

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2021-524746

(P2021-524746A)

(43) 公表日 令和3年9月16日(2021.9.16)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	4 C 0 8 5
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28 Z N A	4 H 0 4 5
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/46	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N	
A 6 1 P 37/04 (2006.01)	A 6 1 P 37/04	
審査請求 有 予備審査請求 未請求 (全 70 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号 特願2020-564922 (P2020-564922)
 (86) (22) 出願日 令和1年5月24日 (2019.5.24)
 (85) 翻訳文提出日 令和3年1月18日 (2021.1.18)
 (86) 国際出願番号 PCT/KR2019/006270
 (87) 国際公開番号 W02019/226017
 (87) 国際公開日 令和1年11月28日 (2019.11.28)
 (31) 優先権主張番号 10-2018-0059257
 (32) 優先日 平成30年5月24日 (2018.5.24)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)
 (31) 優先権主張番号 PCT/KR2018/005968
 (32) 優先日 平成30年5月25日 (2018.5.25)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 韓国 (KR)

(71) 出願人 519238473
 エービーエル バイオ インコーポレイテッド
 大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2 ボンギル, 1 6, 2 階
 (74) 代理人 110002077
 園田・小林特許業務法人
 (72) 発明者 パク, キョンス
 大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2 ボンギル, 1 6, 2 階

最終頁に続く

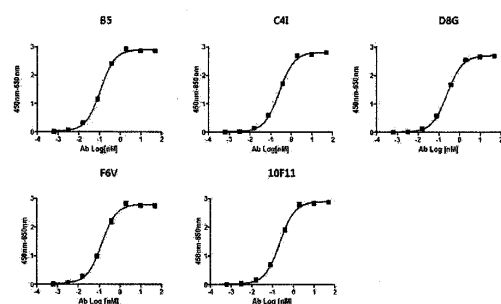
(54) 【発明の名称】 抗-B 7 - H 3 抗体およびその用途

(57) 【要約】

抗体依存性細胞媒介細胞毒性を誘導する免疫チェックポイントの免疫活性および B 7 - H 3 によって抑制された T 細胞の活性化を有し、癌の治療剤に有用に使用可能な B 7 - H 3 を特異的に認識する抗-B 7 - H 3 抗体を提供する。具体的には、免疫チェックポイントの前記抑制活性を有する前記抗体は、他の免疫抗体治療剤と併用して使用可能である。また、B 7 - H 3 に特異的に結合して B 7 - H 3 を発現する多様な癌の検出、および特定の癌に対する薬物の伝達などを含む癌ターゲット治療に有用に使用可能である。

【選択図】 図 1 A

Fig 1a



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片であって

、

前記抗体または抗原結合断片は、(i) C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 の重鎖相補的決定領域 (c o m p l e m e n t a r i t y d e t e r m i n i n g r e g i o n s)、および (i i) C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 の軽鎖相補的決定領域を含み、

前記 C D R H 1 は配列番号 1 ~ 4 から選択されるいずれか 1 つであり；

前記 C D R H 2 は配列番号 5 ~ 9 および 6 8 から選択されるいずれか 1 つであり；

前記 C D R H 3 は配列番号 1 0 ~ 1 4 から選択されるいずれか 1 つであり；

前記 C D R L 1 は配列番号 1 5 ~ 1 9 から選択されるいずれか 1 つであり；

前記 C D R L 2 は配列番号 2 0 ~ 2 4 および 6 9 から選択されるいずれか 1 つであり；

および

前記 C D R L 3 は配列番号 2 5 ~ 2 9 から選択されるいずれか 1 つである、

B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片。

【請求項 2】

前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 が以下のうちのいずれか 1 つの組み合わせである、請求項 1 に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片：

(a) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 1、5 および 1 0 ；

(b) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 2、6 および 1 1 ；

(c) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 3、7 および 1 2 ；

(d) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 1、8 および 1 3 ；

(e) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 4、9 および 1 4 ；または

(f) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 3、6 8 および 1 2 。

【請求項 3】

前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 が以下のうちのいずれか 1 つの組み合わせである、請求項 1 に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片：

(a) 前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 5、2 0 および 2 5 ；

(b) 前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 6、2 1 および 2 6 ；

(c) 前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 7、2 2 および 2 7 ；

(d) 前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 8、2 3 および 2 8 ；

(e) 前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 9、2 4 および 2 9 ；または

(f) 前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 7、6 9 および 2 7 。

【請求項 4】

前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 ；および前記 C D R L 1、C D R L 2 お

10

20

30

40

50

よび C D R L 3 は、以下のうちのいずれか 1 つの組み合わせである、請求項 1 に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片：

前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 は、以下のうちのいずれか 1 つの組み合わせ：

- (a) それぞれ配列番号 1、5 および 1 0 ；
- (b) それぞれ配列番号 2、6 および 1 1 ；
- (c) それぞれ配列番号 3、7 および 1 2 ；
- (d) それぞれ配列番号 1、8 および 1 3 ；
- (e) それぞれ配列番号 4、9 および 1 4 ；または
- (f) それぞれ配列番号 3、6 8 および 1 2 ；および

10

前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 は、以下のうちのいずれか 1 つの組み合わせ：

- (g) それぞれ配列番号 1 5、2 0 および 2 5 ；
- (h) それぞれ配列番号 1 6、2 1 および 2 6 ；
- (i) それぞれ配列番号 1 7、2 2 および 2 7 ；
- (j) それぞれ配列番号 1 8、2 3 および 2 8 ；
- (k) それぞれ配列番号 1 9、2 4 および 2 9 ；または
- (l) それぞれ配列番号 1 7、6 9 および 2 7。

【請求項 5】

前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 ；および前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 は、以下のうちのいずれか 1 つの組み合わせである、請求項 1 に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片：

20

(a) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 1、5 および 1 0、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 1 5、2 0 および 2 5 ；

(b) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 2、6 および 1 1、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 1 6、2 1 および 2 6 ；

(c) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 3、7 および 1 2、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 1 7、2 2 および 2 7 ；

30

(d) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 1、8 および 1 3、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 1 8、2 3 および 2 8 ；

(e) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 4、9 および 1 4、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 1 9、2 4 および 2 9 ；

(f) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 3、6 8 および 1 2、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 1 7、2 2、および 2 7 ；または

40

(g) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 3、6 8 および 1 2、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 1 7、6 9 および 2 7。

【請求項 6】

下記の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、請求項 1 に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片：

(1) 配列番号 3 0 ~ 3 4 および 7 0 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域；および

(2) 配列番号 3 5 ~ 3 9 および 7 1 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域。

50

【請求項 7】

下記の配列組み合わせのうちのいずれか 1 つで表される重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、請求項 6 に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片：

配列番号 3 0 および 3 5 ；配列番号 3 1 および 3 6 ；配列番号 3 2 および 3 7 ；配列番号 3 3 および 3 8 ；配列番号 3 4 および 3 9 ；配列番号 7 0 および 3 7 ；または配列番号 7 0 および 7 1 。

【請求項 8】

前記抗体または抗原結合断片が単クローン抗体である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片。

10

【請求項 9】

前記単クローン抗体が I g G 1 、 I g G 2 、 I g G 3 または I g G 4 タイプである、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片。

【請求項 1 0】

前記 B 7 - H 3 は、ヒト、マウスまたはサルの B 7 - H 3 である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片。

【請求項 1 1】

前記抗体または抗原結合断片が F a b 、 F a b ' 、 F (a b ') ₂ 、 s c F a b 、 F v 、 d s F v 、 s c F V 、 s c F V - F c 、ミニボディ (m i n i b o d y) 、ダイアボディ (d i a b o d y) 、 s c A b 、 d A b 、 2 価抗体 (b i v a l e n t a n t i b o d y) または多価抗体 (m u l t i v a l e n t a n t i b o d y) である、請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する分離された抗体または前記抗体の抗原結合断片。

20

【請求項 1 2】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片をコーディングする分離された、ポリヌクレオチド。

【請求項 1 3】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片をコーディングする前記ポリヌクレオチドを含む、ベクター。

30

【請求項 1 4】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片をコーディングする前記ポリヌクレオチドを含むベクターで形質転換された、細胞株。

【請求項 1 5】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片および薬学的に許容される賦形剤を含む、薬学的組成物。

【請求項 1 6】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片および薬学的に許容される賦形剤を含む B 7 - H 3 の過発現に関連する疾患の治療または予防用、薬学的組成物。

40

【請求項 1 7】

前記 B 7 - H 3 の過発現に関連する疾患は、癌である、請求項 1 6 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 8】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片を B 7 - H 3 の検出を必要とする生物学的サンプルと接触させる段階を含む、生物学的サンプルにおける B 7 - H 3 の検出方法。

【請求項 1 9】

請求項 1 ～ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片を生物学的サ

50

ンプルと接触させる段階、および

B 7 - H 3 が存在するか、前記 B 7 - H 3 の濃度が前記抗体または前記抗体の抗原結合断片と接触した対照群に比べて増加した場合、前記生物学的サンプルまたは前記生物学的サンプルを有している患者が B 7 - H 3 の過発現に関連する疾病を持っていると決定する段階を含む、

B 7 - H 3 の過発現に関連する疾患を診断する方法。

【請求項 20】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片を、T 細胞の活性を再活性化する必要がある被験者または細胞または組織に投与する段階を含む B 7 - H 3 免疫チェックポイントによって抑制された T 細胞の活性を再活性化させる方法。

10

【請求項 21】

請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体または前記抗体の抗原結合断片を含む、B 7 - H 3 免疫チェックポイントによって抑制された T 細胞の活性を再活性化させる組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

抗 - B 7 - H 3 抗体または抗原 - 結合断片およびその用途を提供する。

【背景技術】

【0002】

B 7 - H 3 (C D 2 7 6) は B 7 ファミリーの構成員で、細胞外領域、膜横断領域および細胞内領域を含む膜貫通タンパク質である。B 7 - H 3 の 2 つの細胞外領域は、エクソンの重複により、免疫グロブリンの可変領域および不変領域の単一对 (2 I g B 7 - H 3) または 2 つの同一対 (4 I g B 7 - H 3) で構成される。これら 2 つの形態の機能的な差異点は確認されていない。前記 B 7 - H 3 の細胞内領域は短くて知られたモチーフがない (Chapoval AI, Ni J, Lau JS, Wilcox RA, Flies DB, Liu D, et al. Nat Immunol 2001; 2: 269 - 74。)。

20

【0003】

前記 B 7 - H 3 は B 7 ファミリーの他の構成員と 20 - 27 % のアミノ酸の同一性を有する。ヒト B 7 - H 3 はマウス B 7 - H 3 と 88 % のアミノ酸の同一性を有する。しかし、前記マウス B 7 - H 3 は 1 つのサブタイプ (2 I g B 7 - H 3) を有するが、前記ヒト B 7 - H 3 は 2 つのサブタイプ (2 I g B 7 - H 3、4 I g B 7 - H 3) を有する。4 I g B 7 - H 3 はヒト組織において優勢に確認される。

30

【0004】

マウス B 7 - H 3 が C D 8 + T 細胞の T L T 1 に結合して、T 細胞の増殖、サイトカインの生成および細胞毒性を向上させることが発見されており、これによって T L T 2 が B 7 - H 3 受容体として作用できるとの提案があった。しかし、その後に、このような相互作用に関する前記証拠はマウスおよびヒトともにおいて発見されなかった (M. Loos, D. M. Hedderich, and D. M. Hedderich, et al. BMC Cancer, vol. 9, article 463, 2009)。

40

【0005】

前記 B 7 - H 3 タンパク質は、正常組織において T 細胞、ナチュラルキラー細胞 (natural killer cell、NK cell) および抗原提示細胞 (antigen presenting cell、APC) で常に発現するものではないが、その発現が誘導されることがある。たとえ前記 B 7 - 1 および B 7 - 2 の発現が抗原提示細胞のような免疫細胞にだけ限られているものの、前記 B 7 - H 3 タンパク質は、骨芽細胞 (osteoblast)、線維芽細胞 (fibroblast)、線維芽細胞様滑膜細胞 (fibroblast-like synovial cell) および上皮細胞 (epithelial cell) だけでなく、ヒトの肝、肺、膀胱、睾丸、前立腺、乳房、胎盤およびリンパ管器官にも存在する。このような広範囲な発現パターンは、特に末

50

梢組織においてB7-H3での免疫学的および非-免疫学的機能を提案する。

【0006】

最近、前記B7-H3の発現は、非小細胞肺癌(non-small cell lung cancer)、腎細胞癌(renal cell carcinoma)、神経芽細胞腫(neuroblastoma)、大腸癌(colorectal cancer)、膵臓癌(pancreatic cancer)、胃癌(gastric cancer)、肺癌(lung cancer)、前立腺癌(prostate cancer)、子宮内膜癌(endometrial cancer)、肝細胞癌(hepatocellular carcinoma)、乳癌(breast cancer)、子宮頸癌(cervical cancer)、骨肉腫(osteosarcoma)、口腔癌(oral cancer)、膀胱癌(bladder cancer)、神経膠腫(glioma)、黒色腫(melanoma)などの多様な固形癌で確認され、急性白血病(acute leukemia)、多発性骨髄腫(multiple myeloma)、多様なリンパ腫などの血液癌で発現することが報告されている(Zhimeng Yea, Zhuojun Zhengb et al, Cell Physiol Biochem(2016), Elodie Picarda, Kim C. Ohaegbulam and Xingxing Zang, clinical cancer research(2016), Wei Zhang, Yanfang Wang, Jing Wang et al, international journal of oncology(2015))。

10

20

【0007】

B7-H3は多様な癌種で過発現するが、前記正常組織での発現は極めて低い。多くの研究において、殆どの癌類型で、B7-H3の異常な発現が現れており、細胞質または癌細胞の核内部だけでなく、腫瘍関連の血管系でも発見されることが明らかになった。腫瘍の大きさ、転移、癌病期、生存率および再発率などのような多様な臨床病理学的指標を推定する時、前記B7-H3の過発現は悪い診断および悪い臨床結果に関連づけられている。前立腺癌患者を対象にした研究によれば、前記B7-H3の発現が強い前記腫瘍細胞患者は手術当時の疾病伝播の危険、臨床癌再発および癌関連死亡の危険が有意に高かった。肺癌に対する前記B7-H3の発現は、腫瘍浸潤リンパ球(tumor-infiltrating lymphocytes、TILs)の減少およびリンパ節転移に関連があり、免疫回避および腫瘍生成におけるB7-H3の役割を示唆する(Elodie Picarda, Kim C. Ohaegbulam and Xingxing Zang, Clin Cancer Res, 2017 Jul 12; 22)。

30

【0008】

B7-H3は、腫瘍免疫を調節する役割のほかにも、腫瘍の攻撃性を調節する非免疫性の機能を有している。これは、Jak2/Stat3/MMP-9信号伝達経路を通して多様な癌細胞のフィブロネクチン(fibronectin)に移動、侵入および要請を調節することが明らかになった(Elodie Picarda, Kim C. Ohaegbulam and Xingxing Zang, Clin Cancer Res, 2017 Jul 12; 22)。腫瘍関連抗原のB7-H3は、siRNAによる下方調節によりフィブロネクチンに対する細胞の付着を減少させ、黒色腫(melanoma)および乳癌細胞における移動および浸透を70%以上減少させた(Chen YW, Tekle C, Fodstad O, Curr Cancer Drug Targets 2008; 8)。これらの結果はB7-H3が癌治療に有用なターゲットになり得ることを暗示する。

40

【0009】

B7-H3は、免疫チェックポイントリガンド(immune checkpoint ligand)に属するタンパク質である。前記免疫チェックポイントタンパク質は、人体内の免疫細胞が間違った異常な行動ができないように調節する役割を果たす。前記免疫チェックポイントタンパク質が癌細胞で過発現する時、免疫細胞は前記癌細胞が送る異

50

常な信号を正常信号として受け入れ、前記癌細胞を健康な細胞として認識する。免疫チェックポイント抑制剤は、このような前記癌細胞の異常な信号を遮断して患者自身の免疫機能で癌を治療させる抗癌免疫治療剤である。前記免疫チェックポイントリガンドの一種である B7 - H3 は、T 細胞表面の B7 - H3 受容体と結合し、前記 T 細胞の免疫反応抑制を誘導するが、今のところは B7 - H3 の結合する受容体は何であるかが明らかにされていない。

【0010】

このような免疫チェックポイントリガンドを遮断できる抗体は、免疫チェックポイントリガンドと免疫チェックポイント受容体の相互作用を部分的にまたは完全に中和させて、免疫チェックポイントを抑制させることで低下していた免疫細胞の活性を再活性化させて免疫抗癌治療効果を奏する。B7 - H3 と結合する受容体はまだ発見されていないが、B7 - H3 と結合する抗 - B7 - H3 抗体は、前記免疫チェックポイント受容体および B7 - H3 の間の結合を遮断し、このような免疫チェックポイントを抑制させて前記低下していた免疫細胞の活性を再活性化させて免疫抗癌治療効果を奏することができる。つまり、前記 B7 - H3 受容体と結合を遮断する抗 B7 - H3 単クローン抗体は抗癌治療効果を期待できる (Elodie Picarda, Kim C. Ohaegbulam and Xingxing Zang, Clin Cancer Res, 2017 Jul 12; 22)。米国特許 8,802,091 および 9,371,395 は B7 - H3 に対する抗体を開示している。

10

【0011】

前記同一の B7 - H3 抗原に対する抗体でも、各抗体の特性または用途に応じて多様な抗癌抗体に開発可能なため、このような B7 - H3 の癌特異的発現、多様な癌での発現および免疫チェックポイントリガンドとしての機能を考慮すれば、既存の抗体を補完または代替できる多様な抗体の開発が必要である。

20

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

B7 - H3 を特異的に認識できるタンパク質、例えば、抗体またはその抗原結合断片を提供する。

【課題を解決するための手段】

30

【0013】

一実施形態は、B7 - H3 の細胞外領域またはその抗原結合断片に特異的に結合する分離された抗体およびその用途を提供する。特に、前記抗体はヒト B7 - H3 を特異的に認識することができ、サルとマウス B7 - H3 に交差反応を示す。

【0014】

一実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、(i) CDRH1、CDRH2 および CDRH3 の重鎖相補性決定領域 (heavy chain complementary determining regions)、および (ii) CDRL1、CDRL2 および CDRL3 の軽鎖相補性決定領域 (light chain complementarity determining regions) を含むポリペプチドであつてもよく、前記 CDRH1 は配列番号 1 ~ 4 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり；前記 CDRH2 は配列番号 5 ~ 9 および 68 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり；前記 CDRH3 は配列番号 10 ~ 14 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり；前記 CDRL1 は配列番号 15 ~ 19 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり；前記 CDRL2 は配列番号 20 ~ 24 および 69 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり；前記 CDRL3 は配列番号 25 ~ 29 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり。前記用語「CDRH」は、重鎖可変領域 (heavy chain variable region) に含まれている CDR を示し、前記用語「CDRL」は、軽鎖可変領域 (light chain variable region) に含

40

50

まれている C D R を示す。

【 0 0 1 5 】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、(i) C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 の相補的決定領域 (c o m p l e m e n t a r y d e t e r m i n i n g r e g i o n s) を含む重鎖可変領域、および / または (i i) C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 の相補的決定領域を含む軽鎖可変領域を含むことができ、前記 C D R H 1 は配列番号 1 ~ 4 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり ; 前記 C D R H 2 は配列番号 5 ~ 9 および 6 8 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり ; 前記 C D R H 3 は配列番号 1 0 ~ 1 4 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり ; 前記 C D R L 1 は配列番号 1 5 ~ 1 9 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり ; 前記 C D R L 2 は配列番号 2 0 ~ 2 4 および 6 9 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなり ; 前記 C D R L 3 は配列番号 2 5 ~ 2 9 から選択されるいずれか 1 つを含むか、必須として含んでなる。

10

【 0 0 1 6 】

他の実施形態において、前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 は、以下から選択される組み合わせであってもよい : 順に、配列番号 1、5 および 1 0 ; 配列番号 2、6 および 1 1 ; 配列番号 3、7 および 1 2 ; 配列番号 1、8 および 1 3 ; 配列番号 4、9 および 1 4 ; または配列番号 3、6 8 および 1 2。

【 0 0 1 7 】

他の実施形態において、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 は、以下から選択される組み合わせであってもよい : 順に、配列番号 1 5、2 0 および 2 5 ; 配列番号 1 6、2 1 および 2 6 ; 配列番号 1 7、2 2 および 2 7 ; 配列番号 1 8、2 3 および 2 8 ; 配列番号 1 9、2 4 および 2 9 ; または配列番号 1 7、6 9 および 2 7。

20

【 0 0 1 8 】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、(i) C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 の重鎖相補性決定領域、および / または (i i) C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 の軽鎖相補性決定領域を含むポリペプチドであってもよく、

前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 は、以下の組み合わせのうちの 1 つであり : C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 1、5 および 1 0 の組み合わせ ; C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 2、6 および 1 1 の組み合わせ ; C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 3、7 および 1 2 の組み合わせ ; C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 1、8 および 1 3 の組み合わせ ; C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 4、9 および 1 4 の組み合わせ、または C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 がそれぞれ配列番号 3、6 8 および 1 2 の組み合わせ ; および

30

前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 は、以下の組み合わせのうちの 1 つである : C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 5、2 0 および 2 5 の組み合わせ ; C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 6、2 1 および 2 6 の組み合わせ ; C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 7、2 2 および 2 7 の組み合わせ ; C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 8、2 3 および 2 8 の組み合わせ ; C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 9、2 4 および 2 9 の組み合わせ、または C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 1 7、6 9 および 2 7 の組み合わせ。

40

【 0 0 1 9 】

重鎖可変領域由来の C D R の組み合わせのうちの 1 つ、および軽鎖可変領域由来の C D R の組み合わせのうちの 1 つを自由に組み合わせることができる。

【 0 0 2 0 】

他の実施形態において、前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 ; および前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 の配列は、以下のうちのいずれか 1 つの組み合わせであってもよい :

50

(a) CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号1、5および10、かつ、CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号15、20、および25；

(b) CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号2、6および11、かつ、CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号16、21、および26；

(c) CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号3、7および12、かつ、CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号17、22、および27；

(d) CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号1、8および13、かつ、CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号18、23、および28；

(e) CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号4、9および14、かつ、CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号19、24、および29；

(f) CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号3、68および12、かつ、CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号17、22、および27；または

(g) CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号3、68および12、かつ、CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号17、69および27。

【0021】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、配列番号30～34、および70のアミノ酸配列で構成された群より選択されたいずれか1つで表される重鎖可変領域を含むことができる。

【0022】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、配列番号35～39、および71のアミノ酸配列で構成された群より選択されたいずれか1つで表される軽鎖可変領域を含むことができる。

【0023】

それぞれの重鎖可変領域および軽鎖可変領域を互いに組み合わせることができる。

【0024】

一実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含むことができ、前記重鎖および軽鎖可変領域は、以下の配列の組み合わせであってもよい：配列番号30および35；配列番号31および36；配列番号32および37；配列番号33および38；配列番号34および39；配列番号70および37；または配列番号70および71。

【0025】

他の実施形態において、前記抗体は、IgGタイプ、例えば、ヒト、サルまたはマウスIgG1、IgG2、IgG3またはIgG4タイプであってもよい。

【0026】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、配列番号60によって現れる重鎖不変領域 (heavy chain constant region)、および/または配列番号64によって現れる軽鎖不変領域 (light chain constant region) を提供する。例えば、前記配列番号60の重鎖不変領域を含む重鎖は、配列番号40～44、および72のうちのいずれか1つで表してもよい。例えば、前記配列番号64の軽鎖不変領域を含む重鎖は、配列番号45～49、および73のうちのいずれか1つで表してもよい。

【0027】

他の実施形態において、前記抗体は、下記配列で表される重鎖および軽鎖の組み合わせ

10

20

30

40

50

を含むか、必須として含んでなる：配列番号 4 0 および 4 5；配列番号 4 1 および 4 6；配列番号 4 2 および 4 7；配列番号 4 3 および 4 8；配列番号 4 4 および 4 9；配列番号 7 2 および 4 7 または配列番号 7 2 および 7 3。

【0028】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、ヒト化抗体、ヒト抗体（例：完全なヒト抗体）、または抗体結合断片であってもよく、サルおよびマウスの B 7 - H 3 に対する交差反応性を有することができる。前記抗体または抗原結合断片は、非自然的に発生可能であり；例えば、合成または組換えであってもよいが、これに限定されない。

【0029】

他の実施形態において、前記抗体は、単クローン抗体であってもよく、特にヒト単クローン抗体であってもよい。一実施形態において、前記抗体は、サル B 7 - H 3 およびマウス B 7 - H 3 に交差反応性を有することができる。

【0030】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、特異的にヒト B 7 - H 3、サル B 7 - H 3、および / またはマウス B 7 - H 3 を認識する。

【0031】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F a b、F v、d s F v、s c F V、s c F V - F c、ミニボディ (m i n i b o d y)、ダイアボディ (d i a b o d y)、s c A b、d A b、2 価抗体 (b i v a l e n t a n t i b o d y) または多価抗体 (m u l t i v a l e n t a n t i b o d y) を含み、これに限定されない。

【0032】

他の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、B 7 - H 3 免疫チェックポイントを抑制または遮断することができ、これにより、B 7 - H 3 免疫チェックポイントによって前記活性が分解または抑制された T 細胞を再活性化することができる。そのため、前記抗体または抗原結合断片を前記 B 7 - H 3 免疫チェックポイントによって抑制された T 細胞の再活性化、およびこのような B 7 - H 3 免疫チェックポイントの抑制といったことにより前記再活性化を要求する多様な疾病の治療に有用に使用可能である。

【0033】

他の側面において、本発明はまた、抗体または抗原結合断片をコーディングする分離されたポリヌクレオチドを提供する。

【0034】

一実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、前記重鎖 C D R および軽鎖 C D R で構成された群より選択された少なくとも 1 つをコーディングするポリヌクレオチド、例えば、前記開示のように、C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 を含む重鎖 C D R、および / または C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 を含む軽鎖 C D R であってもよい。

【0035】

他の実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、前記開示された重鎖および / または軽鎖可変領域をコーディングするポリヌクレオチドであってもよい。

【0036】

他の実施形態において、前記ポリヌクレオチドは、前記開示された重鎖および / または軽鎖をコーディングするポリヌクレオチドであってもよい。

【0037】

他の側面において、前記ポリヌクレオチドを含むベクターが提供される。一実施形態において、前記ベクターは、抗体生産のための発現ベクターまたは C A R - T 細胞 (C h i m e r i c A n t i g e n r e c e p t o r r e d i r e c t e d T c e l l s) または C A R - N K (N a t u r a l K i l l e r) 細胞のためのベクターを含むことができる。

【0038】

他の側面において、前記ベクターによって形質転換された細胞株を提供する。

10

20

30

40

50

【 0 0 3 9 】

他の具体例は、前記細胞株から抗体またはその抗原結合断片を分離する段階を含む、B 7 - H 3 またはその抗原結合断片に特異的に結合する、分離された抗体の製造方法を提供する。

【 0 0 4 0 】

他の具体例は、前記抗体またはその抗原結合断片を含む組成物または薬学的組成物および薬学的に許容される賦形剤を提供する。

【 0 0 4 1 】

一実施形態において、前記薬学的組成物は、癌のような疾病を治療および / または予防するための薬学的組成物である。

【 0 0 4 2 】

他の具体例は、本願に開示された抗体またはその抗体結合断片を B 7 - H 3 発現の検出を必要とする生物学的サンプルと接触させる段階を含む生物学的サンプルにおける B 7 - H 3 の検出方法を提供する。

