



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201829463 A

(43)公開日：中華民國 107 (2018) 年 08 月 16 日

(21)申請案號：106139238

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 11 月 14 日

(51)Int. Cl.：

*C07K16/28 (2006.01)**A61K39/395 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2016/11/18

歐洲專利局

16199620.2

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士

(72)發明人：費雪 詹斯 FISCHER, JENS (DE)；麥傑提 梅荷 MAJETY, MEHER (IN)；丹格爾 史蒂芬 DENGL, STEFAN (DE)；蒂芬泰勒 喬治 TIEFENTHALER, GEORG (DE)；克勞斯特曼 史蒂芬 KLOSTERMANN, STEFAN (DE)；柯斯騰費德 克勞蒂亞 KIRSTENPFAD, CLAUDIA (DE)；柯尼格斯伯格 艾斯特 KOENIGSBERGER, ESTHER (AT)；羅斯 法蘭賽斯卡 ROS, FRANCESCA (IT)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：26 項 圖式數：7 共 148 頁

(54)名稱

抗 HLA-G 抗體及其用途

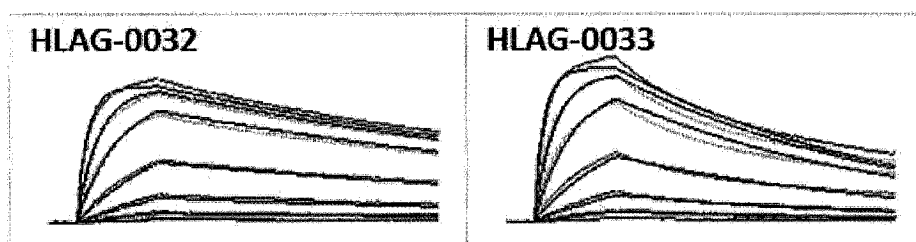
ANTI-HLA-G ANTIBODIES AND USE THEREOF

(57)摘要

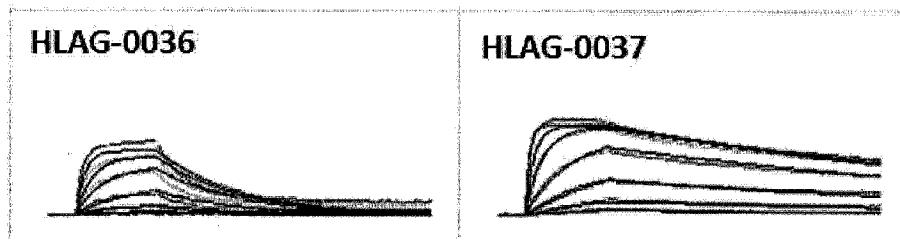
本發明係關於抗 HLA-G 抗體及使用其等抗體之方法。

The present invention relates to anti-HLA-G antibodies and methods of using the same.

指定代表圖：



【圖 3A】



【圖 3B】

【發明說明書】

【中文發明名稱】

抗HLA-G抗體及其用途

【英文發明名稱】

ANTI-HLA-G ANTIBODIES AND USE THEREOF

【技術領域】

本發明係關於抗HLA-G抗體及使用其等抗體之方法。

【先前技術】

又稱為人類白血球抗原G(human leukocyte antigen G ; HLA-G)之I類人類主要組織相容性複合物係由人類染色體6上之HLA-G基因所編碼之蛋白質。HLA-G屬HLA非古典I類重鏈同種同源物。此I類分子係由重鏈及輕鏈(β -2微球蛋白)組成之異二聚體。重鏈固定於膜中，但亦可脫洩出來/分泌出來。

- 重鏈係由三個結構域組成： $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 。 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域形成兩側有兩個 α 螺旋之肽結合槽。小肽(大約9-mer)可此類似於其他MHC I蛋白質結合至槽。

- 第二鏈係 $\beta 2$ 微球蛋白，其類似於其他MHC I蛋白質結合至重鏈。

HLA-G存在7種同種型，3種分泌形式及4種膜結合形式(如圖1中示意性顯示)。

HLA-G可形成功能活性複雜的寡聚結構(Kuroki, K等人 Eur J Immunol. 37 (2007) 1727-1729)。在兩個HLA-G分子之Cys 42之間形成二硫化物連接之二聚體。(Shiroishi M等人, J Biol Chem 281 (2006) 10439-10447。三聚體及四聚體複合物亦已闡述於(例如) Kuroki, K等人

Eur J Immunol. 37 (2007) 1727-1729、Allan D.S.等人 J Immunol Methods. 268 (2002) 43-50及T Gonen-Gross等人，J Immunol 171 (2003)1343-1351中)。

HLA-G主要表現於胎盤中之細胞滋養層上。若干腫瘤(包括胰臟、乳房、皮膚、結腸直腸、胃及卵巢)表現HLA-G (Lin, A.等人，Mol Med. 21 (2015) 782-791；Amiot, L.等人，Cell Mol Life Sci. 68 (2011) 417-431)。亦已報告表現與諸如發炎性疾病、GvHD及癌症等病理狀況相關聯。已報告HLA-G之表現與差的癌症預後相關聯。腫瘤細胞藉由經由HLA-G表現誘導免疫耐受/抑制來逃避宿主免疫監督。

多型性HLA家族概述			
• HLA-A:	2579 seqs	}	古典 I類MHC
• HLA-B:	3283 seqs		
• HLA-C:	2133 seqs		
• HLA-E:	15 seqs	}	非古典 I類MHC
• HLA-F:	22 seqs		
• HLA-G:	50 seqs		

HLA-G與其他MHC I分子共有高同源性(>98%)，因此難以生成與其他MHC I分子不具有交叉反應性之真正HLA-G特異性抗體。

先前已闡述以不同方式與HLA-G相互作用之某些抗體：Tissue Antigens, 55 (2000) 510-518係關於單株抗體，例如87G及MEM-G/9；Neoplasma 50 (2003) 331-338係關於識別完整HLA-G寡聚複合物(例如87G及MEM-G9)以及HLA-G自由重鏈(例如4H84、MEM-G/1及MEM-G/2)二者之某些單株抗體；Hum Immunol. 64 (2003) 315-326係關於針對表現HLA-G之JEG3腫瘤細胞所測試之若干抗體(例如MEM-G/09及

-G/13)，其排他性地與天然HLA-G1分子反應。MEM-G/01識別(類似於4H84 mAb)所有同種型之經變性HLA-G重鏈，而MEM-G/04選擇性地識別經變性HLA-G1、-G2及-G5同種型；Wiendl等人 Brain 2003 176-85係關於不同單株HLA-G抗體，例如87G、4H84、MEM-G/9。

以上出版物報導結合至人類HLA-G或人類HLA-G/ β 2M MHC複合物之抗體。然而，由於HLA家族之高多型性及高同源性，大多數抗體缺乏真正特異性HLA-G結合性質且通常亦與其他HLA家族成員(作為與 β 2M之MHC複合物或呈其 β 2M-自由形式)結合或交叉反應，或其簡單地不抑制HLA-G β 2M MHC複合物與其受體ILT2及/或ILT4之結合(且視為非拮抗抗體)。因此，業內需要生成及/或選擇具有受體阻斷性質之進一步經改良之真正HLA-G特異性抗體。

【發明內容】

本發明提供特製嵌合抗原及/或嚴格篩選分析以在眾多候選者中鑑別HLA-G特異性抗體(避免與其他MHC I類複合物分子之交叉反應性且同時選擇HLA-G受體(例如ILT2)阻斷抗體)。

本發明提供以下各項之套組：

- 單體野生型人類HLA-G β 2M MHC I複合物，其包含SEQ ID NO: 25；及
- 單體經修飾HLA-G β 2M MHC I複合物，其包含SEQ ID NO: 26 (其中HLA-G特定胺基酸已由所有HLA-A之HLA共有胺基酸替換)；及
- ILT2
- ILT4

其用於篩選人類HLA-G β 2M MHC複合物特異性抗體，其顯示與其

他HLA-A家族蛋白質無交叉反應性且抑制HLA-G與其受體ILT2及/或ILT4中之一者的結合。

本發明提供結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體特異性結合至人類HLA-G，其中該抗體結合至包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物。

在一個較佳實施例中，抗HLA-G抗體抑制ILT2結合至單體HLA-G β 2M MHC I複合物。

在另一較佳實施例中，抗HLA-G抗體抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上(與無抗體情形下之結合相比時)。

在一個實施例中，抗HLA-G抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達70%以上(與無抗體情形下之結合相比時)。

在另一較佳實施例中，本發明之抗HLA-G抗體結合至JEG3細胞上之人類HLA-G且抑制ILT2結合至JEG3細胞上之HLA-G (達50%以上) (與無抗體情形下之結合相比時)。

在一個實施例中，抗HLA-G抗體不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)。

在一個實施例中，抗HLA-G抗體不與包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)及/或不與包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)。

在一個實施例中，抗HLA-G抗體不與包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結

合)。

本發明之一個實施例係結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a) HVR-H1，其包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列；及(f) HVR-L3，其包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列；或

B) (a) HVR-H1，其包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列；及(f) HVR-L3，其包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列。

本發明之一個實施例係結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-L3；或

B) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選

自SEQ ID NO:11之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

本發明之一個實施例係結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)項下之抗體之VH及VL的人類化變體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；

ii) 或i)項下之抗體之VH及VL的人類化變體。

在一個實施例中，該抗HLA-G抗體係IgG1同型。

在一個實施例中，該抗HLA-G抗體係具有突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat之EU索引編號)之IgG1同型。

在一個實施例中，本發明之抗HLA-G抗體係單株抗體。

在一個實施例中，本發明之抗HLA-G抗體係人類、人類化或嵌合抗體。

在一個實施例中，本發明之抗HLA-G抗體係結合至HLA-G之抗體片段。

在一個實施例中，本發明之抗HLA-G抗體係Fab片段。

本發明提供經分離核酸，其編碼根據前述技術方案中任一者之抗體。

本發明提供包含該核酸之宿主細胞。

本發明提供產生抗體之方法，其包含培養該宿主細胞以使得產生抗體。

本發明提供產生抗體之該方法，其進一步包含自宿主細胞回收抗體。

本發明提供醫藥調配物，其包含本文所述之抗體及醫藥上可接受之載劑。

本發明提供本文所述之抗體，其用作藥劑。

本發明提供本文所述之抗體，其用於治療癌症。

本發明提供本文所述抗體在製造藥劑中之用途。在一個實施例中，該藥劑係用於治療癌症。

本發明提供治療患有癌症之個體的方法，其包含向該個體投與有效量之本文所述之抗體。

利用本發明之篩選方法，可挑選出新的抗HLA-G抗體。該等抗體顯示高度有價值之性質，例如強烈抑制ILT2結合至JEG3細胞上所表現之HLA-G或抑制ILT2結合至單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物。此外，本發明之抗體能夠藉由將單核球與表現HLA-G之細胞共培養恢復受抑制之免疫反應，即恢復LPS誘導之TNFa產生。另外，抗體具有高度特異性且未顯示與來自小鼠或大鼠起源之HLA-A MHC I複合物或MHC I複合物之交叉反應性。

【圖式簡單說明】

圖1：不同的HLA-G同種型

圖2：圖2A：HLA-G分子與 β 2M締合之示意圖

圖2B： 與某些受體締合之HLA-G分子之結構：與既定受體(例如ILT4及KIR2DL1)複合之HLA-G結構。ILT4結構(PDB代碼：2DYP)。KIR2DL1結構係得自PDB代碼1IM9 (KIR2DL1: HLA-Cw4複合結構)且藉由HLA-Cw4與HLA-G結構之疊加位於HLA-G上。受體係以帶狀表示法顯示，HLA-G係以分子表面表示法顯示。在其他HLA同種同源物中獨特或保守之HLA-G殘基分別著色為白色及灰色。獨特的表面殘基由嵌合反抗原中之HLA共有序列替代。

圖3： HLA-G抗體HLA-G-0032-HLA-G-0037與重組HLA-G (SEQ ID NO: 25)及對照經修飾人類HLA-G β 2M MHC I類複合物(其中HLA-G特異性胺基酸已由HLA-A共有胺基酸替代(= 去接枝化HLA-G SEQ ID NO: 26))之結合的SPR感測圖：

圖3A： HLA-G-0032及HLA-G-0033

圖3B： HLA-G-0036及HLA-G-0037

圖4： HLA-G抗體抑制(或刺激) HLA-G與ILT2及ILT4之相互作用/結合：

圖4A： ILT2抑制

圖4B： ILT4抑制

圖5： 使用於JEG3 (天然表現HLA-G之細胞)、SKOV-3細胞(野生型(wt)對HLA-G轉染之細胞(HLA-G+))及PA-TU-8902細胞(野生型(wt)對HLA-G轉染之細胞(HLA-G+))上之HLA-G抗體，HLA-G之細胞表面表現之流式細胞分析：

圖5A： HLA-G-0032 (編號0032)；**圖5B：** HLA-G-0033 (編號0033)；**圖5C：** HLA-G-0036 (編號0036)；**圖5D：** HLA-G-0037 (編號0037)

0037)

圖6：圖6A：抗HLA-G抗體阻斷/調節人類ILT2 Fc嵌合體與JEG3細胞上所表現HLA-G之相互作用：

細胞表面HLA-G利用新的抗HLA-G抗體之染色係藉由使用偶聯至Alexa488 (a)之抗大鼠IgG二級抗體評價。FACS直方圖中顯示僅利用二級抗體染色之細胞(灰色虛線)及利用抗HLA-G抗體染色之細胞(黑色實線)。在下部列(b)中，繪示與僅利用二級抗體染色之細胞(灰色虛線)相比，結合至JEG3細胞上之HLA-G之人類ILT2-Fc (黑色虛線)。可看出JEG3細胞與HLA-G抗體一起預培育對ILT2 Fc嵌合體結合之影響(黑色實線)：HLA-G-0032及HLA-G-0037顯示幾乎完全抑制ILT2-Fc嵌合體至JEG3細胞之結合。

圖6B：商業/參考抗HLA-G抗體對ILT2 Fc嵌合體至JEG3細胞上之HLA-G之結合的影響：

細胞表面HLA-G利用商業/參考抗HLA-G抗體之染色係藉由使用偶聯至Alexa488 (a)之物種特異性二級抗體進行評價。FACS直方圖中顯示僅利用二級抗體染色之細胞(灰色虛線)及利用抗HLA-G抗體染色之細胞(黑色實線)。在下部列(b)中，繪示與僅利用二級抗體染色之細胞(灰色虛線)相比，結合至JEG3細胞上之HLA-G之人類ILT2-Fc嵌合體(黑色虛線)。可看出JEG3細胞與參考抗體預培育對ILT2 Fc嵌合體結合之影響(黑色實線)。所測試參考抗體均未能阻斷ILT2 Fc嵌合體與JEG3細胞上之細胞表面HLA-G之相互作用。

圖7：利用抑制性抗HLA-G抗體阻斷HLA-G對TNF α 產生之恢復的影響 兩個供體編號

圖7A：供體編號1

圖7B：供體編號2

【實施方式】

當在本文中使用时，術語「HLA-G」、「人類HLA-G」係指HLA-G人類主要組織相容性複合物I類G，亦稱為人類白血球抗原G (HLA-G) (實例性SEQ ID NO: 17)。通常，HLA-G與β2微球蛋白(B2M或β2m)一起形成MHC I類複合物。在一個實施例中，HLA-G係指HLA-G與β2微球蛋白之MHC I類複合物。

如本文所用，「結合至人類HLA-G」、「特異性結合至人類HLA-G」、「結合至人類HLA-G」之抗體或「抗HLA-G抗體」係指**特異性**結合至人類HLA-G抗原或其細胞外結構域(extracellular domain；ECD)之抗體，其中結合親和力之 K_D 值為 5.0×10^{-8} mol/l或更低，在一個實施例中 K_D 值為 1.0×10^{-9} mol/l或更低，在一個實施例中 K_D 值為 5.0×10^{-8} mol/l至 1.0×10^{-13} mol/l。結合親和力係利用標準結合分析(例如表面電漿共振技術(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden))、例如使用包含HLA-G細胞外結構域(例如呈其天然存在之3維結構)之構築體測定。在一個實施例中，結合親和力係利用標準結合分析使用包含含有SEQ ID NO: 25之MHC I類複合物之實例性可溶性HLA-G測定。

HLA-G具有規則MHC I摺疊且由兩條鏈組成：鏈1係由三個結構域組成： $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 及 $\alpha 3$ 。 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 結構域形成兩側有兩個 α 螺旋之肽結合槽。小肽(大約9-mer)可類似於其他MHCI蛋白質結合至此槽。鏈2係β2微球蛋白，其為各種其他MHCI蛋白質所共有。

HLA-G可形成功能活性複雜的寡聚結構(Kuroki, K等人 Eur J

Immunol. 37 (2007) 1727-1729)。在兩個HLA-G分子之Cys 42之間形成二硫化物連接之二聚體。(Shiroishi M等人，J Biol Chem 281 (2006) 10439-10447。三聚體及四聚體複合物亦已闡述於(例如) Kuroki, K等人 Eur J Immunol. 37 (2007) 1727-1729, Allan D.S. 等人 J Immunol Methods. 268 (2002) 43-50 及 T Gonen-Gross 等人，J Immunol 171 (2003)1343-1351中)。不像大多數其他MHC I類分子那樣，HLA-G具有若干自由半胱胺酸殘基。Boyson等人，Proc Nat Acad Sci USA, 99: 16180 (2002)報導HLA-G5之重組可溶形式可利用分子間Cys42-Cys42二硫鍵形成二硫化物連接之二聚體。另外，HLA-G1之膜結合形式亦可在內源性表現HLA-G之Jeg3細胞系之細胞表面上形成二硫化物連接之二聚體。同樣在滋養層細胞之細胞表面亦已發現HLA-G1與HLA-G5之二硫化物連接之二聚體形式(Apps, R., Tissue Antigens, 68:359 (2006))。

HLA-G主要表現於胎盤中之細胞滋養層上。若干腫瘤(包括胰臟、乳房、皮膚、結腸直腸、胃及卵巢)表現HLA-G (Lin, A.等人，Mol Med. 21 (2015) 782-791；Amiot, L.等人，Cell Mol Life Sci. 68 (2011) 417-431)。亦已報告表現與諸如發炎性疾病、GvHD及癌症等病理狀況相關聯。已報告HLA-G之表現與差的癌症預後相關聯。腫瘤細胞藉由經由HLA-G表現誘導免疫耐受/抑制來逃避宿主免疫監督。

HLA-G存在7種同種型，3種分泌形式及4種膜結合形式(如圖1中示意性顯示)。HLA-G之最重要功能同種型包括b2-微球蛋白相關HLA-G1及HLA-G5。然而，該等同種型之致耐受性免疫效應不同且取決於配體之形式(單體、二聚體)及配體-受體相互作用之親和力。

HLA-G可使用標準分子生物技術產生。HLA-G同種型之核酸序列已

為此項技術已知。例如，參見基因庫登錄號AY359818。

HLA-G異構形式促進藉助ILT、具體而言ILT2、ILT4或其組合之信號轉導。

ILT：ILT代表涉及免疫細胞活性之調節及控制免疫細胞功能之Ig型活化及抑制性受體(Borges, L.等人，Curr Top Microbial Immunol, 244:123-136 (1999))。ILT分為三類：(i)抑制性，彼等含有細胞質基於免疫受體酪胺酸之抑制性基序(ITIM)且轉導抑制性信號(ILT2、ILT3、ILT4、ILT5及LIR8)；(ii)活化，彼等含有胞質尾區及跨膜結構域中之帶電胺基酸殘基(ILT1、ILT7、ILT8及LIR6 α)且藉助Fc受體之相關共用 γ 鏈之細胞質基於免疫受體酪胺酸之活化基序(ITAM)遞送活化信號；及(iii)可溶性分子ILT6，其缺少跨膜結構域。許多最近研究已凸顯抗原呈遞細胞(APC)表面上之ILT的免疫調節作用。ILT2、ILT3及ILT4受體(最具特性之免疫抑制性受體)主要表現於骨髓樣及漿細胞樣DC上。ILT3及ILT4係藉由將不成熟DC暴露於已知免疫抑制因子(包括IL-10、維生素D3或抑制性CD8 T細胞)上調(Chang, C. C.等人，Nat Immunol, 3:237-243 (2002))。ILT於DC上之表現係由發炎性刺激物、細胞介素及生長因子嚴格控制，且在DC活化後下調(Ju, X. S.等人，Gene, 331:159-164 (2004))。ILT2及ILT4受體之表現係由組織蛋白乙醯化高度調節，此有助於嚴格控制排他性地於髓系細胞中之基因表現(Nakajima, H., J Immunol, 171:6611-6620 (2003))。

抑制性受體ILT2及ILT4之連結改變單核球之細胞介素及趨化介素分泌輪廓且可抑制Fc受體信號傳導(Colonna, M.等人 J Leukoc Biol, 66:375-381 (1999))。ILT3對DC之作用及功能已由Suciu-Foca小組精確地

闡述(Suciu-Foca, N., *Int Immunopharmacol*, 5:7-11 (2005))。儘管ILT3之配體未知，但已知ILT4結合至HLA I類分子(HLA-A、HLA-B、HLA-C及HLA-G)之第三結構域，其與CD8競爭MHC I類結合(Shiroishi, M., *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:8856-8861 (2003))。若干抑制性ILT受體之優選配體係HLA-G。HLA-G在母體-胎兒耐受性及腫瘤細胞逃避免疫識別及破壞之機制中起到潛在作用(Hunt, J. S.等人，*Faseb J*, 19:681-693 (2005))。最可能地，DC功能藉由HLA-G-ILT相互作用之調節在DC生物學中係重要路徑。已確定，當利用HLA-G處理並利用同種異體T細胞刺激時，高度表現ILT2及ILT4受體之人類單核球源DC仍保持穩定致耐受性樣表型(CD80^{low}、CD86^{low}、HLA-DR^{low})，同時潛在誘導T細胞無反應性(Ristich, V.等人，*Eur J Immunol*, 35:1133-1142 (2005))。而且，HLA-G與高度表現ILT2及ILT4受體之DC之相互作用導致若干涉及MHC II類呈遞路徑之基因的下調。由專職性APC大量表現之溶酶體硫醇還原酶IFN- γ 誘導型溶酶體硫醇還原酶(GILT)在HLA-G修飾之DC中大大減少。經激發CD4⁺ T細胞之譜可受GILT之DC表現影響，此乃因用以選擇抗原之活體內T細胞反應在缺乏GILT之動物中在靶向基因破壞後降低(Marie, M.等人，*Science*, 294:1361-1365 (2001))。DC上之HLA-G/ILT相互作用干擾MHC II類分子之組裝及至細胞表面之輸送，此可能導致結構異常MHC II類分子之呈遞或表現效率較低。已確定，HLA-G顯著降低恆定鏈(CD74)、HLA-DMA及HLA-DMB基因於高度表現ILT抑制性受體之人類單核球源DC上之轉錄(Ristich, V.等人；*Eur J Immunol* 35:1133-1142 (2005))。

