
のうちの一つ以上は任意に、一つ又は複数の結合によって連結されて一つ又は複数の任意に置換された炭素環及び/又は複素環を形成し；

X<sup>1</sup>はO、S及びNRから選択され、ここでRは、H及び任意に置換されたC<sub>1-8</sub>アルキル  
又はC<sub>1-8</sub>ヘテロアルキルから選択され、他のいずれの置換基と連結されず；

X<sup>3</sup>は、O、S、C(R<sup>15</sup>)R<sup>15'</sup>、C(R<sup>15</sup>)(R<sup>15'</sup>)C(R<sup>15''</sup>)(R<sup>15'''</sup>)  
、N(R<sup>15</sup>)N(R<sup>15'</sup>)、C(R<sup>15</sup>)(R<sup>15'</sup>)N(R<sup>15''</sup>)、N(R<sup>15''</sup>)C(R<sup>15</sup>)(R<sup>15'</sup>)、C(R<sup>15</sup>)(R<sup>15'</sup>)O、OC(R<sup>15</sup>)(  
R<sup>15'</sup>)、C(R<sup>15</sup>)(R<sup>15'</sup>)S、SC(R<sup>15</sup>)(R<sup>15'</sup>)、C(R<sup>15</sup>)  
=C(R<sup>15'</sup>)、=C(R<sup>15</sup>)C(R<sup>15'</sup>)=、N=C(R<sup>15'</sup>)、=NC  
(R<sup>15'</sup>)=、C(R<sup>15</sup>)=N、=C(R<sup>15</sup>)N=、N=N、=NN=、C  
R<sup>15</sup>、N、NR<sup>15</sup>から選択され、又はDB1及びDB2では、X<sup>3</sup>はX<sup>3a</sup>及びX<sup>3b</sup>  
を表し、ここでX<sup>3a</sup>はX<sup>34</sup>に接続され、X<sup>34</sup>とX<sup>4</sup>の間には二重結合が存在し、また  
X<sup>3b</sup>はX<sup>11</sup>に接続され、ここでX<sup>3a</sup>は独立して、H及び任意に置換された(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>ee</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sup>13</sup>Re<sup>1</sup>、C<sub>1-8</sub>アルキル又はC<sub>1-8</sub>ヘテロアルキルから選択され、  
他のいずれの置換基と連結されず；

X<sup>4</sup>は、O、S、C(R<sup>16</sup>)R<sup>16'</sup>、NR<sup>16</sup>、N及びCR<sup>16</sup>から選択され；

X<sup>5</sup>は、O、S、C(R<sup>17</sup>)R<sup>17'</sup>、NOR<sup>17</sup>及びNR<sup>17</sup>から選択され、ここでR<sup>17</sup>及  
びR<sup>17'</sup>は独立して、H及び任意に置換されたC<sub>1-8</sub>アルキル又はC<sub>1-8</sub>ヘテロアルキルから  
選択され、他のいずれの置換基と連結されず；

X<sup>6</sup>は、CR<sup>11</sup>、CR<sup>11</sup>(R<sup>11'</sup>)、N、NR<sup>11</sup>、O及びSから選択され；

X<sup>7</sup>は、CR<sup>8</sup>、CR<sup>8</sup>(R<sup>8'</sup>)、N、NR<sup>8</sup>、O及びSから選択され；

X<sup>8</sup>は、CR<sup>9</sup>、CR<sup>9</sup>(R<sup>9'</sup>)、N、NR<sup>9</sup>、O及びSから選択され；

X<sup>9</sup>は、CR<sup>10</sup>、CR<sup>10</sup>(R<sup>10'</sup>)、N、NR<sup>10</sup>、O及びSから選択され；

X<sup>10</sup>は、CR<sup>20</sup>、CR<sup>20</sup>(R<sup>20'</sup>)、N、NR<sup>20</sup>、O及びSから選択され；

X<sup>11</sup>は、C、CR<sup>21</sup>及びNから選択され、又はX<sup>11</sup>X<sup>3b</sup>は、CR<sup>21</sup>、CR<sup>21</sup>(R<sup>21'</sup>)  
)、N、NR<sup>21</sup>、O及びSから選択され；

X<sup>12</sup>は、C、CR<sup>22</sup>及びNから選択され；

X<sup>6\*</sup>、X<sup>7\*</sup>、X<sup>8\*</sup>、X<sup>9\*</sup>、X<sup>10\*</sup>及びX<sup>11\*</sup>は、それぞれX<sup>6</sup>、X<sup>7</sup>、X<sup>8</sup>、X<sup>9</sup>、X<sup>10</sup>及  
びX<sup>11</sup>に関して定義されたものと同じの意味を有し、また独立して選択され；

10

20

30

40

50

X<sup>34</sup>は、C、CR<sup>23</sup>及びNから選択され；

DB 6及びDB 7のX<sup>11\*</sup>の環B原子は、環Aの環式原子に接続され、これによりDB 6及びDB 7の環A及び環Bは単一結合によって直接接続され；

ダッシュで描かれた二重結合は、指示されている結合が単一結合又は

任意に非局在化された非累積二重結合であつてよいことを意味しており；

R<sup>8</sup>、R<sup>8'</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>9'</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>10'</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>15</sup>、R<sup>15'</sup>、R<sup>15''</sup>、R<sup>15'''</sup>、R<sup>16</sup>、R<sup>16'</sup>、R<sup>20</sup>、R<sup>20'</sup>、R<sup>21</sup>、R<sup>21'</sup>、R<sup>22</sup>及びR<sup>23</sup>はそれぞれ独立して、H、OH、SH、NH<sub>2</sub>、N<sub>3</sub>、NO<sub>2</sub>、NO、CF<sub>3</sub>、CN、C(O)NH<sub>2</sub>、C(O)H、C(O)OH、ハロゲン、R<sup>h</sup>、SR<sup>h</sup>、S(O)R<sup>h</sup>、S(O)<sub>2</sub>R<sup>h</sup>、S(O)OR<sup>h</sup>、S(O)<sub>2</sub>OR<sup>h</sup>、OS(O)R<sup>h</sup>、OS(O)<sub>2</sub>R<sup>h</sup>、OS(O)OR<sup>h</sup>、OS(O)<sub>2</sub>OR<sup>h</sup>、OR<sup>h</sup>、NHR<sup>h</sup>、N(R<sup>h</sup>)R<sup>i</sup>、+N(R<sup>h</sup>)(R<sup>i</sup>)R<sup>j</sup>、P(O)(OR<sup>h</sup>)(OR<sup>i</sup>)、OP(O)(OR<sup>h</sup>)(OR<sup>i</sup>)、SiR<sup>h</sup>R<sup>i</sup>R<sup>j</sup>、C(O)R<sup>h</sup>、C(O)OR<sup>h</sup>、C(O)N(R<sup>h</sup>)R<sup>i</sup>、OC(O)R<sup>h</sup>、OC(O)OR<sup>h</sup>、OC(O)N(R<sup>h</sup>)R<sup>i</sup>、N(R<sup>h</sup>)C(O)R<sup>i</sup>、N(R<sup>h</sup>)C(O)OR<sup>i</sup>、N(R<sup>h</sup>)C(O)N(R<sup>i</sup>)R<sup>j</sup>及び水溶性基から選択され；ここで

R<sup>h</sup>、R<sup>i</sup>及びR<sup>j</sup>は独立して、H及び任意に置換された(CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>O)<sub>ee</sub>CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>X<sup>13Re1</sup>、C<sub>1-15</sub>アルキル、C<sub>1-15</sub>ヘテロアルキル、C<sub>3-15</sub>シクロアルキル、C<sub>1-15</sub>ヘテロシクロアルキル、C<sub>5-15</sub>アリール、又はC<sub>1-15</sub>ヘテロアリールから選択され、R<sup>h</sup>、R<sup>i</sup>及び/又はR<sup>j</sup>の任意の置換基のうちの1つ又は複数は任意に、水溶性基であり、R<sup>h</sup>、R<sup>i</sup>及びR<sup>j</sup>のうちの2つ以上は任意に、1つ又は複数の結合によって連結されて1つ又は複数の任意に置換された炭素環及び/又は複素環を形成し；

あるいは、R<sup>8</sup>+R<sup>8'</sup>及び/又はR<sup>9</sup>+R<sup>9'</sup>及び/又はR<sup>10</sup>+R<sup>10'</sup>及び/又はR<sup>11</sup>+R<sup>11'</sup>及び/又はR<sup>15</sup>+R<sup>15'</sup>及び/又はR<sup>15''</sup>+R<sup>15'''</sup>及び/又はR<sup>16</sup>+R<sup>16'</sup>及び/又はR<sup>20</sup>+R<sup>20'</sup>及び/又はR<sup>21</sup>+R<sup>21'</sup>は独立して、=O、=S、=NOR<sup>h1</sup>、=C(R<sup>h1</sup>)R<sup>h2</sup>及び=NR<sup>h1</sup>から選択され、R<sup>h1</sup>及びR<sup>h2</sup>は独立して、H及び及び任意に置換されたC<sub>1-3</sub>アルキルから選択され、R<sup>8</sup>、R<sup>8'</sup>、R<sup>9</sup>、R<sup>9'</sup>、R<sup>10</sup>、R<sup>10'</sup>、R<sup>11</sup>、R<sup>11'</sup>、R<sup>15</sup>、R<sup>15'</sup>、R<sup>15''</sup>、R<sup>15'''</sup>、R<sup>16</sup>、R<sup>20</sup>、R<sup>20'</sup>、R<sup>21</sup>、R<sup>21'</sup>、R<sup>22</sup>及びR<sup>23</sup>のうちの2つ以上は任意に、1つ又は複数の結合によって連結されて1つ又は複数の任意に置換された炭素環及び/又は複素環を形成し；

R<sup>8b</sup>及びR<sup>9b</sup>は独立して選択され、またこれらが他のいずれの置換基と連結し得ないことを除いて、R<sup>8</sup>と同一の意味を有し；

R<sup>4</sup>及びR<sup>4'</sup>のうちの一方と、R<sup>16</sup>及びR<sup>16'</sup>のうちの一方とは任意に、1つ又は複数の結合によって連結されて1つ又は複数の任意に置換された炭素環及び/又は複素環を形成してよく；

R<sup>2</sup>、R<sup>2'</sup>、R<sup>3</sup>及びR<sup>3'</sup>のうちの1つと、R<sup>5</sup>及びR<sup>5'</sup>のうちの一方とは任意に、1つ又は複数の結合によって連結されて1つ又は複数の任意に置換された炭素環及び/又は複素環を形成してよく；

a及びbは独立して0~1から選択され；

DB部分は、DAI、DA2、DAI'又はDA2'部分を含まず；

DB 1の環Bは複素環であり；

DB 1のX<sup>3</sup>が X<sup>3a</sup>及びX<sup>3b</sup>を表し、かつ環Bが芳香族である場合、上記環B上の2つの近接した置換基は連結して、上記環Bに融合した、任意に置換された炭素環又は複素環を形成し；

DB 2のX<sup>3</sup>が X<sup>3a</sup>及びX<sup>3b</sup>を表し、かつ環Bが芳香族である場合、上記環B上の2つの近接した置換基は連結して：上記環Bに融合した、任意に置換された複素環；上記環Bに融合した、任意に置換された非芳香族炭素環；又は上記環Bに融合し、かつヒドロキシ基、一次アミノ基又は二次アミノ基を含有する少なくとも1つの置換基が付着した、置換された芳香族炭素環を形成し、上記一次又は二次アミンは芳香環系中の環式原子でも、アミドの一部でもなく；

DB 2の環Aが6員芳香環である場合、環B上の置換基は、環Bに融合した環を形成する

10

20

30

40

50

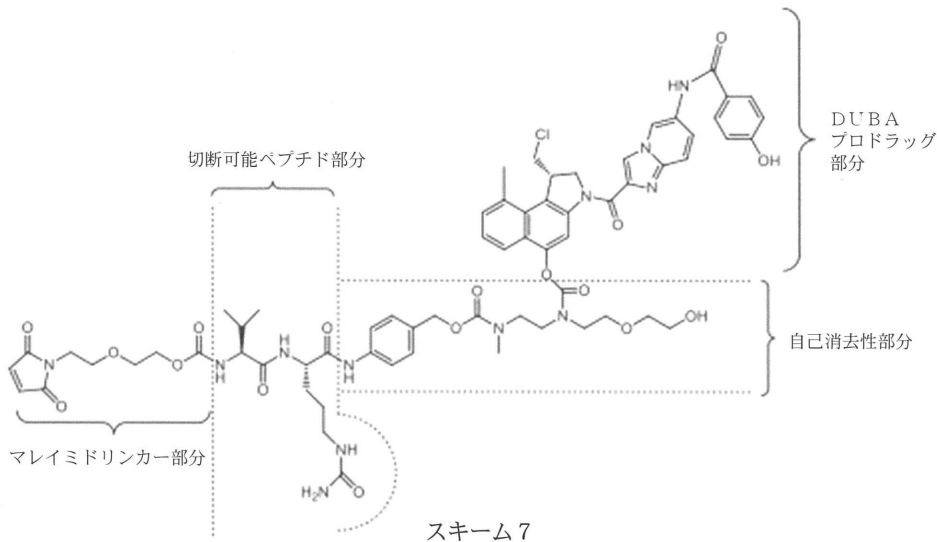
ように連結せず；

D B 8 の環 A 上の 2 つの近接した置換基は連結して、任意に置換された炭素環又は複素環を形成し、これは上記環 A に融合して二環式部分を形成し、これに環がこれ以上融合せず； D B 9 の環 A は、上記環 A に融合したいずれの環と共に、少なくとも 2 つのヘテロ原子を含有する。

【 0 2 8 7 】

上述のリンカー分子は、上で示したように、チオール マレイミドの化学的作用を用いて、システインチオール基にコンジュゲートできる。いくつかの実施形態では、細胞毒性デュオカルマイシン薬物部分は、プロドラッグである。例えば、プロドラッグである v c s e c o D U B A を、切断可能ペプチド部分を介してマレイミドリンカー部分に結合した自己消去性部分にコンジュゲートできる。

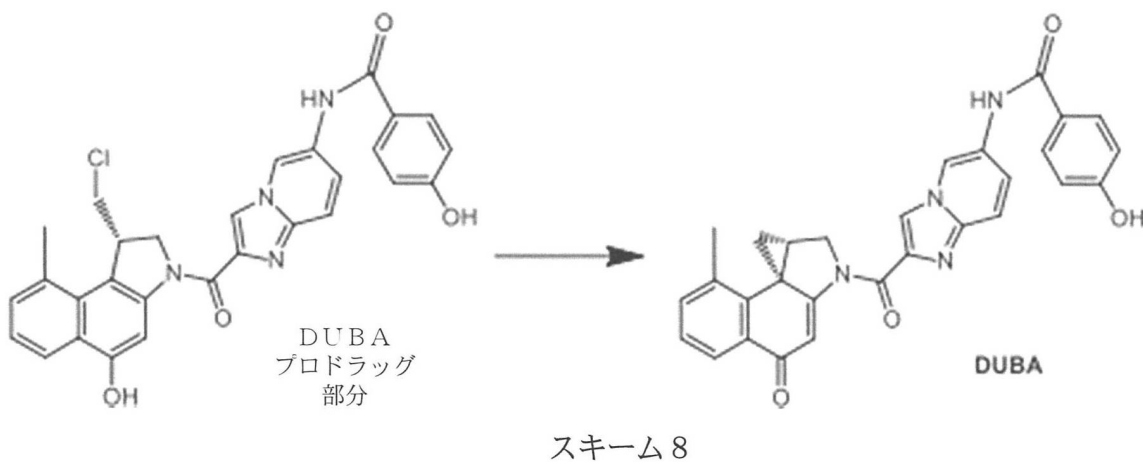
【 化 2 5 】



【 0 2 8 8 】

この分子のマレイミドリンカー部分は、本発明の B 7 H 3 A D C の A b 部分の V L D メイン及び / 若しくは V H D メイン並びに / 又は定常ドメインのシステイン残基のチオール基にコンジュゲートできる。これに続く、切断可能ペプチド部分のタンパク質分解切断の後、自己消去性部分の自発的な消去が発生し、これは s e c o D U B A の放出につながり、これは自然に転位して、活性薬物 D U B A を形成する：

【 化 2 6 】

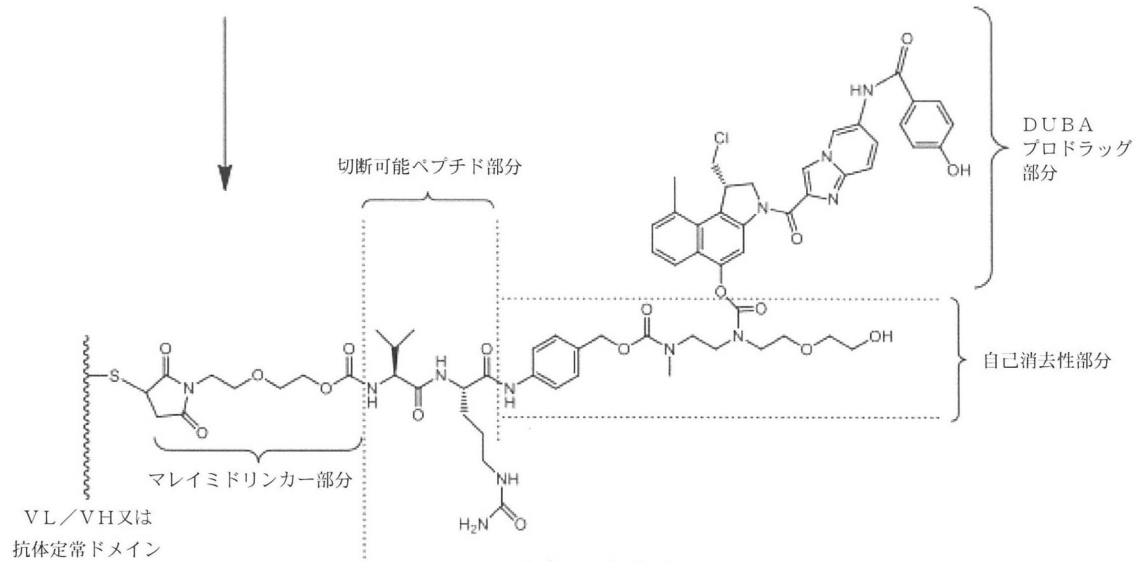
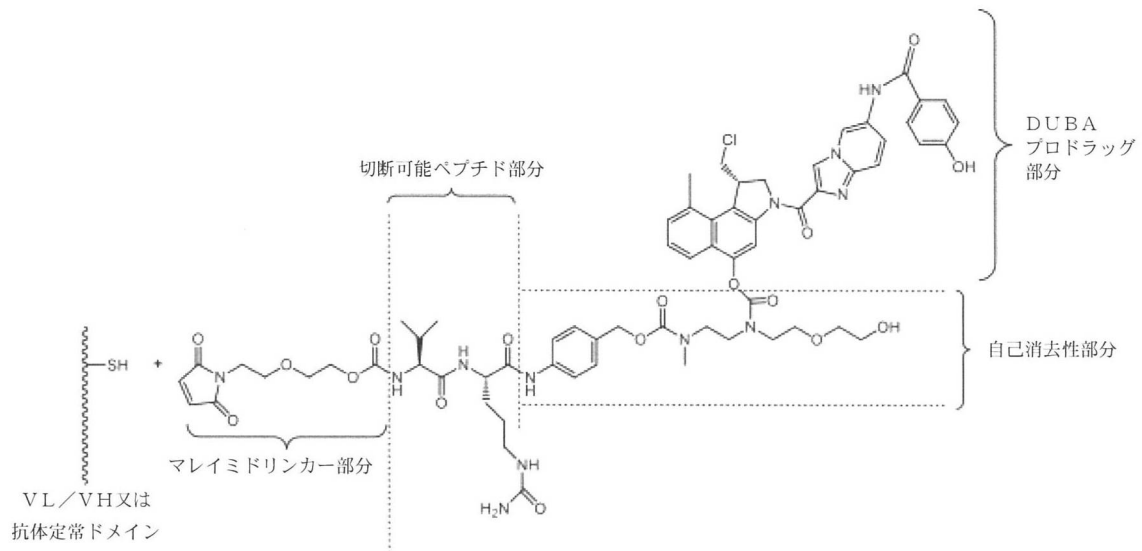


D983/SYD985: Introduction of a New Duocarmycin-Based Linker-Drug Platform," Mol. Cancer Ther. 13(11):2618-2629を参照)

【0289】

B7 H3 デュオカルマイシン薬物部分コンジュゲートの生産のための好ましい方法では、Elgersma, R.C. et al. (2014) "Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985," Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835による方法、又は国際公開第2011/133039号の方法が採用される。従って、抗B7 H3抗体又は抗体断片のVL又はVH鎖のチオール含有基は、マレイミドリンカー部分 切断可能ペプチド部分 自己消去性部分によって、seco DUBA又は他のプロドラッグにコンジュゲートされる(スキーム9A) :

