

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公表特許公報(A)

(11)公表番号

特表2025-507817

(P2025-507817A)

(43)公表日 令和7年3月21日(2025.3.21)

(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	Z N A	4 C 0 7 6
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13		4 C 0 8 4
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 K	47/68		4 C 0 8 5
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	45/00		4 C 0 8 6
A 6 1 K	38/07 (2006.01)	A 6 1 K	38/07		4 H 0 4 5
		審査請求	未請求	予備審査請求	未請求 (全46頁) 最終頁に続く

(21)出願番号	特願2024-551663(P2024-551663)	(71)出願人	524320770
(86)(22)出願日	令和5年2月27日(2023.2.27)		ネクチン セラピューティクス リミテッド
(85)翻訳文提出日	令和6年10月25日(2024.10.25)		イスラエル国 9 1 3 9 0 0 2 エルサレ
(86)国際出願番号	PCT/IL2023/050203		ム、ハイ - テク キャンパス ギバット
(87)国際公開番号	WO2023/161943		ラム、ピー . オー . ボックス 3 9 1 3 5
(87)国際公開日	令和5年8月31日(2023.8.31)	(74)代理人	110000855
(31)優先権主張番号	63/314,490		弁理士法人浅村特許事務所
(32)優先日	令和4年2月28日(2022.2.28)	(72)発明者	ツッカーマン、ピンカス
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		イスラエル国 エルサレム、シュムエル
(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	(72)発明者	アティエ、アナス
			イスラエル国 9 7 1 3 8 2 5 エルサレ
			ム、シュウファート、アル - ハジャジ
			ベン ユセフ 2 4、ピー . オー . ボック
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 ネクチン - 2 に対するヒト化抗体及びその薬物コンジュゲート

(57)【要約】

本開示は、高い親和性及び特異性でヒトネクチン - 2 を認識し、C D 1 1 2 R へのその結合を阻害するヒト化モノクローナル抗体を提供する。これらの抗体は細胞傷害性ペイロードを担持し、F c ガンマ受容体と相互作用しない。本開示はさらに、抗体を含む医薬組成物及びがん免疫治療におけるそれらの使用方法を提供する。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒトネクチン - 2 に特異的に結合するヒト化抗体又は少なくとも抗原結合部位を含むその断片であって、前記抗体又はその断片が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、前記重鎖可変領域が、

(i) 配列番号 1 ~ 3 に示される配列を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

(i i) 4 つの重鎖 (H C) フレームワーク (F R) 配列のセットであって、 F R - H 1 が配列番号 2 1、2 5 及び 2 7 からなる群から選択され ; F R - H 2 が配列番号 2 2 であり ; F R - H 3 が配列番号 2 3、2 6、2 8 及び 2 9 からなる群から選択され ; F R - H 4 が配列番号 2 4 である、4 つの重鎖 (H C) フレームワーク (F R) 配列のセット ;
を含み、

10

前記軽鎖可変領域が、

(i) 配列番号 4 ~ 6 に示される配列を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

(i i) 4 つの軽鎖 (L C) フレームワーク (F R) 配列のセットであって、 F R - L 1 が配列番号 3 0、3 4、3 7 及び 3 9 からなる群から選択され ; F R - L 2 が配列番号 3 1 及び 3 5 からなる群から選択され ; F R - L 3 が配列番号 3 2、3 6、3 8 及び 4 0 からなる群から選択され ; F R - L 4 が配列番号 3 3 である、4 つの軽鎖 (L C) フレームワーク (F R) 配列のセット

を含む、ヒト化抗体又はその断片。

【請求項 2】

20

前記重鎖が、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 からなる群から選択される可変領域配列を含み、前記軽鎖が、配列番号 1 2、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択される可変領域配列を含む、請求項 1 に記載のヒト化抗体。

【請求項 3】

前記ヒト化抗体又はその断片が、以下 :

(i) 重鎖が配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖が配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する可変領域を含む ;

(i i) 重鎖が配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖が配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する可変領域を含む ;

30

(i i i) 重鎖が配列番号 1 3 のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖が配列番号 1 7 のアミノ酸配列を有する可変領域を含む ;

(i v) 重鎖が配列番号 1 4 のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖が配列番号 1 8 のアミノ酸配列を有する可変領域を含む ;

(v) 重鎖が配列番号 1 5 のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖が配列番号 1 9 のアミノ酸配列を有する可変領域を含む ; 及び

(v i) 重鎖が配列番号 1 6 のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖が配列番号 2 0 のアミノ酸配列を有する可変領域を含む ;

からなる群から選択される重鎖及び軽鎖を含む、請求項 1 又は 2 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

40

【請求項 4】

前記ヒト化抗体又はその断片が重鎖及び軽鎖を含み、重鎖が配列番号 1 1 と少なくとも約 9 5 % 同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖が配列番号 1 2 と少なくとも約 9 5 % 同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 5】

前記ヒト化抗体又はその断片が重鎖及び軽鎖を含み、重鎖が配列番号 1 1 のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖が配列番号 1 2 のアミノ酸配列を有する可変領域を含む、請求項 4 に記載のヒト化抗体。

【請求項 6】

50

ヒト化モノクローナル抗体が I g G 1、I g G 4 及び I g G 2 から選択される重鎖定常領域を有する、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 7】

F c R 媒介性内在化を防止する突然変異 F c ドメインを有する、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載のヒト化抗体。

【請求項 8】

前記 F c ドメインが、F c 受容体への結合についてヌルである、請求項 7 に記載のヒト化抗体。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の抗体又はその断片を含むコンジュゲート。

10

【請求項 10】

前記ヒト化抗体又はその断片が、細胞傷害性部分、放射性部分、親和性部分又は標識部分と結合している、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 11】

前記ヒト化抗体又はその断片が毒素（ペイロード）と結合している、請求項 9 に記載のコンジュゲート。

【請求項 12】

前記毒素が、微小管阻害剤、DNA 合成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤及び RNA ポリメラーゼ阻害剤からなる群から選択される、請求項 11 に記載のコンジュゲート。

【請求項 13】

前記微小管阻害剤がアウリスタチン又はその誘導体である、請求項 12 に記載のコンジュゲート。

20

【請求項 14】

前記アウリスタチン誘導体が、モノメチルアウリスタチン E（MMAE）又はモノメチルアウリスタチン F（MMAF）である、請求項 13 に記載のコンジュゲート。

【請求項 15】

前記毒素がメイタンシン誘導体である、請求項 12 に記載のコンジュゲート。

【請求項 16】

前記メイタンシン誘導体が DM4 又は DM1 である、請求項 15 に記載のコンジュゲート。

30

【請求項 17】

前記毒素が DNA トポイソメラーゼ I（TOP1）阻害剤である、請求項 12 に記載のコンジュゲート。

【請求項 18】

前記 DNA トポイソメラーゼ I（TOP1）阻害剤が DXd である、請求項 17 に記載のコンジュゲート。

【請求項 19】

前記 DNA トポイソメラーゼ I（TOP1）阻害剤が SN-38 である、請求項 17 に記載のコンジュゲート。

【請求項 20】

前記抗体と前記毒素がリンカーを介して接続されている、請求項 11 に記載のコンジュゲート。

40

【請求項 21】

前記リンカーが切断可能である、請求項 20 に記載のコンジュゲート。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のヒト化抗体又はその断片の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列。

【請求項 23】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載のヒト化抗体若しくは抗原結合断片、及び / 又は請求項 9 ~ 20 のいずれか一項に記載のコンジュゲート、並びに薬学的に許容され得る賦形

50

剤、担体又は希釈剤を含む医薬組成物。

【請求項 24】

がんの処置に使用するための、請求項 23 に記載の医薬組成物。

【請求項 25】

がんの処置を必要とする対象に、治療有効量の請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのヒト化抗体若しくはその断片又は請求項 9 ~ 21 のいずれか一項に記載のコンジュゲートを投与することを含む、がんを処置する方法。

【請求項 26】

前記がんが固形がんである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

前記がんが、前立腺がん、結腸直腸がん、肝臓がん、卵巣がん、子宮内膜がん、胃がん、甲状腺がん、カルチノイド腫瘍、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、精巣がん、尿路上皮がん、子宮頸がん、黒色腫、リンパ腫及び肺がんからなる群から選択される、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 28】

前記がんが結腸直腸腺がん又は肺腺がんである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 29】

前記がんが血液がんである、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 30】

少なくとも 1 つの追加の抗がん治療を投与又は実施することをさらに含む、請求項 25 ~ 29 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 31】

対象のがんを診断又は予後診断する方法であって、請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つのヒト化抗体又は断片を使用して、前記対象の生物学的試料中のネクチン - 2 の発現レベルを決定することを含む方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫治療の分野にあり、疾患、特にがんを処置するための、抗ネクチン - 2 抗体及び抗体 - コンジュゲート並びにそれらを含む治療用及び診断用組成物に関する。

【背景技術】

【0002】

がん免疫治療は、例えば腫瘍細胞上の抗原に特異的な抗体での処置によって、又は抗腫瘍 T 細胞の特異的活性化によって、抗腫瘍免疫応答を生成及び増強するために利用される。患者の腫瘍細胞に対して免疫細胞（例えば、T 細胞）を動員する能力は、そうでなければ不治と考えられるがんタイプ及び転移と戦う治療様式を提供する。

【0003】

T 細胞媒介性免疫応答は、免疫応答の大きさを制御する共刺激シグナルと共阻害シグナルとの間のバランスによって調節される複数の連続工程を含む。免疫チェックポイントと呼ばれる阻害シグナルは、自己寛容の維持及び免疫媒介性の付随的な組織損傷の制限にとって重要である。これらの阻害シグナルは、T 細胞の応答に影響を及ぼし、免疫応答を再形成する。

【0004】

ポリオウイルス受容体関連タンパク質 2、ポリオウイルス受容体様 2、CD112 又は PRR - 2 と呼ばれたネクチン - 2 は、2 つの Ig 様 C2 型ドメイン及び 1 つの Ig 様 V 型ドメインを有するシングルパス膜貫通糖タンパク質である。ネクチン - 2 は、細胞外マトリックス分子への細胞接着の媒介に関与し、接着性接合部の原形質膜成分の 1 つとして機能する。それはまた、単純ヘルペスウイルス及び仮性狂犬病ウイルスの特定の突然変異株の侵入受容体としても機能し、これらのウイルスの細胞間拡散に関与している。この遺伝子の変異は、多発性硬化症の重症度の違いに関連している。重要なことに、ネクチン

10

20

30

40

50

- 2 は、T細胞シグナル伝達の調節剤としても機能し得る。それは、これらの標的細胞に結合する受容体に応じて、T細胞機能の共刺激剤又は共阻害剤のいずれかであり得る：CD226 (DNAM-1) に結合すると、T細胞増殖並びにIL-2及びIFN- γ のものを含むサイトカイン産生を刺激するが、PVRIG (CD112R) 及び/又はTIGIT (免疫グロブリン及びITIMドメインを有するT細胞免疫受容体) と相互作用すると、T細胞増殖及び活性化を阻害する。これらの相反する相互作用は競合的である。

【0005】

ネクチン-2は、乳がん及び卵巣がんを含む様々な腫瘍において過剰発現されることが示された (Oshima et al. *Molecular Cancer*, 2013, 12:60)。腫瘍細胞上のネクチン-2の存在は、予後不良及びT細胞の活性低減をもたらす (Stamm et al. *Oncogene* (2018) 37:5269-5280)。

10

【0006】

米国特許出願第2017/0037133号は、血液媒介がん、特に急性骨髄性白血病 (AML) の処置に使用するためのCD112 (ネクチン-2、PVR12)、CD155 (PVR)、ガレクチン-9、TIM-3及び/又はTIGITに対する阻害剤 (例えば、抗体) を開示している。

【0007】

国際特許出願番号WO 2020/144697は、がんの処置を使用するための、ヒトネクチン-2を認識し、TIGIT及びCD112Rとの相互作用を遮断するモノクローナル抗体 (mAb) を開示している。

20

【0008】

抗体-薬物コンジュゲート (ADC) は、直接的な腫瘍細胞の死滅及びその結果としてのバスタインダー免疫細胞の活性化の両方のための有望なツールである。これらの治療実体は、細胞傷害性薬物 (ペイロード) に連結されたmAbから構成され、原則として、標的抗原を発現する細胞に送達を特異的に制限することによってそれらの薬物の治療域を広げ、したがってそれらの全身曝露及び毒性を低減するように設計される。

【0009】

可能なペイロードの一例は、微小管破壊薬であるアウリスタチンである。これは、ドラスタチンと呼ばれる海産無殻軟体動物ドーラベラ・アウリキュラ (*Dolabella auricularia*) に由来した。モノメチルアウリスタチンE (MMAE) 及びモノメチルアウリスタチンF (MMAF) などのアウリスタチンの様々な誘導体が合成されている。MMAE及びMMAFはSeattle Geneticsによって開発され、ADCのペイロードとして使用された。MMAF及びMMAEは、それらの利点及び欠点を有する。MMAEは、MMAFよりも膜透過性が高く、IC50が低い。しかしながら、MMAFはより親水性であり、MMAEよりも低い全身毒性を示す低い凝集傾向を有する (park et al. *Molecules* 2019, 24, 2754)。

30

【0010】

安全で強力であり、ネクチン-2発現が関与する疾患における診断的及び治療的使用のために、例えばがんにおけるADCとして、単独で又は標的化ツールとして使用することができるヒトネクチン-2を認識するヒト化抗体を提供するという満たされていない必要性がある。

40

【発明の概要】

【0011】

本発明は、ネクチン-2に特異的に結合するヒト化抗体を提供する。抗体クローンのより大きな集合から選択される本発明のヒト化抗体は、他の抗ネクチン-2抗体と比較して改善された特性を有する。本発明はさらに、いくつかの実施形態によれば、抗体及び診断剤又は治療剤を含むコンジュゲートを提供する。いくつかの実施形態では、コンジュゲートは、当該ヒト化抗体によって、ネクチン-2受容体を表面に提示する腫瘍細胞に対して標的化される細胞傷害性部分を含む。

50

【 0 0 1 2 】

相補性決定領域（CDR）配列及びヒトフレームワーク（FW）配列の特定のセットを組み合わせ、これらの配列に特定の突然変異を導入して、改変された可変領域及び改善された特性を有する抗体を作製することによって、ヒト化抗体の大きな集合を作製した。有利には、本明細書に記載の新規に設計されたヒト化可変領域は、潜在的なT細胞エピトープの発生率をより低くし、したがって抗体に対する有害な免疫応答のリスクを最小限に抑えながら、抗体のコンフォメーション及び結合親和性の維持に重要な残基を保存する。本明細書に開示される抗体は、相同性、T細胞エピトープ、重要な残基、及び予測される構造を含む因子に基づいて設計された。予想外にも、本明細書中に開示されるヒト化抗体は、親キメラ抗体と比較して改善された生物安定性を示す。

10

【 0 0 1 3 】

本明細書に開示されるヒト化抗体は、治療毒素を用いた標的化抗がん治療としての使用に非常に適していることが分かった。細胞傷害性部分にコンジュゲートした本明細書に記載の抗ネクチン - 2モノクローナルヒト化抗体は、様々な腫瘍細胞株の強力な死滅を示すことがここで開示される。本明細書中に記載される抗体を使用する毒素の直接的な標的化は、これらの毒素の抗腫瘍効果を増加させ、それらの全身毒性を低減させ、したがってがん患者の生存を改善する可能性を有する。

【 0 0 1 4 】

ヒトFc受容体（FcR）は、抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び抗体依存性細胞食作用（ADCP）などのFcエフェクター機能を活性化する。本発明のADCのいくつかは、免疫細胞上に発現されるFcRによるそれらの結合を有意に低減させ、それによってそれらの安全性及び特異性を増加させる1つ又は複数のFc突然変異を含む。ここで、特異的Fc突然変異を有しており毒素に連結された抗ネクチン - 2モノクローナルヒト化抗体を含むADCが非常に有効かつ安全であり、抗がん治療に適していることが開示される。

20

【 0 0 1 5 】

本発明の発明者らは、ネクチン - 2を標的とするADCががん、特に固形腫瘍の処置に非常に有用であることを初めて示した。

【 0 0 1 6 】

第1の態様によれば、本発明は、ヒトネクチン - 2に特異的に結合するヒト化抗体又は少なくとも抗原結合部位を含むその断片であって、重鎖（HC）及び軽鎖（LC）を含み、重鎖が、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号15及び配列番号16からなる群より選択される配列と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含み；軽鎖が、配列番号12、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択される配列と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含む、抗体又はその断片を提供する。

