

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-508606

(P2025-508606A)

(43)公表日 令和7年3月26日(2025.3.26)

(51)国際特許分類		F I		テーマコード (参考)	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28		4 C 0 7 6
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	T Z N A	4 C 0 8 4
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L	4 C 0 8 5
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 P	35/00		4 H 0 4 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/68		
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全82頁) 最終頁に続く
(21)出願番号	特願2024-572512(P2024-572512)		(71)出願人	524318124	
(86)(22)出願日	令和5年2月7日(2023.2.7)			ナンジン、プロビオ、バイオテック、カンパニー、リミテッド	
(85)翻訳文提出日	令和6年8月23日(2024.8.23)			NANJING PROBIO BIOTECH CO., LTD.	
(86)国際出願番号	PCT/CN2023/074767			中華人民共和国チアンス、ナンジン、ジャンニン、ディストリクト (ジャンニン、ハイテック、パーク)、ヨンシー、ロード、28、ルーム、4010	
(87)国際公開番号	WO2023/160376		(74)代理人	110003421	
(87)国際公開日	令和5年8月31日(2023.8.31)			弁理士法人フィールズ国際特許事務所	
(31)優先権主張番号	PCT/CN2022/078008		(72)発明者	イー、ジョウ	
(32)優先日	令和4年2月25日(2022.2.25)			中華人民共和国、チアンス、ナンジン、ジャンニン、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、28	
(33)優先権主張国・地域又は機関	中国(CN)			最終頁に続く	
(81)指定国・地域	AP(BW,CV,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,IE,IS,IT,LT,LU,LV)			最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 ヒト B 7 - H 3 に対する抗体及びその変異体

(57)【要約】

本出願は、モノクローナル抗体 (mAb) のような、B 7 - H 3 を特異的に認識する抗体もしくはその抗原結合断片を提供する。本出願はさらに、医薬組成物、又は該抗体もしくはその抗原結合断片の製造及び使用方法を提供する。

【選択図】 なし

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

単離された抗体もしくはその抗原結合断片であって、

I)

1) SEQ ID NO: 2、10、18、26、34、42、50、58、66
及び74からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖決定領域1(CDR1)と、

2) SEQ ID NO: 3、11、19、27、35、43、51、59、67
及び75からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2と、

3) SEQ ID NO: 4、12、20、28、36、44、52、60、68
及び76からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3とをそれぞれ含む重鎖可変ドメイン(VH)と、 10

II)

1) SEQ ID NO: 6、14、22、30、38、46、54、62、70
及び78からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1と、

2) SEQ ID NO: 7、15、23、31、39、47、55、63、71
及び79からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2と、

3) SEQ ID NO: 8、16、24、32、40、48、56、64、72
及び80からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3とをそれぞれ含む軽鎖可変ドメイン(VL)とを含み、

ここで、前記抗体もしくはその抗原結合断片は、B7-H3、好ましくは、ヒトB7-H3と特異的に結合することができる、単離された抗体もしくはその抗原結合断片。 20

【請求項 2】

1) 前記VHは、SEQ ID NO: 2、3及び4のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 6、7及び8のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、

2) 前記VHは、SEQ ID NO: 10、11及び12のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 14、15及び16のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、 30

3) 前記VHは、SEQ ID NO: 18、19及び20のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 22、23及び24のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、

4) 前記VHは、SEQ ID NO: 26、27及び28のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 30、31及び32のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、

5) 前記VHは、SEQ ID NO: 34、35及び36のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 38、39及び40のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、 40

6) 前記VHは、SEQ ID NO: 42、43及び44のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 46、47及び48のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、

7) 前記VHは、SEQ ID NO: 50、51及び52のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 54、55及び56のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、 50

8) 前記VHは、SEQ ID NO: 58、59及び60のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 62、63及び64のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、

9) 前記VHは、SEQ ID NO: 66、67及び68のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 70、71及び72のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含み、又は、

10) 前記VHは、SEQ ID NO: 74、75及び76のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 78、79及び80のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含む、請求項1に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

10

【請求項3】

それぞれ、前記VHは、SEQ ID NO: 1、9、17、25、33、41、49、57、65及び73からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 5、13、21、29、37、45、53、61、69及び77からなる群から選択される配列と少なくとも90%同一であるアミノ酸配列を含む、請求項1又は2に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項4】

20

前記VHは、SEQ ID NO: 1、9、17、25、33、41、49、57、65及び73からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又は前記VHには、アミノ酸が置換された多くとも約3つのその変異体が含まれており、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 5、13、21、29、37、45、53、61、69及び77からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又は前記VLには、アミノ酸が置換された多くとも約3つのその変異体が含まれている、請求項1～3のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項5】

1) 前記VHは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含み、

30

2) 前記VHは、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含み、

3) 前記VHは、SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含み、

4) 前記VHは、SEQ ID NO: 25のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 29のアミノ酸配列を含み、

5) 前記VHは、SEQ ID NO: 33のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 37のアミノ酸配列を含み、

6) 前記VHは、SEQ ID NO: 41のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含み、

40

7) 前記VHは、SEQ ID NO: 49のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 53のアミノ酸配列を含み、

8) 前記VHは、SEQ ID NO: 57のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 61のアミノ酸配列を含み、

9) 前記VHは、SEQ ID NO: 65のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 69のアミノ酸配列を含み、又は、

10) 前記VHは、SEQ ID NO: 73のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 77のアミノ酸配列を含む、請求項1～4のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項6】

50

前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片と、前記 B 7 - H 3 を発現する細胞との結合の E C 5 0 は、 10^{-7} M ～ 約 10^{-12} M であり、好ましくは、約 10^{-8} M ～ 約 10^{-12} M であり、より好ましくは、約 10^{-9} M ～ 約 10^{-12} M である、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 7】

前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片と、前記 B 7 - H 3 を発現する細胞との結合は、参照抗体 M G A 2 7 1 よりも低い E C 5 0 を有する、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である、請求項 1 ～ 7 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 9】

前記ヒト化抗体は V H と V L とを含み、前記 V H は、S E Q I D N O : 8 1 ～ 8 7 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記 V L は、S E Q I D N O : 8 8 ～ 9 1 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 10】

前記ヒト化抗体は、

- 1) S E Q I D N O : 8 1 のアミノ酸配列を含む V H 及び S E Q I D N O : 8 8 のアミノ酸配列を含む V L 、
- 2) S E Q I D N O : 8 2 のアミノ酸配列を含む V H 及び S E Q I D N O : 8 8 のアミノ酸配列を含む V L 、
- 3) S E Q I D N O : 8 3 のアミノ酸配列を含む V H 及び S E Q I D N O : 8 9 のアミノ酸配列を含む V L 、
- 4) S E Q I D N O : 8 4 のアミノ酸配列を含む V H 及び S E Q I D N O : 8 9 のアミノ酸配列を含む V L 、
- 5) S E Q I D N O : 8 5 のアミノ酸配列を含む V H 及び S E Q I D N O : 9 0 のアミノ酸配列を含む V L 、
- 6) S E Q I D N O : 8 6 のアミノ酸配列を含む V H 及び S E Q I D N O : 9 1 のアミノ酸配列を含む V L 、又は、
- 7) S E Q I D N O : 8 6 のアミノ酸配列を含む V H 及び S E Q I D N O : 9 1 のアミノ酸配列を含む V L を含む、請求項 1 ～ 9 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 11】

前記 V H は、免疫グロブリンの重鎖定常領域と融合する、請求項 1 ～ 10 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 12】

前記重鎖定常領域は、ヒト I g G 1 からのものである、請求項 1 ～ 11 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 13】

前記重鎖定常領域は、前記抗体の A D C C 効果を増強する修飾を含む、請求項 1 ～ 12 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 14】

前記重鎖定常領域は、突然変異 K 2 1 4 R 、 L 2 3 5 V 、 F 2 4 3 L 、 R 2 9 2 P 、 Y 3 0 0 L 、 D 3 5 6 E 、 L 3 5 8 M 及び P 3 9 6 L を含む、請求項 1 ～ 13 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 15】

前記重鎖定常領域は、S E Q I D N O : 9 3 又は 9 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 14 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 16】

10

20

30

40

50

前記 V L は、免疫グロブリンの軽鎖定常領域 (C L) と融合する、請求項 1 ～ 1 4 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 1 7】

前記軽鎖定常領域は、S E Q I D N O : 9 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 ～ 1 6 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 1 8】

前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片は、毒素又は化学療法剤とコンジュゲートされる、請求項 1 ～ 1 7 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 1 9】

前記毒素は、シュードモナス外毒素 (P E)、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、リボソーム毒素、サポリン、カリケアミシン又はボツリヌス毒素である、請求項 1 ～ 1 8 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 2 0】

前記化学療法剤は、モノメチルアウリスタチン E 又はメイタンシノイドである、請求項 1 ～ 1 9 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片。

【請求項 2 1】

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片と第 2 の抗体部分とを含む、二重特異性抗体。

【請求項 2 2】

前記第 2 の抗体部分は、B 7 - H 3 以外の抗原に特異的に結合することができる、請求項 2 1 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 3】

前記 B 7 - H 3 以外の抗原は、C T L A - 4、P D - L 1、T I M - 3 又は L A G - 3 である、請求項 2 1 又は 2 2 に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 4】

前記第 2 の抗体部分は、F a b、F a b'、(F a b')₂、F v、単鎖 F v (s c F v)、s c F v - s c F v、ミニボディ、ダイアボディ、s d A b 又は抗体模倣物である、請求項 2 1 ～ 2 3 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体。

【請求項 2 5】

癌を治療するための医薬組成物であって、

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片、又は請求項 2 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体、及び

薬学的に許容可能なキャリア剤を含む、医薬組成物。

【請求項 2 6】

一つ又は複数の他の抗癌剤をさらに含む、請求項 2 5 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 7】

前記癌は、B 7 - H 3 を発現する癌であり、好ましくは、N S C L C、H N S C C 又は乳癌である、請求項 2 5 又は 2 6 に記載の医薬組成物。

【請求項 2 8】

癌を治療する方法であって、それを必要とする被験体に治療有効量の請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片、請求項 2 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体又は請求項 2 5 ～ 2 7 のいずれか一項に記載の医薬組成物を投与することを含む、方法。

【請求項 2 9】

前記癌は、B 7 - H 3 を発現する癌であり、好ましくは、N S C L C、H N S C C 又は乳癌である、請求項 2 8 に記載の方法。

【請求項 3 0】

請求項 1 ～ 2 0 のいずれか一項に記載の単離された抗体もしくはその抗原結合断片又は請求項 2 1 ～ 2 4 のいずれか一項に記載の二重特異性抗体の、癌を治療するための医薬品

10

20

30

40

50

の製造における用途。

【請求項 3 1】

前記癌は、B 7－H 3を発現する癌であり、好ましくは、NSCLC、HNSCC又は乳癌である、請求項 3 0に記載の用途。

【請求項 3 2】

請求項 1～2 0のいずれか一項に記載の使用のための単離された抗体もしくはその抗原結合断片、請求項 2 1～2 4のいずれか一項に記載の二重特異性抗体又は請求項 2 5～2 7のいずれか一項に記載の医薬組成物の、それを必要とする被験体の癌の治療における使用。

【請求項 3 3】

前記癌は、B 7－H 3を発現する癌であり、好ましくは、NSCLC、HNSCC又は乳癌である、請求項 3 2に記載の使用のための単離された抗体もしくはその抗原結合断片、二重特異性抗体又は医薬組成物。

【請求項 3 4】

前記単離された抗体もしくは抗原結合断片、前記二重特異性抗体又は前記医薬組成物は、全身投与又は局所投与に用いられる、請求項 3 2又は3 3に記載の使用のための単離された抗体もしくはその抗原結合断片、二重特異性抗体又は医薬組成物。

【請求項 3 5】

前記単離された抗体もしくは抗原結合断片、前記二重特異性抗体又は前記医薬組成物は、静脈内投与又は腫瘍内投与に用いられる、請求項 3 2～3 4のいずれか一項に記載の使用のための単離された抗体もしくはその抗原結合断片、又は医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【関連出願の相互参照】

【0 0 0 1】

本出願は、2 0 2 2 年 2 月 2 5 日提出されたPCT出願第PCT/CN2 0 2 2 /0 7 8 0 0 8 号の優先権を主張し、その内容全体は、あらゆる目的のために、参照により本明細書に組み込まれる。

【技術分野】

【0 0 0 2】

本出願は、B 7－H 3タンパク質に特異的に結合することができる抗体もしくはその抗原結合断片及びこのような薬剤の用途に関する。これらの抗体もしくはその抗原結合断片は、B 7－H 3の活性及び／又は発現に関連する疾患の治療に用いられてもよい。

【背景技術】

【0 0 0 3】

B 7－H 3は、2 0 0 1 年に発見されたシングルパスI型膜貫通タンパク質であり、B 7ファミリーに属する[Molecular characterization of human 4 Ig－B 7－H 3, a member of the B 7 family with four Ig－like domains. J Immunol 172 (4): 2 3 5 2－2 3 5 9]。それは、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)、乳癌及び他の癌を含む様々な癌で広く発現するが、正常組織では低いか又は検出不可能である[B 7－H 3: an attractive target for antibody－based immunotherapy. Clin Cancer Res]。それとともに、B 7－H 3は、すでに低又は陰性のPD－L 1発現固形腫瘍で発見された。B 7－H 3に対しては、モノクローナル抗体(Mab)、二重特異性抗体(BsAb)、抗体－薬物コンジュゲート(ADC)、キメラ抗原受容体(CAR)－T及び放射免疫療法(RIT)を含む2 0 件超の臨床試験がすでに実施された。

【0 0 0 4】

第I／II相臨床研究では、MGC018(NCT03729596)及びDS－7300a(NCT04145622)、即ちB 7－H 3に対する二つのADCが試験された。B 7－H 3を標的とするADCがあるが、正常細胞でのB 7－H 3の発現が低いため、

10

20

30

40

50

命を脅かすオフ腫瘍オンターゲット毒性を引き起こすか否かはまだ不明である [New B7 family checkpoints in human cancers. Mol Cancer Ther 16 (7) : 1203-1211]。B7-H3を標的とするRIT (ヨウ素-131タグが付いているオンバータマブ (omburtamab)) は、画期的治療法として承認されたが、現在までその適応症が、大抵、脳腫瘍に限定されている。

【0005】

MGA271 (エノブリツズマブ (Enoblituzumab)) 及びDS-5573aは、B7-H3を標的とする二つの抗体である。MGA271 (エノブリツズマブ、Macrogenics) は、Fc最適化ヒト化IgG1抗体であり、且つその安全性特徴及び有効性がすでに3つの臨床研究 (NCT01391143、NCT02923180、NCT02982941) で試験され、B7-H3依存性抗体依存性細胞傷害 (ADCC) 活性の効果を有する。DS-5573a (Daiichi Sankyo Inc) は、ヒト化抗B7-H3 IgG1である [Development of DS-5573a: a novel afucosylated mAb directed at B7-H3 with potent antitumor activity. Cancer Sci 107 (5) : 674-681]。DS-5573aの臨床試験は、オープンラベル第I相研究 (NCT021925679) であり、該研究は、2014年に進行性固形腫瘍患者で開始され、2017年に商業的決定のために終了された。DS-5573aは、ADCC及び補体依存性細胞傷害 (CDC) 活性に依存して腫瘍細胞を殺傷する。

【0006】

アベルマブ (Avelumab) (抗PD-L1)、トラスツズマブ (trastuzumab) (抗HER2) 及びセツキシマブ (cetuximab) (抗EGFR) は、モノクローナル抗体であり、これらの抗体は、主にADCCに依存して細胞を殺傷する。これらの承認された薬物は、固形腫瘍治療におけるADCC関連薬物の治療可能性を裏付ける。また、NCT02923180及びNCT02982941の臨床結果によると、MGA271 (エノブリツズマブ) は、B7-H3を発現する再発性又は難治性固形腫瘍に罹患している患者の寛解を示した。

【0007】

B7-H3を標的とする抗体を開発する必要がある、これらの抗体は、ADCC及びCDCに依存して、NSCLC及びHNSCCのような腫瘍を殺傷することができ、且つ陽性対照MGA271 (エノブリツズマブ) 及びDS-5573aよりも優れた有効性を有する。

【発明の概要】

【0008】

一態様では、本開示は、単離された抗体もしくはその抗原結合断片を提供し、該抗体もしくはその抗原結合断片は、

I)

1) SEQ ID NO: 2、10、18、26、34、42、50、58、66及び74からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖決定領域1 (CDR1) と、

2) SEQ ID NO: 3、11、19、27、35、43、51、59、67及び75からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR2と、

3) SEQ ID NO: 4、12、20、28、36、44、52、60、68及び76からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む重鎖CDR3とをそれぞれ含む重鎖可変ドメイン (VH) と、

II)

1) SEQ ID NO: 6、14、22、30、38、46、54、62、70及び78からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1と、

2) SEQ ID NO: 7、15、23、31、39、47、55、63、71

及び 79 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR2 と、

3) SEQ ID NO: 8、16、24、32、40、48、56、64、72 及び 80 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖 CDR3 とをそれぞれ含む軽鎖可変ドメイン (VL) とを含み、

ここで、前記抗体もしくはその抗原結合断片は、B7-H3、好ましくは、ヒト B7-H3 と特異的に結合することができる。

【0009】

いくつかの実施例において、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片では、1) 前記 VH は、SEQ ID NO: 2、3 及び 4 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 6、7 及び 8 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、2) 前記 VH は、SEQ ID NO: 10、11 及び 12 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 14、15 及び 16 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、3) 前記 VH は、SEQ ID NO: 18、19 及び 20 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 22、23 及び 24 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、4) 前記 VH は、SEQ ID NO: 26、27 及び 28 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 30、31 及び 32 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、5) 前記 VH は、SEQ ID NO: 34、35 及び 36 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 38、39 及び 40 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、6) 前記 VH は、SEQ ID NO: 42、43 及び 44 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 46、47 及び 48 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、7) 前記 VH は、SEQ ID NO: 50、51 及び 52 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 54、55 及び 56 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、8) 前記 VH は、SEQ ID NO: 58、59 及び 60 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 62、63 及び 64 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、9) 前記 VH は、SEQ ID NO: 66、67 及び 68 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 70、71 及び 72 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含み、又は 10) 前記 VH は、SEQ ID NO: 74、75 及び 76 のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 78、79 及び 80 のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖 CDR1、CDR2 及び CDR3 を含む。

【0010】

いくつかの実施例において、それぞれ、前記 VH は、SEQ ID NO: 1、9、17、25、33、41、49、57、65 及び 73 からなる群から選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含み、且つ前記 VL は、SEQ ID NO: 5、13、21、29、37、45、53、61、69 及び 77 からなる群から選択される配列と少なくとも 90% 同一であるアミノ酸配列を含む。

【0011】

いくつかの実施例において、前記 VH は、SEQ ID NO: 1、9、17、25、33、41、49、57、65 及び 73 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む

10

20

30

40

50

が、又は前記VHには、アミノ酸が置換された多くとも約3つのその変異体が含まれており、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 5、13、21、29、37、45、53、61、69及び77からなる群から選択されるアミノ酸配列を含むか、又は前記VLには、アミノ酸が置換された多くとも約3つのその変異体が含まれている。

【0012】

いくつかの実施例において、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片では、1) 前記VHは、SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含み、2) 前記VHは、SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含み、3) 前記VHは、SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含み、4) 前記VHは、SEQ ID NO: 25のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 29のアミノ酸配列を含み、5) 前記VHは、SEQ ID NO: 33のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 37のアミノ酸配列を含み、6) 前記VHは、SEQ ID NO: 41のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含み、7) 前記VHは、SEQ ID NO: 49のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 53のアミノ酸配列を含み、8) 前記VHは、SEQ ID NO: 57のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 61のアミノ酸配列を含み、9) 前記VHは、SEQ ID NO: 65のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 69のアミノ酸配列を含み、又は10) 前記VHは、SEQ ID NO: 73のアミノ酸配列を含み、且つ前記VLは、SEQ ID NO: 77のアミノ酸配列を含む。

10

20

【0013】

いくつかの実施例において、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片と、前記B7-H3を発現する細胞との前記結合のEC₅₀は、 10^{-7} M~約 10^{-12} Mであり、好ましくは、約 10^{-8} M~約 10^{-12} Mであり、より好ましくは、約 10^{-9} M~約 10^{-12} Mである。

【0014】

いくつかの実施例において、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片と、前記B7-H3を発現する細胞との前記結合は、参照抗体MGA271よりも低いEC₅₀を有する。

30

【0015】

いくつかの実施例において、前記抗体は、マウス抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体又はヒト抗体である。

【0016】

いくつかの実施例において、前記ヒト化抗体は、VHとVLとを含み、前記VHは、SEQ ID NO: 81~87からなる群から選択されるアミノ酸配列を含み、前記VLは、SEQ ID NO: 88~91からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0017】

いくつかの実施例において、前記ヒト化抗体は、1) SEQ ID NO: 81のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 88のアミノ酸配列を含むVL、2) SEQ ID NO: 82のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 88のアミノ酸配列を含むVL、3) SEQ ID NO: 83のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 89のアミノ酸配列を含むVL、4) SEQ ID NO: 84のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 89のアミノ酸配列を含むVL、5) SEQ ID NO: 85のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 90のアミノ酸配列を含むVL、6) SEQ ID NO: 86のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 91のアミノ酸配列を含むVL、又は7) SEQ ID NO: 86のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO:

40

50

91のアミノ酸配列を含むV Lを含む。

【0018】

いくつかの実施例において、前記V Hは、免疫グロブリンの重鎖定常領域と融合する。

【0019】

いくつかの実施例において、前記重鎖定常領域は、ヒトI g G 1からのものである。

【0020】

いくつかの実施例において、前記重鎖定常領域は、前記抗体のA D C C効果を増強する修飾を含む。

【0021】

いくつかの実施例において、前記重鎖定常領域は、突然変異K 2 1 4 R、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、D 3 5 6 E、L 3 5 8 M及びP 3 9 6 Lを含む。

10

【0022】

いくつかの実施例において、前記重鎖定常領域は、S E Q I D N O : 93又は94のアミノ酸配列を含む。

【0023】

いくつかの実施例において、前記V Lは、免疫グロブリンの軽鎖定常領域(C L)と融合する。

【0024】

いくつかの実施例において、前記軽鎖定常領域は、S E Q I D N O : 92のアミノ酸配列を含む。

20

【0025】

いくつかの実施例において、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片は、毒素又は化学療法剤とコンジュゲートする。

【0026】

いくつかの実施例において、前記毒素は、シュードモナス外毒素(P E)、リシン、アブリン、ジフテリア毒素、リボソーム毒素(r i b o t o x i n)、サポリン、カリケアミシン(c a l i c h e a m i c i n)又はボツリヌス毒素である。

【0027】

いくつかの実施例において、前記化学療法剤は、モノメチルアウリスタチン(A u r i s t a t i n) E又はメイタンシノイド(m a y t a n s i n o i d)である。

30

【0028】

別の態様では、本開示は、二重特異性抗体を提供し、該二重特異性抗体は、単離された抗体もしくはその抗原結合断片と第2の抗体部分とを含む。

【0029】

いくつかの実施例において、前記第2の抗体部分は、B 7 - H 3以外の抗原に特異的に結合することができる。

【0030】

いくつかの実施例において、B 7 - H 3以外の前記抗原は、C T L A - 4、P D - L 1、T I M - 3又はL A G - 3である。

【0031】

いくつかの実施例において、前記第2の抗体部分は、F a b、F a b'、(F a b')₂、F v、単鎖F v(s c F v)、s c F v - s c F v、ミニボディ、ダイアボディ、s d A b又は抗体模倣物である。

40

【0032】

別の態様では、本開示は、癌を治療するための医薬組成物を提供し、該医薬組成物は、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片、又は前記二重特異性抗体、及び薬学的に許容可能なキャリア剤を含む。

【0033】

いくつかの実施例において、前記医薬組成物は、一つ又は複数の他の抗癌剤をさらに含む。

50

【0034】

いくつかの実施例において、前記癌は、B7-H3を発現する癌であり、好ましくは、NSCLC、HNSCC又は乳癌である。

【0035】

別の態様では、本開示は、癌を治療する方法を提供し、それを必要とする被験体に治療有効量の前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片、前記二重特異性抗体又は前記医薬組成物を投与することを含む。

【0036】

いくつかの実施例において、前記癌は、B7-H3を発現する癌であり、好ましくは、NSCLC、HNSCC又は乳癌である。

10

【0037】

別の態様では、本開示は、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片又は前記二重特異性抗体の、癌を治療するための医薬品の製造における用途を提供する。

【0038】

いくつかの実施例において、前記癌は、B7-H3を発現する癌であり、好ましくは、NSCLC、HNSCC又は乳癌である。

【0039】

別の態様では、本開示は、それを必要とする被験体の癌の治療に使用される、単離された抗体もしくはその抗原結合断片、二重特異性抗体又は医薬組成物を提供する。

【0040】

いくつかの実施例において、前記癌は、B7-H3を発現する癌であり、好ましくは、NSCLC、HNSCC又は乳癌である。

20

【0041】

いくつかの実施例において、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片、前記二重特異性抗体又は前記医薬組成物は、全身投与又は局所投与に用いられる。

【0042】

いくつかの実施例において、前記単離された抗体もしくはその抗原結合断片、前記二重特異性抗体又は医薬組成物は、静脈内投与又は腫瘍内投与に用いられる。

【0043】

本明細書による抗体は、ADCC及びCDCに依存して、NSCLC及びHNSCCのような腫瘍を殺傷することができ、且つ陽性対照MGA271（エノブリツズマブ）及びDS-5573aよりも優れた有効性を有する。

30

【図面の簡単な説明】

【0044】

【図1】マウスmAb FACS結合分析の結果である。

【図2】キメラ抗体のCDC誘導分析の結果である。

【図3】キメラ抗体のADCC誘導分析の結果である。

【図4】ヒト化抗体のFACS結合分析の結果である。

【図5】ヒト化抗体のCDC誘導分析の結果である。

【図6-1】ヒト化抗体のADCC誘導分析の結果である。

40

【図6-2】ヒト化抗体のADCC誘導分析の結果である。

【発明を実施するための形態】

【0045】

本開示は、抗B7-H3モノクローナル抗体及びそれらの応用を提供する。本開示は、マウス抗B7-H3モノクローナル抗体クローン12C9F1B5、38F11B2、34A9C12、37D11F5B8、37F11A10、43H11G12、47F3F10B4、47C7E3、31H11B1及び38D6A4の重鎖可変ドメイン（V_H）及び軽鎖可変ドメイン（V_L）のアミノ酸配列に関する。本開示はさらに、これらのマウス抗B7-H3モノクローナル抗体クローンにおけるいくつかのモノクローナル抗体のヒト化又は翻訳後修飾された重鎖可変ドメイン（V_H）及び軽鎖可変ドメイン（V_L）のア

50

ミノ酸配列に関する。本開示は、これらの抗B7-H3モノクローナル抗体の生成方法に関する。

【0046】

本開示は、開示されたクローンの重鎖及び軽鎖の可変ドメインをヒトIgG1の定常領域と融合することによってキメラ抗B7-H3モノクローナル抗体を提供する。本開示は、マウス抗B7-H3モノクローナル抗体クローンの重鎖可変ドメイン(V_H)及び軽鎖可変ドメイン(V_L)のヒト化形態を提供する。ヒト化抗B7-H3モノクローナル抗体は、開示されたクローンの重鎖及び軽鎖のヒト化可変ドメインをヒトIgG1の定常領域と融合することによって生成される。

【0047】

I. 定義

特にそれに反する指示がなければ、本発明の実施は当分野の技術範囲内に入るウイルス学、免疫学、微生物学、分子生物学及び組換えDNA技術の従来の方法を用い、その多くは、例示の目的のために以下に記載する。そのような技術は、文献において十分に説明されている。例えば、Current Protocols in Molecular Biology or Current Protocols in Immunology, John Wiley & Sons, New York, N. Y. (2009)、Ausubelら, Short Protocols in Molecular Biology, 第3版, Wiley & Sons, 1995、Sambrook及びRussell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第3版, 2001)、ManiatisらMolecular Cloning: A Laboratory Manual (1982)、DNA Cloning: A Practical Approach, 第I及びII巻(D. Glover編集)、Oligonucleotide Synthesis (N. Gait編集, 1984)、Nucleic Acid Hybridization (B. Hames & S. Higgins編集, 1985)、Transcription and Translation (B. Hames & S. Higgins編集, 1984)、Animal Cell Culture (R. Freshney編集, 1986)、Perbal, A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)及び他の類似している参考文献を参照されたい。

【0048】

文脈が別途明確に規定していない限り、本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用されるように、単数形「一つ／一種(a/an)」及び「該／前記(the)」は、複数の指示対象を含むことに留意されたい。

【0049】

別段の指示がない限り、一連の要素に先行する「少なくとも」という用語は、該一連のあらゆる要素を指すと理解すべきである。当業者は、通例の実験だけを使用して、本明細書に記載の本発明の具体的な実施例の多くの等価物を認識するか又は確定することができる。このような等価物は、本発明に包含されることが意図されている。

【0050】

明細書全体及びを添付の特許請求の範囲通して、文脈で別段の要求がない限り、「包含(comprise)」並びに「包含(comprises)」及び「包含(comprising)」という単語の変形は、述べられた整数もしくはステップ又は整数もしくはステップの群を含むが、任意の他の整数もしくはステップ又は整数もしくはステップの群を排除しないと理解されるであろう。本明細書で使用される場合、「包含」という用語は、「含有」又は「含む」という用語に置き換えてもよく、又は本明細書で使用される場合、「有する」という用語に置き換えてもよい。

【0051】

本明細書で使用される場合、「...からなる」は、請求項要素に特定されてい

10

20

30

40

50

ない任意の要素、ステップ又は成分を含まない。本明細書で使用される場合、「実質的に．．．．．からなる」は、請求項の基本的特徴及び新規な特徴に実質的に影響を及ぼさない材料又はステップを排除しない。「包含」、「含有」、「含む」及び「有する」という任意の前述の用語は、本明細書において本出願の態様又は実施例の文脈で使用される場合、いつでも、「．．．．．からなる」又は「実質的に．．．．．からなる」という用語に置き換えて本開示の範囲を変更することができる。