【化27】



スキーム9A

【0290】

本発明はDUBAプロドラッグに関して例示されているが、代わりにスキーム9Bに示すように、他のプロドラッグ、例えばCC 1065を採用してもよい。

10

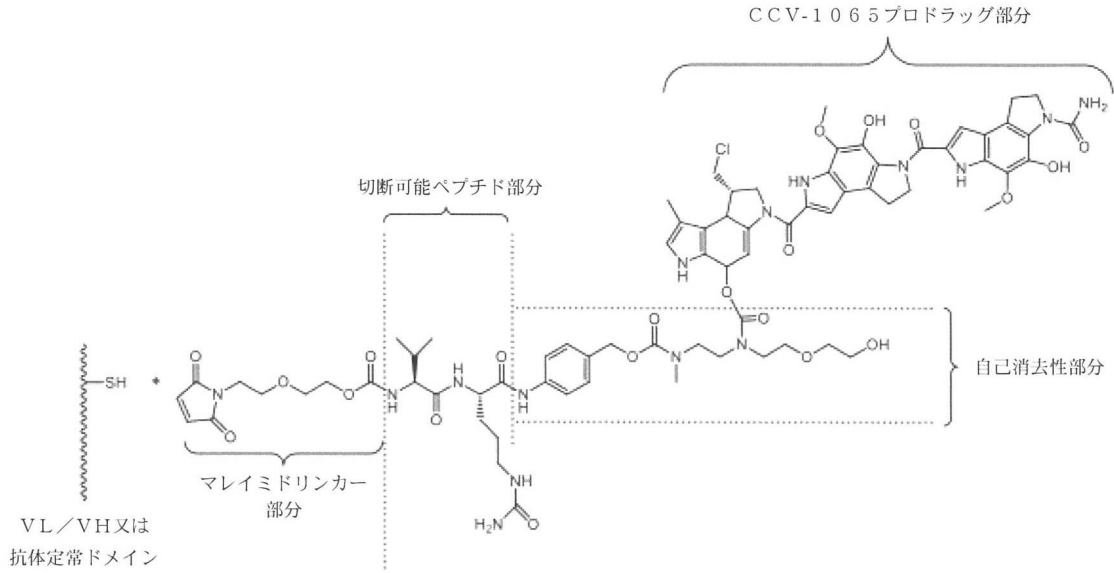
20

30

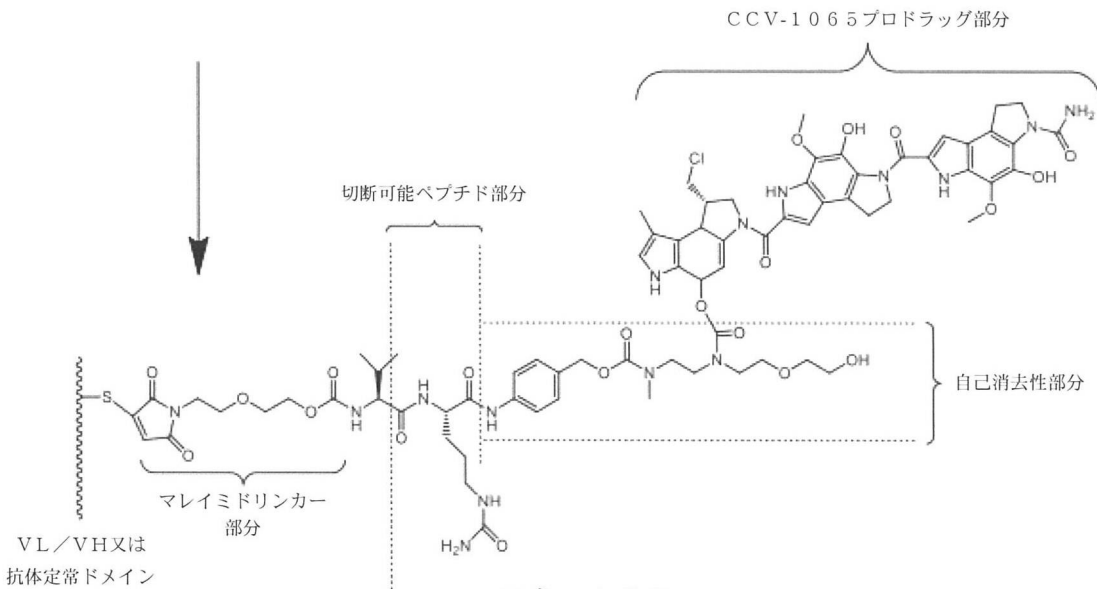
40

50

【化 2 8】



10



20

30

スキーム 9 B

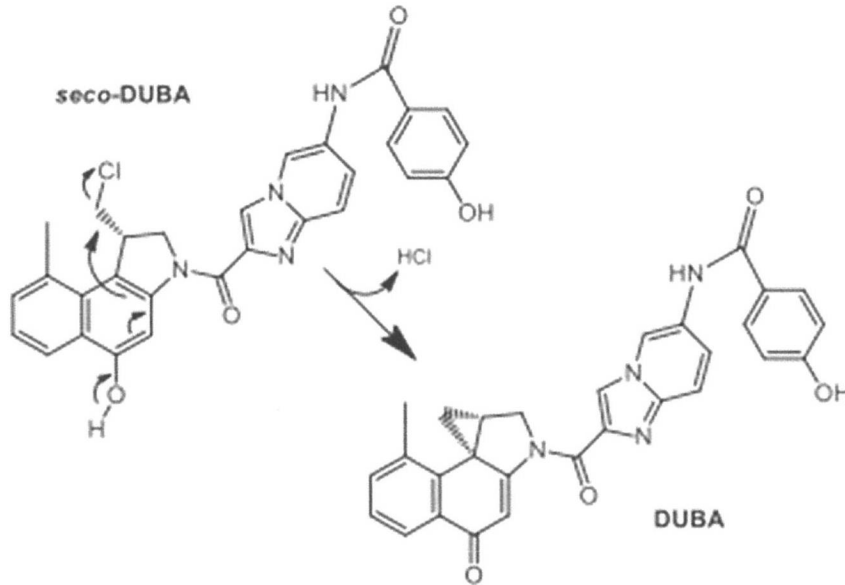
【 0 2 9 1】

切断可能ペプチド部分の切断及び自己消去性部分の消去後、プロドラッグ部分は、Winstein スピロ環化を経て活性薬物を（例えばスキーム 9 C に示すように、*seco* DUBA から DUBA を）もたらすと考えられる。

40

50

## 【化 2 9】



スキーム 9 C

10

20

## 【 0 2 9 2】

seco DUBAは、対応するDNAアルキル化及びDNA結合部分（例えばElgersma, R.C. et al. (2014) “Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duocarmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conjugate SYD985,” Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835に記載されているような1,2,9,9a-テトラヒドロシクロプロパ[1,2-c]ベンゾ[e]インドール-4-オン骨格）から調製される（Boger, D.L. et al. (1989) “Total Synthesis and Evaluation of (±)-N-(tert-Butoxycarbonyl)-CBI, (±)-CBI-CDPI1, and (±)-CBI-CDPI2: CC-1065 Functional Agents Incorporating the Equivalent 1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[1,2-c]benz[1,2-e]indol-4-one (CBI) Left-Hand Subunit,” J. Am. Chem. Soc. 111:6461-6463; Boger, D.L. et al. (1992) “DNA Alkylation Properties of Enhanced Functional Analogs of CC-1065 Incorporating the 1,2,9,9a-Tetrahydrocyclopropa[1,2-c]benz[1,2-e]indol-4-one (CBI) Alkylation Subunit,” J. Am. Chem. Soc. 114:5487-5496を参照）。

30

## 【 0 2 9 3】

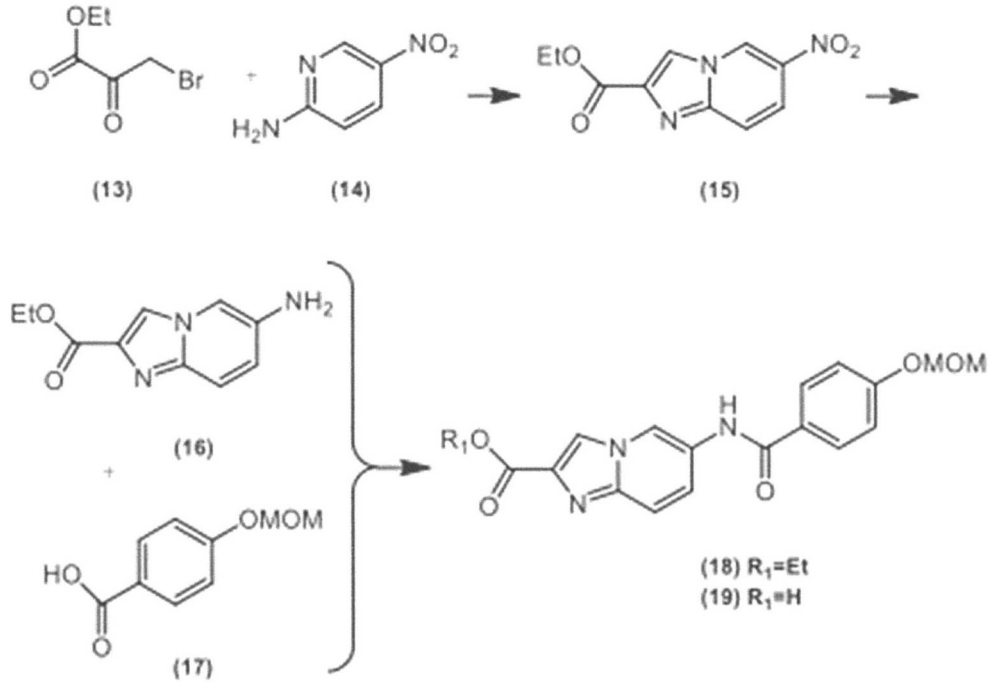
スキーム 9 Dは、DUBAのためのDNAアルキル化部分の合成を示すことによって、本発明を例示する。o-トルアルデヒド（1）とコハク酸ジメチル（2）とを反応させて、ストッベ縮合によって酸（3a / 3b）の混合物を生成する。この酸の混合物の環の閉鎖は、トリフルオロ酢酸無水物を用いて達成でき、これによりアルコール（4）が得られ、次にこれを塩化ベンジルで保護してベンジルエーテル（5）を得る。メチルエステル基を確実に加水分解することにより、カルボン酸（6）が得られ、これをトルエン及びtert-ブチルアルコールの混合物中でクルチウス転位させて、カルバメート（7）を得る。N-プロモスクシンイミドでの臭素化により、臭化物（8）を得る。臭化物（8）をカリウムtert-ブトキシドの存在下において（S）-グリシジルノシレートでアルキル化して、エポキシド（9）を得る。n-ブチルリチウムとの反応は、所望の化合物（10）と、脱臭素化され転位された誘導体（11）とをもたらす。溶媒としてテトラヒドロフランを用い、反応温度を-25~-20に維持した場合、所望の化合物（10）の収率は比較的高くなる。これらの条件下において、所望の化合物（10）と、脱臭素化され転位された誘導体（11）とは、およそ1:1の比率で得ることができる。p-トルエンスルホン酸での後処理により、脱臭素化され転位された誘導体（11）が（7）へと変換され

40

50



## 【化 3 1】



10

20

スキーム 9 E

## 【 0 2 9 5】

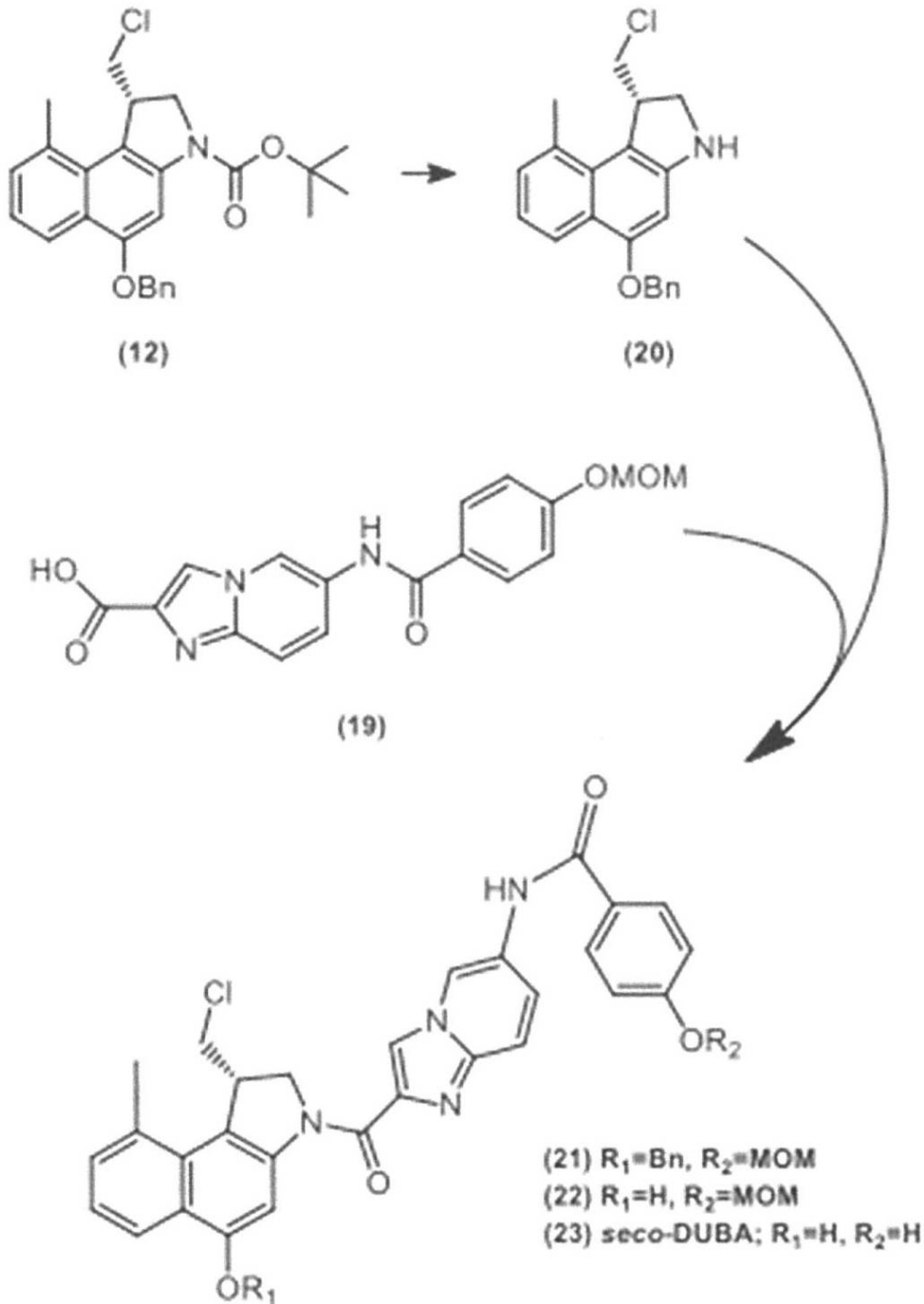
次に、*seco* DUBAを、DNA アルキル化単位 (12) 及びDNA 結合部分 (19) から合成する。*tert* ブトキシドカルボニル (Boc) 保護基を酸性条件下で (12) から除去して、アミン (20) を形成する。アミン (20) と化合物 (19) との EDC 仲介型結合により、被保護化合物 (21) が得られ、次にこれを2つの連続したステップ ((22)) を得るための、Pd/C、NH<sub>4</sub>HCO<sub>2</sub>、MeOH/THFを用いた、3時間、90%のステップ、及びこれに続く、*seco* DUBA (23) をHCl塩として提供するための、HCl、1,4 ジオキサン/水を用いた、1時間、95%のステップ) で完全に脱保護する (スキーム 9 F)。

30

40

50

## 【化 3 2】



スキーム 9 F

## 【 0 2 9 6】

他の薬物のプロドラッグ、例えば CC 1065 は、例えば国際公開第 2010/062171 号に記載されているように合成できる。

## 【 0 2 9 7】

プロドラッグ部分は好ましくは、スキーム 9 G に従って、ADC の他の部分に連結される。(24) と 2-(2-アミノエトキシ)エタノール (25) との縮合反応によってアルコール (26) を得ることから始め、これを次に、4-ニトロフェニルクロロホルメートとの反応によって反応性炭酸塩 (27) に変換することによって、マレイミドリンカー構成ブロックを合成した。Dubowchik, G.M. et al. (2002) "Cathepsin B-Labile Dipep

10

20

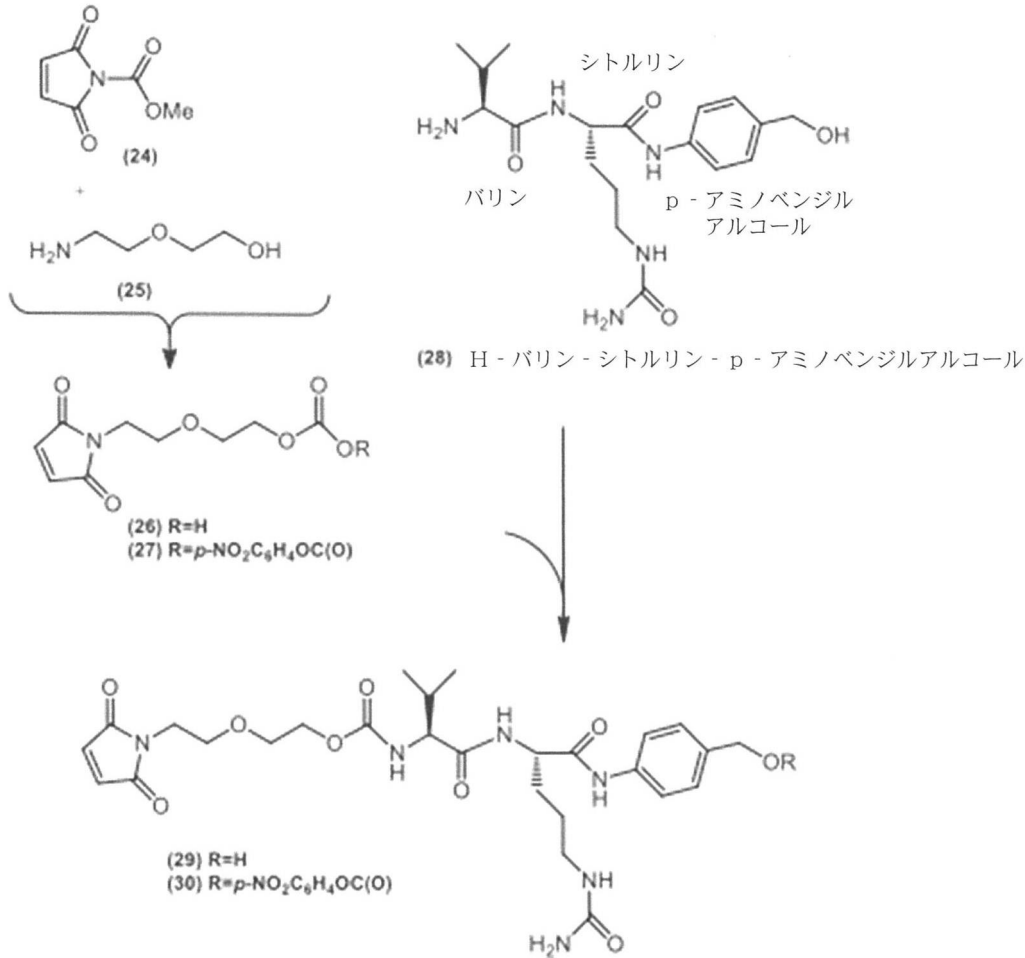
30

40

50

ptide Linkers For Lysosomal Release Of Doxorubicin From Internalizing Immunoc conjugates: Model Studies Of Enzymatic Drug Release And Antigen-Specific I n Vitro Anticancer Activity,” Bioconjugate Chem. 13:855-869に従って調製されたH バリン シトルリン P A B A ( 2 8 ) に ( 2 7 ) を結合させることにより、リンカー ( 2 9 ) が形成され、これを炭酸ビス ( 4 - ニトロフェニル ) で処理することによって、活性化されたリンカー ( 3 0 ) を得た。

【化 3 3】



スキーム 9 G

スキーム 9 H に示すように、*seco* DUBA MOM ( 2 2 ) を、2 ステップでのコンジュゲーションのために修飾した。4 - ニトロフェニルクロロホルメート及び *tert* - ブチルメチル ( 2 - (メチルアミノ) エチル ) カルバメート ( 3 1 ) による ( 2 2 ) の連続処理により、化合物 ( 3 2 ) を得る。( 3 2 ) 中の *Boc* 及び *MOM* 保護基を除去することによって、( 3 3 ) が *TFA* 塩として得られた。

10

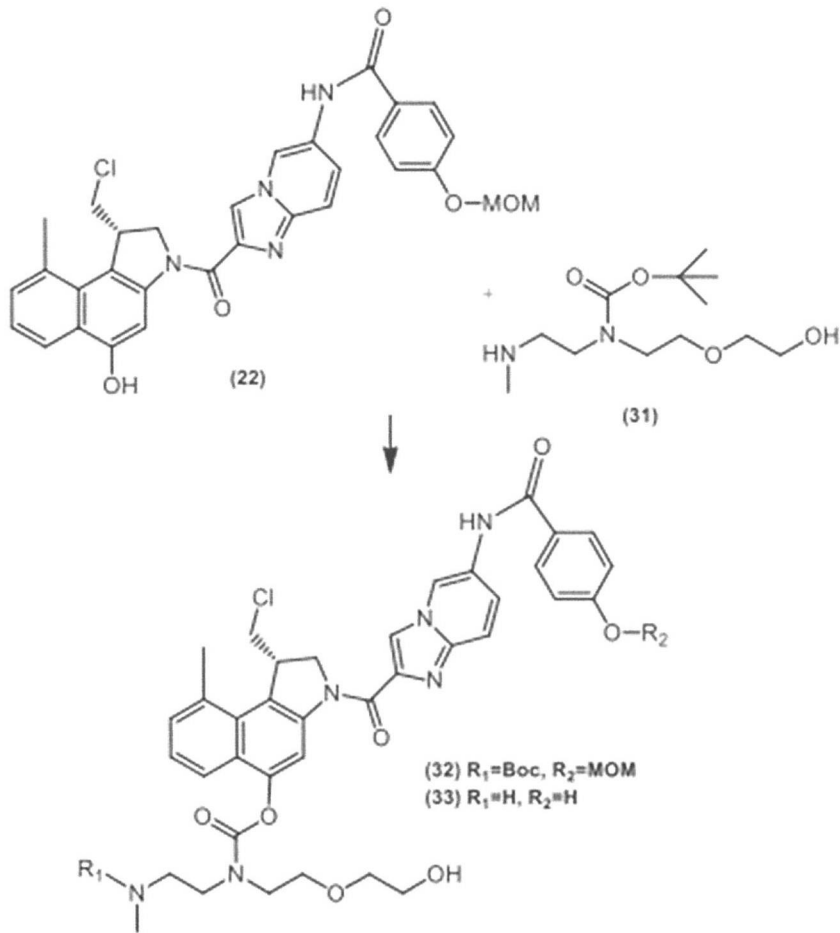
20

30

40

50

## 【化 3 4】



スキーム 9 H

## 【 0 2 9 8】

わずかに塩基性の条件下での、活性化されたリンカー (30) と環化スパーサ デュオカルマイシン構造体 (33) との反応によって、ADC を合成した。これらの条件下では、環化スパーサの自己消去及びその結果としての 3 a の形成は抑制された (スキーム 9 I)。

10

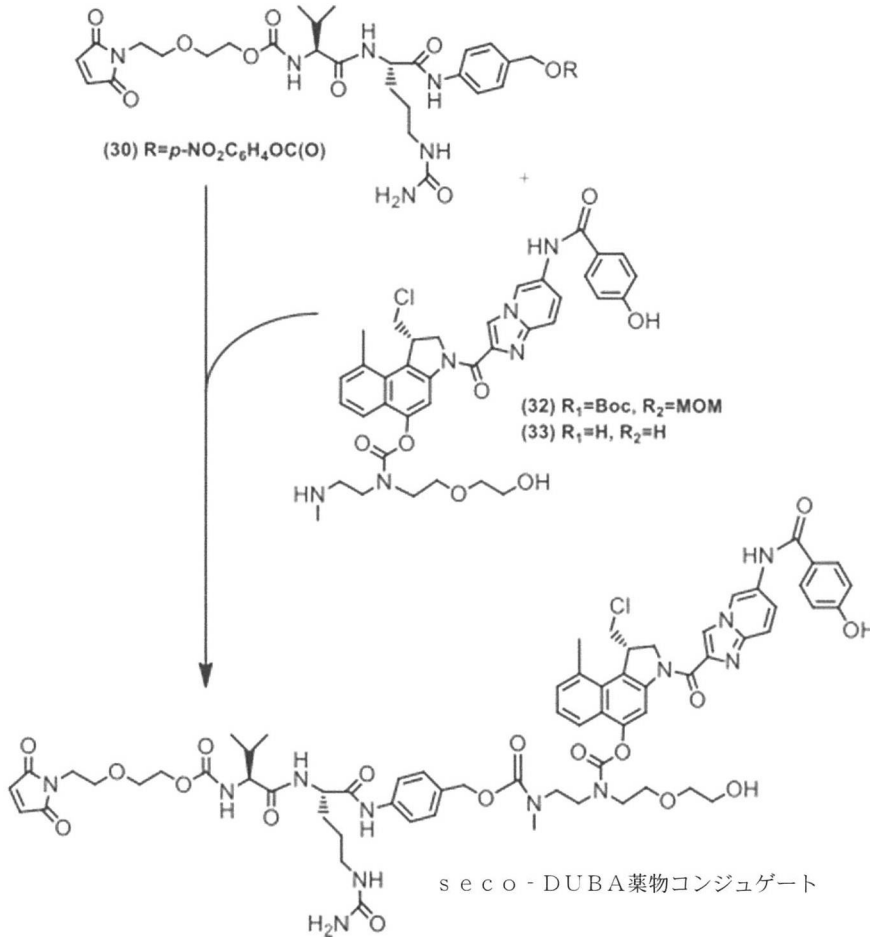
20

30

40

50

## 【化 3 5】



スキーム 9 I

## 【0299】

このプロセスは平均して、mAb 1つあたり2つの遊離チオール基を生成し、これは、平均薬物対抗体比 (drug-to-antibody-ratio: DAR) が約2であり、かつ高分子量種及び残留したコンジュゲートしていないデュオカルマイシン部分の量が少ないB7 H3 ADCの統計的分布をもたらす。

