

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7429192号
(P7429192)

(45)発行日 令和6年2月7日(2024.2.7)

(24)登録日 令和6年1月30日(2024.1.30)

(51)国際特許分類		F I	
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13 Z N A
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10
請求項の数 20 (全220頁) 最終頁に続く			
(21)出願番号	特願2020-554272(P2020-554272)	(73)特許権者	399052796
(86)(22)出願日	平成31年4月5日(2019.4.5)		デyna ファーバー キャンサー インス
(65)公表番号	特表2021-520208(P2021-520208 A)		ティチュート, インコーポレイテッド
(43)公表日	令和3年8月19日(2021.8.19)		アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2
(86)国際出願番号	PCT/US2019/026034		2 1 5, ボストン, ブルックライン ア
(87)国際公開番号	WO2019/204057	(74)代理人	ベニュー 4 5 0
(87)国際公開日	令和1年10月24日(2019.10.24)		100078282
審査請求日	令和4年4月4日(2022.4.4)	(74)代理人	弁理士 山本 秀策
(31)優先権主張番号	62,654,068	(74)代理人	100113413
(32)優先日	平成30年4月6日(2018.4.6)		弁理士 森下 夏樹
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)	(74)代理人	100181674
			弁理士 飯田 貴敏
		(74)代理人	100181641
			弁理士 石川 大輔
		(74)代理人	230113332
		最終頁に続く	

(54)【発明の名称】 H H L A 2 受容体としてのK I R 3 D L 3、抗H H L A 2 抗体、およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

抗H H L A 2 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、

a) 配列番号 2 0 6 のV H C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 2 1 0 のV H C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 2 1 4 のV H C D R 3 アミノ酸配列を含むV H、および

b) 配列番号 2 2 4 のV L C D R 1 アミノ酸配列、配列番号 2 2 8 のV L C D R 2 アミノ酸配列、および配列番号 2 3 2 のV L C D R 3 アミノ酸配列を含むV L を含む、抗H H L A 2 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、

a) 配列番号 1 9 9 のアミノ酸配列を含むV H、および

b) 配列番号 2 1 7 のアミノ酸配列を含むV L

を含む、請求項1に記載の抗H H L A 2 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、

i) キメラ抗体、ヒト化抗体、複合抗体、またはマウス抗体である；かつ／または

i i) 検出可能に標識され、エフェクタードメインを含み、F c ドメインを含む、かつ／または

i i i) F v、F a v、F (a b')₂、F a b'、d s F v、s c F v、s c (F v)

2、およびダイアボディ断片からなる群から選択される、
請求項1または2に記載の抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項に記載の抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される賦形剤とを含む、薬学的組成物。

【請求項5】

ストリンジェントな条件下で、請求項1に記載の抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸の相補体、または請求項1に記載の抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする核酸と少なくとも95%の相同性を有する配列とハイブリダイズする、単離された核酸分子。

【請求項6】

請求項5に記載の単離された核酸を含む、ベクター。

【請求項7】

請求項5に記載の単離された核酸を含むか、請求項6に記載のベクターを含むか、あるいは請求項1～3のいずれか一項に記載の抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を発現する、宿主細胞。

【請求項8】

請求項1～3のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含むデバイスまたはキットであって、前記少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を検出するための標識、または前記抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む複合体を任意に含む、デバイスまたはキット。

【請求項9】

請求項1～3のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を産生する方法であって、

(i) 前記抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片の発現を可能にするのに好適な条件下で、前記少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする配列を含む核酸によって形質転換された形質転換宿主細胞を培養するステップと、

(ii) 前記発現された抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を回収するステップと、
を含む、方法。

【請求項10】

HHLA2ポリペプチドの存在またはレベルを検出する方法であって、請求項1～3のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、得られた試料中の前記ポリペプチドを検出することと、を含み、任意に、

前記少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、HHLA2ポリペプチドと複合体を形成し、前記複合体が、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)の形態で、放射免疫アッセイ(RIA)の形態で、免疫化学的に、ウエスタンブロットの形態で、または細胞内フローアッセイを使用して検出される、方法。

【請求項11】

対象における異常なHHLA2発現に関連する障害の進行の指標としてのHHLA2のレベルを決定する方法であって、

a) 請求項1～3のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、第1の時点で対象試料中のHHLA2レベルを検出することと、

b) その後の時点でステップa)を繰り返すことと、

c) ステップa)で検出されたHHLA2レベルとステップb)で検出されたHHLA2レベルとを比較することであって、ステップa)で検出されたHHLA2レベルとステ

10

20

30

40

50

ップb)で検出されたHHLA2レベルとの前記比較は、前記対象における前記障害の進行の指標であることと、を含み、任意に、前記第1の時点と前記その後の時点との間で、前記対象が前記障害を改善するための治療を受けている、方法。

【請求項12】

異常なHHLA2発現に関連する障害に罹患している対象の臨床転帰の指標としてのHHLA2レベルを決定する方法であって、

a) 請求項1～3のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、対象試料中のHHLA2レベルを決定することと、

b) 前記少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、良好な臨床転帰を有する対照対象由来の試料中のHHLA2レベルを決定することと、

c) 前記対象試料中のHHLA2レベルと前記対照対象由来の前記試料中のHHLA2レベルとを比較することと、を含み、

前記対照対象由来の前記試料中のレベルと比較して前記対象試料中の有意により高いHHLA2レベルが、前記対象が不良な臨床転帰を有することを示し、任意に、前記有意により高いHHLA2レベルは、前記対照対象由来の前記試料の正常なHHLA2レベルと比較した前記対象試料中のHHLA2レベルの少なくとも20パーセントの増加を含む、方法。

【請求項13】

対象における異常なHHLA2発現に関連する障害のための療法の有効性の指標としてのHHLA2レベルを決定する方法であって、

a) 請求項1～3のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、前記療法の少なくとも一部を前記対象に施す前に前記対象から得られた第1の試料中のHHLA2レベルを決定することと、

b) 前記療法の前記一部を施した後に前記対象から得られた第2の試料中のHHLA2レベルを決定することと、を含み、

前記第1の試料と比較して前記第2の試料中の有意により低いHHLA2レベルが、前記療法が前記対象における前記障害を抑制するのに有効であることを示し、任意に、前記有意により低いHHLA2レベルが、HHLA2レベルの少なくとも20パーセントの減少を含む、方法；あるいは

対象における異常なHHLA2発現に関連する障害を抑制するための試験化合物の有効性の指標としてのHHLA2レベルを決定する方法であって、

a) 請求項1～3のいずれか一項に記載の少なくとも1つの抗HHLA2モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、前記対象から得られ、かつ前記試験化合物に曝露された第1の試料中のHHLA2レベルを決定することと、

b) 前記対象から得られた第2の試料中のHHLA2レベルを決定することと、を含み、前記第2の試料が前記試験化合物に曝露されず、前記第2の試料と比較して有意により低いHHLA2レベルが、前記試験化合物が前記対象における前記障害を抑制するのに有効であることを示し、任意に、前記第1の試料および前記第2の試料が、前記対象から得られた単一試料の一部であるか、または前記対象から得られたプールされた試料の一部である、方法。

【請求項14】

(a) 前記障害ががんであり、任意に、前記がんが、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、神経膠腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、乳癌、膵管癌、胸腺腫、B-CLL、白血病、B細胞リンパ腫、およびHHLA2に対する受容体を発現する免疫細胞が浸潤したがんからなる群から選択される；

(b) 前記試料が、前記対象から得られた細胞、血清、腫瘍周辺組織、および／または腫瘍内組織を含む；ならびに／あるいは

10

20

30

40

50

(c) 前記対象がヒトである、請求項 1 1～1 3 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 5】

がん罹患している対象の治療における使用のための組成物であって、前記組成物は、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の少なくとも 1 つの抗 H H L A 2 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む、組成物。

【請求項 1 6】

(a) 前記少なくとも 1 つの抗 H H L A 2 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、細胞毒性薬剤にコンジュゲートされており、任意に、前記細胞毒性薬剤が、化学療法剤、生物学的薬剤、毒素、および放射性同位体からなる群から選択される；

(b) 前記少なくとも 1 つの抗 H H L A 2 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、前記がんにおける増殖細胞の数を減少させ、かつ／または前記がんの腫瘍の体積もしくはサイズを減少させる；

(c) 前記少なくとも 1 つの抗 H H L A 2 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、薬学的に許容される製剤で投与され得る；

(d) がんを治療するためのさらなる治療薬またはレジメンが前記対象に投与され得る；ならびに／あるいは

(e) 免疫療法、チェックポイント遮断、がんワクチン、キメラ抗原受容体、化学療法、放射線、標的療法、および手術からなる群から選択される追加の療法が前記対象に投与され得る、請求項 1 5 に記載の組成物。

【請求項 1 7】

(a) 前記対象におけるがん細胞および／または腫瘍免疫浸潤細胞が H H L A 2 を発現する；

(b) 前記がんが、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、神経膠腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、乳癌、膵管癌、胸腺腫、B－C L L、白血病、B 細胞リンパ腫、および H H L A 2 に対する受容体を発現する免疫細胞が浸潤したがんからなる群から選択される；

(c) 前記がんが、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病 (A M L)、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、および子宮癌からなる群から選択される；

(d) 前記対象が、がんの動物モデルであり；任意に、前記動物モデルがマウスモデルであり、任意に、前記マウスモデルがヒト化マウスモデルである；ならびに／あるいは

(e) 前記対象が哺乳動物であり、任意に、前記哺乳動物がヒト化マウスまたはヒトである、請求項 1 5 または 1 6 に記載の組成物。

【請求項 1 8】

H H L A 2 と K I R D L 3 との間の相互作用を阻害することによって免疫応答を調節するのに使用するための、請求項 4 に記載の薬学的組成物。

【請求項 1 9】

(a) H H L A 2 と K I R D L 3 との間の相互作用が、チェックポイント遮断がん免疫療法における使用のために遮断され、任意に、前記抗 H H L A 2 モノクローナル抗体が、がん免疫療法のための T 細胞活性化のチェックポイント阻害剤である、請求項 1 8 に記載の薬学的組成物。

【請求項 2 0】

免疫応答を調節するのに使用するための請求項 4 に記載の医薬組成物であって、前記医薬組成物を対象に投与すると、前記抗 H H L A 2 モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、H H L A 2 と K I R 3 D L 3 との間の相互作用を阻害または遮断し、H H L A 2 と T M I G D 2 との間の相互作用を部分的に遮断または阻害する、薬学的組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

政府権利の陳述

10

20

30

40

50

本発明は、米国国立衛生研究所により授与された助成金番号 P 0 1 A I 0 5 6 2 9 9 に基づく政府支援を受けて行われた。米国政府は本発明に一定の権利を有する。

【背景技術】

【0002】

CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、ブチロフィリン、およびA2aR、ならびにさらに多くのもの等の免疫チェックポイントは、多数の入力間の複雑なコンビナトリアル相互作用に基づいて免疫応答の進行を負に制御する。免疫チェックポイント阻害剤は、いくつかの対象における免疫応答を調節することができるが、免疫チェックポイント発現および天然結合パートナーとの相互作用は、対象間および対象の組織内で異なる。したがって、介入治療で使用するための新たな免疫チェックポイントを特定する必要性が当該技術分野で高まっている。HLA2は、T細胞機能を調節する新たに特定されたB7ファミリーメンバーである。HLA2は、TMIGD2の特異的リガンドとして特定されており、HLA2/TMIGD2相互作用は、AKT依存性シグナル伝達カスケードを介してヒトT細胞増殖およびサイトカイン産生を選択的に共刺激する（Zhu et al. (2013) Nat. Comm. 4:2043、Janakiram et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2359-2366）。共阻害機能を発揮する活性化T細胞上のHLA2に対する第2の特徴付けられていない受容体がいくつかの研究によって示唆された（Zhao et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:9879-9884、Xiao and Freeman et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2201-2203、Wang et al. (2014) J. Immunol. 192:126.11）。HLA2は様々なヒトがんで発現され、その共阻害機能により、がん免疫療法の候補となる。

【先行技術文献】

【非特許文献】

【0003】

【文献】Zhu et al. (2013) Nat. Comm. 4:2043

【文献】Janakiram et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2359-2366

【文献】Zhao et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:9879-9884

【文献】Xiao and Freeman et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2201-2203

【文献】Wang et al. (2014) J. Immunol. 192:126.11

【発明の概要】

【0004】

本発明は、B7遺伝子ファミリーメンバーHLA2が様々な腫瘍および抗原提示細胞で広範に発現され、T細胞の活性化リガンドおよび阻害リガンドの両方として関与しているという発見に少なくとも部分的に基づいている。ナイーブT細胞で発現されるTMIGD2は、HLA2に対する活性化受容体であり、T細胞抗原受容体（TCR）連結後に共刺激シグナルを伝達する。TMIGD2は、反復TCR刺激後に下方制御される。HLA2に対する推定阻害性受容体が活性化T細胞上で上方制御されて、T細胞活性化を調節することが可能である。本発明は、HLA2がT細胞およびNK細胞上の受容体KIR3DL3に結合し、HLA2:KIR3DL3相互作用の結果がT細胞活性化の阻害であるという発見に少なくとも部分的に基づいている。HLA2が腫瘍で高度に発現され、かつチェックポイントリガンドとしての機能を果たし得るという所見に基づいて、抗

HHLA2ヒトモノクローナル抗体(mAb)のパネルが候補免疫チェックポイント阻害剤薬剤として生成された。抗HHLA2 mAbの遮断および非遮断が、TMIGD2トランスフェクト300、19マウスプレB白血病細胞またはKIR3DL3トランスフェクト300、19マウスプレB白血病細胞に結合する可溶性ヒトHHLA2-mIgG2aを評価することによって特定された。TMIGD2およびKIR3DL3の両方に結合するHHLA2を遮断するか、またはKIR3DL3をより選択的に遮断するが、TMIGD2を遮断しない抗HHLA2 mAbが、T細胞アッセイにおけるチェックポイント阻害剤抗体であることが示された。

一態様では、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、モノクローナル抗体は、a)表2に列記される配列からなる群から選択される重鎖配列と少なくとも約95%の同一性を有する重鎖配列、および/またはb)表2に列記される配列からなる群から選択される軽鎖配列と少なくとも約95%の同一性を有する軽鎖配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が提供される。

【0005】

別の態様では、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、モノクローナル抗体は、a)表2に列記される配列からなる群から選択される重鎖CDR配列と少なくとも約95%の同一性を有する重鎖CDR配列、および/またはb)表2に列記される配列からなる群から選択される軽鎖CDR配列と少なくとも約95%の同一性を有する軽鎖CDR配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が提供される。

【0006】

なお別の態様では、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、モノクローナル抗体は、a)表2に列記される配列からなる群から選択される重鎖配列、および/またはb)表2に列記される配列からなる群から選択される軽鎖配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が提供される。

【0007】

さらに別の態様では、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、モノクローナル抗体は、a)表2に列記される配列からなる群から選択される重鎖CDR配列、および/またはb)表2に列記される配列からなる群から選択される軽鎖CDR配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が提供される。

【0008】

本明細書に記載の本発明のいずれかの態様に適用され得る多数の実施形態がさらに提供される。例えば、一実施形態では、本モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、キメラ、ヒト化、複合、マウス、またはヒトである。別の実施形態では、本モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、検出可能に標識され、エフェクタードメインを含み、Fcドメインを含み、かつ/またはFv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、およびダイアボディ断片からなる群から選択される。なお別の実施形態では、本モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、寄託受入番号_____で寄託されたハイブリドーマ_____から得ることができる。さらに別の実施形態では、本モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、a)HHLA2のTMIGD2への結合、b)HHLA2のKIR3DL3の結合、またはc)HHLA2のTMIGD2の結合およびHHLA2のKIR3DL3の結合を阻害する。T細胞活性化アッセイにおいてHHLA2のKIR3DL3への結合を遮断するHHLA2 mAbがチェックポイント遮断剤であることが示されている。別の実施形態では、本モノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、HHLA2に特異的に結合する。

【0009】

別の態様では、表2に列記される免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列からなる群から選択される免疫グロブリン重鎖および/または軽鎖が提供される。

【0010】

なお別の態様では、ストリンジェントな条件下で、表2に列記されるポリペプチド配列からなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸の相補体、または表2に列記さ

10

20

30

40

50

れるポリペプチド配列からなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸と少なくとも約95%の相同性を有する配列とハイブリダイズする単離された核酸分子が提供される。

【0011】

さらに別の態様では、本明細書に記載の単離された核酸を含むベクターが提供される。

【0012】

別の態様では、本明細書に記載の単離された核酸を含むか、本明細書に記載のベクターを含むか、本明細書に記載の抗体またはその抗原結合断片を発現するか、または寄託受入番号_____で入手可能である、宿主細胞が提供される。

【0013】

なお別の態様では、本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含むデバイスまたはキットであって、少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を検出するための標識、またはモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む複合体を任意に含む、デバイスまたはキットが提供される。

【0014】

さらに別の態様では、本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を産生する方法であって、(i) 当該モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を発現を可能にするのに好適な条件下で請求項1~9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体をコードする配列を含む核酸によって形質転換された形質転換宿主細胞を培養するステップと、(ii) 発現されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を回収するステップと、を含む、方法が提供される。

【0015】

別の態様では、HHLA2ポリペプチドの存在またはレベルを検出する方法であって、試料を得ることと、本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して試料中の当該ポリペプチドを検出することと、を含む、方法。

【0016】

上述のように、ある特定の実施形態が本明細書に記載のいずれかの方法に適用可能である。例えば、一実施形態では、少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、HHLA2ポリペプチドと複合体を形成し、この複合体は、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)の形態で、放射免疫アッセイ(RIA)の形態で、免疫化学的に、ウエスタンブロットの形態で、または細胞内フローアッセイを使用して検出される。

【0017】

別の態様では、対象における異常なHHLA2発現に関連する障害の進行を監視するための方法であって、a) 本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、第1の時点で対象試料中のHHLA2レベルを検出することと、b) その後の時点でステップa)を繰り返すことと、c) ステップa)で検出されたHHLA2レベルとステップb)で検出されたHHLA2レベルとを比較して、対象における障害の進行を監視することと、を含む、方法が提供される。

【0018】

上述のように、ある特定の実施形態が本明細書に記載のいずれかの方法に適用可能である。例えば、一実施形態では、第1の時点とその後の時点との間で、対象は、障害を改善するための治療を受けている。

【0019】

別の態様では、異常なHHLA2発現に関連する障害に罹患している対象の臨床転帰を予測するための方法であって、a) 本明細書に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、対象試料中のHHLA2レベルを決定することと、b) 少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、良好な臨床転帰を有する対照対象由来の試料中のHHLA2レベルを決定することと、c) 対象試料中のHHLA2レベルと対照対象由来の試料中のHHLA2レベルとを比較することと、を含み、対照対象由来の試料中のレベルと比較して対象試料中の有意により高いHH

10

20

30

40

50

L A 2 レベルが、対象が不良な臨床転帰を有することを示す、方法が提供される。

【0020】

なお別の態様では、対象における異常な H H L A 2 発現に関連する障害の療法の有効性を評価する方法であって、a) 本明細書に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、療法の少なくとも一部を対象に施す前に対象から得られた第 1 の試料中の H H L A 2 レベルを決定することと、b) 療法の一部を施した後に対象から得られた第 2 の試料中の H H L A 2 レベルを決定することと、を含み、第 1 の試料と比較して第 2 の試料中の有意により低い H H L A 2 レベルが、療法が対象における障害を抑制するのに有効であることを示す、方法が提供される。

【0021】

さらに別の態様では、対象における異常な H H L A 2 発現に関連する障害を抑制するための試験化合物の有効性を評価する方法であって、a) 本明細書に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、対象から得られ、かつ試験化合物に曝露された第 1 の試料中の H H L A 2 レベルを決定することと、b) 対象から得られた第 2 の試料中の H H L A 2 レベルを決定することと、を含み、第 2 の試料が試験化合物に曝露されず、第 2 の試料と比較して有意により低い H H L A 2 レベルが、試験化合物が対象における障害を抑制するのに有効であることを示す、方法が提供される。

【0022】

上述のように、ある特定の実施形態が本明細書に記載のいずれかの方法に適用可能である。例えば、一実施形態では、第 1 の試料および第 2 の試料は、対象から得られた単一試料の一部であるか、または対象から得られたプールされた試料の一部である。別の実施形態では、障害は、がんである。さらに別の実施形態では、がんは、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、神経膠腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、乳癌、膵管癌、胸腺腫、B - C L L、白血病、B 細胞リンパ腫、および H H L A 2 に対する受容体を発現する免疫細胞が浸潤したがんからなる群から選択される。別の実施形態では、試料は、対象から得られた細胞、血清、腫瘍周辺組織、および／または腫瘍内組織を含む。なお別の実施形態では、有意により高い H H L A 2 レベルは、対照対象由来の試料中の正常な H H L A 2 レベルと比較して対象試料中の H H L A 2 レベルの少なくとも 20 パーセントの増加を含む。別の実施形態では、有意により低い H H L A 2 レベルは、H H L A 2 レベルの少なくとも 20 パーセントの減少を含む。さらに別の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0023】

さらに別の態様では、がんに罹患している対象を治療する方法であって、対象に、本明細書に記載の少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、方法が提供される。

【0024】

上述のように、ある特定の実施形態が本明細書に記載のいずれかの方法に適用可能である。例えば、一実施形態では、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、細胞毒性薬剤にコンジュゲートされている。別の実施形態では、細胞毒性薬剤は、化学療法剤、生物学的薬剤、毒素、および放射性同位体からなる群から選択される。さらに別の実施形態では、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、がんにおける増殖細胞を減少させ、かつ／またはがんの腫瘍の体積またはサイズを減少させる。別の実施形態では、少なくとも 1 つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、薬学的に許容される製剤で投与される。なお別の実施形態では、対象に、がんを治療するための治療薬またはレジメンを投与することをさらに含む本明細書に記載の方法。さらに別の実施形態では、対象に、免疫療法、チェックポイント遮断、がんワクチン、キメラ抗原受容体、化学療法、放射線、標的療法、および手術からなる群から選択される追加の療法を投与することをさらに含む、本明細書に記載の方法。別の実施形態では、対象におけるがん細胞および／または腫瘍免疫浸潤細胞は、H H L A 2 を発現する。さらに別の実施形態では、がんは、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病、頭頸

10

20

30

40

50

部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、神経膠腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、乳癌、膵管癌、胸腺腫、B-CLL、白血病、B細胞リンパ腫、およびHHLA2に対する受容体を発現する免疫細胞が浸潤したがんからなる群から選択される。別の実施形態では、がんは、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病（AML）、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、および子宮癌からなる群から選択される。なお別の実施形態では、対象は、がんの動物モデルである。さらに別の実施形態では、動物モデルは、マウスモデルであり、任意に、マウスモデルは、ヒト化マウスモデルである。別の実施形態では、対象は、哺乳動物である。さらに別の実施形態では、哺乳動物は、ヒト化マウスまたはヒトである。なお別の実施形態では、哺乳動物は、ヒトである。

【0025】

別の態様では、HHLA2とその結合阻害剤受容体KIRDL3との間の相互作用を阻害することによって免疫応答を調節する方法が提供される。

【0026】

なお別の態様では、HHLA2とその結合刺激受容体TMIGD2との間の相互作用を遮断または著しく阻害することなく、HHLA2とその結合阻害剤受容体KIR3DL3との間の相互作用を選択的に阻害することによって免疫応答を調節する方法が提供される。

【0027】

上述のように、ある特定の実施形態が本明細書に記載のいずれかの方法に適用可能である。例えば、一実施形態では、HHLA2とKIRDL3との間の相互作用が、チェックポイント遮断がん免疫療法における使用のために遮断される。別の実施形態では、HHLA2とKIRDL3との間の相互作用は、抗HHLA2抗体を使用して阻害または遮断される。なお別の実施形態では、抗HHLA2抗体は、がん免疫療法のためのT細胞活性化のチェックポイント阻害剤である。

【0028】

棒ヒストグラム、曲線、または説明文に関連する他のデータを示すいずれの図についても、各指標について左から右に提示される棒、曲線、または他のデータは、説明文のボックスの上から下に、または左から右に直接かつ順に対応する。

特定の実施形態では、例えば、以下が提供される：

(項目1)

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記モノクローナル抗体は、

a) 表2に列記される配列からなる群から選択される重鎖配列と少なくとも約95%の同一性を有する重鎖配列、および／または

b) 表2に列記される配列からなる群から選択される軽鎖配列と少なくとも約95%の同一性を有する軽鎖配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

(項目2)

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記モノクローナル抗体は、

a) 表2に列記される配列からなる群から選択される重鎖CDR配列と少なくとも約95%の同一性を有する重鎖CDR配列、および／または

b) 表2に列記される配列からなる群から選択される軽鎖CDR配列と少なくとも約95%の同一性を有する軽鎖CDR配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

(項目3)

モノクローナル抗体またはその抗原結合断片であって、前記モノクローナル抗体は、

a) 表2に列記される配列からなる群から選択される重鎖配列、および／または

b) 表2に列記される配列からなる群から選択される軽鎖配列を含む、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

(項目4)

モノクローナル抗体、またはその抗原結合断片であって、前記モノクローナル抗体は、

a) 表2に列記される配列からなる群から選択される重鎖CDR配列、および／または

b) 表2に列記される配列からなる群から選択される軽鎖CDR配列を含む、モノクロー

10

20

30

40

50

ーナル抗体またはその抗原結合断片。

(項目5)

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、キメラ、ヒト化、複合、マウス、またはヒトである、項目1～4のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

(項目6)

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、検出可能に標識され、エフェクタードメインを含み、Fcドメインを含み、かつ／またはFv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、およびダイアボディ断片からなる群から選択される、項目1～5のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

(項目7)

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、寄託受入番号 で寄託されたハイブリドーマ から得ることができる、項目1～6のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

(項目8)

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、a) HHLA2のTMIGD2への結合、b) HHLA2のKIR3DL3への結合、またはc) HHLA2のTMIGD2への結合およびHHLA2のKIR3DL3への結合を阻害する、項目1～7のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

20

(項目9)

前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、HHLA2に特異的に結合する、項目1～8のいずれか一項に記載のモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

(項目10)

表2に列記される免疫グロブリン重鎖および軽鎖配列からなる群から選択される、免疫グロブリン重鎖および／または軽鎖。

(項目11)

ストリンジェントな条件下で、表2に列記されるポリペプチド配列からなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸の相補体、または表2に列記されるポリペプチド配列からなる群から選択されるポリペプチドをコードする核酸と少なくとも約95%の同一性を有する配列とハイブリダイズする、単離された核酸分子。

30

(項目12)

項目11に記載の単離された核酸を含む、ベクター。

(項目13)

項目11に記載の単離された核酸を含むか、項目12に記載のベクターを含むか、項目1～9のいずれか一項に記載の抗体またはその抗原結合断片を発現するか、または寄託受入番号 で入手可能である、宿主細胞。

(項目14)

項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含むデバイスまたはキットであって、前記少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を検出するための標識、または前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片を含む複合体を任意に含む、デバイスまたはキット。

40

(項目15)

項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を産生する方法であって、(i)前記モノクローナル抗体またはその抗原結合断片の発現を可能にするのに好適な条件下で、項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体をコードする配列を含む核酸によって形質転換された形質転換宿主細胞を培養するステップと、(ii)前記発現されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を回収するステップと、を含む、方法。

(項目16)

50

HHLA2ポリペプチドの存在またはレベルを検出する方法であって、試料を得ることと、項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して前記試料中の前記ポリペプチドを検出することと、を含む、方法。
(項目17)

前記少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、HHLA2ポリペプチドと複合体を形成し、前記複合体が、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)の形態で、放射免疫アッセイ(RIA)の形態で、免疫化学的に、ウエスタンブロットの形態で、または細胞内フローアッセイを使用して検出される、項目16に記載の方法。

(項目18)

対象における異常なHHLA2発現に関連する障害の進行を監視するための方法であって、

a) 項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、第1の時点で対象試料中のHHLA2レベルを検出することと、

b) その後の時点でステップa)を繰り返すことと、

c) ステップa)で検出されたHHLA2レベルとステップb)で検出されたHHLA2レベルとを比較して、前記対象における前記障害の進行を監視することと、を含む、方法。

(項目19)

前記第1の時点と前記その後の時点との間で、前記対象が前記障害を改善するための治療を受けている、項目18に記載の方法。

(項目20)

異常なHHLA2発現に関連する障害に罹患している対象の臨床転帰を予測するための方法であって、

a) 項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、対象試料中のHHLA2レベルを決定することと、

b) 前記少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、良好な臨床転帰を有する対照対象由来の試料中のHHLA2レベルを決定することと、

c) 前記対象試料中のHHLA2レベルと前記対照対象由来の前記試料中のHHLA2レベルとを比較することと、を含み、

前記対照対象由来の前記試料中のレベルと比較して前記対象試料中の有意により高いHHLA2レベルが、前記対象が不良な臨床転帰を有することを示す、方法。

(項目21)

対象における異常なHHLA2発現に関連する障害のための療法の有効性を評価する方法であって、

a) 項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、前記療法の少なくとも一部を前記対象に施す前に前記対象から得られた第1の試料中のHHLA2レベルを決定することと、

b) 前記療法の前記一部を施した後に前記対象から得られた第2の試料中のHHLA2レベルを決定することと、を含み、

前記第1の試料と比較して前記第2の試料中の有意により低いHHLA2レベルが、前記療法が前記対象における前記障害を抑制するのに有効であることを示す、方法。

(項目22)

対象における異常なHHLA2発現に関連する障害を抑制するための試験化合物の有効性を評価する方法であって、

a) 項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を使用して、前記対象から得られ、かつ前記試験化合物に曝露された第1の試料中のHHLA2レベルを決定することと、

b) 前記対象から得られた第2の試料中のHHLA2レベルを決定することと、を含み、前記第2の試料が前記試験化合物に曝露されず、前記第2の試料と比較して有意により低

10

20

30

40

50

いHHLA2レベルが、前記試験化合物が前記対象における前記障害を抑制するのに有効であることを示す、方法。

(項目23)

前記第1の試料および前記第2の試料が、前記対象から得られた単一試料の一部であるか、または前記対象から得られたプールされた試料の一部である、項目22に記載の方法。

(項目24)

前記障害ががんである、項目18～23のいずれか一項に記載の方法。

(項目25)

前記がんが、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、神経膠腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、乳癌、膵管癌、胸腺腫、B-CLL、白血病、B細胞リンパ腫、およびHHLA2に対する受容体を発現する免疫細胞が浸潤したがんからなる群から選択される、項目24に記載の方法。

(項目26)

前記試料が、前記対象から得られた細胞、血清、腫瘍周辺組織、および／または腫瘍内組織を含む、項目16～25のいずれか一項に記載の方法。

(項目27)

前記有意により高いHHLA2レベルが、前記対照対象由来の前記試料の正常なHHLA2レベルと比較した前記対象試料中のHHLA2レベルの少なくとも20パーセントの増加を含む、項目20に記載の方法。

(項目28)

前記有意により低いHHLA2レベルが、HHLA2レベルの少なくとも20パーセントの減少を含む、項目21～26のいずれか一項に記載の方法。

(項目29)

前記対象がヒトである、項目18～28のいずれか一項に記載の方法。

(項目30)

がん罹患している対象を治療する方法であって、前記対象に、項目1～9のいずれか一項に記載の少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、方法。

(項目31)

前記少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、細胞毒性薬剤にコンジュゲートされている、項目30に記載の方法。

(項目32)

前記細胞毒性薬剤が、化学療法剤、生物学的薬剤、毒素、および放射性同位体からなる群から選択される、項目31に記載の方法。

(項目33)

前記少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、前記がんにおける増殖細胞の数を減少させ、かつ／または前記がんの腫瘍の体積もしくはサイズを減少させる、項目30～32のいずれか一項に記載の方法。

(項目34)

前記少なくとも1つのモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、薬学的に許容される製剤で投与される、項目30～33のいずれか一項に記載の方法。

(項目35)

前記対象に、がんを治療するための治療薬またはレジメンを投与することをさらに含む、項目30～34のいずれか一項に記載の方法。

(項目36)

前記対象に、免疫療法、チェックポイント遮断、がんワクチン、キメラ抗原受容体、化学療法、放射線、標的療法、および手術からなる群から選択される追加の療法を投与することをさらに含む、項目30～35のいずれか一項に記載の方法。

(項目37)

前記対象におけるがん細胞および／または腫瘍免疫浸潤細胞がHHLA2を発現する、

10

20

30

40

50

項目 3 0 ～ 3 6 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 8)

前記がんが、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、子宮癌、神経膠腫、神経膠芽腫、神経芽細胞腫、乳癌、膵管癌、胸腺腫、B - C L L、白血病、B 細胞リンパ腫、および H H L A 2 に対する受容体を発現する免疫細胞が浸潤したがんからなる群から選択される、項目 3 0 ～ 3 7 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 3 9)

前記がんが、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、結腸直腸癌、急性骨髄性白血病 (A M L)、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、および子宮癌からなる群から選択される、項目 3 8 に記載の方法。

10

(項目 4 0)

前記対象が、がんの動物モデルである、項目 3 0 ～ 3 9 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 1)

前記動物モデルがマウスモデルであり、任意に、前記マウスモデルがヒト化マウスモデルである、項目 4 0 に記載の方法。

(項目 4 2)

前記対象が哺乳動物である、項目 3 0 ～ 4 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 4 3)

前記哺乳動物がヒト化マウスまたはヒトである、項目 4 2 に記載の方法。

20

(項目 4 4)

前記哺乳動物がヒトである、項目 4 3 に記載の方法。

(項目 4 5)

H H L A 2 とその結合阻害剤受容体 K I R D L 3 との間の相互作用を阻害することによって免疫応答を調節する方法。

(項目 4 6)

H H L A 2 と K I R D L 3 との間の相互作用が、チェックポイント遮断がん免疫療法における使用のために遮断される、項目 4 5 に記載の方法。

(項目 4 7)

H H L A 2 と K I R D L 3 との間の相互作用が、抗 H H L A 2 抗体を使用して阻害または遮断される、項目 4 5 または 4 6 に記載の方法。

30

(項目 4 8)

前記抗 H H L A 2 抗体が、がん免疫療法のための T 細胞活性化のチェックポイント阻害剤である、項目 4 7 に記載の方法。

(項目 4 9)

H H L A 2 とその結合刺激受容体 T M I G D 2 との間の相互作用を遮断または著しく阻害することなく、H H L A 2 とその結合阻害剤受容体 K I R 3 D L 3 との間の相互作用を選択的に阻害することによって免疫応答を調節する方法。

【図面の簡単な説明】

【0 0 2 9】

40

【図 1 A】フローサイトメトリーによる H H L A 2 トランスフェクト 3 0 0 . 1 9 マウスプレ B 細胞白血病細胞株に対する抗 H H L A 2 m A b の結合親和性データを示す。

【図 1 B】フローサイトメトリーによる H H L A 2 トランスフェクト 3 0 0 . 1 9 マウスプレ B 細胞白血病細胞株への T M I G D 2 - ヒト I g G 結合の抗 H H L A 2 m A b 遮断を示す。

【図 2】抗 H H L A 2 m A b 8 D 2 (I H C m A b) でプローブされた 9 個のヒト腫瘍細胞株由来のタンパク質のウエスタンブロットデータを示す。

【図 3】正常腎臓に対する明細胞腎臓癌 (c c R C C) における他のチェックポイント阻害剤と比較した H H L A 2 m R N A 発現を示す。

【図 4】T C G A データベースからの様々ながんにおける H H L A 2 発現を示す。

50

【図5A】陰性対照細胞（300.19）、HHLA-2トランスフェクト300.19細胞（陽性対照）、OC1-Ly1細胞（陰性腫瘍）、およびHDLM2（陽性ホジキンリンパ腫細胞株）HHLA2対照細胞におけるHHLA2免疫組織化学（IHC）結果を示す。

【図5B】正常腎臓におけるHHLA2発現を示す。

【図5C】マイクロアレイ（TMA）からのccRCCにおけるHHLA2発現の代表的な画像を示す。

【図5D】腫瘍マイクロアレイ（TMA）からの異なるccRCCにおけるHHLA2発現を欠く代表的な画像を示す。

【図6A】代表的な約300個の原形質膜クローンセットの二連でのスクリーニング結果、ならびにHHLA2のKIR3DL3への結合を示す確認スクリーンを示す。合計5682個の細胞表面受容体膜クローンをスクリーニングした。

【図6B】HHLA2のKIR3DL3への選択的結合を示す。

【図6C】関連バイオマーカーの遺伝子IDおよびNCBI受入情報を示す。

【図7】Jurkat NFAT受容体遺伝子アッセイの概略図を示す。

【図8】CAR-T細胞モデルを示す。

【図9】腫瘍によって発現され得る阻害性B7ファミリーメンバーを示す。

【図10】T細胞機能を制御するための2つの受容体（刺激性HHLA2受容体および阻害性HHLA2受容体）とHHLA2との相互作用のモデルを示す。T細胞受容体（TCR）シグナル伝達と同時に、ナイーブT細胞上のTMIGD2は、APC上のHHLA2と相互作用し、AKTリン酸化を伴う経路を介してT細胞増殖およびサイトカイン産生を共刺激する。反復T細胞活性化により、刺激性受容体TMIGD2の発現が徐々に失われ、阻害性受容体KIR3DL3の発現が優勢になることを可能にする。APCまたは腫瘍細胞上のHHLA2は、この第2の受容体と相互作用し、共阻害機能を発揮することができる。この図は、Xiao and Freeman et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2201-2203から編集されている。

【図11】非小細胞肺癌におけるHHLA2陽性（すなわち、HHLA2 mAbでの免疫組織化学（IHC）染色に基づいてHHLA2を発現した肺癌組織）患者の層別化を示す。PD-L1陽性および陰性非小細胞肺癌におけるHHLA2発現のパーセンテージを、HHLA2およびPD-L1免疫染色研究に基づいて計算した（Cheng et al. (2018) Clin. Cancer Res. 24:1954-1964）。

【図12A】図12Aおよび12B。トランスフェクト293T細胞におけるTMIGD2（図12A）またはKIR3DL3（図12B）の発現を示す。pEF-Puro発現ベクター中のTMIGD2またはKIR3DL3 cDNAを293T細胞中で一過性にトランスフェクトし、48～72時間後に、それぞれ、（1）TMIGD2 mAb（R&D systemsカタログ番号MAB83162、クローン番号953743）、その後、ヤギ抗マウスIgG F(ab)₂-PE（R&D Systemsカタログ番号F0102B、または（2）KIR3DL3-PEコンジュゲートmAb（R&D Systemsカタログ番号FAB8919R、クローン番号1136B）で染色し、フローサイトメトリーによって検出した。

【図12B】図12Aおよび12B。トランスフェクト293T細胞におけるTMIGD2（図12A）またはKIR3DL3（図12B）の発現を示す。pEF-Puro発現ベクター中のTMIGD2またはKIR3DL3 cDNAを293T細胞中で一過性にトランスフェクトし、48～72時間後に、それぞれ、（1）TMIGD2 mAb（R&D systemsカタログ番号MAB83162、クローン番号953743）、その後、ヤギ抗マウスIgG F(ab)₂-PE（R&D Systemsカタログ番号F0102B、または（2）KIR3DL3-PEコンジュゲートmAb（R&D Systemsカタログ番号FAB8919R、クローン番号1136B）で染色し、フローサイトメトリーによって検出した。

【図12C】図12Cおよび12D。TMIGD2（図12C）またはKIR3DL3（

10

20

30

40

50

図12D) トランスフェクト293T細胞へのHHLA2-Fc結合を示す。TMIGD2またはKIR3DL3で一過性にトランスフェクトされた293T細胞へのHHLA2-mIgG2a結合を、フローサイトメトリーによってPE標識Fab₂ヤギ抗マウスIgG2a抗体(ヒトIgとの交差反応性のために吸収されたもの、Southern Biotechカタログ番号1082-09)を使用して検出した。

【図12D】図12Cおよび12D。TMIGD2(図12C)またはKIR3DL3(図12D) トランスフェクト293T細胞へのHHLA2-Fc結合を示す。TMIGD2またはKIR3DL3で一過性にトランスフェクトされた293T細胞へのHHLA2-mIgG2a結合を、フローサイトメトリーによってPE標識Fab₂ヤギ抗マウスIgG2a抗体(ヒトIgとの交差反応性のために吸収されたもの、Southern Biotechカタログ番号1082-09)を使用して検出した。

10

【図13A】図13Aおよび13B。ヒトおよびカニクイザルHHLA2へのHHLA2 mAb結合を示す。異なる濃度のHHLA2 mAbを、ヒトHHLA2トランスフェクト300.19プレB細胞またはカニクイザルHHLA2トランスフェクト300.19プレB細胞のいずれかと4℃で30分間インキュベートした。トランスフェクト300.19細胞へのHHLA2 mAb結合を、フローサイトメトリーによってPE標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)で検出した。

【図13B】図13Aおよび13B。ヒトおよびカニクイザルHHLA2へのHHLA2 mAb結合を示す。異なる濃度のHHLA2 mAbを、ヒトHHLA2トランスフェクト300.19プレB細胞またはカニクイザルHHLA2トランスフェクト300.19プレB細胞のいずれかと4℃で30分間インキュベートした。トランスフェクト300.19細胞へのHHLA2 mAb結合を、フローサイトメトリーによってPE標識ヤギ抗マウスIgG(H+L)で検出した。

20

【図14】TMIGD2/HHLA2 T細胞共刺激アッセイの概略図を示す。TMIGD2 Jurkat T細胞NFAT-ルシフェラーゼレポーター遺伝子細胞を、抗CD3 scFVまたは抗CD3 scFV+HHLA2でトランスフェクトされたCHO細胞で刺激した。

【図15】CHO-抗CD3 scFV細胞におけるHHLA2発現を示す。抗CD3 scFV+HHLA2でトランスフェクトされたCHO細胞(クローン番号28)におけるHHLA2発現を、フローサイトメトリーによってPEコンジュゲート6F10 HHLA2 mAbで検出した。

30

【図16】Jurkat NFATレポーター細胞におけるTMIGD2発現を示す。TMIGD2トランスフェクトJurkat NFATレポーター細胞(クローン番号62)におけるTMIGD2発現を示す。

【図17】TMIGD2媒介性T細胞共刺激のHHLA2 mAb遮断を示す。HHLA2-TCR-CHO細胞を、白色の底の不透明な96ウェルプレート中のCHOK1成長培地中に 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。37℃/5%CO₂で一晩インキュベートした後、細胞がプレートに付着した。翌日、培地を各ウェルから慎重に取り除き、50μLのJurkat細胞培地中に抗HHLA2抗体を添加し、HHLA2-TCR-CHO細胞を1時間インキュベートした後、MIGD2 NFAT Jurkatレポーター細胞株を50μLのJurkat細胞培地中に $4 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/ウェルで添加した。プレートウェルを混合し、およそ3~6時間インキュベートした。ルシフェラーゼシグナルを発生させるために、ONE-Step(商標)ルシフェラーゼアッセイ系(BPS Bioscience、カタログ番号60690)を製造業者の推奨プロトコルに従って各ウェルに100μL添加した。照度計を使用して発光を読み取った。

40

【図18】KIR3DL3/HHLA2チェックポイントT細胞アッセイの概略図を示す。KIR3DL3 Jurkat T細胞IL-2プロモータールシフェラーゼレポーター遺伝子細胞を、抗CD3 scFVまたは抗CD3 scFV+HHLA2でトランスフェクトされたCHO細胞で刺激した。

【図19A】図19。Jurkat-IL-2レポータークローンにおけるKIR3DL

50

3発現を示す。KIR3DL3発現をKIR3DL3トランスフェクトJurkat IL-2レポーター細胞クローン1~6、1~7、および2~12で検出した。

【図19B】図19。Jurkat-IL-2レポーター細胞クローンにおけるKIR3DL3発現を示す。KIR3DL3発現をKIR3DL3トランスフェクトJurkat IL-2レポーター細胞クローン1~6、1~7、および2~12で検出した。

【図20A】図20A~20C。KIR3DL3媒介性T細胞阻害のHLA2 mAbチェックポイント遮断を示す。HLA2-TCR-CHO細胞を、白色の底の不透明な96ウェルプレート中のCHOK1成長培地中に 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。37℃/5%CO₂で一晩インキュベートした後、細胞がプレートに付着した。翌日、培地を各ウェルから慎重に取り除き、50μLのJurkat細胞培地中に抗HLA2抗体を添加し、HLA2-TCR-CHO細胞を1時間インキュベートした後、KIR3DL3__IL2__Jurkatレポーター細胞株を50μLのJurkat細胞培地中に $4 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/ウェルで添加し、加えて、2μg/mLの抗CD28抗体(BPS Bioscience番号100186)も添加した(1ウェルあたり100μLアッセイ混合物中1μg/mLの最終濃度)。プレートウェルを混合し、およそ5時間インキュベートした。ルシフェラーゼシグナルを発生させるために、ONE-Step(商標)ルシフェラーゼアッセイ系(BPS Bioscience、カタログ番号60690)を推奨プロトコルに従って各ウェルに100μL添加した。照度計を使用して発光を読み取った。

10

【図20B】図20A~20C。KIR3DL3媒介性T細胞阻害のHLA2 mAbチェックポイント遮断を示す。HLA2-TCR-CHO細胞を、白色の底の不透明な96ウェルプレート中のCHOK1成長培地中に 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。37℃/5%CO₂で一晩インキュベートした後、細胞がプレートに付着した。翌日、培地を各ウェルから慎重に取り除き、50μLのJurkat細胞培地中に抗HLA2抗体を添加し、HLA2-TCR-CHO細胞を1時間インキュベートした後、KIR3DL3__IL2__Jurkatレポーター細胞株を50μLのJurkat細胞培地中に $4 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/ウェルで添加し、加えて、2μg/mLの抗CD28抗体(BPS Bioscience番号100186)も添加した(1ウェルあたり100μLアッセイ混合物中1μg/mLの最終濃度)。プレートウェルを混合し、およそ5時間インキュベートした。ルシフェラーゼシグナルを発生させるために、ONE-Step(商標)ルシフェラーゼアッセイ系(BPS Bioscience、カタログ番号60690)を推奨プロトコルに従って各ウェルに100μL添加した。照度計を使用して発光を読み取った。

20

【図20C】図20A~20C。KIR3DL3媒介性T細胞阻害のHLA2 mAbチェックポイント遮断を示す。HLA2-TCR-CHO細胞を、白色の底の不透明な96ウェルプレート中のCHOK1成長培地中に 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。37℃/5%CO₂で一晩インキュベートした後、細胞がプレートに付着した。翌日、培地を各ウェルから慎重に取り除き、50μLのJurkat細胞培地中に抗HLA2抗体を添加し、HLA2-TCR-CHO細胞を1時間インキュベートした後、KIR3DL3__IL2__Jurkatレポーター細胞株を50μLのJurkat細胞培地中に $4 \sim 5 \times 10^4$ 細胞/ウェルで添加し、加えて、2μg/mLの抗CD28抗体(BPS Bioscience番号100186)も添加した(1ウェルあたり100μLアッセイ混合物中1μg/mLの最終濃度)。プレートウェルを混合し、およそ5時間インキュベートした。ルシフェラーゼシグナルを発生させるために、ONE-Step(商標)ルシフェラーゼアッセイ系(BPS Bioscience、カタログ番号60690)を推奨プロトコルに従って各ウェルに100μL添加した。照度計を使用して発光を読み取った。

30

40

【図21A】図21A~21C。Jurkat KIR3DL3阻害アッセイにおけるHLA2 mAbの滴定を示す。Jurkat IL-2ルシフェラーゼクローン1~6、1~7、および2~12を使用して、異なる濃度のHLA2 mAb 2C4および6F

50

10をJurkat IL-2レポータールシフェラーゼアッセイで評価した。

【図21B】図21A～21C。Jurkat KIR3DL3阻害アッセイにおけるHHLA2 mAbの滴定を示す。Jurkat IL-2ルシフェラーゼクローン1～6、1～7、および2～12を使用して、異なる濃度のHHLA2 mAb 2C4および6F10をJurkat IL-2レポータールシフェラーゼアッセイで評価した。

【図21C】図21A～21C。Jurkat KIR3DL3阻害アッセイにおけるHHLA2 mAbの滴定を示す。Jurkat IL-2ルシフェラーゼクローン1～6、1～7、および2～12を使用して、異なる濃度のHHLA2 mAb 2C4および6F10をJurkat IL-2レポータールシフェラーゼアッセイで評価した。

【図22】KIR3DL3-選択的HHLA2 mAb 2C4がTMIGD2媒介性共刺激を遮断しないことを示す。30 µg/mLの濃度のHHLA2 mAb 2C4をJurkat親NFATレポーター細胞中で評価した。HHLA2-TCR-CHO細胞を、白色の底の不透明な96ウェルプレート中のCHOK1成長培地中に 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。37°C/5%CO₂で一晩インキュベートした後、細胞がプレートに付着した。翌日、培地を各ウェルから慎重に取り除き、50 µLのJurkat細胞培地中に抗HHLA2抗体を添加し、HHLA2-TCR-CHO細胞を1時間インキュベートした後、Jurkat親__NFAT__Jurkatレポーター細胞株を50 µLのJurkat細胞培地中に4～5×10⁴細胞/ウェルで添加した。プレートウェルを混合し、およそ3～6時間インキュベートした。ルシフェラーゼシグナルを発生させるために、ONE-Step (商標)ルシフェラーゼアッセイ系(BPS Bioscience、カタログ番号60690)を推奨プロトコルに従って各ウェルに100 µL添加した。照度計を使用して発光を読み取った。

【図23A】図23A～23C。ヒト化SRG-15マウス腫瘍モデル(T細胞およびNK細胞の両方を有する)におけるHHLA2 mAbがどのように評価され得るかを示す。HHLA2 mAbを、HHLA2発現腫瘍細胞を有するヒト化SRG-15マウスに投与し、腫瘍成長阻害を評価する。これらの図は、Herndler-Brandstetter D et al. (2017) 114: E9626-E9634から編集されたものである。

【図23B】図23A～23C。ヒト化SRG-15マウス腫瘍モデル(T細胞およびNK細胞の両方を有する)におけるHHLA2 mAbがどのように評価され得るかを示す。HHLA2 mAbを、HHLA2発現腫瘍細胞を有するヒト化SRG-15マウスに投与し、腫瘍成長阻害を評価する。これらの図は、Herndler-Brandstetter D et al. (2017) 114: E9626-E9634から編集されたものである。

【図23C】図23A～23C。ヒト化SRG-15マウス腫瘍モデル(T細胞およびNK細胞の両方を有する)におけるHHLA2 mAbがどのように評価され得るかを示す。HHLA2 mAbを、HHLA2発現腫瘍細胞を有するヒト化SRG-15マウスに投与し、腫瘍成長阻害を評価する。これらの図は、Herndler-Brandstetter D et al. (2017) 114: E9626-E9634から編集されたものである。

【図24A】図24Aおよび24B。カニクイザルT細胞モデルにおけるHHLA2 mAbがどのように評価され得るかを示す。カニクイザルにHHLA2 mAbを投与し、KLHで免疫化し、T細胞依存性抗体および細胞媒介性応答を評価する。NK細胞毒性をエクスピボで評価する。

【図24B】図24Aおよび24B。カニクイザルT細胞モデルにおけるHHLA2 mAbがどのように評価され得るかを示す。カニクイザルにHHLA2 mAbを投与し、KLHで免疫化し、T細胞依存性抗体および細胞媒介性応答を評価する。NK細胞毒性をエクスピボで評価する。

【発明を実施するための形態】

【0030】

本発明は、B7遺伝子ファミリーメンバーHHLA2が様々な腫瘍および抗原提示細胞で広範に発現され、T細胞の活性化リガンドおよび阻害リガンドの両方として関与しているという発見に少なくとも部分的に基づいている。ナイーブT細胞で発現されるTMIGD2は、HHLA2に対する活性化受容体であり、T細胞抗原受容体(TCR)連結後に共刺激シグナルを伝達する。TMIGD2は、反復TCR刺激後に下方制御される。HHLA2が腫瘍で高度に発現され、かつチェックポイントリガンドとしての機能を果たし得るという所見に基づいて、抗HHLA2ヒトモノクローナル抗体(mAb)のパネルが候補免疫チェックポイント阻害剤治療薬として生成された。B7ファミリーメンバーB7-1およびB7-2の同じリガンド結合ドメインが活性化受容体および阻害性受容体(例えば、CD28およびCTLA-4)の両方に結合することが知られていることを考慮して、TMIGD2結合を遮断する抗HHLA2モノクローナル抗体がその推定阻害性受容体への結合を遮断する良好な候補としての機能を果たすと考えられている。TMIGD2トランスフェクト300.19マウスプレB白血病細胞への可溶性hHHLA2-mIgG2a結合を評価することにより、遮断抗HHLA2 mAbおよび非遮断抗HHLA2 mAbの両方が特定された。TMIGD2結合を遮断し、それぞれ、0.25 µg/mL、0.44 µg/mL、および0.21 µg/mL(ナノモル範囲)の相対EC50結合親和性でHHLA2トランスフェクト300.19細胞に結合した抗HHLA2 mAb(例えば、6F10、4D1、4E5、および2G2)が表2に列記されている。それぞれ、0.63 µg/mLおよび22.49 µg/mLの相対結合親和性でHHLA2に結合した非遮断抗体(例えば、1C8および6D10)が表2に列記されている。これらの候補治療的抗HHLA2抗体の可変領域重鎖および軽鎖遺伝子配列が本明細書に記載されている。

【0031】

抗HHLA2 mAb 1C8および6D10が、良好なホルマリン固定パラフィン包埋免疫組織化学またはウエスタンブロッティング試薬として特定された。TCGAデータベースからの原発腫瘍におけるHHLA2は、肺癌、腎臓癌、膵臓癌、および結腸直腸癌、ならびにAMLにおいて高い発現を示し、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、および子宮癌において中レベルの発現を示す。がんにおけるHHLA2 mRNA発現は、対応する正常組織よりも高い。

【0032】

可溶性ヒトHHLA2-mIgG2aを有する3,500個を超える異なる原形質膜タンパク質を網羅する4500個を超える全長クローンの細胞表面発現ヒト血漿タンパク質ライブラリのスクリーニングにより、KIR3DL3(キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのドメイン、長い細胞質尾部、3)がHHLA2に対する新たな受容体として特定された。KIR3DL3の細胞質尾部は、がん免疫療法を標的とするチェックポイント受容体としての機能を果たし得るHHLA2に対する阻害性受容体を示す配列「VTYAQL」から成るITIMモチーフを含む。14個のKIR受容体(すなわち、KIR3DL3、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS5、KIR3DL1、KIR3DS1、およびKIR3DS1)のパネルを使用した際に他のKIR受容体への結合が観察されなかったため、HHLA2のKIR3DL3への結合の選択性が実証された。

【0033】

HHLA2が複数のタイプの腫瘍において高レベルで発現されるため、抗HHLA2 mAbチェックポイント阻害剤治療薬は、チェックポイント阻害剤治療に应答する患者のプールを増加させ得る。さらに、PD-1療法に対する耐性を発症する患者は、代替の免疫回避戦略としてHHLA2を発現する場合があります、HHLA2遮断がPD-1免疫療法に対する耐性を打開するための手段を提供し得る。

【0034】

したがって、本発明は、HHLA2に特異的に結合するモノクローナル抗体およびその

抗原結合断片、ならびにその免疫グロブリン、ポリペプチド、核酸、ならびに診断、予後、および治療目的のためにかかる抗体を使用する方法を提供する。

【0035】

I. 定義

「a」および「an」という冠詞は、冠詞の文法的目的語の1つまたは2つ以上（すなわち、少なくとも1つ）を指すために本明細書で使用される。一例として、「要素（an element）」は、1つの要素または2つ以上の要素を意味する。

【0036】

マーカーの「変化した量」という用語は、対照試料中のマーカーと比較して、ある試料中のマーカーの増加もしくは減少したコピー数および／または特定のマーカー遺伝子（複
数可）の増加もしくは減少した核酸レベルを指す。マーカーの「変化した量」という用語は、正常対照試料中のマーカーのタンパク質レベルと比較して、ある試料中のマーカーの増加または減少したタンパク質レベルも含む。

10

【0037】

マーカーの「変化した活性」という用語は、正常対照試料中のマーカーの活性と比較して、例えば生体試料中のある病状で増加または減少するマーカーの活性を指す。マーカーの変化した活性は、例えば、マーカーの変化した発現、マーカーの変化したタンパク質レベル、マーカーの変化した構造、または、例えば、マーカーと同じもしくは異なる経路に
関与する他のタンパク質との変化した相互作用、または転写活性化因子または阻害剤との変化した相互作用の結果であり得る。

20

【0038】

マーカーの「変化した構造」という用語は、正常または野生型遺伝子またはタンパク質と比較して、マーカー遺伝子またはマーカータンパク質中での突然変異または対立遺伝子
バリエーション、例えば、マーカーの発現または活性に影響を及ぼす突然変異の存在を指す。例えば、突然変異には、置換、欠失、または付加突然変異が含まれるが、これらに限定されない。突然変異は、マーカーのコーディング領域または非コーディング領域に存在し得る。

【0039】

「活性化受容体」という用語は、抗原、複合抗原（例えば、MHCポリペプチドとの関連で）、または抗体に結合する免疫細胞受容体を含む。かかる活性化受容体は、T細胞受
容体（TCR）、B細胞受容体（BCR）、サイトカイン受容体、LPS受容体、補体受容体、およびFc受容体を含む。

30

【0040】

T細胞受容体はT細胞上に存在し、CD3ポリペプチドと関連している。T細胞受容体は、MHCポリペプチドとの関連で抗原によって（かつポリクローナルT細胞活性化試薬によって）刺激される。TCRを介したT細胞活性化により、多数の変化、例えば、タン
パク質リン酸化、膜脂質変化、イオン流出、環状ヌクレオチド改変、RNA転写変化、タンパク質合成変化、および細胞体積変化がもたらされる。

【0041】

「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、所望の抗原特異性を有する操作されたT細胞受容体（TCR）を指す。Tリンパ球は、T細胞受容体（TCR）と主要組織適合性複合体（MHC）クラスIまたはII分子によって提示される短ペプチドとの相互作用により特異的抗原を認識する。初期活性化およびクローン増殖について、ナイーブ
T細胞は、追加の共刺激シグナルを提供する専門的な抗原提示細胞（APC）に依存している。共刺激の不在下でのTCR活性化により、無応答性およびクローンアネルギーがもたらされ得る。免疫化をバイパスするために、認識特異性がグラフトされた細胞毒性エフェクター細胞を誘導するための異なるアプローチが開発されている。TCR関連CD3複
合体の細胞表面成分に特異的な天然リガンドまたは抗体に由来する結合ドメインからなるCARが構築されている。抗原結合時、かかるキメラ抗原受容体は、エフェクター細胞における内因性シグナル伝達経路に連結し、TCR複合体によって開始されるシグナルと同

40

50

様の活性化シグナルを生成する。キメラ抗原受容体についての最初の報告以来、この概念は着実に改良されており、キメラ受容体の分子設計は最適化されており、いくつかの周知の結合ドメイン、例えば、s c F V、F a v、および本明細書に記載の別のタンパク質結合断片が日常的に使用されている。

【0042】

一般に、C A Rは、本発明による使用のために企図された一種の「細胞療法」（例えば、T細胞療法）である。H H L A 2経路を調節することによって、例えば、H H L A 2とT M I G D 2および／またはK I R 3 D L 3等のH H L A 2天然結合パートナーとの間の相互作用を調節することによって免疫細胞活性を調節するための薬剤および方法の多数の代表的な実施形態が包含されるが、免疫細胞に基づく療法および方法も包含される。例えば、T M I G D 2および／またはK I R 3 D L 3のノックアウト、ノックダウン、または増加した発現を有するように操作されたT細胞が企図される。同様に、T M I G D 2および／またはK I R 3 D L 3等のH H L A 2リガンドのノックアウト、ノックダウン、または増加した発現を有するように操作された免疫細胞または他の細胞も企図される。

【0043】

B細胞受容体は、B細胞上に存在する。B細胞抗原受容体は、膜I g (m I g) と他の膜貫通ポリペプチド（例えば、I g αおよびI g β）との間の複合体である。m I gのシグナル伝達機能は、オリゴマー抗原または多量体抗原による受容体ポリペプチドの架橋によって誘発される。B細胞は、抗免疫グロブリン抗体によって活性化される場合もある。B C R活性化時、チロシンリン酸化を含む多数の変化がB細胞で生じる。

【0044】

F c受容体は、免疫応答に関与する多くの細胞上に見られる。F c受容体 (F c R) は、免疫グロブリンポリペプチド (I g) のF c部分に対する細胞表面受容体である。これまでに特定されているヒトF c Rのうち、I g G (F c γ Rに指定)、I g E (F c ε R 1)、I g A (F c α)、および重合I g M / A (F c μ α R) を認識するものがある。F c Rは、以下の細胞型：F c ε R I (マスト細胞)、F c ε R . I I (多くの白血球)、F c α R (好中球)、およびF c μ α R (腺上皮、肝細胞) に見られる (H o g g, N. (1988) Immunol. Today 9:185-86)。広く研究されたF c γ Rは、細胞性免疫防御の中心となり、自己免疫疾患の発病に関与する炎症メディエーターおよび加水分解酵素の放出の刺激に関与する (U n k e l e s s, J. C. e t a l. (1988) Annu. Rev. Immunol. 6:251-81)。マクロファージ／単球、多形核白血球、およびナチュラルキラー (NK) 細胞F c γ RがI g Gによって媒介される特異的認識要素を付与するため、F c γ Rは、エフェクター細胞とI gを分泌するリンパ球との間に重要な関連性を提供する。ヒト白血球は、I g Gに対する少なくとも3つの異なる受容体：h F c γ R I (単球／マクロファージに見られる)、h F c γ R I I (単球、好中球、好酸球、血小板、恐らくB細胞、およびK 5 6 2細胞株に見られる)、およびF c γ I I I (NK細胞、好中球、好酸球、およびマクロファージに見られる) を有する。

【0045】

T細胞に関して、T細胞への共刺激シグナルの伝達は、シクロスポリンAによって阻害されないシグナル伝達経路を伴う。加えて、共刺激シグナルは、T細胞におけるサイトカイン分泌（例えば、I L - 2および／もしくはI L - 10）を誘導することができ、かつ／または抗原に対する無応答性の誘導、アネルギーの誘導、もしくはT細胞における細胞死（欠失）の誘導を阻止することができる。

【0046】

「活性」という用語は、ポリペプチド、例えば、H H L A 2および／またはH H L A 2天然結合パートナー、例えば、T M I G D 2および／またはK I R 3 D L 3に関して使用される場合、タンパク質の構造に固有の活性を含む。例えば、H H L A 2リガンドに関して、「活性」という用語は、免疫細胞における阻害性シグナルを調節することによって（例えば、免疫細胞上の天然受容体を連結することによって）免疫細胞阻害を調節する能力

を含む。当業者であれば、HHLA2リガンドポリペプチドの活性化形態が阻害性受容体に結合すると、阻害性シグナルが免疫細胞で生成されることを認識するであろう。

【0047】

「阻害性シグナル」という用語は、免疫細胞上のポリペプチドに対する阻害性受容体（例えば、HHLA2、KLRB1、CTLA4、PD-1等）を介して伝達されるシグナルを指す。かかるシグナルは、活性化受容体を介して（例えば、TCR、CD3、BCR、TMIGD2、またはFcポリペプチドを介して）シグナルをアンタゴナイズし、例えば、第2のメッセンジャー生成の阻害、増殖の阻害、免疫細胞におけるエフェクター機能の阻害、例えば、食作用の低減、抗体産生の低減、細胞毒性の低減、免疫細胞がメディエーター（サイトカイン（例えば、IL-2）および／またはアレルギー応答メディエーター等）を産生することができないこと、またはアレルギーの発生をもたらし得る。

【0048】

対象におけるバイオマーカーの量は、バイオマーカーの量が、それぞれ、正常レベルまたは対照レベルよりも、量进行评估するために用いられるアッセイの標準誤差を超える量だけ、好ましくはその量よりも少なくとも20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%高いまたは低い場合、バイオマーカーの正常量よりも「有意に」高いまたは低い。あるいは、対象におけるバイオマーカーの量は、バイオマーカーの量が、それぞれ、バイオマーカーの正常量および／または対照量よりも少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、165%、170%、175%、180%、185%、190%、195%、2倍、3倍、4倍、5倍、もしくはそれ以上、または5%~100%等のそれらの間の任意の範囲高いまたは低い場合、正常量および／または対照量よりも「有意に」高いまたは低いとみなされ得る。かかる有意な調節値は、変化した発現レベル、変化した活性、がん細胞過剰増殖性成長の変化、がん細胞死の変化、バイオマーカー阻害の変化、試験薬剤結合の変化等の本明細書に記載のいずれの測定基準にも適用され得る。

【0049】

対象におけるマーカーの「量」、例えば、マーカーまたはMCRの発現量もしくはコピー数、またはマーカーのタンパク質レベルは、マーカーの量が、それぞれ、正常レベルよりも、量进行评估するために用いられるアッセイの標準誤差を超える量だけ、好ましくはその量の少なくとも2倍、より好ましくは3倍、4倍、5倍、10倍、またはそれ以上高いまたは低い場合、マーカーの正常量よりも「有意に」高いまたは低い。あるいは、対象におけるマーカーの量は、マーカーの量が、それぞれ、マーカーの正常量よりも少なくとも約2倍、好ましくは少なくとも約3倍、4倍、または5倍高いまたは低い場合、正常量よりも「有意に」高いまたは低いとみなされ得る。

【0050】

マーカーの「変化した発現レベル」という用語は、発現またはコピー数进行评估するために用いられるアッセイの標準誤差よりも高いまたは低い、好ましくは対照試料（例えば、関連疾患を有しない健常対象由来の試料）中のマーカーまたは染色体領域の発現レベルまたはコピー数、好ましくはいくつかの対照試料中のマーカーまたは染色体領域の平均発現レベルまたはコピー数の少なくとも2倍、より好ましくは3倍、4倍、5倍、もしくは10倍、またはそれ以上である、試験試料、例えば、がん罹患している対象に由来する試料中のマーカーの発現レベルまたはコピー数を指す。変化した発現レベルは、発現量またはコピー数进行评估するために用いられるアッセイの標準誤差よりも高くまたは低く、対照試料（例えば、関連疾患を有しない健常対象由来の試料）中のマーカーの発現レベルまたはコピー数、好ましくはいくつかの対照試料中のマーカーの平均発現レベルまたはコピー数の好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは3倍、4倍、5倍、もしくは10倍、ま

10

20

30

40

50

たはそれ以上である。

【0051】

「免疫療法」という用語は、例えば、がんワクチンおよび／または感作抗原提示細胞の使用を含み得る標的療法の形態を指す。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞を無傷のまま残しながらがん細胞に感染して溶解させることができるウイルスであり、それらを免疫調節療法に潜在的に有用なものにする。腫瘍溶解性ウイルスの複製は、腫瘍細胞破壊を促進し、腫瘍部位での用量増幅ももたらす。それらは、抗がん遺伝子のベクターとして作用することもでき、それらを腫瘍部位に特異的に送達させる。この免疫療法は、がん抗原または疾患抗原に対して産生された予め形成された抗体の投与（例えば、任意に化学療法剤または毒素に結合しているモノクローナル抗体の腫瘍抗原への投与）によって達成される宿主の短期間保護のための受動免疫を伴い得る。この免疫療法は、がん細胞株の細胞毒性リンパ球によって認識されるエピトープの使用にも焦点を合わせることができる。あるいは、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチド等を使用して、腫瘍またはがんの発症、進行、および／または病理に関連した生体分子を選択的に調節することができる。上述のように、免疫チェックポイント標的、例えば、HHLA2、TMIGD2、KIR3DL3等に対する免疫療法が有用である。

【0052】

本明細書で別途特定されない限り、「抗体 (antibody)」および「抗体 (antibodies)」という用語は、抗体の天然に存在する形態（例えばIgG、IgA、IgM、IgE）および組換え抗体、例えば、一本鎖抗体、キメラおよびヒト化抗体、ならびに多重特異性抗体、ならびに前述の全ての断片および誘導体（これらの断片および誘導体は少なくとも抗原結合部位を有する）を広範に包含する。抗体誘導体は、抗体にコンジュゲートされたタンパク質または化学的部分を含み得る。「抗体」とは、ジスルフィド結合によって相互接続された少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖、またはそれらの抗原結合部分を含む糖タンパク質を指す。各重鎖は、重鎖可変領域（本明細書でV_Hと略される）および重鎖定常領域から成る。重鎖定常領域は、3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3から成る。各軽鎖は、軽鎖可変領域（本明細書でV_Lと略される）および軽鎖定常領域から成る。軽鎖定常領域は、1つのドメイン、CLから成る。V_H領域およびV_L領域は、フレームワーク領域(FR)と称されるより保存された領域が散在する、相補性決定領域(CDR)と称される超可変領域にさらに細分され得る。V_HおよびV_Lは各々、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4の順でアミノ末端からカルボキシル末端に配置される3つのCDRおよび4つのFRから成る。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含む。「不活性化抗体」という用語は、補体系を誘導しない抗体を指す。

【0053】

本明細書で使用される「抗体」という用語は、抗体の「抗原結合部分」（または単に「抗体部分」）も含む。本明細書で使用される「抗原結合部分」という用語は、抗原（例えば、HHLA2ポリペプチドまたはその断片）に特異的に結合する能力を保持する抗体の1つ以上の断片を指す。抗体の抗原結合機能が全長抗体の断片によって果たされ得ることが示されている。抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含される結合断片の例には、(i) Fab断片、VLドメイン、VHドメイン、CLドメイン、およびCH1ドメインからなる一価断片、(ii) F(ab')₂断片、ヒンジ領域でジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む二価断片、(iii) VHドメインおよびCH1ドメインからなるFd断片、(iv) 抗体の単一アームのVLドメインおよびVHドメインからなるFv断片、(v) VHドメインからなるdAb断片(Ward et al., (1989) Nature 341: 544-546)、および(vi) 単離された相補性決定領域(CDR)が挙げられる。さらに、Fv断片の2つのドメインVLおよびVHが別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、組換え法を使用して、それらがVL領域およびVH領域が対合して一価ポリペプチドを形成する単一タンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによって連結され得る（一本鎖Fv(scFv)

として知られている、例えば、Bird et al. (1988) Science 242: 423-426、およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 5879-5883、およびOsbourne et al. 1998, Nature Biotechnology 16: 778を参照のこと)。かかる一本鎖抗体は、抗体の「抗原結合部分」という用語の範囲内に包含されるようにも意図されている。特異的scFvの任意のVH配列およびVL配列は、完全IgGポリペプチドまたは他のアイソタイプをコードする発現ベクターを生成するために、ヒト免疫グロブリン定常領域cDNAまたはゲノム配列に連結され得る。VHおよびVLは、タンパク質化学または組換えDNA技術のいずれかを使用した免疫グロブリンのFab断片、Fv断片、または他の断片の生成にも使用され得る。ダイアボディ等の一本鎖抗体他の形態も包含される。ダイアボディは、VHドメインおよびVLドメインが単一のポリペプチド鎖上に発現されるが、同じ鎖上の2つのドメイン間の対合を可能にするには短すぎるリンカーを使用して発現され、それにより、これらのドメインを別の鎖の相補性ドメインと対合させ、2つの抗原結合部位を作製する二価の二重特異性抗体である（例えば、Holliger, P., et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448、Poljak, R. J., et al. (1994) Structure 2: 1121-1123を参照のこと）。

【0054】

なおさらに、抗体またはその抗原結合部分は、抗体または抗体部分と1つ以上の他のタンパク質またはペプチドとの共有結合的または非共有結合的会合によって形成されるより大きい免疫接着ポリペプチドの一部であり得る。かかる免疫接着ポリペプチドの例には、四量体scFvポリペプチドを作製するためのストレプトアビジンコア領域の使用（Kipriyanov, S. M., et al. (1995) Human Antibodies and Hybridomas 6: 93-101）、および二価のビオチン化scFvポリペプチドを作製するためのシステイン残基、マーカーペプチド、およびC末端ポリヒスチジンタグの使用（Kipriyanov, S. M., et al. (1994) Mol. Immunol. 31: 1047-1058）が挙げられる。Fab断片およびF(ab')₂断片等の抗体部分は、それぞれ、全抗体のパイン消化またはペプシン消化等の従来の技法を使用して、全抗体から調製され得る。さらに、抗体、抗体部分、および免疫接着ポリペプチドは、本明細書に記載の標準の組換えDNA技法を使用して得られ得る。

【0055】

抗体は、ポリクローナルもしくはモノクローナル、異種、同種、もしくは同系、またはそれらの修飾形態（例えば、ヒト化、キメラ等）であり得る。抗体は、完全にヒトである場合もある。一実施形態では、本発明の抗体は、HLA 2ポリペプチドまたはその断片に特異的にまたは実質的に特異的に結合する。本明細書で使用される「モノクローナル抗体」および「モノクローナル抗体組成物」という用語は、抗原の特定のエпитープと免疫反応することができる1種のみ抗原結合部位を含む抗体ポリペプチドの集団を指し、「ポリクローナル抗体」および「ポリクローナル抗体組成物」という用語は、特定の抗原と相互作用することができる複数の種の抗原結合部位を含む抗体ポリペプチドの集団を指す。モノクローナル抗体組成物は、典型的には、それが免疫反応する特定の抗原に対する単一結合親和性を呈する。

【0056】

「体液」という用語は、身体から排泄または分泌される流体、ならびに通常は身体から排泄または分泌されない流体（例えば、羊水、房水、胆汁、血液および血漿、脳脊髄液、耳垢および耳くそ、カウパー液または前射精液、乳糜、糜粥、糞便、雌性射出液、間質液、細胞内液、リンパ液、月経、母乳、粘液、胸膜液、膿汁、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑液、涙、尿、腔粘滑液、硝子体液、嘔吐物）を指す。

【0057】

「がん」または「腫瘍」または「過剰増殖性障害」という用語は、制御不能な増殖、不死性、転移能、速い成長および増殖速度、ならびにある特定の特有の形態学的特徴等のが

10

20

30

40

50

んを引き起こす細胞に特有の特性を有する細胞の存在を指す。がん細胞は、多くの場合、腫瘍の形態であるが、かかる細胞は、動物に単独で存在し得るか、または白血病細胞等の非腫瘍形成性がん細胞であり得る。がんには、B細胞癌、例えば、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、重鎖病、例えば、アルファ鎖病、ガンマ鎖病、およびミュー鎖病等、良性単クローン性ガンマグロブリン血症、および免疫球性アミロイドーシス、黒色腫、乳癌、肺癌、気管支癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、胃癌、卵巣癌、膀胱癌、脳癌または中枢神経系癌、末梢神経系癌、食道癌、子宮頸癌、子宮または子宮内膜癌、口腔癌または咽頭癌、肝臓癌、腎臓癌、睾丸癌、胆道癌、小腸癌または虫垂癌、唾液腺癌、甲状腺癌、副腎癌、骨肉腫、軟骨肉腫、血液学的組織癌等が含まれるが、これらに限定されない。本発明によって包含される方法に適用可能ながんのタイプの他の非限定的な例には、ヒト肉腫および癌腫、例えば、線維肉腫、粘液肉腫、脂肪肉腫、軟骨肉腫、骨肉腫、脊索腫、血管肉腫、内皮肉腫、リンパ管肉腫、リンパ管内皮肉腫、滑液腫瘍、中皮腫、ユーイング腫瘍、平滑筋肉腫、横紋筋肉腫、結腸癌、結腸直腸癌、膵臓癌、乳癌、卵巣癌、前立腺癌、扁平上皮癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、脂腺癌、乳頭癌、乳頭腺癌、嚢胞腺癌、髄様癌、気管支癌、腎細胞癌、肝癌、胆管癌、肝臓癌、絨毛腫、精上皮腫、胎生期癌、ウィルムス腫瘍、子宮頸癌、骨癌、脳腫瘍、睾丸癌、肺癌、小細胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神経膠腫、星状細胞腫、髄芽腫、頭蓋咽頭腫、上衣腫、松果体腫、血管芽細胞腫、聴神経腫、乏突起膠腫、髄膜腫、黒色腫、神経芽細胞腫、網膜芽細胞腫、白血病、例えば、急性リンパ性白血病および急性骨髄性白血病（骨髄芽球性、前骨髄球性、骨髄単球性、単球性、および赤白血病）、慢性白血病（慢性骨髄性（顆粒球性）白血病および慢性リンパ球性白血病）、および真性赤血球増加症、リンパ腫（ホジキン病および非ホジキン病）、多発性骨髄腫、ヴァルデンストレームマクログロブリン血症、および重鎖病が挙げられる。いくつかの実施形態では、がんは、本来、上皮癌であり、がんには、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、結腸癌、婦人科癌、腎臓癌、喉頭癌、肺癌、口腔癌、頭頸部癌、卵巣癌、膵臓癌、前立腺癌、または皮膚癌が含まれるが、これらに限定されない。他の実施形態では、がんは、乳癌、前立腺癌、肺癌、または結腸癌である。なお他の実施形態では、上皮癌は、非小細胞肺癌、非乳頭状腎細胞癌、子宮頸癌、卵巣癌（例えば、漿液性卵巣癌）、または乳癌である。上皮癌は、漿液性、類内膜、粘液性、明細胞、ブレンナー、または未分化を含むが、これらに限定されない様々な他の方法で特徴付けられ得る。

【0058】

「CDR」という用語およびその複数形「CDRs」は、3つが軽鎖可変領域の結合特性（CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3）を構成し、3つが重鎖可変領域の結合特性（CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3）を構成する、相補性決定領域（CDR）を指す。CDRは、抗体分子の機能的活性に寄与し、足場またはフレームワーク領域を含むアミノ酸配列によって分離される。正確な定義CDR境界および長さは、異なる分類および番号付けシステムに付される。したがって、CDRは、Kabata、Chothia、接触、または任意の他の境界定義によって参照され得る。異なる境界にもかかわらず、これらのシステムは各々、可変配列内のいわゆる「超可変領域」を構成するものにある程度の重複を有する。したがって、これらのシステムに従うCDR定義は、隣接するフレームワーク領域に関して長さおよび境界領域の点で異なり得る。例えば、Kabataら、Chothia、および／またはMacCallum et al.（各々参照により全体が組み込まれる、Kabata et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” 5th Edition, U. S. Department of Health and Human Services, 1992、Chothia et al. (1987) J. Mol. Biol. 196, 901、およびMacCallum et al., J. Mol. Biol. (1996) 262, 732）を参照されたい。

【0059】

本明細書で使用される場合、「分類すること」という用語は、試料を病状と「関連付けること」または試料を病状で「カテゴリー化すること」を含む。ある特定の例では、「分

10

20

30

40

50

類すること」は、統計的証拠、実験的証拠、またはそれらの両方に基づいている。ある特定の実施形態では、分類する方法およびシステムは、いわゆる既知の病状を有する試料の訓練セットを使用する。確立された時点で、訓練データセットは、試料の未知の病状を分類するために、未知の試料の特徴が比較される基礎、モデル、またはテンプレートとしての機能を果たす。ある特定の例では、試料の分類は、試料の病状の診断に似ている。ある特定の他の例では、試料の分類は、試料の病状の別の病状との区別に似ている。

【0060】

本明細書で使用される場合、「コーディング領域」という用語は、アミノ酸残基に翻訳されるコドンを含むヌクレオチド配列の領域を指し、「非コーディング領域」という用語は、アミノ酸に翻訳されないヌクレオチド配列の領域（例えば、5'および3'非翻訳領域）を指す。

10

【0061】

「[に対する] 相補体」または「相補的」とは、2つの核酸鎖の領域間または同じ核酸鎖の2つの領域間の配列相補性の広範な概念を指す。第1の核酸鎖のアデニン残基が、残基がチミンまたはウラシルである場合に第1の領域に逆平行の第2の核酸鎖の残基と特異的水素結合（「塩基対合」）を形成することができることが知られている。同様に、第1の核酸鎖のシトシン残基が、残基がグアニンである場合に第1の鎖に逆平行の第2の核酸鎖の残基と塩基対合することができることが知られている。核酸の第1の領域は、第1の領域と第2の領域が逆平行様式で配置されたときに、第1の領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基が第2の領域の残基と塩基対合することができる場合、同じまたは異なる核酸の第2の領域に相補的である。一実施形態では、第1の領域が第1の部分を含み、第2の領域が第2の部分を含み、それにより、第1の部分と第2の部分が平行様式で配置されたときに、第1の部分のヌクレオチド残基の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対合することができる。別の実施形態では、第1の部分の全てのヌクレオチド残基が、第2の部分のヌクレオチド残基と塩基対合することができる。

20

【0062】

本明細書で使用される場合、「複合抗体」という用語は、2つ以上の非関連可変領域由来の生殖系列または非生殖系列免疫グロブリン配列を含む可変領域を有する抗体を指す。加えて、「複合ヒト抗体」という用語は、ヒト生殖系列または非生殖系列免疫グロブリン配列に由来する定常領域および2つ以上の非関連ヒト可変領域由来のヒト生殖系列または非生殖系列配列を含む可変領域を有する抗体を指す。複合ヒト抗体は、ヒト体内の複合ヒト抗体の抗原性が低下するため、本発明による治療薬における有効な成分として有用である。

30

【0063】

「対照」という用語は、試験試料中の発現産物との比較を提供するのに好適な任意の参照基準を指す。一実施形態では、対照は、発現産物レベルが検出され、試験試料由来の発現産物レベルと比較される「対照試料」を得ることを含む。かかる対照試料は、既知の転帰を有する対照がん患者由来の試料（保管された試料もしくは先行試料測定であり得る）、健常患者もしくはがん患者等の対象から単離された正常組織もしくは細胞、がん患者の同じ臓器もしくは身体位置から得られた正常細胞／組織に隣接する、健常対象もしくはがん患者等の対象から単離された培養初代細胞／組織、健常対象から単離された組織もしくは細胞試料、または寄託所から得られた初代細胞／組織を含むが、これらに限定されない、任意の好適な試料を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、ハウスキーピング遺伝子、正常組織（または他の以前に分析された対照試料）由来の発現産物レベル範囲、ある特定の転帰（例えば、1、2、3、4年等の生存期間）を有するか、またはある特定の治療（例えば、標準治療がん療法）を受けている患者群または一組の患者由来の試験試料中の以前に決定された発現産物レベル範囲を含むが、これらに限定されない、任意の好適な源由来の参照基準発現産物レベルを含み得る。当業者であれば、かかる対照試料および参照基準発現産物レベルが対照として本発明の方法と組み合わせて使用され得ることを

40

50

理解するであろう。一実施形態では、対照は、正常または非がん性細胞／組織試料を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、一組の患者、例えば、一組のがん患者の発現レベル、またはある特定の治療を受けている一組のがん患者発現レベル、またはある転帰に対して別の転帰を有する一組の患者の発現レベルを含み得る。前者の場合、各患者の特異的発現産物レベルは、発現のパーセンタイルレベルに割り当てられ得るか、または参照基準発現レベルの平均値もしくは平均よりも高いまたは低いいずれかとして表され得る。別の好ましい実施形態では、対照は、正常細胞、併用化学療法で治療された患者由来の細胞、および良性がんを有する患者由来の細胞を含み得る。別の実施形態では、対照は、測定値、例えば、ある集団におけるハウスキーピング遺伝子の発現レベルと比較した同じ集団における特定の遺伝子の平均発現レベルも含み得る。かかる集団は、健常対象、いずれの治療も受けていない（すなわち、未治療）がん患者、標準治療療法を受けているがん患者、または良性がんを有する患者を含み得る。別の好ましい実施形態では、対照は、試験試料中の2つの遺伝子の発現産物レベルの比率を決定し、それを参照基準で同じ2つの遺伝子の任意の好適な比率と比較すること、試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現産物レベルを決定し、任意の好適な対照中の発現産物レベルの差を決定すること、および試験試料中の2つ以上の遺伝子の発現産物レベルを決定し、それらの発現を試験試料中のハウスキーピング遺伝子の発現に正規化し、任意の好適な対照と比較することを含むが、これらに限定されない、発現産物レベルの比率変換を含む。特に好ましい実施形態では、対照は、試験試料と同じ系統および／またはタイプのものである対照試料を含む。別の実施形態では、対照は、がんを有する全ての患者等の一組の患者試料中のパーセンタイルとしてまたはそれに基づいて群分けされる発現産物レベルを含み得る。一実施形態では、例えば特定のパーセンタイルと比較してより高いまたはより低い発現産物レベルが転帰を予測するための基礎として使用される対照発現産物レベルが確立される。別の好ましい実施形態では、既知の転帰を有するがん対照患者由来の発現産物レベルを使用して対照発現産物レベルが確立され、試験試料由来の発現産物レベルが転帰を予測する基礎として対照発現産物レベルと比較される。以下のデータによって実証されるように、本発明の方法は、試験試料中の発現産物レベルを対照と比較する際の特定のカットポイントの使用に限定されない。

【0064】

本明細書で使用される場合、「Fc領域」という用語は、天然配列Fc領域および可変Fc領域を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために使用される。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界は異なり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、通常、Cys226位のアミノ酸残基から、またはPro230から、そのカルボキシル末端まで及ぶと定義される。本発明の抗体における使用に好適な天然配列Fc領域には、ヒトIgG1、IgG2（IgG2A、IgG2B）、IgG3、およびIgG4が含まれる。

【0065】

本明細書で使用される場合、「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体を説明する。好ましいFcRは、天然配列ヒトFcRである。さらに、好ましいFcRは、IgG抗体に結合するもの（ガンマ受容体）であり、好ましいFcRには、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIサブクラスの受容体（これらの受容体の対立遺伝子バリエーションおよび選択的にスプライスされた形態を含む）が含まれ、FcγRIII受容体には、FcγRIIIA（「活性化受容体」）およびFcγRIIIB（「阻害受容体」）が含まれ、これらは、主にその細胞質ドメインが異なる同様のアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcγRIIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフ（ITAM）を含む。阻害受容体FcγRIIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ（ITIM）を含む（M. Daerom, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)を参照のこと）。FcRは、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991)、Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)、およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995)で概説されている。今後特定され

るものを含む他の F c R も、本明細書における「F c R」という用語によって包含される。
【0066】

分子は、かなりの割合の分子が基質から解離することなく基質が流体（例えば標準のクエン酸生理食塩水、pH 7.4）ですすがれ得るように、分子が基質に共有結合的または非共有結合的に会合している場合、基質に「固定」または「付着（a f f i x）」されている。

【0067】

本明細書で使用される場合、「フレームワーク」または「F R」残基は、本明細書で定義される H V R 残基以外の可変ドメイン残基である。

【0068】

「機能保存的バリエーション」とは、タンパク質または酵素中の所与のアミノ酸残基が、あるアミノ酸と同様の特性（例えば、極性、水素結合能、酸性、塩基性、疎水性、芳香族等）を有するアミノ酸との置換を含むが、これに限定されない、ポリペプチドの全体的な立体配座および機能を改変することなく変化したものである。保存されたものとして示されるもの以外のアミノ酸は、同様の機能を有する任意の2つのタンパク質間のタンパク質またはアミノ酸配列類似性パーセントが変化し得るように、タンパク質中で異なり得、例えば、類似性が M E G A L I G N アルゴリズムに基づくクラスター法等のアライメントスキームに従って決定される、70%~99%であり得る。「機能保存的バリエーション」は、B L A S T または F A S T A アルゴリズムによって決定される、少なくとも60%、好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも85%、なお好ましくは少なくとも90%、さらにより好ましくは少なくとも95%のアミノ酸同一性を有し、かつそれが比較される天然または親タンパク質と同じまたは実質的に同様の特性または機能を有するポリペプチドも含む。