【 0 0 4 3 】

前記方法は、前記接触段階の後、前記抗体または抗原結合断片で処理された（接触した）生物学的サンプルにおける抗原 - 抗体反応を測定する段階を追加的に含むことができる。

【 0 0 4 4 】

一実施形態において、前記方法は、体外または体内で行うことができる。

【 0 0 4 5 】

他の実施形態において、前記抗体またはその抗体結合断片、または前記抗体または抗原結合断片を含む前記組成物を含むキットを提供する。前記キットは、前記キットが使用される特定の目的により、B 7 - H 3 検出用キット、癌治療用投与用キットまたは癌治療用キットとして提供することができ、特定の目的により、追加的な成分を含むことができる。例えば、免疫学的分析のための成分、例えば、検出または診断のためのキットに対するバッファおよび説明書、または抗体投与または癌治療のためのキットに対する投与装置および説明書を含むことができる。

【 0 0 4 6 】

前記抗体またはその抗原結合断片は、（ 1 ）ヒト、マウスまたはサルに由来する細胞表面に発現した B 7 - H 3 を特異的に認識するか、B 7 - H 3 に結合するか、（ 2 ）細胞表面に存在しない B 7 - H 3 の細胞外領域を特異的に認識するか、細胞外領域に結合することができる。

【 0 0 4 7 】

前記単クローン抗体は、抗体 - 依存性細胞 - 媒介細胞毒性（antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity、ADCC）誘導能力および免疫細胞活性化誘導能力とを示し、少なくとも 2 つのメカニズムにより癌細胞の死滅または癌の成長を効果的に抑制することができる。そのため、B 7 - H 3 に特異的な高い ADCC を示す前記抗体を癌細胞特異的死滅により癌の治療に有用に使用可能であり、既存の前記抗 - B 7 - H 3 抗体と比較して、より高い抗体 - 依存性細胞 - 媒介細胞毒性を示し、そのため、前記既存の抗体の代わりに癌細胞の治療に効果的に使用可能である。

【 0 0 4 8 】

また、前記単クローン抗体は、免疫チェックポイントリガンドの B 7 - H 3 によって活性が低下した T 細胞を活性化する免疫チェックポイント抑制剤として効果を奏し、免疫細胞の活性化により癌治療に有用に使用される。

【 0 0 4 9 】

それだけでなく、前記抗体を、例えば、特定の癌などに薬物を伝達するか、特異的結合による癌の検出、診断および / または標的化に使用可能である。

【 0 0 5 0 】

10

20

30

40

50

また、前記開示された単クローン抗体は、ヒト、サルおよびマウス B 7 - H 3 に前記結合親和性を有する種内交差 - 反応性を有する。これは、マウスまたはサル B 7 - H 3 に前記結合親和性を示し得ない他のヒト抗体に比べて、薬などの開発に非常に有用である。例えば、前記単クローン抗体または前記抗体を用いた多様な形態の治療剤は、高費用のサル - ベースの実験を進行させる前に、低費用のマウスモデルから前記初期結果を得て、より経済的で効果的に薬物の開発を進行させることができる。

【図面の簡単な説明】

【 0 0 5 1 】

【図 1】図 1 A および 1 B は、本発明の一実施例により用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体の B 7 - H 3 タンパク質の細胞外領域 (e x t r a c e l l u l a r d o m a i n 、 E C D) に対する前記結合能力の分析 (E L I S A) を行った結果である。すべての抗体がヒト B 7 - H 3 タンパク質の前記細胞外領域に濃度依存的に結合することが明らかになった。

10

【図 2】図 2 は、本発明の一実施例により用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体の B 7 科に属する前記他のタンパク質の E C D に対する前記結合能力の分析 (E L I S A) を行った結果である。本発明の一実施例により用意されたすべての抗体が前記他のタンパク質に結合せず、B 7 - H 3 タンパク質だけを特異的に認識することが明らかになった。

【図 3】図 3 は、本発明の一実施例により用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体の種内交差反応性を E L I S A で分析した結果である。すべての抗体がサル (c y n o m o l g u s) B 7 - H 3 およびマウス B 7 - H 3 に濃度依存的に結合することが明らかになった。

20

【図 4】図 4 は、本発明の一実施例により用意された多様な抗 - B 7 - H 3 抗体の結合能力の程度を E L I S A でマウス B 7 - H 3 タンパク質と比較した結果である。前記マウス B 7 - H 3 に対する抗体の結合程度は多様であるが、すべての抗体は濃度依存的にマウス B 7 - H 3 タンパク質に結合することが明らかになった。対照的に、対照群として使用された 8 4 D 抗体はマウス B 7 - H 3 タンパク質に結合しなかった。

【図 5】図 5 は、本発明の一実施例により用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体の細胞表面発現の B 7 - H 3 抗原に対する結合能力を測定した結果である。M C F - 7 細胞株は B 7 - H 3 を過発現する細胞株であり、J u r k a t は B 7 - H 3 を発現しない細胞株である。抗 - B 7 - H 3 抗体が B 7 - H 3 を過発現する細胞株の M C F - 7 に特異的に結合し、B 7 - H 3 を発現しない細胞株の J u r k a t には結合しないことを示した。

30

【図 6】図 6 は、本発明の一実施例により用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体の前記細胞表面に発現した B 7 - H 3 抗原に対する抗体の濃度変化に対する結合能力を測定 (F A C S) した結果である。すべての抗体が B 7 - H 3 発現の癌細胞株 (M C F - 7 、 D L D - 1 、 H C C 1 9 5 4 、 および H C T 1 1 6) に濃度依存的に結合することを示した。他の多様な癌細胞株で発現する B 7 - H 3 に対する抗体の結合能力は表 5 に開示されている。特定の抗原に対する抗体を治療用抗体などとして体内で使用するためには、細胞表面発現の抗原に結合することが必要である。一部の抗体の場合、精製された抗原に結合するが、前記細胞表面に発現した抗原には結合しない。この場合、体内に投与された前記抗体は体内細胞に結合できないので、体内で治療用抗体として作用できない。そのため、このような結果は、抗 - B 7 - H 3 抗体が細胞表面の B 7 - H 3 に結合して体内で活性を示し得て、治療用抗体として有用に使用できることを示す。

40

【図 7】図 7 は、前記抗 - B 7 - H 3 抗体がマウス由来癌細胞株 (C T 2 6 、 B 1 6 F 1 0 、 および T C - 1) に対する結合能力測定 (F A C S) の結果である。すべての B 7 - H 3 単クローン抗体は、マウス由来癌細胞株の表面で発現した B 7 - H 3 も特異的に認識することが明らかになった。

【図 8】図 8 は、本発明の一実施例で用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体の A D C C 誘導能力を測定した結果である。本発明の一実施例で用意された前記抗体は、M C F - 7 、 C a l u - 6 、 D L D - 1 および M i n o を含むヒト B 7 - H 3 陽性細胞株でのみ特異的な A D C C 誘導を示した。A D C C はヒト B 7 - H 3 陰性細胞株では観察されなかった。これは、前記抗体が B 7 - H 3 発現の癌細胞にのみ特異的に結合し、抗体依存的細胞媒介細

50

胞毒性を誘導するため、癌細胞の死滅に効果的に使用できることを示す。特に、前記抗 - B 7 - H 3 抗体は、対照群抗体の 8 4 D に比べて E C 5 0 が低く、抗体依存性細胞媒介細胞毒性の信号強度がより強いこと、癌治療により効果的に使用できることを示す。

【図 9 A】図 9 A は、B 7 - H 3 タンパク質によって抑制される T 細胞の活性および結果としてインターフェロンガンマ (i n t e r f e r o n g a m m a) の生成を抑制することを示す。これは、前記 B 7 - H 3 タンパク質が濃度依存的にインターフェロンガンマの生成を抑制したことを示した。

【図 9 B】図 9 B は、本発明の一実施例で用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体がインターフェロンガンマの生成によって測定された図 9 A と同様に、B 7 - H 3 タンパク質によって抑制された T 細胞の活性を再活性化させることができることを示す。図 9 A および図 9 B の結果は、前記抗 B 7 - H 3 単クローン抗体が B 7 - H 3 タンパク質による T 細胞の免疫抑制を中和または遮断できることを意味する。つまり、前記 B 7 - H 3 抗体は、活性が抑制された T 細胞を再活性化させて T 細胞による癌細胞の死滅を誘導することができ、これは、前記 B 7 - H 3 抗体が効果的に癌治療に使用できることを示す。

【図 1 0】図 1 0 は、本発明の一実施例で用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体がガンマの生成によって測定された抗 P D - 1 抗体とともに使用される時、インターフェロンによる T 細胞の活性化に与える影響を示す。これは、前記抗 - B 7 - H 3 抗体が単独でまたは前記抗癌免疫抗体と前記 T 細胞を活性化してインターフェロンガンマの生成を促進することを示した。これは、前記抗体が単独でまたは他の抗癌免疫抗体と結合される時、前記 T 細胞を活性化して癌治療に効果的に使用できることを示す。

【図 1 1】図 1 1 は、マウス B 7 - H 3 陽性癌細胞株の C T 2 6 が移植された同種腫瘍移植モデルにおいて本発明の一実施例で用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体を抗 P D - 1 抗体と併用投与した場合、腫瘍の成長が抑制され成長率が増加したことを確認した結果である。抗 P D - L 1 抗体は免疫チェックポイントの抑制により作用する。この結果は、前記抗 - B 7 - H 3 抗体は抗 P D - 1 抗体と併用投与される時、癌治療に効果的に使用可能であり、成長率を増加させることができることを示す。

【図 1 2】図 1 2 は、マウス B 7 - H 3 陽性癌細胞株の C T 2 6 が移植された同種腫瘍移植モデルにおいて本発明の一実施例により用意された前記抗 - B 7 - H 3 抗体を抗 P D - a 抗体と併用投与する時、腫瘍における腫瘍浸潤リンパ球の流れを分析した結果である。これは、前記抗 - B 7 - H 3 抗体と抗 P D - 1 抗体の併用投与によって C D 8 + T 細胞の活性が増加し、調節 T 細胞の増殖が抑制されることを示した。これは、前記抗 - B 7 - H 3 抗体および前記免疫チェックポイント抑制剤の抗 P D - 1 抗体の併用投与による前記抗癌効果が、前記 C D 8 + T 細胞および調節 T 細胞の変化により現れることを意味する。

【発明を実施するための形態】

【 0 0 5 2 】

本明細書は、B 7 - H 3 の細胞外領域を特異的に認識できる抗体の開発に基づくものである。

【 0 0 5 3 】

本項目で使用されたタイトルは、明細書の記載の便宜性のためのものに過ぎず、これに制限されるわけではない。

【 0 0 5 4 】

本明細書において、異なって定義しない限り、本発明で使用された科学および技術的用語は、本技術分野における当業者が通常理解する通りの意味を有する。さらに、文脈上特に要求されなければ、単数は複数を含み、複数は単数を含む。

【 0 0 5 5 】

特定の配列番号で表される本発明で開示されたすべてのアミノ酸配列およびヌクレオチド配列は、抗 - B 7 - H 3 抗体としての活動を維持する限り、特定の配列番号の配列だけでなく、少なくとも 9 0 %、少なくとも 9 2 %、少なくとも 9 4 %、少なくとも 9 5 %、少なくとも 9 6 %、少なくとも 9 7 %、少なくとも 9 8 %、または少なくとも 9 9 % の特定の配列番号の配列と同一性を有する配列を含むか、必須として含むか、または配列で構

10

20

30

40

50

成される。

【0056】

定義

本明細書において、「ポリヌクレオチド」または「核酸」は、単一または二重鎖のヌクレオチドポリマーを含む。このようなポリヌクレオチドを含む前記ヌクレオチドは、リボヌクレオチドまたはデオキシリボヌクレオチド、またはこれらの変形した形態であってもよい。

【0057】

本明細書において、特に断らなければ、前記ポリヌクレオチドの左側末端が5'末端であり、右側末端は3'末端を表す。

10

【0058】

本明細書において、「分離された核酸分子」は、その全部または一部が自然に存在するポリヌクレオチドと関連性がなかったり、または自然で観察されないポリヌクレオチドに連結されている、遺伝体起源のDNAまたはRNA、または合成起源のmRNA、cDNAまたはこれらの組み合わせを意味する。本発明の目的下、特定の核酸配列を含む前記核酸分子は完全な(intact)染色体を含まない。代わりに、特定の核酸配列を含む前記分離された核酸分子は、その特定の配列に付加して、少なくとも数個の付加的なタンパク質コーディング配列を含むか、前記特定の核酸配列の発現のための調節配列および/またはベクターを追加的に含むことができる。

20

【0059】

本明細書において、「調節配列」は、これに作動可能に連結されてコーディング配列の発現およびプロセッシングに影響を与え得るポリヌクレオチド配列を意味する。前記調節配列の特徴は宿主の種類によって影響を受けられる。例えば、原核細胞に作用できる前記調節配列は、プロモーター(promoter)、場合によって、オペレーター(operator)、リボソーム結合部位(ribosome-binding site)および転写終結配列(transcription termination sequence)を含むことができる。真核細胞において、前記調節配列は、複数の認識部位(multiple recognition sites)を含むプロモーター(promote)、転写エンハンサー(transcription enhancer)、ポリアデニル化配列(polyadenylation sequence)および転写終結配列(transcription termination sequence)を含むことができる。前記調節配列は、追加的にリーダー配列(reader sequence)および/または融合パートナー配列(fusion partner sequence)を含むことができる。

30

【0060】

本明細書において、「ベクター」は、タンパク質をコーディングする核酸分子を宿主細胞に伝達するのに使用される、例えば、核酸、プラスミド、バクテリオファージまたはウイルスを含む任意の分子を意味する。

【0061】

本明細書において、「発現ベクター」は、宿主細胞の形質転換に適したベクターを意味し、発現ベクターに作動可能に連結されて目的のタンパク質をコーディングする異種配列の発現を調節する核酸配列を含むベクターを意味する。この発現ベクターはまた、前記コーディング配列に作動可能に連結され、転写、翻訳およびイントロンが存在する場合、RNAスプライシング(splicing)または影響を与える配列を含むことができる。

40

【0062】

本明細書において、「作動可能に連結された」は、連結しようとする核酸配列が適切な条件でターゲティング機能を果たせるように位置することを意味する。例えば、もしコーディング配列および調節配列を含むベクターにおいて適切な条件下で前記コーディング配列の転写が前記調節配列によって影響を受ければ、これは作動可能に連結されたのである。

50

【0063】

本明細書において、「宿主細胞」は、ターゲッティング核酸配列によって形質転換されるか、形質転換される標的ターゲット遺伝子を発現できる細胞を意味する。前記用語は、宿主細胞のアイデンティティおよび形態と遺伝的構成に関係なくターゲット遺伝子を発現する前記宿主細胞の子孫を含む。

【0064】

本明細書において、「形質導入 (transduction)」は、一般にバクテリオファージによってアルバクテリアから他のバクテリアに核酸が動くことを意味する。例えば、複製できないレトロウイルス (retrovirus) を用いて真核細胞への核酸の移動を含む。

【0065】

本明細書において、「伝達移入 (transfection)」は、細胞が外来または外因性 DNA を得ることを意味し、この場合、DNA が細胞膜を通して細胞内に導入する。これは、当該技術分野における公知の方法として、例えば、Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 4th ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2012)、Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates を参照することができる。

【0066】

本明細書において、「形質転換 (transformation)」は、細胞が新しい DNA または RNA を含むように変形した、細胞の遺伝的特徴の変化を意味する。例えば、形質導入、伝達移入、またはその他の技術により新しい遺伝的物質を導入して、細胞の遺伝的特性が変化することによって細胞が形質転換される。形質導入または伝達移入などを含む方法によって形質転換された前記 DNA は、細胞の染色体に物理的に統合されて存在してもよく、複製のないエピソーム形態または複製可能なプラスミドとして一時的に存在してもよい。前記形質転換された DNA が宿主細胞の分裂とともに複製される時、安定して形質転換されたものと見なされる。

【0067】

本明細書において、「アミノ酸」は、当該技術分野で理解される通常の意味を含む。20 個の自然発生したアミノ酸およびこれらの縮約形は当業界に通用するものによる (Immunology - A Synthesis, 2nd Edition, E.S. Golub and D.R. Green, eds., Sinauer Associates: Sunderland, Mass. 1991)。前記アミノ酸は、典型的なアミノ酸、典型的な 20 個のアミノ酸 (D - アミノ酸) の立体異性体、非 - 自然アミノ酸、例えば、 α - 、 α - 二置換されたアミノ酸 (α - 、 α - disubstituted amino acids)、N - アルキルアミノ酸 (N - alkyl amino acids)、および他の非 - 典型的なアミノ酸を含む。非 - 典型アミノ酸の例としては、4 - ヒドロキシプロリン (4 - hydroxyproline)、 γ - カルボキシグルタメート (γ - carboxyglutamate)、 ϵ - N, N, N - トリメチルリシン (ϵ - N, N, N - trimethyllysine)、 ϵ - N - アセチルリシン (ϵ - N - acetyllysine)、O - ホスホセリン (O - phosphoserine)、N - アセチルセリン (N - acetylserine)、N - ホルミルメチオニン (N - formylmethionine)、3 - メチルヒスチジン (3 - methylhistidine)、5 - ヒドロキシリシン (5 - hydroxylysine)、 σ - N - メチルアルギニン (σ - N - methylarginine) および他の類似するアミノ酸とイミノ酸 (例えば、4 - ヒドロキシプロリン) が含まれる。本明細書で使用されたポリペプチド表記において、当業界で一般に通用されるように、配列の左側はアミノ末端であり、配列の右側はカルボキシ末端を表す。

【0068】

本明細書において、「ポリペプチド」または「タンパク質」は、アミノ酸残基の重合体 (polymer) を意味し、本明細書において相互交換的に使用される。これはまた、自然的に発生したアミノ酸残基の重合体だけでなく、その類似体または模倣体の重合体も含む。さらに、前記ポリペプチドまたはタンパク質は、リン酸化またはグリコシル化 (glycosylation) のための炭水化物の追加などの変形を含むことができる。また、前記ポリペプチドまたはタンパク質は、組換えまたは自然的に発見される細胞から生成される。さらに、前記ポリペプチドまたはタンパク質は、野生型配列または前記アミノ酸配列の一部が欠失、添加および/または置換されたものを含むことができる。また、前記ポリペプチドまたはタンパク質は、抗体、例えば、抗-B7-H3抗体(またはB7-H3抗体と称する)、B7-H3結合タンパク質、または抗原結合断片、または前記1つ以上のアミノ酸が欠失、付加および/または置換された配列を含む。さらに、「ポリペプチド断片」は、アミノ末端のアミノ酸配列の欠失、カルボキシル末端のアミノ酸配列の欠失および/または内部欠失を有するポリペプチドを意味する。このような断片はまた、全長タンパク質 (full-length protein) に比べて変形したアミノ酸を含むことができる。一実施形態において、前記断片は、長さが約5~900個のアミノ酸、例えば、断片は少なくとも5、6、8、10、14、20、50、70、100、110、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800または850個のアミノ酸またはそれ以上であってもよい。本発明の目的を考慮すれば、前記有用なポリペプチド断片は、抗原-結合ドメインを含む抗体の免疫学的機能性断片を含む。B7-H3結合抗体の場合、このような有用な断片は、重鎖または軽鎖の1個、2個または3個を含むCDR配列、または重鎖または軽鎖の可変領域または不変領域を含む抗原鎖の全部または一部を含むが、これに限定されるものではない。

【0069】

本明細書において、「分離されたポリペプチド、抗体またはタンパク質」は、これらと通常ともに発見される他のタンパク質が存在せず、自然的にこれらと結合している脂質、炭水化物およびポリヌクレオチドの少なくとも約50%以上が除去されたものである。一般に、前記分離されたタンパク質、ポリペプチドまたは抗体は、特定の組成物において少なくとも約5%以上、少なくとも約10%以上、少なくとも約25%以上または少なくとも約50%以上を含む。このポリペプチドは、ゲノムDNA、cDNA、mRNAまたは合成起源の他のRNAまたはこれらの任意の組み合わせによってコーディングされる。特に、前記分離されたタンパク質、ポリペプチドまたは抗体には、治療、診断および予防研究または他の用途への適用を妨げる他のタンパク質または他のポリペプチドの汚染物質が実質的に存在しない。

【0070】

本明細書において、例えば、抗原結合断片、タンパク質または抗体のようなポリペプチドの「変異体 (variant)」は、他のポリペプチド配列と比較して、1つ以上のアミノ酸残基が挿入、欠失、付加および/または置換されたポリペプチドであり、融合ポリペプチドを含む。また、タンパク質変異体は、タンパク質酵素切断、リン酸化または他の後翻訳変形 (posttranslational modification) によって変形したものの、前記開示された抗体の生物学的活性、例えば、B7-H3に特異的結合および生物学的活性を維持するものを含む。前記変異体は、前記開示された抗体またはその抗原結合断片の配列と約99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、または80%同一のものであってもよい。パーセント同一性 (%) または相同性は、以下の説明を参照して計算することができる。

【0071】

一実施形態において、前記パーセント相同性または同一性を $100 * [(同じ位置) / \min(TG_A, TG_B)]$ で計算することができ、上記式中、 TG_A 、 TG_B は、比較される配列AおよびBの残基の数および内部ギャップ位置の合計である (Russell

et al., J. Mol Biol., 244:332-350 (1994)。

【0072】

本明細書において、前記保存的アミノ酸の置換は、ポリペプチドの活性または抗原性に実質的に影響を与えない置換を意味する。前記ポリペプチドは、1つ以上の保存的置換を含む。非-制限的例示は下記表3に開示されている。

【0073】

前記ポリペプチドの「誘導体(derivative)」は、挿入、欠失、付加または置換変異体とは異なる、他の化学的モイエティ(chemical moiety)との接合により化学的に変形したポリペプチドを意味する。

【0074】

本明細書において、ポリペプチド、核酸、宿主細胞などに関連して使用される前記用語「自然的に発見される」は、自然的に存在する物質を意味する。

【0075】

前記開示された抗体または抗原結合断片によって認識される前記B7-H3(B7 Homolog 3、CD276)は、免疫グロブリン(immunoglobulin、Ig)相と(superfamily)に属するB7科の膜貫通タンパク質を称することができ、細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域を含む。前記抗体が認識する前記B7-H3は、細胞膜に存在するか、存在しない細胞外領域であってもよい。B7-H3の前記ヒトタンパク質は、534個のアミノ酸で構成されており、これはNCBI Reference Sequence: NP_001019907.1で開示されている。前記使用された文脈で明らかでない限り、前記B7-H3は、ヒトB7-H3を称すが、前記抗体は、サルおよびマウスB7-H3に特異的に結合能力を有する。前記サルB7-H3タンパク質は534個のアミノ酸で構成されており、NCBI Reference Sequence: XP_005560056.1で開示されている。前記マウスB7-H3タンパク質は316個のアミノ酸で構成されており、NCBI Reference Sequence: NP_598744.1で開示されている。

【0076】

本明細書において、「同一性」または相同性は、2個以上のポリペプチドまたは2個以上のポリヌクレオチドを整列し比較して決定される2個以上のポリペプチドまたは2個以上のポリヌクレオチドの配列の類似性を意味する。このような配列間の同一性は一般に「同一性パーセント」で表され、これは、比較する分子間の同一のアミノ酸またはヌクレオチドの比率を意味し、比較する分子のうち最も小さい分子の大きさを基準として測定される。核酸またはポリペプチドを配列して多くの分子間の前記同一性を計算するのに使用される方法について以下の文書を参照することができる: Computational Molecular Biology, (Lesk, A.M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D.W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; and Carillo et al., 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073。

【0077】

前記同一性パーセントの計算に際して、比較される配列は、配列間における最大限のマッチングを提供する方式で整列され、前記整列された配列にはギャップ、マッチングおよ

10

20

30

40

50

びミス・マッチが存在し、これは特定の数学的モデルまたはコンピュータアルゴリズムで処理される。一実施形態において、この同一性パーセントは、Needleman and Wunschアルゴリズムを用いて、比較される配列間における前記マッチは最大化し、ギャップの数は最小化する方式で2つの配列を整列するGAPプログラムを含むGCGプログラムパッケージを用いて決定可能である(Devereux et al., 1984, Nucl. Acid Res. 12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI, USA)。前記コンピュータアルゴリズムGAPは、比較される2個のポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列において、これらの間におけるマッチは最大化し、ギャップの数は最小化する方式で2つの配列を整列して「マッチング区間(span)」を決定する。前記アルゴリズムはまた、ギャップ開放ペナルティ(gap opening penalty)[これは3*平均対角線で計算され、前記「平均対角線」は、使用される比較マトリクス(comparison matrix)の対角線平均であり、前記「対角線」は、特定の比較マトリクスによってそれぞれの完全なアミノ酸のマッチに割り当てられたスコアまたは数字である]およびギャップ拡張ペナルティ(gap extension penalty)(これは一般に、ギャップ開放ペナルティの1/10倍である)、そして、例えば、PAM250またはBLOSUM62のような比較マトリクスをもに使用する。一具体例において、標準比較マトリクス(standard comparison matrix)(Dayhoff et al., 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352 for PAM250 comparison matrix; refer to Henikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919 for BLOSUM62 comparison matrix参照)を使用する。一実施形態において、GAPプログラムを用いたポリペプチドまたはポリヌクレオチドの同一性パーセントを決定するために推奨されるパラメータは以下の通りである：アルゴリズム：Needleman et al., 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453；比較マトリクス：BLOSUM62(Henikoff et al., 1992, supra)；ギャップペナルティ：12(no penalty for a terminal gap)；ギャップ長さペナルティ(gap length penalty)：4；類似性閾値(similarity threshold)：0。

【0078】

たとえ、2つの配列間で有意な関連性がないにもかかわらず、2つの配列を特定のパラメータを用いて整列する時、短い配列領域で高い同一性でマッチングされる結果が出る。この場合、2つの配列が最小50個の連続的アミノ酸にわたって整列されるように、前記GAPプログラムのような、使用されるアルゴリズムのパラメータを修正することができる。

【0079】

本明細書で使用される「実質的に純粋な」は、ターゲッティング分子が優勢な種として存在することである。つまり、モル基準で、同一の混合物内で任意の他の個別的な種より濃度がより高いことを意味する。一実施形態において、実質的に純粋な分子は、組成物に含まれているすべてのポリマー種類の少なくとも約50%(モル基準)、少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%または少なくとも約99%含まれる。他の実施形態において、前記ターゲッティング分子は、既存の方法を利用してそれ以上汚染物が検出されない程度まで実質的に均質に精製され、前記組成物は均質な1種類のポリマー物質だけを含む。

【0080】

一側面において、本願は、B7-H3タンパク質に特異的に結合する組換え抗体またはその抗原結合断片に関する。この側面において、「組換えタンパク質」は、組換え技術を用いて、つまり、本明細書に記載されたように、組換え核酸の発現により製造されたタン

パク質である。組換えタンパク質の生産のための前記方法および技術は当該技術分野で広く公知である。

【0081】

本明細書において、「親和性 (a f f i n i t y)」は、抗体またはその抗原結合断片と抗体との間の相互作用の強度であり、これは、抗原の大きさ、形状および/または電荷のような抗原の特徴および抗体または抗原結合断片の C D R 配列によって決定される。前記親和性を決定する前記方法は当該技術分野で公知であり、下記を参照することができる。

