

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7627687号
(P7627687)

(45)発行日 令和7年2月6日(2025.2.6)

(24)登録日 令和7年1月29日(2025.1.29)

(51)国際特許分類	F I	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	Z N A
C 0 7 K 19/00 (2006.01)	C 0 7 K 19/00	
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13	
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	Z
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z
請求項の数 22 (全32頁) 最終頁に続く		

(21)出願番号	特願2022-517990(P2022-517990)	(73)特許権者	515267851 アンヴェクティ・ソシエテ・パール・ア クシオン・サンプリフィエ Invectys SAS フランス、エフ - 7 5 0 1 5 パリ、リュ ・デュ・ドクトール・ルー 2 8 番
(86)(22)出願日	令和2年9月18日(2020.9.18)	(74)代理人	100101454 弁理士 山田 卓二
(65)公表番号	特表2022-548764(P2022-548764 A)	(74)代理人	100122301 弁理士 富田 憲史
(43)公表日	令和4年11月21日(2022.11.21)	(74)代理人	100170520 弁理士 笹倉 真奈美
(86)国際出願番号	PCT/EP2020/076198	(72)発明者	ルストー, マリア フランス7 5 0 0 9 パリ、リュ・シャブ タール1 5
(87)国際公開番号	WO2021/053199		
(87)国際公開日	令和3年3月25日(2021.3.25)		
審査請求日	令和5年9月14日(2023.9.14)		
(31)優先権主張番号	19306148.8		
(32)優先日	令和1年9月20日(2019.9.20)		
(33)優先権主張国・地域又は機関	欧州特許庁(EP)		
最終頁に続く			

(54)【発明の名称】 L I L R B 2 に対するシングルドメイン抗体

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリー B メンバー 2 (L I L R B 2) に特異的に結合するシングルドメイン抗体 (s d A b) であって、前記 s d A b が、3 つの相補性決定領域 (C D R) を含み、C D R 1 が配列番号 1 のアミノ酸配列を含み、C D R 2 が配列番号 2 のアミノ酸配列を含み、そして C D R 3 が配列番号 3 のアミノ酸配列を含む、s d A b。

【請求項 2】

L I L R B 2 がヒト L I L R B 2 である、請求項 1 に記載の s d A b。

【請求項 3】

前記 s d A b が、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリー B メンバー 1 (L I L R B 1) と結合しない、請求項 1 に記載の s d A b。

【請求項 4】

L I L R B 1 がヒト L I L R B 1 である、請求項 3 に記載の s d A b。

【請求項 5】

配列番号 3 4 のアミノ酸配列、またはそれに対して少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上のアミノ酸配列同一性を有するアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の s d A b。

【請求項 6】

配列番号 3 4 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の s d A b。

【請求項 7】

前記 s d A b が、L I L R B 2 とヒト白血球抗原 - G (H L A - G) との間の相互作用を阻害する、請求項 1 に記載の s d A b。

【請求項 8】

前記 s d A b が、L I L R B 2 とアンジオポエチン様 2 (A N G P T L 2) との間の相互作用を阻害する、請求項 1 に記載の s d A b。

【請求項 9】

前記 s d A b が、少なくとも 1 つの分子にコンジュゲートされている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の s d A b。

【請求項 10】

前記 s d A b が、安定化基にコンジュゲートされている、請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の s d A b。

【請求項 11】

安定化基が、F c または I g G である、請求項 10 に記載の s d A b。

【請求項 12】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の s d A b をコードする核酸配列を含む単離された核酸。

【請求項 13】

単離された核酸が、配列番号 45 の核酸配列を含む、請求項 12 に記載の単離された核酸。

【請求項 14】

請求項 12 または 13 に記載の単離された核酸を含むベクター。

【請求項 15】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の s d A b を含むキメラ抗原受容体 (C A R) 。

【請求項 16】

請求項 12 または 13 に記載の単離された核酸を含む、細胞。

【請求項 17】

前記細胞が T 細胞、C D 4 + T 細胞、C D 8 + T 細胞、B 細胞、N K 細胞、N K T 細胞、単球及び樹状細胞から成る群から選択される、請求項 16 に記載の細胞。

【請求項 18】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の s d A b と、薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

【請求項 19】

がんを治療するための、および/または腫瘍細胞または腫瘍組織上の L I L R B 2 を検出するための、医薬の製造における請求項 18 に記載の医薬組成物の使用であって、前記がんが L I L R B 2 を過剰発現している、使用。

【請求項 20】

がんが、肺癌、膵臓癌、子宮内膜癌、肝細胞癌、黒色腫、卵巣癌、乳癌、大腸癌、神経膠腫、胃癌、腎癌、精巣癌、食道癌、子宮頸癌、マウスのルイス肺癌、白血病、甲状腺癌、尿路癌及び頭頸部癌から成る群から選択される、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】

がんが、非小細胞肺癌 (N S C L C)、膵管癌、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、急性骨髄性白血病 (A M L) 及び肝臓癌から成る群から選択される、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の s d A b を使用することを含む、腫瘍細胞または腫瘍組織上の L I L R B 2 を検出するための、試験管内または生体外での方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は免疫療法及び免疫診断の分野に係る。本発明は、白血球免疫グロブリン様

10

20

30

40

50

受容体サブファミリーBメンバー2 (LILRB2) に対するシングルドメイン抗体 (sdAb) を提供する。

【背景技術】

【0002】

白血球免疫グロブリン (Ig) 様受容体 (LILBR) は細胞質尾部がITIM (免疫受容体チロシンベースの抑制性モチーフ) で構成されている抑制性受容体である。LILRB1はすべての免疫細胞サブセットで発現されるのに対して、LILRB2の発現は単球、樹状細胞、及びマクロファージのような抗原提示細胞 (APC) に限定される。

【0003】

LILRB2は、CD1d、補体カスケード由来のいくつかの分子 (C4d、C3d、C4b、C3b、及びiC3b)、アンジオポエチン様2及び5 (ANGPTL2/5) タンパク質、B-アミロイド1-42、及びミエリン由来阻害剤 (Nog66、MAG) ならびに古典的 (HLA-A、-B及び-C) または非古典的MHCクラスI分子 (HLA-E、F及びG) と相互作用する。免疫細胞で発現されるLILRB2とHLA-Gとの間の相互作用は細胞機能を阻害し、免疫抑制細胞を誘導できることが特に実証された。実際、樹状細胞 (DC) に存在するHLA-GとLILRB2との間の相互作用はそれらの成熟を阻害し、それらを寛容原性にする。

【0004】

興味深いことに、LILRB2受容体はいくつかの種類のがんで発現され、転移と頻繁に関連することが示された。LILRB2は抑制性受容体であるが、腫瘍によるその発現は腫瘍細胞の増殖と運動性を高めることが示された。実際、HLA-GまたはANGPTL2への結合の際、LILRB2受容体は腫瘍細胞の増殖、成長、及び播種を抑制する経路を阻害する。注目すべきことに、LILRB2は、特に固形腫瘍の状況において腫瘍関連マクロファージ (TAM) によって発現される。これらのマクロファージは、免疫細胞浸潤の阻害とがん細胞の増殖に有利に働く機能とに関連するM2表現型を示す。LILRB2受容体の発現は健康な人ではAPCに限定されるので、腫瘍でのその新発現と寛容原性DC及びTAMによるその強力な上方調節は、LILRB2受容体を免疫療法治療の標的となる優れた腫瘍関連抗原 (TAA) にする。

【0005】

しかしながら、今日まで、LILRB2を遮断することができる効果的な免疫療法剤はない。抗LILRB2モノクローナル遮断抗体 (mAb) の生成は新しい免疫療法治療への道を開くことになる。しかしながら、mAbのサイズが大きいこと (約150kDa) は、腫瘍の浸透性が低下するので固形がんへの適用が制限されるため、主な欠点であり、未だに治療が最も難しいがんである。したがって、そのようながんを標的とする新しい且つ改良された薬剤に対する当該技術分野における重要な必要性が依然として存在する。