HLA-G之另一受體係KIR2DL4，此乃因KIR2DL4結合至表現HLA-

G之細胞(US2003232051；Cantoni, C.等人 Eur J Immunol 28 (1998) 1980；Rajagopalan, S.及E. O. Long. [出版勘誤出現於J Exp Med 191 (2000) 2027中] J Exp Med 189 (1999) 1093；Ponte, M.等人 PNAS USA 96 (1999) 5674)。KIR2DL4 (亦稱為2DL4)係與活性及一致性受體共有結構特徵之KIR家族成員(亦指定為CD158d) (Selvakumar, A.等人 Tissue Antigens 48 (1996) 285)。2DL4具有細胞質ITIM (此表明抑制性功能)及跨膜區中之帶正電胺基酸(活性KIR之典型特徵)。不像其他以選殖方式分佈之KIR，2DL4係藉由所有NK細胞轉錄(Valiante, N. M.等人 Immunity 7 (1997) 739；Cantoni, C.等人 Eur J Immunol 28 (1998) 1980；Rajagopalan, S.及E. O. Long. [出版勘誤出現於J Exp Med 191 (2000) 2027中] J Exp Med 189 (1999) 1093)。

如本文所用，「不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物；包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物；包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物、包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應」或「不特異性結合至其」之抗HLA-G抗體係指實質上不結合至該等反抗原中之任一者之抗HLA-G抗體。在一個實施例中，「不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物；包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物、包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物及/或包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應」或「不特異性結合至其」之抗HLA-G抗體係指僅顯示非特定結合之抗HLA-G抗體，其中結合親和力之 K_D 值為 5.0×10^{-6} mol/l或更高(直至檢測不到結合親和力)。結合親和力係利用標準結合分析(例如

表面電漿共振技術(BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden))利用各別抗原測定：包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物；包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物；包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物及/或包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物。分析設置以及抗原之構築/製備闡述於實例中。

出於本文目的，「受體人類框架」係包含源自人類免疫球蛋白框架或人類共有框架之輕鏈可變結構域(VL)框架或重鏈可變結構域(VH)框架之胺基酸序列之框架，如下文所定義。「源自」人類免疫球蛋白框架或人類共有框架之受體人類框架可包含其相同胺基酸序列，或其可含有胺基酸序列變化。在一些實施例中，胺基酸變化之數目為10或更小、9或更小、8或更小、7或更小、6或更小、5或更小、4或更小、3或更小或2或更小。在一些實施例中，VL受體人類框架之序列與VL人類免疫球蛋白框架序列或人類共有框架序列一致。(若適當，定義種系)

術語「抗體」在本文中係以最廣泛意義使用且涵蓋各種抗體結構，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、多特異性抗體(例如，雙特異性抗體)及抗體片段，只要其展現所要的抗原結合活性即可。

「抗體片段」係指不同於完整抗體之分子，其包含結合完整抗體所結合抗原之完整抗體之一部分。抗體片段之實例包括(但不限於) Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙特異性抗體；直鏈抗體；單鏈抗體分子(例如scFv)；及自抗體片段形成之多特異性抗體。

「結合至相同表位之抗體」(作為參考抗體)係指在競爭分析中將參考抗體與其抗原之結合阻斷50%或更高的抗體，且反之，參考抗體在競爭分

析中將該抗體與其抗原之結合阻斷50%或更高。實例性競爭分析提供於本文中。

術語「嵌合」抗體係指其中重鏈及/或輕鏈之一部分源自特定源或物種、而重鏈及/或輕鏈之其餘部分源自不同源或物種之抗體。

抗體之「類別」係指其重鏈所具有之恆定結構域或恆定區之類型。存在5種主要抗體類別類：IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，且該等中之若干種可進一步分成子類(同種型)，例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁及IgA₂。對應於不同類別之免疫球蛋白之重鏈恆定結構域分別稱為 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 及 μ 。

如本文所用，術語「細胞毒性劑」係指抑制或阻止細胞功能及/或引起細胞死亡或破壞之物質。細胞毒性劑包括(但不限於)放射性同位素(例如，At211、I131、I125、Y90、Re186、Re188、Sm153、Bi212、P32、Pb212及Lu之放射性同位素)；化學治療劑或藥物(例如胺甲蝶呤、阿黴素(adriamicin)、長春花生物鹼(vinca alkaloids)(長春新鹼(vincristine)、長春鹼(vinblastine)、依託泊苷(etoposide))、多柔比星(doxorubicin)、美法侖(melphalan)、絲裂黴素C(mitomycin C)、氮芥苯丁酸(chlorambucil)、道諾黴素(daunorubicin)或其他嵌入劑)；生長抑制劑；酶及其片段，例如溶核酶；抗生素；毒素，例如細菌、真菌、植物或動物來源之小分子毒素或酶促活性毒素，包括其片段及/或變體；及下文所揭示之各種抗腫瘤劑或抗癌劑。

藥劑(例如，醫藥調配物)之「有效量」係指以所需劑量且在所需時間段內有效達成所要的治療或預防結果之量。

術語「Fc區」在本文中用於定義免疫球蛋白重鏈之含有恆定區之至

少一部分的C末端區。該術語包括原始序列Fc區及變體Fc區。在一個實施例中，人類IgG重鏈Fc區自Cys226或Pro230延伸至重鏈之羧基末端。然而，Fc區之C-末端離胺酸(Lys447)、或C-末端甘胺酸(Gly446)及C-末端離胺酸(Lys447)可存在或不存在。除非在本文中另外指出，否則Fc區或恆定區中胺基酸殘基之編號係根據EU編號系統(亦稱為EU索引)，如Kabat, E.A.等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, 國立衛生研究院(National Institutes of Health), Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242中所闡述。

「框架」或「FR」係指除超變區(HVR)殘基外之可變結構域殘基。可變結構域之FR通常係由4個FR結構域組成：FR1、FR2、FR3及FR4。因此，HVR及FR序列通常出現於VH (或VL)中之下列序列中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換使用，係指具有實質上與原始抗體結構類似之結構或具有含有如本文所定義Fc區之重鏈的抗體。

術語「宿主細胞」、「宿主細胞系」及「宿主細胞培養物」可互換使用且係指向其中引入外源核酸之細胞，包括該等細胞之子代。宿主細胞包括「轉化體」及「經轉化細胞」，其包括原代經轉化細胞及源自其之子代，而不考慮傳代次數。子代之核酸內容物與親代細胞可不完全相同，而是可含有突變。本文包括與在原始經轉化細胞中所篩選或選擇相同之功能或生物活性之突變體子代。

「人類抗體」係具有對應於如下抗體之胺基酸序列的胺基酸序列者：其係由人類或人類細胞產生或源自利用人類抗體譜或其他編碼人類抗

體之序列之非人類來源。此人類抗體之定義明確排除包含非人類抗原結合殘基之人類化抗體。

「人類共有框架」係表示在選擇人類免疫球蛋白VL或VH框架序列中最普遍存在之胺基酸殘基之框架。通常，人類免疫球蛋白VL或VH序列係來自可變結構域序列之亞組。通常，序列亞組係如Kabat, E.A.等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Bethesda MD (1991)，NIH Publication 91-3242，第1-3卷中之亞組。在一個實施例中，對於VL，亞組係如Kabat等人中之亞組κI (見上文)。在一個實施例中，對於VH而言，該亞組係如Kabat等人所述之亞組III (見上文)。

「人類化」抗體係指包含來自非人類HVR之胺基酸殘基及來自人類FR之胺基酸殘基的嵌合抗體。在某些實施例中，人類化抗體將包含實質上全部之至少一個且通常兩個可變結構域，其中全部或實質上全部之HVR (例如，CDR)對應於非人類之彼等HVR，且全部或實質上全部之FR對應於人類抗體之彼等FR。人類化抗體視情況可包含源自人類抗體之抗體恆定區的至少一部分。抗體(例如非人類抗體)之「人類化形式」係指已經歷人類化之抗體。

如本文所用，術語「超變區」或「HVR」係指抗體可變結構域之在序列上超變(「互補決定區」或「CDR」)及/或形成在結構上經定義之環(「超變環」)及/或含有抗原接觸殘基(「抗原觸點」)之區中的每一者。通常，抗體包含6個HVR：3個在VH中(H1、H2、H3)，且3個在VL中(L1、L2、L3)。本文中之實例性HVR包括：

(a) 超變環，其出現於胺基酸殘基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)及96-101 (H3)處(Chothia及Lesk, J. Mol.

Biol. 196:901-917 (1987))；

(b) CDR，其出現於胺基酸殘基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)及95-102 (H3)處(Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第5版，Public Health Service, 國立衛生研究院, Bethesda, MD (1991))；

(c) 抗原觸點，其出現於胺基酸殘基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)及93-101 (H3)處(MacCallum等人，J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；及

(d) (a)、(b)及/或(c)之組合，包括HVR胺基酸殘基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)及94-102 (H3)。

除非另有指示，否則可變結構域中之HVR殘基及其他殘基(例如，FR殘基)在本文中係根據Kabat等人編號(見上文)。

「免疫偶聯物」係偶聯至一或多個異源分子(包括(但不限於)細胞毒性劑)之抗體。

「個體」或「受試者」係哺乳動物。哺乳動物包括(但不限於)家畜動物(例如，牛、綿羊、貓、狗及馬)、靈長類動物(例如，人類及非人類靈長類動物，例如猴子)、兔及齧齒類動物(例如，小鼠及大鼠)。在某些實施例中，個體或受試者係人類。

「經分離」抗體係已自其天然環境之組分分離者。在一些實施例中，將抗體純化至大於95%或99%純度，如藉由(例如)電泳(例如，SDS-PAGE、等電聚焦(IEF)、毛細管電泳)或層析(例如，離子交換或反相HPLC)所測定。關於評價抗體純度之方法的綜述，參見例如Flatman S.等

人，J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87。

「經分離」核酸係指已自其天然環境中之組分分離之核酸分子。經分離核酸包括通常含有核酸分子之細胞中所含的核酸分子，但該核酸分子存在於染色體外或存在於與其天然染色體位置不同之染色體位置處。

「編碼抗HLA-G抗體之經分離核酸」係指編碼抗體重鏈及輕鏈(或其片段)之一或多個核酸分子，包括單一載體或單獨載體中之該(等)核酸分子及存在於宿主細胞中一或多個位置處之該(等)核酸分子。

如本文所用，術語「單株抗體」係指自實質上同源抗體群體獲得之抗體，亦即，構成該群體之個別抗體相同及/或結合相同表位，除(例如)含有天然突變或在產生單株抗體製劑期間產生之可能變體抗體以外，此等變體通常以較小量存在。與通常包括針對不同決定簇(表位)之不同抗體之多株抗體製劑相比，單株抗體製劑之每一單株抗體針對抗原上之單一決定簇。因此，修飾語「單株」指示抗體之特徵係獲自抗體之實質上同源群體，且不應解釋為需要藉由任一具體方法產生抗體。舉例而言，根據本發明欲使用之單株抗體可藉由各種技術製得，包括(但不限於)雜交瘤方法、重組DNA方法、噬菌體展示方法及利用含有所有或一部分人類免疫球蛋白基因座之轉基因動物之方法，該等方法及用於製備單株抗體之其他實例性方法闡述於本文中。

「裸抗體」係指不與異源部分(例如，細胞毒性部分)或放射性標記偶聯之抗體。裸抗體可存在於醫藥調配物中。

「天然抗體」係指具有變化結構之天然免疫球蛋白分子。例如，天然IgG抗體係約150,000道爾頓(dalton)之異四聚體醣蛋白，其由二硫鍵鍵結之兩條相同輕鏈及兩條相同重鏈組成。自N末端至C末端，每一重鏈具

有可變區(VH)(亦稱為可變重結構域或重鏈可變結構域)，隨後係三個恆定結構域(CH1、CH2及CH3)。類似地，自N末端至C末端，每一輕鏈具有可變區(VL)(亦稱為可變輕結構域或輕鏈可變結構域)，隨後係恆定輕鏈(CL)結構域。基於抗體恆定結構域之胺基酸序列，可將該抗體之輕鏈指派為兩種類型中之一者，稱為卡帕(κ)及拉姆達(λ)。

術語「包裝插頁」用於指通常包括於治療產品之商業包裝內之說明書，其含有關於適應症、用法、劑量、投與、組合療法、禁忌及/或關於該等治療產品使用之警告的資訊。

關於參考肽序列之「胺基酸序列一致性百分比(%)」定義為在比對序列並引入空位(若需要)以達成最大序列一致性百分比之後，且不將任何保守取代視為序列一致性之一部分時，候選序列中與參考肽序列中之胺基酸殘基一致之胺基酸殘基的百分比。出於確定胺基酸序列一致性百分比之目的，比對可以本領域技術範圍內之各種方式達成，例如使用可公開獲得之電腦軟體，例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)軟體。彼等熟習此項技術者可確定用於比對序列之適當參數，包括在所比較序列之全長範圍內達成最大比對所需要之任何演算法。然而，出於本文目的，使用序列比較電腦程式ALIGN-2來生成胺基酸序列一致性%之值。ALIGN-2序列比較電腦程式係由Genentech, Inc.編寫，且原始碼已與使用者文件一起提交至U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559，其中其以美國著作權註冊號TXU510087註冊。ALIGN-2程式可自Genentech, Inc., South San Francisco, California公開獲得，或可自原始碼進行編譯。ALIGN-2程式應經編譯用於UNIX操作系統(包括數位UNIX V4.0D)中。所有序列比較參數皆由ALIGN-2程式設定且不改變。

在採用ALIGN-2進行胺基酸序列比較之情形下，既定胺基酸序列A相對於(to)、與(with)或針對(against)既定胺基酸序列B之胺基酸序列一致性%(另一選擇為可表達為相對於、與或針對既定胺基酸序列B具有或包含一定胺基酸序列一致性%之既定胺基酸序列A)計算如下：

$$100 \times \text{分數} X/Y$$

其中X係在A與B之程式比對中由序列比對程式ALIGN-2評定為一致性匹配之胺基酸殘基數，且其中Y係B中胺基酸殘基之總數。應瞭解，在胺基酸序列A之長度不等於胺基酸序列B之長度的情形中，A相對於B之胺基酸序列一致性%將不等於B相對於A之胺基酸序列一致性%。除非另有明確說明，否則本文所用之所有胺基酸序列一致性%的值皆如緊接前述段落中所述使用ALIGN-2電腦程式獲得。

術語「醫藥調配物」係指如下製劑：其所呈現形式允許其中所含活性成分之生物活性有效，且不含對將投與該調配物之受試者具有不可接受毒性的額外組分。

「醫藥上可接受之載劑」係指醫藥調配物中除活性成分以外對受試者無毒之成分。醫藥上可接受之載劑包括(但不限於)緩衝劑、賦形劑、穩定劑或防腐劑。

如本文所用，「治療(treatment)」(及其語法變化形式，例如「治療(treat)」或「治療(treating)」)係指嘗試改變所治療個體之自然病程之臨床干預，且可出於預防目的或在臨床病理學病程期間實施。所要的治療效應包括(但不限於)預防疾病之發生或復發、減輕症狀、減弱疾病之任何直接或間接病理結果、預防轉移、降低疾病進展之速率、改善或緩和疾病狀態及緩解或改良預後。在一些實施例中，使用本發明抗體以延遲疾病之發

生或減緩疾病之進展。

術語「可變區」或「可變結構域」係指抗體重鏈或輕鏈中參與抗體與抗原結合之結構域。天然抗體之重鏈及輕鏈之可變結構域(分別為VH及VL)通常具有類似結構，其中各結構域包含4個保守框架區(FR)及三個超變區(HVR)。(例如，參見Kindt T.J.等人 Kuby Immunology, 第6版, W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), 第91頁) 單一VH或VL結構域可足以賦予抗原-結合特異性。此外，結合特定抗原之抗體可使用來自結合該抗原之抗體之VH或VL結構域分離以分別篩選互補VL或VH結構域文庫。參見例如Portolano, S.等人，J. Immunol. 150 (1993)880-887；Clarkson, T.等人，Nature 352 (1991) 624-628。

如本文所用，術語「載體」係指能夠增殖與其連接之另一核酸的核酸分子。術語包括作為自複製核酸結構之載體，以及併入於引入其之宿主細胞基因組中之載體。某些載體能夠引導與其可操作地連接之核酸的表現。該等載體在本文中稱為「表現載體」。

I. 組合物及方法

在一態樣中，本發明部分地基於以下發現：本發明之所選抗HLA-G抗體結合至HLA-G之某些表位，且具有抑制ILT2及/或ILT4結合至HLA-G之能力。其抑制(例如) ILT2結合至HLA-G並藉由增加在適當刺激下免疫調節性細胞介素(例如TNF α)之分泌恢復HLA-G介導之免疫抑制。

在某些實施例中，提供結合至HLA-G之抗體。本發明抗體可(例如)用於癌症之診斷或治療。

A. 實例性抗HLA-G抗體

在一態樣中，本發明提供結合至人類HLA-G之經分離抗體(抗HLA-G

抗體)。

在某些實施例中，提供特異性結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體結合至包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物(參見實例3)。

在某些實施例中，提供特異性結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體結合至包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物，且其中該抗體抑制ILT2結合至單體HLA-G β 2M MHC I複合物(例如，參見實例4a及4b)。

在某些實施例中，提供特異性結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體結合至人類HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)，且其中該抗體抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上(與無抗體情形下之結合相比時)(例如，參見實例4b)。

在某些實施例中，提供特異性結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體結合至人類HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)，且其中該抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以上)(與無抗體情形下之結合相比時)(例如，參見實例4b)。

在某些實施例中，提供特異性結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體結合至人類HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)，且其中該抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達60%以上(與無抗體情形下之結合相比時)，抑制ILT4與二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上(與無抗體情形下之結合相比時)(例如，參見實例4b)。

在某些實施例中，提供特異性結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體結合至包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物；且其中該抗體抑制ILT2及ILT4結合至HLA-G β 2M MHC I複合物(參見實例4)。

在某些實施例中，提供特異性結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體結合至人類HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)，且其中該抗體抑制ILT2結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之HLA-G (達50%以上(在一個實施例中，達80%以上)) (與無抗體情形下之結合相比時) (參見實例6)。

在某些實施例中，提供特異性結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之HLA-G(參見實例5)，且其中該抗體抑制ILT2結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之HLA-G (達50%以上(在一個實施例中，達80%以上)) (與無抗體情形下之結合相比時) (參見實例6)。

在某些實施例中，本文所述之抗HLA-G抗體不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)。

在某些實施例中，本文所述之抗HLA-G抗體不與包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)及/或不與包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)。

在某些實施例中，本文所述之抗HLA-G抗體不與包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)。

本發明之一個實施例係結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a) HVR-H1，其包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列；及(f) HVR-L3，其包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列；或

B) (a) HVR-H1，其包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列；及(f) HVR-L3，其包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列。

本發明之一個實施例係結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-L3；或

B) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i)

包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

本發明之一個實施例係結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)項下之抗體之VH及VL的人類化變體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；

ii) 或i)項下之抗體之VH及VL的人類化變體。

本發明之一個實施例係本文所述之抗HLA-G抗體

其中該抗體具有獨立地以下性質之特徵：該抗HLA-G抗體

a) 與包含具有SEQ ID NO:7之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:8之胺基酸序列之VL之抗HLA-G抗體競爭結合至HLA-G，及/或

b) 與包含具有SEQ ID NO:7之胺基酸序列之VH及具有SEQ ID NO:8之胺基酸序列之VL之抗HLA-G抗體結合至相同表位，及/或

c) 結合至包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物；及/或

d) 不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

e) 不與包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

f) 不與包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

g) 不與包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

h) 抑制ILT2結合至單體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)；及/或

i) 抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以上)(與無抗體情形下之結合相比時)；及/或

j) 抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以上)(與無抗體情形下之結合相比時)；及/或

k) 抑制ILT2結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之HLA-G(達50%以上(在一個實施例中，達80%以上))(與無抗體情形下之結合相比時)(參見實例6)；及/或

l) 其中該抗體結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之HLA-G(參見實例5)，且其中該抗體抑制ILT2 結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之HLA-G(達50%以上(在一個實施例中，達80%以上))(與無抗體情形下之結合相比時)(參見實例6)；及/或

m) 其中該抗體結合至人類HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)，且其中該抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達60%以上(與無抗體情形下之結合相比時)，抑制ILT4與二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%

以上(與無抗體情形下之結合相比時)(例如，參見實例4b)。

本發明之一個實施例係結合至人類HLA-G之經分離抗體，其中該抗體包含

A) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-L3；或

B) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3；

且其中在A)或B)項下之該抗體具有獨立地以下性質之特徵：該抗HLA-G抗體

a) 結合至包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物；及/或

b) 不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

c) 不與包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

d) 不與包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

e) 不與包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

f) 抑制ILT2結合至單體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)；及/或

g) 抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以上)(與無抗體情形下之結合相比時)；及/或

h) 抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以上)(與無抗體情形下之結合相比時)；及/或

i) 抑制ILT2結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之HLA-G (達50%以上(在一個實施例中，達80%以上))(與無抗體情形下之結合相比時)(參見實例6)；及/或

j) 其中該抗體結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之人類HLA-G (參見實例5)，且其中該抗體抑制ILT2結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)上之人類HLA-G (達50%以上(在一個實施例中，達80%以上))(與無抗體情形下之結合相比時)(參見實例6)；及/或

k) 其中該抗體結合至人類HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)，且其中該抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達60%以上(與無抗體情形下之結合相比時)，抑制ILT4與二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%

以上(與無抗體情形下之結合相比時)(例如，參見實例4b)。

在本發明之一個實施例中，抗體係IgG1同型。在本發明之一個實施例中，抗體係具有突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat之EU索引編號)之IgG1同型。

在又一態樣中，任一上述實施例之抗HLA-G抗體可單獨或組合併入任一特徵，如下文部分1-7中所述：

1. 抗體親和力

在某些實施例中，本文所提供之抗體具有 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.1 \text{ nM}$ 、 $\leq 0.01 \text{ nM}$ 或 $\leq 0.001 \text{ nM}$ (例如 10^{-8} M 或更小，例如 10^{-8} M 至 10^{-13} M ，例如 10^{-9} M 至 10^{-13} M)之解離常數 K_D 。

在一個較佳實施例中， K_D 係使用表面電漿共振分析使用BIACORE[®]，在25°C下利用固定化抗原CM5晶片在約10個反應單位(RU)下量測。簡言之，根據供應商說明書使用N-乙基-N'-(3-二甲基胺基丙基)-碳化二亞胺鹽酸鹽(EDC)及N-羥基琥珀醯亞胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物感測器晶片(CM5，BIACORE, Inc.)。用10 mM乙酸鈉(pH 4.8)將抗原稀釋至5 $\mu\text{g/ml}$ (約0.2 μM)，然後以5 $\mu\text{l/分鐘}$ 之流速注射以達成約10個反應單位(RU)之偶合蛋白質。在注射抗原後，注射1 M乙醇胺以阻斷未反應之基團。對於動力學量測，在25°C下以約25 $\mu\text{l/min}$ 之流速注射存於含有0.05%聚山梨醇酯20 (TWEEN-20TM)表面活性劑之PBS (PBST)中之Fab兩倍連續稀釋液(0.78 nM至500 nM)。締合速率($k_{\text{締合}}$ 或 k_a)及解離速率($k_{\text{解離}}$ 或 k_d)係使用簡單一對一朗格繆爾(Langmuir)結合模型(BIACORE[®]評估軟體3.2版)藉由同時擬合結合及解離感測圖來計算。以比率 k_d/k_a ($k_{\text{解離}}/k_{\text{締合}}$)之形式來計算平衡解離常數 K_D 。例如參見Chen, Y.等人，J. Mol. Biol.