30

【 0 0 1 7 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖は配列番号11と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含み、軽鎖は配列番号12と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含む。

40

【 0 0 1 8 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は重鎖及び軽鎖を含み、重鎖可変領域は配列番号11に示される配列を含み、軽鎖可変領域は配列番号12に示される配列を含む。

【 0 0 1 9 】

所与の抗体分子のCDR配列を決定するための当技術分野で公知のいくつかの方法があるが、標準的な明確な方法はない。抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域からのCDR配列の決定は、KABAT、Chothia及びIMGTとして公知の方法を含むがこれらに限定されない、当技術分野で公知の任意の方法に従って行うことができる。CDRの選択されたセットは、1つよりも多くの方法によって同定された配列を含んでもよく、すな

50

わち、例えば、いくつかのCDR配列はK A B A Tを使用して決定され、いくつかはI M G Tを使用して決定され得る。いくつかの実施形態によれば、m A b可変領域のCDR配列は、I M G T法を用いて決定される。

【0020】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、6つのCDR配列のセットを含み、配列S Y Wを含む重鎖CDR 1、配列V Y P G N S D S（配列番号8）を含む重鎖CDR 2、配列L V G T F D Y（配列番号3）を含む重鎖CDR 3、配列Q N V G I N（配列番号10）を含む軽鎖CDR 1、配列S A Sを含む軽鎖CDR 2、及び配列Q Q Y N T N P F T（配列番号6）を含む軽鎖CDR 3である。

【0021】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、6つのCDR配列のセットを含み、配列S Y W I H（配列番号1）を含む重鎖CDR 1、配列A V Y P G N S D S N Y N Q K F（K A / Q G）（配列番号2）を含む重鎖CDR 2、配列L V G T F D Y（配列番号3）を含む重鎖CDR 3、配列（K / R）A S Q N V G I N V（V / A）（配列番号4）を含む軽鎖CDR 1、配列S A S Y R Y S（配列番号5）を含む軽鎖CDR 2、及び配列Q Q Y N T N P F T（配列番号6）を含む軽鎖CDR 3である。

【0022】

いくつかの実施形態によれば、重鎖CDR 2は、配列A V Y P G N S D S N Y N Q K F K A（配列番号41）又はA V Y P G N S D S N Y N Q K F Q G（配列番号42）を含む。特定の実施形態によれば、軽鎖CDR 1は、K A S Q N V G I N V V（配列番号43）、K A S Q N V G I N V A（配列番号44）、R A S Q N V G I N V V（配列番号45）及びR A S Q N V G I N V A（配列番号46）からなる群から選択される配列を含む。

【0023】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、配列番号1、2、3、4、5、及び6に示される6つのCDR配列のセットを含む。追加の例示的な実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、配列番号7、8、9、10、（S A S）、及び6に示される6つのCDR配列のセットを含む。追加の実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、配列番号1、41、3、43、5、及び6に示される6つのCDR配列のセットを含む。

【0024】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその抗原結合断片は重鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、

i . 配列番号1～3に示される配列を含む3つのCDR配列のセット；及び
 i i . F R - H 1が配列番号21、25及び27からなる群から選択され；F R - H 2が配列番号22であり；F R - H 3が配列番号23、26、28及び29からなる群から選択され；F R - H 4が配列番号24である、4つの重鎖フレームワーク（F R）配列のセット
 を含む。

【0025】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその抗原結合断片は軽鎖可変領域を含み、軽鎖可変領域は、

i . 配列番号4～6に示される配列を含む3つのCDR配列のセット；及び
 i i . F R - L 1が配列番号30、34、37及び39からなる群から選択され；F R - L 2が配列番号31及び35からなる群から選択され；F R - L 3が配列番号32、36、38及び40からなる群から選択され；F R - L 4が配列番号33である、4つの軽鎖フレームワーク（F R）配列のセット
 を含む。

【0026】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその抗原結合断片は重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、

10

20

30

40

50

i . 配列番号 1 ~ 3 に示される配列を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

i i . F R - H 1 が配列番号 2 1、2 5 及び 2 7 からなる群から選択され ; F R - H 2 が配列番号 2 2 であり ; F R - H 3 が配列番号 2 3、2 6、2 8 及び 2 9 からなる群から選択され ; F R - H 4 が配列番号 2 4 である、4 つの重鎖フレームワーク配列のセット ;
を含み、

軽鎖可変領域は、

i . 配列番号 4 ~ 6 に示される配列を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

i i . F R - L 1 が配列番号 3 0、3 4、3 7 及び 3 9 からなる群から選択され ; F R - L 2 が配列番号 3 1 及び 3 5 からなる群から選択され ; F R - L 3 が配列番号 3 2、3 6、3 8 及び 4 0 からなる群から選択され ; F R - L 4 が配列番号 3 3 である、4 つの軽鎖フレームワーク配列のセット

を含む。

【 0 0 2 7 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその抗原結合断片は重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域は、

i . 配列番号 7 ~ 9 に示される配列を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

i i . F R - H 1 が配列番号 2 1、2 5 及び 2 7 からなる群から選択され ; F R - H 2 が配列番号 2 2 であり ; F R - H 3 が配列番号 2 3、2 6、2 8 及び 2 9 からなる群から選択され ; F R - H 4 が配列番号 2 4 である、4 つの重鎖フレームワーク配列のセット ;
を含み、

軽鎖可変領域は、

i . 配列番号 1 0、配列 S A S、及び配列番号 6 に示される配列を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

i i . F R - L 1 が配列番号 3 0、3 4、3 7 及び 3 9 からなる群から選択され ; F R - L 2 が配列番号 3 1 及び 3 5 からなる群から選択され ; F R - L 3 が配列番号 3 2、3 6、3 8 及び 4 0 からなる群から選択され ; F R - L 4 が配列番号 3 3 である、4 つの軽鎖フレームワーク配列のセット

を含む。

【 0 0 2 8 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化モノクローナル抗体の重鎖可変領域は、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 からなる群より選択される配列と少なくとも約 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含み ; 軽鎖可変領域は、配列番号 1 2、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択される配列と少なくとも約 9 5 % 同一のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ヒト化モノクローナル抗体の重鎖可変領域は、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 からなる群より選択される配列と少なくとも約 9 7 % 同一のアミノ酸配列を含み ; 軽鎖可変領域は、配列番号 1 2、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択される配列と少なくとも約 9 7 % 同一のアミノ酸配列を含む。特定の実施形態では、ヒト化モノクローナル抗体の重鎖可変領域は、配列番号 1 1、配列番号 1 3、配列番号 1 4、配列番号 1 5 及び配列番号 1 6 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含み ; 軽鎖可変領域は、配列番号 1 2、配列番号 1 7、配列番号 1 8、配列番号 1 9 及び配列番号 2 0 からなる群から選択されるアミノ酸配列を含む。

【 0 0 2 9 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、モノクローナル抗体、F a b、F (a b)₂、単ドメイン抗体、又は一本鎖可変断片 (s c F v) である。

【 0 0 3 0 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、I g G モノクローナル抗体である。いくつかの実施形態によれば、ヒト化モノクローナル抗体は、I g G 4、I g G 1 及び I g G 2 から選択される重鎖定常領域を含む。特定の実施形態では、ヒト化抗体又

10

20

30

40

50

はその断片は、I g G 4 サブクラスである。特定の実施形態では、ヒト化抗体又はその抗原結合断片は、I g G 1 サブクラスである。

【 0 0 3 1 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化モノクローナル抗体は、カッパ軽鎖定常領域を含む。

【 0 0 3 2 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化モノクローナル抗体は、配列番号 4 7 に示される配列と少なくとも約 9 0 %、9 5 % 又は 9 8 % 同一のアミノ酸配列を含む重鎖を有する I g G 1 である。特定の例示的な実施形態によれば、ヒト化モノクローナル抗体は、配列番号 4 7 に示されるアミノ酸配列を含む重鎖を有する I g G 1 である。

10

【 0 0 3 3 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化モノクローナル抗体は、配列番号 4 9 に示される配列と少なくとも約 9 0 %、9 5 %、又は 9 8 % 同一のアミノ酸配列を含むカッパ軽鎖を有する。特定の例示的な実施形態によれば、ヒト化モノクローナル抗体は、配列番号 4 9 に示されるアミノ酸配列を含むカッパ軽鎖を有する。

【 0 0 3 4 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体は、F c R 媒介性内在化を防止する突然変異 F c ドメインを有する。

【 0 0 3 5 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体は、F c ヌルドメインを含む。特定の実施形態によれば、F c ドメインは、免疫細胞上に見出される F c 受容体への結合についてヌルである。特定の例示的な実施形態によれば、F c ドメインは、C D 6 4、C D 3 2 a、C D 3 2 b、C D 1 6 a 及び / 又は C D 1 6 b への結合についてヌルである。

20

【 0 0 3 6 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体は、I g G 1 F c ドメインを含む。特定の実施形態によれば、I g G 1 F c ドメインは、F c 受容体への結合についてヌルである。追加の実施形態によれば、I g G 1 F c ドメインは、1 つ又は複数の F c 受容体への結合についてヌルである。特定の例示的な実施形態によれば、I g G 1 F c ドメインは、C D 6 4、C D 3 2 a、C D 3 2 b、C D 1 6 a 及び / 又は C D 1 6 b への結合についてヌルである。

30

【 0 0 3 7 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体は、(i) 突然変異 L 2 3 5 S を有するヒト I g G 1 ; (i i) 突然変異 L 2 3 5 S 及び E 2 7 2 K を有するヒト I g G 1 ; (i i i) 突然変異 G 2 3 7 I を有するヒト I g G 1 ; (i v) 突然変異 G 2 3 7 I 及び E 2 7 2 I を有するヒト I g G 1 ; (v) 突然変異 G 2 3 7 I 及び V 2 6 4 R を有するヒト I g G 1 ; (v i) 突然変異 V 2 1 5 A、E 2 6 9 R 及び K 3 2 2 A を有するヒト I g G 1 ; (v i i) 突然変異 L 2 3 4 A、L 2 3 5 A 及び P 3 2 9 G を有するヒト I g G 1 ; (v i i i) 突然変異 S 2 2 8 P、L 2 3 5 P 及び V 2 6 4 R を有するヒト I g G 4 ; (i x) 突然変異 P 2 3 8 H を有するヒト I g G 2 ; 又は (x) 突然変異 P 2 3 8 H 及び V 2 6 4 R を有するヒト I g G 2 からなる群から選択されるヒト I g G を含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

40

【 0 0 3 8 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体は、配列番号 6 1 ~ 7 0 からなる群より選択される重鎖配列を含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【 0 0 3 9 】

いくつかの実施形態によれば、上記のヒト化抗体又はその断片を含むコンジュゲートが提供される。

【 0 0 4 0 】

本発明による抗体又はその断片は、いくつかの実施形態によれば、細胞傷害性部分、放射性部分、又は親和性若しくは標識タグに結合される。

50

【 0 0 4 1 】

本発明による抗体 - 薬物コンジュゲート (ADC) は、本明細書に記載のヒト化抗体、場合によりリンカー、及び毒素を含む。

【 0 0 4 2 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、毒素 (ペイロード) に直接又はリンカーを介してコンジュゲートされる。

【 0 0 4 3 】

いくつかの実施形態によれば、毒素は、微小管阻害剤、DNA合成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤及びRNAポリメラーゼ阻害剤からなる群から選択される。

【 0 0 4 4 】

特定の実施形態によれば、毒素は、微小管破壊薬である。特定の例示的な実施形態によれば、毒素はアウリスタチン又はその誘導体である。特定の実施形態によれば、アウリスタチン誘導体は、モノメチルアウリスタチンE (MMAE) 又はモノメチルアウリスタチンF (MMAF) である。

【 0 0 4 5 】

いくつかの実施形態によれば、毒素はサポリンである。

【 0 0 4 6 】

いくつかの実施形態によれば、毒素はメイトンシン誘導体である。特定の実施形態によれば、メイトンシン誘導体は、DM4 又はDM1 である。

【 0 0 4 7 】

いくつかの実施形態によれば、毒素はキノリンアルカロイドである。特定の実施形態によれば、キノリンアルカロイドはSN-38 である。

【 0 0 4 8 】

いくつかの実施形態によれば、毒素は、DNAトポイソメラーゼI (TOP1) 阻害剤である。いくつかの実施形態によれば、DNAトポイソメラーゼI (TOP1) 阻害剤は、エキサテカン又はエキサテカン誘導体である。特定の実施形態によれば、DNAトポイソメラーゼI (TOP1) 阻害剤はDXd である。

【 0 0 4 9 】

いくつかの実施形態によれば、毒素は抗体に直接接続される。他の実施形態によれば、抗体及び毒素は、リンカー又はスペーサーを介して接続される。いくつかの実施形態によれば、毒素は、直接又はリンカー若しくはスペーサーを介してヒト化抗体に共有結合している。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【 0 0 5 0 】

いくつかの実施形態によれば、リンカーは切断可能である。他の実施形態によれば、リンカーは切断可能ではない。いくつかの実施形態によれば、リンカーは酵素的に切断可能なリンカーである。特定の実施形態によれば、リンカーはpH感受性リンカーである。いくつかの実施形態によれば、リンカーは還元性リンカー (スルホ - SPDB) である。

【 0 0 5 1 】

いくつかの実施形態によれば、リンカーは、マレイミドカプロイル (MC)、マレイミドカプロイル - バリン - シトルリン - p - アミノ - ベンジルオキシカルボニル (MC - VC - PAB)、マレイミドメチルシクロヘキサン - 1 - カルボキシラート (SMCC)、N - スクシンイミジル - 4 - (2 - ピリジルジチオ) ブタノアート (SPDB) 及びLys - PAB - CO (リジン - アミノベンジル - C = O) からなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【 0 0 5 2 】

いくつかの実施形態によれば、上記の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列が提供される。

【 0 0 5 3 】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列はヒト化抗体重鎖可変領域をコードし、ポリヌクレオチドは、配列番号51 ~ 55 又は少なくとも80% の配列同一性を有

10

20

30

40

50

するそのバリエーションからなる群から選択される配列を含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0054】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列はヒト化抗体軽鎖可変領域をコードし、ポリヌクレオチドは、配列番号56～60又は少なくとも80%の配列同一性を有するそのバリエーションからなる群から選択される配列を含む。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0055】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列はヒト化抗体重鎖可変領域をコードし、ポリヌクレオチドは、配列番号51～55からなる群から選択される配列を含む。いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列はヒト化抗体軽鎖可変領域をコードし、ポリヌクレオチドは、配列番号56～60からなる群から選択される配列を含む。

10

【0056】

いくつかの実施形態によれば、ポリヌクレオチド配列はヒト化抗体重鎖可変領域をコードし、当該ポリヌクレオチドは配列番号51に記載の配列を含む。いくつかの実施形態によれば、当該ポリヌクレオチド配列はヒト化抗体軽鎖可変領域をコードし、ポリヌクレオチドは配列番号56に記載の配列を含む。

【0057】

いくつかの実施形態によれば、上記のヒト化抗体の重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド配列が提供される。

20

【0058】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体重鎖をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号48に示される配列又は少なくとも80%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体軽鎖をコードするポリヌクレオチド配列は、配列番号50に示される配列又は少なくとも80%の配列同一性を有するそのバリエーションを含む。

【0059】

いくつかの実施形態によれば、本明細書に記載のヒト化抗体のアミノ酸鎖をコードするDNA配列は、リーダー配列を含む。特定の例示的な実施形態によれば、DNA配列は、配列番号71に記載のリーダーペプチド配列をコードする。

30

【0060】

さらなる態様では、本発明は、本明細書に記載の少なくとも1つのヒト化抗体鎖又はその断片をコードする核酸分子を含む核酸構築物を提供する。いくつかの実施形態によれば、核酸構築物はプラスミドである。

【0061】

本発明の抗体をコードする核酸を含む細胞株も記載される。細胞株は、本明細書に記載のヒト化抗体又はその断片を発現させるためのものである。特定の実施形態では、細胞株は、チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞株などの哺乳動物細胞株である。

【0062】

本発明は、別の態様によれば、本明細書に記載のヒト化抗体若しくは抗原結合断片、又は抗体と薬学的に許容され得る賦形剤、担体、若しくは希釈剤とを含むコンジュゲートを含む医薬組成物を提供する。