【0006】

ラクダ科のメンバーは異なるクラスの抗体: (i) 2つの軽鎖と2つの重鎖 (約150kDa) を含有する従来の重鎖抗体、(ii) H鎖のみを含むホモ二量体重鎖抗体 (HcAb; 約95kDa) 及び(iii) 固有の重鎖に基づく追加のIgGアイソタイプを自然に産生する。これらの重鎖のみ抗体は、従来のmAbと同様に、それらの抗原に対して高い結合親和性及び特異性を有することが実証されている。

【0007】

HcAbsの重鎖の可変ドメイン (すなわち、シングルドメイン抗体 (sdAb) またはNanobodies (登録商標) (Nb)) は、抗原の結合と特異性に関与し、結合特性を失うことなくHcAbから単離することができる。それらの小さいサイズ、一般に約15~20kDaは固形腫瘍を標的とする場合の重要な利点である。実際、それらはがん細胞を取り巻く線維性微小環境にさらに効率的に浸透し、この間質に定着したマクロファージのような標的細胞に到達できるはずである。次に、sdAbは固形腫瘍及びTAMに表示されるLILRB2受容体を標的とするという点で優れた候補である。

【0008】

10

20

30

40

50

本発明者らは、抗LILRB2シングルドメイン抗体(s d A b)の開発において当該技術分野に重要な技術的貢献を行った。

【発明の概要】

【0009】

本発明は、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー2(LILRB2)、好ましくはヒトLILRB2に特異的に結合する、またはそれを特異的に認識するシングルドメイン抗体(s d A b)に関する。

【0010】

好ましくは、前記s d A b抗LILRB2は白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー1(LILRB1)、好ましくはヒトLILRB1と結合しない。

10

【0011】

一態様では、本発明に係るs d A bは、配列番号3、6、9、12、15、18、21、24、27、30もしくは33に示される配列を含む、もしくはその配列で構成される、または1、2、または3のアミノ酸修飾に起因して配列番号3、6、9、12、15、18、21、24、27、30もしくは33とは異なるアミノ酸配列を含む、もしくはその配列で構成される少なくとも1つの相補性決定領域(CDR)を含む。

【0012】

好ましくは、本発明に係るs d A bは3つのCDRを含み、その際、

(a) CDR1は、配列番号1を含む、配列番号1のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号1とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR2は、配列番号2を含む、配列番号2のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号2とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR3は、配列番号3を含む、配列番号3のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号3とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(b) CDR1は、配列番号4を含む、配列番号4のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号4とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR2は、配列番号5を含む、配列番号5のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号5とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR3は、配列番号6を含む、配列番号6のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号6とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(c) CDR1は、配列番号7を含む、配列番号7のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号7とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR2は、配列番号8を含む、配列番号8のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号8とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR3は、配列番号9を含む、配列番号9のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号9とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(d) CDR1は、配列番号10を含む、配列番号10のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号10とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR2は、配列番号11を含む、配列番号11のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号11とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR3は、配列番号12を含む、配列番号12のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号12とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(e) CDR1は、配列番号13を含む、配列番号13のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号13とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR2は、配列番号14を含む、配列番号14のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号14とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

CDR3は、配列番号15を含む、配列番号15のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号15とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(f) CDR1は、配列番号16を含む、配列番号16のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号16とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

20

30

40

50

C D R 2 は、配列番号 17 を含む、配列番号 17 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 17 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 3 は、配列番号 18 を含む、配列番号 18 のものである、または 1、2、3、もしくは 4 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 18 とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(g) C D R 1 は、配列番号 19 を含む、配列番号 19 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 19 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 2 は、配列番号 20 を含む、配列番号 20 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 20 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 3 は、配列番号 21 を含む、配列番号 21 のものである、または 1、2、3、もしくは 4 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 21 とは異なるアミノ酸配列を有する；または

10

(h) C D R 1 は、配列番号 22 を含む、配列番号 22 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 22 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 2 は、配列番号 23 を含む、配列番号 23 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 23 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 3 は、配列番号 24 を含む、配列番号 24 のものである、または 1、2、3、もしくは 4 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 24 とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(i) C D R 1 は、配列番号 25 を含む、配列番号 25 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 25 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 2 は、配列番号 26 を含む、配列番号 26 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 26 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

20

C D R 3 は、配列番号 27 を含む、配列番号 27 のものである、または 1、2、3、もしくは 4 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 27 とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(j) C D R 1 は、配列番号 28 を含む、配列番号 28 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 28 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 2 は、配列番号 29 を含む、配列番号 29 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 29 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 3 は、配列番号 30 を含む、配列番号 30 のものである、または 1、2、3、もしくは 4 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 30 とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(k) C D R 1 は、配列番号 31 を含む、配列番号 31 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 31 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

30

C D R 2 は、配列番号 32 を含む、配列番号 32 のものである、または 1、2、もしくは 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 32 とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 3 は、配列番号 33 を含む、配列番号 33 のものである、または 1、2、3、もしくは 4 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 33 とは異なるアミノ酸配列を有する。

【0013】

特に、抗 L I L R B 2 s d A b は 3 つの C D R を含み、その際、C D R 1 は配列番号 1 を含む、またはそのものであり、C D R 2 は配列番号 2 を含む、またはそのものであり、且つ C D R 3 は配列番号 3 を含む、またはそのものである。

【0014】

特定の態様では、s d A b 抗 L I L R B 2 は、配列番号 34 ~ 配列番号 44 の配列のいずれかで定義される配列、またはそれに対して少なくとも 80% の配列同一性、好ましくは少なくとも 90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む、またはその配列で構成される。

40

【0015】

特に、抗 L I L R B 2 s d A b は配列番号 34 で定義される配列を含む、またはその配列で構成される。

【0016】

好ましくは、本発明に係る s d A b 抗 L I L R B 2 は、L I L R B 2 とヒト白血球抗原 - G (H L A - G) との間の相互作用及び / または L I L R B 2 とアンジオポエチン様 2 (A N G P T L 2) との間の相互作用を阻害する。

50

【 0 0 1 7 】

別の態様では、本発明は、本発明に係る s d A b 抗 L I L R B 2 をコードする配列を含む、好ましくは配列番号 4 5 ~ 5 5 から成る群で選択される配列によって定義される単離された核酸に関する。

【 0 0 1 8 】

本発明はまた、本発明に係る単離された核酸を含むベクターに関するが、本発明に係る s d A b または単離された核酸を含むキメラ抗原受容体 (C A R) にも関する。

【 0 0 1 9 】

特定の態様では、本発明は、本発明に係る単離された核酸またはベクターを含む細胞、または本明細書で開示されている C A R を発現する細胞に関する。好ましくは、細胞は T 細胞、 C D 4 + T 細胞、 C D 8 + T 細胞、 B 細胞、 N K 細胞、 N K T 細胞、単球及び樹状細胞から成る群から選択され、好ましくは、細胞は T 細胞、 B 細胞または N K 細胞である。

10

【 0 0 2 0 】

本発明はさらに、本発明に係る s d A b、単離された核酸、ベクター、 C A R または C A R を発現する細胞と、任意で薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物に関する。

【 0 0 2 1 】

一態様では、本発明に係る s d A b、単離された核酸、ベクター、 C A R、細胞または医薬組成物はがんの治療に使用するためのものであり、好ましくはその際、がんは L I L R B 2 を過剰発現し、さらに好ましくは、がんは肺癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、膵臓癌、膵管癌、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、子宮内膜癌、肝細胞癌、黒色腫、卵巣癌、乳癌、大腸癌、神経膠腫、胃癌、腎癌、精巣癌、食道癌、子宮頸癌、マウスのルイス肺癌、白血病、甲状腺癌、肝臓癌、尿路癌及び頭頸部癌から成る群から選択される。

20

【 0 0 2 2 】

本発明は最終的に、試験管内または生体外で腫瘍細胞または腫瘍組織にて L I L R B 2 を検出するための、本発明に係る s d A b 抗 L I L R B 2 の使用に関する。