## 【0300】

合成の複数のステップの順序は所望に応じて変更してよい。好ましくは、使用方法は、上述のようにスキーム9A~9Iのものとなる。

## 【0301】

XII. 本発明のB7 H3結合分子の使用

本発明は、本発明のB7 H3結合分子 (例えば、抗体、二重特異性抗体、二重特異性ダイアボディ、3価結合分子、B7 H3 ADC等)、このような分子由来のポリペプチド、このような分子又はポリペプチドをエンコードする配列を含むポリヌクレオチド、及び本明細書に記載の他の作用剤を含む、医薬組成物を含む組成物を包含する。

## 【0302】

本明細書に記載されているように、本明細書に記載の抗B7 H3 VL及び/又はVHドメインを含む本発明のB7 H3結合分子は、細胞表面上に存在するB7 H3に結合して、抗体依存性細胞伸介型細胞毒性 (ADCC) 及び/若しくは相補体依存性細胞毒性 (CDC) を誘発する、並びに/又は標的転換細胞殺滅 (例えば標的転換T細胞細胞毒性) を仲介する能力を有する。いずれの作用機序に束縛されることを意味するものではないが、本発明のB7 H3 ADC分子は、腫瘍細胞が発現するB7 H3に結合すると内

10

20

30

40

50

在化され、コンジュゲートした細胞毒素の作用による腫瘍細胞の殺滅を仲介する。

【0303】

よって、本明細書に記載の抗 B7 H3 VL 及び / 又は VH ドメインを含む本発明の B7 H3 結合分子は、B7 H3 の発現に関連する又は B7 H3 の発現を特徴とするいずれの疾患又は状態を治療する能力を有する。上述のように、B7 H3 は、低分化形態を呈する高悪性度腫瘍に関連する多数の血液及び固形悪性病変において発現されるオンコ胚抗原であり、臨床転帰不良と相関する。従って限定するものではないが、本発明の B7 H3 結合分子は、癌、特に B7 H3 の発現を特徴とする癌の診断又は治療に採用できる。

【0304】

本発明の B7 H3 結合分子で治療できる癌としては、以下の細胞：副腎腫瘍；AIDS 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；副腎癌；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；B細胞癌；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；消化器癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；グリア芽細胞腫；血液悪性腫瘍；肝細胞癌；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病（例えば急性骨髄性白血病）；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌（例えば非小細胞肺癌（NSCLC））；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；中皮腫咽頭癌；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；卵巣癌；膵臓癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；小児期の小円形青色細胞腫瘍（神経芽細胞腫及び横紋筋肉腫を含む）；軟組織肉腫；扁平上皮癌（例えば頭頸部扁平上皮細胞癌（SCCHN））；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺癌（例えば甲状腺転移癌）；及び子宮癌からなる群から選択される癌細胞の存在を特徴とする癌が挙げられる。

【0305】

特に本発明の B7 H3 結合分子は、副腎癌、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、グリア芽細胞腫、腎臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、毛様細胞白血病、バーキットリンパ腫、びまん性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、周辺部リンパ腫、中皮腫咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、多発性骨髄腫、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、腎細胞癌、小児期の小円形青色細胞腫瘍（神経芽細胞腫及び横紋筋肉腫を含む）、扁平上皮癌（頭頸部扁平上皮癌（SCCHN））、精巣癌、甲状腺癌（例えば甲状腺転移癌）、並びに子宮癌の治療に使用できる。

【0306】

本発明の二重特異性 B7 H3 結合分子は、上記分子の第2の特異性（例えば CD2、CD3、CD8、CD16、T細胞受容体（TCR）、NKGD2等）を発現する腫瘍細胞の標的転換殺滅を促進することによって、B7 H3 が提供する癌の治療を増進する。このような B7 H3 結合分子は特に癌の治療に有用である。

【0307】

治療における有用性に加えて、本発明の B7 H3 結合分子は検出可能な標識を付すことができ、癌の診断又は腫瘍及び腫瘍細胞の撮像に使用できる。

【0308】

XIII. 医薬組成物

本発明の組成物は、医薬組成物の製造に使用できるバルク薬剤組成物（例えば不純又は非滅菌組成物）、及び単位剤形の調製に使用できる医薬組成物（即ち被験体又は患者への投与に好適な組成物）を含む。これらの組成物は、予防的又は治療的有効量の本発明の B7 H3 結合分子、又はこのような作用剤と薬学的に許容可能なキャリアとの組み合わせを含む。好ましくは、本発明の組成物は、予防的又は治療的有効量の本発明の B7 H3 結

10

20

30

40

50

合分子のうちの1つ又は複数と、薬学的に許容可能なキャリアとを含む。本発明はまた、特定の癌抗原に対して特異的である第2の治療用抗体（例えば腫瘍特異性モノクローナル抗体）、及び薬学的に許容可能なキャリアを更に含む、上記医薬組成物も包含する。

【0309】

ある具体的実施形態では、用語「薬学的に許容可能な（pharmaceutically acceptable）」は、動物、より詳細にはヒトにおける使用に関して、連邦規制当局若しくは州政府によって承認されている、又は米国薬局方若しくは他の一般に認められた薬局方に記載されていることを意味する。用語「キャリア（carrier）」は、希釈剤、アジュバント（例えばフロイントアジュバント（完全及び不完全））、賦形剤、又は治療薬の投与に用いられるビヒクルを指す。一般に、本発明の組成物の成分は、例えば活性作用剤の量を示すアンプル又はサシェ等の気密性コンテナ中の凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として、別個に、又は単位剤形にまとめて混合された状態で供給される。組成物を点滴によって投与する場合、組成物は、滅菌された薬学的グレードの水又は食塩水を内包する点滴ボトルを用いて吐出できる。組成物を注射によって投与する場合、投与前に成分を混合できるように、注射用無菌水又は食塩水のアンプルを提供できる。

10

【0310】

本発明はまた、単独の又は上述のような薬学的に許容可能なキャリアと組み合わせられた本発明のB7 H3結合分子で充填された1つ又は複数のコンテナを含む、医薬パック又はキットも提供する。更に、疾患の治療に有用な1つ又は複数の他の予防剤又は治療剤も、上記医薬パック又はキットに含めることができる。本発明はまた、本発明の医薬組成物の成分のうちの1つ又は複数で充填された1つ又は複数のコンテナを含む、医薬パック又はキットも提供する。任意に、このような1つ又は複数のコンテナは、医薬製品又は生物学的製品の製造、使用又は販売を規制する政府機関によって規定された形式の通知と関連するものとすることができ、上記通知は、ヒトへの投与のための製造、使用又は販売の機関による承認を反映したものである。

20

【0311】

本発明は、上述の方法において使用できるキットを提供する。キットは、B7 H3 ADCを含む本発明のB7 H3結合分子のいずれを含むことができる。このキットは更に、癌の治療に有用な1つ又は複数の他の予防剤及び/又は治療剤を、1つ又は複数のコンテナ内に含むことができる

30

【0312】

XIV. 投与方法

本発明の組成物は、有効量の本発明の融合タンパク質若しくはコンジュゲート分子又は本発明の融合タンパク質若しくはコンジュゲート分子を含む医薬組成物を被験体に投与することによる、疾患、障害又は感染症に関連する1つ又は複数の症状の治療、予防及び改善のために提供できる。好ましい態様では、上記組成物は実質的に精製される（即ち上記組成物の効果を制限する、又は望ましくない副作用を生成する物質を実質的に含まない）。ある具体的実施形態では、被験体は動物、好ましくは非霊長類（例えばウシ属、ウマ科、ネコ科、イヌ科、げっ歯類等）又は霊長類（例えばカニクイザル等のサル、ヒト等）といった哺乳類である。ある好ましい実施形態では、被験体はヒトである。

40

【0313】

例えば抗体又は融合タンパク質を発現できるリポソーム、微粒子マイクロカプセル、組み換え細胞内へのカプセル化；受容体媒介性エンドサイトーシス（例えばWu et al. (1987) "Receptor-Mediated In Vitro Gene Transformation By A Soluble DNA Carrier System," J. Biol. Chem. 262:4429-4432を参照）；レトロウイルス又は他のベクターの一部としての核酸の構築等、様々な送達系が公知であり、本発明の組成物の投与に使用できる。

【0314】

本発明の分子を投与する方法としては：非経口投与（例えば皮内、筋肉内、腹腔内、静脈内及び皮下）；硬膜外；並びに粘膜（例えば鼻腔内及び経口経路）が挙げられるがこれら

50

に限定されない。ある具体的実施形態では、本発明の B 7 H 3 結合分子は、筋肉内、静脈内又は皮下投与される。組成物は、いずれの便利な経路によって、例えば点滴又はボラス注射によって、上皮又は粘膜皮膚層（例えば口腔粘膜、直腸及び腸粘膜等）を通じた吸収によって投与してよく、他の生物学的活性作用剤と共に投与してよい。投与は全身性又は局所性とすることができる。更に、例えば吸入器又は噴霧器の使用及びエアロゾル化剤を用いた処方により、肺投与を採用することもできる。例えば米国特許第 6, 0 1 9, 9 6 8 号；米国特許第 5, 9 8 5, 3 2 0 号；米国特許第 5, 9 8 5, 3 0 9 号；米国特許第 5, 9 3 4, 2 7 2 号；米国特許第 5, 8 7 4, 0 6 4 号；米国特許第 5, 8 5 5, 9 1 3 号；米国特許第 5, 2 9 0, 5 4 0 号；米国特許第 4, 8 8 0, 0 7 8 号；国際公開第 9 2 / 1 9 2 4 4 号；国際公開第 9 7 / 3 2 5 7 2 号；国際公開第 9 7 / 4 4 0 1 3 号；国際公開第 9 8 / 3 1 3 4 6 号；国際公開第 9 9 / 6 6 9 0 3 を参照（これらはそれぞれ、参照により本出願に援用される）。

10

## 【 0 3 1 5 】

本発明はまた、本発明の B 7 H 3 結合分子の調製物を、この分子の量を示すアンプル又はサシェ等の気密性コンテナ内に包装することも提供する。一実施形態では、上記分子は、気密性コンテナ内の滅菌凍結乾燥粉末又は無水濃縮物として供給され、例えば水又は食塩水を用いて、被験体への投与に適切な濃度へと再構成できる。好ましくは、本発明の B 7 H 3 結合分子は、気密性コンテナ内の滅菌凍結乾燥粉末として供給される。

## 【 0 3 1 6 】

凍結乾燥された本発明の B 7 H 3 結合分子の調製物は、その元々のコンテナ内において 2 ~ 8 で保管するべきであり、またこの分子は、再構成後 1 2 時間以内、好ましくは 6 時間以内、5 時間以内、3 時間以内又は 1 時間以内に投与するべきである。ある代替実施形態では、このような分子は、この分子、融合タンパク質又はコンジュゲート分子の量及び濃度を示す気密性コンテナ内に、液体形態で供給される。好ましくは、このような B 7 H 3 結合分子は、液体形態で提供される場合、気密性コンテナ内に供給される。

20

## 【 0 3 1 7 】

障害に関連する 1 つ又は複数の症状の治療、予防及び改善に効果的な本発明の上記調製物の量は、標準的な臨床技術によって決定できる。処方において採用するべき正確な用量は、投与経路及び状態の重篤度にも左右され、施術者の判断及び各患者の状況に従って決定するべきである。効果的な用量は、インビトロ又は動物モデル試験系から得られた用量応答曲線から外挿できる。

30

## 【 0 3 1 8 】

本明細書において使用される場合、医薬組成物の「有効量 (effective amount)」は：疾患によってもたらされる症状の低減；感染の症状（例えばウイルス負荷、発熱、疼痛、敗血症等）若しくは癌の症状（例えば癌細胞の増殖、腫瘍の存在、腫瘍転移等）を減弱させる疾患に起因する症状の減弱；これによる、疾患に罹患したヒトの Q O L の上昇；疾患を治療するために必要な他の投薬量の低減；標的化及び / 若しくは内在化等による別の投薬の効果の増強；疾患の進行の遅延；並びに / 又は個体の生存期間の延長を含むがこれらに限定されない、有益な又は所望の結果を得るために十分な量である。

## 【 0 3 1 9 】

有効量は、1 回又は複数回の投与で投与できる。本発明の目的のために、薬剤、化合物又は医薬組成物の有効量は、直接的又は間接的な：ウイルスの存在の増殖（又はその影響）の低減；並びにウイルス性疾患の進展の低減及び / 又は遅延に十分な量である。いくつかの実施形態では、薬剤、化合物又は医薬組成物の有効量は、別の薬剤、化合物又は医薬組成物と組み合わせて達成してもしなくてもよい。従って「有効量」は、1 つ又は複数の化学療法剤を投与する文脈で考えることができ、また単一の作用剤が、1 つ又は複数の他の作用剤と組み合わせて所望の結果を達成できる又は所望の結果を達成する場合に、有効量で与えられているものと考えられる。個別の必要量は異なるが、各成分の有効量の最適な範囲の決定は当業者の能力の範囲内である。

40

## 【 0 3 2 0 】

50

本発明に包含される B 7 H 3 結合分子に関して、患者に投与される投薬量は好ましくは、レシピエント被検体の体重 ( k g ) に基づいて決定される。本発明に包含される B 7 H 3 結合分子に関して、患者に投与される投薬量は典型的には、被検体の体重に対して約  $0.01 \mu\text{g} / \text{kg} \sim$  約  $30 \text{mg} / \text{kg}$  以上である。

【 0 3 2 1 】

本発明の B 7 H 3 結合分子の投与の用量及び頻度は、例えば脂質化等の改質によって分子の取り込み及び組織貫通を増強することによって低減又は変更できる。

【 0 3 2 2 】

患者に投与される本発明の B 7 H 3 結合分子の投薬量は、単一作用剤による治療としての使用のために計算してよい。あるいは、上記分子は他の治療用組成物と併用され、患者に投与される投薬量は、上記分子を単一作用剤による治療として使用する場合よりも小さくなる。

10

【 0 3 2 3 】

本発明の医薬組成物は、治療が必要な領域に局所的に投与してよく、これは、以下に限定されるものではないが、例えば局所的点滴によって、注射によって、又はインプラントを用いて達成してよく、上記インプラントは多孔性、非多孔性又はゼラチン材料性であり、シラスティック膜等の膜又は繊維を含む。好ましくは、本発明の分子を投与する際、この分子が吸収されない材料を使用するよう注意しなければならない。

【 0 3 2 4 】

本発明の組成物は、小嚢、特にリポソーム中で送達できる ( Langer (1990) " New Methods Of Drug Delivery, " Science 249:1527-1533); Treat et al., in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, New York, pp.353-365(1989); Lopez-Berestein, 同上、pp.317-327を参照 ) 。

20

【 0 3 2 5 】

治療的又は予防的有効量の本発明の B 7 H 3 結合分子を用いた被験体の治療は、単回治療を含むことができ、又は好ましくは一連の複数回の治療を含むことができる。ある好ましい例では、被験体は、上述のようなダイアポディを用いて、約 1 ~ 10 週間、好ましくは 2 ~ 8 週間、より好ましくは約 3 ~ 7 週間、更に好ましくは約 4、5 又は 6 週間に亘って週 1 回処置される。本発明の医薬組成物は、1日に1回投与でき、このような投与は、1週間に1回、1週間に2回、2週間に1回、1ヶ月に1回、6週間に1回、2ヶ月に1回、1年に2回又は1年に1回等の頻度で行われる。あるいは本発明の医薬組成物は1日に2回投与でき、このような投与は、1週間に1回、1週間に2回、1ヶ月に1回、6週間に1回、2ヶ月に1回、1年に2回又は1年に1回等の頻度で行われる。あるいは本発明の医薬組成物は1日に3回投与でき、このような投与は、1週間に1回、1週間に2回、1ヶ月に1回、6週間に1回、2ヶ月に1回、1年に2回又は1年に1回等の頻度で行われる。治療に使用される上記分子の有効な用量設定は、特定の治療の期間に亘って増減させてよいことも理解されるだろう。

30

【 0 3 2 6 】

X V . 本発明の実施形態

40

本発明は特に、以下の実施形態 ( E A 及び E B ) に関する :

E A 1 .

式 :

$A b ( L M ) m ( D ) n$

を含む抗 B 7 H 3 抗体薬物コンジュゲート ( B 7 H 3 A D C ) であって :

A b は、ヒト化可変重鎖 ( V H ) ドメイン及びヒト化可変軽鎖 ( V L ) ドメインを含む B 7 H 3 に結合する抗体、又はその B 7 H 3 結合断片であり ;

D は、細胞毒性薬物部分であり ;

L M は、上記 A b 及び上記 D を共有結合させる結合又はリンカー分子であり ;

m は 0 ~ n の整数であって、上記 B 7 H 3 A D C のリンカー分子の数を表し ;

50

nは1～10の整数であって、上記B7 H3 ADC分子に共有結合した上記細胞毒性薬物部分の数を表す、B7 H3 ADC。

EA2.

- (A)(i)上記ヒト化VLDメインが配列番号99のアミノ酸配列を含み；
- (ii)上記ヒト化VHDメインが配列番号104のアミノ酸配列を含む；又は
- (B)(i)上記ヒト化VLDメインが配列番号20のアミノ酸配列を含み；
- (ii)上記ヒト化VHDメインが配列番号21のアミノ酸配列を含む；
- (C)(i)上記ヒト化VLDメインが配列番号30のアミノ酸配列を含み；
- (ii)上記ヒト化VHDメインが配列番号31のアミノ酸配列を含む、EA1のB7 H3 ADC。

10

EA3.

上記ヒト化VLDメインが配列番号99のアミノ酸配列を含み、上記ヒト化VHDメインが配列番号104のアミノ酸配列を含む、EA1のB7 H3 ADC。

EA4.

上記ヒト化VLDメインが配列番号20のアミノ酸配列を含み、上記ヒト化VHDメインが配列番号21のアミノ酸配列を含む、EA1のB7 H3 ADC。

EA5.

上記ヒト化VLDメインが配列番号30のアミノ酸配列を含み、上記ヒト化VHDメインが配列番号31のアミノ酸配列を含む、EA1のB7 H3 ADC。

EA6.

上記Abが抗体である、EA1～EA5のいずれか1つのB7 H3 ADC。

20

EA7.

上記Abが抗体の抗原結合断片である、EA1～EA5のいずれか1つのB7 H3 ADC。

EA8.

上記B7 H3 ADCが、ヒトIgGのFcドメインを含む、EA1～EA7のいずれか1つのB7 H3 ADC。

EA9.

上記ヒトIgGが、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4である、EA8のB7 H3 ADC。

30

EA10.

上記Fcドメインが変異型Fcドメインであり、上記変異型Fcドメインは：

(a)Fc Rに対する上記変異型Fcドメインの親和性を低減する1つ若しくは複数のアミノ酸修飾：及び/又は

(b)上記変異型Fcドメインの血清半減期を増大させる1つ若しくは複数のアミノ酸修飾を含む、EA8又はEA9のB7 H3 ADC。

EA11.

Fc Rに対する上記変異型Fcドメインの親和性を低減する上記修飾は：L234A；L235A；又はL234A及びL235Aの置換を含み、この番号付与は、Kabab tにおけるものと同様のEUインデックスの番号付与である、EA10のB7 H3 ADC。

40

EA12.

上記変異型Fcドメインの血清半減期を増大させる上記修飾は：M252Y；M252Y及びS254T；M252Y及びT256E；M252Y、S254T及びT256E；又はK288D及びH435Kの置換を含み、この番号付与は、Kabab tにおけるものと同様のEUインデックスの番号付与である、EA10又はEA11のB7 H3 ADC。

EA13.

上記LMのうちの少なくとも1つがリンカー分子である、EA1～EA12のいずれか1つのB7 H3 ADC。

50

E A 1 4 .

上記 L M リンカー分子はペプチドリinkerである、E A 1 3 の B 7 H 3 A D C .

E A 1 5 .

上記 L M リンカー分子は切断可能リンカーである、E A 1 3 の B 7 H 3 A D C .

E A 1 6 .