【0069】

本明細書で使用される場合、「異種抗体」という用語は、かかる抗体を産生するトランスジェニック非ヒト生物との関連で定義される。この用語は、トランスジェニック非ヒト動物からなるものではなく、一般にトランスジェニック非ヒト動物種以外の種由来の生物に見られるものに対応するアミノ酸配列またはコード核酸配列を有する抗体を指す。

【0070】

本明細書で使用される「相同」とは、同じ核酸鎖の2つの領域間または2つの異なる核酸鎖の領域間のヌクレオチド配列類似性を指す。両領域におけるヌクレオチド残基位置が同じヌクレオチド残基によって占有されている場合、それらの領域は、その位置で相同である。第1の領域は、各領域の少なくとも1つのヌクレオチド残基位置が同じ残基によって占有されている場合、第2の領域と相同である。2つの領域間の相同性は、同じヌクレオチド残基によって占有されている2つの領域のヌクレオチド残基位置の割合で表される。一例として、ヌクレオチド配列 5' - A T T G C C - 3' を有する領域およびヌクレオチド配列 5' - T A T G G C - 3' を有する領域は、50%の相同性を共有する。好ましくは、第1の領域が第1の部分を含み、第2の領域が第2の部分を含み、それにより、それらの部分の各々のヌクレオチド残基位置の少なくとも約50%、好ましくは少なくとも約75%、少なくとも約90%、または少なくとも約95%が同じヌクレオチド残基によって占有される。より好ましくは、それらの部分の各々の全てのヌクレオチド残基位置が同じヌクレオチド残基によって占有される。

【0071】

本明細書で使用される場合、「宿主細胞」という用語は、本発明の組換え発現ベクター等の本発明の核酸が導入される細胞を指すよう意図されている。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書で同義に使用される。かかる用語が特定の対象細胞のみならず、かかる細胞の子孫または潜在的子孫も指すことを理解されたい。突然変異または環境影響のいずれかによりある特定の修飾が後世で生じ得るため、かかる子孫は実際には親細胞と同一ではない場合があるが、依然として本明細書で使用される本用語の範囲内に含まれる。

10

20

30

40

50

【0072】

本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語は、ヒト細胞によって作製されるであろう抗体により厳密に似るように改変された可変領域および定常領域を有する非ヒト細胞によって作製された抗体を含むよう意図されている。例えば、非ヒト抗体アミノ酸配列を改変することにより、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に見られるアミノ酸を組み込む。ヒト化抗体は、例えば、CDRにおける、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発またはインビボでの体細胞突然変異によって導入される突然変異）によってコードされていないアミノ酸残基を含み得る。本明細書で使用される「ヒト化抗体」という用語は、マウス等の別の哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列がヒトフレームワーク配列にグラフトされた抗体も含む。

10

【0073】

本明細書で使用されるヒト化マウスとは、機能するヒト遺伝子（例えば、HHLA2、TMIGD2、および／またはKIR3DL3）、細胞、組織、および／または臓器を持つマウスである。ヒト化マウスは、ヒト治療薬のための生物学および医学的研究で小動物モデルとして一般に使用されている。ヌードマウスおよび重症複合免疫不全（SCID）マウスがこの目的のために使用され得る。NCGマウス、NOGマウス、およびNSGマウスが、ヒト細胞および組織を他のモデルよりも効率的に生着させるために使用され得る。かかるヒト化マウスモデルは、健康および病理学のシナリオでヒト免疫系をモデル化するために使用され得、ヒト生理学に関連するインビボ状況での治療候補の評価を可能にし得る。

20

【0074】

本明細書で使用される場合、「超可変領域」、「HVR」、または「HV」という用語は、配列で超可変であり、かつ／または構造的に定義されたループを形成する抗体可変ドメインの領域を指す。一般に、抗体は、6つのHVRを含み、3つがVHにあり（H1、H2、H3）、3つがVLにある（L1、L2、L3）。天然抗体では、H3およびL3が6つのHVRのうちで最も多様性を呈し、特にH3が抗体への微細特異性の付与に特有の役割を果たすと考えられている。例えば、Xu et al. (2000) *Immunity* 13, 37-45、Johnson and Wu in *Methods in Molecular Biology* 248, 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003) を参照されたい。実際には、重鎖のみからなる天然に存在するラクダ類抗体は、軽鎖の不在で機能的であり、安定している（例えば、Hamers-Casterman et al. (1993) *Nature* 363: 446-448 (1993) およびSheriff et al. (1996) *Nature Struct. Biol.* 3, 733-736を参照のこと）。

30

【0075】

本明細書で使用される場合、「免疫細胞」という用語は、免疫応答において役割を果たす細胞を指す。免疫細胞は造血起源のものであり、免疫細胞には、リンパ球、例えば、B細胞およびT細胞、ナチュラルキラー細胞、骨髄細胞、例えば、単球、マクロファージ、好酸球、マスト細胞、好塩基球、および顆粒球が含まれる。

【0076】

40

本明細書で使用される場合、「免疫障害」という用語には、がん、慢性炎症性疾患および障害（例えば、クローン病、炎症性腸疾患、反応性関節炎、およびライム病等）、インスリン依存性糖尿病、臓器特異的自己免疫（例えば、多発性硬化症、橋本甲状腺炎、自己免疫性ブドウ膜炎、およびグレーブス病等）、接触性皮膚炎、乾癬、移植片拒絶、移植片対宿主病、サルコイドーシス、アトピー性状態（例えば、喘息およびアレルギー（アレルギー性鼻炎および食品アレルギー等の消化管アレルギーを含むが、これらに限定されない）等）、好酸球増加症、結膜炎、糸球体腎炎、全身性紅斑性狼瘡、強皮症、蠕虫等のある特定の病原体易感染性（例えば、リーシュマニア症等）およびある特定のウイルス感染（例えば、HIVおよび細菌感染（結核および癰腫癰等）等）、ならびにマラリアを含むが、これらに限定されない免疫疾患、状態、およびそれらの素因が含まれる。

50

【0077】

本明細書で使用される場合、「免疫応答」という用語は、T細胞媒介性および／またはB細胞媒介性免疫応答を含む。例示の免疫応答には、T細胞応答、例えば、サイトカイン産生、および細胞毒性が含まれる。加えて、免疫応答という用語には、T細胞活性化、例えば、抗体産生（体液性応答）およびサイトカイン応答性細胞、例えば、マクロファージの活性化によって間接的にもたらされる免疫応答が含まれる。

【0078】

「免疫治療薬」という用語は、対象における腫瘍またはがんに対する免疫応答をもたらすように宿主免疫系を刺激することができる任意の分子、ペプチド、抗体、または他の薬剤を含み得る。様々な免疫治療薬が本明細書に記載の組成物および方法で有用である。

【0079】

「免疫チェックポイント」という用語は、抗腫瘍免疫応答を下方調節または阻害することによって免疫応答を微調整するCD4+および／またはCD8+T細胞の細胞表面上の分子群を指す。免疫チェックポイントタンパク質は当該技術分野で周知であり、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、ブチロフィリン、およびA2aRが含まれるが、これらに限定されない（例えば、WO 2012/177624を参照のこと）。この用語は、生物学的に活性なタンパク質断片、ならびに全長免疫チェックポイントタンパク質およびその生物学的に活性なタンパク質断片をコードする核酸をさらに包含する。いくつかの実施形態では、この用語は、本明細書に提供される相同性の説明に従う任意の断片をさらに包含する。

【0080】

免疫チェックポイントおよびそれらの配列は当該技術分野で周知であり、代表的な実施形態が以下に記載される。例えば、「PD-1」という用語は、既知のリガンドとしてPD-L1およびPD-L2を有する共阻害受容体として機能する免疫グロブリン遺伝子スーパーファミリーのメンバーを指す。PD-1は、TCR誘導性活性化T細胞死中に上方制御された遺伝子を選択するためのクローニングベースの減算アプローチを使用して以前に特定された。PD-1は、PD-L1に結合するその能力に基づいた分子のCD28/CTLA-4ファミリーのメンバーである。CTLA-4と同様に、PD-1は、抗CD3に応答してT細胞の表面上で迅速に誘導される（Agata et al., 25 (1996) Int. Immunol. 8:765）。しかしながら、CTLA-4とは対照的に、PD-1はB細胞の表面上でも誘導される（抗IgMに応答して）。PD-1は、胸腺細胞および骨髄細胞のサブセット上でも発現される（Agata et al., (1996) (上記参照)、Nishimura et al., (1996) Int. Immunol. 8:773）。

【0081】

本明細書で使用される場合、「阻害すること」という用語およびその文法的等価物は、特定の作用、機能、または相互作用の低減、制限、および／または遮断を指す。一実施形態では、この用語は、所与の出力またはパラメータのレベルを、対応する対照における量よりも少なくとも10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%、またはそれ未満の量（例えば、背景染色、HHLA2シグナル伝達、HHLA2免疫阻害性機能等）に減少させることを指す。所与の出力またはパラメータのレベルの減少は、出力またはパラメータの絶対不在を意味し得るが、意味する必要はない。本発明は、出力またはパラメータを完全に排除する方法を必要とせず、それに限定されない。所与の出力またはパラメータは、本明細書および実施例で論じられる免疫組織化学的アッセイ、分子生物学的アッセイ、細胞生物学的アッセイ、臨床的アッセイ、および生化学的アッ

10

20

30

40

50

セイを含むが、これらに限定されない当該技術分野で周知の方法を使用して決定され得る。「促進すること」、「増加させること」という反意用語、およびそれらの文法的等価物は、阻害または低減について記載されたものと反対である所与の出力またはパラメータのレベルの増加を指す。

【0082】

本明細書で使用される場合、「相互作用」という用語は、2つの分子間の相互作用を指すとき、分子の互いの物理的接触（例えば、結合）（例えば、HHLA2のTMIGD2への結合またはHHLA2のKIR3DL3への結合）を指す。一般に、かかる相互作用は、当該分子の一方または両方の活性をもたらす（それにより、生物学的効果がもたらされる）。活性は、それらの分子の一方または両方の直接活性（例えば、シグナル伝達）であり得る。あるいは、相互作用における一方または両方の分子は、それらのリガンドへの結合を阻止される場合があり、それ故に、リガンド結合活性（例えば、そのリガンドに結合し、免疫応答を誘発または阻害する）に関して不活性で保持される。かかる相互作用を阻害することにより、相互作用に参与する1つ以上の分子の活性の破壊がもたらされる。かかる相互作用を増強することは、当該物理的接触を延長するか、またはその可能性を高めることであり、当該活性の可能性を延長するか、またはその可能性を高めることである。

【0083】

「ネオアジュバント療法」という用語は、一次治療の前に施される治療を指す。ネオアジュバント療法の例には、化学療法、放射線療法、およびホルモン療法が挙げられ得る。

【0084】

本明細書で使用される場合、「単離された抗体」という用語は、異なる抗原特異性を有する他の抗体を実質的に含まない抗体（例えば、HHLA2に特異的に結合し、HHLA2に結合しない抗体を実質的に含まない単離された抗体）を指すよう意図されている。しかしながら、HHLA2に特異的に結合する単離された抗体は、それぞれ、異なる種由来の他のB7ファミリータンパク質に対する交差反応性を有し得る。例えば、いくつかの実施形態では、この抗体は、少なくとも2つの種、例えば、ヒトおよび非齧歯類動物等の他の動物、または他の哺乳動物もしくは非哺乳動物種に対して特異的結合親和性を維持する。しかしながら、いくつかの実施形態では、この抗体は、ヒトHHLA2に対してより高いまたは実際に特異的な親和性および選択性を維持する。加えて、単離された抗体は、典型的には、他の細胞物質および／または化学物質を実質的に含まない。本発明の一実施形態では、ヒトHHLA2に対する異なる特異性を有する「単離された」モノクローナル抗体の組み合わせが、明確に定義された組成物中で組み合わせられる。

【0085】

本明細書で使用される場合、「単離されたタンパク質」とは、他のタンパク質、細胞物質、分離培地、および培養培地（細胞から単離される場合または組換えDNA技法によって産生される場合）、または化学的前駆体もしくは他の化学物質（化学的に合成される場合）を実質的に含まないタンパク質を指す。「単離された」または「精製された」タンパク質またはその生物学的に活性な部分は、抗体、ポリペプチド、ペプチド、もしくは融合タンパク質が由来する細胞もしくは組織源由来の細胞物質もしくは他の夾雑タンパク質を実質的に含まず、または化学的前駆体もしくは他の化学物質（化学的に合成される場合）を実質的に含まない。「細胞物質を実質的に含まない」という言語は、タンパク質が、それが単離されるか、または組換え的に産生される細胞の細胞成分から分離される標的ポリペプチド（例えば、免疫グロブリン）またはその断片の調製物を含む。一実施形態では、「細胞物質を実質的に含まない」という言語は、約30%未満（乾燥重量で）の非標的タンパク質（本明細書で「夾雑タンパク質」とも称される）、より好ましくは約20%未満の非標的タンパク質、なおより好ましくは約10%未満の非標的タンパク質、最も好ましくは約5%未満の非標的タンパク質を有する標的タンパク質またはその断片の調製物を含む。抗体、ポリペプチド、ペプチド、もしくは融合タンパク質、またはそれらの断片、例えば、それらの生物学的に活性な断片が組換え的に産生される場合、これは、好ましくは

、培養培地、すなわち、タンパク質調製物の体積の約20%未満、より好ましくは約10%未満、最も好ましくは約5%未満に相当する培養培地を実質的に含まない。

【0086】

本明細書で使用される場合、「アイソタイプ」という用語は、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgMまたはIgG1）を指す。

【0087】

本明細書で使用される場合、「K_D」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を指すよう意図されている。開示される本発明の抗体の結合親和性は、標準の抗体-抗原アッセイ、例えば、競合的アッセイ、飽和アッセイ、またはELISAもしくはRIA等の標準の免疫アッセイによって測定または決定され得る。

【0088】

本明細書で使用される場合、「キット」とは、本発明のマーカーの発現を特異的に検出または調節するための少なくとも1つの試薬、例えば、プローブを含む任意の製品（例えば、パッケージまたは容器）である。本キットは、本発明の方法を行うための装置として販売促進、流通、または販売され得る。

【0089】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、特定のエピトープに対して単一結合特異性および親和性を呈する抗体を指す。したがって、「ヒトモノクローナル抗体」という用語は、単一結合特異性を呈し、かつヒト生殖系列または非生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、不死化細胞に融合したヒト重鎖トランス遺伝子および軽鎖トランス遺伝子を含むゲノムを有するトランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得られたB細胞を含むハイブリドーマによって産生される。

【0090】

「マーカー」は、ある組織または細胞での発現レベルの正常または健常組織または細胞におけるその発現レベルからの変化ががん等の病状に関連する遺伝子である。「マーカー核酸」は、本発明のマーカーによってコードされるか、またはそれに対応する核酸（例えば、mRNA、cDNA）である。かかるマーカー核酸には、配列表に記載の核酸配列のうちのいずれかの全配列もしくは部分配列、またはかかる配列の相補体を含むDNA（例えば、cDNA）が含まれる。マーカー核酸は、配列表に記載の核酸配列のうちのいずれかの全配列もしくは部分配列、またはかかる配列の相補体を含むRNAも含み、全てのチミジン残基がウリジン残基で置換されている。「マーカータンパク質」は、本発明のマーカーによってコードされるか、またはそれに対応するタンパク質である。マーカータンパク質は、配列表に記載の配列のうちのいずれかの全配列または部分配列を含む。いくつかの実施形態では、HHLA2の全体がマーカーとして使用される。他の実施形態では、HHLA2の断片がマーカーとして使用される。「タンパク質」および「ポリペプチド」という用語は同義に使用される。

【0091】

本明細書で使用される場合、「調節する」という用語は、上方制御および下方制御、例えば、応答の増強または阻害を含む。

【0092】

マーカーの「正常な」発現レベルは、異常なマーカーレベルに関連する疾患または障害に罹患していない対象、例えば、ヒト患者の細胞中のマーカーの発現レベルである。マーカーの「過剰発現」または「有意により高い発現レベル」とは、発現を評価するために用いられるアッセイの標準誤差を超え、かつ対照試料（例えば、マーカー関連疾患を有しない健常対象由来の試料）中のマーカーの発現レベル、好ましくは、いくつかの対照試料中のマーカーの平均発現レベルの好ましくは少なくとも2倍、より好ましくは3、4、5、または10倍である、試験試料における発現レベルを指す。マーカーの「有意により低い発現レベル」とは、対照試料（例えば、マーカー関連疾患を有しない健常対象由来の試料）中のマーカーの発現レベル、好ましくは、いくつかの対照試料中のマーカーの平均発現

10

20

30

40

50

レベルよりも少なくとも2倍、より好ましくは3、4、5、または10倍低い、試験試料における発現レベルを指す。

【0093】

かかる「有意」レベルは、例えば、発現、阻害、細胞毒性、細胞成長等についての本明細書に記載の任意の他の測定されたパラメータにも適用され得る。

【0094】

「所定の」バイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）という用語は、ほんの一例として、特定の治療のために選択され得る対象を評価するために、HHLA2モジュレーター等のHHLA2経路の1つ以上のモジュレーター、ならびにTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナー等の治療への応答を単独でまたは1つ以上の免疫療法と組み合わせてのいずれかで評価するために、かつ／または病状を評価するために使用されるバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）であり得る。所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、がんを有する患者集団またはがんを有しない患者集団において決定され得る。所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、あらゆる患者に平等に適用可能な単数であり得るか、または所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、特定の患者亜集団により異なり得る。対象の年齢、体重、身長、および他の因子は、その個体の所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）に影響を及ぼし得る。さらに、所定のバイオマーカー量および／または活性は、対象毎に個別に決定され得る。一実施形態では、本明細書に記載の方法で決定および／または比較される量は、絶対測定値に基づいている。別の実施形態では、本明細書に記載の方法で決定および／または比較される量は、比率（例えば、細胞比、またはハウスキーピングもしくははさなければ概ね一定のバイオマーカーの発現に正規化された血清バイオマーカー）等の相対測定値に基づいている。所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、任意の好適な基準であり得る。例えば、所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、患者選択が評価される同じまたは異なるヒトから得られ得る。一実施形態では、所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、同じ患者の以前の評価から得られ得る。かかる様式で、患者の選択の経過が経時的に監視され得る。加えて、対照は、別のヒトまたは複数のヒト、例えば、対象がヒトである場合、選択されたヒト群の評価から得られ得る。かかる様式で、選択が評価されるヒトの選択の程度が、好適な他のヒト、例えば、同様もしくは同じ状態（複数可）に罹患しているヒトおよび／または同じ民族集団のヒト等の目的とするヒトと同様の状況下にある他のヒトと比較され得る。

【0095】

「予測的」という用語は、HHLA2経路モジュレーター療法（例えば、HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーターを単独でまたは免疫チェックポイント阻害療法等の免疫療法と組み合わせてのいずれかで）等の免疫調節療法に対するがんの応答の可能性を決定するための、療法前、療法中、または療法後のバイオマーカー核酸および／またはタンパク質状態、例えば、過剰または過小活性、出現、発現、成長、寛解、再発、または腫瘍の抵抗性の使用を含む。バイオマーカーのかかる予測的使用は、例えば、（1）増加または減少したコピー数（例えば、FISH、FISH+SKY、単一分子配列決定（例えば、当該技術分野において少なくともJ. Biotechnol., 86:289-301に記載されるもの）、もしくはqPCRによる）、バイオマーカー核酸の過剰発現もしくは過小発現（例えば、ISH、ノーザンブロット、もしくはqPCRによる）、増加もしくは減少したバイオマーカータンパク質（例えば、IHCによる）および／もしくはバイオマーカー標的、または増加もしくは減少した活性（例えば、アッセイされたヒトがんタイプまたはがん試料の約5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%超、またはそれ以上）、（2）生体試料、例えば、がん罹患している対象、例えば、ヒト由来の組織、全血、血清、血漿、頬搔爬物、唾液、脳脊髄液、尿

10

20

30

40

50

、糞便、または骨髄を含有する試料におけるその絶対または比較的調節された存在または不在、(3) がんを有する患者（例えば、特定の免疫調節療法（例えば、HHLA2経路モジュレーター療法（例えば、HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーターを単独でまたは免疫療法と組み合わせてのいずれかで）に应答する患者、またはそれに対する抵抗性を発症する患者）の臨床サブセットにおけるその絶対または比較的調節された存在または不在によって確認され得る。

【0096】

「予防する」、「予防すること」、「予防」、「予防的治療」等の用語は、疾患、障害、または状態を有しないが、それを発症する危険性があるか、またはそれに罹患し易い対象における疾患、障害、または状態を発症する可能性を低下させることを指す。

10

【0097】

「予後」という用語は、がんの起こり得る経過および転帰または疾患からの回復の可能性の予測を含む。いくつかの実施形態では、統計的アルゴリズムの使用により、個体におけるがんの予後が提供される。例えば、予後は、手術、がんの臨床亜型（例えば、肺癌、黒色腫、および腎細胞癌等の固形腫瘍）の発症、1つ以上の臨床的因子の発症、腸癌の発症、または疾患からの回復であり得る。

【0098】

「療法に対する应答」（例えば、HHLA2経路モジュレーター療法（例えば、HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーターを単独でまたは免疫チェックポイント阻害療法等の免疫療法と組み合わせてのいずれかで）という用語は、療法に対する任意の应答（例えば、HHLA2経路モジュレーター療法（例えば、HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーターを単独でまたは免疫チェックポイント阻害療法等の免疫療法と組み合わせてのいずれかで）に関し、がんの場合、好ましくは、ネオアジュバントまたはアジュバント化学療法の開始後のがん細胞数、腫瘍質量、および／または体積の変化に関する。過剰増殖性障害应答が、例えば、有効性についてまたはネオアジュバントもしくはアジュバント状況で評価され得、全身介入後の腫瘍サイズが、CT、PET、マンモグラム、超音波、または触診によって測定される初期サイズおよび寸法と比較され得る。应答は、生検または外科的切除後の腫瘍のキャリパー測定または病理学検査によっても評価され得る。应答は、腫瘍体積のパーセンテージ変化等の量的様式で、または「病理学的完全寛解」(pCR)、「臨床的完全寛解」(cCR)、「臨床的部分寛解」(cPR)、「臨床的安定疾患」(cSD)、「臨床的進行性疾患」(cPD)、もしくは他の質的基準等の質的様式で記録され得る。過剰増殖性障害应答の評価は、ネオアジュバントまたはアジュバント療法開始後早期に、例えば、数時間後、数日後、数週間後、または好ましくは数ヶ月後に行われ得る。应答評価の典型的なエンドポイントは、ネオアジュバント化学療法の終了時または残留腫瘍細胞および／もしくは腫瘍床の外科的除去時である。これは、典型的には、ネオアジュバント療法開始の3ヶ月後である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療的治療の臨床的有效性は、臨床的有用率(CBR)を測定することによって決定され得る。臨床的有用率は、療法終了の少なくとも6ヶ月後の時点での完全寛解(CR)にある患者のパーセンテージ、部分寛解(PR)にある患者の数、および安定疾患(SD)を有する患者の数の合計を決定することによって測定される。この公式の省略表現は、6ヶ月にわたる $CBR = CR + PR + SD$ である。いくつかの実施形態では、特定のがん治療レジメンのCBRは、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、またはそれ以上である。がん療法に対する应答を評価するための追加の基準は、「生存期間」に関連し、これには、死亡までの生存期間、別名、全生存期間（当該死亡は、原因を問わないか、または腫瘍関連のいずれかであり得る）、「無再発生存期間」（再発という用語は、局所再発および遠隔再発の両方を含むものとする）、無転移生存期間、無病生存期間（病という用語は、がんおよびそれに関

20

30

40

50

連する疾患を含むものとする)の全てが含まれる。当該生存期間の長さは、定義された開始点(例えば、診断時または治療開始時)および終了点(例えば、死、再発、または転移)を参照することによって計算され得る。加えて、治療有効性についての基準は、化学療法に対する応答、生存確率、所与の期間以内の転移確率、および腫瘍再発確率を含むように拡大され得る。例えば、適切な閾値を決定するために、特定のがん治療レジメンが対象集団に投与され得、転帰が任意の免疫調節療法の投与前に決定されたバイオマーカー測定値と相関付けられ得る。転帰測定値は、ネオアジュバント状況で施される療法に対する病理学的応答であり得る。あるいは、バイオマーカー測定値が既知である免疫調節療法後の対象について、全生存期間および無病生存期間等の転帰測定値がある期間にわたって監視され得る。ある特定の実施形態では、投与される用量は、当該技術分野で既知のがん治療薬の標準用量である。対象が監視される期間は異なり得る。例えば、対象は、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、または60ヶ月間監視され得る。

【0099】

「抵抗性」という用語は、免疫調節療法に対するがん試料または哺乳動物の獲得抵抗性または自然抵抗性(すなわち、治療的治療に対して無応答性であるか、または治療的治療に対する低下したまたは限定された応答を有すること)を指し、例えば、治療的治療に対して5%またはそれ以上、例えば、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれ以上、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍、またはそれ以上低下した応答を有する。応答の低下は、抵抗性が獲得される前に同じがん試料または哺乳動物と比較することによって、または治療的治療に対する抵抗性を有しないことが知られている異なるがん試料または哺乳動物と比較することによって測定され得る。化学療法に対する典型的な獲得抵抗性は、「多剤抵抗性」と呼ばれる。多剤抵抗性は、P糖タンパク質によって媒介され得るか、または他の機構によって媒介され得るか、または哺乳動物が多剤抵抗性微生物または微生物の組み合わせに感染したときに生じ得る。治療的治療に対する抵抗性の決定は、当該技術分野で通例であり、当業臨床医の技術の範囲内であり、例えば、「感作」として本明細書に記載の細胞増殖性アッセイおよび細胞死アッセイによって測定され得る。いくつかの実施形態では、「抵抗性を逆転させる」という用語は、一次がん療法(例えば、化学療法または放射線療法)単独では治療されていない腫瘍の腫瘍体積と比較して腫瘍体積の統計的に有意な減少をもたらすことができない状況下で、一次がん療法(例えば、化学療法または放射線療法)と組み合わせた第2の薬剤の使用が、治療されていない腫瘍の腫瘍体積と比較して統計的に有意なレベル(例えば、 $p < 0.05$)で腫瘍体積の有意な減少をもたらすことができることを意味する。これは、一般に、治療されていない腫瘍が対数律動的に成長しているときに行われる腫瘍体積測定に適用される。

【0100】

「応答」または「応答性」という用語は、療法に対する応答を指す。例えば、抗がん応答には、腫瘍サイズの減少または腫瘍成長の阻害が含まれる。これらの用語は、例えば、再発までの時間(第1のイベントとしての第2の原発性がんもしくは再発の証拠のない死の時点で打ち切る第1の再発までの期間)の延長、または全生存期間(治療から任意の原因による死までの期間)の延長によって反映される、改善された予後も指し得る。応答するまたは応答を有するとは、刺激に曝露されたときに有益なエンドポイントが得られることを意味する。あるいは、陰性症状または有害な症状は、刺激への曝露時に最小限に抑えられるか、緩和されるか、または軽減される。腫瘍または対象が好ましい応答を呈する可能性を評価することが、腫瘍または対象が好ましい応答を呈しない(すなわち、応答の欠如を呈するか、または非応答性である)可能性を評価することと同等であることが理解される。

【0101】

「耐性」または「無応答性」という用語は、刺激、例えば、活性化受容体またはサイト

10

20

30

40

50

カインによる刺激に対する免疫細胞等の細胞の屈折性を含む。無応答性は、例えば、免疫抑制剤への曝露または高用量の抗原への曝露により生じ得る。いくつかの独立した方法が耐性を引き起こし得る。1つの機構は、「アネルギー」と称され、細胞がエフェクター機能を有する細胞に分化するのではなく、非応答性細胞としてインビボで存続する状態として定義される。かかる屈折性は、一般に、抗原特異的であり、耐性化抗原への曝露が終了した後に持続する。例えば、T細胞におけるアネルギーは、IL-2等のサイトカイン産生の欠如を特徴する。T細胞アネルギーは、T細胞が抗原に曝露され、第1のシグナル（T細胞受容体またはCD-3媒介シグナル）を第2のシグナル（共刺激シグナル）の不在下で受けたときに生じる。これらの条件下で、細胞の同じ抗原への再曝露（再曝露が共刺激ポリペプチドの存在下で生じる場合でさえも）により、サイトカインの産生に失敗し、それ故に、増殖に失敗する。しかしながら、アネルギーT細胞は、サイトカイン（例えば、IL-2）で培養された場合、増殖することができる。例えば、T細胞アネルギーは、ELISAまたは指標細胞株を使用した増殖アッセイによって測定されるTリンパ球によるIL-2産生の欠如によっても観察され得る。あるいは、レポーター遺伝子構築物が使用され得る。例えば、アネルギーT細胞は、5' IL-2遺伝子エンハンサーの制御下で異種プロモーターによってまたはエンハンサー中に見られ得るAP1配列の多量体によって誘導されるIL-2遺伝子転写を開始することができない（Kang et al. (1992) Science 257:1134）。別の機構は、「疲弊」と称される。T細胞疲弊は、多くの慢性感染症およびがん発症中に生じるT細胞機能障害の状態である。これは、不良なエフェクター機能、阻害性受容体の持続発現、および機能的エフェクターまたはメモリーT細胞とは別個の転写状態によって定義される。

【0102】

本明細書で使用される場合、「核酸分子」という用語は、DNA分子およびRNA分子を含むよう意図されている。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり得るが、好ましくは二本鎖DNAである。本明細書で使用される場合、HLA2（例えば、mAb 2G2、4D1、8A12、8D2、1C8、2C4、6D10、4E5、および6F10、ならびにポリクローナル抗体）に結合する抗体または抗体部分（例えば、V_H、V_L、CDR3）をコードする核酸に関して「単離された核酸分子」という用語は、それらの抗体または抗体部分をコードするヌクレオチド配列が、HLA2以外の抗原に結合する抗体または抗体部分をコードする他のヌクレオチド配列を含まず、他の配列ヒトゲノムDNA中の核酸に天然に隣接し得る核酸分子を指すよう意図されている。

【0103】

核酸は、別の核酸配列と機能的関係に置かれた場合、「作動可能に連結される」。例えば、プロモーターまたはエンハンサーは、コーディング配列の転写に影響を及ぼした場合、その配列に作動可能に連結される。転写制御配列に関して、作動可能に連結されるとは、連結されているDNA配列が隣接しており、必要に応じて、2つのタンパク質コーディング領域を連結するために、隣接してリーディングフレーム内にあることを意味する。スイッチ配列の場合、作動可能に連結されるとは、それらの配列がスイッチ組換えをもたらすことができることを示す。

【0104】

マーカーの「過剰発現」または「有意により高い発現レベル」とは、発現を評価するために用いられるアッセイの標準誤差を超え、好ましくは対照試料（例えば、マーカー関連疾患を有しない健常対象由来の試料）中のマーカーの発現活性またはレベル、好ましくは、いくつかの対照試料中のマーカーの平均発現レベルよりも少なくとも2倍、より好ましくは2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍、またはそれ以上高い、試験試料中の発現レベルを指す。マーカーの「有意により低い発現レベル」とは、対照試料（例えば、マーカー関連疾患を有しない健常対象由来の試料）中のマーカーの発現レベル、好ましくは、いくつかの対照試料中のマーカーの平均発現レベル

よりも少なくとも2倍、より好ましくは2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍、またはそれ以上低い、試験試料中の発現レベルを指す。

【0105】

本明細書に記載のかかる抗体は、放射性免疫アッセイ、ウエスタンブロットアッセイ、免疫蛍光アッセイ、酵素免疫アッセイ、免疫沈降アッセイ、化学発光アッセイ、免疫組織化学的アッセイ、ドットブロットアッセイ、またはスロットブロットアッセイを含むが、これらに限定されない周知の免疫アッセイ形態のうちのいずれか1つで使用され得る。上述の様々な免疫アッセイおよびそれらの技法の他の変形、例えば、インサイチュ近接ライゲーシオンアッセイ（PLA）、蛍光偏光免疫アッセイ（FPIA）、蛍光免疫アッセイ（FIA）、酵素免疫アッセイ（EIA）、比濁阻害免疫アッセイ（NIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、および放射性免疫アッセイ（RIA）、ELISA等を、単独でまたはNMR、MALDI-TOF、LC-MS/MSと組み合わせてまたはその代わりに行う際に使用される一般的な技法が、当業者に既知である。

【0106】

かかる試薬は、臨床試験手順の一環として、例えば、阻害剤の最適投薬量を監視するために、細胞または組織、例えば、白血球またはリンパ球中のタンパク質レベルを監視するためにも使用され得る。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリング（例えば、物理的に連結する）ことによって促進され得る。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が挙げられる。好適な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、β-ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、好適な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ、好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリンが挙げられ、発光物質の例には、ルミノールが挙げられ、生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ、好適な放射性物質の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が挙げられる。

【0107】

かかる試薬はまた、任意の数の生体試料とともに使用されてもよい。生体試料は、核酸および/またはタンパク質を含む体液試料、細胞試料、または組織試料を含む患者由来の様々な源から収集され得る。好ましい実施形態では、対象および/または対照試料は、細胞、細胞株、組織学的スライド、パラフィン包埋組織、生検、全血、乳頭吸引液、血清、血漿、頬搔爬物、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、および骨髓からなる群から選択される。一実施形態では、試料は、血清、血漿、または尿である。別の実施形態では、試料は、血清である。

【0108】

試料は、長期間にわたって個体から繰り返し収集され得る（例えば、約数日間、数週間、数ヶ月に1回以上、年1回、年2回等）。ある期間にわたって個体から多数の試料を得ることは、早期検出からの結果を検証し、かつ/または生物学的パターンの変化を、例えば、疾患進行、薬物治療等の結果として特定するために使用され得る。例えば、対象試料は、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、または本発明による1、2、もしくは3ヶ月間隔の組み合わせで採取および監視され得る。加えて、経時的に得られた対象のバイオマーカー量および/または活性測定値は、監視期間中に、互いに、かつ正常対照のものと好都合に比較され、それにより、対象自身の値を長期監視のための内部対照または個人的対照として提供することができる。

【0109】

試料は、生細胞/組織、新鮮凍結細胞、新鮮組織、生検、固定細胞/組織、パラフィン等の培地中に包埋された細胞/組織、組織学的スライド、またはそれらの任意の組み合わせ

10

20

30

40

50

せを含有し得る。

【0110】

試料調製および分離は、収集された試料のタイプおよび／またはバイオマーカー測定値（複数可）の分析に応じて、手順のうちのいずれかを含み得る。かかる手順には、ほんの一例として、濃縮、希釈、pHの調整、高濃度ポリペプチド（例えば、アルブミン、ガンマグロブリン、およびトランスフェリン等）の除去、保存料および検量体の添加、プロテアーゼ阻害剤の添加、変性剤の添加、試料の脱塩、試料タンパク質の濃縮、脂質の抽出および精製が含まれる。

【0111】

試料調製は、非共有結合複合体中で他のタンパク質（例えば、担体タンパク質）に結合した分子を単離することもできる。このプロセスは、特定の担体タンパク質（例えば、アルブミン）に結合した分子を単離し得るか、またはタンパク質変性による、例えば、酸を使用した、全ての担体タンパク質からの結合した分子の放出、その後の担体タンパク質の除去等のより一般的なプロセスを使用し得る。

【0112】

望ましくないタンパク質（例えば、高濃度の、無益な、または検出不能なタンパク質）の試料からの除去は、高親和性試薬、高分子量フィルター、超遠心分離および／または電気透析を使用して達成され得る。高親和性試薬には、高濃度タンパク質に選択的に結合する抗体または他の試薬（例えば、アプタマー）が含まれる。試料調製には、イオン交換クロマトグラフィー、金属イオン親和性クロマトグラフィー、ゲル濾過、疎水性クロマトグラフィー、クロマト分画、吸着クロマトグラフィー、等電点分画、および関連技法も含まれ得る。分子量フィルターには、サイズおよび分子量に基づいて分子を分離する膜が含まれる。かかるフィルターは、逆浸透、ナノ濾過、限外濾過、および精密濾過をさらに用い得る。

【0113】

「ポリペプチド断片」または「断片」という用語は、参照ポリペプチドに関して使用される場合、アミノ酸残基が参照ポリペプチド自体と比較して欠失しているが、残りのアミノ酸配列が、通常、参照ポリペプチドにおける対応する位置と同一であるポリペプチドを指す。かかる欠失は、参照ポリペプチドのアミノ末端で内部的に、またはそのカルボキシル末端で、またはあるいはそれらの両方で生じ得る。断片は、典型的には、少なくとも5、6、8、または10アミノ酸長、少なくとも14アミノ酸長、少なくとも20、30、40、または50アミノ酸長、少なくとも75アミノ酸長、または少なくとも100、150、200、300、500、またはそれ以上のアミノ酸長である。それらは、例えば、それらが全長ポリペプチドの長さ未満である限り、少なくとも10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600、620、640、660、680、700、720、740、760、780、800、820、840、860、880、900、920、940、960、980、1000、1020、1040、1060、1080、1100、1120、1140、1160、1180、1200、1220、1240、1260、1280、1300、1320、1340、またはそれ以上の長さであり得、および／またはそれを含み得る。あるいは、それらは、それらが全長ポリペプチドの長さ未満である限り、かかる範囲を超えず、かつ／またはかかる範囲を除外し得る。

【0114】

「プローブ」という用語は、特異的に意図される標的分子、例えば、マーカーによってコードされるか、またはそれに対応するヌクレオチド転写物またはタンパク質に選択的に結合することができる任意の分子を指す。プローブは、当業者によって合成されるか、または適切な生物学的調製物に由来するかのいずれかであり得る。標的分子の検出のために

10

20

30

40

50

、プローブは、本明細書に記載されるように、標識されるように特異的に設計され得る。プローブとして利用され得る分子の例には、RNA、DNA、タンパク質、抗体、および有機分子が挙げられるが、これらに限定されない。

【0115】

本明細書で使用される場合、「再編成された」という用語は、Vセグメントが、それぞれ、完全V_HおよびV_Lドメインを本質的にコードする立体配座におけるD-JまたはJセグメントに直接隣接して位置付けられている、重鎖または軽鎖免疫グロブリン遺伝子座の立体配置を指す。再編成された免疫グロブリン遺伝子座は、生殖系列DNAとの比較によって特定され得、再編成された遺伝子座は、少なくとも1つの組換えられた七量体／九量体相同性要素を有する。

10

【0116】

本明細書で使用される場合、「組換え宿主細胞」（または単に「宿主細胞」）という用語は、組換え発現ベクターが導入された細胞を指すよう意図されている。かかる用語が、特定の対象細胞のみならず、かかる細胞の子孫も指すよう意図されていることを理解されたい。突然変異または環境影響のいずれかによりある特定の修飾が後世で生じ得るため、かかる子孫は実際には親細胞と同一ではない場合があるが、依然として本明細書で使用される「宿主細胞」という用語の範囲内に含まれる。

【0117】

本明細書で使用される場合、「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離された全てのヒト抗体、例えば、(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（例えば、マウス）またはそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体（以下にさらに記載される）、(b) 形質転換されて抗体を発現する宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、(c) 組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、および(d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列および／または非生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発（または、ヒトIg配列に対してトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞突然変異誘発）に供され得、それ故に、組換え抗体のV_H領域およびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_H配列およびV_L配列に由来し、かつそれに関連している一方で、インビボでヒト抗体生殖系列レパートリー中に天然に存在しない場合がある配列である。

20

30

【0118】

「共刺激する」という用語は、活性化免疫細胞に関して使用される場合、増殖またはエフェクター機能を誘導する第2の非活性化受容体媒介シグナル（「共刺激シグナル」）を提供する共刺激ポリペプチドの能力を含む。例えば、共刺激シグナルは、例えば、T細胞-受容体媒介性シグナルを受けたT細胞におけるサイトカイン分泌をもたらし得る。例えば、活性化受容体を介して細胞-受容体媒介シグナルを受けた免疫細胞は、本明細書で「活性化免疫細胞」と称される。

40

【0119】

「共刺激受容体」という用語は、共刺激シグナルを免疫細胞、例えば、CD28に伝達する受容体を含む。本明細書で使用される場合、「阻害性受容体」という用語は、負のシグナルを免疫細胞（例えば、CTLA4、KIR3DL3、またはPD-1）に伝達する受容体を含む。阻害性受容体によって伝達された阻害性シグナルは、共刺激受容体（CD28等）が免疫細胞上に存在せず、それ故に、単に共刺激ポリペプチドの結合についての阻害性受容体と共刺激受容体との間の競合の機能ではない場合さえも生じ得る（Fallarino et al. (1998) J. Exp. Med. 188:205）。阻害性シグナルの免疫細胞への伝達により、免疫細胞に無応答性またはアネルギーまたはプログラム細胞死がもたらされ得る。好ましくは、阻害性シグナルの伝達は、アポトーシスを伴わ

50

ない機構により動作する。本明細書で使用される場合、「アポトーシス」という用語は、当該技術分野で既知の技法を使用して特徴付けられ得るプログラム細胞死を含む。アポトーシス細胞死は、例えば、結果的に細胞断片化に至る細胞収縮、膜ブレブ形成、およびクロマチン凝縮によって特徴付けられ得る。アポトーシスを受けた細胞は、ヌクレオソーム間DNA切断の特徴的パターンも呈する。受容体に結合するポリペプチドの形態に応じて、例えば、1つ以上の天然結合パートナーへの結合についてHHLA2および／またはKIR3DL3の活性化形態と競合することによって、シグナルが伝達され得る（例えば、HHLA2および／またはKIR3DL3ポリペプチドの多価形態によって）か、またはシグナルが阻害され得る（例えば、HHLA2および／またはKIR3DL3の可溶性一価形態によって）かのいずれかである。しかしながら、可溶性ポリペプチドが刺激性であり得る例も存在する。調節剤の効果は、本明細書に記載の通例のスクリーニングアッセイを使用して容易に実証され得る。

【0120】

細胞バイオマーカー発現に関連した「高」、「低」、「中間」、および「陰性」という用語は、1つ以上の参照細胞によるバイオマーカーの細胞発現と比較した発現されたバイオマーカーの量を指す。バイオマーカー発現は、1つ以上のバイオマーカーゲノム核酸、リボ核酸、および／またはポリペプチドの細胞レベル、活性、構造等の分析を含むが、これらに限定されない、本明細書に記載の任意の方法に従って決定され得る。一実施形態では、これらの用語は、バイオマーカーを、それぞれ、最高レベル、中間レベル、または最低レベルで発現する細胞集団の定義されたパーセンテージを指す。かかるパーセンテージは、バイオマーカーを高度にまたは弱くのいずれかで発現する細胞集団の上位0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、またはそれ以上、またはそれらの間の任意の範囲（境界値も含む）として定義され得る。「低」という用語は、バイオマーカーを検出可能に発現しない細胞を除外し、これは、かかる細胞がバイオマーカー発現に対して「陰性」であるためである。「中間」という用語は、バイオマーカーを発現するが、それを「高」レベルで発現する集団よりも低いレベルで発現する細胞を含む。別の実施形態では、これらの用語は、質的または統計的プロット領域によって特定されたバイオマーカー発現の細胞集団も指し得るか、またはそれを代わりに指し得る。例えば、フローサイトメトリーを使用して選別された細胞集団は、当該技術分野で周知の方法に従って、検出可能な部分の分析に基づいて、例えば、平均蛍光強度等に基づいて別個のプロットを特定することによって、バイオマーカー発現レベルに基づいて区別され得る。かかるプロット領域は、目的とするバイオマーカーについて当該技術分野で周知の方法に基づいて、数、形状、重複等に従って精製され得る。なお別の実施形態では、これらの用語は、追加のバイオマーカーの発現の存在または不在に従って決定される場合もある。

【0121】

上述のように、「応答」という用語は、概して、例えば、臨床的介入の経過、有効性、または転帰への影響を決定することに関連している。いくつかの実施形態では、応答は、臨床的介入（例えば、抗HHLA2モノクローナル抗体、例えば、2G2、4D1、8A12、8D2、1C8、2C4、6D10、4E5、または6F10、およびポリクローナル抗体の投与）開始後の腫瘍質量および／または体積の変化に直接関連している。例えば、過剰増殖性障害応答は、CT、PET、マンモグラム、超音波、または触診によって測定される初期サイズおよび寸法と比較した、全身介入後の腫瘍のサイズに従って評価され得る。応答は、生検または外科的切除後の腫瘍のキャリパー測定または病理学的試験によっても評価され得る。応答は、腫瘍体積のパーセンテージ変化等の量的様式で、または「病理学的完全寛解」（pCR）、「臨床的完全寛解」（cCR）、「臨床的部分寛解」（cPR）、「臨床的安定疾患」（cSD）、「臨床的進行性疾患」（cPD）、もしくは他の質的基準等の質的様式で記録され得る。評価は、臨床的介入の開始後早期に、例え

ば、数時間後、数日後、数週間後、または好ましくは数ヶ月後に行われ得る。応答評価の典型的なエンドポイントは、臨床的介入の終了時または残留腫瘍細胞および／もしくは腫瘍床の外科的除去時である。

【0122】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」という用語は、抗体の所定の抗原への結合を指す。典型的には、抗体は、ヒトHHLA2を分析物として、かつ抗体をリガンドとして使用したBIACORE（登録商標）アッセイ器具における表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって決定される場合、およそ 10^{-7} M未満、例えば、およそ 10^{-8} M、 10^{-9} M、もしくは 10^{-10} M未満、またはそれよりもさらに低い親和性（ K_D ）で結合し、所定の抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）または密接に関連した抗原への結合に対するその親和性よりも少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、もしくは10.0倍、またはそれ以上高い親和性で所定の抗原に結合する。「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」という語句は、本明細書で「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と同義に使用され得る。

10

【0123】

本明細書で使用される場合、「対象」は、任意の健常動物、哺乳動物、もしくはヒト、または異常なマーカーレベルに関連した疾患または障害に罹患している任意の動物、哺乳動物、もしくはヒトを指す。「対象」という用語は、「患者」と同義である。「非ヒト動物」という用語には、全ての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリ、両生類、爬虫類等の哺乳動物および非哺乳動物が含まれる。

20

【0124】

「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という言語は、タンパク質がタンパク質の合成に関与する化学的前駆体または他の化学物質から分離された抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質の調製物を含む。一実施形態では、「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という言語は、約30%未満（乾燥重量で）の化学的前駆体または非抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質化学物質、より好ましくは約20%未満の化学的前駆体または非抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質化学物質、なおより好ましくは約10%未満の化学的前駆体または非抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質化学物質、最も好ましくは約5%未満の化学的前駆体または非抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質化学物質を有する抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質の調製物を含む。

30

【0125】

本明細書で使用される場合、「生存期間」という用語には、死亡までの生存期間、別名、全生存期間（当該死亡は、原因を問わないか、または腫瘍関連のいずれかであり得る）、「無再発生存期間」（再発という用語は、局所再発および遠隔再発の両方を含むものとする）、無転移生存期間、無病生存期間（病という用語は、がんおよびそれに関連する疾患を含むものとする）の全てが含まれる。当該生存期間の長さは、定義された開始点（例えば、診断時または治療開始時）および終点（例えば、死、再発、または転移）を参照することによって計算され得る。加えて、治療有効性についての基準は、化学療法に対する応答、生存確率、所与の期間以内の転移確率、および腫瘍再発確率を含むように拡大され得る。

40

【0126】

「転写ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド転写物」とは、本発明のマーカーの転写、RNA転写物（存在する場合）の正常転写後プロセッシング（例えば、スプライシング）、およびRNA転写物の逆転写によって作製される成熟mRNAの全てまたは一部に相補的なまたはそれと相同のポリヌクレオチド（例えば、mRNA、hnRNA、cDNA、またはかかるRNAもしくはcDNAの類似体）である。

50

【0127】

本明細書で使用される場合、「T細胞」という用語は、CD4+T細胞およびCD8+T細胞を含む。T細胞という用語は、Tヘルパー1型T細胞およびTヘルパー2型T細胞の両方を含む。「抗原提示細胞」という用語は、専門的抗原提示細胞（例えば、Bリンパ球、単球、樹状細胞、ランゲルハンス細胞）、ならびに他の抗原提示細胞（例えば、ケラチノサイト、内皮細胞、アストロサイト、線維芽細胞、オリゴデンドロサイト）を含む。

【0128】

従来のT細胞、別名、TconvまたはTeffは、1つ以上のT細胞受容体の発現により免疫応答を増強するためのエフェクター機能（例えば、サイトカイン分泌、細胞毒性活性、抗自己認識等）を有する。TconvまたはTeffは、一般に、Tregではない任意のT細胞集団として定義され、それらには、例えば、ナイーブT細胞、活性化T細胞、メモリーT細胞、静止Tconv、または例えばTh1もしくはTh2系統に分化したTconvが含まれる。いくつかの実施形態では、Teffは、非Treg T細胞のサブセットである。いくつかの実施形態では、Teffは、CD4+TeffまたはCD8+Teff、例えば、CD4+ヘルパーTリンパ球（例えば、Th0、Th1、Tfh、またはTh17）およびCD8+細胞毒性Tリンパ球である。本明細書にさらに記載されるように、細胞毒性T細胞は、CD8+Tリンパ球である。「ナイーブTconv」とは、骨髄で分化しており、胸腺での正および負の中枢選択プロセスを成功させたが、抗原への曝露によって活性化されていないCD4+T細胞である。ナイーブTconvは、L-セレクチン（CD62L）の表面発現、CD25、CD44、またはCD69等の活性化マーカーの不在、およびCD45RO等のメモリーマーカーの不在を一般に特徴としている。したがって、ナイーブTconvは、静止状態にあり、非分裂性であり、恒常的生存にインターロイキン-7（IL-7）およびインターロイキン-15（IL-15）を必要とすると考えられている（少なくとも、WO2010/101870を参照のこと）。かかる細胞の存在および活性は、免疫応答の抑制との関連で望ましくない。Tregとは異なり、Tconvは、アネルギー性ではなく、抗原ベースのT細胞受容体活性化に応答して増殖することができる（Lechler et al. (2001) Philos. Trans. R. Soc. Lond. Biol. Sci. 356: 625-637）。腫瘍では、疲弊した細胞がアネルギーの特徴を提示し得る。

【0129】

本明細書で使用される場合、Vセグメントに関して「再編成されていない」または「生殖系列立体配置」という用語は、VセグメントがDセグメントまたはJセグメントに直接隣接するように組換えられていない立体配置を指す。

【0130】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、連結されている別の核酸を輸送することができる核酸を指す。1つの種類のベクターは、追加のDNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。別の種類のベクターは、追加のDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得るウイルスベクターである。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌性複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソーム哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソーム哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指示することができる。かかるベクターは、本明細書で「組換え発現ベクター」または単に「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技法で有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般に使用されている形態であるため、同義に使用され得る。しかしながら、本発明は、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）等の同等の機能を果たす発現ベクターの他の形態を含むよう意図されている。

【0131】

核酸について、「実質的相同性」という用語は、2つの核酸またはそれらの指定された配列が、最適にアラインおよび比較されたときに、適切なヌクレオチド挿入または欠失を伴って、ヌクレオチドの少なくとも約80%、通常、ヌクレオチドの少なくとも約81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、またはそれ以上、より好ましくは、ヌクレオチドの少なくとも約97%、98%、99%、またはそれ以上同一であることを示す。あるいは、実質的相同性は、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下でその鎖の相補体にハイブリダイズする場合に存在する。

【0132】

2つの配列間の同一性パーセントは、それらの2つの配列の最適アライメントのために導入される必要のあるギャップの数および各ギャップの長さを考慮して、それらの配列によって共有された同一の位置の数の関数（すなわち、同一性% = 同一の位置の数 / 位置の総数 × 100）である。2つの配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、以下の非限定的な例に記載されるように、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

【0133】

2つのヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、NWS gap dnaを使用したGCGソフトウェアパッケージ（GCG社ウェブサイトのワールドワイドウェブ上で利用可能なもの）内のGAPプログラムを使用して決定され得る。CMP行列、およびギャップ重み40、50、60、70、または80、および長さ重み1、2、3、4、5、または6である。2つのヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性パーセントは、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4を使用した、ALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれたE. Meyers and W. Miller（CABIOS、4:11-17（1989））のアルゴリズムを使用して決定される場合もある。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Blosum62行列またはPAM250行列のいずれか、およびギャップ重み16、14、12、10、8、6、または4、および長さ重み1、2、3、4、5、または6を使用した、GCGソフトウェアパッケージ（GCG社ウェブサイトのワールドワイドウェブ上で利用可能なもの）内のGAPプログラムに組み込まれたNeedleman and Wunsch（J. Mol. Biol.（48）:444-453（1970））のアルゴリズムを使用して決定され得る。

【0134】

本発明の核酸およびタンパク質配列は、例えば、関連配列を特定するために、公開データベースに対する検索を行うための「問い合わせ配列」としてさらに使用され得る。かかる検索は、Altschul, et al.（1990）J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTプログラムおよびXBLASTプログラム（バージョン2.0）を使用して行われ得る。BLASTヌクレオチド検索は、本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得るために、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて行われ得る。BLASTタンパク質検索は、本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得るために、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3を用いて行われ得る。比較のためのギャップ付きアライメントを得るために、Altschul, et al.,（1997）Nucleic Acids Res. 25（17）:3389-3402に記載のGapped BLASTが利用され得る。BLASTプログラムおよびギャップ付きBLASTプログラムを利用する際に、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータが使用され得る（NCBIウェブサイトのワールドワイドウェブ上で利用可能である）。

【0135】

核酸は、全細胞中に、細胞溶解物中に、または部分的に精製された形態もしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、アルカリ／SDS処理、CsClバンディング、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動、および当該技術分野で周知の他の技

10

20

30

40

50

法 (F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987) を参照のこと) を含む標準の技法によって、他の細胞成分または他の夾雑物、例えば、他の細胞核酸またはタンパク質から精製されたときに、「単離される」または「実質的に純粋にされる」。

【0136】

「対象に好適な治療レジメンを決定すること」という用語は、本発明による分析の結果に基づいてまたは本質的に基づいてまたは少なくとも部分的に基づいて開始、変更、および／または終了される、対象の治療レジメン（すなわち、対象におけるがんの予防および／または治療のために使用される単回療法または異なる療法の組み合わせ）の決定を意味するとみなされる。一例は、免疫調節療法（例えば、HHLA2経路モジュレーター療法（例えば、HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーター））を提供するためにがんに対する標的療法を提供するかを決定することである。別の例は、再発の危険性を低下させることを目的とする手術後にアジュバント療法を開始することであり、別の例は、特定の化学療法の投薬量を変更することであろう。決定は、本発明による分析の結果に加えて、治療される対象の個人的特徴に基づき得る。多くの場合、対象に好適な治療レジメンの実際の決定は、主治医または医師によって行われるであろう。

【0137】

II. モノクローナル抗体、免疫グロブリン、およびポリペプチド

本発明は、部分的に、HHLA2に対して産生される単離されたモノクローナル抗体またはその断片（本明細書に列記されるモノクローナル抗体およびポリクローナル抗体等）に関する。かかる分子は、部分的に、それらが、診断アッセイ、例えば、免疫組織化学的（IHC）、ウエスタンブロット、細胞間フロー、ELISA等においてHHLA2タンパク質を認識する能力を呈することを特徴とする。かかる分子は、部分的に、それらが、T細胞上で発現される受容体（例えば、TMIGD2およびKIR3DL3）等の受容体へのHHLA2の結合を阻害する能力を呈することを特徴とする。

【0138】

「HHLA2」という用語、別名、ヒト内因性レトロウイルスH長末端反復関連タンパク質2、HERV-H LTR関連2、B7y、B7H7、B7-H5、B7-H7は、B7ファミリーのメンバーを指す。HHLA2タンパク質は、正常ヒト組織では限定された発現を有するが、ヒトがんでは広範に発現される。HHLA2タンパク質が3つのIg様ドメイン（IgV-IgC-IgV）を有する膜タンパク質である一方で、B7ファミリーの他のメンバーは、一般に、2つのみのIgドメイン（IgV-IgC）を有する。正常ヒト組織中のHHLA2タンパク質は、腎臓、腸、胆嚢、および乳房の上皮、ならびに胎盤栄養膜細胞で発現される。免疫系では、HHLA2タンパク質は、ヒト単球／マクロファージ上で構成的に発現される。HHLA2は、ヒトT細胞機能を制御し、例えば、HHLA2は、T細胞増殖およびサイトカイン産生を阻害し、T細胞産生およびサイトカイン産生を増加させる。HHLA2は、結腸直腸、腎臓、肺、脾臓、卵巣、および前立腺由来の広範なヒトがんにおいてより高いレベルで発現される。HHLA2は、甲状腺癌、黒色腫、肝臓癌、膀胱癌、結腸癌、腎臓癌、乳癌、および食道癌のヒトがんでも発現される。

【0139】

上述のHHLA2の構造および機能は、当該技術分野で周知である（例えば、Xiao et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2201-2203、Janakiram et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2359-2366、Mager et al. (1999) Genomics 21:2359-2366、Flajnik et al. (2012) Immunogenet. 64:571-590、Zhao et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110:9879-9884、およびZhu et al. (2

013) Nat. Commun. 4:2043を参照のこと)。

【0140】

「HHLA2」という用語は、その断片、バリエーション（例えば、対立遺伝子バリエーション）、および誘導体を含むよう意図されている。代表的なヒトHHLA2 cDNAおよびヒトHHLA2タンパク質配列は、当該技術分野で周知であり、National Center for Biotechnology Information (NCBI) から公的に入手可能である。ヒトHHLA2バリエーションには、バリエーション1 (NM_007072.3およびNP_009003.1、最長転写物を表し、最長アイソフォームをコードする)、バリエーション2 (NM_001282556.1およびNP_001269485.1、代替プロモーターの使用を表し、バリエーション1と比較して5' UTRが異なる)、バリエーション3 (NM_001282557.1およびNP_001269486.1、代替プロモーターの使用を表し、バリエーション1と比較して5' UTRが異なる)、バリエーション4 (NM_001282558.1およびNP_001269487.1、アイソフォームbをコードし、代替プロモーターの使用を表し、バリエーション1と比較して5' UTRが異なり、かつ3' コーディング領域内に代替インフレームエクソンを欠き、アイソフォームaよりも短いアイソフォームをもたらす)、およびバリエーション5 (NM_001282559.1およびNP_001269488.1、アイソフォームcをコードし、代替プロモーターの使用を表し、バリエーション2と比較して複数の相違点を有し、別個の5' UTRをもたらす、バリエーション1と比較して代替開始コドンで翻訳を開始させ、別個のN末端およびアイソフォームaよりも短いアイソフォームをもたらす) が含まれる。ヒト以外の生物中のHHLA2オルソログの核酸およびポリペプチド配列が周知であり、例えば、カエルHHLA2 (NM_001128644.1およびNP_001122116.1) が含まれる。HHLA2オルソログの代表的な配列が以下の表1に提示される。

【0141】

HHLA2タンパク質の検出に好適な抗HHLA2抗体が当該技術分野で周知であり、例えば、抗体カタログ番号ab107119およびab214327 (abcam)、抗体PA5-24146およびPA5-6313 (ThermoFisher Scientific)、抗体MAB80841、AF8084、FAB80841R、FAB80841T、およびMAB8084 (R&D systems)、抗体AP52042PU-N (Origene)、抗体NBP2-49187、MAB80842、H00011148-B01P、およびNBP2-32420 (Novus Biologicals)、抗体GTX51981 (GeneTex)、抗体HPA055478 (Atlas Antibodies)、抗体LS-C321945、LS-C308228、LS-C246742、LS-C246743、LS-C246744、LS-C236210、およびLS-C249186 (LifeSpan Biosciences) 等が含まれる。さらに、HHLA2発現を減少させるための複数のsiRNA、shRNA、CRISPR構築物、例えば、shRNA製品番号TL312462、TF312462、TR312462、TG312462、およびTL312462V、siRNA製品番号SR323358 (Origene Technologies)、siRNA製品番号i009616、i009616a、i009616b、i009616c、i009616d、iV009616、iV009616a、iV009616b、iV009616c、iV009616d、iAAV00961600、iAAV00961601、iAAV00961602、iAAV00961603、iAAV00961604、iAAV00961605、iAAV00961606、iAAV00961607、iAAV00961608、およびiAAV00961609、CRISPR製品番号K0950321、K0950301、K0950302、K0950303、K0950304、K0950305、K0950306、K0950307、K0950308、およびK0950311 (abm)、siRNA製品番号sc-78498、shRNA製品番号sc-78498-Vおよびsc-78498-SH、CRISPR製品番号sc-411576、sc-411576-HDR、sc-411576-NIC、sand c-41

1576-NIC-2 (Santa Cruz Biotechnology) 等は、上記の会社の市販製品リストで見つけることができる。この用語がHHLA2分子に関して本明細書に記載される特徴の任意の組み合わせを指すためにさらに使用され得ることに留意されたい。例えば、配列組成、同一性パーセンテージ、配列長さ、ドメイン構造、機能的活性等の任意の組み合わせを使用して、本発明のHHLA2分子を説明することができる。

【0142】

「HHLA2経路」という用語は、HHLA2およびHHLA2とTMIGD2およびKIR3DL3等のその天然結合パートナーのうちの1つ以上との相互作用を含む。

【0143】

「TMIGD2」という用語は、2、CD28H、IGPR1、およびIGPR-1を含む膜貫通および免疫グロブリンドメインを指し、これは、CD28、CTLA-4、ICOS、およびPD-1と約10%のアミノ酸同一性を有する膜タンパク質である。TMIGD2は、1つの細胞外IgV様ドメイン、膜貫通領域、および2つのチロシンシグナル伝達モチーフを有するプロリンリッチ細胞質ドメインを有する。TMIGD2タンパク質は、全てのナイーブT細胞およびナチュラルキラー（NK）細胞の大半上で構成的に発現されるが、T制御性細胞またはB細胞上では構成的に発現されない。TMIGD2発現は、T細胞の反復刺激により緩徐に失われる。これと一致して、TMIGD2は、メモリーT細胞の約半数のみで発現され、TMIGD2陰性T細胞は、末端が分化した老化表現型を有する。TMIGD2が内皮および上皮細胞で発現され、細胞遊走を減少させる機能を果たし、血管新生中に毛細管形成を促進することも示されている。

【0144】

上述のTMIGD2の構造および機能は、当該技術分野で周知である（例えば、Xiao et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2201-2203、Janakiram et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2359-2366、Zhu et al. (2013) Nat. Commun. 4:2043、およびRahimi (2012) Cell 23:1646-1656）。

【0145】

「TMIGD2」という用語は、その断片、バリエント（例えば、対立遺伝子バリエント）、および誘導体を含むよう意図されている。代表的なヒトTMIGD2 cDNAおよびヒトTMIGD2タンパク質配列は、当該技術分野で周知であり、National Center for Biotechnology Information (NCBI) から公的に入手可能である。ヒトTMIGD2アイソフォームには、アイソフォーム1 (NM_144615.2およびNP_653216.2)、アイソフォーム2 (NM_001169126.1およびNP_001162597.1、バリエント1と比較して3'コーディング領域内で代替インフレームスプライス部位を使用し、アイソフォーム1と比較してより短いアイソフォームをもたらす)、およびアイソフォーム3 (NM_001308232.1およびNP_001295161.1、バリエント1と比較して5'コーディング領域内に代替インフレームエクソンを欠き、アイソフォーム1と比較してより短いアイソフォームをもたらす) が含まれる。ヒト以外の生物中のTMIGD2オルソログの核酸およびポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジーTMIGD2 (XM_009434393.2およびXP_009432668.2、ならびにXM_001138228.4およびXP_001138228.3)、およびウシTMIGD2 (XM_005208980.3およびXP_005209037.1、XM_005208979.3およびXP_005209036.1、ならびにXM_002688933.5およびXP_002688979.1) が含まれる。TMIGD2オルソログの代表的な配列が以下の表1に提示される。

【0146】

TMIGD2タンパク質の検出に好適な抗TMIGD2抗体が当該技術分野で周知であり、例えば、抗体カタログ番号MAB8316、MAB83162、FAB8316R、FAB83162R、FAB83162G、FAB83162N、FAB83162S、

10

20

30

40

50

FAB83162T、FAB83162U、およびFAB83162V (R&D systems)、抗体TA326695 (Origene)、抗体PA5-52787、およびPA5-38055 (ThermoFisher Scientific)、抗体MAB83161およびNBP1-81164 (Novus Biologicals) 等が含まれる。さらに、TMIGD2発現を減少させるための複数のsiRNA、shRNA、CRISPR構築物、例えば、shRNA製品番号TF317829、TG317829、TL317829、TR317829、およびTL317829V、siRNA製品番号SR314913、ならびにCRISPR製品番号KN204938、KN204938LP、KN204938RB、およびKN204938BN (Origene Technologies)、siRNA製品番号i024914、i024914a、i024914b、i024914c、i024914d、iV024914、iV024914a、iV024914b、iV024914c、iV024914d、iAAV02491400、iAAV02491401、iAAV02491402、iAAV02491403、iAAV02491404、iAAV02491405、iAAV02491406、iAAV02491407、iAAV02491408、およびiAAV02491409、ならびにCRISPR製品番号K2409321、K2409301、K2409302、K2409303、K2409304、K2409305、K2409306、K2409307、K2409308、およびK2409311 (Abm)、siRNA製品番号sc-97757、shRNA製品番号sc-97757-SHおよびsc-97757-V、ならびにCRISPR製品番号sc-414261、sc-414261-HDR、sc-414261-NIC、およびsc-414261-NIC-2 (Santa Cruz Biotechnology)、shRNA製品番号SH888208およびSH874720 (Vigene Biosciences) 等は、上記の会社の市販製品リストで見つけることができる。さらに、TMIGD2発現を増加させるための複数のCRISPR構築物、例えば、CRISPR製品番号K2409378、K2409377、K2409376、K2409375、K2409374、K2409373、K2409372、およびK2409371 (Abm)、CRISPR製品番号sc-414261-ACT、sc-414261-ACT-2、sc-414261-LAC、およびsc-414261-LAC-2 (Santa Cruz Biotechnology) 等は、上記の会社の市販製品リストで見つけることができる。この用語がTMIGD2分子に関して本明細書に記載される特徴の任意の組み合わせを指すためにさらに使用され得ることに留意されたい。例えば、配列組成、同一性パーセンテージ、配列長さ、ドメイン構造、機能的活性等の任意の組み合わせを使用して、本発明のTMIGD2分子を説明することができる。

【0147】

上述のTMIGD2とHLA2との間の相互作用、ならびにそれらの機能は、当該技術分野で周知である (例えば、Xiao et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2201-2203、およびJanakiram et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2359-2366を参照のこと)。

【0148】

「KIR3DL3」という用語、別名、キラー細胞免疫グロブリン様受容体3DL3、CD158Z、KIR3DL7、KIR44、KIRC1、KIR2DS2、キラー細胞免疫グロブリン様受容体、3つのIgドメインおよび長い細胞質尾部3とは、ナチュラルキラー細胞およびT細胞のサブセットによって発現される膜貫通糖タンパク質ファミリーのメンバーを指す。キラー細胞免疫グロブリン様受容体 (KIR) 遺伝子は、多型であり、高度に相同であり、それらは、1Mb白血球受容体複合体 (LRC) 内の染色体19q13.4上のクラスターに見られる。KIR遺伝子クラスターの遺伝子含有量はハプロタイプ間で異なるが、いくつかの「フレームワーク」遺伝子が全てのハプロタイプに見られる (KIR3DL3、KIR3DP1、KIR3DL4、KIR3DL2)。KIRタンパク質は、細胞外免疫グロブリンドメイン (2Dまたは3D) の数およびそれらが長い (

L)細胞質ドメインを有するか短い(S)細胞質ドメインを有するかによって分類される。長い細胞質ドメインを有するKIRタンパク質が免疫チロシンベースの阻害性モチーフ(ITIM)を介してリガンド結合時に阻害性シグナルを伝達する一方で、短い細胞質ドメインを有するKIRタンパク質はITIMモチーフを欠き、その代わりに、TYROタンパク質チロシンキナーゼ結合タンパク質に結合して、活性化シグナルを伝達する。いくつかのKIRタンパク質のリガンドはHLAクラスI分子のサブセットであり、それ故に、KIRタンパク質が免疫応答の制御に重要な役割を果たすと考えられている。この遺伝子は、全てのハプロタイプに存在する「フレームワーク」遺伝子座のうちの1つである。KIR3DL3タンパク質は、N末端シグナル配列、3つのIgドメイン、正電荷残基を欠く膜貫通領域、および免疫受容体チロシンベースの阻害性モチーフ(ITIM)を含む長い細胞質尾部を有する。KIR3DL3は、他のKIRに見られるストーク領域を欠く。

【0149】

10

上述のKIR3DL3の構造および機能は、当該技術分野で周知である(例えば、Hsu et al. (2002) Immunol Rev. 190:40-52、Trompeter et al. (2005) J. Immunol. 174:4135-4143、Trundley et al. (2006) Immunogenet. 57:904-916、およびJones et al. (2006) Immunogenet. 58:614-627を参照のこと)。

【0150】

「KIR3DL3」という用語は、その断片、バリエーション(例えば、対立遺伝子バリエーション)、および誘導体を含むよう意図されている。代表的なヒトKIR3DL3 cDNAおよびヒトKIR3DL3タンパク質配列は、当該技術分野で周知であり、National Center for Biotechnology Information (NCBI)から公的に入手可能である。例えば、少なくとも1つのヒトKIR3DL3アイソフォームが既知であり、ヒトKIR3DL3(NM_153443.4)は、転写物(NP_703144.3)によってコード可能である。ヒト以外の生物中のKIR3DL3オルソログの核酸およびポリペプチド配列が周知であり、例えば、チンパンジーKIR3DL3(XM_003316679.3およびXP_003316727.3)、アカゲザルKIR3DL3(NM_001104552.2およびNP_001098022.1)、マウスKIR3DL3(NM_001310690.1およびNP_001297619.1、NM_177749.4およびNP_808417.2、NM_177748.2およびNP_808416.1)、ならびにラットKIR3DL3(NM_181479.2およびNP_852144.1)が含まれる。KIR3DL3オルソログの代表的な配列が以下の表1に提示される。

20

30

【0151】

KIR3DL3タンパク質の検出に好適な抗KIR3DL3抗体が当該技術分野で周知であり、例えば、抗体カタログ番号FAB8919R、MAB8919、FAB8919G、FAB8919N、FAB8919S、FAB8919T、FAB8919U、およびFAB8919V(R&D systems)、抗体AP52374PU-N(Origene)、抗体PA5-26178(ThermoFisher Scientific)、抗体OAA05761、OAA08125、OAA04122、OACA09134、OACA09135、OACD04988、およびOASG01190(Aviva Systems Biology)等が含まれる。さらに、KIR3DL3発現を減少させるための複数のsiRNA、shRNA、CRISPR構築物、例えば、shRNA製品番号TF303684、TR303684、TG303684、TL303684、TL303684V、siRNA製品番号SR314516、ならびにCRISPR製品番号KN224383、KN224383BN、KN224383RB、およびKN224383LP(Origene Technologies)、siRNA製品番号i011627、i011627a、i011627b、i011627c、i011627d、iV011627、iV011627a、iV011627b、iV01162

40

50

7c、iV011627d、iAAV01162700、iAAV01162701、iAAV01162702、iAAV01162703、iAAV01162704、iAAV01162705、iAAV01162706、iAAV01162707、iAAV01162708、およびiAAV01162709、ならびにCRISPR製品番号K1151421、K1151401、K1151402、K1151403、K1151404、K1151405、K1151406、K1151407、K1151408、およびK1151411 (Abm)、siRNA製品番号sc-60892、shRNA製品番号sc-60892-SHおよびsc-60892-V、ならびにCRISPR製品番号sc-406227、sc-406227-KO-2、sc-406227-HDR-2、sc-406227-NIC、およびsc-406227-NIC-2 (Santa Cruz Biotechnology) 等は、上記の会社の市販製品リストで見つけることができる。この用語がKIR3DL3分子に関して本明細書に記載される特徴の任意の組み合わせを指すためにさらに使用され得ることに留意されたい。例えば、配列組成、同一性パーセンテージ、配列長さ、ドメイン構造、機能的活性等の任意の組み合わせを使用して、本発明のKIR3DL3分子を説明することができる。

【0152】

「末梢血球亜型」という用語は、好酸球、好中球、T細胞、単球、NK細胞、顆粒球、およびB細胞を含むが、これらに限定されない末梢血中に通常見られる細胞型を指す。

【0153】

「組換えヒト抗体」という用語は、組換え手段によって調製、発現、作製、または単離された全てのヒト抗体、例えば、(a) ヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックまたはトランス染色体である動物（例えば、マウス）またはそれから調製されたハイブリドーマから単離された抗体（以下にさらに記載される）、(b) 形質転換されて抗体を発現する宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、(c) 組換えコンビナトリアルヒト抗体ライブラリから単離された抗体、および(d) ヒト免疫グロブリン遺伝子配列の他のDNA配列へのスプライシングを伴う任意の他の手段によって調製、発現、作製、または単離された抗体を含む。かかる組換えヒト抗体は、ヒト生殖系列および／または非生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および定常領域を有する。しかしながら、ある特定の実施形態では、かかる組換えヒト抗体は、インビトロ突然変異誘発（または、ヒトIg配列に対してトランスジェニックな動物が使用される場合、インビボ体細胞突然変異誘発）に供され得、それ故に、組換え抗体のV_H領域およびV_L領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列V_H配列およびV_L配列に由来し、かつそれに関連している一方で、インビボでヒト抗体生殖系列レパートリー中に天然に存在しない場合がある配列である。

【0154】

少なくとも1つのバイオマーカーの存在またはレベルを検出または決定するために使用される「試料」という用語は、典型的には、全血、血漿、血清、唾液、尿、糞便（例えば、糞）、涙、および任意の他の体液（例えば、上記の「体液」の定義下で記載されたもの）、または組織試料（例えば、生検）、例えば、小腸、結腸試料、または外科的切除組織である。ある特定の例では、本発明の方法は、試料中の少なくとも1つのマーカーの存在またはレベルの検出または決定前に個体から試料を得ることをさらに含む。

【0155】

本明細書で使用される「RNA干渉剤」は、RNA干渉(RNAi)によって標的バイオマーカー遺伝子の発現に干渉するか、またはそれを阻害する任意の薬剤として定義される。かかるRNA干渉剤には、本発明の標的バイオマーカー遺伝子と相同のRNA分子を含む核酸分子またはその断片、短干渉RNA(siRNA)、およびRNA干渉(RNAi)によって標的バイオマーカー核酸の発現に干渉するか、またはそれを阻害する小分子が含まれるが、これらに限定されない。

【0156】

「RNA干渉(RNAi)」とは、標的バイオマーカー核酸と同一または極めて同様の

配列のRNAの発現または導入により、標的とされた遺伝子から転写されたメッセンジャーRNA (mRNA) の配列特異的分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) がもたらされ (Coburn, G. and Cullen, B. (2002) J. of Virology 76 (18) : 9225を参照のこと)、それにより、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害する、進化的に保存されたプロセスである。一実施形態では、RNAは、二本鎖RNA (dsRNA) である。このプロセスは、植物、脊椎動物、および哺乳類細胞で説明されている。自然界では、RNAiは、dsRNA特異的エンドヌクレアーゼDicerによって開始され、それにより、長いdsRNAのsiRNAと呼ばれる二本鎖断片への前進的な切断が促進される。siRNAは、標的mRNAを認識して切断するタンパク質複合体に組み込まれる。RNAiは、核酸分子、例えば、合成siRNA、shRNA、または他のRNA干渉剤の導入によって開始されて、標的バイオマーカー核酸の発現を阻害またはサイレンシングすることもできる。本明細書で使用される場合、「標的バイオマーカー核酸発現の阻害」または「マーカー遺伝子発現の阻害」は、標的バイオマーカー核酸または標的バイオマーカー核酸によってコードされるタンパク質の発現またはタンパク質活性もしくはレベルの任意の減少を含む。この減少は、RNA干渉剤によって標的とされていない標的バイオマーカー核酸の発現または標的バイオマーカー核酸によってコードされるタンパク質の活性もしくはレベルと比較して、少なくとも30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、もしくは99%、またはそれ以上であり得る。

【0157】

RNAiに加えて、ゲノム編集を使用して、目的とするバイオマーカーのコピー数または遺伝子配列、例えば、HLA2、TMIGD2、および／またはKIR3DL3等のHLA2経路成分等の目的とするバイオマーカーの構成的または誘導性ノックアウトまたは突然変異を調節することができる。例えば、CRISPR-Cas系が、ゲノム核酸の正確な編集のために (例えば、非機能的またはヌル突然変異を引き起こすために) 使用され得る。かかる実施形態では、CRISPRガイドRNAおよび／またはCas酵素が発現され得る。例えば、ガイドRNAのみを含むベクターが、Cas9酵素に対してトランスジェニックな動物または細胞に投与され得る。同様の戦略が使用され得る (例えば、デザイナー亜鉛フィンガー、転写活性化因子様エフェクター (TALE)、またはホーミングメカヌクレアーゼ)。かかる系は、当該技術分野で周知である (例えば、米国特許第8,697,359号、Sander and Joung (2014) Nat. Biotech. 32:347-355、Hale et al. (2009) Cell 139:945-956、Karginov and Hannon (2010) Mol. Cell 37:7、米国特許公開第2014/0087426号および同第2012/0178169号、Boch et al. (2011) Nat. Biotech. 29:135-136、Boch et al. (2009) Science 326:1509-1512、Moscou and Bogdanove (2009) Science 326:1501、Weber et al. (2011) PLoS One 6:e19722、Liet al. (2011) Nucl. Acids Res. 39:6315-6325、Zhang et al. (2011) Nat. Biotech. 29:149-153、Miller et al. (2011) Nat. Biotech. 29:143-148、Lin et al. (2014) Nucl. Acids Res. 42:e47を参照のこと)。かかる遺伝子戦略は、当該技術分野で周知の方法に従って構成的発現系または誘導性発現系を使用することができる。

【0158】

「Piwi相互作用RNA (piRNA)」とは、低分子非コーディングRNAの最大クラスである。piRNAは、Piwiタンパク質との相互作用によりRNA-タンパク質複合体を形成する。これらのpiRNA複合体は、生殖系列細胞、特に精子形成時の生殖系列細胞におけるレトロトランスポゾンおよび他の遺伝要素の後成的遺伝子サイレンシングおよび転写後遺伝子サイレンシングの両方に関連している。これらは、サイズ (21

～24ヌクレオチドではなく26～31ヌクレオチド)、配列保存の欠如、および複雑さの増大の点でマイクロRNA(miRNA)と異なる。しかしながら、他の低分子RNAと同様に、piRNAは、遺伝子サイレンシング、特にトランスポゾンサイレンシングに関与すると考えられている。piRNAの大半がトランスポゾン配列に対してアンチセンスであり、これは、トランスポゾンがpiRNA標的であることを示唆する。哺乳動物において、トランスポゾンサイレンシング時のpiRNAの活性が胚発生中に最も重要であると思われ、C. elegansおよびヒトの両方において、piRNAが精子形成に必要である。piRNAは、RNA誘導性サイレンシング複合体(RISC)の形成によるRNAサイレンシングにおいて役割を果たす。

【0159】

「アプタマー」とは、特定の標的分子に結合するオリゴヌクレオチドまたはペプチド分子である。「核酸アプタマー」とは、様々な分子標的、例えば、小分子、タンパク質、核酸、さらには細胞、組織、および生物に結合するようにインビトロ選択ラウンドの繰り返しまたは同等にSELEX(指数関数的濃縮によるリガンドの系統的進化)により操作された核酸種である。「ペプチドアプタマー」とは、特定の標的分子に結合するように選択または操作された人工タンパク質である。これらのタンパク質は、タンパク質骨格によって呈される可変配列の1つ以上のペプチドループからなる。これらは、典型的には、コンビナトリアルライブラリから単離され、その後、多くの場合、定方向突然変異または可変領域突然変異誘発および選択ラウンドによって改善される。ペプチドアプタマーの進化である「アフィマータンパク質」とは、特定の標的タンパク質に高親和性結合表面を提供するペプチドループを呈するように操作された高度に安定した小さいタンパク質である。これは、シスタチンのシステインプロテアーゼ阻害剤ファミリーに由来する低分子量(12～14kDa)のタンパク質である。アプタマーは、一般に使用される生体分子である抗体と競合する分子認識特性を提供するため、生物工学的用途および治療的用途に有用である。それらの区別認識に加えて、アプタマーは、試験管内で完全に操作され得、化学合成によって容易に産生され、望ましい保管特性を有し、かつ治療的用途において免疫原性をほとんどまたは全く誘発しないため、抗体に優る利点を提供する。

【0160】

本明細書で「低分子干渉RNA」とも称される「短干渉RNA」(siRNA)は、例えば、RNAiによって標的バイオマーカー核酸の発現を阻害する機能を果たす薬剤として定義される。siRNAは、化学的に合成され得るか、インビトロ転写によって産生され得るか、または宿主細胞中に産生され得る。一実施形態では、siRNAは、約15～約40ヌクレオチド長、好ましくは約15～約28ヌクレオチド長、より好ましくは約19～約25ヌクレオチド長、より好ましくは約19、20、21、または22ヌクレオチド長の二本鎖RNA(dsRNA)分子であり、約0、1、2、3、4、または5ヌクレオチド長を有する3'および/または5'オーバーハングを各鎖に有し得る。オーバーハングの長さは、これらの2つの鎖間で独立しており、すなわち、一方の鎖上のオーバーハングの長さは、第2の鎖上のオーバーハングの長さに依存しない。好ましくは、siRNAは、標的メッセンジャーRNA(mRNA)の分解または特異的転写後遺伝子サイレンシング(PTGS)によりRNA干渉を促進することができる。

【0161】

別の実施形態では、siRNAは、小ヘアピン(ステムループとも呼ばれる)RNA(shRNA)である。一実施形態では、これらのshRNAは、短い(例えば、19～25ヌクレオチドの)アンチセンス鎖、続いて、5～9ヌクレオチドのループ、および類似センス鎖から成る。あるいは、センス鎖がヌクレオチドループ構造に先行する場合があります、アンチセンス鎖が続き得る。これらのshRNAは、プラスミド、レトロウイルス、およびレンチウイルス中に含まれ得、例えば、ポリメラーゼIII U6プロモーター、または別のプロモーターから発現され得る(例えば、参照により本明細書に組み込まれるStewart, et al. (2003) RNA Apr; 9(4): 493-501を参照のこと)。

10

20

30

40

50

【0162】

RNA干渉剤、例えば、siRNA分子は、がんで過剰発現されるバイオマーカー遺伝子の発現を阻害し、それにより、対象におけるがんを治療、予防、または抑制するために、がんを有するか、またはがんを有する危険性のある患者に投与され得る。

【0163】

「小分子」という用語は、当該技術分野の用語であり、約1000分子量未満または約500分子量未満の分子を含む。一実施形態では、小分子は、ペプチド結合を排他的に含まない。別の実施形態では、小分子は、オリゴマーではない。活性についてスクリーニングされ得る例示の小分子化合物には、ペプチド、ペプチド模倣薬、核酸、炭水化物、有機小分子（例えば、ポリケチド）（Cane et al., 1998, Science 282: 63）、および天然産物抽出物ライブラリが含まれるが、これらに限定されない。別の実施形態では、これらの化合物は、非ペプチド性有機小分子化合物である。さらなる実施形態では、小分子は、生合成のものではない。

【0164】

生物学的に活性な薬剤に適用される「選択的モジュレーター」または「選択的に調節する」という用語は、標的との直接または相互作用相互作用により、オフターゲット細胞集団、シグナル伝達活性等と比較して、細胞集団、シグナル伝達活性等の標的を調節する薬剤の能力を指す。例えば、HLA2とTMIGD2およびKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用をHLA2と別の結合パートナーとの間の別の相互作用よりも選択的に阻害する薬剤、および／または目的とする細胞集団におけるかかる相互作用（複数可）は、HLA2経路モジュレーター療法（例えば、HLA2とTMIGD2およびKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーター、少なくとも1つの他の結合パートナーに対する薬剤の活性の少なくとも5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、2倍、またはそれ以上である（例えば、少なくとも約3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、65倍、70倍、75倍、80倍、85倍、90倍、95倍、100倍、105倍、110倍、120倍、125倍、150倍、200倍、250倍、300倍、350倍、400倍、450倍、500倍、600倍、700倍、800倍、900倍、1000倍、1500倍、2000倍、2500倍、3000倍、3500倍、4000倍、4500倍、5000倍、5500倍、6000倍、6500倍、7000倍、7500倍、8000倍、8500倍、9000倍、9500倍、10000倍、もしくはそれ以上、またはそれらの間の任意の範囲（境界値も含む）である相互作用）に対する活性を有し得る。かかる測定基準は、典型的には、相互作用／活性を半減させるのに必要な薬剤の相対量の観点で表現される。

【0165】

より一般には、「選択的」という用語は、優先的な作用または機能を指す。「選択的」という用語は、他の標的と比較した目的とする特定の標的における優先的効果の観点で定量化され得る。例えば、測定変数（例えば、他の細胞（Tcon等の他の免疫細胞等）に対するTreg/Bregの調節）は、10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍、もしくはそれ以上、またはそれらの間の任意の範囲（境界値も含む）（例えば、50%～16倍）であり得、意図されないまたは望ましくない標的に対する目的とする標的では異なる。同じ倍率分析を使用して、所与の組織、細胞集団、測定変

数、測定効果等、例えば、 $Treg : Tcon$ 比、 $Breg : Tcon$ 比、過剰増殖性細胞成長速度または体積、 $Treg / Breg$ 増殖速度または数等における効果の規模を確認することができる。

【0166】

対照的に、「特異的」という用語は、排他的作用または機能を指す。例えば、 $HHLA2-TMIGD2$ 相互作用および $HHLA2-KIR3DL3$ 相互作用の特異的調節は、それぞれ、 $HHLA2 / TMIGD2$ 相互作用および $HHLA2 / KIR3DL3$ 相互作用の排他的調節を指し、別のリガンドでの $HHLA2$ の調節ではない。別の例では、抗体の所定の抗原への特異的結合とは、他の抗原に結合することなく目的とする抗原に結合する抗体の能力を指す。典型的には、抗体は、目的とする抗原を分析物として、かつ抗体をリガンドとして使用したBIACORE（登録商標）アッセイ器具における表面プラズモン共鳴（SPR）技術によって決定される場合、およそ $1 \times 10^{-7} M$ 未満、例えば、およそ $10^{-8} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $10^{-10} M$ 、 $10^{-11} M$ 未満、またはそれよりもさらに低い親和性（ K_D ）で結合し、所定の抗原以外の非特異的抗原（例えば、BSA、カゼイン）または密接に関連した抗原への結合に対するその親和性よりも少なくとも1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、もしくは10.0倍、またはそれ以上高い親和性で所定の抗原に結合する。加えて、 K_D は、 K_A の逆数である。「抗原を認識する抗体」および「抗原に特異的な抗体」という語句は、本明細書で「抗原に特異的に結合する抗体」という用語と同義に使用され得る。