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 2 3 】

【 図 1 】アルパカの免疫化及び V H H の特異性の同定。 A は、 r h L I L R B 2 - F c タンパク質によるアルパカ免疫化のプロトコール。 B は、免疫したアルパカからの血清をさまざまな希釈率での E L I S A にて調べた。 C は、 V H H の選択はファージディスプレイベクターとパイオパニング技術を使用して行い、 r h L I L R B 2 - F c に対して評価した。陽性の抗 L I L R B 2 V H H を実線で囲み、陰性の抗 L I L R B 2 V H H を点線で囲む。

30

【 図 2 】 B 8、 C 7、及び C 9 の N b は r h L I L R B 2 の線状エピトープを認識する。変性 r h L I L R B 2 - F c (r h I L T 4 - F c)、 r h L I L R B 2 (r h I L T 4) 及び r h L I L R B 1 (r h I L T 2) のタンパク質をウエスタンブロッティングによって膜に移した。 A は、 r h L I L R B 2 - F c、 r h L I L R B 2 及び r h L I L R B 1 のタンパク質を対照の抗 L I L R B 2 A b (H - 3 0 0 及び 4 2 D 1)、対照の抗 L I L R B 1 (G H I / 7 5 及び H P - F 1) と共にインキュベートした。 B は、 r h L I L R B 2 - F c、 r h L I L R B 2、及び r h L I L R B 1 のタンパク質を B 8、 C 7、及び C 9 の N b と共にインキュベートした。 A b の結合は、 H - 3 0 0 用の H R P 標識ヤギ抗ラット抗体及び 4 2 D 1、 G H I / 7 5、 H P - F 1 用の H R P 標識ヤギ抗マウス抗体、及び H R P 標識マウス抗 c - M y c タグ N b を使用して検出した。

40

【 図 3 】変性した r h I L T 4 (D 1 - D 4 ドメイン) への N b (B 8、 C 7、 C 9) の結合、及び変性した r h I L T 2 (D 1 - D 4) に対する N b (B 8、 C 7、 C 9) の結合の非存在を示す図である。

【 図 4 】 L I L R B 2 で形質導入した D 1 . 1 細胞株に対する N b の特異性を示す図である。 L I L R B 2 D 1 . 1 細胞株を、 4 2 D 1 対照抗体または抗 L I L R B 2 N b と共培養し、フローサイトメトリーで分析した。

50

【図5】P B M Cの単球上のL I L R B 2受容体に対するN bの特異性を示す図である。単球をP B M Cから単離し、無関係な対照N bと比較して4 2 D 1対照抗体とN bによってL I L R B 2受容体の発現について染色し、フローサイトメトリーで分析した。単球は、抗C D 1 4及び抗L I L R B 1抗体によって他の白血球から特定された。

【図6】L I L R B 2 / H L A - G 6の相互作用に対する抗L I L R B 2 N bの遮断能力を示す図である。試験設計パネル(右上)に示されているように、マイクロタイタープレートを個々のN bと同時にインキュベートする前に、r h L I L R B 2 - F cタンパク質でコーティングした。次に、H L A - G 6 V 5タグ付きタンパク質を添加し、H R P結合抗V 5 A bを使用してH L A - G 6 - V 5タンパク質の検出を行った。値は、陰性対照(N bまたは対照A bの非存在下でH L A - G 6 - V 5タンパク質のみとインキュベートしたr h L I L R B 2 - F c)の平均吸光度強度に対して基準化した(n = 3)。

10

【図7】L I L R B 2 / A N G P T L 2の相互作用に対する抗L I L R B 2 N bの遮断能力を示す図である。試験設計パネル(右上)に示されているように、マイクロタイタープレートを個々のN bと同時にインキュベートする前に、r h L I L R B 2 - F cタンパク質でコーティングした。次に、A N G P T L 2タンパク質を添加し、抗A N G P T L 2精製A b、続いてH R P結合抗ウサギA bを使用してA N G P T L 2の検出を行った。値は、陰性対照(N bまたは対照A bの非存在下でA N G P T L 2タンパク質のみとインキュベートしたr h L I L R B 2 - F c)の平均吸光度強度に対して基準化した(n = 1)。

【発明を実施するための形態】

【0024】

20

定義

本明細書で使用されるとき、「白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー2」または「L I L R B 2」は、2または4の細胞外免疫グロブリンドメインと、膜貫通ドメインと、2~4の細胞質免疫受容体チロシンベースの阻害モチーフ(I T I M)とを含有する白血球免疫グロブリン様受容体(L I R)ファミリーのメンバー、特にL I R受容体のサブファミリーBクラスを指す。L I L R B 2は免疫細胞で発現され、抗原提示細胞上のM H CクラスI分子に結合し、免疫応答の刺激を阻害する負のシグナルを伝達する。それは、炎症反応及び細胞傷害性を制御して、免疫反応に集中し、自己反応性を制限するのに役立つと考えられている。L I L R B 2は、例えば、L I R 2、C D 8 5抗原様ファミリーメンバーD、C D 8 5 D、免疫グロブリン様転写物4、I L T 4、単球/マクロファージ免疫グロブリン様受容体10またはM I R - 10のような既知の別名を有する。本発明の文脈では、この用語は特にヒトL I L R B 2を指す。ヒトL I L R B 2は、例えば、UniProt受入番号Q 8 N 4 2 3のもとで当該技術分野にて知られている。例えば、ヒトL I L R B 2のアミノ酸配列は約598アミノ酸であり、遺伝子は染色体領域19q13.4にてクラスター内に位置する。ヒトL I L R B 2は選択的スプライシングによって生成される4の既知のアイソフォームを有する。アイソフォーム1が標準配列として選択されており、受入番号UniProtQ 8 N 4 2 3 - 1のもとで説明され、アイソフォーム2は437位のアミノ酸の欠失によってアイソフォーム1とは異なり、受入番号UniProtQ 8 N 4 2 3 - 2のもとで説明され、アイソフォーム3は、495位~510位及び511位~598位でのアミノ酸の欠失によってアイソフォーム1とは異なり、受入番号UniProtQ 8 N 4 2 3 - 3のもとで説明され、アイソフォーム4は1~116位のアミノ酸の欠失によってアイソフォーム1とは異なり、受入番号UniProtQ 8 N 4 2 3 - 4のもとで説明されている。本発明の文脈では、「L I L R B 2」という用語はL I L R B 2のすべてのアイソフォームを包含する。

30

40

【0025】

本明細書で使用されるとき、「重鎖抗体」(H C A b)は軽鎖を欠き、2つの重鎖から成る免疫グロブリンを指す。各重鎖は特異的な抗原、エピトープ、またはリガンドへの結合を可能にする定常領域(C H)及び可変ドメイン(V H)を含む。本明細書で使用されるとき、H C A bは、各重鎖がV H Hと呼ばれる可変ドメイン及び2つの定常ドメイン(C H 2及びC H 3)を含むラクダ型の重鎖抗体を包含する。注目すべきことに、ラクダ科

50

動物のH C A bは最初の定常ドメイン (C H 1) を欠く。特定の抗原に対するそのような重鎖抗体は免疫したラクダ科動物から得ることができる。本明細書で使用されるとき、「ラクダ科動物」はヒトコブラクダ、ラクダ、ラマ及びアルパカを包含する。ラクダ科動物のH C A bはH a m e r s - C a s t e r m a n e t a l . , N a t u r e , 1 9 9 3 , 3 6 3 : 4 4 6 によって記載されている。H C A bの他の例は、コモリザメ (G i n g l y m o s t o m a c i r r a t u m) やテンジクザメ (O r e c t o l o b u s m a c u l a t e s) のような軟骨魚類に由来する免疫グロブリン様構造 (I g - N A R) である。