【0052】

本明細書で使用されるように、列挙される複数の要素の間の接続語「及び／又は」は、個々の選択肢及び組み合わせ選択肢の両方をカバーすると理解されるべきである。例えば、二つの要素が「及び／又は」を介して接続される場合、第1の選択肢は、第2の要素を有しない場合の第1の要素の適用性を指す。第2の選択肢は、第1の要素がない場合の第2の要素の適用性を指す。第3の選択肢は、第1の要素及び第2の要素の両方を合わせた適用性を指す。これらの選択肢のうちのいずれか一つは、該意義に含まれるため、本明細書で使用される「及び／又は」という用語の要件を満たすと理解されるべきである。これらの選択肢のうちの一つ以上の合わせた適用性も、該意義に含まれるため、「及び／又は」という用語の要件を満たすと理解されるべきである。

【0053】

別段の記載がない限り、任意の数値（本明細書に記載の濃度又は濃度範囲）は、いずれの場合においても、「約」という用語により修飾されると理解されるべきである。したがって、数値は、通常、列挙される値の±10%を含む。例えば、1mg/mLの濃度は、0.9mg/mL～1.1mg/mLを含む。同様に、1mg/mL～10mg/mLの濃度範囲は、0.9mg/mL～11mg/mLを含む。本明細書で使用されるように、数値範囲の使用は、全ての可能なサブ範囲、該範囲内の全ての個々の数値を明示的に含み、文脈が特に明確に示さない限り、このような範囲内の整数及び値の分数を含む。

【0054】

「エピトープ」という用語は、抗体に特異的に結合できるタンパク質決定基を指す。エピトープは、通常、アミノ酸又は糖側鎖のような、分子の化学的に活性な表面基からなり、且つ通常、特定の三次元構造特徴及び特定の電荷特徴を有する。立体構造エピトープと非立体構造エピトープとの相違点は、変性溶媒の存在下で、後者ではなく、前者との結合が失われることにある。

【0055】

本明細書に使用されるように、「治療（treatment又はtreating）」は、有益又は所望の結果（臨床結果を含む）を得るための方法である。本発明の目的のために、有益又は所望の臨床結果は、疾患による一つ又は複数の症状を緩和すること、疾患の程度を減少させること、疾患を安定させること（例えば、疾患の悪化を予防又は遅延させること）、疾患の拡散（例えば、転移）を予防又は遅延させること、疾患の再発を予防又は遅延させること、疾患の進行を遅延させるか又は緩めること、疾患の状態を改善すること、疾患の緩和（一部又は全部）を提供すること、疾患の治療に必要な一つ又は複数の他の薬物の用量を減少させること、疾患の進行を遅延させること、生活の質を向上させること、及び／又は生存を延長することのうちの一つ又は複数を含むが、それらに限らない。「治療」は、疾患の病理的結果を減少させることをさらにカバーする。本発明の方法は、これらの治療態様のうちのいずれか一つ又は複数を検討する。

【0056】

本明細書で使用される「有効量」という用語は、その一つ又は複数の症状の改善、緩和、軽減及び／又は遅延のような特定の障害、病症又は疾患の治療に十分な薬剤又は薬剤の組み合わせの量を指す。癌については、有効量は、腫瘍を縮小させ、及び／又は腫瘍増殖速度を低下させ（例えば、腫瘍増殖を阻害する）、又は他の不要な細胞増殖を予防又は遅延させるのに十分な量を含む。いくつかの実施例において、有効量は、進行を遅延させるのに十分な量を指す。いくつかの実施例において、有効量は、再発を予防又は遅延させるのに十分な量である。有効量は、一回又は複数回の投与で投与され得る。薬物又は組成物

の有効量は、(i) 癌細胞の数を減少させ、(ii) 腫瘍サイズを小さくし、(iii) 周囲の臓器への癌細胞の浸潤をある程度阻害し、遅延させ、緩め、且つ好ましくは、終了し、(iv) 腫瘍の転移を阻害し（即ち、ある程度緩め、且つ好ましくは、終了し）、(v) 腫瘍の増殖を阻害し、(vi) 腫瘍の発生及び／又は再発を予防又は遅延させ、及び／又は(vii) 癌に関連する一つ又は複数の症状をある程度緩和することができる。

【0057】

「抗体」、「抗体部分」又は「抗体構築体」は、その最も広い意味で使用され、且つ様々な抗体構造をカバーし、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、全長抗体及びそれらの抗原結合断片を含むが、それらに限らず、それらは、所望の抗原結合活性を示せばよい。

【0058】

基本的な4鎖抗体単位は、二本の同じ軽(L)鎖と二本の同じ重(H)鎖でからなるヘテロ四量体糖タンパク質である。IgM抗体は、5個の基本的なヘテロ四量体単位及びJ鎖と呼ばれる追加のポリペプチドからなり、且つ10個の抗原結合部位を含有する一方、IgA抗体は、2～5個の基本的な4鎖単位を含有し、これらの単位は、重合して、J鎖と組み合わせる多価の集合体を形成することができる。IgGの場合に、4鎖単位は、通常、約150,000ダルトンである。各本のL鎖は、一つの共有結合性ジスルフィド結合を介してH鎖に連結され、一方二本のH鎖は、H鎖のアイソタイプに依存して一つ又は複数のジスルフィド結合を介して互いに連結される。各本のH鎖とL鎖は、規則的に間隔を置いて配置された鎖内ジスルフィド架橋をさらに有する。各本のH鎖は、N末端に可変ドメイン(V_H)を有し、その後に三つの定常ドメイン C_H (α 鎖及び γ 鎖における各本の鎖について)及び四つの C_H ドメイン(μ アイソタイプ及び ϵ アイソタイプについて)が続く。各本のL鎖は、N末端に可変ドメイン(V_L)を有し、その後にその別の末端にある定常ドメインが続く。 V_L は V_H と整列し、且つ C_L は重鎖の第1の定常領域(C_{H1})と整列する。特定のアミノ酸残基は、軽鎖及び重鎖可変領域の間に境界面を形成すると考えられる。 V_H と V_L は、一緒に対合して単一の抗原結合部位を形成する。異なるクラスの抗体の構造及び特性に関しては、例えばBasic and Clinical Immunology, 第8版, Daniel P. Stites, Abba I. Tarr及びTristram G. Parslow (編集), Appleton & Lange, Norwalk, Conn., 1994, ページ71及び第6章を参照されたい。任意の脊椎動物種からのL鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、明らかに異なる二つのタイプのうちの一つとして指定されてもよく、 κ 及び λ と称される。重鎖定常領域(C_H)のアミノ酸配列に応じて、免疫グロブリンは、異なるクラス又はアイソタイプとして指定され得る。5種類の免疫グロブリン: IgA、IgD、IgE、IgG及びIgMが存在し、それらはそれぞれ、 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及び μ として指定される重鎖を含む。 C_H 配列及び機能における比較的小さい相違点に応じて、 γ 及び α をさらにサブクラスに分類し、例えば、ヒトは、IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1及びIgA2というサブクラスを発現する。

【0059】

「重鎖のみを有する抗体」又は「HCAb」は、重鎖を含むが、通常4鎖抗体に見られる軽鎖を欠く機能性抗体を指す。ラクダ科動物（例えば、ラクダ、ラマ又はアルパカ）は、HCAbを産生することが知られている。

【0060】

「単ドメイン抗体」又は「sdAb」という用語は、三つの相補性決定領域(CDR)を有する単一抗原結合ポリペプチドを指す。単独のsdAbは、抗原に結合することができるが、対応するCDR含有ポリペプチドと対合しない。いくつかの場合、単ドメイン抗体は、ラクダ科HCAbからエンジニアリングされ、且つそれらの重鎖可変ドメインは、本明細書で「 V_HH 」（重鎖抗体の重鎖可変ドメイン）と呼ばれる。いくつかの V_HH は、ナノ抗体とも呼ばれる。ラクダ科sdAbは、既知の最小の抗原結合抗体断片の一つである（例えば、Hamers-Castermanら, Nature 363:44

10

20

30

40

50

6-8 (1993)、Greenbergら、Nature 374:168-73 (1995)、Hassanzadeh-Ghassabehら、Nanomedicine (Lond), 8:1013-26 (2013)を参照されたい)。基本的なV_HHは、N末端からC末端へ、FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4という構造を有し、ここで、FR1~FR4は、それぞれフレームワーク領域1~4を指し、且つここで、CDR1~CDR3は、相補性決定領域1~3を指す。

【0061】

「単離された」抗体は、その産生環境の成分（例えば、天然又は組換え）から同定、単離及び／又は回収された抗体である。好ましくは、単離されたポリペプチドは、その産生環境における全ての他の成分に会合しない。その産生環境の汚染成分、例えば、組換えトランスフェクション細胞から産生された汚染成分は、抗体の研究、診断又は治療用途を典型的に妨げる物質であり、且つ酵素、ホルモン及び他のタンパク質性溶質又は非タンパク質性溶質を含んでもよい。好ましい実施形態において、ポリペプチドは、（1）例えば、Lowry方法により確定されたように、95重量%より大きい抗体、且ついくつかの実施例において、99重量%より大きい抗体まで、（2）スピニングカップシーケンサーを用いることによって、N末端又は内部アミノ酸配列の少なくとも15個の残基を得るのに十分な程度まで、又は（3）非還元条件又は還元条件下でクマシーブルー又は好ましくは、銀染色を用いてSDS-PAGEにより均一性を達成するまで精製される。単離された抗体は、抗体の天然環境の少なくとも一つの成分が存在しなくなるため、組換え細胞内のインサイチュ抗体を含む。しかしながら、単離されたポリペプチド、抗体又は構築体は、通常、少なくとも一つの精製ステップにより製造される。

【0062】

抗体の「可変領域」又は「可変ドメイン」は、抗体の重鎖又は軽鎖のアミノ末端ドメインを指す。重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ「V_H」及び「V_L」と呼ばれてもよい。これらのドメインは、通常、抗体の最も変異しやすい部分（同じクラスの他の抗体と比較）であり、且つ抗原結合部位を含有する。ラクダ科種の重鎖のみを有する抗体は、「V_HH」と呼ばれる単一の重鎖可変領域を有する。そのため、V_HHは、特殊なタイプのV_Hである。

【0063】

「可変」という用語は、抗体における可変ドメインのいくつかのセグメントの配列が広く異なるという事実を指す。Vドメインは、抗原結合を媒介し、特定の抗体のその特定の抗原に対する特異性を限定する。しかしながら、可変性は、可変ドメインの全スパンにわたって均一に分布するわけではない。逆に、それらは、軽鎖及び重鎖可変ドメイン中の相補性決定領域（CDR）又は高可変領域（HVR）と呼ばれる三つのセグメントに集中している。可変ドメインのより高度に保存された部分は、フレームワーク領域（FR）と呼ばれる。天然重鎖及び軽鎖の可変ドメインは、それぞれ4つのFR領域を含み、主にβ-シート配置を用い、三つのCDRを介して連結され、β-シート構造を連結するループを形成し、且ついくつかの場合にβ-シート構造の一部を連結するループを形成する。各鎖におけるCDRは、FR領域を介して緊密に結合し、且つ別の鎖からのCDRとともに、抗体の抗原結合部位の形成に寄与する（Kabataら、Sequences of Immunological Interest, 第五版, National Institute of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照されたい)。定常ドメインは、抗体と抗原との結合に直接関与しないが、抗体依存性細胞傷害での抗体の関与のような様々なエフェクター機能を示す。

【0064】

本明細書で使用される「モノクローナル抗体」という用語は、実質的に同質の抗体集団から得られた抗体を指し、即ち該集団を形成する各抗体は、少量に存在する可能性のある、自然に発生する突然変異及び／又は翻訳後修飾（例えば、異性化、アミド化）を除いて同一である。モノクローナル抗体は、高度に特異的であり、単一の抗原部位に対するものである。異なる決定基（エピトープ）に対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル

抗体製剤と大きく異なって、各モノクローナル抗体は、抗原における単一の決定基に対する。それらの特異性を加えて、モノクローナル抗体の利点は、それらがハイブリドーマ培養物で合成され、他の免疫グロブリンに汚染されないことにある。「モノクローナル」は、実質的に同質の抗体集団から得られた抗体の特徴を指示し、且つ何らか特定の方法による抗体の産生を必要とすると解釈されるべきではない。例えば、本出願に従って使用されるモノクローナル抗体は、様々な技術により製造することができ、これらの技術は、例えば、ハイブリドーマ方法（例えば、Kohler及びMilstein., Nature, 256: 495-97 (1975)、Hongoら, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995)、Harlowら, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988年第2版)と、Hammerlingら, Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、組換えDNA方法（例えば、米国特許第4,816,567号を参照されたい）、ファージディスプレイ技術（例えば、Clacksonら, Nature, 352: 624-628 (1991)、Marksら, J. Mol. Biol. 222: 581-597 (1992)、Sidhuら, J. Mol. Biol. 338 (2): 299-310 (2004)、Leeら, J. Mol. Biol. 340 (5): 1073-1093 (2004)、Fellouse, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 101 (34): 12467-12472 (2004)、及びLeeら, J. Immunol. Methods 284 (1-2): 119-132 (2004)を参照されたい)と、ヒト免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリン遺伝子座又は遺伝子の一部又は全体を有する動物においてヒト抗体又はヒト様抗体を産生する技術（例えば、WO 1998/24893、WO 1996/34096、WO 1996/33735、WO 1991/10741、Jakobovitsら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 2551 (1993)、Jakobovitsら, Nature 362: 255-258 (1993)、Bruggemannら, Year in Immunol. 7: 33 (1993)、米国特許第5,545,807号、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425、及び5,661,016、Marksら, Bio/Technology 10: 779-783 (1992)、Lonbergら, Nature 368: 856-859 (1994)、Morrison, Nature 368: 812-813 (1994)、Fishwildら, Nature Biotechnol. 14: 845-851 (1996)、Neuberger, Nature Biotechnol. 14: 826 (1996)、及びLonbergとHuszar, Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 (1995)を参照されたい)とを含む。

10

20

30

40

50

【0065】

「全長抗体」、「完全抗体」又は「全抗体」という用語は、抗体断片とは対照的に、実質的に完全な形態の抗体を指すために交換可能に使用される。具体的には、全長4-鎖抗体は、Fc領域を含む重鎖及び軽鎖を有するそれらの抗体を含む。全長重鎖のみを有する抗体は、重鎖（例えば、V_HH）とFc領域とを含む。定常ドメインは、天然配列定常ドメイン（例えば、ヒト天然配列定常ドメイン）もしくはそのアミノ酸配列変異体であってもよい。いくつかの場合に、完全抗体は、一つ又は複数のエフェクター機能を有してもよい。

【0066】

「抗体断片」は、完全抗体の一部を含み、好ましくは、完全抗体の抗原結合領域及び／又は可変領域を含む。抗体断片の例は、Fab、Fab'、F(ab')₂及びFv断片、ダイアボディ、線状抗体（米国特許第5,641,870号の実施例2、Zapataら, Protein Eng. 8 (10): 1057-1062 [1995]を参

照されたい)、単鎖抗体分子、単一ドメイン抗体(例えば、 $V_H H$)及び抗体断片からなる多重特異性抗体を含むが、それらに限らない。パパインは、抗体を消化して二つの同じ抗原結合断片(「F a b」断片と呼ばれる)及び残留「F c」断片を産生し、該名前は、容易に結晶化する能力を反映している。F a b断片は、L鎖全体と、H鎖の可変領域ドメイン(V_H)及び一本の重鎖の第1の定常ドメイン($C_H 1$)からなる。各F a b断片は、抗原結合に関して一価であり、即ち単一の抗原結合部位を有する。ペプシンは、抗体を処理して大きな単一F(a b')₂断片を得て、該断片は、異なる抗原結合活性を有する二つのジスルフィド結合により連結されるF a b断片にほぼ対応し、且つ抗原を架橋することが依然として可能である。F a b'断片とF a b断片との相違点は、 $C_H 1$ ドメインのカルボキシル末端に、抗体ヒンジ領域からの一つ又は複数のシステインを含むいくつかの追加の残基を有することにある。F a b'-S Hは、本明細書におけるF a b'の名称であり、ここで、定常ドメインのシステイン残基は遊離チオール基を有する。F(a b')₂抗体断片は、最初には、それらの間にヒンジシステインがあるF a b'断片として産生される。抗体断片の他の化学的カップリングも既知のものである。

10

【0067】

F c断片は、ジスルフィドを介して結合する二本のH鎖のカルボキシル末端部分である。抗体のエフェクター機能は、F c領域における配列により決定され、F c領域は、いくつかのタイプの細胞で発現するF c受容体(F c R)にも認識される領域である。

【0068】

「定常ドメイン領域」又は「定常領域」という用語は、免疫グロブリン分子の一部を指し、該免疫グロブリン分子の一部は、免疫グロブリンの別の部分、即ち可変ドメインと比べて、より保存的アミノ酸配列を有し、該アミノ酸配列は、抗原結合部位を含有する。定常ドメインは、重鎖の $C_H 1$ 、 $C_H 2$ 及び $C_H 3$ ドメイン(C_H と総称される)と軽鎖の $C_H L$ (又は $C L$)ドメインとを含む。

20

【0069】

任意の哺乳動物種の抗体(免疫グロブリン)の「軽鎖」は、いずれも、その定常ドメインのアミノ酸配列に応じて、二つの明らかに異なるタイプのうちの一つとして指定することができ、それぞれ κ a p p a(「 κ 」)と λ a m b d a(「 λ 」)と呼ばれる。

【0070】

「F v」は、完全な抗原認識及び結合部位を含有する最小の抗体断片である。この断片は、密に、非共有結合した一つの重鎖可変領域ドメインと一つの軽鎖可変領域ドメインの二量体からなる。この二つのドメインの折り畳みから、六つの高可変ループ(H鎖及びL鎖の各々3個)が産生され、高可変ループは、抗原結合にアミノ酸残基を提供し、抗体に抗原結合特異性を付与する。しかしながら、単一の可変ドメイン(又は抗原に対して特異性を有する三つのC D Rのみを含むF vの半分)でさえ、抗原を認識し、それに結合する能力を有するが、親和性が結合部位全体よりも低い。

30

【0071】

「単鎖F v」(「s F v」又は「s c F v」とも略される)は、単一ポリペプチド鎖に連結される V_H 及び V_L 抗体ドメインを含む抗体断片である。好ましくは、s F vポリペプチドは、 V_H と V_L ドメインとの間のポリペプチドリinkerをさらに含み、該ポリペプチドリinkerは、s F vが抗原結合のための所望の構造を形成することを可能にする。s F vに関する概説は、The Pharmacology of Monoclonal AntibodiesのPluckthun, 第113巻, Rosenburg及びMore編集, Springer-Verlag, New York, ページ269-315 (1994)を参照されたい。

40

【0072】

本明細書に記載の抗体の「機能断片」は、完全抗体の一部を含み、通常、完全抗体の抗原結合領域もしくは可変領域、又は変化したF c R結合能を保持するか又は有する抗体のF c領域を含む。抗体断片の例は、線状抗体と、単鎖抗体分子と、抗体断片からなる多重特異性抗体とを含む。

50

【0073】

「ダイアボディ」という用語は、V_HドメインとV_Lドメインとの間に短いリンカー（約5～10個の残基）を有するsFv断片（前の段落を参照）を構築し、それによりVドメインの鎖内の対合ではなく鎖間の対合を実現し、2価の断片、即ち二つの抗原結合部位を有する断片を産生するような方法で作製されるミニ抗体断片を指す。二重特異性ダイアボディは、二つの「交差」sFv断片のヘテロ二量体であり、ここで、二つの抗体のV_Hドメイン及びV_Lドメインは、異なるポリペプチド鎖に存在する。ダイアボディは、例えば、EP 404,097、WO 93/11161、Hollingerら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)により詳しく記述されている。

10

【0074】

本明細書のモノクローナル抗体は、具体的には、「キメラ」抗体（免疫グロブリン）であって、重鎖及び／又は軽鎖の一部は、特定の種に由来するか又は特定の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同じ又は相同であり、一方、該鎖の残りの部分は、別の種に由来するか又は別の抗体クラスもしくはサブクラスに属する抗体における対応する配列と同じ又は相同である抗体と、このような抗体の断片とを含み、それらが所望の生物学的活性を示すものであればよい（米国特許第4,816,567号、Morrissonら、Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81: 6851-6855 (1984)）。「ヒト化抗体」は、「キメラ抗体」のサブセットとして用いられる。

20

【0075】

非ヒト（例えば、ラマ又はラクダ）抗体の「ヒト化」形態は、非ヒト免疫グロブリンからの最小配列を含有する抗体である。いくつかの実施例において、ヒト化抗体は、ヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）であり、ここで、レシピエントCDR（以下で定義される）からの残基は、非ヒト種（例えば、マウス、ラット、ウサギ、ラクダ、ラマ、アルパカ又は非ヒト霊長類）からの、所望の特異性、親和性及び容量を有するCDR（ドナー抗体）の残基で置換される。いくつかの場合に、ヒト免疫グロブリンのフレームワーク（「FR」）残基は、対応する非ヒト残基で置換される。なお、ヒト化抗体は、レシピエント抗体又はドナー抗体で発見されていない残基を含んでもよい。これらの修飾は、抗体性能、例えば、結合親和性をさらに改善するために行われてもよい。一般的には、ヒト化抗体は、少なくとも一つ、典型的には二つの可変ドメインを実質的に全て含み、ここで、全て又は実質的に全ての高可変ループは、非ヒト免疫グロブリン配列のそれらのものに対応し、且つ全て又は実質的に全てのFR領域は、ヒト免疫グロブリン配列のそれらのものであり、しかしFR領域は、一つ又は複数の単独のFR残基置換を含んでもよく、これらの置換は、抗体性能、例えば、結合親和性、異性化、免疫原性などを改善する。FRにおけるこれらのアミノ酸置換の数は、典型的には、H鎖において6個以下であり、且つL鎖において3個以下である。ヒト化抗体は、任意選択的に、免疫グロブリン定常領域（Fc）の少なくとも一部をさらに含み、典型的には、ヒト免疫グロブリンの少なくとも一部である。さらなる詳細については、例えば、Jonesら、Nature 321: 522-525 (1986)、Riechmannら、Nature 332: 323-329 (1988)とPresta, Curr. Op. Struct. Biol. 2: 593-596 (1992)を参照する。また、例えば、VaswaniとHamilton, Ann. Allergy, Asthma & Immunol. 1: 105-115 (1998)、Harris, Biochem. Soc. Transactions 23: 1035-1038 (1995)、HurleとGross, Curr. Op. Biotech. 5: 428-433 (1994)、及び米国特許第6,982,321及び7,087,409号を参照されたい。

30

40

【0076】

「ヒト抗体」は、ヒトから産生された抗体に対応するアミノ酸配列を有し、及び／又は本明細書に開示される、ヒト抗体を作製するための技術のいずれかを用いて産生される抗

50

体である。ヒト抗体のこの定義は、非ヒト抗原結合残基を含むヒト化抗体を特に排除する。当分野の既知の種々の技術（ファージディスプレイライブラリーを含む）を用いてヒト抗体を産生してもよい。Hoogenboom及びWinter, J. Mol. Biol., 227:381 (1991)、Marksら, J. Mol. Biol., 222:581 (1991)。ヒトモノクローナル抗体の作製にも使用可能なのは、Coleら, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, ページ77 (1985)、Boernerら, J. Immunol., 147(1):86-95 (1991)である。また、van Dijk及びvan de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5:368-74 (2001)を参照されたい。ヒト抗体は、抗原攻撃に
10 応答してそのような抗体を産生するように修飾されているが、その内因性遺伝子座が無効になったトランスジェニック動物（例えば、免疫した異種マウス（xenomice））に抗原を投与することによって作製され得る（例えば、XENOMOUSETM技術に関する米国特許第6,075,181及び6,150,584号を参照されたい）。また、例えば、Liら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)におけるヒトB細胞ハイブリドーマ技術により産生されるヒト抗体を参照されたい。

【0077】

本明細書で使用される場合、「高可変領域」、「HVR」又は「HV」という用語は、配列が高可変であり、及び／又は構造が限定されるループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。通常、単ドメイン抗体は、HVR1（又はCDR1）、HVR2（又はCDR2）及びHVR3（又はCDR3）という三つのHVR（又はCDR）を含む。HVR3（又はCDR3）は、三つのHVRの最大多様性を示し、且つ抗体に対する精細な特異性の付与において独特の役割を果たすと考えられる。例えば、Hamers-Castermanら, Nature 363:446-448 (1993)、Sheriffら, Nature Struct. Biol. 3:733-736 (1996)を
20 参照されたい。

【0078】

「相補性決定領域」又は「CDR」という用語は、Kabatシステムに従って定義された高可変領域を指すためのものである。Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)を参照されたい。

【0079】

多くのHVR説明は、使用され、且つ本明細書にカバーされる。Kabat相補性決定領域（CDR）は、配列可変性に基づき、且つ最も一般的に使用されている（Kabatら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)）。Chothiaは、代わりに構造的ループの位置を指す（Chothia及びLesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）。AbM HVRは、Kabat HVRとChothia構造的ループとの間の折衷案を表し、且つOxford MolecularのAbM抗体モデリングソフトウェアに使用される。「接触」HVRは、利用可能な複合体結晶構造に対する分析に基づく。これらのHVRにおける各残基は、以下の表1に示される。

【0080】

10

20

30

40

50

【表 1】

表1. HVR説明。

ループ	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24~L34	L24~L34	L26~L32	L30~L36
L2	L50~L56	L50~L56	L50~L52	L46~L55
L3	L89~L97	L89~L97	L91~L96	L89~L96
H1	H31~H35B	H26~H35B	H26~H32	H30~H35B
(Kabat 番号付け)				
H1	H31~H35	H26~H35	H26~H32	H30~H35
(Chothia 番号付け)				
H2	H50~H65	H50~H58	H53~H55	H47~H58
H3	H95~H102	H95~H102	H96~H101	H93~H101

10

【0081】

HVRは、以下の「拡大HVR」を含んでもよく、VLにおける24~36又は24~34 (L1)、46~56又は50~56 (L2) 及び89~97又は89~96 (L3) 並びにVHにおける26~35 (H1)、50~65又は49~65 (H2) 及び93~102、94~102又は95~102 (H3)。これらの定義のうちの各定義に対し、可変領域残基は、以上のKabatらに従って番号付けされる。

20

【0082】

単ドメイン抗体（例えば、V_HH）のアミノ酸残基は、Kabatらが提出したVHドメインの一般的な番号付けに従って番号付けされ（「Sequence of proteins of immunological interest」, US Public Health Services, NIH Bethesda, Md., 公開番号91）、例えば、Riechmann及びMuyldermans, J. Immunol. Methods 2000年6月23日; 240 (1-2): 185-195の論文において、ラクダ科からのV_HHドメインに適する。該番号によると、V_HHのFR1は、1~30位のアミノ酸残基を含み、V_HHのCDR1は、31~35位のアミノ酸残基を含み、V_HHのFR2は、36~49位のアミノ酸残基を含み、V_HHのCDR2は、50~65位のアミノ酸残基を含み、V_HHのFR3は、66~94位のアミノ酸残基を含み、V_HHのCDR3は、95~102位のアミノ酸残基を含み、且つV_HHのFR4は、103~113位のアミノ酸残基を含む。この点に関して、当分野においてV_Hドメイン及びV_HHドメインについて周知であるように、各CDRにおけるアミノ酸残基の総数は、変化可能であり、且つKabat番号で示されるアミノ酸残基の総数に対応してはいけないことに留意すべきである（即ち、Kabat番号による一つ又は複数の位置は、実際の配列において占められてはいけないか、又は実際の配列は、Kabat番号に許容される数よりも多くのアミノ酸残基を含んでもよい）。

30

40

【0083】

表現「例えば、Kabatにおける可変ドメイン残基番号付け」又は「例えば、Kabatにおけるアミノ酸位置番号付け」及びその変形は、上記Kabatらの抗体アセンブラの重鎖可変ドメイン又は軽鎖可変ドメインに用いられる番号付けシステムを指す。この番号付けシステムを使用すると、実際の直鎖アミノ酸配列は、可変ドメインFR又はHVRの短縮又は挿入に対応するより少なく又は別のアミノ酸を含有してもよい。例えば、重鎖可変ドメインは、H2の残基52の後の単一アミノ酸挿入（Kabatの残基52aに基づくものである）及び重鎖FR残基82の後の挿入残基（例えば、Kabatの残基8

50

2 a、8 2 bと8 2 cなどに基づくものである) を含んでもよい。所与の抗体の残基の K a b a t 番号付けは、抗体配列と「標準」K a b a t 番号付け配列との相同性領域におけるアラインメントによって確定することができる。

【0084】

いくつかの実施例において、また、IMGT情報システムを用いて抗体を分析してもよい。IMGT情報システムは、Marie-Paule Lefrancにより1989年に作成され、現在、免疫遺伝学及び免疫情報学の包括的基準として使用されている(例えば、Lefranc M-P, The Immunologist 7: 132-136 (1999) 及びLefranc M-Pら, Nucleic Acids Res 27: 209-212 (1999) を参照されたい)。IMGT番号付けスキームは、表2にまとめられる(<https://www.imgt.org/IMGTinformation/>を参照されたい)。

【0085】

【表2】

表2. IMGT番号付けスキーム

	FR1- IMGT	CDR1- IMGT	FR2- IMGT	CDR2- IMGT	FR3- IMGT	生殖系列 V-遺伝子(*) CDR3-IMGT に対する	再構成された V-J-遺伝子及び V-D-J-遺伝子に対する	
						生殖系列 CDR3-IMGT	再構成された CDR3-IMGT	FR4- IMGT
アミノ酸 番号	1 --> 26 (C 23)	27 --> 38	39 --> 55 (W 41)	56 --> 65	66 --> 104 (C 104)	105 --> 116	105 --> 117 (112.1, 111.1, 112.2, 111.2 など)	118 --> 129
アミノ酸 数	25~26 個のア ミノ酸	5~12 個のア ミノ酸	16~17 個のア ミノ酸	0~10 個のア ミノ酸	36~39 個のア ミノ酸	2~12個の アミノ酸	2~13個のアミ ノ酸(13個を超え るアミノ酸)	10~12 個のア ミノ酸

(*) 7 量体の前に、+ 0、1 又は 2 個のヌクレオチド。

【0086】

本明細書に特に明記しない限り、免疫グロブリン重鎖における残基の番号付けは、以上の K a b a t らに記載の E U インデックスの番号付けである。「K a b a t に記載の E U インデックス」は、ヒト I g G 1 E U 抗体の残基番号付けである。