【0167】

「感作させる」という用語は、療法（例えば、 $HHLA2$ 経路モジュレーター療法（例えば、 $HHLA2$ と $TMIGD2$ および $KIR3DL3$ 等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーター）を単独でまたは免疫チェックポイント阻害療法等の免疫療法と組み合わせてのいずれかで）を用いてより有効な治療を可能にする方法で、がん細胞または腫瘍細胞等の細胞を改変することを意味する。いくつかの実施形態では、正常細胞は、療法（例えば、 $HHLA2$ 経路モジュレーター療法（例えば、 $HHLA2$ と $TMIGD2$ および $KIR3DL3$ 等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーター）を単独でまたは免疫チェックポイント阻害療法等の免疫療法と組み合わせてのいずれかで）によって正常細胞を過度に損傷させる程度に影響を及ぼされない。治療的治療に対する感受性の増加または感受性の低下は、細胞増殖性アッセイ（Tanigawa N, Kern D H, Kikasa Y, Morton D L, Cancer Res 1982; 42: 2159-2164）、細胞死アッセイ（Weisenthal L M, Shoemaker R H, Marsden J A, Dill P L, Baker J A, Moran E M, Cancer Res 1984; 94: 161-173、Weisenthal L M, Lippman M E, Cancer Treat Rep 1985; 69: 615-632、Weisenthal L M, In: Kaspers G J L, Pieters R, Twentyman P R, Weisenthal L M, Veerman A J P, eds. Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma. Langhorne, P A: Harwood Academic Publishers, 1993: 415-432、Weisenthal L M, Contrib Gynecol Obstet 1994; 19: 82-90）を含むが、これらに限定されない、以下の本明細書に記載の特定の治療および方法について当該技術分野で既知の方法に従って測定される。感受性または抵抗性は、腫瘍サイズ減少をある期間、例えば、ヒトの場合6ヶ月およびマウスの場合4～6週間にわたって測定することによって動物においても測定され得る。組成物または方法は、治療感受性の増加または抵抗性の減少が、かかる組成物または方法の不在下での治療感受性または抵抗性と比較して、5%またはそれ以上、例えば、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、またはそれ以上～2倍、3倍、4

倍、5倍、10倍、15倍、20倍、またはそれ以上である場合、治療的治療に対する応答を感作させる。治療的治療に対する感受性または抵抗性の決定は、当該技術分野で通例であり、当業臨床医の技術の範囲内である。免疫調節の有効性を増強するための本明細書に記載のいずれの方法も、過剰増殖性またはさもなければがん性細胞（例えば、耐性細胞）を療法に対して感作させる方法に同等に適用され得ることを理解されたい。

【0168】

「相乗効果」という用語は、2つ以上のHHLA2経路モジュレーター、HHLA2経路モジュレーターおよび免疫療法、HHLA2経路モジュレーターを単独でまたは免疫チェックポイント阻害療法等の免疫療法と組み合わせてのいずれか等の2つ以上の治療薬の併用効果が、抗がん剤単独の個別の効果の合計を上回り得ることを指す。

【0169】

「対象」という用語は、任意の健常動物、哺乳動物、もしくはヒト、または目的とする状態（例えば、がん）に罹患している任意の動物、哺乳動物、もしくはヒトを指す。「対象」という用語は、「患者」と同義である。

【0170】

「生存期間」という用語には、死亡までの生存期間、別名、全生存期間（当該死亡は、原因を問わないか、または腫瘍関連のいずれかであり得る）、「無再発生存期間」（再発という用語は、局所再発および遠隔再発の両方を含むものとする）、無転移生存期間、無病生存期間（病という用語は、がんおよびそれに関連する疾患を含むものとする）の全てが含まれる。当該生存期間の長さは、定義された開始点（例えば、診断時または治療開始時）および終点（例えば、死、再発、または転移）を参照することによって計算され得る。加えて、治療有効性についての基準は、化学療法に対する応答、生存確率、所与の期間以内の転移確率、および腫瘍再発確率を含むように拡大され得る。

【0171】

「治療効果」という用語は、薬理学的に活性な物質によって引き起こされる動物、具体的には哺乳動物、より具体的にはヒトにおける局所または全身効果を指す。したがって、この用語は、動物もしくはヒトにおける疾患の診断、治療、緩和、治療、もしくは予防、または望ましい身体もしくは精神発達および状態の増強における使用を目的とした任意の物質を意味する。「治療有効量」という語句は、いずれの治療にも適用可能な合理的なベネフィット／リスク比でいくらかの所望の局所または全身効果をもたらすかかる物質の量を意味する。ある特定の実施形態では、化合物の治療有効量は、その治療指数、溶解度等に依存するであろう。例えば、本発明の方法によって見出されたある特定の化合物が、かかる治療に適用可能な合理的なベネフィット／リスク比をもたらすのに十分な量で投与され得る。

【0172】

本明細書で使用される「治療有効量」および「有効量」という用語は、いずれの医学的治療にも適用可能な合理的なベネフィット／リスク比で動物における細胞の少なくとも亜集団にいくらかの所望の治療効果をもたらすのに有効な、化合物、本発明の化合物を含む材料、または組成物の量を意味する。対象化合物の毒性および治療有効性は、例えば、LD₅₀およびED₅₀を決定するための、細胞培養または実験動物における標準の医薬品手順によって決定され得る。高い治療指数を呈する組成物が好ましい。いくつかの実施形態では、LD₅₀（致死投薬量）が測定され得、薬剤の投与なしと比較して、薬剤に対して、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、またはそれ以上減少し得る。同様に、ED₅₀（すなわち、症状の半最大阻害を達成する濃度）が測定され得、薬剤の投与なしと比較して、薬剤に対して、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、またはそれ以上増加し得る。また、同様に、IC₅₀（すなわち、がん細胞への半最大細胞毒性または細胞増殖抑制効果を達成

10

20

30

40

50

する濃度)が測定され得、薬剤の投与なしと比較して、薬剤に対して、例えば、少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%、またはそれ以上増加し得る。いくつかの実施形態では、アッセイにおけるがん細胞成長が、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはさらには100%阻害され得る。がん細胞死が、少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはさらには100%促進され得る。別の実施形態では、がん細胞数および／または固形悪性腫瘍の少なくとも約10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはさらには100%の減少が達成され得る。

【0173】

「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という用語は、タンパク質がタンパク質の合成に関与する化学的前駆体または他の化学物質から分離される、抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質の調製を含む。一実施形態では、「化学的前駆体または他の化学物質を実質的に含まない」という言語は、約30%未満(乾燥重量で)の化学的前駆体または非抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質化学物質、より好ましくは約20%未満の化学的前駆体または非抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質化学物質、なおより好ましくは約10%未満の化学的前駆体または非抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質化学物質、最も好ましくは約5%未満の化学的前駆体または非抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質化学物質を有する抗体、ポリペプチド、ペプチド、または融合タンパク質の調製物を含む。

【0174】

「転写ポリヌクレオチド」または「ヌクレオチド転写物」とは、本発明のマーカの転写およびRNA転写物(存在する場合)の正常転写後プロセッシング(例えば、スプライシング)、およびRNA転写物の逆転写によって作製される成熟mRNAの全てまたは一部に相補的なまたはそれと相同のポリヌクレオチド(例えば、mRNA、hnRNA、cDNA、成熟miRNA、プレmiRNA、プリmiRNA、miRNA*、抗miRNA、もしくはmiRNA結合部位、またはそれらのバリエーション、またはかかるRNAもしくはcDNAの類似体)である。

【0175】

「ベクター」という用語は、それが連結されている別の核酸を輸送することができる核酸を指す。1つの種類のベクターは、追加のDNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。別の種類のベクターは、追加のDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得るウイルスベクターである。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができる(例えば、細菌性複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳類ベクター)。他のベクター(例えば、非エピソード哺乳類ベクター)は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指示することができる。かかるベクターは、本明細書で「組換え発現ベクター」または単に「発現ベクター」と称される。一般に、組換えDNA技法で有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミドの形態である。本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、プラスミドがベクターの最も一般に使用されている形態であるため、同義に使用され得る。しかしながら、本発明は、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス)等の同等の機能を果たす発現ベクターの他の形態を含むよう意図されている。

【0176】

特定のタンパク質のアミノ酸配列と、遺伝子コード（以下に示される）によって定義されるタンパク質をコードし得るヌクレオチド配列との間に既知の明確な対応関係が存在する。同様に、特定の核酸のヌクレオチド配列と、遺伝子コードによって定義される核酸によってコードされるアミノ酸配列との間に既知の明確な対応関係が存在する。

【表 1 4】

遺伝子コード

アラニン (Ala, A)	GCA, GCC, GCG, GCT	
アルギニン (Arg, R)	AGA, ACG, CGA, CGC, CGG, CGT	
アスパラギン (Asn, N)	AAC, AAT	10
アスパラギン酸 (Asp, D)	GAC, GAT	
システイン (Cys, C)	TGC, TGT	
グルタミン酸 (Glu, E)	GAA, GAG	
グルタミン (Gln, Q)	CAA, CAG	
グリシン (Gly, G)	GGA, GGC, GGG, GGT	
ヒスチジン (His, H)	CAC, CAT	
イソロイシン (Ile, I)	ATA, ATC, ATT	
ロイシン (Leu, L)	CTA, CTC, CTG, CTT, TTA, TTG	20
リジン (Lys, K)	AAA, AAG	
メチオニン (Met, M)	ATG	
フェニルアラニン (Phe, F)	TTC, TTT	
プロリン (Pro, P)	CCA, CCC, CCG, CCT	
セリン (Ser, S)	AGC, AGT, TCA, TCC, TCG, TCT	
トレオニン (Thr, T)	ACA, ACC, ACG, ACT	
トリプトファン (Trp, W)	TGG	
チロシン (Tyr, Y)	TAC, TAT	30
バリン (Val, V)	GTA, GTC, GTG, GTT	
終結シグナル (終了)	TAA, TAG, TGA	

【0 1 7 7】

遺伝子コードの重要な周知の特徴は、その冗長性であり、それにより、タンパク質を製作するために使用されるアミノ酸の大半には、1つより多くのコーディングヌクレオチドトリプレットが用いられ得る（上で例証される）。したがって、いくつかの異なるヌクレオチド配列が所与のアミノ酸配列をコードし得る。かかるヌクレオチド配列は、全ての生物における同じアミノ酸配列の産生をもたらすため（ある特定の生物はいくつかの配列を他の配列よりも効率的に翻訳し得るが）、機能的に同等であるとみなされる。さらに、時折、プリンまたはピリミジンのメチル化バリエーションが所与のヌクレオチド配列に見られ得る。かかるメチル化は、トリヌクレオチドコドンと対応するアミノ酸との間のコーディング関係に影響を及ぼさない。

【0 1 7 8】

前述を考慮して、バイオマーカー核酸（またはその任意の部分）をコードするDNAまたはRNAのヌクレオチド配列は、DNAまたはRNAをアミノ酸配列に翻訳するための遺伝子コードを使用してポリペプチドアミノ酸配列を得るために使用され得る。同様に、ポリペプチドアミノ酸配列について、ポリペプチドをコードすることができる対応するヌクレオチド配列が遺伝子コードから推定され得る（その冗長性のため、任意の所与のアミノ酸配列に対して複数の核酸配列がもたらされる）。したがって、ポリペプチドをコード

40

50

するヌクレオチド配列の本明細書における説明および／または開示は、ヌクレオチド配列によってコードされるアミノ酸配列の説明および／または開示も含むとみなされるべきである。同様に、本明細書におけるポリペプチドアミノ酸配列の説明および／または開示は、アミノ酸配列をコードすることができる全ての可能なヌクレオチド配列の説明および／または開示も含むとみなされるべきである。

【0179】

最後に、本発明に有用な核酸およびポリペプチド分子の核酸およびアミノ酸配列情報は、当該技術分野で周知であり、National Center for Biotechnology Information (NCBI) 等の公的に利用可能なデータベースで容易に入手可能である。例えば、公的に利用可能な配列データベースに由来する例示の核酸およびアミノ酸配列が、以下の表1に提供される。

表1

配列番号1：ヒトHHLA2バリエーション1 cDNA配列 (NM_007072.3、415～1659位由来のCDS領域)

10

20

30

40

50

【表 1 - 1】

```

1 agttctcttc aagtcattgta atcgactttt ttgaattagt tttcagtttc attttgtttt
61 ccctaattca agttgggaac acttcatttt ccccaattca agttgggaac acttccttgg
121 tatttccttg ctacatggac tttagcaaat gctactttac tctccttcca gctactcagg
181 aggctgaggg aggagaatcg cttgaacccg ggaggoggag gttacagtga gccttttctt
241 agttttactg ttggaagcct aactcacagg agagattatg caatacagtc ctgaagtcaa
301 gggaggagag catgtaggag aatactaacc ctgcacagat tgtgatgggt atgtggaata
361 tactaaagcc tagaacgcac ctctcttgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag
421 gcacagacag cactgtcttt ctctctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaaggc
481 atattccctt tggcttttct catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga
541 cttgatgaag atataattct cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac
601 tggaagtatc aagatagcta taagggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttggaa
661 agccaagatc ccagatatgc aaacaggaca tcccttttct ataagagat tcaaatggg
721 aatgcgtcgc taattcaagt gattacaac aagtggtgc taaagtggtg agtttttctc
781 gtaggaacag caattcaagt gattacaac aagtggtgc taaagtggtg agtttttctc
841 acaccctgta tgaagtatga aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta
901 agtggtttat ctcttccaat tatcacgtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaaac
961 aacatggaag aaacagggtc tttggattct ttttctatta acagcccact gaatattaca
1021 ggatcaaatt catcttatga atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca
1081 gggcgctgga cgatgaaaga tggccttcat aaaatgcaa gtgaacacgt ttcactctca
1141 tgtcaacctg taaatgatta tttttcacc aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga
1201 atgaaaagtg ggactttctc tgtcctggct tactatctga gctcctcaca aaatacaatt
1261 atcaatgaat cccgattctc atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg
1321 aatttgatgg atcttaattc ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat
1381 gaataactt tacttaccat ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc
1441 cataacaaag gcttatggat tttggtgccc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt
1501 tggagcgtaa aatgttgtag agcccagcta gaagccagga ggagcagaca cctgctgat
1561 ggagcccaac aagaaagatg ttgtgtccct cctggtgagc gctgtccag tgcacccgat
1621 aatggcgaag aaaatgtgcc tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac
1681 aactcatgac ctgcatectt aatatccagt gacttcactc cccctttctt caccacaatt
1741 ccaggcaatg gcctgtcgga gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccatttct
1801 tggatcacca tttatttttc aagacatact tttcaagaca tcattcactg accactacc
1861 tgcatgtagt ataaatgcct ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc
1921 tcattcattt acatttctgt tacagtcagc ccaggagggt acagtgagct ctccactaag
1981 aatctggaag aaatgcatca ctagggttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg
2041 agagagcagg taagagccaa agtcacctta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa
2101 ccaagatgat tgatttgaca aggtatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg
2161 gtaaccaact cgatttgga tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag
2221 attgctaggg aaaagggccc tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc
2281 cctgtgattt gcacgtatac atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc aaaaagaag
2341 taaaaatagc cttaactgat gacattccac cattgtgatt tgttctgccc ccaccctaac
2401 tgatcaatgt actttgtaat ctccccacc cttaagaagg tactttgtaa tcttccccac
2461 ccttaagaag gttcttttga attctcccca cccttgagaa tgtactttgt gagatccacc
2521 ctgcccacaa aacattgctc ttaacttcac cgctaacc aaacactata agaactaatg
2581 ataatccatc acccttcgct gactctcttt tgggactcag cccacctgca cccagggtga
2641 ataaacagct ttattgctca cacaacaaaa aaaaaaaaaa

```

10

20

30

配列番号 2 : ヒト HHLA2 バリエント 1 アミノ酸配列 (NP_009003.1)

【表 1 - 2】

```

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGDH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDEGIYT
121 CYVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGETFSV LAYYLSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF
301 SMNLMDLNLN DSGEYLCNIS SDEYTLTIIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAAFL
361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSP PDNGEENVPL SGKV

```

40

配列番号 3 : ヒト HHLA2 バリエント 2 cDNA 配列 (NM_001282556.1、224~1468 位由来の CDS 領域)

50

【表 1 - 3】

```

1 aaatcaaacg taccttgac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat
61 tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga
121 actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa
181 ttggatttgg ggaagagcat gactaatatg ttctgcacaa gacatgaagg cacagacagc
241 actgtctttc ttctcattc tcataacatc tctgagtggg tctcaaggca tttccctttt
301 ggctttcttc atttatgttc ctatgaatga acaaatcgtc attggaagac ttgatgaaga
361 tataattctc ccttcttcat ttgagagggg atccgaagtc gtaatacact ggaagtatca
421 agatagctat aagggttcaca gttactacaa aggcagtga ctttggaaa gccagatcc
481 cagatatgca aacaggacat cccttttcta taatgagatt caaaatggga atgctgctgt
541 atttttcaga agagtaagcc ttctggacga aggaatttac acctgctatg taggaacagc
601 aattcaagtg attacaaaca aagtgggtgt aaagggtggg gtttttctca caccctgat
661 gaagtatgaa aagaggaaca caaacagctt cttaatatgc agcgtgttaa gtgtttatcc
721 tcgtccaatt atcacgtgga aaatggacaa cacacctatc tctgaaaaca acatggaaga
781 aacagggtct ttggattctt tttctattaa cagcccactg aatattacag gatcaaattc
841 atcttatgaa tgtacaattg aaaattcact gctgaagcaa acatggacag ggcgtggac
901 gatgaaagat ggccttcata aaatgcaaag tgaacacgtt tcaactctcat gtcaacctgt
961 aaatgattat ttttcaccaa accaagactt caaagttact tgggtccagaa tgaagggtg
1021 gactttctct gtcttggtt actatctgag ctctcacaa aatacaatta tcaatgaatc
1081 ccgattctca tggacaacaa agctgataaa ccagagtga cttctctatga atttgatgga
1141 tcttaattct tcagacagtg gggaatatat atgcaatat tcttcggatg aatatacttt
1201 acttaccatc cacacagtgc atgtagaacc gagccaagaa acagcttccc ataacaaagg
1261 cttatggatt ttggtgccct ctgcgatttt ggcagctttt ctgctgattt ggagcgtaaa
1321 atgttgacga gccagctag aagccaggag gagcagacac cctgctgatg gagcccaaca
1381 agaaagatgt tgtgtccctc ctggtgagcg ctgtcccagt gaccccgata atggcgaaga
1441 aaatgtgctt ctttcaggaa aagtatagga aatgagagaa gactgtgaca actcatgacc
1501 tgcatectta atatccagt acttcatctc ccctttcttc accacaattc caggcaatgg
1561 cctgtcggag cagacaattc taccactgca aagagttgta accattttct ggtatcacat
1621 ttatttttca agacatactt ttcaagacat cattcactga cccactacct gcattgagta
1681 taaatgcttg gatgttaagg attccaattt aactttgaaa agaactgtct cattcattta
1741 catttctggt acagtcagcc caggagggtta cagtgaagtc tccactaaga atctggaaga
1801 aatgcatcac taggggttga ttcccaatct gatcaactga taatgggtga gagagcaggt
1861 aagagccaaa gtcaccttag tggaaagggt aaaaaccaga gcctggaaac caagatgatt
1921 gatttgacaa ggtatttttag tctagtttta tatgaacggt tgtatcaggg taaccaactc
1981 gatttgggat gaatcttagg gcaccaaaga ctaagacagt atctttaaga ttgctaggga
2041 aaagggccct atgtgtcagg cctctgagcc caagccaagc atcgcatccc ctgtgatttg
2101 caggtatata tccagatggc cttaaagtaac tgaagatcca caaaagaagt aaaaatagcc
2161 ttaactgatg acattccacc attgtgattt gttcctgccc caccctaact gatcaatgta
2221 ctttgtaatc tccccaccc ttaagaagggt actttgtaat ctccccacc ctttaagaagg
2281 ttctttgtaa ttctccccc ccttgagaat gtactttgtg agatccccc tgcaccacaa
2341 acattgctct taacttcacc gcctaaccac aaacctataa gaactaatga taatccatca
2401 cccttcgctg actctctttt cggactcagc ccacctgcac ccagggtgaaa taaacagctt
2461 tattgtctac acaaaaaaaaa aaaaaaaaa

```

10

20

30

配列番号 4 : ヒト HHLA2 バリエント 2 アミノ酸配列 (NP_001269485.1)

【表 1 - 4】

```

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLEDEGIYT
121 CYVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKS GTF SV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSD F
301 SMNLMDLNL S DSGEYLCNIS SDEYTLTTH TVHVEPSQET ASHNGKLWIL VPSAILAAFL
361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCP SA PDNGEENVPL SGKV

```

40

配列番号 5 : ヒト HHLA2 バリエント 3 cDNA 配列 (NM_001282557.1、155~1399 位由来の CDS 領域)

【表 1 - 5】

```

1 agtttactct acatcatagc agagaaaaatg gacaaaacac agctgttttg catgtaggag

```

50

【表 1 - 6】

```

61 aataactaacc ctgcacagat tgtgatgggtg atgtggaata tactaaagcc tagaacgcac
121 ctccctctgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag gcacagacag cactgtcttt
181 ctccctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaaggc atattccctt tggcctttctt
241 catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga cttgatgaag atataattct
301 cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac tggaggtatc aagatagcta
361 taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttgga agccaagatc ccagatatgc
421 aaacaggaca tcccttttct ataatgagat tcaaaatggg aatgcgtcgc tatttttctag
481 aagagtaagc cttctggacg aaggaattta cacctgctat gtaggaacag caattcaagt
541 gattacaaac aaagtgggtgc taaagggtggg agtttttctc acaccctgta tgaagtatga
601 aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta agtgtttatc ctgctccaat
661 tatcacgtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaaac aacatggaag aaacagggtc
721 tttggattct ttttctatta acagccact gaattattaca ggatcaaatt catcttatga
781 atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca gggcgtgga cgatgaaaga
841 tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttcactctca tgtcaacctg taaatgatta
901 tttttcacca aaccaagact tcaaagttac ttgggtccaga atgaaaagtg ggactttctc
961 tgtcctggct tactatctga gctcctcaca aaatacaatt atcaatgaat cccgattctc
1021 atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg aatttgatgg atcttaattc
1081 ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat gaataactt tacttaccat
1141 ccacacagt catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc cataacaaag gcttatggat
1201 tttgggtgcc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt tggagcgtaa aatggtgcag
1261 agccagcta gaagccagga ggagcagaca cctgctgat ggagcccaac aagaaagatg
1321 ttgtgtccct cctggtgagc gctgtcccag tgcaccgat aatggcgaag aaaatgtgcc
1381 tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac aactcatgac ctgcatcctt
1441 aatatccagt gacttcatct cccctttctt caccacaatt ccaggcaatg gcctgtcggg
1501 gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccattttc tggatcaca tttatttttc
1561 aagacatact tttcaagaca tcattcactg acccactacc tgcattgagt ataaatgcct
1621 ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc tcattcattt acattttctgt
1681 tacagtcagc ccaggaggtt acagtgagct ctccactaag aatctggaag aaatgcatca
1741 ctagggttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg agagagcagg taagagccaa
1801 agtcaccta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa ccaagatgat tgatttgaca
1861 aggtatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg gtaaccaact cgatttgga
1921 tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag attgctaggg aaaagggccc
1981 tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc cctgtgattt gcacgtatac
2041 atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag taaaaatagc cttaactgat
2101 gacattccac cattgtgatt tgttctctgc ccaccctaac tgatcaatgt actttgtaat
2161 ctccccacc cttagaaggg tactttgtaa tcttccccac ccttaagaag gttctttgta
2221 attctccca cccttgagaa tgtactttgt gagatecacc ctgcccacaa aacattgtc
2281 ttaacttcac cgcctaacce aaaacctata agaactaatg ataatecatc acccttgcct
2341 gactctctt tcggactcag cccacctgca ccaggtgaa ataaacagct ttattgtctc
2401 cacaaaaaaa aaaaaaaaaa

```

10

20

30

配列番号 6 : ヒト HHLA2 バリエント 3 アミノ酸配列 (NP_001269486.1)

【表 1 - 7】

```

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDP RYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDGDIYT
121 CYVGTAIQVI TNKVVLKVG V FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF
301 SMNLMDLNL S DSGEYLCNIS SDEYTLTLTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAAFL
361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCP SA PDNGEENVPL SGKV

```

40

配列番号 7 : ヒト HHLA2 バリエント 4 cDNA 配列 (NM_001282558.1、302~1495 位由来の CDS 領域)

【表 1 - 8】

```

1 aaatcaaacg taccttgac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat
61 tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga
121 actggatgcc cttgtgttac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa
181 ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccctg cacagattgt gatgggtgatg
241 tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga

```

50

【表 1 - 9】

```

301 catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc
361 tcaaggcata ttcccttttg ctttcttcat ttatgttctt atgaatgaac aaatcgtcat
421 tggaagactt gatgaagata taattctccc ttcttcattt gagaggggat ccgaagtcgt
481 aatacactgg aagtatcaag atagctataa gggtcacagt tactacaaag gcagtgaaca
541 tttggaaagc caagatccca gatatgcaa caggacatcc cttttctata atgagattca
601 aaatgggaat gcgtcgctat ttttcagaag agtaagcctt ctggacgaag gaatttacac
661 ctgctatgta ggaacagcaa ttcaagtgat tacaacaaaa gtggtgctaa aggtgggagt
721 ttttctcaca cccgtgatga agtatgaaaa gaggaacaca aacagcttct taatatgcag
781 cgtgttaagt gtttatcctc gtccaattat cacgtggaaa atggacaaca cacctatctc
841 tgaacaacac atggaagaaa cagggtcttt ggattctttt tctattaaca gccactgaa
901 tattacagga tcaaatctat cttatgaatg tacaattgaa aattcactgc tgaagcaaac
961 atggacaggg cgctggacga tgaagatgg ctttcataaa atgcaaagtg aacacgtttc
1021 actctcatgt caacctgtaa atgattatth ttcacaaac caagacttca aagttacttg
1081 gtccagaatg aaaagtggga ctttctctgt cctggcttac tatctgagct cctcacaaaa
1141 tacaattatc aatgaatccc gattctcatg gaacaaagag ctgataaacc agagtgactt
1201 ctctatgaat ttgatggatc ttaatctttc agacagtggg gaatatttat gcaatatttc
1261 ttcggtatga tatactttac ttaccatcca cacagtgcac gtagaaccga gccaaagaaac
1321 agcttcccat aacaaaggct tatggatttt ggtgcctctt gcgatttttg cagcttttct
1381 gctgatttgg agcgtaaaat gttgcagaga aagatgttgt gtccctcctg gtgagcgtg
1441 tcccagtgca cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag tataggaaat
1501 gagagaagac tgtgacaact catgacctgc atccttaata tccagtgcac tcatctcccc
1561 tttcttcacc acaattccag gcaatggcct gtggagcag acaattctac cactgcaaag
1621 agttgtaacc attttctggt atcacattta tttttcaaga catacttttc aagacatcat
1681 tcactgaccc actacctgca ttgagtataa atgcctggat gttaaggatt ccaatttaac
1741 tttgaaaaga actgtctcat tcattttacat ttctgttaca gtcagcccag gaggttacag
1801 tgagctctcc actaagaatc tggaaagaaat gcatcactag ggggttgatt ccaatctgat
1861 caactgataa tgggtgagag agcaggtaag agccaaagtc accttagtgg aaagggtaaa
1921 aaccagagcc tggaaaccaa gatgattgat ttgacaagggt attttagtct agttttatat
1981 gaacggttgt atcagggtta ccaactcgat ttgggatgaa tcttagggca ccaaagacta
2041 agacagtatc tttaagattg ctagggaaaa gggccctatg tgtcaggcct ctgagcccaa
2101 gccaaagcat gcacccctg tgatttgcaac gtatacatcc agatggccta aagtaactga
2161 agatccacaa aagaagtaaa aatagcctta actgatgaca ttccaccatt gtgatttgtt
2221 cctgccccac cctaactgat caatgtactt tgtaatctcc cccaccctta agaaggtaact
2281 ttgtaatctt cccaccctt aagaagggtt tttgtaattc tccccacct tgagaatgta
2341 ctttgtgaga tccaccctgc ccacaaaaca ttgctcttaa cttcaccgcc taacccaaaa
2401 cctataagaa ctaatgataa tccatcaccc ttcgctgact ctcttttcgg actcagccca
2461 cctgcaccca ggtgaaataa acagctttat tgctcacaca aaaaaaaaaa aaaaa

```

10

20

30

配列番号 8 : ヒト HHLA2 バリエント 4 アミノ酸配列 (NP_001269487.1)

【表 1 - 10】

```

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDEGIYT
121 CYVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKS GTF SV LAYYLSSQN TIINESRFSW NKELINQSD F
301 SMNLMDLNL S DSGEYLCNIS SDEYTL LTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILA AFL
361 LIWSVKCCRE RCCVPPGERC PSAPDNGEEN VPLSGKV

```

40

配列番号 9 : ヒト HHLA2 バリエント 5 cDNA 配列 (NM_001282559.1、232~1284 位由来の CDS 領域)

【表 1 - 1 1】

1	aaatcaaacy	taccttgga	tttactctct	gagaaactca	tagctgaatt	caatgtttat
61	tcttatggac	tacttagcat	ttgactagac	ggtatgaatt	tctaagtaag	cacatataga
121	actggatgcc	cttgtggtac	atctcaaggc	tgatttgaaa	gcttgagaga	ccatcaagaa
181	ttggatttgg	ggaagagcat	gtaggagaat	actaacccctg	cacagattgt	gatgggtgatg
241	tggaatatac	taaagcctag	aacgcacctc	ctctgcatga	ctaatatgtt	ctgcacaaga
301	catgaaggca	cagacagcac	tgtctttctt	cctcattctc	ataacatctc	tgagtggatc
361	tcaagaagag	taagccttct	ggacgaagga	atttacacct	gctatgtagg	aacagcaatt
421	caagtgatta	caaacaaagt	ggtgctaaag	gtgggagttt	ttctcacacc	cgtgatgaag

【表 1 - 1 2】

481	tatgaaaaga	ggaacacaaa	cagcttctta	atatgcagcg	tgttaagtgt	ttatcctcgt
541	ccaattatca	cgtggaaaa	ggacaacaca	cctatctctg	aaaacaacat	ggaagaaaca
601	gggtcttttg	attctttttc	tattaacagc	ccactgaata	ttacaggatc	aaattcatct
661	tatgaatgta	caattgaaaa	ttcactgctg	aagcaaacat	ggacaggggc	ctggacgatg
721	aaagatggcc	ttcataaaat	gcaaagtga	cacgtttcac	tctcatgtca	acctgtaaat
781	gattattttt	caccaaacca	agacttcaaa	gttacttgg	ccagaatgaa	aagtgggact
841	ttctctgtcc	tggettacta	tctgagctcc	tcacaaaata	caattatcaa	tgaatccga
901	ttctcatgga	acaaagagct	gataaaccag	agtgaactct	ctatgaattt	gatggatctt
961	aatctttcag	acagtgggga	atatttatgc	aatatttctt	cggatgaata	tactttactt
1021	accatccaca	cagtgcagtg	agaaccgagc	caagaaacag	cttcccataa	caaaggctta
1081	tggatttttg	tgccctctgc	gattttggca	gcttttctgc	tgatttggag	cgtaaaatgt
1141	tgcagagccc	agctagaagc	caggaggagc	agacaccctg	ctgatggagc	ccaacaagaa
1201	agatgttttg	tccctcctgg	tgagcgctgt	cccagtgcac	ccgataatgg	cgaagaaaat
1261	gtgcctcttt	caggaaaagt	ataggaaatg	agagaagact	gtgacaactc	atgacctgca
1321	tccttaatat	ccagtgaact	catctccctt	ttcttcacca	caattccagg	caatggectg
1381	tcggagcaga	caattctacc	actgcaaaga	gttgtaacca	ttttctggta	tcacatttat
1441	ttttcaagac	atacttttca	agacatcatt	cactgacca	ctacctgcat	tgagtataaa
1501	tgectggatg	ttaaggattc	caatttaact	ttgaaaagaa	ctgtctcatt	catttacatt
1561	tctgttacag	tcagcccagg	aggttacagt	gagctctcca	ctaagaatct	ggaagaaatg
1621	catcactagg	ggttgattcc	caatctgac	aactgataat	gggtgagaga	gcaggtaaga
1681	gcccagtgca	ccttagtgga	aagggtaaaa	accagagcct	ggaaaccaag	atgattgatt
1741	tgacaaggta	ttttagtcta	gttttatatg	aacggttgta	tcagggtaac	caactcgatt
1801	tgggatgaat	cttagggcac	caaagactaa	gacagtatct	ttaagattgc	tagggaaaag
1861	ggccctatgt	gtcaggcctc	tgagcccaag	ccaagcatcg	catccctgtg	gatttgcacg
1921	tatacatcca	gatggcctaa	agtaactgaa	gatccacaaa	agaagtaaaa	atagccttaa
1981	ctgatgacat	tccaccattg	tgatttgttc	ctgcccacc	ctaactgatc	aatgtacttt
2041	gtaatctccc	ccacccttaa	gaaggtaact	tgtaattctc	cccaccctta	agaaggttct
2101	ttgtaattct	ccccaccctt	gagaatgtac	tttgtgagat	ccaccctgcc	cacaaaacat
2161	tgctcttaac	ttcaccgcct	aacccaaaac	ctataagaac	taatgataat	ccatcaccct
2221	tcgctgactc	tcttttcgga	ctcagcccac	ctgcaccag	gtgaaataaa	cagctttatt
2281	gctcacacaa	aaaaaaaaaa	aaaa			

配列番号 10 : ヒト HHLA2 バリエント 5 アミノ酸配列 (NP_001269488.1)

【表 1 - 1 3】

1	MVMWNILKPR	THLLCMTNMF	CTRHEGTDST	VFLPHSHNIS	EWISRRVSL	DEGIYTCYVG
61	TAIQVITNKV	VLKVGVFLTP	VMKYEKRTN	SFLICSVLSV	YPRPIITWKM	DNTPISENNM
121	EETGSLDSFS	INSPINITGS	NSSYECTIEN	SLLKQWTWGR	WTMKDGLHKM	QSEHVSLSQ
181	PVNDYFSPNQ	DFKVTWSRMK	SGTFSVLAYY	LSSSQNTIIN	ESRFSWNKEL	INQSDFSMNL
241	MDLNLSDSGE	YLCNISSDEY	TLLTIHTVHV	EPSQETASHN	KGLWILVPSA	ILAAFLLIWS
301	VKCCRAQLEA	RRSRHPADGA	QQERCCVPPG	ERCPSAPDNG	EENVPLSGKV	

配列番号 11 : ヒト TMIGD2 アイソフォーム 1 cDNA 配列 (NM_144615.2、47~895 位由来の CDS 領域)

10

20

30

40

50

【表 1 - 1 4】

```
1 ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggatgatggg ccaggaatgg ggtccccggg
61 catgggtgctg ggccctcctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt
121 gcagcagggg cccaacttgc tgcaggtgag gcagggcagt caggcgaccc tgggtctgcca
181 ggtggaccag gccacagcct gggaacggct cctgtttaag tggacaaagg atggggccat
241 cctgtgtcaa cgttacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgcg ggcccaggg
301 acggtctctcc tggcaggcac ccagccatct caccctgcag ctggaccctg tgagcctcaa
361 ccacagcggg gcgtacgtgt gctgggcggc cgtagagatt cctgagttgg aggaggctga
421 gggcaacata acaaggctct ttgtggaccc agatgacccc acacagaaca gaaaccggat
481 cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc
541 gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgagctgc cagcaaaggg actcaggtaa
601 cagcccagga aatgcattct acagcaacgt cctataaccg ccccgggggg ccccaaagaa
661 gagtgaggac tgctctggag aggggaagga ccagaggggc cagagcattt attcaacctc
721 ctccccgcaa cgggcccccc gccagccgca cctggcgtca agacctgcc ccagcccag
781 accctgcccc agccccaggc ccggccaccc cgtctctatg gtcagggtct ctccagacc
841 aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat
```

10

【表 1 - 1 5】

```
901 cccaggagac ctcaacagga cccaccccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgaggc
961 cagacacggg ggctcacgcc tgtaatccca gcagtttggg aagccgaggc ggggtggaaca
1021 cttgagggtca ggggtttgag accagcctgg cttgaacctg ggaggcggag gttgcagtga
1081 gccgagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctcaaaaaa
1141 aacaaaaagc aggaggattg ggagcctgtc agccccatcc tgagaccccg tctcatttc
1201 tgtaatgatg gatctcgctc ccactttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa
1261 aagcaaaaaa aaaaaaaaaa aa
```

20

配列番号 1 2 : ヒト T M I G D 2 アイソフォーム 1 アミノ酸配列 (N P _ 6 5 3 2 1 6 . 2)

【表 1 - 1 6】

```
1 MGSPGMVLGL LVQIWAQEAE SSLSVQQGN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT AWERLRVKWT
61 KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD PVSLNHSGAY VCWAAVEIPE
121 LEEAEGNITR LFVDPDDPTQ NRNRIASFPG FLFVLLGVGS MGVA AIVWGA WFWGRRSCQQ
181 RDSGNSPGNA FYSNVLYRPR GAPKSEDCS GEGKDQRGQS IYSTSFPQPA PRQPHLASRP
241 CPSRPRCPSP RPHGPFVSMVR VSPRPSPTQQ PRPKGF PKVG EE
```

30

配列番号 1 3 : ヒト T M I G D 2 アイソフォーム 2 c D N A 配列 (N M _ 0 0 1 1 6 9 . 1 2 6 . 1 、 4 7 ~ 8 8 3 位由来の C D S 領域)

40

50

【表 1 - 17】

```

1 ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg ggggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg
61 catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt
121 gcagcagggg cccaacttgc tgcaggtgag gcagggcagt caggcgaccc tggctctgcca
181 ggtggaccag gccacagcct gggaacggct ccgtgttaag tggacaaagg atggggccat
241 cctgtgtcaa ccgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgcg ggcccaggg
301 acggctctcc tggcaggcac ccagccatct caccctgcag ctggaccctg tgagcctcaa
361 ccacagcggg gcgtagctgt gctgggaggc cgtagagatt cctgagttgg aggaggctga
421 gggcaacata acaaggctct ttgtggaccc agatgacccc acacagaaca gaaaccggat
481 cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc
541 gatcgtgtgg ggtgcctggg tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggaaa
601 tgcatctctac agcaacgtcc tataccggcc ccgggggggc ccaaagaaga gtgaggactg
661 ctctggagag ggggaaggacc agaggggcca gacatttat tcaacctcct tcccgcaacc
721 gcccccgcg cagccgcacc tggcgtcaag accctgcccc agcccgagac cctgcccag
781 ccccaggccc ggccaccccg tctctatggt cagggtctct cctagaccaa gcccaccca
841 gcagccgagg ccaaaagggt tccccaaagt gggagaggag tgagagatcc caggagacct
901 caacaggacc ccacccatag gtacacacaa aaaagggggg atcagggccg gacacgggtg
961 ctcacgcctg taatcccagc agtttgggaa gccgaggcgg gtggaacact tgaggtcagg
1021 ggtttgagac cagcctggct tgaacctggg aggcggaggt tgcagtgagc cgagattgcg
1081 ccaactgact ccagcctggg cgacagagtg agactccgtc tcaaaaaaaaa caaaaagcag
1141 gaggattggg agcctgtcag ccccatcctg agaccccgtc ctcatctctg taatgatgga
1201 tctcgtctcc actttcccc aagaacctaa taaaggcttg tgaagaaaaa gcaaaaaaaa
1261 aaaaaaaaaa

```

10

配列番号 14 : ヒト TMIGD2 アイソフォーム 2 アミノ酸配列 (NP_001162597.1)

20

【表 1 - 18】

```

1 MGSPGMVLGL LVQIWALQEA SSLSVQQGPN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT AWERLRVKWT
61 KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD PVSLNHSAGY VCWAAVEIPE
121 LEEAEGNITR LFVDPDDPTQ NRNRIASFPG FLFVLLGVGS MGVAIVWGA WFWGRRSCQQ
181 RDSGNAFYSN VLYRPRGAPK KSEDCSGEGK DQRGQSIYST SFPQPAPRQP HLASRPCPSP
241 RPCSPRPGH PVMVRVSPR PSPTQQPRPK GFPKVGEE

```

配列番号 15 : ヒト TMIGD2 アイソフォーム 3 cDNA 配列 (NM_001308232.1、47~535 位由来の CDS 領域)

【表 1 - 19】

```

1 ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg ggggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg
61 catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggatgacccc acacagaaca gaaaccggat
121 cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc
181 gatcgtgtgg ggtgcctggg tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggtaa
241 cagccaggga aatgcattct acagcaacgt cctataccgg ccccgggggg ccccaaagaa

```

30

【表 1 - 20】

```

301 gagtgaggac tgctctggag aggggaagga ccagaggggc cagagcattt attcaacctc
361 ctccccgcaa ccggcccccc gccagccgca cctggcgtca agaccctgcc ccagcccag
421 accctgcccc agccccaggc ccggccaacc cgtctctatg gtcaggggtc ctccatagac
481 aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat
541 ccagggagac ctcaacagga cccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgaggc
601 cagacacggg ggctcacgcc tgtaatccca gcagtttggg aagccgaggc ggggtggaaca
661 cttgagggtca ggggtttgag accagcctgg cttgaacctg ggaggcggag gttgcagtga
721 gccgagattg cgcactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctcaaaaaa
781 aacaaaaagc aggaggattg ggagcctgtc agcccatcc tgagaccccg tctcatttc
841 tgtaatatgag gatctcgctc ccactttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa
901 aagcaaaaaa aaaaaaaaaa

```

40

配列番号 16 : ヒト TMIGD2 アイソフォーム 3 アミノ酸配列 (NP_001295161.1)

50

【表 1 - 2 1】

1 MGSPGMVLGL LVQIWDDEPTQ NRNRISAFPG FLFVLLGVGS MGVAIVWGA WFWGRRSCQQ
 61 RDSGNPNA FYSNVLYRPR GAPKSEDCS GEGKDQGRQS IYSTSFPQPA PRQPHLASRP
 121 CPSRPPCPSP RPHGVSMVR VSPRPSPTQQ PRPKGFPGVG EE

配列番号 17 : ヒト KIR3DL3 cDNA 配列 (NM_153443.4、51~1283 位由来の CDS 領域)

【表 1 - 2 2】

1 tgctgctgaa ctgagctggg ggcgagccgc ctgtctgcac cggcagcacc atgtcgtctca
 61 tggctcgtcag catggcgtgt gttgggttct tcttgcctga ggggccttgg ccacatgttg
 121 gtgtgcagga caagcccttc ctctctgcct ggcccggcac tgtggtgtct gaaggacaac
 181 atgtgactct tcagtgtcgc tctcgtcttg ggtttaataa attcagctctg tccaaagaag
 241 acgggatgac tgtccctgag ctctacaaca gaataattcc gaacagcttt ctcatgggac
 301 ctgtgacccc agcacatgca gggacctaca gatgttgacg ttcacaccca cactccccca
 361 ctgggtgggc ggcacccagc aaccctgttg tgatcatggt cacaggagtc cacagaaaac
 421 ctccctctct ggcccaccca ggtcccttgg tgaaatcagg agagacggtc atcctgcaat
 481 gttggtcaga tgtcagggtt gagcgtcttc ttctgcacag agaggggac actgaggacc
 541 ccttgccgct cgttgacag ctccacgatg cgggttccca ggtcaactat tccatgggtc
 601 ccatgacacc tgcccttgca gggacctaca gatgctttgg ttctgtcact cacttacctt
 661 atgagttgtc ggctcccagt gaccctcttg acatcgtggc cgtagggtct tatgggaaac
 721 ctctctctct agcccagccg ggcacccagg ttcaggcagg agagaatgtg accttgtcct
 781 gcagctcccg gagcttgttt gacatttacc atctatccag ggaggcggag gccggtgaac
 841 ttaggctcac tgcagtgtg agggcgaatg gaacattcca ggccaacttc cctctgggac
 901 ctgtgaccca cggaggggaa tacagatgct tgggtctctt ccgtgccctg ccccatgctg
 961 ggtcagaccc gagtgaccca ctgcccgttt ctgtcacagg taactccaga aacctgcacg
 1021 ttctgatttg gacctcagt gtcatcatcc ccttctctat cctcctcttc tttctccttc
 1081 atcgctggtg tgccaacaaa aagaatgtct ttgtaatgga ccaagagcct gcagggaaca
 1141 gaacagtga cagggaggac tctgatgaac aagaccctca ggaggtgaca tgcacagat
 1201 tgaactactg cgttttcaca cagagaaaaa tcaactcgcc ttctcagagg cccaagacac
 1261 ccccaacaga taccagcgtg taacacggaa ctccaaatg ctgagcgcag atccaaagt
 1321 gtcttctgtc cactagcacc acagtcaggc cttgatggga tcttctaggg agacaatagc
 1381 cctgtctcaa aaccgggttg ccagctccca tgtaccagca gctggactct gaaggcgtga
 1441 gtctgcatct tagggcatcg ctcttctcca caccacgaat ctgaacatgc ctctctcttg
 1501 cttacaaaat tctaaggtcc ccactgctg ctggagagaa aacacacttg cttagccac
 1561 aattctccat ttcaactgac ccctgccac ctctccaacc taactggctt acttcttagt
 1621 ctacttgagg ctgcgatcac actgaggaac tcacaattcc aaacatataa gaggtccct
 1681 cttaacacgg cacttagata cgtgctattc caccttctct cag

配列番号 18 : ヒト KIR3DL3 アミノ酸配列 (NP_703144.3)

【表 1 - 2 3】

1 MSLMVSMAC VGFFLLEGPW PHVGGQDKPF LSAWPGTVVS EGQHVTLQCR SRLGFNEFSL
 61 SKEDGMPVPE LYNRIFRNSF LMGPVTPAHA GYRCCSSHP HSPTGWSAPS NPVVIMVTGV
 121 HRKPSLLAHP GPLVKSGETV ILQCWSDVRF ERFLHREGI TEDPLRLVGQ LHDAGSQVNY
 181 SMGPMTPALA GYRCFGSVT HLPYELSAPS DPLDIVVGL YGKPSLSAQF GPTVQAGENV
 241 TLSCSSRSLEF DIYHLSREAE AGELRLTAVL RVNGTFQANF PLGPVTHGGN YRCFGSFRAL
 301 PHAWSDPSPD LPVSVTGNSR NLHVLIGTSV VIIPFALLF FLLHRWCANK KNAVMDQEP

【表 1 - 2 4】

361 AGNRTVNRED SDEQDPQEVY YQLNHCVFY QRKITRPSQR PKTPPTDTSV

*RNA 核酸分子 (例えば、チミンがウリジンで置き換えられたもの)、コードされたタンパク質のオルソログをコードする核酸分子、ならびに表 1 に列記されるいずれかの配列番号の核酸配列またはその一部と全長にわたって少なくとも 80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、またはそれ以上の同一性を有する核酸配列を含む DNA または RNA 核酸配列が表 1 に含まれる。かかる核酸分子は、本明細書にさらに記載される全長核酸の機能を有し得る。

＊タンパク質のオルソログ、ならびに表 1 に列記されるいずれかの配列番号のアミノ酸配列またはその一部と全長にわたって少なくとも 80 %、81 %、82 %、83 %、84 %、85 %、86 %、87 %、88 %、89 %、90 %、91 %、92 %、93 %、94 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、99.5 %、またはそれ以上の同一性を有するアミノ酸配列を含むポリペプチド分子が表 1 に含まれる。かかるポリペプチドは、本明細書にさらに記載される全長ポリペプチドの機能を有し得る。

＊他の既知の HHLA2、TMIGD2、および KIR3DL3 核酸およびアミノ酸配列が表 1 に含まれる。

【0180】

刺激性受容体である（すなわち、共刺激シグナルを免疫細胞に伝達する）ことに加えて、HHLA2 ポリペプチドは、阻害性シグナルを免疫細胞に伝達し、それにより、免疫細胞エフェクター機能を阻害することができる阻害性受容体であるか、または、例えば、阻害性受容体または刺激性受容体に結合しているときに、免疫細胞の共刺激を促進することができる。HHLA2 は、1 つ以上の受容体、例えば、T 細胞上の TMIGD2、KIR3DL3、および／または他のポリペプチドに結合する。

【0181】

「HHLA2 活性」という用語は、例えば、T 細胞上の天然 HHLA2 リガンドを連結することによって、活性化免疫細胞における阻害性シグナルを調節する HHLA2 ポリペプチドの能力を含む。免疫細胞における阻害性シグナルの調節により、免疫細胞の増殖および／または免疫細胞によるサイトカイン分泌の調節がもたらされる。したがって、「HHLA2 活性」という用語には、HHLA2 ポリペプチドのその天然リガンド（複数可）に結合する能力、免疫細胞における共刺激または阻害性シグナルを調節する能力、および免疫応答を調節する能力が含まれる。

【0182】

いくつかの実施形態では、がん等の状態は、HHLA2 遮断単独に対して応答性である。他の実施形態では、がん等の状態は、HHLA2 遮断単独に対して応答性であるが、HHLA2 遮断と別の療法との組み合わせで治療された場合、著しくまたは相乗的により応答性である。HHLA2 遮断に対して単独でまたは組み合わせで応答性である多くの状態には、黒色腫（例えば、進行性または転移性黒色腫）、肺癌（例えば、非小細胞肺癌および小細胞肺癌）、乳癌（例えば、HER-2 陰性乳癌、エストロゲン受容体陽性／HER-2 陰性乳癌、およびトリプルネガティブ乳癌）、膵臓癌（例えば、膵臓腺癌）、およびホジキンリンパ腫、ならびに膀胱癌、胃癌、頭頸部癌、腎臓癌、前立腺癌、婦人科癌、結腸直腸癌、卵巣癌、および血液癌が含まれるが、これらに限定されない。

【0183】

好ましい B7 ポリペプチドは、共刺激または阻害性シグナルを免疫細胞に提供し、それにより、免疫細胞応答を促進または阻害することができる。例えば、共刺激受容体に結合する B7 ファミリーメンバーが T 細胞活性化および増殖を増加させる一方で、阻害性受容体に結合する B7 ファミリーメンバーは共刺激を減少させる。さらに、同じ B7 ファミリーメンバーが T 細胞共刺激を増加させる場合も減少させる場合もある。例えば、共刺激受容体に結合すると、HHLA2 は免疫細胞の共刺激を誘導することができ、あるいは、阻害性受容体に結合すると、HHLA2 は免疫細胞を阻害することができる。阻害性受容体に結合すると、HHLA2 は、阻害性シグナルを免疫細胞に伝達することができる。好ましい B7 ファミリーメンバーには、HHLA2、B7-1、B7-2、B7h、PD-L1、または PD-L2、およびそれらの可溶性断片または誘導体が含まれる。一実施形態では、免疫細胞上の 1 つ以上の受容体、例えば、TMIGD2、KIR3DL3、CTLA4、CD28、ICOS、PD-1、および／または他の受容体に結合する B7 ファミリーメンバーは、受容体に応じて、阻害性シグナルまたは共刺激シグナルを免疫細胞、好ましくは、T 細胞に伝達する能力を有する。

【0184】

共刺激シグナルの調節により、免疫細胞のエフェクター機能の調節がもたらされる。し

たがって、「HHLA2リガンド活性」という用語には、HHLA2リガンドポリペプチドのその天然受容体（複数可）（例えばHHLA2）に結合する能力、免疫細胞における共刺激または阻害性シグナルを調節する能力、および免疫応答を調節する能力が含まれる。

【0185】

HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用の調節により免疫機能が調節され得るように、HHLA2経路が免疫機能の負の制御因子または正の制御因子であることが本明細書で実証される。HHLA2のTMIGD2への結合は、免疫機能の正の制御因子であり得る。HHLA2の阻害性受容体への結合は、免疫機能の負の制御因子である。HHLA2のTMIGD2への結合は、HHLA2の阻害性受容体の結合と同様であると考えられる。したがって、HHLA2のTMIGD2への結合を阻害することが、HHLA2の阻害性受容体への結合を阻害すると考えられる。したがって、HHLA2と1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用を調節するHHLA2経路モジュレーター（例えば、HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用のモジュレーター）である本明細書に記載の本発明の薬剤は、直接的か間接的にかかわらず、免疫系を上方制御または下方制御し、それにより、免疫応答を上方制御または下方制御することができる。かかる相互作用を調節する薬剤は、直接的または間接的のいずれかでそうすることができる。

【0186】

HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上のHHLA2天然結合パートナーとの間の相互作用により、共刺激または共阻害免疫シグナルの送達もたらされる。したがって、一実施形態では、かかる相互作用（複数可）を直接遮断する薬剤（例えば、抗HHLA2、抗TMIGD2、および／または抗KIR3DL3遮断抗体）は、阻害性または刺激性シグナル伝達を阻止し、免疫応答を上方制御または下方制御することができる。あるいは、相互作用（複数可）を間接的に遮断する薬剤は、阻害性シグナル伝達を阻止し、免疫応答を上方制御することができる。免疫応答を上方制御するための例示の薬剤には、HHLA2とKIR3DL3との間の相互作用を遮断するHHLA2またはKIR3DL3に対する抗体、HHLA2またはKIR3DL3の非活性化形態（例えば、優性ネガティブポリペプチド）、HHLA2とKIR3DL3との間の相互作用を遮断する小分子またはペプチド、それぞれ、HHLA2またはKIR3DL3に結合し、HHLA2とKIR3DL3との間の相互作用を阻害する融合タンパク質（例えば、抗体または免疫グロブリンのFc部分に融合したHHLA2またはKIR3DL3の細胞外部分）、HHLA2および／またはKIR3DL3転写または翻訳を遮断する核酸分子および／または遺伝的修飾、天然HHLA2リガンドの非活性化形態、ならびに天然KIR3DL3リガンドの可溶性形態が挙げられる。

【0187】

他の例示の実施形態では、HHLA2ポリペプチドのKIR3DL3ポリペプチド等の1つ以上の天然結合パートナーへの結合を促進する薬剤は、免疫細胞への阻害性シグナルを促進する。かかる相互作用を調節する薬剤は、直接的または間接的のいずれかでそうすることができる。したがって、一実施形態では、HHLA2とKIR3DL3との間の相互作用を直接増強する薬剤（HHLA2アゴニストおよび／またはKIR3DL3アゴニスト）は、阻害性シグナル伝達を促進し、免疫応答を下方制御することができる。あるいは、KIR3DL3の他の標的への結合を遮断する薬剤は、HHLA2への結合に利用可能なKIR3DL3の有効濃度を増加させる。免疫応答を下方制御するための例示の薬剤には、HHLA2とKIR3DL3との間の相互作用を活性化または促進するHHLA2またはKIR3DL3に対する抗体、HHLA2とKIR3DL3との間の相互作用を活性化または促進する小分子またはペプチド、ならびにそれぞれ、HHLA2およびKIR3DL3以外のHHLA2およびKIR3DL3の天然結合パートナーに結合する遮断抗体が挙げられる。これらの関係は、HHLA2とTMIGD2との相互作用にも適用される。

【0188】

本発明の方法で有用な追加の薬剤には、表1に列記されるバイオマーカーを含む本発明のタンパク質バイオマーカーまたはその断片に結合および／またはそれを活性化するか、またはそれを阻害するかのいずれかを行うことができる抗体、小分子、ペプチド、ペプチド模倣薬、天然リガンド、および天然リガンドの誘導体；表1に列記されるバイオマーカーを含む本発明のバイオマーカーまたはその断片の発現および／または活性を下方制御することができるRNA干渉、アンチセンス、核酸アプタマー等が含まれる。

【0189】

HHLA2に対して産生される単離されたモノクローナル抗体またはその断片が提供される。いくつかの実施形態では、ハイブリドーマによって産生されたmAbは、ブダペスト条約の条項に従って、_____に寄託番号_____でAmerican Type Culture Collection (ATCC) に寄託されている。

【0190】

抗体重鎖および軽鎖CDR3ドメインが抗体の抗原に対する結合特異性／親和性に特に重要な役割を果たすことが当該技術分野で周知であるため、上述のように調製された本発明の組換えモノクローナル抗体は、好ましくは、本発明の可変領域の重鎖および軽鎖CDR3（例えば、表2の配列またはその一部を含む）を含む。本抗体は、本発明の可変領域のCDR2（例えば、表2の配列またはその一部を含む）をさらに含み得る。本抗体は、本発明の可変領域のCDR1（例えば、表2の配列またはその一部を含む）をさらに含み得る。他の実施形態では、本抗体は、これらのCDRの任意の組み合わせを含み得る。

【0191】

上述の操作された抗体のCDR1、2、および／または3領域は、本明細書に開示される本発明の可変領域（例えば、表2の配列またはその一部を含む）として正確なアミノ酸配列（複数可）を含み得る。しかしながら、当業者であれば、HHLA2に有効に結合する抗体の能力（例えば、保存的配列修飾）を依然として保持しながら、正確なCDR配列からのいくつかの逸脱が可能であり得ることを理解するであろう。したがって、別の実施形態では、操作された抗体は、例えば、本発明の1つ以上のCDR（例えば、表2の配列またはその一部を含む）と50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、または99.5%同一の1つ以上のCDRから成り得る。

【0192】

既知の非ヒトまたはヒト抗体（例えば、マウスまたは非齧歯類抗ヒトHHLA2抗体）の構造的特徴を使用して、HHLA2の結合等の本発明の抗体の少なくとも1つの機能的特性を保持する構造的に関連したヒト抗ヒトHHLA2抗体（例えば、mAb 8A12、ならびにポリクローナル抗体1.2および2.2）を作製することができる。別の機能的特性には、競合ELISAアッセイにおける本来の既知の非ヒトまたはヒト抗体の結合の阻害が含まれる。

【0193】

いくつかの実施形態では、可変ドメインが表2に提示される重鎖可変ドメインCDR群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖を含む、ヒトHHLA2に結合することができるモノクローナル抗体（例えば、mAb 8A12、ならびにポリクローナル抗体1.2および2.2）が提供される。

【0194】

同様に、可変ドメインが表2に提示される軽鎖可変ドメインCDR群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖を含む、ヒトHHLA2に結合することができるモノクローナル抗体（例えば、mAb 8A12、ならびにポリクローナル抗体1.2および2.2）も提供される。

【0195】

可変ドメインが表2に提示される重鎖可変ドメインCDR群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖を含み、かつ可変ドメインが表2に提示される軽鎖可変ドメインCDR群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖を含む、ヒトHHLA2に結合することができるモノクローナル抗体（例えば、mAb 8A12、ならびにポリクローナル抗体1.2および2.2）も提供される。

【0196】

当業者であれば、かかる相同性パーセンテージが、所与のCDR内での1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の保存的アミノ酸置換と同等であり、その保存的アミノ酸置換を導入することによって達成され得ることに留意するであろう。

【0197】

本発明のモノクローナル抗体は、可変ドメインが表2に提示される重鎖可変ドメインCDRからなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖、および可変ドメインが表2に提示される軽鎖可変ドメインCDRからなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖を含み得る。

【0198】

かかるモノクローナル抗体は、可変ドメインが本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖、および／または可変ドメインが本明細書に記載のCDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3からなる群から選択される配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖を含み得る。いくつかの実施形態では、ヒトHHLA2に結合することができるモノクローナル抗体は、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3を含むか、またはそれからなる。

【0199】

本発明のモノクローナル抗体の重鎖可変ドメインは、表2に記載のvHアミノ酸配列を含み得るか、またはそれからなり得、かつ／または本発明のモノクローナル抗体の軽鎖可変ドメインは、表2に記載のvKアミノ酸配列を含み得るか、またはそれからなり得る。

【0200】

本発明のモノクローナル抗体は、当該技術分野で周知の任意の技法によって産生および修飾され得る。例えば、かかるモノクローナル抗体は、マウスまたは非齧歯類抗体、例えば、_____に寄託_____でATCCに寄託されたハイブリドーマから入手可能なものであり得る。同様に、かかるモノクローナル抗体は、キメラ抗体、好ましくはキメラマウス／ヒト抗体であり得る。いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、可変ドメインが、ヒトアクセプターフレームワーク領域、および任意にヒト定常ドメイン（存在する場合）、ならびに上で定義されるマウスまたは非齧歯類CDR等の非ヒトドナーCDRを含むようなヒト化抗体である。

【0201】

本発明は、Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂、およびダイアボディが含まれるが、これらに限定されない当該モノクローナル抗体の断片、ならびに抗体断片から形成される多重特異性抗体をさらに提供する。例えば、HHLA2、PD-L2、PD-L1、CTLA-4、KIR3DL3等のいくつかの免疫阻害性分子は、かかる分子の発現を効率的に特徴付けるために、二重特異的または多重特異的様式で検出され得る。

【0202】

本発明のモノクローナル抗体の他の断片も企図される。例えば、個別の免疫グロブリン重鎖および／または軽鎖が提供され、その可変ドメインは、表2に提示される少なくとも1つのCDRを含む。一実施形態では、免疫グロブリン重鎖は、表2に提示される重鎖ま

10

20

30

40

50

たは軽鎖可変ドメインCDR群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む。別の実施形態では、免疫グロブリン軽鎖は、本明細書に記載の（例えば、表2に提示される）軽鎖または重鎖可変ドメインCDR群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む。

【0203】

いくつかの実施形態では、免疫グロブリン重鎖および／または軽鎖は、本明細書に記載のCDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、またはCDR-H3のうちの少なくとも1つを含む可変ドメインを含む。かかる免疫グロブリン重鎖は、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3のうちの少なくとも1つを含み得るか、またはそれからなり得る。かかる免疫グロブリン軽鎖は、CDR-L1、CDR-L2、およびCDR-L3のうちの少なくとも1つを含み得るか、またはそれからなり得る。

10

【0204】

他の実施形態では、本発明による免疫グロブリン重鎖および／または軽鎖は、それぞれ、表2に提供されるvH可変ドメイン配列またはvK可変ドメイン配列を含むか、またはそれからなる。

【0205】

20

本発明は、本明細書に記載のvH可変ドメイン、vK可変ドメイン、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2、およびCDR-H3配列からなる群から選択される配列を有するポリペプチドをさらに提供する。

本発明の抗体、免疫グロブリン、およびポリペプチドは、単離された（例えば、精製された）形態で使用され得るか、または膜もしくは脂質小胞（例えば、リポソーム）等のベクター中に含まれ得る。

表2：mAb 8A12、6D10、6F10、8D2、2G2、2C4、4D1、1C8、および4E5を含む抗HHLA2モノクローナル抗体のリーダー領域および可変領域の特定および配列決定

8A12重鎖可変（vH）DNAおよびアミノ酸配列＊

30

MHC2554HC.1；M13 499.5.8A12.11.10.5

CDR分析

GFTFNTNV... IRTKTNNYAT VGAMDY

FASTA形式でのアミノ酸配列（MHC2554HC.1\；M13F）

> MHC2554HC.1\；M13F

遺伝子座8A12_vH 402bpの直鎖状DNA

40

50

【表 2 - 1】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	370. . 402 ／label=FWR4	
V__セグメント	358. . 369 ／label=CDR3	
V__領域	235. . 357 ／label=FWR3	10
V__セグメント	211..234 ／label=CDR2	
V__領域	154..210 ／label=FWR2	
V__セグメント	133..153 ／label=CDR1	
V__領域	58..132 ／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57 ／label=LS	
CDS	1..402 ／label=8A12__vH	

【化 1 9】

8 A 1 2 __ v H
／翻訳="MLLG L K W I F F V V F Y Q G V H C E V Q L V E T G G G L V Q P K G S L K L S C A A S G F T F N T N V M N W V
R Q A P G K G L E W V G R I R T K T N N Y A T Y Y A D S V K G R F T I S R D D S Q S M L Y L Q M N N L K T E D T A T Y F C V G A M D Y W G Q
G T S V T V S S" (配列番号 1 9)

30

F A S T A形式でのヌクレオチド配列 (M H C 2 5 5 4 H C . 1 \ ; M 1 3 F)
> M H C 2 5 5 4 H C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 8 A 1 2 . 1 1 . 1 0 . 5
起源

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 2 0】

1	ATGCTGTTGG	GGCTGAAGTG	GATTTTCTTT	GTTGTTTTTT	ATCAAGGTGT	GCATTGTGAG
61	GTGCAACTTG	TTGAGACTGG	TGGAGGATTG	GTGCAGCCTA	AAGGGTCATT	GAAACTCTCA
121	TGTGCAGCCT	CTGGATTAC	CTTCAACACC	AATGTCATGA	ACTGGGTCCG	CCAGGCTCCA
181	GGAAAGGGTT	TGGAATGGGT	TGGTCGCATA	AGAACTAAAA	CTAATAATTA	TGCAACATAT
241	TATGCCGATT	CAGTGAAAGG	CAGGTTCAAC	ATCTCCAGAG	ATGATTCACA	AAGTATGCTC
301	TATCTGCAAA	TGAACAACCT	GAAAACTGAG	GACACAGCCA	CGTATTTCTG	TGTGGGAGCT
361	ATGGACTACT	GGGGTCAAGG	AACCTCAGTC	ACCGTCTCCT	CA	(配列番号 2 0)

40

【化 2 1】

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT 57

(配列番号 2 1)

／翻訳=「M L L G L K W I F F V V F Y Q G V H C」 (配列番号 2 2)

フレームワーク 1 (塩基対 5 8 ~ 1 3 2) :

【化 2 2】

58 GAG GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT
GAAACTCTCA TGTGCAGCCT CT 132 (配列番号 23)
／翻訳＝“EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSAAS” (配列番号 24)

CDR-H1 (塩基対 133～153) :

【化 2 3】

133 GGATTCAC CTTCAACACC AAT 153

(配列番号 25)

／翻訳＝「GFTFNIN」 (配列番号 26)

フレームワーク 2 (塩基対 154～210) :

【化 2 4】

154 GTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAAGGGTT TGAATGGGT TGGTCGCATA 210

(配列番号 27)

／翻訳＝「VMNWVRQAPGKGLEWVGRI」 (配列番号 28)

CDR-H2 (塩基対 211～234) :

【化 2 5】

211 AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCA 234

(配列番号 29)

／翻訳＝「RTKTNNYA」 (配列番号 30)

フレームワーク 3 (塩基対 235～357) :

【化 2 6】

235 ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTTCCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA
AAGTATGCTC TATCTGCAA TGAACAACTT GAAAACCTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG
TGTGGGA 357 (配列番号 31)

／翻訳＝「TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTA
TYFCVG」 (配列番号 32)

CDR-H3 (塩基対 358～369) :

【化 2 7】

358 GCT ATGGACTAC 369

(配列番号 33)

／翻訳＝「AMDY」 (配列番号 34)

フレームワーク 4 (塩基対 370～402) :

【化 2 8】

370 T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402

(配列番号 35)

／翻訳＝「WGQGTSTVSS」 (配列番号 36)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

MHC 2 5 5 4 HC. 1 4 9 9. 5. 8 A 1 2. 1 1. 1 0.
5

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1~19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS	20~44	25
CDR-H1	GFTFNTN	45~51	7
HFR2	VMNWVRQAPGKGLEWVGRI	52~70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71~78	8
HFR3	TTYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTAT YFCVG	79~119	41
CDR-H3	AMDY	120~123	4
HFR4	WGQGTSTVTVSS	124~134	11

10

8 A 1 2 軽鎖可変 (v L) DNA および アミノ酸配列 ＊
MHC 2 5 5 4 LC. 2 ; M 1 3 . 4 9 9 . 5 . 8 A 1 2 . 1 1 . 1 0 . 5
C D R 分析
E S V D N S G I N F . . _ _ _ R A S _ _ _ Q Q S Y K D P P T
F A S T A 形式でのアミノ酸配列 (MHC 2 5 5 4 LC. 2 \ ; M 1 3 F)
> MHC 2 5 5 4 LC. 2 \ ; M 1 3 F
遺伝子座 8 A 1 2 _ v L 3 9 3 b p の直鎖状 DNA

20

【表 2 - 3】

特徴	位置／修飾子
J__セグメント	364..393 ／label=FWR4
V__セグメント	337..363 ／label=CDR3
V__領域	241..336 ／label=FWR3
V__セグメント	220..240 ／label=CDR2
V__領域	175..219 ／label=FWR2
V__セグメント	130..174 ／label=CDR1
V__領域	61..129 ／label=FWR1
シグナル__ペプチド	1..60 ／label=LS
CDS	1..393 ／label=8A12__vL

30

40

50

【化 2 9】

8 A 1 2 __ v L

／翻訳="METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATVSCRASESVDNSGINF
IHWYQQKPGQSPKLLLYRASNLKSGIPARFSGSGSRDTFTLTINPVETGDVATYYCQQSYKDPPTFGTGT
KLELK" (配列番号 3 7)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 5 4 L C . 2 \ ; M 1 3 F)

> MHC 2 5 5 4 L C . 2 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 8 A 1 2 . 1 1 . 1 0 . 5
起源

10

【化 3 0】

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT
61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC
121 GTCTCCTGCA GAGCCAGCGA AAGTGTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT AACTGGTAC
181 CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAACCTC CTCCTCTATC GTGCATCCAA CCTAAAATCT
241 GGGATCCCTG CCAGGTTTCTG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT
301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGTCAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT
361 ACGTTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG (配列番号 3 8)

20

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 6 0) :

【化 3 1】

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT 60

(配列番号 3 9)

／翻訳=「METDTLLLWVLLLWVPGSTG」 (配列番号 4 0)

フレームワーク 1 (塩基対 6 1 ~ 1 2 9) :

【化 3 2】

61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC
GTCTCCTGC 129 (配列番号 4 1)

30

／翻訳=「DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC」 (配列番号 4 2)

CDR-L 1 (塩基対 1 3 0 ~ 1 7 4) :

【化 3 3】

130 A GAGCCAGCGA AAGTGTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT ACAC 174

(配列番号 4 3)

／翻訳=「RASESVDNSGINFIH」 (配列番号 4 4)

フレームワーク 2 (塩基対 1 7 5 ~ 2 1 9) :

40

【化 3 4】

175 TGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAACCTC CTCCTCTAT 219

(配列番号 4 5)

／翻訳=「WYQQKPGQSPKLLLY」 (配列番号 4 6)

CDR-L 2 (塩基対 2 2 0 ~ 2 4 0) :

【化 3 5】

220 C GTGCATCCAA CCTAAAATCT 240

(配列番号 4 7)

50

／翻訳＝「RASNLKS」（配列番号48）

フレームワーク3（塩基対241～336）：

【化36】

241 GGGATCCCTG CCAGGTTACG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT
CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGT 336 （配列番号49）

／翻訳＝「GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC」（配列番号50）

CDR-L3（塩基対337～363）：

【化37】

337 CAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT ACG 363

（配列番号51）

／翻訳＝「QQSYKDPPT」（配列番号52）

フレームワーク4（塩基対364～393）：

【化38】

364 TTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG 393

（配列番号53）

／翻訳＝「FGTGTKLELK」（配列番号54）

【表2-4】

MHC2554LC. 2. 499. 5. 8A12. 11. 10.
5

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	METDTLLLWVLLLVPGSTG	1~20	20
LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC	21~43	23
CDR-L1	RASESVDNSGINFIH	44~58	15
LFR2	WYQQKPGQSPKLLLY	59~73	15
CDR-L2	RASNLKS	74~80	7
LFR3	GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC	81~112	32
CDR-L3	QQSYKDPPT	113~121	9
LFR4	FGTGTKLELK	122~131	10

6D10重鎖可変（vH）DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC2555HC. 1；M13. 499. 5. 6D10. 11. 11. 7

CDR分析

GFTFNTNV. . . . IRTKTNNYAT VGAMDY

FASTA形式でのアミノ酸配列（MHC2555HC. 1\；M13F）

> MHC2555HC. 1\；M13F 499. 5. 6D10. 11. 11. 7

遺伝子座6D10_vH 402bpの直鎖状DNA

10

20

30

40

50

【表 2 - 5】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	370..402 ／label=FWR4	
V__セグメント	358..369 ／label=CDR3	
V__領域	235..357 ／label=FWR3	10
V__セグメント	211..234 ／label=CDR2	
V__領域	154..210 ／label=FWR2	
V__セグメント	133..153 ／label=CDR1	
V__領域	58..132 ／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57 ／label=LS	
CDS	1..402 ／label=6D10__vH	

【化 3 9】

6 D 1 0 __ v H
／翻訳="MLLGLKWIFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTINVMNWV
RQAPGKGLEWVARIRTKTN⁵NYATYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMN¹⁰NLKTEDTAMY¹⁵YCVGAMD²⁰YWGQ
GTSVT²⁵VSS" (配列番号 5 5)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 5 5 H C . 1 \ ; M 1 3 F)
> MHC 2 5 5 5 H C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 6 D 1 0 . 1 1 . 1 1 . 7
起源

【化 4 0】

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGTGAG
61 GTGCAGCTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA
121 TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAATACC AATGTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA
181 GGAAAGGGTT TGGAATGGGT TGCTCGCATA AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCAACATAT
241 TATGCCGATT CAGTGAAAGA CAGGTTACAC ATCTTCAGAG ATGATTCACA AAGCATTCTC
301 TATCTGCAAA TGAACAAC⁵TT GAAAAC¹⁰TGAG GACACAGCCA TGTATTACTG TGTGGGAGCT
361 ATGGACTACT GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA (配列番号 5 6)

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 4 1】

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT 57

(配列番号 5 7)

／翻訳 = 「MLLGLKWIFFVVFYQGVHC」 (配列番号 5 8)

フレームワーク 1 (塩基対 5 8 ~ 1 3 2) :

【化 4 2】

58 GAG GTGCAGCTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT
GAAACTCTCA TGTGCAGCCT CT 132 (配列番号 59)

／翻訳＝「EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS」(配列番号 60)
CDR-H1 (塩基対 133～153)：

【化 4 3】

133 GGATTCAC CTTCAATACC AAT 153

(配列番号 61)

／翻訳＝「GFTFNTN」(配列番号 62)
フレームワーク 2 (塩基対 154～210)：

【化 4 4】

154 GTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAAGGGTT TGAATGGGT TGCTCGCATA 210

(配列番号 63)

／翻訳＝「VMNWVRQAPKGLEWVARI」(配列番号 64)
CDR-H2 (塩基対 211～234)：

【化 4 5】

211 AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCA 234

(配列番号 65)

／翻訳＝「RTKTNNYA」(配列番号 66)
フレームワーク 3 (塩基対 235～357)：

【化 4 6】

235 ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGA CAGGTTACC ATCTTCAGAG ATGATTCACA
AAGCATTCTC TATCTGCAAA TGAACAACCTT GAAAACCTGAG GACACAGCCA TGTATTACTG
TGTGGGA 357 (配列番号 67)

／翻訳＝「TYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMNNLKTEDTA
MY YCVG」(配列番号 68)

CDR-H3 (塩基対 358～369)：

【化 4 7】

358 GCT ATGGACTAC 369

(配列番号 69)

／翻訳＝「AMDY」(配列番号 70)
フレームワーク 4 (塩基対 370～402)：

【化 4 8】

370 T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402

(配列番号 71)

／翻訳＝「WGQGTSTVTVSS」(配列番号 72)

10

20

30

40

50

【表 2－6】

MHC 2 5 5 5 H C . 1 ; M 1 3 . 4 9 9 . 5 . 6 D 1 0 . 1 1 . 1 1 . 7

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1~19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS	20~44	25
CDR-H1	GFTFNTN	45~51	7
HFR2	VMNWVRQAPGKGLEWVARI	52~70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71~78	8
HFR3	TYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMNNLKTEDTA MYEYCVG	79~119	41
CDR-H3	AMDY	120~123	4
HFR4	WGQGTSTVTVSS	124~134	11

10

6 D 1 0 軽鎖可変（v L）DNA およびアミノ酸配列＊

M H C 2 5 5 5 L C . 1 ; M 1 3 . 4 9 9 . 5 . 6 D 1 0 . 1 1 . 1 1 . 7

C D R 分析

E S V D N Y G I S F . . _ _ _ R A S _ _ _ Q Q S S K D P P T

F A S T A 形式でのアミノ酸配列（M H C 2 5 5 5 L C . 1 \ ; M 1 3 F）

> M H C 2 5 5 5 L C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 6 D 1 0 . 1 1 . 1 1 . 7

遺伝子座 6 D 1 0 _ v L 3 9 3 b p の直鎖状 DNA

【表 2－7】

特徴	位置／修飾子
J__セグメント	3 6 4 . . 3 9 3 ／ l a b e l = F W R 4
V__セグメント	3 3 7 . . 3 6 3 ／ l a b e l = C D R 3
V__領域	2 4 1 . . 3 3 6 ／ l a b e l = F W R 3
V__セグメント	2 2 0 . . 2 4 0 ／ l a b e l = C D R 2
V__領域	1 7 5 . . 2 1 9 ／ l a b e l = F W R 2
V__セグメント	1 3 0 . . 1 7 4 ／ l a b e l = C D R 1
V__領域	6 1 . . 1 2 9 ／ l a b e l = F W R 1
シグナル__ペプチド	1 . . 6 0 ／ l a b e l = L S
C D S	1 . . 3 9 3 ／ l a b e l = 6 D 1 0 _ v L

20

30

40

50

【化 4 9】

6 D 1 0 __ v L

／翻訳＝”

METDTLLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWYQQKPGQPPKL
LIYRASNLKSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYCQQSSKDPPTFGTGTKLELK”

(配列番号 7 3)

FASTA 形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 5 5 L C . 1 \ ; M 1 3 F)

> MHC 2 5 5 5 L C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 6 D 1 0 . 1 1 . 1 1 . 7
起源

10

【化 5 0】

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTCCAGG TTCCACAGGT
61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTAGGGCA GAGGGCCACC
121 ATCTCCTGCA GAGCCAGCGA GAGTGTGAT AATTATGGCA TTAGTTTTAT GCACTGGTAC
181 CAGCAGAAAC CAGGACAGCC ACCCAAATC CTCATCTATC GTGCATCCAA CCTAAAATCT
241 GGGATCCCTG CCAGGTTTCT TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT
301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCTACCTAT TACTGTCAGC AAAGTAGTAA GGATCCTCCT
361 ACGTTCGGTA CTGGGACCAA GCTAGAGCTG AAA (配列番号 7 4)

20

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 6 0) :

【化 5 1】

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTCCAGG TTCCACAGGT 60

(配列番号 7 5)

／翻訳＝「METDTLLWVLLLWVPGSTG」 (配列番号 7 6)

フレームワーク 1 (塩基対 6 1 ~ 1 2 9) :

【化 5 2】

61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTAGGGCA GAGGGCCACC
ATCTCCTGC 129 (配列番号 7 7)

30

／翻訳＝「DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC」 (配列番号 7 8)

CDR-L 1 (塩基対 1 3 0 ~ 1 7 4) :

【化 5 3】

130 A GAGCCAGCGA GAGTGTGAT AATTATGGCA TTAGTTTTAT GCAC 174

(配列番号 7 9)

／翻訳＝「RASESVDNYGISFMH」 (配列番号 8 0)

フレームワーク 2 (塩基対 1 7 5 ~ 2 1 9) :

40

【化 5 4】

175 TGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGCC ACCCAAATC CTCATCTAT 219

(配列番号 8 1)

／翻訳＝「WYQQKPGQPPKLLIY」 (配列番号 8 2)

CDR-L 2 (塩基対 2 2 0 ~ 2 4 0) :

【化 5 5】

220 C GTGCATCCAA CCTAAAATCT 240

(配列番号 8 3)

50

／翻訳＝「RASNLKS」（配列番号84）

フレームワーク3（塩基対241～336）：

【化56】

241 GGGATCCCTG CCAGGTTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT
CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCTACCTAT TACTGT 336（配列番号85）

／翻訳＝「GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC」（配列番号86）

CDR-L3（塩基対337～363）：

【化57】

337 CAGC AAAGTAGTAA GGATCCTCCT ACG 363

10

（配列番号87）

／翻訳＝「QQSSKDPPT」（配列番号88）

フレームワーク4（塩基対364～393）：

【化58】

364 TTCGGTA CTGGGACCAA GCTAGAGCTG AAA 393

（配列番号89）

／翻訳＝「FGTGTKLELK」（配列番号90）

【表2-8】

MHC2555LC.1 499.5.6D10.11.11.7

20

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	1~20	20
LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	21~43	23
CDR-L1	RASESVDNYGISFMH	44~58	15
LFR2	WYQQKPGQPPKLLIY	59~73	15
CDR-L2	RASNLKS	74~80	7
LFR3	GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC	81~112	32
CDR-L3	QQSSKDPPT	113~121	9
LFR4	FGTGTKLELK	122~131	10

30

6F10重鎖可変（vH）DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC2557HCO.1；M13.499.5.6F10.A4.10

CDR分析

GYTFTTYT...___INPSSGYT...___ARHPWDS DY

FASTA形式でのアミノ酸配列（MHC2557HCO.1\；M13F）

> MHC2557HCO.1\；M13F.499.5.6F10.A4.10

遺伝子座6F10__vH 405bpの直鎖状DNA

40

【表 2 - 9】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	373..405 ／label=FWR4	
V__セグメント	352..372 ／label=CDR3	
V__領域	229..351 ／label=FWR3	10
V__セグメント	211..228 ／label=CDR2	
V__領域	154..210 ／label=FWR2	
V__セグメント	133..153 ／label=CDR1	
V__領域	58..132 ／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57 ／label=LS	
CDS	1..405 ／label=6F10__vH	

【化 5 9】

6 F 1 0 __ v H
／翻訳="MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVHLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWV
KQRPQGQLEWIGHINPSSGYTDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARHPWDSDYWG
QGTTLTVSS" (配列番号 9 1)

30

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 5 7 H C O . 1 \ ; M 1 3 F)
> MHC 2 5 5 7 H C O . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 6 F 1 0 . A 4 . 1 0
起源

【化 6 0】

1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCCCAG
61 GTCCACCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC
121 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTTACTACC TACACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT
181 GGACAGGGTC TGGAAATGGAT TGGACACATT AATCCTAGCA GTGGATATAC TGATTACAAT
241 CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGTAC AGCCTACATG
301 CAACTGAACA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ACACCCCTGG
361 GACTCGGACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (配列番号 9 2)

40

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 6 1】

1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCC 57

(配列番号 9 3)

／翻訳=「MERHWIFLFLLSVTAGVHS」 (配列番号 9 4)

フレームワーク 1 (塩基対 5 8 ~ 1 3 2) :

【化62】

58 CAG GTCCACCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT
GAAGATGTCC TGCAAGGCTT CT 132 (配列番号95)

／翻訳＝「QVHLQQSAAELARPGASVKMSCKAS」(配列番号96)

CDR-H1 (塩基対133～153)：

【化63】

133 GGCTACAC CTTTACTACC TAC 153

(配列番号97)

／翻訳＝「GYTFTTY」(配列番号98)

フレームワーク2 (塩基対154～210)：

【化64】

154 ACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT
181 GGACAGGGTC TGGAATGGAT TGGACACATT 210

(配列番号99)

／翻訳＝「TMHWVKQRPGQGLEWIGHI」(配列番号100)

CDR-H2 (塩基対211～228)：

【化65】

211 AATCCTAGCA GTGGATAT 228

(配列番号101)

／翻訳＝「NPSSGY」(配列番号102)

フレームワーク3 (塩基対229～351)：

【化66】

229 AC TGATTACAAT CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACATTGACT GCAGACAAAT
CCTCCAGTAC AGCCTACATG CAACTGAACA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT
ACTGTGCAAG A 351 (配列番号103)

／翻訳＝「TDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSA
VYYCAR」(配列番号104)

CDR-H3 (塩基対352～372)：

【化67】

352 CACCCCTGG GACTCGGACT AC 372

(配列番号105)

／翻訳＝「HPWDS DY」(配列番号106)

フレームワーク4 (塩基対373～405)：

【化68】

373 TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405

(配列番号107)

／翻訳＝「WGQGTTLT VSS」(配列番号108)

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 0】

MHC 2 5 5 7 H C O . 1 4 9 9 . 5 . 6 F 1 0 . A 4 . 1 0

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MERHWIFLFLLSVTAGVHS	1~19	19
HFR1	QVHLQQSAAELARPGASVKMSCKAS	20~44	25
CDR-H1	GYTFTTY	45~51	7
HFR2	TMHWVKQRPGQGLEWIGHI	52~70	19
CDR-H2	NPSSGY	71~76	6
HFR3	TDYNQKFCDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSA VYYCAR	77~117	41
CDR-H3	HPWDSYD	118~124	7
HFR4	WGQGTTLTVSS	125~135	11

10

6 F 1 0 軽鎖可変 (v L) D N A およびアミノ酸配列 *

M H C 2 5 5 7 L C . 1 ; M 1 3 .