293 (1999) 865-881。若藉由上述表面電漿共振分析測得之締合速率超過 $10^6 \text{ M}^{-1} \text{ S}^{-1}$ ，則締合速率可藉由使用螢光淬滅技術測定，該技術係在 25°C 下於增加濃度之抗原存在下量測於 PBS (pH 7.2) 中之 20 nM 抗抗原抗體 (Fab 形式) 之螢光發射強度的增加或降低 (激發 = 295 nm；發射 = 340 nm，16 nm 帶通)，如在分光光度計 (例如配備有斷流之分光光度計 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM- AMINCO™ 分光光度計 (ThermoSpectronic)) 中利用攪拌之比色杯所量測。

2. 抗體片段

在某些實施例中，本文所提供之抗體係抗體片段。抗體片段包括 (但不限於) Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv 及 scFv 片段及下文所述之其他片段。關於某些抗體片段之綜述，參見例如 Hudson, P.J. 等人，Nat. Med. 9 (2003) 129-134。關於 scFv 片段之綜述，參見例如 Plueckthun, A., 於 The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 第 113 卷, Rosenberg 及 Moore (編者), Springer-Verlag, New York (1994), 第 269-315 頁中；亦參見 WO 93/16185 及美國專利第 5,571,894 號及第 5,587,458 號。關於包含補救受體結合表位殘基且活體內半衰期增加之 Fab 及 F(ab')₂ 片段之論述，參見美國專利第 5,869,046 號。

雙價抗體係具有兩個抗原結合位點之抗體片段，其可為二價或雙特異性的。參見例如 EP 0 404 097；WO 1993/01161；Hudson, P.J. 等人，Nat. Med. 9 (2003) 129-134；及 Holliger, P. 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448。三價抗體及四價抗體亦闡述於 Hudson, P.J. 等人，Nat. Med. 9 (2003) 129-134 中。

單一結構域抗體係抗體片段，其包含抗體重鏈可變結構域所有或一

部分或輕鏈可變結構域所有或一部分。在某些實施例中，單一結構域抗體係人類單一結構域抗體(Domantis, Inc., Waltham, MA；例如，參見美國專利第6,248,516 B1號)。

抗體片段可藉由各種技術來製備，包括(但不限於)將完整抗體進行蛋白水解消化作用，以及藉由重組宿主細胞(例如大腸桿菌(*E. coli*)或噬菌體)產生，如本文所述。

3. 嵌合及人類化抗體

在某些實施例中，本文所提供抗體係嵌合抗體。某些嵌合抗體闡述於(例如)美國專利第4,816,567號；及Morrison, S.L.等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81 (1984) 6851-6855)中。在一個實例中，嵌合抗體包含非人類可變區(例如，源自小鼠、大鼠、倉鼠、兔或非人類靈長類動物(例如猴子)之可變區)及人類恆定區。在另一實例中，嵌合抗體係為「類別轉換」抗體，其中該抗體的類別或子類別已不同於親代抗體。嵌合抗體包含其抗原結合片段。

在某些實施例中，嵌合抗體係人類化抗體。通常，將非人類抗體人類化以降低對人類之免疫原性，同時保持親代非人類抗體之特異性及親和性。通常，人類化抗體包含一或多個可變結構域，其中HVR (例如，CDR)(或其部分)係源自非人類抗體，而FR (或其部分)係源自人類抗體序列。人類化抗體視情況亦包含人類恆定區之至少一部分。在一些實施例中，人類化抗體中之一些FR殘基係經來自非人類抗體(例如，產生HVR殘基之抗體)之相應殘基取代，以便(例如)恢復或改良抗體特異性或親和性。

人類化抗體及其製備方法綜述於(例如) Almagro, J.C.及Fransson, J.,

Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633中，且進一步闡述於(例如)以下文獻中：Riechmann, I.等人，Nature 332 (1988) 323-329；Queen, C.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 10029-10033；美國專利第5,821,337號、第7,527,791號、第6,982,321號及第7,087,409號；Kashmiri, S.V.等人，Methods 36 (2005) 25-34 (闡述SDR (a-CDR)接枝)；Padlan, E.A., Mol. Immunol. 28 (1991) 489-498 (闡述「表面重塑」)；Dall'Acqua, W.F.等人，Methods 36 (2005) 43-60 (闡述「FR改組」)；及Osbourn, J.等人，Methods 36 (2005) 61-68及Klimka, A.等人，Br. J. Cancer 83 (2000) 252-260 (闡述FR改組之「引導選擇」方法)。

可用於人類化之人類框架區包括(但不限於)：使用「最佳擬合」方法選擇之框架區(例如，參見Sims, M.J.等人，J. Immunol. 151 (1993) 2296-2308)；源自具有輕鏈或重鏈可變區之特定亞組之人類抗體之共有序列的框架區(例如，參見Carter, P.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289；及Presta, L.G.等人，J. Immunol. 151 (1993) 2623-2632)；人類成熟(體細胞突變)框架區或人類種系框架區(例如，參見Almagro, J.C.及Fransson, J., Front. Biosci. 13 (2008) 1619-1633)；及源自篩選FR文庫之框架區(例如，參見Baca, M.等人，J. Biol. Chem. 272 (1997) 10678-10684及Rosok, M.J.等人，J. Biol. Chem. 271 (1996) 22611-22618)。

4. 人類抗體

在某些實施例中，本文所提供抗體係人類抗體。可使用業內已知之各種技術來產生人類抗體。人類抗體通常闡述於van Dijk及van de

Winkel, J.G. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374 及 Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459 中。

人類抗體可藉由將免疫原投與轉基因動物來製備，該轉基因動物已經改良以產生完整人類抗體或具有因應抗原攻擊之人類可變區的完整抗體。該等動物通常含有所有或一部分人類免疫球蛋白基因座，該等基因座替代內源性免疫球蛋白基因座，或存在於染色體外或隨機整合於動物染色體中。在該等轉基因小鼠中，內源性免疫球蛋白基因座通常已失活。關於自轉基因動物獲得人類抗體之綜述，參見 Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125。亦參見例如美國專利第 6,075,181 號及第 6,150,584 號，其闡述 XENOMOUSE™ 技術；美國專利第 5,770,429 號，其闡述 HUMAB® 技術；美國專利第 7,041,870 號，其闡述 K-M MOUSE® 技術；及美國專利申請公開案第 US 2007/0061900 號，其闡述 VELOCIMOUSE® 技術。由該等動物所產生完整抗體之人類可變區可(例如)藉由與不同人類恆定區組合進一步修飾。

人類抗體亦可藉由基於雜交瘤之方法來製備。已闡述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類異源骨髓瘤細胞系。(例如，參見 Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005；Brodeur, B.R. 等人，*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), 第 51-63 頁；及 Boerner, P. 等人，*J. Immunol.* 147 (1991) 86-95)。經由人類 B 細胞雜交瘤技術產生之人類抗體亦闡述於 Li, J. 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562 中。額外方法包括闡述於(例如)美國專利第 7,189,826 號(闡述自雜交瘤細胞系生成單株人類 IgM 抗體)及 Ni, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006)

265-268 (闡述人類-人類雜交瘤)中之彼等。人類雜交瘤技術(三源雜交瘤 (Trioma technology) 技術)亦闡述於 Vollmers, H.P. 及 Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937 及 Vollmers, H.P. 及 Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191 中。

人類抗體亦可藉由分離選自人類源性噬菌體展示文庫之 Fv 純系可變結構域序列來生成。然後，該等可變結構域序列可與所要的人類恆定結構域組合。自抗體文庫挑選出人類抗體之技術闡述於下文中。

5. 文庫源性抗體

可藉由自組合文庫篩選具有一或多種所要的活性之抗體來分離本發明抗體。舉例而言，業內已知用於產生噬菌體展示文庫及自該等文庫篩選具有所要的結合特性之抗體的眾多種方法。該等方法綜述於(例如) Hoogenboom, H.R. 等人，*Methods in Molecular Biology* 178 (2001) 1-37 中且進一步闡述於(例如) McCafferty, J. 等人，*Nature* 348 (1990) 552-554；Clackson, T. 等人，*Nature* 352 (1991) 624-628；Marks, J.D. 等人，*J. Mol. Biol.* 222 (1992) 581-597；Marks, J.D. 及 Bradbury, A., *Methods in Molecular Biology* 248 (2003) 161-175；Sidhu, S.S. 等人，*J. Mol. Biol.* 338 (2004) 299-310；Lee, C.V. 等人，*J. Mol. Biol.* 340 (2004) 1073-1093；Fellouse, F.A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101 (2004) 12467-12472；及 Lee, C.V. 等人，*J. Immunol. Methods* 284 (2004) 119-132 中。

在某些噬菌體展示方法中，藉由聚合酶鏈反應(PCR)來分別選殖 VH 及 VL 基因之譜且於噬菌體文庫中隨機重組，然後可篩選抗原結合噬菌

體，如Winter, G.等人，Ann. Rev. Immunol. 12 (1994) 433-455中所述。噬菌體通常以單鏈Fv (scFv)片段或以Fab片段展示抗體片段。來自免疫化源之文庫提供針對免疫原之高親和性抗體而無需構築雜交瘤。或者，可(例如，自人類)選殖天然譜以在無任何免疫之情形下提供針對寬範圍非自身以及自身抗原之抗體的單一來源，如Griffiths, A.D.等人，EMBO J. 12 (1993) 725-734所述。最後，亦可藉由自幹細胞選殖未重排的V基因區段並使用含有隨機序列之PCR引子以編碼高度可變CDR3區並在活體外實現重排來以合成方式生成天然文庫，如由Hoogenboom, H.R.及Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388所述。闡述人類抗體噬菌體文庫之專利公開案包括例如：美國專利第5,750,373號及美國專利公開案第2005/0079574號、第2005/0119455號、第2005/0266000號、第2007/0117126號、第2007/0160598號、第2007/0237764號、第2007/0292936號及第2009/0002360號。

本文中將自人類抗體文庫分離之抗體或抗體片段視為人類抗體或人類抗體片段。

6. 多特異性抗體

在某些實施例中，本文所提供之抗體係多特異性抗體，例如雙特異性抗體。多特異性抗體係對至少兩個不同位點具有結合特異性之單株抗體。在某些實施例中，結合特異性中之一者係針對HLA-G且另一者係針對任一其他抗原。在某些實施例中，雙特異性抗體可結合至HLA-G之兩個不同表位。雙特異性抗體亦可用於將細胞毒性劑定位於表現HLA-G之細胞。雙特異性抗體可以全長抗體或抗體片段製備。

製備多特異性抗體之技術包括(但不限於)兩個具有不同特異性之免疫

球蛋白重鏈-輕鏈對之重組共表現(參見Milstein, C.及Cuello, A.C., Nature 305 (1983) 537-540、WO 93/08829及Traunecker, A.等人, EMBO J. 10 (1991) 3655-3659)及「隆凸於孔洞中(knob-in-hole)」工程化(例如, 參見美國專利第5,731,168號)。多特異性抗體亦可藉由以下方式製備: 用於製備抗體Fc-異二聚體分子之工程化靜電轉向效應(WO 2009/089004); 使兩個或更多個抗體或片段交聯(例如, 參見美國專利第4,676,980號及Brennan, M.等人, Science 229 (1985) 81-83); 使用白胺酸拉鍊以產生雙特異性抗體(例如, 參見Kostelny, S.A.等人, J. Immunol. 148 (1992) 1547-1553); 使用用於製備雙特異性抗體片段之「雙價抗體」技術(例如, 參見Holliger, P.等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448); 及使用單鏈Fv (scFv)二聚體(例如, 參見Gruber, M等人, J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374); 及製備三特異性抗體, 如(例如) Tutt, A.等人, J. Immunol. 147 (1991) 60-69中所述。

本文亦包括具有三個或更多個功能抗原結合位點之工程化抗體, 包括「章魚抗體(Octopus antibodies)」(例如, 參見US 2006/0025576)。

本文之抗體或片段亦包括包含結合至HLA-G以及另一不同抗原之抗原結合位點的「雙重作用 Fab」或「DAF」(例如, 參見US 2008/0069820)。

本文之抗體或片段亦包括闡述於以下中之多特異性抗體: WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792、及 WO 2010/145793、WO2011/117330、WO2012/025525、WO2012/025530、

WO2013/026835 、 WO2013/026831 、 WO2013/164325 或 WO2013/174873 。

7. 抗體變體

在某些實施例中，涵蓋本文所提供抗體之胺基酸序列變體。舉例而言，咸期望改良抗體之結合親和力及/或其他生物性質。抗體之胺基酸序列變體可藉由將適當修飾引入至編碼抗體之核苷酸序列中或藉由肽合成來製備。該等修飾包括(例如)抗體之胺基酸序列內殘基之缺失及/或插入及/或取代。可實施缺失、插入及取代之任一組合以獲得最終構築體，前提條件係最終構築體具有所要的特性，例如抗原結合。

取代、插入及缺失變體

在某些實施例中，提供具有一或多個胺基酸取代之抗體變體。用於取代突變誘發之所關注位點包括HVR及FR。實例性變化提供於表1之「實例性取代」標題下，且如下文參照胺基酸側鏈類別進一步闡述。保守取代顯示於表1中之「較佳取代」標題下。可將胺基酸取代引入至所關注抗體且產物針對所要的活性進行篩選，該所要的活性係(例如)保留/改良之抗原結合、降低之免疫原性或經改良之ADCC或CDC。

表1

初始殘基	實例性取代	較佳取代
Ala (A)	Val ; Leu ; Ile	Val
Arg (R)	Lys ; Gln ; Asn	Lys
Asn (N)	Gln ; His ; Asp, Lys ; Arg	Gln
Asp (D)	Glu ; Asn	Glu
Cys (C)	Ser ; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn ; Glu	Asn

初始殘基	實例性取代	較佳取代
Glu (E)	Asp ; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn ; Gln ; Lys ; Arg	Arg
Ile (I)	Leu ; Val ; Met ; Ala ; Phe ; 正白胺酸	Leu
Leu (L)	正白胺酸 ; Ile ; Val ; Met ; Ala ; Phe	Ile
Lys (K)	Arg ; Gln ; Asn	Arg
Met (M)	Leu ; Phe ; Ile	Leu
Phe (F)	Trp ; Leu ; Val ; Ile ; Ala ; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val ; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr ; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp ; Phe ; Thr ; Ser	Phe
Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正白胺酸	Leu

胺基酸可根據常見側鏈性質分組：

- (1) 疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- (2) 中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- (3) 酸性：Asp、Glu；
- (4) 鹼性：His、Lys、Arg；
- (5) 影響鏈取向之殘基：Gly、Pro；
- (6) 芳香族殘基：Trp、Tyr、Phe。

非保守性取代將需要將該等類別之一種之成員與另一類別交換。

一種取代變體類型涉及取代親代抗體(例如人類化或人類抗體)之一或多個超變區殘基。通常，經選擇用於進一步研究之所得變體相對於親代抗體將具有某些生物學性質之改變(例如，改良)(例如，增加之親和性、降

低之免疫原性)及/或將實質上保留親代抗體之某些生物學性質。實例性取代變體係親和性成熟抗體，其可便利地(例如)使用基於噬菌體展示之親和性成熟技術(例如彼等闡述於本文中者)生成。簡言之，使一或多個HVR殘基突變且將變體抗體展示於噬菌體上並針對特定生物學活性(例如結合親和力)進行篩選。

可對HVR作出改變(例如，取代)以(例如)改良抗體親和性。該等改變可在HVR「熱點(hotspot)」(亦即，由在體細胞成熟過程期間以高頻率經歷突變之密碼子編碼的殘基)(例如，參見，Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196)及/或SDR (a-CDR)中進行，其中測試所得變體VH或VL之結合親和力。藉由二級文庫之構築及再選擇之親和性成熟已闡述於(例如)Hoogenboom, H.R.等人之*Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37中。在親和性成熟之一些實施例中，藉由各種方法中之任一者(例如，易錯PCR、鏈改組或寡核苷酸指導的誘變)將多樣性引入針對成熟選擇之可變基因中。然後建立二級文庫。然後篩選文庫以鑑別具有所要的親和性之任一抗體變體。引入多樣性之另一方法涉及HVR指導的方法，其中將若干HVR殘基(例如，一次4至6個殘基)隨機化。可(例如)使用丙胺酸掃描誘變或建模特定鑑別參與抗原結合之HVR殘基。特定而言，通常靶向CDR-H3及CDR-L3。

在某些實施例中，取代、插入或缺失可發生於一或多個HVR內，只要此等變化不會實質上降低抗體結合抗原之能力即可。例如，可對HVR作出不會實質上降低結合親和力之保守改變(例如，本文所提供之保守取代)。該等改變可位於HVR「熱點」或SDR外。在上文所提供變體VH及VL序列之某些實施例中，每一HVR未經改變，或含有不超過一個、兩個

或三個胺基酸取代。

用於鑑別抗體中可靶向誘變之殘基或區的有效方法稱為「丙胺酸掃描誘變」，如由Cunningham, B.C.及Wells, J.A., *Science*, 244 (1989) 1081-1085所闡述。在此方法中，已鑑別殘基或目標殘基組(例如，帶電殘基，例如arg、asp、his、lys及glu)，並由中性或帶負電胺基酸(例如，丙胺酸或聚丙胺酸)替代以確定是否影響抗體與抗原之相互作用。可在對初始取代展現功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，抗原-抗體複合物之晶體結構係用以鑑別抗體與抗原間之接觸點。作為取代候選物，可靶向或消除該等接觸殘基及相鄰殘基。可篩選變體以確定其是否含有所要的性質。

胺基酸序列插入包括胺基-及/或羧基末端融合物(長度在一個殘基至含有一百或更多個殘基之多肽範圍內)以及單一或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N-末端甲硫胺醯殘基之抗體。抗體分子之其他插入變體包括抗體之N末端或C末端與酶(例如用於ADEPT)或延長抗體血清半衰期之多肽之融合物。

b) Fc區變體

在某些實施例中，可將一或多個胺基酸修飾引入本文所提供抗體之Fc區中，藉此產生Fc區變體。Fc區變體可包含人類Fc區序列(例如，人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc區)，該序列在一或多個胺基酸位置包含胺基酸修飾(例如取代)。

具有降低效應子功能之抗體包括彼等具有Fc區殘基238、265、269、270、297、327及329中之一或多者的取代者(美國專利第6,737,056號)。該等Fc突變體包括在胺基酸位置265、269、270、297及327中之兩

者或更多者處具有取代之Fc突變體，包括殘基265及297替代為丙胺酸之所謂「DANA」Fc突變體(美國專利第7,332,581號)。

闡述具有經改良或降低之對FcR之結合的某些抗體變體。(例如，參見美國專利第6,737,056號；WO 2004/056312及Shields, R.L.等人，J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604)。

在一個實施例中，本發明之該抗體係具有突變L234A及L235A或具有突變L234A、L235A及P329G之IgG1。在另一實施例中，該抗體係具有突變S228P及L235E或具有突變S228P、L235E及P329G之IgG4 (根據Kabat之EU索引編號，Kabat等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版Public Health Service, 國立衛生研究院, Bethesda, MD, 1991)。

具有增加之半衰期及經改良與新生兒Fc受體(FcRn)之結合之抗體闡述於US 2005/0014934中，新生兒Fc受體負責將母體IgG轉移至胎兒中(Guyer, R.L.等人，J. Immunol. 117 (1976) 587-593及Kim, J.K.等人，J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434)。彼等抗體包含其中具有一或多個改良Fc區與FcRn之結合之取代之Fc區。此等Fc變體包括在以下Fc區殘基之一或多者處具有取代之彼等：238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434，例如，取代Fc區殘基434 (美國專利第7,371,826號)。