【0082】

前記抗体またはその抗原結合断片は、解離定数 (d i s s o c i a t i o n c o n s t a n t、 K_D) が 10^{-6} M の時、抗原のようなそのターゲットに「特異的に結合する」と呼ばれる。前記抗体は、 K_D が 1×10^{-8} M の時、「高い親和性」でターゲットに特異的に結合する。

10

【0083】

本明細書において、「抗原結合領域または部位」は、特定の抗原に特異的に結合するタンパク質またはタンパク質の一部を意味する。例えば、前記抗原と相互作用して、前記抗体に抗原に対する特異性および親和性を提供するアミノ酸残基を含む抗体の一部がこれに相当する。このような抗原結合領域は典型的に、1つ以上の「相補性決定領域 (c o m p l e m e n t a r y d e t e r m i n i n g r e g i o n s、C D R)」を含む。特定の抗原結合領域はまた、1つ以上の「フレームワーク」領域を含む。前記フレームワーク領域は、これら C D R の適切な形態 (c o n f o r m a t i o n) を維持するのに役立

20

【0084】

本明細書において、「抗体」は、任意の完全な (i n t a c t) 免疫グロブリンのアイソタイプ、またはターゲット抗原への結合のために完全な抗体と競争できる抗原結合断片を意味する。例えば、これは、キメラ、ヒト化、完全なヒトおよび多重特異的抗体またはこれらの抗原結合断片を含む。前記抗体は、それ自体で抗原結合タンパク質の一種である。前記完全な抗体は一般に、少なくとも2個の全長重鎖および2個の全長軽鎖を含むが、ラクダ科動物で自然的に発見される一部のケースのように、前記抗体は、重鎖だけを含んでもよい。前記抗体またはその抗原結合断片は、単に単一源 (s o u r c e) またはキメラに由来できる。前記キメラ抗体は、2種類の異なる抗体に由来する部分を含み、下記により詳しく記載する。前記抗体またはその抗原結合断片は、ハイブリドーマ、組換え D N A 技術または完全な抗体の酵素的または化学的切断によって生成される。他に言及がなければ、本明細書において、前記用語、抗体は、2個の全長重鎖および2個の全長軽鎖を含み、これらの誘導体、変異体、断片、および突然変異体を含み、これらの例は以下に記載する。

30

【0085】

本明細書において、「軽鎖」は、抗原またはエピトープに対する結合特異性を提供するのに十分な可変領域配列を有する全長軽鎖およびその断片を含む。前記全長軽鎖は、可変領域ドメイン V L および不変領域ドメイン C L を含む。前記軽鎖の可変領域ドメインは、軽鎖ポリペプチドのアミノ末端に存在する。前記軽鎖の種類は、カッパ (k a p p a) およびラムダ (l a m d a) 鎖を含む。

40

【0086】

本明細書において、「重鎖」は、抗原またはエピトープに対する結合特異性を提供するのに十分な可変領域配列を有する全長重鎖およびその断片を含む。前記全長重鎖は、可変領域ドメイン V H と3個の不変領域ドメイン C H 1、C H 2 および C H 3 を含む。前記 V H ドメインは重鎖ポリペプチドのアミノ末端に存在し、前記 C H ドメインはカルボキシ末端に存在し、前記 C H 3 ドメインはカルボキシ末端に最も近く位置する。前記重鎖は、I g G (I g G 1、I g G 2、I g G 3 および I g G 4 サブタイプを含む)、I g A (I g A 1 および I g A 2 サブタイプを含む)、および I g M と I g E アイソタイプを含む。

50

【 0 0 8 7 】

本明細書で使用された、抗体または免疫グロブリン鎖（重鎖または軽鎖）の「抗原結合断片」は、全長鎖と比較して一部のアミノ酸が不足するものの、抗原に特異的に結合できる抗体の一部を含む。この断片はターゲット抗原に特異的に結合可能であり、または他の抗体または抗原結合断片と特定のエピトープに結合するために競争できるという側面から、生物学的活性があるといえる。一側面において、この断片は、全長軽鎖または重鎖内に少なくとも1つのCDRを含み、一部の実施形態において、単鎖重鎖および/または軽鎖、またはその一部を含む。このような生物学的活性断片を組換えDNA技術によって生成するか、または、例えば、完全な抗体を酵素的または化学的に切断して生成することができる。免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFab、dsFv、Fv、scFv、scFv-Fc、ダイアボディ(diabody)、ミニボディ(minibody)、scAb、and dAbを含み、これに限定されるものではない。また、ヒト、マウス、ラット、カメリドまたはウサギを含む任意の哺乳動物に由来でき、これに限定されるものではない。本明細書に記載の1つ以上のCDRのような前記抗体の機能的な部分は、第2のタンパク質または低分子化合物と共有結合によって連結されており、特定のターゲットに対するターゲット治療剤として使用できる。

10

【 0 0 8 8 】

本明細書において、「Fc」領域は、抗体のCH₂およびCH₃ドメインを含む2個の重鎖断片を含む。この2個の重鎖断片は、2個以上のジスルフィド結合およびCH₃ドメインの疎水性相互作用によって互いに結合する。

20

【 0 0 8 9 】

本明細書において、「Fab断片」は、1個の軽鎖と、CH₁および可変領域だけを含む1個の重鎖とで構成される。Fab分子の重鎖は、他の重鎖分子とジスルフィド結合を形成できない。

【 0 0 9 0 】

本明細書において、「Fab'断片」は、Fab断片に追加的に重鎖のCH₁およびCH₂ドメインの間の領域を含み、これは、2つの分子のFab'断片の2個の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合を形成し、F(ab')₂分子を形成することができる。

【 0 0 9 1 】

本明細書において、「F(ab')₂断片」は、先に記載したように、2個の軽鎖を含み、可変領域、CH₁およびCH₁とCH₂ドメインの間の不変領域の一部を含む2個の重鎖を含み、2個の重鎖間で鎖間ジスルフィド結合が形成される。したがって、前記F(ab')₂断片は、2個のFab'断片で構成され、前記2個のFab'断片は、これらの間のジスルフィド結合によって互いに接する。

30

【 0 0 9 2 】

本明細書において、「Fv領域」は、重鎖と軽鎖の可変領域それぞれを含むが、不変領域は含まない抗体である。scFcは、Fvが柔軟なリンカーに連結されたものである。scFv-Fcは、FcがscFvに連結されたものである。前記ミニボディ(minibody)は、CH₃がscFvに連結されたものである。前記ダイアボディ(diabody)は、scFvの2つの分子を含む。

40

【 0 0 9 3 】

本明細書において、「単鎖抗体(scAb)」は、重鎖の1つの可変領域または重鎖および軽鎖可変領域が柔軟なリンカーによって連結された軽鎖不変領域を含む単一ポリペプチド鎖である。前記単鎖抗体は、例えば、米国特許第5,260,203号を参照することができ、これは参照によって本明細書に開示される。

【 0 0 9 4 】

本明細書において、「ドメイン抗体(dAb)」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含む免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片である。一実施形態において、2以上のVH領域は、ペプチドリinkerによって共有結合で連結され、2価(bivalent)

50

n t) のドメイン抗体を形成する。このような 2 価のドメイン抗体の 2 個の V H 領域は、同一または異なる抗原をターゲティングすることができる。

【0095】

本明細書において、「2 価抗原 - 結合タンパク質」または「2 価抗体」は、2 つの抗原 - 結合部位を含む。前記 2 価抗体に含まれている 2 個つの抗原 - 結合部位は、同一の抗原特異性を有するか、それぞれ異なる抗原に結合する二重 - 特異的な抗体を有することができる。

【0096】

本明細書において、「多重 - 特異的抗原 - 結合タンパク質」または「多重 - 特異的抗体」は、2 以上の抗原またはエピトープをターゲティングする。

【0097】

本明細書において、「二特異的」、「二重 - 特異的」抗原 - 結合タンパク質または抗体は、2 個の異なる抗原 - 結合部位を有するハイブリッド抗原結合タンパク質または抗体である。このような二特異的抗体は、多重 - 特異的抗原 - 結合タンパク質または多重 - 特異的抗体の一種で、公知の多様な方法、例えば、ハイブリドーマ融合または Fab' 断片の連結によって生成される。例えば、Song s i v i l a i a n d L a c h m a n n , 1 9 9 0 , C l i n . E x p . I m m u n o l . 7 9 : 3 1 5 - 3 2 1 ; K o s t e l n y e t a l . , 1 9 9 2 , J . I m m u n o l . 1 4 8 : 1 5 4 7 - 1 5 5 3 など

を参照することができる。前記二特異的抗原結合タンパク質または抗体の 2 個の抗原結合部位が結合する 2 個の互いに異なるエピトープは、同一または異なるタンパク質のターゲットに位置することができる。

【0098】

本明細書において、「抗原」または「免疫原」は、例えば、抗原結合タンパク質（例：抗体またはその免疫学的に機能的な抗原結合断片）が結合できる分子または分子の一部分を意味し、動物で抗原に結合できる抗体の生成に使用できる。前記抗原は、他の抗体またはその断片と相互作用できる 1 つ以上のエピトープを含むことができる。一実施形態において、前記抗原は、B 7 - H 3 タンパク質の細胞外ドメインである。他の実施形態において、前記抗体は、細胞表面に存在しない B 7 - H 3 または細胞膜に存在する形態の B 7 - H 3 のすべての細胞外ドメインを認識することができる。

【0099】

本明細書において、「エピトープ」は、抗原結合タンパク質または抗体によって結合するか、これらが認識する分子の部分であり、例えば、抗体または T 細胞受容体のような抗原結合タンパク質に特異的に結合できる任意の決定因子を含む。前記エピトープは、連続的または非連続的であってもよく、例えば、ポリペプチド配列では互いに連続的ではないが、分子の側面からは、構造的 (c o n f o r m a t i o n a l) エピトープのように、1 つの抗原結合タンパク質によって結合するが、連続的でなく互いに離れた位置にあるアミノ酸残基であってもよい。一実施形態において、前記エピトープは、抗体の生成に使用される抗原と類似の 3 次元的構造を含むが、前記エピトープで発見される残基を含まないか、一部の残基だけを含み得るという側面から、模倣体 (m i m e t i c) であってもよい。共通して、前記エピトープはタンパク質であるが、核酸のような他の種類の物質であってもよい。前記エピトープ決定因子は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル基、またはスルホニル基のような分子によって表面に形成された化学的活性化グループであるか、特定の 3 次元的構造特徴および / または特定の電荷特徴を有することができる。共通して、特定のターゲット抗原に特異的抗体は、タンパク質および / またはポリマーの複合体内に存在するターゲット抗原のエピトープを認識する。

【0100】

本明細書において、「治療剤」は、目的の治療効果のために被験者に投与される分子を意味する。前記被験者は、ヒトではない哺乳類、例えば、霊長類またはヒトを含む。前記治療剤の例は、ペプチドおよびポリペプチドを含むタンパク質、核酸、抗体または低分子化合物を含む。他の側面において、前記治療剤は、抗体または抗体に結合して癌のような

10

20

30

40

50

関連疾病の治療剤として使用可能である。

【0101】

本明細書において、前記用語「治療」は、負傷、疾患、または疾患または病的状態症状の緩和または治療を意味し、これは、減少(reduction)、軽減(relief)、負傷、疾病または疾患または状態症状の緩和、患者が負傷、疾患、または疾患または病的状態の症状をより良く耐えられるようにすること、負傷、疾患または負傷または病的状態症状の悪化を遅らせること、または患者の精神的または肉体的な生活の質を向上させることを含む任意の客観的または主観的なパラメータを含む。このような負傷、疾患または負傷または病的状態症状の治療または改善を、身体検査の結果、疾病に関連する多様な指標検査および映像検査に基づいて判断できる。

10

【0102】

本明細書において、「有効量」は、一般に疾患、特にB7-H3に関連する疾患による症状の深刻性および/または発生頻度の減少、疾患、特にB7-H3に関連する疾患による症状および/または疾患発生の根本的な原因の除去、または疾患、特にB7-H3に関連する疾患による症状および/または根本的な原因発生の予防および/または疾患、特にB7-H3に関連する疾患による損傷を改善または矯正するのに十分な量を意味する。一実施形態において、前記有効量は、治療的有效量または予防的有效量である。前記「治療的有效量」は、疾患、特にB7-H3に関連する症状または状態を治療するか、疾患、特にB7-H3に関連する症状または状態の予防、遅延またはその進行を逆転させるだけに十分な量である。前記「予防的有效量」は、疾患、特にB7-H3に関連する疾患の発病または再発、または疾患、特にB7-H3に関連する疾患または関連する症状を予防または遅延させ、その発生の可能性を減少させる量である。前記完全な治療的または予防的効果は、服用量の1回投与によって発生するよりは、服用量の数回投与によって発生することができる。したがって、治療的または予防的有效量は、1回以上の投与によって伝達可能である。

20

【0103】

抗体または抗原結合断片

本願は、B7-H3タンパク質の細胞外領域に特異的に結合する抗体またはその抗原結合断片を開示する。前記抗体または抗原結合断片は、マウスおよびサルB7-H3タンパク質の細胞外領域に交差反応性を有する。

30

【0104】

本明細書による前記抗体は、本明細書に開示されたように、1つ以上の相補的決定領域または部位(CDR)を含むポリペプチドである。

【0105】

一部の実施形態において、CDRは、「フレームワーク(framework)」領域に含まれ、前記フレームワークは、このようなCDRが適切な抗原結合特性を有するようにCDRを指向させる。

【0106】

前記抗体は、特異的にヒト、サルおよびマウス由来のB7-H3細胞外領域に特異的に結合し、分離された形態の細胞外領域または細胞表面に発現するB7-H3の細胞内領域に特異的に結合することができる。

40

【0107】

一実施形態において、前記抗体は、単クローン抗体(monoclonal antibody)、二重dual-特異的抗体(specific antibody)、二重抗体(double antibody)、多重特異的抗体(multi-specific antibody)、多重抗体(multiple antibody)、ミニボディ(minibody)、ドメイン抗体(domain antibody)、抗体模倣体(antibody mimetic)(または合成抗体(synthetic antibody))、キメラ抗体(chimeric antibody)、ヒト化抗体(humanized antibody)または抗体融合(antibody fus

50

ion) (または抗体接合体 (antibody conjugate)) およびその断片を含むが、これに限定されるものではなく、本明細書に開示された多様な形態の抗体を含む。

【0108】

一実施形態において、本明細書に開示された前記抗体の抗体断片は、Fab、Fab'、F(ab')₂、scFab、Fv、dsFv、scFv、scFv-Fc、ミニボディ (minibody)、ダイアボディ (diabody)、scab、またはdAbであってもよい。

【0109】

他の実施形態において、本明細書に開示された前記抗体は、表2aおよび表2bに開示された可変領域を含む軽鎖または重鎖だけからなるポリペプチドで構成される。

10

【0110】

本明細書に開示された1つの抗体は、本明細書に開示された他の抗体と特定の領域または配列を共有する。一実施形態において、これは前記抗体または抗原結合断片の不変領域を共有することができる。他の実施形態において、これはFc領域を共有することができる。他の実施形態において、これは可変領域のフレームを共有することができる。

【0111】

一実施形態において、前記抗体は、自然で発見される抗体の典型的な構造を有する。ラクダ科動物は、単一重鎖からなる抗体を生成するが、前記抗体の構造単位は、一般に4量体ポリペプチドを含み、前記4量体は、異なる2個のポリペプチド鎖からなる一対のポリペプチド鎖本体のうちの2個を含む。典型的な抗体において、前記ポリペプチド鎖母体のうちの1つは、1つの全長軽鎖 (約25 kDa) および1つの全長重鎖 (約50 ~ 70 kDa) を含む。各鎖は、特徴的な折り畳みパターンを示し、約90 ~ 110個のアミノ酸からなる様々な免疫グロブリンドメインで構成される。このドメインは、抗体ポリペプチドを構成する基本単位体である。各鎖のアミノ-末端部分は、典型的に抗原を認識する部位である可変領域またはV領域と称される部分を含む。前記カルボキシ-末端部位は、アミノ-末端部位より進化的により多く保存され、不変領域またはC領域と称される部分を含む。前記ヒト軽鎖は、共通して、カッパ (κ) およびラムダ (λ) 軽鎖として分類され、これらそれぞれは、1つの可変領域および1つの不変領域を含む。前記重鎖は典型的に、ミュー (μ)、デルタ (δ)、ガンマ (γ)、アルファ (α) またはエプシロン (ε) 鎖として分類され、これらは、それぞれIgM、IgD、IgG、IgAおよびIgEアイソタイプで定義される。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4を含むが、これに限定されない多数のサブタイプを有する。IgMサブタイプは、IgMおよびIgM2を含む。IgAサブタイプは、IgA1およびIgA2を含む。ヒトにおいて、IgAおよびIgDアイソタイプは、4個の重鎖および4個の軽鎖を含み；IgGおよびIgEアイソタイプは、2個の重鎖および2個の軽鎖を含み、IgMアイソタイプは、5個の重鎖および5個の軽鎖を含む。前記重鎖不変領域は、典型的にエフェクター (effector) の機能を示すが、1つ以上のドメインを含む。前記重鎖不変領域ドメインの数字は、アイソタイプに応じて異なる。IgG重鎖は、例えば、それぞれC_H1、C_H2およびC_H3として公知の3C領域ドメインを含む。本明細書に開示された前記抗体は、このようなアイソタイプおよびサブタイプのうちの任意の1つであってもよい。一実施形態において、前記抗体は、IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG3またはIgG4のサブタイプである。さらなる一実施形態において、前記本願の抗体は、IgG1 - またはIgG2 - 型である。さらなる一実施形態において、前記本願の抗体は、IgG1 - 型である。

20

30

40

【0112】

前記重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、ヒト不変領域の少なくとも一部に連結される。前記不変領域の選択は、部分的に抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity)、抗体依存性細胞食菌作用 (antibody-dependent cell phagocytosis)

50

t o s i s)、および/または補体依存性細胞毒性 (c o m p l e m e n t - d e p e n d e n t c y t o t o x i c i t y) が要求されるかによって決定可能である。例えば、ヒトアイソタイプ I g G 1 および I g G 3 は、補体依存性細胞毒性を持っており、ヒトアイソタイプ I g G 2 および I g G 4 は、このような細胞毒性を持たない。また、ヒト I g G 1 および I g G 3 は、ヒト I g G 2 および I g G 4 よりも強い細胞媒介エフェクター (e f f e c t o r) 機能を誘導する。前記軽鎖不変領域は、ラムダまたはカッパであってもよい。

【 0 1 1 3 】

一実施形態において、本願により生成された前期抗体は、人抗体であっても良く、前期重鎖不変領域は、I g G 1 -、I g G 2 -、I g G 3 - または I g G 4 - 型であってもよい。他の実施形態において、本願の前記抗体は、I g G 1 - または I g G 2 - 型である。

10

【 0 1 1 4 】

他の実施形態において、本願により生成された前記抗体は、ヒト抗体であり、マウスおよびサルに対して交差反応性を有する。

【 0 1 1 5 】

全長軽鎖および重鎖において、可変領域および不変領域は、約 12 個以上のアミノ酸の長さである「J」領域によって結合し、前記重鎖はまた、約 10 個以上のアミノ酸の「D」領域を含む。例えば、Fundamental Immunology, 2nd ed., Ch. 7 (Paul, W., ed.) 1989, New York: Raven Press を参照することができる。典型的に、抗体の重鎖/軽鎖対の可変領域が抗体結合部位を形成する。

20

【 0 1 1 6 】

免疫グロブリン鎖の可変領域は、一般に同一の全体的な構造を有し、「相補的決定部位または領域またはドメイン (c o m p l e m e n t a r y d e t e r m i n i n g s i t e o r r e g i o n o r d o m a i n)」または CDR (C o m p l e m e n t a r y D e t e r m i n i n g R e g i o n) と称される 3 個の超可変領域によって連結された比較的保存されたフレームワーク領域 (f r a m e w o r k r e g i o n、FR) を含む。前記重鎖/軽鎖対を構成する各鎖由来の可変領域の CDR は、典型的にフレームワーク領域によって整列されてターゲットタンパク質の特定のエピトープに特異的に結合する構造を形成する。自然的に発生した軽鎖および重鎖領域の当該要素は、N - 末端から C - 末端まで典型的に以下の順に含まれる: FR 1、CDR 1、FR 2、CDR 2、FR 3、CDR 3 および FR 4。前記可変領域でこれらそれぞれに相当するアミノ酸配列の位置は、Kabata (Kabata et al., (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequence of Proteins of Immunological Interest」、Chothia (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901 - 917 (1987)) または OPA L ライブラリーに関連する方法 (Hye Young Yang et al., 2009 Mol. Cells 27: 225) によって決定可能である。前記各定義によって決定された CDR は、互いに比較すれば、重なるか、1 つが他の 1 つを含むサブセットであってもよい。しかし、本願には、前記各方法によって定義されるすべての CDR が本発明の範囲に含まれる。当業者であれば、抗体の可変領域配列が与えられると、ここで、前記各定義による CDR 配列を容易に選択できるであろう。

30

40

【 0 1 1 7 】

本願の一実施形態による抗体または抗原結合断片の重鎖および軽鎖可変領域に含まれる CDR 配列は、それぞれ表 1 a から 1 f に開示する。

【表 1 a】

CDRH1	
配列	配列番号
DYAMS	1
GYYS	2
SYSMS	3
SYGMS	4

【表 1 b】

CDRH2	
配列	配列番号
SISSGSGSIYYADSVKG	5
LISPSSGSIYYADSVKG	6
GIYSDGSNTYYADSVKG	7
GISPGGSNTYYADSVKG	8
GIYSGGSSKYYADSVKG	9
GIYSDASNTYYADSVKG	68

【表 1 c】

CDRH3	
配列	配列番号
NLIPLDY	10
GLTKFDY	11
MLHRFDY	12
DAWIARLLLFDY	13
NRLRFDY	14

【表 1 d】

CDRL1	
配列	配列番号
SGSSSNIGSNAVS	15
TGSSSNIGSNDVS	16
SGSSSNIGSNSVT	17
SGSSSNIGSNAVT	18
TGSSSNIGSNSVT	19

【表 1 e】

CDRL2	
配列	配列番号
YNSHRPS	20
ANSHRPS	21
ADSQRPS	22
YNNKRPS	23
SDSHRPS	24
ADVQRPS	69

10

20

30

40

50

【表 1 f】

CDRL3	
配列	配列番号
GSWDASLNAYV	25
GSWDDSLSGYV	26
GTWDDSLNAYV	27
GTWDDSLSGYV	28
GTWDASLNAYV	29
GSWDASLNAYV	25

10

【0 1 1 8】

一実施形態において、前記軽鎖および重鎖 C D R 配列を含む抗体または抗原結合断片の重鎖および軽鎖可変領域をそれぞれ下記表 2 a および表 2 b に開示する。

【表 2 a】

重鎖可変領域 (VH) 配列	配列番号
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISSGSGSIYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNLIPLDYWGQGLTVTVSS	30
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYMSWVRQAPGKGLEWVSLISPSSGSIYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGLTKFDYWGQGLTVTVSS	31
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSMSWVRQAPGKGLEWVSGIYSDGSNTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMLHRFDYWGQGLTVTVSS	32
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGISPGGSNTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDAWIARLLLFDYWGQGLTVTVSS	33
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYGMWVRQAPGKGLEWVSGIYSGGSSKYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKNRLRFDYWGQGLTVTVSS	34
EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYSMSWVRQAPGKGLEWVSGIYSDASNTYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKMLHRFDYWGQGLTVTVSS	70

20

30

【表 2 b】

軽鎖可変領域 (VL) 配列	配列番号
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNAVSQYQLPGTAPKLLIYNSHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDASLNAYVFGGGTKLTVLG	35
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGSNDVSQYQLPGTAPKLLIYNSHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCGSWDDSLSGYVFGGGTKLTVLG	36
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNSVTWYQLPGTAPKLLIYADSQRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDDSLNAYVFGGGTKLTVLG	37
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNAVWYQLPGTAPKLLIYNNKRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDDSLSGYVFGGGTKLTVLG	38
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGSNSVTWYQLPGTAPKLLIYSDSHRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWASLNAYVFGGGTKLTVLG	39
QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNSVTWYQLPGTAPKLLIYADVQRPSGVPDRFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDDSLNAYVFGGGTKLTVLG	71

40

【0 1 1 9】

一実施形態において、前記表 1 a から 1 f に開示された軽鎖の各可変領域の C D R と重鎖の各可変領域の C D R とは自由に組み合わせられる。

【0 1 2 0】

50

他の実施形態において、前記表 2 a および表 2 b に開示された重鎖および軽鎖の可変領域は多様な形態の抗体の用意のために自由に組み合わせられ、例えば、s c F V のような単鎖抗体、またはドメイン抗体を形成することができる。

【0121】

本明細書に開示されたそれぞれの重鎖および軽鎖可変領域は、完全な抗体のそれぞれの重鎖および軽鎖を形成するために、目的の多様な重鎖および軽鎖不変領域に結合することができる。また、このように不変領域に結合したそれぞれの重鎖および軽鎖配列はさらに、完全な抗体構造を形成するために組み合わせられる。

【0122】

前記抗体の重鎖および軽鎖の任意の可変領域は、不変領域の少なくとも一部に連結される。前記不変領域は、抗体依存性細胞媒介細胞毒性 (antibody - dependent cell - mediated cytotoxicity)、抗体依存性細胞食菌作用 (antibody - dependent cell phagocytosis) および / または補体依存性細胞毒性 (complement - dependent cytotoxicity) などが必要であるかによって選択される。例えば、ヒトアイソタイプ I g G 1 および I g G 3 は、補体依存性細胞毒性を持っており、ヒトアイソタイプ I g G 2 および I g G 4 は、前記毒性を持たない。ヒト I g G 1 および I g G 3 はまた、ヒト I g G 2 および I g G 4 より強い細胞媒介エフェクター機能を誘導する。例えば、前記重鎖可変領域は、I g G 1、I g G 2、I g G 2 a、I g G 2 b、I g G 3 および I g G 4 のような I g G の不変領域に結合し、前記軽鎖可変領域は、カッパまたはラムダ不変領域に結合することができる。前記不変領域は、目的のところにより適切なものが使用可能であり、例えば、ヒトまたはマウス由来のものが使用可能である。一実施形態において、ヒト重鎖不変領域 I g G 1 が使用され、これは配列番号 60 の配列で表してもよい。他の実施形態において、前記軽鎖不変領域のように、ヒトラムダ領域が使用され、これは配列番号 64 で表してもよい。

10

20

【0123】

本明細書に開示された任意の可変領域は不変領域に結合して、重鎖および軽鎖配列を形成することができる。一実施形態において、本明細書に開示された前記重鎖可変領域はヒト I g G 1 不変領域に結合して、配列番号 40 ~ 44 および 72 から選択されたアミノ酸配列を含むか、必須として含む重鎖 (全長) を形成することができる。他の実施形態において、前記本明細書に開示された軽鎖可変領域は、ヒトラムダ不変領域に結合して、配列番号 45 ~ 49 および 73 から選択されるアミノ酸配列を含むか、必須として含む軽鎖 (全長) を形成することができる。前記軽鎖および重鎖は、多様な組み合わせで組み合わせられて、2 個の軽鎖および 2 個の重鎖で構成される完全な抗体を形成することができる。