上記分子が式：

A b [ V ( W ) k ( X ) 1 A ] D

を含み、ここで：

V は上記切断可能 L M リンカー分子であり；

( W ) k ( X ) 1 A は、1 , ( 4 + 2 n ) 消去によって自己消去する、細長い自己消去性スペーサ系であり；

10

W 及び X はそれぞれ 1 , ( 4 + 2 n ) 電子カスケードスペーサであり、同一であるか又は異なっており；

A は、式 ( Y ) m ( ここで Y は 1 , ( 4 + 2 n ) 電子カスケードスペーサである ) のスペーサ基、又は式 U の基であり、環化除去スペーサであり；

k、1 及び m は独立して、0 ~ 5 ( 両端を含む ) の整数であり；

n は 0 ~ 1 0 ( 両端を含む ) の整数であり；

ただし：

A が ( Y ) m である場合、k + 1 + m = 1 であり；

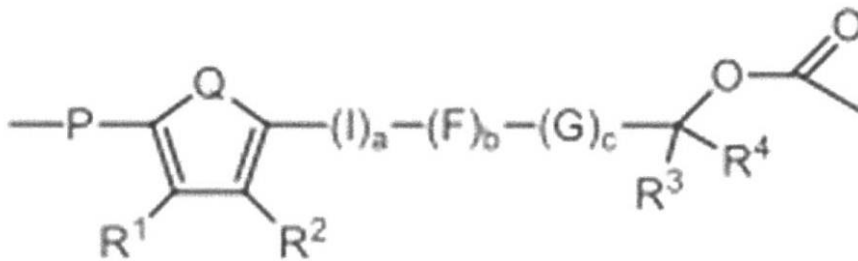
k + 1 + m = 1 である場合、n > 1 であり；

20

A が U である場合、k + 1 = 1 である。

W、X 及び Y は独立して、以下の式：

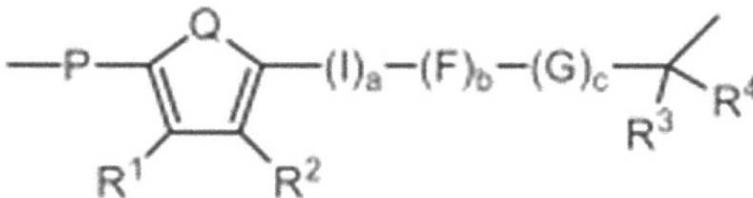
【化 3 6】



30

又は以下の式：

【化 3 7】



40

を有する化合物から選択され、ここで：

Q は R<sup>5</sup>C = CR<sup>6</sup>、S、O、NR<sup>5</sup>、R<sup>5</sup>C = N 又は N = CR<sup>5</sup> であり；

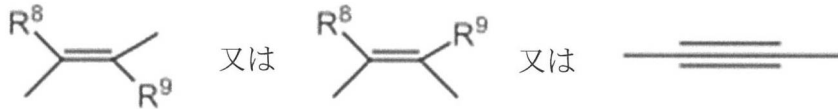
P は NR<sup>7</sup>、O 又は S であり；

a、b 及び c は独立して、0 ~ 5 ( 両端を含む ) の整数であり；

I、F 及び G は独立して、式：

50

## 【化38】



を有する化合物から選択され、ここで：

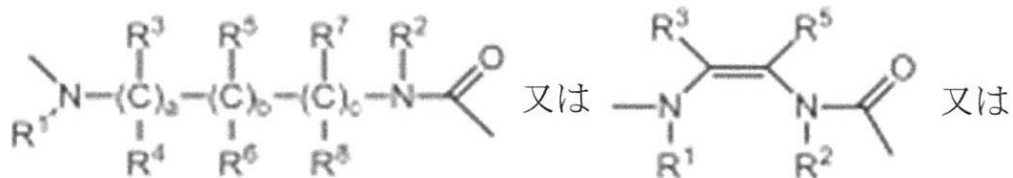
R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>及びR<sup>9</sup>は独立して、H、C<sub>1-6</sub>アルキル、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル、C<sub>5-20</sub>アリール、C<sub>1-6</sub>アルコキシ、ヒドロキシ(OH)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1-5</sub>アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1-6</sub>アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、スルホキシ(S(=O)<sub>2</sub>OH)、スルホン酸塩(S(=O)<sub>2</sub>OR<sub>x</sub>)、スルホニル(S(=O)<sub>2</sub>R<sub>x</sub>)、スルフィキシ(S(=O)OH)、スルフィン酸塩(S(=O)OR<sub>x</sub>)、スルフィニル(S(=O)R<sub>x</sub>)、ホスホノオキシ(OP(=O)(OH)<sub>2</sub>)及びリン酸塩(OP(=O)(OR<sub>x</sub>)<sub>2</sub>)を表し、ここで：

R<sub>x</sub>、R<sub>x</sub><sup>1</sup>及びR<sub>x</sub><sup>2</sup>は独立して、C<sub>1-6</sub>アルキル基、C<sub>3-20</sub>ヘテロシクリル基又はC<sub>5-20</sub>アリール基から選択され；

上記置換基R<sup>1</sup>、R<sup>2</sup>、R<sup>3</sup>、R<sup>4</sup>、R<sup>5</sup>、R<sup>6</sup>、R<sup>7</sup>、R<sup>8</sup>又はR<sup>9</sup>のうちの2つ以上は任意に、互いに接続して1つ又は複数の脂肪族又は芳香族環式構造を形成し；

Uは、式：

## 【化39】



## 【化40】



を有する化合物から選択され、ここで：

a、b及びcは独立して、0又は1の整数となるよう選択され；

ただしa + b + c = 2又は3であり；

R<sup>1</sup>及びR<sup>2</sup>又はR<sup>1</sup>又はR<sup>2</sup>は独立して、H、C<sub>1-6</sub>アルキルを表し、上記アルキルは任意に、以下の基：ヒドロキシ(OH)、エーテル(OR<sub>x</sub>)、アミノ(NH<sub>2</sub>)、モノ置換アミノ(NR<sub>x</sub>H)、ジ置換アミノ(NR<sub>x</sub><sup>1</sup>R<sub>x</sub><sup>2</sup>)、ニトロ(NO<sub>2</sub>)、ハロゲン、CF<sub>3</sub>、CN、CONH<sub>2</sub>、SO<sub>2</sub>Me、CONHMe、環式C<sub>1-5</sub>アルキルアミノ、イミダゾリル、C<sub>1-6</sub>アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール(SH)、チオエーテル(SR<sub>x</sub>)、テトラゾール、カルボキシ(COOH)、カルボン酸塩(COOR<sub>x</sub>)、スルホキシ(S(=O

$\text{)}_2\text{OH}$ )、スルホン酸塩 ( $\text{S}(\text{=O})_2\text{OR}_x$ )、スルホニル ( $\text{S}(\text{=O})_2\text{R}_x$ )、スル  
 フィキシ ( $\text{S}(\text{=O})\text{OH}$ )、スルフィン酸塩 ( $\text{S}(\text{=O})\text{OR}_x$ )、スルフィニル ( $\text{S}$   
 $(\text{=O})\text{R}_x$ )、ホスホノオキシ ( $\text{OP}(\text{=O})(\text{OH})_2$ )、及びリン酸塩 ( $\text{OP}(\text{=O})$   
 $(\text{OR}_x)_2$ )のうちの1つ又は複数によって置換され、ここで $\text{R}_x$ 、 $\text{R}_x^1$ 及び $\text{R}_x^2$ は、  
 $\text{C}_{1-6}$ アルキル基、 $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクリル基又は $\text{C}_{5-20}$ アリアル基から選択され；  
 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 及び $\text{R}^8$ は独立して、 $\text{H}$ 、 $\text{C}_{1-6}$ アルキル、 $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシク  
 リル、 $\text{C}_{5-20}$ アリアル、 $\text{C}_{1-6}$ アルコキシ、ヒドロキシ ( $\text{OH}$ )、アミノ ( $\text{NH}_2$ )、モ  
 ノ置換アミノ ( $\text{NR}_x\text{H}$ )、ジ置換アミノ ( $\text{NR}_x^1\text{R}_x^2$ )、ニトロ ( $\text{NO}_2$ )、ハロゲン  
 、 $\text{CF}_3$ 、 $\text{CN}$ 、 $\text{CONH}_2$ 、 $\text{SO}_2\text{Me}$ 、 $\text{CONHMe}$ 、環式 $\text{C}_{1-5}$ アルキルアミノ、イ  
 ミダゾリル、 $\text{C}_{1-6}$ アルキルピペラジニル、モルホリノ、チオール ( $\text{SH}$ )、チオエーテ  
 ル ( $\text{SR}_x$ )、テトラゾール、カルボキシ ( $\text{COOH}$ )、カルボン酸塩 ( $\text{COOR}_x$ )、ス  
 ルホキシ ( $\text{S}(\text{=O})_2\text{OH}$ )、スルホン酸塩 ( $\text{S}(\text{=O})_2\text{OR}_x$ )、スルホニル ( $\text{S}$   
 $(\text{=O})_2\text{R}_x$ )、スルフィキシ ( $\text{S}(\text{=O})\text{OH}$ )、スルフィン酸塩 ( $\text{S}(\text{=O})\text{OR}_x$ )  
 、スルフィニル ( $\text{S}(\text{=O})\text{R}_x$ )、ホスホノオキシ ( $\text{OP}(\text{=O})(\text{OH})_2$ )、及びリ  
 ン酸塩 ( $\text{OP}(\text{=O})(\text{OR}_x)_2$ )を表し、ここで $\text{R}_x$ 、 $\text{R}_x^1$ 及び $\text{R}_x^2$ は、 $\text{C}_{1-6}$ アルキ  
 ル基、 $\text{C}_{3-20}$ ヘテロシクリル基又は $\text{C}_{5-20}$ アリアル基から選択され、上記置換基 $\text{R}^1$ 、  
 $\text{R}^2$ 、 $\text{R}^3$ 、 $\text{R}^4$ 、 $\text{R}^5$ 、 $\text{R}^6$ 、 $\text{R}^7$ 、又は $\text{R}^8$ のうちの2つ以上は任意に、互いに接続して1  
 つ又は複数の脂肪族又は芳香族環式構造を形成する、 $\text{EA15}$ の $\text{B7 H3 ADC}$ 。  
 $\text{EA17}$ 。

10

上記LMリンカー分子が：

20

- (1) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル；
- (2) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル p  
アミノベンジルオキシカルボニル；
- (3) p アミノシナミルオキシカルボニル；
- (4) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル；
- (5) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル；
- (6) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル；
- (7) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル；
- (8) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノシナミルオキ  
シカルボニル；
- (9) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカ  
ルボニル；
- (10) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノフェニルペン  
タジエニルオキシカルボニル；
- (11) p アミノベンジルオキシカルボニル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ)  
カルボニル；
- (12) p アミノシナミルオキシカルボニル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ)  
カルボニル；
- (13) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル (メ  
チルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル；
- (14) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル  
(メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル；
- (15) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニル  
(メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル；
- (16) p アミノシナミルオキシカルボニル p アミノシナミルオキシカルボニ  
ル (メチルアミノ) エチル (メチルアミノ) カルボニル；
- (17) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジル；
- (18) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノベンジルオキシカルボニル  
p アミノベンジル；
- (19) p アミノシナミル；

30

40

50

(20) p アミノシンナミルオキシカルボニル p アミノベンジル ;  
 (21) p アミノベンジルオキシカルボニル p アミノシンナミル ;  
 (22) p アミノ シンナミルオキシカルボニル p アミノシンナミル ;  
 (23) p アミノフェニルペンタジエニル ;  
 (24) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノシンナミル ;  
 (25) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノベンジル ; 又は  
 (26) p アミノフェニルペンタジエニルオキシカルボニル p アミノフェニルペン  
 タジエニルを含む、E A 1 6 の B 7 H 3 A D C。

E A 1 8 .

上記 L M リンカー分子が上記 A b のポリペプチド鎖のアミノ酸の側鎖にコンジュゲートさ  
 れて、上記 A b を上記細胞毒性薬物部分 D の分子に結合させる、E A 1 3 ~ E A 1 7 のい  
 ずれか 1 つの B 7 H 3 A D C。

10

E A 1 9 .

上記細胞毒性薬物部分 D は、細胞毒素、放射性同位元素、免疫調節因子、サイトカイン、  
 リンホカイン、ケモカイン、成長因子、腫瘍壊死因子、ホルモン、ホルモンアンタゴニス  
 ト、酵素、オリゴヌクレオチド、DNA、RNA、s i RNA、RNA i、マイクロRN  
 A、光活性治療剤、抗血管新生剤、アポトーシス促進剤、ペプチド、脂質、炭水化物、キ  
 レート剤、又はこれらの組み合わせを含む、E A 1 ~ E A 1 8 のいずれか 1 つの B 7 H 3  
 A D C。

E A 2 0 .

上記細胞毒性薬物部分 D は細胞毒素を含み、ツブリン、オーリスタチン、マイタンシノ  
 イド、カリチアマイシン、ピロロベンゾジアゼピン及びデュオカルマイシンからなる群か  
 ら選択される、E A 1 9 の B 7 H 3 A D C。

20

E A 2 1 .

上記細胞毒性薬物部分 D はツブリン細胞毒素を含み、ツブリン A、ツブリン B、ツ  
 ブリン C 及びツブリン D からなる群から選択される、E A 1 9 の B 7 H 3 A D C。

E A 2 2 .

上記細胞毒性薬物部分 D はオーリスタチン細胞毒素を含み、M M A E ( N メチルバリン  
 バリン ドライソロイイン ドラプロイン ノルエフェドリン ) 及び M M A F ( N メ  
 チルバリン バリン ドライソロイイン ドラプロイン フェニルアラニン ) からなる群  
 から選択される、E A 1 9 の B 7 H 3 A D C。

30

E A 2 3 .

上記細胞毒性薬物部分 D はマイタンシノイド細胞毒素を含み、マイタンシン、DM 1 及び  
 DM 4 からなる群から選択される、E A 1 9 の B 7 H 3 A D C。

E A 2 4 .

上記細胞毒性薬物部分 D はカリチアマイシン細胞毒素を含み、カリチアマイシン 1、カ  
 リチアマイシン 1 B r、カリチアマイシン 1 B r、カリチアマイシン 2 I、カリチ  
 アマイシン 3 I、カリチアマイシン 1 I、カリチアマイシン 1 I 及びカリチアマイ  
 シン 1 I からなる群から選択される、E A 1 9 の B 7 H 3 A D C。

E A 2 5 .

上記細胞毒性薬物部分 D はピロロベンゾジアゼピン細胞毒素を含み、バダスツキシマブ・  
 タリリン、S J G 1 3 6、S G 2 0 0 0、S G 2 2 8 5 及び S G 2 2 7 4 からなる群か  
 ら選択される、E A 1 9 の B 7 H 3 A D C。

40

E A 2 6 .

上記細胞毒性薬物部分 D はデュオカルマイシン細胞毒素を含み、デュオカルマイシン A、  
 デュオカルマイシン B 1、デュオカルマイシン B 2、デュオカルマイシン C 1、デュオカ  
 ルマイシン C 2、デュオカルマイシン D、デュオカルマイシン S A、C C 1 0 6 5、ア  
 ドゼレシン、ピゼレシン、カルゼルシン ( U 8 0 2 4 4 ) 及びスピロ デュオカルマイ  
 シン ( D U B A ) からなる群から選択される、E A 1 9 の B 7 H 3 A D C。

E A 2 7 .

50

上記LMリンカー分子は、還元された鎖間ジスルフィドを介して上記Abと共有結合する、EA1～EA26のいずれか1つのB7 H3 ADC。

EA28.

有効量のEA1～EA27のいずれか1つのB7 H3 ADCと、薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤又は希釈剤とを含む、医薬組成物。

EA29.

B7 H3の発現に関連する又はB7 H3の発現を特徴とする疾患若しくは状態の治療における、EA1～EA27のいずれか1つのB7 H3 ADC又はEA28の医薬組成物の使用。

EA30.

B7 H3の発現に関連する又はB7 H3の発現を特徴とする上記疾患又は上記状態は癌である、EA29の使用。

EA31.

上記癌は：副腎腫瘍；AIDS関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；副腎癌；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；B細胞癌；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；消化器癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；グリア芽細胞腫；血液悪性腫瘍；肝細胞癌；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病（例えば急性骨髄性白血病）；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌（例えば非小細胞肺癌（NSCLC））；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；中皮腫咽頭癌；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；卵巣癌；膵臓癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；小児期の小円形青色細胞腫瘍（神経芽細胞腫及び横紋筋肉腫を含む）；軟組織肉腫；扁平上皮癌（例えば頭頸部扁平上皮細胞癌（SCCHN））；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺癌（例えば甲状腺転移癌）；及び子宮癌からなる群から選択される癌細胞の存在を特徴とする、EA30の使用。

EA32.

上記癌は、副腎癌、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、グリア芽細胞腫、腎臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、毛様細胞白血病、バーキットリンパ腫、びまん性大B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、周辺部リンパ腫、中皮腫咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、多発性骨髄腫、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、腎細胞癌、小児期の小円形青色細胞腫瘍（神経芽細胞腫及び横紋筋肉腫を含む）、扁平上皮癌（頭頸部扁平上皮癌（SCCHN））、精巣癌、甲状腺癌（例えば甲状腺転移癌）、並びに子宮癌からなる群から選択される、EA30の使用。

EB1.

CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインを含む可変軽鎖（VL）ドメインと、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインを含む可変重鎖（VH）ドメインとを含み：

（1）上記CDRH1ドメインは配列番号27のアミノ酸配列を含み；

（2）上記CDRH2ドメインは配列番号28のアミノ酸配列を含み；

（3）上記CDRH3ドメインは配列番号29のアミノ酸配列を含む、B7 H3結合分子。

EB2.

CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインを含む上記VLドメインと、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインを含む上記VHドメインとを含み：

（1）上記CDRL1ドメインは配列番号23のアミノ酸配列を含み；

10

20

30

40

50

(2) 上記CDRL2ドメインは配列番号24のアミノ酸配列を含み；

(3) 上記CDRL3ドメインは配列番号25のアミノ酸配列を含む、EB1のB7 H3結合分子。

EB3 .

CDRL1ドメイン、CDRL2ドメイン及びCDRL3ドメインを含む上記VLドメインと、CDRH1ドメイン、CDRH2ドメイン及びCDRH3ドメインを含む上記VHドメインとを含み；

上記ドメインは：

(1) 配列番号27のアミノ酸配列を含む、CDRH1ドメイン；

(2) 配列番号28のアミノ酸配列を含む、CDRH2ドメイン；

(3) 配列番号29のアミノ酸配列を含む、CDRH3ドメイン；

(4) 配列番号23のアミノ酸配列を含む、CDRL1ドメイン；

(5) 配列番号24のアミノ酸配列を含む、CDRL2ドメイン；及び

(6) 配列番号25のアミノ酸配列を含む、CDRL3ドメイン

からなる群から選択される、EB1のB7 H3結合分子。

EB4 .

上記VHドメインが配列番号26又は配列番号31のアミノ酸配列を含む、EB1～EB3のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB5 .

上記VLドメインが配列番号22又は配列番号30のアミノ酸配列を含む、EB1～EB4のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB6 .

VLドメイン及びVHドメインを含み、上記VLドメインは配列番号20のアミノ酸配列を含む、B7 H3結合分子。

EB7 .

VLドメイン及びVHドメインを含み、上記VHドメインは配列番号21のアミノ酸配列を含む、B7 H3結合分子。

EB8 .

VLドメイン及びVHドメインを含み、上記VLドメインは配列番号20のアミノ酸配列を含み、上記VHドメインは配列番号21のアミノ酸配列を含む、B7 H3結合分子。

EB9 .

上記分子は抗体又はその抗原結合断片である、EB1～EB8のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB10 .

上記分子は：

(a) 二重特異性抗体；又は

(b) ダイアボディであって、上記ダイアボディは、2つ、3つ、4つ若しくは5つのポリペプチド鎖を含む共有結合複合体である、ダイアボディ；又は

(c) 3価結合分子、上記3価結合分子は、3つ、4つ、5つ又は6つ以上のポリペプチド鎖を含む共有結合複合体である、3価結合分子

である、EB1～EB8のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB11 .

上記分子はFcドメインを含む、EB1～EB10のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB12 .

上記分子はダイアボディであり、アルブミン結合ドメイン(ABD)を含む、EB10のB7 H3結合分子。

EB13 .

上記Fcドメインが変異型Fcドメインであり、上記変異型Fcドメインは：

(a) Fc Rに対する上記変異型Fcドメインの親和性を低減する1つ若しくは複数のアミノ酸修飾；及び/又は

10

20

30

40

50

(b) 上記変異型Fcドメインの血清半減期を増大させる1つ若しくは複数のアミノ酸修飾を含む、EB11のB7 H3結合分子。

EB14 .

Fc Rに対する上記変異型Fcドメインの親和性を低減する上記修飾は：L234A；L235A；又はL234A及びL235Aの置換を含み、この番号付与は、Kabab tにおけるものと同様のEUインデックスの番号付与である、EB13のB7 H3結合分子。

EB15 .

上記変異型Fcドメインの血清半減期を増大させる上記修飾は：M252Y；M252Y及びS254T；M252Y及びT256E；M252Y、S254T及びT256E；又はK288D及びH435Kの置換を含み、この番号付与は、Kabab tにおけるものと同様のEUインデックスの番号付与である、EB13又はEB14のB7 H3結合分子。

10

EB16 .

上記分子は二重特異性であり、B7 H3のエピトープに免疫特異的に結合できる2つのエピトープ結合部位と、エフェクタ細胞の表面上に存在する分子のエピトープに免疫特異的に結合できる2つのエピトープ結合部位とを含む、EB1～EB15のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB17 .

上記分子は二重特異性であり、B7 H3のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位と、エフェクタ細胞の表面上に存在する分子のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位とを含む、EB1～EB15のいずれか1つのB7 H3結合分子。

20

EB18 .

上記分子は三重特異性であり：

(a) B7 H3のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位；

(b) エフェクタ細胞の表面上に存在する第1の分子のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位；及び

(c) エフェクタ細胞の表面上に存在する第2の分子のエピトープに免疫特異的に結合できる1つのエピトープ結合部位

30

を含む、EB1～EB15のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB19 .

上記分子は、B7 H3と、エフェクタ細胞の表面上に存在する分子との同時に結合できる、EB1～EB8のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB20 .

エフェクタ細胞の表面上に存在する上記分子は、CD2、CD3、CD8、TCR又はNKGD2である、EB16～EB18のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB21 .

上記エフェクタ細胞は細胞毒性T細胞又はナチュラルキラー(NK)細胞である、EB16～EB20のいずれか1つのB7 H3結合分子。

40

EB22 .

エフェクタ細胞の表面上に存在する上記分子はCD3である、EB16～EB20のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB23 .

エフェクタ細胞の表面上に存在する上記第1の分子はCD3であり、エフェクタ細胞の表面上に存在する上記第2の分子はCD8である、EB18のB7 H3結合分子。

EB24 .

上記分子は、B7 H3を発現する細胞及び細胞毒性T細胞の配位結合を仲介する、EB16～EB23のいずれか1つのB7 H3結合分子。

EB25 .

50

有効量の E<sub>B</sub>1 ~ E<sub>B</sub>24 のいずれか 1 つの B7 H3 ADC と、薬学的に許容可能なキャリア、賦形剤又は希釈剤とを含む、医薬組成物。

E<sub>B</sub>26 .

B7 H3 の発現に関連する又は B7 H3 の発現を特徴とする疾患若しくは状態の治療における、E<sub>B</sub>1 ~ E<sub>B</sub>24 のいずれか 1 つの B7 H3 ADC 又は E<sub>B</sub>25 の医薬組成物の使用。

E<sub>B</sub>27 .

B7 H3 の発現に関連する又は B7 H3 の発現を特徴とする上記疾患又は上記状態は癌である、E<sub>B</sub>26 の使用。

E<sub>B</sub>28 .