亦參見Duncan, A.R.及Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740；US 5,648,260；US 5,624,821；及WO 94/29351，其涉及Fc區變體之其他實例。

c) 經半胱胺酸工程化之抗體變體

在某些實施例中，可能產生所要的經半胱胺酸工程化之抗體，例如「thioMAb」，其中抗體之一或多個殘基經半胱胺酸殘基取代。在特定實施例中，經取代殘基出現於抗體之可及位點處。藉由用半胱胺酸取代彼等殘基，反應性硫醇基團由此位於抗體之可及位點處且可用於將抗體偶聯至其他部分(例如藥物部分或連接體-藥物部分)以產生免疫偶聯物，如本文進一步闡述。在某些實施例中，以下殘基中之任一或多者可經半胱胺酸取代：輕鏈之V205 (Kabat編號)、重鏈之A118 (EU編號)及重鏈Fc區之S400 (EU編號)。經半胱胺酸工程化之抗體可如(例如)美國專利第7,521,541號中所述來產生。

d) 抗體衍生物

在某些實施例中，本文所提供之抗體可進一步經修飾以含有業內已知且易於獲得之額外非蛋白質性部分。適於衍生抗體之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇之共聚物、羧甲基纖維素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯基吡咯啉酮、聚-1,3-二氧戊環、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/馬來酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙基吡咯啉酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙烯化之多元醇(例如，甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛可因其在中之穩定性而在製造方面具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為具支鏈或不具支鏈。附接至抗體之聚合物的數目可有所變化，且若附接一個以上聚合物，則其可為相同或不同分子。通常，用於衍生之聚合物之數目及/或類型可基於包括(但不限於)以下之考慮因素來確定：欲改良抗體之特定性質或功能、抗體衍生物是否將用於界定條件下之療法等。

在另一實施例中，提供抗體與可藉由暴露於輻射選擇性加熱之非蛋白質性部分之偶聯物。在一個實施例中，非蛋白質性部分係碳奈米管(Kam, N.W. 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605)。輻射可具有任一波長，且包括(但不限於)如下波長：其不會危害正常細胞，但將非蛋白質性部分加熱至可將鄰近抗體-非蛋白質性部分之細胞殺死的溫度。

B. 重組方法及組合物

可使用重組方法及組合物來產生抗體，例如，如美國專利第4,816,567號中所述。在一個實施例中，提供本文所述之編碼抗HLA-G抗體之分離核酸。此核酸可編碼包含抗體之VL之胺基酸序列及/或包含VH之胺基酸序列(例如，抗體之輕鏈及/或重鏈)。在又一實施例中，提供一個或多個包含此核酸之載體(例如，表現載體)。在又一實施例中，提供包含此核酸之宿主細胞。在一個此實施例中，宿主細胞包含以下各項(例如，已經以下各項轉化)：(1)包含核酸之載體，該核酸編碼包含抗體之VL之胺基酸序列及包含抗體之VH之胺基酸序列，或(2)包含編碼包含抗體之VL之胺基酸序列之核酸的第一載體及包含編碼包含抗體之VH之胺基酸序列之核酸的第二載體。在一個實施例中，宿主細胞係真核細胞，如中國倉鼠卵巢(Chinese Hamster Ovary, CHO)細胞、HEK293細胞或淋巴樣細胞(例如，Y0、NS0、Sp20細胞)。在一個實施例中，提供製備抗HLA-G抗體之方法，其中該方法包含在適於表現抗體之條件下培養如上文所提供包含編碼抗體之核酸的宿主細胞，及視情況自宿主細胞(或宿主細胞培養基)回收抗體。

對於抗HLA-G抗體之重組產生，分離(例如)如上文所述編碼抗體之

核酸並將其插入於一或多個載體中以進一步選殖及/或在宿主細胞中表現。此核酸可使用習用程序容易地分離並測序(例如，藉由使用能與編碼抗體之重鏈及輕鏈之基因特異性結合的寡核苷酸探針)。

用於選殖或表現編碼抗體之載體之適宜宿主細胞包括本文所述原核或真核細胞。舉例而言，抗體可在細菌中產生，具體而言在無需醮基化及Fc效應子功能時。關於抗體片段及多肽在細菌中之表現，參見例如US 5,648,237、US 5,789,199及US 5,840,523。(亦參見Charlton, K.A., 在：Methods in Molecular Biology, 第248卷, Lo, B.K.C. (編輯), Humana Press, Totowa, NJ (2003), 第245-254頁，其闡述抗體片段在大腸桿菌中之表現)。表現後，抗體可自細菌細胞團以可溶部分形式分離出且可進一步純化。

除原核生物外，真核微生物(例如絲狀真菌或酵母菌)亦係用於編碼抗體之載體之適宜選殖或表現宿主，包括醮基化途徑已「人類化」從而產生具有部分或完全人類醮基化模式之抗體的真菌及酵母菌菌株。參見Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414；及Li, H.等人，Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215。

用於表現醮基化抗體之適宜宿主細胞亦源自多細胞生物體(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包含植物及昆蟲細胞。已鑑別多種桿狀病毒株，其可與昆蟲細胞聯合使用，具體而言用於轉染草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞。

亦可利用植物細胞培養物作為宿主。例如，參見美國專利第5,959,177號、第6,040,498號、第6,420,548號、第7,125,978號及第6,417,429號(闡述在轉基因植物中產生抗體之PLANIBODIESTM技術)。

亦可使用脊椎動物細胞作為宿主。舉例而言，可使用適於在懸浮液中生長之哺乳動物細胞系。可用之哺乳動物宿主細胞系之其他實例係藉由SV40轉化之猴腎CV1系(COS-7)；人類胚腎系(293或293細胞，如(例如)Graham, F.L.等人，J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74中所述)；幼倉鼠腎細胞(BHK)；小鼠塞特利氏細胞(mouse sertoli cell)(TM4細胞，如(例如)Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252中所述)；猴腎細胞(CV1)；非洲綠猴腎細胞(VERO-76)；人類子宮頸癌細胞(HELA)；犬腎細胞(MDCK)；水牛鼠肝細胞(buffalo rat liver cell) (BRL 3A)；人類肺細胞(W138)；人類肝細胞(Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤(MMT 060562)；TRI細胞，如(例如) Mather, J.P.等人，Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68中所述；MRC 5細胞；及FS4細胞。其他可用哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢(CHO)細胞，包括DHFR⁻ CHO細胞(Urlaub, G.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220)；及骨髓瘤細胞系，例如Y0、NS0及Sp2/0。關於適於抗體產生之某些哺乳動物宿主細胞系之綜述，參見(例如) Yazaki, P.及Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, 第248卷, Lo, B.K.C. (編輯), Humana Press, Totowa, NJ (2004)，第255-268頁。

C. 分析

可藉由業內已知之各種分析對本文所提供之抗HLA-G抗體進行鑑別、篩選或表徵其物理/化學性質及/或生物活性。

1. 結合分析及其他分析

在一個態樣中，藉由(例如)已知方法(例如ELISA、西方墨點(Western blot)等)測試本發明抗體之抗原結合活性。

在另一態樣中，可使用競爭分析以鑑別與HLA-G-0032 (包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列)競爭結合至HLA-G之抗體。本發明之一個實施例係與包含SEQ ID NO:7之VH序列之所有3個HVR及SEQ ID NO:8之VL序列之所有3個HVR之抗HLA-G抗體競爭結合至人類HLA-G之抗體。在某些實施例中，此一競爭抗體結合至抗HLA-G抗體HLA-G-0032所結合之相同表位(例如，線性或構形表位)。在一個實施例中，提供與包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列之抗體結合至HLA-G上之相同表位之抗HLA-G抗體。在另一態樣中，可使用競爭分析以鑑別與HLA-G-0037 (包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列)競爭結合至HLA-G之抗體。本發明之一個實施例係與包含SEQ ID NO:15之VH序列之所有3個HVR及SEQ ID NO:16之VL序列之所有3個HVR之抗HLA-G抗體競爭結合至人類HLA-G之抗體。在某些實施例中，此一競爭抗體結合至抗HLA-G抗體HLA-G-0037所結合之相同表位(例如，線性或構形表位)。在一個實施例中，提供與包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列之抗體結合至HLA-G上之相同表位之抗HLA-G抗體。用於定位抗體所結合表位之詳細實例性方法提供於Morris, G.E. (編輯), Epitope Mapping Protocols, In: Methods in Molecular Biology, 第66卷, Humana Press, Totowa, NJ (1996)中。

在實例性競爭分析中，將固定化HLA-G在包含結合至HLA-G之第一經標記抗體(例如，抗HLA-G抗體HLA-G-0032或HLA-G.0037)及欲測試其與第一抗體競爭結合至HLA-G之能力的第二未標記抗體的溶液中培育。第二抗體可存在於雜交瘤上清液中。作為對照，在包含第一經標記抗體而無第二未經標記抗體之溶液中培育固定化HLA-G。在允許第一抗體

與HLA-G結合之條件下培育後，去除過量未結合抗體，並量測與固定化HLA-G締合之標記的量。若測試試樣中與固定化HLA-G締合之標記之量相對於對照試樣實質上減少，則此指示第二抗體與第一抗體競爭結合至HLA-G。參見Harlow, E.及Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)。對於另一實例性競爭分析，參見實例2 (表位定位ELISA/結合競爭分析)。

2. 活性分析

在一個態樣中，提供分析以鑑別具有生物活性之抗HLA-G抗體。生物活性可包括(例如)增強不同免疫細胞(包括T細胞)之活化及/或增殖的能力。例如，其增強免疫調節細胞介素(例如干擾素- γ (IFN- γ)及/或腫瘤壞死因子 α (TNF α))之分泌。經增強或可經增強之其他免疫調節細胞介素係(例如)結合至不同細胞類型之IL1 β 、IL6、IL12、顆粒酶B等。亦提供在活體內及/或活體外具有此生物活性之抗體。

在某些實施例中，如(例如)以下實例中所述測試本發明抗體之該此生物活性。

D. 免疫偶聯物(僅癌症或針對靶標修飾)

本發明亦提供包含偶聯至一或多種細胞毒性劑之本文抗HLA-G抗體的免疫偶聯物，該等細胞毒性劑係(例如)化學治療劑或藥物、生長抑制劑、毒素(例如，蛋白質毒素、細菌、真菌、植物或動物來源之酶促活性毒素或其片段)或放射性同位素。

在一個實施例中，免疫偶聯物係抗體-藥物偶聯物(ADC)，其中抗體偶聯至一或多種藥物，該等藥物包括(但不限於)類美登素(maytansinoid)

(參見US 5,208,020、US 5,416,064及EP 0 425 235 B1)；奧裡斯他汀(auristatin)，例如單甲基奧裡斯他汀藥物部分DE及DF(MMAE及MMAF)(參見US 5,635,483、US 5,780,588及US 7,498,298)；尾海兔素(dolastatin)；卡奇黴素(calicheamicin)或其衍生物(參見US 5,712,374、US 5,714,586、US 5,739,116、US 5,767,285、US 5,770,701、US 5,770,710、US 5,773,001及US 5,877,296；Hinman, L.M.等人，Cancer Res. 53 (1993) 3336-3342；及Lode, H.N.等人，Cancer Res. 58 (1998) 2925-2928)；蒽環抗生素，例如道諾黴素(daunomycin)或多柔比星(doxorubicin)(參見Kratz, F.等人，Curr. Med. Chem. 13 (2006) 477-523；Jeffrey, S.C.等人，Bioorg. Med. Chem. Lett. 16 (2006) 358-362；Torgov, M.Y.等人，Bioconjug. Chem. 16 (2005) 717-721；Nagy, A.等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97 (2000) 829-834；Dubowchik, G.M.等人，Bioorg. & Med. Chem. Letters 12 (2002) 1529-1532；King, H.D.等人，J. Med. Chem. 45 (2002) 4336-4343；及美國專利第6,630,579號)；胺甲蝶呤；長春地辛(vindesine)；紫杉烷，例如多西他賽(docetaxel)、太平洋紫杉醇(paclitaxel)、拉羅他賽(larotaxel)、替司他賽(tesetaxel)及奧他賽(ortataxel)；單端孢黴烯(trichothecene)；及CC1065。

在另一實施例中，免疫偶聯物包含與酶促活性毒素或其片段偶聯之本文所述抗體，該酶促活性毒素或其片段包括(但不限於)白喉A鏈、白喉毒素之非結合活性片段、外毒素A鏈(來自綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*))、蓖麻毒素A鏈、相思豆毒蛋白A鏈、葫蘆根毒素A鏈、 α -八疊球菌、油桐(*Aleurites fordii*)蛋白質、石竹素蛋白質、美洲商陸(*Phytolaca americana*)蛋白質(PAPI、PAPII及PAP-S)、苦瓜(momordica

charantia)抑制劑、瀉果素、巴豆毒素、皂草(sapaonaria officinalis)抑制劑、白樹毒素、有絲分裂素(mitogellin)、侷限麴菌素(restrictocin)、酚黴素(phenomycin)、伊諾黴素(enomycin)及單端孢黴烯族毒素(tricothecenes)。

在另一實施例中，免疫偶聯物包含偶聯至放射性原子以形成放射性偶聯物的本文所述抗體。眾多種放射性同位素可用於產生放射性偶聯物。實例包括 At^{211} 、 I^{131} 、 I^{125} 、 Y^{90} 、 Re^{186} 、 Re^{188} 、 Sm^{153} 、 Bi^{212} 、 P^{32} 、 Pb^{212} 及Lu之放射性同位素。當使用放射性偶聯物來檢測時，其可包含用於閃爍法研究之放射性原子，例如 $\text{TC}^{99\text{m}}$ 或 I^{123} ；或用於核磁共振(NMR)成像(亦稱為磁共振成像，MRI)之自旋標記，例如碘-123(再一次)、碘-131、銻-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、釷、錳或鐵。

抗體與細胞毒性劑之偶聯物可使用多種雙功能蛋白質偶合劑製得，例如N-琥珀醯亞胺基3-(2-吡啶基二硫基)丙酸酯(SPDP)、4-(N-馬來醯亞胺甲基)環己烷-1-甲酸琥珀醯亞胺酯(SMCC)、亞胺基硫雜環戊烷(IT)、亞胺基酯之雙功能衍生物(例如己二醯亞胺二甲酯HCl)、活性酯(例如辛二酸二琥珀醯亞胺酯)、醛(例如戊二醛)、雙-疊氮基化合物(例如，雙(對-重氮苯甲醯基)己二胺)、雙-重氮衍生物(例如，雙-(對-重氮苯甲醯基)-乙二胺)、二異氰酸酯(例如，甲苯2,6-二異氰酸酯)及雙-活性氟化合物(例如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如，蓖麻毒素免疫毒素可如Vitetta, E.S.等人，Science 238 (1987) 1098-1104中所述製備。經碳-14-標記之1-異硫氰酸苄基-3-甲基二仲乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)係用於將放射性核苷酸偶聯至抗體之實例性螯合劑。參見WO 94/11026。連接體可為促進細胞毒性藥物在細胞內釋放之「可裂解連接體」。例如，可使用酸不穩定性連接

體、肽酶敏感性連接體、光不穩定性連接體、二甲基連接體或含有二硫化物之連接體(Chari, R.V.等人, *Cancer Res.* 52 (1992) 127-131; 美國專利第5,208,020號)。

本文之免疫偶聯物或ADC明確地涵蓋(但不限於)使用交聯試劑製備之該等偶聯物, 該等交聯試劑包括(但不限於) BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、磺基-EMCS、磺基-GMBS、磺基-KMUS、磺基-MBS、磺基-SIAB、磺基-SMCC及磺基-SMPB以及SVSB ((4-乙基基磺)苯甲酸琥珀醯亞胺酯), 以上試劑可自市面購得(例如, 購自Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A)。

E. 用於診斷及檢測之方法及組合物

在某些實施例中, 本文所提供抗HLA-G抗體中之任一者皆可用於檢測生物試樣中HLA-G之存在。本文所用之術語「檢測」涵蓋定量或定性檢測。在某些實施例中, 生物試樣包含細胞或組織, 例如免疫細胞或T細胞浸潤物及/或腫瘤細胞。

在一個實施例中, 提供用於診斷或檢測方法中之抗HLA-G抗體。在另一態樣中, 提供檢測生物試樣中HLA-G之存在之方法。在某些實施例中, 方法包含使生物試樣與本文所述之抗HLA-G抗體在允許該抗HLA-G抗體結合至HLA-G之條件下接觸, 及檢測抗HLA-G抗體與HLA-G之間是否形成複合物。該方法可為活體外或活體內方法。在一個實施例中, 使用抗HLA-G抗體來選擇適用於利用抗HLA-G抗體之療法的受試者, 例如, 其中HLA-G係用於選擇患者之生物標記。

在某些實施例中, 提供經標記之抗HLA-G抗體。標記包括(但不限於)直接檢測之標記或部分(例如螢光標記、發色標記、電子緻密標記、化

學發光標記及放射性標記)以及經由(例如)酶反應或分子相互作用間接檢測之部分(例如酶或配體)。實例性標記包括(但不限於)放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H及¹³¹I、螢光團(例如稀土螯合物或螢光黃及其衍生物)、玫瑰紅(rhodamine)及其衍生物、丹醯、傘形酮、螢光素酶(例如，螢火蟲螢光素酶及細菌螢光素酶)(美國專利第4,737,456號)、螢光素、2,3-二氫酞嗪二酮、辣根過氧化物酶(HRP)、鹼性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡萄糖澱粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如，葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶及葡萄糖-6-磷酸脫氫酶)、雜環氧化酶(例如，尿酸酶及黃嘌呤氧化酶，其與諸如HRP、乳過氧化物酶或微過氧化物酶等採用過氧化氫氧化染料前體之酶偶聯)、生物素/抗生物素蛋白、自旋標記、噬菌體標記、穩定自由基及諸如此類。

F. 醫藥調配物

本文所述抗HLA-G抗體之醫藥調配物係藉由混合具有期望純度之該抗體與一或多種醫藥上可接受之可選載劑(Remington's Pharmaceutical Sciences, 第16版, Osol, A. (編輯)(1980))以凍乾調配物或水溶液形式製得。醫藥上可接受之載劑通常在所用劑量及濃度下對接受者無毒，且包括(但不限於)：緩衝液，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸及甲硫胺酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；六甲氯銨；苯紫氯銨(benzalkonium chloride)；苄索氯銨(benzethonium chloride)；酚類、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，例如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；兒茶酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；及間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚(乙烷基吡咯啉酮)；胺基酸，例如

甘胺酸、麩胺醯胺、天冬醯胺、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單糖、二糖及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑，例如EDTA；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；鹽形成抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物(例如Zn-蛋白質錯合物)；及/或非離子型表面活性劑，例如聚乙二醇(PEG)。本文之實例性醫藥上可接受之載劑進一步包括間質性藥物分散劑，例如可溶性中性活性透明質酸酶醣蛋白(sHASEGP)，例如，人類可溶性PH-20透明質酸酶醣蛋白，例如rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.)。某些實例性sHASEGP及使用方法(包括rhuPH20)闡述於美國專利公開案第2005/0260186號及第2006/0104968號中。在一個態樣中，sHASEGP與一或多種額外糖胺多糖酶(例如軟骨素酶)組合。

實例性凍乾抗體調配物闡述於美國專利第6,267,958號中。水性抗體調配物包括彼等闡述於美國專利第6,171,586號及WO 2006/044908中者，後者調配物包括組胺酸-乙酸鹽緩衝液。

本文之調配物亦可視需要含有一種以上用於所治療特定適應症之活性成分，較佳具有不會不利地影響彼此之互補活性之彼等。該等活性成分適宜地以有效地用於預期目的之量以組合形式存在。

活性成分亦可分別包載於(例如)藉由凝聚技術或藉由界面聚合製備之微膠囊(例如，羥甲基纖維素或明膠微膠囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微膠囊)中、膠質藥物遞送系統(例如，脂質體、白蛋白微球體、微乳液、奈米粒子及奈米膠囊)或粗滴乳液中。該等技術揭示於 Remington's Pharmaceutical Sciences，第16版，Osol, A. (編輯) (1980)中。

可製備持續釋放製劑。持續釋放製劑之適宜實例包括含有抗體之固

體疏水性聚合物之半透性基質，該等基質呈成形物件之形式，例如，膜或微膠囊。

欲用於活體內投與之調配物通常為無菌的。無菌性可藉由(例如)經由無菌過濾膜進行過濾輕易地達成。

G. 治療方法及組合物

本文所提供抗HLA-G抗體(或抗原結合蛋白)中之任一者可用於治療方法中。

在一個態樣中，提供用作藥劑之抗HLA-G抗體。在其他態樣中，提供用於治療癌症之抗HLA-G抗體。在某些實施例中，提供用於治療方法中之抗HLA-G抗體。在某些實施例中，本發明提供用於治療患有癌症之個體之方法中之抗HLA-G抗體，該方法包括向個體投與有效量之抗HLA-G抗體。

在其他實施例中，本發明提供抗HLA-G抗體，其用作免疫調節劑以藉由(例如)免疫刺激細胞介素(例如TNF α (TNFa)及IFN γ (IFNg))之分泌或免疫細胞之進一步招募用於直接或間接誘導增殖、活化。在某些實施例中，本發明提供抗HLA-G抗體，其用於免疫調節以在個體中藉由(例如)免疫刺激細胞介素(例如TNFa及IFN γ)之分泌或免疫細胞之進一步招募用於直接或間接誘導增殖、活化之方法中，該方法包含向個體投與有效量之抗HLA-G抗體用於免疫調節以藉由(例如)免疫刺激細胞介素(例如TNFa及IFN γ)之分泌或免疫細胞之進一步招募直接或間接誘導增殖、活化。

在其他實施例中，本發明提供抗HLA-G抗體，其用作免疫刺激劑/或用於刺激腫瘤壞死因子 α (TNF α)分泌。在某些實施例中，本發明提供抗

HLA-G抗體，其用於免疫調節以在個體中藉由(例如)免疫刺激細胞介素(例如TNFa及IFNg)之分泌或免疫細胞之進一步招募用於直接或間接誘導增殖、活化之方法中，該方法包含向個體投與有效量之抗HLA-G抗體用於免疫調節以藉由(例如)免疫刺激細胞介素(例如TNFa及IFNg)之分泌或免疫細胞之進一步招募用於直接或間接誘導增殖。