【0087】

「フレームワーク」又は「FR」残基は、本明細書で定義される H V R 残基以外のそれらの可変ドメイン残基である。

【0088】

「ヒトコンセンサスフレームワーク」又は「受容体人フレームワーク」は、ヒト免疫グロブリン V_L 又は V_H フレームワーク配列の選択中に最もよく出現するアミノ酸残基を表すフレームワークである。通常、ヒト免疫グロブリン V_L 又は V_H 配列は、可変ドメイン配列のサブグループから選択される。通常、配列サブグループは、K a b a t ら, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991) におけるもののようなサブグループである。V_L に関する例では、サブグループは、以上の K a b a t らに記載のサブグループ κ I、κ I I、κ I I I 又は κ I V であってもよい。また、V_H に関して、サブグループは、K a b a t らに記載のサブグループ I、サブグループ I I 又はサブグループ I I I であってもよい。代替的に、ヒトコンセンサスフレームワークは、例えば、ドナーフレームワーク配列と様々なヒトフレームワーク配列の集合とのアラインメントを行うことによって、それとドナーフレームワークとの相同性に基づいてヒトフレームワーク残基を選択する場合に、上記特定の残基に由来してもよい。ヒト免疫グロブリンフレームワーク又はヒトコンセンサスフレームワークに「由来する」受容体ヒトフレームワークは、その同じアミノ酸配列を含んでもよく、又はあらかじめ存在す

るアミノ酸配列変化を含有してもよい。いくつかの実施例において、予め存在するアミノ酸変化の数は、10個又はそれ未満、9個又はそれ未満、8個又はそれ未満、7個又はそれ未満、6個又はそれ未満、5個又はそれ未満、4個又はそれ未満、3個又はそれ未満又は2個又はそれ未満である。

【0089】

「親和性成熟」抗体は、その一つ又は複数のCDRに一つ又は複数の改変を有する抗体であり、それらの改変を有しない親抗体に比べて、それらの改変は、抗原に対する抗体の親和性の改善をもたらす。いくつかの実施例において、親和性成熟抗体は、標的抗原に対してナノモル親和性さらにはピコモル親和性を有する。親和性成熟抗体は、当分野に既知の方法で作製されたものである。例えば、Marksら, Bio/Technology 10:779-783 (1992) には、V_H-ドメイン及びV_L-ドメインシャッフリングによる親和性成熟が記述されている。CDR及び／又はフレームワーク残基のランダム変異誘発は、例えば、以下の文献に記述されており、Barbasら Proc Natl Acad Sci USA 91:3809-3813 (1994)、Schierら Gene 169:147-155 (1995)、Yeltonら J. Immunol. 155:1994-2004 (1995)、Jacksonら, J. Immunol. 154(7):3310-9 (1995)、及びHawkinsら, J. Mol. Biol. 226:889-896 (1992)。

10

【0090】

本明細書で使用されるように、「特異的に結合する」、「特異的に認識する」又は「…に対して特異性を有する」という用語は、標的と抗原結合タンパク質（例えば、mAb）との間の測定と再現が可能な相互作用、例えば、結合を指し、それは、ヘテロ分子（生体分子を含む）集団が存在する時の標的の存在を決定する。例えば、標的（エピトープであってもよい）に特異的に結合する抗原結合タンパク質（例えば、mAb）は、他の標的への結合よりも大きな親和性、アビディティで、より容易に、及び／又はより長い持続時間で該標的に結合する抗原結合タンパク質（例えば、mAb）である。いくつかの実施例において、抗原結合タンパク質（例えば、mAb）と関係のない標的との結合程度は、例えば、放射免疫アッセイ（RIA）により測定された抗原結合タンパク質（例えば、mAb）と標的との結合よりも約10%小さい。いくつかの実施例において、標的に特異的に結合する抗原結合タンパク質（例えば、mAb）の解離定数（K_D）は、 $\leq 10^{-5}$ M、 $\leq 10^{-6}$ M、 $\leq 10^{-7}$ M、 $\leq 10^{-8}$ M、 $\leq 10^{-9}$ M、 $\leq 10^{-10}$ M、 $\leq 10^{-11}$ M、又は $\leq 10^{-12}$ Mである。いくつかの実施例において、抗原結合タンパク質は、異なる種からのタンパク質にとって保存的なタンパク質におけるエピトープに特異的に結合する。いくつかの実施例において、特異的結合は、排他的結合を含んでもよいが、これに限定しない。

20

30

【0091】

「特異性」という用語は、抗原結合タンパク質（例えば、mAb）による抗原の特定のエピトープに対する選択的認識を指す。例えば、天然抗体は、単一特異的である。本明細書で使用される「多重特異性」という用語は、抗原結合タンパク質が多エピトープに対する特異性を有する（即ち、1個の生体分子における二つ、三つ又はより多くのエピトープに特異的に結合するか又は二つ、三つ又はより多くの異なる生体分子におけるエピトープに特異的に結合することができる）ことを示す。本明細書で使用される「二重特異性」は、抗原結合タンパク質が、二つの異なる抗原結合特異性を有することを示す。別段の指示がない限り、列挙された二重特異性抗体が結合する抗原の順序は任意である。即ち、例えば、「抗B7-H3/PD-L1」、「抗PD-L1/B7-H3」、「B7-H3×PD-L1」、「PD-L1×B7-H3」、「PD-L1-B7-H3」及び「B7-H3-PD-L1」という用語は、B7-H3及びPD-L1の両方に特異的に結合する二重特異性抗体を指すために交換可能に使用される。本明細書で使用される「単一特異性」という用語は、一つ又は複数の結合部位を有する抗原結合タンパク質（例えば、mAb）を示し、各結合部位は、同じ抗原の同じエピトープに結合する。

40

50

【0092】

本明細書で使用される「価」という用語は、抗原結合タンパク質には、指定された数の結合部位が存在することを示す。例えば、天然抗体又は全長抗体は、二つの結合部位を有し、2価である。そのため、「3価」、「4価」、「5価」及び「6価」はそれぞれ、抗原結合タンパク質に2つの結合部位、3つの結合部位、4つの結合部位、5つの結合部位及び6つの結合部位が存在することを示す。

【0093】

「抗体エフェクター機能」は、抗体のFc領域（天然配列Fc領域又はアミノ酸配列変異体Fc領域）に起因し、且つ抗体アイソタイプによって変化する生物学的活性を指す。抗体エフェクター機能の例は、C1q結合及び補体依存性細胞傷害（CDC）、Fc受容体結合、抗体依存性細胞媒介性細胞傷害（ADCC）、貪食作用、細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御、及びB細胞活性化を含む。「低減又は最小化された」抗体エフェクター機能は、野生型又は修飾されていない抗体に比べて、少なくとも50%（又は60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%）低下した抗体エフェクター機能を指す。抗体エフェクター機能の確定は、当業者により容易に確定され測定され得る。好ましい実施形態において、補体結合、補体依存性細胞傷害及び抗体依存性細胞傷害の抗体エフェクター機能は影響を受ける。いくつかの実施例において、定常領域においてグリコシル化された突然変異（例えば「エフェクターのない突然変異」）を除去することによってエフェクター機能を除去する。一態様では、エフェクターのない突然変異は、CH2領域に、N297A又はDANA突然変異（D265A及び／又はN297A）を含む。Shieldsら, J. Biol. Chem. 276 (9): 6591-6604 (2001)。代替的に、エフェクター機能の低減又は除去を引き起こす別の突然変異は、K322A及びL234A／L235A（LALA）を含む。代替的に、エフェクター機能は、生産技術により低減又は除去することができ、これらの生産技術は、例えば、グリコシル化されないか、又はエフェクター機能の促進に無効であるかもしくは効果が低い変化を引き起こすグリコシル化モードの宿主細胞（例えば、大腸菌（E. coli.））で発現する（例えば、Shinkawaら, J. Biol. Chem. 278 (5): 3466-3473 (2003)）。

【0094】

「抗体依存性細胞媒介性細胞傷害」又はADCCは、細胞傷害形態を指し、ここで、いくつかの細胞傷害細胞（例えば、ナチュラルキラー（NK）細胞、好中球及びマクロファージ）に存在するFc受容体（FcR）に結合する分泌Igにより、これらの細胞傷害エフェクター細胞は、抗原を運ぶ標的細胞に特異的に結合し、続いて細胞毒素で標的細胞を殺傷することができる。抗体は、細胞傷害細胞を「武装（arm）」し、且つこのようなメカニズムで標的細胞を殺傷するのに必要である。ADCCを媒介するための初代細胞NK細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、単核細胞は、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。造血細胞におけるFc発現は、Ravetch及びKinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991) ページ464の表3にまとめられている。目的分子のADCC活性を評価するために、米国特許第5,500,362又は5,821,337号に記載の測定のようなインビトロADCCアッセイを行ってもよい。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞（PBMC）と、ナチュラルキラー（NK）細胞とを含む。代替的に又は付加的に、インビボで、例えば、Clynesら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95: 652-656 (1998)に開示された動物モデルのような動物モデルにおいて、目的分子のADCC活性を評価してもよい。

【0095】

本明細書における「Fc領域」という用語は、免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するためのものであり、天然配列Fc領域と変異体Fc領域とを含む。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界が変化可能であるが、通常、ヒトIgG重鎖のFc領域を、Cys2

10

20

30

40

50

26位置のアミノ酸残基又はPro230からそのカルボキシル末端までの鎖のセグメントとして定義する。例えば、抗体の産生もしくは精製期間、又は抗体重鎖をコードする核酸に対して組換えエンジニアリングを行うことによって、Fc領域のC末端リジン（EU番号付けシステムによる残基447）を除去することができる。そのため、インタクトな抗体の組成物は、全てのK447残基が除去された抗体集団、K447残基が除去されていない抗体集団及びK447残基を含む抗体とそれを含まない抗体との混合物を有する抗体集団を含んでもよい。本明細書に記載の抗体に用いられる適切な天然配列Fc領域は、ヒトIgG1、IgG2（IgG2A、IgG2B）、IgG3及びIgG4を含む。

【0096】

「Fc受容体」又は「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を記述する。好ましいFcRは、天然配列ヒトFcRである。なお、好ましいFcRは、IgG抗体（γ受容体）に結合し、FcγRI、FcγRII及びFcγRIIIサブクラスを受容体を含むFcRであり、対立遺伝子変異体を含み、代替的に、これらの受容体のスプライス形態を含み、FcγRII受容体は、FcγRIIA（「活性化受容体」）とFcγRIIB（「阻害性受容体」）とを含み、それらは、類似するアミノ酸配列を有し、主な区別は、その細胞内ドメインにある。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞内ドメインにおいて、免疫受容体チロシンに基づく活性化モチーフ（ITAM）を含有する。阻害性受容体FcγRIIBは、その細胞内ドメインにおいて、免疫受容体チロシンに基づく阻害性モチーフ（ITIM）を含有する。（M. Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15: 203-234 (1997)を参照されたい）。FcRは、RavetchとKinet, Annu. Rev. Immunol. 9: 457-92 (1991)、Capelら, Immunomethods 4: 25-34 (1994)及びde Haasら, J. Lab. Clin. Med. 126: 330-41 (1995)に概説されている。本明細書の「FcR」という用語は、他のFcRをカバーし、将来同定されるFcRを含む。

【0097】

「Fc受容体」又は「FcR」という用語は、母体IgGの胎児への輸送を担う新生児受容体FcRnをさらに含む。Guyerら, J. Immunol. 117: 587 (1976)及びKimら, J. Immunol. 24: 249 (1994)）。FcRnとの結合の測定方法は既知のものである（例えば、GhetieとWard, Immunol. Today 18: (12): 592-8 (1997)、Ghetieら, Nature Biotechnology 15 (7): 637-40 (1997)、Hintonら, J. Biol. Chem. 279 (8): 6213-6 (2004)、WO 2004/92219 (Hintonら)を参照されたい）。ヒトFcRn高親和性結合ポリペプチドのインビボでのFcRnとの結合及び血清半減期は、例えば、ヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウス又はトランスフェクトされたヒト細胞系において、又は変異体Fc領域を有するポリペプチドが投与された霊長類動物において測定され得る。WO 2004/42072 (Presta)には、FcRとの結合を改善するか又は弱める抗体変異体が記述されている。また、例えば、Shieldsら, J. Biol. Chem. 9 (2): 6591-6604 (2001)を参照されたい。

【0098】

「補体依存性細胞傷害」又は「CDC」は、補体存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的補体経路の活性化は、補体系の第1の成分（C1q）と、その相同な抗原に結合する抗体（適切なサブクラス）との結合によって開始される。補体活性化を評価するために、例えば、Gazzano-Santoroら, J. Immunol. Methods 202: 163 (1996)に記載のように、CDCアッセイを行ってもよい。変化したFc領域アミノ酸配列及び増加又は低減したC1q結合能を有する抗体変異体は、米国特許第6,194,551 B1及びWO 99/51642に記述されている。それらの特許刊行物の内容は、参照により本明細書に明示的に組み込まれる。さらに、Idu

10

20

30

40

50

s o g i e ら J . I m m u n o l . 1 6 4 : 4 1 7 8 - 4 1 8 4 (2 0 0 0) を参照されたい。

【0099】

「結合親和性」は、全体的には、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（partner）（例えば、抗原）との間の非共有相互作用の合計の強度を指す。特に明記しない限り、本明細書で使用されるように、「結合親和性」は、結合対のメンバーの間の1:1の相互作用を反映する固有の結合親和性を指す。結合親和性は、 K_D 、 K_{off} 、 K_{on} 又は K_a で示され得る。本明細書で使用される「 K_{off} 」という用語は、抗体（又は抗原結合ドメイン）が抗体／抗原複合体から解離する解離速度定数を指し、動力学的選択設定により確定されたように、単位 s^{-1} で表される。本明細書で使用される「 K_{on} 」という用語は、抗体（又は抗原結合ドメイン）が抗原と会合して抗体／抗原複合体を形成する会合速度定数を指し、単位 $M^{-1}s^{-1}$ で表される。本明細書で使用されるように、平衡解離定数「 K_D 」という用語は、特定の抗体－抗原相互作用の解離定数を指し、且つ平衡状態で抗体分子溶液に存在する全ての抗体結合ドメインの半分を占めるのに必要な抗原濃度を記述し、且つ K_{off}/K_{on} に等しく、単位Mで表される。 K_D の測定は、全ての結合剤がいずれも溶液にあると予め仮定する。抗体が細胞壁に結合している場合、例えば、酵母発現系において、対応する平衡速度定数は EC_{50} として表され、 K_D の良好な近似値を示した。親和定数 K_a は、解離定数 K_D の逆数であり、単位 M^{-1} で表される。

10

【0100】

解離定数（ K_D ）は、抗体の抗原に対する親和性を示す指標として用いられる。例えば、Scatchard方法により、様々な標識剤で標識された抗体を用いて、非処方測定セット（キット）としてのBiacoreX（Amersham Biosciencesにより製造）又は類似するセットを使用することによって、セットに添付されたマニュアル及び実験操作方法に従って、容易に分析することができる。これらの方法で得られる K_D 値は、単位M（モル／リットル）で表される。標的に特異的に結合する抗体もしくははその抗原結合断片は、例えば、 $\leq 10^{-5}M$ 、 $\leq 10^{-6}M$ 、 $\leq 10^{-7}M$ 、 $\leq 10^{-8}M$ 、 $\leq 10^{-9}M$ 、 $\leq 10^{-10}M$ 、 $\leq 10^{-11}M$ 又は $\leq 10^{-12}M$ の解離定数（ K_D ）を有してもよい。

20

【0101】

抗体もしくははその抗原結合ドメインの結合特異性は、当分野の既知の方法で実験によって確定されてもよい。このような方法は、ウエスタンブロット、ELISAー、RIAー、ECLー、IRMAー、EIAー、BIAcore検定ペプチド走査を含むが、それらに限らない。

30

【0102】

半値最大阻害濃度（ IC_{50} ）は、物質（例えば、抗体）が特定の生物学的機能又は生化学的機能を阻害する有効性の尺度である。それは、所定の生物学的プロセス（例えば、PD-L1とB7-1との結合、又はプロセスの成分、即ち酵素、細胞、細胞受容体又は微生物）の半分を阻害するために、特定の薬物又は他の物質（抗体のような阻害剤）がどれだけ必要であるかを示す。該値は、典型的には、モル濃度として表される。 IC_{50} は、アゴニスト薬物又は他の物質（例えば、抗体）の EC_{50} に相当する。 EC_{50} は、また、インビボで50%最大効果を得るために必要な血漿濃度を表す。本明細書で使用されるように、「 IC_{50} 」は、インビトロで50%抗原の生物学的活性（例えば、PD-L1の生物学的活性）を中和するために必要な抗体（例えば、抗PD-L1 mAb）の有効濃度を示すためのものである。 IC_{50} 又は EC_{50} は、生物学的アッセイにより測定することができ、例えば、FACS分析（競合結合分析）、細胞ベースのサイトカイン放出アッセイ又は増幅発光近接均一アッセイ（AlphaLISA）によってリガンド結合に対する阻害を測定する。

40

【0103】

ペプチド、ポリペプチド又は抗体配列に関する「アミノ酸配列同一性パーセント（%）」

50

」及び「相同性」は、最大配列同一性パーセントを実現するために、配列をアラインメントし、且つ必要な場合にギャップを導入し、いかなる保存的置換も配列同一性の一部として考慮せず、候補配列における、特定のペプチド又はポリペプチド配列におけるアミノ酸残基と同じであるアミノ酸残基の割合として定義される。アミノ酸配列同一性パーセントを確定するという目的のために、当分野の技術における種々の方法でアラインメントを実現することができ、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN又はMEGALIGNTM (DNASTAR) ソフトウェアのような公衆に取得可能なコンピュータソフトウェアを用いる。当業者は、比較される配列の全長範囲内に最大整列を実現させる任意のアルゴリズムを含み、測定整列に用いられる適当なパラメータを確定することができる。

【0104】

10

本明細書に記載の構築体、抗体もしくはその抗原結合断片をコードする「単離した」核酸分子は、その生産環境において、通常、それに関連する少なくとも一つの汚染物核酸分子から同定されて単離された核酸分子である。好ましくは、単離した核酸は、産生環境に関する全ての成分に会合しない。本明細書に記載のポリペプチドと抗体をコードする単離した核酸分子の形式は、天然に存在する形式又はバックグラウンドと異なる。したがって、単離した核酸分子は、細胞に天然に存在する本明細書に記載のポリペプチドと抗体をコードする核酸と異なる。単離された核酸は、核酸分子を通常含む細胞に含まれる該核酸分子を含むが、該核酸分子は、染色体外又はその天然染色体位置と異なる染色体位置に存在する。

【0105】

20

本明細書に使用されるように、「ベクター」という用語は、それに連結される別の核酸を増殖させることができる核酸分子を指す。該用語は、自己複製核酸構造としてのベクターと、宿主細胞（ベクターがすでにその中に導入された）ゲノムに組み込まれたベクターとを含む。いくつかのベクターは、それに操作可能に連結される核酸の発現を導くことができる。このようなベクターは、本明細書において、「発現ベクター」と呼ばれる。

【0106】

本明細書で使用される「トランスフェクトした」又は「形質転換した」又は「形質導入した」という用語は、外因性核酸を宿主細胞に転移又は導入するプロセスを指す。「トランスフェクトした」又は「形質転換した」又は「形質導入した」細胞は、すでに異種核酸でトランスフェクト、形質転換又は形質導入した細胞である。該細胞は、初代標的細胞及びその子孫を含む。

30

【0107】

「宿主細胞」、「宿主細胞系」及び「宿主細胞培養物」という用語は、交換使用可能であるとともに、外因性核酸が導入された細胞、及びこのような細胞の子孫を指す。宿主細胞は、「形質転換体」と「形質転換細胞」とを含み、それは、継代回数を考慮せず、初代形質転換細胞及びそれに由来する子孫を含む。子孫の核酸含有量は、親細胞と完全に同じではない場合があり、突然変異を含有してもよい。元の形質転換細胞においてスクリーニング又は選択されたものと同じ機能又は生物学的活性を有する突然変異体子孫は本明細書に含まれている。

【0108】

40

「医薬組成物」の「薬物製剤」という用語は、製剤を指し、該製剤の形態は、活性成分の生物学的活性が有効であることを許容し、且つ該製剤は、該製剤が投与される被験体に対して許容されない毒性を有する他の成分を含まない。このような製剤は、滅菌である。「滅菌」製剤は、消毒されたか又は生きている微生物及びその胞子がないものである。

【0109】

理解すべきこととして、本明細書に記載の発明の実施例は、「実施例からなる」及び／又は「実質的に実施例からなる」を含む。

【0110】

本明細書において、「約」値又はパラメータに対する言及は、該値又はパラメータ自体に対する変化を含む（且つ記述する）。例えば、「約X」に関する記述は、「X」の記述

50

を含む。

【0111】

本明細に用いられる「約X-Y」という用語は、「約Xから約Y」と同じ意味を有する。

【0112】

II. 抗B7-H3構築体

抗B7-H3モノクローナル抗体

本明細書に記載の単離された抗B7-H3構築体は、B7-H3を特異的に認識するか又はそれに結合するモノクローナル抗体(mAb)部分(又は「抗B7-H3 mAb」)を含む。本発明のいくつかの実施例において、単離された抗B7-H3構築体は全長IgGである。

【0113】

B7スーパーファミリー及びB7-H3

本明細書で使用されるように、「B7-H3」という用語は、ヒトB7タンパク質ファミリーのメンバーを指し、Ig様ドメインを有するI型膜タンパク質であり、CD276とも呼ばれる。

【0114】

CD28受容体のリガンドに対する研究は、すでにB7スーパーファミリーと呼ばれる関連分子のグループに対する特徴付けを生成した。B7ファミリーメンバーは、免疫グロブリン-V様ドメイン及び免疫グロブリン-C様ドメインを有する免疫グロブリンスーパーファミリーメンバーである。B7ファミリーメンバーのIgV及びIgCドメインは、それぞれ単一のエクソンによりコードされ、リーダー配列、膜貫通ドメイン及び細胞内ドメインをコードするエクソンが別にある。細胞内ドメインは、短く、長さ範囲が19個〜62個のアミノ酸残基であり、且つ複数のエクソンによりコードされてもよい。B7-H3のユニークな点は、主なヒト形態が二つの細胞外タンデムIgV-IgCドメイン(即ち、IgV-IgC-IgV-IgC)を含有することである(Collins, M.ら(2005), Genome Biol. 6:223.1-223.7)。B7ファミリーのメンバーは、細胞表面で背中合わせの非共有結合的ホモ二量体を形成すると予測され、且つB7-1(CD80)及びB7-2(CD86)について、このような二量体がすでに発見された。

【0115】

最初に2つのIgドメイン(IgV-IgC)のみを含むと考えられていたが(Chapoval, A.ら(2001), Nature Immunol. 2:269-274; Sun, M.ら(2002), J. Immunol. 168:6294-6297)、四つの免疫グロブリンの細胞外ドメインの変異体(「4Ig-B7-H3」)がすでに同定され、且つ該タンパク質のより一般的なヒト形態であることが発見された(Sharpe, A. H.ら(2002), Nature Rev. Immunol. 2:116-126)。天然マウス形態(2Ig)とヒト4Ig形態が類似の機能を示すため、これらの2つの形態の間から機能的差異はまだ観察されていない(Hofmeyer, K.ら(2008), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105(30):10277-10278)。4Ig-B7-H3分子は、ナチュラルキラー細胞媒介性癌細胞溶解を阻害する(Castriconi, R.ら, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101(34):12640-12645)。ヒトB7-H3(2Ig形態)は、活性化されたT細胞における推定受容体と結合することによってT細胞の活性化及びIFN-γの酸性を促進することがすでに発見された(Chapoval, A.ら(2001), Nature Immunol. 2:269-274; Xu, H.ら(2009), Cancer Res. 69(15):5275-5281)。腫瘍細胞で発現する場合、B7-H4及びB7-H1は、いずれも有効な免疫機能阻害剤である(Flies, D. B.ら(2007), J. Immunother. 30(3):251-260)。

10

20

30

40

50

【0116】

タンパク質がT細胞の共刺激及び共阻害の両方を媒介するため、B7-H3の作用パターンは複雑である (Hofmeyer, K. ら (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (30): 10277-10278、Martin-Orozco, N. ら (2007), *Semin. Cancer Biol.* 17 (4): 288-298、Subudhi, S. K. ら (2005), *J. Mol. Med.* 83: 193-202)。B7-H3は、(TREM) 様転写物2 (TLT-2) に結合し、T細胞の活性化を共刺激するが、まだ同定されていない一つ又は複数の受容体に結合してT細胞の共阻害を媒介する。また、B7-H3は、未知の受容体との相互作用により、ナチュラルキラー細胞及び骨芽細胞の阻害剤である (Hofmeyer, K. ら (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 105 (30): 10277-10278)。該阻害は、主要なシグナル伝達経路のメンバー (例えば、NFTA、NF-κB又はAP-1因子) との相互作用によって作用することができ、T細胞受容体 (TCR) は、これらの主要なシグナル伝達経路によって遺伝子転写を調節する。

10

【0117】

B7-H3は、CD4+及びCD8+ T細胞の増殖を共刺激する。B7-H3は、またIFN-γの産生及びCD8+の溶解活性を刺激する (Chapoval, A. ら (2001), *Nature Immunol.* 2: 269-274、Sharpe, A. H. ら (2002), *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126)。しかしながら、該タンパク質はさらに、NFAT (活性化されたT細胞の核因子)、NF-κB (核因子κB) 及びAP-1 (活性化されたタンパク質-1) 因子によって作用して、T細胞の活性化を阻害することができる (Yi, K. H. ら (2009), *Immunol. Rev.* 229: 145-151)。さらに、B7-H3は、インビボでTh1、Th2又はTh17を阻害すると考えられる (Prasad, D. V. ら (2004), *J. Immunol.* 173: 2500-2506、Fukushima, A. ら (2007), *Immunol. Lett.* 113: 52-57、Yi, K. H. ら (2009), *Immunol. Rev.* 229: 145-151)。いくつかの独立した研究は、ヒト悪性腫瘍細胞がB7-H3タンパク質発現の有意な増加を示し、且つこのような増加した発現が疾患の重篤度の増加と相関することをすでに示し (Zang, X. ら (2007), *Clin. Cancer Res.* 13: 5271-5279)、腫瘍がB7-H3を免疫回避経路として利用することを示唆している (Hofmeyer, K. ら (2008), *Proc. Natl. Acad. Sci. (U. S. A.)* 105 (30): 10277-10278)。

20

30

【0118】

T細胞受容体 (例えば、CD28) へのB7分子の結合能をブロックする分子は、免疫系を阻害し、且つ自己免疫疾患の治療として提案されている (Linsley, P. S. ら (2009), *Immunolog. Rev.* 229: 307-321)。抗4Ig-B7-H3抗体で処理された、4Ig-B7-H3を発現する神経芽腫細胞は、NK細胞に対してより感受性が高い。しかしながら、4Ig-B7-H3に対して産生された報告された全ての抗体もB7-H3の二種類のIg様形態に結合するため、このような活性は、4Ig-B7-H3形態に対する抗体のみに起因するか否かが不明である (Steinberger, P. ら (2004), *J. Immunol.* 172 (4): 2352-2359及びCastriconi ら (2004), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101 (34): 12640-12645)。

40

【0119】

B7-H3は、休止B細胞又はT細胞、単球又は樹状細胞で発現しないが、樹状細胞においてIFN-γにより誘導され、且つ単球においてGM-CSFにより誘導される (Sharpe, A. H. ら (2002), *Nature Rev. Immunol.* 2: 116-126)。B7-H3に結合する受容体は、まだ完全に特徴付けられてい

50

い。初期の研究により、このような受容体の一つは、活性化された後にT細胞において迅速で瞬間的に上方制御する必要があることが示された (L o k e , P . ら (2 0 0 4) , A r t h r i t i s R e s . T h e r . 6 : 2 0 8 - 2 1 4) 。

【0120】

ヒトB7-H3は、神経芽腫細胞で発現することに加えて、様々な他の癌細胞（例えば、胃癌、卵巣癌及び非小細胞肺癌）でも発現することが知られている。B7-H3タンパク質の発現は、すでに腫瘍細胞系において免疫組織学により検出された (C h a p o v a l , A . ら (2 0 0 1) , N a t u r e I m m u n o l . 2 : 2 6 9 - 2 7 4 , S a a t i a n , B . ら (2 0 0 4) , A m e r . J . P h y s i o l . L u n g C e l l . M o l . P h y s i o l . 2 8 7 : L 2 1 7 - L 2 2 5 , C a s t r i c o n i ら (2 0 0 4) , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1 0 1 (3 4) : 1 2 6 4 0 - 1 2 6 4 5) 、 S u n , M . ら (2 0 0 2) , J . I m m u n o l . 1 6 8 : 6 2 9 4 - 6 2 9 7) 。 mRNA発現は、すでに心臓、腎臓、精巣、肺、肝臓、膵臓、前立腺、結腸及び骨芽細胞で発見された (C o l l i n s , M . ら (2 0 0 5) , G e n o m e B i o l . 6 : 2 2 3 . 1 - 2 2 3 . 7) 。 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、乳腺、胎盤及びリンパ器官から発見された (H o f m e y e r , K . ら (2 0 0 8) , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A , 1 0 5 (3 0) : 1 0 2 7 7 - 1 0 2 7 8) 。

10

【0121】

いくつかの実施例において、本開示の抗B7-H3 mAbは、ヒト以外の種からのB7-H3、又はB7-H3と構造的に関連する他のタンパク質と交差反応することができ。いくつかの実施例において、本出願の抗B7-H3 mAbは、ヒトB7-H3に対して完全に特異的であり、且つ種又は他のタイプの交差反応性を示さない。

20

【0122】

抗体親和性

抗体もしくはその抗原結合ドメインの結合特異性は、当分野の既知の方法で実験によって確定されてもよい。このような方法は、ウエスタンブロット、ELISA、RIA、ECL、IRMA、EIA、BIAcore検定ペプチド走査を含むが、それらに限らない。

【0123】

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbとB7-H3との結合の K_D は、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-6}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-7}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-8}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-11}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-10}M$ ～約 $10^{-12}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-9}M$ ～約 $10^{-11}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-8}M$ ～約 $10^{-10}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、約 $10^{-7}M$ ～約 $10^{-9}M$ 、約 $10^{-5}M$ ～約 $10^{-8}M$ 又は約 $10^{-6}M$ ～約 $10^{-8}M$ である。

30

40

【0124】

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbとB7-H3との結合の K_{on} は、約 $10^2M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^4M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^4M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^6M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^2M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^3M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^4M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^5M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^7M^{-1}s^{-1}$ 、約 $10^3M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^6M^{-1}s^{-1}$ 又は約 $10^4M^{-1}s^{-1}$ ～約 $10^6M^{-1}s^{-1}$ である。

【0125】

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbとB7-H3との結合の K_{off} は、約 $1s^{-1}$ ～約 $10^{-2}s^{-1}$ 、約 $10^{-2}s^{-1}$ ～約 $10^{-4}s^{-1}$ 、約 $10^{-4}s^{-1}$