C D R 分析

E N I D S Y _ _ _ _ _ A A T _ _ _ _ _ Q H Y Y I T P F T

20

F A S T A 形式でのアミノ酸配列 (M H C 2 5 5 7 L C . 1 \ ; M 1 3 F)

> M H C 2 5 5 7 L C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 6 F 1 0 . A 4 . 1 0

遺伝子座 6 F 1 0 _ v L 3 8 1 b p の直鎖状 D N A

【表 2 - 1 1】

特徴	位置／修飾子
J__セグメント	352..381 ／label=FWR4
V__セグメント	325..351 ／label=CDR3
V__領域	229..324 ／label=FWR3
V__セグメント	208..228 ／label=CDR2
V__領域	163..207 ／label=FWR2
V__セグメント	130..162 ／label=CDR1
V__領域	61..129 ／label=FWR1
シグナル__ペプチド	1..60 ／label=LS
CDS	1..381 ／label=6F10__vL

30

40

50

【化69】

6 F 1 0__v L

／翻訳="MSVPTQLLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIDSYLAWY
QQKQGRSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYCQHYYITPFTFGSGTKLEI
A" (配列番号109)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC2557LC.1\;M13F)

> MHC2557LC.1\;M13F.499.5.6F10.A4.10

起源

10

【化70】

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT
61 GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC
121 ATCACATGTC GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CATGGTATCA GCAGAAACAG
181 GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTATGCT GCAACAACT TAGCAGATGG TGTGCCATCA
241 AGGTTCAAGTGC GAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTCC AGATCAACCG CCTGCAGTCT
301 GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGTCAACAT TATTATATTA CTCCATTAC GTTCGGCTCG
361 GGGACAAAAT TGGAAATAGC A (配列番号110)

シグナルペプチド (塩基対1~60) :

【化71】

20

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT 60

(配列番号111)

／翻訳=「MSVPTQLLGLLLLWLTDARC」 (配列番号112)

フレームワーク1 (塩基対61~129) :

【化72】

61 GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC
ATCACATGT 129 (配列番号113)

／翻訳=「DIQMTQSPASLSASVGETVTITC」 (配列番号114)

30

CDR-L1 (塩基対130~162) :

【化73】

130 C GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CA 162

(配列番号115)

／翻訳=「RASENIDSYLA」 (配列番号116)

フレームワーク2 (塩基対163~207) :

【化74】

163 TGGTATCA GCAGAAACAG GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTAT 207

40

(配列番号117)

／翻訳=「WYQQKQGRSPQLLVY」 (配列番号118)

CDR-L2 (塩基対208~228) :

【化75】

208 GCT GCAACAACT TAGCAGAT 228

(配列番号119)

／翻訳=「AATNLAD」 (配列番号120)

フレームワーク3 (塩基対229~324) :

50

【化 7 6】

229 GG TGTGCCATCA AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTCC
AGATCAACCG CCTGCAGTCT GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGT 324 (配列番号121)

／翻訳＝「GVPSRFSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYC」(配
列番号122)

CDR-L3 (塩基対325～351)：

【化 7 7】

325 CAACAT TATTATATTA CTCCATTCAC G 351

(配列番号123)

／翻訳＝「QHYYITPFT」(配列番号124)

フレームワーク4 (塩基対352～381)：

【化 7 8】

352 TTCGGCTCG GGGACAAAAT TGGAAATAGC A 381

(配列番号125)

／翻訳＝「FGSGTKLEIA」(配列番号126)

【表 2-12】

MHC2557LC. 1 499. 5. 6F10. A4. 10

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MSVPTQLGLLLLWLTIDARC	1~20	20
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	21~43	23
CDR-L1	RASENIDSYLA	44~54	11
LFR2	WYQQKQGRSPQLLVY	55~69	15
CDR-L2	AATNLAD	70~76	7
LFR3	GVPSRFSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYC	77~108	32
CDR-L3	QHYYITPFT	109~117	9
LFR4	FGSGTKLEIA	118~127	10

8D2重鎖可変(vH)DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC2558HC. 1；M13. 499. 8D2. 6. 8

CDR分析

GFTFNTNV. . . . IRTKTNNYAT__VGAMDY

FASTA形式でのアミノ酸配列(MHC2558HC. 1\；M13F)

> MHC2558HC. 1\；M13F. 499. 8D2. 6. 8

遺伝子座8D2_vH 402bpの直鎖状DNA

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 3】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	370..402	
	／label=FWR4	
V__セグメント	358..369	
	／label=CDR3	
V__領域	235..357	
	／label=FWR3	10
V__セグメント	211..234	
	／label=CDR2	
V__領域	154..210	
	／label=FWR2	
V__セグメント	133..153	
	／label=CDR1	
V__領域	58..132	
	／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57	
	／label=LS	
CDS	1..402	
	／label=8D2__vH	

【化 7 9】

8 D 2 __ v H
／翻訳="MLLGLKWIFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNVMNWV
RQAPGKGLEWVGRI¹TKTN²NYATYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMN³NLKTEDTATYFCV⁴GAM⁵DYWG⁶Q
GTSVT⁷VSS" (配列番号 1 2 7)

30

F A S T A形式でのヌクレオチド配列 (M H C 2 5 5 8 H C . 1 \ ; M 1 3 F)

> M H C 2 5 5 8 H C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 8 D 2 . 6 . 8

起源

【化 8 0】

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGTGAG
61 GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA
121 TGTGCAGCCT CTGGATTAC CTTCAACACC AATGTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA
181 GGAAAGGGTT TGGAAATGGT TGGTCGCATA AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCAACATAT
241 TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTTCACC ATCTCCAGAG ATGATTACACA AAGTATGCTC
301 TATCTGCAAA TGAACAAC¹TT GAAA²ACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGAGCT
361 ATGGACTACT GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA (配列番号 1 2 8)

40

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 8 1】

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT 57

(配列番号 1 2 9)

／翻訳=「M L L G L K W I F F V V F Y Q G V H C」 (配列番号 1 3 0)

フレームワーク 1 (塩基対 5 8 ~ 1 3 2) :

【化82】

58 GAG GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT
GAAACTCTCA TGTGCAGCCT CT 132 (配列番号131)

／翻訳＝「EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS」(配列番号132)
CDR-H1 (塩基対133～153)：

【化83】

133 GGATTCAC CTTCAACACC AAT 153

(配列番号133)

／翻訳＝「GFTFNTN」(配列番号134)
フレームワーク2 (塩基対154～210)：

【化84】

154 GTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAAGGGTT TGGAAATGGGT TGGTCGCATA 210
(配列番号135)

／翻訳＝「VMNWVRQAPKGLEWVGRI」(配列番号136)
CDR-H2 (塩基対211～234)：

【化85】

211 AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCA 234

(配列番号137)

／翻訳＝「RTKTNNYA」(配列番号138)
フレームワーク3 (塩基対235～357)：

【化86】

235 ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGG TTCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA
AAGTATGCTC TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG
TGTGGGA 357 (配列番号139)

／翻訳＝「TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTA
TYFCVG」(配列番号140)
CDR-H3 (塩基対358～369)：

【化87】

358 GCT ATGGA CTAC 369

(配列番号141)

／翻訳＝「AMDY」(配列番号142)
フレームワーク4 (塩基対370～402)：

【化88】

370 T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402

(配列番号143)

／翻訳＝「WGQGTSTVTVSS」(配列番号144)

10

20

30

40

50

【表 2－14】

MHC 2558HC. 1 499. 8D2. 6. 8

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1~19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS	20~44	25
CDR-H1	GFTFNTN	45~51	7
HFR2	VMNWVRQAPGKGLEWVGRI	52~70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71~78	8
HFR3	TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTA TYFCVG	79~119	41
CDR-H3	AMDY	120~123	4
HFR4	WGQGTSTVTVSS	124~134	11

10

8D2 軽鎖可変 (vL) DNA および アミノ酸配列 *

MHC 2558LC. 2 ; M13. 499. 8D2. 6. 8

CDR 分析

ESVDNSGINF. . ____RAS. ____QQSYKDPPT

FASTA 形式でのアミノ酸配列 (MHC 2558LC. 2 \ ; M13F)

> MHC 2558LC. 2 \ ; M13F. 499. 8D2. 6. 8

遺伝子座 8D2 __vL 393bp の直鎖状 DNA

【表 2－15】

特徴	位置／修飾子
J__セグメント	364..393 ／label=FWR4
V__セグメント	337..363 ／label=CDR3
V__領域	241..336 ／label=FWR3
V__セグメント	220..240 ／label=CDR2
V__領域	175..219 ／label=FWR2
V__セグメント	130..174 ／label=CDR1
V__領域	61..129 ／label=FWR1
シグナル__ペプチド	1..60 ／label=LS
CDS	1..393 ／label=8D2__vL

20

30

40

50

【化 8 9】

8 D 2 _ v L

／翻訳="METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATVSCRASESVDNSGINF
IHWYQQKPGQSPKLLLYRASNLKSGIPARFSGSGSRDFTLTINPVETGDVATYYCQQSYKDPPTFGTGT
KLELK" (配列番号 1 4 5)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 5 8 L C . 2 \ ; M 1 3 F)

> MHC 2 5 5 8 L C . 2 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 8 D 2 . 6 . 8

起源

10

【化 9 0】

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT
61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC
121 GTCTCCTGCA GAGCCAGCGA AAGTGTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT AACTTGGTAC
181 CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAATC CTCCTCTATC GTGCATCCAA CCTAAAATCT
241 GGGATCCCTG CCAGGTTTCTG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT
301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGTCAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT
361 ACGTTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG (配列番号 1 4 6)

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 6 0) :

【化 9 1】

20

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT 60

(配列番号 1 4 7)

／翻訳 = 「METDTLLLWVLLLWVPGSTG」 (配列番号 1 4 8)

フレームワーク 1 (塩基対 6 1 ~ 1 2 9) :

【化 9 2】

61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC
GTCTCCTGCA 129 (配列番号 1 4 9)

／翻訳 = 「DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC」 (配列番号 1 5 0)

30

CDR-L 1 (塩基対 1 3 0 ~ 1 7 4) :

【化 9 3】

130 A GAGCCAGCGA AAGTGTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT ACAC 174

(配列番号 1 5 1)

／翻訳 = 「RASESVDNSGINFIH」 (配列番号 1 5 2)

フレームワーク 2 (塩基対 1 7 5 ~ 2 1 9) :

【化 9 4】

175 CTGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAATC CTCCTCTAT 219

40

(配列番号 1 5 3)

／翻訳 = 「WYQQKPGQSPKLLLY」 (配列番号 1 5 4)

CDR-L 2 (塩基対 2 2 0 ~ 2 4 0) :

【化 9 5】

220 C GTGCATCCAA CCTAAAATCT 240

(配列番号 1 5 5)

／翻訳 = 「RASNLKS」 (配列番号 1 5 6)

フレームワーク 3 (塩基対 2 4 1 ~ 3 3 6) :

50

【化 9 6】

241 GGGATCCCTG CCAGGTTGAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT
CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGT 336 (配列番号157)

／翻訳＝「GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC」(配
列番号158)

CDR-L3 (塩基対337～363)：

【化 9 7】

337 CAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT ACG 363

(配列番号159)

／翻訳＝「QQSYKDPPT」(配列番号160)

フレームワーク4 (塩基対364～393)：

【化 9 8】

364 TTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG 393

(配列番号161)

／翻訳＝「FGTGTKLELK」(配列番号162)

【表 2 - 1 6】

MHC2558LC. 2 499. 8D2. 6. 8

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	1~20	20
LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC	21~43	23
CDR-L1	RASESVDNSGINFIH	44~58	15
LFR2	WYQQKPGQSPKLLLY	59~73	15
CDR-L2	RASNLKS	74~80	7
LFR3	GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC	81~112	32
CDR-L3	QQSYKDPPT	113~121	9
LFR4	FGTGTKLELK	122~131	10

2 G 2 重鎖可変 (v H) DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC2561HC. 1；M13. 499. 5. 2 G 2. 13. 3. 10

CDR分析

GLTFSSYA. . . . _ _ _ _ ISSGGSHT. . _ _ _ _ TRLGRAFDY

FASTA形式でのアミノ酸配列 (MHC2561HC. 1 \；M13F)

> MHC2561HC. 1 \；M13F. 499. 5. 2 G 2. 13. 3. 10

遺伝子座2 G 2 _ v H 405bpの直鎖状DNA

10

20

30

40

50

【表 2 - 1 7】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	373..405 ／label=FWR4	
V__セグメント	352..372 ／label=CDR3	
V__領域	229..351 ／label=FWR3	10
V__セグメント	211..228 ／label=CDR2	
V__領域	154..210 ／label=FWR2	
V__セグメント	133..153 ／label=CDR1	
V__領域	58..132 ／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57 ／label=LS	
CDS	1..405 ／label=2G2__vH	

【化 9 9】

2 G 2 __ v H
／翻訳="MNFGLSLIFLVVLKGVQCEVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGLTFSSYAMSWV
RQTPEKRLEWVATISSGGSHYYPDSVKGRFIISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDAMYYCTRLGRAFDYWG
QGTTLTVSS" (配列番号 1 6 3)

30

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 6 1 H C . 1 \ ; M 1 3 F)
> MHC 2 5 6 1 H C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 2 G 2 . 1 3 . 3 . 1 0
起源

【化 1 0 0】

1 ATGAACTTCG GGCTCAGCTT GATTTTCCTT GTCCTTGTTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAA
61 GTGATGCTGG TGGAGTCAGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGATCCCT GAAACTCTCC
121 TGTGCAGTCT CTGGATTAAC TTTTAGTAGT TATGCCATGT CTTGGGTTCG CCAGACTCCG
181 GAGAAGAGGC TGGAGTGGGT CGCAACCATT AGTAGTGGTG GTAGTCACAC CTACTATCCA
241 GACAGTGTGA AGGGGCGATT CATCATTTCT AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTACCTG
301 CAAATGAACA GTCTGAGGTC TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTACAAG ACTGGGACGG
361 GCCTTTGACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (配列番号 1 6 4)

40

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 1 0 1】

1 ATGAACTTCG GGCTCAGCTT GATTTTCCTT GTCCTTGTTT TAAAAGGTGT CCAGTGT 57

(配列番号 1 6 5)

／翻訳=「MNFGLSLIFLVVLKGVQC」 (配列番号 1 6 6)

フレームワーク 1 (塩基対 5 8 ~ 1 3 2) :

【化102】

58 GAA GTGATGCTGG TGGAGTCAGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGATCCCT
GAAACTCTCC TGTGCAGTCT CT 132 (配列番号167)

／翻訳＝「E V M L V E S G G G L V K P G G S L K L S C A V S」(配列番号168)
CDR-H1 (塩基対133～153)：

【化103】

133 GGATTAAC TTTTAGTAGT TAT 153

(配列番号169)

／翻訳＝「G L T F S S Y」(配列番号170)
フレームワーク2 (塩基対154～210)：

【化104】

154 GCCATGT CTTGGGTTCG CCAGACTCCG GAGAAGAGGC TGGAGTGGGT CGCAACCATT 210

(配列番号171)

／翻訳＝「A M S W V R Q T P E K R L E W V A T I」(配列番号172)
CDR-H2 (塩基対211～228)：

【化105】

211 AGTAGTGGTG GTAGTCAC 228

(配列番号173)

／翻訳＝「S S G G S H」(配列番号174)
フレームワーク3 (塩基対229～351)：

【化106】

229 AC CTACTATCCA GACAGTGTGA AGGGGCGATT CATCATTTCT AGAGACAATG
CCAAGAACAC CCTGTACCTG CAAATGAACA GTCTGAGGTC TGAGGACACG GCCATGTATT
ACTGTACAAG A 351 (配列番号175)

／翻訳＝「T Y Y P D S V K G R F I I S R D N A K N T L Y L Q M N S L R S E D T A
M Y Y C T R」(配列番号176)
CDR-H3 (塩基対352～372)：

【化107】

352 CTGGGACGG GCCTTTGACT AC 372

(配列番号177)

／翻訳＝「L G R A F D Y」(配列番号178)
フレームワーク4 (塩基対373～405)：

【化108】

373 TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405

(配列番号179)

／翻訳＝「W G Q G T T L T V S S」(配列番号180)

10

20

30

40

50

【表 2－18】

MHC 2561HC. 1 499. 5. 2G2. 13. 3. 10

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MNFGLSLIFLVVLKGVQC	1~19	19
HFR1	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVS	20~44	25
CDR-H1	GLTFSSY	45~51	7
HFR2	AMSWVRQTPEKRLEWVATI	52~70	19
CDR-H2	SSGGSH	71~76	6
HFR3	TYYPDSVKGRFIISRDNAKNTLYLQMNSLRSED TAM YYCTR	77~117	41
CDR-H3	LGRAFDY	118~124	7
HFR4	WGQGTTTLTVSS	125~135	11

10

2G2軽鎖可変（vL）DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC 2561LC. 1；M13. 499. 5. 2G2. 13. 3. 10

CDR分析

QDVSTA. WAS. QQDYSTPWT

FASTA形式でのアミノ酸配列（MHC 2561LC. 1\；M13F）

> MHC 2561LC. 1\；M13F. 499. 5. 2G2. 13. 3. 10

遺伝子座2G2__vL 381bpの直鎖状DNA

【表 2－19】

特徴	位置／修飾子
J__セグメント	352..381 ／label=FWR4
V__セグメント	325..351 ／label=CDR3
V__領域	229..324 ／label=FWR3
V__セグメント	208..228 ／label=CDR2
V__領域	163..207 ／label=FWR2
V__セグメント	130..162 ／label=CDR1
V__領域	61..129 ／label=FWR1
シグナル__ペプチド	1..60 ／label=LS
CDS	1..381 ／label=2G2__vL

20

30

40

50

【化109】

2 G 2 __ v L

／翻訳="MESQIQVFVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWY
QQKPGQSPKVLIIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYCQQDYSTPWTFGGGTKLEI
K" (配列番号181)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC2561LC.1\;M13F)

> MHC2561LC.1\;M13F.499.5.2G2.13.3.10

起源

【化110】

1 ATGGAGTCAC AGATTCAGGT CTTTGTATTC GTGTTTCTCT GGTGTCTGG TGTGACGGA
61 GACATTGTGA TGACCCAGTC TCACAAATTC ATGTCCACAT CAGTAGGAGA CAGGGTCAGC
121 ATCACCTGCA AGGCCAGTCA GGATGTGAGT ACTGCTGTAG CCTGGTATCA ACAAAGCCA
181 GGGCAATCTC CTAAAGTTCT GATTTACTGG GCATCCACCC GGCACACTGG AGTCCCTGAT
241 CGCTTCACAG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TGTGCAGGCT
301 GAAGACCTGG CACTTTATTA CTGTCAGCAA GATTATAGCA CTCCGTGGAC GTTCGGTGA
361 GGCACCAAGC TGGAAATCAA A (配列番号182)

シグナルペプチド (塩基対1~60) :

【化111】

1 ATGGAGTCAC AGATTCAGGT CTTTGTATTC GTGTTTCTCT GGTGTCTGG TGTGACGGA 60

(配列番号183)

／翻訳=「MESQIQVFVFVFLWLSGVDG」 (配列番号184)

フレームワーク1 (塩基対61~129) :

【化112】

61 GACATTGTGA TGACCCAGTC TCACAAATTC ATGTCCACAT CAGTAGGAGA CAGGGTCAGC
ATCACCTGC 129 (配列番号185)

／翻訳=「DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC」 (配列番号186)

CDR-L1 (塩基対130~162) :

【化113】

130 A AGGCCAGTCA GGATGTGAGT ACTGCTGTAG CC 162

(配列番号187)

／翻訳=「KASQDVSTAVA」 (配列番号188)

フレームワーク2 (塩基対163~207) :

【化114】

163 TGGTATCA ACAAAGCCA GGGCAATCTC CTAAAGTTCT GATTAC 207

(配列番号189)

／翻訳=「WYQQKPGQSPKVLIIY」 (配列番号190)

CDR-L2 (塩基対208~228) :

【化115】

208 TGG GCATCCACCC GGCACACT 228

(配列番号191)

／翻訳=「WASTRHT」 (配列番号192)

フレームワーク3 (塩基対229~324) :

10

20

30

40

50

【化116】

229 GG AGTCCCTGAT CGCTTCACAG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTACTCTCA
CCATCAGCAG TGTGCAGGCT GAAGACCTGG CACTTTATTA CTGT 324 (配列番号193)

／翻訳＝「GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYC」(配
列番号194)

CDR-L3 (塩基対325～351)：

【化117】

325 CAGCAA GATTATAGCA CTCCGTGGAC G 351

(配列番号195)

／翻訳＝「QQDYSTPWT」(配列番号196)

フレームワーク4 (塩基対352～381)：

【化118】

352 TTCGGTGGG GGCACCAAGC TGGAAATCAA A 381

(配列番号197)

／翻訳＝「FGGGTKLEIK」(配列番号198)

【表2-20】

MHC2561LC. 1 499. 5. 2G2. 13. 3. 10

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MESQIQVFVFLWLSGVDG	1~20	20
LFR1	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	21~43	23
CDR-L1	KASQDVSTAVA	44~54	11
LFR2	WYQQKPGQSPKVLII	55~69	15
CDR-L2	WASTRHT	70~76	7
LFR3	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYC	77~108	32
CDR-L3	QQDYSTPWT	109~117	9
LFR4	FGGGTKLEIK	118~127	10

2C4重鎖可変(vH)DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC2562HC. 1；M13. 499. 5. 2C4. E6. 6. 8. 1

CDR分析

GFSFTDYN. . . . ____IDPYYGRI. . ____ATGAYTSGYSWF
AY

FASTA形式でのアミノ酸配列(MHC2562HC. 1\；M13F)

> MHC2562HC. 1\；M13F. 499. 5. 2C4. E6. 6. 8. 1

遺伝子座2C4__vH 420bpの直鎖状DNA

【表 2 - 2 1】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	388..420	
	／label=FWR4	
V__セグメント	352..387	
	／label=CDR3	
V__領域	229..351	
	／label=FWR3	10
V__セグメント	211..228	
	／label=CDR2	
V__領域	154..210	
	／label=FWR2	
V__セグメント	133..153	
	／label=CDR1	
V__領域	58..132	
	／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57	
	／label=LS	
CDS	1..420	
	／label=2C4__vH	

【化 1 1 9】

2 C 4 __ v H
／翻訳="MGWTWIFILILSVTTGVHSEVHLQQSGPELEKPGVSVKISCKASGFSFTDYNMNWV
KQSSGKSLEWIGNIDPYGRINYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCATGAYTSGYSW
FAYWGQGTLVTVSA" (配列番号 1 9 9)

30

F A S T A形式でのヌクレオチド配列 (M H C 2 5 6 2 H C . 1 \ ; M 1 3 F)
> M H C 2 5 6 2 H C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 2 C 4 . E 6 . 6 . 8 . 1
起源

【化 1 2 0】

1	ATGGGATGGA	CCTGGATCTT	TATTTTAATC	CTGTCAGTAA	CTACAGGTGT	CCACTCTGAG
61	GTCCACCTGC	AGCAGTCTGG	ACCTGAGCTG	GAGAAGCCTG	GCGTTTCAGT	GAAGATATCC
121	TGCAAGGCTT	CTGGTTTCTC	ATTCACTGAC	TACAACATGA	ACTGGGTGAA	ACAGAGCAGT
181	GGAAAAGAGCC	TTGAGTGGAT	TGGAAATATT	GATCCTTACT	ATGGACGTAT	TAACTATAAC
241	CAGAAATTCA	AGGGCAAGGC	CACATTGAGT	GTAGACAAAT	CCTCCAGCAC	AGCCTACATG
301	CACCTCAAGA	GCCTGACATC	TGAGGACTCT	GCAGTCTATT	ACTGTGCAAC	TGGGGCCTAC
361	ACCTCGGGCT	ACTCCTGGTT	TGCTTACTGG	GGCCAAGGGA	CTCTGGTCAC	TGTCTCTGCA

40

(配列番号 2 0 0)

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 1 2 1】

1 ATGGGATGGA CCTGGATCTT TATTTTAATC CTGTCAGTAA CTACAGGTGT CCACTCT 57

(配列番号 2 0 1)

／翻訳=「MGWTWIFILILSVTTGVHS」 (配列番号 2 0 2)

フレームワーク 1 (塩基対 5 8 ~ 1 3 2) :

50

【化122】

58 GAG GTCCACCTGC AGCAGTCTGG ACCTGAGCTG GAGAAGCCTG GCGTTTCAGT
GAAGATATCC TGCAAGGCTT CT 132 (配列番号203)

／翻訳＝「EVHLQQSGPELEKPGVSVKISKAS」(配列番号204)
CDR-H1 (塩基対133～153)：

【化123】

133 GGTTCCTC ATTCAGTAC TAC 153

(配列番号205)

／翻訳＝「GFSFTDY」(配列番号206)
フレームワーク2 (塩基対154～210)：

【化124】

154 AACATGA ACTGGGTGAA ACAGAGCAGT GGAAAGAGCC TTGAGTGGAT TGGAAATATT 210

(配列番号207)

／翻訳＝「NMNWVKQSSGKSLEWIGNI」(配列番号208)
CDR-H2 (塩基対211～228)：

【化125】

211 GATCCTTACT ATGGACGT 228

(配列番号209)

／翻訳＝「DPYYGR」(配列番号210)
フレームワーク3 (塩基対229～351)：

【化126】

229 AT TAACTATAAC CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACATTGAGT GTAGACAAAT
CCTCCAGCAC AGCCTACATG CACCTCAAGA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT
ACTGTGCAAC T 351 (配列番号211)

／翻訳＝「INYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSA
VYYCAT」(配列番号212)

CDR-H3 (塩基対352～387)：

【化127】

352 GGGGCCTAC ACCTCGGGCT ACTCCTGGTT TGCTTAC 387

(配列番号213)

／翻訳＝「GAYTSGYSWFAY」(配列番号214)
フレームワーク4 (塩基対388～420)：

【化128】

388 TGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC TGTCTCTGCA 420

(配列番号215)

／翻訳＝「WGQGTLVTVSA」(配列番号216)

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 2】

MHC 2 5 6 2 H C . 1 4 9 9 . 5 . 2 C 4 . E 6 . 6 .
8 . 1

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MGWTWIFILISVTTGVHS	1~19	19
HFR1	EVHLQQSGPELEKPGVSVKISCKAS	20~44	25
CDR-H1	GFSFTDY	45~51	7
HFR2	NMNWVKQSSGKSLEWIGNI	52~70	19
CDR-H2	DPYYGR	71~76	6
HFR3	INYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDS AVYYCAT	77~117	41
CDR-H3	GAYTSGYSWFAY	118~129	12
HFR4	WGQGTLLVTVSA	130~140	11

10

2 C 4 軽鎖可変 (v L) D N A およびアミノ酸配列＊
M H C 2 5 6 2 L C . 2 ; M 1 3 . 4 9 9 . 5 . 2 C 4 . E 6 . 6 . 8 . 1
C D R 分析
S S V S S S Y _ _ _ _ R T S _ _ _ _ Q Q W S G Y P F T
F A S T A 形式でのアミノ酸配列 (M H C 2 5 6 2 L C . 2 \ ; M 1 3 F)
> M H C 2 5 6 2 L C . 2 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 2 C 4 . E 6 . 6 . 8 . 1
遺伝子座 2 C 4 _ v L 3 9 0 b p の直鎖状 D N A

20

【表 2 - 2 3】

特徴	位置／修飾子
J__セグメント	361..390 ／label=FWR4
V__セグメント	334..360 ／label=CDR3
V__領域	238..333 ／label=FWR3
V__セグメント	217..237 ／label=CDR2
V__領域	172..216 ／label=FWR2
V__セグメント	136..171 ／label=CDR1
V__領域	67..135 ／label=FWR1
シグナル__ペプチド	1..66 ／label=LS
CDS	1..390 ／label=2C4__vL

30

40

50

【化129】

2C4_vL

／翻訳＝"MGLQVQVISFLLISVTVIMSRGENVLTQSPGIMAASLGEKVTMTCSASSSVSSSYL
HWYQQRSGASPKPLIHRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPTFGSGTK
LEIK" (配列番号217)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC2562LC.2\;M13F)

> MHC2562LC.2\;M13F.499.5.2C4.E6.6.8.1
起源

10

【化130】

1 ATGGGTTTAC AGGTGCAGGT TATCAGCTTC CTGTTAATCA GTGTCACAGT CATAATGTCC
61 AGAGGAGAAA ATGTGCTCAC CCAGTCTCCA GGAATAATGG CTGCCTCTCT GGGGAGAAAG
121 GTCACCATGA CCTGCAGTGC CAGCTCAAGT GTAAGTTCCA GTTACTTGCA CTGGTACCAG
181 CAGAGGTCAG GCGCTTCCCC CAAACCCTTG ATTCATAGGA CATCCAACCT GGCTTCTGGT
241 GTCCCAGCTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGGACCTCTT ACTCTCTCAC AATCAGCAGC
301 GTGGAGGCTG AAGATGATGC AACTTATTAC TGCCAGCAGT GGAGTGGTTA CCCATTACAG
361 TTCGGCTCGG GGACAAAGTT GGAAATAAAA (配列番号218)

シグナルペプチド (塩基対1～66) :

【化131】

20

1 ATGGGTTTAC AGGTGCAGGT TATCAGCTTC CTGTTAATCA GTGTCACAGT CATAATGTCC
AGAGGA 66 (配列番号219)

／翻訳＝「MGLQVQVISFLLISVTVIMSRG」 (配列番号220)

フレームワーク1 (塩基対67～135) :

【化132】

67 GAAA ATGTGCTCAC CCAGTCTCCA GGAATAATGG CTGCCTCTCT GGGGAGAAAG
GTCACCATGA CCTGC 135 (配列番号221)

／翻訳＝「ENVLTQSPGIMAASLGEKVTMTCS」 (配列番号222)

30

CDR-L1 (塩基対136～171) :

【化133】

136 AGTGC CAGCTCAAGT GTAAGTTCCA GTTACTTGCA C 171

(配列番号223)

／翻訳＝「SASSSVSSSYLH」 (配列番号224)

フレームワーク2 (塩基対172～216) :

【化134】

172 TGGTACCAG CAGAGGTCAG GCGCTTCCCC CAAACCCTTG ATTCAT 216

40

(配列番号225)

／翻訳＝「WYQQRSGASPKPLIH」 (配列番号226)

CDR-L2 (塩基対217～237) :

【化135】

217 AGGA CATCCAACCT GGCTTCT 237

(配列番号227)

／翻訳＝「RTSNLAS」 (配列番号228)

フレームワーク3 (塩基対238～333) :

50

【化136】

238 GGT GTCCAGCTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGGACCTCTT ACTCTCTCAC
AATCAGCAGC GTGGAGGCTG AAGATGATGC AACTTATTAC TGC 333 (配列番号229)

／翻訳＝「GVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYC」(配
列番号230)

CDR-L3 (塩基対334～360)：

【化137】

334 CAGCAGT GGAGTGGTTA CCCATTACG 360

(配列番号231)

／翻訳＝「QQWSGY PFT」(配列番号232)

フレームワーク4 (塩基対361～390)：

【化138】

361 TTCGGCTCGG GGACAAAGTT GGAAATAAAA 390

(配列番号233)

／翻訳＝「FGSGTKLEIK」(配列番号234)

【表2-24】

MHC2562LC. 2 499. 5. 2C4. E6. 6. 8. 1

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MGLQVQVISFLLISVTVIMSRG	1~22	22
LFR1	ENVLTQSPGIMAASLGEKVTMTC	23~45	23
CDR-L1	SASSSVSSSYLH	46~57	12
LFR2	WYQQRSGASPKPLIH	58~72	15
CDR-L2	RTSNLAS	73~79	7
LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYC	80~111	32
CDR-L3	QQWSGY PFT	112~120	9
LFR4	FGSGTKLEIK	121~130	10

4D1重鎖可変(vH)DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC2563HC. 1；M13. 499. 5. 4D1. 5. 16

CDR分析

GYTFTDYA. . . . I STYYGDT. . . . ARGNYDDWYFNV

FASTA形式でのアミノ酸配列(MHC2563HC. 1\；M13F)

> MHC2563HC. 1\；M13F. 499. 5. 4D1. 5. 16

遺伝子座4D1_vH 414bpの直鎖状DNA

10

20

30

40

50

【表 2 - 2 5】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	382..414 ／label=FWR4	
V__セグメント	352..381 ／label=CDR3	
V__領域	229..351 ／label=FWR3	10
V__セグメント	211..228 ／label=CDR2	
V__領域	154..210 ／label=FWR2	
V__セグメント	133..153 ／label=CDR1	
V__領域	58..132 ／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57 ／label=LS	
CDS	1..414 ／label=4D1__vH	

【化 1 3 9】

4 D 1 __ v H

／翻訳="MDWSCIIFFLVATATGVHSQVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWV
KQSHAKSLEWIGSISTYYGDTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGNYDDWYFN
VWGAGTTVTVSS" (配列番号 2 3 5)

30

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 6 3 HC. 1 \ ; M 1 3 F)

> MHC 2 5 6 3 HC. 1 \ ; M 1 3 F. 4 9 9. 5. 4 D 1. 5. 1 6

起源

【化 1 4 0】

1 ATGGATTGGA GCTGTATCAT CTTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT GCACTCCCAG
61 GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GTGAGGCCTG GGGTCTCAGT GAAGATTTCC

121 TGCAAGGGTT CTGGCTACAC ATTCAGTATG TATGCTATGC ACTGGGTGAA GCAGAGTCAT
181 GCAAAGAGTC TAGAGTGGAT TGGAAGTATT AGTACTTACT ATGGTGATAC TAATTACAAC
241 CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACAATGACT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTATATG
301 GAACTTGCCA GACTGACATC TGAGGATTCT GCCATCTATT ACTGTGCAAG AGGTAATTAC
361 GACGACTGGT ACTTCAATGT CTGGGGCGCA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCA

(配列番号 2 3 6)

40

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 1 4 1】

1 ATGGATTGGA GCTGTATCAT CTTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT GCACTCC 57

(配列番号 2 3 7)

／翻訳 = 「MDWSCIIFFLVATATGVHS」 (配列番号 2 3 8)

50

フレームワーク1（塩基対58～132）：

【化142】

58 CAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GTGAGGCCTG GGGTCTCAGT
GAAGATTTCC TGCAAGGGTT CT 132（配列番号239）

／翻訳＝「QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGS」（配列番号240）

CDR-H1（塩基対133～153）：

【化143】

133 GGCTACAC ATTCAGTGAT TAT 153

10

（配列番号241）

／翻訳＝「GYTF TDY」（配列番号242）

フレームワーク2（塩基対154～210）：

【化144】

154 GCTATGC ACTGGGTGAA GCAGAGTCAT GCAAAGAGTC TAGAGTGGAT TGGAAGTATT 210

（配列番号243）

／翻訳＝「AMHWVKQSHAKSLEWIGSI」（配列番号244）

CDR-H2（塩基対211～228）：

【化145】

211 AGTACTTACT ATGGTGAT 228

20

（配列番号245）

／翻訳＝「STYYGD」（配列番号246）

フレームワーク3（塩基対229～351）：

【化146】

229 AC TAATTACAAC CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACAATGACT GTAGACAAAT
CCTCCAGCAC AGCCTATATG GAACTTGCCA GACTGACATC TGAGGATTCT GCCATCTATT
ACTGTGCAAG A 351（配列番号247）

30

／翻訳＝「TNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSA
IYYCAR」（配列番号248）

CDR-H3（塩基対352～381）：

【化147】

352 GGTAATTAC GACGACTGGT ACTTCAATGT C 381

（配列番号249）

／翻訳＝「GNYDDWYFNV」（配列番号250）

フレームワーク4（塩基対382～414）：

【化148】

382 TGGGGCGCA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCA 414

40

（配列番号251）

／翻訳＝「WGAGTTVTVSS」（配列番号252）

50

【表 2 - 2 6】

MHC 2 5 6 3 HC. 1 4 9 9. 5. 4 D 1. 5. 1 6

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MDWSCIIFFLVATATGVHS	1~19	19
HFR1	QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGS	20~44	25
CDR-H1	GYTFTDY	45~51	7
HFR2	AMHWVKQSHAKSLEWIGSI	52~70	19
CDR-H2	STYYGD	71~76	6
HFR3	TNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDS AIYYCAR	77~117	41
CDR-H3	GNYYDDWYFNV	118~127	10
HFR4	WGAGTTVTVSS	128~138	11

10

4 D 1 軽鎖可変 (v L) DNA および アミノ酸配列 *

MHC 2 5 6 3 LC. 1 ; M 1 3. 4 9 9. 5. 4 D 1. 5. 1 6

C D R 分析

Q D I S G Y _ _ _ _ S T S _ _ _ _ L Q Y A S S P Y T

20

FASTA 形式でのアミノ酸配列 (MHC 2 5 6 3 LC. 1 \ ; M 1 3 F)

> MHC 2 5 6 3 LC. 1 \ ; M 1 3 F. 4 9 9. 5. 4 D 1. 5. 1 6

遺伝子座 4 D 1 _ v L 3 8 1 b p の直鎖状 DNA

【表 2 - 2 7】

特徴	位置 / 修飾子
J__セグメント	352. . 381 /label=FWR4
V__セグメント	325. . 351 /label=CDR3
V__領域	229. . 324 /label=FWR3
V__セグメント	208. . 228 /label=CDR2
V__領域	163. . 207 /label=FWR2
V__セグメント	130. . 162 /label=CDR1
V__領域	61. . 129 /label=FWR1
シグナル__ペプチド	1. . 60 /label=LS
CDS	1. . 381 /label=4D1_vL

30

40

50

【化149】

4D1__vL

／翻訳="MRIPAHVFGFLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDISGYLSWL
QQKPDGTIKRLIYSTSTLDSGVPKRFSGRSGSDYSLTISSESEDFADYYCLQYASSPYTFGGGAKLEI
KR" (配列番号253)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC2563LC.1\;M13F)

> MHC2563LC.1\;M13F.499.5.4D1.5.16

起源

10

【化150】

1 ATGAGGATTC CTGCTCACGT TTTTGGCTTC TTGTTGCTCT GGTTCAGG TGCCAGATGT
61 GACATCCAAA TGACCCAGTC TCCATCTTCC TTATCTGCCT CTCTGGGAGA AAGAGTCAGT
121 CTCACCTTGT GGGCAAGTCA GGATATTAGT GGTTACTTAA GCTGGCTTCA GCAGAAACCA
181 GATGGAACCTA TTAAACGTCT GATTTATAGC ACATCCACTT TAGATTCTGG TGTCCCAAAA
241 AGGTTCAGTG GCAGTAGGTC TGGGTCAGAT TATTCTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGTCT
301 GAAGATTTTG CAGACTATTA CTGTCTACAA TATGCTAGTT CTCCGTACAC GTTCGGAGGG
361 GGGCCAAGC TGAATAAA A (配列番号254)

シグナルペプチド (塩基対1~60) :

【化151】

20

1 ATGAGGATTC CTGCTCACGT TTTTGGCTTC TTGTTGCTCT GGTTCAGG TGCCAGATGT

(配列番号255)

／翻訳=「MRIPAHVFGFLLWFPGAR」 (配列番号256)

フレームワーク1 (塩基対61~129) :

【化152】

61 GACATCCAAA TGACCCAGTC TCCATCTTCC TTATCTGCCT CTCTGGGAGA AAGAGTCAGT
CTCACTTGT 129 (配列番号257)

／翻訳=「DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC」 (配列番号258)

30

CDR-L1 (塩基対130~162) :

【化153】

130 C GGGCAAGTCA GGATATTAGT GGTTACTTAA GC 162

(配列番号259)

／翻訳=「RASQDISGYLS」 (配列番号260)

フレームワーク2 (塩基対163~207) :

【化154】

163 TGGCTTCA GCAGAAACCA GATGGAACCTA TTAAACGTCT GATTTAT 207

40

(配列番号261)

／翻訳=「WLQQKPDGTIKRLIY」 (配列番号262)

CDR-L2 (塩基対208~228) :

【化155】

208 AGC ACATCCACTT TAGATTCT 228

(配列番号263)

／翻訳=「STSTLDS」 (配列番号264)

フレームワーク3 (塩基対229~324) :

50

【化156】

229 GG TGTCCCAAAA AGGTTCACTG GCAGTAGGTC TGGGTCAGAT TATTCTCTCA
CCATCAGCAG CCTAGAGTCT GAAGATTTTG CAGACTATTA CTGT 324 (配列番号265)

／翻訳＝「GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYC」(配
列番号266)

CDR-L3 (塩基対325～351)：

【化157】

325 CTACAA TATGCTAGTT CTCCGTACAC G 351

(配列番号267)

／翻訳＝「LQYASSPYT」(配列番号268)

フレームワーク4 (塩基対352～381)：

【化158】

352 TTCGGAGGG GGGGCAAGC TGGAAATAAA A 381

(配列番号269)

／翻訳＝「FGGGAKLEIK」(配列番号270)

【表2-28】

MHC2563LC. 1 499. 5. 4D1. 5. 16

領域	配列断片	残基	長さ
リーダ	MRIPAHVFGFLLWFPGARC	1~20	20
LFR1	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC	21~43	23
CDR-L1	RASQDISGYLS	44~54	11
LFR2	WLQKKPDGTIKRLIY	55~69	15
CDR-L2	STSTLDS	70~76	7
LFR3	GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYC	77~108	32
CDR-L3	LQYASSPYT	109~117	9
LFR4	FGGGAKLEIK	118~127	10

1C8重鎖可変(vH)DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC2564HC. 1; M13. 499. 5. 1C8. 9. 12. 2

CDR分析

GFNIKDTY. . . . ____IDPANGKT. . ____AWLLPYFYFDY

FASTA形式でのアミノ酸配列(MHC2564HC. 1\; M13F)

> MHC2564HC. 1\; M13F. 499. 5. 1C8. 9. 12. 2

遺伝子座1C8__vH 408bpの直鎖状DNA

【表 2 - 2 9】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	376..408 ／label=FWR4	
V__セグメント	352..375 ／label=CDR3	
V__領域	229..351 ／label=FWR3	10
V__セグメント	211..228 ／label=CDR2	
V__領域	154..210 ／label=FWR2	
V__セグメント	133..153 ／label=CDR1	
V__領域	58..132 ／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57 ／label=LS	
CDS	1..408 ／label=1C8__vH	

【化 1 5 9】

1 C 8 __ v H

／翻訳="MKCSWIIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTASGFENIKDTYMHVW
KORPEQGLEWIGRIDPANGKTIFDPKFQVKATITADTSSNTVYLHLSSLTSEDTAIYYCAWLLPYFDYW
GQGTTLTVSS" (配列番号 2 7 1)

30

F A S T A 形式でのヌクレオチド配列 (M H C 2 5 6 4 H C . 1 \ ; M 1 3 F)

> M H C 2 5 6 4 H C . 1 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 1 C 8 . 9 . 1 2 . 2

起源

【化 1 6 0】

```
1 ATGAAATGCA GCTGGATTAT CTTCTTCCTG ATGGCTGTGG TTACAGGGGT CAATTCAGAG
61 GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAACTT GTGCAGCCAG GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC
121 TGTACAGCTT CTGGCTTCAA TATTAAAGAC ACCTATATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT
181 GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGGAAGGATT GATCCTGCCA ATGGTAAAAC TATTTTTCAC
241 CCGAAGTTCC AGGTCAAGGC CACTATAACT GCCGACACAT CCTCCAACAC AGTCTACCTG
301 CATCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCATCTATT ACTGTGCTTG GTTACTTCCT
361 TACTACTTTG ACTACTGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCA (配列番号 2 7 2)
```

40

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 1 6 1】

1 ATGAAATGCA GCTGGATTAT CTTCTTCCTG ATGGCTGTGG TTACAGGGGT CAATTCA 57

(配列番号 2 7 3)

／翻訳=「M K C S W I I F F L M A V V T G V N S」 (配列番号 2 7 4)

フレームワーク 1 (塩基対 5 8 ~ 1 3 2) :

50

【化162】

58 GAG GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAACTT GTGCAGCCAG GGGCCTCAGT
CAAGTTGTCC TGTACAGCTT CT 132 (配列番号275)

／翻訳＝「EVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTAS」(配列番号276)

CDR-H1 (塩基対133～153)：

【化163】

133 GGCTTCAA TATTAAAGAC ACC 153

(配列番号277)

／翻訳＝「GFNIKDT」(配列番号278)

フレームワーク2 (塩基対154～210)：

【化164】

154 TATATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGGAAGGATT 210

210 (配列番号279)

／翻訳＝「YMHVVKQRPEQGLEWIGRI」(配列番号280)

CDR-H2 (塩基対211～228)：

【化165】

211 GATCCTGCGA ATGGTAAA 228

(配列番号281)

／翻訳＝「DPANGK」(配列番号282)

フレームワーク3 (塩基対229～351)：

【化166】

229 AC TATTTTGTGAC CCGAAGTTCC AGGTCAAGGC CACTATAACT GCCGACACAT
CCTCCAACAC AGTCTACCTG CATCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCATCTATT
ACTGTGCTTG G 351 (配列番号283)

／翻訳＝「TIFDPKFQVKATITADTSSNTVYLHLSSLTSEDTA

IYYCAW」(配列番号284)

CDR-H3 (塩基対352～375)：

【化167】

352 TTACTTCCT TACTACTTTG ACTAC 375

(配列番号285)

／翻訳＝「LLPY YFDY」(配列番号286)

フレームワーク4 (塩基対376～408)：

【化168】

376 TGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCA 408

(配列番号287)

／翻訳＝「WGQGTTLT VSS」(配列番号288)

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 0】

MHC 2 5 6 4 H C . 1 4 9 9 . 5 . 1 C 8 . 9 . 1 2 . 2

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MKCSWIIFFLMAVVTGVNS	1~19	19
HFR1	EVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTAS	20~44	25
CDR-H1	GFNIKDT	45~51	7
HFR2	YMHWVKQRPEQGLEWIGRI	52~70	19
CDR-H2	DPANGK	71~76	6
HFR3	TIFDPKFQVKATITADTSSNTVYLHLSSLTSEDTAIY YCAW	77~117	41
CDR-H3	LLPYIFYDY	118~125	8
HFR4	WGQGTTLTVSS	126~136	11

10

1 C 8 軽鎖可変 (v L) D N A およびアミノ酸配列 *

M H C 2 5 6 4 L C B . 4 ; M 1 3 . 4 9 9 . 5 . 1 C 8 . 9 . 1 2 . 2

C D R 分析

S S I S S S N _ _ _ _ G T S _ _ _ _ Q K W S H Y P L T

F A S T A 形式でのアミノ酸配列 (M H C 2 5 6 4 L C B . 4 \ ; M 1 3 F)

> M H C 2 5 6 4 L C B . 4 \ ; M 1 3 F . 4 9 9 . 5 . 1 C 8 . 9 . 1 2 . 2

遺伝子座 1 C 8 _ v L 3 9 0 b p の直鎖状 D N A

【表 2 - 3 1】

特徴	位置／修飾子
J__セグメント	361..390 ／label=FWR4
V__セグメント	334..360 ／label=CDR3
V__領域	238..333 ／label=FWR3
V__セグメント	217..237 ／label=CDR2
V__領域	172..216 ／label=FWR2
V__セグメント	136..171 ／label=CDR1
V__領域	67..135 ／label=FWR1
シグナル__ペプチド	1..66 ／label=LS
CDS	1..390 ／label=1C8__vL

20

30

40

50

【化169】

1 C 8__v L

／翻訳＝"MDFHVQIFSFMLISVTVMLSSGEIVLTQSPAVMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNL

HWYQQKSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEDAATYYCQKWSHYPLTFGAGTK

LELK" (配列番号289)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC2564LCB.4\;M13F)

> MHC2564LCB.4\;M13F.499.5.1C8.9.12.2

起源

【化170】

```
1 ATGGATTTTC ATGTGCAGAT TTTCAGCTTC ATGCTAATCA GTGTCACAGT CATGTTGTCC
61 AGTGGGGAAA TTGTACTCAC CCAGTCTCCA GCAGTCATGG CTGCATCTCC AGGGGAGAAG
121 GTCACCATCA CCTGCAGCGT CAGTTCAAGT ATAAGTTCCA GCAACTTGCA CTGGTACCAG
181 CAGAAGTCAG GAACCTCGCC CAAACTCTGG ATTTATGGCA CATCCAACCT GGCTTCTGGA
241 GTCCCTGTTT GCTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACCTCTT ATTCTCTCAC AATCAGCAGC
301 ATGGAGGCTG AAGATGCTGC CACTTATTAC TGTCAAAAGT GGAGTCATTA CCCGCTCAGC
361 TTCGGTGTCTG GGACCAAGCT GGAGCTGAAA (配列番号290)
```

シグナルペプチド (塩基対1～66) :

【化171】

```
1 ATGGATTTTC ATGTGCAGAT TTTCAGCTTC ATGCTAATCA GTGTCACAGT CATGTTGTCC
AGTGGG 66 (配列番号291)
```

／翻訳＝「MDFHVQIFSFMLISVTVMLSSG」 (配列番号292)

フレームワーク1 (塩基対67～135) :

【化172】

```
67 GAAA TTGTACTCAC CCAGTCTCCA GCAGTCATGG CTGCATCTCC AGGGGAGAAG
GTCACCATCA CCTGC 135 (配列番号293)
```

／翻訳＝「EIVLTQSPAVMAASPGEKVTITC」 (配列番号294)

CDR-L1 (塩基対136～171) :

【化173】

```
136 AGCGT CAGTTCAAGT ATAAGTTCCA GCAACTTGCA C 171
```

(配列番号295)

／翻訳＝「SVSSSISSSNLH」 (配列番号296)

フレームワーク2 (塩基対172～216) :

【化174】

```
172 TGGTACCAG CAGAAGTCAG GAACCTCGCC CAAACTCTGG ATTTAT 216
```

(配列番号297)

／翻訳＝「WYQQKSGTSPKLWIY」 (配列番号298)

CDR-L2 (塩基対217～237) :

【化175】

```
217 GGCA CATCCAACCT GGCTTCT 237
```

(配列番号299)

／翻訳＝「GTSNLAS」 (配列番号300)

フレームワーク3 (塩基対238～333) :

10

20

30

40

50

【化176】

238 GGA GTCCCTGTTC GCTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACCTCTT ATTCTCTCAC
AATCAGCAGC ATGGAGGCTG AAGATGCTGC CACTTATTAC TGT 333 (配列番号301)

／翻訳＝「GVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC」(配
列番号302)

CDR-L3 (塩基対334～360)：

【化177】

334 CAAAAGT GGAGTCATTA CCCGCTCAG 360

(配列番号303)

／翻訳＝「QKWSHYPLT」(配列番号304)

フレームワーク4 (塩基対361～390)：

【化178】

361 TTCGGTGCTG GGACCAAGCT GGAGCTGAAA 390

(配列番号305)

／翻訳＝「FGAGTKLELK」(配列番号306)

【表2-32】

MHC2564LCB. 4 499. 5. 1C8. 9. 12.
2

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MDFHVQIFSFMLISVTVMLSSG	1~22	22
LFR1	EIVLTQSPAVMAASPGEKVTITC	23~45	23
CDR-L1	SVSSSISSNLH	46~57	12
LFR2	WYQQKSGTSPKLWIY	58~72	15
CDR-L2	GTSNLAS	73~79	7
LFR3	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC	80~111	32
CDR-L3	QKWSHYPLT	112~120	9
LFR4	FGAGTKLELK	121~130	10

4E5重鎖可変(vH)DNAおよびアミノ酸配列＊

MHC2556HCN. 1；M13. 499. 5. 4E5. 20. 22

CDR分析

GYTFTTYT. . . . ____INPSSGYT. . ____ARHPWDSNY

FASTA形式でのアミノ酸配列(MHC2556HCN. 1\；M13F)

>MHC2556HCN. 1\；M13F

遺伝子座4E5__vH 405bpの直鎖状DNA

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 3】

特徴	位置／修飾子	
J__セグメント	373..405 ／label=FWR4	
V__セグメント	352..372 ／label=CDR3	
V__領域	229..351 ／label=FWR3	10
V__セグメント	211..228 ／label=CDR2	
V__領域	154..210 ／label=FWR2	
V__セグメント	133..153 ／label=CDR1	
V__領域	58..132 ／label=FWR1	20
シグナル__ペプチド	1..57 ／label=LS	
CDS	1..405 ／label=4E5__vH	

【化 1 7 9】

4 E 5 __ v H

／翻訳="MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFITTYTMHWV
KQRPQGQLEWIGHINPSSGYTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAQMQLSSLTSEDSAVYYCARHPWDSNYWG
QGTTLTVSS" (配列番号 3 0 7)

30

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 5 6 H C N . 1 \ ; M 1 3 F)
>MHC 2 5 5 6 H C N . 1 \ ; M 1 3 F

起源

【化 1 8 0】

1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCCCAG
61 GTCCAGCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC
121 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTTACTACC TACACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT
181 GGACAGGGTC TGGAGTGGAT TGGACACATT AATCCTAGCA GTGGATATAC TGAGTACAAT
241 CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACACTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCACATG
301 CAACTGAGCA GCCTAACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ACACCCCTGG
361 GACTCGAACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (配列番号 3 0 8)

40

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 5 7) :

【化 1 8 1】

1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCC 57

(配列番号 3 0 9)

／翻訳=「MERHWIFLFLLSVTAGVHS」 (配列番号 3 1 0)

フレームワーク 1 (塩基対 5 8 ~ 1 3 2) :

50

【化182】

58 CAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT
GAAGATGTCC TGCAAGGCTT CT 132 (配列番号311)

／翻訳＝「QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKAS」(配列番号312)
CDR-H1 (塩基対133～153)：

【化183】

133 GGCTACAC CTTTACTACC TAC 153

(配列番号313)

／翻訳＝「GYTFTTY」(配列番号314)
フレームワーク2 (塩基対154～210)：

【化184】

154 ACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT GGACAGGGTC TGGAGTGGAT TGGACACATT 210

(配列番号315)

／翻訳＝「TMHWVKQRPGQGLEWIGHI」(配列番号316)
CDR-H2 (塩基対211～228)：

【化185】

211 AATCCTAGCA GTGGATAT 228

(配列番号317)

／翻訳＝「NPSSGY」(配列番号318)
フレームワーク3 (塩基対229～351)：

【化186】

229 AC TGAGTACAAT CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACACTGACT GCAGACAAAT
CCTCCAGCAC AGCCACATG CAACTGAGCA GCCTAACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT
ACTGTGCAAG A 351 (配列番号319)

／翻訳＝「TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTA HMQLSSLTSEDSA
VYYCAR」(配列番号320)
CDR-H3 (塩基対352～372)：

【化187】

352 CACCCCTGG GACTCGAACT AC 372

(配列番号321)

／翻訳＝「HPWDSNY」(配列番号322)
フレームワーク4 (塩基対373～405)：

【化188】

373 TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405

(配列番号323)

／翻訳＝「WGQGTTTLTVSS」(配列番号324)

10

20

30

40

50

【表 2 - 3 4】

MHC 2 5 5 6 HCN. 1 4 9 9. 5. 4 E 5. 2 0. 2 2

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MERHWIFLFLSVTAGVHS	1~19	19
HFR1	QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKAS	20~44	25
CDR-H1	GYTFTTY	45~51	7
HFR2	TMHWVKQRPGQGLEWIGHI	52~70	19
CDR-H2	NPSSGY	71~76	6
HFR3	TEYNQKFCDKTTLTADKSSSTAQMQLSSLTSED SAVYYCAR	77~117	41
CDR-H3	HPWDSNY	118~124	7
HFR4	WGQGTTTLTVSS	125~135	11

10

4 E 5 軽鎖可変 (v L) DNA および アミノ酸配列 *

MHC 2 5 5 6 LCN. 2 ; M 1 3. 4 9 9. 5. 4 E 5. 2 0. 2 2

CDR 分析

E N I D S Y _ _ _ _ _ A A T _ _ _ _ _ Q H Y Y I T P F T

20

FASTA 形式でのアミノ酸配列 (MHC 2 5 5 6 LCN. 2 \ ; M 1 3 F)

> MHC 2 5 5 6 LCN. 2 \ ; M 1 3 F

遺伝子座 4 E 5 _ v L 3 8 1 b p の直鎖状 DNA

【表 2 - 3 5】

特徴	位置 / 修飾子
J__セグメント	352..381 /label=FWR4
V__セグメント	325..351 /label=CDR3
V__領域	229..324 /label=FWR3
V__セグメント	208..229 /label=CDR2
V__領域	163..207 /label=FWR2
V__セグメント	130..162 /label=CDR1
V__領域	61..129 /label=FWR1
シグナル__ペプチド	1..60 /label=LS
CDS	1..381 /label=4E5__vL

30

40

50

【化 1 8 9】

4 E 5 __ v L

／翻訳＝"MSVPTQLLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIDSYLAWY
QQKQGRSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVARYYCQHYYITPFTFGSGTKLEI
K" (配列番号 3 2 5)

FASTA形式でのヌクレオチド配列 (MHC 2 5 5 6 L C N . 2 \ ; M 1 3 F)

> MHC 2 5 5 6 L C N . 2 \ ; M 1 3 F

起源

10

【化 1 9 0】

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT
61 GACATCCAGA TGA CT CAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC
121 ATCACATGTC GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CATGGTATCA GCAGAAACAG
181 GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTATGCT GCAACAAACT TAGCAGATGG TGTGCCATCA
241 AGGTT CAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TATTCTCTCA AGATCAACAG CCTGCAGTCT
301 GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGTCAACAT TATTATATTA CTCCATTAC GTTCGGCTCG
361 GGGACAAAGT TGGAAATAAA A (配列番号 3 2 6)

20

シグナルペプチド (塩基対 1 ~ 6 0) :

【化 1 9 1】

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT 60

(配列番号 3 2 7)

／翻訳＝「MSVPTQLLGLLLLWLTDARC」 (配列番号 3 2 8)

フレームワーク 1 (塩基対 6 1 ~ 1 2 9) :

【化 1 9 2】

61 GACATCCAGA TGA CT CAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC
ATCACATGT 129 (配列番号 3 2 9)

30

／翻訳＝「DIQMTQSPASLSASVGETVTITC」 (配列番号 3 3 0)

CDR-L 1 (塩基対 1 3 0 ~ 1 6 2) :

【化 1 9 3】

130 C GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CA 162

(配列番号 3 3 1)

／翻訳＝「RASENIDSYLA」 (配列番号 3 3 2)

フレームワーク 2 (塩基対 1 6 3 ~ 2 0 7) :

40

【化 1 9 4】

163 TGGTATCA GCAGAAACAG GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTAT 207

(配列番号 3 3 3)

／翻訳＝「WYQQKQGRSPQLLVY」 (配列番号 3 3 4)

CDR-L 2 (塩基対 2 0 8 ~ 2 2 8) :

【化 1 9 5】

208 GCT GCAACAAACT TAGCAGAT 228

(配列番号 3 3 5)

50

／翻訳＝「A A T N L A D」（配列番号 3 3 6）

フレームワーク 3（塩基対 2 2 9～3 2 4）：

【化 1 9 6】

229 GG TGTGCCATCA AGGTTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TATTCTCTCA

AGATCAACAG CCTGCAGTCT GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGT 324（配列番号 3 3 7）

／翻訳＝「G V P S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q S E D V A R Y Y C」（配列番号 3 3 8）

CDR-L3（塩基対 3 2 5～3 5 1）：

【化 1 9 7】

325 CAACAT TATTATATTA CTCCATTCAC G 351

10

（配列番号 3 3 9）

／翻訳＝「Q H Y Y I T P F T」（配列番号 3 4 0）

フレームワーク 4（塩基対 3 5 2～3 8 1）：

【化 1 9 8】

352 TTCGGCTCG GGGACAAAGT TGGAAATAAA A 381

（配列番号 3 4 1）

／翻訳＝「F G S G T K L E I K」（配列番号 3 4 2）

【表 2-36】

MHC 2 5 5 6 L C N. 2 4 9 9. 5. 4 E 5. 2 0. 2 2

20

領域	配列断片	残基	長さ
リーダー	MSVPTQLLGLLLLWLTDARC	1~20	20
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	21~43	23
CDR-L1	RASENIDSYLA	44~54	11
LFR2	WYQQKQGRSPQLLVY	55~69	15
CDR-L2	AATNLAD	70~76	7
LFR3	GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLSQSEDVARYYC	77~108	32
CDR-L3	QHYYITPFT	109~117	9
LFR4	FGSGTKLEIK	118~127	10

30

＊CDRの定義およびK a b a tに従うタンパク質配列の番号付け。CDRアミノ酸配列には、それぞれ、CDR 1、CDR 2、およびCDR 3の順に下線が引かれている。

40

50

【表 3】

表 3：抗HHLA2 mAbの結合およびリガンド遮断特徴の概要

HHLA2 mAb (アイソタイプ)	8A12 (IgG2a)	6D10 (IgG1)	6F10 (IgG1)	8D2 (IgG2a)	2G2 (IgG1)	2C4 (IgG1)	4D1 (IgG1)	1C8 (IgG2a)	4E5 (IgG1)
¹ 結合 EC50 (ug/mL)	³ nd	22.49	0.25	³ nd	0.21	0.24	0.44	0.63	³ nd
² 機能	IHC、 WB	非遮 断剤	遮断 剤	IHC、 WB	弱い 遮断 剤	結合 増強	遮断 剤	非遮 断剤	遮断 剤

10

¹：フローサイトメトリーによるHHLA2トランスフェクト300. 19マウスプレB細胞白血病細胞株への結合

²：フローサイトメトリーによるHHLA2-mIgG2aのTMIGD2トランスフェクト300. 19マウスプレB細胞白血病細胞株への結合の遮断

³：決定されず：8A12-低結合のため測定不能；4E5-培養上清

【0206】

III. 核酸、ベクター、および組換え宿主細胞

20

本発明のさらなる目的は、本発明のモノクローナル抗体およびその断片、免疫グロブリン、ならびにポリペプチドをコードする核酸配列に関する。

【0207】

例えば、特定の実施形態では、本発明は、mAb 8A12のvHドメインまたはmAb 8A12のvLドメインをコードする核酸配列に部分的に関する。別の特定の実施形態では、本発明は、ポリクローナル抗体1. 2および/または2. 2から単離された少なくとも1つの有効な抗HHLA2 mAbのvHドメインまたはvLドメインをコードする核酸配列に部分的に関する。

【0208】

典型的には、当該核酸は、プラスミド、コスミド、エピソーム、人工染色体、ファージ、またはウイルスベクター等の任意の好適なベクター中に含まれ得るDNAまたはRNA分子である。

30

【0209】

「ベクター」、「クローニングベクター」、および「発現ベクター」という用語は、DNAまたはRNA配列（例えば、外来遺伝子）が宿主細胞に導入されて、宿主を形質転換し、導入された配列の発現（例えば、転写および翻訳）を促進し得るビヒクルを意味する。したがって、本発明のさらなる目的は、本発明の核酸を含むベクターに関する。

【0210】

かかるベクターは、対象への投与時に当該ポリペプチドの発現を引き起こすか、または指示するための制御要素、例えば、プロモーター、エンハンサー、ターミネーター等を含み得る。動物細胞の発現ベクターに使用され得るプロモーターおよびエンハンサーの例には、SV40の初期プロモーターおよびエンハンサー（Mizukami T. et al. 1987）、モロニー Maus 白血病ウイルスのLTRプロモーターおよびエンハンサー（Kuwana Y et al. 1987）、免疫グロブリンH鎖のプロモーター（Mason J O et al. 1985）およびエンハンサー（Gillies S D et al. 1983）等が挙げられる。

40

【0211】

動物細胞のいずれの発現ベクターも使用され得る。好適なベクターの例には、pAGE107（Miyaji H et al. 1990）、pAGE103（Mizukami T et al. 1987）、pHSG274（Brady G et al. 1984）

50

、pKCR (O'Hare K et al. 1981)、pSG1ベータd2-4- (Miyaji H et al. 1990) 等が挙げられる。プラスミドの他の代表的な例には、複製起点を含む複製プラスミド、または組み込み型プラスミド、例えば、pUC、pCDNA、pBR等が挙げられる。ウイルスベクターの代表的な例には、アデノウイルスベクター、レトロウイルスベクター、ヘルペスウイルスベクター、およびAAVベクターが挙げられる。かかる組換えウイルスは、パッケージング細胞のトランスフェクションまたはヘルパープラスミドもしくはウイルスでの過渡的トランスフェクション等の当該技術分野で既知の技法によって産生され得る。ウイルスパッケージング細胞の典型的な例には、PA317細胞、PsiCRIP細胞、GPenv陽性細胞、293細胞等が挙げられる。かかる複製欠損組換えウイルスを産生するための詳細なプロトコルは、例えば、WO 95/14785、WO 96/22378、米国特許第5,882,877号、米国特許第6,013,516号、米国特許第4,861,719号、米国特許第5,278,056号、およびWO 94/19478で見つけることができる。

10

【0212】

本発明のさらなる目的は、本発明による核酸および／またはベクターによってトランスフェクト、感染、または形質転換された細胞に関する。「形質転換」という用語は、「外来」（すなわち、外因性または細胞外）遺伝子またはDNAもしくはRNA配列の宿主細胞への導入を意味し、これにより、宿主細胞が導入された遺伝子または配列を発現して、導入された遺伝子または配列によってコードされる所望の物質、典型的には、タンパク質または酵素を産生するようになる。導入されたDNAまたはRNAを受容および発現する宿主細胞が「形質転換されている」。

20

【0213】

本発明の核酸を使用して、好適な発現系において本発明の組換えポリペプチドを産生することができる。「発現系」という用語は、例えば、ベクターによって運搬されて宿主細胞に導入された外来DNAによってコードされたタンパク質の発現に好適な条件下での宿主細胞および適合性ベクターを意味する。

【0214】

一般的な発現系には、E. coli 宿主細胞およびプラスミドベクター、昆虫宿主細胞およびバキュロウイルスベクター、ならびに哺乳類宿主細胞およびベクターが含まれる。宿主細胞の他の例には、原核細胞（細菌等）および真核細胞（酵母細胞、哺乳類細胞、昆虫細胞、植物細胞等）が挙げられるが、これらに限定されない。特定の例としては、E. coli、Kluyveromyces、またはSaccharomyces酵母、哺乳類細胞株（例えば、Vero細胞、CHO細胞、3T3細胞、COS細胞等）、ならびに初代または樹立哺乳類細胞培養物（例えば、リンパ芽球、線維芽細胞、胚細胞、上皮細胞、神経細胞、脂肪細胞等から産生される）が挙げられる。例としては、マウスSP2/0-Ag14細胞(ATCC CRL 1581)、マウスP3X63-Ag8.653細胞(ATCC CRL 1580)、ジヒドロ葉酸還元酵素遺伝子（以下、「DHFR遺伝子」と称される）が欠損しているCHO細胞(Urlaub G et al.; 1980)、ラットYB2/3HL.P2.G11.16Ag.20細胞(ATCC CRL 1662、以下、「YB2/0細胞」と称される）等も挙げられる。キメラまたはヒト化抗体のADCC活性がYB2/0細胞で発現されたときに増強されるため、YB2/0細胞が好ましい。

30

40

【0215】

本発明は、本発明による本発明の抗体またはポリペプチドを発現する組換え宿主細胞を産生する方法であって、(i) 上述の組換え核酸またはベクターをコンピテント宿主細胞にインビトロまたはエクスピボで導入するステップ、(ii) 得られた組換え宿主細胞をインビトロまたはエクスピボで培養するステップ、および(iii) 任意に、当該抗体またはポリペプチドを発現および／または分泌する細胞を選択するステップからなるステップを含む、方法にも関する。かかる組換え宿主細胞は、本発明の抗体およびポリペプチドの産生に使用され得る。

50

【0216】

別の態様では、本発明は、選択的ハイブリダイゼーション条件下で本明細書に開示されるポリヌクレオチドにハイブリダイズする単離された核酸を提供する。したがって、この実施形態のポリヌクレオチドは、かかるポリヌクレオチドを含む核酸の単離、検出、および／または定量化に使用され得る。例えば、本発明のポリヌクレオチドを使用して、寄託されたライブラリにおける部分長または全長クローンを特定、単離、または増幅することができる。いくつかの実施形態では、ポリヌクレオチドは、ヒトもしくは哺乳類核酸ライブラリから単離されるか、またはさもなければヒトもしくは哺乳類核酸ライブラリ由来のcDNAと相補的なゲノムもしくはcDNA配列である。好ましくは、cDNAライブラリは、少なくとも80%の全長配列、好ましくは、少なくとも85%または90%の全長配列、より好ましくは、少なくとも95%の全長配列を含む。cDNAライブラリは、珍しい配列の提示を増加させるために正規化され得る。低または中程度ストリンジェンシーハイブリダイゼーション条件は、排他的ではなく典型的に、相補的配列と比較して配列同一性が減少した配列に用いられる。中程度および高ストリンジェンシー条件は、任意に、より高い同一性の配列に用いられ得る。低ストリンジェンシー条件は、約70%の配列同一性を有する配列の選択的ハイブリダイゼーションを可能にし、オルソログまたはパラログ配列を特定するために用いられ得る。任意に、本発明のポリヌクレオチドは、本明細書に記載のポリヌクレオチドによってコードされる抗体の少なくとも一部をコードする。本発明のポリヌクレオチドは、本発明の抗体をコードするポリヌクレオチドへの選択的ハイブリダイゼーションのために用いられ得る核酸配列を包含する。例えば、各々参照により本明細書に全体的に組み込まれる、Ausubel（上記参照）、Colligan（上記参照）を参照されたい。

10

20

【0217】

IV. 抗体を産生する方法

本発明の抗体およびその断片、免疫グロブリン、ならびにポリペプチドは、単独または組み合わせでのいずれかでの任意の化学的、生物学的、遺伝的、または酵素的技法等であるが、これらに限定されない当該技術分野で既知の任意の技法によって産生され得る。

【0218】

所望の配列のアミノ酸配列を知ることにより、当業者であれば、ポリペプチドを産生するための標準技法によって当該抗体またはポリペプチドを容易に産生することができる。例えば、それらは、周知の固相法を使用して、好ましくは、製造業者の指示に従って市販のペプチド合成装置（例えば、Applied Biosystems（Foster City, Calif.）製のもの）を使用して合成され得る。あるいは、本発明の抗体および他のポリペプチドは、当該技術分野で周知の組換えDNA技法によって合成され得る。例えば、これらの断片は、所望の（ポリ）ペプチドをコードするDNA配列の発現ベクターへの組み込みおよびかかるベクターの所望のポリペプチドを発現する好適な真核または原核宿主への導入後にDNA発現産物として得られ得、所望のポリペプチドは、周知の技法を使用して後に単離され得る。

30

【0219】

具体的には、本発明はさらに、本発明の抗体またはポリペプチドを産生する方法であって、（i）当該抗体またはポリペプチドの発現を可能にするのに好適な条件下で本発明による形質転換宿主細胞を培養するステップ、および（ii）発現された抗体またはポリペプチドを回収するステップからなるステップを含む、方法に関する。

40

【0220】

本発明の抗体および他のポリペプチドは、例えば、タンパク質A-セファロース、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、親和性クロマトグラフィー、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィー、およびレクチンクロマトグラフィー等の従来の免疫グロブリン精製手順によって培養培地から好適に分離される。高速液体ク

50

ロマトグラフィー（「HPLC」）も精製に用いられ得る。例えば、各々参照により本明細書に全体的に組み込まれる、Colligan, Current Protocols in Immunology、またはCurrent Protocols in Protein Science, John Wiley & Sons, NY, N. Y., (1997-2001)、例えば、第1、4、6、8、9、10章を参照されたい。

【0221】

本発明のキメラ抗体（例えば、マウスーヒトキメラまたは非齧歯類ーヒトキメラ）は、前述のようにVLおよびVHドメインをコードする核配列を得て、それらを、ヒト抗体CHおよびヒト抗体CLをコードする遺伝子を有する動物細胞の発現ベクターに挿入することによってヒトキメラ抗体発現ベクターを構築し、発現ベクターを動物細胞に導入することによってコーディング配列を発現することによって産生され得る。ヒトキメラ抗体のCHドメインは、IgGクラスまたはそのサブクラス、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4等のヒト免疫グロブリンに属する任意の領域であり得る。同様に、ヒトキメラ抗体のCLは、カッパクラスまたはラムダクラス等のIgに属する任意の領域であり得る。標準の組換えDNA技法を使用して作製され得るヒト部分および非ヒト部分の両方を含むキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、本発明の範囲内である。かかるキメラおよびヒト化モノクローナル抗体は、当該技術分野で既知の組換えDNA技法によって、例えば、国際特許公開第PCT/US86/02269号（Robinson et al.）、欧州特許出願第184,187号（Akira et al.）、欧州特許出願第171,496号（Taniguchi, M.）、欧州特許出願第173,494号（Morrison et al.）、PCT出願第WO86/01533号（Neuberger et al.）、米国特許第4,816,567号（Cabilly et al.）、欧州特許出願第125,023号（Cabilly et al.）、Better et al. (1988) Science 240:1041-1043、Liu et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:3439-3443、Liu et al. (1987) J. Immunol. 139:3521-3526、Sun et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:214-218、Nishimura et al. (1987) Cancer Res. 47:999-1005、Wood et al. (1985) Nature 314:446-449、Shaw et al. (1988) J. Natl. Cancer Inst. 80:1553-1559、Morrison, S. L. (1985) Science 229:1202-1207、Oi et al. (1986) Biotechniques 4:214、米国特許第5,225,539号（Winter）、Jones et al. (1986) Nature 321:552-525、Verhoeyan et al. (1988) Science 239:1534、およびBeidler et al. (1988) J. Immunol. 141:4053-4060に記載の方法を使用して産生され得る。

【0222】

加えて、ヒト化抗体は、米国特許第5,565,332号に開示されるプロトコル等の標準のプロトコルに従って作製され得る。別の実施形態では、抗体鎖または特異的結合対メンバーは、当該技術分野で既知の技法、例えば、米国特許第5,565,332号、同第5,871,907号、または同第5,733,743号に記載の技法を使用して、特異的結合対メンバーのポリペプチド鎖と複製可能なジェネリックディスプレイパッケージの構成成分との融合物をコードする核酸分子を含むベクターと、単一の結合対メンバーの第2のポリペプチド鎖をコードする核酸分子を含むベクターとの間の組換えによって産生され得る。本発明のヒト化抗体は、前述のようにCDRドメインをコードする核酸配列を得て、それらを、(i) ヒト抗体と同一の重鎖定常領域および(ii) ヒト抗体と同一の軽鎖定常領域をコードする遺伝子を有する動物細胞の発現ベクターに挿入することによってヒト化抗体発現ベクターを構築し、発現ベクターを動物細胞に導入することによって遺伝子を発現することによって産生され得る。ヒト化抗体発現ベクターは、抗体重鎖をコー

ドする遺伝子および抗体軽鎖をコードする遺伝子が別個のベクター上に存在するタイプのもの、またはこれらの両方の遺伝子と同じベクター上に存在するタイプ（タンデムタイプ）のもののいずれかであり得る。

【0223】

従来の組換えDNA技法および遺伝子トランスフェクション技法に基づいてヒト化抗体を産生するための方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Riechmann L. et al. 1988、Neuberger M S. et al. 1985を参照のこと）。抗体は、例えば、CDRグラフティング（EP 239, 400、PCT公開第WO 91/09967号、米国特許第5, 225, 539号、同第5, 530, 101号、および同第5, 585, 089号）、ベニヤリングまたはリサーフェシング（EP 592, 106、EP 519, 596、Padlan EA (1991)、Studnicka G M et al. (1994)、Roguska M A. et al. (1994)）、および鎖シャッフリング（米国特許第5, 565, 332号）を含む、当該技術分野で既知の様々な技法を使用してヒト化され得る。かかる抗体を調製するための一般的な組換えDNA技術も既知である（欧州特許出願第EP 125023号および国際特許出願第WO 96/02576号を参照のこと）。

【0224】

同様に、本明細書に記載の二重特異性または多重特異性抗体は、標準の手順に従って作製され得る。例えば、トリオーマおよびハイブリッドハイブリドーマは、二重特異性または多重特異性抗体を分泌することができる細胞株の2つの例である。ハイブリッドハイブリドーマまたはトリオーマによって産生される二重特異性および多重特異性抗体の例は、米国特許第4, 474, 893号に開示されている。かかる抗体は、化学的手段（Staerz et al. (1985) Nature 314:628、およびPerez et al. (1985) Nature 316:354）、およびハイブリドーマ技術（Staerz and Bevan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. U S A, 83:1453、およびStaerz and Bevan (1986) Immunol. Today 7:241）によっても構築され得る。あるいは、かかる抗体は、異なる抗体を作製するハイブリドーマまたは他の細胞を融合させることによってヘテロハイブリドーマを作製し、その後、所望の抗体を産生して共集合させるクローンを特定することによっても生成され得る。それらは、完全免疫グロブリン鎖またはFabおよびFv配列等のその一部の化学的または遺伝的コンジュゲーションによっても生成され得る。抗体成分は、本明細書に記載の1つ以上の免疫阻害性バイオマーカーを含む、本発明の1つ以上のバイオマーカーのポリペプチドまたはその断片に結合することができる。

【0225】

加えて、抗体断片を産生するための方法が周知である。例えば、本発明のFab断片は、ヒトHLA2と特異的に反応する抗体（例えば、mAb 8A12、ならびにポリクローナル抗体1.2および2.2）をパパイン等のプロテアーゼで処理することによって得られ得る。また、Fabは、抗体のFabをコードするDNAを原核発現系または真核発現系のベクターに挿入し、そのベクターを原核生物または真核生物（適切な場合）に導入してFabを発現させることによって産生され得る。

【0226】

同様に、本発明のF(ab')₂断片は、HLA2と特異的に反応する抗体をプロテアーゼ（ペプシン）で処理することによって得られ得る。また、F(ab')₂断片は、チオエーテル結合またはジスルフィド結合により以下に記載のFab'に結合することによって産生され得る。

【0227】

本発明のFab'断片は、ヒトHLA2と特異的に反応するF(ab')₂を還元剤ジチオスレイトールで処理することによって得られ得る。また、Fab'断片は、抗体のFab'断片をコードするDNAを原核生物の発現ベクターまたは真核生物の発現ベクターに挿入し、そのベクターを原核生物または真核生物（適切な場合）に導入してそれを発現させ

ることによって産生され得る。

【0228】

加えて、本発明の s c F v は、前述のように V H および V L ドメインをコードする c D N A を得て、s c F v をコードする D N A を構築し、その D N A を原核生物の発現ベクターまたは真核生物の発現ベクターに挿入し、その後、その発現ベクターを原核生物または真核生物（適切な場合）に導入して s c F v を発現させることによって産生され得る。ヒト化 s c F v 断片を生成するために、ドナー s c F v 断片から相補性決定領域（C D R）を選択することと、それらを、既知の三次元構造を有するヒト s c F v 断片フレームワークにグラフトすることを含む、C D R グラフティングと呼ばれる周知の技術が使用され得る（例えば、W O 9 8 / 4 5 3 2 2、W O 8 7 / 0 2 6 7 1、米国特許第 5, 8 5 9, 2 0 5 号、米国特許第 5, 5 8 5, 0 8 9 号、米国特許第 4, 8 1 6, 5 6 7 号、E P 0 1 7 3 4 9 4 を参照のこと）。

【0229】

V. 抗体、免疫グロブリン、およびポリペプチドの修飾

本明細書に記載の抗体のアミノ酸配列修飾（複数可）が企図される。例えば、抗体の結合親和性および／または他の生物学的特性を改善することが望ましくあり得る。ヒト化抗体が非ヒト動物に由来する抗体の V H および V L 内の C D R のみをヒト抗体の V H および V L の F R に単にグラフトすることによって産生された場合、抗原結合活性が非ヒト動物に由来する元の抗体と比較して減少することが知られている。C D R 内のみならず F R 内の非ヒト抗体の V H および V L のいくつかのアミノ酸残基が抗原結合活性に直接または間接的に関連するとみなされる。したがって、これらのアミノ酸残基の、ヒト抗体の V H および V L の F R に由来する異なるアミノ酸残基での置換により、結合活性が減少し、アミノ酸を、非ヒト動物に由来する元の抗体のアミノ酸残基で置き換えることによって補正され得る。

【0230】

修飾および変化が本発明の抗体の構造およびそれらをコードする D N A 配列になされ得、望ましい特徴を有する抗体およびポリペプチドをコードする機能的分子を依然として得ることができる。例えば、ある特定のアミノ酸は、活性の認識可能な損失なしにタンパク質構造における他のアミノ酸によって置換され得る。タンパク質の相互作用的能力および性質がタンパク質の生物学的機能的活性を定義するため、ある特定のアミノ酸置換が、タンパク質配列に、ひいては言うまでもなくその D N A コード配列になされ得、それにもかかわらず、同様の特性を有するタンパク質を得ることもできる。したがって、様々な変化が、それらの生物学的活性の認識可能な損失なしに、本発明の抗体配列または当該ポリペプチドをコードする対応する D N A 配列になされ得ることが企図される。

【0231】

一実施形態では、アミノ酸変化は、D N A 配列内のコドンを変化させて、遺伝子コードの保存に基づいて保存的置換をコードすることによって達成され得る。具体的には、特定のタンパク質のアミノ酸配列と、遺伝子コード（以下に示される）によって定義されるタンパク質をコードし得るヌクレオチド配列との間に既知の明確な対応関係が存在する。同様に、特定の核酸のヌクレオチド配列と、遺伝子コード（上記の遺伝子コード図表を参照のこと）によって定義される核酸によってコードされるアミノ酸配列との間に既知の明確な対応関係が存在する。

【0232】

上述のように、遺伝子コードの重要な周知の特徴は、その冗長性であり、それにより、タンパク質を作製するために使用されるアミノ酸の大半には、1 つより多くのコーディングヌクレオチドトリプレットが用いられ得る（上で例証される）。したがって、いくつかの異なるヌクレオチド配列が所与のアミノ酸配列をコードし得る。かかるヌクレオチド配列は、全ての生物における同じアミノ酸配列の産生をもたらすため（ある特定の生物はいくつかの配列を他の配列よりも効率的に翻訳し得るが）、機能的に同等であるとみなされる。さらに、時折、プリンまたはピリミジンのメチル化バリエーションが所与のヌクレオチド

配列に見られ得る。かかるメチル化は、トリヌクレオチドコドンと対応するアミノ酸との間のコーディング関係に影響を及ぼさない。

【0233】

ポリペプチドのアミノ配列を変化させる際に、アミノ酸の疎水性親水性指標が考慮され得る。相互作用的生物学的機能をタンパク質に付与する際の疎水性親水性アミノ酸指数の重要性は、当該技術分野で一般に理解されている。アミノ酸の相対的疎水性親水性特性が、結果として生じたタンパク質の二次構造に寄与し、次いで、タンパク質と、他の分子、例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原等との相互作用を定義することが認められている。各アミノ酸には、それらの疎水性および電荷特性に基づいて疎水性親水性指標が割り当てられており、それらは、イソロイシン (+4.5)、バリン (+4.2)、ロイシン (+3.8)、フェニルアラニン (+2.8)、システイン/シスチン (+2.5)、メチオニン (+1.9)、アラニン (+1.8)、グリシン (-0.4)、トレオニン (-0.7)、セリン (-0.8)、トリプトファン (-0.9)、チロシン (-1.3)、プロリン (-1.6)、ヒスチジン (-3.2)、グルタミン酸 (-3.5)、グルタミン (-3.5)、アスパラギン酸 (<RTI 3.5)、アスパラギン (-3.5)、リジン (-3.9)、およびアルギニン (-4.5) である。

【0234】

ある特定のアミノ酸が同様の疎水性親水性指標またはスコアを有する他のアミノ酸によって置換されてもよく、同様の生物学的活性を有するタンパク質が依然としてもたらされる、すなわち、機能的に同等の生物学的タンパク質が依然として得られることが当該技術分野で既知である。

【0235】

したがって、上で概説されるように、アミノ酸置換は、一般に、置換基のアミノ酸側鎖の相対的類似性、例えば、それらの疎水性、親水性、電荷、サイズ等に基づいている。前述の様々な特性を考慮した例示の置換が当業者に周知であり、これらには、アルギニンおよびリジン、グルタミン酸およびアスパラギン酸、セリンおよびトレオニン、グルタミンおよびアスパラギン、ならびにバリン、ロイシン、およびイソロイシンが含まれる。

【0236】

本発明の抗体のアミノ酸修飾の別のタイプが、例えば、安定性を増加させるための抗体の元のグリコシル化パターンを改変させる際に有用であり得る。「改変させる」とは、抗体に見られる1つ以上の炭水化物部分を欠失させること、および/または抗体に存在しない1つ以上のグリコシル化部位を付加することを意味する。抗体のグリコシル化は、典型的には、N結合であり得る。「N結合」とは、炭水化物部分のアスパラギン残基の側鎖への結合を指す。トリペプチド配列アスパラギン-X-セリンおよびアスパラギン-X-トレオニン(ここで、Xは、プロリンを除く任意のアミノ酸である)は、炭水化物部分のアスパラギン側鎖への酵素結合の認識配列である。したがって、ポリペプチドにおけるこれらのトリペプチド配列のいずれかの存在により、潜在的なグリコシル化部位が作製される。抗体へのグリコシル化部位の付加は、(N結合グリコシル化部位について)上に記載されるトリペプチド配列のうちの1つ以上を含むようにアミノ酸配列を改変することによって好都合に達成される。共有結合的修飾の別のタイプは、グリコシドを抗体に化学的または酵素的にカップリングすることを含む。これらの手順は、N結合またはO結合グリコシル化のためのグリコシル化能力を有する宿主細胞における抗体の産生を必要としないという点で有利である。使用されるカップリング様式に応じて、糖(複数可)が、(a)アルギニンおよびヒスチジン、(b)遊離カルボキシル基、(c)遊離スルフヒドリル基、例えば、システインの遊離スルフヒドリル基、(d)遊離ヒドロキシル基、例えば、セリン、トレオニン、もしくはヒドロキシプロリンの遊離ヒドロキシル基、(e)芳香族残基、例えば、フェニルアラニン、チロシン、もしくはトリプトファンの芳香族残基、または(f)グルタミンのアミド基に結合していてもよい。例えば、かかる方法は、WO 87/05330に記載されている。

【0237】

同様に、抗体上に存在するいずれの炭水化物部分の除去は、化学的または酵素的に達成され得る。化学的脱グリコシル化は、化合物トリフルオロメタンスルホン酸または同等の化合物への抗体の曝露を必要とする。この処理により、抗体をインタクトに保った状態で、結合糖（N-アセチルグルコサミンまたはN-アセチルガラクトサミン）を除く大半または全ての糖の切断がもたらされる。化学的脱グリコシル化は、Sojahn H. et al. (1987) および Edge, A. S. et al. (1981) によって説明されている。抗体上の炭水化物部分の酵素的切断は、Thotakura, N. R. et al. (1987) によって説明される様々なエンドグリコシダーゼおよびエキソグリコシダーゼの使用によって達成され得る。

【0238】

他の修飾は、イムノコンジュゲートの形成を含み得る。例えば、1つのタイプの共有結合的修飾では、抗体またはタンパク質が、米国特許第4,640,835号、同第4,496,689号、同第4,301,144号、同第4,670,417号、同第4,791,192号、または同第4,179,337号に記載の様式で、ポリエチレングリコール、ポリプロピレングリコール、またはポリオキシアルキレン等の様々な非タンパク質性ポリマーのうちの1つに共有結合的に連結される。

【0239】

本発明の抗体または他のタンパク質の異種薬剤とのコンジュゲーションは、N-スクシンイミジル（2-ピリジルジチオ）プロピオネート（SPDP）、スクシンイミジル（N-マレイミドメチル）シクロヘキサン-1-カルボキシレート、イミノチオラン（IT）、イミドエステルの二官能性誘導体（アジプイミド酸ジメチルHCL等）、活性エステル（スベリン酸ジスクシンイミジル等）、アルデヒド（グルタルアルデヒド等）、ビス-アジド化合物（ビス（p-アジドベンゾイル）ヘキサンジアミン等）、ビス-ジアゾニウム誘導体（ビス（p-ジアゾニウムベンゾイル）-エチレンジアミン等）、ジイソシアネート（トルエン2,6ジイソシアネート等）、およびビス-活性フッ素化合物（1,5-ジフルオロ-2,4-ジニトロベンゼン等）を含むが、これらに限定されない、様々な二官能性タンパク質カップリング剤を使用して行われ得る。例えば、炭素標識1-イソチオシアナトベンジルメチルジエチレントリアミン五酢酸（MX-DTPA）は、放射性ヌクレオチドの抗体へのコンジュゲーションのための例示のキレート剤である（WO94/11026）。

【0240】

別の態様では、本発明は、細胞毒素、薬物、および／または放射性同位体等の治療的部分にコンジュゲートされたHHLA2に特異的に結合する抗体を特色とする。細胞毒素にコンジュゲートされると、これらの抗体コンジュゲートは、「免疫毒素」と称される。細胞毒素または細胞毒性薬剤には、細胞に有害な（例えば、細胞を死滅させる）任意の薬剤が含まれる。例としては、タキソール、サイトカラシンB、グラミシジンD、臭化エチジウム、エメチン、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ドキシソルビシン、ダウノルビシン、ジヒドロキシアントラシンジオン、ミトキサントロン、ミトラマイシン、アクチノマイシンD、1-デヒドロテストステロン、グルココルチコイド、プロカイン、テトラカイン、リドカイン、プロプラノロール、およびピューロマイシン、ならびにそれらの類似体または相同体が挙げられる。治療薬には、代謝拮抗剤（例えば、メトトレキサート、6-メルカプトプリン、6-チオグアニン、シタラビン、5-フルオロウラシルデカルバジン）、アルキル化剤（例えば、メクロレタミン、チオエパクロラムブシル、メルファラン、カルムスチン（BSNU）およびロムスチン（CCNU）、シクロホスファミド、ブスルファン、ジブロモマンニトール、ストレプトゾトシン、マイトマイシンC、ならびにシス-ジクロロジアミン白金（II）（DDP）シスプラチン）、アントラサイクリン（例えば、ダウノルビシン（以前のダウノマイシン）およびドキシソルビシン）、抗生物質（例えば、ダクチノマイシン（以前のアクチノマイシン）、ブレオマイシン、ミトラマイシン、およびアントラマイシン（AMC））、および抗分裂剤（例えば、ビンクリスチンおよびビンブラスチン）が挙げられるが、

10

20

30

40

50

これらに限定されない。本発明の抗体は、放射性同位体、例えば、放射性ヨウ素にコンジュゲートされて、がん等の関連障害を治療するための細胞毒性放射性医薬品を生成することができる。

【0241】

コンジュゲートされた抗HHLA2抗体を使用して、臨床試験手順の一環として組織中のポリペプチドレベルを診断的または予後的に監視して、例えば、所与の治療レジメンの有効性を決定するか、または免疫療法に応答する可能性が最も高い患者を選択することができる。例えば、細胞がフローサイトメトリーアッセイで透過処理されて、HHLA2に結合する抗体(mAb 8A12およびポリクローナル抗体1.2および2.2等)にその認識された細胞内エピトープを標的とさせ、コンジュゲートされた分子から発せられるシグナルを分析することによって結合の検出を可能にすることができる。検出は、抗体を検出可能な物質にカップリングする(すなわち、物理的に連結する)ことによって促進され得る。検出可能な物質の例には、様々な酵素、補欠分子族、蛍光物質、発光物質、生物発光物質、および放射性物質が挙げられる。好適な酵素の例には、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、 β -ガラクトシダーゼ、またはアセチルコリンエステラーゼが挙げられ、好適な補欠分子族複合体の例には、ストレプトアビジン/ビオチンおよびアビジン/ビオチンが挙げられ、好適な蛍光物質の例には、ウンベリフェロン、フルオレセイン、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)、ローダミン、ジクロロトリアジニルアミンフルオレセイン、塩化ダンシル、またはフィコエリトリン(PE)が挙げられ、発光物質の例には、ルミノールが挙げられ、生物発光物質の例には、ルシフェラーゼ、ルシフェリン、およびエクオリンが挙げられ、好適な放射性物質の例には、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 、または ^3H が挙げられる。本明細書で使用される場合、抗体に関して「標識される」という用語は、検出可能な物質、例えば、放射性薬剤またはフルオロフォア(例えば、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)またはフィコエリトリン(PE)またはインドシアニン(Cy5))を抗体にカップリングする(すなわち、物理的に連結する)ことによる抗体の直接標識、ならびに検出可能な物質との反応による抗体の間接的標識を包含するよう意図されている。