上述實施例中之任一者之「個體」較佳係人類。在另一態樣中，本發明提供抗HLA-G抗體在製造或製備醫藥中之用途。在一個實施例中，該藥劑係用於治療癌症。在另一實施例中，該藥劑用於治療癌症之方法中，該方法包含向患有癌症之個體投與有效量之藥劑。在另一實施例中，藥劑係用於誘導細胞介導之癌細胞溶解。在另一實施例中，藥劑係用於在患有癌症之個體中誘導細胞介導之癌細胞溶解的方法中，該方法包含向個體投與有效量之藥劑以誘導癌細胞之細胞凋亡/或以抑制癌細胞增殖。上述實施例中之任一者之「個體」可為人類。

在另一態樣中，本發明提供用於治療癌症之方法。在一個實施例中，方法包含向患有癌症之個體投與有效量之抗HLA-G抗體。上述實施例中之任一者之「個體」可為人類。

在另一態樣中，本發明提供用於在患有癌症之個體中誘導細胞介導之癌細胞溶解之方法中。在一個實施例中，該方法包含向個體投與有效量之有效量之抗HLA-G抗體以在患有癌症之個體中誘導細胞介導之癌細胞溶解。在一個實施例中，「個體」係人類。

在另一態樣中，本發明提供醫藥調配物，其包含本文所提供抗HLA-G抗體中之任一者以(例如)用於上述治療方法中之任一者中。在一個實施

例中，醫藥調配物包含本文所提供任一抗HLA-G抗體及醫藥上可接受之載劑。

本發明抗體(及任一額外治療劑)可藉由任何適宜方式投與，包括非經腸、肺內及鼻內、以及若視需要用於局部治療，病灶內投與。非經腸輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜腔內或皮下投與。可藉由任一適宜途徑、例如藉由注射、例如靜脈內或皮下注射投藥，此部分取決於投與係短期還是長期投與。本文涵蓋各種投藥方案，包括(但不限於)在各個時間點單次或多次投與、濃注投與及脈衝輸注。

本發明抗體應以與良好醫療實務一致之方式調配、投藥及投與。在此上下文中需考慮之因素包括所治療之特定病症、所治療之特定哺乳動物、個體患者之臨床狀況、病因、藥劑之遞送位點、投與方法、投與時間表及從業醫師所知之其他因素。抗體無需但可視情況與一或多種當前用於預防或治療所論述病症之藥劑一起調配。該等其他藥劑之有效量取決於調配物中所存在抗體之量、病症或治療之類型以及上文所討論之其他因素。該等藥劑通常係以相同劑量及使用如本文所述之投與途徑或約1%至99%之本文所述劑量或以任一劑量及藉由任一在經驗上/臨床上確定為適當之途徑來使用。

對疾病之預防或治療而言，本發明抗體之合適劑量(當單獨使用或與一或多種其他額外治療劑組合使用時)應端視擬治療疾病之類型、抗體類型、疾病之嚴重程度及病程、投與抗體用於預防還是治療目的、先前療法、患者之臨床病史及對抗體之反應以及主治醫師之判斷而定。將抗體適宜地一次性或經一系列治療投與患者。端視疾病之類型及嚴重度，不論

(例如)藉由一或多次分開投與還是藉由連續輸注來投與，約1 $\mu\text{g/kg}$ 至15 mg/kg (例如0.5 mg/kg 至10 mg/kg)抗體可係投與患者之初始候選劑量。端視上述因素而定，一個典型日劑量可在約1 $\mu\text{g/kg}$ 至100 mg/kg 之範圍內或更高。對於經若干天或更長時間重複投與而言，端視病況而定，通常將持續治療直至出現疾病症狀之所要的阻抑為止。抗體之一個實例性劑量將在約0.05 mg/kg 至約10 mg/kg 範圍內。因此，可向患者投與約0.5 mg/kg 、2.0 mg/kg 、4.0 mg/kg 或10 mg/kg (或其任一組合)之一或多個劑量。該等劑量可間歇性投與，例如每週或每三週(例如，使得患者接受約二至約二十或例如約六個劑量之抗體)。可投與初始較高負荷劑量，隨後投與一或多個較低劑量。實例性投藥方案包含投與約4 mg/kg 抗體之初始負荷劑量，隨後投與約2 mg/kg 抗體之每週維持劑量。然而，可使用其他劑量方案。此療法之進展容易地藉由習用技術及分析來監測。

應瞭解，可使用本發明之免疫偶聯物代替抗HLA-G抗體或與抗HLA-G抗體一起實施任一上述調配物或治療方法。

II. 製品

在本發明之另一態樣中，提供含有可用於治療、預防及/或診斷上述病症之材料的製品。該製品包含容器及位於該容器上或與該容器相連之標記或包裝插頁。適宜容器包括(例如)瓶子、小瓶、注射器、IV溶液袋等。該等容器可自諸如玻璃或塑膠等眾多種材料形成。容器裝有自身或與另一組合物組合有效治療、預防及/或診斷病況之組合物，且可具有無菌存取口(例如，該容器可為靜脈注射液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。該組合物中至少一種活性劑係本發明抗體。標記或包裝插頁指示該組合物用於治療所選病況。另外，該製品可包含(a)含有組合物之第一

容器，其中該組合物包含本發明抗體；及(b)含有組合物之第二容器，其中該組合物包含另一細胞毒性劑或治療劑。本發明此實施例中之製品可進一步包含指示組合物可用於治療特定病況之包裝插頁。或者或另外，該製品可進一步包括第二(或第三)容器，該容器包括醫藥上可接受之緩衝劑，例如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液(Ringer's solution)及右旋糖溶液。從商業及使用者的角度而言可進一步包括所合意的其他材料，包括其他緩衝液、稀釋劑、濾膜、針及注射器。

提供以下實例及圖以幫助理解本發明，本發明之實際範圍陳述於隨附申請專利範圍中。應理解，可在不背離本發明精神之情況下對程序作出修改。

胺基酸序列之闡述

SEQ ID NO: 1	重鏈HVR-H1, HLA-G-0032
SEQ ID NO: 2	重鏈HVR-H2, HLA-G-0032
SEQ ID NO: 3	重鏈HVR-H3, HLA-G-0032
SEQ ID NO: 4	輕鏈HVR-L1, HLA-G-0032
SEQ ID NO: 5	輕鏈HVR-L2, HLA-G-0032
SEQ ID NO: 6	輕鏈HVR-L3, HLA-G-0032
SEQ ID NO: 7	重鏈可變結構域VH, HLA-G-0032
SEQ ID NO: 8	輕鏈可變結構域VL, HLA-G-0032
SEQ ID NO: 9	重鏈HVR-H1, HLA-G-0037
SEQ ID NO: 10	重鏈HVR-H2, HLA-G-0037
SEQ ID NO: 11	重鏈HVR-H3, HLA-G-0037
SEQ ID NO: 12	輕鏈HVR-L1, HLA-G-0037

SEQ ID NO: 13 輕鏈HVR-L2, HLA-G-0037

SEQ ID NO: 14 輕鏈HVR-L3, HLA-G-0037

SEQ ID NO: 15 重鏈可變結構域VH, HLA-G-0037

SEQ ID NO: 16 輕鏈可變結構域VL, HLA-G-0037

SEQ ID NO: 17 : 實例性人類HLA-G

SEQ ID NO: 18 : 實例性人類HLA-G細胞外結構域(ECD)

SEQ ID NO: 19 : 實例性人類β2M

SEQ ID NO: 20 : 經修飾人類HLA-G (其中HLA-G特異性胺基酸已由HLA-A共有胺基酸(= 去接枝化HLA-G, 亦參見圖1) ECD替代)

SEQ ID NO: 21 : 實例性人類HLA-A2

SEQ ID NO: 22 : 實例性人類HLA-A2 ECD

SEQ ID NO: 23 : 實例性小鼠H2Kd ECD

SEQ ID NO: 24 : 實例性大鼠RT1A ECD

SEQ ID NO: 25 : 實例性人類HLA-G β2M MHC I類複合物

SEQ ID NO: 26 : 實例性經修飾人類HLA-G β2M MHC I類複合物 (其中HLA-G特異性胺基酸已由HLA-A共有胺基酸(= 去接枝化HLA-G)替代), 亦參見圖1)

SEQ ID NO: 27 : 實例性小鼠H2Kd β2M MHC I類複合物

SEQ ID NO: 28 : 實例性人類HLA-G/小鼠H2Kd β2M MHC I類複合物, 其中特定針對人類HLA-G之位置接枝於小鼠H2Kd框架上

SEQ ID NO: 29 : 實例性大鼠RT1A β2M MHC I類複合物

SEQ ID NO: 30 : 實例性人類HLA-G/大鼠RT1A β2M MHC I類複合物, 其中特定針對人類HLA-G之位置接枝於大鼠RT1A框架上

SEQ ID NO: 31 連接體及his-Tag

SEQ ID NO: 32 肽

SEQ ID NO: 33 人類κ輕鏈恆定區

SEQ ID NO: 34 人類λ輕鏈恆定區

SEQ ID NO: 35 源自IgG1之人類重鏈恆定區

SEQ ID NO: 36 源自具有突變L234A、L235A及P329G之IgG1之人類重鏈恆定區

SEQ ID NO: 37 源自IgG4之人類重鏈恆定區

SEQ ID NO: 38 重鏈可變結構域VH, HLA-G-0033

SEQ ID NO: 39 輕鏈可變結構域VL, HLA-G-0033

在本發明之以下特定實施例中列示：

1. 一種經分離抗體，其特異性結合至人類HLA-G，其中該抗體結合至包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β2M MHC I複合物。

2. 根據實施例1之抗體，其中該抗體 抑制ILT2結合至單體HLA-G β2M MHC I複合物。

3. 根據實施例2之抗體，其中該抗體抑制ILT2與單體HLA-G β2M MHC I複合物之結合達50%以上(與無抗體情形下之結合相比時)。

4. 根據實施例2之抗體，其中該抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β2M MHC I複合物之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以上)(與無抗體情形下之結合相比時)。

5. 根據實施例1至4中任一者之抗體，其中該抗體抑制ILT2結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)(上之人類HLA-G)(達50%以上(在一個實施例中，達80%以上)(如在流式細胞術分析中所量測(使用螢光活化細胞

分選) (FACS分析)) (與無抗體情形下之結合相比時)。

6. 一種經分離抗體，其特異性結合至人類HLA-G，其中該抗體結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36) (上之人類HLA-G)，且其中與無抗體情形下之結合相比時，該抗體抑制ILT2與JEG3細胞(ATCC編號HTB36) (上之人類HLA-G)之結合達50%以上(在一個實施例中，達80%以上)) (如在流式細胞術分析中所量測(使用螢光活化細胞分選) (FACS分析))。

7. 根據實施例1至6中任一者之抗體，其中該抗體

不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)。

8. 根據實施例1至7中任一者之抗體，其中該抗體

不與包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)及/或不與包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)。

9. 根據實施例1至8中任一者之抗體，其中該抗體

不與包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)。

10. 一種經分離抗體，其結合至人類HLA-G，其中該抗體包含

A) (a) HVR-H1，其包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列；及(f) HVR-L3，其包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列；或

B) (a) HVR-H1，其包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列；(b) HVR-

H2，其包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列；及(f) HVR-L3，其包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列。

11.一種經分離抗體，其結合至人類HLA-G，其中該抗體包含

A) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選自SEQ ID NO:3之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-L3；
或

B) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

12.一種經分離抗體，其結合至人類HLA-G，其中該抗體

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)項下之抗體之VH及VL的人類化變體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；

ii) 或i)項下之抗體之VH及VL的人類化變體。

13.一種經分離抗體，其結合至人類HLA-G，其中該抗體

a) 與包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列之抗體結合至相同表位；

或b) 與包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列之抗體結合至相同表位。

14.根據實施例10至13中任一者之抗HLA-G抗體

其中該抗體具有獨立地以下性質之特徵：該抗HLA-G抗體

a) 不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

b) 不與包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

c) 不與包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

d) 不與包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物交叉反應(不與其特異性結合)；及/或

e) 抑制ILT2結合至單體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)；及/或

f) 抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以上)(與無抗體情形下之結合相比時)；及/或

g) 抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以

上) (與無抗體情形下之結合相比時)；及/或

h) 抑制ILT2結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36) (上之人類HLA-G) (達50%以上(在一個實施例中，達80%以上)) (與無抗體情形下之結合相比時) (參見實例6)；及/或

i) 其中該抗體結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36) (上之人類HLA-G) (參見實例5)，且其中該抗體抑制ILT2結合至JEG3細胞(ATCC編號HTB36)(上之人類HLA-G) (達50%以上(在一個實施例中，達80%以上)) (與無抗體情形下之結合相比時) (參見實例6)；及/或

j) 其中該抗體結合至人類HLA-G β 2M MHC I複合物(包含SEQ ID NO: 25)，且其中該抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達60%以上 (與無抗體情形下之結合相比時)，抑制ILT4與二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上(與無抗體情形下之結合相比時) (例如，參見實例4b)。

15.根據前述實施例中任一者之抗體，其中該抗體係IgG1同型。

16.根據實施例15之抗體，其中該抗體係具有突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat之EU索引編號)之IgG1同型。

17.一種經分離核酸，其編碼根據前述實施例中任一者之抗體。

18.一種宿主細胞，其包含實施例17之核酸。

19.一種產生抗體之方法，其包含培養實施例18之宿主細胞以使得產生該抗體。

20.根據實施例19之方法，其進一步包含自該宿主細胞回收該抗體。

21.一種醫藥調配物，其包含根據實施例1至16中任一者之抗體及醫藥上可接受之載劑。

22.如根據實施例1至16中任一者之抗體，其用作藥劑。

23.根據實施例1至16中任一者之抗體，其用於治療癌症。

24.一種根據實施例1至16中任一者之抗體的用途，其用於製造藥劑。

25.根據實施例24之用途，其中該藥劑用於治療癌症。

26.一種治療患有癌症之個體之方法，其包含向該個體投與有效量之根據實施例1、6或10至13之抗體。

27.一種挑選抗HLA-G抗體(例如根據實施例1至4)之方法，其包含以下步驟：

a) 藉由表面電漿共振分析測定抗HLA-G抗體與包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物之結合；

b) 測定各別抗HLA-G抗體對ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合的抑制；及

c) 挑選抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上(在一個實施例中，達80%以上)之抗HLA-G抗體(與無抗體情形下之結合相比時)，或挑選抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上(在一個實施例中，達70%以上)之抗HLA-G抗體(與無抗體情形下之結合相比時)。

28.一種挑選抗HLA-G抗體(例如根據實施例6)之方法，其包含以下步驟：

a) 在流式細胞術分析中(使用螢光活化細胞分選) (FACS分析)測定抗HLA-G抗體與JEG3細胞(ATCC編號HTB36)之結合；

b) 在流式細胞術分析(使用螢光活化細胞分選) (FACS分析)中測定各

別抗HLA-G抗體對ILT2與JEG3細胞(ATCC編號HTB36)之結合的抑制；及

c) 挑選結合至JEG3 (ATCC編號HTB36)細胞且與無抗體情形下之結合相比時抑制ILT2與JEG3細胞(ATCC編號HTB36)之結合達50%以上(在一個實施例中，達80%以上)之抗HLA-G抗體。

實例

重組DNA技術

使用標準方法來操作DNA，如以下文獻中所述：Sambrook, J.等人，Molecular Cloning: A laboratory manual；Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989。根據製造商說明書使用分子生物學試劑。

基因及寡核苷酸合成

所需要的基因片段係在Geneart GmbH公司(Regensburg, Germany)以化學合成法製備的。將合成之基因片段選殖於大腸桿菌質體中以便進行增殖/擴增。藉由DNA測序來證實亞選殖基因片段之DNA序列。或者，藉由使化學合成的寡核苷酸進行黏合作用或經由PCR組裝成短合成DNA片段。各別寡核苷酸係由metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany)製備。

基本/標準哺乳動物表現質體之闡述

為了表現所要的基因/蛋白質(例如，全長抗體重鏈、全長抗體輕鏈或MHC I類分子，例如HLA-G或融合至肽及 β -2微球蛋白之MHC I類分子，例如融合至HLA-G結合肽及/或 β -2微球蛋白之HLA-G)，使用包含以下功能元件之轉錄單元：

- 來自人類巨細胞病毒(P-CMV)之立即早期增強子及啟動子，包括

內含子A，

- 人類重鏈免疫球蛋白5'-非翻譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 欲表現之基因/蛋白質(例如，全長抗體重鏈或MHC I類分子)，及
- 牛生長激素多聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

除包括欲表現所要的基因之表現單位/盒以外，基本/標準哺乳動物表現質體含有

- 來自載體pUC18之複製起點，其讓此質體在大腸桿菌中複製，及
- β -內醯胺酶基因，其賦予大腸桿菌中之胺苄青黴素(ampicillin)抗性。

性。

蛋白質測定

利用以多肽之胺基酸序列所計算之莫耳消光係數為基礎，以在280 nm下所測定光學密度(OD)來測定經純化多肽之蛋白質濃度。

實例1

用於篩選及反向篩選之HLA-G嵌合分子的生成

由於與其他MHC I分子之高同源性(>98%)，利用HLA-G分子進行免疫導致生成由MHC-I交叉反應性抗體以及真正HLA-G特異性抗體之混合物組成之多選殖血清。

迄今為止，尚未提供用於選擇與其他人類MHC-I (例如HLA-A)無交叉反應性之真正HLA-G特異性抗體及用於進一步選擇具有受體阻斷功能之彼等的工具。

鑑別出獨特的HLA-G位置與結構順從性及受體相互作用(ILT2/4及KIR2DL4)所需位置之組合。

然後將人類HLA-G之獨特及近端位置「接枝」於來自不同齧齒類動物物種之MHC I類複合物分子(例如，大鼠RT1A及小鼠H2kd)上以生成「嵌合」免疫原/篩選抗原。

所生成抗體針對結合/特異性(且分別對抗原無結合/特異性)經嚴格篩選。

篩選抗原：

- 表現為包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC複合物之rec. HLA-G

- 接枝於大鼠RT-1及小鼠H2kd之HLA-G特異性序列(SEQ ID NO: 28：人類HLA-G/小鼠H2Kd β 2M MHC I類複合物，其中特定針對人類HLA-G之位置接枝於小鼠H2Kd框架上，及SEQ ID NO: 30：人類HLA-G/大鼠RT1A β 2M MHC I類複合物，其中特定針對人類HLA-G之位置接枝於大鼠RT1A框架上)

- 表現細胞(例如Jeg3細胞)之天然HLA-G MHC I類複合物，或人類HLA-G轉染細胞系SKOV3 HLA-G+及PA-TU-8902 HLA-G+

篩選反抗原：

- 反抗原(MHC I類複合物)，其具有與不同肽(參見例如HLA-G框架上之SEQ ID NO 22 (HLA-A2)及SEQ ID NO: 26 HLA-A共有序列)組合之其他HLA-A序列(HLA-A2及HLA-G^{去接枝化且具有HLA-A共有序列})

- 來自其他物種之反抗原(MHC I類複合物)，例如大鼠RT-1及小鼠H2kd (SEQ ID NO: 27及SEQ ID NO: 29)

- 未修飾之腫瘤細胞系SKOV3及PA-TU-8902，其特徵在於缺乏HLA-G表現。

用於免疫及篩選中以用於生成HLA特異性抗體之嵌合HLA-G抗原的設計(參見圖1)：

設計攜帶HLA-G獨特位置(SEQ ID NO: 30)之嵌合大鼠MHC I分子(RT1-A)用於野生型(wt)及轉基因大鼠、或兔及小鼠等之免疫，及/或用於篩選分析：

HLA-G獨特位置係藉由比對來自IMGT (如2014年2月6日獲得)之2579 HLA-A、3283 HLA-B、2133 HLA-C、15 HLA-E、22 HLA-F及50 HLA-G序列鑑別。在3個序列集HLA-A、HLA-B及HLA-C + HLA-E + HLA-F之組合集中任一者之少於1% (幾乎約0%)序列中出現之HLA-G之彼等殘基稱為HLA-G獨特位置。

4個核心獨特位置(2個在 α -1且2個在 α -3)在HLA-G序列集中未顯示多型性且其他HLA基因在該等位置均不含HLA-G特異性殘基(除M100之1x HLA-A、Q103之1x HLA-B及Q103之1x HLA-C以外)。

將大鼠RT1-A之晶體結構(Rudolph, M.G.等人 J.Mol.Biol. 324: 975-990 (2002)；PDB代碼：1KJM)疊加於人類HLA-G之晶體結構上(Clements, C.S. 等人 PROC.NATL.ACAD.SCI.USA 102: 3360-3365 (2005)；PDB代碼：1YDP)。保藏 α -鏈及相關 β -2-微球蛋白之總體結構。

藉由序列比較及結構比對鑑別RT1-A結構中之HLA-G獨特位置。在第一步驟中，鑑別HLA-G及RT1-A之分子表面上所暴露且由此抗體可及之獨特HLA-G位置。將包埋於蛋白質摺疊內之獨特位置排除用於工程化。在第二步驟，鑑別結構近端殘基，該等殘基亦需要經交換以獲得相應區「HLA-G樣」，即，生成含有獨特位置之實際HLA-G表位，而非生成將為人工之HLA-G/大鼠RT1-A嵌合表位。分析針對突變由此選擇之所有

位置用於來自HLA-G之各別殘基的結構適配以避免突變時分子結構之可能局部擾動。

以類似方式生成用於免疫及/或用於篩選分析之攜載HLA-G獨特位置 (SEQ ID NO: 28)之嵌合小鼠MHC I分子(H2Kd)。

藉由針對HLA-A共有序列使HLA-G獨特位置「去接枝化」來設計基於HLA-A之反抗原以在篩選中用作反抗原(SEQ ID NO:26)