40

【0063】

いくつかの実施形態によれば、医薬組成物は、がんの処置に使用するものである。

【0064】

非経口及び経腸投与モードを含む任意の投与モードを使用して、本発明の組成物をそれを必要とする対象に送達してもよい。

【0065】

いくつかの実施形態によれば、医薬組成物は、注射又は注入のために製剤化される。い

50

くつかの実施形態によれば、医薬組成物は、静脈内投与のために製剤化される。特定の実施形態では、医薬組成物は、腫瘍内投与のために製剤化される。

【0066】

さらに別の態様によれば、本発明は、がんの処置を必要とする対象に、治療有効量の本明細書に記載の少なくとも1つのヒト化抗体又はそのコンジュゲートを投与することを含む、がんを処置する方法を提供する。

【0067】

いくつかの実施形態によれば、がんは、ネクチン - 2 の過剰発現を特徴とする。

【0068】

特定の実施形態では、がんは固形腫瘍を含む。

10

【0069】

特定の実施形態では、がんは、前立腺がん、結腸直腸がん、肝臓がん、卵巣がん、子宮内膜がん、胃がん、甲状腺がん、カルチノイド腫瘍、頭頸部がん、乳がん、膵臓がん、精巣がん、尿路上皮がん、子宮頸がん、黒色腫、リンパ腫及び肺がんからなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0070】

いくつかの実施形態によれば、がんは乳がんである。いくつかの実施形態によれば、がんは、結腸直腸腺がん又は肺腺がんである。

【0071】

他の実施形態によれば、がんは血液がんである。いくつかの実施形態によれば、血液がんは、急性骨髄性白血病 (AML)、慢性骨髄性白血病 (CML)、急性リンパ性白血病 (ALL)、及び慢性リンパ性白血病 (CLL) を含む白血病；ホジキン病、及び非ホジキンリンパ腫を含むリンパ腫；並びに多発性骨髄腫から選択される。

20

【0072】

いくつかの実施形態によれば、対象はヒトである。

【0073】

いくつかの実施形態によれば、がんを処置する方法は、少なくとも1つの追加の抗がん治療を投与又は実施することを含む。特定の実施形態によれば、追加の抗がん治療は、手術、化学治療、放射線治療又は免疫治療である。

【0074】

いくつかの実施形態によれば、がんを処置する方法は、本明細書中に記載のヒト化抗体及び追加の抗がん剤の投与を含む。いくつかの実施形態によれば、追加の抗がん剤は、免疫調節剤、活性化リンパ球細胞、キナーゼ阻害剤及び化学治療剤からなる群から選択される。

30

【0075】

他の実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、ヒトネクチン - 2 以外の抗原に結合する抗体、抗体断片又は抗体コンジュゲートである。

【0076】

いくつかの実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、免疫チェックポイント分子に対する抗体である。いくつかの実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、ヒトプログラム細胞死タンパク質 1 (PD-1)、PD-L1 及び PD-L2、がん胎児性抗原関連細胞接着分子 1 (CEACAM1)、リンパ球活性化遺伝子 3 (LAG3)、CD137、OX40 (CD134 と呼ばれる)、キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR)、TIGIT、PVR、CTLA-4、NKG2A、GITR、及び任意の他のチェックポイント分子又はそれらの組み合わせからなる群から選択される免疫チェックポイント分子に対する抗体である。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。特定の実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、PD-1 に対する抗体である。いくつかの実施形態によれば、追加の免疫調節剤は、CTLA-4 に対する抗体である。

40

【0077】

いくつかの実施形態によれば、抗がん剤は、エルピタックス、シタラピン、フルダラビ

50

ン、フルオロウラシル、メルカプトプリン、メトトレキサート、チオグアニン、ゲムシタピン、ピンクリスチン、ピンブラスチン、ビノレルピン、カルムスチン、ロムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シスプラチン、カルボプラチン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、チオテパ、ダカルバジン、プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキシソルビシン、イダルビシン、マイトマイシン、ミトキサントロン、プリカマイシン、エトポシド、テニポシド及びそれらの任意の組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0078】

いくつかの実施形態によれば、がんを処置する方法は、対象における転移の形成、成長又は広がり防止又は低減することを含む。

10

【0079】

追加の態様によれば、本発明は、がんの処置に使用するための、ヒトネクチン - 2 に特異的に結合するヒト化抗体及び毒素を含む抗体 - 薬物コンジュゲートを提供する。

【0080】

がん及び毒素は、上記の通りである。

【0081】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体は突然変異Fcドメインを含む。

【0082】

本発明はさらに、一態様によれば、対象のがんを診断又は予後診断する方法であって、本明細書に記載の少なくとも1つのヒト化抗体、断片又はコンジュゲートを使用して、当該対象の生物学的試料中のネクチン - 2 の発現レベルを決定することを含む方法を提供する。

20

【0083】

本発明はさらに、別の態様によれば、ネクチン - 2 の発現を決定又は定量する方法であって、生物学的試料を本明細書に記載の抗体又は抗体断片と接触させること、及び複合体形成のレベルを測定することを含む方法を提供する。

【0084】

いくつかの実施形態によれば、ネクチン - 2 の発現を検出又は定量するための方法は、
i . 試料を、ネクチン - 2 に特異的な抗体又は少なくとも抗原結合部分を含むその抗体断片と共にインキュベートする工程；

30

ii . 検出可能なプローブを用いて結合したネクチン - 2 を検出する工程、を含む。

いくつかの実施形態によれば、本方法はさらに、

iii . (ii) の量を、既知量のネクチン - 2 を含有する参照試料から得られた標準曲線と比較する工程；及び

iv . 標準曲線から試料中のネクチン - 2 の量を計算する工程、を含む。

【0085】

いくつかの特定の実施形態によれば、試料は体液又は固体組織である。いくつかの実施形態では、本方法はインビトロ又はエクスピボで行われる。

【0086】

本明細書に記載の少なくとも1つの抗体又は抗体断片及びネクチン - 2 発現を測定するための手段を含む、生物学的試料中のネクチン - 2 の発現を測定するためのキットも提供される。いくつかの実施形態では、キットは、キットの使用を指示する説明材料をさらに含む。

40

【0087】

本発明のさらなる実施形態及び適用可能性の全範囲は、以下に与えられる詳細な説明から明らかになるであろう。しかしながら、詳細な説明及び特定の例は、本発明の好ましい実施形態を示しているが、本発明の趣旨及び範囲内の様々な変更及び修正がこの詳細な説明から当業者に明らかになるので、単なる例示として与えられていることを理解されたい。

【図面の簡単な説明】

50

【 0 0 8 8 】

【図 1】図 1 A ~ 図 1 C は、ネクチン - 2 mRNA レベル（示されるように、高い又は低い）と、低悪性度神経膠腫（図 1 A）、腎明細胞がん（図 1 B）及び肺腺がん（図 1 C）患者の生存確率との相関を示す。データセットを TCGA 部位から得て、`oncology.org` のサイト（`https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67`）を用いて分析した。N は、分析に含まれる患者の数を示す。

【図 2】図 2 は、免疫細胞上に発現される受容体、及び腫瘍によって、又は抗原提示細胞（APC）上に発現されるネクチン - 2（CD112）に対するそれらのそれぞれの親和性の概略図である。TIGIT は、多くの免疫細胞（例えば、T 細胞及び NK 細胞）上の共阻害受容体であり；DNAM-1（CD226 と呼ばれる）は、多くの免疫細胞（例えば、T 細胞）上の活性化受容体であり、CD112R（PVRIg と呼ばれる）及び TIGIT は、リンパ系免疫細胞（例えば、T 細胞及び NK 細胞）上の共阻害受容体であり；ネクチン - 2 は、主に CD112R（長方形）へのその高親和性結合を介して、免疫細胞に対する阻害性リガンドとして作用する。

【図 3】図 3 は、ネクチン - 2 発現について陽性の腫瘍の割合を示すグラフである。データは、HPA012759 mAb（抗ネクチン - 2；Sigma-Aldrich（登録商標））を使用して `proteinatlas.com` から得た。17/20 の適応症では、中程度～高いネクチン - 2 の膜発現が見られる。

【図 4】図 4 A ~ 図 4 C は、親（キメラ）抗ネクチン 2 mAb のヒト化バリエーションの改善された細胞上結合を示す。ネクチン - 2 発現細胞を、段階希釈した mAb ヒト化バリエーションの結合について FACS 分析によって分析した。EC-50 値を各バリエーションについて計算し、1 として設定されたキメラ Ab（H0K0）の EC-50 値に対する相対値で報告する。図 4 A - ヒトネクチン - 2 を発現する 293T 細胞への EC-50 結合の倍率変化。図 4 B - アフリカミドリザル（AFG、Chlorocebus）に由来し、ネクチン - 2 を天然に発現する Vero 細胞（XP_007995342.1）への EC-50 結合の倍率変化。図 4 C - 濃度 66 ~ 0.81 nM における、抗ネクチン - 2 ヒト化クローンの存在下でヒトネクチン - 2 を過剰発現する CHO (K) 1 細胞に結合する CD112R-Fc の FACS 分析によって評価した場合の、異なるヒト化 mAb バリエーションによる CD112R ブロッキングの結果。最低用量で > 70% のブロッキング能力を維持するバリエーションを優れていると見なした。

【図 5】図 5 A ~ 図 5 C は、ヒト化抗ネクチン - 2 ADC バリエーションの死滅効果を示す。ADC はサボリン（ZAP）に基づいており、A549 標的細胞（肺腺がん）はネクチン - 2 を発現していることが確認された。図 5 A は、2 つの濃度で試験した他のヒト化バリエーションと比較して、リードクローン H3K3 の優れた死滅効果を示す。図 5 B は、ヒト化 H3K3 バリエーションと H4K2 バリエーションとの間の同程度のレベルの ADC 活性を示す。図 5 C - 3 つの濃度でのキメラ mAb（H0K0）とヒト化 H3K3 バリエーションとの間の同程度のレベルの ADC 活性。FcγR 又は Fc を有し、このバリエーションの効力に影響を及ぼさなかった、IgG2-P238H 上に移植した場合の H3K3 も試験した。NS（有意でない）によって示されない限り、全ての死滅結果は有意である（ $p < 0.001$ 、二元 t 検定）。

【図 6】図 6 A ~ 図 6 C は、様々な毒素にコンジュゲートしたヒト化 H3K3 - FcγR 又は抗ネクチン - 2 ADC が、様々な固形腫瘍細胞株の強力な死滅をもたらすことを実証している。図は、72 時間のインキュベーション後の、異なる ADC 濃度及び異なるがん標的にわたる H3K3 - FcγR 又は ADC の有意な死滅活性を示す。図 6 A は、RKO 細胞（結腸直腸腺がん）の死滅を示す。図 6 B は、MDA-MB-231 細胞（トリプルネガティブ乳がん）の死滅を示す。図 6 C は、A549 細胞（肺腺がん）の死滅を示す。標的細胞の死滅は、NS（有意でない）によって示されない限り、有意であった（ $p < 0.001$ ）。全ての ADC は毒性効果を有していたが、その大きさは、コンジュゲート毒素及び標的細胞の性質を考慮して変動した。それでも、MMAE 又は MMAF のいずれかを含む ADC は、全ての標的細胞にわたって他の全てよりも優れていた。

10

20

30

40

50

【図7】図7は、ヒト化H3K3-FcγR^{ヌル}抗ネクチン-2 ADCが高親和性FcγR-CD64との相互作用を介して内在化されないことを実証する。CHO-K1細胞、又はネクチン-2ではなくヒトCD64(hCD64)を過剰発現するCHO-K1細胞を、2つのバージョンのH3K3-FcγR^{ヌル}ADC(MMAE又はDM4のいずれかにコンジュゲートさせた)、又はhIgG4(S228P)若しくはhIgG1-Fc(両方ともDM4にコンジュゲートさせた)のいずれかを有する対照の無関係なADCと共に、12ug/mlで72時間インキュベートした。CD64陽性細胞では、hIgG4又はhIgG1のいずれかを使用した場合に特異的な死滅の増加が見られたが、FcγR^{ヌル}Fc-H3K3 ADCパリアントを使用した場合には見られなかった。標的細胞によるネクチン-2又はCD64のいずれかの発現にかかわらず、DM4によってバックグラウンドの非特異的の死滅が誘導されたことに留意されたい。

【図8】図8は、ヒト化H3K3-FcγR^{ヌル}抗ネクチン-2 ADCが血液細胞株の強力な死滅をもたらすことを実証している。示されたリンカー-ペイロードの組み合わせを有するH3K3-FcγR^{ヌル}Abを、9-1ug/mlからの濃度で、HL-60細胞(AMLモデル)と共に72時間インキュベートした。DM1を除く全てのリンカー-ペイロードの組み合わせは、高用量で>90%の死滅及び試験した全ての用量で有意な死滅をもたらした(p<0.001)。

【図9】図9A~図9Bは、ヌード雌マウスにs.c.移植した血液腫瘍細胞株HL-60に対するヒト化H3K3-FcγR^{ヌル}抗ネクチン-2 ADCのインビボ有効性を示す。図9Aは、リンカーペイロード(LP)の異なる組み合わせによる処理の効果を比較する。LPの組み合わせのうち2つは有意な効果を有した: DM4は有意な腫瘍増殖阻害(TGI、p<0.05)をもたらしたが、MMAEについては完全な腫瘍退縮が見られた。他の処理を含まない、MMAEベースのADCの効果を図9Bに示す。

【図10】図10は、固形(結腸直腸腺がん)腫瘍細胞株RKOに対するヒト化H3K3-FcγR^{ヌル}抗ネクチン-2 ADC(1107-MC-VC-MMAE)のインビボ有効性を示す。空のビヒクルを対照として使用した。

【図11】図11は、TNBCのための承認されたADC薬物であるTrodelvy(サシズマブ・ゴビテカン)と比較した、Dxdに連結されたヒト化H3K3-FcγR^{ヌル}抗ネクチン-2 mAb(NTX1107)によるMDA-MB-231(トリプルネガティブ乳がん又はTNBC)細胞のインビボ死滅を示す。両方のADCは、同じクラスの細胞傷害性ペイロード(すなわち、トポイソメラーゼI(TOP1)阻害剤)を使用する。MDA-MB-231細胞を、示された濃度のこれらのADCの存在下でインキュベートした。120時間後に死滅を評価した。標的細胞の強力な死滅が両方のADCによって誘導され、両方の濃度でTrodelvyの有意な優位性があった(*** p<0.0005)。

【図12】図12は、ヌード雌マウスにおけるMDA-MB-231 s.c.腫瘍モデルに対するヒト化H3K3-FcγR^{ヌル}抗ネクチン-2 ADC(NTX1107)の、Trodelvyと比較したインビボ有効性を示す。NTX1107-Dxdは腫瘍増殖を有意に阻害することができ、腫瘍静止をもたらしたが、Trodelvyは同じ処置レジメンで腫瘍増殖に対して効果がなかった。

【図13】図13は、ヌード雌マウスにおけるMDA-MB-231 s.c.腫瘍モデルに対するH3K3-FcγR^{ヌル}-Dxd(NTX1107-Dxd)によるインビボ処置の効果をH3K3-FcγR^{ヌル}MMAE(NTX1107-MMAE)の効果と比較する。完全な腫瘍退縮がH-NTX1107-MMAEについて見られ、7/7のマウスが研究終了時に測定可能な腫瘍を有していなかった。腫瘍退縮がNTX1107-Dxdについて見られ、4/7のマウスが研究終了時に測定可能な腫瘍を有していなかった。

【発明を実施するための形態】

【0089】

本発明は、ネクチン-2を認識するヒト化モノクローナル抗体を提供する。有利には、本発明の抗体は、ほぼ完全にヒト化され、したがって、抗体に対する有害な免疫応答の

スクを回避し、したがって、ヒトにおける使用のために安全である可能性が高い。本発明の抗体は、独特なCDR配列及び新規なヒト化フレームワーク配列及び設計を有することを特徴とする。

【0090】

本発明はさらに、いくつかの実施形態では、がんの処置に有用な本明細書に記載のヒト化抗体を含む抗体-薬物コンジュゲート、すなわちADCを提供する。

【0091】

以下の説明では、様々な実施形態の完全な理解を提供するために、特定の具体的な詳細が記載される。しかしながら、当業者は、提供される実施形態がこれらの詳細なしで実施され得ることを理解するであろう。文脈がそうでないことを要求しない限り、明細書及び以下の特許請求の範囲を通して、「含む(comprise)」という単語及びその変形、例えば「comprises」及び「comprising」は、オープンで包括的な意味で、すなわち「含むが、限定されない」と解釈されるべきである。本明細書及び添付の特許請求の範囲で使用される場合、単数形「a」、「an」、及び「the」は、内容が明らかにそうでないことを示さない限り、複数の指示対象を含む。また、「又は」という用語は、内容が明らかにそうでないことを指示しない限り、「及び/又は」を含むその意味で一般的に使用されることに留意されたい。さらに、本明細書で提供される見出しは、便宜上のものに過ぎず、特許請求される実施形態の範囲又は意味を解釈するものではない。