50

～約 10^{-5} s^{-1} 、約 10^{-5} s^{-1} ～約 10^{-6} s^{-1} 、約 1 s^{-1} ～約 10^{-6} s^{-1} 、約 10^{-2} s^{-1} ～約 10^{-6} s^{-1} 、約 10^{-3} s^{-1} ～約 10^{-6} s^{-1} 、約 10^{-4} s^{-1} ～約 10^{-6} s^{-1} 、約 10^{-2} s^{-1} ～約 10^{-5} s^{-1} 又は約 10^{-3} s^{-1} ～約 10^{-5} s^{-1} である。

【0126】

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbとB7-H3発現CHO-K1細胞との結合のFACS研究では、抗B7-H3 mAbの E_{50} は10 nM未満である。いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbの EC_{50} は1 nM未満である。

【0127】

キメラ又はヒト化抗体

いくつかの実施例において、本明細書による抗B7-H3抗体はキメラ抗体である。いくつかのキメラ抗体は、例えば、米国特許第4,816,567号及びMorrisonら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)に記述されている。一例では、キメラ抗体は、非ヒト可変領域（例えば、ラマのようなラクダ科種からの可変領域）とヒト定常領域とを含む。別の例では、キメラ抗体は、「クラス転換」抗体であり、ここで、クラス又はサブクラスは、親抗体のクラス又はサブクラスに比べて変化した。キメラ抗体は、その抗原結合断片を含む。

【0128】

いくつかの実施例において、キメラ抗体はヒト化抗体である。通常、非ヒト抗体に対してヒト化を行い、ヒトに対する免疫原性を減少させると共に、親非ヒト抗体の特異性と親和性を残す。通常、ヒト化抗体は、一つ又は複数の可変ドメインを含み、ここで、HVR、例えばCDR、（又はその部分）は非ヒト抗体からのものであり、一方、FR（又はその部分）はヒト抗体配列からのものである。ヒト化抗体は、任意選択的に、ヒト定常領域の少なくとも一部をさらに含んでもよい。いくつかの実施例において、ヒト化抗体におけるいくつかのFR残基は、非ヒト抗体（例えば、HVR残基に起源する抗体）からの該当する残基によって置換され、例えば、抗体特異性又は親和性を回復又は改善する。

【0129】

ヒト化抗体及びその作製方法は、例えば、Almagro及びFransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)に概説されており、且つ例えば、Riechmannら, Nature 332:323-329 (1988)、Queenら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 86:10029-10033 (1989)、米国特許第5,821,337、7,527,791、6,982,321及び7,087,409号、Kashmiriら, Methods 36:25-34 (2005) (SDR(a-CDR)移植が記述されている)、Padlan, Mol. Immunol. 28:489-498 (1991)（「リサーフェシング」が記述されている）、Dall'Acquaら, Methods 36:43-60 (2005)（「FRシャッフリング」が記述されている）、及びOsbourneら, Methods 36:61-68 (2005)とKlimkaら, Br. J. Cancer, 83:252-260 (2000)（FRシャッフリングの「ガイド選択」方法が記述されている）という文献にさらに記述されている。

【0130】

ヒト化に使用され得るヒトフレームワーク領域は、「最適フィッティング」方法で選択されるフレームワーク領域（例えば、SimsらJ. Immunol. 151:2296 (1993)を参照されたい）と、軽鎖又は重鎖可変領域の特定サブグループのヒト抗体の共有配列からのフレームワーク領域（例えば、CarterらProc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)及びPrestara J. Immunol., 151:2623 (1993)を参照されたい）と、ヒトの成熟した（体細胞突然変異した）フレームワーク領域又はヒト生殖系列フレームワーク領域（例えば、AlmagroとFransson, Front. Biosci. 13:1619-1633 (2008)を参照されたい）と、FRライブラリーのスク

10

20

30

40

50

リーニングからのフレームワーク領域（例えば、Baccaら, J. Biol. Chem. 272: 10678-10684 (1997) 及びRosokら, J. Biol. Chem. 271: 22611-22618 (1996) を参照されたい）とを含むが、それらに限らない。

【0131】

いくつかの実施例において、mAbに対してヒト化のような修飾を行い、抗原に対するドメインの天然の親和性を弱めることなく、且つそれとともに異種の種に対するその免疫原性を低下させる。例えば、抗体重鎖及び軽鎖可変ドメイン（VH及びVL）のアミノ酸残基を確定することができ、且つ例えば、フレームワーク領域における一つ又は複数のマウスアミノ酸が、ヒト共有配列において発見されたそれらのヒト対応物で置換されるが、該ポリペプチドはその典型的な特徴を失わず、即ちヒト化は、得られたポリペプチドの抗原結合能に著しい影響を与えない。マウスモノクローナル抗体のヒト化には、二本の鎖（軽鎖及び重鎖）における限られた量のアミノ酸の導入と変異誘発及び二本の鎖の組み立ての保持が必要である。

10

【0132】

ヒト抗体

いくつかの実施例において、本明細書による抗B7-H3抗体、特にmAbは、ヒト抗体である。ヒト抗体は、当分野の既知の異なる技術を用いて産生されてもよい。ヒト抗体は、一般的には、van Dijkとvan de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol. 5: 368-74 (2001) 及びLonberg, Curr. Opin. Immunol. 20: 450-459 (2008) という文献に記述されている。完全ヒト単一ドメイン抗体を産生できるトランスジェニックマウス又はラットは、当分野の既知のものである。例えば、US 20090307787 A1、米国特許第8,754,287号、US 20150289489 A1、US 20100122358 A1、及びWO 2004049794を参照されたい。

20

【0133】

抗原攻撃に応答して、完全ヒト抗体又はヒト可変領域を有する完全抗体を生成するように修飾されたトランスジェニック動物に、免疫原を投与することによって、ヒト抗体を作製することができる。このような動物は、通常、全部又は一部のヒト免疫グロブリン遺伝子座を含有し、それらが内因性免疫グロブリン遺伝子座を置換しており、又は、染色体に存在し、又は動物の染色体にランダムに組み込まれる。このようなトランスジェニックマウスにおいて、内因性免疫グロブリン遺伝子座は、通常、不活性化されている。トランスジェニック動物からヒト抗体を得る方法の概説について、Lonberg, Nat. Biotech. 23: 1117-1125 (2005) を参照されたい。また、例えば、XENOMOUSETM 技術が記述されている米国特許第6,075,181及び6,150,584号、HuMab（商標）技術が記述されている米国特許第5,770,429号、K-M MOUSE（商標）技術が記述されている米国特許第7,041,870号、及びVELOCI MOUSE（商標）技術が記述されている米国特許出願公開番号US 2007/0061900を参照されたい。このような動物によって生成された完全抗体からのヒト可変領域は、（例えば、異なるヒト定常領域に結合することで）さらに修飾されてもよい。

30

40

【0134】

ヒト抗体は、ハイブリドーマに基づく方法で作製されてもよい。ヒトモノクローナル抗体を生成するためのヒト骨髓腫とマウス-ヒト異種骨髓腫細胞系が記述されている。（例えば、Kozbor J. Immunol., 133: 3001 (1984)、Brodeurら, Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications, ページ51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)、Boernerら, J. Immunol., 147: 86 (1991) を参照されたい）。ヒトB細胞ハイブリドーマ技術によって産生されるヒト抗体は、Liら, Proc. Nat'l.

50

Acad. Sci. USA, 103:3557-3562 (2006)にも記述されている。別の方法は、例えば、米国特許第7,189,826号(ハイブリドーマ細胞系からモノクローナルヒトIgM抗体を生産することが記述された)とNi, Xi and ai Mi any i xue, 26(4):265-268 (2006)(ヒト-ヒトハイブリドーマが記述されている)に記述されるそれらの方法を含む。ヒトハイブリドーマ技術(Trioma技術)は、VollmersとBrandlein, Histology and Histopathology, 20(3):927-937 (2005)及びVollmersとBrandlein, Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology, 27(3):185-91 (2005)にも記述されている。

10

【0135】

ヒト抗体は、ヒトファージディスプレイライブラリーから選ばれるFvクローン可変ドメイン配列を単離させることで生成されてもよい。そして、このような可変ドメイン配列を、所望のヒト定常ドメインと組み合わせてもよい。抗体ライブラリーからヒト抗体を選択する技術に関する記述は、以下のとおりである。

【0136】

ライブラリーからの抗体

本出願の抗体は、組み合わせライブラリーにおける所望の活性を有する抗体をスクリーニングすることによって単離され得る。例えば、当分野では、ファージディスプレイライブラリー、及び所望の結合特徴を有する抗体をスクリーニングするこのようなライブラリーを作成するための多くの方法が知られている。このような方法は、例えば、Hoogenboomら, Methods in Molecular Biology 178:1-37(O'Brienら編集, Human Press, Totowa, NJ, 2001)に概説されており、例えば、McCaffertyら, Nature 348:552-554、Clacksonら, Nature 352:624-628 (1991)、Marksら, J. Mol. Biol. 222:581-597 (1992)、MarksとBradbury, Methods in Molecular Biology 248:161-175(Lo編集, Human Press, Totowa, NJ, 2003)、Sidhuら, J. Mol. Biol. 338(2):299-310 (2004)、Leeら, J. Mol. Biol. 340(5):1073-1093 (2004)、Fellouse, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 101(34):12467-12472 (2004)、及びLeeら, J. Immunol. Methods 284(1-2):119-132 (2004)という文献にさらに記述されている。単ドメイン抗体ライブラリーを構築するための方法が記述されており、例えば、米国特許第7371849号を参照されたい。

20

30

【0137】

いくつかのファージディスプレイ方法において、VH及びVL遺伝子ライブラリーをポリメラーゼ連鎖反応(PCR)によりそれぞれクローニングし、ファージライブラリーにおいて、ランダムに組換えを行い、そして抗原結合ファージに対してそれをスクリーニングしてもよく、Winterら, Ann. Rev. Immunol., 12:433-455 (1994)という文献に記載のとおりである。ファージは、典型的には、単鎖Fv(scFv)断片又はFab断片の形態で抗体断片をディスプレイする。免疫源からのライブラリーは、ハイブリドーマを構築することなく、免疫原に対する高親和性抗体を提供する。代替的に、元のライブラリーを(例えば、ヒトから)クローニングして、いかなる免疫も必要とせずに、様々な非自己抗原及び自己抗原に対する単一抗体源を提供することができ、Griffithsら, EMBO J, 12:725-734 (1993)という文献に記載のとおりである。最後に、さらに、再構成されていないV遺伝子断片を幹細胞からクローニングし、ランダム配列を含有するPCRプライマーを用いて高度に可変なCDR3領域をコードし、インビトロ再構成を完了することによって元のラ

40

50

イブラリーを合成することができ、HoogenboomとWinter, J. Mol. Biol., 227: 381-388 (1992)という文献に記載のとおりである。ヒト抗体ファージライブラリーを記述する特許公開は、例えば、米国特許第5,750,373号及び米国特許公開番号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936と2009/0002360を含む。

【0138】

ヒト抗体ライブラリーから単離した抗体又は抗体断片は、本明細書において、ヒト抗体又はヒト抗体断片と考えられる。

【0139】

抗B7-H3抗体

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbを提供し、該抗B7-H3 mAbは、SEQ ID NO: 2 (DHYMH)、SEQ ID NO: 10 (GMN)、SEQ ID NO: 18 (GIN)、SEQ ID NO: 26 (DFGMN)、SEQ ID NO: 34 (NNGMN)、SEQ ID NO: 42 (NYGMN)、SEQ ID NO: 50 (DFGMN)、SEQ ID NO: 58 (DYG MN)、SEQ ID NO: 66 (NFGMN)及びSEQ ID NO: 74 (SYWMH)のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む重鎖CDR1であって、該変異体は、多くとも約3個のアミノ酸置換（例えば、約1、2又は3個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む（3個のアミノ酸残基を有するCDRについて、その変異体は多くとも約2個（例えば、1又は2個）のアミノ酸置換を含んでもよい）重鎖CDR1、SEQ ID NO: 3 (YIFPNNGVSGYNQNFKD)、SEQ ID NO: 11 (WINPYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO: 19 (WINPYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO: 27 (WINPYSGVPTYADEFKG)、SEQ ID NO: 35 (WINPYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO: 43 (WINPYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO: 51 (WLNSYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO: 59 (WINIYSGVPTYADDFKG)、SEQ ID NO: 67 (WIYTPSGVPIYADDFKG)及びSEQ ID NO: 75 (HINPNSGSTNQNAKFKN)のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む重鎖CDR2であって、該変異体は、多くとも約3個のアミノ酸置換（例えば、約1、2又は3個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む重鎖CDR2、及びSEQ ID NO: 4 (RQLGLGTMDY)、SEQ ID NO: 12 (DDGFHYTMDY)、SEQ ID NO: 20 (DDGFHYTMDY)、SEQ ID NO: 28 (DDGYHYTMDY)、SEQ ID NO: 36 (DDGYHYTMDY)、SEQ ID NO: 44 (DDGFHYTMDY)、SEQ ID NO: 52 (DDGYNYTMNY)、SEQ ID NO: 60 (DDGYHYTMNY)、SEQ ID NO: 68 (DDGYYYTMDY)及びSEQ ID NO: 76 (SGSNYRRNYFDY)のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む重鎖CDR3であって、該変異体は、多くとも約3個のアミノ酸置換（例えば、約1、2又は3個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む重鎖CDR3を有する重鎖可変ドメイン（VH）と、SEQ ID NO: 6 (RASKSVSTSGYNYMH)、SEQ ID NO: 14 (RSSQNLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO: 22 (RSSQNLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO: 30 (RSSQSLIHSNGITYLH)、SEQ ID NO: 38 (RSSQSLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO: 46 (RSSQSLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO: 54 (RSSQSLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO: 62 (RSSQSLVHSNGITYLH)、SEQ ID NO: 70 (RSSQSLVHSNGITYLH)及びSEQ ID NO: 78 (KA

10

20

30

40

50

SDHINNWL A) のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む軽鎖 CDR1 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換（例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む軽鎖 CDR1、SEQ ID NO: 7 (LASNLES)、SEQ ID NO: 15 (KVSNRFS)、SEQ ID NO: 23 (KVSNRFS)、SEQ ID NO: 31 (KVSNRFS)、SEQ ID NO: 39 (KVSHRFS)、SEQ ID NO: 47 (KVSHRFS)、SEQ ID NO: 55 (KVSNRFS)、SEQ ID NO: 63 (KVSNRFS)、SEQ ID NO: 71 (KVSNRFS) 及び SEQ ID NO: 79 (GATSLET) のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む軽鎖 CDR2 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換（例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む軽鎖 CDR2、及び SEQ ID NO: 8 (QHSKELPWT)、SEQ ID NO: 16 (SQSTLVPWT)、SEQ ID NO: 24 (SQSTLVPWT)、SEQ ID NO: 32 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO: 40 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO: 48 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO: 56 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO: 64 (SQSTHVPWT)、SEQ ID NO: 72 (SQSTHVPWT) 及び SEQ ID NO: 80 (QQYWSTPLT) のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む軽鎖 CDR3 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換（例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む軽鎖 CDR3 を有する軽鎖可変ドメイン (VL) とを含む。いくつかの実施例において、抗 B7-H3 mAb と B7-H3 との結合の K_D は、約 $10^{-5} M$ ~ 約 $10^{-12} M$ （例えば、約 $10^{-7} M$ ~ 約 $10^{-12} M$ 又は約 $10^{-8} M$ ~ 約 $10^{-12} M$ ）である。いくつかの実施例において、抗 B7-H3 抗体は、齧歯動物、キメラ、ヒト、部分ヒト化又は完全ヒト化である。

10

20

30

40

50

【0140】

いくつかの実施例において、抗 B7-H3 mAb は、VH CDR3 と VL CDR3 とを含み、該 VH CDR3 は、SEQ ID NO: 4、12、20、28、36、44、52、60、68 及び 76 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含み、該 VL CDR3 は、SEQ ID NO: 8、16、24、32、40、48、56、64、72 及び 80 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含み、且つアミノ酸置換は、VH ドメイン及び VL ドメインの CDR1 及び／又は CDR2 にある。

【0141】

そのため、いくつかの実施例において、抗 B7-H3 mAb を提供し、該抗 B7-H3 mAb は、SEQ ID NO: 2、10、18、26、34、42、50、58、66 及び 74 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む CDR1 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換（例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む CDR1 と、SEQ ID NO: 3、11、19、27、35、43、51、59、67 及び 75 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む CDR2 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換（例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む CDR2、及び SEQ ID NO: 4、12、20、28、36、44、52、60、68 及び 76 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含む CDR3 を有する重鎖可変ドメイン (VH) と、SEQ ID NO: 6、14、22、30、38、46、54、62、70 及び 78 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む CDR1 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換（例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む CDR1 と、SEQ ID NO: 7、15、23、31、39、47、55、63、71 及び 79 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含む CDR2 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換（例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含む CDR2、及び SEQ ID NO: 8、16、24、32、40、48、56、64、72 及

び80のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含むCDR3を有する軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む。いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbとB7-H3との結合の K_D は、約 $10^{-5}M$ ~約 $10^{-12}M$ (例えば、約 $10^{-7}M$ ~約 $10^{-12}M$ 又は約 $10^{-8}M$ ~約 $10^{-12}M$)又はそれ未満である。いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbは、齧歯動物、キメラ、ヒト、部分ヒト化又は完全ヒト化である。

【0142】

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbを提供し、該抗B7-H3 mAbは、SEQ ID NO: 2、10、18、26、34、42、50、58、66及び74のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含むCDR1と、SEQ ID NO: 3、11、19、27、35、43、51、59、67及び75のうちのいずれか一つのアミノ酸を含むCDR2と、及びSEQ ID NO: 4、12、20、28、36、44、52、60、68及び76のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含むCDR3を有する重鎖可変ドメイン(VH)と、SEQ ID NO: 6、14、22、30、38、46、54、62、70及び78のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含むCDR1と、SEQ ID NO: 7、15、23、31、39、47、55、63、71及び79のうちのいずれか一つのアミノ酸を含むCDR2、及びSEQ ID NO: 8、16、24、32、40、48、56、64、72及び80のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含むCDR3を有する軽鎖可変ドメイン(VL)とを含む。いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbとB7-H3との結合の K_D は、約 $10^{-5}M$ ~約 $10^{-12}M$ (例えば、約 $10^{-7}M$ ~約 $10^{-12}M$ 又は約 $10^{-8}M$ ~約 $10^{-12}M$)である。いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbは、齧歯動物、キメラ、ヒト、部分ヒト化又は完全ヒト化である。

【0143】

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbを提供し、該抗B7-H3 mAbは、1) SEQ ID NO: 2、3及び4のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 6、7及び8のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、2) SEQ ID NO: 10、11及び12のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 14、15及び16のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、3) SEQ ID NO: 18、19及び20のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 22、23及び24のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、4) SEQ ID NO: 26、27及び28のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 30、31及び32のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、5) SEQ ID NO: 34、35及び36のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 38、39及び40のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、6) SEQ ID NO: 42、43及び44のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 46、47及び48のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、7) SEQ ID NO: 50、51及び52のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 54、55及び56のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、8) SEQ ID NO: 58、59及び60のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 62、63及び64のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、9) SEQ ID NO: 66、67及び68のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、

及びSEQ ID NO: 70、71及び72のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3を含むVL、又は10) SEQ ID NO: 74、75及び76のアミノ酸配列をそれぞれ有する重鎖CDR1、CDR2及びCDR3配列を含むVH、及びSEQ ID NO: 78、79及び80のアミノ酸配列をそれぞれ有する軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3 VLを含む。

【0144】

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbを提供し、該抗B7-H3 mAbは、1) SEQ ID NO: 1のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 5のアミノ酸配列を含むVL (47F3F10B4)、2) SEQ ID NO: 9のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 13のアミノ酸配列を含むVL (12C9F1B5)、3) SEQ ID NO: 17のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 21のアミノ酸配列を含むVL (34A9C12)、4) SEQ ID NO: 25のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 29のアミノ酸配列を含むVL (38D6A4)、5) SEQ ID NO: 33のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 37のアミノ酸配列を含むVL (37D11F5B8)、6) SEQ ID NO: 41のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 45のアミノ酸配列を含むVL (37F11A10)、7) SEQ ID NO: 49のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 53のアミノ酸配列を含むVL (43H11G12)、8) SEQ ID NO: 57のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 61のアミノ酸配列を含むVL (38F11B2)、9) SEQ ID NO: 65のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 69のアミノ酸配列を含むVL (47C7E3)、又は10) SEQ ID NO: 73のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 77のアミノ酸配列を含むVL (31H11B1)を含む。

【0145】

CDRは、ペアになる様々な組み合わせ方で組み合わせて多くのヒト化抗B7-H3抗体を形成することができる。ヒト化置換は、当業者には明らかである。例えば、天然に存在するVH又はVLのFR配列を密接に関連する一つ又は複数のヒトVH又はVLの対応するFR配列と比較し、そして当分野で既知の方法（本明細書にも記載される）を用いて、一つ又は複数のこのような潜在的に有用なヒト化置換を前記VH又はVLに導入することによって、潜在的に有用なヒト化置換を同定することができる。ヒト化重鎖及び軽鎖は対合する。得られたヒト化抗体は、B7-H3結合親和性、安定性、発現の容易さ及びレベル及び／又は他の所望の特性について試験され得る。本明細書に記載の抗B7-H3 mAbは、部分又は完全ヒト化であってもよい。好ましくは、得られたヒト化抗体、例えば、ヒト化mAbもしくはその抗原結合断片は、本明細書に記載のKD、Kon、KoffでB7-H3に結合する。

【0146】

いくつかの実施例において、抗B7-H3ヒト化mAbもしくはその抗原結合断片を提供し、該抗B7-H3ヒト化mAbもしくはその抗原結合断片は、SEQ ID NO: 81～87のうちのいずれか一つのアミノ酸配列又はSEQ ID NO: 81～87のうちのいずれか一つと少なくとも約80%（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%のうちのいずれか一つ）の配列同一性を有するその変異体を含むVHドメインと、SEQ ID NO: 88～91のうちのいずれか一つのアミノ酸配列又はSEQ ID NO: 88～91のうちのいずれか一つと少なくとも約80%（例えば、少なくとも約80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%のうちのいずれか一つ）の配列同一性を有するその変異体を含むVLドメインとを含む。いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbを提供し、該抗B7-H3 mAbは、SEQ ID NO: 81～87のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含むVHドメインであって、該変異体は、該VHドメインにおいて

多くとも約3個のアミノ酸置換（例えば、約1、2又は3個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含むVHドメインと、SEQ ID NO: 88~91のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくはその変異体を含むVLドメインであって、該変異体は、該VLドメインにおいて多くとも約3個のアミノ酸置換（例えば、約1、2又は3個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含むVLドメインとを含む。いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbもしくはその抗原結合断片は、SEQ ID NO: 81~87のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を有するVHドメインの変異体であって、該変異体は、VHのCDR、例えば、CDR1及び／又はCDR2及び／又はCDR3においてアミノ酸置換を含むVHドメインの変異体と、SEQ ID NO: 88~91のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を有するVLドメインの変異体であって、該変異体は、VLのいずれか一つのCDR、例えば、CDR1及び／又はCDR2及び／又はCDR3においてアミノ酸置換を含むVLドメインの変異体とを含む。いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbもしくはその抗原結合断片は、SEQ ID NO: 81~87のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を有するVHドメインの変異体であって、該変異体は、VHのいずれか一つのFR、例えば、FR1及び／又はFR2及び／又はFR3及び／又はFR4においてアミノ酸置換を含むVHドメインの変異体と、SEQ ID NO: 88~91のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を有するVLドメインの変異体であって、該変異体は、FR、例えば、FR1及び／又はFR2及び／又はFR3及び／又はFR4においてアミノ酸置換を含むVLドメインの変異体とを含む。

10

20

【0147】

いくつかの実施例において、抗B7-H3ヒト化mAbもしくはその抗原結合断片を提供し、該抗B7-H3ヒト化mAbもしくはその抗原結合断片は、1) SEQ ID NO: 81のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 88のアミノ酸配列を含むVL(47F3F10B4-VH1-VL4)、2) SEQ ID NO: 82のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 88のアミノ酸配列を含むVL(47F3F10B4-VH2-VL4)、3) SEQ ID NO: 83のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 89のアミノ酸配列を含むVL(12C9F1B5-VH2.1-VL2)、4) SEQ ID NO: 84のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 89のアミノ酸配列を含むVL(12C9F1B5-VH4-VL2)、5) SEQ ID NO: 85のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 90のアミノ酸配列を含むVL(43H11G12-VH4-VL2)、6) SEQ ID NO: 86のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 91のアミノ酸配列を含むVL(31H11B1-VH1-VL3)、又は7) SEQ ID NO: 86のアミノ酸配列を含むVH及びSEQ ID NO: 91のアミノ酸配列を含むVL(31H11B1-VH1.1-VL3)を含む。

30

【0148】

いくつかの実施例において、本明細書に記載のいずれか一つの抗B7-H3 mAbと競合してB7-H3に特異的に結合する抗B7-H3抗体、例えば、mAb（以下では「競合的抗B7-H3抗体又は競合的抗B7-H3 mAb」と称する）もしくはその抗原結合断片を提供する。いくつかの実施例において、競合的結合は、ELISAアッセイで確定され得る。いくつかの実施例において、競合的抗B7-H3抗体及び上記抗B7-H3抗体は、B7-H3における同じエピトープに結合する。

40

【0149】

抗B7-H3 mAbを含む構築体

抗B7-H3 mAbを含む抗B7-H3構築体は、任意の可能な形態であってもよい。

【0150】

いくつかの実施例において、抗B7-H3 mAbを含む抗B7-H3構築体は、追加のポリペプチド配列、例えば、一つ又は複数の抗体部分をさらに含んでもよい。このような追加のポリペプチド配列は、抗B7-H3 mAbの（生物学的）特性を変化させることができるかもしくはできないか、又は他の方式でそれに影響を与え、且つ本明細書に記

50

載の抗 B 7-H 3 mAb に他の機能を増加させることができるか又はできない。いくつかの実施例において、追加のポリペプチド配列は、本出願の抗 B 7-H 3 mAb に一つ又は複数の所望の特性又は機能を付与する。いくつかの実施例において、抗 B 7-H 3 構築体は、細胞外抗原結合ドメインを含むキメラ抗原受容体 (CAR) であり、該細胞外抗原結合ドメインは、一つ又は複数の本明細書に記載の抗 B 7-H 3 結合部分を含む。

【0151】

いくつかの実施例において、追加のポリペプチド配列は、第 2 の抗原に特異的に認識する第 2 の抗体部分 (例えば、s dAb、s cFv) であってもよい。いくつかの実施例において、第 2 の抗原は B 7-H 3 ではない。いくつかの実施例において、第 2 の抗体部分と本明細書に記載の抗 B 7-H 3 mAb は、B 7-H 3 における同じエピトープを特異的に認識する。いくつかの実施例において、第 2 の抗体部分と本明細書に記載の抗 B 7-H 3 mAb は、B 7-H 3 における異なるエピトープを特異的に認識する。

10

【0152】

いくつかの実施例において、本明細書に記載の抗 B 7-H 3 mAb 自体に比べて、追加のポリペプチド配列は、本発明の抗 B 7-H 3 構築体の分子安定性、溶解性又は吸収を増加させ、免疫原性又は毒性を低減させ、望ましくない副作用を除去するか又は弱め、及び／又は本発明の抗 B 7-H 3 構築体に他の有利な特性を付与し、及び／又は望ましくない特性を減少させることができる。

【0153】

全長 IgG

20

いくつかの実施例において、抗 B 7-H 3 mAb は全長 IgG である。いくつかの実施例において、抗 B 7-H 3 mAb は、IgG (例えば、IgG1、IgG2、IgG3 又は IgG4 のうちのいずれか一つ) の定常領域を含む。いくつかの実施例において、該定常領域は、ヒト定常領域である。いくつかの実施例において、該定常領域は、ヒト IgG1 定常領域である。

【0154】

そのため、いくつかの実施例において、抗 B 7-H 3 全長 IgG を提供し、該抗 B 7-H 3 全長 IgG は、可変領域 (VH) が、SEQ ID NO: 2、10、18、26、34、42、50、58、66 及び 74 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくははその変異体を含む CDR1 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換 (例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ) を含む CDR1 と、SEQ ID NO: 3、11、19、27、35、43、51、59、67 及び 75 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくははその変異体を含む CDR2 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換 (例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ) を含む CDR2 と、SEQ ID NO: 4、12、20、28、36、44、52、60、68 及び 76 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくははその変異体を含む CDR3 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換 (例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ) を含む CDR3 とを含み、且つここで、該 VH が、免疫グロブリンの重鎖定常領域 (ヒンジ領域、CH1、CH2 及び CH3) と融合する重鎖と、可変領域 (VL) が、SEQ ID NO: 6、14、22、30、38、46、54、62、70 及び 78 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくははその変異体を含む CDR1 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換 (例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ) を含む CDR1 と、SEQ ID NO: 7、15、23、31、39、47、55、63、71 及び 79 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくははその変異体を含む CDR2 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換 (例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ) を含む CDR2 と、SEQ ID NO: 8、16、24、32、40、48、56、64、72 及び 80 のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくははその変異体を含む CDR3 であって、該変異体は、多くとも約 3 個のアミノ酸置換 (例えば、約 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ) を含む CDR3 とを含み、且つここで

30

40

50

、該V Lが、免疫グロブリンの軽鎖定常領域（C L）と融合する軽鎖とを含む。いくつかの実施例において、抗B 7－H 3全長I g Gを提供し、該抗B 7－H 3全長I g Gは、可変領域（V H）が、SEQ ID NO： 2、10、18、26、34、42、50、58、66及び74のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含むCD R 1と、SEQ ID NO： 3、11、19、27、35、43、51、59、67及び75のうちのいずれか一つのアミノ酸を含むCD R 2と、SEQ ID NO： 4、12、20、28、36、44、52、60、68及び76のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくははその変異体を含むCD R 3であって、該変異体は、多くとも約3個のアミノ酸置換（例えば、約1、2又は3個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含むCD R 3とを含み、且つここで、該V Hが、免疫グロブリンの重鎖定常領域（ヒンジ領域、C_H1、C_H2及びC_H3）と融合する重鎖と、可変領域（V L）が、SEQ ID NO： 6、14、22、30、38、46、54、62、70及び78のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含むCD R 1と、SEQ ID NO： 7、15、23、31、39、47、55、63、71及び79のうちのいずれか一つのアミノ酸を含むCD R 2と、SEQ ID NO： 8、16、24、32、40、48、56、64、72及び80のうちのいずれか一つのアミノ酸配列もしくははその変異体を含むCD R 3であって、該変異体は、多くとも約3個のアミノ酸置換（例えば、約1、2又は3個のアミノ酸置換のうちのいずれか一つ）を含むCD R 3とを含み、且つここで、該V Lが、免疫グロブリンの軽鎖定常領域（C L）と融合する軽鎖とを含む。いくつかの実施例において、全長抗B 7－H 3 mAbは、V HとV Lとを含み、該V Hは、SEQ ID NO： 1、9、17、25、33、41、49、57、65及び73のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含み、該V Lは、SEQ ID NO： 5、13、21、29、37、45、53、61、69及び77のうちのいずれか一つのアミノ酸配列を含む。