分析人類HLA-G (PDB代碼：1YDP)之晶體結構中源自多重序列比對之獨特位置。第一，排除未暴露於HLA-G表面上且因此抗體不可及之位置用於工程化。第二，分析表面暴露之殘基之胺基酸交換的可行性(即，排除相關位置突變時分子結構之可能局部擾動)。經驗證總共14個位置用於交換。針對源自從IMGT (如2014年2月6日獲得)下載之2579個HLA-A序列的多重序列比對之HLA-A共有序列使經驗證位置中之胺基酸突變。

生成用於可溶性古典及非古典MHC I類分子之表現質體

重組體MHC I類基因編碼N-末端延伸融合分子，該等融合分子係由已知藉由各別MHC I類分子結合之肽、 β -2微球蛋白及各別MHC I類分子組成。

用於可溶性MHC I類分子之瞬時表現的表現質體除可溶性MHC I類分子表現盒以外亦包含來自載體pUC18之複製起點(其允許此質體在大腸桿菌中複製)及 β -內醯胺酶基因(其賦予大腸桿菌中之胺苄青黴素抗性)。

可溶性MHC I類分子之轉錄單位包含以下功能元件：

- 來自人類巨細胞病毒(P-CMV)之立即早期增強子及啟動子，包括內含子A，

- 人類重鏈免疫球蛋白5'-非翻譯區(5'UTR)，
- 鼠類免疫球蛋白重鏈信號序列，
- 編碼N-末端截斷金黃色葡萄球菌(*S. aureus*)轉肽酶A之核酸，及
- 牛生長激素多聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

源自各種物種成熟可溶性MHC I類分子之胺基酸序列係：

SEQ ID NO: 25： 實例性人類HLA-G β 2M MHC I類複合物

SEQ ID NO: 26： 實例性經修飾人類HLA-G β 2M MHC I類複合物
(其中HLA-G特異性胺基酸已由HLA共有胺基酸替代(= 去接枝化HLA-G)，亦參見圖1)

SEQ ID NO: 27： 實例性小鼠H2Kd β 2M MHC I類複合物

SEQ ID NO: 28： 實例性人類HLA-G/小鼠H2Kd β 2M MHC複合物，其中特定針對人類HLA-G之位置接枝於小鼠H2Kd框架上

SEQ ID NO: 29： 實例性大鼠RT1A β 2M MHC I類複合物

SEQ ID NO: 30： 實例性人類HLA-G/大鼠RT1A β 2M MHC複合物，其中特定針對人類HLA-G之位置接枝於大鼠RT1A框架上

對於篩選中所用之實例性HLA-A2 β 2M MHC I類複合物，使用以下組分並將複合物表現於大腸桿菌中並純化。

MHCI複合物HLA-A2 / β 2M (SEQ ID NO 22及19) (二者均具有額外N-末端甲硫胺酸) + VLDFAPPGA肽(SEQ ID NO: 32) + 連接體及his標籤(SEQ ID NO: 31)

實例2

免疫接種

a. 嵌合蛋白(用於針對非特異性MHC-I/HLA之耐受性且針對獨特HLA-G

位置)

使用自Charles River Laboratories International, Inc.獲得之Balb/C小鼠進行免疫。根據Appendix A 「Guidelines for accommodation and care of animals」將動物圈養於AAALACi認可之動物設施中。所有動物免疫方案及實驗均由上巴伐利亞政府(Government of Upper Bavaria)批准(許可證號55.2-1-54-2531-19-10及55.2-1-54-2532-51-11)且根據德國動物福利法案(German Animal Welfare Act)及歐洲議會及理事會(European Parliament and Council)之第2010/63號指令實施。

6-8週齡之Balb/C小鼠(n=5)經4週時期接受用嵌合H2Kd/HLA-G分子(SEQ ID NO: 28 (「HLA-G-0006」))之五輪免疫。在每一免疫之前，小鼠利用氧及異氟烷(isoflurane)之氣體混合物麻醉。對於第一次免疫，將溶於20 mM His/HisCl、140 mM NaCl (pH 6.0)中之15 µg蛋白質與等體積CFA (BD Difco, 編號263810)混合並沿小鼠之背部皮下(s.c.)投與至六個鄰近引流淋巴結之位點，其中兩個位點在頸背處，而兩個位點在腹股溝及小腿兩側。將另一15 µg於RIBI佐劑(Sigma-Aldrich, 編號S6322)中乳化之蛋白質沿腹部投與至六個位點旁邊，其中兩個位點各自在腋窩、腹股溝及大腿兩側。除自始至終使用RIBI佐劑且僅沿腹部以外，以類似方式在第7天(10 µg)、第14天(5 µg)、第21天(5 µg)及第28天(5 µg)給予遞減抗原劑量之加強免疫。在最後一次免疫後三天，使小鼠安樂死並以無菌方式分離雙側膈、淺表腹股溝、腋窩及鰓淋巴結並準備用於雜交瘤生成。在第三次及第四次免疫後藉由ELISA測試血清之重組人類HLA-G及免疫原特异性總IgG抗體產生。

另一組6-8週齡之Balb/C小鼠(n=5)經3個月時期接受用嵌合

H2Kd/HLA-G分子(HLA-G-0006)之三次免疫。對於第一次免疫，將溶於20 mM His/HisCl、140 mM NaCl (pH 6.0)中之100 µg蛋白質與等體積CFA (BD Difco, 編號263810)混合並經腹膜內(i.p.)投與。以類似方式在第28天及第56天給予加強免疫，惟使用不完全弗氏佐劑(Freund's adjuvant) (IFA，來自BD Difco, 編號DIFC263910)。在最後一次免疫後四至五週，小鼠經靜脈內(i.v.)接受溶於無菌PBS中之大約25 µg免疫原，且72小時後，以無菌方式採集脾臟並準備用於雜交瘤生成。在第三次免疫後，藉由ELISA測試血清之重組人類HLA-G (SEQ ID NO: 25 (「HLA-G-0003」))及免疫原特異性嵌合H2Kd/HLA-G分子(SEQ ID NO: 28 (「HLA-G-0006」))總IgG抗體產生，並利用具有共有HLA-A特異性位點之「去接枝化」人類HLA-G (SEQ ID NO: 26 (「HLA-G-0007」))及鼠類H2kd蛋白質(SEQ ID NO: 27 (「HLA-G-0009」))進行反向篩選。

b. wt HLA-G蛋白質

使用自Charles River Laboratories International, Inc.獲得之CD大鼠進行免疫。根據Appendix A 「Guidelines for accommodation and care of animals」將動物圈養於AAALACi認可之動物設施中。所有動物免疫方案及實驗均由上巴伐利亞政府批准(許可證號55.2-1-54-2532-51-11)且根據德國動物福利法案及歐洲議會及理事會之第2010/63號指令實施。

6-8週齡之CD大鼠(n=4)經4週之時期接受用重組人類HLA-G蛋白質(SEQ ID NO: 25 (「HLA-G-0003」))之四次免疫。對於第一次免疫，將100 µg溶於20 mM His/HisCl、140 mM NaCl (pH 6.0)中之蛋白質與等體積CFA (BD Difco, 編號263810)混合並腹膜內投與。以類似方式在第28天、第56天及第84天給予加強免疫，惟自始至終使用不完全弗氏佐劑

(IFA，來自BD Difco, 編號DIFC263910)。在最後一次免疫後三至四週，大鼠i.v.接受於無菌PBS中之大約 75 µg免疫原；且72小時後，以無菌方式採集脾臟並準備用於雜交瘤生成。在第三次及第四次免疫後藉由ELISA測試血清之重組HLA-G (SEQ ID NO: 25 (「HLA-G-0003」))特異性IgG1、IgG1a、IgG2b及IgG2c抗體產生並利用具有共有HLA-A特異性位點之「去接枝化」人類HLA-G (SEQ ID NO: 26 (「HLA-G-0007」))進行反向篩選。

c. JEG3細胞(ATCC編號HTB36) (天然表現HLA-G)

使用自Charles River Laboratories International, Inc.獲得之CD大鼠進行免疫。根據Appendix A 「Guidelines for accommodation and care of animals」將動物圈養於AAALACi認可之動物設施中。所有動物免疫方案及實驗均由上巴伐利亞政府批准(許可證號AZ. 55.2-1-54- 2531-83-13)且根據德國動物福利法案及歐洲議會及理事會之第2010/63號指令實施。

兩組6-8週齡之CD大鼠(n=2)分別經5個月(A)至7個月(B)之時期使用JEG-3細胞(ATCC HTB36)接受5次(組A)或7次(組B)免疫。對於第一次免疫，將溶於無菌PBS中之 1×10^7 個細胞與等體積CFA (BD Difco, 編號263810)混合並腹膜內投與。以類似方式在第28天、第56天、第84天、第112天、第140天(僅B)及第168天(僅B)給予A及B加強免疫，惟自始至終使用不完全弗氏佐劑(IFA，來自BD Difco, 編號DIFC263910)。在最後一次免疫後三週，大鼠i.v.接受於無菌PBS中之100 µg重組人類HLA-G蛋白(SEQ ID NO: 25 (「HLA-G-0003」))；且72小時後，以無菌方式採集脾臟並準備用於雜交瘤生成。分別在第三次、第五次及第七次免疫後藉由

ELISA測試血清之重組HLA-G (SEQ ID NO: 25 (「HLA-G-0003」))特異性IgG1、IgG1a、IgG2b及IgG2c抗體產生並利用具有共有HLA-A特異性位點之「去接枝化」人類HLA-G (SEQ ID NO: 26 (「HLA-G-0007」))進行反向篩選。

d. JEG3/DNA IMS (用於加強效應)

使用自Charles River Laboratories International, Inc.獲得之CD大鼠進行免疫。根據Appendix A 「Guidelines for accommodation and care of animals」將動物圈養於AAALACi認可之動物設施中。所有動物免疫方案及實驗均由上巴伐利亞政府批准(許可證號AZ. 55.2-1-54- 2531-83-13)且根據德國動物福利法案及歐洲議會及理事會之第2010/63號指令實施。

6-8週齡之CD大鼠(n=5)經3個月之時期以交替方案接受質體DNA及基於細胞之免疫。作為單鏈分子編碼人類HLA-G之質體DNA HLA-G-0030 (p17747)以及表現JEG-3細胞(ATCC HTB36)之天然HLA-G分別用於此目的。

對於第一次免疫，將動物異氟烷麻醉並經真皮內(i.d.)利用100 µg於無菌H₂O中之質體DNA進行免疫，該質體DNA係在已剃毛背部鄰近動物的尾部施加至一個點。在i.d.施加後，該點在ECM 830電穿孔系統(BTX Harvard裝置)上使用以下參數進行電穿孔：兩次1000V/cm，每次0.1ms，由125ms之時間間隔分開，隨後四次287.5V/cm達10ms，亦由125ms之時間間隔分開。對於第14天之第二次免疫，動物接受溶於無菌PBS中之 1×10^7 個細胞，將其與等體積CFA (BD Difco, 編號263810)混合且在生成穩定乳液之後經腹膜內投與。以類似方式在第28天(DNA)、第42天(細

胞)、第56天(DNA)及第70天(細胞)給予加強免疫,惟自始至終使用不完全弗氏佐劑(IFA,來自BD Difco,編號DIFC263910)。在最後一次免疫後四週,大鼠i.v.接受於無菌PBS中之100 µg可溶性重組人類HLA-G MHC I類蛋白質(SEQ ID NO: 25 (「HLA-G-0003」));且72小時後,以無菌方使採集脾臟並準備用於雜交瘤生成。分別在第三次、第五次及第六次免疫後藉由ELISA測試血清之可溶性重組人類HLA-G MHC I蛋白質(SEQ ID NO: 25 (「HLA-G-0003」))特異性IgG1、IgG2a、IgG2b及IgG2c抗體產生並利用具有共有HLA-A特異性位點之「去接枝化」人類HLA-G (SEQ ID NO: 26 (「HLA-G-0007」))進行反向篩選。

在所有免疫策略中,均誘導高多反應性體液免疫反應,此識別HLA-G以及用於反向篩選之蛋白質(例如,重組「去接枝化」人類HLA-G、嵌合H2Kd/HLA-G分子或相關人類HLA-A2分子),如在ELISA格式中使用來自免疫動物之多選殖血清所分析(數據未顯示)。

如以下實例中所述測定所獲得抗HLA-G特異性抗體之結合性及生物活性並與已知參考抗體相比較。

實例3

A) 抗HLA-G抗體至可溶性人類HLA-G、具有HLA-A特異性序列之可溶性去接枝化人類HLA-G、人類HLA-A2大鼠RT1-A及小鼠H2-Kd之結合

針對自免疫獲得之抗體與人類、大鼠及小鼠HLA-G、嵌合、去接枝化HLA-G及HLA-A之結合性質篩選該等抗體。各別分析闡述於下文。對於人類HLA-G之測試,使用單體、以及二聚體及三聚體形式(參見下文製備)。

人類HLA-G MHC I類蛋白質之二聚化/三聚化

將含有單體經His加標籤之可溶性人類HLA-G MHC I類蛋白質(SEQ ID NO: 23)之上清液使用ÄKTA-FPLC在室溫下以0.2ml/min之流速加載於具有5 ml Ni-Sepharose之HisTrap HP管柱(GE Healthcare編號17-5248-02)上過夜。管柱然後利用含有0.5M咪唑之2% DPBS (Merck 編號8.14223.025)洗滌，直至達到基線為止。管柱然後利用存於2% DPBS中且含有0.5M咪唑之10mM DTT平衡並在室溫下培育30分鐘。利用PBS/10mM咪唑將DTT自管柱洗出並以含有0.5 mM咪唑之2 – 100% DPBS之梯度溶析蛋白質。使用Amicon-Ultra 15 M /Ultracel 10K濃縮溶析液之後，將蛋白質於室溫下培育24小時，隨後於4℃下48小時以允許二聚體 / 多聚化。然後使用SEC於Superdex 200 HiLoad 16/60 (GE Healthcare編號17-5175-01)中實施二聚體與三聚體之分離並利用0.5M NaOH過夜洗滌。將管柱用PBS平衡，隨後用10mg/ml BSA飽和。然後收集二聚體(部分A9)及三聚體(部分A8)，分成等份試樣並於-80℃下儲存直至進一步使用為止。

人類wt HLA-G結合ELISA

經鏈黴抗生物素蛋白塗佈之板(Nunc, MicroCoat編號11974998001)的每一孔用25 μ l濃度為250 ng/ml之生物素化人類wt HLA-G塗佈並在4℃下過夜培育。洗滌之後(每一孔用90 μ l PBST緩衝液洗滌3次)，添加25 μ l抗HLA-G試樣(1:3稀釋於OSEP緩衝液中)或參考抗體(G233, Thermo/Pierce編號MA1-19449, 500 ng/ml)並於RT下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 μ l PBST緩衝液洗滌3次)，每一孔添加25 μ l山羊抗小鼠H+L-POD (Biorad編號170-6561, 1:2000於OSEP中)或驢抗兔IgG POD (GE編號NA9340V, 1:5000於OSEP中)並在振盪器上於RT下培育1小時。對

於大鼠 IgG 之檢測，添加山羊抗大鼠 IgG1-POD (Bethyl 編號 A110-106P)、山羊抗大鼠 IgG2a-POD (Bethyl 編號 A110-109P) 及山羊抗大鼠 IgG2b-POD (Bethyl 編號 A110-111P) 1:10000 於 OSEP 中之混合物並在振盪器上於 RT 下培育 1 小時。洗滌之後(每一孔用 90 μ l PBST 緩衝液洗滌 6 次)，每一孔添加 25 μ l TMB 受質(Roche, 11835033001)並培育直至 OD 2-3 為止。在 Tecan Safire 2 儀器上於 370/492 nm 進行量測。

具有 HLA-A 特異性序列之人類去接枝化 HLA-G 結合 ELISA

經鏈黴抗生物素蛋白塗佈之板(Nunc, MicroCoat 編號 11974998001) 的每一孔用濃度為 250 ng/ml 之 25 μ l 生物素化人類去接枝化 HLA-G 塗佈並在 4°C 培育過夜。洗滌之後(每一孔用 90 μ l PBST 緩衝液洗滌 3 次)，添加 25 μ l 抗 HLA-G 試樣(1:3 稀釋於 OSEP 緩衝液中)或大鼠血清(1:600 稀釋於 OSEP 中)並於 RT 下培育 1 小時。洗滌之後(每一孔用 90 μ l PBST 緩衝液洗滌 3 次)，每一孔添加 25 μ l 山羊抗大鼠 IgG1-POD (Bethyl 編號 A110-106P)、山羊抗大鼠 IgG2a-POD (Bethyl 編號 A110-109P) 及山羊抗大鼠 IgG2b-POD (Bethyl 編號 A110-111P) 1:10000 於 OSEP 中之混合物並在振盪器上於 RT 下培育 1 小時。洗滌之後(每一孔用 90 μ l PBST 緩衝液洗滌 6 次)，每一孔添加 25 μ l TMB 受質(Roche, 11835033001)並培育直至 OD 2-3 為止。在 Tecan Safire 2 儀器上於 370/492 nm 進行量測。

大鼠 MHC I (RT1-A) 結合 ELISA

經鏈黴抗生物素蛋白塗佈之板(Nunc, MicroCoat 編號 11974998001) 的每一孔用濃度為 250 ng/ml 之 25 μ l 生物素化大鼠 MHC I (RT1-A) 塗佈並在 4°C 培育過夜。洗滌之後(每一孔用 90 μ l PBST 緩衝液洗滌 3 次)，添加 25 μ l 抗 HLA-G 試樣(1:3 稀釋於 OSEP 緩衝液中)或大鼠血清(1:600 稀釋於

OSEP中)並於RT下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 μ l PBST緩衝液洗滌3次)，每一孔添加25 μ l山羊抗大鼠IgG1-POD (Bethyl 編號 A110-106P)、山羊抗大鼠IgG2a-POD (Bethyl 編號 A110-109P)及山羊抗大鼠IgG2b-POD (Bethyl 編號 A110-111P) 1:10000於OSEP中之混合物並在振盪器上於RT下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 μ l PBST緩衝液洗滌6次)，每一孔添加25 μ l TMB受質(Roche, 11835033001)並培育直至OD 2-3為止。在Tecan Safire 2儀器上於370/492 nm進行量測。

HLA-A2結合ELISA

經鏈黴抗生物素蛋白塗佈之板(Nunc, MicroCoat 編號 11974998001)的每一孔用濃度為250 ng/ml之25 μ l生物素化人類HLA-A2塗佈並在4°C培育過夜。洗滌之後(每一孔用90 μ l PBST緩衝液洗滌3次)，添加25 μ l抗HLA-G試樣(1:3稀釋於OSEP緩衝液中)或大鼠血清(1:600稀釋於OSEP中)並於RT下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 μ l PBST緩衝液洗滌3次)，每一孔添加25 μ l山羊抗大鼠IgG1-POD (Bethyl 編號 A110-106P)、山羊抗大鼠IgG2a-POD (Bethyl 編號 A110-109P)及山羊抗大鼠IgG2b-POD (Bethyl 編號 A110-111P) 1:10000於OSEP之混合物中並在振盪器上於RT下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 μ l PBST緩衝液洗滌6次)，每一孔添加25 μ l TMB受質(Roche, 11835033001)並培育直至OD 2-3為止。在Tecan Safire 2儀器上於370/492 nm進行量測。

抗HLA-G抗體之結合動力學

抗HLA-G抗體對人類HLA-G、去接枝化人類HLA-G及人類HLA-A2之結合動力學係藉由表面電漿共振使用BIACORE T200儀器(GE Healthcare)研究。所有實驗均在25°C下使用PBS緩衝液(pH 7.4 + 0.05%

Tween20)作為運行緩衝液及PBS緩衝液(+ 0,1% BSA)作為稀釋緩衝液來實施。在pH 5.0下藉由使用GE Healthcare供應之胺偶合試劑盒將抗人類Fc (JIR009-005-098, Jackson)或抗大鼠Fc (JIR112-005-071, Jackson)或抗小鼠Fc (JIR115-005-071, Jackson)抗體固定於S系列CM5感測器晶片(GE Healthcare)上。將抗HLA-G抗體捕獲於表面上，此導致50 – 200 RU之捕獲反應。將HLA-G分子以30 μ l/min以自2.5 nM至高達800 nM (2 $\times$ 1:2及4 $\times$ 1:3稀釋系列)之濃度注射於表面(締合相)上達180秒。藉由利用運行緩衝液洗滌監測解離相達300 -600秒。藉由注射H₃PO₄ (0,85%)達60 + 30秒用於抗人類Fc捕獲抗體、甘胺酸pH 1,5達60秒及甘胺酸pH 2,0達60秒用於抗大鼠Fc捕獲抗體、H₃PO₄ (0,85%)達80 + 60秒用於抗小鼠Fc捕獲抗體使表面再生。藉由減去自模擬表面獲得之反應校正體折射率差異。減去空白注射(雙重參照)。使用BIAevaluation軟體將所導出曲線擬合至1:1朗格繆爾(Langmuir)結合模型。

抗HLA-G抗體之交叉阻斷

抗HLA-G抗體至人類HLA-G之結合的交叉阻斷實驗係藉由表面電漿共振使用BIAcore T200或B4000儀器(GE Healthcare)來研究。所有實驗均在25 $^{\circ}$ C使用PBS緩衝液(pH 7.4 + 0.05% Tween20)作為運行緩衝液來實施。

根據提供商方案將抗人類Fab (GE-Healthcare, 28-9583-25)抗體固定於S系列CM5感測器晶片(GE Healthcare)上以捕獲來自OMT大鼠含有人類Ck結構域之抗體。將抗HLA-G抗體在15 μ g/ml之濃度下捕獲70秒。將Wt HLA-G以500或1000 nM之濃度注射(30 μ l/min) 60秒。然後將Wt大鼠抗體以30 μ g/ml之濃度注射90秒。藉由利用運行緩衝液洗滌將解離相監測60或