30

【0124】

しかし、本明細書に開示された前記可変領域に結合と組み合わせ可能な当該不変領域配列は例示的なものであり、当該分野における通常の技術者は、I g G 1 重鎖不変領域、I g G 3 または I g G 4 重鎖不変領域、任意のカッパまたはラムダ軽鎖不変領域、安定性、発現、製造の可能性または他の目的とする特徴などのために変形した不変領域を含む他の不変領域が使用できることが分かるであろう。

40

【0125】

本願は、1 つ以上の本明細書に開示された 1 つ以上のアミノ酸と実質的な配列同一性を有する 1 つ以上のアミノ酸配列を含む。前記実質的同一性とは、配列の変異が存在する本明細書に開示された効果を維持することを意味する。一実施形態において、これは、表 2 a に開示された前記重鎖可変領域と約 90 %、95 %、または 99 % の同一性を有する。他の実施形態において、表 2 b に開示された前記軽鎖可変領域と約 90 %、95 %、または 99 % の同一性を有する。例えば、本明細書に開示された前記抗体または抗原結合断片と 90 %、95 %、または 99 % 同一性を示す変異体の場合、任意の変異は、C D R よりは可変領域の骨格で発生する。

【0126】

50

本明細書では、本明細書に開示された前記抗体またはその一部をコーディングする核酸を開示する。前記核酸は、抗体の各鎖、または前記抗体の断片、その突然変異、誘導体、または変異体をコーディングするポリヌクレオチド、軽鎖または重鎖可変領域または単に C D R をコーディングするポリヌクレオチド、混成化プローブとしての使用に十分なポリヌクレオチド、ポリペプチドをコーディングするポリヌクレオチドを増幅、究明、分析または突然変異の誘発に使用する P C R または塩基配列分析プライマーを含む。これらは、例えば、長さが 5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1,000、1,500、2000、または 2500 個以上のポリヌクレオチドであってもよく、1 つ以上の追加的な配列、例えば、調節配列を含んでもよく、より大きい核酸、例えば、ベクターの一部であってもよい。前記核酸は、単一鎖または二重鎖であってもよく、RNA および / または DNA ポリヌクレオチド、およびその人工変異体（例：ペプチド核酸）を含むことができる。

【0127】

一実施形態において、本明細書に開示された前記抗体またはその断片をコーディングする前記核酸は、本明細書に開示された C D R、前記 C D R を含む可変領域、前記可変領域および不変領域を含む全長抗体をコーディングする核酸である。前記アミノ酸配列が決定されると、前記核酸配列は、公知の逆転写プログラムおよびコドン使用頻度 (codon usage) などを考慮して、容易に決定可能である。ヒト Ig G 1 をコーディングする前記重鎖不変領域の例示的な核酸配列は、配列番号 61 ~ 63 で表してもよい。ヒトラムダをコーディングする前記軽鎖不変領域の例示的な核酸配列は、配列番号 65 ~ 67 で表してもよい。前記不変領域の前記アミノ酸配列を含む前記全長重鎖の例示的な核酸配列は、配列番号 50 ~ 54 および 74 (ヒト Ig G 1 不変領域を含む重鎖) から選択され、前記例示的な核酸配列は、配列番号 60 ~ 57 および 75 (ヒトラムダ不変領域を含む軽鎖) から選択される。

【0128】

また、表 1 a から表 1 f の C D R 配列、および表 2 a および表 2 b の可変領域をコーディングする核酸配列が含まれる。このような核酸配列は、前記開示された全長抗体をコーディングする核酸配列に含まれるため、別途に記載せず、前記分野における通常の技術者であれば、本明細書に開示された C D R および可変領域のタンパク質配列に基づいて、これをコーディングする核酸配列を前記核酸配列番号 50 ~ 59 から容易に確認するであろう。

【0129】

本願はまた、本明細書に開示された 1 つ以上の核酸配列と実質的な配列同一性を有する 1 つ以上の核酸配列を含む。前記実質的な同一性とは、核酸の変異がアミノ酸置換を伴わない保存的置換またはアミノ酸変異を誘発する場合にも、核酸によってコーディングされた前記抗体または抗原結合断片が本明細書に開示された効果を維持することを意味する。

【0130】

抗体の抗原に対する特異性および親和度

前記抗体または抗原結合断片は、特に B 7 - H 3 抗原に対する特異性および抗体治療剤 / 診断剤としての使用に適切な親和度を有する。一実施形態において、表 5 によれば、前記凝集体に対する親和度は $K_D < 1.0 \times 10^{-9} \text{ M}$ であり；他の実施形態では、 $K_D 1.0 \times 10^{-10} \text{ M}$ である。前記親和度を有する前記抗体または抗原結合断片は、低い親和度を有する抗体、例えば、 10^{-7} M 以上の親和度を有する抗体に比べて、投与量が少ないという利点がある。これは、例えば、抗体を限定するものではないが、皮下注射のようなより簡単な方式で投与するにもかかわらず、十分な効能が得られるため、臨床的に大きなメリットがある。

【0131】

抗体の可変領域

本願は、前記表 2 a および表 2 b に示すような、前記抗体の軽鎖可変領域または抗体の

重鎖可変領域および免疫機能性断片、誘導体、突然変異タンパク質および前記軽鎖および重鎖可変領域の変異体を含む抗体（およびこれに相応する核酸配列）に関する。重鎖および軽鎖の前記可変領域が多様に結合した前記抗体は「VHx/VLy」で表してもよく、前記「x」は重鎖可変領域の配列番号、「y」は軽鎖可変領域の配列番号に相当する。一実施形態において、前記可変領域は、下記の組み合わせを含むことができ、これに限定されるものではない：VH30/VL35、VH30/VL36、VH30/VL37、VH30/VL38、VH30/VL39、VH30/VL71、VH31/VL35、VH31/VL36、VH31/VL37、VH31/VL38、VH31/VL39、VH31/VL71、VH32/VL35、VH32/VL36、VH32/VL37、VH32/VL38、VH32/VL39、VH32/VL71、VH33/VL35、VH33/VL36、VH33/VL37、VH33/VL38、VH33/VL39、VH33/VL71、VH34/VL35、VH34/VL36、VH34/VL37、VH34/VL38、VH34/VL39、VH34/VL71、VH70/VL35、VH70/VL36、VH70/VL37、VH70/VL38、VH70/VL39、またはVH70/VL71。

10

先に言及されたような前記多様な可変領域の多様な組み合わせは、完全な抗体およびscFVなどを含む多様な形態の抗体に使用可能である。

【0132】

CDR

本明細書に開示された前記抗体は、1つ以上のCDRがグラフト、挿入および/または連結されたポリペプチドである。一実施形態において、前記抗体は、1、2、3、4、5または6個のCDRを有することができる。したがって、前記抗体は、例えば、1つの重鎖CDR1（「CDRH1」）、および/または1つの重鎖CDR2（「CDRH2」）、および/または1つの重鎖CDR3（「CDRH3」）、および/または1つの軽鎖CDR1（「CDRL1」）、および/または1つの軽鎖CDR2（「CDRL2」）、および/または1つの軽鎖CDR3（「CDRL3」）を有することができる。

20

【0133】

可変領域において抗体の相補的決定領域（complementary determining region、CDR）およびフレーム領域（frame region、FR）に相当する前記アミノ酸配列の位置は、Kabat（Kabat et al., (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」）、Chothia（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987)）またはOPALライブラリーに関連する方式（Hye Young Yang et al., 2009 Mol. Cells 27:225）によって決定可能である。各定義によって決定された前記CDRは、互いに比較すれば、重なるか、1つが他の1つを含むサブセットであってもよい。しかし、本明細書には、前記各方法によって定義されるすべてのCDRが本願の範囲に含まれる。前記分野における通常の技術者であれば、抗体の可変領域配列が与えられると、ここで、前記各定義によるCDR配列を容易に選択するであろう。

30

40

【0134】

一実施形態において、前記抗体の重鎖および軽鎖に含まれるCDRは、表1aから表1fに開示されている（あるいは、重鎖CDRH1は配列番号1～4から選択されたいずれか1つで表し、CDRH2は配列番号5～9および68から選択されたいずれか1つで表し、CDRH3は配列番号10～14から選択されたいずれか1つで表し、CDRL1は配列番号15～19から選択されたいずれか1つで表し、CDRL2は配列番号20～24および69から選択されたいずれか1つで表し、CDRL3は配列番号25～29から選択されたいずれか1つで表す）。

【0135】

一実施形態はまた、表1aから表1fに開示された1つ以上のCDRのアミノ酸配列と

50

実質的な配列同一性を有する1つ以上のアミノ酸配列を含む。前記実質的な同一性は、配列の変異が存在する、本明細書に開示された効果を維持することを意味する。

前記自然的にまたは非自然的に生じる抗体のCDRの構造および特徴は先に言及した通りである。簡単に、典型的な抗体において、前記CDRは、抗原結合および認識に関与する領域からなる重鎖および軽鎖可変領域のフレームワークで構成される。前記可変領域は、フレームワーク内に3個の重鎖CDRおよび/または3個の軽鎖を含む。前記CDRは決定可能であり、前記アミノ酸残基は、Kabat定義(Kabat et al., (1983) U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of Proteins of Immunological Interest」)、Chothia(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))またはOPALライブラリーに関連する方式(Hye Young Yang et al., 2009 Mol. Cells 27:225)により重鎖および軽鎖またはこれらの可変領域で番号づけられる。しかし、本明細書に開示された前記CDRは、抗体結合ドメインの典型的な抗体構造を定義するために使用され、また、本明細書に開示されたように、他の多様なポリペプチド構造に含まれて使用される。

【0136】

前記分野における通常の技術者であれば、抗体が本明細書に開示された1つ以上のCDRを含む場合、開示されたそれぞれのCDRは、互いに独立して選択され組み合わせられることを理解するであろう。したがって、抗体は、1、2、3、4、5または6個の独立して選択されたCDRを有する。また、前記分野における通常の技術者であれば、組み合わせのために前記CDRが選択される時、同じ種類のCDRが繰り返し使用されず、例えば、前記抗体は、一般に2個のCDRH2領域を含んで製造されないことが分かるであろう。

【0137】

単クローン抗体

本明細書に開示された前記抗体は、B7-H3に結合する単クローン抗体を含む。特に、B7-H3の細胞外領域を特異的に認識するヒト単クローン抗体を含み、マウスおよびサルB7-H3に対する交差反応性を示す。

【0138】

前記単クローン抗体は、当該技術分野で公知の任意の技術を用いて製造できる。例えば、抗原に対して多様な親和度を有する多様な抗体のように他の特性を有している抗体製造技術が公知である。この技術は、例えば、ファージディスプレイ(phage display)というフィラメントバクテリオファージの表面に免疫グロブリンの可変領域の遺伝子レパートリーを表示して行うチェーンシャッフリング(chain shuffling)である。例えば、本明細書の実施例に開示されたものを参照するか、さらなる技術は、Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222:581-597; Marks et al., 1992, Bio Technology 10:779-783に記載のものを参照することができる。

【0139】

また、前記単クローン抗体を前記技術分野で公知の任意の技術を用いて製造することができる。例えば、免疫化された形質転換動物から収集された脾臓細胞(splenocyte)を不滅化(immortalizing)させて生産することができる。前記脾臓細胞は、前記技術分野で公知の任意の技術を用いて、例えば、これを骨髓腫細胞(myeloma cell)と融合させてハイブリドーマを生成して不滅化される。前記ハイブリドーマ-生産融合過程に使用するための前記骨髓腫細胞は、好ましくは、非-抗体-生産性であり、高い融合効率を有し、特定の酵素が欠如してこれらが目的とする融合細胞(ハイブリドーマ)のみの成長を支援する特定の選択培地中で成長できないようにする。マウス融合に使用される適切な細胞株の例は、Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1-Ag41、Sp210-Ag14、FO、NSO

/ U、MPC - 11、MPC 11 - X45 - GTG 1.7 および S194 / 5X X O B u l を含み、ラット融合に使用される細胞株の例は、R210、RCY3、Y3 - Ag 1 . 2 . 3、IR983F および 4B210 を含む。細胞融合のために使用される他の細胞株には、U - 266、GM1500 - GRG2、LICR - LON - HMy2 および UC 729 - 6 を含むことができる。いくつかの場合には、ハイブリドーマ細胞株は、動物（例えば、ヒト免疫グロブリン配列を有する形質転換動物、B7 - H3 免疫原によって免疫化された動物）から脾臓細胞を収集して生成され；収集された脾臓細胞を骨髓腫細胞に融合してハイブリドーマを生成し；ハイブリドーマ細胞からハイブリドーマ細胞株を確立し、B7 - H3 に結合する抗体を生産するハイブリドーマ細胞株を確認する。ハイブリドーマ細胞株によって分泌された前記単クローン抗体は、前記技術分野で公知の技術を用いて精製することができる。

10

【0140】

キメラ抗体

前記抗体は、多様な目的のために多様な方式で変形できる。キメラ抗体は、異なる抗体に由来するポリペプチド断片が共有結合で連結されて免疫学的に機能的な軽鎖、重鎖またはその断片を形成する抗体である。一般に、前記キメラ抗体の軽鎖および/または重鎖の一部は、特定の種または特定の綱またはサブタイプに属する配列であり、残りの配列は、他の種または他の綱またはサブタイプに属する。キメラ抗体の製造方法について、例えば、U.S. patent 第4,816,567号；および Morrison et al., 1985, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81: 6851 - 6855 を参照することができる。CDR 移植 (grafting) は、例えば、U.S. patent 第6,180,370号、第5,693,762号、第5,693,761号、第5,585,089号および第5,530,101号を参照することができる。

20

【0141】

一般に、キメラ抗体を製造する目的は、抗体が使用される生物体で発見されるアミノ酸の数を最大化することである。一例は「CDR - 移植 (CDR - grafted)」抗体であるが、前記抗体は、特定の1種または特定の綱またはサブタイプ由来の1つ以上のCDRを含み、残りの部分は、他の種、または他の綱またはサブタイプの抗体に由来する。例えば、ヒトに使用するために、齧歯類抗体の可変領域またはCDRを代替するか、またはその逆であってもよい。

30

【0142】

また、一実施形態において、ヒト以外の種に由来する不変領域は、ヒト由来の可変領域と組み合わせられたハイブリッド抗体が使用可能である。

【0143】

完全ヒト抗体

完全ヒト抗体も開示される。特定の抗原に特異的な完全ヒト抗体は、ヒトを抗原に露出させずに製造することができる。

【0144】

前記完全ヒト抗体は、ファージ - ディスプレイライブラリー (phage - display library) に由来できる (Hoogenboom et al., 1991, J. Mol. Biol. 227: 381; and Marks et al., 1991, J. Mol. Biol. 222: 581)。前記ファージディスプレイ技術は、フィラメント (filamentous) バクテリオファージの表面で抗体レパートリーを表示し、それからターゲット抗原 (targeting antigen) に結合するファージを分類する一種の免疫選択を模倣した方法である。このような技術は、本明細書の実施例または PCT 公開公報第 WO99 / 10494 号を参照することができる。一実施形態において、本明細書の前記完全ヒト B7 - H3 抗体は、前記ファージディスプレイ方法により選別される。この技術は、本明細書の実施例または PCT 公開公報第 WO2005 / 012359 号を参照することができる。

40

【0145】

50

完全ヒト抗体を製造する他の方法は、マウス体液性免疫系を「ヒト化(humanizing)」することである。内因性Ig遺伝子は、活性化されていないマウスにヒト免疫グロブリン(Ig)遺伝子座位(loci)を導入して、前記マウスで完全ヒト単クローン抗体(mAb)を生成することができる。もし、前記完全ヒト抗体を使用すれば、マウスまたはマウス由来のmAbをヒトに投与して誘発される免疫原性反応およびアレルギー反応を最小化できる。このような完全ヒト抗体は、内因性免疫グロブリンの生成が欠乏してヒト抗体を生成できる形質転換動物(通常、マウス)を免疫化させて生成可能である。このような目的のための抗原は典型的に、6個またはそれ以上の連続したアミノ酸を有し、任意に担体、例えば、ハプテン(hapten)に接合される。例えば、以下を参照することができる; Jakobovits et al., 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 2551 - 2555; Jakobovits et al., 1993, Nature 362: 255 - 258; および Bruggerman et al., 1993, Year in Immunol. 7: 33。一例として、このような方法で、前記形質転換動物は、マウスの重鎖および軽鎖免疫グロブリン鎖をコーディングする内因性マウス免疫グロブリン遺伝子座位を無力化させ、ヒトの重鎖および軽鎖タンパク質をコーディングするヒトゲノムDNAを含む座位断片を挿入して生成される。部分的にヒト免疫グロブリン遺伝子座位を含む部分的に変形したマウスを交差結合させて、完全ヒト免疫グロブリン遺伝子が導入されたマウスが生成される。前記動物に免疫原(immunogen)が投与されると、前記免疫原に免疫特異的であるものの、可変領域を含む抗体がミュリン(murine)ではないヒトのアミノ酸配列を有する。このような方法は、例えば、WO 96/33735 および WO 94/02602 を参照する。ヒト抗体を製造するための形質転換マウスに関連する方法は、米国特許第5,545,807号; 第6,713,610号; 第6,673,986号; 第6,162,963号; 第5,545,807号; 第6,300,129号; 第6,255,458号; 第5,877,397号; 第5,874,299号および第5,545,806号; 第WO 91/10741号、第WO 90/04036号、およびEP第546073B1号を参照することができる。

【0146】

次いで、ハイブリドーマ技術を用いて、目的の特異性を有する抗原-特異性ヒトmAbが遺伝子導入マウス、例えば、先に記述されたものから生成され選択される。このような抗体は、適切なベクターおよび宿主細胞を用いてクローニングされ発現するか、または前記抗体は培養されたハイブリドーマ細胞から収集される。

【0147】

抗体の多様な形態

本明細書に開示された前記抗体はまた、本明細書に開示された前記抗体の変異体である。例えば、抗原の一部は、前記開示された重鎖または軽鎖、可変領域またはCDR配列の残基のうちの1つ以上に保守的アミノ酸置換を含む。前記保守的アミノ酸置換は、ポリペプチドまたは抗原性に実質的に影響を与えない置換を意味する。一実施形態において、前記保守的アミノ酸置換は、下記のアミノ酸分類のうち同一の分類に属する他の残基への置換を称する。自然的に発生するアミノ酸は、以下のような側鎖特性の共通特性により分類される: 1) 疎水性: ノルロイシン(norleucine)、メチオニン(Met)、アラニン(Ala)、バリン(Val)、ロイシン(Leu)、イソロイシン(Ile); 2) 中性、親水性: システイン(Cys)、セリン(Ser)、トレオニン(Thr)、アスパラギン(Asn)、グルタミン(Gln); 3) 酸性: アスパラギン酸(Asp)、グルタミン酸(Glu); 4) 基本: ヒスチジン(His)、リシン(Lys)、アルギニン(Arg); 5) 鎖方向に影響を与える残基: グリシン(Gly)、プロリン(Pro); および 6) 芳香族性: トリプトファン(Trp)、チロシン(Tyr)、フェニルアラニン(Phe)。

【0148】

前記保守的アミノ酸置換は、前記分類において同一の分類に属する他の残基への置換を

意味する。前記保存的アミノ酸置換はまた、ペプチド模倣体のような非 - 自然的 - 発生アミノ酸残基を含むことができ、この残基は、一般に細胞ではない化学的合成によって導入される。

【 0 1 4 9 】

保存的アミノ酸置換の制限のない例示は表 3 に示した。

【表 3】

保存的アミノ酸置換

元の残基	例示的置換
アラニン (Ala)	セリン (Ser)
アルギニン (Arg)	リシン (Lys)
アスパラギン (Asn)	グルタミン (Gln), ヒスチジン (His)
アスパラギン酸 (Asp)	グルタミン酸 (Glu)
システイン (Cys)	セリン (Ser)
グルタミン (Gln)	アスパラギン (Asn)
グルタミン酸 (Glu)	アスパラギン酸 (Asp)
グリシン (Gly)	プロリン (Pro)
ヒスチジン (His)	アスパラギン (Asn), グルタミン (Gln)
イソロイシン (Ile)	ロイシン (Leu), バリン (Val)
ロイシン (Leu)	イソロイシン (Ile), バリン (Val)
リシン (Lys)	アルギニン (Arg), グルタミン (Gln), グルタミン酸 (Glu)
メチオニン (Met)	ロイシン (Leu), イソロイシン (Ile)
フェニルアラニン (Phe)	メチオニン (Met), ロイシン (Leu), チロシン (Tyr)
セリン (Ser)	トレオニン (Thr)
トレオニン (Thr)	セリン (Ser)
トリプトファン (Trp)	チロシン (Tyr)
チロシン (Tyr)	トリプトファン (Trp), フェニルアラニン (Phe)
バリン (Val)	イソロイシン (Ile), ロイシン (Leu)

10

20

30

【 0 1 5 0 】

非保存的置換は、前記分類のうち他の分類に属する残基への置換を含む。このような置換は、ヒト抗体と相同性である抗体領域または非相同性領域に導入可能である。

【 0 1 5 1 】

このような置換を導入するために、一実施形態において、アミノ酸の疎水性または親水性を示す指数（親水性指数）を考慮すれば良い。タンパク質の前記指数プロファイル（数値療法プロファイル）は、各アミノ酸の指数を指定した後、この値を繰り返し平均して計算する。前記各アミノ酸の指数は、下記のような疎水性と電荷特性を基準として指定される：イソロイシン（isoleucine）（+ 4 . 5）；バリン（valine）（+ 4 . 2）；ロイシン（leucine）（+ 3 . 8）；フェニルアラニン（phenylalanine）（+ 2 . 8）；システイン/シスチン（cysteine/cysteine）（+ 2 . 5）；メチオニン（methionine）（+ 1 . 9）；アラニン（alanine）（+ 1 . 8）；グリシン（glycine）（- 0 . 4）；トレオニン（threonine）（- 0 . 7）；セリン（serine）（- 0 . 8）；トリプトファン（tryptophan）（- 0 . 9）；チロシン（tyrosine）（- 1 . 3）；プロリン（proline）（- 1 . 6）；ヒスチジン（histidine）（- 3 . 2）；グルタミン酸（glutamate）（- 3 . 5）；グルタミン（glutamine）（- 3 . 5）；アスパラギン酸（aspartate）（- 3 . 5）；アスパラギン（asparagine）（- 3 . 5）；リシン（lysine）（- 3 . 9）

40

50

；およびアルギニン (arginine) (- 4 . 5) 。タンパク質に相互作用的な生物学的機能を付与するために、指数プロファイルの重要性は前記技術分野で公知である (K y t e e t a l . , 1982 , J . M o l . B i o l . 157 : 105 - 131) 。特定のアミノ酸が類似の数値指数または点数を有する他のアミノ酸に置換されてもよく、前記類似の生物学的活性が維持できることが知らされている。一実施形態において、前記指数に基づいて変更を行うために、指数が ± 2 、 ± 1 、または ± 0.5 にある置換を含む。

【 0 1 5 2 】

また、類似アミノ酸間の置換、特に、置換によって生成されたタンパク質が本明細書に記載されたような免疫学的活性を有するタンパク質の場合、親水性を基準として行われる。一実施形態において、近いアミノ酸の親水性によって決定されるタンパク質の最大局所平均親水性値は、免疫原性および抗原結合特性のようなタンパク質の生物学的特性に関連する。

10

【 0 1 5 3 】

アミノ酸残基の親水性値は下記の通りである：アルギニン (arginine) (+ 3 . 0) ；リシン (lysine) (+ 3 . 0) ；アスパラギン酸 (aspartate) (+ 3 . 0 $\pm$ 1) ；グルタミン酸 (glutamate) (+ 3 . 0 $\pm$ 1) ；セリン (serine) (+ 0 . 3) ；アスパラギン (asparagine) (+ 0 . 2) ；グルタミン (glutamine) (+ 0 . 2) ；グリシン (glycine) (0) ；トレオニン (threonine) (- 0 . 4) ；プロリン (proline) (- 0 . 5 $\pm$ 1) ；アラニン (alanine) (- 0 . 5) ；ヒスチジン (histidine) (- 0 . 5) ；システイン (cysteine) (- 1 . 0) ；メチオニン (methionine) (- 1 . 3) ；バリン (valine) (- 1 . 5) ；ロイシン (leucine) (- 1 . 8) ；イソロイシン (isoleucine) (- 1 . 8) ；チロシン (tyrosine) (- 2 . 3) ；フェニルアラニン (phenylalanine) (- 2 . 5) およびトリプトファン (tryptophan) (- 3 . 4) 。類似の親水性値に基づいて置換をする場合、一実施形態において、親水性値が ± 2 内、 ± 1 内、または ± 0.5 内にあるアミノ酸置換が含まれる。また、親水性に基づいて前記 1 次アミノ酸配列からエピトープを識別することもできる。さらに、これらの領域は「エピトープコア領域」と称される。

20

30

【 0 1 5 4 】

前記技術分野における通常の技術者であれば、公知の技術を用いて、本明細書に開示された前記ポリペプチドの適切な変異体を決定するであろう。前記技術分野における通常の技術者であれば、前記ポリペプチドにおいて活性に重要とされない領域を変異体のターゲティングにして、活性を破壊することなくタンパク質を変化させられる部位を探すであろう。前記技術分野における通常の技術者であれば、また、類似のポリペプチド間で保存される残基または部分を識別するであろう。さらに、他の実施形態において、生物学的活性または構造に重要とされる部分に対して、前記保存的アミノ酸置換が生物学的活性を破壊したりポリペプチド構造に否定的な影響を与えずに行われる。

40

【 0 1 5 5 】

さらに、前記技術分野における通常の技術者であれば、類似のポリペプチドにおいて活性または構造に重要な残基を識別するために構造 - 機能的な分析を行うことができる。このような分析により、これと類似のタンパク質の活性または構造に重要なアミノ酸残基に相応する残基を探して、目的のタンパク質において重要なアミノ酸残基を予測できる。前記技術分野における通常の技術者は、このように予測された重要なアミノ酸残基を化学的に類似のアミノ酸に置換することができる。

【 0 1 5 6 】

前記技術分野における通常の技術者はまた、前記類似のポリペプチドの 3 次元構造およびこれに関連するアミノ酸配列の分析に基づいて抗体の 3 次元構造に関連するアミノ酸残基を予測できる。前記技術分野における通常の技術者は、タンパク質の表面に存在すると

50

予測される前記アミノ酸残基が他の分子と重要な相互作用に関与できるため、急激な変化を導入しない。しかも、前記技術分野における通常の技術者は、それぞれの目的とするアミノ酸残基において単一のアミノ酸置換を含む試験変異体を生成することができる。これらの変異体はその後、抗原に対する結合力を利用してスクリーニングされて、どのアミノ酸置換が目的に合うかに関する情報を得ることができる。このような情報を利用して、前記技術分野における通常の技術者は、置換されてもよい位置、回避すべき位置を容易に決定することができる。

【0157】

また、タンパク質の2次構造に基づいて置換される位置を決定することができる。例えば、2次構造を予測する1つの方法は、相同性モデリング(homology modeling)に基づく。例えば、30%超過の配列同一性または40%超過の類似性を有する2個のポリペプチドまたはタンパク質は、類似の構造的位相を有することができる(Holm et al., 1999, Nucl. Acid. Res. 27:244-247)。2次構造を予測するさらなる方法には、「スレッディング(threading)」(Jones, 1977, Curr. Opin. Struct. Biol. 7:377-387; Sippl et al., 1996, Structure 4:15-19)、「プロファイル分析(profile analysis)」(Bowie et al., 1991, Science 253:164-170; Gribskov et al., 1990, Meth. Enzym. 183:146-159; Gribskov et al., 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. 84:4355-4358)、および「進化的連鎖(evolutionary linkage)」(Holm, 1999, ibid; and Brenner, 1997, ibid)が含まれる。