10

20

【0092】

本明細書で使用される場合、「約」という用語は、記載された量に10%以下で近い量を指す。

【0093】

本明細書で使用される「ネクチン-2」又は「ネクチン細胞接着分子2」という用語は、CD112及びPVR12としても知られるヒト原形質膜糖タンパク質を指す。ネクチン-2タンパク質は、2つのIg様C2型ドメイン及び1つのIg様V型ドメインを有するシングルパスI型膜糖タンパク質である。このタンパク質は、接着結合部の原形質膜成分の1つである。それはまた、単純ヘルペスウイルス及び仮性狂犬病ウイルスの特定の突然変異株の侵入としても機能し、これらのウイルスの細胞間拡散に関与している。本発明による例示的なネクチン-2は、SwissPort、UniPort及びGenBankの記号又はアクセッション番号：遺伝子ID：5819、Q92692、I68093、NP_001036189.1、NP_002847.1、及び#Q92692に記載されている。

30

【0094】

一態様によれば、本発明は、ネクチン-2に特異的に結合するヒト化抗体又は少なくとも抗原結合部位を含むその断片であって、重鎖及び軽鎖を含み、重鎖が、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号15及び配列番号16からなる群より選択される配列と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含み；軽鎖が、配列番号12、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択される配列と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含む、抗体又はその断片を提供する。

40

【0095】

別の態様によれば、本発明は、ネクチン-2に特異的に結合するヒト化抗体又は少なくとも抗原結合部位を含むその断片であって、抗体又はその断片が、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、重鎖可変領域が、

(i) 配列番号1~3に示される配列を含む3つのCDR配列のセット；及び

(ii) FR-H1(フレームワーク重鎖番号1)が配列番号21、25及び27からなる群から選択され；FR-H2が配列番号22であり；FR-H3が配列番号23、26、28及び29からなる群から選択され；FR-H4が配列番号24である、4つの重鎖フレームワーク配列のセット；

50

を含み、

軽鎖可変領域が、

(i) 配列番号 4 ~ 6 に示される配列を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

(i i) F R - L 1 (フレームワーク軽鎖番号 1) が配列番号 3 0、3 4、3 7 及び 3 9 からなる群から選択され ; F R - L 2 が配列番号 3 1 及び 3 5 からなる群から選択され ; F R - L 3 が配列番号 3 2、3 6、3 8 及び 4 0 からなる群から選択され ; F R - L 4 が配列番号 3 3 である、4 つの軽鎖フレームワーク配列のセット

を含む、ヒト化抗体又はその断片を提供する。

【 0 0 9 6 】

フレームワークは、鎖可変領域の非 C D R 配列である。F R - H 1 は重可変鎖における C D R 1 の前の配列であり、F R - H 2 は C D R 1 と C D R 2 との間の配列であり、F R - H 3 は C D R 2 と C D R 3 との間の配列であり、F R - H 4 は C D R 3 の後の配列である。F R - L 1 は軽可変鎖における C D R 1 の前の配列であり、F R - L 2 は C D R 1 と C D R 2 との間の配列であり、F R - L 3 は C D R 2 と C D R 3 との間の配列であり、F R - L 4 は C D R 3 の後の配列である。

10

【 0 0 9 7 】

追加の態様によれば、本発明は、重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むヒト化抗体又はその抗原結合断片を提供し、重鎖可変領域は、

i . 配列 S Y W、配列番号 8、及び配列番号 3 を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

i i . F R - H 1 が配列番号 2 1、2 5 及び 2 7 からなる群から選択され ; F R - H 2 が配列番号 2 2 であり ; F R - H 3 が配列番号 2 3、2 6、2 8 及び 2 9 からなる群から選択され ; F R - H 4 が配列番号 2 4 である、4 つの重鎖フレームワーク配列のセット ;

20

を含み、

軽鎖可変領域は、

i . 配列番号 1 0、S A S、及び配列番号 6 に示される配列を含む 3 つの C D R 配列のセット ; 及び

i i . F R - L 1 が配列番号 3 0、3 4、3 7 及び 3 9 からなる群から選択され ; F R - L 2 が配列番号 3 1 及び 3 5 からなる群から選択され ; F R - L 3 が配列番号 3 2、3 6、3 8 及び 4 0 からなる群から選択され ; F R - L 4 が配列番号 3 3 である、4 つの軽鎖フレームワーク配列のセット

30

を含む。

【 0 0 9 8 】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体又はその断片は、配列番号 7、配列番号 8 及び配列番号 9 の配列を含む 3 つの C D R 配列のセットを含む重鎖可変領域を含み ; 配列番号 1 0、S A S 及び配列番号 6 の配列を含む 3 つの C D R 配列のセットを含む軽鎖可変領域を含む。

【 0 0 9 9 】

提供される抗体の中には、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、二重特異性抗体及び多反応性抗体)、及び抗体断片がある。抗体には、抗体コンジュゲート及び抗体を含む分子、例えばキメラ分子が含まれる。したがって、抗体は、全長、並びにその結合特異性を保持するその断片及び部分、例えば任意の数の免疫グロブリンクラス及び / 又はアイソタイプ (例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g M、I g A、I g D、I g E 及び I g M) を有するものを含むその任意の特異的結合部分 ; F a b、F (a b ') 2、F v 及び s c F v (一本鎖又は関連する実体) を含むがこれらに限定されない生物学的に関連する (抗原結合) 断片又はその特異的結合部分を含むがこれらに限定されない。モノクローナル抗体は、一般に、実質的に均一な抗体の組成内のものであり ; したがって、モノクローナル抗体組成物内に含まれる任意の個々の抗体は、少量で存在し得る、天然に存在する可能性のある突然変異を除いて同一である。ポリクローナル抗体は、一般に 2 つ以上の異なる決定基 (エピトープ) に対して向けられる様々な配列の異なる抗体を含む調製物である。モノクローナル抗体は、ヒト I g G 1 定常

40

50

領域を含むことができる。モノクローナル抗体は、ヒトIgG4定常領域を含むことができる。

【0100】

本明細書における「抗体」という用語は、最も広い意味で使用され、断片抗原結合(Fab)断片、F(ab')₂断片、Fab'断片、Fv断片、組換えIgG(rIgG)断片、一本鎖可変断片(sFv又はscFv)を含む一本鎖抗体断片、及び単ドメイン抗体(例えば、sdAb、sdFv、ナノボディ)断片を含む、インタクトな抗体及びその機能的(抗原結合)抗体断片を含むポリクローナル及びモノクローナル抗体を含む。この用語は、遺伝子操作された及び/又は他の方法で改変された形態の免疫グロブリン、例えばイントラボディ、ペプチボディ、完全ヒト抗体、ヒト化抗体及びヘテロコンジュゲート抗体、多重特異性、例えば二重特異性抗体、ダイアボディ、トリアボディ及びテトラボディ、タンデムジscFv、タンデムトリscFvを包含する。特に明記しない限り、「抗体」という用語は、その機能的抗体断片を包含すると理解されるべきである。この用語はまた、IgG及びそのサブクラス、IgM、IgE、IgA、及びIgDを含む任意のクラス又はサブクラスの抗体を含む、インタクト又は全長抗体を包含する。抗体は、ヒトIgG1定常領域を含むことができる。抗体は、ヒトIgG4定常領域を含むことができる。

10

【0101】

所与の重鎖又は軽鎖可変配列からのCDR同定又は決定は、典型的には、当技術分野で公知の少数の方法のうちの一つを使用して行われる。例えば、そのような決定は、Kabata(Wu T. T and Kabat E. A., J Exp Med, 1970; 132: 211-50)及びIMGT(Lefranc M-P, et al., Dev Comp Immunol, 2003, 27: 55-77)に従って行われる。

20

【0102】

「配列を有するCDR」という用語又は同様の用語が使用される場合、それは、CDRが指定された配列を含む選択肢、及びCDRが指定された配列からなる選択肢も含む。

【0103】

抗体の抗原特異性は、超可変領域(HVR)、すなわち抗原結合部位を共に形成する軽鎖及び重鎖の両方の固有のCDR配列に基づく。

【0104】

提供される抗体の中には、抗体断片がある。「抗体断片」は、インタクト抗体が結合する抗原に結合するインタクト抗体の一部を含む、インタクト抗体以外の分子を指す。抗体断片の例としては、Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;ダイアボディ;線状抗体;一本鎖抗体分子(例えば、scFv又はsFv);及び抗体断片から形成された多重特異性抗体が挙げられるが、これらに限定されない。特定の実施形態では、抗体は、scFvなどの可変重鎖領域及び/又は可変軽鎖領域を含む一本鎖抗体断片である。

30

【0105】

「ヒト化」抗体は、全て又は実質的に全てのCDRアミノ酸残基が非ヒトCDRに由来し、全て又は実質的に全てのフレームワーク領域(FR)アミノ酸残基がヒトFRに由来する抗体である。ヒト化抗体は、場合により、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部を含み得る。非ヒト抗体の「ヒト化形態」とは、親非ヒト抗体の特異性及び親和性を保持しながら、典型的にはヒトに対する免疫原性を低減させるためにヒト化を受けた非ヒト抗体のバリエーションを指す。いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体中のいくつかのFR残基は、例えば、抗体の特異性及び親和性を回復又は改善するために、非ヒト抗体(例えば、CDR残基が由来する抗体)由来の対応する残基で置換される。

40

【0106】

Fcドメイン中のアミノ酸残基は、ヌルであるように置換することができ、これは、FcドメインがFc受容体に結合しないか、又は結合の結果としてFc受容体シグナル伝達を引き起こさないような低い親和性及び/又は結合活性で結合することができることを意

50

味する。Fcドメインは、Fc受容体への結合についてヌルであり得る。Fcドメインが結合についてヌルであり得るFc受容体のいくつかの例は、FcRI(CD64)、FcRIIA(CD32a)、FcRIIB(CD32b)、FcRIIIA(CD16a)、FcRIIIA(CD16a)F158バリエーション、FcRIIIA(CD16a)V158バリエーション、又はFcRIIIB(CD16b)であり得るが、これらに限定されない。Fcドメインは、Fc受容体へのFcドメインの結合を減少させる1つ以上、2つ以上、3つ以上、又は4つ以上のアミノ酸置換を有し得る。

【0107】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体は、FcR媒介性内在化を防止する突然変異Fcドメインを有する。

【0108】

いくつかの実施形態によれば、ヒト化抗体は、Fcヌルドメインを含む。特定の実施形態によれば、Fcドメインは、Fc受容体への結合についてヌルである。

【0109】

本明細書中で使用されるとき、「Fcヌル」とは、Fc受容体のうちの1つ又は複数に対する結合が弱い、又は全くないドメインのことを指す。

【0110】

抗体-薬物コンジュゲート

一態様によれば、本発明は、毒素に融合された本明細書に記載のヒト化抗体を含むコンジュゲートを提供する。

【0111】

いくつかの実施形態によれば、コンジュゲートは、重鎖及び軽鎖を含む抗体又はその断片を含み、重鎖は、配列番号11、配列番号13、配列番号14、配列番号15及び配列番号16からなる群より選択される配列と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含み；軽鎖は、配列番号12、配列番号17、配列番号18、配列番号19及び配列番号20からなる群から選択される配列と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有する可変領域を含む。

【0112】

いくつかの実施形態によれば、毒素は、微小管阻害剤、DNA合成阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤及びRNAポリメラーゼ阻害剤からなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0113】

特定の実施形態によれば、毒素は、微小管破壊薬である。特定の例示的な実施形態によれば、毒素はアウリスタチン又はその誘導体である。特定の実施形態によれば、アウリスタチン誘導体は、モノメチルアウリスタチンE(MMAE)又はモノメチルアウリスタチンF(MMAF)である。

【0114】

いくつかの実施形態によれば、毒素はサポニンである。

【0115】

いくつかの実施形態によれば、毒素はメイタンシン誘導体である。特定の実施形態によれば、メイタンシン誘導体は、DM4又はDM1である。

【0116】

いくつかの実施形態によれば、毒素はキノリンアルカロイドである。特定の実施形態によれば、キノリンアルカロイドはSN-38である。

【0117】

追加の実施形態によれば、毒素は、MMAE、MMAF、サポリン、DM4、DM1、SN-38、カリケマイシン、DXd、PBD、デュオカルマイシン、サンドラマイシン、アルファ-アマニチン、ケトシン、ダウノルピシン、17-AG、アグロケリンA、ドキシルピシン、メトトレキサート、コルヒチン、コルディセピン、ハイグロリジン、ヘルボキシジエン、フェルレノール、クルブリン、エングレリンA、タルトブリン、トリ

10

20

30

40

50

ブトライド、クリプトフィシン、及びネモルピシンからなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0118】

いくつかの実施形態によれば、毒素は、DNAトポイソメラーゼI (TOP1) 阻害剤である。特定の実施形態によれば、DNAトポイソメラーゼI (TOP1) 阻害剤は、DXdである。

【0119】

毒素名は、当技術分野で公知のように本明細書で使用される。適切なペイロードの非限定的な例には、以下が含まれる。

- DM1 - N²' - デアセチル - N²' - (3 -メルカプト - 1 - オキソプロピル) - メイタンシン - チューブリン阻害剤。 10

- DM4 - N²' - デアセチル - N²' - (4 -メルカプト - 4 -メチル - 1 - オキソペンチル) - ラブタンシン - チューブリン阻害剤。

- SN-38 - 強力なDNAトポイソメラーゼI阻害剤、(4S) - ピラノ[3', 4': 6, 7]インドリジノ[1, 2-b]キノリン-3, 14 - ジオンであるピラノインドリジノキノリンのクラスのメンバーであり、4位及び11に2つの追加のエチル置換基、並びに4位及び9位に2つの追加のヒドロキシ置換基を有する。

- DXd - エキサテカン誘導体、強力なDNAトポイソメラーゼI阻害剤(例えば、MCE (登録商標) のカタログ番号: HY-13631D)。

- MMAF - モノメチルアウリスタチンF - 式C₃₉H₆₅N₅O₈を有するチューブリン阻害剤。 20

- MMAE - モノメチルアウリスタチンE - 式C₃₉H₆₇N₅O₇を有するチューブリン阻害剤。

【0120】

いくつかの実施形態によれば、抗体は、毒素に直接連結される。他の実施形態によれば、抗体と毒素は、リンカーを介して連結される。いくつかの実施形態によれば、本明細書に記載のヒト化は、毒素に共有結合している。

【0121】

いくつかの実施形態によれば、リンカーは切断可能である。追加の実施形態によれば、リンカーは切断可能ではない。 30

【0122】

いくつかの実施形態によれば、リンカーは、pH又は酸化還元電位の変化に応答して切断される。いくつかの実施形態によれば、リンカーは、リソソーム酵素と接触すると切断される。

【0123】

本発明は、別の態様によれば、本明細書に記載のヒト化抗体若しくは抗原結合断片、又は抗体と薬学的に許容され得る賦形剤、担体、若しくは希釈剤とを含むコンジュゲートを含む医薬組成物を提供する。

【0124】

他の実施形態によれば、本発明による医薬組成物は、ネクチン-2の過剰発現を特徴とするがんの処置に使用するためのものである。ネクチン-2過剰発現に関連するがんタイプは、Cancer Genome Atlas (TCGA) などの既知のデータベースを使用して同定することができる。特定の実施形態によれば、本発明による組成物で処置可能ながんは、副腎皮質がん (ACC)、色素嫌性腎細胞がん (KICH)、肝臓肝細胞がん (LIHC)、結腸直腸腺がん (COAD、READ)、膵管腺がん (PAD)、褐色細胞腫及び傍神経節腫 (PCPG)、乳頭状腎がん (KIRP)、肺腺がん (LUAD)、頭頸部扁平上皮がん (HNSC)、前立腺腺がん (PRAD)、子宮体部子宮内膜がん (UCEC)、子宮頸がん (CESC)、皮膚黒色腫 (SKCM)、中皮腫 (MESO)、尿路上皮膀胱がん (BLCA)、明細胞腎がん (KIRC)、肺扁平上皮がん (LUSC)、子宮がん肉腫 (UCS)、肉腫 (SARC)、卵巣漿液性嚢胞腺がん (OV) 40 50

、甲状腺乳頭がん（THCA）、多形性膠芽腫（GBM）、乳がん（BRCA）、低悪性度神経膠腫（LGG）、及びびまん性大細胞型B細胞リンパ腫（DLBC）からなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0125】