【0242】

本発明の抗体コンジュゲートを使用して、所与の生物学的応答を修飾することができる。治療的部分が古典的な化学的治療薬に限定されると解釈されるべきではない。例えば、薬物部分は、所望の生物学的活性を有するタンパク質またはポリペプチドであり得る。かかるタンパク質には、例えば、酵素的に活性な毒素またはその活性断片(アブリン、リシンA、シュードモナス外毒素、またはジフテリア毒素等)、タンパク質(腫瘍壊死因子またはインターフェロン-ガンマ等)、または生物学的応答修飾因子(例えば、リンフォカイン、インターロイキン-1(「IL-1」)、インターロイキン-2(「IL-2」)、インターロイキン-6(「IL-6」)、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子(「GM-CSF」)、顆粒球コロニー刺激因子(「G-CSF」)、または他のサイトカインもしくは成長因子等)が含まれ得る。

【0243】

かかる治療的部分を抗体にコンジュゲートするための技法が周知であり、例えば、Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985)、Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987)、Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in Monoclonal Antibodi

es' 84: Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475 506 (1985)、"Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp. 303 16 (Academic Press 1985)、および Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62:119 58 (1982) を参照されたい。

10

【0244】

いくつかの実施形態では、コンジュゲーションは、細胞における細胞毒性薬剤または成長阻害剤の放出を促進する「切断可能なリンカー」を使用して行われ得る。例えば、酸不安定性リンカー、ペプチダーゼ感受性リンカー、感光性リンカー、ジメチルリンカー、またはジスルフィド含有リンカー（例えば、米国特許第5,208,020号を参照のこと）が使用され得る。あるいは、抗体および細胞毒性薬剤または成長阻害剤を含む融合タンパク質が組換え技法またはペプチド合成によって作製され得る。DNAの長さは、互いに隣接しているか、またはコンジュゲートの所望の特性を破壊しないリンカーペプチドをコードする領域によって分離されているかのいずれかのコンジュゲートの2つの部分をコードするそれぞれの領域を含み得る。

20

【0245】

VI. 本発明の使用および方法

本明細書に記載の本発明の抗HHLA2抗体、免疫グロブリン、ポリペプチド、および核酸は、HHLA2レベルの検出に基づく多数の予測的医薬アッセイ（例えば、診断アッセイ、予後アッセイ、および臨床試験の監視）で使用され得、いくつかの実施形態では、単独で、または毒性化合物もしくは他の治療薬にコンジュゲートされたときに、治療目的（例えば、治療的および予防的）に有用であり得る。本明細書で使用される「検出」という用語は、対照の参照を伴うまたは伴わない質的および／または量的検出（レベルの測定）を含む。本明細書に記載されるように、本発明のHHLA2ポリペプチドまたはその断片は、以下の活性：1) TMIGD2および／またはKIR3DL3等のその天然結合パートナー（複数可）に結合し、かつまたはその活性を調節すること、2) 共免疫阻害性シグナル伝達等の細胞内または細胞間シグナル伝達を調節すること、3) リンパ球の活性化および／または増殖を調節すること、4) 生物、例えば、マウス、非齧歯類動物、またはヒト等の哺乳類生物の免疫応答を調節すること、および5) 免疫細胞アネルギーを調節することのうちの1つ以上を有する。

30

【0246】

したがって、本発明の一態様は、生体試料（例えば、血液、血清、細胞、または組織）との関連でHHLA2ポリペプチドレベルを決定し、それにより、試料中のHHLA2ポリペプチドレベルを決定し、個体が障害に罹患しているかを決定し、かつ／またはかかるHHLA2レベルによって示されるかかる障害の状態を決定するための診断アッセイに関する。例えば、本発明の抗体は、HHLA2に関連するがん疾患の病期分類に有用である。

40

【0247】

本発明は、個体がかかる障害を発症する危険性があるかを決定するための予後（または予測的）アッセイも提供する。本発明の別の態様は、臨床試験におけるHHLA2の発現または活性への薬剤（例えば、薬物、化合物）の影響の監視に関する。

【0248】

本発明は、HHLA2シグナルを伝達する薬剤を特定するための手段としてHHLA2の検出も提供する。HHLA2シグナルを伝達する薬剤は、免疫応答を減弱させ、自己免疫疾患、喘息、および耐性の確立に有用であり得る。

50

【0249】

本明細書に記載のいずれの方法においても、HHLA2は、単独で、または他の免疫チェックポイントおよび／もしくは共刺激分子等の他の分子の発現と組み合わせて検出され得る。いくつかの分子のコンビナトリアル検出（例えば、順次または同時）は、治療的介入の相乗作用および／または障害亜型の個別化された高分解能診断に関する有用な情報を提供し得る。いくつかの実施形態では、HHLA2は、もう1つのマーカーでコンビナトリアル的に検出される。

【0250】

1. 診断アッセイ

本発明は、生体試料が細胞制限HHLA2を発現するか、かつ／または細胞制限HHLA2レベルが調節される（例えば、上方制御または下方制御される）かを正確に分類し、それにより、がん等の目的とする障害の状態を示すための方法、システム、およびコードを部分的に提供する。いくつかの実施形態では、本発明は、統計的アルゴリズムおよび／または経験的データ（例えば、HHLA2の存在、不在、またはレベル）を使用してHHLA2によって媒介されるがんまたはその亜型に関連するか、またはその危険性があるものとして試料（例えば、対象由来の）を分類する際に有用である。

【0251】

HHLA2またはその断片のレベルを検出するための例示の方法であって、それ故に、試料がHHLA2またはその臨床亜型の異常な発現（例えば、上方制御または下方制御）によって媒介される疾患または障害に関連するかの分類に有用である、方法は、生体試料を試験対象から得ることと、HHLA2レベルが生体試料中で検出されるように、生体試料を、HHLA2を検出することができる本発明の抗体またはその抗原結合断片と接触させることを含む。いくつかの実施形態では、少なくとも1つの抗体またはその抗原結合断片が使用され、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれ以上のかかる抗体または抗体断片が組み合わせで（例えば、サンドイッチELISAで）または順次に使用され得る。ある特定の例では、統計的アルゴリズムは、単一の学習統計的分類子システムである。例えば、単一の学習統計的分類子システムは、予測値または確率値およびHHLA2の存在またはレベルに基づいて試料をHHLA2試料として分類するために使用され得る。単一の学習統計的分類子システムの使用により、典型的には、試料が、少なくとも約75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%の感受性、特異性、陽性予測値、陰性予測値、および／または全体精度を有するHHLA2試料として分類される。

【0252】

他の好適な統計的アルゴリズムが当業者に周知である。例えば、学習統計的分類子システムは、複雑なデータセット（例えば、目的とするマーカーのパネル）に適合し、かかるデータセットに基づいて決定することができる機械学習アルゴリズム技法を含む。いくつかの実施形態では、分類ツリー（例えば、ランダムフォレスト）等の単一の学習統計的分類子システムが使用される。他の実施形態では、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の学習統計的分類子システムの組み合わせが、好ましくは直列で使用される。学習統計的分類子システムの例には、帰納的学習（例えば、ランダムフォレスト、分類および回帰ツリー（C&RT）、ブーストツリー等の決定／分類ツリー）、確率的に近似的に正しい（PAC）学習、コネクショニスト学習（例えば、ニューラルネットワーク（NN）、人工ニューラルネットワーク（ANN）、ニューロファジーネットワーク（NFN）、ネットワーク構造、多層パーセプトロン等のパーセプトロン、多層フィードフォワードネットワーク、ニューラルネットワークの適用、信念ネットワークにおけるベイズ学習等）、強化学習（例えば、ナイーブ学習、適応動的学習、および時間差学習等の既知の環境における受動的学習、未知の環境における受動的学習、未知の環境における能動的学習、学習行動値関数、強化学習の適用等）、ならびに遺伝的アルゴリズムおよび進化的プログラミングを使用したものが挙げられるが、これらに限定されない。他の学習統

計的分類子システムは、サポートベクトルマシン（例えば、カーネル法）、多変量適応型回帰スプライン（MARS）、レーベンバーグ・マーカートアルゴリズム、ガウス・ニュートンアルゴリズム、ガウスの混合（mixtures of Gaussians）、勾配降下アルゴリズム、および学習ベクトル量子化（LVQ）を含む。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、HLA 2 試料分類結果を臨床医、例えば、組織病理学者または腫瘍学者に送信することをさらに含む。

【0253】

別の実施形態では、本発明の方法は、個体がHLA 2に関連する状態または障害を有する確率の形態で診断をさらに提供する。例えば、個体は、約0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、またはそれ以上のその状態または障害を有する確率を有し得る。さらに別の実施形態では、本発明の方法は、個体における状態または障害の予後をさらに提供する。いくつかの事例では、試料をHLA 2 試料として分類する方法は、試料が得られる個体の症状（例えば、臨床的因子）にさらに基づいている。症状または症状の群は、例えば、リンパ球数、白血球数、赤血球沈降速度、下痢、腹痛、痙攣、発熱、貧血、体重減少、不安、うつ、およびそれらの組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、HLA 2に関連する状態または障害を有する個体の診断に続いて、個体に、その状態または障害に関連する1つ以上の症状の治療に有用な薬物（例えば、化学療法剤）の治療有効量が投与される。

【0254】

一実施形態では、本方法は、対照生体試料（例えば、HLA 2によって媒介される状態または障害を有しない対象由来の生体試料）、HLA 2によって媒介される状態または障害の寛解中またはそれを発症した後の対象由来の生体試料、またはHLA 2によって媒介される状態または障害を発症する治療中の対象由来の生体試料を得ることをさらに含む。

【0255】

HLA 2ポリペプチドまたはその断片の存在または不在を検出するための例示の方法は、HLA 2ポリペプチドに結合することができる本発明の抗体またはその断片、好ましくは検出可能な標識を有する抗体である。抗体は、ポリクローナルであり得るか、またはより好ましくは、モノクローナルであり得る。かかる薬剤が標識され得る。抗体に関して「標識される」という用語は、検出可能な物質をプローブまたは抗体にカップリングする（すなわち、物理的に連結する）ことによるプローブまたは抗体の直接標識、ならびに直接標識される別の試薬との反応によるプローブまたは抗体の間接的標識を包含するよう意図されている。間接標識の例には、蛍光標識された二次抗体を使用した一次抗体の検出が挙げられる。「生体試料」という用語は、対象から単離された組織、細胞、および血清等の生体液、ならびに対象に存在する組織、細胞、および体液を含むよう意図されている。すなわち、本発明の検出方法を使用して、生体試料中のHLA 2またはその断片をインビトロで、かつインビボで検出することができる。HLA 2ポリペプチドの検出のためのインビトロ技法には、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、ウエスタンブロット、免疫沈降、免疫組織化学（IHC）、細胞内フローサイトメトリーおよび関連技法、ならびに免疫蛍光が含まれる。さらに、HLA 2ポリペプチドまたはその断片の検出のためのインビボ技法には、対象に標識された抗HLA 2抗体を導入することが含まれる。例えば、本抗体は、放射性、発光、蛍光、または他の同様のマーカーで標識され得、対象におけるその存在および位置が、標準の画像技法によって単独で、または細胞型マーカー（例えば、CD8+T細胞マーカー）等の他の分子の画像法と組み合わせてのいずれかで検出され得る。

【0256】

一実施形態では、生体試料は、試験対象由来のポリペプチド分子を含有する。好ましい生体試料は、従来の手段によって対象から単離される血清、腫瘍微小環境、腫瘍周辺、または腫瘍内である。

【0257】

別の実施形態では、本方法は、対照対象から対照生体試料を得ることと、HHLA2ポリペプチドもしくはその断片の存在が生体試料中で検出されるように、対照試料を、化合物またはHHLA2ポリペプチドもしくはその断片を検出することができる薬剤と接触させることと、対照試料中のHHLA2ポリペプチドもしくはその断片の存在を、試験試料中のHHLA2ポリペプチドもしくはその断片の存在と比較することとをさらに含む。

【0258】

なお他の実施形態では、本抗体は、ELISAまたはRIAにおける抗体の使用のための構成要素またはデバイスと関連付けられる。非限定的な例には、これらのアッセイで使用するために固体表面上に固定化された（例えば、上述のように光または放射線放出に基づいて検出可能な標識に連結および／またはコンジュゲートされた）抗体が挙げられる。他の実施形態では、本抗体は、免疫クロマトグラフィーアッセイまたは免疫化学的アッセイ、例えば、「サンドイッチ」または競合的アッセイ、免疫組織化学、免疫蛍光顕微鏡法等の使用によるHHLA2の検出のためのデバイスまたは条片と関連付けられる。かかるデバイスまたは条片の追加の例は、自宅での検査または迅速な臨床現場即時検査用に設計されたものである。さらなる例には、単一試料中の複数の分析物の同時分析用に設計されたものが挙げられる。例えば、本発明の非標識抗体は、生体試料中の「捕捉」HHLA2ポリペプチドに適用され得、捕捉された（または固定化された）HHLA2ポリペプチドは、検出のために本発明の抗HHLA2抗体の標識形態に結合し得る。例えば、免疫拡散、免疫電気泳動、免疫組織病理学、免疫組織化学、および組織病理学に基づくアッセイを含む免疫アッセイの他の標準の実施形態が当業者に周知である。

【0259】

2. 予後アッセイ

さらに、本明細書に記載の診断法は、HHLA2に関連する障害を有するか、またはそれを発症する危険性のある対象を特定するために利用され得る。本明細書で使用される場合、「異常な」という用語は、正常なHHLA2レベルから逸脱するHHLA2上方制御または下方制御を含む。異常な発現または活性には、増加または減少した発現または活性、ならびに正常な発現発生パターンまたは細胞内発現パターンに従わない発現または活性が含まれる。例えば、異常なHHLA2レベルは、HHLA2遺伝子もしくは制御配列の突然変異またはその染色体HHLA2遺伝子の増幅によりHHLA2の上方制御または下方制御が引き起こされる場合を含むよう意図されている。本明細書で使用される場合、「望ましくない」という用語は、免疫細胞活性化等の生物学的応答に関与する望ましくない現象を含む。例えば、望ましくないという用語は、対象において望ましくないHHLA2を含む。

【0260】

実施例でさらに説明されるように、HHLA2に関連する多くの障害が当業者に既知である。HHLA2は、選択リンパ性悪性疾患、ウイルス誘導性がん、および多くの固形腫瘍を含む複数の腫瘍タイプによって発現される。一般に、HHLA2は、それを必要とする状態に対する強力な免疫応答を阻害する免疫チェックポイント制御因子を活性化するため、予後不良マーカーである。しかしながら、いくつかの障害、例えば、自己免疫疾患、炎症性疾患等を治療する際に免疫応答を下方制御するために免疫阻害が所望される。

【0261】

前述の診断アッセイまたは以下のアッセイ等の本明細書に記載のアッセイを利用して、HHLA2活性化の誤制御に関連する障害を有するか、またはそれを発症する危険性のある対象を特定することができる。したがって、本発明は、異常なまたは望ましくないHHLA2活性化に関連する障害を特定するための方法を提供し、本方法において、試験試料が対象から得られ、HHLA2が検出され、HHLA2ポリペプチドの存在が、異常なまたは望ましくないHHLA2活性に関連する障害を有するか、またはそれを発症する危険性のある対象の診断に用いられる。本明細書で使用される場合、「試験試料」は、目的とする対象から得られた生体試料を指す。例えば、試験試料は、生体液（例えば、脳脊髄液

または血清)、細胞試料、または組織、例えば、腫瘍微小環境、腫瘍周辺領域、および／または腫瘍内領域の組織病理学的スライドであり得る。好ましい実施形態では、試料は、成熟膜結合型HHLA2および／またはHHLA2断片を発現する細胞を含む。

【0262】

さらに、本明細書に記載の予後アッセイを使用して、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣薬、ポリペプチド、ペプチド、核酸、小分子、または他の薬物候補）が対象に投与されて、異常なまたは望ましくないHHLA2活性に関連するかかる障害を治療することができるかを決定することができる。例えば、かかる方法を使用して、対象が1つの薬剤または薬剤の組み合わせで有効に治療され得るかを決定することができる。したがって、本発明は、対象が、異常なまたは望ましくないHHLA2活性化に関連する障害を治療するための1つ以上の薬剤で有効に治療され得るかを決定するための方法を提供し、本方法において、試験試料が得られ、HHLA2が検出される（例えば、HHLA2ポリペプチドの存在量が、異常なまたは望ましくないHHLA2活性化に関連する障害を治療するための薬剤を投与される対象の診断に用いられる）。

10

【0263】

本明細書に記載の方法は、例えば、HHLA2を伴う疾患または疾病の症状または家族歴を呈する患者を診断するための臨床状況において好都合に使用され得る、例えば、本明細書に記載の少なくとも1つの抗体試薬を含む予めパッケージングされた診断キットを利用することによって行われ得る。

【0264】

20

さらに、HHLA2が発現される任意の細胞型または組織が本明細書に記載の予後アッセイで利用され得る。

【0265】

本発明の別の態様は、異常なHHLA2活性化に関連する障害を有する個体由来の生体試料中のHHLA2が分析され、その情報が好ましくは同様の年齢および人種の対照（例えば、その障害を有しない個体であり、対照は、「健常」もしくは「正常」個体とも称され得るか、または所与の経時的研究における初期の時点のもの）と比較される、関連および／または層別化分析のための本明細書に記載の組成物および方法の使用を含む。患者および対照の適切な選択は、関連および／または層別化研究の成功に重要である。したがって、十分に特徴付けられた表現型を有する個体のプールが非常に望ましい。疾患診断、疾患素因スクリーニング、疾患予後、薬物応答性決定（薬理ゲノミクス）、薬物毒性スクリーニング等の基準が本明細書に記載される。

30

【0266】

遺伝的関連および／または層別化研究のための異なる研究設計が使用され得る（Modern Epidemiology, Lippincott Williams & Wilkins (1998), 609-622）。患者の応答が干渉されない観察的研究が最も頻繁に行われている。観察的研究の第1のタイプは、疾患の疑わしい原因が存在するヒトの試料および疑わしい原因が存在しないヒトの別の試料を特定し、その後、2つの試料における疾患の発症頻度が比較される。これらの試料採取された集団はコホートと呼ばれ、この研究は前向き研究である。観察的研究の他のタイプは、症例対照研究または後向き研究である。典型的な症例対照研究では、試料は、疾患のある特定の兆候等の目的とする表現型を有する個体（症例）および結論が導き出される集団（標的集団）におけるその表現型を有しない個体（対照）から収集される。その後、疾患の考えられる原因が後向きに調査される。症例対照研究における試料収集時間および費用が前向き研究よりも大幅に下回るため、症例対照研究は、少なくとも探索および発見段階中の遺伝的関連研究におけるより一般に使用されている研究設計である。

40

【0267】

全ての関連表現型および／または遺伝子型情報が得られた後、個体の表現型特性を有する対立遺伝子または遺伝子型の存在間に有意な相関関係が存在するかを決定するための統計的分析が行われる。好ましくは、データの検査および整理が最初に行われ、その後、遺

50

伝的関連のための統計的検定が行われる。試料の疫学的および臨床データが当該技術分野で周知の表およびグラフを用いて記述統計学によって要約され得る。好ましくは、データ完成、一貫性のないエントリ、および外れ値を確認するためのデータ検証が行われる。その後、それぞれ、離散変数および連続変数について症例と対照との間の有意差を確認するためのカイ二乗検定およびt-検定（分布が正規分布ではない場合、ウィルコクソンの順位和検定）が使用され得る。

【0268】

遺伝的関連検定を行う際の重要な決定は、有意レベルの決定であり、それらの検定のp値がそのレベルに達したときに有意な関連が断言され得る。陽性ヒットがその後の確認検定で追跡される予備的分析では、例えば、0.2（寛大な有意レベル）未満の未調整p値が、HHLA2レベルの疾患のある特定の表現型特性との有意な関連のための仮説を生み出すために使用され得る。0.05（当該技術分野で伝統的に使用されている有意レベル）未満のp値が疾患との関連を有するとみなされるようにそのレベルが達成されることが好ましい。ヒットが同じ源由来のより多くの試料または異なる源由来の異なる試料における確認的分析で追跡されるとき、複数の検定の調整が、実験ワイズエラー率を0.05で維持しながら過剰なヒット数を回避するように行われる。複数の検定を調整して異なる種類のエラー率を制御するための異なる方法が存在する一方で、一般に使用されているが、むしろ保守的な方法は、実験ワイズまたはファミリーワイズエラー率を制御するためのボンフェローニ補正である（Multiple comparisons and multiple tests, Westfall et al, SAS Institute (1999)）。偽発見率（FDR）を制御するための並べ替え検定がより有力であり得る（Benjamini and Hochberg, Journal of the Royal Statistical Society, Series B 57, 1289-1300, 1995、Resampling-based Multiple Testing, Westfall and Young, Wiley (1993)）。これらの検定が依存적であり、実験ワイズエラー率の制御とは対照的に偽発見率の制御が十分である場合に、多重度を制御するためのかかる方法が好ましいであろう。

【0269】

個々の遺伝的または非遺伝的危険因子が疾患の素因になることが見出されると、分類／予測スキームが設定されて、個体の表現型および／または遺伝子型ならびに他の非遺伝的危険因子に応じて個体が属するカテゴリー（例えば、疾患または非疾患）を予測することができる。離散形質のロジスティック回帰および連続形質の線形回帰が、かかる課題のための標準の技法である（Applied Regression Analysis, Draper and Smith, Wiley (1998)）。さらに、他の技法も分類を設定するために使用され得る。かかる技法には、MART、CART、ニューラルネットワーク、および異なる方法の性能の比較における使用に好適な判別分析が含まれるが、これらに限定されない（The Elements of Statistical Learning, Hastie, Tibshirani & Friedman, Springer (2002)）。

【0270】

3. 臨床試験中の効果の監視

薬剤（例えば、化合物、薬物、または小分子）のHHLA2ポリペプチドまたはその断片への影響（例えば、細胞増殖および／または遊走の調節）の監視は、基本的な薬物スクリーニングのみならず、臨床試験でも適用され得る。例えば、HHLA2遺伝子発現を減少させるか、ポリペプチドレベルを減少させるか、またはHHLA2活性を下方制御するための本明細書に記載のスクリーニングアッセイによって決定される薬剤の有効性は、減少したHHLA2遺伝子発現、減少したポリペプチドレベル、または下方制御されたHHLA2活性を呈する対象の臨床試験で監視され得るか、または本明細書に記載の抗HHLA2抗体または断片によって検出可能な減少したHHLA2発現を呈する対象の臨床試験で監視され得る。かかる臨床試験では、HHLA2遺伝子の発現もしくは活性および／ま

たは目的とする障害の症状もしくはマーカーが、特定の細胞、組織、または系の表現型の「読み出し」またはマーカーとして使用され得る。同様に、HHLA2遺伝子発現を増加させるか、ポリペプチドレベルを増加させるか、またはHHLA2活性を増加させるための本明細書に記載のスクリーニングアッセイによって決定される薬剤の有効性は、増加したHHLA2遺伝子発現、増加したポリペプチドレベル、または増加したHHLA2活性を呈する対象の臨床試験で監視され得るか、または本明細書に記載の抗HHLA2抗体または断片によって検出可能な増加したHHLA2を呈する対象の臨床試験で監視され得る。かかる臨床試験では、HHLA2遺伝子の発現もしくは活性および／または目的とする障害の症状もしくはマーカーが、自己免疫障害等の特定の細胞、組織、または系の表現型の「読み出し」またはマーカーとして使用され得る。

10

【0271】

例であって、限定するものではなく、HHLA2活性（例えば、本明細書に記載のスクリーニングアッセイで特定された）を調節する薬剤（例えば、化合物、薬物、または小分子）での処理によって細胞内で調節されるHHLA2を含む遺伝子が特定され得る。したがって、例えば、臨床試験において、異常なHHLA2活性化に関連する障害への薬剤の効果を研究するために、細胞が単離され、核酸および／またはタンパク質が調製され、異常なHHLA2活性化に関連する障害に関与するHHLA2および／または他の遺伝子のレベルについて分析され得る。遺伝子発現レベル（例えば、遺伝子発現パターン）は、産生されるポリペプチドの量を測定することによって、本明細書に記載の方法のうちの1つによって、またはHHLA2または他の遺伝子のレベルを測定することによって分析される。この方法で、遺伝子発現パターンは、薬剤に対する細胞の生理学的応答を示すマーカーとしての機能を果たし得る。したがって、この応答状態は、薬剤での個体の治療前およびその治療中の様々な時点で決定され得る。

20

【0272】

好ましい実施形態では、本発明は、薬剤（例えば、アゴニスト、アンタゴニスト、ペプチド模倣薬、ポリペプチド、ペプチド、核酸、小分子、または本明細書に記載のスクリーニングアッセイによって特定される他の薬物候補）での対象の治療の有効性を監視するための方法であって、（i）薬剤の投与前に対象から投与前試料を得るステップと、（ii）投与前試料中のHHLA2ポリペプチドまたはその断片のレベルを検出するステップと、（iii）対象から1つ以上の投与後試料を得るステップと、（iv）投与後試料中のHHLA2ポリペプチドまたはその断片のレベルを検出するステップと、（v）投与前試料中のHHLA2ポリペプチドまたはその断片のレベルを、投与後試料（複数可）中のHHLA2ポリペプチドと比較するステップと、（vi）対象への薬剤の投与を適宜に変更するステップとを含む、方法を提供する。例えば、薬剤の増加した投与は、HHLA2を検出されたレベルよりも低いレベルに低下させる、すなわち、薬剤の有効性を高めるのに望ましくあり得る。かかる実施形態に従って、HHLA2は、観察可能な表現型応答の不在下でさえも薬剤の有効性の指標として使用され得る。同様に、免疫組織化学（IHC）等によるHHLA2分析を使用して、1つ以上の免疫チェックポイントを阻害するためのHHLA2免疫療法を受ける患者を選択することもできる。本明細書に記載されるように、腫瘍がHHLA2活性化を有する患者は、HHLA2 mAb免疫療法に応答する可能性が高い。この免疫療法により、免疫活性化が最初にもたらされ、活性化T細胞がIFN-γを産生し、次いで、HHLA2活性化を上方制御する。通常、これにより、HHLA2の会合および免疫応答の下方制御がもたらされるが、HHLA2が本明細書に記載の抗HHLA2 mAbによって遮断され得るため、免疫応答は腫瘍等の所望の状態が排除されるまで継続する。対照的に、HHLA2を介して活発にシグナル伝達するmAbは、免疫応答を直接下方制御する。

30

40

【0273】

4. 治療的方法および使用

いくつかの実施形態では、本発明の抗体、断片、またはイムノコンジュゲート（例えば、抗HHLA2抗体のみ、または治療的部分にコンジュゲートされたもの）は、異常な

50

たは望ましくないHHLA2活性化に関連する任意の障害（例えば、がん）の治療に有用である。ある特定の実施形態では、治療は、ヒト等の哺乳動物のものである。本発明のかかる抗体は、目的とする障害を治療するために、単独で、または任意の好適な薬剤もしくは適切な療法と組み合わせて使用され得る。例えば、HHLA2および別の免疫チェックポイントまたは共刺激分子を含む細胞を治療したときに治療的相乗作用が現れるようになると考えられる。

【0274】

治療用モノクローナル抗体が、その抗体によって特異的に認識される抗原を細胞外に有する細胞の枯渇をもたらすことが周知である。この枯渇は、少なくとも3つの機構：抗体媒介性細胞毒性（ADCC）、補体依存性溶解、および抗体によって標的とされる抗原を介して伝達されるシグナルによる腫瘍成長の直接抗腫瘍阻害によって媒介され得る。

【0275】

「補体依存性細胞毒性」または「CDC」とは、補体の存在下での標的細胞の溶解を指す。古典的な補体経路の活性化は、補体系の第1の成分の、それらの同族抗原に結合している抗体への結合によって開始される。補体活性化を評価するために、CDCアッセイ、例えば、Gazzano-Santoro et al. (1997)に記載のCDCアッセイが行われ得る。

【0276】

「抗体依存性細胞媒介性細胞毒性」または「ADCC」とは、ある特定の細胞毒性細胞（例えばナチュラルキラー（NK）細胞、好中球、およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）に結合した分泌抗体により、これらの細胞毒性エフェクター細胞が抗原を有する標的細胞に特異的に結合し、その後、標的細胞を死滅させることが可能になる細胞毒性の形態を指す。目的とする分子のADCC活性を評価するために、インビトロADCCアッセイ、例えば、米国特許第5,500,362号または同第5,821,337号に記載のインビトロADCCアッセイが行われ得る。当該技術分野で周知のように、Fc部分は、Fc受容体との所望の相互作用を達成するか、またはそれを欠くように操作され得る。

【0277】

細胞内標的の抗体媒介性結合、中和、および／または調節のために、ある特定の修飾がなされ得る。本明細書に記載されるように、sFvおよびFab等のある特定の抗体型式が、抗体様分子の細胞内発現に適している。特定の経路で抗原または分子に対抗する、核、ER、細胞質、ゴルジ、原形質膜、ミトコンドリアを含む細胞の異なるコンパートメントにおける発現を標的とするためのかかる適合抗体様分子を作製および使用するための方法が周知である（少なくとも、米国特許公開第2008/0233110号および同第2003/0104402号、Marasco et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 90:7889-7893、Chen et al. (1994) Human Gene Therapy 5:595-601、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 91:5932-5936、Mhashilkar et al. (1995) EMBO J. 14:1542-1551、Marasco et al. (1997) Gene Therapy 4:11-15、Richardson et al. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 92:3137-3141、およびDuan et al. (1994) Human Gene Therapy 5:1315-1324を参照のこと）。

【0278】

本明細書で使用される場合、「細胞内免疫グロブリン分子」という用語は、天然に存在する分泌免疫グロブリンと同じであるが、合成後に細胞内に残存する完全免疫グロブリンである。「細胞内免疫グロブリン断片」とは、細胞内免疫グロブリン分子の一本鎖断片を含む任意の断片を指す。したがって、細胞内免疫グロブリン分子またはその断片は、細胞の外で分泌または発現されない。一本鎖細胞内免疫グロブリン断片は、本明細書で「一

本鎖免疫グロブリン」と称される。本明細書で使用される場合、「細胞内免疫グロブリン分子またはその断片」という用語は、「細胞内免疫グロブリン」、「一本鎖細胞内免疫グロブリン」（またはその断片）、「細胞内免疫グロブリン断片」、「細胞内抗体」（またはその断片）、および「イントラボディ」（またはその断片）を包含すると理解される。したがって、「細胞内免疫グロブリン」、「細胞内Ig」、「細胞内抗体」、および「イントラボディ」という用語は、本明細書で同義に使用され得、全て「細胞内免疫グロブリン分子またはその断片」の一般的定義によって包含される。本発明の細胞内免疫グロブリン分子またはその断片は、いくつかの実施形態では、2つ以上のサブユニットポリペプチド、例えば、「第1の細胞内免疫グロブリンサブユニットポリペプチド」および「第2の細胞内免疫グロブリンサブユニットポリペプチド」を含み得る。しかしながら、他の実施形態では、細胞内免疫グロブリンは、単一のポリペプチドのみを含む「一本鎖細胞内免疫グロブリン」であり得る。本明細書で使用される場合、「一本鎖細胞内免疫グロブリン」は、所望の活性、例えば、抗原への細胞内結合を有する任意の単位断片として定義される。したがって、一本鎖細胞内免疫グロブリンは、重鎖可変領域および軽鎖可変領域の両方を含むもの、ならびに抗原に結合する単一の可変領域、例えば、本明細書に記載の「ラクダ化」重鎖可変領域のみを有する一本鎖細胞内免疫グロブリンを包含する。細胞内免疫グロブリンまたはIg断片は、細胞内の実質的に任意の場所で、例えば、細胞質内、細胞膜の内面上、または核、ゴルジ、小胞体、エンドソーム、ミトコンドリア等の細胞内コンパートメント（細胞サブコンパートメントまたは細胞コンパートメントとも称される）内で発現され得る。さらなる細胞サブコンパートメントには、本明細書に記載され、かつ当該技術分野で周知のものが含まれる。

10

20

【0279】

かかる細胞内免疫グロブリンは、標的とされる抗原を含むレシピエント細胞または宿主細胞で発現される。本発明の宿主細胞は、好ましくは、真核細胞もしくは細胞株、好ましくは、植物、動物、脊椎動物、哺乳類、齧歯類、マウス、霊長類、またはヒト細胞もしくは細胞株である。

【0280】

理論によって束縛されることなく、本明細書に記載の免疫グロブリンポリペプチドの細胞内発現により、HHLA2の細胞内標的およびそれへの結合が可能になり、それにより、例えば、阻害性受容体への結合による活性化時にシグナル伝達を伝播するその能力を調節すること等によってシグナル伝達する分子の能力を立体的に調節し、かつ／または複数のHHLA2分子の局所有効濃度の増加時にシグナル伝達を調節すると考えられる。

30

【0281】

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、前述の成長阻害剤、細胞毒性薬剤、またはプロドラッグ活性化酵素等の治療的部分にコンジュゲートされ得る。本発明の抗体は、当該成長阻害剤、細胞毒性薬剤、またはプロドラッグの、所望のHHLA2量を過小または過剰発現する細胞への標的に有用であり得る。

【0282】

したがって、本発明の目的は、異常なHHLA2活性化に関連する障害を治療するための方法であって、それを必要とする対象に、本発明の抗体、断片、またはイムノコンジュゲートの治療有効量を投与することを含む、方法に関する。

40

【0283】

あるいは、いくつかの実施形態では、本発明の抗体または抗原結合断片は、免疫応答の上方制御に関する診断、予後、および予防用途に加えて、治療的用途に有用である。免疫応答の上方制御は、既存の免疫応答を増強する形態または初期免疫応答を誘発する形態であり得る。例えば、主題の組成物および方法を使用した免疫応答の増強は、がんおよび微生物（例えば、細菌、ウイルス、または寄生虫）感染に対する免疫学的防御を改善する場合に有用である。例えば、本明細書に記載の免疫応答機能の上方制御または増強は、腫瘍免疫の誘導に有用である。

【0284】

50

別の実施形態では、免疫応答は、既存の耐性、クローン欠失、および／または疲弊（例えば、T細胞疲弊）が克服されるように、本明細書に記載の方法によって刺激され得る。例えば、対象が有意な免疫応答を開始することができない抗原、例えば、腫瘍特異的抗原等の自己抗原に対する免疫応答は、免疫応答を上方制御する本明細書に記載の適切な薬剤を投与することによって誘導され得る。一実施形態では、腫瘍特異的抗原等の自己抗原が同時投与され得る。別の実施形態では、免疫応答は、神経学的障害を治療するための抗原（例えば、自己抗原）に対して刺激され得る。別の実施形態では、主題の薬剤は、能動免疫化の過程で外来抗原に対する応答を高めるためのアジュバントとして使用され得る。

【0285】

ある特定の例では、免疫応答をさらに増強するために、免疫応答を上方制御する他の薬剤、例えば、共刺激受容体を介してシグナルを伝達する他のB7ファミリーメンバーの形態をさらに投与することが望ましくあり得る。また、免疫応答を上方制御する薬剤が様々なポリペプチド（例えば、病原体に由来するポリペプチド）に対するワクチンにおいて予防的に使用され得る。病原体（例えば、ウイルス）に対する免疫は、適切なアジュバントにおいて免疫応答を上方制御する薬剤とともにウイルスタンパク質をワクチン接種することによって誘導され得る。

【0286】

あるいは、いくつかの実施形態では、本発明の抗体および抗原結合断片は、診断、予後、および予防用途に加えて、免疫反応を上方制御する疾患、例えば、喘息、自己免疫疾患（糸球体腎炎、関節炎、拡張型心筋症様疾患、潰瘍性大腸炎、シェーグレン症候群、クローン病、全身性紅斑性狼瘡、慢性リウマチ性関節炎、多発性硬化症、乾癬、アレルギー性接触皮膚炎、多発性筋炎、強皮症、結節性動脈周囲炎、リウマチ熱、尋常性白斑、インスリン依存性糖尿病、ベーチェット病、橋本病、アジソン病、皮膚筋炎、重症筋無力症、ライター症候群、グレーブス病、悪性貧血、グッドパスチャー症候群、不妊症、慢性活動性肝炎、天疱瘡、自己免疫性血小板減少性紫斑病、および自己免疫性溶血性貧血、活動性慢性肝炎、アジソン病、抗リン脂質症候群、アトピー性アレルギー、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫無塩酸症（*achlorhydria autoimmune*）、セリアック病、クッシング症候群、皮膚筋炎、円板状紅斑性狼瘡、グッドパスチャー症候群、橋本甲状腺炎、特発性副腎萎縮、特発性血小板減少症、インスリン依存性糖尿病、ランバート・イートン症候群、ルポイド肝炎、いくつかのリンパ球減少症例、混合結合組織病、類天疱瘡、尋常性天疱瘡、悪性貧血、水晶体起因性ブドウ膜炎、結節性多発性動脈炎、多腺性自己免疫症候群、原発性胆汁性肝硬変、原発性硬化性胆管炎、レイノー症候群、再発性多発性軟骨炎、シュミット症候群、限局性強皮症（またはクレスト症候群）、交感性眼炎、全身性紅斑性狼瘡、高安動脈炎、側頭動脈炎、甲状腺機能亢進症、B型インスリン抵抗性、潰瘍性大腸炎、およびヴェグナー肉芽腫症）を抑制するための治療的用途（疾患の治療およびその発症または進行の遅延等）に有用である。

【0287】

同様に、本発明の抗体および抗原結合断片は、診断、予後、および予防用途に加えて、持続する感染性疾患（例えば、HPV、HBV、C型肝炎ウイルス（HCV）、レトロウイルス、例えば、ヒト免疫不全ウイルス（HIV-1およびHIV-2）、ヘルペスウイルス、例えば、エプスタインバーウイルス（EBV）、サイトメガロウイルス（CMV）、HSV-1およびHSV-2、ならびにインフルエンザウイルスを含むウイルス感染性疾患のための治療的用途（疾患の治療およびその発症または進行の遅延等）に有用である。本明細書に記載されるように使用され得る病原体に関連する他の抗原は、マラリア、好ましくはNANPの反復に基づくマラリアペプチドを含む、様々な寄生虫の抗原である。加えて、*Aspergillus*、*Brugia*、*Candida*、*Chlamydia*、*Coccidia*、*Cryptococcus*、*Dirofilaria*、*Gonococcus*、*Histoplasma*、*Leishmania*、*Mycobacterium*、*Mycoplasma*、*Paramecium*、*Pertussis*、*Plasmodium*、*Pneumococcus*、*Pneumocystis*、*Ricketts*

10

20

30

40

50

ia、Salmonella、Shigella、Staphylococcus、Streptococcus、Toxoplasma、およびVibrio cholerae等の細菌性、真菌性、および他の病原性疾患が含まれる。例示の種には、Neisseria gonorrhea、Mycobacterium tuberculosis、Candida albicans、Candida tropicalis、Trichomonas vaginalis、Haemophilus vaginalis、B群Streptococcus菌種、Microplasma hominis、Hemophilus ducreyi、Granuloma inguinale、Lymphopathia venereum、Treponema pallidum、Brucella abortus、Brucella melitensis、Brucella suis、Brucella canis、Campylobacter fetus、Campylobacter fetus intestinalis、Leptospira pomona、Listeria monocytogenes、Brucella ovnis、Chlamydia psittaci、Trichomonas foetus、Toxoplasma gondii、Escherichia coli、Actinobacillus equuli、Salmonella abortus ovis、Salmonella abortus equi、Pseudomonas aeruginosa、Corynebacterium equi、Corynebacterium pyogenes、Actinobacillus seminis、Mycoplasma bovis genitalium、Aspergillus fumigatus、Absidia ramosa、Trypanosoma equiperdum、Babesia caballi、Clostridium tetani、Clostridium botulinum、または真菌、例えば、Paracoccidioides brasiliensis等、または他の病原体、例えば、Plasmodium falciparumが含まれる。国立アレルギー感染症研究所（NIAID）優先病原体も含まれる。これらには、カテゴリーA薬剤、例えば、大痘瘡（天然痘）、Bacillus anthracis（炭疽）、Yersinia pestis（疫病）、Clostridium botulinum毒素（ボツリヌス中毒症）、Francisella tularensis（野兎病）、フィロウイルス（エボラ出血熱、マールブルグ出血熱）、アレナウイルス（ラッサ（ラッサ熱）、フニンウイルス（アルゼンチン出血熱）、および関連ウイルス）、カテゴリーB薬剤、例えば、Coxiella burnetii（Q熱）、Brucella種（ブルセラ症）、Burkholderia mallei（鼻疽）、アルファウイルス（ベネズエラ脳脊髄炎、東部および西部ウマ脳脊髄炎）、Ricin communis（ヒマシ実）由来のリシン毒素、Clostridium perfringensのイブシロン毒素、StaphylococcusエンテロトキシンB、Salmonella種、Shigella dysenteriae、Escherichia coli菌株O157:H7、Vibrio cholerae、Cryptosporidium parvum、カテゴリーC薬剤、例えば、ニパウイルス、ハンタウイルス、ダニ媒介性出血熱ウイルス、ダニ媒介性脳炎ウイルス、黄熱、および多剤耐性結核菌、蠕虫、例えば、SchistosomaおよびTaenia、ならびに原虫、例えば、Leishmania（例えば、L. mexicana）およびPlasmodiumが含まれる。

【0288】

なお別の実施形態では、本発明の抗体または抗原結合断片は、診断、予後、および予防用途に加えて、免疫学的耐性、臓器移植片拒絶、移植片対宿主病（GVHD）、アレルギー性疾患、およびHHLA2によって媒介された免疫反応の減弱によって引き起こされる疾患の誘導に関して治療的用途に有用である。

【0289】

本発明との関連で、本明細書で使用される「治療すること」または「治療」という用語は、かかる用語が適用される障害もしくは状態、またはかかる障害もしくは状態の1つ以

10

20

30

40

50

上の症状を逆転させるか、軽減するか、その進行を抑制するか、または予防することを意味する。本明細書で使用される「がんを治療する」という用語は、がんの細胞の成長および／または増殖の抑制を意味する。好ましくは、かかる治療は、腫瘍成長の退縮（すなわち、測定可能な腫瘍のサイズの減少）をもたらす。最も好ましくは、かかる治療は、腫瘍の完全退縮をもたらす。

【0290】

いくつかの実施形態では、「患者」または「それを必要とする患者」という用語は、異常なHHLA2活性化に関連するがんに罹患しているか、または罹患する可能性の高いヒトまたは非ヒト哺乳動物を対象とする。

【0291】

本発明のポリペプチドの「治療有効量」とは、いずれの医学的治療にも適用可能な合理的なベネフィット／リスク比でがん等の目的とする障害を治療するのに十分な抗体の量を意味する。しかしながら、本発明の抗体および組成物の総1日使用量は、正しい医学的判断の範囲内で主治医によって決定されることが理解されるであろう。任意の特定の患者の特定の治療有効用量レベルは、治療される障害および障害の重症度；用いられる特定の抗体の活性；用いられる特定の組成物、患者の年齢、体重、一般的な健康状態、性別、および食生活；用いられる特定の抗体の投与時間、投与経路、および排泄速度；治療期間；用いられる特定のポリペプチドと組み合わせるまたはそれと同時に使用される薬物；ならびに医学技術分野で周知の同様の因子を含む様々な因子に依存するであろう。例えば、所望の治療効果を達成するのに必要なレベル未満のレベルで化合物の投与を開始し、所望の効果が達成されるまで投薬量を徐々に増加させることが当業者に周知である。

【0292】

本発明の抗体を1つ以上含む治療用製剤は、凍結乾燥製剤または水溶液の形態で、所望の純度を有する抗体を、任意の生理学的に許容される担体、賦形剤、または安定剤（Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)）と混合することによって保管用に調製される。抗体組成物は、良好な医療行為と一致する様式で製剤化、投薬、および投与される。この関連での考慮すべき因子には、治療される特定の障害、治療される特定の哺乳動物、個々の患者の臨床状態、障害の原因、薬剤送達部位、投与方法、投与のスケジュール、および医師に既知の他の因子が含まれる。

【0293】

治療用量は、少なくとも約0.01 μg/kg体重、少なくとも約0.05 μg/kg体重、少なくとも約0.1 μg/kg体重、少なくとも約0.5 μg/kg体重、少なくとも約1 μg/kg体重、少なくとも約2.5 μg/kg体重、少なくとも約5 μg/kg体重、および約100 μg/kg体重以下であり得る。当業者であれば、かかるガイドラインが、例えば、抗体断片の使用時または抗体コンジュゲートの使用時に、活性薬剤の分子量に応じて調整されることを理解するであろう。投薬量は、局所投与、例えば、経鼻、吸入等、または全身投与、例えば、筋肉内、腹腔内、静脈内等によっても変化し得る。

【0294】

本組成物は、活性を増強するか、または別様に治療効果を高める1つ以上の薬剤を必要としないが、任意にそれと製剤化される。これらは、一般に、本明細書で使用される同じ投薬量および投与経路で、またはこれまでに用いられた投薬量の約1～99%で使用される。

【0295】

許容される担体、賦形剤、または安定剤は、用いられる投薬量および濃度でレシピエントに非毒性であり、これらには、リン酸、クエン酸、および他の有機酸等の緩衝液；アスコルビン酸およびメチオニンを含む抗酸化剤；保存料（塩化オクタデシルジメチルベンジルアンモニウム；塩化ヘキサメトニウム；塩化ベンザルコニウム、塩化ベンゼトニウム；フェノール、ブチル、またはベンジルアルコール；メチルパラベンまたはプロピルパラベン等のアルキルパラベン；カテコール；レゾルシノール；シクロヘキサノール；3-ペン

タノール；およびm-クレゾール等）；低分子量（約10残基未満）ポリペプチド；血清アルブミン、ゼラチン、または免疫グロブリン等のタンパク質；ポリビニルピロリドン等の親水性ポリマー；グリシン、グルタミン、アスパラギン、ヒスチジン、アルギニン、またはリジン等のアミノ酸；グルコース、マンノース、またはデキストリンを含む単糖、二糖、および他の炭水化物；EDTA等のキレート剤；スクロース、マンニトール、トレハロース、またはソルビトール等の糖；ナトリウム等の塩形成対イオン；金属錯体（例えば、亜鉛-タンパク質錯体）、および／またはTWEEN（登録商標）、PLURONIC S（登録商標）、またはポリエチレングリコール（PEG）等の非イオン性界面活性剤が含まれる。インビボ投与に使用される製剤は、滅菌でなければならない。これは、滅菌濾過膜を通す濾過によって容易に達成される。

10

【0296】

これらの活性成分は、例えば、液滴形成技法または界面重合によって調製されたマイクロカプセルに、例えば、それぞれ、ヒドロキシメチルセルロースまたはゼラチンマイクロカプセルおよびポリ-（メチルメタクリレート）マイクロカプセルに、コロイド薬物送達系（例えば、リポソーム、アルブミンマイクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子、およびナノカプセル）に、またはマクロエマルジョンに封入される場合もある。かかる技法は、Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)に開示されている。

【0297】

本明細書に記載の組成物は、非経口、皮下、腹腔内、肺内、および鼻内を含む任意の好適な手段によって投与され得る。非経口注入には、筋肉内、静脈内、動脈内、腹腔内、または皮下投与が含まれる。加えて、本組成物は、特に本抗体の用量の減少に伴うパルス注入によって好適に投与され得る。

20

【0298】

疾患の予防または治療のために、抗体の適切な投薬量は、上で定義される治療される疾患のタイプ、疾患の重症度および経過、抗体が予防のために投与されるか、以前の療法、患者の臨床歴および抗体に対する応答、および主治医の判断に依存するであろう。抗体は、1回または一連の治療にわたって患者に好適に投与される。

【0299】

本発明の治療薬は、単独で使用され得るか、または例えば、化学療法剤、ホルモン、抗血管新生剤、放射性標識化合物、または手術、凍結療法、および／もしくは放射線療法との併用療法で投与され得る。前述の治療法は、従来の療法と連続して、従来の療法の前に、または従来の療法の後のいずれかで、従来の療法の他の形態（例えば、当業者に周知の標準治療がん治療）と併せて施され得る。例えば、本発明の薬剤は、化学療法剤の治療有効用量と投与され得る。別の実施形態では、本発明の薬剤は、化学療法剤の活性および有効性を増強するために化学療法と併せて投与される。医師用添付文書集（PDR）は、様々ながんの治療に使用されている化学療法剤の投薬量を開示している。治療的に有効なこれらの前述の化学療法薬の投薬レジメンおよび投薬量は、治療される特定のがん、疾患の程度、および当該技術分野の医師が精通している他の因子に依存し、医師によって決定され得る。

30

40

【0300】

がんワクチンも、標的療法、例えば、免疫療法と組み合わせて投与され得る。「標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用し、それにより、がんを治療する薬剤の投与を指す。例えば、本発明の方法と組み合わせた免疫チェックポイント阻害剤の阻害に関する標的療法が有用である。「免疫チェックポイント阻害剤」という用語は、抗腫瘍免疫応答を下方調節または阻害することによって免疫応答を微調整するCD4+および／またはCD8+T細胞の細胞表面上の分子群を意味する。免疫チェックポイントタンパク質は、当該技術分野で周知であり、CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVE M、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIRファミリー受容体、TI

50

M-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPアルファ（CD47）、CD48、2B4（CD244）、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、TMIDG2、KIR3DL3、およびA2aR（例えば、WO2012/177624を参照のこと）が含まれるが、これらに限定されない。1つ以上の免疫チェックポイント阻害剤の阻害により、阻害性シグナル伝達が遮断またはさなければ中和され、それにより、免疫応答が上方制御されて、がんがより有効に治療され得る。いくつかの実施形態では、がんワクチンは、PD1、PD-L1、および／またはCD47阻害剤等の1つ以上の免疫チェックポイント阻害剤と組み合わせて投与される。

【0301】

免疫療法は、例えば、追加のがんワクチンおよび／または感作抗原提示細胞の使用を含み得る、標的療法の一形態である。例えば、腫瘍溶解性ウイルスは、正常細胞を無傷のまま残しながらがん細胞に感染して溶解させることができるウイルスであり、それらのがん療法に潜在的に有用なものにする。腫瘍溶解性ウイルスの複製は、腫瘍細胞破壊を促進し、腫瘍部位での用量増幅ももたらす。それらは、抗がん遺伝子のベクターとして作用することもでき、それらを腫瘍部位に特異的に送達させる。この免疫療法は、がん抗原または疾患抗原に対して産生された予め形成された抗体の投与（例えば、任意に化学療法剤または毒素に結合しているモノクローナル抗体の腫瘍抗原への投与）によって達成される宿主の短期間保護のための受動免疫を伴い得る。例えば、抗VEGFおよびmTOR阻害剤は、腎細胞癌の治療に有効であることが既知である。この免疫療法は、がん細胞株の細胞毒性リンパ球によって認識されるエピトープの使用にも焦点を合わせることができる。あるいは、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチド等を使用して、腫瘍またはがんの発症、進行、および／または病理に関連した生体分子を選択的に調節することができる。

【0302】

「非標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用しないが、がんを治療する薬剤の投与を指す。非標的療法の代表的な例には、化学療法、遺伝子療法、および放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0303】

一実施形態では、化学療法が使用される。化学療法は、化学療法剤の投与を含む。かかる化学療法剤は、以下の化合物の群：白金化合物、細胞毒性抗生物質、代謝拮抗剤、抗分裂剤、アルキル化剤、ヒ素化合物、DNAトポイソメラーゼ阻害剤、タキサン、ヌクレオシド類似体、植物アルカロイド、および毒素、ならびにそれらの合成誘導体から選択されるものであり得るが、これらに限定されない。例示の化合物には、アルキル化剤（シスプラチン、トレオスルファン、およびトロホスファミド）、植物アルカロイド（ビンブラスチン、パクリタキセル、ドセタキセル）、DNAトポイソメラーゼ阻害剤（テニポシド、クリスナトール、およびマイトマイシン）、抗葉酸剤（メトトレキサート、ミコフェノール酸、およびヒドロキシウレア）、ピリミジン類似体（5-フルオロウラシル、ドキシフルリジン、およびシトシンアラビノシド）、プリン類似体（メルカプトプリンおよびチオグアニン）、DNA代謝拮抗剤（2'-デオキシ-5-フルオロウリジン、グリシン酸アフィジコリン、およびピラゾロイミダゾール）、ならびに有糸分裂阻害剤（ハリコンドリン、コルヒチン、およびリゾキシシン）が挙げられるが、これらに限定されない。1つ以上の化学療法剤（例えば、FLAG、CHOP）を含む組成物も使用され得る。FLAGには、フルダラビン、シトシンアラビノシド（Ara-C）、およびG-CSFが含まれる。CHOPには、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキソルビシン、およびプレドニゾンが含まれる。化学療法剤の前述の例は例示的なものであり、限定するようには意図されていない。

【0304】

別の実施形態では、放射線療法が使用される。放射線療法で使用される放射線は、電離放射線であり得る。放射線療法は、ガンマ線、X線、または陽子ビームでもあり得る。放射線療法の例には、外部ビーム放射線療法、放射性同位体（I-125、パラジウム、イ

10

20

30

40

50

リジウム)、ストロンチウム-89等の放射性同位体の間質埋め込み、胸部放射線療法、腹腔内P-32放射線療法、ならびに／または全腹部および骨盤放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。放射線療法の一般概要については、Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita et al., eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphiaを参照されたい。放射線療法は、放射線が遠隔源から向けられる外部ビーム放射線または遠隔療法として施され得る。放射線治療は、放射性源ががん細胞または腫瘍塊に近接して体内に設置される内部療法または小線源療法として施される場合もある。ヘマトポルフィリンおよびその誘導体、ベルトポルフィン(BPD-MA)、フタロシアニン、感光剤Pc4、デメトキシーヒポクレリンA、ならびに2BA-2-DMHA等の感光剤の投与を含む光線力学的療法の使用も包含される。

【0305】

別の実施形態では、ホルモン療法が使用される。ホルモン治療的治療は、例えば、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト(例えば、フルタミド、ピカルタミド、タモキシフェン、ラロキシフェン、酢酸ロイプロリド(LUPRON)、LH-RHアンタゴニスト)、ホルモン生合成および処理阻害剤、ならびにステロイド(例えば、デキサメタゾン、レチノイド、デルトイド、ベータメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、ジヒドロテストステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステロン)、ビタミンA誘導体(例えば、オールトランス型レチノイン酸(ATRA))、ビタミンD3類似体、抗ゲスターゲン(例えば、ミフェプリストン、オナプリストン)、または抗アンドロゲン(例えば、酢酸シプロテロン)を含み得る。

【0306】

5. アッセイおよびスクリーニング法

本発明の別の態様は、非細胞ベースのアッセイおよび異種移植片動物モデルアッセイを含むスクリーニングアッセイに関する。一実施形態では、これらのアッセイは、HHLA2シグナル伝達を減少させ、それにより、免疫応答を増加させる薬剤を特定し、かつ／またはHHLA2シグナル伝達を増加させ、それにより、免疫応答を減少させる薬剤を特定するために、ヒトまたは動物モデルアッセイ等においてHHLA2シグナル伝達を調節する薬剤を特定するための方法を提供する。

【0307】

一実施形態では、本発明は、HHLA2、TMIGD2、およびKIR3DL3等の本明細書(例えば、表、図、実施例、またはさもなければ本明細書)に記載の少なくとも1つのバイオマーカーに結合するか、またはその生物学的活性を調節する試験薬剤をスクリーニングするためのアッセイに関する。一実施形態では、かかる薬剤を特定するための方法は、本明細書に記載の少なくとも1つのバイオマーカーを調節する、例えば、阻害する薬剤の能力の決定を伴う。

【0308】

一実施形態では、アッセイは、本明細書に記載の少なくとも1つのバイオマーカーを試験薬剤と接触させることと、以下に記載されるように基質の直接結合を測定することまたは間接的パラメータを測定すること等によって、バイオマーカーの酵素活性を調節する(例えば、阻害する)試験薬剤の能力を決定することを含む、無細胞アッセイまたは細胞ベースのアッセイである。

【0309】

例えば、直接結合アッセイでは、結合が複合体中の標識タンパク質または分子を検出することによって決定され得るように、バイオマーカータンパク質(またはそれらのそれぞれの標的ポリペプチドまたは分子)が放射性同位体または酵素標識にカップリングされ得る。例えば、標的は、直接的または間接的のいずれかで、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 、または ^3H で標識され得、放射性同位体が放射線放出の直接計数またはシンチレーション計数

によって検出され得る。あるいは、標的は、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリ性ホスファターゼ、またはルシフェラーゼで酵素的に標識され得、酵素標識が適切な基質の産物への変換の決定によって検出され得る。バイオマーカーと基質との間の相互作用の決定が標準の結合または酵素分析アッセイを使用して達成される場合もある。上述のアッセイ方法の1つ以上の実施形態では、ポリペプチドまたは分子を固定化して、タンパク質または分子の一方または両方の複合体形成されていない形態からの複合体形成された形態の分離を促進し、かつアッセイの自動化を適応させることが望ましくあり得る。

【0310】

試験薬剤の標的への結合は、反応物を収容するのに好適な任意の容器内で達成され得る。かかる容器の非限定的な例には、マイクロタイタープレート、試験管、および微小遠心管が挙げられる。本明細書に記載の抗体の固定化された形態は、多孔性、微孔性（約1ミクロン未満の平均細孔径を有する）またはマクロ多孔性（約10ミクロン超の平均細孔径を有する）材料、例えば、膜、セルロース、ニトロセルロース、またはガラス繊維；ビーズ、例えば、アガロースもしくはポリアクリルアミドもしくはラテックス製のもの；または皿、プレート、もしくはウェルの表面、例えば、ポリスチレン製のもの等の固相に結合した抗体も含み得る。

10

【0311】

代替の実施形態では、バイオマーカーと基質またはバイオマーカーとその天然結合パートナーとの間の相互作用を調節する薬剤の能力決定は、シグナル伝達経路（例えば、フィードバックループ）内のその位置の下流または上流で機能するポリペプチドまたは他の産物の活性を調節する試験薬剤の能力を決定することによって達成され得る。かかるフィードバックループは当該技術分野で周知である（例えば、Chen and Guillem in (2009) Int. J. Tryptophan Res. 2:1-19を参照のこと）。

20

【0312】

HHLA2の状態は、本明細書に記載の抗HHLA2抗体を使用して測定され得る。HHLA2発現の減少は、この薬剤がHHLA2活性／シグナル伝達を阻害することを示し、HHLA2活性／シグナル伝達の阻害および免疫応答の増加に有用なものとして薬剤を特定する。HHLA2のTMIGD2、KIR3DL3、および／または阻害性受容体への結合の減少は、その薬剤がHHLA2活性／シグナル伝達を阻害することを示し、HHLA2活性／シグナル伝達の阻害および免疫応答の増加に有用なものとして薬剤を特定する。対照的に、HHLA2発現の増加は、その薬剤がHHLA2活性／シグナル伝達を促進することを示し、HHLA2活性／シグナル伝達の促進および免疫応答の減少に有用なものとして薬剤を特定する。HHLA2のTMIGD2、KIR3DL3、および／または阻害性受容体への結合の増加は、その薬剤がHHLA2活性／シグナル伝達を促進することを示し、HHLA2活性／シグナル伝達の促進および免疫応答の減少に有用なものとして薬剤を特定する。

30

【0313】

本発明はさらに、上述のスクリーニングアッセイによって特定された新規の薬剤に関する。したがって、本明細書に記載されるように特定された薬剤を適切な動物モデル等にさらに使用することは本発明の範囲内である。例えば、本明細書に記載されるように特定された薬剤が動物モデルに使用されて、かかる薬剤での治療の有効性、毒性、または副作用を決定することができる。あるいは、本明細書に記載されるように特定された抗体が動物モデルに使用されて、かかる薬剤の作用機構を決定することができる。

40

【0314】

本発明の一態様は、非細胞ベースのアッセイおよび異種移植片動物モデルアッセイを含むスクリーニングアッセイに関する。一実施形態では、これらのアッセイは、異種移植片動物モデルアッセイを使用することによってヒト等におけるがんが抗HHLA2抗体療法に応答する可能性があるかを特定し、かつ／または薬剤が抗HHLA2抗体療法に応答する可能性の低いがん細胞の成長を阻害するか、またはそれを死滅させることができるかを

50

特定するための方法を提供する。

【0315】

6. 予防的方法

一態様では、本発明は、対象における、望ましくないまたは決して望ましいとはいえない免疫応答に関連する疾患または状態を予防するための方法を提供する。特許請求される薬剤または方法での治療から恩恵を受けるであろう疾患を発症する危険性のある対象が、例えば、当該技術分野で既知の診断アッセイまたは予後アッセイのうちのいずれかまたはそれらの組み合わせによって特定され得る。予防薬の投与は、望ましくないまたは決して望ましいとはいえない免疫応答に関連する症状の兆候の前に起こり得る。治療に使用される適切な薬剤（例えば、抗体、ペプチド、融合タンパク質、または小分子）は、臨床的適応に基づいて決定され得、例えば、本明細書に記載のスクリーニングアッセイを使用して特定され得る。

10

【0316】

VII. 薬学的組成物

例えば、抗体、ペプチド、融合タンパク質、または小分子を遮断することを含む、HHLA2とTMIGD2および／またはKIR3DL3等の1つ以上の天然結合パートナーとの間の相互作用を調節する（例えば、阻害または促進する）薬剤が、対象への投与に好適な薬学的組成物に組み込まれ得る。かかる組成物は、典型的には、抗体、ペプチド、融合タンパク質、または小分子、および薬学的に許容される担体を含む。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」という言語は、薬学的投与と適合性のあるありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸収遅延剤等を含むよう意図されている。薬学的に活性な物質のためのかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。いずれの従来の媒体または薬剤も活性化化合物と適合性のない場合を除いて、本組成物におけるそれらの使用が企図される。補足的活性化化合物も本組成物に組み込まれ得る。

20

【0317】

本発明の薬学的組成物は、その意図される投与経路と適合性であるように製剤化される。投与経路の例には、非経口、例えば、静脈内、皮内、皮下、経口（例えば、吸入）、経皮（局所）、経粘膜、および直腸投与が挙げられる。非経口、皮内、または皮下適用に使用される溶液または懸濁液は、以下の成分：滅菌希釈剤、例えば、注射用水、生理食塩水溶液、固定油、ポリエチレングリコール、グリセリン、プロピレングリコール、または他の合成溶媒；抗細菌剤、例えば、ベンジルアルコールまたはメチルパラベン；抗酸化剤、例えば、アスコルビン酸または重亜硫酸ナトリウム；キレート剤、例えば、エチレンジアミン四酢酸；緩衝液、例えば、酢酸、クエン酸、またはリン酸；および張度を調整するための薬剤、例えば、塩化ナトリウムまたはデキストロースを含み得る。pHは、塩酸または水酸化ナトリウム等の酸または塩基で調整され得る。これらの非経口調製物は、ガラスまたはプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ、または複数回投与バイアル内に封入され得る。

30

【0318】

注射用に好適な薬学的組成物には、滅菌注射用溶液または分散剤の即時調製のための滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散剤および滅菌粉末が含まれる。静脈内投与の場合、好適な担体には、生理学的生理食塩水、静菌水、Cremophor EL（商標）（BASF, Parsippany, NJ）、またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）が含まれる。全ての場合において、本組成物は滅菌でなければならず、容易なシリンジ通過性（syringeability）が存在する程度に流体であるべきである。本組成物は、製造および保管条件下で安定しているべきであり、細菌および真菌等の微生物の混入作用から保護されるべきである。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチン等のコーティング剤の使用、必要な粒径の維持（分散剤の場合）、および界面活性剤の使用により

40

50

、適切な流動性が維持され得る。微生物作用の阻止は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成され得る。多くの場合、本組成物中に、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、本組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことによってもたらされ得る。

【0319】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて、活性化合物を必要な量で上に列挙される成分のうちの1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒に組み込み、その後、濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散剤は、活性化合物を、塩基性分散媒および上に列挙されるもの由来の必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、活性成分と事前に滅菌濾過された溶液由来の任意の追加の所望の成分との粉末をもたらす真空乾燥および凍結乾燥である。

【0320】

経口組成物には、一般に、不活性希釈剤または食用担体が含まれる。それらは、ゼラチンカプセル内に封入され得るか、または錠剤に圧縮され得る。治療的経口投与の目的のために、活性化合物が賦形剤と組み込まれ、錠剤、トローチ、またはカプセルの形態で使用され得る。経口組成物は、洗口液としての使用のための流体担体を使用して調製される場合もあり、流体担体中の化合物は、経口適用され、口内でグチュグチュされ、吐き出されるか、または飲み込まれる。薬学的に適合性のある結合剤、および／またはアジュバント材料が、本組成物の一部として含まれ得る。錠剤、丸剤、カプセル、トローチ等は、以下の成分：結合剤、例えば、微結晶性セルロース、トラガカントガム、もしくはゼラチン；賦形剤、例えば、デンプンもしくはラクトース；崩壊剤、例えば、アルギン酸、*Primo gel*、もしくはトウモロコシデンプン；滑沢剤、例えば、ステアリン酸マグネシウムもしくは *Sterotes*；流動促進剤、例えば、コロイド状二酸化ケイ素；甘味剤、例えば、スクロースもしくはサッカリン；または香味剤、例えば、ペパーミント、サリチル酸メチル、もしくはオレンジ香味料のうちのいずれか、または同様の性質を有する化合物を含有し得る。

【0321】

吸入による投与の場合、化合物は、好適な推進剤、例えば、二酸化炭素等のガスを含有する加圧容器もしくはディスペンサー、または噴霧器からのエアゾールスプレーの形態で送達される。

【0322】

全身投与は、経粘膜または経皮手段による場合もある。経粘膜または経皮投与の場合、浸透される障壁に適切な浸透剤が製剤中に使用される。かかる浸透剤は、当該技術分野で一般的に知られており、これらには、例えば、経粘膜投与の場合、洗剤、胆汁塩、およびフシジン酸誘導体が含まれる。経粘膜投与は、鼻腔スプレーまたは坐薬の使用によって達成され得る。経皮投与の場合、活性化合物は、当該技術分野で一般的に知られているように、軟膏、膏薬、ゲル、またはクリームに製剤化され得る。

【0323】

化合物は、坐薬（例えば、ココアバターおよび他のグリセリド等の従来の坐薬基剤を用いて）または直腸送達の場合には保持浣腸剤の形態で調製される場合もある。

【0324】

一実施形態では、調節剤は、インプラントおよびマイクロカプセル化送達系を含む、放出制御製剤等の体内からの迅速な排除から化合物を保護する担体を用いて調製される。エチレン酢酸ビニル、ポリ無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステル、およびポリ乳酸等の生分解性生体適合性ポリマーが使用され得る。かかる製剤を調製するための方法は、当業者に明らかであるはずである。これらの材料は、*Alza Corporation* および *Nova Pharmaceuticals, Inc.* から商業的

に入手することもできる。リボソーム懸濁液（ウイルス抗原に対するモノクローナル抗体に感染した細胞を標的としたリボソームを含む）も薬学的に許容される担体として使用され得る。これらは、当業者に既知の方法、例えば、米国特許第4,522,811号に記載の方法に従って調製され得る。

【0325】

投与の簡便性および投薬量の均一性のために経口または非経口組成物を単位剤形で製剤化することが特に有利である。本明細書で使用される単位剤形とは、治療される対象の単位投薬量に適した物理的に別個の単位を指し、各単位が、必要な薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された活性化化合物の所定の量を含む。本発明の単位剤形の仕様は、活性化化合物の特有の特性、達成される特定の治療効果、および個体の治療のためのかかる活性化化合物を化合する当該技術分野に固有の制限によって決定され、かつそれらに直接依存する。

10

【0326】

かかる化合物の毒性および治療有効性は、細胞培養物または実験動物における標準の薬学的手順によって決定され得、例えば、LD50（集団の50%に致死的な用量）およびED50（集団の50%に治療的に有効な用量）を決定するためのものである。毒性作用と治療効果との間の用量比は治療指数であり、LD50/ED50比として表現され得る。高い治療指数を呈する化合物が好ましい。毒性副作用を呈する化合物が使用され得るが、非感染細胞への潜在的な損傷を最小限に抑え、それにより、副作用を軽減するために、かかる化合物を罹患組織部位に標的させる送達系を設計する際に注意を払われなければならない。

20

【0327】

細胞培養アッセイおよび動物研究から得られたデータが、ヒトにおける使用のためのある範囲の投薬量の製剤化に使用され得る。かかる化合物の投薬量は、好ましくは、毒性をほとんどまたは全く有しないED50を含む循環濃度の範囲内である。投薬量は、用いられる剤形および利用される投与経路に応じてこの範囲内で変動し得る。本発明の方法で使用されるいずれの化合物についても、治療有効用量は、細胞培養アッセイから最初に推定され得る。用量が動物モデルで製剤化されて、細胞培養において決定されるIC50（すなわち、症状の半最大抑制を達成する試験化合物の濃度）を含む循環血漿濃度範囲を達成することができる。かかる情報を使用して、ヒトにおける有用な用量をより正確に決定することができる。血漿中のレベルは、例えば、高速液体クロマトグラフィーによって測定され得る。

30

【0328】

上述の調節剤は、当該薬剤をコードする発現可能な核酸の形態で投与され得る。これらが含まれるかかる核酸および組成物も本発明によって包含される。例えば、本発明の核酸分子は、ベクターに挿入され、遺伝子療法ベクターとして使用され得る。遺伝子療法ベクターは、例えば、静脈内注射、局所投与（米国特許第5,328,470号を参照のこと）、または定位注射（例えば、Chen et al. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:3054-3057を参照のこと）によって対象に送達され得る。遺伝子療法ベクターの薬学的調製物は、許容される希釈剤中の遺伝子療法ベクターを含み得るか、または遺伝子送達ビヒクルが埋め込まれる徐放性マトリックスを含み得る。あるいは、完全な遺伝子送達ベクターが組換え細胞からインタクトで産生され得る場合、例えば、レトロウイルスベクターの場合、薬学的調製物は、遺伝子送達系を産生する1つ以上の細胞を含み得る。

40

【0329】

薬学的組成物は、投与についての指示と一緒に容器、パック、またはディスペンサー内に含まれ得る。

【0330】

VIII. 薬剤の投与

本発明の免疫調節薬剤は、免疫細胞媒介性免疫応答を増強するか、または抑止するかの

50

いずれかのために、インビボでの医薬品投与に好適な生物学的に適合性の形態で対象に投与される。「インビボ投与に好適な生物学的に適合性の形態」とは、いずれの毒性作用もタンパク質の治療効果を上回る投与されるタンパク質の形態を意味する。「対象」という用語は、免疫応答が誘発され得る生きている生物、例えば、哺乳動物を含むよう意図されている。対象の例には、ヒト、イヌ、ネコ、マウス、ラット、およびそれらのトランスジェニック種が含まれる。本明細書に記載の薬剤の投与は、薬剤の治療的に活性な量を単独でまたは薬学的に許容される担体と組み合わせて含む任意の薬理学的形態であり得る。

【0331】

本発明の治療的組成物の治療的に活性な量の投与は、必要な投薬量で必要な期間にわたって所望の結果を達成するのに有効な量として定義される。例えば、薬剤の治療的に活性な量は、個体の病状、年齢、性別、および体重等の因子、ならびに個体に所望の応答を誘発するペプチドの能力により異なり得る。投薬量レジメンは、最適治療応答を提供するように調整され得る。例えば、いくつかの分割用量が1日1回投与され得るか、または用量は、治療状況の緊急事態によって示されるように比例的に減少し得る。

【0332】

本明細書に記載の薬剤または本発明は、注射（皮下、静脈内等）、経口投与、吸入、経皮適用、または直腸投与等の簡便な様式で投与され得る。投与経路に応じて、活性化化合物は、化合物を不活性化し得る酵素、酸、および他の自然条件の作用から化合物を保護するための材料でコーティングされ得る。例えば、薬剤の投与について、非経口投与以外の方法により、薬剤をその不活性化を阻止するための材料でコーティングするか、または薬剤をその材料と同時に投与することが望ましくあり得る。

【0333】

薬剤は、個体に、適切な担体、希釈剤、もしくはアジュバント中で投与されるか、酵素阻害剤と同時に投与されるか、またはリポソーム等の適切な担体中で投与され得る。薬学的に許容される希釈剤には、生理食塩水および水性緩衝溶液が含まれる。アジュバントは、その最も広い意味で使用され、インターフェロン等の任意の免疫刺激化合物を含む。本明細書で企図されるアジュバントには、レゾルシノール、非イオン性界面活性剤、例えば、ポリオキシエチレンオレイルエーテルおよびn-ヘキサデシルポリエチレンエーテルが含まれる。酵素阻害剤には、膵臓トリプシン阻害剤、ジイソプロピルフルオロリン酸（DEEP）、およびトラジロールが含まれる。リポソームには、水中油中水乳剤、ならびに従来のリポソーム（Sterna et al. (1984) J. Neuroimmunol. 7: 27）が含まれる。

【0334】

薬剤は、非経口または腹腔内投与される場合もある。分散剤が、グリセロール、液体ポリエチレングリコール、およびそれらの混合物、ならびに油中で調製される場合もある。通常の保管および使用条件下で、これらの調製物は、微生物増殖を阻止するための保存料を含有し得る。

【0335】

注射用に好適な薬剤の薬学的組成物には、滅菌注射用溶液または分散剤の即時調製のための滅菌水溶液（水溶性の場合）または分散剤および滅菌粉末が含まれる。全ての場合において、本組成物は、好ましくは滅菌であり、容易なシリンジ通過性が存在する程度に流体であるべきである。本組成物は、好ましくは製造および保管条件下で安定しており、細菌および真菌等の微生物の混入作用から保護されるであろう。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコール、および液体ポリエチレングリコール等）、およびそれらの好適な混合物を含有する溶媒または分散媒であり得る。例えば、レシチン等のコーティング剤の使用、必要な粒径の維持（分散剤の場合）、および界面活性剤の使用により、適切な流動性が維持され得る。微生物作用の阻止は、様々な抗細菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノール、アスコルビン酸、チメロサル等によって達成され得る。多くの場合、本組成物中に、等張剤、例えば、糖、多価アルコール、例えば、マンニトール、ソルビトール、塩化ナトリウ

10

20

30

40

50

ムを含むことが好ましい。注射用組成物の持続的吸収は、本組成物中に吸収を遅延させる薬剤、例えば、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンを含むことによってもたらされ得る。

【0336】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて、本発明の薬剤（例えば、抗体、ペプチド、融合タンパク質、または小分子）を必要な量で上に列挙される成分のうちの1つまたは組み合わせを有する適切な溶媒に組み込み、その後、濾過滅菌することによって調製され得る。一般に、分散剤は、活性化合物を、塩基性分散媒および上に列挙されるもの由来の必要な他の成分を含有する滅菌ビヒクルに組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液の調製のための滅菌粉末の場合、好ましい調製方法は、薬剤と事前に滅菌濾過された溶液由来の任意の追加の所望の成分との粉末をもたす真空乾燥および凍結乾燥である。

10

【0337】

上述のように薬剤が好適に保護される場合、タンパク質は、例えば、不活性希釈剤または同化可能な食用担体と経口投与され得る。本明細書で使用される場合、「薬学的に許容される担体」は、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング剤、抗細菌剤および抗真菌剤、等張剤、ならびに吸収遅延剤等を含む。薬学的に活性な物質のためのかかる媒体および薬剤の使用は、当該技術分野で周知である。いずれの従来の媒体または薬剤も活性化合物と適合性のない場合を除いて、治療的組成物におけるそれらの使用が企図される。補足的活性化合物も本組成物に組み込まれ得る。

20

【0338】

投与の簡便性および投薬量の均一性のために非経口組成物を単位剤形で製剤化することが特に有利である。本明細書で使用される「単位剤形」とは、治療される哺乳類対象の単位投薬量に適した物理的に別個の単位を指し、各単位が、必要な薬学的担体と関連して所望の治療効果をもたらすように計算された活性化合物の所定の量を含む。本発明の単位剤形の仕様は、（a）活性化合物の特有の特性および達成される特定の治療効果、ならびに（b）個体における感受性の治療のためのかかる活性化合物を化合する当該技術分野に固有の制限によって決定され、かつそれらに直接依存する。

【0339】

一実施形態では、本発明の薬剤は、抗体である。本明細書で定義されるように、抗体の治療有効量（すなわち、有効投薬量）は、約0.001~30mg/kg体重、好ましくは約0.01~25mg/kg体重、より好ましくは約0.1~20mg/kg体重、さらにより好ましくは約1~10mg/kg、2~9mg/kg、3~8mg/kg、4~7mg/kg、または5~6mg/kg体重の範囲である。当業者であれば、疾患または障害の重症度、以前の治療、対象の一般的な健康状態および／または年齢、ならびに存在する他の疾患を含むが、これらに限定されないある特定の因子が、対象を有効に治療するのに必要な投薬量に影響を及ぼし得ることを理解する。さらに、抗体の治療有効量での対象の治療は、単回治療を含み得るか、または好ましくは一連の治療を含み得る。好ましい例では、対象は、約0.1~20mg/kg体重の範囲の抗体で、約1~10週間、好ましくは2~8週間、より好ましくは約3~7週間、さらにより好ましくは約4、5、または6週間にわたって週1回治療される。治療に使用される抗体の有効投薬量が特定の治療の過程にわたって増加または減少し得ることも理解されるであろう。投薬量の変化により、診断アッセイの結果がもたらされ得る。

30

40

【0340】

上述のように、いくつかの実施形態では、投与のための薬剤は、細胞ベースである。細胞ベースの薬剤は、対象宿主と免疫適合性関係にあり、任意のかかる関係が本発明による使用のために企図される。例えば、養子T細胞等の細胞は同系であり得る。「同系」という用語は、特に抗原または免疫学的反応に関して遺伝学的に同一である同じ種に由来するか、それに起源するか、またはそのメンバーである状態を指し得る。これらには、一致するMHC型を有する同一の双子が含まれる。したがって、「同系移植」とは、ドナーからドナーと遺伝学的に同一であるか、または望ましくない有害な免疫原性応答（例えば、本

50

明細書に記載の免疫学的スクリーニング結果の解釈に反するであろうもの等) なしに移植を可能にするのに十分に免疫学的に適合性であるレシピエントへの細胞の移入を指す。

【0341】

移入された細胞が同じ対象から得られ、同じ対象に移植される場合、同系移植は、「自己」のものであり得る。「自己移植」は、対象自身の細胞または臓器の採取および再注入または移植を指す。自己細胞の排他的または補足的使用により、細胞の宿主への戻し投与、特定の移植片対宿主反応の多くの有害作用が排除または軽減され得る。

【0342】

移入された細胞が同じ種から得られ、かつその同じ種の異なるメンバーに移植されるが、有害な免疫原性応答を回避するのに十分に一致した主要組織適合性複合体(MHC)抗原を有する場合、同系移植は、「一致した同種」のものであり得る。MHC不一致の程度

10

の決定は、当該技術分野で既知の使用されている標準の試験に従って達成され得る。例えば、ヒトにおいて、移植生物学で重要であると特定されているMHC遺伝子の少なくとも6つの主要なカテゴリーが存在する。HLA-A、HLA-B、HLA-Cは、HLAクラスIタンパク質をコードし、HLA-DR、HLA-DQ、およびHLA-DPは、HLAクラスIIタンパク質をコードする。これらの群の各々の群内の遺伝子は、ヒト集団に見られる多数のHLA対立遺伝子またはバリエーションに反映されるように高度に多型であり、

20

個体間のこれらの群の差は、移植細胞の免疫応答の強度に関連する。MHC一致の程度を決定するための標準方法は、HLA-B群およびHLA-DR群、またはHLA-A群、HLA-B群、およびHLA-DR群内の対立遺伝子を試験する。したがって、試験は、それぞれ、2つまたは3つのHLA群内の少なくとも4つ、さらには5つまたは6つのMHC抗原からなり得る。血清学的MHC試験では、各HLA抗原型に対して産生された抗体が1体の対象(例えば、ドナー)由来の細胞と反応して、その抗体と反応するある特定のMHC抗原の存在または不在を決定する。これは、他の対象(例えば、レシピエント)の反応性プロファイルと比較される。抗体のMHC抗原との反応は、典型的には、抗体を細胞とインキュベートし、その後、補体を添加して細胞溶解を誘導すること(すなわち、リンパ球毒性試験)によって決定される。反応は、この反応において溶解した細胞の量に従って試験および等級分けされる(例えば、Mickelson and Peter

30

s d o r f (1999) Hematopoietic Cell Transplantation, Thomas, E. D. et al. eds., pg 28-37, Blackwell Scientific, Malden, Mass. を参照のこと)。他の細胞ベースのアッセイには、標識抗体を使用したフローサイトメトリーまたは酵素結合免疫アッセイ(ELISA)が含まれる。MHC型を決定するための分子法が周知であり、HLAタンパク質をコードする特定の遺伝子配列を検出するための合成プローブおよび/またはプライマーを一般に用いる。合成オリゴヌクレオチドは、特定のHLA型に関連する制限断片長多型を検出するためのハイブリダイゼーションプローブとして使用され得る(V

40

a u g h n (2002) Method. Mol. Biol. MHC Protocol. 210:45-60)。あるいは、(例えば、ポリメラーゼ連鎖反応またはライゲーション連鎖反応により)HLA配列を増幅するためのプライマーが使用され得、その産物は、直接DNA配列決定、制限断片多型分析(RFLP)、または一連の配列特異的オリゴヌクレオチドプライマー(SSOP)とのハイブリダイゼーションによってさらに試験され得る(Petersdorf et al. (1998) Blood 92:3515-3520、Morishima et al. (2002) Blood 99:4200-4206、およびMiddleton and Williams (2002) Method. Mol. Biol. MHC Protocol. 210:67-112)。

【0343】

移入された細胞と対象の細胞が、典型的には同系交配により、単一遺伝子座等の定義された遺伝子座で異なる場合、同系移植は、「類遺伝子性」であり得る。「類遺伝子性」という用語は、同じ種に由来するか、それに起源するか、またはそのメンバーであることを指し、これらのメンバーは、小さい遺伝領域、典型的には単一遺伝子座(すなわち、単一

50

遺伝子)を除いて遺伝学的に同一である。「類遺伝子移植」とは、レシピエントが単一遺伝子座を除いてドナーと遺伝学的に同一である、細胞または臓器のドナーからレシピエントへの移入を指す。例えば、CD45は、いくつかの対立遺伝子形態で存在し、マウス株がCD45.1またはCD45.2対立遺伝子バージョンが発現されるかに関して異なる類遺伝子マウス株が存在する。

【0344】

対照的に、「不一致同種」とは、有害な免疫原性応答を誘発するのに十分なMHC抗原の定義されたメンバーの血清学的分析または分子分析等の当該技術分野で使用されている標準のアッセイによって典型的に決定される、非同一の主要組織適合性複合体(MHC)抗原(すなわち、タンパク質)を有する同じ種に由来するか、それに起源するか、またはそのメンバーであることを指す。「部分的不一致」とは、メンバー間、典型的にはドナーとレシピエントとの間で試験されたMHC抗原の部分的な一致を指す。例えば、「半不一致」とは、試験されたMHC抗原の50%が2つのメンバー間で異なるMHC抗原型を示すことを指す。「完全(full)」または「完全(complete)」不一致とは、試験された全てのMHC抗原が2つのメンバー間で異なることを指す。

【0345】

同様に、対照的には、「異種」とは、異なる種、例えば、ヒトおよび齧歯類、ヒトおよびブタ、ヒトおよびチンパンジー等に由来するか、それに起源するか、またはそのメンバーであることを指す。「異種移植」とは、レシピエントがドナーの種とは異なる種である、細胞または臓器のドナーからレシピエントへの移入を指す。

【0346】

加えて、細胞は、単一の源または複数の源(例えば、単一の対象または複数の対象)から得られ得る。複数とは、少なくとも2つ(例えば、1つより多く)を指す。なお別の実施形態では、非ヒト哺乳動物は、マウスである。目的とする細胞型が得られる動物は、成体、新生児(例えば、48時間齢未満)、未熟、または子宮内であり得る。目的とする細胞型は、初代がん細胞、がん幹細胞、樹立がん細胞株、不死化初代がん細胞等であり得る。ある特定の実施形態では、宿主対象の免疫系は、移植がん細胞と免疫学的に適合性のあるように操作されるか、または別様に選出され得る。例えば、一実施形態では、対象は、ヒトがん細胞と適合性になるように「ヒト化」され得る。「免疫系ヒト化」という用語は、ヒトHSC系統細胞ならびにヒト後天性および先天性免疫細胞を含むマウス等の動物が、宿主動物から拒絶されることなく生存し、それにより、ヒト造血ならびに後天性免疫および先天性免疫の両方の宿主動物における再構成を可能にすることを指す。後天性免疫細胞には、T細胞およびB細胞が含まれる。先天性免疫細胞には、マクロファージ、顆粒球(好塩基球、好酸球、好中球)、DC、NK細胞、およびマスト細胞が含まれる。代表的な非限定的な例には、SCID-hu、Hu-PBL-SCID、Hu-SRC-SCID、NSG(先天性免疫系、B細胞、T細胞、およびサイトカインシグナル伝達を欠くNOD-SCID IL2r-ガンマ(ヌル))、NOG(NOD-SCID IL2r-ガンマ(切断))、BRG(BALB/c-Rag2(ヌル)IL2r-ガンマ(ヌル))、およびH2dRG(Stock-H2d-Rag2(ヌル)IL2r-ガンマ(ヌル))マウス(例えば、Shultz et al. (2007) Nat. Rev. Immunol. 7:118、Pearson et al. (2008) Curr. Protoc. Immunol. 15:21、Brehm et al. (2010) Clin. Immunol. 135:84-98、McCune et al. (1988) Science 241:1632-1639、米国特許第7,960,175号、および米国特許公開第2006/0161996号を参照のこと)、ならびに免疫関連遺伝子の関連ヌル突然変異体、例えば、Rag1(B細胞およびT細胞を欠く)、Rag2(B細胞およびT細胞を欠く)、TCRアルファ(T細胞を欠く)、パーフォリン(cD8+T細胞が細胞毒性機能を欠く)、FoxP3(機能的CD4+T制御性細胞を欠く)、IL2rg、またはPrfl、ならびにHHLA2、KIR3DL3、TMIGD2、PD-1、PD-L1、Tim3、および/または2B4の突然変異体またはノックアウトが挙げられ、マ

10

20

30

40

50

ウス等の免疫不全動物のコンパートメント特異的モデルにおけるヒト免疫細胞の効率的な生着を可能にし、かつ／またはそのモデルを提供する（例えば、PCT公開第WO2013/062134号を参照のこと）。加えて、NSG-CD34+（NOD-SCID IL2 γ -ガンマ（ヌル）CD34+）ヒト化マウスは、マウス等の動物モデルにおけるヒト遺伝子および腫瘍活性の研究に有用である。