【0026】

本明細書で使用されるとき、「シングルドメイン抗体」 (s d A b または N b) は、抗原、エピトープ、またはリガンドと単独で結合することができる、重鎖のみ抗体に由来する単一可変ドメインを指す、つまり、別の結合ドメインを必要としない。シングルドメイン抗体は、V H H もしくは V - N A R に由来してもよく、または V H H もしくは V - N A R にあってもよい。V H H はラクダ科の H C A b に見られる可変ドメインを指す。V - N A R は軟骨魚類で発見された免疫グロブリン様構造 (I g - N A R) に見られる可変ドメインを指す。別の方法として、シングルドメイン抗体はナイーブな合成ライブラリーから入手されてもよい。シングルドメイン抗体に関する概説については、人は S a e r e n s e t a l . , C u r r e n t O p i n i o n i n P h a r m a c o l o g y , 2 0 0 8 , 8 : 6 0 0 - 6 0 8 , M u y l d e r m a n s e t a l . , V e t . I m m u n o l . I m m u n o p a t h o l . 2 0 0 9 , M a r , 1 5 ; 1 2 8 (1 - 3) : 1 7 8 - 8 3 , 及び/または M u y l d e r m a n s , 2 0 1 3 , A n n u . R e v . B i o c h e m . 2 0 1 3 ; 8 2 : 7 7 5 - 9 7 を参照してもよく、その開示は参照によって組み込まれている。

【0027】

本明細書で使用されるとき、「結合する」または「結合すること」は、抗原を認識して接触するペプチド、ポリペプチド、タンパク質、融合タンパク質、及び抗体 (s d A b を含む) を指す。「特異的に結合する」または「免疫特異的に結合する」とは、抗体が特定の抗原を認識するが、試料における他の分子または抗原を実質的に認識もせず、それと結合もしないことを意味する。場合によっては、「特異的結合」または「特異的に結合すること」という用語は、抗体、タンパク質、またはペプチドと第2の化学種との相互作用に関連して使用されて、相互作用が特定の構造 (例えば、抗原決定基またはエピトープ) の存在に依存することを意味することができる。本明細書で使用されるとき、「特異的結合」という用語は少なくとも 10^{-6} M または 10^{-7} M の結合親和性での抗体と抗原との間の接触を意味する。ある特定の態様では、抗体は少なくとも約 10^{-8} M、好ましくは 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M の親和性で結合する。

【0028】

本明細書で使用されるとき、「L I L R B 2 に特異的に結合する s d A b」という用語及び類似の用語は、L I L R B 2 を特異的に認識し、他の抗原 (例えば、L I L R B 1 のような L I L R ファミリーの他のメンバーを含む) を認識しない、または弱く認識する s d A b を指す。好ましくは、L I L R B 2 に特異的に結合する s d A b は、他の L I L R ファミリーメンバー、例えば L I L R B 1 などを含む他の抗原またはその断片に対する親和性と比較した場合、好ましくは少なくとも 10、100 または 1000 倍、この抗原に対してさらに高い親和性を有する。

【0029】

抗体または s d A b の親和性は、単一の抗原 - 抗体部位での特定の抗原との結合の尺度であることができ、本質的に、抗体の抗原結合部位と特定のエピトープとの間の相互作用に存在するすべての引力及び反発力の合計である。特定の抗原 (例: L I L R B 2) に対する抗体または s d A b の親和性は、抗体結合部位の親和性を表す方程式 $K_d = [A_g][A_b] / [A_g A_b]$ で定義される、解離の平衡定数 K で表されてもよく; その際、[A g] は遊離抗原の濃度 (M) であり、[A b] は遊離抗体の濃度 (M) であり、[A g

10

20

30

40

50

A b] は抗原 - 抗体複合体の濃度 (M) である。抗原と抗体または s d A b が強く反応する場合、遊離抗原または遊離の抗体または s d A b はほとんど存在しないため、抗体または s d A b の平衡定数または親和性は低いであろう。

【 0 0 3 0 】

2つのアミノ酸配列 (A) と (B) との間の「同一性割合」の「同一性」は、比較のウィンドウを通して最適な方法で整列させた2つの配列を比較することによって決定される。配列の前記配列比較は、例えば、Needleman - Wunschのグローバル配列比較のためのアルゴリズムを使用して周知の方法によって実行することができる。タンパク質分析ソフトウェアは、保存的アミノ酸置換を含む、種々の置換、欠失、及びその他の修飾に割り当てられた類似性の尺度を使用して、類似した配列を合わせる。完全な配列比較が得られたら、配列 (A) と (B) の間の最長の配列に含有される残基の総数で整列させた同一のアミノ酸残基の総数を割ることによって同一性の割合を得ることができる。配列同一性は通常、配列分析ソフトウェアを使用して決定される。2つのアミノ酸配列を比較するために、例えば、EMBL - EBIによって提供され、http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_needle&context=proteinで利用可能なタンパク質のペアワイズ配列の配列比較のためのツール「エンボスニードル」を、初期設定：(i) マトリックス：BLOSUM62、(i i) ギャップ開放：10、(i i i) ギャップ拡張：0.5、(i v) 出力形式：ペア、(v) エンドギャップペナルティ：偽、(v i) エンドギャップ開放：10、(v i i) エンドギャップ拡張：0.5を用いて使用することができる。

10

20

【 0 0 3 1 】

本明細書で使用されるとき、「アミノ酸修飾」とは、ポリペプチドのアミノ酸配列における変化を意味する。「アミノ酸の変化」とも呼ばれてもよい「アミノ酸の修飾」は、本明細書では、ポリペプチド配列における置換、挿入、及び/または欠失のようなアミノ酸変異を含む。本明細書における「アミノ酸置換」または「置換」とは、親ポリペプチド配列の特定の位置にあるアミノ酸を別のアミノ酸で置換することを意味する。好ましくは、置換はサイレント置換である。「アミノ酸挿入」または「挿入」とは、親ポリペプチド配列の特定の位置でのアミノ酸の付加を意味する。「アミノ酸欠失」または「欠失」とは、親ポリペプチド配列の特定の位置にあるアミノ酸の除去を意味する。アミノ酸置換は保存的であってもよい。保存的置換とは、所与のアミノ酸残基を、同様の化学的特性 (例えば、電荷、容積及び/または疎水性) を持つ側鎖 (「R - 基」) を有する別の残基で置換することである。一般に、保存的なアミノ酸置換はタンパク質の機能特性を実質的に変化させないであろう。保守的な置換及び対応する規則は最新技術で十分に説明されている。

30

【 0 0 3 2 】

本明細書で使用されるとき、「親ポリペプチド」または「ポリペプチド親」はその後、修飾されて変異型を生成する修飾されていないポリペプチドを指す。本発明の文脈では、親ポリペプチドは天然に存在するH C A b由来のV H Hであってもよい。

【 0 0 3 3 】

本明細書で使用されるとき「変異型ポリペプチド」、「ポリペプチド変異型」または「変異型」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾に起因して親ポリペプチド配列のものとは異なるポリペプチド配列を指す。例えば、本発明の文脈では、変異型は天然に存在するH C A b由来のV H Hの変異型であってもよい。通常、変異型は1 ~ 50アミノ酸修飾、好ましくは1 ~ 40アミノ酸修飾を含む。特に、変異型はその親と比べて1 ~ 30のアミノ酸変化、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、または30のアミノ酸変化を有してもよい。変異型は、1またはいくつかのアミノ酸置換、及び/または1またはいくつかのアミノ酸挿入、及び/または1またはいくつかのアミノ酸欠失を含んでもよい。いくつかの実施形態では、変異型は、例えば、上記に示されるように1またはいくつかの保存的置換を含んでもよい。いくつかのさらなる実