【0158】

一部の実施形態において、アミノ酸置換は、(1)タンパク質の分解に対する敏感性の減少、(2)酸化に対する敏感性の減少、(3)タンパク質複合体を形成するための結合親和度の変更、(4)抗原結合親和度の変更および/または、(5)タンパク質に他の物理化学的または機能的特性を付与するように変更を行う。例えば、保存的置換を含む単一または複数のアミノ酸置換は、抗体において、分子間接触に関与するドメインではない、その他の部分で置換を行うことができる。このような実施形態において、親配列の構造的特徴を実質的に変化させない前記保存的アミノ酸置換、例えば、抗体の2次構造を変化させない1つ以上のアミノ酸への置換が使用可能である。前記技術分野で公知のポリペプチド2次および3次構造の例は、Proteins, Structures and Molecular Principles (Creighton, Ed.), 1984, W. H. New York: Freeman and Company; Introduction to Protein Structure (Branden and Tooze, eds.), 1991, New York: Garland Publishing; および Thornton et al., 1991, Nature 354:105)を参照することができる。

【0159】

さらなる好ましい抗体変異体は、親配列内で1つ以上のシステイン残基が欠失するか、前記システイン残基がセリンのような他のアミノ酸に置換された変異体が含まれる。前記システイン変異体は、特に、抗体が生物学的活性を有する構造に再びフォールディング(folding)されてこそ有用である。前記システイン変異体は、親抗体と比較して少ない数のシステイン残基を有することができ、対のないシステインによる相互作用を最小化させるために、一般に偶数で含まれる。

【0160】

本明細書に開示された前記重鎖および軽鎖、可変領域ドメインおよびCDRは、B7-H3に特異的に結合できる抗原結合領域を含むポリペプチドを製造するのに使用可能である。例えば、表4に開示されたCDRのうちの1つ以上は、ポリペプチドのような分子に非共有または共有結合して、免疫接着分子(immunogenic adhesion

m o l e c u l e) として使用される。このような免疫接着分子は、C D R が大きなポリマー内に統合されたものであるが、C D R が他のポリペプチドに連結されたものであってもよい。このような免疫接着分子は、これに連結されたポリペプチドまたはその他の物質を目的とする抗原、例えば、B 7 - H 3 またはエピトープに特異的結合可能にする。

【 0 1 6 1 】

本明細書に開示された可変領域およびC D R に基づいたペプチド模倣体がさらに提供される。このような模倣体は、ペプチド、非 - ペプチド、またはペプチドおよび非 - ペプチドの組み合わせであってもよく、下記を参照することができる：F a u c h e r e , 1 9 8 6 , A d v . D r u g R e s . 1 5 : 2 9 ; V e b e r a n d F r e i d i n g e r , 1 9 8 5 , T I N S p . 3 9 2 ; およびE v a n s e t a l . , 1 9 8 7 , J . M e d . C h e m . 3 0 : 1 2 2 9 。 1 つの有用なポリペプチドと構造的に類似のペプチド模倣体は、前記元のポリペプチドと類似の効果を有する。このような化合物は、コンピュータ分子モデリング (c o m p u t e r i z e d m o l e c u l a r m o d e l i n g) を利用して開発できる。一般に、前記ペプチド模倣体は、本明細書のB 7 - H 3 に特異的に結合する能力を示す抗体と構造的に類似しているが、1 つ以上のペプチド結合は、前記技術分野で広く公知の方法によって、- C H 2 N H - 、- C H 2 S - 、- C H 2 - C H 2 - 、- C H - C H - (c i s および t r a n s) 、- C O C H 2 - 、- C H (O H) C H 2 - およびC H 2 S O - からなる群より選択される結合に代替できる。より安定したタンパク質の生産のために、1 つ以上の保存配列の残基を同じ種類のD - アミノ酸 (例えば、L - リシンの代わりにD - リシン) に置換されてもよい。また、ペプチドを環化できる分子は、内部に架橋 (c r o s s l i n k) 形成システイン残基を導入して保存配列に構造的に制限を加えるペプチドを生成することができる (R i z o a n d G i e r a s c h , 1 9 9 2 , A n n . R e v . B i o c h e m . 6 1 : 3 8 7) 。

【 0 1 6 2 】

本願はまた、本明細書に開示された前記抗体の誘導体を提供する。前記誘導化された抗体は、前記抗体またはその断片に目的の特性、例えば、特定の用途で増加した半減期を提供する任意の分子または物質を含むことができる。前記誘導化された抗体は、検出可能な (または標識) 残基 (例：放射性、比色計、抗原性または酵素分子に結合する分子、検出可能なビーズ (例：磁気ビーズまたは電子密度 (例：金) ビーズ)) 、または他の分子 (例：ビオチン (b i o t i n) またはストレプトアビジン (s t r e p t a v i d i n)) 、治療的または診断的残基 (例：放射性、細胞毒性、または薬学的活性残基) 、または特別な用途に対する抗体の適合性を増加させる分子 (例えば、被験者に投与、例えば、ヒト被験者、またはその他の生体内試験管内使用) を含むことができる。抗体を誘導化させるのに使用される分子の例には、アルブミン (例：ヒト血清 (s e r u m) アルブミン) およびポリエチレングリコール (P E G) が含まれる。前記抗体のアルブミン結合およびペギル化された (p e g y l a t e d) 誘導体は、前記技術分野で広く公知の技術を用いて製造することができる。一実施形態において、ペギル化された単鎖ポリペプチドを含む。他の実施形態において、前記抗体は、トランスサイレチン (t r a n s t h y r e t i n , T T R) またはT T R 変異体に接合または連結される。前記T T R またはT T R 変異体は、例えば、デキストラン (d e x t r a n) 、ポリ (n - ビニルピロリドン) (p o l y (n - v i n y l p y r r o l i d o n e)) 、ポリエチレングリコール (p o l y e t h y l e n e g l y c o l) 、プロピレングリコール単独重合体 (p r o p r o p y l e n e g l y c o l h o m o p o l y m e r) 、ポリプロピレンオキシド / エチレンオキシド共重合体 (p o l y p r o p y l e n e o x i d e / e t h y l e n e o x i d e c o p o l y m e r) 、ポリオキシエチル化ポリオール (p o l y o x y e t h y l a t e d p o l y o l) およびポリビニルアルコール (p o l y v i n y l a l c o h o l) からなる群より選択された化学物質で化学的に変形できる。

【 0 1 6 3 】

他の誘導体は、例えば、B 7 - H 3 タンパク質のN - 末端またはC - 末端に融合された異種ポリペプチドを含む組換え融合タンパク質の発現によって製造できるB 7 - H 3 結合

10

20

30

40

50

タンパク質および他のタンパク質またはポリペプチドの共有または凝集接合体を含む。例えば、前記接合されたペプチドは、異種信号（またはリーダー）ポリペプチド、例えば、酵母アルファ - 因子リーダー、またはペプチド、例えば、エピトープタグであってもよい。前記 B 7 - H 3 抗体 - を含む融合タンパク質は、B 7 - H 3 結合タンパク質（例：ポリ - H i s）の精製または識別を容易にするために追加されたペプチドを含むことができる。B 7 - H 3 結合タンパク質はまた、H o p p e t a l . , 1 9 8 8 , B i o / T e c h n o l o g y 6 : 1 2 0 4 ; および米国特許第 5 , 0 1 1 , 9 1 2 号に開示されたような F L A G ペプチドに連結されてもよい。前記 F L A G ペプチドは、抗原性 (a n t i g e n i c i t y) に優れて、特定の単クローン抗体 (m A b) によって可逆的に結合できるエピトープとして作用して、組換えタンパク質の迅速な確認および容易な精製を可能にする。

10

【 0 1 6 4 】

一実施形態において、これは、前記 B 7 - H 3 結合タンパク質に融合されたペプチド残基の間の共有または非共有相互作用により結合する多数の B 7 - H 3 - 結合ポリペプチドを含むオリゴマー (o l i g o m e r) に関する。該結合するペプチドは、ペプチドリinker (スペーサ) またはオリゴマー化を促進する性質を有するロイシンジッパーのようなペプチドであってもよい。一実施形態において、前記オリゴマーは、2 個または 4 個の B 7 - H 3 結合タンパク質を含む。前記オリゴマーの前記 B 7 - H 3 結合タンパク質残基は、上記で言及したような任意の形態、例えば、変形体または断片であってもよい。好ましくは、前記オリゴマーは、B 7 - H 3 結合活性を有する B 7 - H 3 結合タンパク質を含む。

20

【 0 1 6 5 】

一実施形態において、前記オリゴマーは、免疫グロブリンに由来するポリペプチドを用いて製造される。抗体由来ポリペプチドの多様な部位 (F c ドメインを含む) に融合された異種ポリペプチドを含む融合タンパク質の製造は、例えば、A s h k e n a z i e t a l . , 1 9 9 1 , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 8 8 : 1 0 5 3 5 ; B y r n e t a l . , 1 9 9 0 , N a t u r e 3 4 4 : 6 7 7 ; および H o l l e n b a u g h e t a l . , 1 9 9 2 「 C o n s t r u c t i o n o f I m m u n o g l o b u l i n F u s i o n P r o t e i n s » , i n C u r r e n t P r o t o c o l s i n I m m u n o l o g y , S u p p l . 4 , p a g e s 1 0 . 1 9 . 1 - 1 0 . 1 9 . 1 1 を参照することができる。他の実施形態は、前記 B 7 - H 3 結合タンパク質が抗体の F c 領域に融合された 2 個の融合タンパク質を含む二量体に関する。前記二量体は、融合タンパク質をコーディングする遺伝子の融合を適切な発現ベクターに挿入し、組換え発現ベクターによって形質転換された宿主細胞で遺伝子融合を発現し、発現した融合タンパク質が抗体分子と類似して結合されるようにして製造され、これに関連して、鎖間の二硫化 (d i s u l f i d e) 結合は F c 残基の間に形成されて前記二量体を得る。

30

【 0 1 6 6 】

本明細書で使用する前記用語「 F c ポリペプチド」は、抗体の F c 領域に由来するポリペプチドで、野生型または突然変異形態を含む。二量体化を促進するヒンジ (h i n g e) 領域を含む切断された形態のポリペプチドも含まれる。F c 残基またはそれから形成されたオリゴマーを含む前記融合タンパク質は、タンパク質 A またはタンパク質 G カラムを用いた親和性クロマトグラフィーで簡単に分離できるという利点がある。

40

【 0 1 6 7 】

適切な F c ポリペプチドの例としては、米国特許第 5 , 4 2 6 , 0 4 8 号および第 5 , 2 6 2 , 5 2 2 号、第 5 , 4 5 7 , 0 3 5 号および B a u m e t a l . , 1 9 9 4 , E M B O J . 1 3 : 3 9 9 2 - 4 0 0 1 に記載のものが挙げられる。このような突然変異タンパク質の前記アミノ酸配列において、前記野生型アミノ酸 1 9 番残基が L e u から A l a に置換され、アミノ酸 2 0 番残基が L e u から G l u に置換され、アミノ酸 2 2 番残基が G l y から A l a に置換される。前記突然変異タンパク質において、F c 受容体に

50

対する親和度が減少する。

【0168】

他の実施形態において、本明細書に開示されたB7-H3結合タンパク質の重鎖および/または軽鎖の前記可変領域は、他の抗体の重鎖および/または軽鎖の可変領域に置換されて入ってもよい。

【0169】

標識およびエフェクターグループ

一部の実施形態において、前記抗体または抗原結合断片は、1つ以上の標識 (label) を含むことができる。「標識」は、任意の検出可能な物質を意味する。適切な標識グループの例は、放射線同位元素または放射線核種 (例: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I)、蛍光性グループ (例: FITC、ローダミン (rhodamine)、ランタン族蛍光体 (lanthanoid fluorescent substance)、酵素グループ (例: ホースラディッシュペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase)、 β -ガラクトシダーゼ (β -galactosidase)、ルシフェラーゼ (luciferase)、アルカリ性ホスファターゼ (alkaline phosphatase))、化学発光性グループ、ビオチニルグループ、または2次レポーターによって認識される特定のポリペプチドエピトープ (例えば、ロイシンジッパー対配列 (leucine zipper pair sequence)、2次抗体結合部位 (secondary antibody binding site)、金属結合ドメイン (metal binding domain)、エピトープタグ (epitope tag)) を含み、これに限定されない。一部の実施形態において、前記標識化グループは、潜在的な立体化グループは潜在的な立体障害 (steric hindrance) を減少させるために多様な長さのスペースアーム (space arm) を介して抗体にカップリングされる。タンパク質を標識化するための多様な方法は前記技術分野で公知であり、前記技術分野における通常の技術者であれば、特定の目的のために適切な標識および適切な方法を選択するであろう。

【0170】

前記用語「エフェクターグループ」は、抗体または合成物質に結合または接合される物質である。一実施形態において、前記合成物質は、治療用として機能する任意の物質を意味する。一実施形態において、適切な治療用物質の例は、放射線同位元素または放射線核種 (例: ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{111}In 、 ^{125}I 、 ^{131}I) のような治療用放射線物質を含む。他の適切な例は、細胞毒性剤または抗癌剤を含み、例えば、パクリタキセル (paclitaxel)、ドセタキセル (docetaxel)、オーリスタチン (auristatin)、ゲルダナマイシン (geldanamycin)、オーリスタチン (auristatin)、ゲルダナマイシン (geldanamycin)、マイタンシン (maytansine)、アントラサイクリン (anthracycline) 誘導体、カリケアマイシン (Calicheamicin)、デュオカルマイシン (Duocarmycin)、カンプトテシン (Camptothecin)、アマニチン (amanitin)、ピロロベンゾジアゼピン (pyrrollobenzodiazepines、PBD) 二量体、1-(クロロメチル)-2,3-ジヒドロ-1H-ベンゾ[e]インドール (1-(Chloromethyl)-2,3-dihydro-1H-benzo[e]indole、CBI) 二量体およびCBI-PBD異種二量体を含むことができるが、これに限定されるものではない。一部の実施形態において、前記エフェクターグループは、潜在的な立体障害を減少させるために多様な長さのスペースアームを介して抗体にカップリングされる。

【0171】

一般に、標識は検出方法により分類される: a) 放射性または同位元素標識; b) 磁気標識 (例: 磁気粒子); c) 酸化-還元活性残基; d) 光学染料; 酵素グループ (例えば、ホースラディッシュペルオキシダーゼ、 β -ガラクトシダーゼ、ルシフェラーゼ、アル

カリ性ホスファターゼ) ; e) ビオチニルグループ ; および f) 2 次レポーターによって認識される特定のポリペプチドエピトープ (例 : ロイシンジッパー対配列、2 次抗体のための結合部位、金属結合ドメイン、エピトープタグなど) 。一部の実施形態において、前記標識化グループは、潜在的な立体障害を減少させるために多様な長さのスペーサアームを介して抗体にカップリングされる。タンパク質を標識化するための多様な方法が前記技術分野で公知である。

【 0 1 7 2 】

一実施形態において、前記標識は、発色団 (chromophore) 、蛍光体 (phosphor) および蛍光物質 (fluorescent substance) を含む光学染料を含むが、これに限定されるものではない。前記蛍光体は、低分子蛍光物質またはタンパク質性蛍光物質であってもよい。

10

【 0 1 7 3 】

「蛍光標識 (fluorescent label) 」は、物質が有する蛍光特性により検出可能な任意の分子を意味する。蛍光標識の例としては、フルオレセイン (fluorescein) 、ローダミン (rhodamine) 、テトラメチルローダミン (tetramethylrhodamine) 、エオシン (eosin) 、エリスロシン (erythrosine) 、クマリン (coumarin) 、メチル - クマリン (methyl - coumarin) 、ピレン (pyrene) 、マラカイトグリーン (malachite green) 、スチルベン (stilbene) 、ルシファーイエロー (lucifer yellow) 、カスケードブルー J (cascade blue J) 、テキサスレッド (texas red) 、IAEDANS、EDANS、BODIPY FL、LC レッド 640、Cy5、Cy5.5、LC レッド 705、オレゴングリーン (oregon green) 、アレクサ - フルオル染料 (alexa - fluor dye) (アレクサフルオル 350 (alexa - fluor 350) 、アレクサ - フルオル 430 (alexa - fluor 430) 、アレクサ - フルオル 488 (alexa - fluor 488) 、アレクサ - フルオル 546 (alexa - fluor 546) 、アレクサ - フルオル 568 (alexa - fluor 568) 、アレクサ - フルオル 594 (alexa - fluor 594) 、アレクサ - フルオル 633 (alexa - fluor 633) 、アレクサ - フルオル 647 (alexa - fluor 647) 、アレクサ - フルオル 660 (alexa - fluor 660) 、アレクサ - フルオル 680 (alexa - fluor 680)) 、カスケードブルー (cascade blue) 、カスケードイエロー (cascade yellow) および R - フィコエリスリン (R - phycoerythrin、PE) 、FITC、) 、Cy5、Cy5.5、および Cy7 などが含まれるが、これに限定されるものではない。多様な光学的染料は Molecular Probes Handbook, Richard P. Haugland を参照することができる。

20

30

【 0 1 7 4 】

前記タンパク質蛍光標識物質は、レニルラ (Renilla) 、プチロサルカス (Ptilosarcus) またはエクオレア (Aequorea) 種の GFP を含む緑色蛍光物質 (Chalfie et al., 1994, Science 263 : 802 - 805) 、EGFP (Clontech Labs., Inc., Genbank Accession Number U55762) 、青色蛍光タンパク質 (BFP、Quantum Biotechnologies, Inc., Quebec, Canada ; Stauder, 1998 Biotechniques 24 : 462 - 471 ; Heim et al., 1996, Curr. Biol. 6 : 178 - 182) 、向上した黄色蛍光タンパク質 (EYFP、Clontech Labs., Inc.) 、ルシフェラーゼ (Ichiki et al., 1993, J. Immunol. 150 : 5408 - 5417) 、 β ガラクトシダーゼ (Nolan et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85 : 2603 - 2607) を含むが、これに限定されるものではない。

40

50

【0175】

核酸

一側面において、本願は、特定の混成化条件で本明細書に開示された核酸に混成される核酸に関する。前記核酸の混成化方法は、前記技術分野で広く公知である。例えば、*Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N.Y. (1989), 6.3.1 - 6.3.6を参照することができる。本明細書において、厳しい混成化条件は5x塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム(sodium chloride/sodium citrate、SSC)を含む前洗浄溶液、0.5% SDS、1.0mM EDTA (pH 8.0); 約50%ホルムアミドの混成化緩衝剤、6xSSC、および55の混成化温度(または他の類似する混成化溶液、例えば、50%ホルムアミドを含む溶液、42の混成化温度)、および0.5xSSC、0.1% SDSで60の洗浄条件を使用する。前記厳しい混成化条件は、45で6xSSC、その後、68で0.1xSSC、そして0.2% SDSで1回以上の洗浄によって混成化される。さらに、前記技術分野における通常の技術者は、配列間で少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%同一のヌクレオチド配列を含む核酸が典型的に互いに混成化された状態を維持するのに必要な適切な混成化条件を選択するであろう。

10

【0176】

混成化条件の選択に影響を与える基本パラメータおよび適切な条件は、例えば、*Sambrook, Fritsch, and Maniatis*, (2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 前記; および *Current Protocols in Molecular Biology*, 1995, Ausubel et al., eds., John Wiley & Sons, Inc., section 2.10 および 6.3 - 6.4. を参照することができる。このような条件は、例えば、核酸の長さおよび/または塩基組成(A、G、CおよびT(U)の構成)などに基づいて、前記技術分野における通常の技術者によって容易に決定可能である。

20

【0177】

本明細書に開示された前記核酸はまた、突然変異変異体を含む。前記核酸がコーディングするポリペプチド(抗体または抗体誘導体)のアミノ酸配列の変化を核酸の突然変異によって誘導することができる。前記突然変異は、前記技術分野で公知の任意の技術を用いて導入できる。例えば、部位-指示された突然変異誘発(site-directed mutagenesis)方法、ランダム突然変異誘発(random mutagenesis)方法が使用可能である。このように製造された前記核酸の突然変異は、目的とする特徴を有するポリペプチドに対して選別される。

30

【0178】

前記核酸によってコーディングされるポリペプチドの生物学的活性を顕著に変化させることなく、前記突然変異は前記核酸内に導入できる。例えば、非-必須アミノ酸残基でアミノ酸置換を誘発するヌクレオチド置換を行うことができる。代案的に、前記核酸によってコーディングされるポリペプチドの生物学的活性を選択的に変化させる1つ以上の突然変異が前記核酸に導入できる。例えば、前記突然変異は、生物学的活性を定量的にまたは定性的に変化させることができる。前記定量的な変化の例は、活性の増加、減少または除去を含む。前記定性的な変化の例は、抗体の抗原に対する特異性の変化を含む。

40

【0179】

また、前記核酸によってコーディングされるポリペプチドのアミノ酸配列を変化させることなく、例えば、細胞内発現のためのコドン最適化のための変異は前記核酸内に導入できる。この場合、コドンの重畳性(degeneracy)によって前記同一のポリペプチドをコーディングする多数の核酸が製造可能である。

【0180】

50

本明細書に開示された任意の抗体またはその断片をコーディングする前記核酸は、前記技術分野で広く公知の分子生物学技術を用いてアミノ酸配列が変更されるように突然変異化される。

【0181】

他の側面において、また、本願は、本明細書に開示された前記核酸配列の検出のためのプライマーまたは混成化プローブへの使用に適した核酸分子に関する。このような核酸は、全長核酸配列の一部、例えば、プローブまたはプライマーとして使用可能な全長ポリペプチドをコーディングする核酸の断片、またはポリペプチドの活性部分（B7-H3結合部分）をコーディングする断片核酸を含むことができる。

【0182】

前記核酸配列に基づいて製造された前記プライマーおよびプローブは、本明細書に開示された前記核酸または類似の核酸、またはポリペプチドをコーディングする転写体（transcriptome）を検出するために使用することができる。一実施形態において、該プローブは、前記ポリペプチドを発現する細胞を識別するのに使用可能である。前記プライマーまたはプローブは、放射線同位元素、蛍光性化合物、酵素または酵素補助因子のような標識物質によって標識される。

【0183】

他の側面において、さらに、本願は、前記ポリペプチドまたはその一部分（例えば、1つ以上のCDRまたは1つ以上の可変領域ドメインを含む断片）をコーディングする核酸を含むベクターを提供する。前記ベクターの例は、プラスミド、ウイルスベクター、非-エピソード哺乳動物ベクターおよび（組換え）発現ベクター、CAR-T細胞またはCAR-NK細胞治療剤に使用されるベクターなどを含むが、これに限定されるものではない。前記組換え発現ベクターは、宿主細胞で核酸の発現に適した形態の核酸を含むことができる。前記組換え発現ベクターは、発現に使用される宿主細胞ベースの1つ以上の調節配列を含み、このような調節配列は、発現する核酸配列に作動可能に連結される。前記調節配列には、多くの種類の宿主細胞でヌクレオチド配列の発現を調節できる、例えば、SV40初期遺伝子エンハンサー（enhancer）、ラウス（Rous）肉腫ウイルスプロモーター（promoter）およびサイトメガロウイルス（cytomegalovirus）プロモーターのようなプロモーター；または例えば、特定の宿主細胞内でのみヌクレオチド配列の発現を調節する、組織-特異的調節配列（Voss et al., 1986, Trends Biochem. Sci. 11:287、Maniatis et al., 1987, Science 236:1237）、および特別な処理または条件に反応してヌクレオチド配列の誘導性発現を指示する、哺乳動物細胞で作用するメタロチオネイン（metallothionein）プロモーター、および原核生物および真核生物システムの両方ともで作用するtet-反応性および/またはストレプトマイシン反応性プロモーターを含む。前記技術分野における通常の技術者であれば、形質転換される宿主細胞の種類、ターゲットタンパク質の発現程度のような要因を考慮して、適切なベクターおよび調節配列を選択するであろう。前記選択された発現ベクターは宿主細胞に伝達され、本明細書に開示された前記核酸によってコーディングされたタンパク質の生産に使用可能である。

【0184】

他の側面において、本願は、組換えベクターが導入された宿主細胞を提供する。前記宿主細胞は、任意の原核生物（例えば、E. coli）または真核生物（例えば、酵母、昆虫、または哺乳動物細胞）であってもよい。前記ベクターDNAは、公知の形質転換または形質感染（transfection）技術により原核生物または真核生物に導入できる。哺乳動物細胞で安定した形質感染の場合、使用される発現ベクターの種類および形質転換手法により少数の細胞だけが形質感染によって伝達されたDNAをそのゲノムに統合できることが知られている。したがって、形質感染した細胞を識別し選択するために、一般に抗生剤耐性マーカーのような選択マーカーをコーディングする遺伝子が目的の遺伝子とともに宿主細胞内に導入される。好ましい選択マーカーの場合には、例えば、G418

10

20

30

40

50

、ハイグロマイシン (h y g r o m y c i n) およびメトトレキサート (m e t h o t r e x a t e) への耐性を提供する薬物が含まれる。目的の核酸が安定して導入された前記細胞の選別は、薬物処理により生存する細胞だけを選択して達成できる。

【 0 1 8 5 】

治療方法、薬学的剤形

抗体を用いた治療方法も提供される。一実施形態において、前記抗体は患者に提供される。前記抗体は、一実施形態において、癌細胞表面、癌血管新生血管または抗原提示細胞 (a n t i g e n p r e s e n t i n g c e l l) で発現するヒト B 7 - H 3 に結合して T 細胞の免疫チェックポイントを抑制して、T 細胞を活性化させる。前記抗体は、癌細胞表面または癌血管新生血管で発現するヒト B 7 - H 3 に結合して癌細胞の成長を抑制する。一実施形態において、前記抗体は、C A R - T または C A R - N K などのような細胞治療剤の表面で発現し、前記抗体は、ヒト B 7 - H 3 に結合して前記細胞治療剤を前記癌細胞に特異的に伝達して、前記癌細胞の死滅を誘導する。一実施形態において、前記抗体は、抗癌免疫抗体と組み合わせて使用可能であり、これによって前記 T 細胞の活性により癌を抑制することができる。

10

【 0 1 8 6 】

治療的有効量の前記抗体および製薬的に許容される希釈剤 (d i l u e n t)、担体 (c a r r i e r)、可溶化剤 (s o l u b i l i z e r)、乳化剤 (e m u l s i f i e r)、保存剤 (p r e s e r v a t i v e) および / または補充剤 (s u p p l e m e n t) を含む製薬組成物をさらに提供する。また、例えば、このような薬学的組成物を投与して癌患者を治療する方法を含む。本明細書において、前記被験者または患者は、ヒト患者を含む。

20

【 0 1 8 7 】

許容される剤形物質は、使用された用量および濃度で収容者に毒性がない。特定の一実施形態において、治療的有効量のヒト B 7 - H 3 抗体を含む製薬組成物を提供する。