240秒。藉由注射甘胺酸pH 1,5達60秒及90秒之額外穩定時期使表面再生。

在另一分析設置中，根據提供商之方案將抗人類 Fab (GE-Healthcare, 28-9583-25) 抗體固定於 S 系列 CM5 感測器晶片 (GE Healthcare)上，以捕獲來自 OMT 大鼠含有人類 Ck 結構域之抗體。將抗 HLA-G 抗體以 30 µg/ml 之濃度捕獲 90 秒。捕獲抗體上之未佔用結合位點藉由以 500 µg/ml 之濃度及 30 µl/min 之流速 4 x 120 秒注射人類 IgG (JIR009-000-003) 來阻斷。將 Wt HLA-G 以 500 nM 之濃度 (30µl/min) 注射 90 秒。然後以 30µg/ml 之濃度來自 OMT 大鼠之第二抗體 (人類 Ck 結構域) 達 90 秒。藉由利用運行緩衝液洗滌將解離相監測 240 秒。藉由注射甘胺酸 pH 1,5 達 60 秒及 90 秒之額外穩定時期使表面再生。

表：HLA-G 抗體與呈其單體、二聚體及三聚體形式之重組可溶性 HLA-G MHC 1 類複合物之結合 (ELISA)

抗體	HLA-G 單體 EC50 [nM]	HLA-G 二聚體 EC50 [nM]	HLA-G 三聚體 EC50 [nM]
HLA-G-0032	3.59	1.36	1.76
HLA-G-0033	4.94	1.98	1.54
HLA-G-0036	6.33	4.74	5.66
HLA-G-0037	4.95	2.01	2.50

上表匯總源自 wt 蛋白質 IMS 之不同大鼠抗人類 HLA-G 單株抗體之結合。顯示各別結合至 rec. wt 單體、二聚體及三聚體 HLA-G 蛋白質之相對 EC50 值 [ng/ml]，如藉由 ELISA 所評價。ELISA 係藉由將生物素化 wt HLA-G 抗原塗佈至鏈黴抗生物素蛋白板來設置。培育及洗滌步驟之後，

各別抗體在10 – 0 μg之濃度範圍內以連續1:2稀釋步驟方式進行結合。所結合抗體之檢測係藉由抗Fc-抗體-POD偶聯物實施。EC50值係自所得結合曲線在產生半數最大信號之抗體濃度下測定。在非生物素化HLA-G二聚體及三聚體抗原之情形中，藉由分析板上之隨機塗層實施固定化。

HLA-G抗體對重組HLA-G (SEQ ID NO :25)及對照經修飾人類HLA-G β2M MHC I類複合物(其中HLA-G特異性胺基酸已由HLA-A共有胺基酸替代(= 去接枝化HLA-G SEQ ID NO: 26:))之結合親和力(「-」指示無可檢測結合)

抗體	wt HLA-G (SEQ ID NO:25) (單體)				去接枝HLA-G上之 HLA-A共有(SEQ ID NO:26)			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t 1/2 (min)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t 1/2 (min)	KD (M)
HLA-G-0032	5.12E+04	7.60E-04	15	1.49E-08	-	-	-	-
HLA-G-0033	5.23E+04	1.65E-03	7	3.15E-08	9.54E+06	3.45E-02	0.3	3.62E-09
HLA-G-0036	5.60E+04	1.95E-02	1	3.48E-07	-	-	-	-
HLA-G-0037	1.31E+05	8.82E-04	13	6.75E-09	5.47E+04	1.16E-01	0.1	2.12E-06

上表匯總針對wt及去接枝化HLA-G之抗體親和力及t1/2值，如藉由表面電漿共振(Biacore)分析所評價。

抗HLA-G抗體對人類HLA-G、去接枝化人類HLA-G及人類HLA-A2之結合動力學係藉由表面電漿共振使用BIACORE T200儀器(GE Healthcare)研究。所有實驗均在25℃下使用PBS緩衝液(pH 7.4 + 0.05% Tween20)作為運行緩衝液及PBS緩衝液(+ 0,1% BSA)作為稀釋緩衝液來

實施。在pH 5.0下藉由使用GE Healthcare供應之胺偶合試劑盒將抗人類Fc (JIR009-005-098, Jackson)或抗大鼠Fc (JIR112-005-071, Jackson)或抗小鼠Fc (JIR115-005-071, Jackson)抗體固定於S系列CM5感測器晶片 (GE Healthcare)上。將抗HLA-G抗體捕獲於表面上，此導致50 – 200 RU之捕獲反應。將HLA-G分子以30 µl/min以自2.5 nM至高達800 nM (2×1:2及4×1:3稀釋系列)之濃度注射於表面(締合相)上達180秒。藉由利用運行緩衝液洗滌監測解離相達300 -600秒。藉由注射H₃PO₄ (0,85%)達60 + 30秒用於抗人類Fc捕獲抗體、甘胺酸pH 1,5達60秒及甘胺酸pH 2,0達60秒用於抗大鼠Fc捕獲抗體、H₃PO₄ (0,85%)達80 + 60秒用於抗小鼠Fc捕獲抗體使表面再生。藉由減去自模擬表面獲得之反應校正體折射率差異。減去空白注射(雙重參照)。使用BIAevaluation軟體將所導出曲線擬合至1:1朗格繆爾結合模型。(上表中之-指示未檢測到結合)。

相應SPR感測圖於圖3中。

在進一步實驗中，比較以下參考抗體(自不同市售供應商獲得)與單體人類HLA-G MHC I (SEQ ID NO: 23 (「HLA-G-0003」))及具有共有HLA-A特異性位點之「去接枝化」人類HLA-G (SEQ ID NO: 24 (「HLA-G-0007」))之結合：

MEM/G9、87G、G233、2A12、4H84、5A6G7、6D463、9-1F10、MEM-G/1、MEM-G/11、MEM-G/2及MEM-G/4 (「-」指示無可檢測結合)。

抗原	抗體	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t 1/2 (Min)	KD (M)
wt HLA-G (SEQ ID NO:25) (單體)	MEM/G9	1.5E+05	1.1E-03	10	7.7E-09
	87G	-	-	-	-
	G233	1.8E+05	3.7E-03	3	2.0E-08

	2A12	-	-	-	-
	4H84	-	-	-	-
	5A6G7	-	-	-	-
	6D463	-	-	-	-
	9-1F10	-	-	-	-
	MEM-G/1	-	-	-	-
	MEM-G/11	7.4E+04	8.5E-04	14	1.2E-08
	MEM-G/2	-	-	-	-
	MEM-G/4	-	-	-	-

抗原	抗體	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t 1/2 (Min)	KD (M)
去接枝 HLA-G 上之HLA-A共有 (SEQ ID NO:26)	MEM/G9	1.2E+05	3.6E-02	0.3	3.0E-07
	87G	-	-	-	-
	G233	-	-	-	-
	2A12	-	-	-	-
	4H84	-	-	-	-
	5A6G7	-	-	-	-
	6D463	-	-	-	-
	9-1F10	-	-	-	-
	MEM-G/1	-	-	-	-
	MEM-G/11	8.9E+04	1.2E-03	10	1.3E-08
	MEM-G/2	-	-	-	-
	MEM-G/4	-	-	-	-

有趣的是，大多數所量測抗體並未顯示與單體人類HLA-G MHC I (SEQ ID NO: 25 (「HLA-G-0003」))之任何特異性結合(亦包括抗體87G)。如文獻中所述與HLA-G之寡聚形式之結合可係親合力驅動的，此乃因寡聚性質增加之結合位點。

僅結合親和力之KD值為7.7E⁻⁰⁹M之抗體MEM/G9、KD值為2.0E⁻⁰⁸M之抗體G233及結合親和力之KD值為1.2E⁻⁰⁸ M之MEM-G/11顯示結合至

單體wt人類HLA-G MHC I複合物。然而，該等抗體MEM-G/11中之一者亦顯示與去接枝HLA-G上之HLA-A共有(SEQ ID NO:26)具有一定程度的結合/交叉反應性。另外，另一抗體(MEM/G9)亦顯示更強的非特異性結合至去接枝HLA-G上之HLA-A共有(SEQ ID NO:26)。

實例4

受體阻斷(利用單體、二聚體及三聚體HLA-G)

a) 抗HLA-G抗體之ILT2及ILT4阻斷性質之生物化學比較

經鏈黴抗生物素蛋白塗佈之板(Nunc, MicroCoat編號11974998001)的每一孔用濃度為500 ng/ml 之25 µl生物素化人類wt HLA-G塗佈並在4℃培育過夜。洗滌之後(每一孔用90 µl PBST緩衝液洗滌3次)，將25 µl抗HLA-G試樣以8 µg/ml開始、然後以連續1:3步驟稀釋以降低之濃度添加並於RT下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 µl PBST緩衝液洗滌3次)，每一孔添加濃度為150 ng/ml之25µl c-myc標記之重組ILT-2受體並於室溫下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 µl PBST緩衝液洗滌3次)，每一孔添加25 µl山羊抗c-myc-POD (Bethyl編號A190-104P 1:7000於OSEP中)並在振盪器上於RT下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 µl PBST緩衝液洗滌6次)，每一孔添加25 µl TMB受質(Roche, 11835033001)並培育直至OD 2-3為止。在Tecan Safire 2儀器上於370/492 nm進行量測。

HLA-G抗體中和HLA-G-ILT2/4受體連結(IC50 [nM])

候選者	抑制% ILT2 (3 µg/ml抗體)	IC ₅₀ ILT2 [nM]			抑制% ILT4	IC ₅₀ ILT4 [nM]		
		M	D	T		M	D	T
HLA-G-0032	86.84	8.4	1.3	0.4	42.99	n. d.	50.3	71.3
HLA-G-0033	85.28	8	1.2	0.5	44.62	n. d.	31.3	61.5
HLA-G-0036	84.23	3.3	1.5	0.4	40.52	n. d.	61.9	51.3

HLA-G-0037	82.91	13	0.8	0.1	41.05	n. d.	n. d.	>200
------------	-------	----	-----	-----	-------	-------	-------	------

上表匯總rec. HLA-G蛋白質(單體及寡聚物)與其受體ILT2及ILT4間之相互作用的阻斷，如藉由ELISA所評價。顯示HLA-G/受體相互作用之抑制% (對於ILT2及ILT4而言)以及HLA-G/受體相互作用之中和的相對IC50值[nM] (在使用單體(M)、二聚體(D)或三聚體(T) HLA-G蛋白質之情形中)。較不明顯之ILT4抑制依賴於此受體之主要β-2M依賴性相互作用。

ELISA係藉由將生物素化抗原wt HLA-G塗佈至鏈黴抗生物素蛋白板來設置。培育及洗滌步驟之後，各別抗體在8 – 0 μg之濃度範圍內以連續1:3稀釋步驟進行結合。將經C-myc加標籤之ILT-2或ILT-4受體添加至HLA-G-抗體複合物。培育及洗滌步驟之後，藉由抗cmcy-抗體-POD偶聯物實施所結合受體之檢測。IC50值係自所得抑制曲線在產生半數最大抑制之抗體濃度下測定。在非生物素化HLA-G二聚體及三聚體抗原之情形中，藉由分析板上之隨機塗層實施固定化。

b) 使用不同分析設置來生物化學比較抗HLA-G抗體之ILT2及ILT4阻斷性質

ELISA係藉由將經Fc加標籤之ILT2及ILT4分別塗佈至Maxisorp微量滴定板來設置。培育及洗滌步驟之後，以100 nM之濃度添加各別抗體。將可溶性經His加標籤之單體、二聚體或三聚體HLA-G添加至各孔。培育及洗滌步驟之後，藉由抗His-抗體-POD偶聯物實施所結合受體之檢測。抑制百分比(%)係與在無抗HLA-G或ILT2/4抗體之情形下自具有ILT2/4 + HLA-G (單體、二聚體或三聚體)之孔獲得之值相比較進行計算(100%結合 = 0%抑制)。

候選者	抑制% ILT2			抑制% ILT4		
	M	D	T	M	D	T
HLA-G-0032	75	95	93	12	62	68
HLA-G-0033	75	95	93	14	70	71
HLA-G-0036	71	94	93	23	60	70
HLA-G-0037	73	96	93	1	61	67

上表匯總rec. HLA-G蛋白質(單體及寡聚物)與其受體ILT2及ILT4間之相互作用的阻斷，如藉由ELISA所評價。顯示HLA-G/受體相互作用之抑制% (對於ILT2及ILT4而言)。較不明顯之ILT4抑制依賴於此受體之主要β2M依賴性相互作用。

下文條形圖顯示與市售抗體相比由所述抗HLA-G抗體所達成之%抑制，如圖表中所示。市售HLA-G抗體87G、MEM/G09及G233不能與所述抗體一樣有效地阻斷HLA-G / ILT2或ILT4相互作用。而且，在一些情形中，市售抗體在結合時導致HLA-G與ILT2或ILT4之結合增加。

實例5

抗HLA-G抗體與細胞之結合

a) 細胞表面HLA-G結合ELISA

將25 μl/孔JEG3細胞(天然表現HLA-G, 20000個細胞/孔)、Skov-3細胞或在細胞表面上表現重組HLA-G之Skov-3細胞(二者均10000個細胞/孔)接種於經組織培養處理之384孔板(Corning, 3701)中並在37℃下培育過夜。次日，添加12.5 μl抗HLA-G試樣(最終稀釋度1:3)並在4℃培育2小時。將每一孔添加50 μl戊二醛至0,05%之最終濃度(Sigma Cat.編號: G5882；批號: 056K5318)使細胞固定。洗滌之後(每一孔用90 μl PBST緩衝液洗滌3次)，每一孔添加25μl山羊抗小鼠H+L-POD (Biorad編號170-

6561 1:2000於OSEP中)或驢抗兔IgG POD (GE編號NA9340V, 1:5000於OSEP中)並在振盪器上於RT下培育1小時。對於大鼠IgG之檢測，添加山羊抗大鼠IgG1-POD (Bethyl編號A110-106P)、山羊抗大鼠IgG2a-POD (Bethyl編號A110-109P)及山羊抗大鼠IgG2b-POD (Bethyl編號A110-111P) 1:10000於OSEP中之混合物中並在振盪器上於RT下培育1小時。洗滌之後(每一孔用90 µl PBST緩衝液洗滌4次)，每一孔添加25 µl TMB受質(Roche, 11835033001)並培育直至OD 2-3為止。在Tecan Safire 2儀器上於370/492 nm進行量測。

抗體	Jeg3	wt Skov3	HLA-G ⁺ Skov3	wt PA-TU-8902	HLA-G ⁺ PA-TU-8902
HLA-G-0032	+++	-	+++	-	+++
HLA-G-0033	+++	+	+++	-	+++
HLA-G-0036	+	-	++	-	+
HLA-G-0037	+++	+	+++	-	+++

上表匯總不同的大鼠抗人類HLA-G單株抗體與表現於不同細胞及細胞上之HLA-G之結合，如藉由FACS分析所評價。闡述與表現天然HLA-G之JEG3腫瘤細胞或Skov3或PA-TU-8902轉染子及各別親代、未轉染細胞之結合。

b) HLA-G抗體與細胞上所編碼之天然或重組HLA-G之結合(如藉由FACS分析所評價)

對於流式細胞術分析，將細胞在4℃下利用抗HLA-G mAb染色。簡言之，將25µl/孔之每一細胞懸浮液(5×10^4 個細胞/孔)轉移至聚丙稀96孔V底部板中並在冰箱中於5℃預冷10分鐘。將抗HLA-G試樣於染色緩衝液中稀釋至80 µg/ml之2倍起始濃度。實施抗體之4倍連續稀釋並將25µl/孔抗

體溶液添加至所準備細胞中並在5°C培育1小時。將細胞用200 μ l/孔染色緩衝液洗滌兩次並在300g下離心3分鐘。為進行檢測，將螢光標記之抗物種抗體(偶聯至Alexa 488之山羊抗大鼠IgG (H+L), Life technologies編號 A11006；或山羊抗小鼠IgG (H+L), Life technologies編號 A11001)在染色緩衝液中稀釋至20 μ g/ml並將細胞糰粒以50 μ l/孔檢測抗體懸浮。在5°C培育1小時後，將細胞再次用染色緩衝液洗滌兩次，再懸浮於70 μ l染色緩衝液中並在FACS Canto II量測。

純系HLA-G編號0032-0037之實例性FACS染色係在圖5之FACS覆蓋圖中給出。

實例6

抗HLA-G抗體抑制/調節重組ILT2與天然表現於JEG3細胞上之HLA-G之相互作用

為進行分析，將JEG3細胞(ATCC HTB36)在與不同抗HLA-G抗體一起預培育或不預培育之情形下用ILT2-Fc融合蛋白(對照= 無抑制)染色。對於與抗HLA-G抗體一起預培育，將25 μ l/孔之細胞懸浮液轉移至聚丙稀96孔V底部板中並在4°C下預冷10分鐘。將抗HLA-G抗體或參考抗體(G233, MEM-G/9或87G)於染色緩衝液中稀釋至20 μ g/ml之2倍濃度，並將25 μ l/孔之抗體溶液添加至所準備細胞並於5°C培育1小時。將細胞用200 μ l/孔之染色緩衝液洗滌兩次，同時在300g下離心3分鐘且最終再懸浮於25 μ l/孔之染色緩衝液中。

人類ILT2-Fc嵌合體蛋白質(RD編號2017-T2-050)結合至a) 與抗HLA-G mAb一起預培育之JEG3細胞或b) 未經處理JEG3細胞作為參考之檢測係如下測定：簡言之，將ILT2-Fc或對照人類IgG (Jackson-Immuno-

Research編號009-000-003)於染色緩衝液中稀釋至20μg/ml (ILT2)之2倍濃度並將25μl/孔之ILT2-Fc蛋白質溶液添加至所準備細胞並於5℃下培育2小時。將細胞再次用200 μl/孔之染色緩衝液洗滌兩次。人類ILT2-Fc蛋白質係用螢光標記之抗人類IgG Fc-γ特異性抗體(F(ab')₂片段山羊抗人類IgG, Fcγ片段特異性-FITC, Jackson-Immuno-Research , 編號109-096-008)以於染色緩衝液中之10μg/ml之稀釋液進行檢測。將細胞糰粒再懸浮於50μl/孔之檢測抗體中。於5℃下1小時培育後，將細胞用染色緩衝液洗滌兩次，再懸浮於70 μl之染色緩衝液中並在FACS Canto II下量測，以測定ILT2與JEG 3細胞之結合。

作為對照，藉由使用抗物種抗體(偶聯至Alexa 488之山羊抗大鼠IgG (H+L) (Life technologies 編號A11006)或山羊抗小鼠IgG (H+L)-Alexa 488, (Life technologies, 編號A11001))以10μg/ml之濃度檢測結合至JEG-3預培育細胞之抗HLA-G抗體。

圖6中之圖表顯示不同HLA-G抗體改變重組ILT2與天然表現於JEG3腫瘤細胞上之HLA-G之相互作用及結合之各別能力。

下表匯總實驗之結果。抗HLA-G抗體與JEG3細胞之結合繪示為+ = 弱結合- +++=強結合。抗HLA-G抗體抑制/阻斷或增加ILT2與表現HLA-G之JEG3細胞之結合的能力係指示於第三行中(HLA-G:ILT2相互作用)。在最後一行中，顯示/量化重組ILT2與細胞之結合或其抑制/阻斷(ILT2-Fc在無抗HLA-G抗體情形下之染色設定為100%結合(其係0%抑制)，負值指示甚至增加之結合；低於5%之染色信號差異不顯著，歸類為無效應)：

抗體	結合於JEG-3細胞上	HLA-G:ILT2相互作用	ILT2 與Jeg3細胞之結合的抑制
無 mAb (ctrl)	-	-	0%抑制 =100 %結合

HLA-G-0032	+++	抑制ILT2之結合	98.1% 抑制
HLA-G-0033	+++	稍微 增加 ILT2之結合	-9.3% (= 增加/刺激ILT2結合)
HLA-G-0036	+	無顯著效應	2.3% 抑制
HLA-G-0037	+++	抑制ILT2之結合	96.5% 抑制
87G	++	無顯著效應	2.3% 抑制
MEM-G/9	+++	抑制ILT2之結合	-27.9% (=增加/刺激ILT2結合)
G223	+++	抑制ILT2之結合	-55.8% (=增加/刺激ILT2結合)

實例7

單核球細胞介素恢復分析(HLA-G介導之抑制之後)

表現HLA-G之細胞與單核球之以下共培養分析用於不同大鼠抗人類HLA-G單株抗體之功能表徵。外周人類單核球係自健康供體之血液分離。簡言之，將血液收集於含有抗凝劑之試管中並1:2稀釋於PBS中。為分離外周血單核細胞(PBMC)，將30 ml混合物轉移至具有預填充分離介質之每一Leucosep試管。12分鐘離心(1200xg，無制動)後收集PBMC特異性條帶，用PBS洗滌三次並於300 xg下離心10分鐘。最後，將細胞糰粒再懸浮於來自Miltenyi之MACS緩衝液中並利用來自Miltenyi之人類單核球分離試劑盒II (編號130-091-153)根據製造商說明書經由磁性分離自PBMC分離人類單核球(負向選擇)。將經分離單核球以5×10e5個細胞/ml之密度再懸浮於原代細胞培養基(RPMI 1640, PAN編號P04-17500，其補充有10% FCS, Gibco編號10500；2mM L-麩醯胺酸, Sigma編號G7513；1

mM丙酮酸鈉, Gibco編號11360；MEM非必需胺基酸, Gibco編號11140；0,1 mM 2-巰基乙醇, Gibco編號31350；MEM維生素, Gibco編號11120；青黴素鏈黴素, Gibco編號15140)中。藉由流式細胞術監測CD14⁺ CD16⁺細胞之富集並分析細胞之ILT2及ILT4表現。對於經富集單核球與表現HLA-G之細胞的共培養分析，將JEG-3細胞以8×10³個細胞/孔以100 μl於JEG-3培養基(具有EBSS及L-麩醯胺酸之MEM Eagle, PAN編號P04-00509，其補充有10% FCS, Gibco編號10500；1mM丙酮酸鈉, Gibco編號11360；MEM非必需胺基酸 Gibco編號11140)中在分析前一天接種於96孔平底組織培養板，以在分析當天形成融合層。將附著JEG-3細胞與抗HLA-G抗體之4倍系列稀釋液在原代細胞培養基中預培育。因此，去除來自附著JEG-3細胞之上清液並添加50 μl/孔之所製備抗體溶液並在37℃及5% CO₂下在潮濕氣氛中培育1小時。將人類單核球以於50μl原代細胞培養基中之2,5×10⁴人類單核球/孔添加至抗HLA-G抗體預培育JEG-3細胞中並在在37℃及5% CO₂下在潮濕氣氛中培育過夜(大約18-20小時)。次日，利用50ng/ml LPS實施LPS刺激達7小時且之後收穫共培養之上清液。使用來自eBioscience之人類TNF α ELISA Ready-SET-Go!® (編號88-7346-88)測定共培養上清液之TNF α的濃度。