40

50

施形態では、s d A bの変異型は親s d A bのCDRドメインにて1またはいくつかのアミノ酸修飾を含んでもよい。CDR3は同じ認識パターンを有するs d A bファミリーを定義するために一般的に使用されるので、CDR3におけるそのような修飾は親s d A bと比べて異なる結合特性（例えば、結合特性の増加）を有する新しいs d A bファミリーにつながってもよいのに対して、CDR1またはCDR2における修飾は同じファミリーの異なるメンバー（すなわち、同じCDR3を有するが、異なるCDR1及び/またはCDR2を有する）を定義することにつながってもよい。いくつかの他の実施形態では、親s d A bの変異型は少なくとも1つのフレームワークドメインにて1またはいくつかのアミノ酸修飾を含んでもよい。

【0034】

「治療」という用語は、疾患または疾患の症状の治療、防止、予防及び遅延のような患者の健康状態を改善することを目的としたどんな行為も指す。それは疾患の治癒的治療及び/または予防的治療の双方を指摘する。治癒的治療は、治癒をもたらす治療、または疾患もしくは疾患の症状もしくはそれが直接的または間接的に引き起こす苦痛を緩和する、改善する及び/または排除する、軽減する及び/または安定化させる治療として定義される。予防的治療は、疾患の予防をもたらす治療と、疾患の進行及び/または発生率またはその発生のリスクを減らす及び/または遅延させる治療との双方を含む。ある特定の実施形態では、そのような用語は、疾患、障害、感染症、またはそれに関連する症状の改善または根絶を指す。他の実施形態では、この用語はがんの広がりまたは悪化を最小限に抑えることを指す。本発明に係る治療は、必ずしも100%の治療または完全な治療を意味するものではない。むしろ、当業者が潜在的な利益または治療効果を有すると認識する治療の程度はさまざまである。

【0035】

本明細書で使用されるとき、「障害」または「疾患」という用語は、遺伝的なもしくは発達上のエラー、感染、毒、栄養の不足または不均衡、毒性または不利な環境要因の影響から生じる、身体の誤って機能する臓器、部分、構造、またはシステムを指す。好ましくは、これらの用語は、健康の障害または疾患、例えば、正常な身体的または精神的な機能を破壊する病気を指す。さらに好ましくは、障害という用語は、がんのような動物及び/またはヒトに影響を与える免疫及び/または炎症性の疾患を指す。

【0036】

本明細書で使用されるとき「がん」という用語は、異常な細胞の急速で制御されていない増殖を特徴とする疾患として定義される。がん細胞は、局所的に、または例えば、転移にて血流やリンパ系を介して体の他の部分に広がることができる。

【0037】

本明細書で使用されるとき、「対象」、「宿主」、「個体」、または「患者」という用語はヒト及び獣医の対象、特に動物、好ましくは哺乳動物、一層さらに好ましくは成人及び小児を含むヒトを指す。しかしながら、「対象」という用語はまた、非ヒト動物、特に、とりわけイヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ及び非ヒト霊長類のような哺乳動物も包含する。

【0038】

本明細書で使用されるとき、「医薬組成物」は、例えば、本発明に係る抗L I L R B 2抗体またはs d A bの抗原結合ドメインを含む活性剤の1以上の、生理的に好適な担体及び賦形剤のような任意の他の化学成分との調製物を指す。医薬組成物または獣医用組成物の目的は生物への活性剤の投与を容易にすることである。本発明の組成物は、任意の従来の投与経路または使用経路に好適な形態であることができる。一実施形態では、「医薬組成物」は通常、活性剤、例えば、化合物または組成物と、不活性の（例えば、検出可能な薬剤または標識）または活性がある天然に存在するまたは天然に存在しない担体、例えば、補助剤、希釈剤、結合剤、安定剤、緩衝液、塩、親油性溶媒、防腐剤、補助剤などとの組み合わせを意図し、且つ薬学的に許容される担体を含む。

【0039】

10

20

30

40

50

本明細書で言及されるとき「許容されるビヒクル」または「許容される担体」は、医薬組成物または獣医用組成物を製剤化するのに有用であることが当業者に知られている任意の既知の化合物または化合物の組み合わせである。

【 0 0 4 0 】

「治療有効量」は、対象に投与されたときに、標的となる疾患もしくは障害を治療するために、または所望の効果を生み出すために必要とされる活性剤の量である量である。「有効量」は薬剤（複数可）、疾患及びその重症度、ならびに治療される対象の年齢、体重、及び特徴に応じて異なるであろう。

【 0 0 4 1 】

本明細書で使用されるとき、「薬物」という用語は、障害及び/または疾患に対する治療的特性または予防的特性を持つ任意の物質または組成物を指す。

10

【 0 0 4 2 】

L I L R B 2 に対するシングルドメイン抗体

上記のように、s d A b 分子は軽鎖を自然に欠いている重鎖のみ抗体の可変領域に対応する。s d A b の抗原結合表面は、ふつう平坦または凹面である従来の抗体の表面よりも凸状（または突出）である。

【 0 0 4 3 】

本発明に係るシングルドメイン抗体は、抗原またはエピトープ（例えば、L I L B R 2）と単独で、すなわち、別の結合ドメインを必要とせずに、結合することができる抗体に由来する単一の可変ドメインを含む。特に、本発明に係るシングルドメイン抗体は軽鎖またはその断片を欠いている。本発明に係るs d A b 分子は、ラクダ科、軟骨魚類、ナイーブライブラリーから、または抗体の重鎖可変ドメインの操作された形態から単離されてもよい重鎖のみ抗体（H c A b）の抗原結合ドメインを含む、またはそれから成る、または本質的にそれらから成るポリペプチドである。好ましくは、s d A b はラクダ科動物のH C A b に由来し、好ましくはアルパカH C A b に由来する。

20

【 0 0 4 4 】

いくつかの好ましい実施形態では、シングルドメイン抗体はV H H、I g - N A R 由来のV - N A R、操作されたV - N A R、V H H 変異型、特にヒト化V H H または最適化されたV H H、及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。

【 0 0 4 5 】

一実施形態では、L I L R B 2 に対するs d A b は最適化されたs d A b である。最適化されたs d A b は、天然に存在するs d A b と比べて1またはいくつかのアミノ酸修飾を含む単離されたH C A b に由来するs d A b の変異型を指し、前記修飾は、例えば、s d A b の安定性を高めること、またはL I L R B 2 に対するs d A b 変異型の親和性及び/または選択性を向上させることを可能にする。

30

【 0 0 4 6 】

別のまたはさらなる実施形態では、L I L R B 2 に対するs d A b はヒト化s d A b である。ヒト化s d A b は、天然に存在するs d A b と比べて1またはいくつかのアミノ酸修飾を含むs d A b 変異型を指し、前記修飾はL I L R B 2 に対する親和性を著しく低下させることなく、ヒト対象に関するその免疫原性を減らすのを可能にする。本発明に係るヒト化s d A b は、ラクダ科または軟骨魚のs d A b 配列における1以上のアミノ酸を、好ましくはヒトコンセンサス配列に見られるような、それらのヒト対応物で置き換えることによって得られてもよいが、前記アミノ酸修飾は得られるs d A b の抗原結合能力にも、またはL I L R B 2 とヒト白血球抗原 - G (H L A - G) との間の相互作用を阻害する能力のようなその特性にも大きな影響を与えないという条件がある。そのような方法は当業者に周知である。当該技術分野は、本発明の文脈で使用することができるV H H のためのヒト化足場のいくつかの例を提供する。ヒト化s d A b s は部分的にヒト化されたs d A b s 及び完全にヒト化されたs d A b s を包含する。