10

20

【0155】

いくつかの実施例において、全長抗B 7－H 3 I g GとB 7－H 3との結合のK_Dは、約10⁻⁵ M～約10⁻¹² M（例えば、約10⁻⁷ M～約10⁻¹² M又は約10⁻⁸ M～約10⁻¹² M）又はそれ未満である。いくつかの実施例において、全長抗B 7－H 3 I g Gは、齧歯動物、キメラ、ヒト、部分ヒト化又は完全ヒト化である。

【0156】

多価抗体及び／又は多重特異性抗体

30

いくつかの実施例において、抗B 7－H 3構築体は、一つ又は複数の他の抗体部分（例えば、別の抗原を特異的に認識する抗体部分）と融合する本明細書に記載の抗B 7－H 3 mAbを含む。該一つ又は複数の他の抗体部分は、任意の抗体又は抗体断片形態、例えば、sdAb、全長抗体、Fab、Fab'、(Fab')₂、Fv、単鎖Fv（scFv）、scFv－scFv、ミニボディ又はダイアボディであってもよい。いくつかの抗体断片の概説について、HudsonらNat. Med. 9：129－134（2003）を参照されたい。scFv断片の概説について、例えば、The Pharmacology of Monoclonal AntibodiesのPluckthuen, 第113巻, Rosenburg及びMoore編集, (Springer－Verlag, New York), ページ269－315（1994）を参照されたく、また、WO 93／16185及び米国特許第5, 571, 894及び5, 587, 458号を参照されたい。救済受容体結合エピトープ残基を含み、延長したインビボ半減期を有するFab及びF(ab')₂断片に関する検討は、米国特許第5, 869, 046号を参照されたい。多重特異性抗体の概説について、Weidleら, Cancer Genomics Proteomics, 10（1）：1－18, 2013、Geering及びFussenegger, Trends Biotechnol., 33（2）：65－79, 2015、Stamovaら, Antibodies, 1（2）：172－198, 2012を参照されたい。ダイアボディは、二つの抗原結合部位を有し、二価又は二重特異性であり得る抗体断片である。例えば、EP 404, 097、WO 1993／01161、Hudsonら, Nat. Med. 9：129－134（2003）及

40

50

びHollingerら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)を参照されたい。トリアボディ及びテトラボディは、Hudsonら, Nat. Med. 9: 129-134 (2003)にも記述されている。抗体断片は、複数の技術によって作製されてもよく、本明細書に記載のように、完全な抗体のタンパク質分解消化及び組換え宿主細胞（例えば、大腸菌又はファージ）の産生を含むが、それらに限らない。いくつかの実施例において、該一つ又は複数の他の抗体部分は、抗体模倣物であり、抗体を想起させる抗原結合ドメインを含む小さな操作タンパク質である（Geering及びFussenegger, Trends Biotechnol., 33(2): 65-79, 2015）。これらの分子は、従来のヒト足場タンパク質からのものであり、且つ複数のポリペプチドを含む。本明細書に記載の抗B7-H3構築体に含まれ得る例示的抗体模倣物は、設計されたアンキリン反復タンパク質（DARPin、フランクキングがN末端及びC末端Capドメインである3～5個の全合成アンキリン反復配列を含む）、アビマー（avimer、複数のAドメインを含む高親和性タンパク質であり、各ドメインは標的に対して親和性が低い）又はAnticalin（リボカリンに基づく足場、4つのアクセス可能なループを有し、各ループの配列がランダム化され得る）であってもよいが、それらに限らない。

10

20

30

40

50

【0157】

多重特異性抗体を作製するための技術は、異なる特異性を有する二つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアを組換えて発現する技術（MilsteinとCuellar, Nature 305: 537 (1983)）、WO 93/08829及びTrauneckerら, EMBO J. 10: 3655 (1991)を参照されたい）と、「ノブホール構造（knob-in-hole）」エンジニアリング（例えば、米国特許第5,731,168号）とを含むが、それらに限らない。多重特異性抗体は、また、抗体Fcヘテロ二量体分子を作製するための操作静電ステアリング効果（WO 2009/089004 A1）、二つ以上の抗体又は断片を架橋させること（例えば、米国特許第4,676,980号及びBrennanら, Science, 229: 81 (1985)）を参照されたい）、ロイシンジッパーを用いて二重特異性抗体を産生すること（例えば、Kostelnyら, J. Immunol., 148(5): 1547-1553 (1992)）を参照されたい）、二重特異性抗体断片を作製するための「ダイアボディ」技術を用いること（例えば、Hollingerら, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA, 90: 6444-6448 (1993)を参照されたい）、単鎖Fv（scFv）二量体を用いること（例えば、Gruberら, J. Immunol., 152: 5368 (1994)を参照されたい）、例えば、Tuttleら, J. Immunol., 147: 60 (1991)に記載のように三重特異性抗体を作製すること、タンデム単ドメイン抗体を含むポリペプチドを産生すること（例えば、米国特許出願番号20110028695、及びConrathら, J. Biol. Chem., 2001, 276(10): 7346-50を参照されたい）という方式で作製され得る。本明細書は、三つ又はより多くの機能的抗原結合部位を有する操作抗体をさらに含み、「タコ抗体」を含む（例えば、US 2006/0025576 A1を参照されたい）。

【0158】

ペプチドリンカー

いくつかの実施例において、抗B7-H3構築インビボの二つ又はより多くの抗体部分は、任意選択的に、ペプチドリンカーを介して連結され得る。抗B7-H3構築体に使用されるペプチドリンカーの長さ、柔軟性及び／又は他の特性は、特性に何らかの影響を与える可能性があり、これらの特性は、一つ又は複数の特定の抗原又はエピトープに対する親和性、特異性又はアビディティを含むが、それらに限らない。例えば、隣接する二つのドメインが空間的に互いに干渉しないよう確保するために、より長いペプチドリンカーを選択してもよい。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーは、柔軟な残基（例えば、グリシン及びセリン）を含み、それによって隣接するドメインは、互いに自由に移動す

る。例えば、グリシンーセリン二剤は、適切なペプチドリンカーであってもよい。

【0159】

ペプチドリンカーは、任意の適切な長さを有してもよい。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーの長さは、少なくとも約以下のうちのいずれか一つである：1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、50、75、100個又はより多くのアミノ酸。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーの長さは、約以下のうちのいずれか一つ以下である：100、75、50、40、35、30、25、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5個又はより少ないアミノ酸。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーの長さは、約1個のアミノ酸～約10個のアミノ酸、約1個のアミノ酸～約20個のアミノ酸、約1個のアミノ酸～約30個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約15個のアミノ酸、約10個のアミノ酸～約25個のアミノ酸、約5個のアミノ酸～約30個のアミノ酸、約10個のアミノ酸～約30個のアミノ酸、約30個のアミノ酸～約50個のアミノ酸、約50個のアミノ酸～約100個のアミノ酸、又は約1個のアミノ酸～約100個のアミノ酸のうちのいずれか一つである。

10

20

30

40

50

【0160】

ペプチドリンカーは、天然に存在する配列又は非天然に存在する配列を有してもよい。例えば、重鎖のみを有する抗体に由来するヒンジ領域の配列は、リンカーとして用いられてもよい。例えば、WO 1996/34103を参照されたい。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーは、突然変異したヒトIgG1ヒンジ（EPKSSDKTHTSPSP、SEQ ID NO: 95）である。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーは、柔軟なリンカーである。例示的な柔軟なリンカーは、グリシンポリマー（G）_n、グリシンーセリンポリマー（例えば、（GS）_n、（GSGGS）_n、（GGGS）_n及び（GGGGS）_nを含み、ここで、nは、少なくとも1の整数である）、グリシンーアラニンポリマー、アラニンーセリンポリマー及び当分野の既知の他の柔軟なリンカーを含む。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーは、GGGGSGGGGS（SEQ ID NO: 96）のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーは、SEQ ID NO: 97（GGGGSGGGGS）のアミノ酸配列を含む。

【0161】

二重特異性抗体

いくつかの実施例において、本出願の単離された抗体もしくはその抗原結合断片は、第2の抗体部分と融合する本明細書に記載の抗B7-H3 IgGを含む二重特異性抗体又は多重特異性抗体であり、ここで、第2の抗体部分は、別の抗原、好ましくは、別の阻害性免疫チェックポイント分子に特異的に結合する。

【0162】

一実施例において、別の抗原は、CTLA-4であり、且つ第2の抗体部分は、CTLA-4に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片、例えば、抗CTLA-4 mAb、好ましくは、抗CTLA-4 sdAbを含む。B7-H3及びCTLA-4に対する二重特異性を有する、単離された抗体もしくはその抗原結合断片は、以下では、「抗B7-H3/CTLA-4抗体」、「抗B7-H3/CTLA-4構築体」又は「B7-H3×CTLA-4抗体」と呼ばれてもよい。

【0163】

一実施例において、別の抗原は、PD-L1であり、且つ第2の抗体部分は、PD-L1に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片、例えば、抗PD-L1 mAb、好ましくは、抗PD-L1 sdAbを含む。B7-H3及びPD-L1に対する二重特異性を有する、単離された抗体もしくはその抗原結合断片は、以下では、「抗B7-H3/PD-L1抗体」、「抗B7-H3/PD-L1構築体」又は「B7-H3×PD-L1抗体」と呼ばれてもよい。

【0164】

一実施例において、別の抗原は、TIM-3であり、且つ第2の抗体部分は、TIM-3に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片、例えば、抗TIM-3 mAb、好ましくは、抗TIM-3 sdAbを含む。B7-H3及びTIM-3に対する二重特異性を有する、単離された抗体もしくはその抗原結合断片は、以下では、「抗B7-H3/TIM-3抗体」、「抗B7-H3/TIM-3構築体」又は「B7-H3×TIM-3抗体」と呼ばれてもよい。

【0165】

一実施例において、別の抗原は、LAG-3であり、且つ第2の抗体部分は、LAG-3に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片、例えば、抗LAG-3 mAb、好ましくは、抗LAG-3 sdAbを含む。B7-H3及びLAG-3に対する二重特異性を有する、単離された抗体もしくはその抗原結合断片は、以下では、「抗B7-H3/LAG-3抗体」、「抗B7-H3/LAG-3構築体」又は「B7-H3×LAG-3抗体」と呼ばれてもよい。

【0166】

CTLA-4、PD-L1、TIM-3及びLAG-3は、阻害性免疫チェックポイント分子である。

【0167】

コンジュゲート

B7-H3に対する特異性を有するヒトモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片は、当業者に既知の様々な方式を用いて、エフェクター分子又は検出可能なマーカーのような薬剤にコンジュゲートされ得る。共有結合と非共有結合の連結方法を用いてもよい。コンジュゲートは、エフェクター分子又は検出可能なマーカーが、B7-H3に特異的に結合する抗体もしくはその抗原結合断片と共有結合的に連結する分子を含むが、それに限らない。当業者であれば、化学療法剤、抗血管新生剤、毒素、放射剤（例えば、 ^{125}I 、 ^{32}P 、 ^{14}C 、 ^3H 及び ^{35}S ）及び他のタグ、標的部分とリガンドなどを含むが（それらに限らない）様々なエフェクター分子及び検出可能なマーカーを使用できることを理解するであろう。

【0168】

特定のエフェクター分子又は検出可能なマーカーの選択は、特定の標的分子又は標的細胞、及び所望の生物学的効果に依存する。そのため、例えば、エフェクター分子は、特定の標的細胞（例えば、腫瘍細胞）の死亡を引き起こすための細胞毒素であってもよい。

【0169】

エフェクター分子及び検出可能なマーカーは、当業者に既知の任意の方式を用いて、目的抗体もしくはその抗原結合断片に連結され得る。共有結合と非共有結合の連結方法を用いてもよい。エフェクター分子又は検出可能なマーカーを抗体もしくはその抗原結合断片に結合する手順は、エフェクターの化学的構造によって変化する。ポリペプチドは、通常、様々な官能基、例えば、カルボン酸（COOH）、遊離アミン（ $-\text{NH}_2$ ）又はメルカプト（ $-\text{SH}$ ）基を含有し、これらの基は、抗体における適切な官能基と反応してエフェクター分子又は検出可能なマーカーの結合を引き起こすことに用いることができる。代替的に、抗体もしくはその抗原結合断片を誘導体化して、別の反応性官能基を露出又は結合させる。誘導体化は、Pierce Chemical Company, Rockford, IL. から入手可能なもののような、様々な既知のリンカー分子のうちのいずれか一つへの結合に閏与し得る。リンカーは、抗体もしくはその抗原結合断片をエフェクター分子又は検出可能なマーカーに連結するための任意の分子であってもよい。リンカーは、抗体もしくはその抗原結合断片及びエフェクター分子又は検出可能なマーカーの両方と共有結合を形成することができる。適切なリンカーは、当業者に周知のものであり、直鎖又は分岐鎖炭素リンカー、複素環式炭素リンカー又はペプチドリナーを含むが、それらに限らない。抗体もしくはその抗原結合断片及びエフェクター分子又は検出可能なマーカーがポリペプチドである場合に、リンカーは、そのペンダント基を介して（例えば、システインとのジスルフィド結合を介して）構成アミノ酸に連結され、又は末端アミノ酸の α 炭

10

20

30

40

50

素アミノ基及びカルボキシル基に連続され得る。

【0170】

また、いくつかの実施例において、リンカーは、スペーサーエレメントを含んでもよく、存在する場合、スペーサーエレメントは、リンカーのサイズを大きくして、エフェクター分子又は検出可能なマーカーと抗体もしくはその抗原結合断片との間の距離を大きくする。例示的スペーサーは、当業者に既知のものであり、且つ米国特許第7,964,5667、498,298、6,884,869、6,323,315、6,239,104、6,034,065、5,780,588、5,665,860、5,663,149、5,635,483、5,599,902、5,554,725、5,530,097、5,521,284、5,504,191、5,410,024、5,138,036、5,076,973、4,986,988、4,978,744、4,879,278、4,816,444と4,486,414号及び米国特許公開番号20110212088と20110070248という列挙されるものに含まれ、これらの特許の各々が、全体として参照により組み込まれる。

10

【0171】

そのため、いくつかの実施例において、コンジュゲートは、エフェクター分子又は検出可能なマーカーをB7-H3特異性抗体もしくはその抗原結合断片に連結するリンカーを含む。いくつかの実施例において、リンカーは、細胞内条件下で切断可能であり、それによりリンカーの切断により、細胞内環境においてエフェクター分子又は検出可能なマーカーが抗体もしくはその抗原結合断片から放出される。他の実施例において、リンカーは切断不可能であり、且つエフェクター分子又は検出可能なマーカーは、例えば、抗体分解によって放出される。いくつかの実施例において、リンカーは、細胞内環境（例えば、リソソーム又はエンドソーム又は小窩内）に存在する切断剤により切断され得る。リンカーは、例えば、細胞内ペプチダーゼ又はプロテアーゼ（リソソームプロテアーゼ又はエンドソームプロテアーゼを含むが、それらに限らない）により切断されるペプチドリンカーであってもよい。いくつかの実施例において、ペプチドリンカーは、少なくとも二つのアミノ酸の長さ又は少なくとも三つのアミノ酸の長さである。しかしながら、リンカーは、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14又は15個のアミノ酸の長さ、例えば、1~2、1~3、2~5、3~10、3~15、1~5、1~10、1~15個のアミノ酸の長さであってもよい。プロテアーゼは、カテプシンB及びDと、プラスミンとを含んでもよく、これらのプロテアーゼは、いずれもジペプチド薬物誘導体を加水分解し、標的細胞の内部での活性薬物の放出を引き起こすことが知られている（例えば、DubowchikとWalker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123を参照されたい）。例えば、チオール依存性プロテアーゼ、即ちカテプシン-Bにより切断され得るペプチドリンカー（例えば、フェニルアラニン-ロイシン又はグリシン-フェニルアラニン-ロイシン-グリシンリンカー）を用いてもよい。このようなリンカーの他の例は、例えば、米国特許第6,214,345号に記述され、該特許が参照により本明細書に組み込まれる。一具体的な実施例において、細胞内プロテアーゼにより切断され得るペプチドリンカーは、バリニン-シトルリンリンカー又はフェニルアラニン-リジンリンカーである（例えば、米国特許第6,214,345号を参照されたく、該特許には、バリニン-シトルリンリンカーを有するドキソルビシンの合成が記述されている）。

20

30

40

【0172】

他の実施例において、切断可能なリンカーは、pH感受性であり、即ちいくつかのpH値で加水分解を受けやすい。通常、pH感受性リンカーは、酸性条件下で加水分解可能である。例えば、リソソーム中で加水分解可能な酸不安定性リンカー（例えば、ヒドラゾン、セミカルバゾン、チオセミカルバゾン、シスアコニットアミド、オルトエステル、アセタール、ケタールなど）を用いてもよい。（例えば、米国特許第5,122,368、5,824,805、5,622,929号、DubowchikとWalker, 1999, Pharm. Therapeutics 83: 67-123、Nevilleら

50

、1989、*Biol. Chem.* 264:14653-14661を参照されたい)。このようなリンカーは、血中のような中性pH条件下では比較的安定的であるが、pH 5.5又は5.0（リソソームの近似pH）より低い場合に不安定である。いくつかの実施例において、加水分解可能なリンカーは、チオエーテルリンカー（例えば、アシルヒドラゾン結合を介して治療剤に結合したチオエーテル）である（例えば、米国特許第5,622,929号を参照されたい）。

【0173】

他の実施例において、リンカー（例えば、ジスルフィドリンカー）は、還元条件下で切断可能である。当分野では、多くのジスルフィドリンカーが知られており、例えば、SATA（N-スクシンイミジル-S-アセチルチオアセテート）、SPDP（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）プロピオネート）、SPDB（N-スクシンイミジル-3-（2-ピリジルジチオ）ブチレート）及びSMPT（N-スクシンイミジールオキシカルボニル- α -メチル- α -（2-ピリジルジチオ）トルエン）-、SPDB及びSMPTを用いて形成され得るものを含む。（例えば、Thorpeら、1987、*Cancer Res.* 47:5924-5931、Wawrzynczakら、*In Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer*（C. W. Vogel編集、Oxford U. Press、1987）、Phillipsら、*Cancer Res.* 68:92809290、2008を参照されたい。また、米国特許第4,880,935号を参照されたい）。

【0174】

他の具体的な実施例において、リンカーは、マロン酸エステルリンカー（Johnsonら、1995、*Anticancer Res.* 15:1387-93）、マレイミドベンゾイルリンカー（Lauら、1995、*Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1299-1304）又は3'-N-アミド類似体である（Lauら、1995、*Bioorg-Med-Chem.* 3(10):1305-12）。

【0175】

他の実施例において、リンカーは、切断不可能であり、且つエフェクター分子又は検出可能なマーカーは、抗体分解によって放出される。（その全体として参照により本明細書に組み込まれる美国公開番号2005/0238649を参照されたい）。

【0176】

いくつかの実施例において、リンカーは、細胞外環境で切断に対して耐性を有する。例えば、コンジュゲートが細胞外環境に存在する（例えば、血漿に存在する）場合、コンジュゲート試料において、約20%以下、約15%以下、約10%以下、約5%以下、約3%以下又は約1%以下のリンカーは切断される。細胞外環境においてリンカーが切断に対して耐性があるか否かは、例えば、目的リンカーを含有するコンジュゲートを血漿とともに所定の期間（例えば、2、4、8、16又は24時間）インキュベートし、そして血漿に存在する遊離エフェクター分子又は検出可能なマーカーの量を定量することによって確定され得る。コンジュゲートに用いられ得る様々な例示的リンカーは、WO 2004-010957、米国公開番号2006/0074008、米国公開番号2005/0238649及び米国公開番号2006/0024317に記述されており、これらの各々は、その全体が参照により本明細書に組み込まれる。

【0177】

本明細書に開示される抗体もしくはその抗原結合断片は、例えば、二つ又はより多くの抗体（同じタイプ又は異なるタイプの抗体、例えば、二重特異性抗体を産生する）を架橋することによって誘導体化され得る。適切な架橋剤は、ヘテロ二官能性であり、適切なスペーサーによって隔てられた二つの明らかな反応性基を有する架橋剤（例えば、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル）又はホモ二官能性架橋剤（例えば、スベリン酸ジスクシンイミジル）を含む。このようなリンカーは市販されている。

【0178】

多数の放射性診断用化合物、放射性治療用化合物、タグ（例えば、酵素又は蛍光分子）、毒素、及び他の薬剤を抗体に結合させるための多くの方法が報告されたことを考慮すると、当業者は、所定の薬剤を抗体もしくはその抗原結合断片又は他のポリペプチドに結合させるための適切な方法を確定することができる。例えば、抗体もしくはその抗原結合断片は、モノメチルアウリスタチンE（MMAE）、モノメチルアウリスタチンF（MMAF）、メイタンシン（maytansine）、メイタンシン誘導体（DM1と称されるメイタンシン誘導体（メルタンシン（mertansine）とも呼ばれる）を含む）もしくはその他化学療法剤のような低分子量薬物とコンジュゲートして、抗体薬物コンジュゲート（ADC）を製造することができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の様々な化学療法剤は、提供される抗体とコンジュゲートしてコンジュゲートを生成することができる。

10

【0179】

いくつかの実施例において、抗体もしくはその抗原結合断片と、一つ又は複数の低分子毒素とのコンジュゲートを提供し、これらの低分子毒素は、例えば、カリケアミシン、メイタンシノイド、ドラスタチン（dolastatin）、アウリスタチン、トリコテセン（trichothecene）及びCC1065、並びにこれらの毒素の毒素活性を有する誘導体である。

【0180】

メイタンシノイド毒素部分としての使用に適したメイタンシン化合物は、市販されており、且つ既知の方法に従って天然の供給源から単離し、遺伝子工学的技術で産生するか（Yuら（2002）PNAS 99：7968-7973を参照されたい）、又は既知の方法に従って合成して、メイタンシノール（maytansinol）及びメイタンシノール類似体を製造することができる。メイタンシノイドは、チューブリン重合を阻害することにより作用する有糸分裂阻害剤である。メイタンシンは、東アフリカの低木、即ちメイテナスセラタ（Maytenus serrata）から初めて単離される（米国特許第3,896,111号）。その後、いくつかの微生物もメイタンシノール及びC-3メイタンシノールエステルのようなメイタンシノイドを生成することが発見された（米国特許第4,151,042号）。合成されたメイタンシノール及びその誘導体と類似体は、例えば、米国特許第4,137,230、4,248,870、4,256,746、4,260,608、4,265,814、4,294,757、4,307,016、4,308,268、4,308,269、4,309,428、4,313,946、4,315,929、4,317,821、4,322,348、4,331,598、4,361,650、4,364,866、4,424,219、4,450,254、4,362,663及び4,371,533号に開示され、これらの特許の各々が、参照により組み込まれる。メイタンシノイドを含有するコンジュゲートであって、これらのコンジュゲートの製造方法及びそれらの治療用途は、例えば、米国特許第5,208,020、5,416,064、6,441,163号及び欧州特許EP 0 425 235 B1に開示され、これらの特許の開示内容は、参照により明示的に組み込まれる。

20

30

【0181】

抗B7-H3抗体変異体

いくつかの実施例において、本明細書による抗体のアミノ酸配列変異体を考慮した。例えば、抗体の結合親和性及び／又は他の生物学的特性を改善することが望ましい場合がある。抗体のアミノ酸配列変異体は、抗体をコードする核酸配列に適切な修飾を導入すること又はペプチド合成によって作製され得る。このような修飾は、例えば、抗体のアミノ酸配列内の残基の欠失及び／又は挿入及び／又は置換を含む。欠失、挿入及び置換の任意の組み合わせを行うことによって最終的な構築体を得ることができ、その条件として、最終的な構築体は、所望の特徴、例えば、抗原結合性を有する。

40

【0182】

a) 置換、挿入、欠失及び変異体

50

いくつかの実施例において、一つ又は複数のアミノ酸の置換を有する抗体変異体を提供した。置換変異誘発の目的部位は、HVRとFRとを含む。保存的置換は、タイトルが「好ましい置換」である表3に示されている。タイトルが「例示的置換」である表3では、より実質的な変化が提供され、且つ以下では、アミノ酸側鎖クラスを参照しながら、さらに記述される。アミノ酸の置換は、目的抗体に導入され、所望の活性（例えば、保持／改善した抗原結合、低下した免疫原性、又は改善したADCC又はCDC）に対して、生成物をスクリーニングすることができる。

【0183】

【表3】

表3. アミノ酸の置換

元の残基	例示的な置換	好ましい置換
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Asp, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn, Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, ノルロイシン	Leu
Leu (L)	ノルロイシン, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Trp, Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val, Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, ノルロイシン	Leu

【0184】

アミノ酸は、共通の側鎖特性に応じてグループ分けすることができる。

【0185】

- (1) 疎水性：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、Ile、
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln、
- (3) 酸性：Asp、Glu、
- (4) 塩基性：His、Lys、Arg、
- (5) 鎖配向に影響する残基：Gly、Pro、
- (6) 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

【0186】

非保存的置換は、これらのクラスにおける一つのメンバーを別のクラスに交換する必要がある。

【0187】

置換変異体の一つのタイプは、親抗体（例えば、ヒト化又はヒト抗体）の一つ又は複数の高可変領域残基の置換に係る。通常、更なる研究に用いられる、得られた変異体を選択し、親抗体に対して、いくつかの生物学的特性（例えば、増加した親和性、低下した免疫原性）で修飾（例えば、改善）し、及び／又は、親抗体のいくつかの生物学的特性を実質的に保持する。例示的な置換変異体は、親和性が成熟した抗体であり、該抗体は、容易に生成することができ、例えば、ファージディスプレイに基づく、親和性が成熟した技術（

例えば、本明細書に記載のもの）を用いる。簡単に説明すると、一つ又は複数のHVR残基は突然変異し、且つ変異体抗体は、ファージにディスプレイし、特定の生物学的活性（例えば、結合親和性）に対してスクリーニングを行う。

【0188】

HVRにおいて、改変（例えば、置換）を行って、例えば、抗体の親和性を向上させることができる。このような改変は、HVR「ホットポイント」、即ち体細胞成熟中に高頻度で突然変異したコドンによってコードされる残基（例えば、Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008)を参照されたい）及び／又はSDR（a-CDR）において行うことができ、ここで、得られた変異体VH又はVLの結合親和性を試験する。例えば、Hoogenboomらは、Methods in Molecular Biology 178:1-37において、二次ライブラリーからの構築及び再選択による親和性成熟をすでに記述した（O'Brienら編集, Human Press, Totowa, NJ, (2001)）。親和性成熟のいくつかの実施例において、様々な方法（例えば、エラープローンPCR、鎖シャッフリング、又はオリゴヌクレオチド特異的突然変異誘発）のうちのいずれか一つは、多様性を、成熟のために選択された可変遺伝子に導入する。そして、二次ライブラリーを作成する。そして、ライブラリーをスクリーニングし、所望の親和性を有する任意の抗体変異体を同定する。多様性を導入する別の方法は、HVR配向方法に関し、ここで、若干のHVR残基（例えば、一度に4～6個の残基）をランダム化する。抗原結合に関与するHVR残基を特異的に同定することができ、例えば、アラニンスキャニング変異誘発又はモデル化を用いる。特に、CDR-H3及びCDR-L3は、常に標的となる。

10

20

【0189】

いくつかの実施例において、このような改変が抗原に結合する抗体の能力を実質的に低下させない限り、置換、挿入又は欠失は、一つ又はそれ以上のHVR内に発生してもよい。例えば、HVRにおいて、結合親和性を著しく低下させない保存的改変（例えば、本明細書による保存的置換）を行ってもよい。このような改変は、HVR「ホットポイント」又はCDR外にある可能性がある。提供された上記変異体VHH配列のいくつかの実施例において、各HVRは、改変されていないものであるか又は一つ、二つ又は三つ以下のアミノ酸置換を含有するものである。

【0190】

CunninghamとWells (1989) Science, 244:1081-1085に記載のように、標的変異誘発を行うことができる抗体の残基又は領域を同定するための有用な方法は、「アラニンスキャニング変異誘発」と呼ばれる。この方法において、標的残基の残基又は残基群（例えば、Arg、Asp、His、Lys及びGluのような荷電残基）を同定し、中性又は負に荷電したアミノ酸（例えば、アラニン又はポリアラニン）を用いて置換を行うことで、抗体と抗原の相互作用が影響を受けたか否かを確定する。アミノ酸の位置に別の置換を導入することで、初期置換に対する機能的感受性を実証することができる。代替的に又は付加的に、抗原-抗体複合体の結晶構造は、抗体と抗原との接触点を同定するためのものである。このような接触残基と隣接残基は、置換候補として標的化又は排除されてもよい。変異体は、所望の特性を含むか否かを確定するためにスクリーニングされてもよい。

30

40

【0191】

アミノ酸配列の挿入は、長さが一つの残基から百個又はそれ以上の残基を含むポリペプチドの範囲内にあるアミノ末端及び／又はカルボキシ末端の融合と、単一又は複数のアミノ酸残基の配列内挿入とを含む。末端挿入の例として、N末端メチオニル残基を有する抗体が挙げられる。抗体分子の他の挿入変異体は、抗体のN末端又はC末端と、該抗体の血清半減期を延長する酵素（例えば、ADEPTの場合）又はポリペプチドとの融合を含む。

【0192】

b) グリコシル化変異体

50

いくつかの実施例において、本明細書による抗B7-H3構築体を改変して、構築体のグリコシル化程度を増加又は減少させる。抗体へのグリコシル化部位の付加又は欠失は、アミノ酸配列を改変して一つ又は複数のグリコシル化部位を産生又は除去することで、容易に実現可能である。