下表匯總既定HLA-G抗體候選者之功能特徵。

功能抗HLA-G抗體能夠恢復受抑制之免疫反應，即在與表現HLA-G之細胞的共培養中恢復單核球之LPS誘導之TNFa產生。

	抗體	HLA-G-0032 (編號32)	HLA-G-0033 (編號33)	HLA-G-0036 (編號36)	HLA-G-0037 (編號37)
供體					
1		++	-	-	+++

2		+	-	-	++
3		(+)	-	-	(+)
4		(+)	-	-	++
7		+	-	n.t.	+++
8		+	-	n.t.	++

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司

<120> 抗 HLA-G 抗體及其用途

<130> P33980-FT

<150> EP16199620.2

<151> 2016-11-18

<160> 39

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 5

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 1

Ser Tyr Asp Met His
1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 2

Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Asn
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 12

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 3

Pro Thr Val Ala Thr Arg Tyr Asn Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 4

Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 5

Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 6

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Leu Pro Ile Thr
1 5 10

<210> 7
<211> 121
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 7

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Tyr
20 25 30

Asp Met His Trp Ile Lys Gln Gln Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Asn Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Lys Pro Thr Val Ala Thr Arg Tyr Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 107
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 8

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
35 40 45
Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu
65 70 75 80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Leu Pro Ile
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 9
<211> 5
<212> PRT
<213> 大鼠
<400> 9

Thr Tyr Ser Val Ser
1 5

<210> 10
<211> 16
<212> PRT
<213> 大鼠
<400> 10

Ala Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
1 5 10 15

<210> 11
<211> 12
<212> PRT
<213> 大鼠
<400> 11

Met Asn Asn Lys Phe Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 大鼠
<400> 12

Arg Ala Ser Glu Thr Val Ser Thr Met Leu His
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 13

Leu Ala Ser His Leu Glu Ser
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 14

Gln Gln Thr Trp Asn Asp Pro Leu Thr
1 5

<210> 15
<211> 120
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 15

Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
20 25 30

Ser Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Leu Arg Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Leu Leu
65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Arg Ala Met Tyr Phe Cys Val
85 90 95

Arg Met Asn Asn Lys Phe Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro
100 105 110

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 16
<211> 106
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 16

Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15
Lys Ile Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Thr Val Ser Thr Met Leu
20 25 30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Ser
35 40 45
Leu Ala Ser His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp
65 70 75 80
Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Asn Asp Pro Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 17
<211> 314
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30
Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45
Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr
50 55 60
Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr
65 70 75 80
Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln
85 90 95
Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
100 105 110
Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu

115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys
130 135 140

Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
180 185 190

Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu
260 265 270

Arg Trp Lys Gln Ser Ser Leu Pro Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val
275 280 285

Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala Val Val Thr Gly Ala Ala Val Ala
290 295 300

Ala Val Leu Trp Arg Lys Lys Ser Ser Asp
305 310

<210> 18
<211> 274
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg

35 40 45

Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr
50 55 60

Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln
85 90 95

Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys
130 135 140

Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
180 185 190

Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu
260 265 270

Arg Trp

<210> 19
<211> 99
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
1 5 10 15
Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
20 25 30
Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
35 40 45
Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
50 55 60
Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys
65 70 75 80
Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp
85 90 95
Arg Asp Met

<210> 20
<211> 275
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 經修飾人類 HLA-G (其中 HLA-G 特異性胺基酸已由
HLA-A 共有胺基酸替代(= 去接枝化 HLA-G) ECD)

<400> 20

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15
Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30
Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45
Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr
50 55 60
Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Val Asn Leu Gly Thr
65 70 75 80
Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln
85 90 95

Trp Met Ile Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys
130 135 140

Arg Lys Cys Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
180 185 190

Pro Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Lys
275

<210> 21
<211> 341
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60

Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile
275 280 285

Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala
290 295 300

Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr
305 310 315 320

Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu
325 330 335

Thr Ala Cys Lys Val
340

<210> 22
<211> 275
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60

Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Glu
275

<210> 23
<211> 275
<212> PRT
<213> 家鼯鼠

<400> 23

Gly Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr
50 55 60

Gln Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr
65 70 75 80

Ala Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln
85 90 95

Arg Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
115 120 125

Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg
130 135 140

Arg Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn
165 170 175

Glu Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His
180 185 190

Pro Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu
210 215 220

Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Lys
275

<210> 24
<211> 274
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 24

Gly Ser His Ser Leu Arg Tyr Phe Tyr Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Leu Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Glu
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Glu Asn Pro Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Arg Trp Met Glu Arg Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Gln Gln Thr
50 55 60

Arg Ile Ala Lys Glu Trp Glu Gln Ile Tyr Arg Val Asp Leu Arg Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Gly Gly Ser His Thr Ile Gln
85 90 95

Glu Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Ser Leu Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
115 120 125

Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Phe Ala Ala Gln Ile Thr Arg
130 135 140

Asn Lys Trp Glu Arg Ala Arg Tyr Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Ser Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Leu Arg Ser Asp Pro Pro Glu Ala His Val Thr Leu His
180 185 190

Pro Arg Pro Glu Gly Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu
210 215 220

Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn
245 250 255

Tyr Thr Cys Arg Val Glu His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Ser Gln
260 265 270

Arg Trp

<210> 25
<211> 440
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Arg Ile Ile Pro Arg His Leu Gln Leu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln
20 25 30

Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn
35 40 45

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu
50 55 60

Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe
65 70 75 80

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
85 90 95

Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser
100 105 110

Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg
145 150 155 160

Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
165 170 175

Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala
180 185 190

Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg
195 200 205

Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu
210 215 220

Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln Trp
225 230 235 240

Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
245 250 255

Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu Asp
260 265 270

Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg
275 280 285

Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu
290 295 300

Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro
325 330 335

Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
340 345 350

Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr
355 360 365

Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
370 375 380

Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr
385 390 395 400

Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg
405 410 415

Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
420 425 430

His Glu His His His His His His
435 440

<210> 26
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 實例性經修飾人類 HLA-G β2M MHC I 類複合物(其中 HLA-G 特異性胺
基酸已由 HLA-A 共有胺基酸替代(= 去接枝化 HLA-G)

<400> 26

Arg Ile Ile Pro Arg His Leu Gln Leu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln
20 25 30

Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn
35 40 45

Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu
50 55 60

Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe
65 70 75 80

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
85 90 95

Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser

100										105										110									
Gln	Pro	Lys	Ile	Val	Lys	Trp	Asp	Arg	Asp	Met	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser														
		115					120					125																	
Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly														
	130					135					140																		
Ser	His	Ser	Met	Arg	Tyr	Phe	Ser	Ala	Ala	Val	Ser	Arg	Pro	Gly	Arg														
145					150					155					160														
Gly	Glu	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Met	Gly	Tyr	Val	Asp	Asp	Thr	Gln	Phe														
				165					170					175															
Val	Arg	Phe	Asp	Ser	Asp	Ala	Ala	Ser	Pro	Arg	Met	Glu	Pro	Arg	Ala														
			180					185					190																
Pro	Trp	Val	Glu	Gln	Glu	Gly	Pro	Glu	Tyr	Trp	Asp	Glu	Glu	Thr	Arg														
		195					200					205																	
Asn	Thr	Lys	Ala	His	Ala	Gln	Thr	Asp	Arg	Val	Asn	Leu	Gly	Thr	Leu														
	210					215					220																		
Arg	Gly	Cys	Tyr	Asn	Gln	Ser	Glu	Ala	Gly	Ser	His	Thr	Leu	Gln	Trp														
225					230					235				240															
Met	Ile	Gly	Cys	Asp	Val	Gly	Ser	Asp	Gly	Arg	Leu	Leu	Arg	Gly	Tyr														
				245					250					255															
Glu	Gln	Tyr	Ala	Tyr	Asp	Gly	Lys	Asp	Tyr	Leu	Ala	Leu	Asn	Glu	Asp														
			260					265					270																
Leu	Arg	Ser	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Ala	Gln	Ile	Ser	Lys	Arg														
		275					280					285																	
Lys	Cys	Glu	Ala	Ala	His	Val	Ala	Glu	Gln	Arg	Arg	Ala	Tyr	Leu	Glu														
	290					295					300																		
Gly	Thr	Cys	Val	Glu	Trp	Leu	Arg	Arg	Tyr	Leu	Glu	Asn	Gly	Lys	Glu														
305					310					315					320														
Thr	Leu	Gln	Arg	Ala	Asp	Pro	Pro	Lys	Thr	His	Val	Thr	His	His	Pro														
				325					330					335															
Val	Ser	Asp	His	Glu	Ala	Thr	Leu	Arg	Cys	Trp	Ala	Leu	Gly	Phe	Tyr														
			340					345					350																
Pro	Ala	Glu	Ile	Thr	Leu	Thr	Trp	Gln	Arg	Asp	Gly	Glu	Asp	Gln	Thr														
		355					360					365																	

Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
370 375 380

Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr
385 390 395 400

Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg
405 410 415

Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
420 425 430

Trp His Glu His His His His His His
435 440

<210> 27
<211> 441
<212> PRT
<213> 家鼯鼠

<400> 27

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
20 25 30

Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn
35 40 45

Cys Tyr Val Thr Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu
50 55 60

Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe
65 70 75 80

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro
85 90 95

Thr Glu Thr Asp Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Asp Ser Met Ala
100 105 110

Glu Pro Lys Thr Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu
145 150 155 160

Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
165 170 175

Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg Ala
180 185 190

Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr Gln
195 200 205

Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr Ala
210 215 220

Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln Arg
225 230 235 240

Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
245 250 255

Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
260 265 270

Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg Arg
275 280 285

Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu
290 295 300

Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn Glu
305 310 315 320

Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His Pro
325 330 335

Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
340 345 350

Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
355 360 365

Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
370 375 380

Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
385 390 395 400

Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg
405 410 415

Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
420 425 430

Trp His Glu His His His His His His
435 440

<210> 28
<211> 441
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 實例性人類 HLA-G/ 小鼠 H2Kd β 2M MHC I 類複合物，其中
特異性針對 HLA-G 之位置接枝於小鼠 H2Kd 框架上

<400> 28

Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
20 25 30
Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn
35 40 45
Cys Tyr Val Thr Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu
50 55 60
Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe
65 70 75 80
Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro
85 90 95
Thr Glu Thr Asp Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Asp Ser Met Ala
100 105 110
Glu Pro Lys Thr Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu
145 150 155 160
Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
165 170 175
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Ser Pro Arg Phe Glu Pro Arg Ala
180 185 190
Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr Gln
195 200 205

Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Met Ser Leu Gln Thr Ala
210 215 220

Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Phe Gln Arg
225 230 235 240

Met Phe Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
245 250 255

Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
260 265 270

Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Lys Arg
275 280 285

Lys Trp Glu Ala Ala Asn Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu
290 295 300

Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Met Leu Gln Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr His His Pro
325 330 335

Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
340 345 350

Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
355 360 365

Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
370 375 380

Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
385 390 395 400

Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg
405 410 415

Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
420 425 430

Trp His Glu His His His His His His
435 440

<210> 29
<211> 440
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 29
Ala Gln Phe Ser Ala Ser Ala Ser Arg Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
20 25 30
Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn
35 40 45
Cys Tyr Val Ser Gln Phe His Pro Pro Gln Ile Glu Ile Glu Leu Leu
50 55 60
Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Asn Ile Glu Met Ser Asp Leu Ser Phe
65 70 75 80
Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro
85 90 95
Thr Glu Thr Asp Val Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Lys
100 105 110
Glu Pro Lys Thr Val Thr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140
Ser His Ser Leu Arg Tyr Phe Tyr Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu
145 150 155 160
Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Glu Phe
165 170 175
Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Glu Asn Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala
180 185 190
Arg Trp Met Glu Arg Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Gln Gln Thr Arg
195 200 205
Ile Ala Lys Glu Trp Glu Gln Ile Tyr Arg Val Asp Leu Arg Thr Leu
210 215 220
Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Gly Gly Ser His Thr Ile Gln Glu
225 230 235 240
Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Ser Leu Leu Arg Gly Tyr
245 250 255
Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp

260

265

270

Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Phe Ala Ala Gln Ile Thr Arg Asn
275 280 285

Lys Trp Glu Arg Ala Arg Tyr Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Glu
290 295 300

Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Ser Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Lys Glu
305 310 315 320

Thr Leu Leu Arg Ser Asp Pro Pro Glu Ala His Val Thr Leu His Pro
325 330 335

Arg Pro Glu Gly Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
340 345 350

Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
355 360 365

Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
370 375 380

Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
385 390 395 400

Thr Cys Arg Val Glu His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Ser Gln Arg
405 410 415

Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
420 425 430

His Glu His His His His His His
435 440

<210> 30
<211> 440
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 實例性人類 HLA-G/ 大鼠 RT1A β2M MHC I 類複合物，其
中特異性針對 HLA-G 之位置接枝於大鼠 RT1A 框架上

<400> 30

Ala Gln Phe Ser Ala Ser Ala Ser Arg Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
1 5 10 15

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
20 25 30

Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn
35 40 45

Cys Tyr Val Ser Gln Phe His Pro Pro Gln Ile Glu Ile Glu Leu Leu
50 55 60

Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Asn Ile Glu Met Ser Asp Leu Ser Phe
65 70 75 80

Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro
85 90 95

Thr Glu Thr Asp Val Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Val Thr Leu Lys
100 105 110

Glu Pro Lys Thr Val Thr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
115 120 125

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
130 135 140

Ser His Ser Leu Arg Tyr Phe Tyr Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu
145 150 155 160

Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Glu Phe
165 170 175

Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Ser Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala
180 185 190

Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Gln Gln Thr Arg
195 200 205

Ile Ala Lys Glu Trp Glu Gln Ile Tyr Arg Met Asp Leu Gln Thr Leu
210 215 220

Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Ile Gln Glu
225 230 235 240

Met Tyr Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
245 250 255

Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
260 265 270

Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Phe Ala Ala Gln Ile Thr Lys Arg
275 280 285

Lys Trp Glu Ala Ala Asn Tyr Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Glu
290 295 300

Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Glu Ala His Val Thr His His Pro
325 330 335

Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
340 345 350

Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
355 360 365

Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
370 375 380

Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Ser Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
385 390 395 400

Thr Cys Arg Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Met Leu Arg
405 410 415

Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
420 425 430

His Glu His His His His His His
435 440

<210> 31
<211> 33
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 連接體及 his 標籤

<400> 31

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp
1 5 10 15

Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu His His His His His
20 25 30

His

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工

<220>
<223> 肽

<400> 32
Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala
1 5

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 34
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34
Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15
Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe
20 25 30
Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val
35 40 45
Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys
50 55 60
Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser
65 70 75 80

His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu
85 90 95

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 35
<211> 328
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 36
<211> 328
<212> PRT
<213> 智人

<400> 36

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
325

<210> 37
<211> 325
<212> PRT
<213> 智人

<400> 37

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65 70 75 80

Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
100 105 110

Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
115 120 125

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
130 135 140

Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145 150 155 160

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
165 170 175

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
180 185 190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu
325

<210> 38
<211> 122
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 38

Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr
20 25 30

Trp Met Thr Trp Thr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ser Ile Thr Asn Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Gln Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Lys Glu Arg Ile Tyr Leu Thr Ala Tyr Trp Phe Phe Asp Phe Trp
100 105 110

Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 39
<211> 106
<212> PRT
<213> 大鼠

<400> 39

Asp Thr Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu Ile
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Leu Ala Ser His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp
65 70 75 80

Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Asn Glu Pro Arg Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105



201829463

【發明摘要】

【中文發明名稱】

抗HLA-G抗體及其用途

【英文發明名稱】

ANTI-HLA-G ANTIBODIES AND USE THEREOF

【中文】

本發明係關於抗HLA-G抗體及使用其等抗體之方法。

【英文】

The present invention relates to anti-HLA-G antibodies and methods of using the same.

【指定代表圖】

圖3A、3B

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種經分離抗體，其特異性結合至人類HLA-G，其中該抗體結合至包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物。

【第2項】

如請求項1之抗體，其中該抗體抑制ILT2結合至單體HLA-G β 2M MHC I複合物。

【第3項】

如請求項2之抗體，其中該抗體抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上。

【第4項】

如請求項2之抗體，其中該抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上。

【第5項】

如請求項1至4中任一項之抗體，其中該抗體抑制ILT2結合至JEG3細胞。

【第6項】

一種經分離抗體，其特異性結合至人類HLA-G，其中該抗體結合至JEG3細胞，且其中與無抗體情形下之結合相比時，該抗體抑制ILT2與JEG3細胞之結合達50%以上。

【第7項】

如請求項1至4及6中任一項之抗體，其中該抗體不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物交叉反應。

【第8項】

如請求項1至4及6中任一項之抗體，其中該抗體不與包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物交叉反應及/或不與包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物交叉反應。

【第9項】

如請求項1至4及6中任一項之抗體，其中該抗體不與包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應。

【第10項】

一種經分離抗體，其結合至人類HLA-G，其中該抗體包含

A) (a) HVR-H1，其包含SEQ ID NO: 1之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含SEQ ID NO: 2之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含SEQ ID NO: 3之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含SEQ ID NO: 4之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列；及(f) HVR-L3，其包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列；或

B) (a) HVR-H1，其包含SEQ ID NO: 9之胺基酸序列；(b) HVR-H2，其包含SEQ ID NO: 10之胺基酸序列；(c) HVR-H3，其包含SEQ ID NO: 11之胺基酸序列；(d) HVR-L1，其包含SEQ ID NO: 12之胺基酸序列；(e) HVR-L2，其包含SEQ ID NO: 13之胺基酸序列；及(f) HVR-L3，其包含SEQ ID NO: 14之胺基酸序列。

【第11項】

一種經分離抗體，其結合至人類HLA-G，其中該抗體包含

A) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:1之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:2之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選

自SEQ ID NO:3之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:4之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:5之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:6之胺基酸序列之HVR-L3；
或

B) (a) VH結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:9之胺基酸序列之HVR-H1、(ii) 包含SEQ ID NO:10之胺基酸序列之HVR-H2及(iii) 包含選自SEQ ID NO:11之胺基酸序列之HVR-H3；及(b) VL結構域，其包含(i) 包含SEQ ID NO:12之胺基酸序列之HVR-L1；(ii) 包含SEQ ID NO:13之胺基酸序列之HVR-L2及(iii) 包含SEQ ID NO:14之胺基酸序列之HVR-L3。

【第12項】

一種經分離抗體，其結合至人類HLA-G，其中該抗體

A)

i) 包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列；

ii) 或i)項下之抗體之VH及VL的人類化變體；

或B)

i) 包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列；

ii) 或i)項下之抗體之VH及VL的人類化變體。

【第13項】

一種經分離抗體，其結合至人類HLA-G，其中該抗體

a) 與包含SEQ ID NO:7之VH序列及SEQ ID NO:8之VL序列之抗體結合至相同表位；

或b) 與包含SEQ ID NO:15之VH序列及SEQ ID NO:16之VL序列之

抗體結合至相同表位。

【第14項】

如請求項10至13中任一項之抗HLA-G抗體，

其中該抗體獨立地具有以下性質之特徵：該抗HLA-G抗體

a) 不與包含SEQ ID NO:26之經修飾人類HLA-G β 2M MHC I複合物交叉反應；及/或

b) 不與包含SEQ ID NO:21及SEQ ID NO: 19之人類HLA-A2 β 2M MHC I複合物交叉反應；及/或

c) 不與包含SEQ ID NO:27之小鼠H2Kd β 2M MHC I複合物交叉反應；及/或

d) 不與包含SEQ ID NO:29之大鼠RT1A β 2M MHC I複合物交叉反應；及/或

e) 抑制ILT2結合至單體HLA-G β 2M MHC I複合物；及/或

f) 抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上；及/或

g) 抑制抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上；及/或

h) 抑制ILT2結合至JEG3細胞；及/或

i) 其中該抗體結合至JEG3細胞，且其中該抗體抑制ILT2結合至JEG3細胞；及/或

j) 其中該抗體結合至人類HLA-G β 2M MHC I複合物，且其中該抗體抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達60%以上，且抑制ILT4與二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複

合物之結合達50%以上。

【第15項】

如請求項1至4、6及10至13中任一項之抗體，其中該抗體係IgG1同型。

【第16項】

如請求項15之抗體，其中該抗體係具有突變L234A、L235A及P329G (根據Kabat之EU索引編號)之IgG1同型。

【第17項】

一種經分離核酸，其編碼如請求項1至16中任一項之抗體。

【第18項】

一種宿主細胞，其包含如請求項17之核酸。

【第19項】

一種產生抗體之方法，其包含培養如請求項18之宿主細胞，使得產生該抗體。

【第20項】

如請求項19之方法，其進一步包含自該宿主細胞回收該抗體。

【第21項】

一種醫藥調配物，其包含如請求項1至16中任一項之抗體及醫藥上可接受之載劑。

【第22項】

如請求項1至4、6及10至13中任一項之抗體，其用作藥劑。

【第23項】

如請求項1至4、6及10至13中任一項之抗體，其用於治療癌症。

【第24項】

一種如請求項1至16中任一項之抗體之用途，其用於製造藥劑。

【第25項】

如請求項24之用途，其中該藥劑用於治療癌症。

【第26項】

一種用於挑選抗HLA-G抗體(例如，如請求項1至4)之方法，其包含以下步驟：

a) 藉由表面電漿共振分析(Surface Plasmon Resonance assay)測定抗HLA-G抗體與包含SEQ ID NO: 25之人類HLA-G β 2M MHC I複合物之結合；

b) 測定該等各別抗HLA-G抗體對ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合的抑制；及

c) 挑選與無抗體情形下之結合相比抑制ILT2與單體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上之抗HLA-G抗體，或挑選與無抗體情形下之結合相比抑制ILT2與單體及/或二聚體及/或三聚體HLA-G β 2M MHC I複合物之結合達50%以上之抗HLA-G抗體。