40

【 0 0 4 7 】

潜在的に有用なヒト化するアミノ酸修飾、特に置換は、天然に存在するV H H 配列のフ

50

フレームワーク領域の配列を1以上の密接に関連するヒトVH配列の対応するフレームワーク配列と比較することによって決定することができ、その後、このように決定された潜在的に有用なヒト化する置換（またはそれらの組み合わせ）の1以上を、（それ自体が知られている任意の方法で）前記VHH配列に導入することができ、得られるヒト化されたVHH配列を、標的に対する親和性、安定性、発現の容易さ及びレベル及び/または他の所望の特性について調べることができる。このようにして、限られた程度の試行錯誤によって、好適なヒト化する置換（またはそれらの好適な組み合わせ）を当業者が決定することができる。別の方法として、当業者はLILRB2に対して向けられた所望のヒト化sdAbを得るために、当該技術分野で記載されているVHHのヒト化足場内にVHHのCDRを移植してもよい。sdAbをヒト化するための方法と同様にヒト化されたsdAbの足場は、例えば、特許出願US2010/0215664、WO2011/117423、またはConrath et al., Journal of Molecular Biology, 2005, 350:112-125及びVincke, Journal of Biological Chemistry, 2009, 284, 3273-3284のような刊行物に提供されている。

10

【0048】

別の方法として、LILRB2に対して向けられた所望のsdAbを得るために、当業者は当該技術分野で記載されているsdAbの普遍的な足場内にCDRを移植してもよい（Saerens et al., J. Mol. Biol. (2005), 352, 597-607）。本発明のsdAbは、例えば、Saerens, et al. に示されているように、普遍的なフレームワーク足場を含み、且つ以下に定義される少なくとも1つのCDR、好ましくは3つのCDRを含むVHHであってもよい。

20

【0049】

本発明のシングルドメイン抗体はその結合特異性を決定する少なくとも1つ、好ましくは3つの相補性決定領域（CDR）を含む。好ましくは、シングルドメイン抗体はフレームワーク領域（FR）間に分布するいくつかの、好ましくは3つのCDRを含む。CDR及びFRは好ましくは、天然に存在する抗体可変ドメイン由来の断片、変異型または誘導体である。CDRは一般に5～30アミノ酸の長さを有し、抗原結合に参与し、抗原特異性を提供する配列内容と構造コンフォメーションの双方で高い変動性を示す。

【0050】

好ましくは、シングルドメイン抗体は4つのフレームワーク領域または「FR」を含み、これらは、当該技術分野及び本明細書ではそれぞれ「フレームワーク領域1」または「FR1」、「フレームワーク領域2」または「FR2」、「フレームワーク領域3」または「FR3」、及び「フレームワーク領域4」または「FR4」と呼ばれる。これらのフレームワーク領域は3つの相補性決定領域または「CDR」によって中断され、これらは、当該技術分野ではそれぞれ「相補性決定領域1」または「CDR1」、「相補性決定領域2」または「CDR2」、及び「相補性決定領域3」または「CDR3」と呼ばれる。これらのフレームワーク領域及び相補性決定領域は、好ましくは、以下の順序：FR1 - CDR1 - FR2 - CDR2 - FR3 - CDR3 - FR4（アミノ末端からカルボキシ末端へ）で操作可能に連結される。

30

40

【0051】

所与のsdAbのCDRは当業者に利用可能な任意の方法によって決定することができる。例えば、非限定的な方法で、ChlothiaまたはKabatsの方法を使用してCDRを決定することができる（Chlothia et al., Nature, 342, 877-883; Kabat et al., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., United States Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda）。ChlothiaとKabatsの間のAbM（Oxford Molecular AbM抗体モデリングソフトウェア）と呼ばれる中間法、または利用可能な複雑な構造の分析に基づくいわゆる

50

「接触」法 (Saerens et al, Mol. Biol. 2005) のような CDR を決定する代替法も使用することができ、または Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol., 2003, 27: 55 - 77 (「IMGT」番号付けスキーム) にて開示されているような IMGT 法にて使用することもできる。

従来のヒト抗体 V_H と比べて、s d A b の F R 2 領域及び C D R にていくつかのアミノ酸を置換することができる。例えば、F R 2 領域における高度に保存された疎水性アミノ酸 (例えば、Val 47、Gly 49、Leu 50、及び/または Trp 52) は親水性アミノ酸 (Phe 42、Glu 49、Arg 50、Gly 52) によって置き換えられることが多く、構造全体をさらに親水性にし、高い安定性、溶解性、凝集に対する耐性に寄与する。

10

【0052】

いくつかの特定の実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は配列番号 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 または 33 に示される配列を含む、もしくはその配列で構成される、または 1、2、または 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30 または 33 とは異なるアミノ酸配列を含む、もしくはその配列で構成される C D R 3 を含む。好ましくは、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号 3、6 または 9 に示される配列を含む、もしくはその配列で構成される、または 1、2、または 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 3、6 または 9 とは異なるアミノ酸配列を含む、もしくはその配列で構成される C D R 3 を含む。好ましくは、そのようなアミノ酸修飾は、得られる s d A b の抗原結合能にも、または L I L R B 2 とヒト白血球抗原 - G (H L A - G) との間の相互作用を阻害する能力のようなその特性にも重大な影響を及ぼさない。好ましくは、そのようなアミノ酸修飾はサイレント置換のような置換である。

20

【0053】

いくつかの特定の実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号 2、5、8、11、14、17、20、23、26、29 または 32 に示される配列を含む、もしくはその配列で構成される、または 1、2、または 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 2、5、8、11、14、17、20、23、26、29 または 32 とは異なるアミノ酸配列を有する C D R 2 を含む。好ましくは、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号 2、5 または 8 に示される配列を含む、もしくはその配列で構成される、または 1、2、または 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 2、5 または 8 とは異なるアミノ酸配列を含む、もしくはその配列で構成される C D R 2 を含む。好ましくは、そのようなアミノ酸修飾は、得られる s d A b の抗原結合能にも、または L I L R B 2 とヒト白血球抗原 - G (H L A - G) との間の相互作用を阻害する能力のようなその特性にも重大な影響を及ぼさない。好ましくは、そのようなアミノ酸修飾はサイレント置換のような置換である。

30

【0054】

いくつかの特定の実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号 1、4、7、10、13、16、19、22、25、28 または 31 に示される配列を含む、もしくはその配列で構成される、または 1、2、または 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 1、4、7、10、13、16、19、22、25、28 または 31 とは異なるアミノ酸配列を有する C D R 1 を含む。好ましくは、本発明のシングルドメイン抗体は、配列番号 1、4 または 7 に示される配列を含む、もしくはその配列で構成される、または 1、2、または 3 のアミノ酸修飾に起因して配列番号 1、4 または 7 とは異なるアミノ酸配列を含む、もしくはその配列で構成される C D R 1 を含む。好ましくは、そのようなアミノ酸修飾は、得られる s d A b の抗原結合能にも、または L I L R B 2 とヒト白血球抗原 - G (H L A - G) との間の相互作用を阻害する能力のようなその特性にも重大な影響を及ぼさない。好ましくは、そのようなアミノ酸修飾はサイレント置換のような置換である。

40

【0055】

いくつかの特定の実施形態では、本発明のシングルドメイン抗体は、
(a) C D R 1 は、配列番号 1 を含む、配列番号 1 のものである、または 1、2、もしくは

50

3のアミノ酸修飾に起因して配列番号26とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR3は、配列番号27を含む、配列番号27のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号27とは異なるアミノ酸配列を有する；または
 (j) CDR1は、配列番号28を含む、配列番号28のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号28とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR2は、配列番号29を含む、配列番号29のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号29とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR3は、配列番号30を含む、配列番号30のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号30とは異なるアミノ酸配列を有する；または
 (k) CDR1は、配列番号31を含む、配列番号31のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号31とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR2は、配列番号32を含む、配列番号32のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号32とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR3は、配列番号33を含む、配列番号33のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号33とは異なるアミノ酸配列を有する；を含む、またはその配列で構成される3つのCDRを含む。

10

【0056】

好ましくは、抗LILRB2 sdAbは3つのCDRを含み、その際、
 (a) CDR1は、配列番号1を含む、配列番号1のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号1とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR2は、配列番号2を含む、配列番号2のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号2とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR3は、配列番号3を含む、配列番号3のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号3とは異なるアミノ酸配列を有する；または
 (b) CDR1は、配列番号4を含む、配列番号4のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号4とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR2は、配列番号5を含む、配列番号5のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号5とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR3は、配列番号6を含む、配列番号6のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号6とは異なるアミノ酸配列を有する；または
 (c) CDR1は、配列番号7を含む、配列番号7のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号7とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR2は、配列番号8を含む、配列番号8のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号8とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ
 CDR3は、配列番号9を含む、配列番号9のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号9とは異なるアミノ酸配列を有する。