本明細書で使用される場合、「個体」、「患者」又は「対象」という用語は、記載された組成物及び方法が処置に有用である少なくとも1つの疾患と診断された、罹患している疑いがある、又は発症するリスクがある個体を指す。いくつかの実施形態によれば、個体は哺乳動物である。いくつかの実施形態によれば、哺乳動物は、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ヒツジ、ブタ、ヤギ、ラマ、アルパカ、又はヤクである。いくつかの実施形態によれば、個体はヒトである。

10

【0126】

本明細書で使用される場合、「有効量」という用語は、哺乳動物に投与された場合に生物学的効果を引き起こす治療薬の量を指す。生物学的効果には、受容体リガンド相互作用（例えば、PVR-TIGIT、PD-1-PD-L1/PD-L2）の阻害又は遮断、シグナル伝達経路の阻害、腫瘍増殖の低減、腫瘍転移の低減、又は腫瘍を有する動物の生存期間の延長が含まれるが、これらに限定されない。「治療量」は、治療効果を発揮するように計算された薬物の協調である。治療量は、個体の集団において治療応答を誘導することができる投薬量の範囲を包含する。哺乳動物はヒト個体であり得る。ヒト個体は、腫瘍に罹患しているか、腫瘍が疑われるか、又は腫瘍に罹患している可能性がある。

【0127】

本明細書で使用される場合、「組み合わせ」又は「組み合わせ処置」という用語は、組み合わせる物品の同時投与又は組み合わせる物品の連続投与のいずれかを指すことができる。本明細書に記載されるように、組み合わせが物品の連続投与を指す場合、物品は任意の時間的順序で投与することができる。

20

【0128】

本明細書中で使用される場合、「チェックポイント阻害剤」は、生物においてT細胞の抗腫瘍/がん活性を負に調節する生物によって産生される生物学的分子（「チェックポイント分子」）を阻害する薬物を指す。チェックポイント分子には、PD-1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM-3、LAG-3、VISTA、SIGLEC7、PVR、TIGIT、IDO、KIR、A2AR、B7-H3、B7H4、CEACAM1及びCD112Rが含まれるが、これらに限定されない。

30

【0129】

活性成分としての本発明の分子は、周知のように、薬学的に許容され得、活性成分と適合性である賦形剤に溶解、分散又は混合される。適切な賦形剤は、例えば、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水（PBS）、デキストロース、グリセロール、エタノールなど、及びそれらの組み合わせである。他の適切な担体は当業者に周知である。さらに、所望であれば、組成物は、湿潤剤又は乳化剤、pH緩衝剤などの少量の補助物質を含有することができる。

【0130】

本明細書で使用される「処置」という用語は、治療的処置と予防的又は防止的手段の両方を指す。処置を必要とする者には、既に障害を有する者並びに障害を防止すべき者が含まれる。

40

【0131】

「がん」及び「腫瘍」という用語は、細胞増殖の調節解除を特徴とする哺乳動物における生理学的症状に関する。がんは、細胞群が制御されない増殖又は望ましくない増殖を示す疾患のクラスである。がん細胞はまた、他の位置にも広がり得、これは転移の形成をもたらし得る。体内でのがん細胞の広がりは、例えば、リンパ又は血液を介して起こり得る。制御されない増殖、侵入、及び転移形成は、がんの悪性特性とも呼ばれる。これらの悪性特性は、典型的には浸潤も転移もしない良性腫瘍からがんを区別する。

【0132】

50

いくつかの実施形態によれば、がんを処置する方法は、少なくとも1つの追加の抗がん剤の投与を含む処置レジメンの一部として医薬組成物を投与することを含む。

【0133】

いくつかの実施形態によれば、抗がん剤は、代謝拮抗物質、有糸分裂阻害剤、タキサン、トポイソメラーゼ阻害剤、トポイソメラーゼII阻害剤、アスパラギナーゼ、アルキル化剤、抗腫瘍抗生物質、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0134】

いくつかの実施形態によれば、代謝拮抗物質は、シタラビン、フルダラビン、フルオロウラシル、メルカプトプリン、メトトレキサート、チオグアニン、ゲムシタビン及びヒドロキシ尿素からなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、有糸分裂阻害剤は、ビンクリスチン、ビンブラスチン及びビノレルピンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、トポイソメラーゼ阻害剤は、トポテカン及びイリノテカンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、アルキル化剤は、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、クロラムブシル、シクロホスファミド、シスプラチン、カルボプラチン、イホスファミド、メクロレタミン、メルファラン、チオテパ、ダカルバジン及びプロカルバジンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、抗腫瘍抗生物質は、プレオマイシン、ダクチノマイシン、ダウノルピシン、ドキシソルピシン、イダルピシン、マイトマイシン、ミトキサントロン及びプリカマイシンからなる群から選択される。いくつかの実施形態によれば、トポイソメラーゼIIは、エトポシド及びテニポシドからなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【0135】

本発明は、別の態様によれば、がんに罹患している個体におけるがんを処置する方法であって、治療有効量のヒト化抗体若しくはその抗原結合断片又は医薬組成物、及びPD-1、PD-L1、CTLA-4又はCD112Rシグナル伝達の阻害剤を個体に投与することを含む方法を提供する。特定の実施形態では、がんは固形腫瘍を含む。特定の実施形態では、がんは、肺がん、結腸がん、神経膠芽腫、膵臓がん、乳がん、膀胱がん、腎臓がん、頭頸部がん、卵巣がん、子宮頸がん、又は前立腺がんからなる群から選択される。特定の実施形態では、PD-1シグナル伝達の阻害剤は、PD-1に結合する抗体又はその断片である。特定の実施形態では、PD-1に結合する抗体又はその断片は、ペンブロリズマブ、ニボルマブ、AMP-514、チスレリズマブ、スパルタリズマブ、又はそのPD-1結合断片である。特定の実施形態では、PD-1シグナル伝達の阻害剤は、PD-L1又はPD-L2に特異的に結合する抗体である。特定の実施形態では、PD-L1又はPD-L2に特異的に結合する抗体は、デュルバルマブ、アテゾリズマブ、アベルマブ、BMS-936559若しくはFAZ053、又はそのPD-L1若しくはPD-L2結合断片を含む。特定の実施形態において、PD-1シグナル伝達の阻害剤は、PD-1、PD-L1又はPD-L2に結合するFc融合タンパク質を含む。特定の実施形態では、Fc融合タンパク質は、AMP-224又はそのPD-1結合断片を含む。特定の実施形態では、PD-1シグナル伝達の阻害剤は、PD-1、PD-L1又はPD-L2の小分子阻害剤を含む。特定の実施形態では、PD-1、PD-L1又はPD-L2シグナル伝達の小分子阻害剤は、N- { 2 - [({ 2 - メトキシ - 6 - [(2 - メチル [1 , 1 ' - ビフェニル] - 3 - イル) メトキシ] ピリジン - 3 - イル } メチル) アミノ] エチル } アセトアミド (BMS 202) ; (2 - ((3 - シアノベンジル) オキシ) - 4 - ((3 - (2 , 3 - ジヒドロベンゾ [b] [1 , 4] ジオキシ - 6 - イル) - 2 - メチルベンジル) オキシ) - 5 - メチルベンジル) - D - セリン塩酸塩 ; (2 R , 4 R) - 1 - (5 - クロロ - 2 - ((3 - シアノベンジル) オキシ) - 4 - ((3 - (2 , 3 - ジヒドロベンゾ [b] [1 , 4] ジオキシ - 6 - イル) - 2 - メチルベンジル) オキシ) ベンジル) - 4 - ヒドロキシピロリジン - 2 - カルボン酸 ; 3 - (4 , 6 - ジクロロ - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イル) - 1 - フェニルインドール ; 3 - (4 , 6 - ジクロロ - 1 , 3 , 5 - トリアジン - 2 - イル) - 1 - フェニル - 1 h - インドール ; L - - グル

10
20
30
40
50

タミン、N 2 , N 6 - ビス (L - セリル - L - アスパラギニル - L - トレオニル - L - セリル - L - - グルタミル - L - セリル - L - フェニルアラニル) - L - リシル - L - フェニルアラニル - L - アルギニル - L - バリル - L - トレオニル - L - グルタミニル - L - ロイシル - L - アラニル - L - プロリル - L - リシル - L - アラニル - L - グルタミニル - L - イソロイシル - L - リシル) ; (2 S) - 1 - [[2 , 6 - ジメトキシ - 4 - [(2 - メチル [1 , 1 ' - ビフェニル] - 3 - イル) メトキシ] フェニル] メチル] - 2 - ピペリジンカルボン酸 ; グリシンアミド、N - (2 - メルカプトアセチル) - L - フェニルアラニル - N - メチル - L - アラニル - L - アスパラギニル - L - プロリル - L - ヒスチジル - L - ロイシル - N - メチルグリシル - L - トリプトフィル - L - セリル - L - トリプトフィル - N - メチル - L - ノルロイシル - N - メチル - L - ノルロイシル - L - アルギニル - L - システイニル - 、環状 (1 1 4) - チオエーテル ; 又はその誘導体若しくは類似体のうちの 1 つ又は複数を含む。

10

【 0 1 3 6 】

ヒト化抗体又はその抗原結合断片と、薬学的に許容され得る賦形剤、担体又は希釈剤とを混合することを含む、がん罹患している個体においてがんを処置するための組成物を製造する方法も本明細書に記載される。特定の実施形態では、がんは固形腫瘍を含む。特定の実施形態では、がんは、結腸がん、膵臓がん、乳がん、膀胱がん、腎臓がん、頭頸部がん、卵巣がん、神経膠芽腫、子宮頸がん、前立腺がん、及び肺がんからなる群から選択される。

【 0 1 3 7 】

ヒト化抗体又はその抗原結合断片を産生する方法であって、本明細書に記載の細胞株を、ヒト化抗体又はその抗原結合断片の発現及び分泌を可能にするのに十分な条件下で細胞培養培地中でインキュベートすることを含む方法も本明細書に記載される。

20

【 0 1 3 8 】

いくつかの特定の実施形態によれば、追加の抗がん剤は、ペバシズマブ、カルボプラチン、シクロホスファミド、ドキシソルピシン塩酸塩、ゲムシタピン塩酸塩、トポテカン塩酸塩、チオテバ、及びそれらの組み合わせからなる群から選択される。各可能性は、本発明の別個の実施形態を表す。

【 0 1 3 9 】

例

ここで、上記の説明と共に本発明を非限定的に例示する以下の例を参照する。

30

【 0 1 4 0 】

一般に、本明細書で使用される命名法及び本発明で利用される実験室手順には、分子技術、生化学的技術、微生物学的技術、免疫学的技術、及び組換え DNA 技術が含まれる。多くのそのような技術は当技術分野で周知である。周知の手順を参照する他の一般的な参考文献は、読者の便宜のためにこの文書全体を通して提供される。

【 0 1 4 1 】

例 1 . ネクチン - 2 mRNA の高発現は、様々ながん患者の低い生存確率と相関する。

ネクチン - 2 mRNA 発現レベルと生存確率との間の相関を、TCGA サイトからのデータで調べ、oncolnc.org サイトを使用して分析した (<https://doi.org/10.7717/peerj-cs.67>)。ネクチン - 2 mRNA 発現レベルは、低悪性度神経膠腫 (図 1 A ; $p = 5.22E - 5$)、腎明細胞がん (図 1 B ; $p = 0.00037$) 及び肺腺がん (図 1 C ; $p = 0.0319$) 患者について図 1 の矢印によって示されるように、低発現及び高発現の 2 つのサブグループについて患者を分けるための基礎であった。

40

【 0 1 4 2 】

例 2 . ネクチン - 2 は、特異的受容体を介して免疫細胞に結合し、影響を及ぼす。

図 2 の概略図は、免疫細胞上に発現される受容体、及び腫瘍によって、又は抗原提示細胞 (APC) 上に発現されるネクチン - 2 に対するそれらのそれぞれの親和性を実証する。TIGIT は、T 細胞及び NK 細胞などの免疫細胞上の共阻害受容体に関連し ; DNA

50

M - 1 (C D 2 2 6 と呼ばれる) は、免疫細胞 (例えば、 T 細胞) 上の活性化受容体に関連し、 C D 1 1 2 R (P V R I G と呼ばれる) は、リンパ系免疫細胞 (例えば、 T 細胞及び N K 細胞) 上の共阻害受容体に関連し ; ネクチン - 2 (C D 1 1 2) は、主に C D 1 1 2 R へのその結合を介して、免疫細胞に対する阻害性リガンドとして働く。本発明によれば、ヒト化抗ネクチン - 2 m A b は、その高親和性受容体 C D 1 1 2 R とのネクチン - 2 相互作用を遮断し、特異的毒素送達及び死滅のためにがん細胞を標的化し得る。

【 0 1 4 3 】

例 3 . ネクチン - 2 は固形腫瘍の大部分で発現される

データベース Protein atlas . com を、ネクチン - 2 の全ての別名 (N E C T I N 2 、 C D 1 1 2 、 H V E B 、 P R R 2 、 P V R L 2 、 P V R R 2) について検索した。病理実験のもと、3つの異なる m A b を使用したデータが見出された。H P A 0 1 2 7 5 6 9 m A b は、直交法によって検証されたため、最も高い検証スコア (増強) を有する。したがって、異なる腫瘍にわたる発現データをこのクローンについてのみ選択し、図 3 に示す。グラフは、ネクチン - 2 発現について陽性の腫瘍の割合を示している。17 / 20 の適応症では、ネクチン - 2 の膜発現が中程度 ~ 高レベルで見られる。

10

【 0 1 4 4 】

例 4 . ヒト化抗ネクチン - 2 m A b の改善された特性

特許出願公開番号 W O 2 0 2 0 1 4 4 6 9 7 に開示されているマウス抗ヒトネクチン - 2 クローン 2 . 1 1 を、ヒト化のためのリード m A b として選択した。構造解析に基づいて、ヒト化バリエーションを作製するために使用された配列セグメントの大きな予備セットを同定した。これらのセグメントを、ヒト M H C クラス I I 対立遺伝子へのペプチド結合のインシリコ分析のための i T o p e (商標) 技術を使用して (P e r r y e t a l . , 2 0 0 8) 、及び既知の抗体配列関連 T 細胞エピトープの T C E D (商標) を使用して (B r y s o n e t a l . , 2 0 1 0) 選択し、分析した。ヒト M H C クラス I I に対する有意な非ヒト生殖細胞系バインダーとして同定された、又は T C E D (商標) に対する有意なヒットを記録した配列セグメントを破棄した。これにより、セグメントのセットが低減し、これらの組み合わせを上記のようにさらに分析して、セグメント間の接合部が潜在的な T 細胞エピトープを含有しないことを確実にした。選択された配列セグメントを、有意な T 細胞エピトープを欠く完全な V 領域配列にアセンブルした。次いで、5つの重鎖 (V H 1 ~ V H 5) 及び5つの軽鎖 (V K 1 ~ V K 5) 配列を選択した。表 1 のデータは、i T o p e (商標) アルゴリズムの読み出しを示す。抗薬物抗体 (A D A) 生成の可能性を低減させるために、m A b の配列を M H C I I の潜在的結合について分析した。主なリスクは高親和性結合ペプチドに関連しており、それらは中程度の親和性結合ペプチドから分離されている。

20

30

40

50

【表 1】

表 1. ヒト化抗ネクチン-2 mAb の改善された特徴。

リード薬物選択のためのヒト化バリエーションを生成するために使用される親 (V0) 並びにヒト化重 (VH1~5) 及び軽 (Vk1~5) 可変鎖の予測MHCII エピトープ (iTopeスコア) の例示。

重鎖

予測親和性MHCII	VH0	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
中程度	5	6	4	4	4	3
高	8	4	3	3	1	1

10

軽鎖

予測親和性MHCII	Vk0	Vk1	Vk2	Vk3	Vk4	Vk5
中程度	8	4	3	3	3	1
高	4	3	3	2	2	2

20

【0145】

親重鎖 (VH0) は 8 個の予測される高親和性モチーフを有し、親軽鎖 (Vk0) は 4 個のそのようなモチーフを有する。ヒト化プロセスに続いて、重鎖についての予測された高親和性MHCII エピトープの数は 3 (VH2、VH3) 又はさらには 1 (VH4、VH5) に低減し、軽鎖については予測された高親和性MHCII モチーフは 2 (VK3~5) に低減した。