【0193】

抗B7-H3構築体がFc領域を含む場合、それに結合する炭水化物を改変してもよい。哺乳動物細胞から産生された天然抗体は、通常、分岐型バイ接触角オリゴ糖を含み、それは、通常、N-結合を介してFc領域CH2ドメインのAsn297に結合する。例えば、Wrightら TIBTECH 15:26-32 (1997) を参照されたい。オリゴ糖は、様々な炭水化物、例えば、マンノース、N-アセチルグルコサミン (GlcNAc)、ガラクトースとびシアル酸、及びバイ接触角オリゴ糖構造の「ステム」においてGlcNAcに結合するフコースを含んでもよい。いくつかの実施例において、本出願の抗B7-H3構築体におけるオリゴ糖に対して修飾を行って、いくつかの改善した特性を有する抗体変異体を生成することができる。

【0194】

いくつかの実施例において、炭水化物構造を有する抗体変異体を提供し、該炭水化物構造は、(直接又は間接に) Fc領域に結合したフコースを欠く。例えば、このような抗体におけるフコースの含有量は、1%~80%、1%~65%、5%~65%又は20%~40%であってもよい。フコースの量は、MALDI-TOF質量分析法により測定されたAsn297に結合した全ての糖構造(例えば、複合体化、ハイブリッド及び高マンノース構造)の合計に対するAsn297糖鎖におけるフコースの平均量を計算することにより決定され、例えば、WO 2008/077546に記載のとおりである。Asn297は、Fc領域中の約297(Fc領域残基のEU番号)に位置するアスパラギン残基を指し、しかしながら、抗体における微小な配列変化のため、Asn297は、位置297の上流又は下流約±3個のアミノ酸、即ち位置294~300に位置する場合もある。このようなフコシル化変異体は、改善したADCC機能を有してもよい。例えば、米国特許公開番号US 2003/0157108 (Presta, L.)、US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd) を参照されたい。「脱フコシル化」又は「フコース欠損型」抗体変異体に関わる刊行物の例としては、US 2003/0157108、WO 2000/61739、WO 2001/29246、US 2003/0115614、US 2002/0164328、US 2004/0093621、US 2004/0132140、US 2004/0110704、US 2004/0110282、US 2004/0109865、WO 2003/085119、WO 2003/084570、WO 2005/035586、WO 2005/035778、WO 2005/053742、WO 2002/031140、Okazakiら J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004)、Yamane-Ohnukiら Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004) が挙げられる。脱フコシル化抗体を産生できる細胞系の例としては、タンパク質フコシル化作用欠損型 Lec13 CHO細胞 (Ripkaら Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986)、米国特許出願番号US 2003/0157108 A1, Presta, L、及びWO 2004/056312 A1, Adamsら、特に例11)、及びノックアウト細胞系、例えば、 α -1, 6-フコシルトランスフェラーゼ遺伝子 FUT8、ノックアウトCHO細胞が挙げられる(例えば、Yamane-Ohnukiら Biotech. Bioeng. 87: 614 (2004)、Kanda, Y.ら, Biotechnol. Bioeng., 94(4):680-688 (2006)、及びWO 2003/085107を参照されたい)。

【0195】

抗B7-H3構築体変異体はさらに、等分されるオリゴ糖を有し、例えば、ここで、抗体Fc領域に結合するバイ接触角オリゴ糖をGlcNAcにより等分する。このような抗

体変異体は、減少したフコシル化及び／又は改善したADCC機能を有してもよい。このような抗体変異体の例は、例えば、WO 2003/011878 (Jean-Mairetら)、米国特許第6,602,684号 (Umanaら)、及びUS 2005/0123546 (Umanaら)に記述されている。オリゴ糖においてFc領域に結合する少なくとも一つのガラクトース残基を有する抗体変異体をさらに提供する。このような抗体変異体は、改善したCDC機能を有してもよい。このような抗体変異体は、例えば、WO 1997/30087 (Patelら)、WO 1998/58964 (Raju, S.)、及びWO 1999/22764 (Raju, S.)に記述されている。

【0196】

c) Fc領域変異体

いくつかの実施例において、一つ又は複数のアミノ酸修飾を本明細書による抗B7-H3構築体のFc領域内に導入することによって、Fc領域変異体を生成することができる。Fc領域変異体は、ヒトFc領域配列 (例えば、ヒトIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4 Fc領域) を含んでもよく、該配列は、一つ又は複数のアミノ酸位置にあるアミノ酸修飾 (例えば、置換) を含む。

【0197】

いくつかの実施例において、本出願は、抗B7-H3構築体変異体を考慮し、該変異体は、全てではなく、一部のエフェクター機能を有し、このような機能により、該変異体は、応用に適する理想的な候補物になり、これらの応用において、抗B7-H3構築体のインビボ半減期が重要であるが、いくつかのエフェクター機能 (例えば、補体及びADCC) は、必要でないか又は有害である。インビトロ及び／又はインビボでの細胞毒性アッセイを実施することによって、CDC及び／又はADCC活性の減少／枯渇を確認することができる。例えば、Fc受容体 (FcR) 結合アッセイを行うことにより、抗体がFcγR結合能を有しない (したがってADCC活性を欠く可能性がある) が、FcRn結合能を保持できることを保証することができる。ADCCを媒介するための初代細胞NK細胞は、FcγRIIIのみを発現するが、単核細胞は、FcγRI、FcγRII、及びFcγRIIIを発現する。造血細胞でのFcR発現は、Ravetch及びKinet、Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991)のページ464の表3にまとめられている。目的分子のADCC活性を評価するインビトロアッセイの非限定的例は、米国特許第5,500,362号 (例えば、Hellstrom, I.らProc. Nat'l Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) 及びHellstrom, I.ら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985)を参照されたい)、5,821,337 (Bruggemann, M.ら, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)を参照されたい)に記述されている。代替的に、非放射性アッセイ方法 (例えば、フローサイトメリーののためのACTITM非放射性細胞傷害性アッセイ (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA、及びCytotox 96 (商標) 非放射性細胞傷害性アッセイ (Promega, Madison, WI)を参照されたい)もよい。このようなアッセイに有用なエフェクター細胞は、末梢血単核細胞 (PBMC) と、ナチュラルキラー (NK) 細胞とを含む。代替的に又は付加的に、例えば、Clynesら, Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998)に開示される動物モデルのような動物モデルにおいて、インビボで目的分子のADCC活性を評価することができる。C1q結合アッセイを行うことにより、抗体がC1qに結合できず、且つそのためCDC活性を欠くことを確認することができる。例えば、WO 2006/029879及びWO 2005/100402におけるC1qとC3cとの結合のELISAを参照されたい。補体活性化を評価するために、CDCアッセイを行ってもよい (例えば、Gazano-Santoroら, J. Immunol. Methods 202:163 (1996)、Cragg, M. S.ら, Blood 101:1045-1052 (2003)、及びCragg, M. S.とM. J. Glennie, Blood 1

10

20

30

40

50

03:2738-2743 (2004)を参照されたい)。当分野の既知の方法で、FcRn結合とインビボクリアランス／半減期アッセイを行ってもよい(例えば、Petkova, S. B.ら, Int'l. Immunol. 18(12):1759-1769 (2006)を参照されたい)。

【0198】

低下したエフェクター機能を有する抗体は、Fc領域残基238、265、269、270、297、327及び329のうちの一つ又は複数に対する置換を有する抗体を含む(米国特許第6,737,056号)。このようなFc突然変異体は、アミノ酸位置265、269、270、297及び327における二つ又はより多くのものを置換するFc突然変異体を含み、残基265及び297がアラニン置換される、「DANA」と称されるFc突然変異体を含む(米国特許第7,332,581号)。

10

【0199】

FcRへの結合性が向上又は低下したいくつかの抗体変異体が記述されている。(例えば、米国特許第6,737,056号、WO 2004/056312、及びShieldsら, J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001)を参照されたい)。

【0200】

いくつかの実施例において、抗B7-H3構築体変異体は、一つ又は複数のアミノ酸置換を有するFc領域を含み、これらの置換(例えば、Fc領域内の位置298、333及び／又は334にある置換(残基のEU番号))はADCCを改善する。

20

【0201】

いくつかの実施例において、Fc領域内に改変が発生することによって、C1q結合及び／又は補体依存性細胞傷害(CDC)の改変(即ち、向上又は低減)を引き起こし、例えば、米国特許第6,194,551号、WO 99/51642及びIdusogieら, J. Immunol. 164:4178-4184 (2000)に記述されるとおりである。

【0202】

いくつかの実施例において、変異体Fc領域を含む抗B7-H3構築体(例えば、HCAb)変異体を提供し、該変異体Fc領域は、半減期を延長し、及び／又は新生児Fc受容体(FcRn)との結合を改善する一つ又は複数のアミノ酸置換を含む。延長した半減期及び新生児Fc受容体(FcRn)との改善した結合を有する抗体は、母体IgGの胎児への転移を担い(Guyerら, J. Immunol. 117:587 (1976)及びKimら, J. Immunol. 24:249 (1994))、US 2005/0014934 A1(Hintonら)に記述されている。それらの抗体は、一つ又は複数の置換を有するFc領域を含み、これらの置換は、Fc領域とFcRnとの結合を改善した。このようなFc変異体は、238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424又は434というFc領域残基のうちの一つ又は複数の残基に置換、例えば、Fc領域残基434の置換を有するものを含む(米国特許第7,371,826号)。

40

【0203】

また、Duncan & Winter, Nature 322:738-40 (1988)、米国特許第5,648,260号、米国特許第5,624,821号、及びFc領域変異体の他の例に関わるWO 94/29351を参照されたい。

【0204】

本明細書に記載の任意のFc変異体もしくはその組み合わせた抗B7-H3構築体(例えば、全長IgG又はsdAbに融合した抗B7-H3 IgG)を考慮した。

【0205】

いくつかの実施例において、定常領域は、ヒトIgG1定常領域である。いくつかの実施例において、重鎖定常領域は、ADCC効果を増強する修飾を含む。いくつかの実施例

50

において、重鎖定常領域は、突然変異 K 2 1 4 R、L 2 3 5 V、F 2 4 3 L、R 2 9 2 P、Y 3 0 0 L、D 3 5 6 E、L 3 5 8 M 及び P 3 9 6 L を含む。いくつかの実施例において、重鎖定常領域は、S E Q I D N O : 9 3 又は 9 4 のアミノ酸配列を含む。いくつかの実施例において、軽鎖定常領域は、S E Q I D N O : 9 2 のアミノ酸配列を含む。

【0206】

d) システイン操作抗体の変異体

いくつかの実施例において、システイン操作抗 B 7 - H 3 構築体、例えば、「チオ M A b」の産生が望ましい場合があり、ここで、抗体の一つ又は複数の残基がシステイン残基で置換される。特定の実施例において、置換された残基は、抗体のアクセス可能な部位に存在する。システインを用いてそれらの残基を置換することで、反応性チオール基は、抗体のアクセス可能な部位に位置し、本明細書にさらに記載されるように、他の部分、例えば、薬物部分又はリンカー-薬物部分と抗体をコンジュゲートして、免疫コンジュゲートを産生するために用いられてもよい。いくつかの実施例において、重鎖の A 1 1 8 (E U 番号)、及び重鎖 F c 領域の S 4 0 0 (E U 番号) という残基のうちの任意の一つ又は複数の残基は、システインで置換されてもよい。システイン操作抗 B 7 - H 3 構築体は、例えば、米国特許第 7, 5 2 1, 5 4 1 号に記載のように生成され得る。

【0207】

e) 抗体誘導体

いくつかの実施例において、本明細書による抗 B 7 - H 3 構築体は、当分野で既知であり、容易に入手できる他の非タンパク質部分を含有するために、さらに修飾されてもよい。抗体誘導体化に適した部分は、水溶性ポリマーを含むが、それに限らない。水溶性ポリマーの非限定的な例は、ポリエチレングリコール (P E G)、エチレングリコール／プロピレングリコール共重合体、カルボキシメチルセルロース、デキストラン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、ポリ-1, 3-ジオキソラン、ポリ-1, 3, 6-トリオキサン、エチレン／無水マレイン酸共重合体、ポリアミノ酸 (ホモポリマー又はランダムコポリマー) とデキストラン又はポリ (n-ビニルピロリドン) ポリエチレングリコール、プロピレングリコールホモポリマー、プロピレンオキシド／エチレンオキシドコポリマー、ポリオキシエチル化ポリオール (例えば、グリセロール)、ポリビニルアルコール及びそれらの混合物を含むが、それらに限らない。ポリエチレングリコールプロピオンアルデヒドは、水中での安定性のために製造において優位性を有する可能性がある。ポリマーは、任意の分子量を有してもよく、且つ分岐状又は非分岐状であってもよい。抗体に結合するポリマーの数は変わってもよく、且つ結合するポリマーが一種よりも多い場合、それらは、同じ又は異なる分子であってもよい。一般的には、誘導体化に用いられるポリマーの数及び／又はタイプは、以下の考慮要因に基づいて確定されてもよく、それらの要因は、改善されるべき抗体の特定の特性又は機能、抗体誘導体を条件が確定された療法に用いるか否かなどを含むが、それらに限らない。

【0208】

いくつかの実施例において、抗 B 7 - H 3 構築体と非タンパク質とのコンジュゲートを提供し、該非タンパク質部分は、放射線への曝露によって選択的に加熱され得る。いくつかの実施例において、非タンパク質部分は、カーボンナノチューブである (K a m r a, P r o c. N a t ' l. A c a d. S c i. U S A 1 0 2 : 1 1 6 0 0 - 1 1 6 0 5 (2 0 0 5))。放射線は、任意の波長を有してもよく、通常の細胞に害を及ぼさないが、抗体-非タンパク質部分に隣接する細胞が殺傷される温度まで非タンパク質部分を加熱する波長を含むが、それらに限らない。

【0209】

いくつかの実施例において、本明細書による抗 B 7 - H 3 構築体 (例えば、抗 B 7 - H 3 I g G、抗 B 7 - H 3 / C T L A - 4 二重特異性抗体、抗 B 7 - H 3 / P D - L 1 二重特異性抗体、抗 B 7 - H 3 / T I M - 3 二重特異性抗体又は抗 B 7 - H 3 / L A G - 3 二重特異性抗体) は、一つ又は複数の生物学的に活性なタンパク質、ポリペプチドもしくは

はその断片を含有するようにさらに修飾されてもよい。本明細書で使用されるように「生物学的に活性な」又は「生物学的活性を有する」は、特定の機能を果たす生物学活性がインビボで示されることを指す。例えば、それは、特定の生体分子（例えば、タンパク質、DNAなど）に結合し、そしてこのような生体分子の活性を促進又は阻害することを意味することができる。いくつかの実施例において、生物学的に活性なタンパク質もしくはその断片は、免疫刺激活性／免疫調節活性、膜輸送活性又は酵素活性を有する。

【0210】

いくつかの実施例において、本明細書に記載の抗B7-H3構築体と融合できる生物学的に活性なタンパク質もしくはその断片は、特異性細胞受容体と相互作用するリンフォカイン及びサイトカインのようなリガンドである。リンフォカインは、抗原又はレクチンがT細胞の成長を刺激する場合にT細胞から分泌される低分子量タンパク質である。リンフォカインの例は、インターフェロン- α 、インターフェロン- γ 、インターロイキン-1（IL-1）、インターロイキン-2（IL-2）、インターロイキン-3（IL-3）、腫瘍壊死因子（TNF）、コロニー刺激因子（例えば、CSF-1、G-CSF又はGM-CSF）、ケモカイン、マクロファージ遊走阻止因子（MIF）、マクロファージ活性化因子（MAF）、NK細胞活性化因子、T細胞置換因子、白血球阻害因子（LIF）、リンホトキシン、破骨細胞活性化因子（OAF）、可溶性免疫応答阻害剤（SIRS）、成長刺激因子、標的成長因子などを含むが、それらに限らない。本発明の抗B7-H3融合タンパク質に取り込まれ得るサイトカインは、腫瘍壊死因子 α （TNF α ）、インターフェロン（IFN）及び神経成長因子（NGF）などを含むが、それらに限らない。

【0211】

III. 医薬組成物

本出願は、医薬組成物をさらに提供し、これらの医薬組成物は、抗B7-H3構築体（例えば、抗B7-H3 IgG、全長抗B7-H3 IgG、抗B7-H3／CTLA-4二重特異性抗体、抗B7-H3／PD-L1二重特異性抗体、抗B7-H3／TIM-3二重特異性抗体又は抗B7-H3／LAG-3二重特異性抗体）のうちのいずれか一つと任意選択的な薬学的に許容されるキャリア剤とを含む。医薬組成物は、本明細書に記載の、所望の純度を有する抗B7-H3構築体を任意選択的な薬学的に許容されるキャリア剤、賦形剤又は安定剤と混合することによって製造することができ（Remington's Pharmaceutical Sciences 第16th版, Osol, A. Ed. (1980)）、凍結乾燥製剤又は水溶液の形態を示す。

【0212】

医薬組成物は、好ましくは、安定的であり、ここで、本明細書に記載の抗B7-H3 mAbを含む抗B7-H3構築体は、保存時にその物理的及び化学的安定性並びに完全性を実質的に保持する。タンパク質の安定性を測定するための様々な分析技術は、当分野で入手可能であり、且つPeptide and Protein Drug Delivery, 247-301, Vincent Lee編集, Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y., Pubs. (1991)及びJones, A. Adv. Drug Delivery Rev. 10: 29-90 (1993)に概説されている。安定性は、選択された温度で選択された期間にわたって測定される。迅速なスクリーニングのために、製剤を40℃で2週間から1ヶ月保持してもよく、その場合に安定性を測定する。製剤が2～8℃で保存される場合、通常、製剤は、30℃又は40℃で少なくとも1ヶ月、及び／又は2～8℃で少なくとも2年間安定化すべきである。製剤が30℃で保存される場合、通常、製剤は、30℃で少なくとも2年、及び／又は40℃で少なくとも6ヶ月間安定化すべきである。例えば、保存期間の凝集程度は、タンパク質の安定性の指標として用いられ得る。いくつかの実施例において、本明細書に記載の抗B7-H3構築体の安定的な製剤は、凝集体として製剤に存在する約10%未満（好ましくは、約5%未満）の抗B7-H3構築体を含んでもよい。

【0213】

許容可能なキャリア剤、賦形剤又は安定剤は、用いられる用量及び濃度でレシピエント

にとって非毒性であり、且つ緩衝剤と、アスコルビン酸、メチオニン、ビタミンE、メタ重亜硫酸ナトリウムを含む酸化防止剤と、防腐剤、等張剤（例えば、塩化ナトリウム）、安定剤、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）と、EDTAのようなキレート剤及び／又は非イオン性界面活性剤とを含む。

【0214】

生理学的許容可能なキャリア剤の例は、リン酸塩、クエン酸塩及び他の有機酸のような緩衝剤、アスコルビン酸とメチオニン酸とを含む酸化防止剤、防腐剤（例えば、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム、塩化ヘキサメトニウム、塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム、フェノール、ブタノール又はベンジルアルコール、メチルパラベン又はプロピルパラベンのようなアルキルパラベン類、カテコール、レソルシノール、シクロヘキサノール、3-ペンタノール、及びm-クレゾール）、低分子量（約10個の残基未満）ポリペプチド、血清アルブミン、ゼラチン又は免疫グロブリンのようなタンパク質、ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー、グリシン、グルタミン、アスパラギン、アルギニン、又はリジンのようなアミノ酸、グルコース、マンノース又はデキストリンを含む単糖類、二糖類及び他の炭水化物、EDTAのようなキレート剤、スクロース、マンニトール、トレハロース、又はソルビトールのような糖、ナトリウムイオンのような塩形成対イオン、金属錯体（例えば、Zn-タンパク質錯体）、及び／又はTWEENTM、ポリエチレングリコール（PEG）及びPLURONICSTM又はポリエチレングリコール（PEG）のような非イオン性界面活性剤を含む。

【0215】

緩衝剤は、特に安定性がpH依存性である場合、治療有効性を最適化する範囲内にpHを制御するためのものである。緩衝剤は、好ましくは、約50mM～約250mMの濃度で存在する。本出願に適した緩衝剤は、有機酸、無機酸及びそれらの塩を含む。例えば、クエン酸塩、リン酸塩、コハク酸塩、酒石酸塩、フマル酸塩、グルコン酸塩、シュウ酸塩、乳酸塩、酢酸塩である。また、緩衝剤は、ヒスチジン塩及びトリメチルアミン塩、例えば、Trisを含んでもよい。

【0216】

防腐剤は、微生物の成長を遅延させるために加えられ、且つ防腐剤は、通常、0.2%～1.0%（w/v）の範囲で存在する。防腐剤の添加は、例えば、複数回使用（複数回用量）製剤の製造を促進することができる。本出願に適した防腐剤は、塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウムと、塩化ヘキサメトニウムと、ハロゲン化ベンザルコニウム（例えば、塩化ベンザルコニウム、臭化ベンザルコニウム、ヨウ化ベンザルコニウム）、塩化ベンゼトニウムと、チメロサル、フェノール、ブタノール又はベンジルアルコールと、メチルパラベン又はプロピルパラベンのようなアルキルパラベン類と、カテコールと、レソルシノールと、シクロヘキサノール、3-ペンタノール及びm-クレゾールとを含む。

【0217】

等張化剤（「安定剤」と呼ばれることもある）は、組成物における液体の張力を調節又は維持するために存在してもよい。タンパク質及び抗体のような大きな荷電生体分子と共に使用される場合、それらは、アミノ酸側鎖の荷電基と相互作用することによって分子間及び分子内相互作用の可能性を低下させることができるため、多くの場合に「安定剤」と呼ばれる。他の成分の相対量を考慮して、等張化剤は、0.1重量%～25重量%、好ましくは、1重量%～5重量%の任意の量で存在することができる。好ましい等張化剤は、ポリヒドロキシ糖アルコールを含み、好ましくは、トリヒドロキシ以上の糖アルコールであり、例えば、グリセリン、エリスリトール、アラビトール、キシリトール、ソルビトール及びマンニトールである。

【0218】

さらなる賦形剤は、（1）充填剤、（2）溶解度促進剤、（3）安定剤、（4）変性又は容器壁への粘着を防止する薬剤のうちの一つ又は複数として用いられ得る薬剤を含む。このような賦形剤は、ポリヒドロキシ糖アルコール（上記に列挙した）と、アラニン

、グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、リジン、オルニチン、ロイシン、２－フェニルアラニン、グルタミン酸、スレオニンなどのようなアミノ酸と、スクロース、ラクトース、ラクチトール、トレハロース、スタキオース、マンノース、ソルボース、キシロース、リボース、リビトール、ミオイニシトース (myoinisitolose)、ミオイノシトール (myoinisitol)、ガラクトース、ガラクトール、グリセロール、シクリトール (例えば、イノシトール (inositol))、ポリエチレングリコールのような有機糖又は糖アルコールと、尿素、グルタチオン、チオクト酸、チオグリコール酸ナトリウム、チオグリセロール、 α －モノチオグリセロール及びチオ硫酸ナトリウムのような含硫還元剤と、ヒト血清アルブミン、ウシ血清アルブミン、ゼラチン又は他の免疫グロブリンのような低分子量タンパク質と、ポリビニルピロリドンのような親水性ポリマー、単糖類 (例えば、キシロース、マンノース、フルクトース、グルコース) と、二糖類 (例えば、ラクトース、マルトース、スクロース) と、ラフィノースのような三糖類と、デキストリン又はデキストランのような多糖類とを含む。

10

【0219】

治療剤の溶解を促進し、治療用タンパク質を攪拌誘発性凝集から保護することにより、活性治療用タンパク質又は抗体の変性を引き起こすことなく製剤が剪断表面応力に曝露されることを可能にするために、非イオン性界面活性剤又はデタージェント (「湿潤剤」とも呼ばれる) は存在してもよい。非イオン性界面活性剤は、約 0.05 mg/ml ～約 1.0 mg/ml 、好ましくは、約 0.07 mg/ml ～約 0.2 mg/ml の範囲で存在する。

20

【0220】

適切な非イオン性界面活性剤は、ポリソルベート (20、40、60、65、80 など)、ポロキサマー (184、188 など)、PLURONIC (商標) ポリオール、TRITON (商標)、ポリオキシエチレンソルビタンモノエーテル (TWEEN (商標) -20、TWEEN (商標) -80 など)、ラウロマクロゴール400、ステアリン酸ポリオキシル40、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油10、50及び60、モノステアリン酸グリセロール、スクロース脂肪酸エステル、メチルセルロース及びカルボキシメチルセルロースを含む。利用可能なアニオン性デタージェントとしては、ラウリル硫酸ナトリウム、ジオクチルスルホコハク酸ナトリウム及びジオクチルスルホン酸ナトリウムが挙げられる。カチオン性デタージェントとしては、塩化ベンザルコニウム又は塩化ベンゼトニウムが挙げられる。

30

【0221】

医薬組成物は、インビボ投与に用いるために、滅菌でなければならない。医薬組成物は、滅菌濾過膜で濾過することによって滅菌にすることができる。本明細書の医薬組成物は、通常、滅菌の入り口を有する容器、例えば、皮下注射針によって穿刺可能なストッパを有する静脈内溶液バッグ又はバイアルに入れられる。

【0222】

投与経路は、単回又は複数回のボーラス注入又は適切な方式、例えば、皮下、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、病巣内もしくは関節内経路による注射もしくは注入、局所投与、吸入、又は持続放出もしくは遅延放出方式による長時間注入のような、既知かつ許容可能な方法に従って行われる。いくつかの実施例において、医薬組成物は、局所投与、例えば、腫瘍内投与される。

40

【0223】

徐放性製剤を製造することができる。徐放性製剤の適切な例は、拮抗薬を含有する固体疎水性ポリマーの半透過性マトリックスを含み、これらのマトリックスは、成形品の形態、例えば、フィルム又はマイクロカプセルである。徐放性マトリックスの例は、ポリエステル、ヒドロゲル (例えば、ポリ (2－ヒドロキシエチル－メタクリレート) 又はポリ (ビニルアルコール))、ポリラクチド (米国特許第3,773,919号)、L－グルタミン酸とL－グルタミン酸エチルとの共重合体、非分解性エチレン－酢酸ビニル、LUPRON DEPOTTM (乳酸－グリコール酸共重合体及び酢酸リユープロレリンからな

50

る注射可能なマイクロスフェア)のような分解性乳酸-グリコール酸共重合体及びポリ-D-(−)-3-ヒドロキシ酪酸を含む。

【0224】

本明細書の医薬組成物は、治療される特定の適応症に必要とされる一つ以上の活性化化合物をさらに含んでもよく、好ましくは、互いに悪影響を及ぼさない、相補的活性を有するそれらの活性化化合物を有する。代替的に又は付加的に、該組成物は、細胞傷害性薬剤、化学療法剤、サイトカイン、免疫阻害剤又は成長阻害剤を含んでもよい。このような分子は、所望の目的に有効な量で適宜組み合わせられて存在する。

【0225】

活性成分は、また、例えば、コアセルベーション技術又は界面重合によって製造されるマイクロカプセル、例えば、それぞれヒドロキシメチルセルロース又はゼラチンマイクロカプセル及びポリ(メチルメタクリレート)マイクロカプセル、コロイド状薬物送達システム(例えば、リボソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノパーティクル及びナノカプセル)又はマクロエマルジョンにも埋め込まれ得る。このような技術は、Remington's Pharmaceutical Sciences 第18版に開示されている。

【0226】

いくつかの実施例において、医薬組成物は、使い捨てバイアル、例えば、密封された使い捨てバイアルに収容されている。いくつかの実施例において、医薬組成物は、複数回使用バイアルに収容されている。いくつかの実施例において、医薬組成物は、バルク状態で容器に収容されている。いくつかの実施例において、医薬組成物は、凍結保存されている。

【0227】

IV. 使用又は応用方法

本明細書に記載の、B7-H3を特異的に認識するmAbを含む抗B7-H3構築体(例えば、抗B7-H3全長IgG、抗B7-H3/CTLA-4二重特異性抗体、抗B7-H3/PD-L1二重特異性抗体、抗B7-H3/TIM-3二重特異性抗体又は抗B7-H3/LAG-3二重特異性抗体)及びそれらの組成物(例えば、医薬組成物)は、診断、分子アッセイ及び治療のような様々な応用に用いられ得る。

【0228】

本発明の一態様では、それを必要とする個体におけるB7-H3関連疾患又は病症を治療する方法を提供し、該方法は、本明細書に記載の抗B7-H3構築体を含む有効量の医薬組成物を個体に投与することを含む。いくつかの実施例において、B7-H3関連疾患は癌である。いくつかの実施例において、該癌は、非小細胞肺癌(NSCLC)、頭頸部扁平上皮癌(HNSCC)又は乳癌である。

【0229】

本出願は、タンパク質構築体(例えば、抗B7-H3全長IgG、抗B7-H3/CTLA-4二重特異性抗体、抗B7-H3/PD-L1二重特異性抗体、抗B7-H3/TIM-3二重特異性抗体又は抗B7-H3/LAG-3二重特異性抗体)、タンパク質構築体をコードする核酸分子及び/又はベクター、タンパク質構築体をコードする核酸分子及び/又はベクターを含む宿主細胞を部分的に考慮し、これらは、単独で投与されるか又は別の療法と組み合わせて投与され、且つ少なくともいくつかの態様で、薬学的に許容可能なキャリア剤又は賦形剤とともに投与され得る。いくつかの実施例において、抗B7-H3構築体を投与する前に、それらは、当分野に周知の適切な薬物キャリア剤及び賦形剤と組み合わせてもよい。本開示に従って製造された組成物は、癌の治療又は悪化の遅延に用いられ得る。

【0230】

いくつかの実施例において、癌を治療する方法を提供し、該方法は、個体に有効量の医薬組成物を投与することを含み、該医薬組成物は、B7-H3を特異的に認識するmAbを含有する、単離された抗B7-H3構築体(例えば、抗B7-H3全長IgG、抗B7