【 0 1 8 8 】

以下、本発明の理解のために好ましい実施例を提示する。しかし、下記の実施例は本発明の理解のために提供されるものであり、本発明は下記の実施例によって制限されない。

【 0 1 8 9 】

実施例

30

実施例 1 : 抗体の製造

実施例 1 - 1 : 抗原の製造

抗 - B 7 - H 3 抗体製造のためのファージディスプレイ (p h a g e d i s p l a y) の実行に使用される抗原を購入して使用した。ヒト B 7 - H 3 の場合、NP__001019907.1 のアミノ酸配列 1 番 ~ 461 番を含み、C 末端にヒスチジン - タグ (H i s t a g) が結合している組換え B 7 - H 3 タンパク質 (2318 - B3 / CF、R & D S y s t e m s) を使用した。

【 0 1 9 0 】

下記の実施例の E L I S A 分析、S P R 分析または T 細胞の活性分析に使用される抗原を下記のように購入して使用した。ヒト B 7 - H 3 の場合、NP__001019907.1 のアミノ酸配列 1 番 ~ 451 番を含み、C 末端にヒスチジン - タグ (H i s - t a g) が結合している組換え B 7 - H 3 タンパク質 (S i n o B i o l o g i c a l、11188 - H02H) と、C 末端にヒト I g G 1 の F c 部分が結合しているタンパク質 (S i n o B i o l o g i c a l、11188 - H02H) を使用した。

40

【 0 1 9 1 】

実施例 1 - 2 : ファージライブラリー (p h a g e l i b r a r y) スクリーニングによる抗体の選別製造

ライブラリーファージの製造

多様な抗原に対する結合の可能性を有しているヒト由来 s c F v (単鎖可変断片) ライブラリー (M o l . C e l l s O T、225 - 235、February 28、200

50

9) 遺伝子を有する大腸菌 (E. coli) を 2 X Y T (Amresco、J902-500G)、アンピシリン (ampicillin) が 100 µg/ml、2% のグリコース (sigma、G7021) を含む培地に 2×10^{10} 個を接種し、37 で 2 時間 ~ 3 時間培養して、OD600 値が 0.5 ~ 0.7 となるようにした。培養された大腸菌にヘルパーファージ (helper phage) を感染させた後、2 X Y T [2 X Y T、アンピシリン 100 µg/ml、1 mM IPTG (Duchefa、I1401)] 培地に 30 で 16 時間培養して、ファージパッケージング (phage packaging) を誘導した。次いで、培養された細胞を 4、4500 rpm の条件で 20 分間遠心分離した後、4% PEG 8000 (sigma、P2139) と 3% NaCl (Samchun、S2097) を上澄液に入れてよく溶かした後、氷上で 1 時間反応させた。再び 4、8000 rpm の条件で遠心分離した後、PBS (Phosphate buffered saline、Gibco 10010-023) をペレットに添加して懸濁させた。前記懸濁液を 4、1200 rpm の条件で 10 分間遠心分離させた後、前記上澄液を新しいチューブに移して、使用時まで 4 で保管した。

【0192】

ファージディスプレイ (phage display) によるパニング (panning)

ヒト B7-H3 タンパク質と結合する抗体を選別するために、実施例 101 のヒスチン-タグ (His-tag) が結合している前記組換え B7-H3 タンパク質を用いて、下記のようなパニングを計 3 回進行させた。

【0193】

具体的には、免疫試験管 (immunotube、maxisorp 444202) に 2 µg/ml 濃度の組換えヒト B7-H3 タンパク質を 1 ml 添加して、37、200 rpm の条件で 1 時間反応させて、試験管の表面にタンパク質を吸着させた。以後、上澄液を除去し、3% 脱脂乳を含む溶液を試験管に添加し、室温で 1 時間反応させた。しかし、前記組換えヒト B7-H3 タンパク質が吸着していない前記免疫管の表面に脱脂乳が吸着して、非特異的結合を遮断した。前記上澄液を除去した後、実施例 1-2 で製造されたファージライブラリーの 1012 CFU を脱脂乳 3% を含む溶液に混合して、免疫検査に投入し、37、150 rpm の条件で 1 時間反応させ、ヒト B7-H3 タンパク質に特異的なファージが抗原に結合するようにした。

【0194】

次いで、非特異的に結合したファージを PBS-T (Phosphate buffered saline-0.05% Tween 20) 溶液で洗浄して除去し、前記残っている抗原特異的ファージ抗体を 100 mM のトリエチルアミン溶液を 1 ml 添加して得た。トリエチルアミン溶液の pH が低いため、1 M Tris 緩衝溶液 (pH 7.4) で中和させた後、OD600 で 0.8 ~ 1 に成長した ER2537 大腸菌に、37、1200 rpm の条件で 1 時間 30 分間感染させた。前記培養液を 4、4500 rpm の条件で 15 分間遠心分離した後、前記上澄液を除去し、アンピシリンを含む 2 X Y T 寒天培地に感染した大腸菌を塗抹して、37 で 16 時間以上沈ませた細胞を培養した。翌日、前記培養された大腸菌をすべて掻き出して 5 ml の 2 X Y T アンピシリン培養液に懸濁し、50% グリセロールを添加して、一部は -80 に保管し、残りは次の実験のためのファージを製造するのに使用した。アンピシリンを含む 2 X T B に培養された大腸菌 20 µl を接種して成長させた後、ヘルパーファージを感染させて実施例 2-1 および 2-2 を 2 回さらに繰り返して、ヒト B7-H3 タンパク質特異的ファージプール (phage pool) を増幅および濃縮した。

【0195】

単クローンのスクリーニング

前記パニングにより得られた前記ファージプールからヒト B7-H3 タンパク質に特異的に結合する単クローン抗体を選別するために、下記のような実験を行った。

【0196】

前記濃縮されたプールから単クローンを分離するために、LB-アンピシリン寒天培地に前記ファージプールを塗抹した後、培養して、単コロニーを得た。次に、単クローンをウェルあたり200 μ lのスーパーブロス(super broth、SB)培地が入った96-ディープウェルプレートに接種し、夜中培養して、一部を他のプレートに移して細胞ストックを作った。残りの細胞培養液に1Mm IPTGを入れて、30で16時間培養してscFvの生成を誘導した。前記培養された培養液を4、6000rpmの条件で遠心分離した後、前記上澄液を捨てて細胞だけを得た後、TES溶液を用いて細胞を溶解させた後、再び遠心分離して、上澄液だけを得て使用した。

【0197】

次いで、B7-H3-His抗原に結合する可溶性単クローンscFv(2318-B3/CF、R&D Systems)を発現するクローンを下記のようなELISA方法を利用して選択した(Steinberger, Rader and Barbas III, 2000, Phage display vectors, In: Phage Display Laboratory Manual, 1sted, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, USA, pp. 11.9-11.12)。具体的には、96-ウェルプレート(96-well plate、Nunc-Immuno Plates、NUNC、Rochester、NY、USA)に実施例1で製造された組換えヒトB7-H3-hisタンパク質を載せて、4で一晩吸着させた。翌日、PBST(Phosphate buffered saline-0.05% Tween 20)で前記タンパク質を洗浄した後、非特異的結合を防止するために、ウェルあたり200 μ lの3%BSAを含むPBS緩衝液を入れて、37で2時間反応させた。以後、PBSTで再び洗浄した後、予め遠心分離して用意したファージが含まれている上澄液を各ウェルあたり100 μ lを入れて、37で約1時間反応させた。以後、PBSTで洗浄した後、ヒトB7-H3に結合したファージを検出するために、前記抗-HA HRP(Horseradish peroxidase)結合抗体(Roche、12013819001)を1%BSAを含むPBSに1:5000で希釈して、ウェルあたり100 μ lを入れて、37で約1時間反応させた。再びPBSTで洗浄した後、TMB(Tetramethylbenzidine、Thermo、34028)100 μ lを入れて発色させた。RTで5~10分間反応させた後、1N H₂SO₄ 50mlを入れて反応を終結させた。450nmでの吸光度を測定して、値が1.0以上のクローンを分類した。

【0198】

これから、前記組換えヒトB7-H3タンパク質に結合する7個の抗体クローン(B5、C41、D8G、F6V、10F11、D8G M1 and D8G M3)を選別し、前記各抗体の重鎖可変および軽鎖可変領域のアミノ酸配列およびCDR配列は下記表の通りである。

【表4】

クロー ン	重鎖可変(Heavy Chain Variable, VH)のCDR配列						VH
	CDRH1		CDRH2		CDRH3		
	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列 番号
B5	DYAMS	1	SISSGSGSIYYADSVKG	5	NLIPLDY	10	30
C4I	GYYS	2	LISPSSGSIYYADSVKG	6	GLTKFDY	11	31
D8G	SYSMS	3	GIYSDGSNTYYADSVKG	7	MLHRFDY	12	32
F6V	DYAMS	1	GISPGGSNTYYADSVKG	8	DAWIARLLLFDY	13	33
10F11	SYGMS	4	GIYSGGSSKYYADSVKG	9	NRLRFDY	14	34
D8G M1	SYSMS	3	GIYSDASNTYYADSVKG	68	MLHRFDY	12	70
D8G M3	SYSMS	3	GIYSDASNTYYADSVKG	68	MLHRFDY	12	70

【表 5】

クロー ン	軽鎖可変(Light Chain Variable, VL)のCDR配列						VL
	CDRL1		CDRL2		CDRL3		
	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列	配列 番号	配列 番号
B5	SGSSSNIGSNAVS	15	YNSHRPS	20	GSWDASLNAYV	25	35
C4I	TGSSSNIGSNDVS	16	ANSHRPS	21	GSWDDSLSGYV	26	36
D8G	SGSSSNIGSNSVT	17	ADSQRPS	22	GTWDSSLNAYV	27	37
F6V	SGSSSNIGSNAVT	18	YNNKRPS	23	GTWDDSLSGYV	28	38
10F11	TGSSSNIGSNSVT	19	SDSHRPS	24	GTWDASLNAYV	29	39
D8G M1	SGSSSNIGSNSVT	17	ADSQRPS	22	GTWDSSLNAYV	27	37
D8G M3	SGSSSNIGSNSVT	17	ADVQRPS	69	GTWDSSLNAYV	27	71

10

【0199】

前記可変領域およびCDR配列をコーディングする前記核酸配列は、B5、C41、D8G、F6V、10F11、D8G M1、およびD8G M3の順に下記の全長核酸配列で構成されている：配列番号：50（重鎖）および55（軽鎖）；配列番号：51（重鎖）および56（軽鎖）；配列番号：52（重鎖）および57（軽鎖）；配列番号：53（重鎖）および58（軽鎖）；配列番号：54（重鎖）および59（軽鎖）；配列番号：74（重鎖）および57（軽鎖）；および配列番号：74（重鎖）および75（軽鎖）。前記核酸配列のうち、不変領域をコーディングする核酸配列は、配列番号61～63（重鎖）、および配列番号65～67（軽鎖）であった。

20

【0200】

実施例2：抗B7-H3 scFvの全体IgG形態に変換およびその生産

実施例2-1：抗B7-H3 scFvの全体IgG形態へのクローニング

実施例1で確保したそれぞれのヒトB7-H3特異的単クローン抗体のファージ抗体を全体IgG形態に変換するために、実施例1で確保した各クローンの重鎖および軽鎖可変領域をコーディングする核酸を合成した（Genotech、Korea）。重鎖および軽鎖不変領域（それぞれ配列番号：60 and 64）のタンパク質のヒトIgG1のサブタイプをコーディングする遺伝子（重鎖不変領域の配列番号：61（C41、D8G、10F11、D8G M1、D8G M3クローン）、62（B5クローン）、63（F6Vクローン）、および軽鎖可変領域65（C41、D8G、10F11、D8G M1、D8G M3クローン）、66（B5クローン）および67（F6Vクローン））を合成して、前記各重鎖および軽鎖可変領域をコーディングする核酸と連結した。各抗体の軽鎖および重鎖をコーディングする前記核酸をそれぞれpcDNA3.1ベースの発現ベクターにクローニングし、CHO-Sなどの哺乳動物細胞株で核酸抗体をコーディングするベクターを得た。また、既存の抗-B7-H3抗体のEnoblituzumabを比較群の抗体として使用するために、前記抗体の可変領域配列を特許（US8,802,091）から得、前記遺伝子を確保して、上述した方法と同一にクローニングして、84Dと名付けて使用した。

30

40

【0201】

IgG形態の抗体は、B5、C41、D8G、F6V、10F11、D8G M1、およびD8G M3の順に下記の重鎖および軽鎖の全長配列で開示された：配列番号：50（重鎖）および55（軽鎖）；配列番号：51（重鎖）および56（軽鎖）；配列番号：52（重鎖）および57（軽鎖）；配列番号：53（重鎖）および58（軽鎖）；配列番号：54（重鎖）および59（軽鎖）；配列番号：74（重鎖）および57（軽鎖）；および配列番号：74（重鎖）および75（軽鎖）。

【0202】

実施例2-2：抗-B7-H3抗体の発現

50

前記抗 - B 7 - H 3 抗体の発現は、Thermo社で開発したExpiCHO-STM (Thermo Fisher、A29127) 細胞を用い、ExpiCHOTM Expression System Kit (Thermo Fisher、A29133) のプロトコルに従って前記抗体の発現を行った。

製造方法を簡略に説明すれば、ExpiCHO-S細胞は、8%CO₂、37℃の条件の振盪培養器(shaking incubator)で120rpmの条件で培養された。形質感染当日、ExpiCHO-S細胞を6×10⁶細胞/mlの細胞濃度でExpiCHOTM発現培地(Thermo Fisher、A2910001)を添加して希釈し製造した。

【0203】

次いで、実施例2-1の前記重鎖および軽鎖を発現する各ベクターをそれぞれ培地mlあたり1μgずつOptiPROTM SFM培地(Thermo Fisher、12309050)に希釈し、ExpiFectamineTM発現システムに含まれているExpiFectamineTM CHOをmlあたり3.2μgをOptiPROTM SFM培地に希釈させた。前記ベクターおよびExpiFectamineTM CHO混合物を混合して、常温で5分間反応させた後、前記用意された細胞に混合物を入れて、8%CO₂、37℃、120rpmの条件で20時間培養した。20時間、2.2μl/mlおよび240μl/mlのEnhancer 1を添加した後、ExpiCHOTM発現システムキット(Thermo Fisher、A29133)に含まれているExpiCHOTM Feedをそれぞれ細胞に添加し、8%CO₂、37℃、120rpmの条件で7日~10日間培養した。

【0204】

培養後、前記細胞培養液を4℃、6000rpmの条件で30分間遠心分離した後、前記上澄液を分離して冷蔵保管した。

【0205】

実施例2-3：抗-B7-H3抗体の分離および精製

平衡緩衝液(50mM Tris-HCl、pH7.5、100mM NaCl)をMab選択器(GE healthcare、5ml)に通過させて平衡化させた後、実施例2-2の前記培養液をカラム(Mab select sure(GE healthcare、5ml))に通過させて発現した抗体がカラムに結合するようにした。この後、50mM Na-citrate(pH3.4)、100mM NaCl溶液で溶出させた後、1M Tris-HCl(pH9.0)を用いて中和させて、最終pHが7.2となるようにした。緩衝液をPBS(phosphate buffered saline、pH7.4)に交換した。

【0206】

実施例3：抗-B7-H3抗体のB7-H3に対する結合特異性の分析

実施例3-1：抗B7-H3 IgG抗体の組換えB7-H3抗原に対する結合特異性の分析(ELISA)

実施例1および2で選別して製造した抗B7-H3 IgG抗体のB7-H3抗原に対する特異的結合能力を確認するために、ELISAに基づいた溶液結合実験を行った。

【0207】

具体的には、前記組換えヒトB7-H3タンパク質を1μg/mlの濃度に希釈して、96ウェルプレート(Nunc-Immuno Plates、NUNC)にウェルあたり100μlを入れて、4℃で16時間反応してコーティングした。実施例1で用いた前記組換えヒトB7-H3タンパク質を使用した。

【0208】

その後、前記タンパク質を除去し、PBSTで洗浄した後、1%BSA(bovine serum albumin)を含むPBSバッファーをウェルあたり200μlずつ入れて、37℃で2時間反応させて非特異的結合を遮断させた。その後、実施例2で製造した抗-B7-H3抗体を96ウェルプレートに10μl/mlの濃度に希釈した後、1

10

20

30

40

50

00 μ l を各ウェルに入れて、37 で1時間反応させた。その後、PBSTで洗浄した。ヒトB7-H3に結合した抗体を検出するために、HRP-連結抗ヒトIgG F(ab')₂抗体 (Goat anti-Human IgG F(ab')₂ Cross-Adsorbed Secondary Antibody、HRP、Pierce、31414) を1%ウシ血清アルブミン (BSA) を含むPBSに1:10,000で希釈し、ウェルあたり100 μ lを入れて、37 で約1時間反応させた。再びPBSTで洗浄した後、TMB (Tetramethylbenzidine、Sigma、T0440) 100 μ lを入れて発色させた。室温で5~10分間反応させた後、1N H₂SO₄ 50 μ lを入れて反応を終了させ、マイクロプレートリーダー (分子素子) を用いて、450nmおよび650nmで吸光度を測定した。

10

【0209】

前記結果は図1Aおよび1Bに記載されている。ELISA方法を利用して結合能力を測定した結果、抗-B7-H3抗体がヒトB7-H3の細胞外領域に濃度依存的に結合することを確認した。

【0210】

実施例3-2: 抗-B7-H3抗体のB7ファミリーの他のタンパク質に対する結合能力の分析

B7ファミリータンパク質は、互いに20~40%のアミノ酸の同一性を共有し、免疫グロブリンドメインの反復性のような構造的関連性を有する。そのため、本明細書の抗-B7-H3抗体が他のB7ファミリータンパク質ではないB7-H3タンパク質に特異的に結合するか否かを下記のように分析した。

20

【0211】

免疫特異的結合能力を確認するために、構造的類似性を有するB7ファミリーの構成タンパク質: B7-1 (Sino Biological、Cat#: 10698-H08H)、B7-2 (Sino Biological、Cat#: 10699-H08H)、B7-DC (Sino Biological、Cat#: 10292-H08H)、B7-H1 (Sino Biological、Cat#: 10084-H08H)、B7-H2 (Sino Biological、Cat#: 11559-H08H)、B7-H4 (Sino Biological、Cat#: 10738-H08H)、B7-H5 (Sino Biological、Cat#: 13482-H08H)、B7-H6 (Sino Biological、Cat#: 16140-H08H)、B7-H7 (Sino Biological、Cat#: 16139-H02H) を購入して使用した。

30

【0212】

具体的には、前記組換えヒトB7ファミリータンパク質を1 μ g/ml濃度に希釈して、96ウェルプレート (Nunc-Immuno Plates、NUNC) にウェルあたり100 μ l入れて、4 で16時間反応してコーティングした。前記実施例1で用いた組換えタンパク質を使用した。

【0213】

その後、タンパク質を除去し、PBSTで洗浄した後、ウェルあたり1%BSA (bovine serum albumin) を含むPBSバッファー200 μ lを入れて、37 で2時間反応させて非特異的結合を遮断させた。この後、実施例2で製造された抗-B7-H3抗体を96ウェルプレート上で10 μ g/mlに希釈した後、各ウェルに100 μ lずつ入れて、37 で1時間反応させた。その後、PBSTで洗浄した。抗原に結合した抗体を検出するために、HRPが連結された抗ヒトIgG F(ab')₂抗体 (Goat anti-Human IgG F(ab')₂ Cross-Adsorbed Secondary Antibody、HRP、Pierce、31414) を1%のウシ血清アルブミン (BSA) が含まれているPBSに1:10,000で希釈して、ウェルあたり100 μ lずつ入れて、37 で約1時間反応させた。再びPBSTで洗浄した後、TMB (Tetramethylbenzidine、Sigma、T0

40

50

440) 100 μ l を入れて発色させた。室温で5～10分間反応させた後、50 μ l の H_2SO_4 を投入して反応を終了させ、マイクロプレートリーダー（分子素子）を用いて、450 nm および 650 nm で吸光度を測定した。

【0214】

前記結果は図2に記載されている。ELISA法を利用して前記結合能力を測定した結果、前記抗-B7-H3抗体はB7-H3にのみ特異的に結合し、前記他のB7ファミリータンパク質には結合しないことを確認した。

【0215】

実施例3-3：抗-B7-H3抗体のヒト、サルおよびマウスB7-H3抗原に対する種間交差反応性の分析

ヒトに臨床を進行させる前に、前記抗-B7-H3抗体の抗体効能および免疫調節活性を推定するには、齧歯類または霊長類モデルの推定が重要である。ヒトB7-H3の配列は、サルおよびマウスと90%以上の同一性を共有する。実施例2で製造された本願の抗-B7-H3抗体のマウスまたはサルB7-H3に対する交差反応性は、下記のようなELISA分析法で分析した。

【0216】

前記特異的交差反応を確認するために、ヒスチジンタグ（histidine tag、His tag）がC末端（Sino Biological、Cat#: 50973-M08H）に連結された組換えマウスB7-H3タンパク質と、C末端にヒトIgG1のFc部分が結合している組換えサルB7-H3タンパク質（Sino Biological、Cat#: 90806-C02H）抗原を購入して使用した。

【0217】

前記組換えヒトB7-H3、マウスB7-H3およびサルB7-H3タンパク質を1 μ g/mlの濃度に希釈し、96ウェルプレート（Nunc-Immuno Plates、NUNC）にウェルあたり100 μ l 入れた後、4で16時間反応させてコーティングした。前記用いた組換えタンパク質は、実施例1で分析のために購入した製品を使用した。

【0218】

この後、タンパク質を除去し、PBSTで洗浄した後、ウェルあたり1%のBSA（bovine serum albumin）を含む200 μ l のPBSバッファーを入れて、37で2時間反応させて非特異的結合を遮断した。この後、実施例2で製造した前記抗-B7-H3抗体を96ウェルプレートに10 μ g/ml から一定の比率で希釈した後、各ウェルに100 μ l 入れて、37で1時間反応させた。次いで、PBSTで洗浄し、ヒトB7-H3、マウスB7-H3およびサルB7-H3に結合した抗体、HRP連結抗ヒトIgG F(ab')₂抗体（Goat anti-Human IgG F(ab')₂ Cross-Adsorbed Secondary Antibody、HRP、Pierce、31414）を1%ウシ血清アルブミン（BSA）が含まれているPBSに1:10,000で希釈して、ウェルあたり100 μ l を入れて、37で約1時間反応させた。再びPBSTで洗浄した後、TMB（Tetramethylbenzidine、Sigma、T0440）100 μ l を入れて発色させた。室温で5～10分間反応させた後、 H_2SO_4 50 μ l を投入して反応を終了させ、マイクロプレートリーダー（分子素子）を用いて、450 nm および 650 nm で吸光度を測定した。

【0219】

前記結果は図3および4に記載した。ELISA法を利用して結合能力を測定した結果、抗-B7-H3抗体がヒト、サルおよびマウスB7-H3に特異的に結合することを確認した。ヒトおよびサルB7-H3に対する本願の1つのB7-H3抗体の結合程度は類似していることが明らかになったが、マウスB7-H3に対する結合程度は相対的に低かった（図3）。マウスB7-H3に対する抗-B7-H3抗体の結合程度はクローンごとに異なり、比較抗体として使用された84D抗体はマウスB7-H3タンパク質に結合しないことが観察された（図4）。

10

20

30

40

50

【0220】

実施例3-4：抗-B7-H3抗体の細胞表面発現B7-H3抗原に対する結合能力の測定

この後、FACS分析により、実施例2で製造された本願の抗-B7-H3抗体が細胞表面に発現したヒトB7-H3に結合する能力を測定した。

【0221】

前記実験のために、ヒトB7-H3、MCF-7（ヒト乳癌細胞株、Human breast adenocarcinoma cell line、ATCC HTB-22TM）、DLD1（結腸直腸腺癌細胞株、colorectal adenocarcinoma cell lines、ATCC CCL-221TM）、HCC1954（TNM stage IIA、grade 3、ductal carcinoma、ATCC CRL-2338TM）、およびHCT116（結腸癌細胞、colon cancer cell、ATCC CCL-247TM）を発現する癌細胞およびヒトB7-H3を発現しない癌細胞株のJurkat（acute T cell leukemia、ATCC TIB-152TM）を使用した。

10

【0222】

具体的には、各細胞株を解離し、PBS緩衝液で洗浄した後、細胞数を数えてウェルあたり2*10⁵個の細胞に調整し、200μlのPBSを入れて用意した。実施例2の抗-B7-H3抗体および比較群抗体（84D）は、それぞれ1%DM LBSAを含むPBSで一定の濃度10μg/ml以上に希釈して、予め用意した細胞と4で1時間反応させた。PBSバッファーを用いて2回洗浄した後、FITC標識された抗ヒトFc FITC（Goat anti-human IgG FITC conjugate、Fc specific、Sigma、F9512、濃度：2.0mg/ml）を1：500で希釈して、ウェルあたり100μl処理し、4で1時間反応させた。前記陰性対照群はFITC標識された抗ヒトFc FITCのみ処理した。再びPBSバッファーを用いて2回洗浄し、FACSCalibur装置を用いて、抗BCMA IgGの結合程度を測定した。

20

【0223】

各B7-H3単クローン抗体を処理した実験群においてヒトB7-H3単クローン抗体-FITC結合に対するピーク移動結果を陰性対照群と比較した。前記結果は、B7-H3単クローン抗体を処理した実験群のピークシフト値を、陰性対照群のピークシフト値（平均蛍光強度比率、Mean Fluorescence Intensity Ratio）で割った値を示し、図5および6に記載した。FACS方法を利用して結合能力を測定した結果、抗-B7-H3抗体が細胞表面に発現したヒトB7-H3に濃度依存的に特異的に結合することを確認した。

30

【0224】

実施例3-5：多様な癌種における抗B7-H3 IgG抗体の細胞表面発現B7-H3抗原に対する結合能力の測定

この後、FACS分析により、本願の抗-B7-H3抗体が多様な癌細胞株で細胞表面発現B7-H3に結合するか否かを確認した。

40

【0225】

多様な種類の癌細胞A2780（ヒト卵巣癌、human ovarian cancer、ECACC、93112519）、SKOV-3（ヒト卵巣腺癌、human ovarian adenocarcinoma、ATCC^R HTB-77TM）、OVCAR-3（ヒト卵巣腺癌、human ovarian adenocarcinoma、ATCC^R HTB-161TM）、HCT116（結腸癌細胞、colon cancer cell、ThermoFisher Sci）、HT29（大腸直腸腺癌、colorectal adenocarcinoma、ATCC^R HTB-38TM）、DLD-1（結腸直腸腺癌細胞株、colorectal adenocarcinoma cell lines、ATCC^R CCL-221TM）、Calu-6（非

50

小細胞性肺癌、Non-small-cell lung carcinoma、ATCC^R HTB-56^{T M})、HCC1954 (TNM stage IIA、grade 3、ductal carcinoma、ATCC^R CRL-2338^{T M})、HCC1187 (TNM stage IIA、ATCC^R CLC-2322^{T M})、renal cancer cell line 786-0 (腎臓癌細胞株、renal cell adenocarcinoma、ATCC^R CRL-1932^{T M})、A498 (腎臓癌、kidney carcinoma、ATCC^R HTB-44^{T M})、Panc-1 (膵臓上皮癌、pancreas epithelioid carcinoma、TCC CRL-1469^{T M})、NCI-N87 (胃癌、gastric carcinoma、TCC CRL-5822^{T M})、HeLa (子宮頸癌、cervix adenocarcinoma、ATCC^R CCL-2^{T M})、JeKo-1 (リンパ腫、Lymphoma、ATCC^R CRL-3006^{T M})およびFACSCalibur (BD Biosciences) 機器を用いて、抗-B7-H3抗体とB7-H3との結合した程度を下記のように測定した。