30

【0146】

したがって、ヒト化プロセスは、mAb に対する免疫原性を誘発し得る予測された高親和性MHCII モチーフの大部分を排除した。

【0147】

安定性についてタンパク質及び製剤をランク付けするための十分に確立された方法である熱勾配安定性実験によって、ヒト化バリエーションの安定性を評価した。タンパク質の変性プロファイルは、その熱安定性に関する情報を提供し、構造及び製剤緩衝液の改変を評価するための構造「フィンガープリント」を表す。タンパク質の熱構造安定性の広く使用されている尺度は、タンパク質が天然状態から変性状態にアンフォールディングする温度である。

40

【0148】

多くのタンパク質では、このアンフォールディングプロセスは狭い温度範囲で起こり、この転移の中間点は「融解温度」又は「Tm」と呼ばれる。タンパク質の融解温度を決定するために、Uncleは、タンパク質がコンフォメーション変化を受けるときの (タンパク質の露出した疎水性領域に結合する) Sypro Orange の蛍光を測定する。Tmの増加は、より安定なAbを予測するので、Abリード選択において望ましい特徴である。

50

【 0 1 4 9 】

精製リードヒト化抗体バリエーションを二連で、PBS中で0.5 mg/mlの最終試験濃度に希釈し、そこにSypro Orange (160xストック溶液)を添加して20x溶液の最終濃度にした。9 µLの各試料混合物を二連でUNiマイクロキュベットに充填した。試料を、15~95 で、0.3 /分のランプ速度及び473 nmの励起で熱ランプに供した。全発光スペクトルを250~720 nmから収集し、510~680 nmの曲線下面積を使用して、遷移曲線の変曲点 (Tonset及びTm)を計算した。表2に見られるように、試験した全ての抗体について、Tm1及びTonsetは、キメラ抗体 (VH0/Vk0)と比較してヒト化バリエーションについてより高い。

【表2】

10

表2. UNcle生物安定性プラットフォームを使用して決定された、親/キメラ (VH0/Vk0) 抗体及び6つの精製リードヒト化バリエーションの熱安定性値の要約。5°Cを超えるTonset及びTM1 (アンフォールディングの測定) の両方の安定性の改善は重要であると考えられ、太字フォントでマークされている。

バリエーション	平均Tonset(°C)	平均Tm1(°C)
VH0/Vk0	58.1	67.3
VH3/Vk3	65.6	74.3
VH4/Vk2	60.7	71.9
VH4/Vk3	60.6	70.8
VH5/Vk3	58.8	72.7
VH5/Vk4	59.9	68.3
VH5/Vk5	61.3	69.4

20

30

【 0 1 5 0 】

例5. ネクチン-2への結合の改善、及びヒト化抗ネクチン-2 mAbによるCD112R結合のブロッキング

40

293T細胞 (タンパク質id: Q92692) 及びクロロセブス (アフリカミドリザル、AFG) ペロ細胞によって発現されるヒトネクチン-2に結合するヒト化抗ネクチン-2 mAbを評価し、EC50値を確立した。AFGは、ヒトネクチン-2と97%の類似性でネクチン-2タンパク質 (XP_007995342.1) を発現する。図4A及び図4Bは、それぞれネクチン-2を発現したヒト細胞及びAFG細胞に対するEC50値の倍率変化を示す。両方の細胞株をウェルあたり0.5 x 10⁵細胞で播種した。キメラmAb (HOK0) 及びヒト化mAbを20~0.001 nMの濃度範囲で添加した。検出のために、抗ヒトAPC Abを1:200希釈で使用した (Jackson Immunoresearch AB_2340526)。細胞をFACSによって分析し、EC50を計算し、キメラAbと比較した (倍率改善)。この分析により、キメラmAb

50

bと比較して、ヒト化バリエーションの結合の改善、及びサルネクチン - 2 に対する同様の程度の交差反応性が明らかになった (図 4 A 対 4 B)。ヒト化 A b のブロッキング能力を評価するために、ヒトネクチン - 2 をチャイニーズハムスター卵巣 (CHO) 細胞で過剰発現させた。図 4 C は、 10^5 個の CHO - hNectin - 2 / ウェルを、 $66 \sim 0.81$ nM の範囲の濃度で、示されたヒト化 A b の存在下で 30 nM のヒト CD112R - mIgG2a とインキュベートした場合に生成されたデータを示す。結合した CD112R を、mIgG2a - 647 (Jackson Immunoresearch カタログ 115 - 607 - 186) を 1 : 200 希釈で使用し、続いて FACS 分析を使用することによって検出した。見ることができるよう、全てのヒト化バリエーションは完全なブロッキング能力を維持した。

10

【0151】

例 6 . 抗 hNectin - 2 ヒト化バリエーション H3K3 は、Fc 非依存的様式で ADC ドライバーとして働くことができる

ADC として働く mAb の能力を評価するために、ストレプトアビジン - サポリン (ZAP)、IT - 27 - 250 (ATS) を使用した。図 5 に示される mAb を、ビオチン化キット Ab207195 (Abcam) を 1 : 1 比で使用してビオチン化した。図 5 A は、上位のヒト化クローン及び A549 (肺腺がん) 細胞を標的として含む初期スクリーニングの結果を示す。ウェルあたり 2×10^3 細胞を播種し、4 ~ 6 時間かけて接着させた。ADC を添加し、細胞を ADC と共にインキュベートした。72 時間後、このアッセイを回収し、腫瘍細胞の死滅を、CellTiter - Glo (登録商標) 2.0 Cell Viability Assay - (Promega G9242) を標準プロトコルに従って使用して評価した。クローン H3K3 のみが強い死滅を示した。次に、クローン H3K3 をクローン H4K2 と直接比較した (図 5 B)。両方のクローンが強い死滅を示し、H3K3 は、優れた発達特性のために将来の分析のために選択された。キメラ親クローン及びクローン H3K3 (IgG1) の FcγR_{2b} バリエーション (IgG2 - P238H) (FcγR_{2b} では、g はガンマ又は γ を表す) を上記条件下で試験し、結果を図 5 C に示す。キメラ及びヒト化 H3K3 バリエーションの両方による有意な死滅 ($p < 0.001$) が、これらの ADC の全ての濃度で見られ、FcγR_{2b} バリエーションは、hIgG1 クローンと比較して、同一のレベルの標的細胞死滅をもたらした。

20

【0152】

例 7 . 抗 hNectin - 2 H3K3 - FcγR_{2b} ADC は、インピトロで固形腫瘍細胞株を強力な死滅をもたらす。

表 3 に示すように、ヒト IgG1 のヒンジ領域内の重要な残基を突然変異させることによって、追加の H3K3 - FcγR_{2b} mAb を生成した。

30

40

50

【表 3】

表3. ヒト化IgG1 FcγRヌルリンカー-ペイロードの組み合わせに対するFc置換、放出機構、及びH3K3ベースのADCに対する関連する薬物対抗体比(DAR)の要約。

Fc-突然変異 (FcγR ^{ヌル})	リンカー	ペイロード	放出機構	平均DAR (LC-MS)
hIgG1 G237I	MC-VC-PAB	MMAE	タンパク質切断	4.3
hIgG1 G237I	MC	MMAF	分解	4.2
hIgG1 L235S	SMCC	DMI	分解	4.0
hIgG1 L235S	SPDB	DM4	酸化還元	4.2
hIgG1 L235S/G237I	Lys-PAB-CO	SN38	pH	8

10

20

【0153】

提示されたリンカー-ペイロードの組み合わせは、所望の放出機構に従って選択され、Abzena LTDによる標準プロトコルに従って生成された。手短に言えば、mAbを還元し、過剰のリンカー-ペイロードとインキュベートして、8の標的DARを有するSN-38を除く全てのリンカー-ペイロードについて4の所望の薬物抗体比(DAR)を得た。次いで、最終生成物を精製し、LC/MS法によってDARを確立した。様々な固形腫瘍を表す選択された腫瘍細胞株を使用して、様々なリンカー-ペイロードの組み合わせの効力をインビトロで評価した。示された標的細胞をウェルあたり 2×10^3 細胞で播種し、4~6時間かけて接着させた。5倍希釈液を用いて4~0.16 μg/mlの濃度でADCを添加し、細胞をADCと共にインキュベートした。72時間後、このアッセイを回収し、腫瘍細胞の死滅を、CellTiter-Glo(登録商標) 2.0 Cell Viability Assay - (Promega G9242)を標準プロトコルに従って使用して評価した。RKO細胞(結腸直腸腺がん)、MDA-MB-231細胞(トリプルネガティブ乳がん)及びA549細胞(肺腺がん)の強力な死滅をそれぞれ図6A~図6Cに示す。標的細胞の死滅は、NS(有意でない、 $p > 0.05$)によって示されない限り、両側スチューデントt検定によって有意であった($p < 0.001$)。

30

【0154】

例8. 選択されたFcγR^{ヌル}突然変異はFcγRを介したADC死滅を防止する。そのFcγRへのAb-Fc結合に起因し、ADCの非特異的効果に寄与し得る、ヒト化抗ネクチン-2 ADCによる非標的・特異的・死滅の程度を評価するために、高親和性Fc受容体hCD64(CHO-hCD64)を過剰発現するCHO細胞を作製した。これらの細胞はヒトネクチン-2を発現せず、したがって標的・特異的・死滅は予想されない。親CHO細胞及びCHO-hCD64をウェルあたり 2×10^3 細胞で播種し、4~6時間かけて接着させた。異なるFcバリエーションADCを12 μg/mlで添加した。72時間のインキュベーション後、このアッセイを回収し、腫瘍細胞の死滅を、CellTiter-Glo(登録商標) 2.0 Cell Viability Assay - (Promega G9242)を使用して評価した。

40

50

【0155】

図7に見られるように、IgG4-S228P及びhIgG1陽性対照の両方が、予想通り、親CHO細胞と比較してCHO-hCD64細胞の有意により高い程度の死滅をもたらした。一方、IgG1-G237I置換は、親細胞及びhCD64過剰発現細胞の両方の同様の低レベルの死滅をもたらした（非特異的死滅）。これらの結果は、FcγRヌルバリエーションが高親和性FcγR-CD64によって結合及び内在化されないことを確認する。

【0156】

例9. 抗hNectin-2ヒト化H3K3-FcγRヌルADCは、インビトロで血液腫瘍細胞株HL-60の強力な死滅をもたらす

10

HL-60細胞（AMLモデル）をウェルあたり 2×10^3 細胞で播種し、ADCを3倍希釈を使用して $9 \sim 1 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で添加した。細胞をADCと共に72時間インキュベートした。次いで、上記のように、このアッセイを回収し、腫瘍細胞の死滅を、Cell Titer-Glo（登録商標）2.0 Cell Viability Assay - (Promega G9242)を使用して評価した。図8に見られるように、DM1ペイロード（グラフに示す）を除いて、他の全ての化合物は、試験した全ての濃度で標的の有意な死滅をもたらし、全てが最高濃度（ $> 60 \text{ nM}$ ）で90%を超えた。これらの結果に基づいて、SMCC-DM1リンカーペイロードを将来の実験から除外した。

【0157】

例10. 抗hNectin-2 H3K3-FcγRヌル-MC-VC-PAB-MM AE ADCは、侵襲性AMLモデルにおいて腫瘍退縮をもたらす

20

ヌード雌マウス（ $n = 25$ ）に、1:1マトリゲル中 10×10^6 個のHL-60細胞をs.c.注射した。腫瘍が 205 mm^3 の平均体積に達したら、マウスを5つの群（ $n = 5$ /群）にランダム化し、PBS（ビヒクル）、H3K3-FcγRヌル-MMAE、H3K3-FcγRヌル-MMAF、H3K3-FcγRヌル-DM4又はH3K3-FcγRヌル-SN-38のいずれかのi.v.注射によって盲検様式で処置した。全ての処置は $5 \text{ mg}/\text{kg}$ であり、4日ごとに4回の連続投与で与えた。図9Aに見られるように、ランダム化後23日目に、H3K3-FcγRヌル-MMAF及びSN-38バリエーションは腫瘍増殖を減弱させなかった。H3K3-FcγRヌル-DM4は49%の有意な腫瘍増殖阻害（TGI）をもたらしたが、H3K3-FcγRヌル-MMAEは有意な腫瘍退縮をもたらした。図9Bは、H3K3-FcγRヌル-MMAEの平均効果を示す。

30

【0158】

例11. 抗hNectin-2 H3K3-FcγRヌル-MC-VC-PAB-MM AE ADCは、侵襲性結腸腺がんモデルにおいて腫瘍退縮をもたらす

ヌード雌マウス（ $n = 5$ /群）に、1:1マトリゲル中 5×10^6 個のRKO細胞をSC注射した。腫瘍が 160 mm^3 の平均体積に達したら、マウスを2つの群にランダム化し、PBS（ビヒクル）又はH3K3-FcγRヌル-MMAE（1107-MC-VC-MMAE）のいずれかを $5 \text{ mg}/\text{kg}$ で4回連続用量でi.v.注射することによって、盲検様式で4日ごとに処置した。ランダム化後13日目に、H3K3-FcγRヌル-MMAEは、図10に見られるように有意な腫瘍退縮をもたらし、ビヒクル処置群と比較して $> 80\%$ のTGIを示した。

40

【0159】

例12. 抗hNectin-2 H3K3-FcγRヌルmAbは、Trodelvyと比較して同様のインビトロ死滅活性を有する

インビトロ死滅アッセイ（図11）のために、MDA-MB-231標的細胞をウェルあたり 2×10^3 細胞で播種し、4~6時間かけて接着させた。次に、Dxdに連結したH3K3-FcγRヌル抗ネクチン-2 mAb（NTX1107）及びTNBCの承認されたADC薬物であるTrodelvy（サシツズマブ・ゴピテカン）を $12 \mu\text{g}/\text{ml}$ （濃い灰色のバー）及び $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ （薄い灰色のバー）の濃度で添加した。注目すべきことに、両方のADCは、同じクラスの細胞傷害性ペイロード（すなわち、トポイソメ

50

ラーゼ I (TOP1) 阻害剤) を使用する。細胞を ADC と共に 120 時間インキュベートし、その後、腫瘍細胞の死滅を、Cell Titer - Glo (登録商標) 2.0 Cell Viability Assay - (Promega G9242) を標準プロトコルに従って使用して評価した。MDA - MB - 231 細胞の強力な死滅が両方の ADC によって誘導され、両方の濃度で Trodelvy の有意な優位性があった (***) $p < 0.0005$)。

【0160】

例 13 . Trodelvy ではなくトポイソメラーゼ 1 阻害剤にコンジュゲートさせた抗 hNectin - 2 H3K3 - Fc g R^{ヌル} は、侵襲性 MDA - MB - 231 腫瘍のインビボでの増殖を阻害する

ヌード雌マウス (n = 7 / 群) に、1 : 1 マトリゲル中 5×10^6 個の MDA - MB - 231 細胞を s.c. 注射した。腫瘍が平均体積 230 mm^3 に達したら、マウスを処置群にランダムし、PBS (ビヒクル)、NTX1107 - Dxd 又は Trodelvy のいずれかを 5 mg / kg で i.v. 注射によって、盲検様式で 3 回の連続用量について 4 日間ごとに処置した。腫瘍増殖に対する Trodelvy 処理の効果はなかった。

【0161】

図 12 に見られるように、NTX1107 - Dxd は、腫瘍増殖を有意に阻害することができた (* $p < 0.02$, ** < 0.005 , *** $p < 0.0005$)。Trodelvy のインビボ死滅効力が NTX1107 - Dxd よりも高く (図 11)、Trodelvy は TNBC のための承認された ADC であるので、これらの知見は予想外であった。これらの所見は、抗ネクチン - 2 (NTX1107) が固形腫瘍の処置のための独特に強力な ADC であることを示唆する。

【0162】

例 14 . 抗 hNectin - 2 H3K3 - Fc g R^{ヌル} は、チューブリン又は TOP1 標的化剤にコンジュゲートさせた場合、侵襲性 MDA - MB - 231 腫瘍をインビボで退行させることができる

ヌード雌マウス (n = 7 / 群) に、1 : 1 マトリゲル中 5×10^6 個の MDA - MB - 231 細胞を s.c. 注射した。腫瘍が平均体積 210 mm^3 に達したら、マウスを処置群にランダムし、PBS (ビヒクル)、H3K3 - Fc g R^{ヌル} (NTX1107) - MMAE、又は NTX1107 - Dxd のいずれかで i.v. 注射によって、盲検様式で 5 回の連続用量について 4 日間ごとに処置した。図 13 に見られるように、NTX1107 - MMAE で処置した全ての動物は、研究終了時に検出可能な腫瘍を有していなかった。NTX1107 - Dxd で処置した動物については、4 匹が腫瘍を有さなかったが、残りの 3 匹については平均腫瘍体積は 210 mm^3 であり、腫瘍静止を示した。これらの知見は、本明細書中に記載されるネクチン - 2 を標的とするヒト化抗体 (NTX1107) が、様々なクラスのペイロードを使用するとき、固形腫瘍の処置のための独特に強力な ADC を形成し得ることを示唆している。