【0347】

本明細書で使用される場合、生物学的材料源から「得られる」とは、ドナー由来の生物学的材料を採取するか、またはその源を分配する任意の従来の方法を意味する。例えば、生物学的材料は、固形腫瘍、末梢血もしくは臍帯血試料等の血液試料から得られ得るか、または骨髄もしくは羊水等の別の体液から採取され得る。かかる試料を得るための方法は、当業者に周知である。本発明では、試料は、新鮮なもの（すなわち、凍結することなくドナーから得られたもの）であり得る。さらに、試料は、増殖前に外来性のまたは望ましくない成分を除去するようにさらに操作され得る。試料は、保存ストックから得られる場合もある。例えば、細胞株または末梢血もしくは臍帯血等の体液の場合、試料は、かかる細胞株または体液の低温貯蔵的にまたは別様に保存されたバンクから採取され得る。かかる試料は、任意の好適なドナーから得られ得る。

【0348】

得られた細胞集団は、直接使用され得るか、または後日使用するために凍結され得る。凍結保存のための様々な媒体およびプロトコルが当該技術分野で既知である。一般に、凍結媒体は、約5～10%のDMSO、10～90%の血清アルブミン、および50～90%の培養培地を含む。細胞の保存に有用な他の添加物には、例として、トレハロース等の二糖（Scheinkoniget al. (2004) Bone Marrow Transplant. 34:531-536）、またはヘタスターチ（すなわち、ヒドロキシエチルデンプン）等の血漿増量剤が挙げられるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態では、リン酸緩衝生理食塩水等の等張緩衝溶液が使用され得る。例示の凍結保存組成物は、4%のHSA、7.5%のジメチルスルホキシド（DMSO）、および2%のヘタスターチを有する細胞培養培地を有する。凍結保存のための他の組成物および方法は、当該技術分野で周知であり、説明されている（例えば、Broxmeyer et al. (2003) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 100:645-650を参照のこと）。細胞は、約-135℃未満の最終温度で保存される。

【0349】

細胞は、対象の体重1キログラムあたり 0.1×10^6 、 0.2×10^6 、 0.3×10^6 、 0.4×10^6 、 0.5×10^6 、 0.6×10^6 、 0.7×10^6 、 0.8×10^6 、 0.9×10^6 、 1.0×10^6 、 5.0×10^6 、 1.0×10^7 、 5.0×10^7 、 1.0×10^8 、 5.0×10^8 個の細胞、もしくはそれ以上、またはそれらの間の任意の範囲もしくはそれらの間の任意の値で投与され得る。移植される細胞の数は、所与の時間量での所望の生着レベルに基づいて調整され得る。一般に、 1×10^5 ～約 1×10^9 細胞/kg体重、約 1×10^6 ～約 1×10^8 細胞/kg体重、もしくは約 1×10^7 細胞/kg体重、またはそれ以上の細胞が必要に応じて移植され得る。いくつかの実施形態では、平均サイズのマウスに対して少なくとも約 0.1×10^6 、 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 2.0×10^6 、 3.0×10^6 、 4.0×10^6 、または 5.0×10^6 個の総細胞の移植が有効である。

【0350】

細胞は、注入等の本明細書に記載の任意の好適な経路で投与され得る。細胞は、他の抗がん剤の前に、それと同時に、またはその後に投与される場合もある。

【0351】

投与は、当該技術分野で一般に既知の方法を使用して達成され得る。細胞を含む薬剤は、直接注射によって、または血管内、脳内、非経口、腹腔内、静脈内、硬膜外、髄腔内、胸骨内、関節内、滑液嚢内、鞘内、動脈内、心臓内、もしくは筋肉内投与を含むが、これらに限定されない当該技術分野で使用されている任意の他の手段によって所望の部位に導

入され得る。例えば、目的とする対象は、様々な経路によって移植細胞と生着し得る。かかる経路には、静脈内投与、皮下投与、特定の組織への投与（例えば、焦点移植）、大腿骨髓腔への注射、脾臓への注射、胎児肝臓の腎被膜下への投与等が含まれるが、これらに限定されない。ある特定の実施形態では、本発明のがんワクチンは、対象の腫瘍内にまたは皮下に注射される。細胞は、1回の注入で、または所望の効果をもたらすのに十分な定義された期間にわたる順次注入により投与され得る。移植細胞の移植、生着評価、およびマーカー表現型決定分析のための例示の方法は、当該技術分野で周知である（例えば、Pearson et al. (2008) Curr. Protoc. Immunol. 81:15.21.1-15.21.21、Ito et al. (2002) Blood 100:3175-3182、Traggiai et al. (2004) Science 304:104-107、Ishikawa et al. Blood (2005) 106:1565-1573、Shultz et al. (2005) J. Immunol. 174:6477-6489、およびHolyoake et al. (1999) Exp. Hematol. 27:1418-1427を参照のこと）。

【0352】

2つ以上の細胞型、例えば、細胞ベースの療法と幹細胞の養子細胞移入、がんワクチンと細胞ベースの療法等が組み合わせられ、投与され得る。例えば、養子細胞ベースの免疫療法が本発明の細胞ベースの療法と組み合わせられ得る。照射自己または同種腫瘍細胞、腫瘍溶解物またはアポトーシス腫瘍細胞、抗原提示細胞ベースの免疫療法、樹状細胞ベースの免疫療法、養子T細胞移入、養子CAR T細胞療法、自己免疫増強療法（AIEIT）、がんワクチン、および／または抗原提示細胞を含むが、これらに限定されない、周知の養子細胞ベースの免疫療法様式。かかる細胞ベースの免疫療法は、1つ以上の遺伝子産物を発現して免疫応答をさらに調節する、例えば、GM-CSF等のサイトカインを発現するように、かつ／またはMAGE-1、gp-100等の腫瘍関連抗原（TAA）抗原を発現するようにさらに修正され得る。本明細書に記載のがんワクチン中のがん細胞の他の細胞型に対する比率は、1:1であり得るが、所望される任意の量で調節され得る（例えば、1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1、またはそれ以上）。

【0353】

移植細胞の生着は、腫瘍体積、サイトカインレベル、投与時間、移植後の1つ以上の時点で対象から得られた目的とする細胞のフローサイトメトリー分析等であるが、これらに限定されない様々な方法のうちのいずれかによって評価され得る。例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28日待ちの時間ベースの分析、または腫瘍採取時間を示し得る。任意のかかる測定基準は、抗がん免疫療法に対する応答への変数の影響を決定するために周知のパラメータに従って調整され得る変数である。加えて、移植細胞は、他の薬剤、例えば、サイトカイン、細胞外マトリックス、細胞培養支持体等と共に移植され得る。

【0354】

本発明は、以下の実施例によってさらに例証され、これらの実施例は、限定するものとして解釈されるべきではない。本明細書を通じて引用される全ての参考文献、特許、および公開された特許出願の内容、ならびに図面は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0355】

IX. 対象

一実施形態では、HHLA2抗体療法の有効性の予測可能性が決定される対象は、哺乳動物（例えば、マウス、ヒト化マウス、ラット、霊長類、非ヒト哺乳動物、家畜、例えば、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ等）であり、好ましくはヒトである。別の実施形態では、対象は、がんの動物モデルである。例えば、動物モデルは、ヒト由来のがんの同所性異種移植

片動物モデルであり得る。

【0356】

本発明の方法の別の実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、標的療法、および／または抗免疫チェックポイント療法等の治療を受けていない。なお別の実施形態では、対象は、化学療法、放射線療法、標的療法、および／または抗免疫チェックポイント療法等の治療を受けている。

【0357】

ある特定の実施形態では、対象は、がん性または前がん性組織を取り除くための手術を受けている。他の実施形態では、がん性組織は取り除かれておらず、例えば、がん性組織は、生命に不可欠な組織または外科的手技が患者に危害を及ぼすかなりの危険性を引き起こすであろう領域等の身体の手術不能な領域に位置し得る。

【0358】

本発明の方法を使用して、本明細書に記載のもの等の対象における多くの異なるがんのHHLA2阻害剤療法に対する応答性を決定することができる。

【0359】

X. 試料の収集、調製、および分離

いくつかの実施形態では、対象由来の試料中のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）が所定の対照（基準）試料と比較される。対象由来の試料は、典型的には、がん細胞または組織等の罹患組織由来である。対照試料は、同じ対象または異なる対象由来であり得る。対照試料は、典型的には、罹患していない正常試料である。しかしながら、いくつかの実施形態では、疾患の病期分類または治療の有効性の評価等のために、対照試料は罹患組織由来であり得る。対照試料は、いくつかの異なる対象由来の試料の組み合わせであり得る。いくつかの実施形態では、対象由来のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）が所定のレベルと比較される。この所定のレベルは、典型的には、正常試料から得られる。本明細書に記載される場合、「所定の」バイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、ほんの一例として、治療に選択され得る対象を評価する（例えば、ゲノム突然変異の数および／またはDNA修復遺伝子の非機能性タンパク質を引き起こすゲノム突然変異の数に基づいて）、抗HHLA2抗体療法に対する応答を評価する、および／または1つ以上の追加の抗がん療法を伴う抗HHLA2抗体療法に対する応答を評価するために使用されるバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）であり得る。所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、がんを有する患者集団またはがんを有しない患者集団において決定され得る。所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、あらゆる患者に平等に適用可能な単数であり得るか、または所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、特定の患者亜集団により異なり得る。対象の年齢、体重、身長、および他の因子は、その個体の所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）に影響を及ぼし得る。さらに、所定のバイオマーカー量および／または活性は、対象毎に個別に決定され得る。一実施形態では、本明細書に記載の方法で決定および／または比較される量は、絶対測定値に基づいている。

【0360】

別の実施形態では、本明細書に記載の方法で決定および／または比較される量は、比率等の相対的測定（例えば、治療前対治療後のバイオマーカーコピー数、レベル、および／または活性、スパイクまたは人工対照に対するかかるバイオマーカー測定値、ハウスキピング遺伝子の発現に対するかかるバイオマーカー測定値等）に基づいている。例えば、相対的分析は、治療後バイオマーカー測定と比較した治療前バイオマーカー測定の比率に基づき得る。治療前バイオマーカー測定は、抗がん療法開始前の任意の時点で行われ得る。治療後バイオマーカー測定は、抗がん療法開始後の任意の時点で行われ得る。いくつかの実施形態では、治療後バイオマーカー測定は、抗がん療法開始の1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20週間、またはそれ以上後に、継続的監視のために無期限に近いさらに長い期間後に行われ

10

20

30

40

50

る。治療は、1つ以上の抗HHLA2抗体を単独でまたは免疫チェックポイント阻害剤等の他の抗がん剤と組み合わせて含む治療レジメン等の抗がん療法を含み得る。

【0361】

所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、任意の好適な基準であり得る。例えば、所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、患者選択が評価される同じまたは異なるヒトから得られ得る。一実施形態では、所定のバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）は、同じ患者の以前の評価から得られ得る。かかる様式で、患者の選択の経過が経時的に監視され得る。加えて、対照は、別のヒトまたは複数のヒト、例えば、対象がヒトである場合、選択されたヒト群の評価から得られ得る。かかる様式で、選択が評価されるヒトの選択の程度が、好適な他のヒト、例えば、同様もしくは同じ状態（複数可）に罹患しているヒトおよび／または同じ民族集団のヒト等の目的とするヒトと同様の状況下にある他のヒトと比較され得る。

10

【0362】

本発明のいくつかの実施形態では、所定のレベルからのバイオマーカー量および／または活性測定値（複数可）の変化は、約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、もしくは5.0倍、またはそれ以上、またはそれらの間の任意の範囲（境界値も含む）である。測定値が相対的变化に基づいている、例えば、治療前バイオマーカー測定を治療後バイオマーカー測定と比較した比率に基づいている場合に、かかるカットオフ値が平等に適用される。

20

【0363】

生体試料は、核酸および／またはタンパク質を含む体液試料、細胞試料、または組織試料を含む患者由来の様々な源から収集され得る。「体液」とは、身体から排泄または分泌される流体、ならびに通常は身体から排泄または分泌されない流体（例えば、羊水、房水、胆汁、血液および血漿、脳脊髄液、耳垢および耳くそ、カウパー液または前射精液、乳糜、糜粥、糞便、雌性射出液、間質液、細胞内液、リンパ液、月経、母乳、粘液、胸膜液、膿汁、唾液、皮脂、精液、血清、汗、滑液、涙、尿、腔粘滑液、硝子体液、嘔吐物）を指す。好ましい実施形態では、対象試料および／または対照試料は、細胞、細胞株、組織学的スライド、パラフィン包埋組織、生検、全血、乳頭吸引液、血清、血漿、頬搔爬物、唾液、脳脊髄液、尿、糞便、および骨髓からなる群から選択される。一実施形態では、試料は、血清、血漿、または尿である。別の実施形態では、試料は、血清である。

30

【0364】

試料は、長期間にわたって個体から繰り返し収集され得る（例えば、約数日間、数週間、数ヶ月に1回以上、年1回、年2回等）。ある期間にわたって個体から多数の試料を得ることは、早期検出からの結果を検証し、かつ／または生物学的パターンの変化を、例えば、疾患進行、薬物治療等の結果として特定するために使用され得る。例えば、対象試料は、1ヶ月に1回、2ヶ月に1回、または本発明による1、2、もしくは3ヶ月間隔の組み合わせで採取および監視され得る。加えて、経時的に得られた対象のバイオマーカー量および／または活性測定値は、監視期間中に、互いに、かつ正常対照のものと好都合に比較され、それにより、対象自身の値を長期監視のための内部対照または個人的対照として提供することができる。

40

【0365】

試料調製および分離は、収集された試料のタイプおよび／またはバイオマーカー測定値（複数可）の分析に応じて、手順のうちのいずれかを含み得る。かかる手順には、ほんの一例として、濃縮、希釈、pHの調整、高濃度ポリペプチド（例えば、アルブミン、ガンマグロブリン、およびトランスフェリン等）の除去、保存料および検量体の添加、プロテアーゼ阻害剤の添加、変性剤の添加、試料の脱塩、ならびに試料タンパク質の濃縮、脂質の抽出および精製が含まれる。

【0366】

試料調製は、非共有結合複合体中で他のタンパク質（例えば、担体タンパク質）に結合

50

した分子を単離することもできる。このプロセスは、特定の担体タンパク質（例えば、アルブミン）に結合した分子を単離し得るか、またはタンパク質変性による、例えば、酸を使用した、全ての担体タンパク質からの結合した分子の放出、その後の担体タンパク質の除去等のより一般的なプロセスを使用し得る。

【0367】

望ましくないタンパク質（例えば、高濃度の、無益な、または検出不能なタンパク質）の試料からの除去は、高親和性試薬、高分子量フィルター、超遠心分離および／または電気透析を使用して達成され得る。高親和性試薬には、高濃度タンパク質に選択的に結合する抗体または他の試薬（例えば、アプタマー）が含まれる。試料調製には、イオン交換クロマトグラフィー、金属イオン親和性クロマトグラフィー、ゲル濾過、疎水性クロマトグラフィー、クロマト分画、吸着クロマトグラフィー、等電点分画、および関連技法も含まれ得る。分子量フィルターには、サイズおよび分子量に基づいて分子を分離する膜が含まれる。かかるフィルターは、逆浸透、ナノ濾過、限外濾過、および精密濾過をさらに用い得る。

【0368】

超遠心分離とは、望ましくないポリペプチドを試料から除去するための方法である。超遠心分離とは、光学系で粒子の沈降（またはその欠如）を監視しながら、約15,000〜60,000 rpmで試料を遠心分離することである。電気透析とは、イオンが電位勾配の影響下で半透性膜を通して1つの溶液から別の溶液に輸送されるプロセスにおいて電気膜または半透性膜を使用する手技である。電気透析に使用される膜は、正電荷または負電荷を有するイオンを選択的に輸送するか、反対電荷のイオンを拒絶するか、または種がサイズおよび電荷に基づいて半透性膜を通して移動することを可能にする能力を有し得るため、電気透析を電解質の濃縮、除去、または分離に有用なものにする。

【0369】

本発明における分離および精製は、当該技術分野で既知の任意の手技、例えば、キャピラリー電気泳動（例えば、キャピラリー内もしくはチップ上）またはクロマトグラフィー（例えば、キャピラリー内、カラム、もしくはチップ上）を含み得る。電気泳動とは、電場の影響下でイオン性分子を分離するために使用され得る方法である。電気泳動は、ゲル中、キャピラリー内、またはチップ上のマイクロチャンネル内で行われ得る。電気泳動に使用されるゲルの例には、デンプン、アクリルアミド、ポリエチレンオキシド、アガロース、またはそれらの組み合わせが挙げられる。ゲルは、その架橋結合、洗剤または変性剤の添加、酵素または抗体（アフィニティー電気泳動）または基質（ザイモグラフィー）の固定化、およびpH勾配の組み込みによって修飾され得る。電気泳動に使用されるキャピラリーの例には、エレクトロスプレーと連動するキャピラリーが挙げられる。

【0370】

キャピラリー電気泳動（CE）は、複合親水性分子と高度に荷電された溶質の分離に好ましい。CE技術は、マイクロ流体チップ上に実装される場合もある。使用されるキャピラリーおよび緩衝液のタイプに応じて、CEは、キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）、キャピラリー等電点電気泳動（CIEF）、キャピラリー等速電気泳動（cITP）、およびキャピラリー電気クロマトグラフィー（CEC）等の分離技法にさらに分けられ得る。CE技法をエレクトロスプレーイオン化に連結するための実施形態は、揮発性溶液、例えば、揮発性酸および／または塩基を含有する水性混合物ならびにアルコールまたはアセトニトリル等の有機物の使用を含む。

【0371】

キャピラリー等速電気泳動（cITP）とは、分析物がキャピラリーを通過して一定速度で移動するが、それにもかかわらずそれらのそれぞれの移動度によって分離される技法である。キャピラリーゾーン電気泳動（CZE）、別名、自由溶液CE（FSCE）とは、分子上の電荷によって決定される種の電気泳動移動度の差および分子が移動中に遭遇する摩擦抵抗（多くの場合、分子のサイズに正比例する）に基づいている。キャピラリー等電点電気泳動（CIEF）は、弱イオン性両性分子がpH勾配で電気泳動によって分離され

ることを可能にする。C E Cは、伝統的な高速液体クロマトグラフィー（H P L C）とC Eとの間のハイブリッド技法である。

【0372】

本発明で使用される分離および精製技法は、当該技術分野で既知の任意のクロマトグラフィー手順を含む。クロマトグラフィーは、ある特定の分析物の示差的吸着および溶出または移動相と固定相との間での分析物の分配に基づき得る。クロマトグラフィーの異なる例としては、液体クロマトグラフィー（L C）、ガスクロマトグラフィー（G C）、高速液体クロマトグラフィー（H P L C）等が挙げられるが、これらに限定されない。

【0373】

X I．バイオマーカーポリペプチド

本発明の別の態様は、バイオマーカータンパク質およびその生物学的に活性な部分の使用に関する。一実施形態では、マーカーに対応する天然ポリペプチドは、標準のタンパク質精製技法を使用して適切な精製スキームによって細胞源または組織源から単離され得る。別の実施形態では、本発明のマーカーに対応するポリペプチドは、組換えDNA技法によって産生される。組換え発現の代替案として、本発明のマーカーに対応するポリペプチドは、標準のペプチド合成技法を使用して化学的に合成され得る。

【0374】

バイオマーカーポリペプチドの生物学的に活性な部分は、本明細書に記載のバイオマーカータンパク質アミノ酸配列と十分に同一であるか、またはそれに由来するアミノ酸配列を含むが、全長タンパク質よりも少ないアミノ酸を含み、対応する全長タンパク質の少なくとも1つの活性を呈するポリペプチドを含む。典型的には、生物学的に活性な部分は、対応するタンパク質の少なくとも1つの活性を有するドメインまたはモチーフを含む。本発明のタンパク質の生物学的に活性な部分は、例えば、10、25、50、100、またはそれ以上のアミノ酸長のポリペプチドであり得る。さらに、タンパク質の他の領域が欠失している他の生物学的に活性な部分は、組換え技法によって調製され、本発明のポリペプチドの天然形態の機能的活性のうちの1つ以上について評価され得る。

【0375】

好ましいポリペプチドは、本明細書に記載の核酸分子によってコードされるバイオマーカータンパク質のアミノ酸配列を有する。他の有用なタンパク質は、これらの配列のうちの1つと実質的に同一であり（例えば、少なくとも約40%、好ましくは50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、または99%）、対応する天然に存在するタンパク質のタンパク質の機能的活性を保持するが、天然対立遺伝子変異または突然変異誘発によりアミノ酸配列が異なる。

【0376】

2つのアミノ酸配列または2つの核酸の同一性パーセントを決定するために、配列が最適比較目的のためにアラインされる（例えば、第2のアミノ酸または核酸配列との最適アライメントのために第1のアミノ酸または核酸配列の配列にギャップが導入され得る）。その後、対応するアミノ酸位置またはヌクレオチド位置のアミノ酸残基またはヌクレオチドが比較される。第1の配列における位置が第2の配列における対応する位置と同じアミノ酸残基またはヌクレオチドによって占有されている場合、それらの分子はその位置で同一である。2つの配列間の同一性パーセントは、それらの配列によって共有される同一の位置の数の関数（すなわち、同一性% = 同一の位置の数 / 総位置数（例えば、重複している位置）× 100）である。一実施形態では、2つの配列は、同じ長さである。

【0377】

2つの配列間の同一性パーセントの決定は、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。2つの配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの好ましい非限定的な例は、K a r l i n a n d A l t s c h u l (1993) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 90:5873-5877にあるように修正されたK a r l i n a n d A l t s c h u l (1990) P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 87:22

10

20

30

40

50

64-2268のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410のNBLASTおよびXBLASTプログラムに組み込まれる。本発明の核酸分子と相同のヌクレオチド配列を得るために、BLASTヌクレオチド検索が、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12で行われ得る。本発明のタンパク質分子と相同のアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索が、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長=3で行われ得る。比較目的のためにギャップドアライメントを得るために、ギャップドBLASTがAltschul et al. (1997) Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402に記載されるように利用され得る。あるいは、PSI-Blastを使用して、分子間の距離関係を検出する反復検索を行うことができる。BLAST、ギャップドBLAST、およびPSI-Blastプログラムを利用する場合、それぞれのプログラム（例えば、XBLASTおよびNBLAST）のデフォルトパラメータが使用され得る。http://www.ncbi.nlm.nih.govを参照されたい。配列の比較に利用される数学的アルゴリズムの別の好ましい非限定的な例は、Myers and Miller, (1988) Comput Appl Biosci, 4: 11-7のアルゴリズムである。かかるアルゴリズムは、GCG配列アライメントソフトウェアパッケージの一部であるALIGNプログラム（バージョン2.0）に組み込まれる。アミノ酸配列を比較するためにALIGNプログラムを利用する場合、PAM120重み残基表、ギャップ長ペナルティ12、およびギャップペナルティ4が使用され得る。局所配列類似性およびアライメントの領域の特定に有用なさらに別のアルゴリズムは、Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 2444-2448に記載のFASTAアルゴリズムである。ヌクレオチドまたはアミノ酸配列を比較するためにFASTAアルゴリズムを使用する場合、例えば、PAM120重み残基表がk-タプル値2で使用され得る。

【0378】

2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップを許容してまたはギャップを許容することなく、上述の技法と同様の技法を使用して決定され得る。同一性パーセントを計算する際、正確な一致のみが計数される。

【0379】

本発明は、バイオマーカータンパク質に対応するキメラまたは融合タンパク質も提供する。本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、異種ポリペプチド（すなわち、マーカーに対応するポリペプチド以外のポリペプチド）に作動可能に連結された本発明のマーカーに対応するポリペプチドの全てまたは一部（好ましくは、生物学的に活性な部分）を含む。融合タンパク質において、「作動可能に連結される」という用語は、本発明のポリペプチドと異種ポリペプチドが互いにインフレームで融合していることを示すよう意図されている。異種ポリペプチドは、本発明のポリペプチドのアミノ末端またはカルボキシル末端に融合し得る。

【0380】

1つの有用な融合タンパク質は、本発明のマーカーに対応するポリペプチドがGST配列のカルボキシル末端に融合しているGST融合タンパク質である。かかる融合タンパク質は、本発明の組換えポリペプチドの精製を容易にし得る。

【0381】

別の実施形態では、融合タンパク質は、異種シグナル配列、免疫グロブリン融合タンパク質、毒素、または他の有用なタンパク質配列を含む。本発明のキメラおよび融合タンパク質は、標準的組換えDNA技法によって産生され得る。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含む従来の技法によって合成され得る。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、2つの連続した遺伝子断片間の相補的オーバーハングをもたらすアンカープライマーを使用して行われ得、その後、これがアニールおよび再増幅されて、キメラ遺伝子配列を生成することができる（例えば、Ausubel et al. (上記参照)を参照のこと）。さらに、融合部分（例えば、GSTポリペプチド）をすでにコードする多

くの発現ベクターが市販されている。本発明のポリペプチドをコードする核酸は、融合部分が本発明のポリペプチドにインフレームで連結されるように、かかる発現ベクターにクローニングされ得る。

【0382】

シグナル配列を使用して、分泌タンパク質または目的とする他のタンパク質の分泌および単離を容易にすることができる。シグナル配列は、典型的には、一般に1つ以上の切断事象において分泌中に成熟タンパク質から切断される疎水性アミノ酸のコアを特徴とする。かかるシグナルペプチドは、分泌経路を通過する際に成熟タンパク質からのシグナル配列の切断を可能にする処理部位を含む。したがって、本発明は、シグナル配列を有する記載のポリペプチド、ならびにシグナル配列がタンパク質分解的に切断されたポリペプチド（すなわち、切断産物）に関する。一実施形態では、シグナル配列をコードする核酸配列は、通常は分泌されないか、またはさもなければ単離が困難なタンパク質等の目的とするタンパク質に発現ベクター内で作動可能に連結され得る。シグナル配列は、発現ベクターが形質転換される真核宿主等からのタンパク質の分泌を指示し、シグナル配列がその後にはまたは同時に切断される。その後、タンパク質は、当該技術分野によって認識された方法によって細胞外培地から容易に精製され得る。あるいは、シグナル配列は、GSTドメイン等の精製を容易にする配列を使用して目的とするタンパク質に連結され得る。

【0383】

本発明は、本明細書に記載のバイオマーカーポリペプチドのバリエーションにも関する。かかるバリエーションは、アゴニスト（模倣物）またはアンタゴニストのいずれかとして機能し得る改変されたアミノ酸配列を有し得る。バリエーションは、突然変異誘発、例えば、離散点突然変異または切断によって生成され得る。アゴニストは、タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性と実質的に同じものまたはそのサブセットを保持し得る。タンパク質のアンタゴニストは、例えば、目的とするタンパク質を含む細胞シグナル伝達カスケードの下流または上流メンバーに競合的に結合することによって、タンパク質の天然に存在する形態の活性のうちの1つ以上を阻害し得る。したがって、特定の生物学的効果が限定された機能を有するバリエーションでの処理によって誘発され得る。タンパク質の天然に存在する形態の生物学的活性のサブセットを有するバリエーションでの対象の治療は、タンパク質の天然に存在する形態での治療と比較して対象におけるより少ない副作用を有し得る。

【0384】

アゴニスト（模倣物）またはアンタゴニストのいずれかとして機能するバイオマーカータンパク質のバリエーションは、本発明のタンパク質の突然変異体、例えば、切断突然変異体のコンビナトリアルライブラリをアゴニストまたはアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって特定され得る。一実施形態では、バリエーションの多様化ライブラリが核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発によって生成され、多様化遺伝子ライブラリによってコードされる。バリエーションの多様化ライブラリは、潜在的なタンパク質配列の縮重セットが個々のポリペプチドとしてまたはあるいはより大きい融合タンパク質のセットとして（例えば、ファージディスプレイ用に）発現可能であるように、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的にライゲートすることによって産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列から本発明のポリペプチドの潜在的なバリエーションのライブラリを産生するために使用され得る様々な方法が存在する。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当該技術分野で既知である（例えば、Narang, 1983, Tetrahedron 39:3、Itakura et al., 1984, Ann. Rev. Biochem. 53:323、Itakura et al., 1984, Science 198:1056、Ike et al., 1983 Nucleic Acid Res. 11:477を参照のこと）。

【0385】

加えて、本発明のマーカーに対応するポリペプチドのコーディング配列の断片のライブラリを使用して、バリエーションのスクリーニングおよびその後の選択のためのポリペプチドの多様化集団を生成することができる。例えば、コーディング配列断片のライブラリは、

ニッキングが1分子あたり約1回のみ生じる条件下で目的とするコーディング配列の二本鎖PCR断片をヌクレアーゼで処理し、二本鎖DNAを変性させ、DNAを復元して異なるニッキング産物由来のセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖DNAを形成し、S1ヌクレアーゼでの処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、結果として生じた断片ライブラリを発現ベクターにライゲートすることによって生成され得る。この方法により、目的とするタンパク質の様々なサイズのアミノ末端および内部断片をコードする発現ライブラリが得られ得る。

【0386】

点突然変異または切断によって作製されたコンビナトリアルライブラリの遺伝子産物をスクリーニングするための、かつ選択された特性を有する遺伝子産物についてcDNAライブラリをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該技術分野で既知である。大きい遺伝子ライブラリをスクリーニングするためのハイスループット分析に従う最も広く使用されている技法は、典型的には、遺伝子ライブラリを複製可能な発現ベクターにクローニングすることと、適切な細胞をベクターの結果として生じたライブラリで形質転換することと、所望の活性の検出が、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で、コンビナトリアル遺伝子を発現させることとを含む。ライブラリにおける機能的突然変異体の頻度を高める技法である再帰的アンサンブル突然変異誘発（REM）が、本発明のタンパク質のバリエーションを特定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせ使用され得る（Arkinn and Yourvan, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815、Delgrave et al., 1993, Protein Engineering 6(3):327-331）。

【0387】

表1に列記されるバイオマーカーまたはその断片を含む本発明の1つ以上のバイオマーカーに対応する単離されたポリペプチドまたはその断片（またはかかるポリペプチドをコードする核酸）は、当該技術分野で周知の方法に従ってポリクローナル抗体およびモノクローナル抗体を調製するための標準の技法を使用して、当該免疫原に結合する抗体を生成するために、免疫原として使用され得る。抗原ペプチドは、少なくとも8個のアミノ酸残基を含み、ペプチドに対して産生された抗体がそれぞれの全長分子と特異的免疫複合体を形成するように、それぞれの全長分子中に存在するエピトープを包含する。好ましくは、抗原ペプチドは、少なくとも10個のアミノ酸残基を含む。一実施形態では、かかるエピトープは、マウスまたはヒト等の1つの種由来の所与のポリペプチド分子に対して特異的であり得る（すなわち、種にわたって保存されていないポリペプチド分子の領域にわたる抗原ペプチドが免疫原として使用され、かかる保存されていない残基が本明細書に提供されるアライメント等のアライメントを使用して決定され得る）。

【0388】

一実施形態では、抗体は、HHLA2に実質的に特異的に結合し、例えば、それとHHLA2受容体（例えば、TMIGD2および／またはKIR3DL3）との相互作用を妨害することによってその機能を阻害または遮断する。別の実施形態では、抗体は、1つ以上のHHLA2受容体を実質的に特異的に結合し、例えば、それとHHLA2およびその受容体のうちの少なくとも1つとの相互作用を妨害することによってその機能を阻害または遮断する。

【0389】

例えば、ポリペプチド免疫原は、典型的には、好適な対象（例えば、ウサギ、ヤギ、マウス、ヒト化マウス、または他の哺乳動物）を免疫原で免疫化することによって抗体を調製するために使用される。適切な免疫原性調製物は、例えば、免疫応答が生成される組換え的に発現されたまたは化学的に合成された分子またはその断片を含み得る。この調製物は、フロインド完全もしくは不完全アジュバント等のアジュバント、または同様の免疫刺激剤をさらに含み得る。好適な対象の免疫原性調製物での免疫化により、内部に含まれる抗原ペプチドに対するポリクローナル抗体の応答が誘導される。

【0390】

ポリクローナル抗体は、好適な対象をポリペプチド免疫原で免疫化することによって上述のように調製され得る。免疫化された対象におけるポリペプチド抗体力価が、固定化ポリペプチドを使用した酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）等の標準の技法によって経時的に監視され得る。所望の場合、抗原に対して産生された抗体が哺乳動物から（例えば、血液から）単離され、タンパク質Aクロマトグラフィー等の周知の技法によってさらに精製されて、IgG画分を得ることができる。免疫化後の適切な時点で、例えば、抗体力価が最も高い時点で、抗体を産生する細胞を対象から得ることができ、それを使用して、ハイブリドーマ技法（Kohler and Milstein (1975) *Nature* 256: 495-497によって最初に説明された）（Brown et al. (1981) *J. Immunol.* 127: 539-46、Brown et al. (1980) *J. Biol. Chem.* 255: 4980-83、Yeh et al. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76: 2927-31、Yeh et al. (1982) *Int. J. Cancer* 29: 269-75も参照のこと）、より最近のヒトB細胞ハイブリドーマ技法（Kozbor et al. (1983) *Immunol. Today* 4: 72）、EBV-ハイブリドーマ技法（Cole et al. (1985) *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, Inc., pp. 77-96）、またはトリオーマ技法等の標準の技法によってモノクローナル抗体を調製する。モノクローナル抗体ハイブリドーマを産生するための技術が周知である（概して、Kenneth, R. H. in *Monoclonal Antibodies: A New Dimension In Biological Analyses*, Plenum Publishing Corp., New York, New York (1980)、Lerner, E. A. (1981) *Yale J. Biol. Med.* 54: 387-402、Gefter, M. L. et al. (1977) *Somatic Cell Genet.* 3: 231-36を参照のこと）。簡潔には、不死細胞株（典型的には、骨髄腫）が上述のように免疫原で免疫化された哺乳動物由来のリンパ球（典型的には、脾細胞）に融合し、結果として生じたハイブリドーマ細胞の培養上清がスクリーニングされて、ポリペプチド抗原に好ましくは特異的に結合するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが特定される。いくつかの実施形態では、免疫化は、目的とする標的抗原のノックアウトを有する（例えば、免疫化前に抗原を産生しない）細胞または動物宿主で行われる。

【0391】

リンパ球を不死化細胞株に融合させるために使用される多くの周知のプロトコルのうちのいずれか、表1に列記されるバイオマーカーを含む本発明の1つ以上のバイオマーカーまたはその断片に対するモノクローナル抗体を生成する目的のために適用され得る（例えば、Galfre, G. et al. (1977) *Nature* 266: 55052、Gefter et al. (1977)（上記参照）、Lerner (1981)（上記参照）、Kenneth (1980)（上記参照）を参照のこと）。さらに、当業者であれば、同様に有用であらうかか方法の多くの変形が存在することを理解する。典型的には、不死細胞株（例えば、骨髄腫細胞株）は、リンパ球と同じ哺乳類種に由来する。例えば、マウスハイブリドーマは、本発明の免疫原性調製物で免疫化されたマウス由来のリンパ球を不死化マウス細胞株に融合させることによって作製され得る。好ましい不死細胞株は、ヒポキサンチン、アミノプテリン、およびチミジンを含有する培養培地（「HAT培地」）に感受性のマウス骨髄腫細胞株である。例えば、P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653、またはSp2/O-Ag14骨髄腫株等のいくつかの骨髄腫細胞株のうちのいずれかが、標準の技法に従って融合パートナーとして使用され得る。これらの骨髄腫株は、American Type Culture Collection (ATCC) (Rockville, MD) から入手可能である。典型的には、HAT感受性マウス骨髄腫細胞は、ポリエチレングリコール（「PEG」）を使用してマウス脾細胞に融合する。その後、この融合から生じたハイブリドーマ細胞が、融合していない骨

10

20

30

40

50

髄腫細胞および非生産的に融合した骨髓腫細胞を死滅させるHAT培地を使用して選択される（融合していない脾細胞は形質転換されていないため、数日後に死ぬ）。本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマ細胞は、例えば、標準のELISAアッセイを使用して、ハイブリドーマ培養上清を所与のポリペプチドに結合する抗体についてスクリーニングすることによって検出される。

【0392】

モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマを調製する代替案として、上述のポリペプチドのうちの1つに特異的なモノクローナルは、組換えコンビナトリアル免疫グロブリンライブラリ（例えば、抗体ファージディスプレイライブラリ）を適切なポリペプチドでスクリーニングし、それにより、ポリペプチドに結合する免疫グロブリンライブラリメンバーを単離することによって特定および単離され得る。ファージディスプレイライブラリを生成およびスクリーニングするためのキットが市販されている（例えば、Pharmacia Recombinant Phage Antibody System（カタログ番号27-9400-01）、およびStratagene SurfZAP（商標）Phage Display Kit（カタログ番号240612））。加えて、抗体ディスプレイライブラリの生成およびスクリーニングにおける使用に特に従う方法および試薬の例は、例えば、Ladner et al.（米国特許第5,223,409号）、Kang et al.（国際公開第WO92/18619号）、Dower et al.（国際公開第WO91/17271号）、Winter et al.（国際公開第WO92/20791号）、Markland et al.（国際公開第WO92/15679号）、Breitling et al.（国際公開第WO93/01288号）、McCafferty et al.（国際公開第WO92/01047号）、Garrard et al.（国際公開第WO92/09690号）、Ladner et al.（国際公開第WO90/02809号）、Fuchs et al.（1991）Biotechnology（NY）9:1369-1372、Hay et al.（1992）Hum. Antibod. Hybridomas 3:81-85、Huse et al.（1989）Science 246:1275-1281、Griffiths et al.（1993）EMBO J. 12:725-734、Hawkins et al.（1992）J. Mol. Biol. 226:889-896、Clarkson et al.（1991）Nature 352:624-628、Gram et al.（1992）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:3576-3580、Garrard et al.（1991）Biotechnology（NY）9:1373-1377、Hoogenboom et al.（1991）Nucleic Acids Res. 19:4133-4137、Barbas et al.（1991）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7978-7982、およびMcCafferty et al.（1990）Nature 348:552-554で見つけることができる。

【0393】

非ヒト抗体またはヒト抗体（例えば、ラット抗マウス／抗ヒト抗体）の構造的特徴を使用して、HHLA2、HHLA2受容体、TMIGD2、および／またはKIR3DL3のうちの1つ以上への結合等の本発明の抗体の少なくとも1つの機能特性を保持する構造的に関連したヒト抗体を作製することができる。別の機能的特性には、競合ELISAアッセイにおける本来の既知の非ヒトまたはヒト抗体の結合の障害が含まれる。

【0394】

いくつかの実施形態では、可変ドメインが、本明細書に提示されるか、またはさもなければ公的に入手可能な重鎖可変ドメインCDRの群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖を含む、HHLA2、HHLA2受容体、TMIGD2、および／またはKIR3DL3のうちの1つ以上に結合し、かつそれを障害／遮断することができるモノクローナル抗体が提供され

る。

【0395】

同様に、可変ドメインが、本明細書に提示されるか、またはさもなければ公的に入手可能な軽鎖可変ドメインCDRの群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖を含む、HHLA2、HHLA2受容体、TMIGD2、および／またはKIR3DL3のうちの1つ以上に結合し、かつそれを阻害／遮断するモノクローナル抗体も提供される。

【0396】

可変ドメインが、本明細書に提示されるか、またはさもなければ公的に入手可能な重鎖可変ドメインCDRの群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む重鎖を含み、かつ可変ドメインが、本明細書に提示されるか、またはさもなければ公的に入手可能な軽鎖可変ドメインCDRの群と少なくとも80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、または100%同一の配列を有する少なくとも1つのCDRを含む軽鎖を含む、HHLA2、HHLA2受容体、TMIGD2、および／またはKIR3DL3のうちの1つ以上に結合し、かつそれを阻害／遮断することができるモノクローナル抗体も提供される。

【0397】

当業者であれば、かかる相同性パーセンテージが、所与のCDR内での1、2、3、4、5、6、7、8、9、10個、またはそれ以上の保存的アミノ酸置換と同等であり、その保存的アミノ酸置換を導入することによって達成され得ることに留意するであろう。

【0398】

加えて、完全ヒト抗体が、表1に列記されるバイオマーカーを含む本発明のバイオマーカーまたはその断片に対して作製され得る。完全ヒト抗体は、例えば、Hogan, et al., "Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual," Cold Spring Harbor Laboratoryに従って、ヒト免疫グロブリン遺伝子に対してトランスジェニックであるマウスに作製され得る。簡潔には、トランスジェニックマウスは、精製された免疫原で免疫化される。脾臓細胞が採取され、骨髄腫細胞に融合して、ハイブリドーマが産生される。ハイブリドーマは、免疫原に結合する抗体を産生するそれらの能力に基づいて選択される。完全ヒト抗体は、ヒトにおけるかかる抗体の免疫原性を低下させるであろう。

【0399】

一実施形態では、本発明で使用するための抗体は、二重特異性または多重特異性抗体である。二重特異性抗体は、単一の抗体ポリペプチド内に2つの異なる抗原に対する結合部位を有する。抗原結合は、同時または順次であり得る。トリオーマおよびハイブリッドハイブリドーマは、二重特異性抗体を分泌することができる細胞株の2つの例である。ハイブリッドハイブリドーマまたはトリオーマによって産生された二重特異性抗体の例は、米国特許第4,474,893号に開示されている。二重特異性抗体は、化学的手段 (Staerz et al. (1985) Nature 314:628およびPerez et al. (1985) Nature 316:354)、およびハイブリドーマ技術 (Staerz and Bevan (1986) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83:1453およびStaerz and Bevan (1986) Immunol. Today 7:241) によって構築されている。二重特異性抗体は、米国特許第5,959,084号にも記載されている。二重特異性抗体の断片は、米国特許第5,798,229号に記載されている。

【0400】

二重特異性薬剤は、異なる抗体を作製するハイブリドーマまたは他の細胞を融合させることによりヘテロハイブリドーマを作製し、その後、これらの両方の抗体を産生して共集

合させるクローンを特定することによっても生成され得る。それらは、完全免疫グロブリン鎖または F a b および F v 配列等のその一部の化学的または遺伝的コンジュゲーションによっても生成され得る。抗体成分は、表 1 に列記される 1 つ以上のバイオマーカーを含む本発明の 1 つ以上のバイオマーカーまたはその断片のポリペプチドまたはその断片に結合することができる。一実施形態では、二重特異性抗体は、ポリペプチドまたはその断片およびその天然結合パートナー（複数可）またはその断片（複数可）の両方に特異的に結合し得る。

【0401】

本発明の別の態様では、ペプチドまたはペプチド模倣物を使用して、表 1 に列記される 1 つ以上のバイオマーカーを含む本発明の 1 つ以上のバイオマーカーまたはその断片（複数可）の活性をアンタゴナイズすることができる。一実施形態では、それぞれの全長タンパク質の調節剤として機能する表 1 に列記される 1 つ以上のバイオマーカーのバリエーションは、突然変異体、例えば、切断突然変異体のコンビナトリアルライブラリをアンタゴニスト活性についてスクリーニングすることによって特定され得る。一実施形態では、バリエーションの多様化ライブラリが核酸レベルでのコンビナトリアル突然変異誘発によって生成され、多様化遺伝子ライブラリによってコードされる。バリエーションの多様化ライブラリは、潜在的なポリペプチド配列の縮重セットがポリペプチド配列のセットを内部に含む個々のポリペプチドとして発現可能であるように、例えば、合成オリゴヌクレオチドの混合物を遺伝子配列に酵素的にライゲートすることによって産生され得る。縮重オリゴヌクレオチド配列からポリペプチドバリエーションのライブラリを産生するために使用され得る様々な方法が存在する。縮重遺伝子配列の化学的合成が自動 DNA 合成機で行われ、その後、合成遺伝子が適切な発現ベクターにライゲートされ得る。遺伝子の縮重セットの使用により、1 つの混合物における、潜在的なポリペプチド配列の所望のセットをコードする配列の全ての提供が可能になる。縮重オリゴヌクレオチドを合成するための方法は当該技術分野で既知である（例えば、Narang, S. A. (1983) Tetrahedron 39:3、Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323、Itakura et al. (1984) Science 198:1056、Ike et al. (1983) Nucleic Acid Res. 11:477 を参照のこと。

【0402】

加えて、ポリペプチドコーディング配列の断片のライブラリを使用して、所与のポリペプチドのバリエーションのスクリーニングおよびその後の選択のためのポリペプチド断片の多様化集団を生成することができる。一実施形態では、コーディング配列断片のライブラリは、ニックングが 1 ポリペプチドあたり約 1 回のみ生じる条件下でポリペプチドコーディング配列の二本鎖 PCR 断片をヌクレアーゼで処理し、二本鎖 DNA を変性させ、DNA を復元して異なるニックング産物由来のセンス／アンチセンス対を含み得る二本鎖 DNA を形成し、S1 ヌクレアーゼでの処理により再形成された二本鎖から一本鎖部分を除去し、結果として生じた断片ライブラリを発現ベクターにライゲートすることによって生成され得る。この方法により、ポリペプチドの様々なサイズの N 末端、C 末端、および内部断片をコードする発現ライブラリが得られ得る。

【0403】

点突然変異または切断によって作製されたコンビナトリアルライブラリの遺伝子産物をスクリーニングするための、かつ選択された特性を有する遺伝子産物について cDNA ライブラリをスクリーニングするためのいくつかの技法が当該技術分野で既知である。かかる技法は、ポリペプチドのコンビナトリアル突然変異誘発によって生成された遺伝子ライブラリの迅速なスクリーニングに適応可能である。大きい遺伝子ライブラリをスクリーニングするためのハイスループット分析に従う最も広く使用されている技法は、典型的には、遺伝子ライブラリを複製可能な発現ベクターにクローニングすることと、適切な細胞をベクターの結果として生じたライブラリで形質転換することと、所望の活性の検出が、産物が検出された遺伝子をコードするベクターの単離を容易にする条件下で、コンビナトリ

アル遺伝子を発現させることを含む。ライブラリにおける機能的突然変異体の頻度を高める技法である再帰的アンサンブル突然変異誘発 (REM) が、目的とするバリエーションを特定するためのスクリーニングアッセイと組み合わせて使用され得る (Arkin and Youvan (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:7811-7815, Delagrave et al. (1993) Protein Eng. 6(3):327-331)。一実施形態では、細胞ベースのアッセイが、多様化ポリペプチドライブラリを分析するために利用され得る。例えば、発現ベクターのライブラリは、通常は表1に列記される1つ以上のバイオマーカーを含む本発明の1つ以上のバイオマーカーまたはその断片を合成する細胞株にトランスフェクトされ得る。その後、トランスフェクト細胞は、全長ポリペプチドおよび特定の突然変異体ポリペプチドが産生されるように培養され、細胞上清における全長ポリペプチド活性への突然変異体の発現の影響が、例えば、いくつかの機能的アッセイのうちのいずれかによって検出され得る。その後、プラスミドDNAが、全長ポリペプチド活性の阻害、またはあるいは増強をスコア化する細胞から回収され、個々のクローンがさらに特徴付けられ得る。

【0404】

ポリペプチドアミノ酸配列の1つ以上のアミノ酸の同じタイプのD-アミノ酸での系統的置換 (例えば、L-リジンの代わりにD-リジン) を使用して、より安定したペプチドを生成することができる。加えて、目的とするポリペプチドアミノ酸配列または実質的に同一の配列変形を含む制限ペプチドが、当該技術分野で既知の方法 (参照により本明細書に組み込まれる、Rizo and Gierasch (1992) Annu. Rev. Biochem. 61:387) によって、例えば、ペプチドを環化する分子内ジスルフィド架橋を形成することができる内部システイン残基を付加することによって生成され得る。

【0405】

本明細書に開示されるアミノ酸配列は、当業者がペプチド配列およびその配列バリエーションに対応するポリペプチドを産生することを可能にするであろう。かかるポリペプチドは、多くの場合、より大きいポリペプチドの一部として、ペプチド配列をコードするポリヌクレオチドの発現によって原核または真核宿主細胞中に産生され得る。あるいは、かかるペプチドは、化学的方法によって合成され得る。組換え宿主で異種タンパク質を発現させるための方法、ポリペプチドの化学的合成、およびインビトロ翻訳は、当該技術分野で周知であり、参照により本明細書に組み込まれる、Maniatis et al. Molecular Cloning: A Laboratory Manual (1989), 2nd Ed., Cold Spring Harbor, N.Y., Berger and Kimmel, Methods in Enzymology, Volume 152, Guide to Molecular Cloning Techniques (1987), Academic Press, Inc., San Diego, Calif., Merrifield, J. (1969) J. Am. Chem. Soc. 91:501, Chaiken I. M. (1981) CRC Crit. Rev. Biochem. 11:255, Kaiser et al. (1989) Science 243:187, Merrifield, B. (1986) Science 232:342, Kent, S. B. H. (1988) Annu. Rev. Biochem. 57:957, および Offord, R. E. (1980) Semisynthetic Proteins, Wiley Publishing にさらに記載されている。

【0406】

ペプチドは、典型的には、直接化学合成によって産生され得る。ペプチドは、非ペプチド部分がN末端および／またはC末端への共有結合的結合によって結合している修飾ペプチドとして産生され得る。ある特定の好ましい実施形態では、カルボキシ末端もしくはアミノ末端のいずれか、またはそれらの両方が、化学的に修飾されている。末端アミノ基および末端カルボキシル基の最も一般的な修飾は、それぞれ、アセチル化およびアミド化である。アシル化 (例えば、アセチル化) またはアルキル化 (例えば、メチル化) 等のアミノ末端修飾およびアミド化等のカルボキシ末端修飾、ならびに環化を含む他の末端修飾が

、本発明の様々な実施形態に組み込まれ得る。コア配列に対するある特定のアミノ末端修飾および／もしくはカルボキシ末端修飾ならびに／またはペプチド伸長により、増強された安定性、増加した効力および／または有効性、血清プロテアーゼに対する抵抗性、望ましい薬物動態学的特性等の有利な物理的、化学的、生化学的、および薬理学的特性が提供され得る。本明細書に開示されるペプチドは、例えば、患者における共刺激を改変することによって、疾患を治療するために治療的に使用され得る。

【0407】

ペプチド模倣薬（参照により本明細書に組み込まれる、Fauchere (1986) Adv. Drug Res. 15:29、Veber and Freidinger (1985) TINS p. 392、およびEvans et al. (1987) J. Med. Chem. 30:1229）は、通常、コンピュータ化された分子モデリングを用いて開発される。治療的に有用なペプチドと構造的に同様のペプチド模倣物を使用して、同等の治療または予防効果をもたらすことができる。一般に、ペプチド模倣薬は、パラダイムポリペプチド（すなわち、生物学的または薬理学的活性を有するポリペプチド）と構造的に同様であるが、当該技術分野で既知であり、かつ以下の参考文献：各々参照により本明細書に組み込まれる、Spatola, A. F. in "Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins" Weinstein, B., ed., Marcel Dekker, New York, p. 267 (1983)、Spatola, A. F., Vega Data (March 1983), Vol. 1, Issue 3, "Peptide Backbone Modifications" (一般概説)、Morley, J. S. (1980) Trends Pharm. Sci. pp. 463-468 (一般概説)、Hudson, D. et al. (1979) Int. J. Pept. Prot. Res. 14:177-185 (-CH₂NH-, CH₂CH₂-)、Spatola, A. F. et al. (1986) Life Sci. 38:1243-1249 (-CH₂-S)、Hann, M. M. (1982) J. Chem. Soc. Perkin Trans. I. 307-314 (-CH-CH-, シスおよびトランス)、Almquist, R. G. et al. (1990) J. Med. Chem. 23:1392-1398 (-COCH₂-)、Jennings-White, C. et al. (1982) Tetrahedron Lett. 23:2533 (-COCH₂-)、Szelke, M. et al. European Appln. EP 45665 (1982) CA:97:39405 (1982) (-CH(OH)CH₂-)、Holladay, M. W. et al. (1983) Tetrahedron Lett. (1983) 24:4401-4404 (-C(OH)CH₂-)、およびHruby, V. J. (1982) Life Sci. (1982) 31:189-199 (-CH₂-S-) にさらに記載される方法により、-CH₂NH-, -CH₂S-, -CH₂-CH₂-, -CH=CH- (シスおよびトランス)、-COCH₂-, -CH(OH)CH₂-, および-CH₂SO-からなる群から選択される結合によって任意に置き換えられる1つ以上のペプチド結合を有する。特に好ましい非ペプチド結合は、-CH₂NH-である。かかるペプチド模倣物は、例えば、より経済的な産生、より高い化学的安定性、増強された薬理学的特性（半減期、吸収、効力、有効性等）、改変された特異性（例えば、生物学的活性の広域スペクトル）、低下した抗原性等を含む、ポリペプチド実施形態に優る重大な利点を有し得る。ペプチド模倣薬の標識は、通常、定量的構造活性データおよび／または分子モデリングによって予測されるペプチド模倣薬上の非干渉位置（複数可）への1つ以上の標識の直接またはスペーサー（例えば、アミド基）を介した共有結合的結合を伴う。かかる非干渉位置は、概して、ペプチド模倣薬が結合して治療効果をもたらすマクロポリペプチド（複数可）との直接接触を形成しない位置である。ペプチド模倣薬の誘導体化（例えば、標識）は、ペプチド模倣薬の所望の生物学的または薬理学的活性に実質的に干渉してはならない。

【0408】

例えば、本明細書に記載のまたは表1に列記されるバイオマーカーとそれらの天然結合

10

20

30

40

50

パートナーとの間の相互作用を調節する（増強または阻害のいずれか）ことができる小分子も本発明によって包含される。本発明の小分子は、空間的にアドレス可能な並列固相または溶液相ライブラリ、デコンボリューションを必要とする合成ライブラリ法、「1ビーズ1化合物」ライブラリ法、および親和性クロマトグラフィー選択を使用した合成ライブラリ法を含む当該技術分野で既知のコンビナトリアルライブラリ方法における多数のアプローチのうちのいずれかを使用して得られ得る。（Lam, K. S. (1997) *Anticancer Drug Des.* 12:145）。

【0409】

分子ライブラリを合成するための方法の例は、当該技術分野で、例えば、DeWitt et al. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909、Erb et al. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422、Zuckermann et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:2678、Cho et al. (1993) *Science* 261:1303、Carrell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2059、Carell et al. (1994) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 33:2061、およびGallop et al. (1994) *J. Med. Chem.* 37:1233で見つけることができる。

【0410】

化合物のライブラリは、溶液中に（例えば、Houghten (1992) *Biotechniques* 13:412-421）、またはビーズ上に（Lam (1991) *Nature* 354:82-84）、チップ上に（Fodor (1993) *Nature* 364:555-556）、細菌上に（Ladner USP 5,223,409）、胞子上に（Ladner USP 5,223,409）、プラスミド上に（Cull et al. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869）、またはファージ上に（Scott and Smith (1990) *Science* 249:386-390）、（Devlin (1990) *Science* 249:404-406）、（Cwirla et al. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:6378-6382）、（Felici (1991) *J. Mol. Biol.* 222:301-310）、（Ladner（上記参照））提示され得る。化合物は、細胞ベースのアッセイまたは非細胞ベースのアッセイでスクリーニングされ得る。化合物は、プール中で（例えば、各試験試料中の複数の化合物）または個別の化合物としてスクリーニングされ得る。

【0411】

本発明は、表1に列記されるバイオマーカーを含む本発明のバイオマーカーまたはその断片のキメラまたは融合タンパク質にも関する。本明細書で使用される場合、「キメラタンパク質」または「融合タンパク質」は、それぞれのバイオマーカーと実質的に相同ではないタンパク質に対応するアミノ酸配列を有する別のポリペプチドに作動可能に連結された、表1に列記される1つ以上のバイオマーカーを含む本発明の1つ以上のバイオマーカーまたはその断片を含む。好ましい実施形態では、融合タンパク質は、表1に列記される1つ以上のバイオマーカーを含む本発明の1つ以上のバイオマーカーまたはその断片の少なくとも1つの生物学的に活性な部分を含む。融合タンパク質において、「作動可能に連結される」という用語は、融合から独立して発現されたときに呈される機能を保存する方法で、バイオマーカー配列および非バイオマーカー配列が互いにインフレームで融合していることを指すよう意図されている。「別の」配列が、それぞれ、バイオマーカー配列のN末端またはC末端に融合し得る。

【0412】

かかる融合タンパク質は、第1のペプチドをコードするヌクレオチド配列および第2のペプチドをコードするヌクレオチド配列の組換え発現によって産生され得る。第2のペプチドは、任意に、第1のペプチドの溶解度、親和性、安定性、または原子価を改変する部分、例えば、免疫グロブリン定常領域に対応し得る。別の好ましい実施形態では、第1の

ペプチドは、生物学的に活性な分子の一部（例えば、ポリペプチドの細胞外部分またはリガンド結合部分）からなる。第2のペプチドは、免疫グロブリン定常領域、例えば、ヒトC γ 1ドメインまたはC γ 4ドメイン（例えば、ヒトIgC γ 1またはヒトIgC γ 4のヒンジ、CH2、およびCH3領域、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、Capon et al. 米国特許第5,116,964号、同第5,580,756号、同第5,844,095号等を参照のこと）を含み得る。かかる定常領域は、エフェクター機能（例えばFc受容体結合）を媒介する領域を保持し得るか、またはエフェクター機能を低下させるように改変され得る。結果として生じた融合タンパク質は、独立して発現された第1のペプチドと比較して改変された溶解度、結合親和性、安定性、および／または原子価（すなわち、1ポリペプチドあたりの利用可能な結合部位の数）を有し得、タンパク質精製の効率を高め得る。組換え技法によって産生された融合タンパク質およびペプチドが分泌され、細胞とそのタンパク質またはペプチドを含有する培地との混合物から単離され得る。あるいは、タンパク質またはペプチドは、細胞質的に保持され、細胞が採取され、溶解し、タンパク質が単離され得る。細胞培養物は、典型的には、宿主細胞、培地、および他の副産物を含む。細胞培養に好適な培地は、当該技術分野で周知である。タンパク質およびペプチドは、タンパク質およびペプチドを精製するための当該技術分野で既知の技法を使用して、細胞培養培地、宿主細胞、またはそれらの両方から単離され得る。宿主細胞をトランスフェクトするための技法およびタンパク質およびペプチドを精製するための技法は、当該技術分野で既知である。

【0413】

好ましくは、本発明の融合タンパク質は、標準の組換えDNA技法によって産生される。例えば、異なるポリペプチド配列をコードするDNA断片が、従来の技法に従って、例えば、ライゲーションのための平滑末端化またはスタッガー末端化末端、適切な末端を提供するための制限酵素消化、適切な場合、付着末端の充填、望ましくない連結を回避するためのアルカリ性ホスファターゼ処理、および酵素的ライゲーションを用いて、一緒にインフレイムでライゲートされる。別の実施形態では、融合遺伝子は、自動DNA合成機を含む従来の技法によって合成され得る。あるいは、遺伝子断片のPCR増幅は、2つの連続した遺伝子断片間の相補的オーバーハングをもたらしアンカープライマーを使用して行われ得、その後、これがアニールおよび再増幅されて、キメラ遺伝子配列を生成することができる（例えば、Current Protocols in Molecular Biology, eds. Ausubel et al. John Wiley & Sons: 1992を参照のこと）。

【0414】

特に好ましいIg融合タンパク質は、免疫グロブリン定常領域（例えば、Fc領域）にカップリングされた表1に列記される1つ以上のバイオマーカーの細胞外ドメイン部分または可変領域様ドメインを含む。免疫グロブリン定常領域は、免疫グロブリン構造に固有のエフェクター活性を低減または排除する遺伝子修飾を含み得る。例えば、目的とするポリペプチドの細胞外部分をコードするDNAは、例えば、WO97/28267に教示される部位特異的突然変異誘発によって修飾されたヒトIgG γ 1および／またはIgG γ 4のヒンジ、CH2、およびCH3領域をコードするDNAに連結され得る。

【0415】

別の実施形態では、融合タンパク質は、そのN末端に異種シグナル配列を含む。ある特定の宿主細胞（例えば、哺乳類宿主細胞）において、ポリペプチドの発現および／または分泌が異種シグナル配列の使用により増加し得る。

【0416】

本発明の融合タンパク質を免疫原として使用して、対象に抗体を産生することができる。かかる抗体は、融合タンパク質が生成されたそれぞれの天然ポリペプチドを精製するために使用され得るか、またはスクリーニングアッセイにおいて1つ以上のバイオマーカーポリペプチドまたはその断片とその天然結合パートナー（複数可）またはその断片（複数可）との間の相互作用を阻害するポリペプチドを特定するために使用され得る。

【0417】

本明細書に記載の調節剤（例えば、抗体、小分子、ペプチド、融合タンパク質、または小核酸）が薬学的組成物に組み込まれ、インビボで対象に投与され得る。本組成物は、単一のかかる分子もしくは薬剤または本明細書に記載の薬剤の任意の組み合わせを含み得る。本明細書に記載の「単一の活性薬剤」は、本明細書に提供される方法および組成物による当該技術分野で既知の他の薬理学的に活性な化合物（「第2の活性薬剤」）と組み合わせられ得る。

【0418】

本明細書に記載のバイオマーカー核酸および／またはバイオマーカーポリペプチド分子の産生および使用は、標準の組換え技法を使用することによって容易になり得る。いくつかの実施形態では、かかる技法は、バイオマーカーポリペプチドまたはかかるポリペプチドの一部をコードする核酸を含むベクター、好ましくは発現ベクターを使用する。本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、連結されている別の核酸を輸送することができる核酸分子を指す。1つの種類のベクターは、追加のDNAセグメントがライゲートされ得る環状二本鎖DNAループを指す「プラスミド」である。別の種類のベクターは、追加のDNAセグメントがウイルスゲノムにライゲートされ得るウイルスベクターである。ある特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製することができる（例えば、細菌性複製起源を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳類ベクター）。他のベクター（例えば、非エピソード哺乳類ベクター）は、宿主細胞への導入時に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、それにより、宿主ゲノムとともに複製される。さらに、ある特定のベクター、すなわち、発現ベクターは、それらが作動可能に連結される遺伝子の発現を指示することができる。一般に、組換えDNA技法で有用な発現ベクターは、多くの場合、プラスミド（ベクター）の形態である。しかしながら、本発明は、ウイルスベクター（例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス、およびアデノ随伴ウイルス）等の同等の機能を果たす発現ベクターの他の形態を含むよう意図されている。

【0419】

本発明の組換え発現ベクターは、宿主細胞での核酸の発現に好適な形態で本発明の核酸を含む。これは、組換え発現ベクターが、発現される核酸配列に作動可能に連結される、発現に使用される宿主細胞に基づいて選択される1つ以上の制御配列を含むことを意味する。組換え発現ベクターにおいて、「作動可能に連結される」とは、目的とするヌクレオチド配列が、（例えば、インビトロ転写／翻訳系での、またはベクターが宿主細胞に導入される場合は宿主細胞での）ヌクレオチド配列の発現を可能にする様式で制御配列（複数可）に連結されることを意味するよう意図されている。「制御配列」という用語は、プロモーター、エンハンサー、および他の発現対照要素（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含むよう意図されている。かかる制御配列は、例えば、Goeddel, Method in Enzymology: Gene Expression Technology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA (1991)に記載されている。制御配列には、多くの種類の宿主細胞でのヌクレオチド配列の構成的発現を指示するものおよびある特定の宿主細胞のみでのヌクレオチド配列の発現を指示するもの（例えば、組織特異的制御配列）が含まれる。当業者であれば、発現ベクターの設計が、形質転換される宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現レベル等の因子に依存し得ることを理解するであろう。本発明の発現ベクターが宿主細胞に導入され、それにより、本明細書に記載の核酸によってコードされる融合タンパク質またはペプチドを含むタンパク質またはペプチドを産生することができる。

【0420】

本発明における使用のための組換え発現ベクターは、原核（例えば、E. coli）または真核細胞（例えば、昆虫細胞 {バキュロウイルス発現ベクターを使用}、酵母細胞、または哺乳類細胞）での本発明のマーカーに対応するポリペプチドの発現のために設計され得る。好適な宿主細胞は、Goeddel（上記参照）に詳述されている。あるいは、組換え発現ベクターは、例えば、T7プロモーター制御配列およびT7ポリメラーゼを使

用して、インビトロで転写および翻訳され得る。

【0421】

原核生物でのタンパク質の発現は、多くの場合、融合タンパク質または非融合タンパク質のいずれかの発現を指示する構成的または誘導性プロモーターを含むベクターを用いて *E. coli* で行われる。融合ベクターは、いくつかのアミノ酸をそれにコードされるタンパク質に、通常、組換えタンパク質のアミノ末端に付加する。かかる融合ベクターは、典型的には、1) 組換えタンパク質の発現を増加させる、2) 組換えタンパク質の溶解度を増加させる、および3) 親和性精製においてリガンドとして作用することによって組換えタンパク質の精製を助けるという3つの目的を果たす。多くの場合、融合発現ベクターにおいて、タンパク質分解的切断部位が融合部分と組換えタンパク質との接合部に導入されて、融合タンパク質の精製後に融合部分からの組換えタンパク質の分離を可能にする。かかる酵素、およびそれらの同族認識配列には、第Xa因子、トロンビン、およびエンテロキナーゼが含まれる。典型的な融合発現ベクターには、それぞれ、グルタチオンS-トランスフェラーゼ (GST)、マルトースE結合タンパク質、またはタンパク質Aを標的組換えタンパク質に融合させる、pGEX (Pharmacia Biotech Inc、Smith and Johnson, 1988, Gene 67:31-40)、pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA)、およびpRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ) が含まれる。

10

【0422】

好適な誘導性非融合 *E. coli* 発現ベクターの例には、pTrc (Amann et al., 1988, Gene 69:301-315) およびpET 11d (Studier et al., p. 60-89, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1991) が挙げられる。pTrcベクターからの標的バイオマーカー核酸発現は、ハイブリッドtrp-lac融合プロモーターからの宿主RNAポリメラーゼ転写に依存する。pET 11dベクターからの標的バイオマーカー核酸発現は、共発現されたウイルスRNAポリメラーゼ (T7 gn1) によって媒介されたT7 gn10-lac融合プロモーターからの転写に依存する。このウイルスポリメラーゼは、lacUV 5プロモーターの転写制御下でT7 gn1遺伝子を保有する常在性プロファージ由来の宿主株BL21 (DE3) またはHMS174 (DE3) によって供給される。

20

30

【0423】

E. coli での組換えタンパク質発現を最大化するための1つの戦略は、組換えタンパク質をタンパク質分解的に切断する能力が損なわれた宿主細菌でタンパク質を発現することである (Gottesman, p. 119-128, In Gene Expression Technology: Methods in Enzymology vol. 185, Academic Press, San Diego, CA, 1990)。別の戦略は、各アミノ酸の個々のコドンが *E. coli* で優先的に利用されるものになるように発現ベクターに挿入される核酸の核酸配列を改変することである (Wada et al., 1992, Nucleic Acids Res. 20:2111-2118)。本発明の核酸配列のかかる改変は、標準のDNA合成技法によって行われ得る。

40

【0424】

別の実施形態では、発現ベクターは、酵母発現ベクターである。酵母 *S. cerevisiae* での発現のためのベクターの例には、pYepSec1 (Baldari et al., 1987, EMBO J. 6:229-234)、pMFa (Kurjan and Herskowitz, 1982, Cell 30:933-943)、pJRY88 (Schultz et al., 1987, Gene 54:113-123)、pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA)、およびpPicZ (Invitrogen Corp, San Diego, CA) が挙げられる。

50

【0425】

あるいは、発現ベクターは、バキュロウイルス発現ベクターである。昆虫培養細胞（例えば、Sf 9細胞）でのタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターには、pAc系列（Smith et al., 1983, Mol. Cell Biol. 3: 2156-2165）およびpVL系列（Lucklow and Summers, 1989, Virology 170: 31-39）が含まれる。

【0426】

さらに別の実施形態では、本発明の核酸は、哺乳類発現ベクターを使用して哺乳類細胞で発現される。哺乳類発現ベクターの例には、pCDM8（Seed, 1987, Nature 329: 840）およびpMT2PC（Kaufman et al., 1987, EMBO J. 6: 187-195）が挙げられる。哺乳類細胞で使用される場合、発現ベクターの制御機能は、多くの場合、ウイルス制御要素によって提供される。例えば、一般に使用されているプロモーターは、ポリオマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス、およびシミアンウイルス40に由来する。原核細胞および真核細胞の両方に好適な他の発現系については、Sambrook et al.（上記参照）の第16章および第17章を参照されたい。

【0427】

別の実施形態では、組換え哺乳類発現ベクターは、特定の細胞型で優先的に核酸の発現を指示することができる（例えば、組織特異的制御要素を使用して核酸を発現させる）。組織特異的制御要素は、当該技術分野で既知である。好適な組織特異的プロモーターの非限定的な例には、アルブミンプロモーター（肝臓特異的、Pinkert et al., 1987, Genes Dev. 1: 268-277）、リンパ系特異的プロモーター（Calame and Eaton, 1988, Adv. Immunol. 43: 235-275）、具体的にはT細胞受容体プロモーター（Winoto and Baltimore, 1989, EMBO J. 8: 729-733）および免疫グロブリンプロモーター（Banerji et al., 1983, Cell 33: 729-740、Queen and Baltimore, 1983, Cell 33: 741-748）、ニューロン特異的プロモーター（例えば、ニューロフィラメントプロモーター、Byrne and Ruddie, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 5473-5477）、膵臓特異的プロモーター（Edlund et al., 1985, Science 230: 912-916）、ならびに乳腺特異的プロモーター（例えば、乳清プロモーター、米国特許第4, 873, 316号および欧州出願公開第264, 166号）が挙げられる。発生的に制御されたプロモーター、例えば、マウスhoxプロモーター（Kessel and Gruss, 1990, Science 249: 374-379）およびα-フェトプロテインプロモーター（Camper and Tilghman, 1989, Genes Dev. 3: 537-546）も包含される。

【0428】

本発明は、アンチセンス配向で発現ベクターにクローニングされたDNA分子を含む組換え発現ベクターをさらに提供する。すなわち、DNA分子は、本発明のポリペプチドをコードするmRNAに対してアンチセンスであるRNA分子の（DNA分子の転写による）発現を可能にする様式で制御配列に作動可能に連結される。様々な細胞型でのアンチセンスRNA分子の連続発現を指示する、アンチセンス配向でクローニングされた核酸に作動可能に連結された制御配列、例えば、ウイルスプロモーターおよび／またはエンハンサーが選択され得るか、またはアンチセンスRNAの構成的、組織特異的、もしくは細胞型特異的発現を指示する制御配列が選択され得る。アンチセンス発現ベクターは、組換えプラスミド、ファージミド、または弱毒化ウイルスの形態であり得、そこで、アンチセンス核酸が高効率制御領域の制御下で産生され、その活性が、ベクターが導入される細胞型によって決定され得る。アンチセンス遺伝子を使用した遺伝子発現の制御の考察については、（Weintraub et al., 1986, Trends in Genetics, Vol. 1 (1)）を参照されたい。

10

20

30

40

50

【0429】

本発明の別の態様は、本発明の組換え発現ベクターが導入された宿主細胞に関する。「宿主細胞」および「組換え宿主細胞」という用語は、本明細書で同義に使用される。かかる用語が特定の対象細胞のみならず、かかる細胞の子孫または潜在的な子孫も指すことが理解される。突然変異または環境影響のいずれかによりある特定の修飾が後世で生じ得るため、かかる子孫は実際には親細胞と同一ではない場合があるが、依然として本明細書で使用される本用語の範囲内に含まれる。

【0430】

宿主細胞は、任意の原核（例えば、*E. coli*）細胞または真核細胞（例えば、昆虫細胞、酵母、もしくは哺乳類細胞）であり得る。

【0431】

ベクターDNAは、従来の形質転換またはトランスフェクション技法によって原核または真核細胞に導入され得る。本明細書で使用される場合、「形質転換」および「トランスフェクション」という用語は、リン酸カルシウムもしくは塩化カルシウム共沈、DEAE-デキストラン媒介性トランスフェクション、リポフェクション、または電気穿孔を含む、外来核酸を宿主細胞に導入するための様々な当該技術分野で認識されている技法を指すよう意図されている。宿主細胞の形質転換またはトランスフェクションに好適な方法は、Sambrook, et al.（（上記参照））および他の研究室マニュアルで見つけることができる。

【0432】

哺乳類細胞の安定したトランスフェクションのために、使用される発現ベクターおよびトランスフェクション技法に応じて、わずかな細胞のみが外来DNAをそれらのゲノムに組み込むことができることが既知である。これらの組み込み体を特定および選択するために、一般に、（例えば、抗生物質に対する抵抗性のための）選択可能なマーカーをコードする遺伝子が目的とする遺伝子とともに宿主細胞に導入される。好ましい選択可能なマーカーには、G418、ハイグロマイシン、およびメトトレキサート等の薬物に対する抵抗性を付与するものが含まれる。導入された核酸で安定してトランスフェクトされた細胞は、薬物選択によって特定され得る（例えば、選択可能なマーカー遺伝子を組み込んだ細胞が生存する一方で、他の細胞は死ぬ）。

【0433】

XII. バイオマーカー核酸およびポリペプチドの分析

バイオマーカー核酸および／またはバイオマーカーポリペプチドは、本明細書に記載の方法および当業者に既知の技法に従って分析されて、1) バイオマーカー転写物またはポリペプチドのレベルの改変、2) バイオマーカー遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの欠失または付加、4) バイオマーカー遺伝子の1つ以上のヌクレオチドの置換、5) 発現制御領域等のバイオマーカー遺伝子の異常な修飾を含むが、これらに限定されない、本発明に有用な遺伝子改変または発現改変を特定することができる。

【0434】

a. コピー数を検出するための方法

バイオマーカー核酸のコピー数を評価する方法は、当業者に周知である。染色体獲得または喪失の存在または不在は、単に本明細書で特定された領域またはマーカーのコピー数を決定することによって評価され得る。

【0435】

一実施形態では、生体試料は、ゲノムマーカーを含むゲノム遺伝子座のコピー数変化の存在について試験される。少なくとも3、4、5、6、7、8、9、または10のコピー数が抗HHLA2抗体療法のより不良な転帰を予測する。

【0436】

バイオマーカー遺伝子座のコピー数を評価する方法には、ハイブリダイゼーションベースのアッセイが含まれるが、これに限定されない。ハイブリダイゼーションベースのアッセイには、伝統的な「直接プローブ」法、例えば、サザンブロット、インサイツハイブリ

10

20

30

40

50

ダイゼーション（例えば、FISHおよびFISHプラスSKY）法、および「比較プローブ」法、例えば、比較ゲノムハイブリダイゼーション（CGH）、例えば、cDNAベースまたはオリゴヌクレオチドベースのCGHが含まれるが、これらに限定されない。これらの方法は、基質（例えば、膜もしくはガラス）結合方法またはアレイベースのアプローチを含むが、これらに限定されない多種多様の形式で使用され得る。

【0437】

一実施形態では、試料中のバイオマーカー遺伝子のコピー数の評価は、サザンブロットを伴う。サザンブロットでは、ゲノムDNA（典型的には、電気泳動ゲル上で断片および分離されたもの）が標的領域に特異的なプローブにハイブリダイズされる。標的領域に対するプローブからのハイブリダイゼーションシグナルと、正常ゲノムDNA（例えば、同じまたは関連細胞、組織、臓器等の非増幅部分）の分析からの対照プローブシグナルとの強度の比較により、標的核酸の相対コピー数の推定値が提供される。あるいは、試料中のコード核酸のコピー数を評価するためにノーザンブロットが利用され得る。ノーザンブロットでは、mRNAが標的領域に特異的なプローブにハイブリダイズされる。標的領域に対するプローブからのハイブリダイゼーションシグナルと、正常RNA（例えば、同じまたは関連細胞、組織、臓器等の非増幅部分）の分析からの対照プローブシグナルとの強度の比較により、標的核酸の相対コピー数の推定値が提供される。あるいは、適切な対照（例えば、同じまたは関連細胞組織、臓器等の非増幅部分）と比較してより高いまたはより低い発現により、標的核酸の相対コピー数の推定値が提供されるように、RNAを検出するための当該技術分野で周知の他の方法が使用され得る。

【0438】

ゲノムコピー数を決定するための代替手段は、インサイチュハイブリダイゼーション（例えば、Angerer（1987）Meth. Enzymol 152:649）である。一般に、インサイチュハイブリダイゼーションは、以下のステップ：（1）分析される組織または生物学的構造の固定、（2）標的DNAのアクセス可能性を高め、かつ非特異的結合を減少させるための生物学的構造のプレハイブリダイゼーション処理、（3）生物学的構造または組織における核酸混合物の核酸へのハイブリダイゼーション、（4）ハイブリダイゼーションで結合しなかった核酸断片を除去するためのポストハイブリダイゼーション洗浄、および（5）ハイブリダイズされた核酸断片の検出を含む。これらのステップの各々で使用される試薬および使用条件は、特定の用途に応じて異なる。典型的なインサイチュハイブリダイゼーションアッセイでは、細胞が、固体支持体、典型的には、スライドガラスに固定される。核酸がプローブされる場合、細胞は、典型的には、熱またはアルカリで変性される。その後、これらの細胞は適度な温度でハイブリダイゼーション溶液と接触して、タンパク質をコードする核酸配列に特異的な標識プローブのアニールングを可能にする。その後、標的（例えば、細胞）は、典型的には、適切なシグナル対ノイズ比が得られるまで所定のストリンジェンシーでまたは増加するストリンジェンシーで洗浄される。プローブは、典型的には、例えば、放射性同位体または蛍光レポーターで標識される。一実施形態では、プローブは、ストリンジェントな条件下で標的核酸（複数可）と特異的にハイブリダイズするのに十分に長い。プローブは、一般に、約200塩基長〜約1000塩基長の範囲である。いくつかの用途では、反復配列のハイブリダイゼーション能力を阻止することが必要である。したがって、いくつかの実施形態では、非特異的ハイブリダイゼーションを阻止するために、tRNA、ヒトゲノムDNA、またはCot-1 DNAが使用される。

【0439】

ゲノムコピー数を決定するための代替手段は、比較ゲノムハイブリダイゼーションである。一般に、ゲノムDNAは、正常参照細胞および試験細胞（例えば、腫瘍細胞）から単離され、必要に応じて増幅される。これらの2つの核酸は、差次的に標識され、その後、参照細胞の分裂中期の染色体にインサイチュでハイブリダイズされる。参照DNAおよび試験DNAの両方の反復配列は、ある手段によって、例えば、適切な遮断核酸とのプレハイブリダイゼーションによって、かつ／または当該ハイブリダイゼーション中に当該反復

配列に対するかかる遮断核酸配列を含むことによって除去されるか、またはそれらのハイブリダイゼーション能力が低下するかのいずれかである。その後、結合した標識DNA配列は、必要に応じて、視覚可能な形態にされる。コピー数が増加または減少した試験細胞における染色体領域は、2つのDNAからのシグナル比が変化する領域を検出することによって特定され得る。例えば、試験細胞におけるコピー数が減少した領域は、ゲノムの他の領域と比較して参照よりも試験DNAから比較的より低いシグナルを示すであろう。試験細胞におけるコピー数が増加した領域は、試験DNAから比較的より高いシグナルを示すであろう。染色体の欠失または増倍が存在する場合、2つの標識からのシグナルの比率の差が検出され、この比率により、コピー数の尺度が提供される。CGHの別の実施形態であるアレイCGH (aCGH) では、固定化された染色体要素がアレイ上の一群の固体支持体に結合した標的核酸で置き換えられ、ゲノムの大部分または全てが一群の固体支持体に結合した標的に表されることを可能にする。標的核酸は、cDNA、ゲノムDNA、オリゴヌクレオチド (例えば、単一ヌクレオチド多型を検出するため) 等を含み得る。アレイベースのCGHは、(対照および可能な腫瘍試料を2つの異なる色素で標識し、ハイブリダイゼーション前にそれらを混合し、それにより、アレイ上のプローブの競合的ハイブリダイゼーションに起因する比率がもたらされることとは対照的に) 単色標識で行われる場合もある。単色CGHでは、対照が標識され、1つのアレイにハイブリダイズされ、絶対シグナルが読み取られ、可能な腫瘍試料が標識され、第2のアレイ (同一の含有量) にハイブリダイズされ、絶対シグナルが読み取られる。コピー数の差が2つのアレイからの絶対シグナルに基づいて計算される。固定化された染色体またはアレイを調製する方法および比較ゲノムハイブリダイゼーションを行う方法は、当該技術分野で周知である (例えば、米国特許第6,335,167号、同第6,197,501号、同第5,830,645号、および同第5,665,549号、ならびにAlbertson (1984) EMBO J. 3:1227-1234、Pinkel (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:9138-9142、欧州特許庁公開第430,402号、Methods in Molecular Biology, Vol. 33: In situ Hybridization Protocols, Choo, ed., Humana Press, Totowa, N. J. (1994) 等を参照のこと)。別の実施形態では、Pinkel, et al. (1998) Nature Genetics 20:207-211またはKallioniemi (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:5321-5325 (1992) のハイブリダイゼーションプロトコルが使用される。

【0440】

なお別の実施形態では、増幅ベースのアッセイを使用して、コピー数を測定することができる。かかる増幅ベースのアッセイでは、核酸配列は、増幅反応 (例えば、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) において鋳型としての機能を果たす。定量的増幅では、増幅産物の量は、元の試料中の鋳型の量に比例するであろう。適切な対照、例えば、健常組織との比較により、コピー数の尺度が提供される。

【0441】

「定量的」増幅法は、当業者に周知である。例えば、定量的PCRは、同じプライマーを使用して既知の量の対照配列を同時に共増幅することを含む。これにより、PCR反応を較正するために使用され得る内部標準が提供される。定量的PCRの詳細なプロトコルは、Innis, et al. (1990) PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications, Academic Press, Inc. N. Y.) に提供されている。定量的PCR分析を使用したマイクロサテライト遺伝子座でのDNAコピー数の測定は、Ginzinger, et al. (2000) Cancer Research 60:5405-5409に記載されている。遺伝子の既知の核酸配列は、当業者が遺伝子の任意の部分を増幅するためにプライマーを通例的に選択することを可能にするのに十分である。蛍光発生的定量的PCRも本発明の方法で使用され得る。蛍光発生的定量的PCRでは、定量は、蛍光シグナル、例えば、Taq

ManおよびSYBRグリーンの量に基づいている。

【0442】

他の好適な増幅法には、リガーゼ連鎖反応（LCR）（Wu and Wallace (1989) Genomics 4:560、Landegren, et al. (1988) Science 241:1077、およびBarringer et al. (1990) Gene 89:117を参照のこと）、転写増幅（Kwoh, et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173）、自己持続配列複製（Guatelli, et al. (1990) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 87:1874）、ドットPCR、およびリンカーアダプターPCR等が含まれるが、これらに限定されない。

10

【0443】

ヘテロ接合性の喪失（LOH）および主要コピー比率（MCP）マッピング（Wang, Z. C., et al. (2004) Cancer Res 64(1):64-71、Seymour, A. B., et al. (1994) Cancer Res 54, 2761-4、Hahn, S. A., et al. (1995) Cancer Res 55, 4670-5、Kimura, M., et al. (1996) Genes Chromosomes Cancer 17, 88-93、Li et al., (2008) MBC Bioinform. 9, 204-219）も、増幅または欠失の領域を特定するために使用され得る。

20

【0444】

b. バイオマーカー核酸発現を検出するための方法

バイオマーカー発現は、転写分子またはタンパク質の発現を検出するための多種多様の周知の方法のうちのいずれかによって評価され得る。かかる方法の非限定的な例には、分泌タンパク質、細胞表面タンパク質、細胞質タンパク質、または核タンパク質を検出するための免疫学的方法、タンパク質精製法、タンパク質機能または活性アッセイ、核酸ハイブリダイゼーション法、核酸逆転写法、および核酸増幅法が挙げられる。

【0445】

好ましい実施形態では、特定の遺伝子の活性は、遺伝子転写物（例えば、mRNA）の尺度、翻訳されたタンパク質の量の尺度、または遺伝子産物活性の尺度によって特徴付けられる。マーカー発現は、mRNAレベル、タンパク質レベル、またはタンパク質活性（これらはいずれも標準の技法を使用して測定され得る）を検出することを含む様々な方法で監視され得る。検出は、遺伝子発現（例えば、ゲノムDNA、cDNA、mRNA、タンパク質、または酵素活性）レベルの定量化を含むか、またはあるいは、具体的には対照レベルと比較した遺伝子発現レベルの質的評価であり得る。検出されるレベルのタイプは、文脈から明らかであろう。

30

【0446】

別の実施形態では、バイオマーカーおよびその機能的に同様の相同体（その断片または遺伝子改変を含む）の（例えば、その制御領域またはプロモーター領域における）発現レベルの検出または決定は、目的とするマーカーのRNAレベルを検出または決定することを含む。一実施形態では、1つ以上の細胞が試験される対象から得られ、その細胞からRNAが単離される。好ましい実施形態では、乳房組織細胞の試料が対象から得られる。

40

【0447】

一実施形態では、RNAは、単一細胞から得られる。例えば、細胞は、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション（LCM）によって組織試料から単離され得る。この技法を使用して、細胞が、染色された組織切片を含む組織切片から単離され、それにより、所望の細胞が単離されることを確実にすることができる（例えば、Bonner et al. (1997) Science 278:1481、Emmert-Buck et al. (1996) Science 274:998、Fend et al. (1999) Am. J. Path. 154:61、およびMurakami et al. (2000) Kidney Int. 58:1346を参照のこと）。例えば、Murakami et

50

a l. (上記参照) は、事前に免疫染色された組織切片からの細胞の単離について説明している。

【0448】

対象から細胞を得て、その細胞をインビトロで培養すること、例えば、RNAが抽出され得るより大きい細胞集団を得ることも可能である。非形質転換細胞の培養物、すなわち、初代細胞培養物を確立するための方法が当該技術分野で既知である。

【0449】

個体由来の組織試料または細胞からRNAを単離する際に、組織または細胞が対象から除去された後に遺伝子発現のいかなるさらなる変化も阻止することが重要であり得る。発現レベルの変化は、攪乱後に、例えば、熱ショックまたはリポ多糖 (LPS) もしくは他の試薬での活性化後に急速に変化することが知られている。加えて、組織および細胞中のRNAは、急速に分解し得る。したがって、好ましい実施形態では、対象から得られた組織または細胞は、可能な限り迅速に瞬間凍結される。

【0450】

RNAは、様々な方法、例えば、チオシアン酸グアニジウム溶解に続くCsCl遠心分離によって組織試料から抽出され得る (Chirgwin et al., 1979, Biochemistry 18:5294-5299)。単一細胞由来のRNAは、例えば、Dulac, C. (1998) Curr. Top. Dev. Biol. 36, 245およびJena et al. (1996) J. Immunol. Methods 190:199に記載の単一細胞からcDNAライブラリを調製するための方法に記載されるように得られ得る。例えば、RNAsinの包含により、RNA分解を回避するために注意を払われなければならない。

【0451】

その後、RNA試料は、特定の種で濃縮され得る。一実施形態では、ポリ(A)+RNAがRNA試料から単離される。一般に、かかる精製は、mRNA上のポリ-A尾部を利用する。具体的には、上述のように、ポリ-Tオリゴヌクレオチドは、固体支持体内に固定化されて、mRNAに対する親和性リガンドとしての機能を果たし得る。この目的のためのキット、例えば、MessageMakerキット (Life Technologies, Grand Island, NY) が市販されている。

【0452】

好ましい実施形態では、RNA集団は、マーカー配列で濃縮される。濃縮は、例えば、プライマー特異的cDNA合成によって、またはcDNA合成および鋳型特異的インビトロ転写に基づく複数回の線形増幅によって行われ得る (例えば、Wang et al. (1989) PNAS 86, 9717, Dulac et al. (上記参照)、およびJena et al. (上記参照) を参照のこと)。

【0453】

特定の種または配列で濃縮されたRNA集団または濃縮されていないRNA集団がさらに増幅され得る。本明細書で定義される場合、「増幅プロセス」は、RNA中の分子を強化するか、増加させるか、または増大させるように設計されている。例えば、RNAがmRNAである場合、シグナルが検出可能であるか、または検出が増強されるように、RT-PCR等の増幅プロセスが利用されて、mRNAを増幅することができる。かかる増幅プロセスは、特に生体試料、組織試料、または腫瘍試料のサイズまたは体積が小さい場合に有益である。