上記癌は：副腎腫瘍；AIDS 関連癌；胞巣状軟部肉腫；星状細胞腫瘍；副腎癌；膀胱癌；骨癌；脳及び脊髄の癌；転移性脳腫瘍；B 細胞癌；乳癌；頸動脈球腫瘍；子宮頸癌；軟骨肉腫；脊索腫；嫌色素性腎細胞癌；明細胞癌；大腸癌；結腸直腸癌；皮膚の良性線維性組織球腫；線維形成性小円形細胞腫瘍；上衣腫；ユーイング腫瘍；骨外性粘液型軟骨肉腫；骨性線維形成不全症；線維性骨異形成；胆嚢又は胆管癌；消化器癌；妊娠性絨毛性疾患；胚細胞腫瘍；頭頸部癌；グリア芽細胞腫；血液悪性腫瘍；肝細胞癌；膵島細胞腫瘍；カボジ肉腫；腎癌；白血病（例えば急性骨髄性白血病）；脂肪肉腫／悪性脂肪腫；肝癌；リンパ腫；肺癌（例えば非小細胞肺癌（NSCLC））；髄芽腫；黒色腫；髄膜腫；中皮腫咽頭癌；多発性内分泌腫瘍；多発性骨髄腫；骨髄異形成症候群；神経芽細胞腫；神経内分泌腫瘍；卵巣癌；膵臓癌；甲状腺乳頭癌；副甲状腺腫瘍；小児癌；末梢神経鞘腫瘍；褐色細胞腫；下垂体腫瘍；前立腺癌；後部ブドウ膜黒色腫；腎転移性癌；ラブドイド腫瘍；横紋筋肉腫；肉腫；皮膚癌；小児期の小円形青色細胞腫瘍（神経芽細胞腫及び横紋筋肉腫を含む）；軟組織肉腫；扁平上皮癌（例えば頭頸部扁平上皮細胞癌（SCCHN））；胃癌；滑膜肉腫；精巣癌；胸腺癌；胸腺腫；甲状腺癌（例えば甲状腺転移癌）；及び子宮癌からなる群から選択される癌細胞の存在を特徴とする、E<sub>B</sub>27 の使用。

E<sub>B</sub>29 .

上記癌は、副腎癌、膀胱癌、乳癌、結腸直腸癌、胃癌、グリア芽細胞腫、腎臓癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、急性リンパ球性白血病、急性骨髄性白血病、慢性リンパ球性白血病、慢性骨髄性白血病、毛様細胞白血病、パーキットリンパ腫、びまん性大 B 細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、マントル細胞リンパ腫、周辺部リンパ腫、中皮腫咽頭癌、非ホジキンリンパ腫、小リンパ球性リンパ腫、多発性骨髄腫、黒色腫、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、皮膚癌、腎細胞癌、小児期の小円形青色細胞腫瘍（神経芽細胞腫及び横紋筋肉腫を含む）、扁平上皮癌（頭頸部扁平上皮癌（SCCHN））、精巣癌、甲状腺癌（例えば甲状腺転移癌）、並びに子宮癌からなる群から選択される、E<sub>B</sub>27 の使用。

【実施例】

【0327】

ここまで本発明について概説してきたが、本発明は以下の実施例を参照することによって更に容易に理解される。以下の実施例は、本発明の診断又は治療方法における、組成物に関する様々な方法を例示する。以下の実施例は本発明の範囲の例示を目的としたものであり、本発明の範囲を限定することを目的としたものではない。

【0328】

実施例 1

抗 B7 H3 抗体の生成、ヒト化及び特性決定

過去に記述されているように、生存ヒト胎児前駆細胞又は腫瘍開始／癌段階様細胞（cancer step-like cell: CSLC）を用いたマウスの免疫化によってモノクローナル抗体を生成した（Loo et al. (2007) “The glycotope-specific RAV12 monoclonal antibody induces oncosis in vitro and has antitumor activity against gastrointestinal adenocarcinoma tumor xenografts in vivo” Mol Cancer Ther; 6: 856-65）。癌特異性 mAb に関する IHC スクリーニングにより、高分化腫瘍対正常組織結合を有する抗 B7 H3 (CD276) 反応性 mAb を同定した。サポニンコンジュゲート抗マウス F

10

20

30

40

50

a bを製造元のプロトコル(Advanced Targeting Systems)に従って1:1又は10:1のFab ZAP:試験mAb比で用いる5日間のアッセイで実施される内在化アッセイを用いて、効率的に内在化された抗B7 H3抗体のサブセットを同定した。図7に示すように、「mAb C」及び「mAb D」と称される抗B7 H3抗体を含む多数の抗B7 H3抗体を効率的に内在化させた。

【0329】

上述の抗B7 H3 mAb: mAb B、mAb C及びmAb Dを用いて、ヒト化VL及びVHドメインを形成する。これらのドメインのCDRL及びCDRHは、ヒトフレームワークドメインに融合している。これらのヒト化VH及びVLドメインを用いて、軽鎖定常領域(即ち配列番号1)並びにIgG1 CH1、ヒンジ及びFcドメイン(即ち配列番号3、7、12)を有するヒト化軽鎖を生成する。これらのヒト化抗体は、「hmAb B」、「hmAb C」及び「hmAb D」と称される。

10

【0330】

上記ヒト化VH及びVLドメインのアミノ酸配列は、既に提示されている。なお、上述のようにhmAb BのCDRを修飾することによって、代替的なヒト化VH及びVLドメインを生成してもよい。hmAb C及びhmAb Dの全ヒト化軽鎖及び重鎖のアミノ酸配列は既に提示されている。

【0331】

上記ヒト化抗体の結合動態を、可溶性ヒト又はカニクイザルB7 H3(4Ig) Hisタグ融合タンパク質(それぞれshB7 H3 His又はscB7 H3 His)を不動化された抗体に通過させるBiacore分析を用いて調査した。簡潔に述べると、各ヒト化抗体を、不動化されたFab2ヤギ抗ヒトFc表面上で捕捉し、shB7 H3 His又はscB7 H3 his(6.25~100nM)を用いてインキュベートし、結合の動態をBiacore分析によって決定した。2価結合フィッティングを用いてこれらの研究から算出されたka、kd及びKDを表6に示す。これらの結果は、ヒト化抗体がヒト及びカニクイザルB7 H3によって、様々な親和性で結合することを実証している。

20

【表7】

表6						
抗体	ヒト			カニクイザル		
	K <sub>a</sub> (x10 <sup>4</sup> )	K <sub>d</sub> (x10 <sup>-4</sup> )	K <sub>D</sub> (nM)	K <sub>a</sub> (x10 <sup>4</sup> )	K <sub>d</sub> (x10 <sup>-4</sup> )	K <sub>D</sub> (nM)
hmAb-B	11.0	0.12	0.11	7.1	2.9	4.1
hmAb-C	16	34	21.3	6.4	31	48.4
hmAb-D	3.4	22	62.9	1.35	77	592.3

30

【0332】

ヒト化抗体の組織交差反応性を、免疫組織化学(immunohistochemistry: IHC)によって検査した。表7は、正常なヒト組織、ヒト腫瘍組織、ヒト癌細胞株、及びB7 H3を発現する又は発現しないCHO細胞株に対して、ヒト化抗B7 H3抗体を指示されている抗体濃度で用いて実施した、複数のIHC研究に関する発見をまとめたものである。これらの研究の採点基準は表8に提示されている。

40

50

【表 8】

表 7				
組織	試料 ID	hmAb-B 0.313 ug/ml	hmAb-C 0.625 ug/ml	hmAb-D 2.5 ug/ml
結腸	MG06-CHTN-94F	epi 2+ (c) 中程度	粘膜固有層細胞 1+(c) 極めて稀	-
肝臓	ILS11103A	肝細胞 3+ (m) 中程度～頻繁	肝細胞 2-3+ (m) 稀～中程度	肝細胞 1+ (m) 稀
腎臓	ILS11119D	epi 1+ (c) 稀	-	-
膵臓	ILS10266	細原線維 3+ (c) 稀	細胞内 1+ (c,m) 極めて稀	-
肺	MG06-CHTN-85-A-2	肺細胞 1+ (c) 中程度	-	-
心臓	MG06-CHTN-76B	細胞内 2+ (c) 稀～中程度	細胞内 1+ (c) 極めて稀	-
皮膚	MG03-St.Agn-50B	epi 2+ (c) 中程度	扁平上皮 1+ (c,m) 稀	-
副腎	MG04-St.Agn-22B-A	4+ (m,c) 頻繁	epi 3+ (m,c) 中程度～頻繁	epi 2+ (c,m) 稀～中程度
頭頸部 CA (扁平上皮)	VNM00340-D03	2	2	1
	VNM00302-D01	3	2	1
	ILS7068-D04	3	2	1
	ILS2073-D01	3	3	2
肺 CA (NSCLC)	ILS7115-C	3	2	1
	ILS7253-C	2	1	1
	ILS2153-G	3	2	1
	ILS-11149- C	2	1 (BV) のみ	1
Hs700T ABC = 2.1e6	91812	4+ (c,m) 頻繁	4+ (m > c) 頻繁	2-3+ (m)
NCI-H1703 ABC = 8.1e5	033115-1	3-4+ (c) 頻繁	2-3+ (c,m) 中程度～頻繁	±
CHO +B7H3 Cl 31 ABC = 4.9e6	32113	2+ (c) 頻繁	3-4+ (c, m) 頻繁	3+ (m, c)
CHO +B7H3 Cl 32 ABC = 2.2e5	31813	3+ (c) 頻繁	1-2+ (c) 稀～中程度	±
CHO - B7-H3	060414-2	-	-	-

c: 細胞質

m: 膜

epi: 上皮

Tu: 腫瘍

BV: 血管

10

20

30

40

50

【表 9】

正常組織の採点基準		腫瘍の採点基準	
-	陰性	0 (陰性) :	染色なし
±	あいまい	1 (弱) :	1 + の染色強度の特異的染色細胞が 1 ~ 10 %、又は 2 + の染色強度の特異的染色細胞が 1 ~ 20 %
1 +	弱		
2 +	中程度	2 (中程度) :	特異的染色細胞の 21 ~ 79 % が 2 + の染色強度、又は特異的染色細胞の 1 ~ 49 % が 3 + の染色強度
3 +	強		
4 +	極めて強	3 (強) :	特異的染色細胞の 80 ~ 100 % が 2 + の染色強度、又は特異的染色細胞の $\geq 50$ % が 3 + の染色強度

10

20

## 【0333】

これらの結果は、全てのヒト化抗体が多数の B7 H3 陽性腫瘍細胞への結合を示すことを実証している。hmAb B は、試験した条件下において最高の腫瘍反応性を示しているが、肝細胞及び副腎組織について正常組織反応性も示す。hmAb C は、hmAb B に比べて腫瘍反応性が若干低い、正常な肝細胞との反応性は有意に低く、また反応性を示す個々の試料の数が少ない。hmAb D は、腫瘍及び正常細胞に対する反応性が全体的に低下している。これらの抗体は、カニクイザル組織との相当な交差反応性を示すが、hmAb D はこれらの IHC 研究では比較的低い強度で結合する。標的外の毒性を最小化するために、本発明の B7 H3 ADC 分子の生成には、hmAb C 及び hmAb D が好ましいものとなり得る。

30

## 【0334】

## 実施例 2

## B7 H3 ADC の生成

上述のマウス抗 B7 H3 mAb : mAb A、mAb B、mAb C 及び mAb D を用いてキメラ抗体を形成した。この抗体の VL ドメインはヒト軽鎖 定常領域 (配列番号 1) に融合しており、またこの抗体の VH ドメインはヒト IgG1 CH1 ヒンジ CH2 CH3 定常領域 (それぞれ配列番号 3、7 及び 12) に融合している。キメラ化された抗体 (「chmAb A」、「chmAb B」、「chmAb C」及び「chmAb D」) を、上述のような切断可能オーリスチン E リンカー/ペイロード「vc MMAE」(Concortis Biosystems) を用いた B7 H3 結合ドメインへのシステムインコンジュゲーションによって、B7 H3 ADC に変換した。

40

## 【0335】

## 実施例 3

## B7 H3 ADC は強力なインビトロ活性を示す

本発明の B7 H3 ADC の抗腫瘍活性を実証するために、上述の B7 H3 ADC (MMAE) を 1 ~ 100,000 pM の濃度で、B7 H3 発現性 JIMT-1 乳癌細胞、MDA-MB-468 乳癌細胞、A375.52 黒色腫細胞、Calu-6 非小細胞肺癌細胞、NCI-H1703 非小細胞肺癌細胞、NCI-H1975 非小細胞肺癌細胞、PA-1 卵巣癌細胞、Hs700T 膵臓癌細胞、DU145 前立腺癌細胞、又は B7 H3 陰性 Raji B 細胞リンパ腫細胞と共にインキュベートした。7 日後にインビトロ

50

細胞毒性を定量した。簡潔に述べると、B7 H3 ADC及び対照を希釈し、マイクロタイタープレート上に播種し、各ウェルに5000個の細胞を添加して37℃で4～7日間インキュベートする。AlamarBlue試薬(例えばBioRad/ThermoFisher/Invitrogen)をプレートに添加し、製造元のプロトコルに従って読み取る。これらの細胞上に存在する抗体結合部分の数を、Bangs QFACS(商標)キットを用いて決定した。

【0336】

この研究から得られた細胞毒性曲線を、図8A～8Jに提示する。IC50値を決定し、これを表9に示す。これらの研究の結果は、試験した内在性抗B7 H3抗体がそれぞれ、B7 H3発現性腫瘍細胞に対してインビトロでの用量依存的細胞毒性を示したことを実証している。これらの抗体は様々な効力を示した。これらのアッセイにおける相対効力は：chmAb C > chmAb B > chmAb D > chmAb Aであった。

【表10】

B7-H3-ADC	細胞株								
	乳癌		黒色腫	非小細胞肺癌			卵巣癌	膵臓癌	前立腺癌
	JIMT-1	MDA-MB-468	A375.52	Calu-6	NCI-H1703	NCI-H1975	PA-1	Hs700T	DU145
	細胞1個あたりの抗体結合部位 (x 10 <sup>5</sup> )								
	11	4.2	7.5	8.5	8.1	4.8	6.1	21	2.4
	IC50 (pM)								
chmAb-A B7-H3 ADC	9100	8095	703	995	1517	26976	8326	607	20153
chmAb-B B7-H3 ADC	221	352	153	59	90	31	555	159	3770
chmAb-C B7-H3 ADC	124	201	267	30	43	16	409	109	465
chmAb-D B7-H3 ADC	735	1383	887	171	219	162	1795	303	2587

【0337】

実施例4

B7 H3 ADCは強力なインビボ活性を示す

本発明のB7 H3 ADCの抗腫瘍活性を更に実証するために、上述のchmAb B B7 H3 ADC、chmAb C B7 H3 ADC及び/又はchmAb D B7 H3 ADC(MMAE)分子を、異なる複数の腫瘍細胞株を用いて、CD1ヌードマウスモデルにおいてインビボ毒性に関して評価した。簡潔に述べると、 $\sim 5 \times 10^6$ 個の腫瘍細胞(1:1培地及びMATRIGEL(登録商標)中に懸濁)を、一群のCD1ヌードマウス(Charles River Laboratories)に皮下移植した。腫瘍の体積がおよそ150 mm<sup>3</sup>に達した時にマウスをランダム化し、B7 H3 ADC又は対照ピヒクルを腹腔内に投与した。これらの研究では、1用量のB7 H3 ADC又は対照ピヒクルを投与した(qd x 1)。電子キャリパーを用いた直交測定によって、腫瘍を1週間に2回測定し、腫瘍体積を(長さ×幅×高さ)/2として算出した。(対照に対する)腫瘍体積を決定した('T/C')。処置済みの動物の腫瘍体積が研究期間中に5 mm<sup>3</sup>まで減少するという発見は、完全応答(Complete Response: 'CR')を意味するものと考え

えられた。

【0338】

MDA MB 468 乳癌腫瘍細胞に対するインビボ活性

乳房脂肪体に移植されたMDA MB 468 乳癌腫瘍細胞に対するこの研究の結果を表10及び図9に提示する。これは、MDA MB 468 腫瘍細胞に対する応答性を示す。

【表11】

表10				
治療 (30日目に初期投薬)	用量 (mg/kg)	T/C	CR	応答
chmAb-B B7-H3 ADC	10	4	6/7	高活性
chmAb-C B7-H3 ADC	10	20	4/7	高活性
chmAb-D B7-H3 ADC	10	8	1/7	高活性

10

【0339】

NCI H1703 非小細胞肺癌腫瘍細胞に対するインビボ活性

皮下移植されたNCI H1703 非小細胞肺癌腫瘍細胞に対するこの研究の結果を表11及び図10A～10Cに提示する。これは、NCI H1703 腫瘍細胞に対する応答性を示す。

【表12】

表11				
治療 (52日目に初期投薬)	用量 (mg/kg)	T/C	CR	応答
chmAb-B B7-H3-ADC	10	28	5/7	高活性
	3	22	3/7	高活性
	1	74	0/7	活性
chmAb-C B7-H3-ADC	10	0	6/7	高活性
	3	11	5/7	高活性
	1	70	0/7	活性
chmAb-D B7-H3-ADC	10	32	5/7	高活性
	3	4	6/7	高活性
	1	76	0/7	活性

20

30

【0340】

PA 1 卵巣癌腫瘍腫瘍細胞に対するインビボ活性

皮下移植されたPA 1 卵巣癌腫瘍細胞に対するこの研究の結果を表12及び図11A～11Cに提示する。これは、PA 1 腫瘍細胞に対する応答性を示す。

40

50

【表 1 3】

表 1 2				
治療 (4 2 日目に初期投薬)	用量 (mg/kg)	T/C	CR	応答
chmAb-B B7-H3-ADC	10	0	6/7	高活性
	3	65	0/7	活性
	1	105	0/7	非活性
chmAb-C B7-H3-ADC	10	37	3/7	高活性
	3	76	1/7	活性
	1	93	0/7	非活性
chmAb-D B7-H3-ADC	10	11	7/7	高活性
	3	57	1/7	活性
	1	113	0/7	非活性

10

【0 3 4 1】

C a l u 6 非小細胞肺癌腫瘍細胞に対するインビボ活性

皮下移植されたC a l u 6 非小細胞肺癌腫瘍細胞に対するこの研究の結果を表 1 3 及び図 1 2 A ~ 1 2 C に提示する。これは、C a l u 6 腫瘍細胞に対する応答性を示す。

【表 1 4】

20

表 1 3				
治療 (2 0 日目に初期投薬)	用量 (mg/kg)	T/C	CR	応答
chmAb-B B7-H3-ADC	10	15	3/7	高活性
	3	35	0/7	活性
	1	64	0/7	活性
chmAb-C B7-H3-ADC	10	1	3/7	高活性
	3	87	0/7	非活性
	1	68	0/7	活性
chmAb-D B7-H3-ADC	10	39	2/7	高活性
	3	43	0/7	活性
	1	54	0/7	活性

30

【0 3 4 2】

A 3 7 5 . S 2 黒色腫瘍細胞に対するインビボ活性

皮下移植されたA 3 7 5 . S 2 黒色腫瘍細胞に対するこの研究の結果を表 1 4 及び図 1 3 A ~ 1 3 C に提示する。これは、A 3 7 5 . S 2 黒色腫細胞に対する応答性を示す。

40

50

【表 1 5】

治療 (20日目に初期投薬)	用量 (mg/kg)	T/C	CR	応答
chmAb-B B7-H3-ADC	10	3	2/7	高活性
	3	13	0/7	高活性
	1	65	0/7	活性
chmAb-C B7-H3-ADC	10	4	1/7	高活性
	3	23	0/7	高活性
	1	70	0/7	活性
chmAb-D B7-H3-ADC	10	26	0/7	高活性
	3	7	0/7	高活性
	1	80	0/7	活性

## 【0343】

これらの研究の結果は、試験したB7 H3 ADCがそれぞれ、乳房、肺及び卵巣癌並びに黒色腫のマウス異種移植片モデルにおけるB7 H3陽性腫瘍に対して、有意な用量依存性インビボ抗腫瘍活性を示したことを実証している。

## 【0344】

上述のB7 H3 ADC (MMAE)分子を、非腫瘍担持CD1ヌードマウスにおいて、上記分子を5mg/kgの単回用量で腹腔内投与することによって評価した。血液試料を10日間にわたって回収し、サンドイッチELISAを血清に対して実施して、全抗体及び完全なB7 H3 ADCの濃度を定量した。

## 【0345】

chmAb B B7 H3 ADC、chmAb C B7 H3 ADC及びchmAb D B7 H3 ADCに対するこの研究の代表的な結果を、図14A 14C及び表15に提示する。これは、B7 H3 ADC分子が極めて安定しており、およそ2.2~3.6日の半減期を示したことを示している。これらのコンジュゲートの半減期は、コンジュゲートしていない分子の半減期に相当し、これはB7 H3 ADC分子がマウス内で極めて安定していることを示している。

## 【表 1 6】

B7-H3-ADC	全抗 B7-H3 抗体		完全な B7-H3-ADC*	
	T <sub>1/2</sub> (時間)	AUC (hr*ng/mL)	T <sub>1/2</sub> (時間)	AUC (hr*ng/mL)
chmAb-B B7-H3 ADC	114.1	4,796,235	58.9	4,032,575
chmAb-C B7-H3 ADC	75.9	2,698,831	52.6	2,201,893
chmAb-D B7-H3 ADC	177.2	5,162,024	87.3	3,502,158

\*MMAE コンジュゲート

## 【0346】

## 実施例 5

切断可能リンカー デュオカルマイシン部分を有するB7 H3 ADC

B7 H3 ADCであって、既に記載したように(スキーム9A~9Iを参照)、かつ Elgersma, R.C. et al. (2014) "Design, Synthesis, and Evaluation of Linker-Duo carmycin Payloads: Toward Selection of HER2-Targeting Antibody-Drug Conju

gate SYD985,” Mol. Pharmaceut. 12:1813-1835 (国際公開第02/083180号; 国際公開第2010/062171号; 国際公開第2011/133039号; 国際公開第2015/104359号; 及び国際公開第2015/185142号も参照)におけるように、還元された鎖間ジスルフィドを介して上記抗体にコンジュゲートされた切断可能リンカーを介してそのAb部分のアミノ酸残基に結合された例示的なデュオカルマイシン部分(DUBA)を有する、B7 H3 ADC(「hmAb C B7 H3 ADC」)を構成する。平均薬物対抗体比(DAR)は約2~4、典型的には約2.7である。正確なDARは調製毎に変化し得ることが理解されるだろう。合成の複数のステップの順序は所望に応じて変更してよい。好ましくは、使用方法は、上述のようにスキーム9A~9Iのものとなり、リンカー DUBAは還元された鎖間ジスルフィドを介して抗体にコンジュゲートされる。

10

## 【0347】

## 実施例6

切断可能リンカー デュオカルマイシン部分を有するB7 H3 ADCは、生物活性を保持する

上述のhmAb C B7 H3 ADC(切断可能リンカーを介してそのAb部分のアミノ酸残基に結合された例示的なデュオカルマイシン部分(DUBA)を有する)(「hmAb C DUBA」)を、細胞と共に7日間インキュベートし、基本的に上述の通りのalamarBlueアッセイを用いて生存率を決定した。図15A~15Cに示すように、hmAb C DUBA構造は、B7 H3陽性腫瘍細胞に対するその細胞毒性活性によって証明されるように、生物活性を保持した。同様の結果が、デュオカルマイシンに結合した上述のchmAb C(「chmAb C DUBA」)に関して観察された。

20

## 【0348】

この研究及び以下に記載の追加の研究において、DUBAにコンジュゲートされた無関係の抗原(CD20)に結合する分子(「Ctrl DUBA」)を非結合対照ADCとして使用して、げっ歯類の血漿中に存在するげっ歯類特異的カルボキシルエステラーゼCES1cによるインビボでの非特異的活性について考察した。