20

30

【0057】

好ましくは、そのようなアミノ酸修飾は、得られるsdAbの抗原結合能にも、またはLILRB2とヒト白血球抗原-G(HLA-G)との間の相互作用を阻害する能力のようなその特性にも重大な影響を及ぼさない。好ましくは、そのようなアミノ酸修飾はサイレント置換のような置換である。

40

【0058】

一層さらに好ましくは、抗LILRB2 sdAbは3つのCDRを含み、その際、CDR1は配列番号1を含む、または配列番号1のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾、好ましくは1、2、もしくは3のサイレント変異、一層さらに好ましくは1、2、もしくは3のサイレント置換に起因して配列番号1とは異なるアミノ酸配列を有し、且つCDR2は配列番号2を含む、または配列番号2のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾、好ましくは1、2、もしくは3のサイレント変異、一層さらに好ましくは1、2、もしくは3のサイレント置換に起因して配列番号2とは異なるアミノ酸配列を有し、且つCDR3は配列番号3を含む、または配列番号3のものである、

50

または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾、好ましくは1、2、もしくは3のサイレント変異、一層さらに好ましくは1、2、もしくは3のサイレント置換に起因して配列番号3とは異なるアミノ酸配列を有する。

【0059】

いくつかの実施形態では、抗LILRB2 sdAbは配列番号34～配列番号44の配列のいずれかで定義される配列、またはそれに対して少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくともそれに対して90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む、または本質的にそれから成る。

【0060】

好ましくは、抗LILRB2 sdAbは配列番号34、配列番号35及び配列番号36から成る群で選択される配列、またはそれに対して少なくとも80%の配列同一性を有する配列、好ましくは少なくとも90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む、またはその配列で構成される。

【0061】

一実施形態では、抗LILRB2 sdAbは、配列番号34で定義される配列、またはそれに対して少なくとも80%の配列同一性、好ましくは少なくとも90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む、またはその配列で構成される。好ましくは、配列番号34に対して少なくとも80%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む、またはその配列で構成される抗LILRB2 sdAbは、好ましくは配列番号34で定義される配列を含む、またはその配列で構成される抗LILRB2 sdAbと同様の親和性でLILRB2に依然として結合することができ、LILRB2とヒト白血球抗原-G(HLA-G)との間の相互作用を阻害する能力のような同じ特性を保全する。

【0062】

いくつかの特定の実施形態では、本発明のsdAbは約11kDa～約18kDa、例えば、14～16kDa、または14.5～15.5kDa、例えば、約15kDaのような11kDa～17kDaの分子量を有する。

【0063】

ある特定の態様では、sdAbは少なくとも約 10^{-6} Mまたは 10^{-7} M、好ましくは少なくとも 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} Mまたは 10^{-11} Mの親和性でLILRB2と結合する。特に、見かけの K_d は0.1nM～10 μ Mの間、特に1 μ M～1nMの間で構成される。結合親和性は、当業者に利用可能な任意の方法によって、特に表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定することができる。

【0064】

好ましい実施形態では、抗LILRB2 sdAbはLILRB2以外のLILRBファミリーの他のメンバーを認識しない。好ましくは、抗LILRB2 sdAbはLILRB1を認識しない。あるいは、抗LILRB2 sdAbはLILRB1を弱く認識する。好ましくは、抗LILRB2 sdAbは特に10倍、100倍または1000倍、LILRB2よりも少なくLILRB1を認識する。

【0065】

特定の実施形態では、抗LILRB2 sdAbはLILRB2とヒト白血球抗原-G(HLA-G)との間の相互作用を競合して阻害する、またはヒト白血球抗原-G(HLA-G)のLILRB2への結合を競合して阻害する。

【0066】

「競合して阻害する」という用語は、本発明に係るsdAbがLILRB2へのタンパク質、抗体またはリガンドの結合、または任意のタンパク質、抗体またはリガンドとLILRB2との間の相互作用、特に試験管内、生体外または生体内での相互作用を低減する

10

20

30

40

50

、または阻害する、または置き換えることができることを示す。競合アッセイは、例えば、競合 E L I S A または他の結合アッセイのような標準的な技法を使用して実施することができる。s d A b が L I L R B 2 へのタンパク質、抗体、またはリガンドの結合の少なくとも 30%、40%、50%、60%、70%、または 80% を阻害するまたは置き換える場合、それは競合性であると見なされる。好ましい競合する s d A b s は、L I L R B 2 上のタンパク質、抗体、またはリガンドによって認識されるまたは結合されるエピトープと共通のアミノ酸残基を共有するエピトープと結合する。

【0067】

本明細書で使用されるとき、「H L A - G」という用語は少なくとも 7 つのアイソフォームを含むヒト白血球抗原 G を示し、その際、4 つは膜結合型 (H L A - G 1、H L A - G 2、H L A - G 3 及び H L A - G 4) であり、3 つは可溶性 (H L A - G 5、H L A - G 6 及び H L A - G 7) である。H L A - G ヒトアイソフォームは、例えば、Uniprot 受入番号、H L A - G 1 については P 1 7 6 9 3 - 1、H L A - G 2 については P 1 7 6 9 3 - 2、H L A - G 3 については P 1 7 6 9 3 - 3、H L A - G 4 については P 1 7 6 9 3 - 4、H L A - G 5 については P 1 7 6 9 3 - 5、H L A - G 6 については P 1 7 6 9 3 - 6、H L A - G 7 については P 1 7 6 9 3 - 7 のもとで説明される。

10

【0068】

特定の実施形態では、抗 L I L R B 2 s d A b は L I L R B 2 と H L A - G 6 との間の相互作用を競合して阻害する、または H L A - G 6 の L I L R B 2 への結合を競合して阻害する。

20

【0069】

別の実施形態では、本発明に係る s d A b は L I L R B 2 へのアンジオポエチン様 2 (A N G P T L 2) の結合を競合して阻害する、または L I L R B 2 と A N G P T L 2 との間の相互作用を競合して阻害する。本明細書で使用されるとき、「A N G P T L 2」はその血管新生促進及び抗アポトーシス能力について当該技術分野で知られている血管内皮増殖因子ファミリーのメンバーである。この用語は、好ましくはヒト A N G P T L 2 を指す。ヒト A N G P T L 2 は、例えば、Uniprot 受入番号 O 1 5 1 2 3 のもとで説明される。

【0070】

本発明はまた、少なくとも 1 つの分子にコンジュゲートされた、上記で定義されたような 1 以上の抗 L I L R B 2 s d A b を含むキメラ薬剤 (本明細書では相互交換可能に「コンジュゲート」とも呼ばれる) にも関する。s d A b にコンジュゲートされた分子は、例えば、薬物、画像化分子、診断剤、トレーサー、タグまたは染料のような、医学において有用な任意の活性化化合物であってもよい。キメラ薬剤はまた、前記活性化化合物に加えて、またはその代わりに、s d A b またはコンジュゲートの血漿半減期を増やす安定化基 (例えば、Fc または IgG) も含有してもよい。そのようなキメラ薬剤は、s d A b と分子との間のカップリングを使用して、当該技術分野で知られている任意の方法によって、好ましくは化学的、生化学的または酵素的な経路によって、または遺伝子工学によって調製することができる。

30

【0071】

特定の実施形態では、本発明の抗 L I L R B 2 s d A b は、標識手段、例えば、西洋ワサビペルオキシダーゼまたはアルカリホスファターゼのような酵素、GFP のような蛍光タンパク質、フルオレセイン、ローダミンのような蛍光標識、標識、化学発光標識、またはルミナル、発色団のような生物発光標識、例えば、生体内、生体外または試験管内の画像化または診断好適な放射性同位体から選択される分子またはタンパク質に融合されてもよいし、またはコンジュゲートされてもよい。