10

20

30

40

50

－H 3／C T L A－4二重特異性抗体、抗B 7－H 3／P D－L 1二重特異性抗体、抗B 7－H 3／T I M－3二重特異性抗体又は抗B 7－H 3／L A G－3二重特異性抗体）を含む。いくつかの実施例において、癌は、固形腫瘍（例えば、肺癌）である。いくつかの実施例において、該医薬組成物は、全身（例えば、静脈内）投与される。いくつかの実施例において、該医薬組成物は、局所（例えば、腫瘍内）投与される。いくつかの実施例において、該方法は、追加の癌療法（例えば、手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法又はそれらの組み合わせ）を個体に施すことをさらに含む。いくつかの実施例において、個体はヒトである。いくつかの実施例において、癌を治療する方法は、（１）癌細胞の殺傷（バースタンダー殺傷を含む）、（２）癌細胞増殖の阻害、（３）腫瘍における免疫応答の誘導、（４）腫瘍サイズの減少、（５）癌を有する個体の一つ又は複数の症状の緩和、（６）腫瘍転移の阻害、（７）生存期間の延長、（８）癌の進行までの時間の延長、及び（９）癌再発の可能性の予防、阻害又は低下という一つ又は複数の生物学的活性を有する。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される癌細胞殺傷方法は、少なくとも約４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又はより高いパーセントのうちのいずれか一つの腫瘍細胞死亡率を実現することができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される癌細胞殺傷方法は、少なくとも約１０％、２０％、３０％、４０％、５０％、６０％、７０％、８０％、９０％、９５％又はより高いパーセントのうちのいずれか一つのバースタンダー腫瘍細胞（腫瘍溶解性細胞V Vにより感染されていない）の死亡率を実現することができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される腫瘍サイズの減少方法は、腫瘍サイズの少なくとも約１０％（例えば、少なくとも約２０％、３０％、４０％、６０％、７０％、８０％、９０％又は１００％のうちのいずれか一つを含む）を減少させることができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される腫瘍転移の阻害方法は、少なくとも約１０％（例えば、少なくとも約２０％、３０％、４０％、６０％、７０％、８０％、９０％又は１００％のうちのいずれか一つを含む）の転移を阻害することができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される個体（例えば、ヒト）生存の延長方法は、個体の生存を１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１、１２、１８又は２４ヶ月のうちの少なくとも一つ延長させることができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される癌の進行までの時間の延長方法は、癌の進行までの時間を１、２、３、４、５、６、７、８、９、１０、１１又は１２週間のうちの少なくとも一つに延長させることができる。

10

20

30

40

50

【0231】

本明細書に記載の方法は、固形癌及び液体癌の両方を含む様々な癌の治療に用いられ得る。これらの方法は、初期癌、非転移性癌、原発性癌、進行癌、局所進行癌、転移性癌又は寛解癌を含む全てのステージの癌に適する。本明細書に記載の方法は、補助治療又は新規な補助治療において、第１の療法、第２の療法、第３の療法又は当分野の既知の他のタイプの癌療法、例えば、化学療法、手術、ホルモン療法、放射線、遺伝子療法、免疫療法（例えば、T細胞療法）、骨髓移植、幹細胞移植、標的療法、凍結療法、超音波療法、光線力学療法、ラジオ波焼灼などとの併用療法として用いられてもよい（即ち、該方法は、主要／確定的療法の前に行われ得る）。いくつかの実施例において、該方法は、以前に治療された個体を治療するためのものである。いくつかの実施例において、癌は、以前の療法に難治性になった。いくつかの実施例において、該方法は、以前に治療されていない個体を治療するためのものである。

【0232】

いくつかの実施例において、該方法は、異常なB 7－H 3発現、活性及び／又はシグナル伝達を有する癌の治療に適し、非限定的例の方式は、膀胱癌、子宮頸癌、結腸癌、結腸直腸癌、胃癌、肝臓癌、肺癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、腎臓癌、乳癌、頭頸部癌、皮膚癌、肉腫、脳腫瘍、脳及び脊髄癌、副腎癌、子宮癌、神経芽腫、小円形細胞腫瘍、末梢神経鞘腫、骨癌、横紋筋腫、リンパ腫、多発性骨髓腫、白血病、神経内分泌腫瘍及び黒色腫

を含む。

【0233】

そのため、いくつかの実施例において、免疫療法応答性固形腫瘍（例えば、癌又は腺癌、例えば、異常なB7-H3発現、活性及び／又はシグナル伝達を有する癌）の治療方法を提供し、該方法は、個体に有効量の医薬組成物を投与することを含み、該医薬組成物は、B7-H3を特異的に認識するモノクローナル抗体を含有する、単離された抗B7-H3構築体（例えば、抗B7-H3全長IgG、抗B7-H3／CTLA-4二重特異性抗体、抗B7-H3／PD-L1二重特異性抗体、抗B7-H3／TIM-3二重特異性抗体又は抗B7-H3／LAG-3二重特異性抗体）を含む。いくつかの実施例において、癌は、固形腫瘍（例えば、肺癌）である。いくつかの実施例において、該医薬組成物は、全身（例えば、静脈内）投与される。いくつかの実施例において、該医薬組成物は、局所（例えば、腫瘍内）投与される。いくつかの実施例において、該方法は、追加の癌療法（例えば、手術、放射線、化学療法、免疫療法、ホルモン療法又はそれらの組み合わせ）を個体に施すことをさらに含む。いくつかの実施例において、個体はヒトである。いくつかの実施例において、癌を治療する方法は、（1）癌細胞の殺傷（バースタンダー殺傷を含む）、（2）癌細胞増殖の阻害、（3）腫瘍における免疫応答の誘導、（4）腫瘍サイズの減少、（5）癌を有する個体の一つ又は複数の症状の緩和、（6）腫瘍転移の阻害、（7）生存期間の延長、（8）癌の進行までの時間の延長、及び（9）癌再発の可能性の予防、阻害又は低下という一つ又は複数の生物学的活性を有する。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される癌細胞殺傷方法は、少なくとも約40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はより高いパーセントのうちのいずれか一つの腫瘍細胞死亡率を実現することができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される癌細胞殺傷方法は、少なくとも約10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%又はより高いパーセントのうちのいずれか一つのバースタンダー腫瘍細胞（腫瘍溶解性細胞V.V.により感染されていない）の死亡率を実現することができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される腫瘍サイズの減少方法は、腫瘍サイズの少なくとも約10%（例えば、少なくとも約20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%又は100%のうちのいずれか一つを含む）を減少させることができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される腫瘍転移の阻害方法は、少なくとも約10%（例えば、少なくとも約20%、30%、40%、60%、70%、80%、90%又は100%のうちのいずれか一つを含む）の転移を阻害することができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される個体（例えば、ヒト）生存の延長方法は、個体の生存を1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、18又は24ヶ月のうちの少なくとも一つ延長させることができる。いくつかの実施例において、本明細書に記載の医薬組成物により媒介される癌の進行までの時間の延長方法は、癌の進行までの時間を1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11又は12週間のうちの少なくとも一つに延長させることができる。

【0234】

本出願の医薬組成物の用量及び所望の薬物濃度は、意図される特定の用途に応じて変化することができる。適切な用量又は投与経路の確定は、当業者の技術的範囲内である。動物実験は、ヒト治療のための有効用量を確定するための信頼できる指針を提供する。有効用量の種間類推は、Mordenti, J. 及びChappell, W. 「The Use of Interspecies Scaling in Toxicokinetics,」 In Toxicokinetics and New Drug Development, Yacobiら編集, Pergamon Press, New York 1989, ページ42-46で定められた原理に従って行われ得る。

【0235】

本明細書に記載の、抗B7-H3 mAbを含む抗B7-H3構築体のインビボ投与を行う場合、正常な用量は、1日あたり約10ng/kg～約100mg/kgの哺乳動物

体重又はより多くの変化であってもよく、好ましくは、約 1 mg/kg/日 ～ 10 mg/kg/日 、例えば、約 $1\sim3\text{ mg/kg/日}$ 、約 $2\sim4\text{ mg/kg/日}$ 、約 $3\sim5\text{ mg/kg/日}$ 、約 $4\sim6\text{ mg/kg/日}$ 、約 $5\sim7\text{ mg/kg/日}$ 、約 $6\sim8\text{ mg/kg/日}$ 、約 $6\sim6.5\text{ mg/kg/日}$ 、約 $6.5\sim7\text{ mg/kg/日}$ 、約 $7\sim9\text{ mg/kg/日}$ 又は約 $8\sim10\text{ mg/kg/日}$ であり、これは投与経路に依存する。本出願の範囲内で、異なる製剤は、異なる治療及び異なる病症に有効であり、且つ特定の器官又は組織を治療することを目的とする投与は、別の器官又は組織への送達とは異なる方式で送達する必要があり得る。そして、用量は、一回又は複数回で別個に投与されるか又は連続的注入によって投与され得る。数日又はより長い期間の反復投与の場合、病症に応じて、疾患症状に望ましい抑制が起こるまで治療を続ける。しかしながら、他の用量スキームも有用であり得る。この治療の進行は、従来技術及びアッセイによって容易に監視される。

10

【0236】

いくつかの実施例において、医薬組成物は、一回投与（例えば、ボラス注入）される。いくつかの実施例において、医薬組成物は、複数回（例えば、2、3、4、5、6回又はそれ以上のうちのいずれか一つ）投与される。複数回投与の場合、それらは、同じ又は異なる経路で行われてもよく、且つ同じ部位又は代替部位で行われてもよい。医薬組成物は、週に2回、週に3回、週に4回、週に5回、1日1回、中断することなく1日1回、週に1回、中断することなく週に1回、2週間に1回、3週間に1回、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、3ヶ月に1回、4ヶ月に1回、5ヶ月に1回、6ヶ月に1回、7ヶ月に1回、8ヶ月に1回、9ヶ月に1回、10ヶ月に1回、11ヶ月に1回又は年に1回で投与されてもよい。投与間の間隔は、約 24 h ～ 48 h 、2日～3日、3日～5日、5日～1週間、1週間～2週間、2週間～1ヶ月、1ヶ月～2ヶ月、2ヶ月～3ヶ月、3ヶ月～6ヶ月又は6ヶ月～1年のうちのいずれか一つであってもよい。間隔は、不規則になる（例えば、腫瘍進行の後）こともある。いくつかの実施例において、投与計画は中断しない。いくつかの実施例において、医薬組成物は、4日ごとに4回投与される。特定の患者に対する最適な用量及び治療スキームは、患者の疾患徴候をモニタリングし、それに応じて治療を調整することによって、医学分野の当業者により容易に確定され得る。

20

【0237】

本出願の医薬組成物（再構成製剤と液体製剤とを含むが、それらに限らない）は、本明細書に記載の抗B7-H3構築体による治療を必要とする個体、好ましくは、ヒトに既知の方法に従って投与され、これらの既知の方法は、例えば、ボラスとしての静脈内投与又は一定の期間にわたる連続注入であり、筋肉内、腹腔内、脳脊髄液内、皮下、静脈内（i.v.）、関節内、滑膜内、くも膜下腔内、経口、局所又は吸入経路により行われる。再構成製剤は、本明細書に記載の凍結乾燥抗B7-H3構築体を希釈剤に溶解させてタンパク質をその中に分散させることによって製造され得る。本出願に適する例示的薬学的に許容可能な（ヒトへの投与の場合に安全で毒性がない）希釈剤は、滅菌水、静菌性注射用水（BWF I）、pH緩衝溶液（例えば、リン酸塩緩衝食塩水）、滅菌食塩水溶液、リンゲル溶液もしくはグルコース溶液、又は塩及び／又は緩衝剤の水溶液を含むが、それらに限らない。

30

【0238】

いくつかの実施例において、医薬組成物は、皮下（即ち、皮膚下で）投与によって個体に投与される。このような目的のために、医薬組成物は、注射器で注射されてもよい。しかしながら、医薬組成物を投与するための他の装置は、利用可能であり、例えば、注射装置、注射ペン、自動注射器装置、無針装置、及び皮下貼付剤送達システムである。

40

【0239】

いくつかの実施例において、医薬組成物は、個体に静脈内投与される。いくつかの実施例において、医薬組成物は、注入（例えば、静脈内注入）により個体に投与される。免疫療法用の注入技術は、当分野で既知のものである（例えば、Rosenbergら, New Eng. J. of Med. 319: 1676 (1988)を参照されたい）。

【0240】

50

本明細書に記載の、B7-H3を特異的に認識するmAbを含む抗B7-H3構築体（例えば、抗B7-H3全長IgG、抗B7-H3/CTLA-4二重特異性抗体、抗B7-H3/PD-L1二重特異性抗体、抗B7-H3/TIM-3二重特異性抗体又は抗B7-H3/LAG-3二重特異性抗体）及びそれらの組成物（例えば、医薬組成物）は、診断又は分子アッセイにも用いられ得る。例えば、抗体もしくはその抗原結合断片は、生体試料におけるB7-H3を検出又は定量することによって、B7-H3に関連する疾患（例えば、上記疾患）の進行又は治療を検出又はモニタリングするために用いられ得る。

【0241】

抗体、抗原結合断片、コンジュゲート、二重特異性抗体又は組成物の投与は、他の抗癌もしくは抗血管新生剤又は治療的処置（例えば、腫瘍の外科的切除又は放射線療法）の投与を伴ってもよい。例えば、治療量の抗体又はコンジュゲートの投与前、投与中又は投与後に、被験体は、一つ又は複数の追加の療法を受けてもよい。一例において、治療量の腫瘍治療するための一つ又は複数の薬剤を投与する前に、被験体は、一つ又は複数の治療を受けて、腫瘍を除去するか又は減少させる。例えば、追加の薬剤は、化学療法剤、抗血管新生剤又はそれらの組み合わせを含んでもよいが、それらに限らない。別の例において、治療有効量の抗体もしくはその抗原結合断片又はコンジュゲートを投与する前に、腫瘍の少なくとも一部は、外科的切除されるかもしくは他の方式で切除されるか、又はサイズもしくは体積を減少させる。

【0242】

利用可能な追加の治療剤の特定の例は、微小管結合剤、DNAインターカレーター又は架橋剤、DNA合成阻害剤、DNA及びRNA転写阻害剤、抗体、酵素、酵素阻害剤、遺伝子調節剤及び血管新生阻害剤を含む。これらの薬剤（治療有効量で投与される）及び治療は、単独で又は組み合わせて使用することができる。例えば、任意の適切な抗癌剤又は抗血管新生剤は、いずれも本明細書に開示される抗体、コンジュゲートと組み合わせて投与することができる。このような薬剤の方法及び治療用量は、当業者に既知のものであり、且つ熟練した臨床医により確定され得る。一例において、化学療法剤は、5-FUもしくはIRTを含むか又は5-FUとIRTの両方を含む。

【0243】

V. 製造方法

本明細書に記載の抗B7-H3構築体（例えば、抗B7-H3モノクローナル抗体）は、当業者に既知又は本明細書に記載の任意の方法で製造され得る。

【0244】

齧歯動物モノクローナル抗体は、齧歯動物類種（例えば、マウス又はラット）を免疫化し、それからハイブリドーマを得るか、又は当分野で既知の分子生物学的技術でFab断片又は単鎖Fc(scFv)ライブラリーをクローニングし、その後EELISAにより、選択されていないライブラリーの単クローンもしくはファージディスプレイを使用することによって選択するような当業者に既知の方法で入手することができる。

【0245】

組換えてモノクローナル抗体を産生するために、モノクローナル抗体をコードする核酸を単離又は合成し、それを複製可能なベクターに挿入し、さらなるクローニング（DNA増幅）又は発現に用いる。従来の手順を用いて（例えば、抗体コードする重鎖及び軽鎖の遺伝子に特異的に結合できるオリゴヌクレオチドプローブを使用することにより）、モノクローナル抗体をコードするDNAを容易に単離し配列決定することができる。多くのベクターは利用可能である。ベクターの選択部分は、使用される宿主細胞に依存する。通常、好ましい宿主細胞は、原核又は真核（通常、哺乳動物）からのものである。

【0246】

例

以下の例は、単に本発明的の例示であることを意図するため、いかなる方式で本発明を限定するものと見なされるべきではない。以下の具体的な例と詳細な記述は、説明として提供されるものであり、限定として提供されるものではない。

10

20

30

40

50

【0247】

例1：抗B7-H3モノクローナル抗体（mAb）の産生
免疫

A/Jマウスを、腹部皮膚下において25 µgのヒトB7-H3タンパク質免疫（AcroBiosystems、カタログ番号B7B-H52E7）で皮下免疫化し、該タンパク質をアジュバント（CFA、初回免疫に用いられる完全フロイントアジュバント、IFA、強化免疫に用いられる不完全フロイントアジュバント）とともにエマルジョンとして調製し、体積が200 µlである。各マウスは、3剤～5剤を受けた。免疫の各時点（最後の免疫を除く）から7日後に、動物から20 µlの血液試料を収集し、融合基準を満たすまで、固定化B7-H3-Hisタンパク質を用いたELISAアッセイにおいて抗血清力価をモニタリングした。

10

【0248】

抗ヒトB7-H3抗体を分泌するハイブリドーマの選択

最後の免疫から3日後に、滅菌環境において、標準的なハイブリドーマ生成スキームに従って、選択されたマウスからの脾臓細胞を抽出し、SP2/0細胞と融合させた。融合した細胞を、1x HAT（ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン）を含有するDMEM培地（10%のFBSが補充されている）中で7日間培養した。ELISAにより、ハイブリドーマ上清とヒトB7-H3、カニクイザルB7-H3又はマウスB7-H3との結合能をそれぞれ分析した。有限希釈によって陽性ハイブリドーマクローンに対してサブクロニングを行い、1x HT（ヒポキサンチン-チミジン）を含有するDMEM培地（10%のFBSが補充されている）中で培養した。細胞を1週間培養し、そして陽性モノクローナルを得るまで、新たなスクリーニングを行った。各クローンを用いて0.5 mgの抗体を産生し、タンパク質Aクロマトグラフィーを用いて抗体を精製して、さらなる特徴付けに用いた。クローンタイピングシステム-HRP, Southern Biotech.を用いて抗体アイソタイプを試験した。

20

【0249】

例2：インビトロB7-H3マウス抗体の特徴付け

FACSにより測定されたCHO-K1/B7-H3細胞結合

陽性クローンからの精製抗体は、CHO-K1/B7-H3細胞系（Probio Biotech）に対するFACS結合測定に用いられ、ここで、結合EC₅₀値（図1）を生成した。陽性クローンは、12C9F1B5、38F11B2、34A9C12、37D11F5B8、37F11A10、43H11G12、47F3F10B4、47C7E3、31H11B1、38D6A4、MGA271を含む。マウスIgGは、アイソタイプ対照として用いられた。

30

【0250】

FACS結合測定のEC₅₀値は表4に示されている。全ての陽性クローンは、いずれもMGA271の参照抗体（エノブリツズマブ）よりも高い結合親和性を有する。

【0251】

40

【表 4】

表4. マウスmAb FACS結合分析

クローン番号	FACS 結合の EC ₅₀ 値 (nM)
12C9F1B5	4.759
38F11B2	0.6511
34A9C12	0.8217
37D11F5B8	0.9091
37F11A10	1.377
43H11G12	6.375
47F3F10B4	0.7509
47C7E3	0.8696
31H11B1	0.9766
38D6A4	1.777
MGA271	20.82
マウス IgG	不適用

10

【0252】

例3：キメラ抗体の産生及び分析

特徴付けのためのキメラ抗体の構築

この10種類のmAbの可変領域コード配列を、GenScriptオンラインツールを用いて、ヒトコドンバイアス発現について最適化した。可変なDNA断片を合成し、ヒトIgG1重鎖ドメイン（CH1－ヒンジ－CH2－CH3）及び軽鎖κ定常領域（CL）と融合させ、キメラ形態での一過性発現に用いた。重鎖及び軽鎖発現構築体をpTT5に基づく単一のプラスミドにクローニングし、シグナルペプチドを合成した後に、分泌発現に用いた。

20

【0253】

PEI max 40,000 (polysciences)を用いて、抗体重鎖／軽鎖ペアによりプラスミドをトランスフェクトしたHEK293－6E細胞においてキメラ抗体を発現した。24時間後、トリプトンN－1サプリメント（Kirgen Bioscience）で発現／分泌を増強した。37℃、5% CO₂下で5日間振盪培養した後に、上清を収集し、プロテイン－Aビーズ（GenScript）で抗体内容物を精製した。キメラ抗体生成物をPBSに保存し分析に用いた。

30

【0254】

抗B7－H3抗体誘導のCDC分析

キメラ抗体に対してCDCアッセイを行った。標的細胞系（CHO－K1が過剰発現するヒトB7－H3）を培養し回収し、特定の細胞密度で該標的細胞系を384ウェルプレート（5E3個の細胞／ウェル）に接種した。それに応じて抗体試料をプレートに加え、プレートを37℃／5% CO₂下で30分間インキュベートした。そして精製された正常ヒト血清補体（NHSC、SIGMA－ALDRICH）をプレートに加え、プレートをさらに4時間インキュベートした。インキュベーターからプレートを取り出し、Cell Titer－Glo（商標）アッセイキット（Promega）で細胞生存率を分析した。PheraStar（BMG）により発光データを捕捉し、細胞生存率分析に用いた。標的細胞溶解％対候補抗体濃度で表されるCDCアッセイ結果は、図2に示されている。

40

【0255】

CDCアッセイからの全ての候補キメラ抗体のEC₅₀値は、表5にまとめられている。クローン43H11G12－hIgG1は、最も低いEC₅₀値を示し、0.1217 μg／mlである。DS－5573a（特許番号：US 2013／0078234 A

50

1) と同じアミノ酸配列を有する、自社合成された陽性対照の EC_{50} 値を用いて、各候補抗体の相対的活性 ($\% \text{相対的活性} = (\text{陽性対照の } EC_{50} / \text{試料の } EC_{50}) * 100$) を計算した。全てのキメラ mAb 試料は、いずれも 100% を超える相対的活性を示した。

【0256】

【表5】

表5. キメラ抗体CDC誘導分析

試料 ID	$EC_{50}(\mu\text{g/ml})$	% 相対的活性
12C9F1B5-hIgG1	0.2995	230.32
38F11B2-hIgG1	0.3187	216.44
34A9C12-hIgG1	0.2686	256.81
37D11F5B8-hIgG1	0.2673	258.06
37F11A10-hIgG1	0.3574	193.01
43H11G12-hIgG1	0.1217	566.80
47F3F10B4-hIgG1	0.4178	165.10
47C7E3-hIgG1	0.251	274.82
31H11B1-hIgG1	0.3925	175.75
38D6A4-hIgG1	0.5034	137.03
DS-5573a	0.6898	100.00

10

20

【0257】

抗B7-H3抗体誘導のADCCアッセイ

アッセイ手順では、標的細胞系 (CHO-K1 が過剰発現するヒトB7-H3) (Probio Biotech) を培養し回収し、特定の細胞密度で該標的細胞系を96ウェルプレートに接種した。自社合成された、MGA-271 (エノブリツズマブ) (特許番号: US 2012/0294796 A1) と同じアミノ酸配列を有するキメラ抗体試料又は陽性対照をプレートに加え、プレートを $37^{\circ}\text{C} / 5\% \text{CO}_2$ 下で30分間インキュベートした。NK92/CD16a-VV細胞をエフェクター細胞として用い、プレートに加え、同じ条件下で6時間インキュベートした。アッセイプレートを取り出し、短時間遠心分離した。メーカーの指示 (Roche) に従って、上清を収集し、新たなプレートに移してLDH活性アッセイに用いた。PheraStar (BMG) により吸光度データを捕捉し、GraphPad Prism 6.0で分析した。全てのキメラ抗体のADCC効果を比較した。標的細胞溶解%対候補抗体濃度で表されるADCCアッセイ結果は、図5に示されている。

30

【0258】

表6には、ADCCアッセイ (一つの実験における二枚のプレート) からの以下の候補キメラ抗体の EC_{50} 値がまとめられている。クローン43H11G12-hIgG1は、最も低い EC_{50} 値を示し、 $0.001615 \mu\text{g/ml}$ である。MGA-271 (エノブリツズマブ) (特許番号: US 2012/0294796 A1) と同じアミノ酸配列を有する、自社合成された陽性対照の EC_{50} 値を用いて、各アッセイプレートにおける各候補抗体の相対的活性 ($\% \text{相対的活性} = (\text{陽性対照の } EC_{50} / \text{試料の } EC_{50}) * 100$) を計算した。全てのキメラ mAb 試料は、いずれも 300% を超える相対的活性を示した。

40

【0259】

50

【表 6】

表6. キメラ抗体のADCC誘導分析

プレート番号	試料 ID	EC ₅₀ (μg/ml)	% 相対的活性
プレート 01	12C9F1B5-hIgG1	0.002585	1524.56
	38F11B2-hIgG1	0.002656	1483.81
	34A9C12-hIgG1	0.003411	1155.38
	37D11F5B8-hIgG1	0.00368	1070.92
	37F11A10-hIgG1	0.003339	1180.29
	MGA-271	0.03941	100.00
プレート 02	43H11G12-hIgG1	0.001615	2744.89
	47F3F10B4-hIgG1	0.002892	1532.85
	47C7E3-hIgG1	0.003684	1203.31
	31H11B1-hIgG1	0.003254	1362.32
	38D6A4-hIgG1	0.01132	391.61
	MGA-271	0.04433	100.00

10

【0260】

例 4. ヒト化抗体の産生及び分析

20

候補抗体のヒト化デザイン

抗体の機能アッセイにおける有効性及びその可変ドメイン配列に基づいて、CDR及びFRを分析し、相同性モデリングを行うことによって、47F3F10B4、12C9F1B5、43H11G12及び31H11B1のmAbのモデリング構造を得た。フレームワーク残基の溶媒接触表面積を計算した。結果に基づいて、埋め込まれたフレームワーク残基（即ち溶媒接触表面積<15%）を同定した。マウス対応物との配列同一性の高いVH及びVLのヒト受容体を選択した。マウス抗体のCDRをヒト受容体フレームワークに直接移植することによって、いかなる復帰突然変異もない移植抗体の配列を得た。発達可能性評価によって、移植配列における、脱アミド、異性化酸化及びグリコシル化などを含む翻訳後修飾及び化学分解を分析した。PTMホットポイント、例えば、N-グリコシル化部位、異常なプロリン残基、脱アミド部位、異性化部位、酸化部位及び対合されていないシステイン残基などを同定し、それらは、移植抗体の結合活性及び作製可能性に影響を及ぼし得る。ヒト化軽鎖及び重鎖をコードするDNA配列を合成した。抗体特徴を比較して最適な候補抗体を選択した。これらのヒト化分子の産生に成功した。

30

【0261】

ヒト化抗体

抗体のヒト化重鎖及び軽鎖を組み合わせて、抗体の産生に用いた。各重鎖と軽鎖の組み合わせについて、詳しい情報は表7に示されている。それとともに、IgG1mと称されるヒトIgG1の重鎖突然変異体（K214R、L235V、F243L、R292P、Y300L、D356E、L358M及びP396L）をADCC効果の増強に用いた。

40

【0262】

50

【表 7】

表7. 重鎖と軽鎖の対合によるヒト化抗体の産生

抗体名称	重鎖	軽鎖
47F3F10B4-VH1-VL4	47F3F10B4-VH1	47F3F10B4-VL4
47F3F10B4-VH2-VL4	47F3F10B4-VH2	47F3F10B4-VL4
12C9F1B5-VH2.1-VL2	12C9F1B5-VH2.1	12C9F1B5-VL2
12C9F1B5-VH4-VL2	12C9F1B5-VH4	12C9F1B5-VL2
43H11G12-VH4-VL2	43H11G12-VH4	43H11G12-VL2
31H11B1-VH1-VL3	31H11B1-VH1	31H11B1-VL3
31H11B1-VH1.1-VL3	31H11B1-VH1.1	31H11B1-VL3

10

【0263】

FACSにより測定されたCHO-K1/B7-H3細胞結合

ヒト化抗体の細胞表面抗原結合を検証するために、ヒトB7-H3を発現するCHO-K1細胞を収集し、抗B7-H3 mAbとともにインキュベートし、次にヤギ抗ヒトIgG(H+L)二次抗体(Invitrogen)とともにインキュベートした。そしてフローサイトメトリーで試料を分析した。典型的な結合図は図4に示されている。

20

【0264】

FACS結合のEC₅₀値は、表8にまとめられている。全てのヒト化抗体は、MGA271(特許番号:US 2012/0294796 A1、重鎖が上記IgG1mである)及びMGA271-hIgG1(重鎖が野生型ヒトIgG1であり、且つ別のアミノ酸配列がMGA271と同じである)の参照抗体よりもはるかに高い結合親和性を示した。

【0265】

30

【表 8】

表8. ヒト化抗体のFACS結合分析

クローン番号	FACS 結合のEC ₅₀ 値 (nM)
47F3F10B4-VH1-VL4	0.8884
47F3F10B4-VH2-VL4	0.7667
12C9F1B5-VH2.1-VL2	0.1528
31H11B1-VH1-VL3	0.7904
31H11B1-VH1.1-VL3	0.4053
12C9F1B5-VH4-VL2	0.3385
43H11G12-VH4-VL2	0.1554
31H11B1-VH1-VL3(IgG1m)	0.4209
31H11B1-VH1.1-VL3(IgG1m)	0.3342
47F3F10B4-VH1-VL4(IgG1m)	0.2994
MGA271	101.6
MGA271-hIgG1	81.63
ヒト IgG	不適用

40

【0266】

50

抗 B 7 - H 3 抗体誘導の C D C アッセイ

ヒト化抗体に対して C D C アッセイを行った。標的細胞系（C H O - K 1 が過剰発現するヒト B 7 - H 3）を培養し回収し、特定の細胞密度で該標的細胞系を 9 6 ウェルプレート（5 E 3 個の細胞／ウェル）に接種した。それに応じて抗体試料をプレートに加え、プレートを 3 7 ° C / 5 % C O ₂ 下で 3 0 分間インキュベートした。そして精製された正常ヒト血清補体（N H S C、S I G M A - A L D R I C H）をプレートに加え、プレートをさらに 4 時間インキュベートした。インキュベーターからプレートを取り出し、C e l l T i t e r - G l o（商標）アッセイキットで細胞生存率を分析した。P h e r a S t a r（B M G）により発光データを捕捉し、細胞生存率分析に用いた。標的細胞溶解 % 対候補抗体濃度で表される C D C アッセイ結果は、図 5 に示されている。

10

【 0 2 6 7 】

表 9 には、C D C アッセイ（一つの実験における二枚のプレート）からの全ての候補ヒト化抗体の E C ₅₀ 値がまとめられている。D S - 5 5 7 3 a（特許番号：U S 2 0 1 3 / 0 0 7 8 2 3 4 A 1）と同じアミノ酸配列を有する、自社合成された陽性対照の E C ₅₀ 値を用いて、各アッセイプレートにおける各候補抗体の相対的活性（% 相対的活性 = （陽性対照の E C ₅₀ / 試料の E C ₅₀） * 1 0 0 %）を計算した。クローン 3 1 H 1 1 B 1 - V H 1 - V L 3（I g G 1 m）、3 1 H 1 1 B 1 - V H 1 . 1 - V L 3（I g G 1 m）、4 7 F 3 F 1 0 B 4 - V H 1 - V L 4（I g G 1 m）は、3 0 0 % を超える相対的活性を示した。