【0163】

配列

10

20

30

40

50

【表 4】

表 4 : CDR 配列 :

説明	KABAT	IMGT	重複配列
重鎖 CDR1	SYWIH (配列番号 1)	GYIFTSYW (配列番号 7)	SYW
重鎖 CDR2	AVYPGNSDSNYNQKF(KA/QG) (配列番号 2)	VYPGNSDS (配列番号 8)	配列番号 8
重鎖 CDR3	LVGTFDY (配列番号 3)	TKLVGTFDY (配列番号 9)	配列番号 3
軽鎖 CDR1	(K/R)ASQNVGINV(V/A) (配列番号 4)	QNVGIN (配列番号 10)	配列番号 10
軽鎖 CDR2	SASYRYS (配列番号 5)	SAS	SAS
軽鎖 CDR3	QQYNTNPFT (配列番号 6)	配列番号 6	配列番号 6

配列番号 1 1 - 重鎖可変領域 NT 2 0 - 1 1 __ V H 3

【数 1】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS
DSNYNQKFKARVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTV
TVSS

配列番号 1 2 軽鎖可変領域 NT 2 0 - 1 1 __ V k 3

【数 2】

DIQMTQSPSTLSASVGDRVSVTCKASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYS
VPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

配列番号 1 3 - 重鎖可変領域 NT 2 0 - 1 1 __ V H 1

【数 3】

EVQLVQSGTELEKPKPGSSVKVCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS
DSNYNQKFKARATITAVTSTSTAYMELSSLTSEDSAVYYCTKLVGTFDYWGQGTTV
TVSS

配列番号 1 4 - 重鎖可変領域 NT 2 0 - 1 1 __ V H 2

【数 4】

10

20

30

40

50

EVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS
DSNYNQKFKARATITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGT
TVSS

配列番号 15 - 重鎖可変領域 NT 20 - 11 __ V H 4

【数 5】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS
DSNYNQKFQGRVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGT
TVSS

10

配列番号 16 - 重鎖可変領域 NT 20 - 11 __ V H 5

【数 6】

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS
DSNYNQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTKLVGTFDYWGQGT
TVSS

20

配列番号 17 - 軽鎖可変領域 NT 20 - 11 __ V k 1

【数 7】

DIVMTQSPSFLSASVGDRVSVTCKASQNVGINVVWYQQRAGQPPKTLIYSASYRYS
GVPDRFTGSGSGTDFLTISLQSEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

配列番号 18 - 軽鎖可変領域 NT 20 - 11 __ V k 2

【数 8】

DIVMTQSPSTLSASVGDRVSVTCKASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYS
GVPDRFTGSGSGTDFLTISLQAEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

30

配列番号 19 - 軽鎖可変領域 NT 20 - 11 __ V k 4

【数 9】

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNVGINVVWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

配列番号 20 - 軽鎖可変領域 NT 20 - 11 __ V k 5

【数 10】

DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCRASQNVGINVAWYQQKPGQPPKTLIYSASYRYS
GVPDRFSGSGSGTDFLTISLQAEDVAVYYCQQYNTNPFTFGQGTKLEIK

40

【表 5】

表 5 : ヒト化重鎖可変領域のフレームワーク (非CDR) 配列

鎖	FR-H1	FR-H2	FR-H3	FR-H4
VH3	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGYIFT (配列番号21)	WVRQPPGKGLE WIG (配列番号22)	RVTITAVTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTK (配列番号23)	WGQGTTVT VSS (配列番号24)
VH1	EVQLVQSGTELKPKGS SVKVSCKASGYIFT (配列番号25)	WVRQPPGKGLE WIG (配列番号22)	RATITAVTSTSTAY MELSSLTSEDSAV YYCTK (配列番号26)	WGQGTTVT VSS (配列番号24)
VH2	EVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGYIFT (配列番号27)	WVRQPPGKGLE WIG (配列番号22)	RATITAVTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTK (配列番号28)	WGQGTTVT VSS (配列番号24)
VH4	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGYIFT (配列番号21)	WVRQPPGKGLE WIG (配列番号22)	RVTITAVTSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTK (配列番号23)	WGQGTTVT VSS (配列番号24)
VH5	QVQLVQSGAEVKKPGS SVKVSCKASGYIFT (配列番号21)	WVRQPPGKGLE WIG (配列番号22)	RVTITADESTSTAY MELSSLRSED TAVYYCTK (配列番号29)	WGQGTTVT VSS (配列番号24)

10

【表 6】

表 6 : ヒト化光可変領域のフレームワーク (非CDR) 配列

鎖	FR-L1	FR-L2	FR-L3	FR-L4
LK3	DIQMTQSPSTLSASVG DRVSVTC (配列番号30)	WYQQKPGQPPKTL IY (配列番号31)	GVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDLAE YFC (配列番号32)	FGQGTKLE IK (配列番号33)
LK1	DIVMTQSPSFLSASVG DRVSVTC (配列番号34)	WYQQRAGQPPKTL IY (配列番号35)	GVPDRFTGSGSGTD FTLTISSLQSEDLAE YFC (配列番号36)	FGQGTKLE IK (配列番号33)
LK2	DIVMTQSPSTLSASVG DRVSVTC (配列番号37)	WYQQKPGQPPKTL IY (配列番号31)	GVPDRFTGSGSGTD FTLTISSLQAEDLAE YFC (配列番号38)	FGQGTKLE IK (配列番号33)
LK4	DIQMTQSPSTLSASVG DRVTITC (配列番号39)	WYQQKPGQPPKTL IY (配列番号31)	GVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVA VYYC (配列番号40)	FGQGTKLE IK (配列番号33)
LK5	DIQMTQSPSTLSASVG DRVTITC (配列番号39)	WYQQKPGQPPKTL IY (配列番号31)	GVPDRFSGSGSGTD FTLTISSLQAEDVA VYYC (配列番号40)	FGQGTKLE IK (配列番号33)

20

30

配列番号 41 - HC CDR2 AVYPGNSDSNYNQKFKA
 配列番号 42 - HC CDR2 AVYPGNSDSNYNQKFG
 配列番号 43 - LC CDR1 KASQNVGINVV
 配列番号 44 - LC CDR1 KASQNVGINVA
 配列番号 45 - LC CDR1 RASQNVGINVV
 配列番号 46 - LC CDR1 RASQNVGINVA
 配列番号 47 - VH3 全長 h I g G 1 重鎖のアミノ酸配列

40

【数 1 1】

50

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYIFTSYWIHWVRQPPGKGLEWIGAVYPGNS
 DSNYNQKFKARVTITAVTSTSTAYMELSSLRSEDVAVYYCTKLVGTFDYWGQGT
 TVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP
 AVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPC
 PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQ
 PREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLD
 SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

10

配列番号 48 - DNA 配列 V H 3 全長 h I g G 1

【数 1 2】

caggtgcagctggtgcagagcggcgcggaagtgaaaaaaccgggcagcagcgtgaaagtg
 agctgcaaagcagcggctatattttaccagctattggattcattgggtgcgccagccg
 ccgggcaaaggcctggaatggattggcggcggtgtatccgggcaacagcgatagcaactat
 aaccagaaatttaagcgcgcgtgaccattaccgcggtgaccagcaccagcaccgcgat
 atggaactgagcagcctgcgcagcgaagataccgcggtgtattattgcaccaaactggtg
 ggcacctttgattattggggccagggcaccaccggtgaccgtgagcagcgcgagcaccaaa
 ggcccagcgtgtttccgctggcgccgagcagcaaaagcaccagcggcgccaccgcgccg
 ctgggctgcctggtgaaagattattttccggaaaccggtgaccgtgagctggaacagcggc
 gcgctgaccagcggcgtgcatacctttccggcggtgctgcagagcagcggcctgtatagc
 ctgagcagcgtggtgaccgtgccgagcagcagcctgggcaccagacctatatttgcaac
 gtgaaccataaaccgagcaaacaccaaagtggataaacgcgtggaaccgaaaagctgcgat
 aaaaccataacctgcccgcctgcccggcgccggaactgctggcgcccgagcgtgttt
 ctgtttccgcccgaaccgaaagatacctgatgattagccgcaccccgggaagtgacctgc
 gtggtggtggatgtgagccatgaagatccggaagtgaaatttaactggtatgtggatggc
 gtggaagtgcataacgcgaaaaccaaaccgcgcgaaagaacagtataacagcacctatcgc
 gtggtgagcgtgctgaccgtgctgcatcaggattggctgaacggcaaagaatataaatgc
 aaagtgagcaacaaagcgtgcccggcgccgattgaaaaaacattagcaaaagcgaaggc
 cagccgcgcgaaccgcaggtgtataccctgccgcgcgagccgcgaagaatgacccaaaac
 caggtgagcctgacctgcctggtgaaaggcttttatccgagcgatattgcggtggaatgg
 gaaagcaacggccagccgaaaacaactataaaaccaccccgccggtgctggatagcgat
 ggcagctttttctgtatagcaaaactgaccgtggataaaaagccgctggcagcagggcaac
 gtgttttagctgcagcgtgatgcatgaagcgcctgcataaccattataccagaaaagcctg
 agcctgagcccggcaaa

20

30

配列番号 49 - V k 3 全長カップ軽鎖のアミノ酸配列

【数 1 3】

DIQMTQSPSTLSASVGDVSVTCKASQNVGINVVWYQKPGQPPKTLIYSASYRYSG
 VPDFRSGSGSGLDFTLTISSLQAEDLAEYFCQQYNTNPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSV
 FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS
 YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

40

配列番号 50 - DNA 配列 V k 3 全長カップ

【数 1 4】

50

gatattcagatgacccagagcccagcaccctgagcgcgagcgtgggcgatcgcgtgagc
 gtgacctgcaaagcagagccagaacgtgggcattaacgtggtgtggtatcagcagaaaccg
 ggccagccgcccgaaaaccctgatttatagcgcgagctatcgctatagcggcgtgccggat
 cgctttagcggcagcggcagcggcaccgattttaccctgaccattagcagcctgcaggcg
 gaagatctggcgggaatatttttggccagcagtataaacaccaaccgtttacctttggccag
 ggcaccaaactggaaattaaacgcaccgtggcggcgccgagcgtgtttatTTTTCCGCCG
 agcgatgaacagctgaaaagcggcaccgcgagcgtggtgtgctgctgaacaacttttat
 ccgcgcgaagcgaagtgcagtggaaagtggataaacgcgctgcagagcggcaacagccag
 gaaagcgtgaccgaacaggatagcaaagatagcacctatagcctgagcagcaccctgacc
 ctgagcaaagcggattatgaaaaacataaagtgtatgcgtgcgaagtgacccatcagggc
 ctgagcagcggcgtgacccaaaagctttaaccgcggcgaatgc

10

配列番号 5 1 - V H 3 核酸

配列番号 5 2 - V H 1 核酸

配列番号 5 3 - V H 2 核酸

配列番号 5 4 - V H 4 核酸

配列番号 5 5 - V H 5 核酸

配列番号 5 6 - V k 3 核酸

配列番号 5 7 - V k 1 核酸

配列番号 5 8 - V k 2 核酸

配列番号 5 9 - V k 4 核酸

配列番号 6 0 - V k 5 核酸

配列番号 6 1 - ヒト I g G 1 (L 2 3 5 S) (V H 3 を含む)

配列番号 6 2 - ヒト I g G 1 (L 2 3 5 S / E 2 7 2 K) (V H 3 を含む)

配列番号 6 3 - ヒト I g G 1 (G 2 3 7 I) (V H 3 を含む)

配列番号 6 4 - ヒト I g G 1 (G 2 3 7 I / E 2 7 2 I) (V H 3 を含む)

配列番号 6 5 - ヒト I g G 1 (G 2 3 7 I / V 2 6 4 R) (V H 3 を含む)

配列番号 6 6 - ヒト I g G 1 (V 2 1 5 A / E 2 6 9 R / K 3 2 2 A) (V H 3 を含む)

20

30

配列番号 6 7 - ヒト I g G 1 (L 2 3 4 A / L 2 3 5 A / P 3 2 9 G) (V H 3 を含む)

配列番号 6 8 - ヒト I g G 4 (S 2 2 8 P / L 2 3 5 P / V 2 6 4 R) (V H 3 を含む)

配列番号 6 9 - ヒト I g G 2 (P 2 3 8 H) (V H 3 を含む)

配列番号 7 0 - ヒト I g G 2 (P 2 3 8 H / V 2 6 4 R) (V H 3 を含む)