10

【0226】

各細胞株を解離し、PBS緩衝液で洗浄した後、細胞数を数えて 2×10^5 個の細胞/ $200 \mu\text{l}$ PBSで調整した後、実施例2で製造された $10 \mu\text{g/ml}$ のB7-H3単クローン抗体で処理した。反応は4で1時間進行させた。前記反応した細胞をPBSで洗浄した後、前記FITC標識された不変領域(Fc)-特異的抗体(Goat anti-human IgG FITC conjugate、Fc specific、Sigma、F9512、濃度： 2.0 mg/ml)を1:500で希釈し、ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ を添加し、4で1時間反応させた。前記反応後、細胞をPBSで洗浄し、前記FACSCalibur装置を用いて分析した。前記陰性対照群はFITC-標識された不変領域(Fc)特異的抗体でのみ処理した。癌細胞株別B7-H3の発現程度を比較するために、各B7-H3単クローン抗体を処理した試験群のピークシフト値を、陰性対照群におけるピークシフト値で割った値(MFI Ratio、Mean Fluorescence Intensity Ratio)を示した。前記結果は表6に記載した。

20

【表 6】

癌細胞株		MFI比率					
		B5	C4I	D8G	F6V	10F11	84D
卵巣癌	A2780	26.6	18.3	21.6	25.2	25.5	13.1
	SKOV-3	29.5	20.4	23.3	27.7	28.5	11.9
	OVCAR-3	33.1	22.4	26.7	33.1	35.6	13.7
大腸癌	HCT116	11.9	6.8	7.9	10.8	12	5.9
	HT29	17.6	12.7	11.9	15.9	18.7	8.9
	DLD-1	24.9	14.9	18.5	25.6	24.6	10.7
NSCLC	Calu-6	47.9	45.5	43.2	N/D	47.8	23.2
TNBC	MDA-MB-231	11.4	6.2	8.5	11.3	12.4	5.4
	MDA-MB-468	16.2	9.7	11.4	17.6	17.2	8.6
乳癌	MCF-7	154	109	136	151	152	78
	HCC1954	29	21	25	30	35	14
	HCC1187	21.8	11.2	13.3	18.4	22	14.9
腎臓癌	786-0	32	24	22	33	34	20
	A-498	35	26	25	37	35	24
膵臓癌	Panc-1	18	12	12	19	18	9
胃癌	NCI-N87	27.3	17.6	21.5	33.4	31.7	12.8
子宮頸癌	Hela	38.7	26.1	30.2	42.7	40.6	23.5
MCL	JeKo-1	1.5	7.9	3.1	N/D	1.7	2.9

(MFI比率: 抗B7-H3のMFI / 2nd AbのMFI)

(N/D: 決定されない状態)

【0227】

FACS方法を利用して結合能力を測定した結果、本願の抗-B7-H3抗体が卵巣癌、結腸直腸癌、非小細胞肺癌、乳癌、腎臓癌、膵臓癌、胃癌、子宮頸癌およびリンパ腫由来の多様な癌細胞株に結合することを確認した。また、本明細書の前記抗-B7-H3抗体は、同一の濃度で比較群84Dに比べてより高い結合能力を示して、細胞表面発現B7-H3に対する結合能力がより優れていることを確認した。

【0228】

実施例3-6: 抗-B7-H3抗体のマウス由来癌細胞のマウスB7-H3抗原に対する結合能力の測定(FACS)

この後、FACS分析により、本明細書の抗B7-H3の細胞表面発現マウスB7-H3に対する結合能力を測定した。実施例3-3において抗-B7-H3抗体がヒトB7-H3およびマウスB7-H3組換えタンパク質ともに結合していることを、ELISA方法により確認した。It was confirmed that the anti-B7-H3 antibody bound to human B7-H3 and mouse B7-H3 recombinant proteins both through ELISA method in Example 3-3。本明細書の前記抗-B7-H3抗体がマウス癌細胞株の細胞表面に発現するマウスB7-H3に結合するか否かを確認するために、マウス由来癌細胞株のCT26 (Mus musculus colon carcinoma、ATCC^R CRL-2638TM)、B16F10 (Mus musculus skin melanoma、ATCC^R CRL-6475TM)、TC-1 (Mus musculus Lung tumor、ATCC^R CRL-2493TM)細胞株を使用した。

【0229】

各細胞株に対して、細胞を分離し、PBS緩衝液で洗浄した。細胞の数を数えてウェル

あたり 2×10^5 の細胞数に調整して、 $200 \mu\text{l}$ の PBS を入れて用意した。前記細胞は 1% BSA を含む PBS で $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度で用意した。前記実施例 2 で製造された抗-B7-H3 抗体と比較抗体 (84D) をそれぞれ 4 で 1 時間反応させた。

【0230】

PBS 緩衝液を用いて細胞を洗浄した後、FITC 標識された抗ヒトFc-FITC (Sigma、F9512) を 1:500 で希釈して、ウェルあたり $100 \mu\text{l}$ ずつ添加し、4 で 1 時間反応させた。前記対照群は、FITC 標識抗ヒトFc-FITC のみ処理した。再び PBS 緩衝液を用いて 2 回洗浄し、FACSS Calibur 装置を用いて、抗 B7-H3-IgG 抗体の結合程度を測定した。

前記 B7-H3 単クローン抗体を処理した実験群のピークシフト値を、陰性対照群のピークシフト値と比較した。その結果は図 7 に記載した。FACS 方法を利用した測定結果、本明細書の抗-B7-H3 抗体が細胞表面に発現したマウス B7-H3 に特異的に結合することを確認した。

【0231】

実施例 4：抗-B7-H3 抗体の B7-H3 に対する親和度の測定

抗原 B7-H3 および抗-B7-H3 抗体の結合親和度は SPR 方法で測定した。まず、 $1 \times \text{HBSE-P}$ 緩衝液に希釈した抗-B7-H3 抗体を 60 秒の接触時間、60 秒の安定化時間および流速 $30 \mu\text{l}/\text{min}$ で Protein A チップ (GE Healthcare、Cat. No. 29127556) に 50 RU となるようにキャプチャした。 $1 \times \text{HBSE-P}$ バッファーを用いて、前記抗原 B7-H3 (R&D systems、2318-B3-050/CF) を 100nM から 3.125nM まで 2 倍ずつ段階的に希釈して用意した。この時、ブランク (blank) に $1 \times \text{HBSE-P}$ バッファーを追加して用意した。前記抗-B7-H3 抗体をキャプチャしたチップ上に用意した抗原 B7-H3 を流速 $30 \mu\text{l}/\text{min}$ で association 時間 60 秒、dissociation 時間 180 秒間流した。再生は 10mM グリシン-HCl pH 1.5 (GE Healthcare、Cat. No. BR100354) を流速 $30 \mu\text{l}/\text{min}$ で contact 時間 30 秒にした。前記結果は表 7 に記載した。

【表 7】

抗-B7-H3 抗体の B7-H3 に対する親和度の測定

Ab	K_a ($1/\text{Ms}$, $\times 10^5$)	K_d ($1/\text{s}$, $\times 10^{-3}$)	K_D (M, $\times 10^{-9}$)	$R_{\max}$ (RU)	Chi^2
10F11	3.57	3.70	10.36	12.25	0.02
B5	3.72	1.12	3.02	20.39	0.03
C4I	4.44	3.41	7.69	14.59	0.07
D8G	2.06	3.81	18.46	10.46	0.02
F6V	1.10	0.88	8.03	11.64	0.01

【0232】

実施例 5：抗-B7-H3 抗体の抗体依存的細胞毒性の測定

前記抗-B7-H3 抗体の抗体依存性細胞媒介細胞毒性能力は ADCC Reporter Bioassay (Promega、G7018) キットを用いて確認した。前記実験方法を前記製造業者のプロトコルに従って行った。

【0233】

抗体依存性細胞毒性能力分析のために、B7-H3 の発現程度が相対的に高い細胞株として MCF-7 乳癌細胞株、Calu-6 肺癌細胞株および DLD-1 大腸癌細胞株を、B7-H3 の発現程度が相対的に低い細胞株としては Mino mantle 細胞リンパ腫細胞株を使用した。B7-H3 発現のない陰性対照群としては Jurkat 成人 T 細胞

白血病細胞株を使用した。具体的には、付着培養細胞株のMCF-7、Calu-6およびDLD-1細胞株は実験前日に解離させた後、4、1200rpmの条件で5分間遠心分離した後、細胞を10%ウシ胎児血清(fetal bovine serum、FBS)が含まれているRPMI1640培地に懸濁させ、ウェルあたり 5×10^3 または 1×10^4 個の細胞を接種して培養した。実験当日に培地を除去し、PBSで洗浄した後、4%のLow IgG Serum(Promega、AX20A)が添加されたRPMI1640培地を25 μ l添加して製造した。懸濁培養細胞株のMinoおよびJurkat細胞株は4、1200rpmの条件で5分間遠心分離した後、RPMI1640(4% Low IgG Serum)培地に懸濁して、96ウェルプレートにウェルあたり 5×10^3 または 1×10^4 /25 μ lの細胞を接種した。

10

【0234】

実施例2で製造した本明細書の前記抗-B7-H3抗体および比較抗体(84D)をそれぞれ10 μ g/mlまたは15 μ g/mlまたは18 μ g/mlの濃度から一定の比率でRPMI1640(4% Low IgG Serum)培地に希釈して製造した後、ウェルあたり25 μ lずつ添加した。次いで、ADCC reporter Bioassayに含まれているJurkat/NFAT-Fc γ RIIIa細胞を37の水浴に入れて溶かした後、RPMI1640 medium(4% Low IgG Serum)を3.6mL添加して混合させた。各ウェルあたりJurkat/NFAT-Fc γ RIIIa細胞を25 μ lずつ添加した後、37で6時間反応させた。次いで、Bio-Glo luciferase assay(Promega、G7941)に入っている基質を溶解し、ウェルあたり75 μ lを添加して5分~10分間反応させた後、蛍光を測定した。

20

【0235】

前記抗-B7-H3抗体の抗体依存性細胞媒介細胞毒性効果を図8に記載した。B7-H3を発現しない陰性対照群のJurkat細胞株では、抗体依存性細胞媒介細胞毒性が観察されなかったが、B7-H3を発現するMCF-7、Calu-6、DLD-1およびMino細胞株で抗-B7-H3抗体特異的に抗体依存性細胞媒介細胞毒性効果が現れることを確認した。これは、抗体がB7-H3を発現する癌細胞に特異的に結合して抗体依存性細胞媒介細胞毒性を誘導するため、癌細胞の死滅に効果的に使用できることを示す。特に、本明細書の抗-B7-H3抗体は、比較抗体の84Dと比較した時、半数影響濃度(EC50)が低く、抗体依存性細胞媒介細胞毒性信号の強度は強く、より効果的に癌治療に使用できることを示す。

30

【0236】

実施例6：抗-B7-H3抗体のT細胞の活性誘導能力の測定

実施例6-1．ヒト末梢血液単核球細胞(PBMC)におけるB7-H3タンパク質によるT細胞の活性抑制効果の測定

B7-H3は免疫チェックポイントリガンドに属するタンパク質で、T細胞表面のB7-H3受容体と結合して、T細胞の免疫反応を抑制することが知られている。したがって、予め活性化されたT細胞によるサイトカイン(インターフェロンガンマ)の放出がB7-H3タンパク質によって抑制されるかを確認するために、PBMCにB7-H3タンパク質処理後、ヒトT細胞のサイトカイン分泌量を測定した。

40

【0237】

具体的には、ヒトT細胞を活性化するために、抗-CD3抗体(UCHT1、Biolegend)を5 μ g/mlとなるようにPBSに希釈して用意し、B7-H3タンパク質(Sino Biological、11188-H08H)または陰性対照群のIgG1(BioXCell、BP0297、IgG1またはCont. Abで標識)を5 μ g/mlに希釈した抗CD3抗体に添加して、40 μ g/mlで4倍連続希釈して製造した。前記抗CD3抗体およびB7-H3タンパク質または希釈して用意した抗CD3抗体と陰性対照群を96ウェルの細胞培養プレート(Corning)に50 μ l/wellで分注し、4で一晩または37で2時間反応させた後、PBSで1回洗浄した。購入

50

して製造したヒト末梢血液単核細胞 (CTL) を 10% FBS (fetal bovine serum) が含まれている RPMI 1640 培養液に懸濁し、抗 CD3 抗体と B7-H3 タンパク質または抗 CD3 抗体と陰性対照群を処理してコーティングしたプレートに 1×10^6 cells/well で分注して培養した。培養 3 日後、培養上澄液を用いて、分析製造会社の指針に従い、ELISA 分析器 (R&D system) でヒト T 細胞のインターフェロンガンマ放出量の分析実験を進行させた。前記結果は図 9A に記載した。ヒト T 細胞のインターフェロンガンマ分泌量を測定した結果、T 細胞の活性が B7-H3 タンパク質によって抑制されてインターフェロンガンマの生成が減少することを確認した。

【0238】

10

実施例 6-2. ヒト末梢血液単核球細胞 (PBMC) における抗-B7-H3 抗体による T 細胞の活性化誘導能力の測定

次いで、ヒト末梢血液単核球細胞 (PBMC) を用いて、B7-H3 タンパク質によって抑制された T 細胞の活性を、本明細書による抗-B7-H3 抗体が再び活性化させられるかを調べるために実験を行った。B7-H3 タンパク質と T 細胞表面の B7-H3 受容体との間の結合を遮断できる抗-B7-H3 抗体は、B7-H3 によって抑制された T 細胞の免疫反応を再活性化させることができる。これは、前記のように活性化された T 細胞が免疫抗癌治療効果を奏し得ることを意味する。

【0239】

20

本明細書で製造された抗-B7-H3 抗体が活性化された T 細胞によるサイトカイン (インターフェロンガンマ) の放出に対する B7-H3 の抑制を遮断できるかを確認するための実験を行った。

【0240】

前記 B7-H3 タンパク質がコーティングされたプレートに PBMC を入れた後、本明細書の抗-B7-H3 抗体を処理した。ヒト T 細胞のサイトカインの放出量を測定した。

【0241】

ヒト T 細胞を活性化するために、抗 CD3 抗体 (UCHT1、Biolegend) を $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となるように PBS に希釈して用意し、前記 B7-H3 タンパク質による T 細胞の活性化を抑制させるために、前記製造した抗 CD3 抗体に $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 濃度の B7-H3 タンパク質を添加した。前記製造された B7-H3 タンパク質を 96 ウェルの細胞培養プレート (Corning) にウェルあたり $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、4 で一晩または 37 で 2 時間反応させた後、PBS で 1 回洗浄した。前記抗-B7-H3 抗体と陰性対照群の IgG1 (BioXcell、BP0297、IgG1 or Cont. Ab で標識される) を RPMI-1640 培養液 (Invitrogen) に 10% FBS (fetal bovine serum) とともに添加し、 $16 \mu\text{g}/\text{ml}$ から 4 倍連続希釈を進行させて製造した。

30

【0242】

購入して用意したヒト末梢血液単核細胞 (PBMC、CTL) を 10% FBS (ウシ胎児血清、fetal bovine serum) が含まれている RPMI 1640 培養液に懸濁し、抗 CD3 抗体および B7-H3 タンパク質がコーティングされたプレートに 1×10^6 cells/well の量で添加した。

40

【0243】

PBMC が置かれたプレートに抗-B7-H3 抗体および連続 4 倍希釈で製造された陰性対照群 IgG1 を添加した ($50 \mu\text{l}/\text{well}$)。次いで、10% FBS が含まれている RPMI 1640 培養液をウェルあたり $100 \mu\text{l}$ ずつ分注して、前記抗体が細胞に処理される最高濃度の最終濃度が $4 \mu\text{g}/\text{ml}$ (27nM) となるように実験した。抗-B7-H3 抗体を単一濃度で処理した実験の場合、抗体の最終濃度が $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ であった。培養 3 日後、前記培養上澄液を用いて、分析器製造会社の指針に従って、ELISA 分析器 (R&D system) でヒト T 細胞のインターフェロンガンマ分泌量の分析実験を進行させた。

50

【0244】

前記結果は図9Bに記載した。ヒトT細胞のインターフェロンガンマ放出量を測定した結果、本明細書で製造された抗-B7-H3抗体がB7-H3タンパク質によって抑制されたT細胞を再活性化してインターフェロンガンマの生成が促進されることを確認した。前記分析結果は、本明細書の抗-B7-H3抗体が免疫チェックポイント抑制剤として開発できることを示唆する。

【0245】

実施例6-3：ヒト末梢血液単核球細胞(PBMC)における抗-B7-H3抗体と免疫抗癌治療剤の併用処理効果の分析

前記抗-B7-H3抗体と免疫抗癌治療剤を併用して、T細胞によるサイトカイン(インターフェロンガンマ)の放出が増加するか否かを調べた。抗PD-1抗体は、WO2008-156712に開示された配列に基づいてMerck社のPembrolizumabを遺伝的に合成および生産して使用した。

10

【0246】

具体的には、抗CD3抗体(UCHT1、Biolegend)をPBSで5 μ g/mlに希釈し、製造された抗CD3抗体にB7-H3タンパク質を添加した。前記製造されたB7-H3タンパク質を抗CD3抗体に添加して、96ウェルの細胞培養プレート(Corning)にウェルあたり50 μ lずつ入れて、4で一晚または37で2時間反応させた後、PBSで1回洗浄した。

20

【0247】

本明細書の抗-B7-H3抗体と陰性対照群のIgG1(BioXcell、BP0297、IgG1またはCont.Abで標識)、そして前記製造された抗PD-1抗体を10%FBS(fetal bovine serum、Invitrogen)があるRPMI-1640培養液(Invitrogen)を追加して、連続4倍希釈して製造した。

【0248】

購入して用意したヒト末梢血液単核球細胞(CTL)を10%FBS(fetal bovine serum、ウシ胎児血清)が含まれているRPMI1640培養液に懸濁し、抗CD3抗体とB7-H3タンパク質がコーティングされたプレートにウェルあたり1 $\times$ 10⁶個の細胞を入れた。

30

【0249】

PBMCが置かれたプレートに、前記抗-B7-H3抗体と連続4倍希釈で製造された陰性対照群IgG1を添加した(50 μ l/well)。次いで、10%のFBSが含まれているRPMI1640培養溶液をウェルあたり100 μ lずつ添加した。

【0250】

前記抗-B7-H3抗体を単一濃度で処理した場合、抗体の最終濃度は10 μ g/mlであった。前記抗-B7-H3抗体を多様な濃度で処理した場合、最高濃度の20nMから始めて、最終濃度として連続4倍希釈した濃度で処理した。培養3日後、培養上澄液を用いて、分析器製造会社の指示に従って、ELISA分析器(R&D system)でヒトT細胞のインターフェロンガンマの放出量分析を進行させた。

40

【0251】

前記結果は図10に記載した。ヒトT細胞のインターフェロンガンマの放出量を測定した結果、抗-B7-H3抗体を抗PD-1抗体と共同処理した時、各抗体を単一処理した時よりT細胞を強く活性化させて、インターフェロンガンマの生成がさらに促進されることを確認した。

【0252】

実施例7：マウス同種性腫瘍移植モデルにおける抗-B7-H3抗体と抗PD-1抗体の併用投与による抗癌効果の分析

動物モデルにおける抗体の免疫チェックポイント抑制効果を確認するために、抗体がヒトとマウスとの間に特異的交差反応性を有する場合、マウス同種性腫瘍移植モデルを使用

50

することができる。

【0253】

実施例3-3および3-6から確認したように、本明細書の抗-B7-H3抗体は、マウスB7-H3抗原に対する特異的種間交差反応性がある。本明細書の抗-B7-H3抗体の腫瘍増殖抑制効果を確認するために、マウス同種性腫瘍モデルに抗マウスPD-1抗体のRMP1-14(BioXcell、BE0146)とともに併用投与して、腫瘍の増殖抑制効果を下記のように確認した。

【0254】

CT26は、マウス(BALB/c)およびマウスB7-H3を過発現する細胞株由来の結腸癌である。実施例2で製造された抗-B7-H3抗体が、実施例3-6でCT26マウス癌細胞株の表面に発現したマウスB7-H3に結合することを確認した(図7)。

10

【0255】

実験方法を具体的に説明すれば、CT26(BALB/c origin)細胞株を解離させ、PBSバッファで洗浄した後、細胞数を数えてウェルあたり 5×10^5 cellsに調整した。製造された細胞はマウス(BALB/c、6週齢、Samtako)に皮下注射で投与し、腫瘍の大きさが $50 \sim 100 \text{ mm}^3$ の時、それぞれ相当する抗体を $200 \mu\text{g}$ ずつ計 1 mg を3日間隔で5回にわたって処理した。対照群と抗PD-1(RMP1-14)抗体単一治療群、抗PD-1抗体および抗B7-H3併用治療群の腫瘍の大きさを、カリパスを用いて、腫瘍の最も長い直径(D1)とそれに垂直な直径(D2)を測定して($0.5 * D1 * D2^2$)のように計算して体積を求めた(図11)。

20

【0256】

腫瘍観察中、腫瘍の大きさが 2000 mm^3 より大きい潰瘍ができた場合、当該マウスの場合、安楽死させた。すべての抗体処理が終わった後、計30日間観察して生存率および腫瘍の大きさを測定した。

【0257】

前記結果を図11に示した。その結果、抗PD-1(RMP1-14)抗体を単独で処理した群と比較して、抗PD-1と抗-B7-H3抗体を併用投与した群より腫瘍増殖抑制効果および生存率の向上を確認した。前記結果は、本明細書の抗-B7-H3抗体が免疫チェックポイント抑制効果を示し、抗PD-1抗体が他の免疫抑制剤とは異なる機序により免疫細胞を活性化させると、抗癌治療効果が強化されたことを意味する。実施例3-3から確認できるように、本明細書の抗-B7-H3抗体のマウスB7-H3に対する結合能力はヒトB7-H3に比べて相対的に低い。低いマウスB7-H3に対する結合力にもかかわらず、本明細書の抗-B7-H3抗体は、同種腫瘍移植モデルにおける抗PD-1抗体と併用投与において、抗PD-1抗体の単独投与対比、目立った癌成長抑制効果および生存率の向上を示した。本明細書の抗-B7-H3抗体はヒトB7-H3により強く結合して、マウス同種性腫瘍移植モデルよりも強いヒト免疫チェックポイント抑制効果を期待できる。

30

【0258】

実施例8：マウス同種性腫瘍移植モデルにおける抗-B7-H3抗体と抗PD-1抗体の併用投与による腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の変化分析

40

腫瘍浸潤リンパ球(TIL)は、血流を離れた腫瘍に移動する白血球をいう。腫瘍浸潤リンパ球はT細胞とB細胞を含むことができ、単核および多形成核免疫細胞を含み、腫瘍の類型および段階により多様で、疾病の予後と関連がある。特に、免疫抗癌抗体の作用メカニズムは、腫瘍浸潤リンパ球の分析により確認可能である。

【0259】

抗-B7-H3抗体(F6V)と抗PD-1抗体(RMP-14-1)の併用投与(combinationと記載)による抗癌効果メカニズムを分析するために、腫瘍浸潤リンパ球を分析した。実験は実施例8と同様の方法で行った。各抗体の3回投与が完了した後、マウスから腫瘍を分離して腫瘍浸潤リンパ球を得た。

【0260】

50

収穫した腫瘍浸潤細胞を PMA 50 ng / ml および ロノマイシン 1 μ M で再刺激し、免疫細胞の変化を分析した (図 12)。抗癌免疫反応の主な役割を果たす代表的な免疫細胞は、細胞毒性 T 細胞 (cytotoxic T cell) と調節 T 細胞 (regulatory T cell) である。実験結果、本明細書の抗 - B7 - H3 抗体と抗 PD - 1 抗体を併用投与したマウスから分離した腫瘍浸潤リンパ球において明確な細胞毒性 T 細胞の活性化と調節 T 細胞の増殖抑制を観察した。

【0261】

本明細書の抗 - B7 - H3 抗体と抗 PD - 1 抗体を併用投与したマウスから分離した腫瘍浸潤リンパ球では、CD8 + T 細胞中、IFN γ + Granzyme B + の水準が顕著に増加し、CD8 + T 細胞の間で Granzyme B の放出増加を観察した。

10

【0262】

本明細書の抗 - B7 - H3 抗体と抗 PD - 1 抗体を併用投与したマウスから分離した腫瘍浸潤リンパ球において調節 T 細胞の頻度と細胞数、抗 Foxp3 抗体 (eBioscience、FJK - 16s) および抗 Ki67 (BD、B56) 抗体を用いて調節 T 細胞の増殖能力を確認した。

【0263】

前記結果は図 12 に記載した。実験結果、抗 - B7 - H3 抗体と抗 PD - 1 を併用投与した群における調節 T 細胞の数が減少するだけでなく、調節 T 細胞の増殖能力を示す Ki67 + も減少することを確認した。このような結果は、抗 - B7 - H3 抗体と抗 PD - 1 抗体の併用投与が細胞毒性 T 細胞の活性増加と調節 T 細胞の抑制を同時に誘導して、免疫

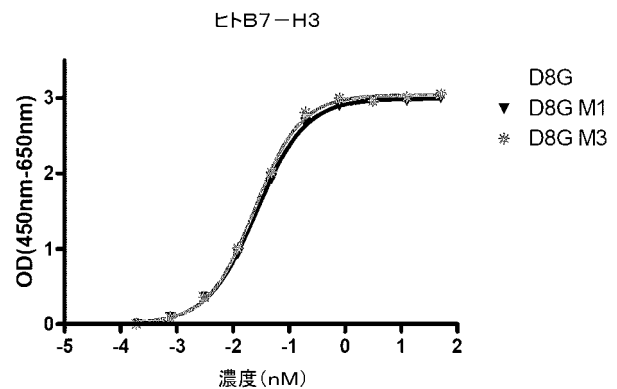
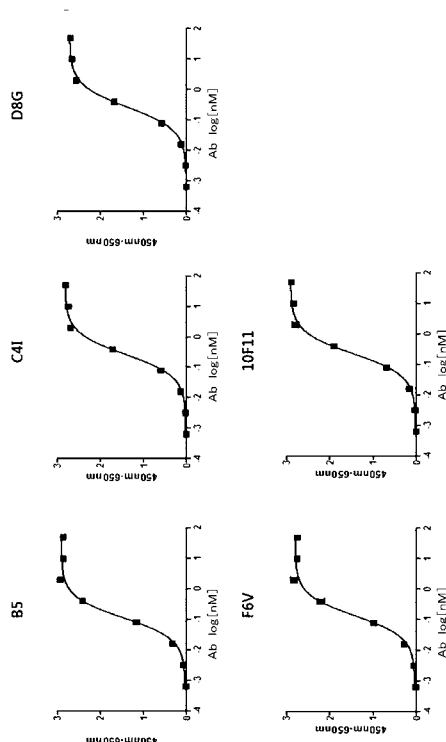
20