20

【 0 2 6 8 】

【表 9】

表9. ヒト化抗体の CDC 誘導分析

プレート番号	試料 ID	EC ₅₀ (μg/ml)	% 相対的活性
プレート 01	47F3F10B4-VH1-VL4	0.6187	96.10
	12C9F1B5-VH4-VL2	0.384	154.84
	43H11G12-VH4-VL2	0.5698	104.35
	31H11B1-VH1-VL3	0.7393	80.43
	31H11B1-VH1.1-VL3	0.874	68.03
	DS-5573a	0.5946	100.00
	MGA271	不適用	不適用
	ヒト IgG1	不適用	不適用
プレート 02	31H11B1-VH1.1-VL3	0.6361	98.70
	31H11B1-VH1-VL3(IgG1m)	0.1827	343.62
	31H11B1-VH1.1-VL3(IgG1m)	0.1457	430.89
	47F3F10B4-VH1-VL4(IgG1m)	0.1412	444.62
	31H11B1-VH1-VL3	0.7064	88.87
	47F3F10B4-VH1-VL4	0.5494	114.27
	DS-5573a	0.6278	100.00
	MGA271-hIgG1	不適用	不適用
	MGA271	不適用	不適用

30

40

【 0 2 6 9 】

抗 B 7 - H 3 抗体誘導の A D C C アッセイ

アッセイ手順では、標的細胞系 A 5 4 9（プレート 0 1 とプレート 0 2）及び D e t r o i t 5 6 2（プレート 0 3 とプレート 0 4）を培養し、回収し、特定の細胞密度（1 E 4 個の細胞／ウェル）で 9 6 ウェルプレートに接種した。自社合成された、M G A - 2 7 1（エノブリツズマブ）（特許番号：U S 2 0 1 2 / 0 2 9 4 7 9 6 A 1）と同じ

50

アミノ酸配列を有するヒト化抗体試料又は陽性対照をプレートに加え、プレートを37℃/5% CO₂で30分間インキュベートした。論文(Paulら, (2002) PLOS ONE 2014; 9(4): e95787を参照されたい)を参照して内部構造化されたADCCレポーター細胞系(GS-J2C/CD16A)をエフェクター細胞として用い、プレートに加え、且つ同じ条件下で6時間インキュベートした。アッセイプレートを取り出し、Bio-Glo(商標)アッセイキット(Promega)でADCCレポーター細胞系の活性化を分析した。PheraStar(BMG)により発光データを捕捉し、細胞生存率分析に用いた。PheraStar(BMG)により吸光度データを捕捉し、GraphPad Prism 6.0で分析した。ヒト化抗体のADCC効果を比較した。ADCCアッセイの結果は図6A及びBに示されている。

10

【0270】

ADCCアッセイからの以下のヒト化抗体のEC₅₀値は表10にまとめられている。クローン47F3F10B4-VH1-VL4(IgG1m)は、A549細胞(0.00959 µg/ml)及びDetroit 562細胞(0.01419 µg/ml)において最も低いEC₅₀値を示した。MGA-271(エノブリツズマブ)(特許番号: US 2012/0294796 A1)と同じアミノ酸配列を有する、自社合成された陽性対照のEC₅₀値を用いて、各アッセイプレートにおける各候補抗体の相対的活性(%相対的活性=(陽性対照のEC₅₀/試料のEC₅₀)*100)を計算した。31H11B1-VH1-VL3(IgG1m)、31H11B1-VH1.1-VL3(IgG1m)及び47F3F10B4-VH1-VL4(IgG1m)は、ADCCアッセイにおいて、A549細胞を標的とする1000%超の相対的活性及びDetroit 562細胞を標的とする600%超の相対的活性を示した。

20

【0271】

これらのインビトロアッセイ結果は、固形腫瘍(HNSCC、NSCLC)のための可能な治療を提供し、且つこれらの抗体の安全性及び有効性は、さらなる前臨床研究及び臨床研究において証明する必要がある。

【0272】

30

40

50

【表 10】

表10. ヒト化抗体のADCC誘導分析

プレート番号	試料 ID	EC ₅₀ (μg/ml)	% 相対的活性
プレート 01	47F3F10B4-VH1-VL4	0.0391	365.22
	47F3F10B4-VH2-VL4	0.1719	83.07
	12C9F1B5-VH2.1-VL2	0.6254	22.83
	31H11B1-VH1-VL3	0.2567	55.63
	31H11B1-VH1.1-VL3	0.2135	66.89
	MGA271	0.1428	100.00
プレート 02	31H11B1-VH1.1-VL3	1.225	55.18
	31H11B1-VH1-VL3(IgG1m)	0.06465	1045.63
	31H11B1-VH1.1-VL3(IgG1m)	0.04581	1475.66
	47F3F10B4-VH1-VL4(IgG1m)	0.00959	7049.01
	MGA271-hIgG1	7.764	8.71
	MGA271	0.676	100.00
プレート 03	47F3F10B4-VH1-VL4	0.09533	467.01
	47F3F10B4-VH2-VL4	0.5767	77.20
	12C9F1B5-VH2.1-VL2	0.6662	66.83
	31H11B1-VH1-VL3	0.6921	64.33
	31H11B1-VH1.1-VL3	0.5065	87.90
	MGA271	0.4452	100.00
プレート 04	31H11B1-VH1.1-VL3	1.501	193.67
	31H11B1-VH1-VL3(IgG1m)	0.4357	667.20
	31H11B1-VH1.1-VL3(IgG1m)	0.2286	1271.65
	47F3F10B4-VH1-VL4(IgG1m)	0.01419	20486.26
	MGA271-hIgG1	7.297	39.84
	MGA271	2.907	100.00

10

20

30

【0273】

以下では、本明細書で言及されるいくつかのアミノ酸配列及び核酸配列が列挙されている。下線が付けられているアミノ酸配列は、それぞれCDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2及びCDRL3である。

【0274】

>47F3F10B4-VH (SEQ ID NO: 1)

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTDHYMHWVKQS
HGKSLIEWIGYIFPNNG VSGYNQNFKDKATLTVDKSSSTA
YMDLRSLTPEDSAVYYCTRRQLGLGTMDYWGQG TSVTVS
S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 2、
3及び4として指定される)

40

>47F3F10B4-VL (SEQ ID NO: 5)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYNYMHWY
QQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNI
HPVEEEDAATYYCQHSEKELPWTFGGGTKLEIK (下線が付けられ
ているCDR アミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 6、7及び8として指
定される)

>12C9F1B5-VH (SEQ ID NO: 9)

QGQIQLVQSGPELVKPGGETVKISCKASGFNTNYGMNHWVKQA

50

PGKGLKWMGWINPYSG VPTYADDFKGRFAFSLETSASTA
YLQINNLLKNEDTATYFCARDDGFHYTMDYWGQGT SVTVS
S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 10
、11及び12として指定される)

>12C9F1B5-VL (SEQ ID NO: 13)

DVVL TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNLVHSNGITYLHW
YLQKPGQSPKLLIYKVSNR FSGV PDRFSGSGSGTDFTLT
ISRVEAEDLG VYFC SQSTLVPWTFGGG TKLEIK (下線が付けら
れているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 14、15及び16と
して指定される)

>34A9C12-VH (SEQ ID NO: 17)

QGQIQLVQSGPELKKSGETVKISCKASGFTNYGINWVKQA
PGKGLKWMGWINPYSGV PTYADDFKGRFAFSLETSASTA
YLQINNLLKNEDSATYFCARDDGFHYTMDYWGQGTS VTVS
S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 18
、19及び20として指定される)

>34A9C12-VL (SEQ ID NO: 21)

DVVL IQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNLVHSNGITYLHW
YLQKPGQSPKLLIYKVSNR FSGV PDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDLG VYFC SQSTLVPWTFGGG TKLEIK (下線が付けら
れているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 22、23及び24と
して指定される)

>38D6A4-VH (SEQ ID NO: 25)

QIQLVQSGPELKKPGEAVKISCKASGSTFTDFGMNWVRQA
PGKGLKWMGWINPYSG VPTYADEFKGRFVFSLETSARVA
YMQINDLLKNEDTATYFCARDDGYHYTMDYWGQG TSVTVS
S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 26
、27及び28として指定される)

>38D6A4-VL (SEQ ID NO: 29)

DVVM TQTPLPLPVSLGDQASISCRSSQSLIHSNGITYLHW
YLQKPGQSPKLLIYKVSNR FSGV PDRFTGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDLG VYFC SQSTHVPWTFGGG SKLEIR (下線が付けら
れているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 30、31及び32と
して指定される)

>37D11F5B8-VH (SEQ ID NO: 33)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGDTFRNNGMNWVKQA
PGKGLKWMGWINPYSG VPTYADDFKGRFAFSLETSASTA
FLQINNLLKNEDTATYFCARDDGYHYTMDFWGLGT SVTVS
S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 34
、35及び36として指定される)

>37D11F5B8-VL (SEQ ID NO: 37)

DVVM TQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGITYLHW
YLQKPGQSPKLLTYKVS HRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDLG VYFC SQSTHVPWTFGGG TKLEIK (下線が付けら
れているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 38、39及び40と
して指定される)

>37F11A10-VH (SEQ ID NO: 41)

QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGDTFRNYGMNWVKQA
PGKGLKWMGWINPYSG VPTYADDFKGRFAFSLETSASTA
FLQINNLLKNEDTATYFCARDDGFHYTMDYWGGLGT SVTVS

10

20

30

40

50

S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 42、43及び44として指定される)

>37F11A10-VL (SEQ ID NO: 45)

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

I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P W T F G G G T K L E I R (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 46、47及び48として指定される)

>43H11G12-VH (SEQ ID NO: 49)

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

S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 50、51及び52として指定される)

>43H11G12-VL (SEQ ID NO: 53)

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

I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P W T F G G G T K L E I K (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 54、55及び56として指定される)

>38F11B2-VH (SEQ ID NO: 57)

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

S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 58、59及び60として指定される)

>38F11B2-VL (SEQ ID NO: 61)

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

I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P W T F G G G T K L E I K (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 62、63及び64として指定される)

>47C7E3-VH (SEQ ID NO: 65)

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

S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 66、67及び68として指定される)

>47C7E3-VL (SEQ ID NO: 69)

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

I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P W T F G G G T K L E I K (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 70、71及び72として指定される)

>31H11B1-VH (SEQ ID NO: 73)

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

V S S (下線が付けられているCDRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 74、75及び76として指定される)

10

20

30

40

50

>31H11B1-VL (SEQ ID NO: 77)

DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKP
GNAPRL LISGATSLETGV PSRFSGSGSGSKDYTLSTSLQ
TEDVATYYCQQYWSTPLTFGAGTKLELK (下線が付けられているC
DRアミノ酸配列は、それぞれSEQ ID NO: 78、79及び80として指定さ
れる)

以下のタンパク質配列は、ヒト化mAb配列である。

[0275]

>47F3F10B4-VH1 (SEQ ID NO: 81)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYMHWVRQA
PGQGLEWMGYIFPNNGVSGYNQNFKDRVTMTRDTSISTA
YMELSRLRSDDTAVYYCARRQLGLGTMDYWGQ GTLVTVSS

10

>47F3F10B4-VH2 (SEQ ID NO: 82)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDHYMHWVRQA
PGQGLEWMGYIFPNNGVSGYNQNFKDRVTMTRDTSSTSTVY
MELSSRLRSED TAVYYCARRQLGLGTMDYWGQ GTLVTVSS

>12C9F1B5-VH2.1 (SEQ ID NO: 83)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTNYYGMNHWVRQAPG
QGLEWMGWINPYSGVPTYADDFKGRVTMTRDTSISTAYME
LSRLRSDDTAVYYCARD DDFS FHYTMDYWGQ GT LVTVSS

20

>12C9F1B5-VH4 (SEQ ID NO: 84)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGFTNYYGMNHWVRQAPG
QRL EWMGWINPYSGVPTYADDFKGRVTITRDT SASTAYME
LSSRLRSED TAVYYCARD D DGFHYTMDYWGQ GT LVTVSS

>43H11G12-VH4 (SEQ ID NO: 85)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYNFRDFGMNHWVRQA
PGQRL EWMGW LNSYSGVPTYADDFKGRVTITRDT SASTAY
MELSSRLRSED TAVYYCARD D DGYNYTMNYWG QGT LVTVSS

>31H11B1-VH1 (SEQ ID NO: 86)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA
PGQGLEWMGHINPNNSGSTNQNAKFKNRVTMTRDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCARSGSNYRRNYFDYW GQGT LVTV
SS

30

>31H11B1-VH1.1 (SEQ ID NO: 87)

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMHWVRQA
PGQGLEWMGHINPNNSGSTNQNAKFKNRVTMTRDTSISTAY
MELSLRLRSDDTAVYYCTRSGSNYRRNYFDYW GQGT LVTV
SS

>47F3F10B4-VL4 (SEQ ID NO: 88)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVSTSGYNYMHWY
QQKPGKAPKLLIYLASNLES GVP SRFSGSGSGSGTDFTLTIS
SLQPEDFATYYCQHSEKELPWTFGQGGTKVEIK

40

>12C9F1B5-VL2 (SEQ ID NO: 89)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQN LVHSNGITYLHW
YLQKPGQSPQLLIYKVS N R FSGV PDRFSGSGSGSGTDFTLK I
SRVEAEDVG VYYCSQSTLVPWTFGQGGTKVEIK

>43H11G12-VL2 (SEQ ID NO: 90)

DIVMTQSPLSLPVTGPGEPAISCRSSQS LVHSNGITYLHW
YLQKPGQSPQLLIYKVS N R FSGV PDRFSGSGSGSGTDFTLK
ISRVEAEDVG VYYCSQSTHVPWTFGQGGTKVEIK

50

>31H11B1-VL3 (SEQ ID NO: 91)

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCKASDHINNWLAWYQQKP
GKAPKLLIYGATSLETGV PSRFSGSGSGTDFTFITISSLQ
PEDIATYYCQQYWSTPLTFGGGKLEIK

ヒトκ軽鎖定常領域 (SEQ ID NO: 92):

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ
WKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSSTLTLSKADY
EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

ヒトIgG1重鎖定常領域 (SEQ ID NO: 93):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELLG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD
ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

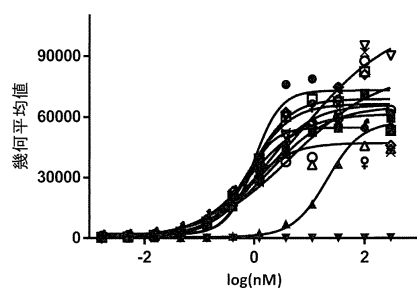
ヒトIgG1m配列 (SEQ ID NO: 94):

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVVTVPSSSLGTQ
TYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCTPPCPAPELVG
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNSTLRVVS SVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRE
EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP
VLDSGDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHY
TQKSLSLSPGK

【図面】

【図1】

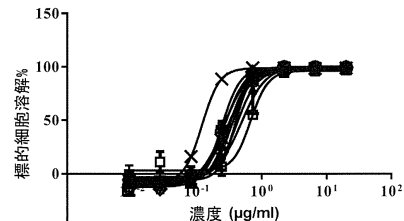
FACS 結合試験-ヒト B7-H3 細胞系



● 12C9F1B5
▲ 38F11B2
◆ 34A9C12
■ 37D11F5B8
✕ 37F11A10
✕ 43H11G12
✕ 47F3F10B4
✕ 47C7E3
● 31H11B1
■ 38D6A4
▲ MGA271
✕ マウス IgG

【図2】

5% NHSC を含有する CHO-K1/B7-H3 細胞の CDC アッセイ



■ DS-5573a
▲ 12C9F1B5-hIgG1
◆ 38F11B2-hIgG1
✕ 34A9C12-hIgG1
● 37D11F5B8-hIgG1
✕ 37F11A10-hIgG1
✕ 43H11G12-hIgG1
▲ 47F3F10B4-hIgG1
■ 47C7E3-hIgG1
● 31H11B1-hIgG1
✕ 38D6A4-hIgG1

10

20

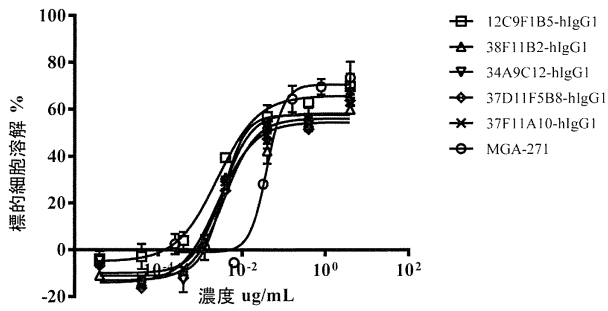
30

40

50

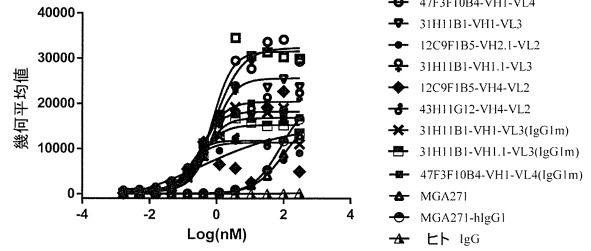
【図 3】

CHO-K1/B7H3&NK92 に対するADCCアッセイ(プレート01)

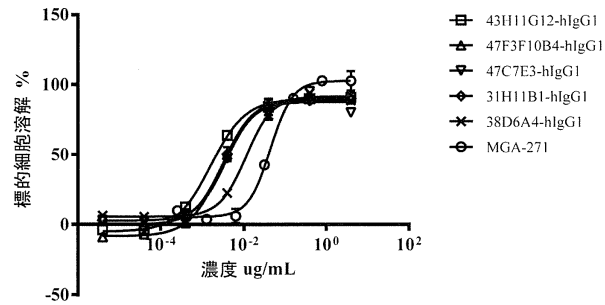


【図 4】

FACS 結合試験-ヒト B7-H3 細胞系

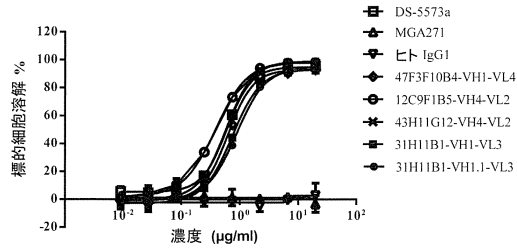


CHO-K1/B7H3&NK92 に対するADCCアッセイ(プレート02)

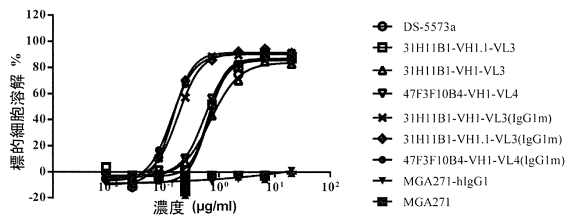


【図 5】

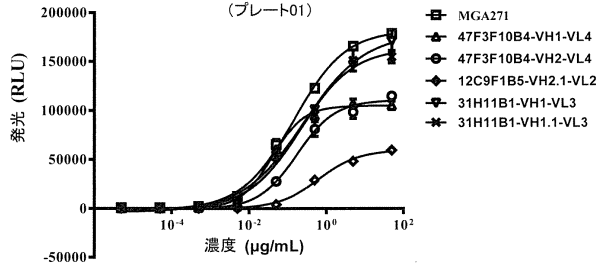
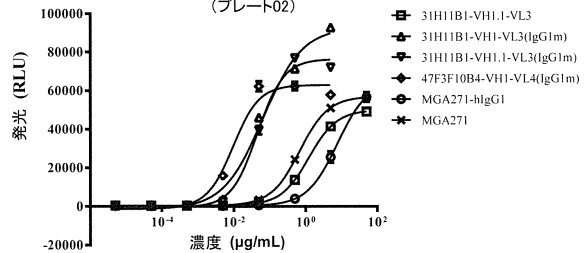
5% NHSCを含有する CHO-K1/B7-H3 細胞のCDCアッセイ(プレート01)



5% NHSC を含有する CHO-K1/B7-H3 細胞のCDCアッセイ(プレート02)



【図 6 - 1】

GS-J2C/CD16Aを用いた A549 に対する
ADCC アッセイ (E:T=6:1)
(プレート01)GS-J2C/CD16Aを用いた A549 に対する
ADCC アッセイ (E:T=6:1)
(プレート02)

10

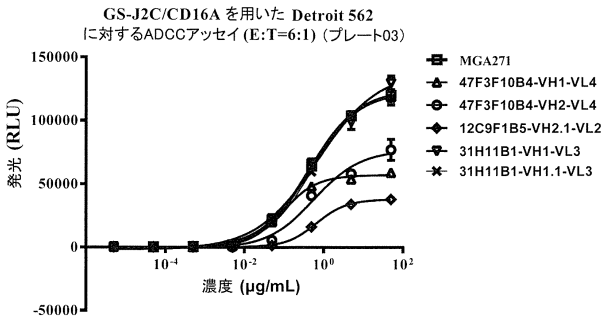
20

30

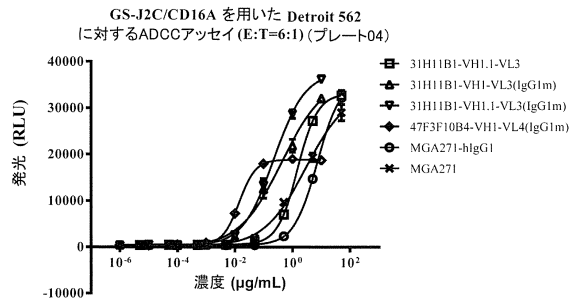
40

50

【図 6 - 2】



10



20

【配列表】

2025508606000001.xml

30

40

50

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/CN2023/074767
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER C07K16/30(2006.01)i;A61K39/395(2006.01)i;A61P35/00(2006.01)i According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K A61P Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNTXT,ENTXT,ENTXTC,DWPL,VEN,CNKI,PubMed,GenBank,EBI-EBML,STN:Nanjing Probio, B7-3H,B7 homolog 3 protein,CD276,B7RP-2,antibody,mAb,antigen-binding,SEQ ID NOs:1-8,81-82,88		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2017214322 A1 (ABBVIE INC.) 14 December 2017 (2017-12-14) claims 1-118, description example 5 table 4	1-35
A	CN 113402610 A (DONGDA BIOTECHNOLOGY (SUZHOU) CO., LTD.) 17 September 2021 (2021-09-17) the whole document	1-35
A	WO 2017214335 A1 (ABBVIE INC.) 14 December 2017 (2017-12-14) the whole document	1-35
A	WO 2017214339 A1 (ABBVIE INC.) 14 December 2017 (2017-12-14) the whole document	1-35
A	WO 2018177393 A1 (JIANGSU HENGRI MEDICINE CO., LTD. et al) 04 October 2018 (2018-10-04) the whole document	1-35
A	WO 2019225787 A1 (ABL BIO INC.) 28 November 2019 (2019-11-28) the whole document	1-35
☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "D" document cited by the applicant in the international application "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 10 April 2023		Date of mailing of the international search report 18 April 2023
Name and mailing address of the ISA/CN CHINA NATIONAL INTELLECTUAL PROPERTY ADMINISTRATION 6, Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing 100088, China		Authorized officer YANG,JiaQian
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No. (+86) 010-53961939

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/074767

Box No. I	Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)
1.	With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing: a. ☒ forming part of the international application as filed. b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)), ☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2.	☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3.	Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/074767

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

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

1. ☒ Claims Nos.: **28-29**
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

The subject matter of claims 28-29 relates to a method of treating cancer, and therefore does not warrant an international search according to the criteria set out in Rule 39.1(iv). However, the search has been carried out and based on the manufacturing of a medicament.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

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

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

I: claims 1-35 (partial, relative to 47F3F10B4) direct to an isolated antibody or an antigen-binding fragment capable of specifically binding to B7-H3, comprising a VH comprising CDR1-3 as SEQ ID NOs: 2-4, and a VL comprising CDR1-3 as SEQ ID NOs: 6-8; the VH having an amino acid sequence as SEQ ID NO: 1, and the VL having an amino acid sequence as SEQ ID NO: 5; an humanized antibody comprising VH as SEQ ID NOs: 81-82, and VL as SEQ ID NO:88; a bispecific antibody; a pharmaceutical composition; a method of treating cancer; use of the antibody;

II-X: claims 1-35 (partial, relative to 12C9F1B5, 34A9C12, 38D6A4, 37D11F5B8, 37F11A10, 43H11G12, 38F11B2, 47C7E3 and 31H11B1 respectively) direct to an isolated antibody or an antigen-binding fragment capable of specifically binding to B7-H3, comprising a VH comprising CDR1-3 as SEQ ID NOs: 10-12, 18-20, 26-28, 34-36, 42-44, 50-52, 58-60, 66-68 or 74-76 and a VL comprising CDR1-3 as SEQ ID NOs: 14-16, 22-24, 30-32, 38-40, 46-48, 54-56, 62-64, 70-72 or 78-80; the VH having an amino acid sequence as SEQ ID NO: 9, 17, 25, 33, 41, 49, 57, 65 or 73, and the VL having an amino acid sequence as SEQ ID NO: 13, 21, 29, 37, 45, 53, 61, 69 or 77; an humanized antibody comprising VH as SEQ ID NOs: 83-87, and VL as SEQ ID NO:89-91; a bispecific antibody; a pharmaceutical composition; a method of treating cancer; use of the antibody.

The same or corresponding technical features among the inventions above are as follows: an antibody specifically binding to B7-H3. However, the same or corresponding technical features above are well known in the art. It follows that the same or corresponding technical features of claims above do not make a contribution over the prior art and can not be considered as special technical features within the meaning of PCT Rule 13.2. The application, hence does not meet the requirement of unity of invention as defined in PCT Rule 13.1.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/074767

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

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: **1-35 (partial)**

Remark on Protest

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2023/074767

Box No. IV	Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)
	Provided is an antibody, such as a monoclonal antibody (mAb), or an antigen-binding fragment thereof, that specifically recognizes B7-H3. Also provided are pharmaceutical compositions, or methods of making and using the antibody or antigen-binding fragment thereof.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/074767

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 111662384 A (GUANGZHOU BIO-GENE TECHNOLOGY CO., LTD.) 15 September 2020 (2020-09-15) the whole document	1-35
A	CN 113527487 A (FOSUN KITE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 22 October 2021 (2021-10-22) the whole document	1-35
A	KONTOS,F.et al. "B7-H3: An Attractive Target for Antibody-based Immunotherapy" <i>Clin. Cancer Res., Vol. 27, No. 5, 01 March 2021 (2021-03-01),</i> pages 1227-1235	1-35

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/074767

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2017214322	A1	14 December 2017	US	2020002421	A1	02 January 2020
				WO	2017214322	A4	01 February 2018
				EP	3468993	A1	17 April 2019
				CA	3027044	A1	14 December 2017
				AU	2017279539	A1	03 January 2019
				JP	2019526529	A	19 September 2019
				BR	112018075653	A2	27 August 2019
				MX	2018015277	A	06 September 2019
				CN	109563167	A	02 April 2019
CN	113402610	A	17 September 2021	None			
WO	2017214335	A1	14 December 2017	US	2017355769	A1	14 December 2017
				US	10640563	B2	05 May 2020
				US	2021171637	A1	10 June 2021
				WO	2017214335	A4	08 March 2018
				EP	3458479	A1	27 March 2019
				EP	3458479	B1	04 January 2020
				EP	3835322	A2	16 June 2021
				EP	3835322	A3	06 October 2021
				CA	3027045	A1	14 December 2017
				AU	2017279550	A1	10 October 2019
				JP	2019528240	A	10 October 2019
				JP	6751165	B2	02 September 2020
				JP	2021006527	A	21 January 2021
				CN	109963870	A	02 July 2019
WO	2017214339	A1	14 December 2017	CN	109641962	A	16 April 2019
				CA	3027103	A1	14 December 2017
				WO	2017214339	A4	08 February 2018
				AU	2017279554	A1	03 January 2019
				BR	112018075649	A2	09 April 2019
				EP	3469000	A1	17 April 2019
				JP	2019521973	W	08 August 2019
				MX	2018015285	A1	18 September 2019
				US	2020338209	A1	29 October 2020
WO	2018177393	A1	04 October 2018	US	2020031934	A1	30 January 2020
				US	10899837	B2	26 January 2021
				BR	112019019111	A2	05 May 2020
				US	2021101984	A1	08 April 2021
				KR	20190134614	A	04 December 2019
				TW	201837056	A	16 October 2018
				RU	2019132843	A	30 April 2021
				RU	2019132843	A3	16 August 2021
				RU	2765306	C2	28 January 2022
				EP	3604337	A1	05 February 2020
				EP	3604337	A4	10 March 2021
				CA	3056474	A1	04 October 2018
				AU	2018243123	A1	26 September 2019
				MX	2019011117	A	05 November 2019
				UA	125593	C2	27 April 2022
				JP	2020515251	A	28 May 2020

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

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/074767

Patent document cited in search report				Publication date (day/month/year)		Patent family member(s)		Publication date (day/month/year)	
						JP	7158403	B2	21 October 2022
						CN	109937212	A	25 June 2019
WO	2019225787	A1	28 November 2019			EP	3802612	A1	14 April 2021
						EP	3802612	A4	23 March 2022
						JP	2021524746	A	11 October 2021
						JP	7150880	B2	11 October 2022
						KR	20210003295	A	11 January 2021
						CN	112189021	A	05 January 2021
						WO	2019226017	A1	28 November 2019
CN	111662384	A	15 September 2020			None			
CN	113527487	A	22 October 2021			None			

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

テーマコード (参考)

C 0 7 K 16/46 (2006.01)**A 6 1 K 45/00****C 1 2 N 15/13 (2006.01)****C 0 7 K 16/46****C 1 2 N 15/62 (2006.01)****C 1 2 N 15/13****C 1 2 N 15/62****Z**

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

(72)発明者

チョンダオ、リ

中華人民共和国、チアンス、ナンジン、ジャンニン、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、28

(72)発明者

チョウ、ファン

中華人民共和国、チアンス、ナンジン、ジャンニン、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、28

(72)発明者

ウェンシュアン、ジャ

中華人民共和国、チアンス、ナンジン、ジャンニン、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、28

(72)発明者

クイエン、シャオ

中華人民共和国、チアンス、ナンジン、ジャンニン、サイエンス、パーク、ヨンシー、ロード、28

F ターム (参考)

4C076 AA95 BB11 CC27 CC41 EE59 FF70

4C084 AA19 NA05 ZB261 ZB262 ZC752

4C085 AA14 AA21 BB01 BB41 BB43 BB44 DD61 EE01 EE03

4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 CA40 DA76 EA28 FA72 FA74