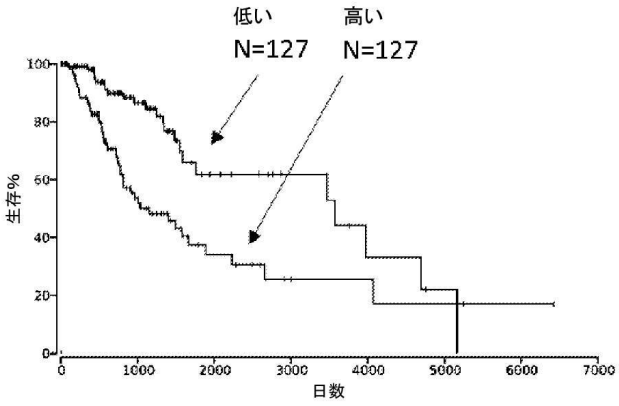
配列番号 7 1 - リーダーペプチド配列。

40

50

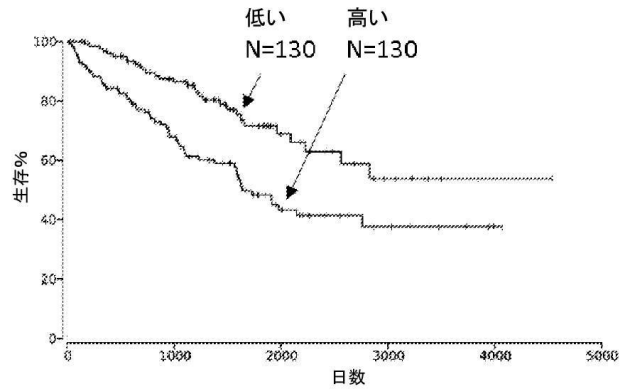
【図面】

【図 1 - 1】



A

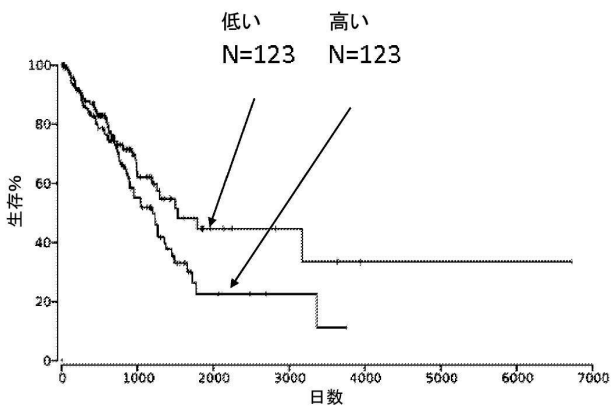
【図 1 - 2】



B

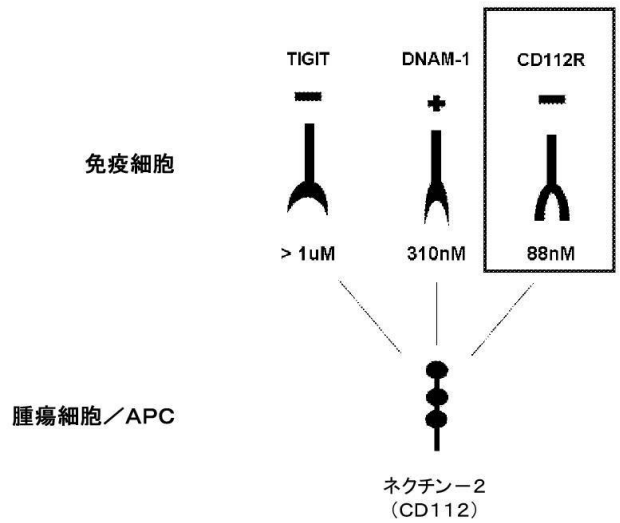
10

【図 1 - 3】



C

【図 2】



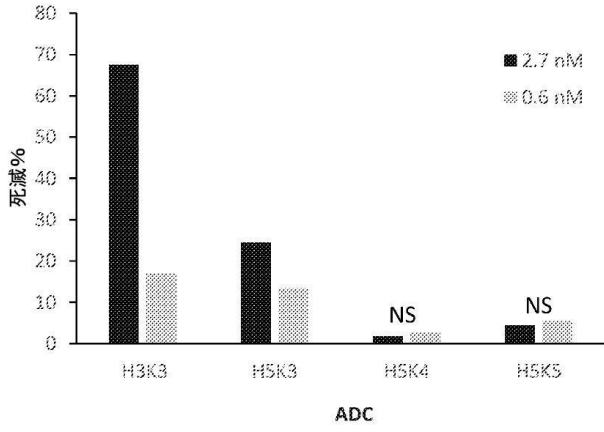
20

30

40

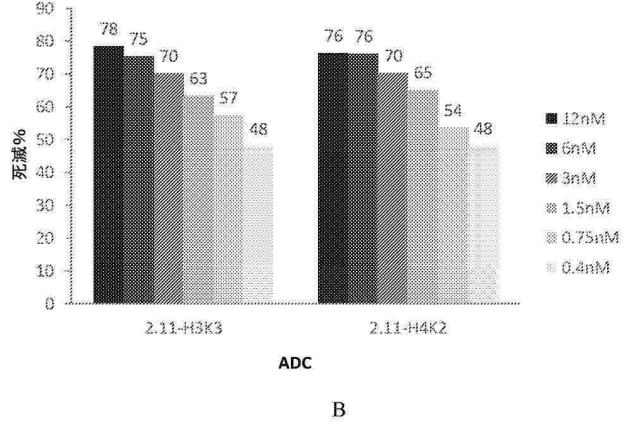
50

【 5 - 1 】



A

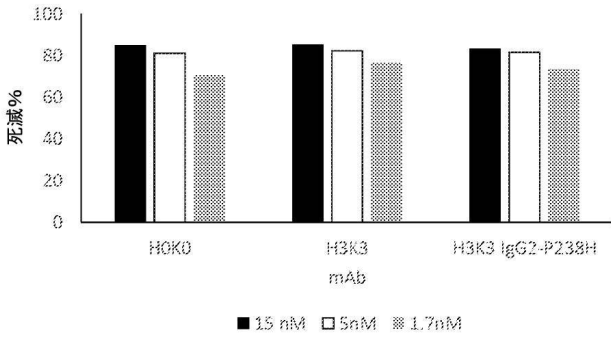
【 5 - 2 】



B

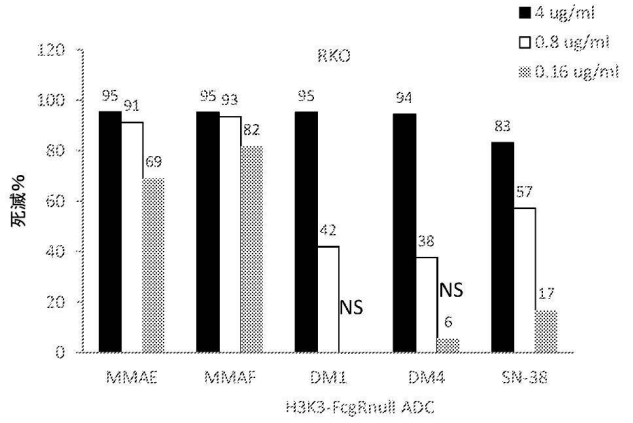
10

【 5 - 3 】



C

【 6 - 1 】



A

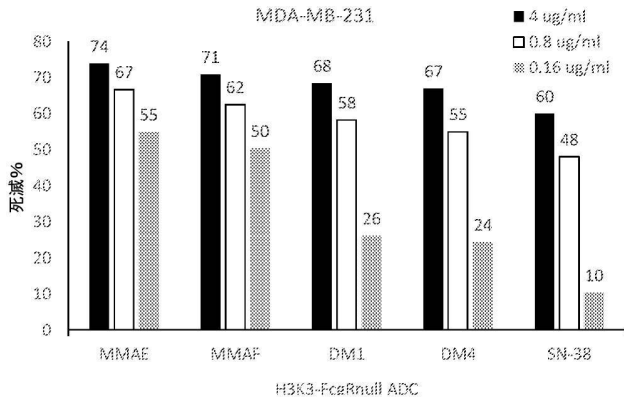
20

30

40

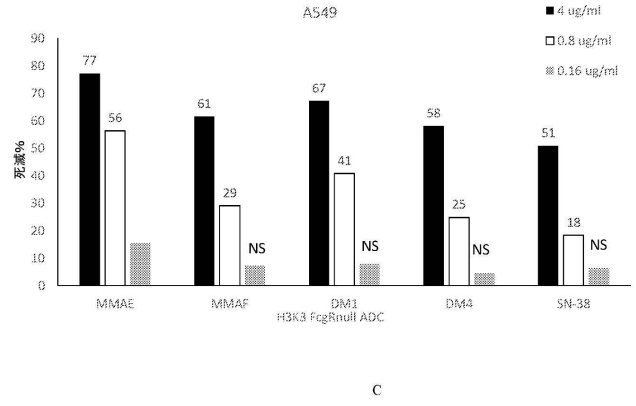
50

【 図 6 - 2 】



B

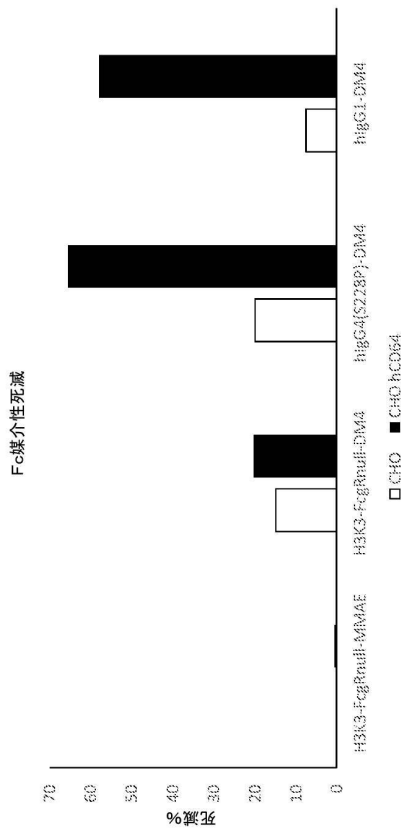
【 図 6 - 3 】



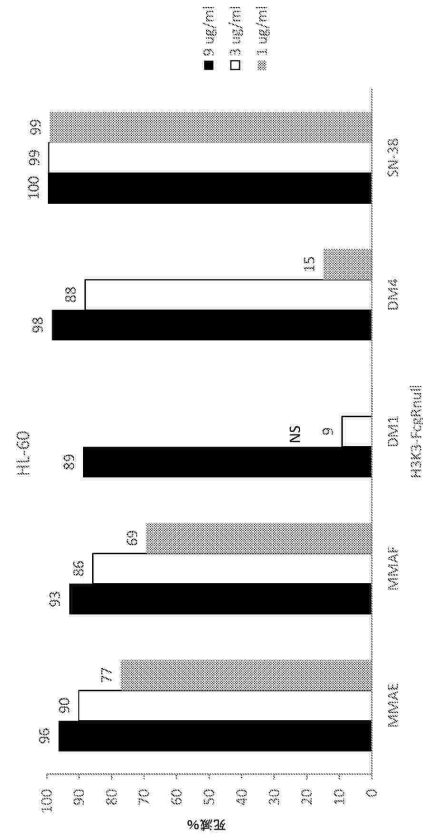
C

10

【 図 7 】



【 図 8 】



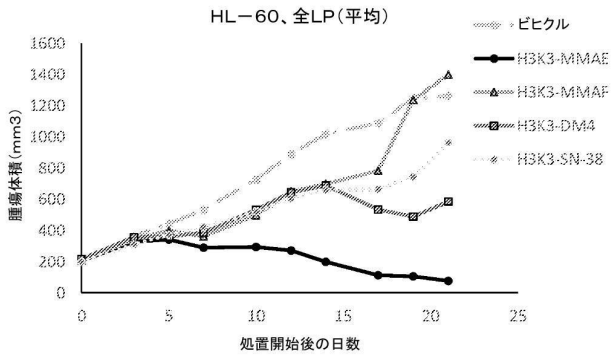
20

30

40

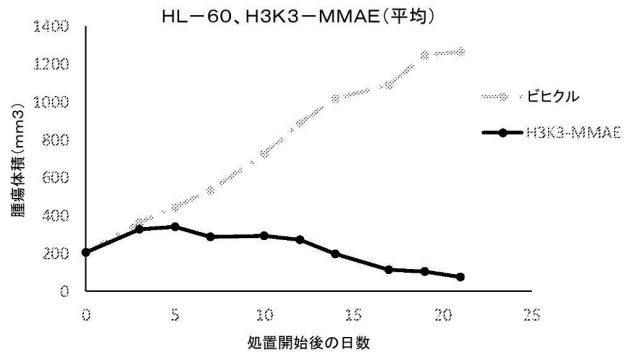
50

【 図 9 - 1 】



A

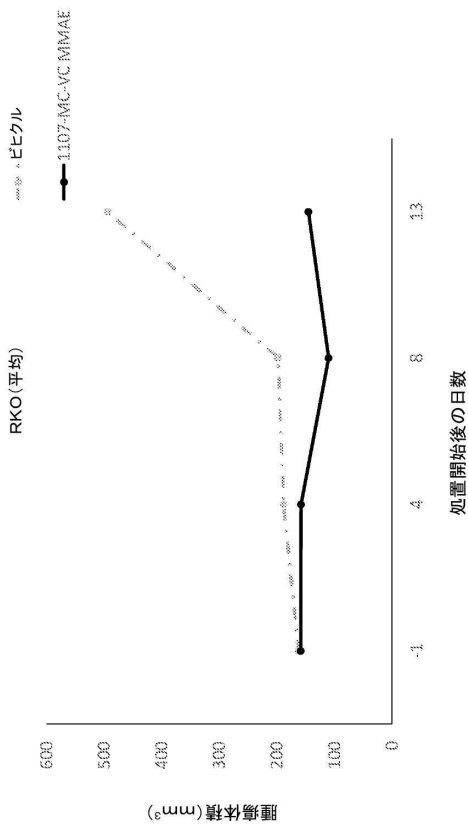
【 図 9 - 2 】



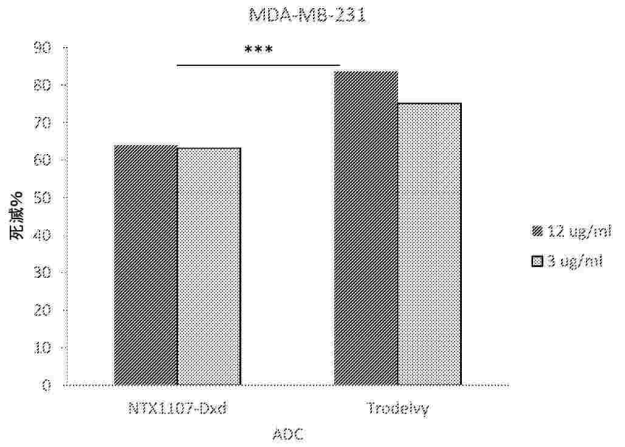
B

10

【 図 1 0 】



【 図 1 1 】



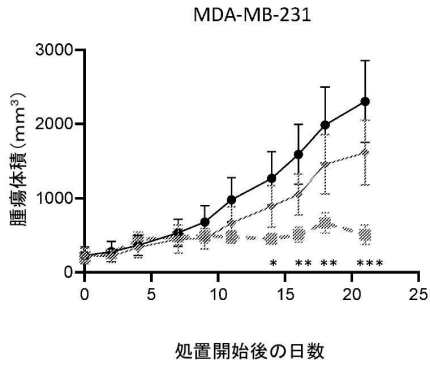
20

30

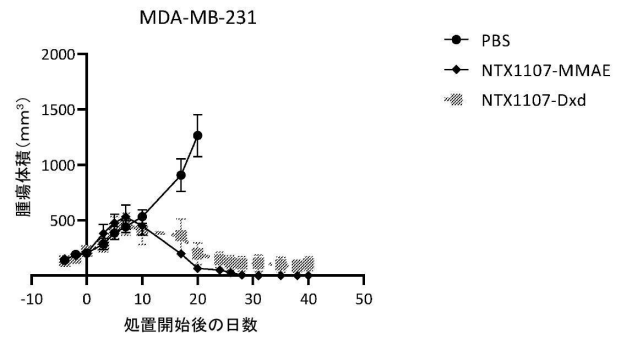
40

50

【 図 1 2 】



【 図 1 3 】



10

【 配列表 】

2025507817000001.xml

20

30

40

50

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No PCT/IL2023/050203
--

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
INV. C07K16/28 A61K47/68 A61P35/00		
ADD.		
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) A61P C07K A61K		
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) EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/008928 A1 (SATO SHUJI [US] ET AL.) 14 January 2010 (2010-01-14) examples 1,8,36-38,6,12, 21-24,7,11,9,14-15; tables 3,7,9 -----	1-31
X	WO 2008/126847 A1 (TAKEDA PHARMACEUTICAL [JP]; SATO SHUJI [JP] ET AL.) 23 October 2008 (2008-10-23) examples ref 1,ref.2, 2-5 -----	1-31
X	WO 2020/144697 A1 (YISSUM RES DEV CO OF HEBREW UNIV JERUSALEM LTD [IL] ET AL.) 16 July 2020 (2020-07-16) cited in the application examples 3,4,6,7,12 -----	1-31
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents :		
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	
"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)	"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	
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	"&" document member of the same patent family	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		
Date of the actual completion of the international search 15 May 2023	Date of mailing of the international search report 30/05/2023	
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Siaterli, Maria	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

page 1 of 2

10

20

30

40

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/IL2023/050203

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>OSHIMA TSUTOMU ET AL: "Fc engineering of anti-Nectin-2 antibody improved thrombocytopenic adverse event in monkey", PLOS ONE, vol. 13, no. 5, 3 May 2018 (2018-05-03), page e0196422, XP093036789, DOI: 10.1371/journal.pone.0196422 the whole document</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1-31

10

20

30

40

1

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/IL2023/050203

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:

10

20

30

40

50

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/IL2023/050203

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 2010008928 A1	14-01-2010	AR 063153 A1	30-12-2008
		AU 2007307536 A1	17-04-2008
		BR PI0717024 A2	11-03-2014
		CA 2666249 A1	17-04-2008
		CL 2007002879 A1	27-06-2008
		CN 101541834 A	23-09-2009
		CO 6190538 A2	19-08-2010
		EC SP099276 A	30-06-2009
		EP 2067791 A1	10-06-2009
		JP WO2008044754 A1	18-02-2010
		KR 20090078339 A	17-07-2009
		MA 30816 B1	01-10-2009
		PE 20081456 A1	27-11-2008
		RU 2009117237 A	20-11-2010
		TN 2009000090 A1	19-08-2010
		TW 200823235 A	01-06-2008
		US 2010008928 A1	14-01-2010
		WO 2008044754 A1	17-04-2008
		WO 2008126847 A1	23-10-2008
WO 2020144697 A1	16-07-2020	AU 2020207664 A1	22-07-2021
		CA 3125962 A1	16-07-2020
		CN 113301954 A	24-08-2021
		EP 3908372 A1	17-11-2021
		IL 284807 A	31-08-2021
		JP 2022519341 A	23-03-2022
		KR 20210117277 A	28-09-2021
		US 2022112283 A1	14-04-2022
WO 2020144697 A1	16-07-2020		

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 K 38/08 (2019.01)	A 6 1 K 38/08	
A 6 1 K 31/537 (2006.01)	A 6 1 K 31/537	
A 6 1 K 31/4745(2006.01)	A 6 1 K 31/4745	
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	E
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	T
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
	G 0 1 N 33/531	A

,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

ス 7 7 1 5 5

- (72)発明者 オビエダット、アクラム
 イスラエル国 9 1 2 9 3 0 エルサレム、ピー . オー . ボックス 2 9 3 5 9
- (72)発明者 シナモン、ガイ
 イスラエル国 6 5 2 1 2 1 4 テルアビブ、パルファー ストリート 4 5

F ターム (参考) 4C076 AA95 CC27 CC41 EE41 EE59
 4C084 AA17 BA16 NA05 NA13 ZB26
 4C085 AA14 AA16 AA21 BB36 BB42 CC23 DD62 EE01 GG01
 4C086 AA01 AA02 CB09 CB22 MA01 MA02 MA04 MA05 NA05 NA13
 ZB26
 4H045 AA10 AA30 BA09 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74