## 【0349】

## 実施例7

B7 H3 ADCは、インビボで強力な抗腫瘍活性を示す

上記分子のインビボでの有効性を評価するために、多回用量研究を実施した。Calu6非小細胞肺癌細胞を、基本的に上述の通りのマウスの群(n=5)に皮下移植し、マウスは続いて、接種後24、31、38及び45日目(矢印で示す)に複数の用量のhmAb C DUBA(1mg/kg×3、3mg/kg×3、又は6mg/kg×3)を投与され、これらの動物を、最長で62日間にわたって、(基本的に上述の通りに)腫瘍体積に関して評価した。図16に示すように、試験した全てのhmAb C DUBAの用量は、腫瘍体積の低減又は排除に有効であることが分かった。Calu6細胞は2+のIHCスコアを示した。細胞1個あたりの抗体結合部位(ABC)は、表9において報告されている。

30

## 【0350】

第2のインビボ研究(基本的に上述の通りに実施した)では、Calu6非小細胞肺癌細胞をマウスの群(n=7)に皮下移植し、マウスは続いて、20日目(矢印で示す)に単回用量のhmAb C DUBA又はCtrl DUBA(3mg/kg又は10mg/kg)を投与された。表16及び図17はその結果をまとめたものであり、hmAb C DUBAを提供することによって腫瘍体積が大幅に低減されたことを示す。

40

【表 1 7】

表 1 6			
治療	用量 - QW (mg/kg)	腫瘍体積 治療／対照%	完全な寛解
hmAb-C-DUBA	10	8	0/7
hmAb-C-DUBA	3	41	0/7
Ctrl-DUBA	10	71	0/7
Ctrl-DUBA	3	71	0/7

10

【 0 3 5 1】

第3のインビボ研究（基本的に上述の通りに実施した）では、P A 1 卵巣癌細胞をマウスの群（n = 6）に皮下移植し、マウスは続いて、25日目（矢印で示す）に単回用量のhmAb C DUBA又はCtrl DUBA（1mg/kg、6mg/kg又は10mg/kg）を投与された。表17及び図18はその結果をまとめたものであり、hmAb C DUBAを提供することによって腫瘍体積が大幅に低減され、最高で治療対象の動物の半分が完全な寛解を達成したことを示す。

【表 1 8】

表 1 7			
治療	用量 - QW (mg/kg)	腫瘍体積 治療／対照%	完全な寛解
hmAb-C-DUBA	10	11	3/6
hmAb-C-DUBA	6	9	2/6
hmAb-C-DUBA	3	57	1/6
Ctrl-DUBA	10	84	0/6
Ctrl-DUBA	6	89	0/6
Ctrl-DUBA	3	111	0/6

20

【 0 3 5 2】

A 3 7 5 . S 2 黒色腫細胞に対しても、強力なインビボ活性が観察された。上記細胞をマウスの群（n = 7）に皮下移植し、マウスは続いて、25日目（矢印で示す）に単回用量のhmAb C DUBA又はCtrl DUBA（1mg/kg又は3mg/kg）を投与された。表18及び図19はその結果をまとめたものであり、hmAb C DUBAを提供することによって腫瘍体積が大幅に低減され、試験したうちの高い方の用量において、治療対象の動物の5/7が完全な寛解を達成したことを示す。

【表 1 9】

表 1 8			
治療	用量 - QW (mg/kg)	腫瘍体積 治療／対照%	完全な寛解
hmAb-C-DUBA	3	1	5/7
hmAb-C-DUBA	1	16	1/7
Ctrl-DUBA	3	33	0/7
Ctrl-DUBA	1	70	1/7

40

【 0 3 5 3】

M D A M B 4 6 8 乳癌細胞に対しても、強力なインビボ活性が観察された。上記細胞を（基本的に上述の通りに）マウスの群（n = 5）の乳房脂肪体に移植し、マウスは続いて、70日目（矢印で示す）に単回用量のhmAb C DUBA若しくはCtrl DUBA

50

BA (3 mg/kg 若しくは 6 mg/kg) を、又は 3 用量の hmAb-C-DUBA 若しくは Ctrl-DUBA (3 mg/kg) を、投与された。これらの動物を、最長で 110 日間にわたって、(基本的に上述の通りに) 腫瘍体積に関して評価した。MDA-MB468 細胞は 2+ の IHC スコアを示した。ABC は表 9 において報告されている。表 19 及び図 20A ~ 20D は、その結果をまとめたものである。図 20A は、6 mg/kg (単回用量) におけるピヒクル、hmAb-C-DUBA 又は Ctrl-DUBA に関する結果を示す。図 20B は、3 mg/kg (単回用量) におけるピヒクル、hmAb-C-DUBA 又は Ctrl-DUBA に関する結果を示す。図 20C は、3 mg/kg (3 回用量) におけるピヒクル、hmAb-C-DUBA 又は Ctrl-DUBA に関する結果を示す。図 20D は、これらの結果全てを 1 つのグラフ上で示す。データは、hmAb-C-DUBA を提供することによって腫瘍体積が大幅に低減され、試験したうちの高い方の用量において、治療対象の動物の 4/5 が完全な寛解を達成したこと、及び用量を繰り返し提供することによって治療転帰が改善されたことを示す。

10

【表 20】

表 19			
治療	用量 - QW (mg/kg)	腫瘍体積 治療/対照%	完全な寛解
hmAb-C-DUBA	6	1	4/5
hmAb-C-DUBA	3	51	1/5
hmAb-C-DUBA	3×3 用量	2	3/5
Ctrl-DUBA	6	41	0/5
Ctrl-DUBA	3	43	0/5
Ctrl-DUBA	3×3 用量	53	0/5

20

【0354】

更なる研究では、PA1 卵巣癌細胞の異種移植片 (1:1 培地及び MATRIGEL (登録商標) 中に懸濁された ~ 5 x 10<sup>6</sup> 個の腫瘍細胞) を、マウスの群に皮下移植し、マウスは続いて、接種後 24 日目にある用量の hmAb-C-DUBA 若しくは Ctrl-DUBA (3 mg/kg、6 mg/kg 若しくは 10 mg/kg の単回用量) を、又は (接種後 24 及び 28 日目に) 10 mg/kg の用量の hmAb-C-DUBA を 2 回、又は (接種後 24、28、31 及び 35 日目に) 6 mg/kg の用量の hmAb-C-DUBA を 4 回、投与された。これらの動物を、(基本的に上述の通りに) 最大 70 日間、腫瘍体積に関して評価した。PA1 細胞は 2+ の IHC スコアを示した。ABC は表 9 において報告されている。図 21A ~ 21D は、その結果をまとめたものである。図 21A は、10 mg/kg (単回又は 2 回用量) における hmAb-C-DUBA 又は Ctrl-DUBA に関する結果を示す。図 21B は、6 mg/kg (単回又は 4 回用量) におけるピヒクル、hmAb-C-DUBA 又は Ctrl-DUBA に関する結果を示す。図 21C は、3 mg/kg (単回用量) におけるピヒクル、hmAb-C-DUBA 又は Ctrl-DUBA に関する結果を示す。図 21D は、これらの結果全てを 1 つのグラフ上で示す。データは、hmAb-C-DUBA を提供することによって、治療対象の動物において腫瘍体積が大幅に低減されたことを示す。

30

40

【0355】

実施例 8

B7H3 ADC の薬物動態

上述の chmAb-C-DUBA の薬物動態を、それぞれ単回用量の chmAb-C-DUBA (5 mg/kg) を皮下投与されたマウス (n = 3) における全 IgG 又は完全 ADC 曲線の対数線形プロットを用いて調査した。結果を図 22 に示す。

【0356】

chmAb-C-DUBA の薬物動態を、それぞれ単回用量の chmAb-C-DUBA

50

( 1 m g / k g ( オス 1 頭 ; メス 1 頭 ) 、 3 m g / k g ( オス 1 頭 ; メス 1 頭 、 1 0 m g / k g ( オス 1 頭 ; メス 1 頭 ) 又は 2 7 m g / k g ( オス 2 頭 ; メス 2 頭 ) ) を皮下投与されたカニクイザルにおける全 I g G 又は完全 A D C 曲線の対数線形プロットを用いて調査した。結果を図 2 3 A ( 全 I g G ) 及び図 2 3 B は ( 完全 A D C ) に示す。

【 0 3 5 7 】

これらの研究では、全 I g G は E L I S A で決定した。簡潔に述べると、血清試料、標準及び対照を、ヤギ抗ヒト I g G ( H + L ) でコーティングしたマイクロタイタープレート上で捕捉した。洗浄後、プレートをペルオキシダーゼ コンジュゲート済みヤギ抗ヒト I g G F c と共にインキュベートした。洗浄後、プレートを 3 、 3 ' 、 5 、 5 ' テトラメチルベンジジン ( T M B ) 基質で発色させ、リン酸で反応を停止させて、プレートを 4 0 5 n M で読み取った。試験試料中の全 I g G を、標準曲線から算出した。完全 A D C もまた E L I S A で決定した。簡潔に述べると、マウス抗デュオカルマイシン m A b をマイクロタイタープレート上で不動化した。洗浄後、プレートをペルオキシダーゼ コンジュゲート済みヤギ抗ヒト I g G F c と共にインキュベートした。洗浄後、プレートを 3 、 3 ' 、 5 、 5 ' テトラメチルベンジジン ( T M B ) 基質で発色させ、リン酸で反応を停止させて、プレートを 4 0 5 n M で読み取った。試験試料中の完全 A D C を、標準曲線から算出した。

10

【 0 3 5 8 】

用量 5 m g / k g のマウス、並びに用量 3 m g / k g 及び 1 0 m g / k g のカニクイザルに関する、薬物動態パラメータを、これらのデータを比較することによって推測した。これは表 2 0 にまとめられている ( ここで A U C L a s t は、始点から最終データ点までの曲線の下側の領域を意味する ) 。マウスにおける完全 A D C の曝露は、げっ歯類特異的カルボキシルエステラーゼ C E S 1 c によって限定されている。これらのデータは、前臨床的状况における大きな治療指数を示す。

20

【表 2 1】

表 2 0				
種	用量 (mg/kg)	T <sub>1/2</sub> (hr)	C <sub>max</sub> (ng/ml)	AUC Last (hr*µg/ml)
マウス	5	ND	5909	45
カニクイザル	3	62.7	113484	3798
カニクイザル	10	57.3	330983	17978

30

【 0 3 5 9 】

実施例 9

抗 B 7 H 3 ダイアボディの特性決定

B 7 H 3 x C D 3 二重特異性 2 鎖及び 3 鎖ダイアボディを評価して、これらの、標的転換細胞殺滅、及び / 又は細胞表面 B 7 H 3 を発現する標的細胞からのサイトカイン放出を仲介する能力を実証する。標的転換細胞殺滅を、細胞毒性 T リンパ球 ( C T L ) アッセイを用いて試験する。簡潔に述べると、B 7 H 3 x C D 3 二重特異性ダイアボディ ( 又は B 7 H 3 の代わりに無関係な抗原に結合する陰性対照ダイアボディ ) を、エフェクタ p a n T 細胞及び標的 B 7 H 3 発現性腫瘍細胞 ( エフェクタ : 標的細胞の比は 1 0 : 1 ) と共に、2 4 時間インキュベートする。% 細胞毒性 ( 即ち細胞殺滅 ) を、損傷した細胞による培地への乳酸デヒドロゲナーゼ ( L D H ) の放出の測定によって決定する。サイ

40

50

トカイン放出を同様のフォーマットを用いて試験する。簡潔に述べると、B7 H3 × C D3 二重特異性ダイアボディ（又はB7 H3 結合部位を含まない陰性対照ダイアボディ）を、エフェクタP BMC細胞のみと共に、又は10：1若しくは30：1のエフェクタ：標的細胞比での標的腫瘍細胞（例えばSK MES 1肺癌細胞）の存在下で、インキュベートし、IFN、TNF 及びIL 10サイトカインの放出を決定する。この分析は、B7 H3 × C D3 二重特異性ダイアボディの、標的転換細胞殺滅及びサイトカイン放出を仲介する能力を示す。

【0360】

本明細書中で言及されている全ての刊行物及び特許は、これらの個々の刊行物又は特許出願がそれぞれ、その全体が参照により援用されることが具体的かつ個別に指示されているかのように、参照により本出願に援用される。本発明について、その具体的な実施形態に関連して説明したが：更なる修正が可能であること；並びに本出願が、本発明の原理に基本的に従い、かつ発明が属する技術分野内での公知の又は慣例的な慣行の範囲内であるような、及びこれ以前に記載されている本質的な特徴に適合し得るような、本開示からの発展を含む、本発明のいずれの変更、使用又は改変を包含することを意図したものであることが、理解されるだろう。

【配列表フリーテキスト】

【0361】

配列表の数字見出し< 2 2 3 >の記載は以下のとおりである。

配列番号1：ヒトIgG CL ドメイン

配列番号2：ヒトIgG CL ドメイン

配列番号3：ヒトIgG1 CH1ドメイン

配列番号4：ヒトIgG2 CH1ドメイン

配列番号5：ヒトIgG3 CH1ドメイン

配列番号6：ヒトIgG4 CH1ドメイン

配列番号7：ヒトIgG1ヒンジドメイン

配列番号8：ヒトIgG2ヒンジドメイン

配列番号9：ヒトIgG3ヒンジドメイン

配列番号10：ヒトIgG4ヒンジドメイン

配列番号11：S228P安定化ヒトIgG4ヒンジドメイン

配列番号12：ヒトIgG1 CH2 CH3ドメイン、Xはリシン（K）又は不在である

配列番号13：ヒトIgG2 CH2 CH3ドメイン、Xはリシン（K）又は不在である

配列番号14：ヒトIgG3 CH2 CH3ドメイン、Xはリシン（K）又は不在である

配列番号15：ヒトIgG4 CH2 CH3ドメイン、Xはリシン（K）又は不在である

配列番号16：B7 - H3のヒト4Ig形態

配列番号17：B7 - H3のヒト2Ig形態

配列番号18：マウス抗B7 H3抗体「mAb C」のVLドメイン

配列番号19：マウス抗B7 H3抗体「mAb C」のVHドメイン

配列番号20：ヒト化抗B7 H3抗体「hmAb C」のVLドメイン

配列番号21：ヒト化抗B7 H3抗体「hmAb C」のVHドメイン

配列番号22：マウス抗B7 H3抗体「mAb D」のVLドメイン

配列番号23：抗体mAb Dの軽鎖CDR1

配列番号24：抗体mAb Dの軽鎖CDR2

配列番号25：抗体mAb Dの軽鎖CDR3

配列番号26：マウス抗B7 H3抗体「mAb D」のVHドメイン

配列番号27：抗体mAb Dの重鎖CDR1

配列番号28：抗体mAb Dの重鎖CDR2

配列番号29：抗体mAb Dの重鎖CDR3

配列番号30：ヒト化抗B7 H3抗体「hmAb D」のVLドメイン

配列番号31：ヒト化抗B7 H3抗体「hmAb D」のVLドメイン

10

20

30

40

50

配列番号 32	: ポリペプチドリンカー (リンカー 1)	
配列番号 33	: システイン含有スペーサペプチド (リンカー 2)	
配列番号 34 ~ 39	: ポリペプチドスペーサペプチド (代替的なリンカー 2)	
配列番号 40 ~ 44	: ヘテロ二量体促進ドメイン	
配列番号 45	: : ヘテロ二量体促進 E コイルドメイン	
配列番号 46	: : ヘテロ二量体促進 K コイルドメイン	
配列番号 47	: : ヘテロ二量体促進システイン含有 E コイルドメイン	
配列番号 48	: : ヘテロ二量体促進システイン含有 K コイルドメイン	
配列番号 49	: 連鎖球菌株 G 1 4 8 のタンパク質 G のアルブミン結合ドメイン 3 ( A B D 3 )	10
配列番号 50 ~ 52	: 連鎖球菌株 G 1 4 8 のタンパク質 G のアルブミン結合ドメイン 3 ( A B D 3 ) の脱免疫化変異型	
配列番号 53 ~ 59	: ポリペプチドリンカー	
配列番号 60	: L 2 3 4 A / L 2 3 5 A ヒト I g G 1 C H 2 及び C H 3 ドメイン、 X はリシン ( K ) 又は不在である	
配列番号 61	: ヒト I g G 1 C H 2 及び C H 3 ドメインの「ノブ担持」変異型、 X はリシン ( K ) 又は不在である	
配列番号 62	: ヒト I g G 1 C H 2 及び C H 3 ドメインの「ホール担持」変異型、 X はリシン ( K ) 又は不在である	
配列番号 63	: マウス抗ヒト C D 2 L o C D 2 a の V H ドメイン	20
配列番号 64	: マウス抗ヒト C D 2 L o C D 2 a の V L ドメイン	
配列番号 65	: マウス抗ヒト C D 3 抗体 C D 3 m A b 1 V H ( 1 ) の V H ドメイン	
配列番号 66	: マウス抗ヒト C D 3 抗体 C D 3 m A b 1 V H ( 2 ) の V H ドメイン	
配列番号 67	: マウス抗ヒト C D 3 抗体 C D 3 m A b 1 の V L ドメイン	
配列番号 68	: マウス抗ヒト C D 3 抗体 C D 3 m A b 1 ( D 6 5 G ) の V H ドメイン	
配列番号 69	: マウス抗ヒト C D 3 抗体 C D 3 m A b 1 L o w の V H ドメイン	
配列番号 70	: マウス抗ヒト C D 3 抗体 C D 3 m A b 1 F a s t の V H ドメイン	
配列番号 71	: マウス抗ヒト C D 3 抗体 O K T 3 の V H ドメイン	
配列番号 72	: マウス抗ヒト C D 3 抗体 O K T 3 の V L ドメイン	
配列番号 73	: マウス抗ヒト C D 8 抗体 O K T 8 の V H ドメイン	30
配列番号 74	: マウス抗ヒト C D 8 抗体 O K T 8 の V L ドメイン	
配列番号 75	: マウス抗ヒト C D 8 抗体 T R X 2 の V H ドメイン	
配列番号 76	: マウス抗ヒト C D 8 抗体 T R X 2 の V L ドメイン	
配列番号 77	: マウス抗ヒト C D 1 6 抗体 3 G 8 の V H ドメイン	
配列番号 78	: マウス抗ヒト C D 1 6 抗体 3 G 8 の V L ドメイン	
配列番号 79	: マウス抗ヒト C D 1 6 抗体 A 9 の V H ドメイン	
配列番号 80	: マウス抗ヒト C D 1 6 抗体 A 9 の V L ドメイン	
配列番号 81	: マウス抗ヒト T 細胞受容体抗体 B M A 0 3 1 の V H ドメイン	
配列番号 82	: マウス抗ヒト T 細胞受容体抗体 B M A 0 3 1 の V L ドメイン	
配列番号 83	: マウス抗ヒト N K G 2 D 受容体抗体 K Y K - 1 . 0 の V H ドメイン	40
配列番号 84	: マウス抗ヒト N K G 2 D 受容体抗体 K Y K - 1 . 0 の V L ドメイン	
配列番号 85	: マウス抗ヒト N K G 2 D 受容体抗体 K Y K - 2 . 0 の V H ドメイン	
配列番号 86	: マウス抗ヒト N K G 2 D 受容体抗体 K Y K - 2 . 0 の V L ドメイン	
配列番号 87	: D A R T D 1 の第 1 のポリペプチド鎖	
配列番号 88	: D A R T D 1 の第 2 のポリペプチド鎖	
配列番号 89	: D A R T D 2 の第 1 のポリペプチド鎖	
配列番号 90	: D A R T D 2 の第 2 のポリペプチド鎖	
配列番号 91	: 「 D A R T D 3 」 の第 1 のポリペプチド鎖、 X はリシン ( K ) 又は不在である	
配列番号 92	: 「 D A R T D 3 」 の第 2 のポリペプチド鎖	50