【0454】

様々な増幅法および検出法が使用され得る。例えば、mRNAのcDNAへの逆転写に続くポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR)、または米国特許第5,322,770号に記載される両ステップでの単一の酵素の使用、またはR. L. Marshall, et al., PCR Methods and Applications 4:80-84 (1994)に記載されるmRNAのcDNAへの逆転写に続く対称ギャップリガーゼ連鎖反応 (RT-AGLCR) は本発明の範囲内である。リアルタイムPCRも使用され得る。

【0455】

本明細書で利用され得る他の既知の増幅法には、PNAS USA 87:1874-1878 (1990)に記載されており、かつNature 350 (No. 6313): 91-92 (1991)にも記載されているいわゆる「NASBA」または「3SR」技法、公開された欧州特許出願(EPA)第4544610号に記載のQ-ベータ増幅、G. T. Walker et al., Clin. Chem. 42:9-13 (1996)および欧州特許出願第684315号に記載の鎖置換増幅、PCT公開第WO9322461号に記載の標的媒介増幅、PCR、リガーゼ連鎖反応(LCR)(例えば、Wu and Wallace, Genomics 4, 560 (1989)、Landegren et al., Science 241, 1077 (1988)を参照のこと)、自己持続配列複製(SSR)(例えば、Guatelli et al., Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 87, 1874 (1990)を参照のこと)、および転写増幅(例えば、Kwoh et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 1173 (1989)を参照のこと)が含まれるが、これらに限定されない。

【0456】

遺伝子発現の絶対レベルおよび相対レベルを決定するための多くの技法が当該技術分野で既知であり、本発明での使用に好適な一般に使用されている技法には、ノーザン分析、RNase保護アッセイ(RPA)、マイクロアレイ、およびPCRベースの技法、例えば、定量的PCRおよび差次的発現PCRが含まれる。例えば、ノーザンブロットティングは、RNA調製物を変性アガロースゲル上に泳動させ、それを、活性化セルロース、ニトロセルロース、またはガラスもしくはナイロン膜等の好適な支持体に移送することを含む。その後、放射性標識cDNAまたはRNAが調製物にハイブリダイズされ、洗浄され、オートラジオグラフィーによって分析される。

【0457】

放射活性的に標識されたアンチセンスRNAプローブが生検試料の薄切片とハイブリダイズされ、洗浄され、RNaseで切断され、オートラジオグラフィーのために感受性乳剤に曝露されるインサイチュハイブリダイゼーション視覚化も用いられ得る。試料がヘマトキシリンで染色されると、試料の組織学的組成を示すことができ、好適な光フィルターを用いた暗視野撮像により、現像された乳剤が示される。ジゴキシゲニン等の非放射性標識も使用され得る。

【0458】

あるいは、mRNA発現は、DNAアレイ、チップ、またはマイクロアレイ上で検出され得る。対象から得られた試験試料の標識核酸が、バイオマーカーDNAを含む固体表面にハイブリダイズされ得る。正のハイブリダイゼーションシグナルがバイオマーカー転写物を含有する試料で得られる。DNAアレイを調製する方法およびそれらを使用する方法は、当該技術分野で周知である(例えば、参照により全体が本明細書に組み込まれる、米国特許第6,618,679号、同第6,379,897号、同第6,664,377号、同第6,451,536号、同第548,257号、米国2003/0157485号、ならびにSchena et al. (1995) Science 20, 467-470、Gerhold et al. (1999) Trends In Biochem. Sci. 24, 168-173、およびLennon et al. (2000) Drug Discovery Today 5, 59-65を参照のこと)。遺伝子発現の連続分析(SAGE)も行われ得る(例えば、米国特許出願第2003/0215858号を参照のこと)。

【0459】

mRNAレベルを監視するために、例えば、mRNAが試験される生体試料から抽出され、逆転写され、蛍光標識cDNAプローブが生成される。その後、マーカーcDNAにハイブリダイズすることができるマイクロアレイが標識cDNAプローブでプローブされ、スライドがスキャンされ、蛍光強度が測定される。この強度は、ハイブリダイゼーション強度および発現レベルと相関する。

【0460】

本明細書に記載の方法で使用され得るプローブのタイプには、cDNA、リボプローブ、合成オリゴヌクレオチド、およびゲノムプローブが含まれる。使用されるプローブのタイプは、一般に、例えば、インサイチュハイブリダイゼーションの場合にはリボプローブおよびノーザンブロッティングの場合にはcDNA等の特定の状況によって決定される。一実施形態では、プローブは、RNAに特有のヌクレオチド領域に向けられる。プローブは、マーカーmRNA転写物を差次的に認識するのに必要な程度に短くてもよく、例えば、15塩基程度に短くてもよいが、少なくとも17、18、19、もしくは20塩基、またはそれ以上の塩基のプローブが使用されてもよい。一実施形態では、プライマーおよびプローブは、ストリンジントな条件下で、マーカーに対応するヌクレオチド配列を有するDNA断片に特異的にハイブリダイズする。本明細書で使用される場合、「ストリンジントな条件」という用語は、ヌクレオチド配列に少なくとも95%の同一性が存在する場合にのみハイブリダイゼーションが生じることを意味する。別の実施形態では、「ストリンジントな条件」下でのハイブリダイゼーションは、配列間に少なくとも97%の同一性が存在する場合に生じる。

10

【0461】

プローブの標識の形態は、放射性同位体、例えば、 ^{32}P および ^{35}S の使用等の任意の適切なものであり得る。好適に標識された塩基の使用により、プローブが化学的に合成されるか生物学的に合成されるかにかかわらず、放射性同位体での標識が達成され得る。

【0462】

一実施形態では、生体試料は、試験対象由来のポリペプチド分子を含有する。あるいは、生体試料は、試験対象由来のmRNA分子または試験対象由来のゲノムDNA分子を含有し得る。

20

【0463】

別の実施形態では、本方法は、対照対象から対照生体試料を得ることと、マーカーポリペプチド、mRNA、ゲノムDNA、またはそれらの断片の存在が生体試料中で検出されるように、対照試料を、マーカーポリペプチド、mRNA、ゲノムDNA、またはそれらの断片を検出することができる化合物または薬剤と接触させることと、対照試料中のマーカーポリペプチド、mRNA、ゲノムDNA、またはそれらの断片の存在を、試験試料中のマーカーポリペプチド、mRNA、ゲノムDNA、またはそれらの断片の存在と比較することとをさらに含む。

30

【0464】

c. バイオマーカータンパク質発現を検出するための方法

バイオマーカータンパク質の活性またはレベルは、発現されたポリペプチドを検出または定量化することによって検出および／または定量化され得る。ポリペプチドは、当業者に周知のいくつかの手段のうちのいずれかによって検出および定量化され得る。バイオマーカー核酸およびその機能的に同様の相同体（その断片または遺伝子改変を含む）によってコードされるポリペプチドの（例えば、その制御領域またはプロモーター領域における）異常なポリペプチド発現レベルは、抗HHLA2抗体療法に対するがんの応答の可能性と関連付けられる。ポリペプチドを検出するための当該技術分野で既知の任意の方法が使用され得る。かかる方法には、免疫拡散、免疫電気泳動、放射性免疫アッセイ（RIA）、酵素結合免疫吸着アッセイ（ELISA）、免疫蛍光アッセイ、ウエスタンブロッティング、結合剤リガンドアッセイ、免疫組織化学的技法、凝集、補体アッセイ、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）、薄層クロマトグラフィー（TLC）、超拡散クロマトグラフィー等が含まれるが、これらに限定されない（例えば、参照により組み込まれる、Basic and Clinical Immunology, Sites and Terr, eds., Appleton and Lange, Norwalk, Conn. p 217-262, 1991）。抗体をエピトープ（複数可）と反応させることと、標識ポリペプチドまたはその誘導体を競合的に置き換えることとを含む、結合剤リガンド免疫アッセイ法が好ましい。ある特定の実施形態では、表2に列記される抗体を使用して、

40

50

表 1 に列記されるバイオマーカーを検出および／または定量化する。

【0465】

例えば、ELISAおよびRIA手順は、所望のバイオマーカータンパク質標準が（¹²⁵Iもしくは³⁵S等の放射性同位体、または西洋ワサビペルオキシダーゼもしくはアルカリ性ホスファターゼ等のアッセイ可能な酵素で）標識され、非標識試料と一緒に、対応する抗体と接触させられるように行われ得、そこで、第2の抗体が第1の抗体に結合するために使用され、放射活性または固定化酵素がアッセイされる（競合的アッセイ）。あるいは、試料中のバイオマーカータンパク質が対応する固定化抗体と反応させられ、放射性同位体標識または酵素標識抗バイオマーカータンパク質抗体がこの系と反応させられ、放射活性または酵素がアッセイされる（ELISA-サンドイッチアッセイ）。好適な場合、他の従来する方法も用いられ得る。

10

【0466】

上述の技法は、「一段階」アッセイまたは「二段階」アッセイとして本質的に行われ得る。「一段階」アッセイは、抗原を固定化抗体と接触させ、洗浄することなく、混合物を標識抗体と接触させることを含む。「二段階」アッセイは、混合物を標識抗体と接触させる前に洗浄することを含む。好適な場合、他の従来する方法も用いられ得る。

【0467】

一実施形態では、バイオマーカータンパク質レベルを測定するための方法は、生物学的検体を、バイオマーカータンパク質に選択的に結合する抗体またはそのバリエーション（例えば、断片）と接触させるステップと、当該抗体またはそのバリエーションが当該試料に結合しているかを検出するステップと、それにより、バイオマーカータンパク質レベルを測定するステップとを含む。

20

【0468】

バイオマーカータンパク質および／または抗体の酵素標識および放射標識は、従来の手段によって達成され得る。かかる手段は、一般に、特に酵素の活性に悪影響を及ぼさないように、例えば、グルタルアルデヒドによる、問題となっている抗原または抗体への酵素の共有結合的連結を含み、これは、酵素がその基質と依然として相互作用することができなければならないことを意味するが、酵素の全てが活性である必要はないが、但し、アッセイの達成を可能とするのに十分な酵素が活性のままであることを条件とする。実際には、酵素に結合するためのいくつかの技法は非特異的であり（例えば、ホルムアルデヒドを使用して）、ある割合の活性酵素しかもたらさない。

30

【0469】

アッセイ系の1つの成分を支持体上に固定化し、それにより、系の他の成分がその1つの成分と接触し、多大な労力と時間を必要とすることなく容易に除去されることを可能にすることが通常望ましい。第2の相が第1の相から離れて固定化されることが可能であるが、通常、1つの相で十分である。

【0470】

酵素自体を支持体上に固定化することが可能であるが、固相酵素が必要とされる場合、これは、通常、抗体に結合し、その抗体を当該技術分野で周知の支持体、モデル、および系に付着することによって最も良好に達成される。単純なポリエチレンが好適な支持体を提供し得る。

40

【0471】

標識に用いられ得る酵素は特に限定されていないが、例えばオキシダーゼ群のメンバーから選択され得る。これらは、それらの基質との反応により過酸化水素の産生を触媒し、グルコースオキシダーゼは、その良好な安定性、入手の容易さおよび安価、ならびにその基質（グルコース）の入手し易さのため、使用されることが多い。オキシダーゼの活性は、当該技術分野で周知の制御された条件下で酵素標識抗体と基質との反応後に形成された過酸化水素の濃度を測定することによってアッセイされ得る。

【0472】

他の技法を使用して、本開示に基づいて専門家の選好に従ってバイオマーカータンパク

50

質を検出することができる。かかる技法の1つは、好適に処理された試料をSDS-PAGEゲル上で泳動させた後にニトロセルロースフィルター等の固体支持体に移すウエスタンブロッティング (Towbin et al., Proc. Nat. Acad. Sci. 76: 4350 (1979)) である。その後、抗バイオマーカータンパク質抗体 (非標識) を支持体と接触させ、標識タンパク質Aまたは抗免疫グロブリン (^{125}I 、西洋ワサビペルオキシダーゼ、およびアルカリ性ホスファターゼを含む好適な標識) 等の二次免疫学的試薬によってアッセイする。クロマトグラフ検出も使用され得る。

【0473】

免疫組織化学を使用して、例えば、生検試料中のバイオマーカータンパク質の発現を検出することができる。好適な抗体が、例えば、細胞の薄層と接触させられ、洗浄され、その後、第2の標識抗体と接触させられる。標識は、蛍光マーカー、酵素、例えば、ペルオキシダーゼ、アビジン、または放射標識により得る。このアッセイは、顕微鏡を使用して視覚的にスコア化される。

【0474】

イントラボディ等の抗バイオマーカータンパク質抗体 (例えば、表2に列記される) も撮像目的のために使用されて、例えば、対象の細胞および組織中のバイオマーカータンパク質の存在を検出することができる。好適な標識には、放射性同位体、ヨウ素 (^{125}I 、 ^{121}I)、炭素 (^{14}C)、硫黄 (^{35}S)、トリチウム (^3H)、インジウム (^{112}In)、およびテクネチウム ($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、フルオレセインおよびローダミン等の蛍光標識、ならびにビオチンが含まれる。

【0475】

インビボ撮像の目的のために、抗体は、それ自体が体外から検出不能であるため、検出を可能にするために標識されるか、または別様に修飾されなければならない。この目的のためのマーカーは、抗体結合を実質的に妨害しないが、外部検出を可能にする任意のマーカーであり得る。好適なマーカーには、X線ラジオグラフィー、NMR、またはMRIによって検出され得るものが含まれ得る。X線ラジオグラフィー技法の場合、好適なマーカーには、検出可能な放射線を放出するが、対象に明らかに有害ではない任意の放射性同位体 (例えば、バリウムまたはセシウム等) が含まれる。NMRおよびMRIに好適なマーカーには、一般に、例えば、関連ハイブリドーマの栄養素の好適な標識によって抗体に組み込まれ得る重水素等の検出可能な特徴的スピンを有するものが含まれる。

【0476】

対象のサイズおよび使用される撮像システムにより、診断的画像を生成するのに必要な撮像部分の量が決定される。放射性同位体部分の場合、ヒト対象について、注射される放射活性の量は、通常、テクネチウム-99約5~20ミリキュリーの範囲である。その後、標識された抗体または抗体断片は、バイオマーカータンパク質を含有する細胞の場所に優先的に蓄積する。その後、標識された抗体または抗体断片が既知の技法を使用して検出され得る。

【0477】

バイオマーカータンパク質を検出するために使用され得る抗体には、天然であるか合成であるか、全長であるかその断片であるか、モノクローナルであるかポリクローナルであるかにかかわらず、検出されるバイオマーカータンパク質に十分に強くかつ特異的に結合する任意の抗体 (例えば、表2に列記される) が含まれる。抗体は、最大約 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M の K_d を有し得る。「特異的に結合する」という語句は、例えば、結合が、同一または同様のエピトープ、抗原、または抗原決定基の第2の調製物で置き換えられ得るか、またはそれと競合され得るような様式での、抗体のエピトープまたは抗原または抗原決定基への結合を指す。抗体は、関連タンパク質等の他のタンパク質と比較してバイオマーカータンパク質に優先的に結合し得る。

【0478】

抗体は、市販されているか、または当該技術分野で既知の方法に従って調製され得る。

【0479】

使用され得る抗体およびその誘導体は、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体、キメラ、ヒト、ヒト化、霊長類化（CDR-グラフト化）、ベニヤ化、または一本鎖抗体、ならびに抗体の機能的断片、すなわち、バイオマーカータンパク質結合断片を包含する。例えば、バイオマーカータンパク質またはその一部（Fv、Fab、Fab'、およびF（ab'）2断片を含むが、これらに限定されない）に結合することができる抗体断片が使用され得る。かかる断片は、酵素的切断または組換え技法によって産生され得る。例えば、パパインまたはペプシン切断により、それぞれ、Fab断片またはF（ab'）2断片が生成され得る。必要な基質特異性を有する他のプロテアーゼもFab断片またはF（ab'）2断片を生成するために使用され得る。抗体は、1つ以上の終止コドンが天然終止部位の上流に導入された抗体遺伝子を使用して様々な切断形態で産生される場合もある。例えば、F（ab'）2重鎖部分をコードするキメラ遺伝子は、重鎖のCH、ドメイン、およびヒンジ領域をコードするDNA配列を含むように設計され得る。

10

【0480】

合成抗体および操作された抗体は、例えば、Cabilly et al.（米国特許第4,816,567号）、Cabilly et al.（欧州特許第0,125,023号B1）、Boss et al.（米国特許第4,816,397号）、Boss et al.（欧州特許第0,120,694号B1）、Neuberger, M. S. et al.（WO86/01533）、Neuberger, M. S. et al.（欧州特許第0,194,276号B1）、Winter（米国特許第5,225,539号）、Winter（欧州特許第0,239,400号B1）、Queen et al.（欧州特許第0451216号B1）、およびPadlan, E. A. et al.（欧州特許第0519596号A1）に記載されている。霊長類化抗体についてはNewman, R. et al., BioTechnology, 10:1455-1460（1992）、一本鎖抗体についてはLadner et al.（米国特許第4,946,778号）およびBird, R. E. et al., Science, 242:423-426（1988）も参照されたい。ライブラリ、例えば、ファージディスプレイライブラリから産生された抗体も使用され得る。

20

【0481】

いくつかの実施形態では、抗体以外のバイオマーカータンパク質に特異的に結合する薬剤、例えば、ペプチドが使用される。バイオマーカータンパク質に特異的に結合するペプチドは、当該技術分野で既知の任意の手段によって特定され得る。例えば、バイオマーカータンパク質の特異的ペプチド結合剤は、ペプチドファージディスプレイライブラリの使用についてスクリーニングされ得る。

30

【0482】

d. バイオマーカーの構造的改変を検出するための方法

以下の例証的な方法は、例えば、過剰発現される、過剰機能的である等のHHLA2、TMIGD2、KIR3DL3を特定するために、バイオマーカー核酸および／またはバイオマーカーポリペプチド分子の構造的改変の存在を特定するために使用され得る。

【0483】

ある特定の実施形態では、改変の検出は、アンカーPCRもしくはRACE PCR等のポリメラーゼ連鎖反応（PCR）（例えば、米国特許第4,683,195号および同第4,683,202号を参照のこと）、またはあるいはライゲーション連鎖反応（LCR）（例えば、Landegran et al.（1988）Science 241:1077-1080、およびNakazawa et al.（1994）Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:360-364を参照のこと）におけるプローブ／プライマーの使用を含み、後者は、バイオマーカー遺伝子等のバイオマーカー核酸の点突然変異の検出に特に有用であり得る（Abravaya et al.（1995）Nucleic Acids Res. 23:675-682を参照のこと）。この方法は、対象から細胞試料を収集するステップと、試料の細胞から核酸（例えば、ゲノム、mRN

40

50

A、またはそれらの両方)を単離するステップと、バイオマーカー遺伝子(存在する場合)のハイブリダイゼーションおよび増幅が生じるような条件下で、核酸試料を、バイオマーカー遺伝子に特異的にハイブリダイズする1つ以上のプライマーと接触させるステップと、増幅産物の存在または不在を検出するステップ、または増幅産物のサイズを検出して、対照試料と長さを比較するステップとを含み得る。PCRおよび/またはLCRを予備的増幅ステップとして本明細書に記載の突然変異を検出するために使用される技法のうちのいずれかと併せて使用することが望ましくあり得ることが理解される。

【0484】

代替の増幅法には、自己持続配列複製(Guatelli, J. C. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:1874-1878)、転写増幅系(Kwoh, D. Y. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:1173-1177)、Q-ベータレプリカーゼ(Lizardi, P. M. et al. (1988) Bio-Technology 6:1197)、または任意の他の核酸増幅法が含まれ、その後、当業者に周知の技法を使用した増幅された分子の検出が続く。これらの検出スキームは、核酸分子が非常に少ない数で存在する場合の核酸分子の検出に特に有用である。

【0485】

代替の実施形態では、試料細胞由来のバイオマーカー核酸の突然変異は、制限酵素切断パターンの改変によって特定され得る。例えば、試料DNAおよび対照DNAが単離され、増幅され(任意に)、1つ以上の制限エンドヌクレアーゼと消化され、断片長サイズがゲル電気泳動によって決定され、比較される。試料DNAと対照DNAとの間の断片長サイズの差が、試料DNAの突然変異を示す。さらに、配列特異的リボザイムの使用(例えば、米国特許第5,498,531号を参照のこと)を使用して、リボザイム切断部位の発生または喪失による特異的突然変異の存在についてスコア化することができる。

【0486】

他の実施形態では、バイオマーカー核酸の遺伝子突然変異は、試料核酸および対照核酸、例えば、DNAまたはRNAを、何百または何千ものオリゴヌクレオチドプローブを含有する高密度アレイにハイブリダイズすることによって特定され得る(Cronin, M. T. et al. (1996) Hum. Mutat. 7:244-255, Kozal, M. J. et al. (1996) Nat. Med. 2:753-759)。例えば、バイオマーカーの遺伝子突然変異は、Cronin et al. (1996)(上記参照)に記載されるように、光生成DNAプローブを含有する二次元アレイで特定され得る。簡潔には、プローブの第1のハイブリダイゼーションアレイを使用して、試料および対照中のDNAの長いストレッチを走査して、連続的な重複プローブの線形アレイを作製することによって配列間の塩基の変化を特定することができる。このステップにより、点突然変異の特定が可能になる。このステップの後に、検出される全てのバリエーションまたは突然変異に相補的なより小さい特殊化されたプローブアレイを使用することによって特異的突然変異の特徴付けを可能にする第2のハイブリダイゼーションアレイが続く。突然変異アレイは各々、並列プローブセットから成り、一方は野生型遺伝子に相補的であり、他方は突然変異体遺伝子に相補的である。かかるバイオマーカーの遺伝子突然変異は、例えば、生殖系列および体細胞突然変異を含む様々な状況で特定され得る。

【0487】

さらに別の実施形態では、当該技術分野で既知の様々な配列決定反応のうちのいずれかを使用して、バイオマーカー遺伝子を直接配列決定し、試料バイオマーカーの配列を対応する野生型(対照)配列と比較することによって突然変異を検出することができる。配列決定反応の例には、Maxam and Gilbert (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:560またはSanger (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463によって開発された技法に基づくものが挙げられる。質量分析による配列決定(例えば、PCT国際公開第WO94/16101号、Cohen et al. (1996) Adv. Chromatogr. 36:1

10

20

30

40

50

27-162、およびGriffin et al. (1993) Appl. Biochem. Biotechnol. 38:147-159を参照のこと)を含む、様々な自動配列決定手順のうちのいずれかが、診断アッセイを行う際に利用され得ることも企図される(Naeve (1995) Biotechniques 19:448-53)。

【0488】

バイオマーカー遺伝子の突然変異を検出するための他の方法には、切断薬剤からの保護を使用してRNA/RNAまたはRNA/DNAヘテロ二重鎖中のミスマッチ塩基を検出する方法が含まれる(Myers et al. (1985) Science 230:1242)。一般に、当該技術分野の技法である「ミスマッチ切断」は、野生型バイオマーカー配列を含有する(標識された)RNAまたはDNAを組織試料から得られた潜在的に突然変異のRNAまたはDNAとハイブリダイズすることによって形成されたヘテロ二重鎖を提供することから開始する。二本鎖二重鎖は、対照鎖と試料鎖との間の塩基対ミスマッチにより存在するもの等の二重鎖の一本鎖領域を切断する薬剤で処理される。例えば、RNA/DNA二重鎖がRNaseで処理され、DNA/DNAハイブリッドがS1核酸レアーゼで処理されて、ミスマッチ領域を酵素的に消化することができる。他の実施形態では、DNA/DNA二重鎖またはRNA/DNA二重鎖のいずれかがヒドロキシルアミンまたは四酸化オスミウムおよびピペリジンで処理されて、ミスマッチ領域を消化することができる。ミスマッチ領域を消化した後、結果として生じた物質が変性ポリアクリルアミドゲル上でサイズにより分離されて、突然変異の部位を決定する。例えば、Cotton et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:4397およびSaleeba et al. (1992) Methods Enzymol. 217:286-295を参照されたい。好ましい実施形態では、対照DNAまたはRNAが検出のために標識され得る。

【0489】

なお別の実施形態では、ミスマッチ切断反応は、細胞試料から得られたバイオマーカーcDNAの点突然変異を検出およびマッピングするための定義された系において二本鎖DNA中のミスマッチ塩基対を認識する1つ以上のタンパク質(いわゆる「DNAミスマッチ修復」酵素)を用いる。例えば、E. coliのmutY酵素は、G/AミスマッチでAを切断し、HeLa細胞由来のチミジンDNAグリコシラーゼは、G/TミスマッチでTを切断する(Hsu et al. (1994) Carcinogenesis 15:1657-1662)。例示の実施形態に従って、バイオマーカー配列、例えば、DNAミスマッチ修復酵素で処理された野生型バイオマーカーおよび切断産物(存在する場合)に基づくプローブが、電気泳動プロトコル等から検出され得る(例えば、米国特許第5,459,039号)。

【0490】

他の実施形態では、電気泳動移動度の改変を使用して、バイオマーカー遺伝子の突然変異を特定することができる。例えば、一本鎖立体配座多型(SSCP)を使用して、突然変異核酸と野生型核酸との間の電気泳動移動度の差を検出することができる(Orita et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2766、Cotton (1993) Mutat. Res. 285:125-144およびHayashi (1992) Genet. Anal. Tech. Appl. 9:73-79も参照のこと)。試料および対照バイオマーカー核酸の一本鎖DNA断片は変性され、復元され得る。一本鎖核酸の二次構造は配列によって異なり、電気泳動移動度の結果として生じた改変は、単一塩基の変化の検出さえも可能にする。DNA断片は、標識プローブで標識または検出され得る。アッセイの感度は、二次構造が配列の変化により敏感である(DNAではなく)RNAを使用することによって増強され得る。好ましい実施形態では、主題の方法は、電気泳動移動度の変化に基づいて二本鎖ヘテロ二重鎖分子を分離するためのヘテロ二重鎖分析を利用する(Keen et al. (1991) Trends Genet. 7:5)。

【0491】

さらに別の実施形態では、変性剤勾配を有するポリアクリルアミドゲル中での突然変異断片または野生型断片の移動が変性勾配ゲル電気泳動 (D G G E) を使用してアッセイされる (Myers et al. (1985) Nature 313:495)。D G G E が分析法として使用される場合、DNA は、例えば、P C R によっておよそ 40 b p の高融点 G C リッチ DNA の G C クランプを付加することによって、完全に変性しないことを確実にするように修飾される。さらなる実施形態では、温度勾配が変性勾配の代わりに使用されて、対照 DNA と試料 DNA との移動度の差を特定する (Rosenbaum and Reissner (1987) Biophys. Chem. 265:12753)。

【0492】

点突然変異を検出するための他の技法の例には、選択的オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーション、選択的増幅、または選択的プライマー伸長が挙げられるが、これらに限定されない。例えば、オリゴヌクレオチドプライマーは、既知の突然変異が中心に配置されるように調製され得、その後、完全マッチが見つけれられた場合にのみハイブリダイゼーションを許容する条件下で標的 DNA にハイブリダイズされ得る (Saiki et al. (1986) Nature 324:163、Saiki et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:6230)。かかる対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチドは、オリゴヌクレオチドがハイブリダイズ膜に付着され、標識された標的 DNA とハイブリダイズされる場合に、P C R 増幅された標的 DNA またはいくつかの異なる突然変異にハイブリダイズされる。

【0493】

あるいは、選択的 P C R 増幅に依存する対立遺伝子特異的増幅技術が、本発明と併せて使用され得る。特異的増幅のためのプライマーとして使用されるオリゴヌクレオチドは、目的とする突然変異を、分子の中心に（これにより、増幅が差次的ハイブリダイゼーションに依存ようになる）(Gibbs et al. (1989) Nucleic Acids Res. 17:2437-2448)、または適切な条件下でミスマッチがポリメラーゼ伸長を阻止または低減する1つのプライマーの最も3'側に (Prossner (1993) Tibtech 11:238) 有し得る。加えて、切断ベースの検出を行うために突然変異の領域内に新規制限部位を導入することが望ましくあり得る (Gasparini et al. (1992) Mol. Cell Probes 6:1)。ある特定の実施形態では、増幅が増幅用の Taq リガーゼを使用して行われる場合もあることが理解される (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:189)。そのような場合、5'配列の3'末端に完全マッチが存在する場合にのみライゲーションが生じ、増幅の存在または不在を探すことによって特定の部位での既知の突然変異の存在を検出することを可能にする。

【0494】

抗がん療法

抗 H H L A 2 抗体療法の有効性は、本明細書に記載の方法による対象におけるがんに関連するバイオマーカー量および／または活性に従って予測される。一実施形態では、かかる抗 H H L A 2 抗体療法または療法の組み合わせ（例えば、別の免疫チェックポイント阻害剤等の1つ以上の追加の抗がん療法と組み合わせた1つ以上の抗 H H L A 2 抗体療法）は、特に対象が最初に抗 H H L A 2 抗体療法に応答する可能性の高い者として示された場合に投与され得る。別の実施形態では、かかる抗 H H L A 2 抗体療法は、対象が抗 H H L A 2 抗体療法に応答する可能性の低い者として示されたときに避けられ得、標的および／または非標的抗がん療法等の代替の治療レジメンが投与され得る。併用療法も企図され、これは、例えば、1つ以上の化学療法剤および放射線、1つ以上の化学療法剤および免疫療法、または1つ以上の化学療法剤、放射線、および化学療法を含み得、これらの組み合わせは各々、抗免疫チェックポイント療法との併用であり得る。加えて、特定の標的を調節するための薬剤の任意の代表的な実施形態は、当業者によって本明細書および以下に記載の任意の他の標的に適応され得る（例えば、本明細書に記載の直接および間接的 H H L A 2 阻害剤は、他の免疫チェックポイント阻害剤および／または H H L A 2、例えば、単

一特異性抗体、二重特異性抗体、非活性化形態、小分子、ペプチド、干渉核酸等に適用され得る)。

【0495】

「標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用し、それにより、がんを治療する薬剤の投与を指す。一例には、当該技術分野で周知の免疫チェックポイント阻害剤が挙げられる。例えば、当該技術分野で周知であり、かつ上に記載されている治療用モノクローナル遮断抗体等の抗CTLA-4経路剤を使用して、CTLA-4リガンド(例えば、CD80およびCD86)等のCTLA-4経路の望ましくない成分を発現する腫瘍微小環境および細胞を標的とすることができる。

【0496】

例えば、「CTLA-4経路」という用語は、CTLA-4受容体およびそのリガンド、例えば、CD80およびCD86を指す。「CTLA-4経路阻害剤」は、相互作用によって別様に生成された免疫阻害性シグナル伝達が遮断されるか、またはさもなければ低下するように、CTLA-4とそのリガンドの一方または両方との間の相互作用を遮断するか、またはさもなければ低下させる。抗免疫チェックポイント阻害剤は、直接または間接的であり得る。直接抗免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントとそのリガンドの少なくとも一方との間の相互作用を遮断するか、またはさもなければ低下させる。例えば、CTLA-4阻害剤は、CTLA-4のそのリガンドの一方または両方との結合を遮断することができる。直接CTLA-4組み合わせ阻害剤は、特にCTLA-4の天然結合パートナー(例えば、CD80およびCD86)が既知であるため、当該技術分野で周知である。

【0497】

例えば、二重特異性抗体等のCTLA-4と1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーとの間の相互作用を直接遮断する薬剤は、阻害性シグナル伝達を阻止し、免疫応答を上方制御することができる(すなわち、CTLA-4経路阻害剤として)。あるいは、CTLA-4とそのリガンドの一方または両方との間の相互作用を間接的に遮断する薬剤は、阻害性シグナル伝達を阻止し、免疫応答を上方制御することができる。例えば、B7-1またはその可溶性形態は、CTLA-4ポリペプチドへの結合により、CTLA-4への結合に利用可能なPD-L1ポリペプチドの有効濃度を間接的に減少させる。例示の薬剤には、受容体とリガンド(複数可)との間の相互作用を遮断するCTLA-4および1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーに対する単一特異性または二重特異性遮断抗体、CTLA-4および1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーの非活性化形態(例えば、優性ネガティブまたは可溶性ポリペプチド)、CTLA-4と1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーとの間の相互作用を遮断する小分子またはペプチド、CTLA-4および1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーに結合し、その受容体とリガンド(複数可)との間の相互作用を阻害する融合タンパク質(例えば、抗体または免疫グロブリンのFc部分に融合したCTLA-4および1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーの細胞外部分)、天然CTLA-4および1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーの非活性化形態、ならびに天然CTLA-4および1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーの可溶性形態が挙げられる。

【0498】

間接的抗免疫チェックポイント阻害剤は、免疫チェックポイントとそのリガンドの少なくとも一方との間の相互作用によって生成された免疫阻害性シグナル伝達を遮断するか、またはさもなければ低下させる。例えば、阻害剤は、CTLA-4とそのリガンドの一方または両方との間の相互作用を必ずしも直接遮断することなく、CTLA-4とそのリガンドの一方または両方との間の相互作用を遮断することができる。例えば、間接的阻害剤には、免疫阻害性シグナル伝達を遮断するか、またはさもなければ低下させるために、シグナル伝達することを必要とされるCTLA-4および／または1つ以上のCTLA-4

10

20

30

40

50

リガンドおよび／または結合パートナーの細胞内部分に結合するイントラボディが含まれる。同様に、CTLA-4および／または1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーの発現を減少させる核酸は、相互作用のための成分の利用可能性を除去することによって、CTLA-4とそのリガンドの一方または両方との間の相互作用を間接的に阻害することができる。かかる核酸分子は、転写または翻訳のためにCTLA-4および／または1つ以上のCTLA-4リガンドおよび／または結合パートナーを遮断することができる。

【0499】

同様に、HLA2とHLA2受容体（複数可）／共受容体（複数可）との間の相互作用を直接的に遮断する薬剤、例えば、抗HLA2抗体、1つ以上のHLA2受容体（複数可）／共受容体（複数可）を認識する抗体、抗HLA2／抗免疫チェックポイント二重特異性抗体等は、HLA2および／またはその受容体（複数可）／共受容体（複数可）のシグナル伝達およびその下流免疫応答を阻止することができる。あるいは、HLA2とその受容体（複数可）／共受容体（複数可）との間の相互作用を間接的に遮断する薬剤は、HLA2および／またはその受容体（複数可）／共受容体（複数可）のシグナル伝達およびその下流免疫応答を阻止することができる。例えば、HLA2の細胞外ドメイン等のHLA2の可溶性形態は、その受容体（複数可）／共受容体（複数可）への結合により、細胞表面上のHLA2への結合に利用可能なその受容体（複数可）／共受容体（複数可）の有効濃度を間接的に減少させる。例示の薬剤には、受容体とリガンド（複数可）との間の相互作用を遮断するHLA2および／またはその受容体（複数可）／共受容体（複数可）に対する単一特異性または二重特異性遮断抗体、HLA2および／またはその受容体（複数可）／共受容体（複数可）の非活性化形態（例えば、優性ネガティブまたは可溶性ポリペプチド）、HLA2とその受容体（複数可）／共受容体（複数可）との間の相互作用を遮断する小分子またはペプチド、HLA2および／またはその受容体（複数可）／共受容体（複数可）に結合し、その受容体とリガンド（複数可）との間の相互作用を阻害する融合タンパク質（例えば、抗体または免疫グロブリンのFc部分に融合したHLA2および／またはその受容体（複数可）／共受容体（複数可）の細胞外部分）、天然HLA2および／またはその受容体（複数可）／共受容体（複数可）の非活性化形態、ならびに天然HLA2および／またはその受容体（複数可）／共受容体（複数可）の可溶性形態が挙げられる。

【0500】

免疫応答を誘発または増幅するように設計された免疫療法は、「活性化免疫療法」と称される。免疫応答を低下または抑制するように設計された免疫療法は、「抑制免疫療法」と称される。遺伝学的に修飾された移植がん細胞に免疫系効果をもたらすと考えられる任意の薬剤をアッセイして、薬剤が免疫療法であるかを決定し、所与の遺伝子修飾が免疫応答の調節にもたらす効果を決定することができる。いくつかの実施形態では、免疫療法は、がん細胞特異的である。いくつかの実施形態では、免疫療法は、「非標的」であり得、これは、免疫系細胞と選択的に相互作用しないが、免疫系機能を調節する薬剤の投与を指す。非標的療法の代表的な例には、化学療法、遺伝子療法、および放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0501】

免疫療法は、がん抗原または疾患抗原に対して産生された予め形成された抗体の投与（例えば、任意に化学療法剤または毒素に結合しているモノクローナル抗体の腫瘍抗原への投与）によって達成される宿主の短期間保護のための受動免疫を伴い得る。この免疫療法は、がん細胞株の細胞毒性リンパ球によって認識されるエピトープの使用にも焦点を合わせることができる。あるいは、アンチセンスポリヌクレオチド、リボザイム、RNA干渉分子、三重らせんポリヌクレオチド等を使用して、腫瘍またはがんの発症、進行、および／または病理に関連した生体分子を選択的に調節することができる。

【0502】

一実施形態では、免疫療法は、養子細胞ベースの免疫療法を含む。照射自己または同種

10

20

30

40

50

腫瘍細胞、腫瘍溶解物またはアポトーシス腫瘍細胞、抗原提示細胞ベースの免疫療法、樹状細胞ベースの免疫療法、養子T細胞移入、養子CAR T細胞療法、自己免疫増強療法（AIEET）、がんワクチン、および／または抗原提示細胞を含むが、これらに限定されない、周知の養子細胞ベースの免疫療法様式。かかる細胞ベースの免疫療法は、1つ以上の遺伝子産物を発現して免疫応答をさらに調節する、例えば、GM-CSF等のサイトカインを発現するように、かつ／またはMAGE-1、gp-100、患者特異的ネオ抗原ワクチン等の腫瘍関連抗原（TAA）抗原を発現するようにさらに修正され得る。

【0503】

別の実施形態では、免疫療法は、非細胞ベースの免疫療法を含む。一実施形態では、ワクチン増強アジュバントを有するまたは有しない抗原を含む組成物が使用される。かかる組成物は、ペプチド組成物、腫瘍溶解性ウイルス、融合タンパク質を含む組換え抗原等の多くの周知の形態で存在する。なお別の実施形態では、免疫調節インターロイキン、例えば、IL-2、IL-6、IL-7、IL-12、IL-17、IL-23等、ならびにそのモジュレーター（例えば、遮断抗体またはより強力な形態もしくはより長い時間持続する形態）が使用される。さらに別の実施形態では、免疫調節サイトカイン、例えば、インターフェロン、GM-CSF、イミキモド、TNFアルファ等、ならびにそのモジュレーター（例えば、遮断抗体またはより強力な形態もしくはより長い時間持続する形態）が使用される。別の実施形態では、免疫調節ケモカイン、例えば、CCL3、CCL26、およびCXCL7等、ならびにそのモジュレーター（例えば、遮断抗体またはより強力な形態もしくはより長い時間持続する形態）が使用される。別の実施形態では、免疫抑制を標的とする免疫調節分子、例えば、STAT3シグナル伝達モジュレーター、NFカッパBシグナル伝達モジュレーター、および免疫チェックポイントモジュレーターが使用される。「免疫チェックポイント」および「抗免疫チェックポイント療法」という用語は、上で説明されている。

【0504】

なお別の実施形態では、免疫調節薬、例えば、免疫細胞増殖抑制薬、グルココルチコイド、細胞増殖抑制剤、イムノフィリン、およびそのモジュレーター（例えば、ラパマイシン、カルシニューリン阻害剤、タクロリムス、シクロスポリン（cyclosporin）（シクロスポリン（cyclosporin））、ピメクロリムス、アベチムス、グスペリムス、リダフォロリムス、エベロリムス、テムシロリムス、ゾタロリムス等）、ヒドロコルチゾン（コルチゾール）、酢酸コルチゾン、プレドニゾン、プレドニゾロン、メチルプレドニゾロン、デキサメタゾン、ベータメタゾン、トリアムシノロン、ベクロメタゾン、酢酸フルドコルチゾン、酢酸デオキシコルチコステロン（doca）アルドステロン、非グルココルチコイドステロイド、ピリミジン合成阻害剤、レフルノミド、テリフルノミド、葉酸類似体、メトトレキサート、抗胸腺細胞グロブリン、抗リンパ球グロブリン、サリドマイド、レナリドミド、ペントキシフィリン、ブプロピオン、クルクミン、カテキン、オピオイド、IMPDH阻害剤、ミコフェノール酸、ミリオシン、フィンゴリモド、NF- κ B阻害剤、ラロキシフェン、ドロトレコギンアルファ、デノスマブ、NF- κ Bシグナル伝達カスケード阻害剤、ジスルフィラム、オルメサルタン、ジチオカルバメート、プロテアソーム阻害剤、ボルテゾミブ、MG132、Pro1、NPI-0052、クルクミン、ゲニステイン、レスベラトロール、パルテノリド、サリドマイド、レナリドミド、フラボピリドール、非ステロイド性抗炎症薬（NSAID）、三酸化ヒ素、デヒドロキシメチルエポキシキノマイシン（DHMEQ）、I3C（インドール-3-カルビノール）／DIM（ジインドールメタン）（I3C／DIM）、Bay 11-7082、ルテオリン、細胞透過性ペプチドSN-50、IKB α -スーパーリプレッサー過剰発現、NFKBデコイオリゴデオキシヌクレオチド（ODN）、またはそれらのいずれかの誘導体もしくは類似体を使用される。さらに別の実施形態では、免疫調節抗体またはタンパク質が使用される。例えば、CD40、Toll様受容体（TLR）、OX40、GITR、CD27、または4-1BB、T細胞二重特異性抗体、抗IL-2受容体抗体、抗CD3抗体、OKT3（ムロモナブ）、オテリキ

10

20

30

40

50

シズマブ、テブリズマブ、ビジリズマブ、抗CD4抗体、クレノリキシマブ、ケリキシマブ、ザノリムマブ、抗CD11a抗体、エファリズマブ、抗CD18抗体、エルリズマブ、ロベリズマブ、抗CD20抗体、アフツズマブ、オクレリズマブ、オフアツムマブ、パスコリズマブ、リツキシマブ、抗CD23抗体、ルミリキシマブ、抗CD40抗体、テネリキシマブ、トラリズマブ、抗CD40L抗体、ルブリズマブ、抗CD62L抗体、アセリズマブ、抗CD80抗体、ガリキシマブ、抗CD147抗体、ガビリモマブ、Bリンパ球刺激因子（BLyS）阻害抗体、ベリムマブ、CTLA4-Ig融合タンパク質、アバタセプト、ベラタセプト、抗CTLA4抗体、イピリムマブ、トレメリムマブ、抗エオタキシン1抗体、ベルチリムマブ、抗a4-インテグリン抗体、ナタリズマブ、抗IL-6R抗体、トシリズマブ、抗LFA-1抗体、オデュリモマブ、抗CD25抗体、バシリキシマブ、ダクリズマブ、イノリモマブ、抗CD5抗体、ゾリモマブ、抗CD2抗体、シブリズマブ、ネレリモマブ、ファラリモマブ、アトリズマブ、アトロリムマブ、セデリズマブ、ドルリモマブアリトクス、ドルリキシズマブ、フォントリズマブ、ガンテネルマブ、ゴミリキシマブ、レブリリズマブ、マスリモマブ、モロリムマブ、パキセリズマブ、レスリズマブ、ロベリズマブ、タリズマブ、テリモマブアリトクス、バパリキシマブ、ベパリモマブ、アフリベルセプト、アレファセプト、リロナセプト、IL-1受容体アンタゴニスト、アナキンラ、抗IL-5抗体、メポリズマブ、IgE阻害剤、オマリズマブ、タリズマブ、IL12阻害剤、IL23阻害剤、ウステキヌマブ等に結合する抗体。

【0505】

ビタミンA、ビタミンE、ビタミンC等の免疫応答を増強する栄養補助剤が当該技術分野で周知であり（例えば、米国特許第4,981,844号および同第5,230,902号ならびにPCT公開第WO2004/004483号を参照のこと）、本明細書に記載の方法で使用され得る。

【0506】

同様に、薬剤および免疫療法以外の療法またはそれらの組み合わせを抗HHLA2抗体と組み合わせて使用して、免疫応答を刺激し、それにより、それから恩恵を受けるであろう状態を治療することができる。例えば、化学療法、放射線、後成的修飾因子（例えば、ヒストンデアセチラーゼ（HDAC）修飾因子、メチル化修飾因子、リン酸化修飾因子等）、標的療法等が当該技術分野で周知である。

【0507】

「非標的療法」という用語は、選択された生体分子と選択的に相互作用しないが、がんを治療する薬剤の投与を指す。非標的療法の代表的な例には、化学療法、遺伝子療法、および放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。

【0508】

一実施形態では、化学療法が使用される。化学療法は、化学療法剤の投与を含む。かかる化学療法剤は、以下の化合物の群：白金化合物、細胞毒性抗生物質、代謝拮抗剤、抗分裂剤、アルキル化剤、ヒ素化合物、DNAトポイソメラーゼ阻害剤、タキサン、ヌクレオシド類似体、植物アルカロイド、および毒素、ならびにそれらの合成誘導体から選択されるものであり得るが、これらに限定されない。例示の化合物には、アルキル化剤（シスプラチン、トレオスルファン、およびトロホスファミド）、植物アルカロイド（ビンブラスチン、パクリタキセル、ドセタキセル）、DNAトポイソメラーゼ阻害剤（テニポシド、クリスナトール、およびマイトマイシン）、抗葉酸剤（メトトレキサート、ミコフェノール酸、およびヒドロキシウレア）、ピリミジン類似体（5-フルオロウラシル、ドキシフルリジン、およびシトシンアラビノシド）、プリン類似体（メルカプトプリンおよびチオグアニン）、DNA代謝拮抗剤（2'-デオキシ-5-フルオロウリジン、グリシン酸アフィジコリン、およびピラゾロイミダゾール）、ならびに有糸分裂阻害剤（ハリコンドリン、コルヒチン、およびリゾキシシン）が挙げられるが、これらに限定されない。1つ以上の化学療法剤（例えば、FLAG、CHOP）を含む組成物も使用され得る。FLAGには、フルダラビン、シトシンアラビノシド（Ara-C）、およびG-CSFが含まれる。CHOPには、シクロホスファミド、ビンクリスチン、ドキシソルビシン、およびプレドニ

10

20

30

40

50

ゾンが含まれる。別の実施形態では、PARP（例えば、PARP-1および／またはPARP-2）阻害剤が使用され、かかる阻害剤は当該技術分野で周知である（例えば、Olaparib、ABT-888、BSI-201、BGP-15（N-Gene Research Laboratories, Inc.）、INO-1001（Inotek Pharmaceuticals Inc.）、PJ34（Soriano et al., 2001、Pacher et al., 2002b）、3-アミノベンズアミド（Trevigen）、4-アミノ-1, 8-ナフタルイミド（Trevigen）、6（5H）-フェナントリジノン（Trevigen）、ベンズアミド（米国特許Re第36, 397号）、およびNU1025（Bowman et al.）。作用機構は、一般に、PARPに結合し、その活性を低下させるPARP阻害剤の能力に関連する。PARPは、ベーターニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD⁺）のニコチンアミドおよびポリ-ADP-リボース（PAR）への変換を触媒する。ポリ（ADP-リボース）およびPARPはいずれも、転写制御、細胞増殖、ゲノム安定性、および発がんに関連付けられている（Bouchard V. J. et al. Experimental Hematology, Volume 31, Number 6, June 2003, pp. 446-454（9）、Herceg Z.; Wang Z.-Q. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis, Volume 477, Number 1, 2 Jun. 2001, pp. 97-110（14））。ポリ（ADP-リボース）ポリメラーゼ1（PARP1）は、DNA一本鎖破壊（SSB）の修復における重要な分子である（de Murcia J. et al. 1997. Proc Natl Acad Sci USA 94:7303-7307、Schreiber V, Dantzer F, Ame J C, de Murcia G（2006）Nat Rev Mol Cell Biol 7:517-528、Wang Z Q, et al.（1997）Genes Dev 11:2347-2358）。PARP1機能の阻害によるSSB修復のノックアウトにより、相同性指向DSB修復に欠陥のあるがん細胞における合成致死を誘発し得るDNA二本鎖破壊（DSB）が誘導される（Bryant H E, et al.（2005）Nature 434:913-917、Farmer H, et al.（2005）Nature 434:917-921）。化学療法剤の前述の例は例示的なものであり、限定するようには意図されていない。

【0509】

別の実施形態では、放射線療法が使用される。放射線療法で使用される放射線は、電離放射線であり得る。放射線療法は、ガンマ線、X線、または陽子ビームでもあり得る。放射線療法の例には、外部ビーム放射線療法、放射性同位体（I-125、パラジウム、イリジウム）、ストロンチウム-89等の放射性同位体の間質埋め込み、胸部放射線療法、腹腔内P-32放射線療法、ならびに／または全腹部および骨盤放射線療法が挙げられるが、これらに限定されない。放射線療法の一般概要については、Hellman, Chapter 16: Principles of Cancer Management: Radiation Therapy, 6th edition, 2001, DeVita et al., eds., J. B. Lippencott Company, Philadelphiaを参照されたい。放射線療法は、放射線が遠隔源から向けられる外部ビーム放射線または遠隔療法として施され得る。放射線治療は、放射性源ががん細胞または腫瘍塊に近接して体内に設置される内部療法または小線源療法として施される場合もある。ヘマトポルフィリンおよびその誘導体、ベルトポルフィン（BPD-MA）、フタロシアニン、感光剤Pc4、デメトキシーヒポクレリンA、ならびに2BA-2-DMHA等の感光剤の投与を含む光線力学的療法の使用も包含される。

【0510】

別の実施形態では、がん性細胞および／または組織を物理的に取り除くために外科的介入が行われ得る。

【0511】

なお別の実施形態では、ホルモン療法が使用される。ホルモン治療的治療は、例えば、ホルモンアゴニスト、ホルモンアンタゴニスト（例えば、フルタミド、ピカルタミド、タモキシフェン、ラロキシフェン、酢酸ロイプロリド（LUPRON）、LH-RHアンタゴニスト）、ホルモン生合成および処理阻害剤、ならびにステロイド（例えば、デキサメタゾン、レチノイド、デルトイド、ベータメタゾン、コルチゾール、コルチゾン、プレドニゾン、ジヒドロテストステロン、グルココルチコイド、ミネラルコルチコイド、エストロゲン、テストステロン、プロゲステン）、ビタミンA誘導体（例えば、オールトランス型レチノイン酸（ATRA））、ビタミンD3類似体、抗ゲスターゲン（例えば、ミフェプリストン、オナプリストン）、または抗アンドロゲン（例えば、酢酸シプロテロン）を含み得る。

10

【0512】

さらに別の実施形態では、身体組織が高温（最大106°F）に曝露される手技である温熱療法が使用される。熱は、細胞を損傷するか、またはそれらが生きるのに必要な物質をそれらから取り除くことによって腫瘍を縮小させる助けとなり得る。温熱療法は、外部および内部加熱デバイスを使用した局部、局所、および全身温熱療法であり得る。温熱療法は、ほとんどの場合、他の療法形態（例えば、放射線療法、化学療法、および生物学的療法）とともに使用されて、それらの有効性を向上させるよう試みる。局部温熱とは、腫瘍等の非常に小さい領域に適用される熱を指す。その領域は、体外のデバイスから腫瘍に向けられた高周波で外部から加熱され得る。内部加熱を達成するために、細い加熱ワイヤまたは温水が充填された中空管、埋め込み型マイクロ波アンテナ、および高周波電極を含む滅菌プローブのいくつかのタイプのうちの1つが使用され得る。局所温熱療法では、臓器または肢が加熱される。高エネルギーを生み出す磁石およびデバイスが加熱される領域上に配置される。灌流と呼ばれる別のアプローチでは、患者の血液のいくらかが取り除かれ、加熱され、その後、内部加熱される領域にポンプ注入（灌流）される。全身加熱は、全身に広がった転移がんを治療するために使用される。これは、温水毛布、温ワックス、誘導コイル（電気毛布中のもの等）、または熱チャンバ（大型インキュベーターと同様のもの）を使用して達成され得る。温熱療法は、放射線副作用または合併症の著しい増加を引き起こさない。しかしながら、皮膚に直接適用される熱は、治療される患者の約半数に不快感またはさらには著しい局所疼痛をもたらし得る。これは、通常は急速に治癒する水疱も引き起こし得る。

20

【0513】

なお別の実施形態では、光線力学的療法（別名、PDT、光線照射療法、光線療法、または光化学療法）が、いくつかのがんタイプの治療に使用される。これは、単細胞生物が特定のタイプの光に曝露されたときに感光剤として既知のある特定の化学物質がその生物を死滅させることができるという発見に基づいている。PDTは、感光剤と組み合わせて固定周波数レーザー光を使用することによってがん細胞を破壊する。PDTでは、感光剤は、血流に注射され、全身の細胞によって吸収される。この薬剤は、正常細胞で残存するよりも長い時間にわたってがん細胞で残存する。処理されたがん細胞がレーザー光に曝露されると、感光剤は光を吸収し、処理されたがん細胞を破壊する酸素の活性形態を産生する。露光は、感光剤の大半が健常細胞を去っているが、依然としてがん細胞中に存在しているときに生じるように、慎重に時間調節されなければならない。PDTで使用されるレーザー光は、光ファイバー（極細ガラスストランド）を通して方向付けられ得る。光ファイバーは、適切な量の光を送達するためにがんに近接して設置される。光ファイバーは、肺癌の治療の場合には気管支鏡を通して肺内に方向付けられ得、食道癌の治療の場合には内視鏡を通して食道内に方向付けられ得る。PDTの利点は、健常組織に最小限の損傷しか引き起こさないことである。しかしながら、現在使用されているレーザー光が約3センチメートル（1と1/8インチをわずかに超える）を超える組織を通過することができないため、PDTは、皮膚上もしくは皮膚真下または内臓器官の内膜上の腫瘍の治療に主に使用されている。光線力学的療法により、治療後6週間以上にわたって皮膚および目が光に敏感になる。患者は、直射日光および明るい室内照明を少なくとも6週間避けるよう忠

30

40

50

告される。患者が屋外に出なければならない場合、サングラスを含む防護衣類を着用しなければならない。PDTの他の一時的な副作用は、特定の領域の治療に関連しており、咳嗽、嚥下困難、腹痛、および痛みを伴う呼吸または息切れが含まれ得る。1995年12月、米国食品医薬品局（FDA）は、閉塞を引き起こしている食道癌およびレーザーのみでは満足に治療することができない食道癌の症状を緩和するためのポルフィマーナトリウムと呼ばれる感光剤またはPhotofrin（登録商標）を承認した。1998年1月、FDAは、通常の肺癌治療が適切ではない患者における早期非小細胞肺癌の治療のためにポルフィマーナトリウムを承認した。国立がん研究所および他の機関は、膀胱癌、脳癌、喉頭癌、および口腔癌を含むいくつかのがんタイプに対する光線力学的療法の使用を評価するための臨床試験（調査研究）を支援している。

【0514】

さらに別の実施形態では、レーザー療法は、高強度光を利用してがん細胞を破壊するために使用される。この技法は、多くの場合、特にがんが他の治療によって治癒されない場合に、出血または閉塞等のがんの症状を緩和するために使用される。この技法は、腫瘍を縮小または破壊することによってがんを治療するためにも使用され得る。「レーザー」という用語は、励起誘導放射による光増幅を表す。電球からの光等の常光は、多くの波長を有し、全ての方向に広がる。その一方で、レーザー光は、特定波長を有し、狭ビームに集中する。このタイプの高強度光は、多くのエネルギーを含んでいる。レーザーは、非常に強力であり、鋼鉄の切断またはダイヤモンドの成形に使用され得る。レーザーは、眼内の損傷網膜の修復または組織の切断（外科用メスの代わりに）等の非常に精密な外科的作業にも使用され得る。いくつかの異なる種類のレーザーが存在するが、医学分野で3種類のみが広く使用されている。二酸化炭素（CO₂）レーザー：このタイプのレーザーは、深層を貫通することなく皮膚表面から薄層を取り除くことができる。この技法は、皮膚の深部に広がっていない腫瘍およびある特定のながん性状態を治療する際に特に有用である。伝統的な外科用メス手術の代替案として、CO₂レーザーも皮膚を切断することができる。レーザーをこの方法で使用して、皮膚癌を取り除く。ネオジム：イットリウム-アルミニウム-ガーネット（Nd：YAG）レーザー：このレーザーからの光は、他のタイプのレーザーよりも深く組織に透過することができ、血液を素早く凝固させることができる。これは、光ファイバーを通じて身体の到達しにくい部分に運ばれ得る。このタイプのレーザーは、咽喉癌の治療に使用されることもある。アルゴンレーザー：このレーザーは、組織の表層のみを通過することができ、したがって、皮膚科学および眼の手術に有用である。これは、光線力学的療法（PDT）として既知の手技において腫瘍を治療するために感光性色素とともに使用される。レーザーは、以下を含む標準の手術道具に優るいくつかの利点を有する。レーザーは、外科用メスよりも精密である。周辺皮膚または他の組織とほとんど接触しないため、切開付近の組織が保護される。レーザーによって生成された熱が手術部位を滅菌するため、感染の危険性を低下させる。レーザーの精度がより小さい切開を可能にするため、より短い手術時間しか要しない場合がある。多くの場合、治療時間が短縮され、レーザー熱が血管を閉鎖するため、出血、腫脹、または瘢痕が軽減される。レーザー手術はあまり複雑ではない場合がある。例えば、光ファイバーを用いて、レーザー光は、大きく切開することなく、身体部分に方向付けられ得る。より多くの手技が外来で行われ得る。レーザーを2つの方法で使用して、すなわち、熱で腫瘍を縮小もしくは破壊することによって、またはがん細胞を破壊する感光剤として既知の化学物質を活性化することによって、がんを治療することができる。PDTでは、感光剤はがん細胞で保持され、がん細胞を死滅させる反応を引き起こす光によって刺激され得る。CO₂およびNd：YAGレーザーは、腫瘍を縮小または破壊するために使用される。これらは、医師が膀胱等の身体のある特定の領域を覗き込むことを可能にする管である内視鏡とともに使用され得る。いくつかのレーザーからの光は、光ファイバーを装着したフレキシブル内視鏡を通して伝達され得る。これにより、医師が手術を除いては別様に到達することのできない身体部分を見て作業することが可能になり、それ故に、レーザービームの非常に精密な照準が可能になる。レーザーは、低出力顕微鏡とともに使用される場合もあり、医師は治療を

10

20

30

40

50

されている部位をはっきりと見ることができる。他の器具とともに使用して、レーザーシステムは、極細糸の幅未満である直径最小200ミクロンの切断領域を生成することができる。レーザーは、多くのがんタイプを治療するために使用される。レーザー手術は、声門（声帯）癌、子宮頸癌、皮膚癌、肺癌、膣癌、外陰癌、および陰茎癌のある特定の病期に対する標準の治療である。がんを破壊するための使用に加えて、レーザー手術は、がんによって引き起こされる症状の緩和（緩和ケア）を助けるためにも使用される。例えば、レーザーを使用して、患者の気管（trachea）（気管（wind pipe））を封鎖している腫瘍を縮小または破壊し、呼吸を容易にすることができる。これは、結腸直腸癌および肛門癌の緩和に使用されることもある。レーザー誘起間質温熱療法（LITT）は、レーザー療法における最新の開発のうちの1つである。LITTは、熱が、細胞を損傷するか、またはそれらが生きるのに必要な物質をそれらから取り除くことによって腫瘍を縮小させる助けとなり得る、温熱療法と呼ばれるがん治療と同じ発想を使用する。この治療では、レーザーは、体内の間質領域（臓器間の領域）に方向付けられる。その後、レーザー光が腫瘍の温度を上昇させ、これにより、がん細胞が損傷または破壊される。

【0515】

療法を用いた治療の持続期間および／または用量は、特定の治療薬またはそれらの組み合わせによって異なり得る。当業者であれば、特定のがん治療薬の適切な治療時間を理解するであろう。本発明は、各がん治療薬の最適治療スケジュールの継続的な評価を企図し、ここで、本発明の方法によって決定される対象のがんの表現型が、最適治療用量およびスケジュールを決定する要因である。

【0516】

ポリヌクレオチドを哺乳動物、ヒト、もしくは非ヒト、またはそれらの細胞に導入するための任意の手段は、本発明の様々な構築物を対象とするレシピエントに送達するための本発明の実施に適応され得る。本発明の一実施形態では、DNA構築物は、トランスフェクションによって、すなわち、「ネイキッド」DNAの送達によって、またはでコロイド分散系との複合体で細胞に送達される。コロイド系には、巨大分子複合体、ナノカプセル、ミクロスフェア、ビーズ、および脂質ベースの系、例えば、水中油乳剤、ミセル、混合ミセル、およびリポソームが含まれる。本発明の好ましいコロイド系は、脂質複合体化DNAまたはリポソーム製剤化DNAである。前者のアプローチでは、例えば、脂質でのDNAの製剤化の前に、所望のDNA構築物を有するトランス遺伝子を含むプラスミドが発現（例えば、イントロンの5'非翻訳領域への包含および不要な配列の排除（Felgner, et al., Ann NY Acad Sci 126-139, 1995）について最初に実験的に最適化され得る。その後、例えば、様々な脂質またはリポソーム材料でのDNAの製剤化が、既知の方法および材料を使用して達成され得、レシピエント哺乳動物に送達され得る。例えば、Canonica et al, Am J Respir Cell Mol Biol 10:24-29, 1994、Tsan et al, Am J Physiol 268、Alton et al., Nat Genet. 5:135-142, 1993、および米国特許第5,679,647号（Carson et al.）を参照されたい。

【0517】

リポソームの標的は、解剖学的要因および機構的要因に基づいて分類され得る。解剖学的分類は、選択性レベル、例えば、臓器特異的、細胞特異的、および細胞小器官特異的に基づいている。機構的標的は、それが受動的であるか能動的であるかに基づいて区別され得る。受動的標的は、洞様毛細血管を含む臓器内の細網内皮系（RES）の細胞に分布するリポソームの生来の傾向を利用する。その一方で、能動的標的は、天然に存在する局在化部位以外の臓器および細胞型への標的を達成するために、リポソームをモノクローナル抗体、糖、糖脂質、もしくはタンパク質等の特異的リガンドに結合することによる、またはリポソームの組成またはサイズを変化させることによるリポソームの改変を伴う。

【0518】

標的とされた送達系の表面は、様々な方法で修飾され得る。リポソーム標的送達系の場合

合、脂質基は、標的リガンドをリポソーム二重層と安定した会合で維持するために、リポソームの脂質二重層に組み込まれ得る。脂質鎖を標的リガンドに連結するために様々な連結基が使用され得る。送達ビヒクル、例えば、リポソームと会合したネイキッドDNAまたはDNAは、対象におけるいくつかの部位に投与され得る（以下を参照のこと）。

【0519】

核酸は、任意の所望のベクターで送達され得る。これらには、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクター、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、およびプラスミドベクターを含むウイルスまたは非ウイルスベクターが含まれる。例示のウイルスタイプには、HSV（単純ヘルペスウイルス）、AAV（アデノ随伴ウイルス）、HIV（ヒト免疫不全ウイルス）、BIV（ウシ免疫不全ウイルス）、およびMLV（マウス白血病ウイルス）が挙げられる。核酸は、十分に効率的な送達レベルを提供する任意の所望の形式で、例えば、ウイルス粒子、リポソーム、ナノ粒子で投与され、ポリマーに複合体化され得る。

【0520】

目的とするタンパク質または核酸をコードする核酸は、プラスミドもしくはウイルスベクター、または当該技術分野で既知の他のベクターに存在し得る。かかるベクターは周知であり、任意のベクターが特定の用途のために選択され得る。本発明の一実施形態では、遺伝子送達ビヒクルは、プロモーターおよびデメチラーゼコーディング配列を含む。好ましいプロモーターは、組織特異的プロモーターおよび細胞増殖によって活性化されるプロモーター、例えば、チミジンキナーゼおよびチミジル酸シンターゼプロモーターである。他の好ましいプロモーターには、ウイルス感染によって活性化可能なプロモーター、例えば、 α -および β -インターフェロンプロモーター、ならびにエストロゲン等のホルモンによって活性化可能なプロモーターが含まれる。使用され得る他のプロモーターには、モロニーウイルスLTR、CMVプロモーター、およびマウスアルブミンプロモーターが含まれる。プロモーターは、構成的または誘導性であり得る。

【0521】

別の実施形態では、ネイキッドポリヌクレオチド分子が、WO90/11092および米国特許第5,580,859号に記載されるように遺伝子送達ビヒクルとして使用される。かかる遺伝子送達ビヒクルは、成長因子DNAまたはRNAのいずれかであり得、ある特定の実施形態では、死滅アデノウイルスに連結される。Curriel et al., Hum. Gene Ther. 3:147-154, 1992。任意に使用され得る他のビヒクルには、DNA-リガンド (Wu et al., J. Biol. Chem. 264:16985-16987, 1989)、脂質-DNA組み合わせ (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-7417, 1989)、リポソーム (Wang et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 84:7851-7855, 1987)、およびマイクロプロジェクティル (Williams et al., Proc. Natl. Acad. Sci. 88:2726-2730, 1991) が含まれる。

【0522】

遺伝子送達ビヒクルは、ウイルス複製起源またはパッケージングシグナル等のウイルス配列を任意に含み得る。これらのウイルス配列は、アストロウイルス、コロナウイルス、オルトミクソウイルス、パポバウイルス、パラミクソウイルス、パルボウイルス、ピコルナウイルス、ポックスウイルス、レトロウイルス、トガウイルス、またはアデノウイルス等のウイルスから選択され得る。好ましい実施形態では、成長因子遺伝子送達ビヒクルは、組換えレトロウイルスベクターである。組換えレトロウイルスおよびその様々な使用が、多数の参考文献、例えば、Mann et al., Cell 33:153, 1983, Cane and Mulligan, Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 81:6349, 1984, Miller et al., Human Gene Therapy 1:5-14, 1990、米国特許第4,405,712号、同第4,861,719号、および同第4,980,289号、ならびにPCT出願第WO89/02,

468号、同第WO89/05,349号、および同第WO90/02,806号に記載されている。例えば、EP0,415,731、WO90/07936、WO94/03622、WO93/25698、WO93/25234、米国特許第5,219,740号、WO9311230、WO9310218、Vile and Hart, Cancer Res. 53:3860-3864, 1993、Vile and Hart, Cancer Res. 53:962-967, 1993、Ram et al., Cancer Res. 53:83-88, 1993、Takamiya et al., J. Neurosci. Res. 33:493-503, 1992、Baba et al., J. Neurosurg. 79:729-735, 1993 (米国特許第4,777,127号、GB2,200,651、EP0,345,242、およびWO91/02805)に記載のものを含む、多数のレトロウイルス遺伝子送達ビヒクルが本発明で利用され得る。

10

【0523】

本発明のポリヌクレオチドを送達するために使用され得る他のウイルスベクター系は、ヘルペスウイルス、例えば、単純ヘルペスウイルス (米国特許第5,631,236号 (Woo et al., 1997年5月20日発行) およびWO00/08191 (Neurovex))、ワクチニアウイルス (Ridgeway (1988) Ridgeway, "Mammalian expression vectors," In: Rodriguez R L, Denhardt D T, ed. Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses. Stoneham: Butterworth, Baichwal and Sugden (1986) "Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes," In: Kuc herlapati R, ed. Gene transfer. New York: Plenum Press, Coupar et al. (1988) Gene, 68:1-10)、およびいくつかのRNAウイルスに由来している。好ましいウイルスには、アルファウイルス、ポキシウイルス、アレナウイルス、ワクチニアウイルス、ポリオウイルス等が含まれる。それらは、様々な哺乳類細胞にいくつかの魅力的な特徴を提供する (Friedmann (1989) Science, 244:1275-1281、Ridgeway, 1988 (上記参照)、Baichwal and Sugden, 1986 (上記参照)、Coupar et al. 1988、Horwich et al. (1990) J. Virol., 64:642-650)。

20

30

【0524】

他の実施形態では、ゲノム中の標的DNAは、当該技術分野で周知の方法を使用して操作され得る。例えば、ゲノム中の標的DNAは、欠失、挿入、および/または突然変異によって操作され得、これらは、レトロウイルス挿入、人工染色体技法、遺伝子挿入、組織特異的プロモーターによるランダム挿入、遺伝子標的、転移性因子、および/または外来DNAを導入するためのまたは修飾DNA/修飾核DNAを産生するための任意の他の方法である。他の修飾技法は、DNA配列をゲノムから欠失させることおよび/または核DNA配列を改変することを含む。例えば、核DNA配列は、部位特異的突然変異誘発によって改変され得る。

40

【0525】

他の実施形態では、組換えバイオマーカーポリペプチドおよびその断片が対象に投与され得る。いくつかの実施形態では、増強された生物学的特性を有する融合タンパク質が構築および投与され得る。加えて、バイオマーカーポリペプチドおよびその断片は、増加したバイオアベイラビリティおよび減少したタンパク質分解等の望ましい生物学的活性をさらに増強するために、当該技術分野で周知の薬理学的的方法 (例えば、ペグ化、グリコシル化、オリゴマー化等) に従って修飾され得る。

【0526】

臨床的有效性

50

臨床的有効性は、当該技術分野で既知の任意の方法によって測定され得る。例えば、抗 H H L A 2 抗体療法等の療法に対する応答は、がん、例えば、腫瘍のその療法に対する任意の応答、好ましくは、ネオアジュバントまたはアジュバント化学療法の開始後の腫瘍質量および／または体積の変化に関連する。腫瘍応答は、C T、P E T、マンモグラム、超音波、または触診によって測定される全身介入後の腫瘍サイズが初期サイズおよび寸法と比較され得るネオアジュバントまたはアジュバント状況下で評価され得、腫瘍の細胞充実度が組織学的に推定され得、治療開始前に採取された腫瘍生検の細胞充実度と比較され得る。応答は、生検または外科的切除後の腫瘍のキャリパー測定または病理学的試験によっても評価され得る。応答は、腫瘍体積もしくは細胞充実度のパーセンテージ変化等の定量様式で記録され得るか、または残留がん組織量等の半定量スコア化システム (S y m m a n s e t a l . , J . C l i n . O n c o l . (2 0 0 7) 2 5 : 4 4 1 4 - 4 4 2 2) もしくはミラー・ペインスコア (O g s t o n e t a l . , (2 0 0 3) B r e a s t (E d i n b u r g h , S c o t l a n d) 1 2 : 3 2 0 - 3 2 7) を使用して、「病理学的完全応答」(p C R)、「臨床的完全寛解」(c C R)、「臨床的部分寛解」(c P R)、「臨床的安定疾患」(c S D)、「臨床的進行性疾患」(c P D)、または他の質的基準等の質的様式で記録され得る。腫瘍応答の評価は、ネオアジュバントまたはアジュバント療法の開始後早期に、例えば、数時間後、数日後、数週間後、または好ましくは数ヶ月後に行われ得る。応答評価の典型的なエンドポイントは、ネオアジュバント化学療法の終了時または残留腫瘍細胞および／もしくは腫瘍床の外科的除去時である。

【0527】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載の治療的治療の臨床的有効性は、臨床的有用率 (C B R) を測定することによって決定され得る。臨床的有用率は、療法終了の少なくとも6ヶ月後の時点での完全寛解 (C R) にある患者のパーセンテージ、部分寛解 (P R) にある患者の数、および安定疾患 (S D) を有する患者の数の合計を決定することによって測定される。この公式の省略表現は、6ヶ月にわたる $C B R = C R + P R + S D$ である。いくつかの実施形態では、特定の抗免疫チェックポイント治療レジメンの C B R は、少なくとも25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、またはそれ以上である。

【0528】

抗免疫チェックポイント療法に対する応答を評価するための追加の基準は、「生存期間」に関連し、これには、死亡までの生存期間、別名、全生存期間 (当該死亡は、原因を問わないか、または腫瘍関連のいずれかであり得る)、「無再発生存期間」 (再発という用語は、局所再発および遠隔再発の両方を含むものとする)、無転移生存期間、無病生存期間 (病という用語は、がんおよびそれに関連する疾患を含むものとする) の全てが含まれる。当該生存期間の長さは、定義された開始点 (例えば、診断時または治療開始時) および終了点 (例えば、死、再発、または転移) を参照することによって計算され得る。加えて、治療有効性についての基準は、化学療法に対する応答、生存確率、所与の期間以内の転移確率、および腫瘍再発確率を含むように拡大され得る。

【0529】

例えば、適切な閾値を決定するために、特定の抗がん治療レジメンが対象集団に投与され得、転帰が任意の抗免疫チェックポイント療法の投与前に決定されたバイオマーカー測定値と相関付けられ得る。転帰測定値は、ネオアジュバント状況で施される療法に対する病理学的応答であり得る。あるいは、バイオマーカー測定値が既知である抗免疫チェックポイント療法後の対象について、全生存期間および無病生存期間等の転帰測定値がある期間にわたって監視され得る。ある特定の実施形態では、同じ用量の抗免疫チェックポイント薬剤が各対象に投与される。関連実施形態では、投与される用量は、抗免疫チェックポイント薬剤の当該技術分野で既知の標準用量である。対象が監視される期間は異なり得る。例えば、対象は、少なくとも2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55、または60ヶ月間監視され得る。抗免疫チェックポイント療法の転帰と相関するバイオマーカー測定閾値は、実施例の節に記載の方

法等の方法を使用して決定され得る。

【0530】

X I I I . キット

加えて、本発明は、生体試料中のHHLA2ポリペプチドまたはその断片の存在を検出するためのキットも包含する。例えば、キットは、生体試料中のHHLA2ポリペプチドまたはその断片を検出することができる標識化合物または薬剤、試料中のHHLA2ポリペプチドまたはその断片の量を決定するための手段、および試料中のHHLA2ポリペプチドまたはその断片の量を標準と比較するための手段を含み得る。化合物または薬剤は、好適な容器内にパッケージングされ得る。例えば、本発明は、本明細書に記載の少なくとも1つの抗体を含むキットを提供する。本発明の抗体を含むキットは、HHLA2の検出または治療もしくは診断アッセイで使用され得る。本発明のキットは、固体支持体、例えば、組織培養プレートまたはビーズ（例えば、セファロースビーズ）に結合した抗体を含み得る。

10

【0531】

キットは、キットが設計される特定の用途を容易にするために追加の成分を含み得る。例えば、インビトロでの、例えば、ELISAまたはウエスタンブロットでのHHLA2の検出および定量化のための抗体を含むキットが提供され得る。キットが含み得る追加の例示の薬剤には、標識を検出する手段（例えば、酵素標識のための酵素基質、蛍光標識を検出するためのフィルターセット、ヒツジ抗マウス-HRP等の適切な二次標識等）および対照に必要な試薬（例えば、対照生体試料またはHHLA2タンパク質標準）が挙げられる。キットは、開示される本発明の方法での使用が認められている緩衝液および他の試薬をさらに含み得る。非限定的な例には、担体タンパク質または洗剤等の非特異的結合を減少させる薬剤が挙げられる。本発明のキットは、本明細書に提供される開示される本発明の方法における開示される本発明のキットまたは抗体の使用を開示または記載する教材も含み得る。

20

【0532】

本発明は、以下の実施例によってさらに例証され、これらは、限定するものと解釈されるべきではない。本明細書を通じて引用される全ての参考文献、特許、および公開された特許出願の内容、ならびに図面は、参照により本明細書に組み込まれる。

【実施例】

30

【0533】

実施例1：抗ヒトHHLA2モノクローナル抗体の誘導

いくつかの抗HHLA2モノクローナル抗体を生成および分析した。簡潔には、マウスモノクローナル抗体の免疫化および生成前にヒトHHLA2-mIgG2a融合タンパク質を産生した。ヒトHHLA2のコーディング領域を、プライマー5'-TGTTCTGCACAAGACA-3'（ATG開始のすぐ5'側に位置するセンスプライマー）および5'-GTAAGGATGCAGGTCATGAGT-3'（終止コドンのすぐ3'側に位置する抗センスプライマー）を使用してPCR増幅し、TAクローニングによりpEF6ベクターに導入した。HHLA2-mIgG2a融合タンパク質を、cDNAのHHLA2細胞外ドメインをマウスIgG2aヒンジおよびFcドメイン（Fc受容体への結合を減少させる突然変異を有する）に融合させ、pEF6ベクターにクローニングすることによって作製した。構築物をCHO細胞に導入し、HHLA2-mIgG2a融合タンパク質をタンパク質Gカラム上で親和性クロマトグラフィーにより精製した。

40

【0534】

4～6週間齢の5匹のマウス（Balb/c、C57BL/6、Swiss-Webster）をCharles River Laboratories（Wilmington, MA）から入手した。全ての動物を、Institutional Animal Care and Use Committee of Harvard Standing Committee on Animalsのガイドラインに従って入手および維持した。

【0535】

50

初回免疫化のために、50マイクログラムの組換えHHLA2-mIgG2a融合タンパク質をダルベッコリン酸緩衝生理食塩水（PBS、GIBCO, Grand Island, NY）中に懸濁し、等体積の完全フロイントアジュバント（Sigma Chemical Co., St. Louis, MO）で乳化した。マウスを、リンパ節が見られる5つの皮下部位（鼠径、腕、腋窩、および浅頸）への乳剤の注射によって、かつ腹腔内で免疫した。初回免疫化の14日後に、マウスを、等体積の不完全フロイントアジュバントで乳化した50マイクログラムの組換えHHLA2-mIgG2a融合タンパク質で腹腔内追加免疫した。14日後、マウスを、等体積の不完全フロイントアジュバントで乳化した50マイクログラムの組換えHHLA2-mIgG2a融合タンパク質で腹腔内追加免疫した。42日後、マウスを、等体積の不完全フロイントアジュバントで乳化した50マイクログラムの組換えHHLA2-mIgG2a融合タンパク質および50マイクログラムの変性組換えHHLA2-mIgG2a融合タンパク質で腹腔内追加免疫した。タンパク質を、0.1%ドデシル硫酸ナトリウムの存在下で5分間沸騰させることによって変性させた。13日後、マウスを、等体積の不完全フロイントアジュバントで乳化した50マイクログラムの組換えHHLA2-mIgG2a融合タンパク質および50マイクログラムの変性組換えHHLA2-mIgG2a融合タンパク質で腹腔内追加免疫した。追加免疫の10～12日後に少量の血液を収集した。HHLA2に対する血清活性を、HHLA2 cDNAでトランスフェクトされた300.19細胞およびトランスフェクトされていない300.19細胞上でフローサイトメトリーにより滴定した。36日目に、マウスを最後に50マイクログラムの変性組換えHHLA2-mIgG2a融合タンパク質で腹腔内および静脈内追加免疫した。

【0536】

最も高い滴定量を有するマウス番号5を、4日後の融合のために選択した。採取した脾臓およびリンパ節を細胞懸濁液にし、その後、DMEMで洗浄した。脾臓／リンパ節細胞を計数し、2：1の脾臓：骨髓腫比を使用して、重鎖免疫グロブリン鎖も軽鎖免疫グロブリン鎖もいずれも分泌することができないSP 2／0骨髓腫細胞と混合した（Kearney et al. (1979) J. Immunol. 123:1548-1550およびKilpatrick et al. (1997) Hybridoma 16:381-389）。細胞を、標準手順（Kohler and Milstein (1975) Nature 256:495-497）に従ってHAT選択培地中の8個の96ウェル組織培養プレート内でポリエチレングリコール1450と融合させた。

【0537】

融合の10～21日後、ハイブリドーマコロニーが可視になり、培養上清を収集し、その後、HHLA2 cDNAでトランスフェクトされた300.19細胞上でフローサイトメトリーによってHHLA2に対して、かつトランスフェクトされていない300.19細胞上で反応性の欠如に対してスクリーニングした。

【0538】

実施例2：抗HHLA2抗体

いくつかの抗HHLA2 mAbを配列決定して、それらのCDR領域を分析した。簡潔には、RACE（cDNA末端迅速増幅）を行い、vHおよびvLのDNAを増幅した（mRNA変性、cDNA合成、5' RACE反応、およびPCR結果の分析）。陽性クローンを特定するために、PCR反応試料をアガロースゲル上で分析して、増幅DNA断片を可視化した。正しい抗体可変領域DNA断片は、500～700塩基対のサイズを有するはずである。PCR陽性バンドをTOPOクローニングし、その後、PCR増幅した後、ゲル電気泳動、アガロースゲルからの回収、および配列決定を行った。配列決定データを使用してCDR分析を行った（VBASE2を使用してCDR領域を定義、vbase2.org／のワールドワイドウェブを参照のこと）。

【0539】

表2は、mAb配列決定の結果を列記する。抗体の軽鎖は、カップ型である。マウス抗体8A12、8D2、および1C8は、IgG2aアイソタイプであり、2C4、5H4

、6 G 8、6 D 1 0、2 G 2、4 D 1、4 E 5、および6 F 1 0は、I g G 1アイソタイプである。

【0540】

新たに特定された抗HHLA2抗体を、インビトロ結合およびTMIGD2遮断について特徴付けた。

【0541】

具体的には、各抗HHLA2抗体の結合親和性をアッセイした。HHLA2 cDNAおよびピューロマイシン耐性をコードするベクターを、電気穿孔（300ボルト、1600マイクロファラッド）によりマウス300.19細胞に同時トランスフェクトし、5 μg/mLのピューロマイシンを含有する培地で選択した。HHLA2を発現する細胞を、TMIGD2-ヒトFc融合タンパク質での染色により特定し、フィコエリトリンにコンジュゲートされたヤギ抗ヒトFc抗体および単一細胞をフローサイトメトリーにより選別した。個々のクローンでのHHLA2の発現を、上述のようにフローサイトメトリーによって確認した。HHLA2トランスフェクト300.19細胞を抗HHLA2 mAbで滴定した（図1A）。

【0542】

図1Bは、フローサイトメトリーによるTMIGD2遮断の評価結果を示す。簡潔には、ヒトHHLA2細胞でトランスフェクトされた300.19細胞へのTMIGD2-ヒトIgGの結合の抗HHLA2 mAb遮断についてのアッセイを行った。例えば、96ウェル丸底プレートの1ウェルあたり20 μL（25,000個の300.19細胞と同等）のヒトHHLA2で安定してトランスフェクトされた300.19細胞を添加した。1ウェルあたり50 μLの抗体であった。未希釈物、1～10倍希釈物、および1～100倍希釈物をアッセイした。細胞を上下にピペットして細胞をmAb中に再懸濁し、回転台上で混合しながら4℃で30分間インキュベートした。FACS緩衝液（PBS+2% FBS、0.02%アジド）中20 μLの2 μg/mLヒトTMIGD2-ヒトIgG1融合タンパク質（R&D Systemsカタログ番号8316-TR-050）を各ウェルに添加した。TMIGD2-hIgGを有しない細胞の陰性対照ウェルおよびマウスIgGアイソタイプ対照を有するTMIGD2の陽性対照を含めた。プレートを混合しながら4℃で30分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液中で2回洗浄し、上清を除去した。50 μLの2.5 μg/mL第2の抗体（マウスIgに対して交差吸収されたFab2ヤギ抗ヒト-IgG-PE、Southern Biotech 2043-09）を各ウェルに添加した。細胞を上下に3回ピペットして細胞をAb中に再懸濁し、混合しながら4℃で30分間インキュベートした。細胞をFACS緩衝液中で2回洗浄し、上清を除去した。細胞を80 μLのPBS+2%ホルムアルデヒド中に再懸濁し、結合をFACS機で分析した。FACS緩衝液（PBS+2% FBS、0.02%アジド）を使用した。

【0543】

図2は、抗HHLA2モノクローナル抗体8D2を使用して分析したヒト腫瘍細胞株のウェスタンブロッティング結果を示す。簡潔には、タンパク質溶解物を製造業者（Thermo Scientific）の指示に従ってRIPA緩衝液で調製し、溶解物の調製前にプロテアーゼ阻害剤カクテルを緩衝液（complete Ultra tabletts、小型、EDTAフリー、Roche）に添加した。タンパク質溶解物を、ヒトHHLA2で安定してトランスフェクトされた300.19細胞および示されるヒト腫瘍細胞株から作製した。L428およびHDLM2は、ホジキンリンパ腫細胞株であり、OC1-Ly1は、B細胞非ホジキンリンパ腫（びまん性大細胞）細胞株であり、Rajiは、バーキットリンパ腫細胞株であり、Jurkat E6は、T細胞白血病細胞株であり、THP-1は、急性単球性白血病細胞株であり、MDA231およびSKBRは、乳房腫瘍細胞株であり、CAKI2は、ヒト明細胞腎細胞癌（ccRCC）細胞株である。80 μgの溶解物を4～15%勾配ミニプロティアンTGXゲル（BioRad）に装填し、半乾燥法によって移動させた。膜を、Tween20（TBST）、12%無脂肪乳、およ

10

20

30

40

50

び1%正常ヤギ血清を有するTris緩衝生理食塩水で、室温で1時間遮断した。膜をTBSTで洗浄し、一次抗体(TBSTおよび1%BSA中最終濃度1 μ g/mLの抗HHLA2 mAb 499.5.8D2)と4℃で一晩インキュベートした。膜を室温のTBSTで3回洗浄し、二次抗体(1:4000、西洋ワサビコンジュゲートヤギ抗マウスIgG HRP抗体、Southern Biotechカタログ番号1030-05)と、TBST、6%無脂肪乳、および0.5%正常ヤギ血清中で30分間インキュベートした。TBSTでさらに3回洗浄した後、1:1比のECL基質:エンハンサーを膜に添加し(SuperSignal West Pico Stable Peroxide Solution、Supersignal West Pico Luminol/Enhancer Solution、ThermoScientific)、Hyblot CLオートラジオグラフィフィルム(Denville Scientific)上で画像化した。

10

【0544】

実施例3:正常組織およびがん組織におけるHHLA2 mRNA発現

図3は、正常腎臓に対する腎臓癌における他のチェックポイント阻害剤と比較したHHLA2 mRNA発現の結果を示す。正常腎臓および腎臓腫瘍における示されるB7ファミリーメンバー免疫受容体および腫瘍浸潤白血球の発現を、TCGAデータベースからのRNAseqデータを正規化することによって評価した。正常組織と比較して腫瘍において増加した受容体発現が、PD-L1、PD-L2、B7-H3、VISTA、およびHHLA2で観察された。正常組織と比較して腫瘍において増加したレベルもCD8+およびCD14+腫瘍浸潤細胞で観察された。

20

【0545】

同様に、図4は、TCGAデータベースからの様々ながんにおけるHHLA2発現の結果を示す(図4)。簡潔には、様々ながんタイプにおけるHHLA2の発現プロファイルを、RNAseq分析によるTCGAデータベース(National Cancer Institute's Center for Cancer Genomics and the National Human Genome Research Instituteによる監督)を使用して調査した。図4に示されるように、HHLA2は、明細胞および乳頭状腎細胞癌、肺腺癌、結腸直腸癌、および膵臓癌で高レベル(太字イタリック体)で発現し、AML、子宮頸癌、頭頸部癌、肝臓癌、卵巣癌、前立腺癌、睾丸癌、および肺扁平上皮癌で中程度に発現する。