【0264】

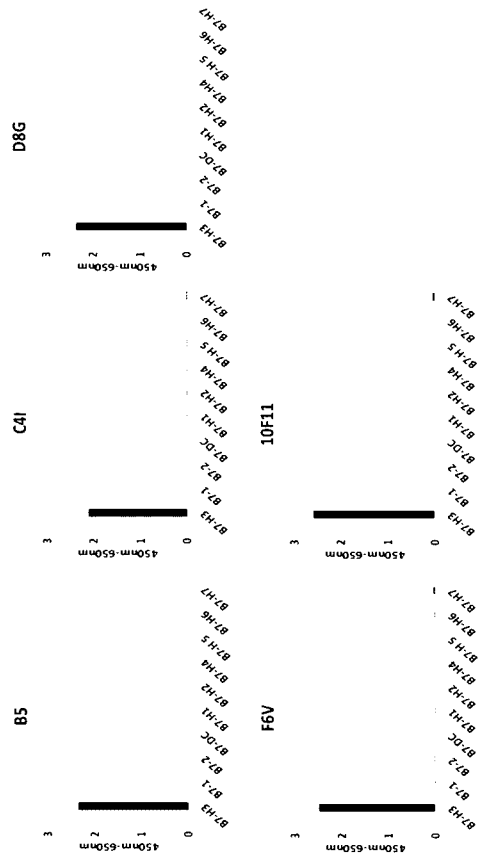
上述した説明は例示のためのものであり、当該技術分野における通常の技術者であれば、技術的な思想や必須の特徴を変更することなく他の具体的な形態に容易に変形可能であることを理解するであろう。

【図 1 A】

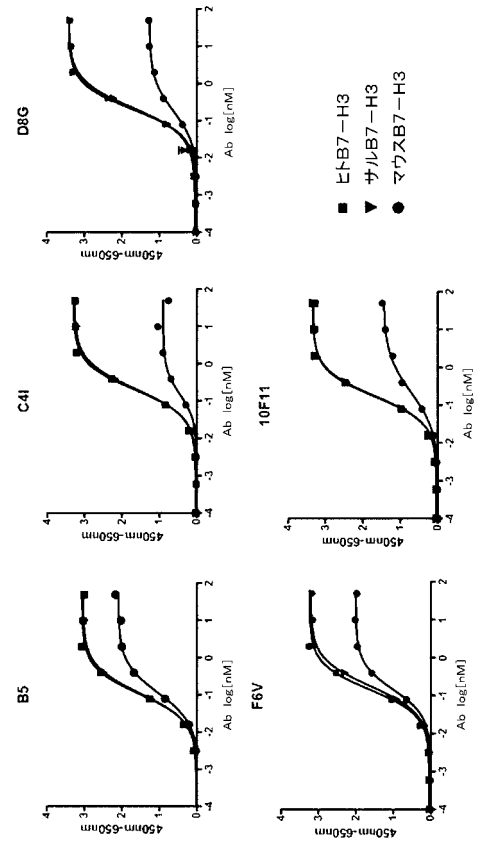
【図 1 B】



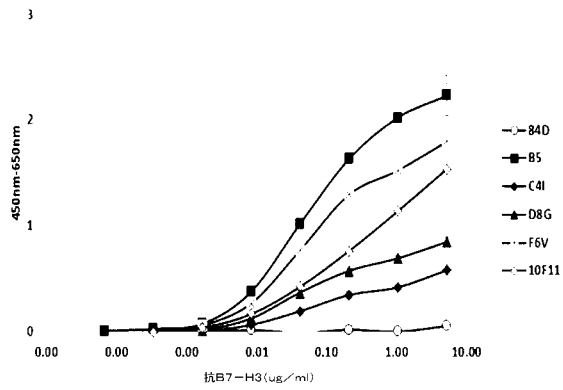
【図 2】



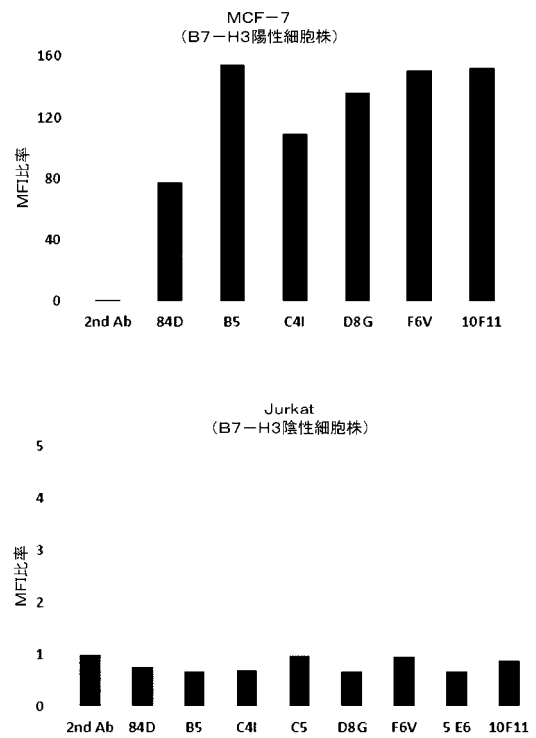
【図 3】



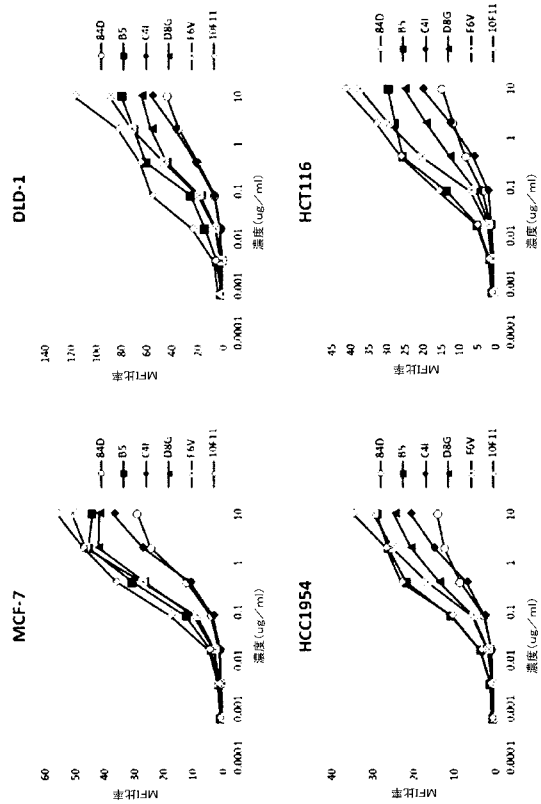
【図 4】



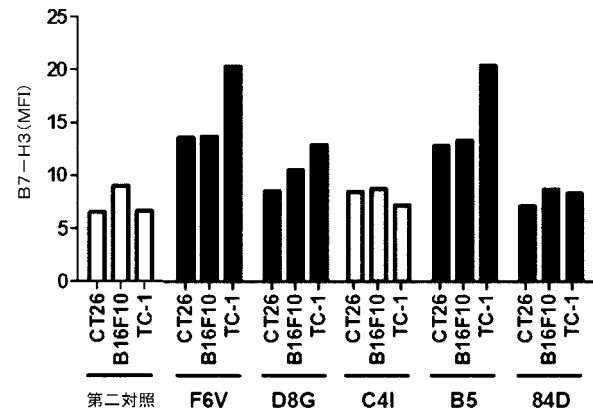
【図 5】



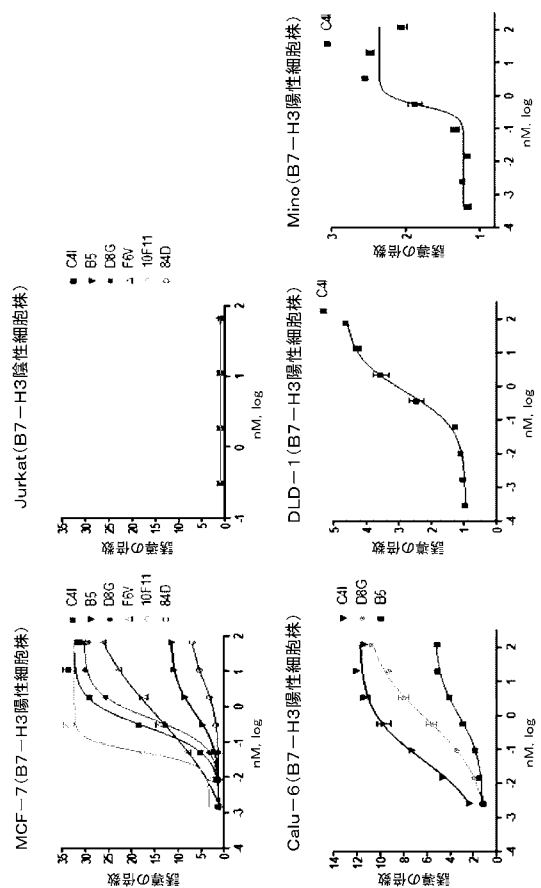
【図 6】



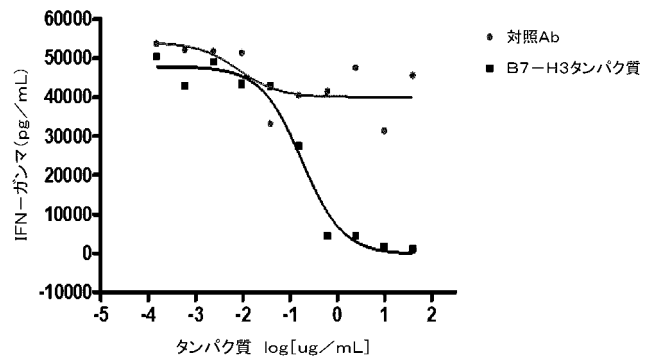
【図 7】



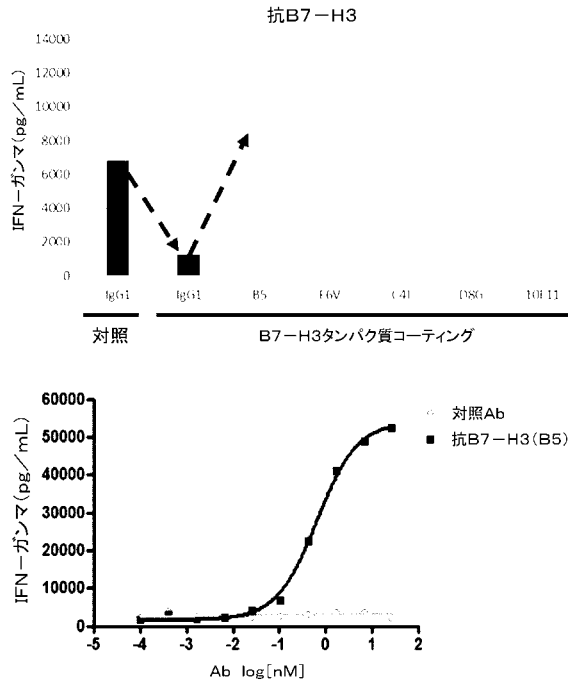
【図 8】



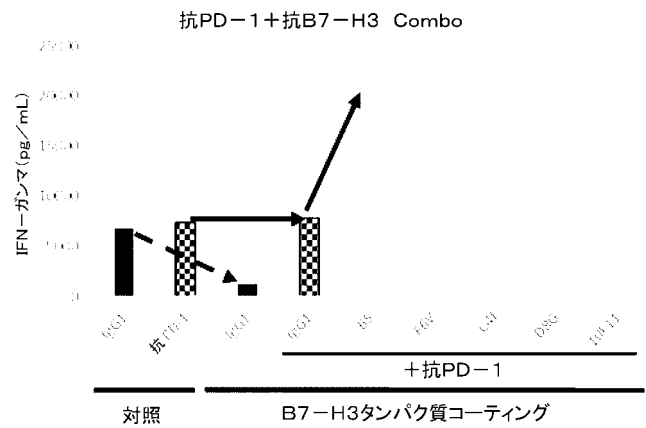
【図 9 A】



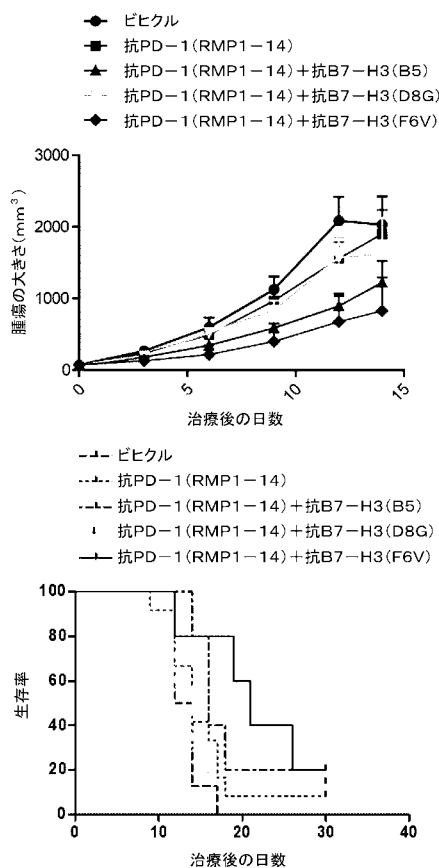
【図 9 B】



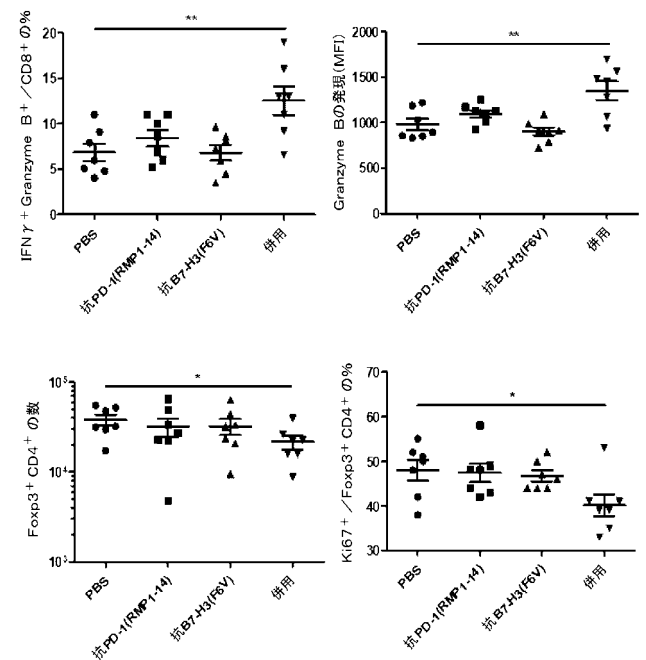
【図 10】



【図 11】



【図 12】



【配列表】

2021524746000001.app

【手続補正書】

【提出日】令和3年2月2日(2021.2.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

B7-H3を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片であって、

前記抗体または抗原結合断片は、(i)CDRH1、CDRH2およびCDRH3の重鎖相補性決定領域、および(ii)CDRL1、CDRL2およびCDRL3の軽鎖相補性決定領域を含み、

前記CDRH1は配列番号1～4から選択されるいずれか1つであり；

前記CDRH2は配列番号5～9および68から選択されるいずれか1つであり；

前記CDRH3は配列番号10～14から選択されるいずれか1つであり；

前記CDRL1は配列番号15～19から選択されるいずれか1つであり；

前記CDRL2は配列番号20～24および69から選択されるいずれか1つであり；

および

前記CDRL3は配列番号25～29から選択されるいずれか1つである、

抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】

前記CDRH1、CDRH2およびCDRH3が以下のうちのいずれか1つの組み合わせである、請求項1に記載のB7-H3を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片：

(a)前記CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号1、5および10；

(b)前記CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号2、6および11；

(c)前記CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号3、7および12；

(d)前記CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号1、8および13；

(e)前記CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号4、9および14；または

(f)前記CDRH1、CDRH2およびCDRH3がそれぞれ配列番号3、68および12。

【請求項3】

前記CDRL1、CDRL2およびCDRL3が以下のうちのいずれか1つの組み合わせである、請求項1または2に記載のB7-H3を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片：

(a)前記CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号15、20および25；

(b)前記CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号16、21および26；

(c)前記CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号17、22および27；

(d)前記CDRL1、CDRL2およびCDRL3がそれぞれ配列番号18、23お

よび 28 ;

(e) 前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 19、24 および 29 ; または

(f) 前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 がそれぞれ配列番号 17、69 および 27。

【請求項 4】

前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 ; および前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 は、以下のうちのいずれか 1 つの組み合わせである、請求項 1 に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片 :

(a) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 1、5 および 10、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 15、20 および 25 ;

(b) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 2、6 および 11、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 16、21 および 26 ;

(c) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 3、7 および 12、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 17、22 および 27 ;

(d) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 1、8 および 13、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 18、23 および 28 ;

(e) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 4、9 および 14、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 19、24 および 29

(f) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 3、68 および 12、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 17、22、および 27 ; または

(g) 前記 C D R H 1、C D R H 2 および C D R H 3 はそれぞれ配列番号 3、68 および 12、かつ、前記 C D R L 1、C D R L 2 および C D R L 3 はそれぞれ配列番号 17、69 および 27。

【請求項 5】

請求項 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片であって、

(1) 配列番号 30 ~ 34 および 70 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む重鎖可変領域 ; および

(2) 配列番号 35 ~ 39 および 71 からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域

を含む、抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 6】

下記の配列で表される、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の組み合わせのいずれかを含む、請求項 5 に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片 :

配列番号 30 および 35 ; 配列番号 31 および 36 ; 配列番号 32 および 37 ; 配列番号 33 および 38 ; 配列番号 34 および 39 ; 配列番号 70 および 37 ; または配列番号 70 および 71。

【請求項 7】

前記抗体または抗原結合断片がモノクローナル抗体である、請求項 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8】

前記モノクローナル抗体が I g G 1、I g G 2、I g G 3 または I g G 4 タイプである、請求項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する抗体またはその抗

原結合断片。

【請求項 9】

前記 B 7 - H 3 は、ヒト、マウスまたはサルの B 7 - H 3 である、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 10】

前記抗体または抗原結合断片が F a b、F a b'、F (a b')₂、s c F a b、F v、d s F v、s c F V、s c F V - F c、ミニボディ、ダイアボディ、s c A b、d A b、2 価抗体または多価抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の B 7 - H 3 を特異的に認識する抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 11】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片をコードするポリヌクレオチド。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片および薬学的に許容される賦形剤を含む、B 7 - H 3 の過剰発現に関連する疾患の治療または予防のための、薬学的組成物。

【請求項 13】

前記 B 7 - H 3 の過剰発現に関連する疾患は、癌である、請求項 12 に記載の薬学的組成物。

【請求項 14】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む、生物学的サンプルにおける B 7 - H 3 の検出のための組成物。

【請求項 15】

B 7 - H 3 の過剰発現に関連する疾患を診断するための組成物であって、請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含み、B 7 - H 3 の過剰発現に関連する疾患は癌である、組成物。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 10 のいずれか 1 項に記載の抗体またはその抗原結合断片を含む、B 7 - H 3 免疫チェックポイントによって抑制された T 細胞の活性を再活性化させる、組成物。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/KR2019/006270
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/28(2006.01)i, A61K 47/68(2017.01)i, A61P 35/00(2006.01)i, G01N 33/574(2006.01)i, A61K 39/00(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 16/28; A61K 38/00; A61K 39/395; C07K 16/00; C07K 16/18; C07K 16/30; C12P 21/08; A61K 47/68; A61P 35/00; G01N 33/574; A61K 39/00		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Korean utility models and applications for utility models Japanese utility models and applications for utility models		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) eKOMPASS(KIPO internal) & Keywords: CD276, B7-H3, antibody, extracellular domain, cancer, cross-activity		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 9150656 B2 (JOHNSON, L. S. et al.) 06 October 2015 See abstract; claims 1-5, 19-21; column 1, lines 27-35, column 7, lines 45-53, column 8, lines 5-20, column 9, lines 6-12, column 88, lines 5-8.	1-14, 16-18, 21
X	US 9371395 B2 (TAKAHASHI, S. et al.) 21 June 2016 See abstract; claims 1-52.	1-14, 16-18, 21
A	YAN, R. et al., "A novel monoclonal antibody against mouse B7-H3 developed in rats", Hybridoma, 2012, Vol. 31, No. 4, pages 267-271 See the whole document.	1-14, 16-18, 21
A	CN 101104639 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 16 January 2008 See the whole document.	1-14, 16-18, 21
A	LEE, Y.-H. et al., "Inhibition of the B7-H3 immune checkpoint limits tumor growth by enhancing cytotoxic lymphocyte function", Cell Research, 2017, Vol. 27, pages 1034-1045 See the whole document.	1-14, 16-18, 21
☐ 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 "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 26 August 2019 (26.08.2019)		Date of mailing of the international search report 26 August 2019 (26.08.2019)
Name and mailing address of the ISA/KR International Application Division Korean Intellectual Property Office 189 Cheongsu-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578		Authorized officer KAM, Yoo Lim Telephone No. +82-42-481-3516

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/006270

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.: 19-20
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 19-20 are directed to diagnostic methods and a method comprising a step of administering the antibody to human and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under PCT Article 17(2)(a)(i) and PCT Rule 39, 1(iv), to search.
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.: 15
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:

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 an additional fees, this Authority did not invite payment of any 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.:

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

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/006270

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 9150656 B2	06/10/2015	AR 080462 A1	11/04/2012
		AU 2011-223782 A1	20/09/2012
		AU 2011-223782 B2	18/09/2014
		BR 122016002916 A2	28/05/2019
		CA 2791658 A1	09/09/2011
		CL 2012002433 A1	22/03/2013
		CL 2016000284 A1	02/09/2016
		CL 2018002380 A1	07/12/2018
		CL 2018002383 A1	07/12/2018
		CN 102892426 A	23/01/2013
		CN 102892426 B	31/08/2016
		CN 106279416 A	04/01/2017
		CO 6630123 A2	01/03/2013
		CR 20120450 A	27/12/2012
		EA 030226 B1	31/07/2018
		EA 201270734 A1	30/04/2013
		EC SP12012139 A	28/12/2012
		EP 2542256 A2	09/01/2013
		EP 2542256 A4	12/02/2014
		EP 2542256 B1	22/05/2019
		EP 2982380 A1	10/02/2016
		GE P20166442 B	10/03/2016
		GE P201706660 B	25/04/2017
		GT 201200255 A	17/12/2013
		HK 1221154 A1	26/05/2017
		HN 2012001846 A	04/05/2015
		IL 221767 A	29/11/2012
		JP 2013-520994 A	10/06/2013
		JP 2017-035086 A	16/02/2017
		JP 5998060 B2	28/09/2016
		JP 6294414 B2	14/03/2018
		KR 10-1828570 B1	13/02/2018
		KR 10-2013-0010117 A	25/01/2013
		MA 34062 B1	05/03/2013
		MX 2012010201 A	03/04/2013
		MX 345232 B	20/01/2017
		MY 156358 A	15/02/2016
		NZ 602161 A	24/12/2014
		NZ 701539 A	24/04/2015
		NZ 705128 A	24/04/2015
		PE 04792013 A1	12/05/2013
		PE 07792017 A1	04/07/2017
		PH 12018501083 A1	18/02/2019
		SG 10201604336 A	28/07/2016
		SG 183847 A1	30/10/2012
		TN 2012000437 A1	30/01/2014
		TW 201130514 A	16/09/2011
		TW 201410255 A	16/03/2014
		TW 201439120 A	16/10/2014

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/006270

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		TW 201617096 A	16/05/2016
		TW 201707724 A	01/03/2017
		TW 201708258 A	01/03/2017
		TW I551296 B	01/10/2016
		TW I551611 B	01/10/2016
		TW I639441 B	01/11/2018
		TW I645857 B	01/01/2019
		TW I645858 B	01/01/2019
		TW I646110 B	01/01/2019
		UA 110789 C2	25/02/2016
		US 2012-0294796 A1	22/11/2012
		US 2013-0149236 A1	13/06/2013
		US 2014-0328750 A1	06/11/2014
		US 2015-0259434 A1	17/09/2015
		US 2015-0274838 A1	01/10/2015
		US 2016-0264672 A1	15/09/2016
		US 2017-0362333 A1	21/12/2017
		US 2018-0134790 A1	17/05/2018
		US 8802091 B2	12/08/2014
		US 9441049 B2	13/09/2016
		US 9714295 B2	25/07/2017
		US 9714296 B2	25/07/2017
		US 9896508 B2	20/02/2018
		WO 2011-109400 A2	09/09/2011
		WO 2011-109400 A3	24/11/2011
		ZA 201206556 B	29/05/2013
US 9371395 B2	21/06/2016	AU 2012-248470 A1	21/11/2013
		AU 2012-248470 B2	27/10/2016
		CA 2834136 A1	01/11/2012
		CA 2834136 C	17/04/2018
		CN 103687945 A	26/03/2014
		CN 103687945 B	12/10/2016
		CO 6811812 A2	16/12/2013
		CY 1120255 T1	10/07/2019
		DK 2703486 T3	28/05/2018
		EP 2703486 A1	05/03/2014
		EP 2703486 A4	25/02/2015
		EP 2703486 B1	07/03/2018
		ES 2667568 T3	11/05/2018
		HR P20180640 T1	01/06/2018
		HU E038685 T2	28/11/2018
		IL 229061 A	31/12/2013
		JP 2016-165294 A	15/09/2016
		JP 5917498 B2	18/05/2016
		JP 6224759 B2	01/11/2017
		KR 10-2014-0033018 A	17/03/2014
		LT 2703486 T	25/05/2018
		MX 2013012285 A	21/11/2013
		MX 344773 B	06/01/2017

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2019/006270

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
		NZ 616809 A	28/08/2015
		PL 2703486 T3	31/07/2018
		PT 2703486 T	18/05/2018
		RS 57279 B1	31/08/2018
		RU 2013152164 A	27/05/2015
		RU 2668170 C2	26/09/2018
		SG 194620 A1	30/12/2013
		SI 2703486 T1	31/05/2018
		TR 201808018 T4	21/06/2018
		TW 201249869 A	16/12/2012
		TW I561531 B	11/12/2016
		US 2013-0078234 A1	28/03/2013
		US 2016-0368990 A1	22/12/2016
		WO 2012-147713 A1	01/11/2012
		ZA 201307983 B	27/01/2016
CN 101104639 A	16/01/2008	None	

フロントページの続き

(51) Int. Cl.	F I	テーマコード (参考)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
G 0 1 N 33/531 (2006.01)	G 0 1 N 33/531	A
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A

(81) 指定国・地域 AP(BW, 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, MC, 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, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT

(特許庁注: 以下のものは登録商標)

1. T W E E N

- (72) 発明者 リー, ヤンスン
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 チョン, ヘジン
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 ユン, ウイユン
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 ソン, ヨンギュ
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 ハ, サンユン
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 キム, ミヨン ジュン
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 パク, ウンヤン
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 パク, キョンジン
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 スン, ウンシル
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 キム, ヨンジュ
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2
ボンギル, 1 6, 2 階
- (72) 発明者 アン, チヒョン
大韓民国 1 3 4 8 8 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 7 1 2

ボンギル, 16, 2階
(72)発明者 スン, ビョンジェ
大韓民国 13488 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 712
ボンギル, 16, 2階
(72)発明者 ソン, テヘ
大韓民国 13488 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 712
ボンギル, 16, 2階
(72)発明者 パク, ヨントン
大韓民国 13488 キョンギド, ソンナムシ, プンダング, デワンパンギョロ 712
ボンギル, 16, 2階
F ターム(参考) 4C085 AA13 AA14 AA19 BB11 DD62 EE01 GG01
4H045 AA11 AA30 BA10 CA40 DA76 EA20 EA50 FA74