配列番号 93 : 「DART D3」の第3のポリペプチド鎖、Xはリシン(K)又は不在である

配列番号 94 : Streptovercillium mobaraenseトランスグルタミナーゼのテトラペプチド基質

配列番号 95 : マウス抗ヒトB7-H3抗体「mAb-A」のVLドメイン

配列番号 96 : マウス抗ヒトB7-H3抗体「mAb-A」のVHドメイン

配列番号 97 : マウス抗ヒトB7-H3抗体「mAb-B」のVLドメイン

配列番号 98 : マウス抗ヒトB7-H3抗体「mAb-B」のVHドメイン

配列番号 99 : ヒト化抗ヒトB7-H3抗体「hmAb-B」のVLドメイン

配列番号 100 : ヒト化抗ヒトB7-H3抗体「hmAb-B」の軽鎖CDR1

10

配列番号 101 : 代替的なヒト化抗ヒトB7-H3抗体「hmAb-B」の軽鎖CDR1

配列番号 102 : ヒト化抗ヒトB7-H3抗体「hmAb-B」の軽鎖CDR2

配列番号 103 : 代替的なヒト化抗ヒトB7-H3抗体「hmAb-B」の軽鎖CDR2

配列番号 104 : ヒト化抗ヒトB7-H3抗体「hmAb-B」のVHドメイン

配列番号 105 : ヒト化抗ヒトB7-H3抗体「hmAb-B」の重鎖CDR2

配列番号 106 : 代替的なヒト化抗ヒトB7-H3抗体「hmAb-B」の重鎖CDR2

【図面】

【図1】

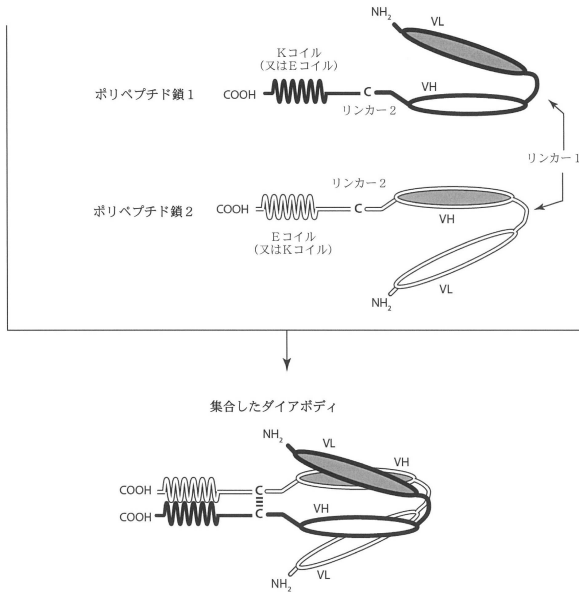


Figure 1

【図2】

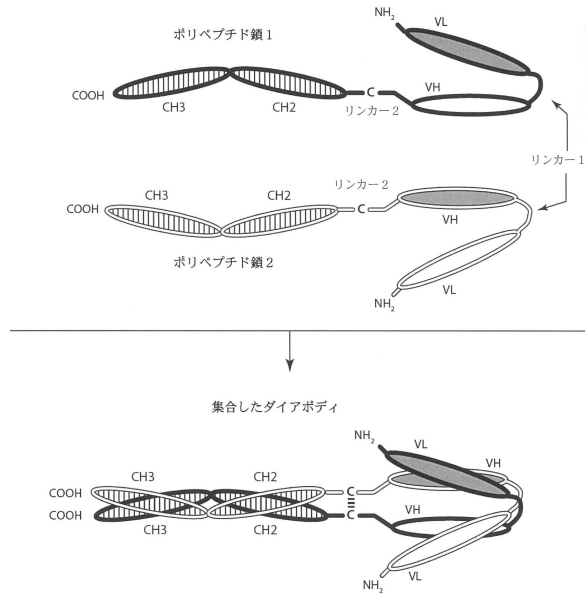


Figure 2

20

30

40

50

【図3A】

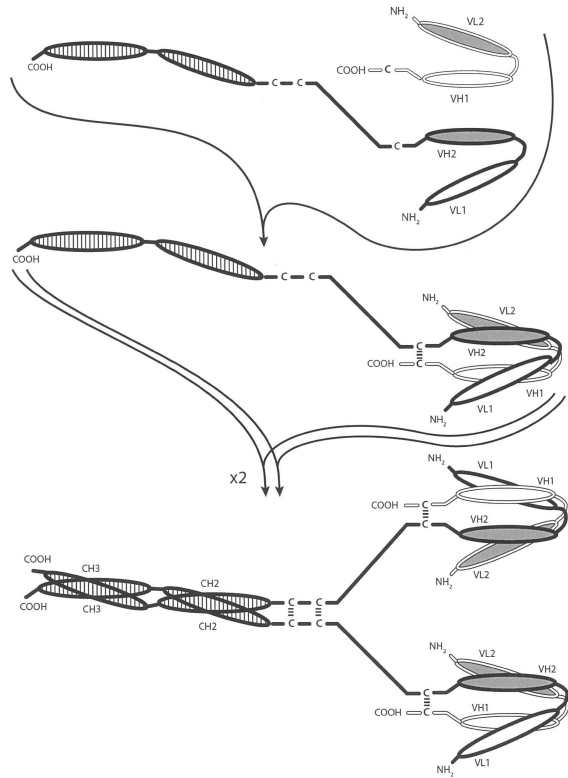


Figure 3A

【図3B】

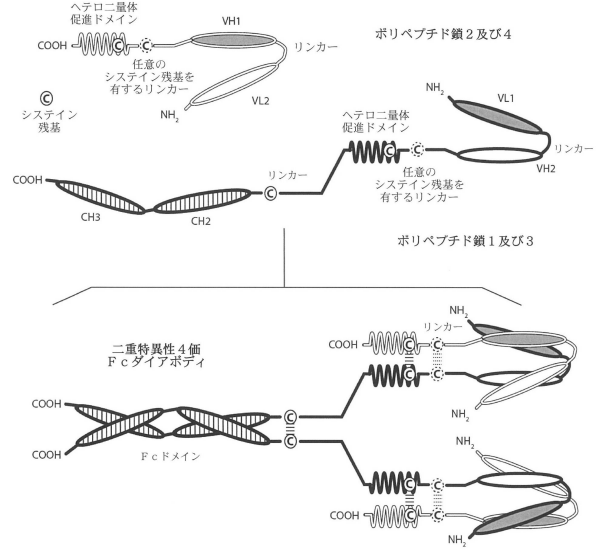


Figure 3B

【図3C】

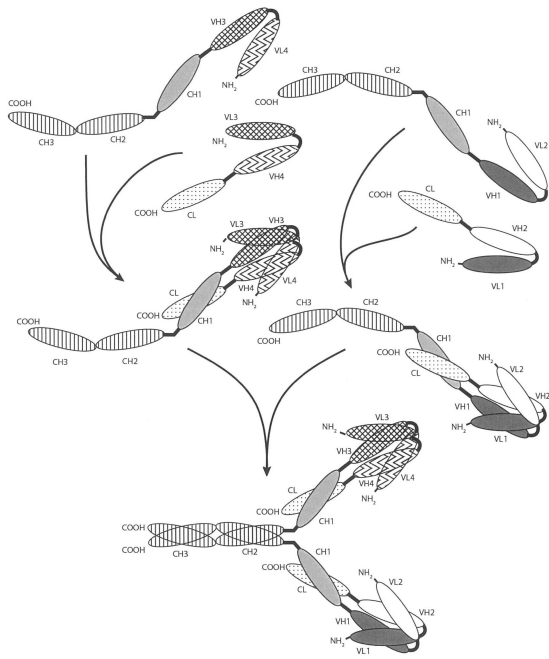


Figure 3C

【図4A】

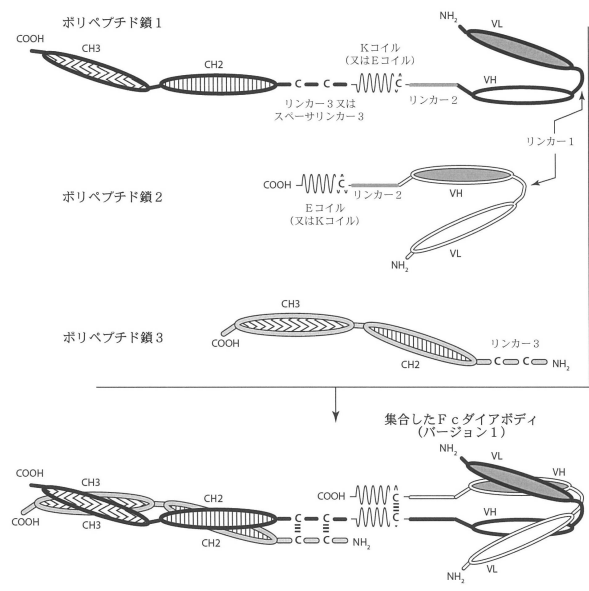


Figure 4A

10

20

30

40

50

【図4B】

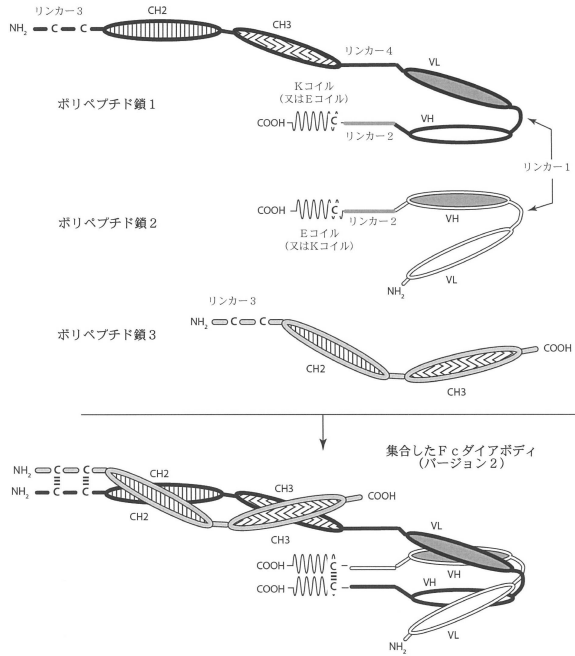


Figure 4B

【図5】

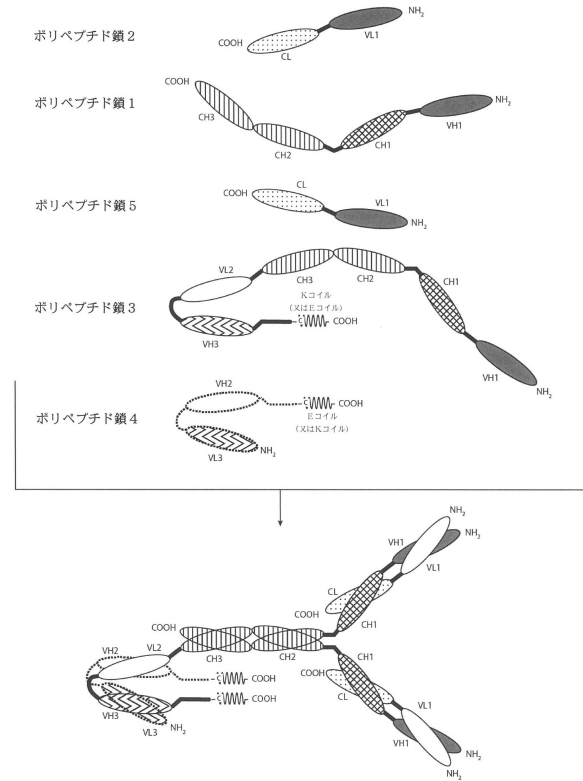


Figure 5

【図6A】

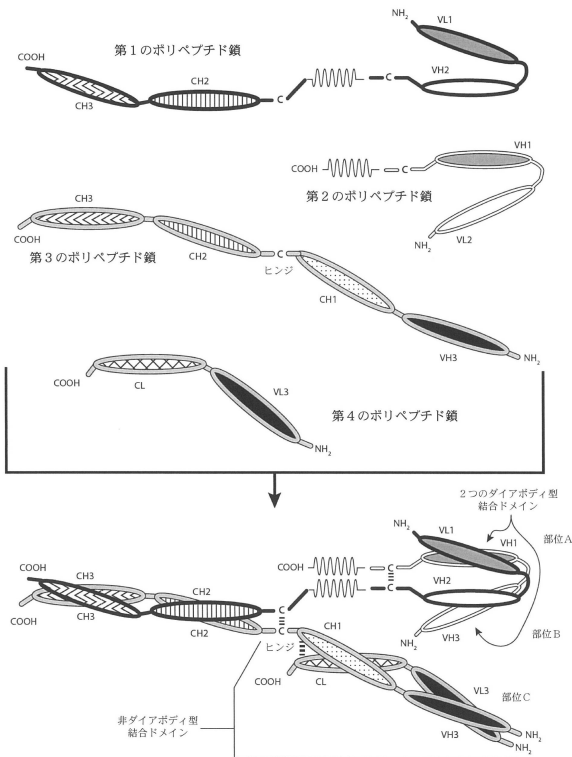


Figure 6A

【図6B】

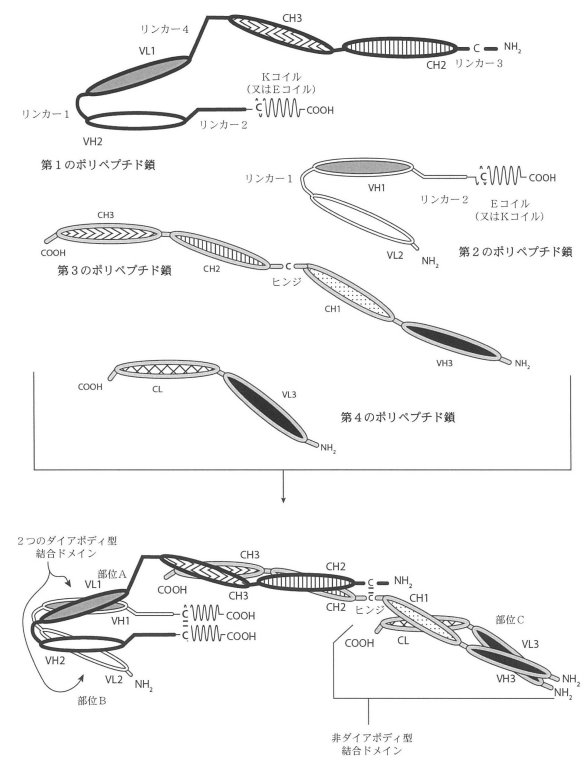


Figure 6B

10

20

30

40

50

【図 6 C】

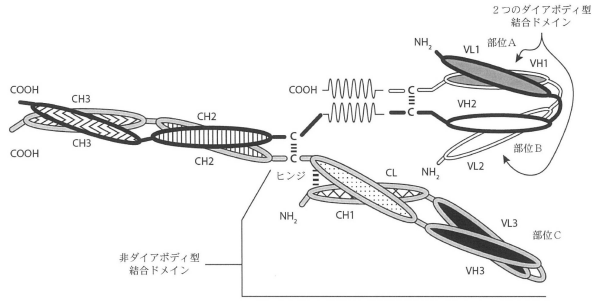


Figure 6C

【図 6 D】

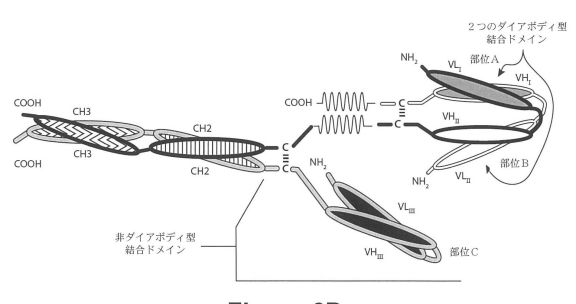


Figure 6D

10

【図 6 E】

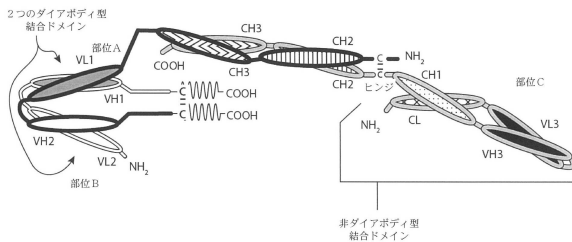


Figure 6E

【図 6 F】

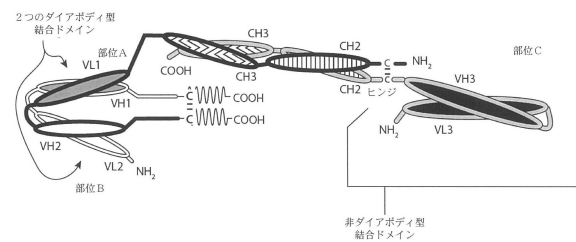


Figure 6F

20

【図 7】

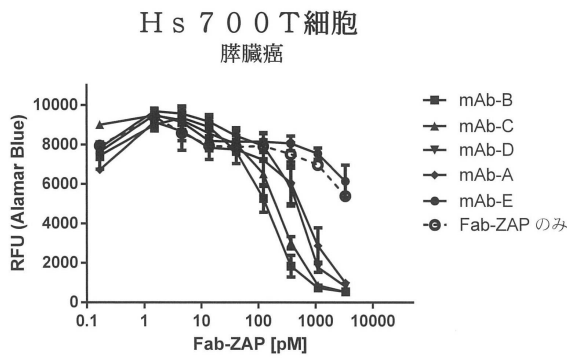


Figure 7

【図 8 A】

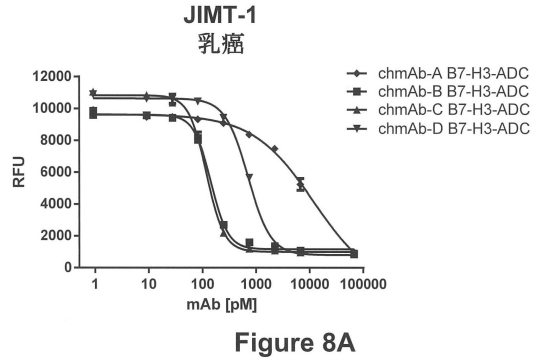


Figure 8A

30

40

50

【 図 8 B 】

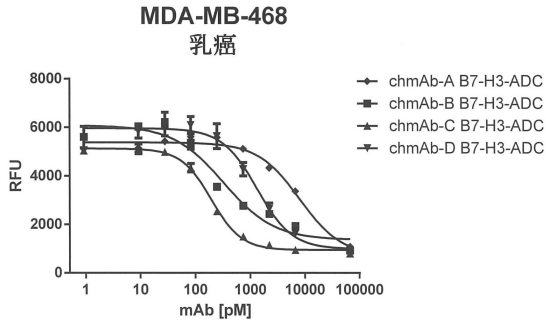


Figure 8B

【 図 8 C 】

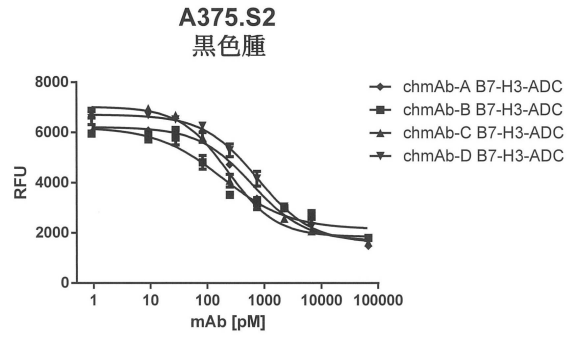


Figure 8C

10

【 図 8 D 】

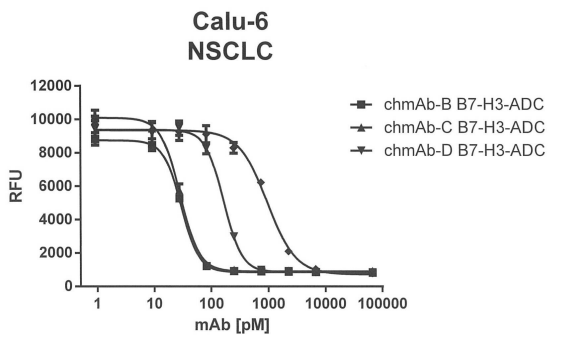


Figure 8D

【 図 8 E 】

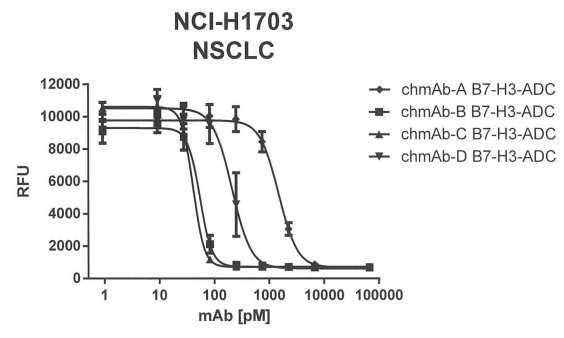


Figure 8E

20

【 図 8 F 】

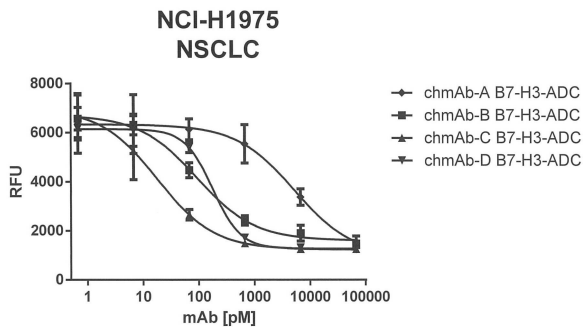


Figure 8F

【 図 8 G 】

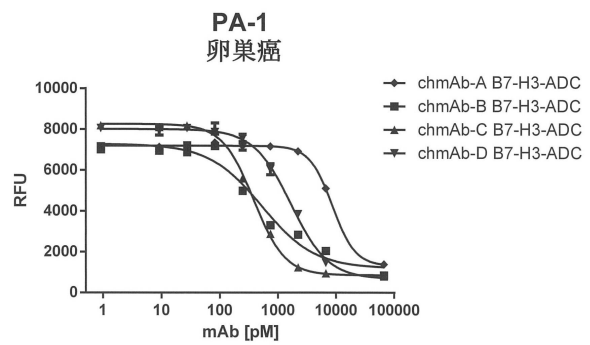


Figure 8G

30

40

50

【 図 8 H 】

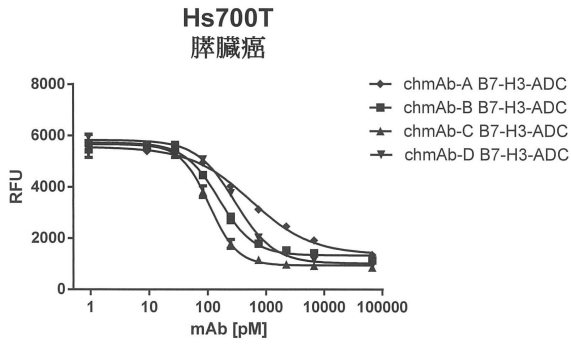


Figure 8H

【 図 8 I 】

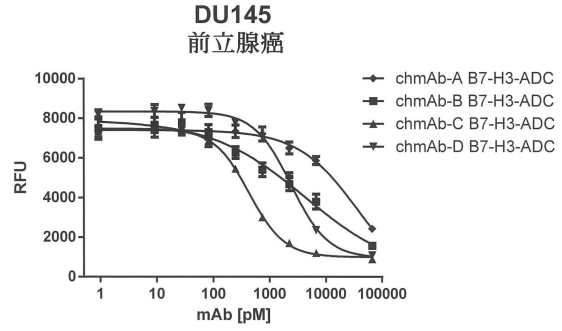


Figure 8I

10

【 図 8 J 】

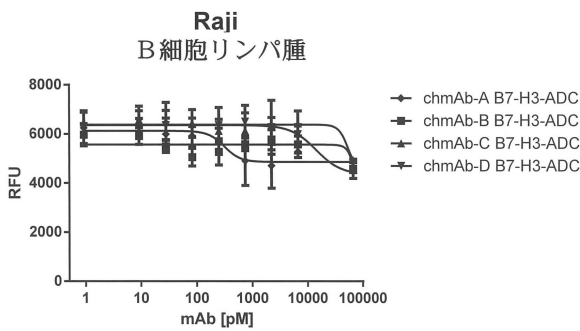


Figure 8J

【 図 9 】

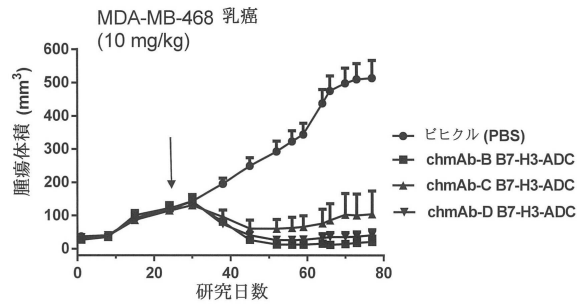


Figure 9

20

【 図 10 A 】

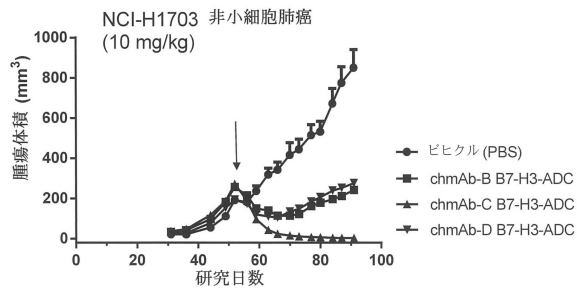


Figure 10A

【 図 10 B 】

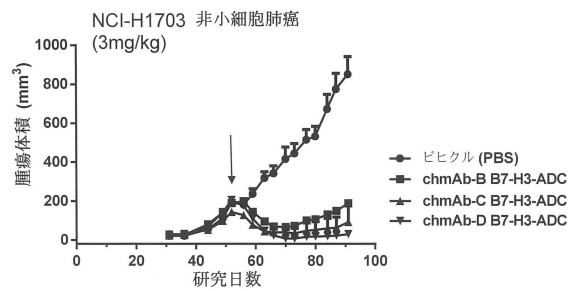


Figure 10B

30

40

50

【図 10 C】

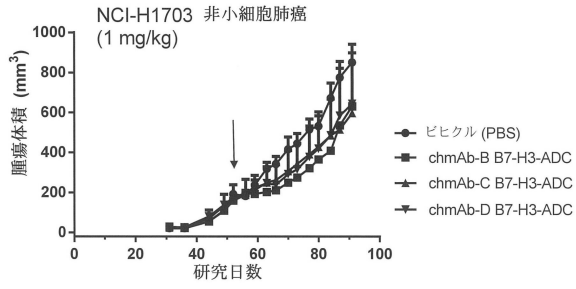


Figure 10C

【図 11 A】

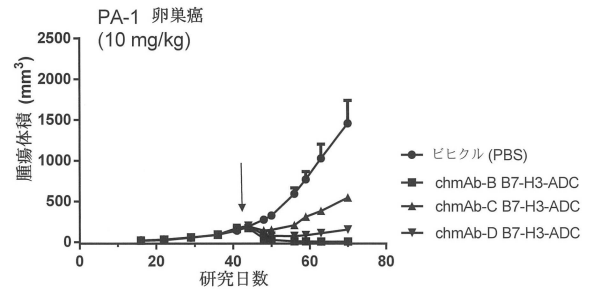


Figure 11A

10

【図 11 B】

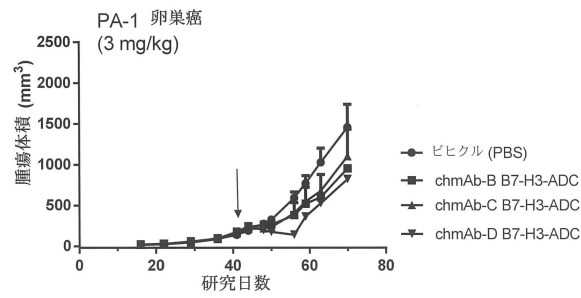


Figure 11B

【図 11 C】

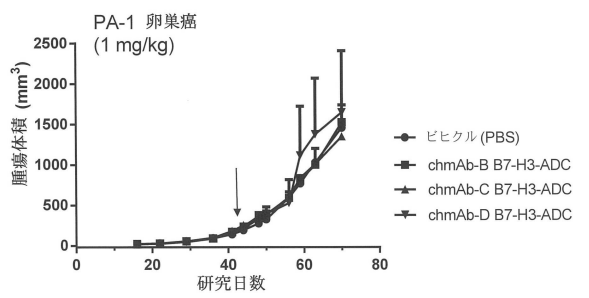


Figure 11C

20

【図 12 A】

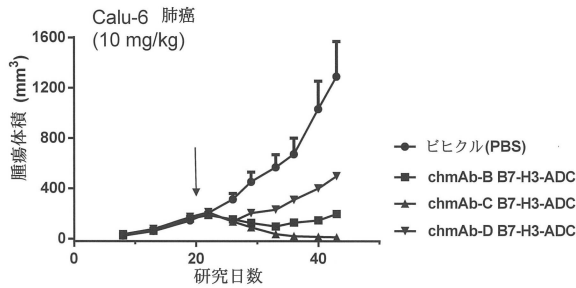


Figure 12A

【図 12 B】

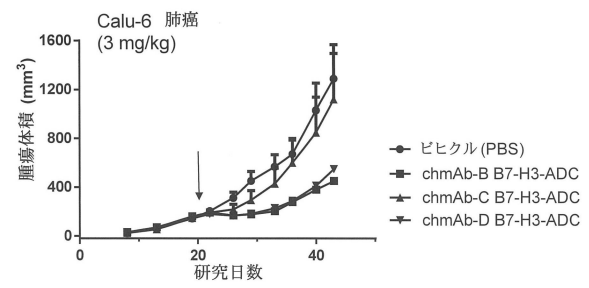


Figure 12B

30

40

50

【図 1 2 C】

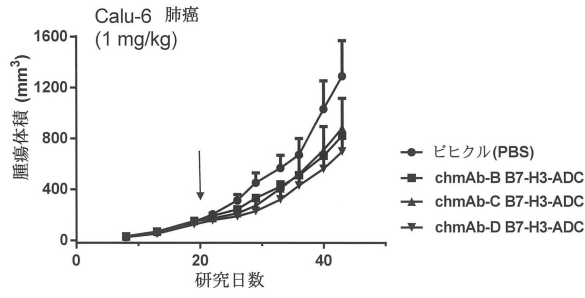


Figure 12C

【図 1 3 A】

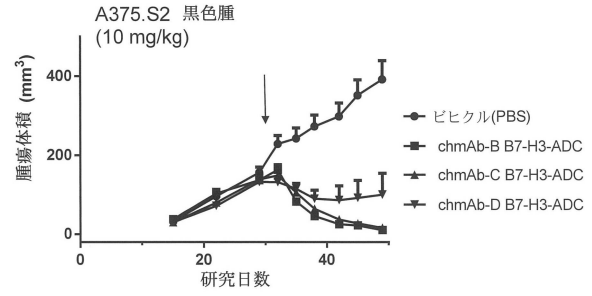


Figure 13A

10

【図 1 3 B】

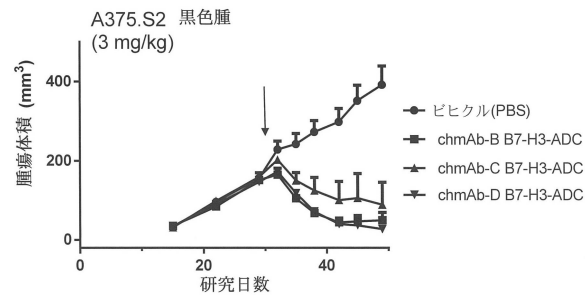


Figure 13B

【図 1 3 C】

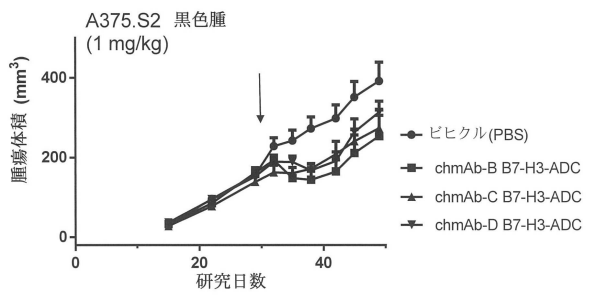


Figure 13C

20

【図 1 4 A】

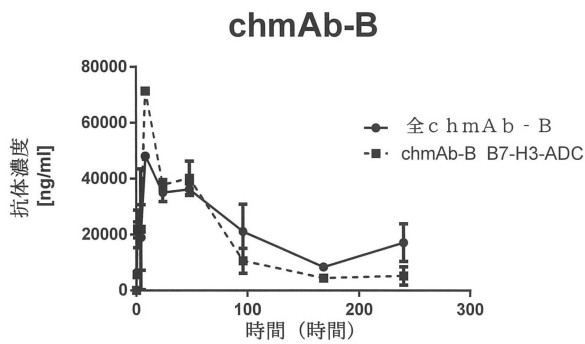


Figure 14A

【図 1 4 B】

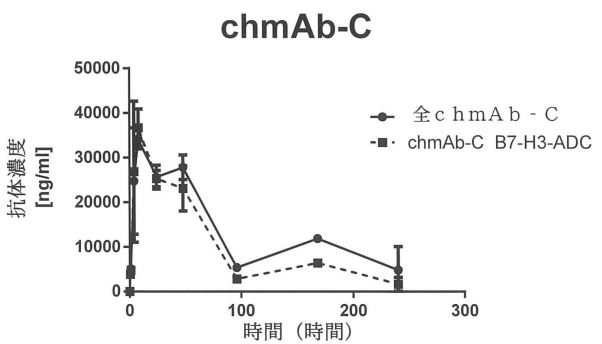


Figure 14B

30

40

50