30

【0546】

図5は、HHLA2陽性および陰性細胞株腎臓癌腫瘍アレイ等における免疫組織化学によるHHLA2発現の結果を示す。腎臓癌腫瘍アレイおよび細胞株におけるHHLA2発現を免疫組織化学によって検出した。再水和パラフィン包埋組織切片および細胞株切片を、圧力鍋(Biocare Medical)を用いてEDTA緩衝液(pH8)(Life Technologies)中で、125℃で30秒間煮沸した。室温に冷却した後、組織切片をペルオキシダーゼ遮断溶液(二重内因性酵素遮断溶液、Dako)およびタンパク質遮断溶液(無血清遮断溶液、Dako)と室温で各々5分間連続してインキュベートした。次に、切片を抗体希釈剤中バックグラウンド低減成分(Dako)で希釈したマウス抗HHLA-2抗体(1/100、クローン8D2)と室温で1時間インキュベートした。その後、組織切片をEnVision(登録商標)抗マウス西洋ワサビ(HRP)コンジュゲート抗体(Dako)と室温で30分間インキュベートした。3,3'-ジアミノベンジジン基質(DAB+、Dako)を適用することによってHRP視覚化を行った。各ステップ間で、タンパク質遮断ステップおよび一次抗体インキュベーションステップの免除時に、組織切片を洗浄緩衝液(0.1mM Tris(pH7.4)+0.05%Tween 20)中で5分間洗浄した。核をヘマトキシリンで対比染色した(図5A~5D)。

40

【0547】

図11は、HHLA2およびPD-L1免疫染色研究(Cheng et al. (20

50

18) Clin. Cancer Res. 24:1954-1964) に基づいて計算したPD-L1陽性および陰性非小細胞肺癌におけるHHLA2発現のパーセンテージを示す。全NSCLC集団の63%がHHLA2で標的可能であることが示された。

【0548】

実施例4：HHLA2受容体の特定

HHLA2は、TMIGD2に対する特異的リガンドとして特定されており、HHLA2/TMIGD2相互作用は、AKT依存性シグナル伝達カスケードを介してヒトT細胞成長およびサイトカイン産生を選択的に共刺激する(Zhu et al. (2013) Nat. Comm. 4:2043、Janakiram et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2359-2366)。共阻害機能を果たす活性化T細胞におけるHHLA2に対する第2の受容体がいくつかの研究によって示唆されている(Zhao et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 110:9879-9884、Xiao and Freeman et al. (2015) Clin. Cancer Res. 21:2201-2203、Wang et al. (2014) J. Immunol. 192:126.11)。本研究では、TMIGD2のHHLA2への結合を確認し、新たなHHLA2受容体であるKIR3DL3が特定された。簡潔には、HEK293細胞上で発現され、かつ細胞マイクロアレイ技術(Retrogenix, Whaley Bridge, UK)を使用してスライド上にインプリントされた3,500個超の異なる原形質膜タンパク質を包含する4500個超の全長クローンのライブラリを、可溶性ヒトHHLA2-mIg融合タンパク質への結合について評価した。

【0549】

フルスクリーンの開始前に結合のアッセイ条件を最初に発生させた。陽性対照受容体TMIGD2または陰性対照EGFRトランスフェクト細胞または非トランスフェクト細胞でインプリントされたスライドを、2:1のモル比でHHLA2-mIgG2aと予め複合体化されたか、または連続して添加されたかのいずれかのAF647標識抗マウスIgG検出抗体で検出された、2、10、および20ug/mLの濃度で可溶性HHLA2-mIgG2aへの特異的結合について評価した。

【0550】

一次スクリーニングについて、各々全長ヒト原形質膜タンパク質をコードする4,500個超の発現ベクターを、それぞれ、13個のマイクロアレイスライド(「スライドセット」)にわたって二連でアレイした。

【0551】

発現ベクター(pIRES-hEGFR-IRES-ZsGreen1)を全てのスライド上で四連でスポッティングし、これを使用して、全てのスライド上でトランスフェクション効率の最小閾値が達成または超過されたことを確実にした。この最小閾値(1.5のバックグラウンドにわたるpIRES-EGFR-ZsGreen1ベクターからの平均ZsGreen1シグナル)は以前に定義されている。

【0552】

ヒトHHLA2-mIgG2a融合タンパク質を固定トランスフェクトHEK293細胞スライドのスライドに20ug/mLの濃度で添加し、タンパク質をAF647標識抗マウスIgG検出抗体で検出した。2つの複製スライドを13個のスライドセット毎にスクリーニングした。蛍光画像を、ImageQuantソフトウェア(GE)を使用して分析および定量した(トランスフェクション効率について)。タンパク質「ヒット」を、バックグラウンドレベルと比較して上昇したシグナルを示す重複スポットとして定義した。これを、ImageQuantソフトウェア上にグリッドされた画像を使用して目視検査によって達成した。

【0553】

重複スポットの強度に応じて、ヒットを、「強い、中間、弱い、または非常に弱い」に分類した。2つの一次スクリーンの一方または両方で特定されたヒットをコードする全て

10

20

30

40

50

のベクターを配列決定して、それらの同一性を二重確認した。

【0554】

どのヒット（複数可）（存在する場合）が再現可能であり、かつヒトHHLA2に特異的であるかを決定するために、一次ヒットをコードする全てのベクター、および適切な対照KIR受容体を新たなスライド上にアレイした。同一のスライドを、一次スクリーンで使用した用量およびインキュベーション条件を使用して、各試験リガンドでスクリーニングし、適切な陽性および陰性対照（n=1処理あたり2つのスライド）でスクリーニングした。

【0555】

可溶性HHLA2-mIgG2aを使用した4500個超の全長細胞表面受容体クローンのスクリーニングにより、KIR3DL3をHHLA2結合のヒットとして特定した。二連での約300個の原形質膜クローンの代表的なセットのスクリーニング結果を図6Aに示す。HHLA2-mIgG2aの不在下でのAF647標識抗マウスIgG検出抗体の添加はシグナルを生成しなかった。

【0556】

新たにアレイされたスライド上の確認スクリーンは、HHLA2のKIR3DL3への結合を示した（図6A）。HHLA2-mIgG2aの不在下でのAF647標識抗マウスIgG検出抗体のみの添加はシグナルを生成しなかった。HHLA2のKIR3DL3への結合の選択性を、スライド上にアレイされた14個のKIR受容体を使用して評価した。HHLA2のKIR3DL3への選択的結合が実証された（表4および図6B～6C）。

【表4】

表4

KIR 受容体	KIR3 DL3	KIR2 DL1	KIR2 DL2	KIR2 DL3	KIR2 DL4	KIR2 DL5A	KIR2 DL5B	KIR2 DS1	KIR2 DS2	KIR2 DS3	KIR2 DS5	KIR3 DL1	KIR3 DS1	KIR3 DL2
HHLA 2 結合	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【0557】

実施例5：抗ヒトHHLA2 mAbの免疫チェックポイント阻害を確認するためのT細胞活性化アッセイ

A. プラスミドの構築

膜アンカーキメラ抗体であるTCR活性化因子を、抗ヒトCD3 mAb OKT3（Kipriyanov et al. (1997) PDS 10:445-453）の一本鎖可変断片（scFv）を、ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、および細胞質ドメインを含むマウスCD8α（受入番号：NP_001074579.1）のC末端ドメイン（残基113～220）に融合させることによって構築した。これを行うことにより、抗CD3 scFvがT細胞活性化因子としてCHO-K1細胞表面にアンカーされた。TCR活性化因子をコードするDNA配列を合成し、pIRES-hyg3ベクター（Clontech）に挿入して、結果として得られる構築物TCRα pIREShyg3を作製した。

【0558】

ヒトHHLA2（受入番号：NP_009003.1およびTMIGD2（受入番号：NM_144615.2）のDNA配列をpIRES-Hyg3またはpIRES-Neo3に個別にクローニングして、それぞれ、HHLA2_pIRESneo3およびTMIGD2_pIREShyg3を作製した。KIR3DL3（受入番号：BC143802.1、Genecopoeia社製）のDNA配列を合成し、puroEIF2ベクターに挿入した。

【0559】

NFATレポーターは、NFAT応答要素の4つのコピーの制御下で蛍ルシフェラーゼ

遺伝子を含み、その後最小プロモーターが続く。IL2レポーターは、内因性IL2プロモーターの制御下で蛍光シフェラーゼ遺伝子を含む。これらのレポーターをコードするDNA配列をp cDNA 3.1に挿入して、NFAT-Luc-p cDNAおよびIL2-Luc-p cDNAを生成した。

【0560】

B. 細胞株および細胞培養

親Jurkat（クローンE6-1）（ATCC番号TIB-152）細胞およびCHO-K1（ATCC番号CCL-61）細胞をATCCから入手した。Jurkat細胞を、10% FBS（Life Technologies番号26140-079）および1% ペニシリン／ストレプトマイシン（Hyclone番号SV30010.01）を補充したRPMI 1640培地（Life Technologies番号A10491-01）を使用して、37℃／5% CO₂で培養した。

【0561】

TMIGD2-NFAT-Jurkat安定細胞株培養物に1000 μg/mLのジェネティシン（Life Technologies番号11811031）および200 μg/mLのハイグロマイシン（Invitrogen番号10687010）を補充して、TMIGD2およびNFATレポーターの組換え発現が維持されることを確実にした。

【0562】

KIR3DL3-IL2-Jurkat安定細胞株培養物に1000 μg/mLのジェネティシンおよび250 ng/mLのピューロマイシン（InvivoGen番号ant-pr-1）を補充して、KIR3DL3およびIL-2レポーターの組換え発現が維持されることを確実にした。

【0563】

CHO細胞を、10% FBSおよび1% ペニシリン／ストレプトマイシンを補充したF12-K（Hyclone番号SH30526.01）培地中で維持した。HHLA2-TCR-CHO安定細胞株培養物に1000 μg/mLのジェネティシンおよび500 μg/mLのハイグロマイシンを補充して、HHLA2およびTCR活性化因子の組換え発現が維持されることを確実にした。

【0564】

C. JurkatレポーターおよびCHO安定細胞株の生成

Jurkatクローン：TMIGD2-NFAT-Jurkat安定細胞株を作製するために、Jurkat細胞（クローンE6-1）を電気穿孔によってNFAT__Luc__p cDNAおよびTMIGD2__p IRES Hyg 3で順次に同時トランスフェクトした。安定したクローンをハイグロマイシンならびにG418二重選択および限界希釈によって生成した。選択された安定した細胞クローンを、ハイグロマイシンおよびG418を補充した完全細胞培養培地で維持した。細胞をRPMI+10% FBS+1% P/S+1000 μg/mLのG418+200 μg/mLのハイグロマイシン中で維持した。

【0565】

KIR3DL3-IL2-Jurkat安定細胞株を作製するために、Jurkat細胞（クローンE6-1）を電気穿孔によってIL2__Luc__p cDNAおよびKIR3DL3__puroで順次に同時トランスフェクトした。安定したクローンをピューロマイシンならびにG418二重選択および限界希釈によって生成した。選択された安定した細胞クローンを、ピューロマイシンおよびG418を補充した完全細胞培養培地で維持した。細胞をRPMI+10% FBS+1% P/S+1000 μg/mLのG418+250 ng/mLのピューロマイシン中で維持した。

【0566】

NFAT（Jurkat-ルシフェラーゼ）またはIL-2プロモーター（Jurkat-IL-2）のみを発現する親JurkatクローンをRPMI+10% FBS+1% P/S+1000 μg/mLのG418（BPS Biosciences）中で維持した。

10

20

30

40

50

【0567】

CHO細胞クローン：HHLA2-TCR-CHO安定細胞株を作製するために、CHO-K1細胞をLipofectamine（登録商標）2000（Invitrogen）によってTCRa_pIRESHyg3およびHHLA2_pIRESneo3で順次に同時トランスフェクトした。安定したクローンをハイグロマイシンならびにG418二重選択および限界希釈によって生成した。選択された安定した細胞クローンを、ハイグロマイシンおよびG418を補充した完全細胞培養培地で維持した。細胞をF12-K+10%FBS+1%P/S+1000μg/mLのG418+500μg/mLのハイグロマイシン中で維持した。抗CD3 s c F vを発現する親CHOクローンをF12-K+10%FBS+1%P/S+500μg/mLのハイグロマイシン（BPS Biosciences）中で維持した。

10

【0568】

D. Jurkatレポーター遺伝子アッセイ

TMIGD2 NFAT Jurkatレポーター遺伝子共刺激アッセイおよびHHLA2抗体による阻害：HHLA2-TCR-CHO細胞を、白色の底の不透明な96ウェルプレート中のCHO-K1成長培地中に 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。37℃/5%CO₂で一晩インキュベートした後、細胞がプレートに付着した。翌日、培地を各ウェルから慎重に取り除き、抗HHLA2抗体を50μLのJurkat細胞培地中に添加し、HHLA2-TCR-CHO細胞を1時間インキュベートした後、TMIGD2_NFAT_Jurkatレポーター細胞株を50μLのJurkat細胞培地中に4~5×10⁴細胞/ウェルで添加した。プレートウェルを混合し、およそ3~6時間インキュベートした。ルシフェラーゼシグナルを発生させるために、ONE-Step（商標）ルシフェラーゼアッセイ系（BPS Bioscience、カタログ番号60690）を推奨プロトコルに従って各ウェルに100μL添加した。照度計を使用して発光を読み取った。

20

【0569】

KIR3DL3 IL2 Jurkatレポーター遺伝子阻害アッセイおよびHHLA2抗体による逆転：HHLA2-TCR-CHO細胞を、白色の底の不透明な96ウェルプレート中のCHO-K1成長培地中に 2×10^4 細胞/ウェルの密度で播種した。37℃/5%CO₂で一晩インキュベートした後、細胞がプレートに付着した。翌日、培地を各ウェルから慎重に取り除き、抗HHLA2抗体を50μLのJurkat細胞培地中に添加し、HHLA2-TCR-CHO細胞を1時間インキュベートした後、KIR3DL3_IL2_Jurkatレポーター細胞株を50μLのJurkat細胞培地中に4~5×10⁴細胞/ウェルで添加し、加えて、2μg/mLの抗CD28抗体（BPS Bioscience番号100186）も添加した（1ウェルあたり100μLのアッセイ混合物中1μg/mLの最終濃度）。プレートウェルを混合し、およそ5時間インキュベートした。ルシフェラーゼシグナルを発生させるために、ONE-Step（商標）ルシフェラーゼアッセイ系（BPS Bioscience、カタログ番号60690）を推奨プロトコルに従って各ウェルに100μL添加した。照度計を使用して発光を読み取った。

30

【0570】

これらの材料および方法を使用して、HHLA2 mAbまたはアイソタイプ対照抗体を、図14に示され、かつ以下の表9に概説されるようにTMIGD2/HHLA2 T細胞共刺激アッセイにおいて共刺激遮断について評価した。

40

【表 9】

表 9：TMIGD2／HHLA2 T細胞共刺激アッセイにおけるHHLA2 mAbの
評価についての研究の概要

レスポnder	CHO 細胞の刺激	予想された応答
JurkatNFAT 細胞		
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-親細胞	なし
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv	活性化
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv/ HHLA2	増強された活性化
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv/ HHLA2+HHLA2 mAb	増強された活性化の逆転

10

【0571】

抗CD3 scFVおよびHHLA2でトランスフェクトされたCHO細胞でのHHLA2の発現を検出した（図15）。TMIGD2でトランスフェクトされたJurkat NFATレポーター細胞でのTMIGD2の発現も検出された（図16）。抗CD3 scFVおよびHHLA2を発現するCHO細胞ならびにTMIGD2を発現するJurkat NFATレポーター細胞をT細胞共刺激アッセイで使用した。HHLA2 mAb（6F10）がHHLA2によって誘導された増強された活性化を逆転させた一方で、アイソタイプ対照抗体がかかる作用を及ぼさなかったことが見出された（図17）。

20

【0572】

HHLA2 mAbまたはアイソタイプ対照抗体を、図18に示され、かつ以下の表10に概説されるようにKIR3DL3／HHLA2 T細胞阻害アッセイにおいてチェックポイント遮断についても評価した。

【表 10】

表 10：KIR3DL3／HHLA2 T細胞チェックポイントアッセイ（Jurkat T細胞IL-2レポーター遺伝子アッセイ）の研究の概要

30

レスポnderJurkat NFAT 細胞	CHO 細胞の刺激	予想された応答
Jurkat IL-2/KIR3DL3	CHO-親細胞	なし
Jurkat IL-2/KIR3DL3	CHO-抗 CD3 Fv	活性化
Jurkat IL-2/KIR3DL3	CHO-抗 CD3 Fv/HHLA2	阻害
Jurkat IL-2/KIR3DL3	CHO-抗 CD3 Fv/HHLA2 +HHLA2 mAb	阻害の逆転

40

【0573】

KIR3DL3でトランスフェクトされたJurkat-IL-2レポーター細胞でのKIR3DL3の発現を検出した（図19Aおよび図19B）。抗CD3 scFVおよびHHLA2を発現するCHO細胞ならびにKIR3DL3を発現するJurkat-IL-2レポーター細胞をT細胞阻害アッセイで使用した。HHLA2 mAb（クローン6F10およびクローン2C4）がHHLA2による阻害を逆転させた一方で、アイソタイプ対照抗体がかかる作用を及ぼさなかったことが見出された（図20A～20Cおよび図21A～21C）。KIR3DL3選択的HHLA2 mAbクローン2C4は、TM

50

I G D 2によって媒介された共刺激遮断しなかった（図22）。

【0574】

本明細書に記載のデータは、T M I G D 2をH H L A 2に対するT細胞共刺激受容体として実証し、T M I G D 2共刺激を遮断するH H L A 2 m A bが特定された。これらのデータは、K I R 3 D L 3もH H L A 2に対するT細胞阻害性受容体として実証し、H H L A 2 m A bチェックポイント遮断剤が特定された。

【0575】

追加のアッセイを使用して、H H L A 2 m A bを評価することができる。例えば、アロ刺激T細胞アッセイ、例えば、C D 4 T細胞および同種単球由来のD Cまたはマクロファージを使用したアッセイを使用して、抗ヒトH H L A 2 m A bの免疫チェックポイント阻害を確認することができる。Wang et al. (2014) Cancer Immunol. Res. 2:846およびBrown et al. (2003) J. Immunol. 170:1257等に記載のかかる方法は、当該技術分野で周知である。

【0576】

いくつかの実施形態では、H H L A 2は、樹状細胞およびマクロファージで発現される。例えば、Zhao et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110:9879およびZhu et al. (2013) Nat. Comm. 4:2043等の樹状細胞培養物を誘導する方法は、当該技術分野で周知である。

【0577】

いくつかの実施形態では、単球由来の未熟D C (i D C) を、単球精製キット (M i l t e n y i B i o t e c) を使用してP B M Cから単離された単球を培養し、50 ng/mLのI L - 4および100 ng/mLのG M - C S F (R & D S y s t e m s) で7日間培養することによって生成する。単球由来の活性化D Cを、単球精製キット (M i l t e n y i B i o t e c) を使用してP B M Cから単離された単球を培養し、1 ug/mLのL P Sおよび100 ng/mLのI F N - ガンマまたはポリI Cで7日間培養することによって生成することができる。

【0578】

いくつかの実施形態では、マクロファージを、単球精製キット (M i l t e n y i B i o t e c) を使用してP B M Cから単離された単球を培養することによって生成し、100 ng/mLのL P Sおよび100 ng/mLのI F N - gまたはポリI Cの存在下で3日間培養する。

【0579】

樹状細胞およびマクロファージ培養物を、H H L A 2、T M I G D 2 (C D 2 8 H)、およびP D - L 1の発現について、これらの抗原に対する抗体を使用したフローサイトメトリーによって評価することができる。

【0580】

アロ刺激T細胞活性化アッセイを使用して、T細胞増殖を測定することができる。簡潔には、いくつかの実施形態では、C D 4 + T細胞 (1×10^5) および上述のように誘導された同種D C (1×10^4) またはマクロファージを、10:1 (T/D C) 比で、抗ヒトH H L A - 2、P D - 1 (ニボルマブ)、およびアイソタイプ対照抗体ありおよびなしで6日間共培養する。5日目の培養上清中のI F N - ガンマ分泌をE L I S A (B D b i o s c i e n c e sまたはR & D s y s t e m sのキット) によって測定する。6日目のT細胞増殖を、フローサイトメトリーを使用してC F S E希釈によって測定する。

【0581】

いくつかの実施形態では、I L - 2およびI F N - ガンマレベルを使用して、T細胞活性化を、例えば、S E B刺激P B M C活性化アッセイを使用して、確認することができる（例えば、Wang et al. (2014) Cancer Immunol. Res. 2:846を参照のこと）。例えば、健常ドナー由来のP B M C (10^5 細胞) を、1、0.1、および0.01 ug/mLの濃度のブドウ球菌エンテロトキシンB (S E B、T o x i n T e c h n o l o g y) の存在下で、飽和濃度の抗ヒトH H L A - 2、P D -

10

20

30

40

50

1 (ニボルマブ)、およびアイソタイプ対照抗体ありまたはなしで3日間共培養することができる。培養上清中のIL-2およびIFN-ガンマレベルをELISAまたは多重分析(BD Biosciences)によって測定することができる。

【0582】

他の実施形態では、CMV溶解物刺激PBMC活性化リコールアッセイを使用して、T細胞活性化を確認することができる(例えば、Sinclair et al. (2004) Viral Immunol. 17:445およびWang et al. (2014) Cancer Immunol. Res. 2:846を参照のこと)。例えば、CMV陽性ドナー由来のPBMC (2×10^5 細胞)を、抗ヒトHLA-2、PD-1 (ニボルマブ)、およびアイソタイプ対照抗体ありおよびなしで共培養することができ、CMV感染細胞 ($3 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、Advanced Biotechnologies) 由来の溶解物で4日間刺激する。培養上清中でのIFN-ガンマ分泌をELISA (BD biosciencesまたはR&D systemsのキット)によって測定することができる。T細胞増殖を、フローサイトメトリーを使用してCFSE希釈によって測定することができる。

【0583】

いくつかの実施形態では、腫瘍ベースの混合リンパ球反応(MLR)アッセイを使用して、T細胞活性化を確認することができる(例えば、McWhirter et al. (2006) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:1041を参照のこと)。例えば、樹状細胞(DC)を、単球精製キット(Miltenyi Biotec)を使用してPBMCから単離された単球を培養することによって生成することができ、 $500 \text{ U}/\text{mL}$ のIL-4、 $800 \text{ U}/\text{mL}$ のGM-CSF、および $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ のIFN-ガンマで5日間培養する。混合リンパ球培養物を、抗HLA2 mAbまたはアイソタイプ対照 ($10 \mu\text{g}/\text{mL}$) の存在下で、樹状細胞 (2×10^5)、同種CD3⁺T細胞 (1×10^6)、およびHLA2を発現する照射腫瘍細胞 (2×10^5) を使用して24ウェルプレート内に48時間配置することができる。上清を収集し、多重サイトカインアッセイキットを使用してサイトカイン産生について評価する。

【0584】

いくつかの実施形態では、Jurkat T細胞NFAT-Lucレポーター遺伝子アッセイを使用して、T細胞活性化を確認することができる(例えば、BPS bioscienceのウェブサイトおよびWang et al. (2017) J. Pharm. Biomed. Anal. 145:247を参照のこと)。例えば、NFAT-ルシフェラーゼレポーター遺伝子カセット(BPS bioscience)およびKIR3DL受容体(以下のアッセイ番号1を参照のこと)またはTMIGD2受容体(以下のアッセイ番号2を参照のこと)でトランスフェクトされたJurkat T細胞を、抗HLA2 mAbの存在下または不在下で、膜貫通抗CD3 scFV (BPS bioscience) およびHLA2でトランスフェクトされたCHO細胞で刺激する(図7)。例示のJurkat NFAT受容体遺伝子アッセイ構成を以下の表5に列記する。 5×10^4 個のCHO細胞を96ウェルアッセイプレート中に播種し、12~14時間培養する。附着CHO細胞を、 $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ で抗HLA2 mAbまたはアイソタイプ対照と37℃で1時間プレインキュベートする。 1×10^5 個のJurkat細胞をCHO細胞と6時間共培養し、発光基質を添加し、照度計を使用してルシフェラーゼ単位を定量する。

10

20

30

40

50

【表 5】

表 5

アッセイ番号 1: KIR3DL3 アッセイ		
レスポンドー Jurkat NFAT 細胞	CHO 細胞の刺激	応答
Jurkat NFAT/KIR3DL3 (受入番号 BC143802.1)	CHO-親細胞	活性化なし
Jurkat NFAT/KIR3DL3 (受入番号 BC143802.1)	CHO-抗 CD3 Fv (PD-1 アッセイに使用したのと同じ抗 CD3 クローン)	活性化
Jurkat NFAT/KIR3DL3 (受入番号 BC143802.1)	CHO-抗 CD3 Fv/HLA2 (PD-1 アッセイに使用したのと同じ抗 CD3 クローン)	阻害
Jurkat NFAT/KIR3DL3 (受入番号 BC143802.1)	CHO-抗 CD3 Fv/HLA2+抗 HHLA2 6F10 mAb (PD-1 アッセイに使用したのと同じ抗 CD3 クローン)	阻害の逆転
アッセイ番号 2 : TMIGD2 アッセイ		
レスポンドー Jurkat NFAT 細胞	CHO 細胞の刺激	応答
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-親細胞	活性化なし
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv (PD-1 アッセイに使用したのと同じ抗 CD3 クローン)	活性化
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv/HLA2 (PD-1 アッセイに使用したのと同じ抗 CD3 クローン)	増強された活性化
Jurkat NFAT/TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv/HLA2+抗 HHLA2 6F10 mAb (PD-1 アッセイに使用したのと同じ抗 CD3 クローン)	増強された活性化の逆転

10

20

30

【0585】

実施例 6 : HHLA2 mAb 活性のインビボ確認および動物モデルの開発

加えて、Wang et al. (2014) Cancer Immunol. Res. 2:846、Brown et al. (2003) J. Immunol. 170:1257、Zhao et al. (2013) Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 110:9879、Zhu et al. (2013) Nat. Comm. 4:2043、および Sinclair et al. (2004) Viral Immunol. 17:445) 等に記載の抗体をインビボで特徴付けする方法が当該技術分野で周知である。腫瘍モデル用の齧歯類、イヌ、および他の従来種における HHLA2 経路の不在により、新たな動物腫瘍または薬理学モデルが必要とされる。

40

【0586】

いくつかの実施形態では、キメラ抗原受容体-T細胞 (CAR-T) モデルを使用する (図 8)。例えば、NSG マウスに、炭酸脱水酵素 IX (CAIX)、HHLA2、および PD-L1 を発現するヒト腎臓癌細胞株細胞を移植する。抗炭酸脱水酵素 IX (CAIX) 標的キメラ抗原受容体 (抗 CAIX CAR-T 細胞) ならびに PD-1 および KIR3DL 受容体を発現するヒト T 細胞 (CAR-T) を、抗 HHLA2 または KIR3DL mAb とともに単独または抗 PD-1 / L-1 mAb と組み合わせてのいずれかで静脈内注射する。腫瘍成長を、(例えば、Suarez et al. (2016) Onco

50

t a r g e t 7 : 3 4 3 4 1 に記載されるように) ルシフェリン I P 注射後に生物発光画像法によって定量化する。

【 0 5 8 7 】

いくつかの実施形態では、S C I D マウスにおける C A R - T 細胞腫瘍モデルを開発する。H e L a - C D 1 9 - H H L A 2 腫瘍を有する S C I D マウスに H H L A 2 m a b および C D 1 9 / K I R 3 D L 3 C A R - T 細胞を投与し、腫瘍成長阻害を評価する。6 週齢の雌 S C I D マウス (J a c k s o n L a b o r a t o r i e s , B a r H a r b o r , M E) を利用する。0 日目に、各マウスに、 2×10^6 個の H e L a - C D 1 9 細胞または H e L a - C D 1 9 + H H L A 2 細胞を含有する滅菌 P B S を $100 \mu\text{L}$ 皮下 (S C) 注射する。P B S 中の C A R - T 細胞を 1 9 日目 (5×10^6 細胞) および 3 3 日目 (9×10^6 細胞) に腫瘍内注射し、腫瘍成長を毎日追跡する。抗体を腹腔内 (I P) 投与により週に 3 回投与する。体重を週に 2 回監視する。腫瘍サイズをキャリパーで毎日測定し、式 $W^2 L / 2$ (式中、W が腫瘍の幅であり、L が腫瘍の長さである) を使用して腫瘍体積 (mm^3 単位) を決定する。研究期間はおおよそ 4 5 日間であり、1 アームあたり 1 0 匹のマウスを使用する。マウスに、H H L A 2 m A b をこれらの抗体の P K プロファイルに基づいて投与する。

【 0 5 8 8 】

この実験の最後に、腫瘍を切除し、末端出血を行い、血清を E L I S A および F A C S 分析のために保管する。腫瘍を採取し、秤量し、腫瘍の半分を新たに凍結し、半分を 4 % パラホルムアルデヒド中に固定し、その後、H & E 染色および免疫組織化学 (I H C) のためにパラフィンに包埋する。例示の C D 1 9 / K I R 3 D L 3 C A R - T 細胞腫瘍モデル構成を以下の表 1 2 に列記する。

【 表 1 2 】

表 1 2 : インビボでの C D 1 9 / K I R 3 D L 3 C A R - T 細胞腫瘍モデルにおける H H L A 2 の評価

腫瘍	処理	予想される結果
HeLa/CD19/HHLA2	T 細胞なし	腫瘍成長
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19	腫瘍成長の阻害
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3+アイソタイプ対照	腫瘍成長
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3+HHLA2 mAb	腫瘍成長の阻害

【 0 5 8 9 】

いくつかの実施形態では、カニクイザルにおける T 細胞増殖、サイトカイン、および / または T 細胞依存性抗体応答 (T D A R) を確認する抗原刺激および追加免疫アッセイを使用して H H L A 2 m A b がインビボ活性を有することが確認される。いくつかの実施形態では、カニクイザル K L H 抗原チャレンジ T 細胞モデルを生成および使用する (図 2 4 A および 図 2 4 B) 。例えば、抗 H H L A 2 m A b を静脈内投与したカニクイザルを 2 日目にフロイント不完全アジュバント中の K L H (0 . 1 m g) で免疫化し、1 4 日後にフロイント不完全アジュバント中の低用量 K L H で追加免疫する。免疫前および免疫後の出血を、免疫アッセイを使用して抗 K L H I g G 抗体の増強された産生について評価する。カニクイザルを 1 日目に H H L A 2 m A b で処理し、2 ~ 5 0 m g / k g で H H L A 2 m A b を毎週 I V 投与する。抗 H H L A 2 m A b 処理前および処理後のカニクイザルから単離された P B M C を、T 細胞依存性抗 K L H 抗体応答、K i 6 7 染色およびフローサイトメトリーによる T 細胞および N K 細胞増殖、ならびにインビボでの C D 1 0 7 a F A C S 染色による N K 細胞毒性またはエクスピボでの K 5 6 2 細胞に対する細胞毒性について評価する。いくつかの実施形態では、カニクイザル S I V モデルを開発し、これを使用して、H H L A 2 m A b をインビボで評価する。

【 0 5 9 0 】

いくつかの実施形態では、ヒト化SRG-15マウス腫瘍モデルを使用し、HHLA2 mAbのヒト化SRG-15 (Flavell) マウスまたはNSG-15 (Greiner) マウスにおけるヒト腫瘍への影響を試験する (図23A~23C、Herndler-Brandstetter D et al. (2017) 114: E9626-E9634)。

【0591】

実施例7: HHLA2 mAbの細胞結合および受容体遮断特性

HHLA2 mAbの結合および遮断特性を分析した。例えば、HHLA2 mAbのHHLA2への結合のEC50、およびHHLA2のTMIGD2またはKIR3DL3への結合のHHLA2 mAb遮断のIC50を検出した。トランスフェクト293T細胞でのTMIGD2およびKIR3DL3の発現をフローサイトメトリーによって検出した (図12Aおよび図12B)。HHLA2-FcのTMIGD2およびKIR3DL3トランスフェクト293T細胞への結合を示した (図12Cおよび図12D)。HHLA2、TMIGD2、またはKIR3DL3を発現する安定してトランスフェクトされた300.19プレB細胞も生成した。

【0592】

その後、HHLA2 mAbの細胞結合および受容体遮断実験を行った。ある実験では、異なる濃度のHHLA2 mAbをHHLA2トランスフェクト300.19プレB細胞と4℃で30分間インキュベートした。HHLA2 mAbのトランスフェクト300.19細胞への結合をPE標識ヤギ抗マウスIgGで検出した (H+L)。HHLA2 mAb遮断実験の場合、異なる濃度のHHLA2 mAbを4ug/mLのHHLA2-mIgG2aと1:1比で30分間ブレインキュベートし、TMIGD2またはKIR3DL3トランスフェクト293T細胞のいずれかに添加し、4℃で30分間インキュベートした。HHLA2-mIgG2aのTMIGD2またはKIR3DL3トランスフェクト293T細胞への結合をPE標識Fab2ヤギ抗mIgG2a抗体で検出した。EC50およびIC50分析を、Graph Pad Prismを使用して行った。データを表6に示す。HHLA2 mAbクローン2C4が完全KIR3DL3遮断および部分的TMIGD2遮断の所望の特性を有することが示された (表6)。

【表6】

表6: HHLA2 mAbの細胞結合および受容体遮断実験1

HHLA2 mAb (アイソタイプ) \	¹ HHLA2 結合 EC50(ug/mL)	² TMIGD2 遮断 IC50(ug/mL)		² KIR3DL3 遮断 IC50(ug/mL)	
1C8(IgG2a)	0.63	+	1.65	+	1.15
2C4(IgG1)	0.24	+/-	28.2	+	0.52
2G2(IgG1)	0.21	+	0.85	+	0.53
4D1(IgG1)	0.44	+	0.56	+	0.68
6D10(IgG1)	22.5	+/-	11.7	+/-	7.0
6F10(IgG1)	0.25	+	0.55	+	0.9

¹HHLA2 mAbのHHLA2トランスフェクト300.19マウスプレB細胞株への結合

²HHLA2-mIgG2aのTMIGD2またはKIR3DL3トランスフェクト293T細胞への結合のHHLA2 mAb遮断 (一過性)

【0593】

別の実験では、異なる濃度のHHLA2 mAbをHHLA2トランスフェクト300.19プレB細胞と4℃で30分間インキュベートした。HHLA2 mAbのトランス

フェクト300.19細胞への結合をPE標識ヤギ抗マウスIgGで検出した(H+L)。HHLA2 mAb遮断実験の場合、異なる濃度のHHLA2 mAbを4ug/mLのHHLA2-mIgG2aと1:1比で30分間ブレインキュベートし、TMIGD2またはKIR3DL3トランスフェクト300.19プレB細胞のいずれかに添加し、4℃で30分間インキュベートした。HHLA2-mIgG2aのTMIGD2またはKIR3DL3トランスフェクト300.19プレB細胞への結合をPE標識Fab2ヤギ抗mIgG2a抗体で検出した。EC50およびIC50分析を、Graph Pad Prismを使用して行った。データを表7に示す。HHLA2 mAbクローン2C4が完全KIR3DL3遮断および部分的TMIGD2遮断の所望の特性を有することが示された(表7)。

10

【表7】

表7：HHLA2 mAbの細胞結合および受容体遮断実験2

HHLA2 mAb (アイソタイプ)\	¹ HHLA2 結合 EC50(ug/mL)	² TMIGD2 遮断 IC50(ug/mL)		² KIR3DL3 遮断 IC50(ug/mL)	
2C4(IgG1)	0.29	+/-	7.3	+	0.97
5H4(IgG1)	2.03	+/-	9.63	+	1.25
6F10(IgG1)	0.22	+	0.92	+	0.74
6G8(IgG1)	2.14	+/-	10.85	+	1.18

20

¹HHLA2 mAbのHHLA2トランスフェクト300.19マウスプレB細胞への結合

²HHLA2-mIgG2aのTMIGD2またはKIR3DL3トランスフェクト300.19プレB細胞への結合のHHLA2 mAb遮断

【0594】

異なるHHLA2 mAbのヒトおよびカニクイザルHHLA2への結合も試験し、EC50結合分析を行った(図13Aおよび図13B)。異なる濃度のHHLA2 mAbをヒトまたはカニクイザルHHLA2トランスフェクト300.19プレB細胞のいずれかと4℃で30分間インキュベートした。HHLA2 mAbのトランスフェクト300.19細胞への結合をPE標識ヤギ抗マウスIgGで検出した(H+L)。EC50分析を、Graph Pad Prismを使用して行った。データを表8に示す。

30

40

50

【表 8】

表 8：HHLA2 mAb のヒトおよびカニクイザル h h l a 2 への結合

HHLA2 mAb(アイソタイプ)	¹ ヒト HHLA2 結合 EC50(ug/mL)	カニクイザル HHLA2 結合 EC50(ug/mL)
2C4(IgG1)	0.29	0.47
5H4(IgG1)	2.03	結合なし
6F10(IgG1)	0.22	0.40
6G8(IgG1)	2.14	結合なし

10

¹HHLA2 mAb のヒト HHLA2 トランスフェクト 300. 19 マウスプレ B 細胞への結合

²HHLA2 mAb のカニクイザル トランスフェクト 300. 19 マウスプレ B 細胞への結合

【0595】

実施例 8：HHLA2 mAb 活性のインビトロ確認

20

いくつかの実施形態では、HeLa-CD19 および HHLA2 を発現する標的腫瘍細胞に対する CD19 および KIRDL3 を発現する CAR-T 細胞 (CAR-T/CD19/KIRDL3) の細胞毒性を HHLA2 mAb の存在下または不在下のいずれかで評価する。CAR-T/CD19/KIRDL3 細胞を生成する。抗 CD19 scFv および KIR3DL3 を発現するレンチウイルスプラスミドを構築し、GM-CSF 由来の分泌シグナルペプチド、ヒンジ領域、膜貫通ドメイン、および CD28 由来の共刺激ドメイン、および CD3 ζ 活性化ドメインを含む第二世代 CAR カセットにサブクローニングする。1000 万個の成長停止 HEK293FT 細胞を T75 フラスコに播種し、一晚培養し、その後、CalPhos (商標) トランスフェクションキット (Takara, Mountain View, CA) を使用して pPACKH1 Lentivector Packaging mix (System Biosciences, Palo Alto, CA) ならびに抗 CD19 scFv および KIR3DL3 を含有する各レンチウイルスベクター 10 μg でトランスフェクトする。1 日後、培地を新鮮な培地と交換し、48 時間後にレンチウイルス含有培地を収集する。2100 g で 30 分間の遠心分離によって培地から細胞残屑を除去する。112,000 g で 100 分間の遠心分離によってウイルス粒子を収集し、アリコートし、-80℃で凍結させる。ウイルス調製物の力価を、Lenti-X (商標) qRT-PCR キットを使用して定量的 RT-PCR によって決定する。

30

【0596】

PBMC を、10% FBS および 300 U/mL の IL-2 を含有する AIM-V 培地中に 1×10^6 細胞/mL で懸濁されたヒト末梢血単核細胞 (Dana Farber Cancer Institute によってその承認 IRB プロトコルに従って提供されたもの) から単離し、等数 (1:1 比) の CD3/CD28 Dynabeads (Thermo Fisher) と混合し、未処理 24 ウェルプレート中で培養する (0.5 mL/ウェル)。24 時間および 48 時間時点で、レンチウイルスを感染多重度 (MOI) 5 で 1 μL の TransPlus (商標) 形質導入エンハンサー (Alstem) とともに培養物に添加する。T 細胞が次の 2 週間にわたって増殖するにつれて、細胞を 2~3 日毎に計数し、300 U/mL の IL-2 を有する新鮮な培地を培養物に添加して、細胞密度を $1 \sim 3 \times 10^6$ 細胞/mL で維持する。CAR 発現を、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、および抗 CD19 抗体を使用してフローサイトメトリーによって評価する。したがって、

40

50

形質導入の前に、抗CD28抗体共刺激と組み合わせて抗CD3抗体を使用してT細胞を活性化する。培養下でのCAR-T細胞の急速な増殖は、一般に、2週間以内に達成され、外因性IL-2の存在によって駆動される。このCARを、以下でCAR-T/CD19/KIRDL3と呼ぶ。

【0597】

HHLA2トランスフェクトHeLa-CD19細胞を生成する。HeLa-CD19発現細胞をLipofectamine（登録商標）2000（Invitrogen）によってHHLA2_pIRESneo3でトランスフェクトする。安定したクローンをG418選択および限界希釈によって生成し、フローサイトメリーによってHHLA2発現について評価する。

【0598】

リアルタイム細胞毒性アッセイ（RTCA）におけるインビトロでの初代T細胞のKIR3DL3阻害を行う。付着標的細胞（HeLaまたはHeLa-CD19）を96ウェルE-プレート（Acea Biosciences, San Diego, CA）に 1×10^4 細胞/ウェルで播種し、インピーダンスベースのリアルタイム細胞分析（RTCA）xCELLigenceシステム（Acea Biosciences）を用いて培養下で一晩監視する。翌日、三連で、培地を取り除き、10%FBS± 1×10^5 個のエフェクター細胞（CAR-T/CD19/KIRDL3細胞または非形質導入T細胞）を含有するAIM V-AlbuMAX（登録商標）培地と交換する。E-プレート中の細胞をRTCAシステムでさらに2～3日間監視し、インピーダンスを経時的にプロットする。細胞溶解を、（エフェクター細胞なしの標的細胞のインピーダンス-エフェクター細胞ありの標的細胞のインピーダンス）×100/エフェクター細胞なしの標的細胞のインピーダンスとして計算する。

【0599】

サイトカイン分泌も評価する。いくつかの実施形態では、サイトカイン誘導アッセイを行う。例えば、HeLa-CD19/HHLA2標的細胞を、10%FBSを含有するAIM V-AlbuMAX（登録商標）培地200mLを有するU底96ウェルプレート中に、エフェクターCAR-T/CD19/KIRDL3細胞または非形質導入T細胞と1:1比（各々 1×10^4 細胞）で三連で培養する。16時間後、培地の上部150mLをV底96ウェルプレートに移し、300gで5分間遠心分離して、いずれの残留細胞もペレットにする。上清の上部120mLを新たな96ウェルプレートに移し、Thermo Fisher製のキットを製造業者のプロトコルに従って使用してELISAによってヒトIFN-γおよびIL-2レベルについて分析する。

【0600】

例示のCAR-T細胞毒性モデルインビトロ立体配置を以下の表11に列記する。

【表11】

表11：インビトロでのCAR-T細胞毒性モデルにおけるHHLA2 mAbの評価

腫瘍	処理	予想される結果
HeLa/CD19/HHLA2	T細胞なし	活性化なし
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19	T細胞活性化
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3+アイソタイプ対照	T細胞活性化の阻害
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3+HHLA2 mAb	T細胞活性化の逆転

【0601】

いくつかの実施形態では、NK細胞毒性のKIR3DL3阻害アッセイを行う。KIR

3DL3トランスフェクトNK92細胞を生成する。例えば、NK92細胞をKIR3DL3 puroEIF2ベクターでトランスフェクトし、ピューロマイシン耐性のために選択し、KIR3DL3発現をフローサイトメトリーによって検出する。

【0602】

HHLA2トランスフェクトK562標的細胞を生成する。例えば、標的K562細胞をHHLA2 pIRESneo3でトランスフェクトし、ネオマイシン耐性のために選択し、HHLA2発現をフローサイトメトリーによって検出した。

【0603】

KIR3DL3でトランスフェクトされたNK92細胞を、4時間細胞毒性アッセイにおいて、HHLA2 mAbの存在下または不在下で、K562細胞に対するNK細胞毒性（+または-HHLA2）について異なるE/T比で評価する。例示のCAR-T細胞毒性モデルインビトロ立体配置を以下の表13に列記する。

【表13】

表13：NK細胞毒性モデルにおけるHHLA2 mAbの評価

エフェクターNK細胞	標的K562細胞	予想される応答
NK92/KIRDL3	K562	細胞毒性
NK92/KIRDL3	K562/HHLA2+アイソタイプ対照	細胞毒性の阻害
NK92/KIRDL3	K562/HHLA2+HHLA2 mAb	細胞毒性

【0604】

いくつかの実施形態では、Jurkat T細胞におけるKIR3DL3シグナル伝達経路を研究する。

【0605】

参照による組み込み

本明細書で言及される全ての刊行物、特許、および特許出願は、個々の刊行物、特許、または特許出願が各々参照により組み込まれると具体的かつ個別に示されるかのように、参照によりそれらの全体が本明細書に組み込まれる。矛盾する場合には、本明細書のいずれの定義も含む本出願が支配する。

【0606】

The Institute for Genomic Research (TIGR) のワールドワイドウェブ tigr.org および／または National Center for Biotechnology Information (NCBI) のワールドワイドウェブ ncbi.nlm.nih.gov によって管理されているもの等の公開データベースのエントリと相関する受入番号を参照する任意のポリヌクレオチドおよびポリペプチド配列も参照によりそれらの全体が組み込まれる。

【0607】

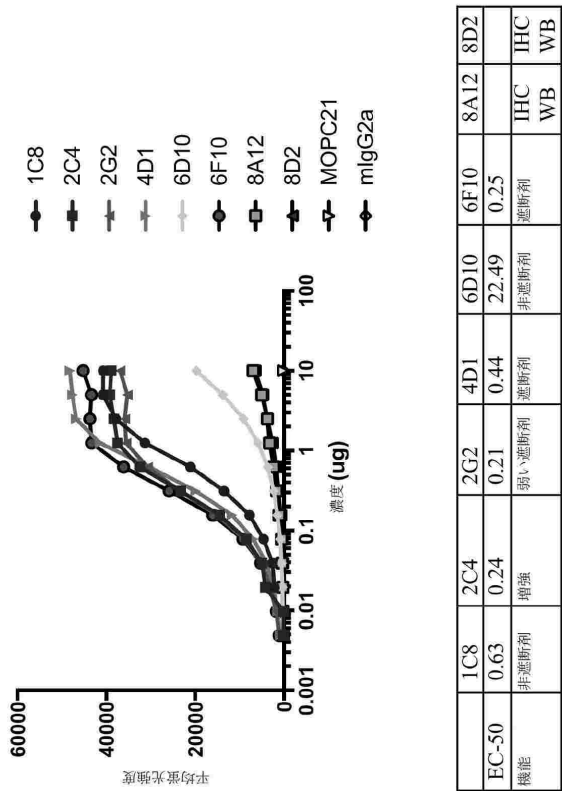
等価物

当業者であれば、通例の実験のみを使用して、本明細書に記載の本発明の特定の実施形態に対する多くの等価物を認識するか、または確定することができるであろう。かかる等価物は、以下の特許請求の範囲によって包含されるよう意図されている。

【図面】

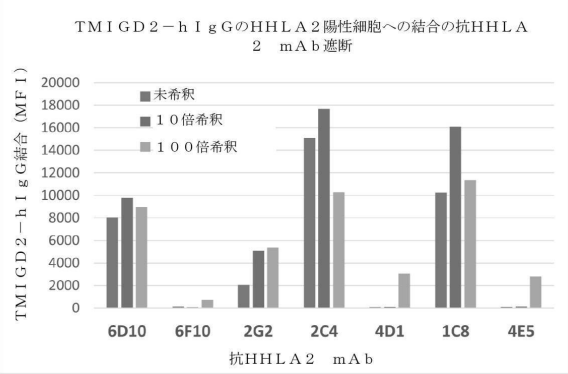
【図 1 A】

【図 1 A】



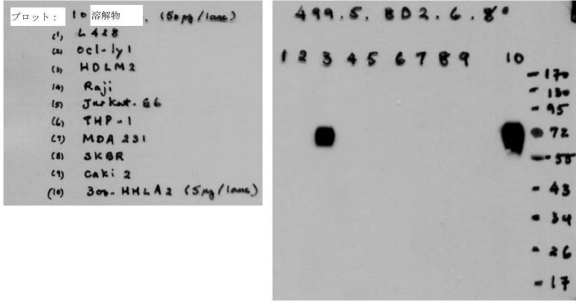
【図 1 B】

【図 1 B】



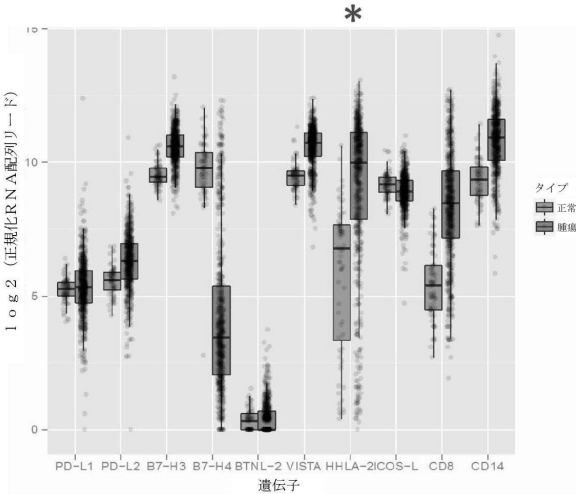
【図 2】

【図 2】



【図 3】

【図 3】



10

20

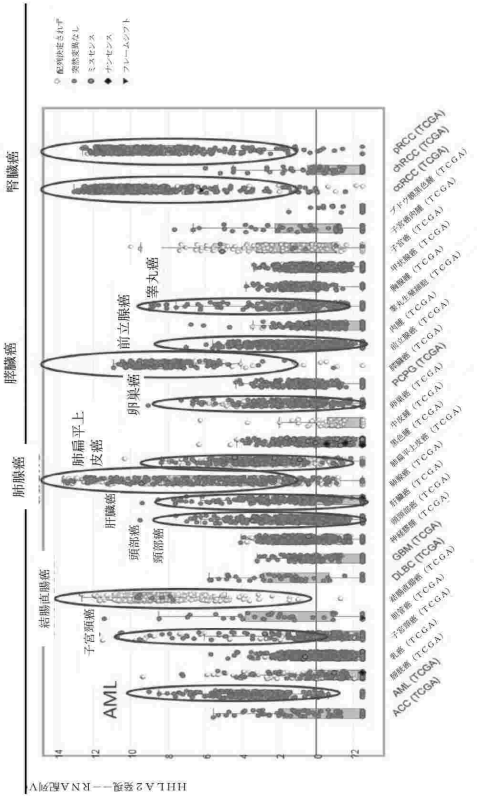
30

40

50

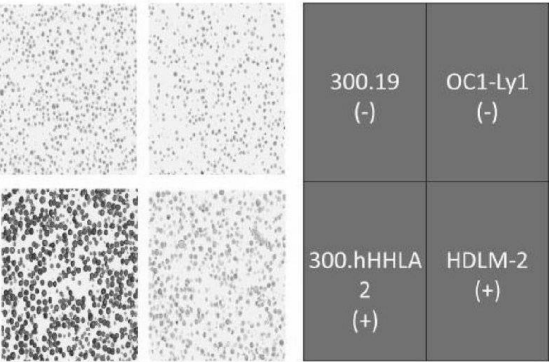
【図 4】

【図 4】



【図 5 A】

【図 5 A】

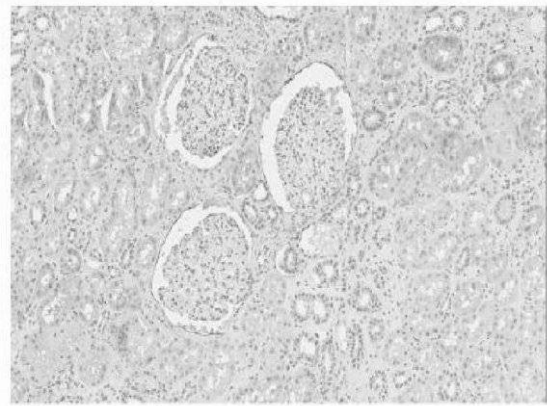


10

20

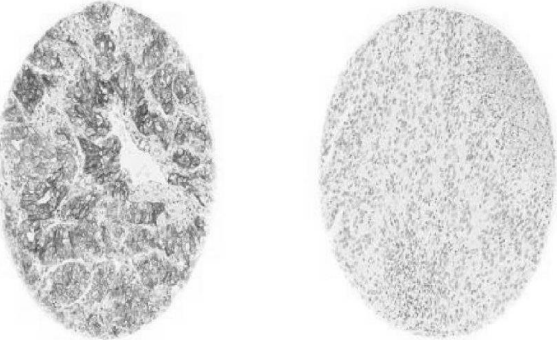
【図 5 B】

【図 5 B】



【図 5 C】

【図 5 C】



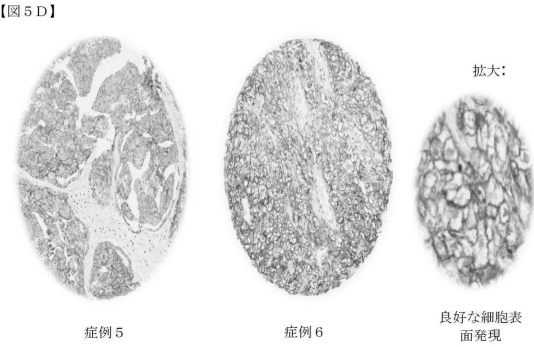
症例 1 Gordon Freeman/Tony Ar
anandam
2016年10月 症例 2

30

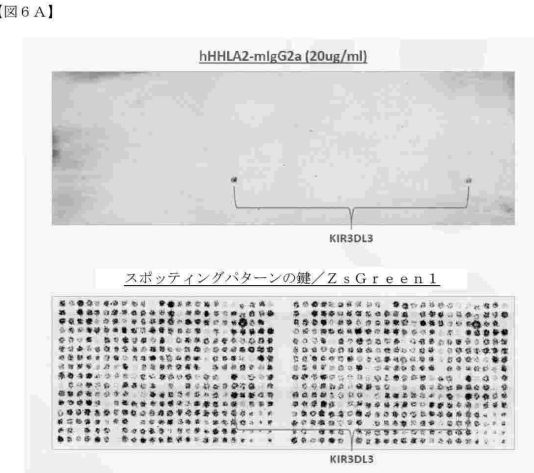
40

50

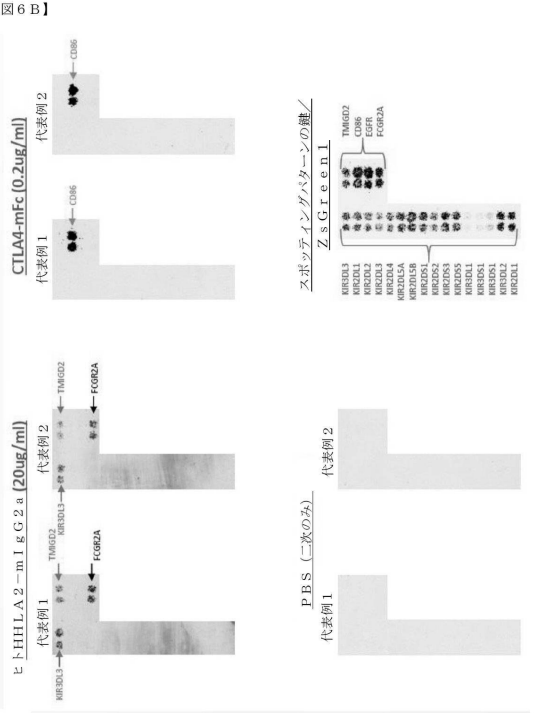
【図 5 D】



【図 6 A】



【図 6 B】



【図 6 C】

【図 6 C】

位置	遺伝子ID	受入	位置	遺伝子ID	受入
1	KIR3DL3	BC143802	17	TM6D2	NM_1444615.1
2	KIR2DL1	BC069344	18	CD86	
3	KIR2DL2	NM_014219	19	EGFR	
4	KIR2DL3	BC032422	20	FCGR2A	
5	KIR2DL4	BC041611			
6	KIR2DL5A	NM_020535			
7	KIR2DL5B	NM_001018081			
8	KIR2DL1	NM_014512			
9	KIR2DL2	BC108917			
10	KIR2DL3	NM_012313			
11	KIR2DL5	NM_014513			
12	KIR3DL1	BC028206			
13	KIR3DL1	NM_001085539			
14	KIR3DL1	BC098107			
15	KIR3DL2	NM_006737			
16	KIR2DL1	NM_014218			

10

20

30

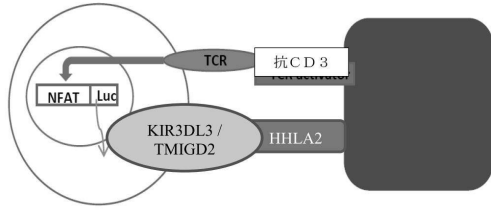
40

50

【図 7】

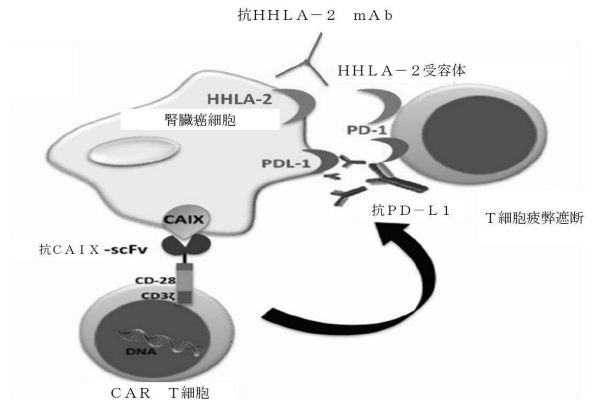
【図 7】

NFATレポーター-Jurkat T細胞 TCR活性化因子-CHO細胞



【図 8】

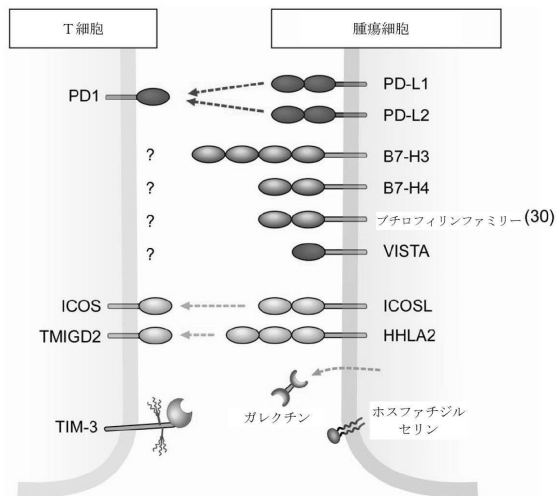
【図 8】



10

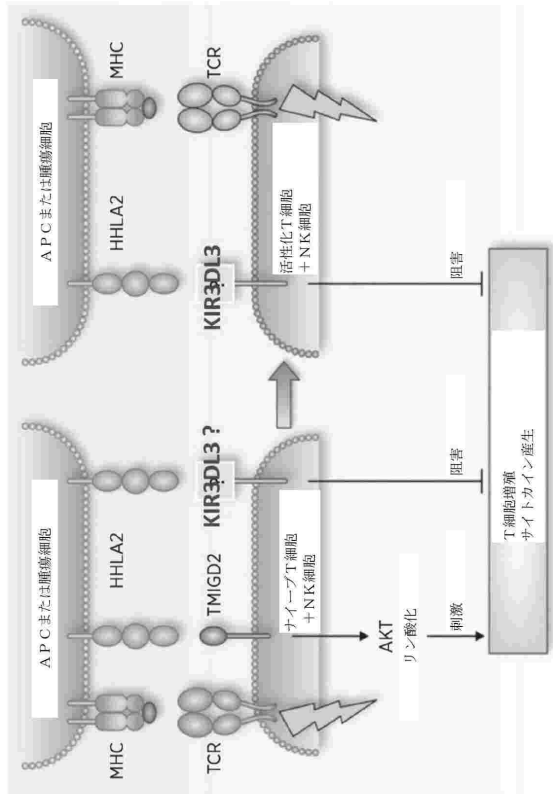
【図 9】

【図 9】



【図 10】

【図 10】



20

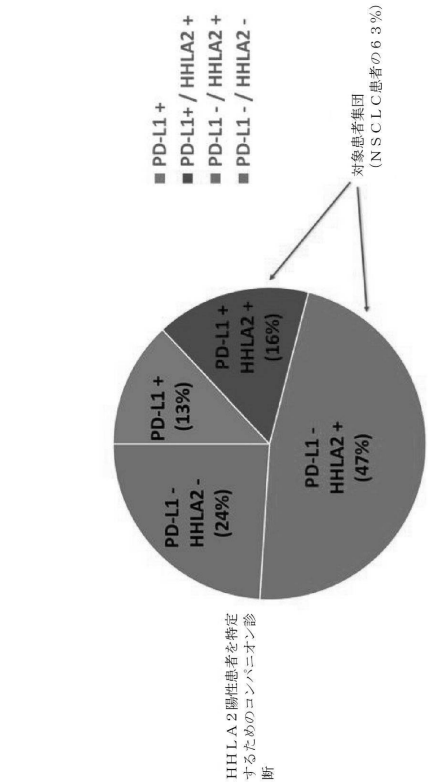
30

40

50

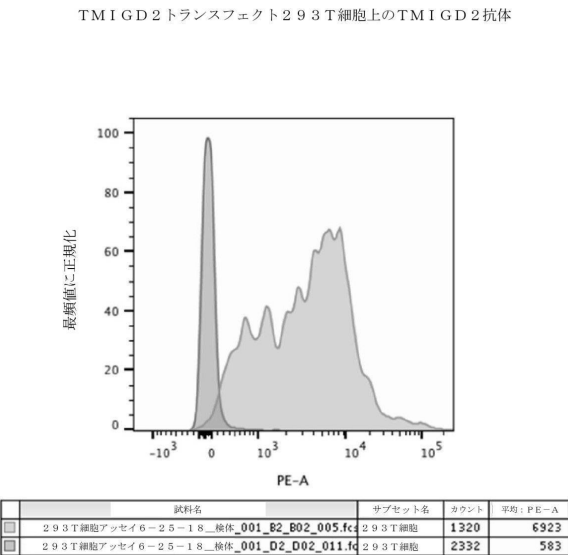
【図 1 1】

【図 1 1】



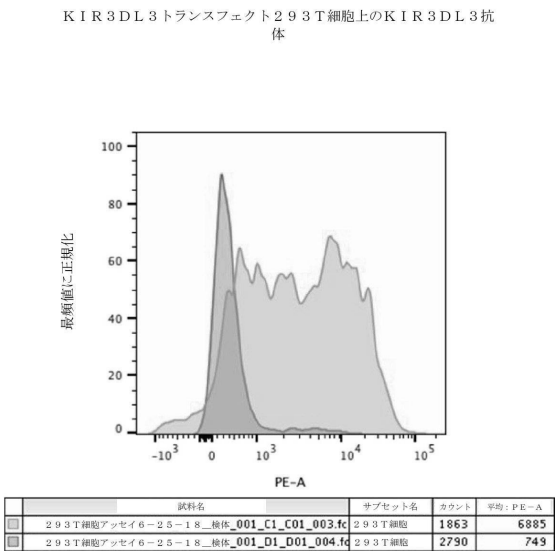
【図 1 2 A】

【図 1 2 A】



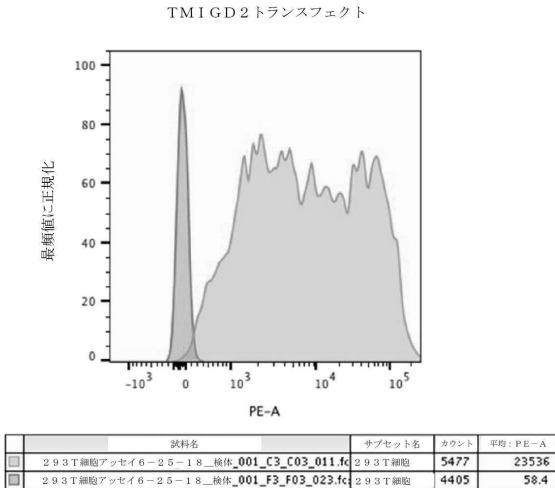
【図 1 2 B】

【図 1 2 B】



【図 1 2 C】

【図 1 2 C】



10

20

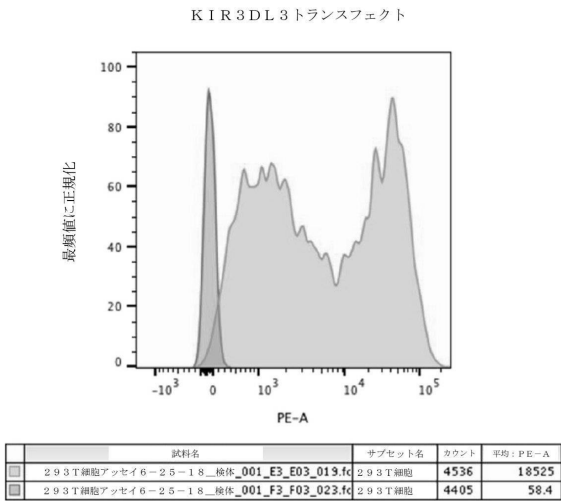
30

40

50

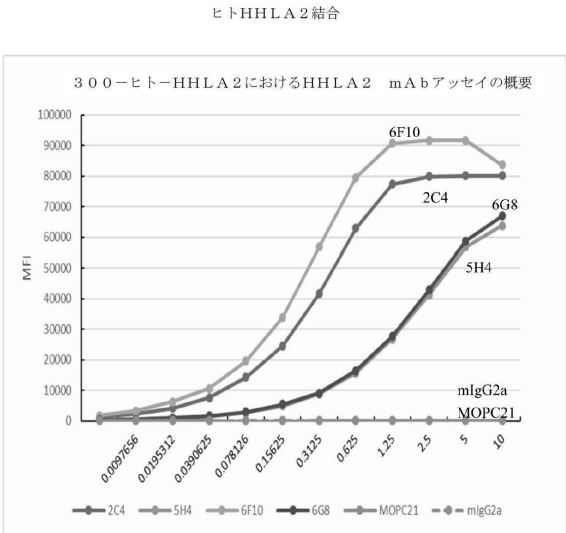
【図 1 2 D】

【図 1 2 D】



【図 1 3 A】

【図 1 3 A】



10

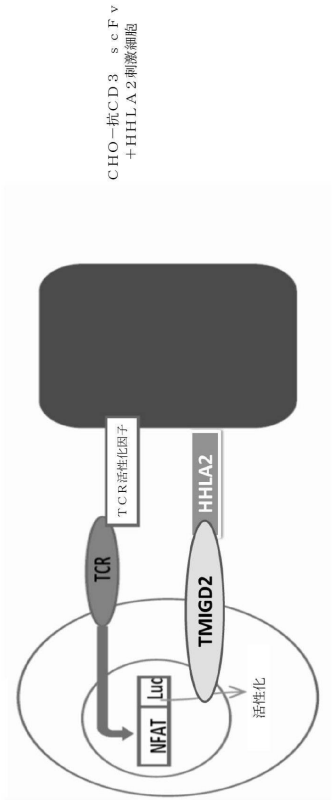
【図 1 3 B】

【図 1 3 B】



【図 1 4】

【図 1 4】



20

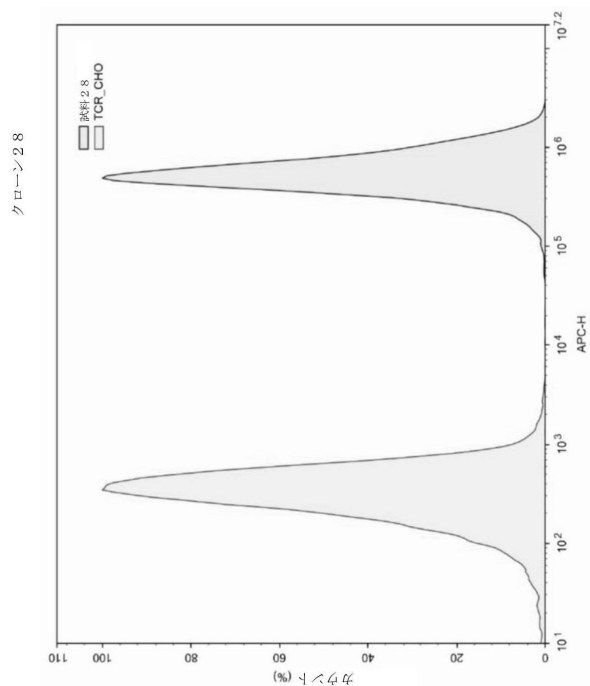
30

40

50

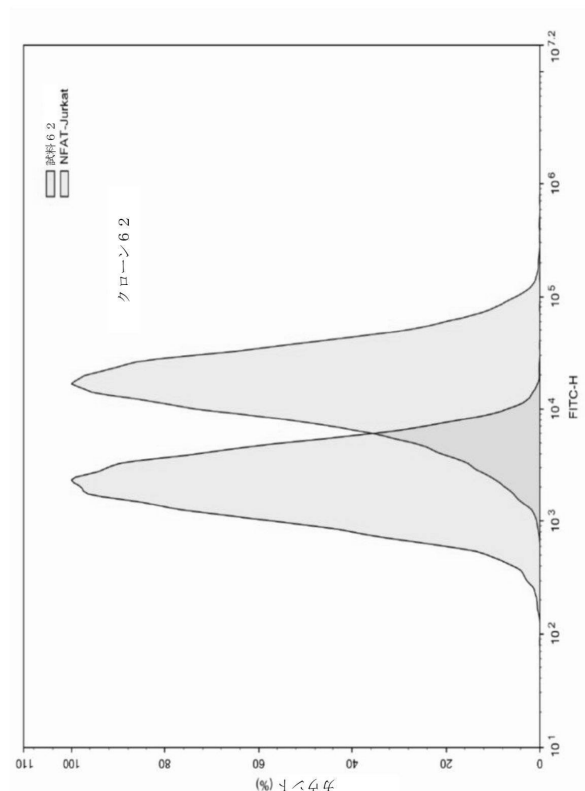
【図 15】

【图 15】



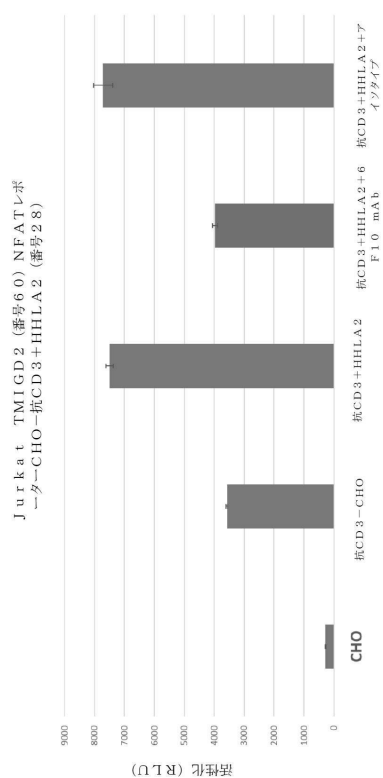
【図 16】

【图 16】



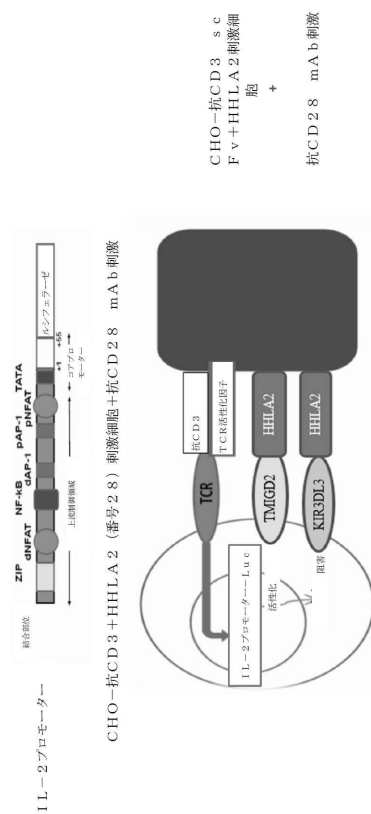
【図 17】

【图 17】



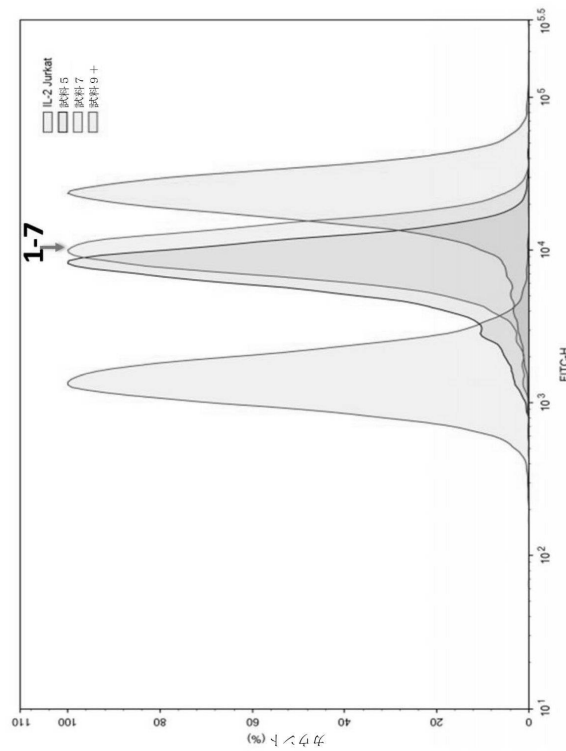
【図 18】

【图 18】



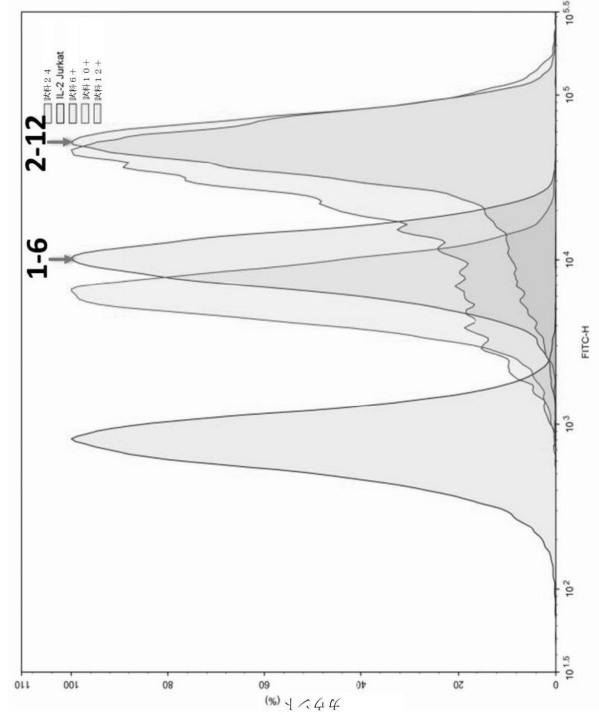
【図 19 A】

【図 19 A】



【図 19 B】

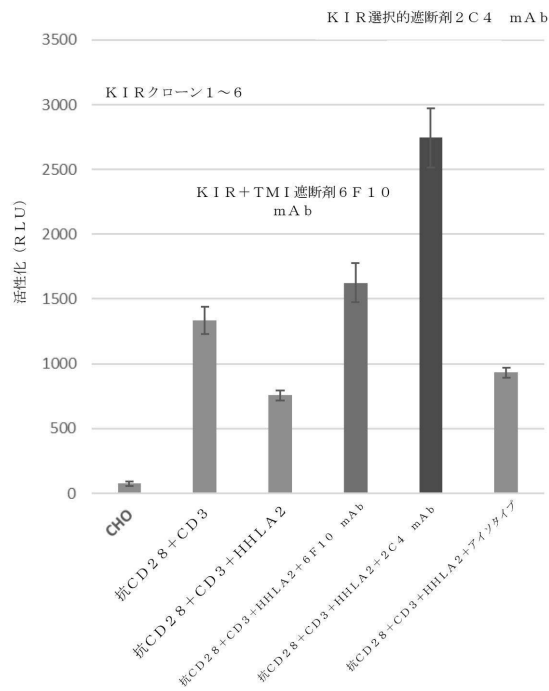
【図 19 B】



【図 20 A】

【図 20 A】

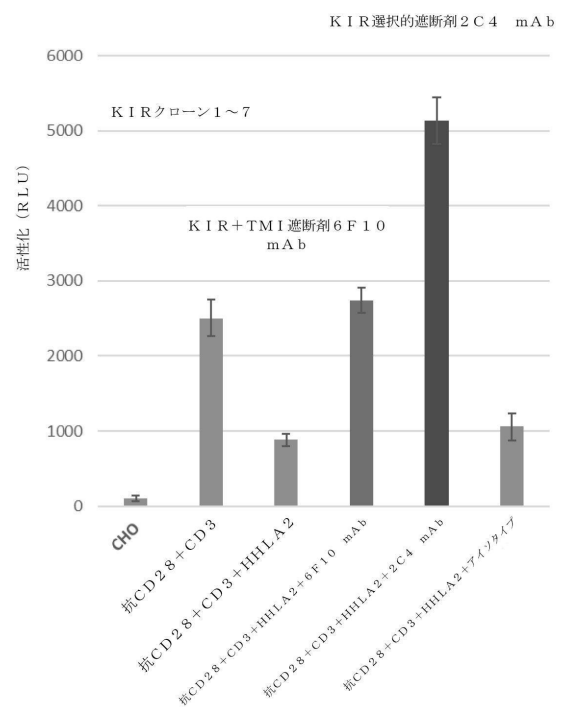
KIRクローン1～6



【図 20 B】

【図 20 B】

KIRクローン1～7



10

20

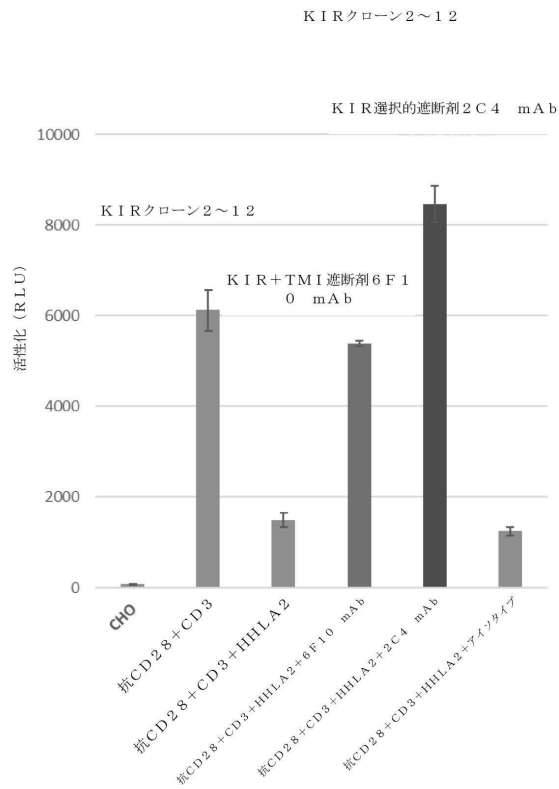
30

40

50

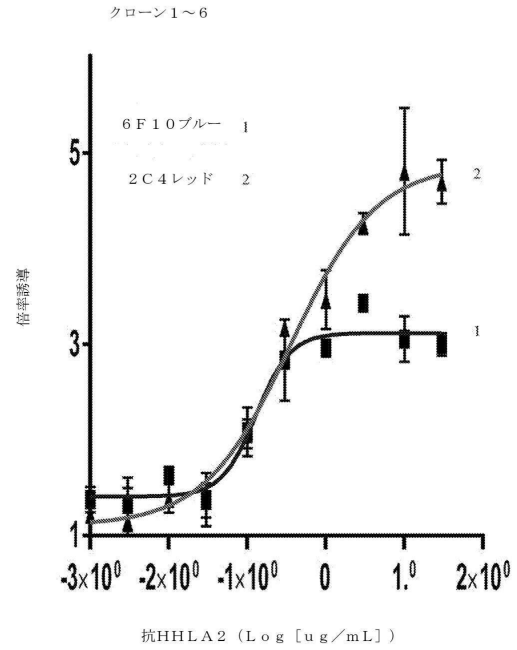
【図 20C】

【図 20C】



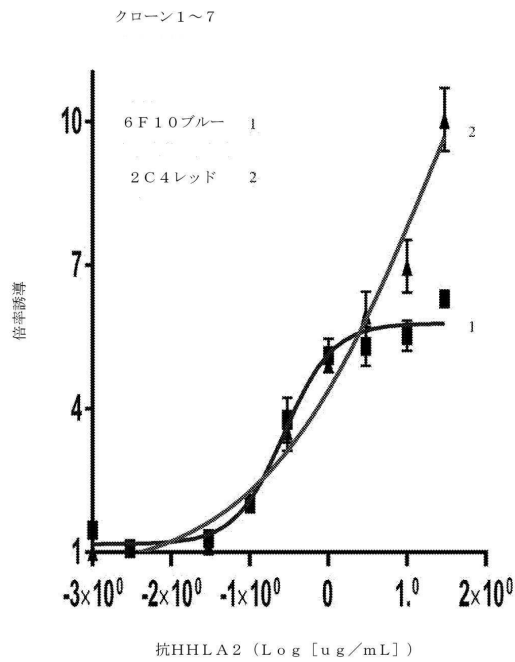
【図 21A】

【図 21A】



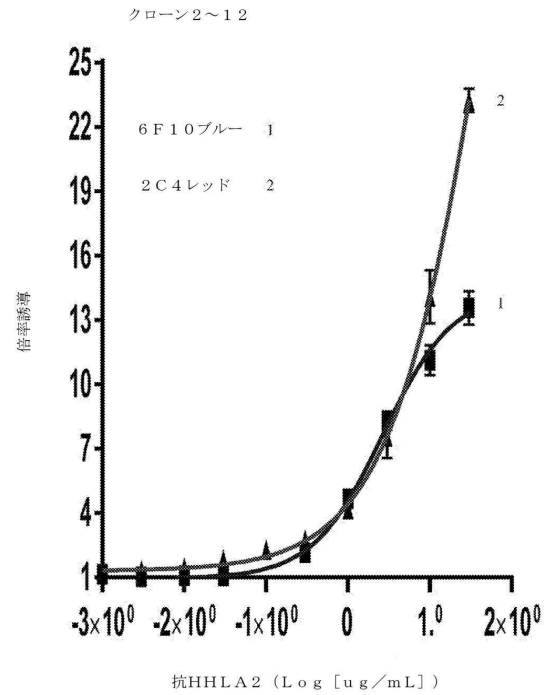
【図 21B】

【図 21B】



【図 21C】

【図 21C】



10

20

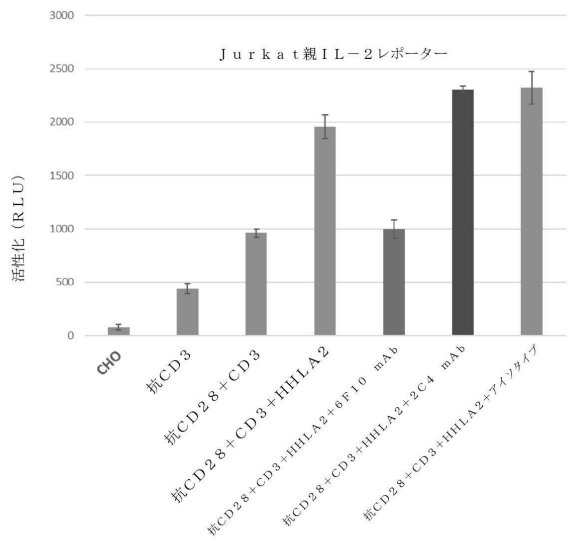
30

40

50

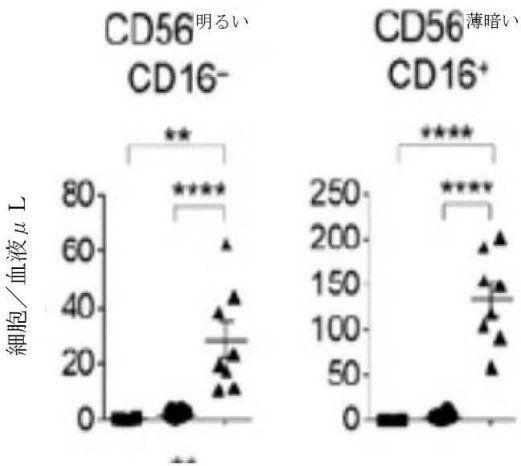
【図 2 2】

【図 2 2】



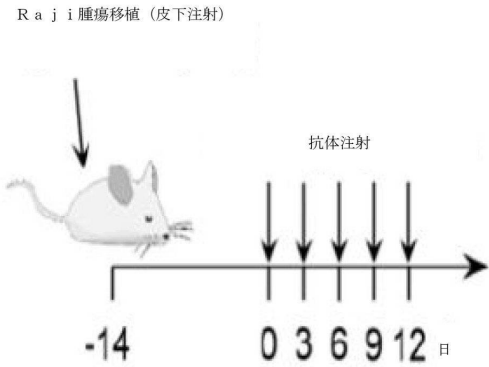
【図 2 3 A】

【図 2 3 A】



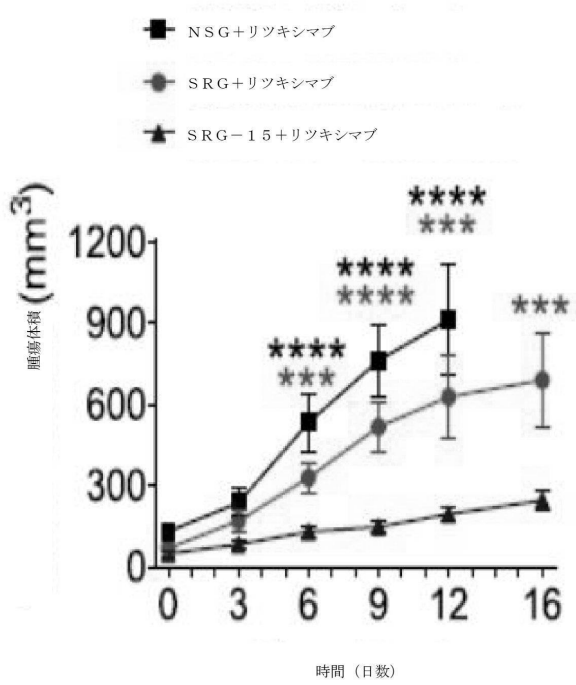
【図 2 3 B】

【図 2 3 B】



【図 2 3 C】

【図 2 3 C】



10

20

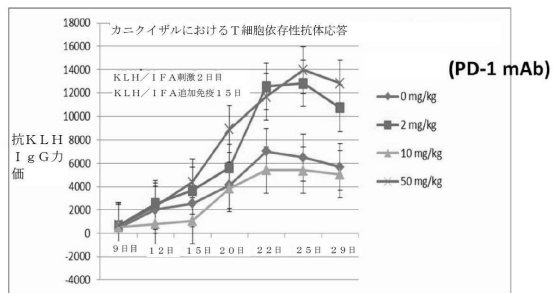
30

40

50

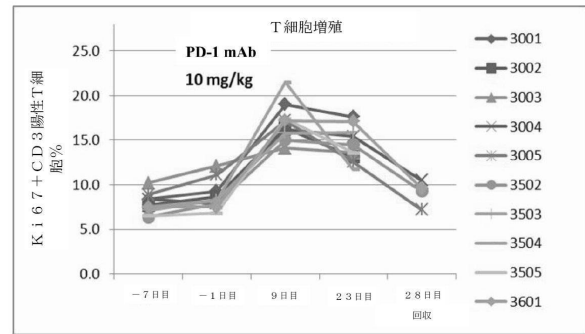
【図 2 4 A】

【図 2 4 A】



【図 2 4 B】

【図 2 4 B】



10

【配列表】

0007429192000001.app

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 P	21/08 (2006.01)	C 1 2 P	21/08	
C 0 7 K	16/18 (2006.01)	C 0 7 K	16/18	
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	L
A 6 1 K	47/68 (2017.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 K	45/00 (2006.01)	A 6 1 K	47/68	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 K	45/00	
G 0 1 N	33/53 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
G 0 1 N	33/531 (2006.01)	G 0 1 N	33/53	D
		G 0 1 N	33/531	A

弁護士 山本 健策

(72)発明者 フリーマン, ゴードン ジェイ.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 2 4 4 5, ブルックライン, ウォルナット ストリート
3 0 5

(72)発明者 アルラナンダム, アントニオ アール.

アメリカ合衆国 マサチューセッツ 0 1 8 9 0, ウィンチェスター, スカイライン ドライブ 4

審査官 中山 基志

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 7 / 0 0 8 1 4 1 0 (US, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)

U n i P r o t / G e n e S e q