【 図 1 4 C 】

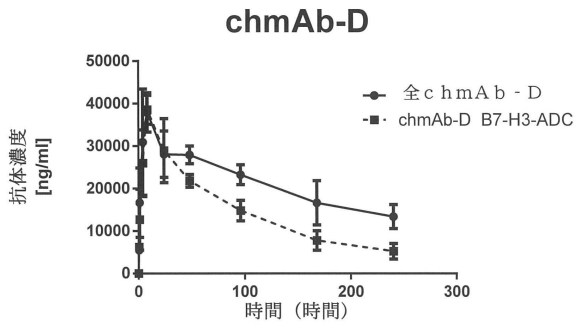


Figure 14C

【 図 1 5 A 】

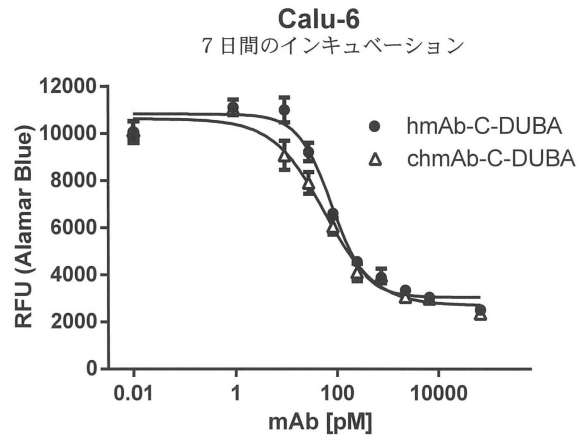


Figure 15A

10

【 図 1 5 B 】

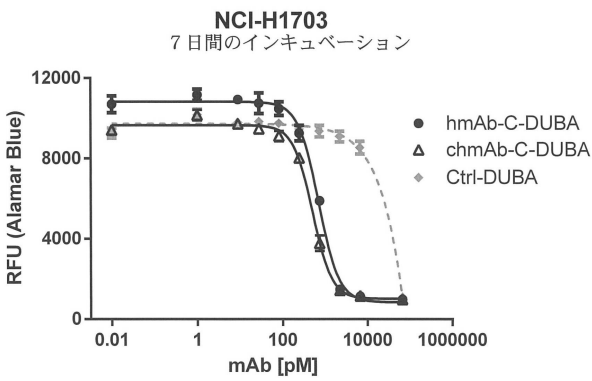


Figure 15B

【 図 1 5 C 】

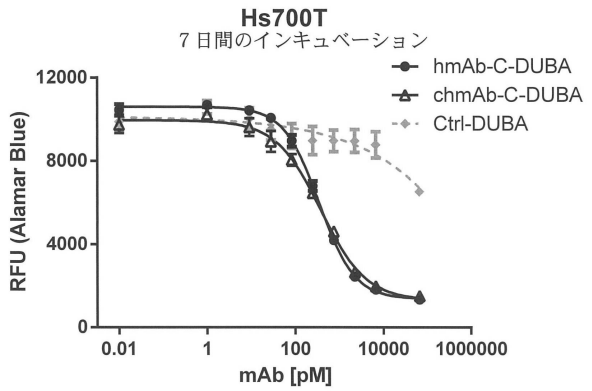


Figure 15C

20

30

40

50

【 図 1 6 】

hmAb - C - DUBA - C a l u - 6 細胞、多回用量でのインビボ効力研究

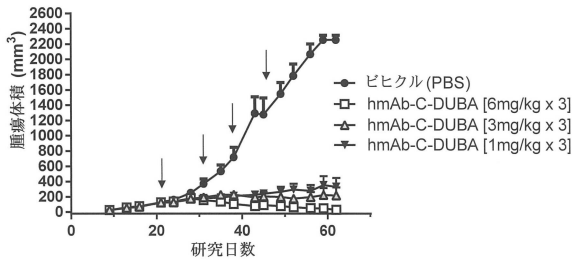


Figure 16

【 図 1 7 】

hmAb - C - DUBA - C a l u - 6 細胞、単回用量でのインビボ効力研究

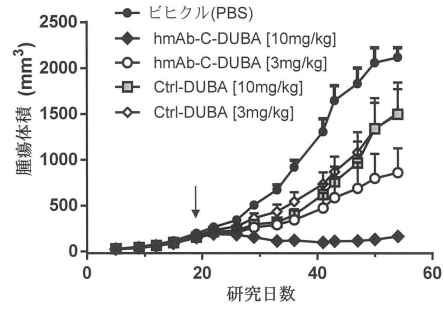


Figure 17

10

【 図 1 8 】

hmAb - C - DUBA - P A - 1 細胞、単回用量でのインビボ効力研究

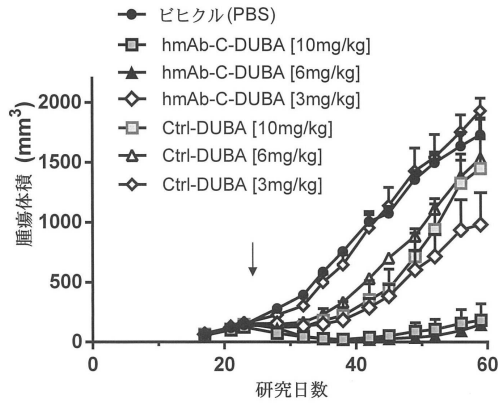


Figure 18

【 図 1 9 】

hmAb - C - DUBA - A 3 7 5 . S 2 黒色腫細胞、単回用量でのインビボ効力研究

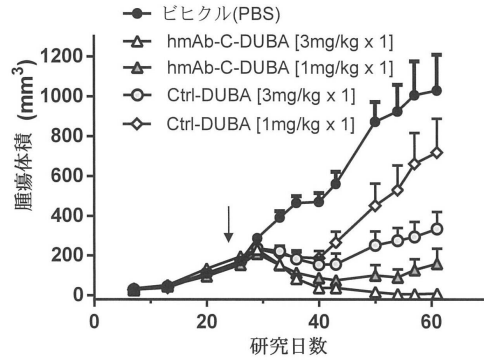


Figure 19

20

30

40

50

【図20A】

抗B7-H3-DUBAに対する、MDA-MB-468乳房脂肪体異種移植片 (6mg/kgの単回用量でのデータ)

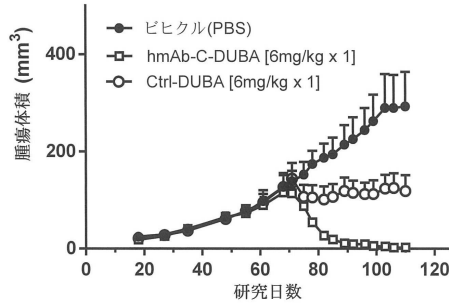


Figure 20A

【図20B】

抗B7-H3-DUBAに対する、MDA-MB-468乳房脂肪体異種移植片 (3mg/kgの単回用量でのデータ)

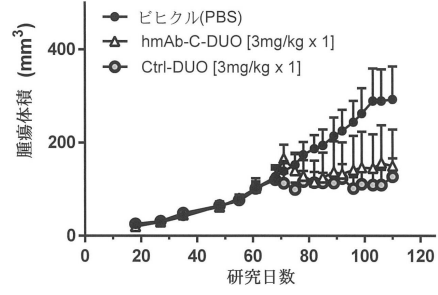


Figure 20B

10

【図20C】

抗B7-H3-DUBAに対する、MDA-MB-468乳房脂肪体異種移植片 (3mg/kgの3回用量でのデータ)

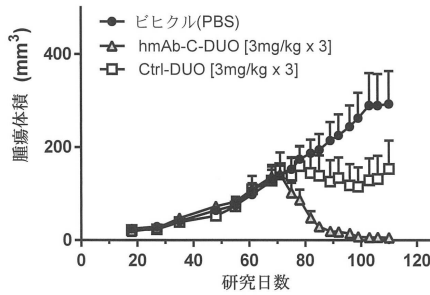


Figure 20C

【図20D】

抗B7-H3-DUBAに対する、MDA-MB-468乳房脂肪体異種移植片 (全てのデータ)

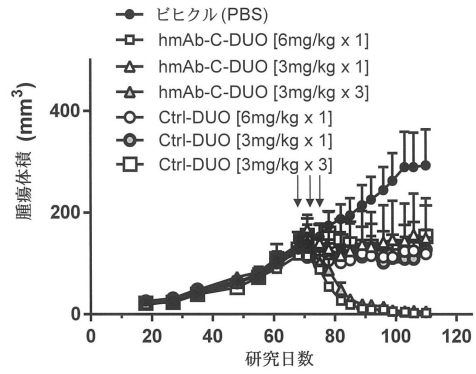


Figure 20D

20

30

40

50

【図 2 1 A】

抗B7-H3-DUBAに対する、PA-1皮下異種移植片  
(10mg/kgの単回又は2回用量でのデータ)

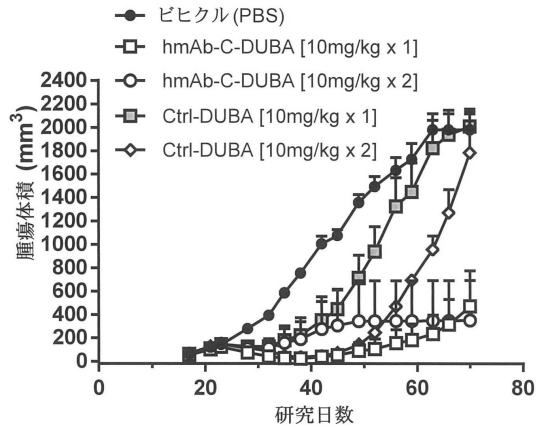


Figure 21A

【図 2 1 B】

抗B7-H3-DUBAに対する、PA-1皮下異種移植片  
(6mg/kgの単回又は4回用量でのデータ)

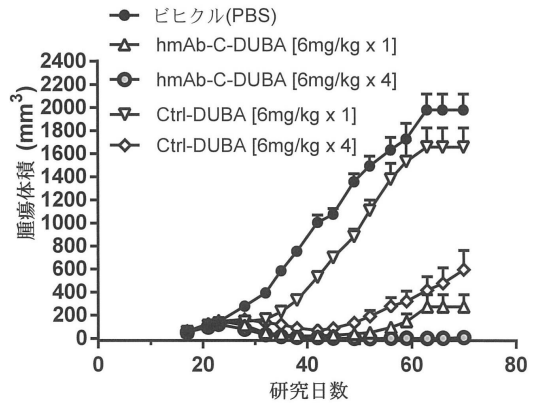


Figure 21B

10

【図 2 1 C】

抗B7-H3-DUBAに対する、PA-1皮下異種移植片  
(3mg/kg、単回用量)

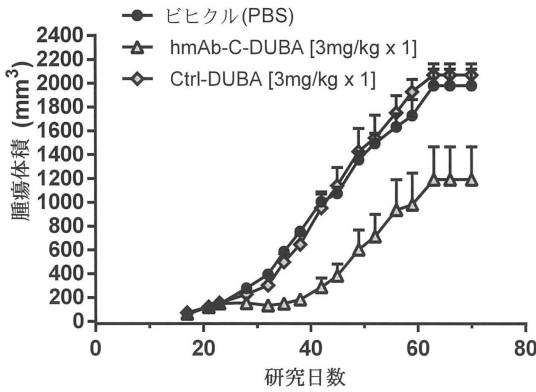


Figure 21C

【図 2 1 D】

抗B7-H3-DUBAに対する、PA-1皮下異種移植片  
(全てのデータ)

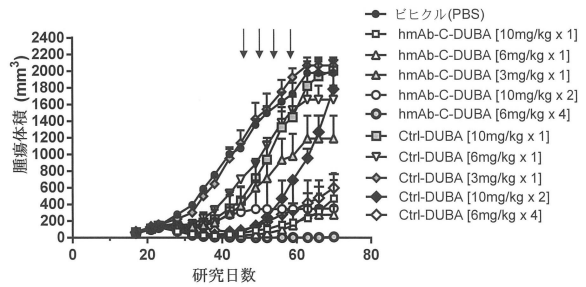


Figure 21D

20

30

40

50

【 図 2 2 】

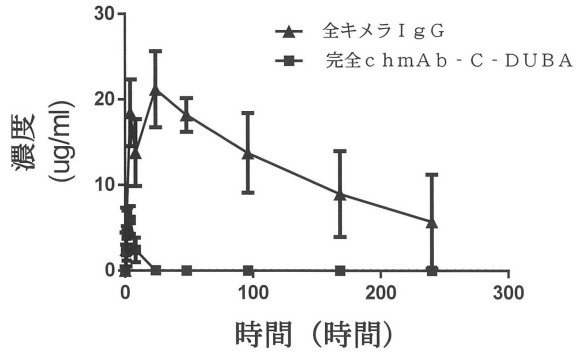


Figure 22

【 図 2 3 A 】

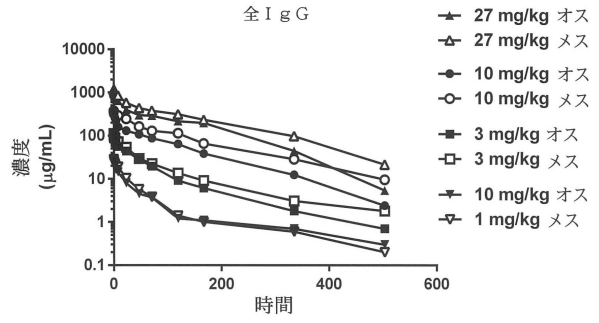


Figure 23A

10

【 図 2 3 B 】

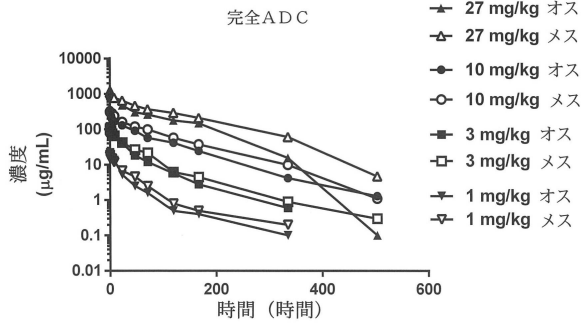


Figure 23B

20

【 配列表 】

0007002467000001.app

30

40

50

## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K	31/704 (2006.01)	A 6 1 K	31/704	
A 6 1 K	38/05 (2006.01)	A 6 1 K	38/05	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	47/65 (2017.01)	A 6 1 K	47/65	
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
C 0 7 K	16/30 (2006.01)	C 0 7 K	16/30	

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

## (31)優先権主張番号 62/323,249

## (32)優先日 平成28年4月15日(2016.4.15)

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

8 2 1 0

## (72)発明者 ジョンソン レスリー エス .

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 7 4 , ダーネスタウン , ポプラ ヒル ロード 1 4 4 1 1

## (72)発明者 ソン トーマス

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 1 2 2 , サンフランシスコ , 3 9 番アベニュー 1 3 9 0

## (72)発明者 スクリプナー ジュニパー

アメリカ合衆国 カリフォルニア州 9 4 0 1 0 , バーリングゲーム , オーク グローブ アベニュー  
1 2 1 7 , アパートメント シャープ4

## (72)発明者 ボンビニ エツィオ

アメリカ合衆国 メリーランド州 2 0 8 5 4 , ポトマック , パウダー ホーン ドライブ 1 1 1 3 6

審査官 中山 基志

## (56)参考文献

国際公開第2 0 1 6 / 0 4 4 3 8 3 ( W O , A 1 )

国際公開第2 0 1 4 / 0 6 1 2 7 7 ( W O , A 1 )

国際公開第2 0 1 4 / 0 5 7 6 8 7 ( W O , A 1 )

国際公開第2 0 1 6 / 0 3 7 1 1 9 ( W O , A 1 )

特表2 0 1 5 - 5 2 4 3 8 7 ( J P , A )

国際公開第2 0 0 2 / 0 8 3 1 8 0 ( W O , A 1 )

## (58)調査した分野 (Int.Cl. , D B 名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 K 4 7 / 6 8

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