40

【0072】

別の特定の実施形態では、本発明に係る s d A b は C A R 構築物に含まれる。本明細書で使用されるとき「キメラ抗原受容体」(C A R)、「操作された細胞受容体」、または「キメラ免疫受容体」(I C R) という用語は、抗原結合特異性を免疫細胞に移植するの

50

で、抗原結合ドメインの抗原結合特性を免疫細胞の免疫原性活性、例えば、T細胞の溶解能や自己再生と組み合わせる操作された受容体を指す。特に、CARは、任意でシグナルペプチド、抗原と結合することができる細胞外ドメイン、膜貫通ドメイン、任意でヒンジドメイン及び少なくとも1つの細胞内ドメインを含む融合タンパク質を指す。好ましい実施形態では、CARは細胞外ドメインまたは抗原結合ドメイン、膜貫通ドメイン、任意でヒンジドメイン、及び少なくとも1つの細胞内ドメインとして本明細書で開示されているような抗LILRB2 sdAbを含む。

【0073】

核酸、ベクター、及び宿主細胞

本発明のさらなる態様は、上記で定義されたようなsdAbをコードする単離された核酸構築物またはポリペプチド構築物に関する。核酸は一本鎖または二本鎖、またはその2つの混合物であってもよい。核酸は、DNA(cDNAまたはgDNA)、RNA、またはそれらの混合物であることができる。それは、例えば、修飾された結合、修飾されたプリン塩基またはピリミジン塩基、または修飾された糖を含む修飾されたヌクレオチドを含むことができる。それは、化学合成、組換え、及び/または突然変異誘発を含む、当業者に知られている任意の方法によって調製することができる。

【0074】

本発明に係る核酸は、本発明に係るsdAb分子のアミノ酸配列から推定されてもよく、コドン使用頻度は、核酸が転写される宿主細胞に従って適合させてもよい。これらの工程は、当業者に周知の方法に従って実施されてもよく、そのいくつかは、参照マニュアル Sambrook et al. (Sambrook J. Russell D (2001), Molecular cloning: a laboratory manual, Third Edition, Cold Spring Harbor) に記載されている。そのような核酸配列の具体例には、配列番号61~75のいずれかを含む配列、及びそれに相補性の配列が挙げられる。

【0075】

本発明はまた、任意で調節配列(例えば、プロモーター、ターミネーターなど)の制御下にある、そのような単離された核酸を含有するベクターにも関する。ベクターは、例えば、プラスミド、ウイルス、コスミド、ファージミド、または人工染色体であってもよい。

【0076】

本発明はさらに、宿主細胞を形質転換する、それに形質移入するまたは形質導入するための本発明に係る核酸またはベクターの使用に関する。

【0077】

したがって、本発明はまた、本発明の1またはいくつかの核酸及び/または本発明の1またはいくつかのベクター及び/または本発明のsdAbをコードする1またはいくつかのポリペプチドを含む宿主細胞も提供する。

【0078】

宿主細胞は、例えば、E. coliのような原核生物宿主細胞、または例えば、CHO細胞、BHK細胞、ヒト細胞株(HeLa、COS及びPERC6を含む)、Sf9細胞及びSf+細胞を含む(培養された)哺乳動物、植物、昆虫、真菌または酵母の宿主細胞を含む、本発明のsdAbを発現させるまたは産生することができる任意の宿主細胞であってもよい。適切な宿主細胞は酵母及び糸状菌のような真核微生物の細胞を包含する。好ましい酵母宿主細胞には、Saccharomyces cerevisiae、Pichia pastoris、Hansenula polymorpha、及びKluyveromyces lactisが含まれる。「宿主細胞」という用語はまた、複製中に起こる突然変異のために親宿主細胞と同一ではない親宿主細胞の任意の子孫も包含する。好ましくは、細胞はヒト胚性幹細胞ではない。

【0079】

本発明のさらなる目的は、本発明に係るsdAbを作製するための方法であり、この方法は、

10

20

30

40

50

- a) 以前に定義されたように宿主細胞を培養する工程、及び
 b) 細胞培養から、上記で定義されたような s d A b をコードする前記核酸、ベクターまたはポリペプチドを回収する工程を含む。

【0080】

工程 a) は、宿主細胞による所望の核酸、ベクターまたはポリペプチドの発現を可能にする条件下で行われることは言うまでもない。好適な発現条件には、好適な培地の使用、好適な食物源及び/または好適な栄養素の存在、好適な温度、及び任意で好適な誘導因子または誘導化合物の存在（例えば、本発明のヌクレオチド配列が誘導性プロモーターの制御下にある場合）が挙げられてもよく；これらのすべては当業者によって選択されてもよい。

10

【0081】

そのような条件下で、本発明の s d A b は構成的様式で、一時的様式で、または好適に誘導された場合にのみ発現されてもよい。

【0082】

次に、本発明の s d A b は、例えば、クロマトグラフィー及び/または電気泳動技術、差次的沈殿技術、親和性技術などのようなそれ自体が知られているタンパク質単離及び/または精製の技術を使用して、宿主細胞から及び/または前記宿主細胞が培養された培養培地から単離されてもよい。s d A b は、精製目的でヒスチジンタグまたはストレプトアビジンタグのようなタグも含んでもよい。

【0083】

本発明はまた、本明細書で定義されるような L I L R B 2 に対する s d A b を得るための方法も提供する。本発明に係る s d A b を得る及び/または選択するための方法は、細胞ディスプレイ、ファージディスプレイ、リボソームディスプレイ、mRNAディスプレイ、DNAディスプレイまたはプラスミドディスプレイのような、しかし、これらに限定されないタンパク質選択技術に基づいてもよい。これらの技術は当該技術分野で十分に説明されている。例えば、バクテリオファージに表示される V H H のライブラリーを生成するために、当業者はその開示が参照によってその中に組み込まれる、Muyderman *et al.*, *Molecular Biotechnology*, 2001, 74, 277-302、特に組換え V H H と題されたセクションを参照することができる。バクテリオファージに表示される V - N A R のライブラリーを生成するために、当業者は D o o l e y *et al.* *Mol. Immunol.*, 2003, 40: 25-30 を参照してもよい。ある特定の実施形態では、本発明の方法は、機能的 s d A b、特に L I L R B 2 を認識することができる s d A b、または L I L R B 2 と H L A - G との間の相互作用を競合して阻害することができる、及び/または L I L R B 2 と A N G P T L 2 との間の相互作用を競合して阻害することができる s d A b を選択することを可能にする 1 またはいくつかの工程を包含してもよい。

20

30

【0084】

特定の実施形態では、本発明に係る s d A b を含む C A R は細胞によって発現される。細胞は原核細胞または真核細胞であってもよい。好ましくは、細胞は哺乳動物細胞のような真核細胞である。好ましくは、本発明に係る s d A b を含む C A R を発現する細胞は免疫細胞である。細胞は、マクロファージ、T細胞、B細胞、NK細胞、NK T、単球及び樹状細胞から成る群から選択することができる。好ましくは、細胞はヒト胚性幹細胞ではない。

40

【0085】

医薬組成物

本発明はまた、上記で定義された少なくとも1つの s d A b、C A R または細胞と、任意で1以上の薬学的に許容される賦形剤とを含むことを特徴とする医薬組成物にも関する。

【0086】

本発明の医薬組成物は Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Lippincott Williams & Wi

50

lkins; Twenty first Edition, 2005)に記載されているもののような標準的な方法に従って製剤化されてもよい。使用されてもよい薬学的に許容される賦形剤は特に、Handbook of Pharmaceuticals Excipients, American Pharmaceutical Association (Pharmaceutical Press; 6th revised edition, 2009)に記載されている。

【0087】

一態様では、本発明の組成物は薬学的に許容される担体または賦形剤を有利に含む。薬学的に許容される担体は、例えば、(a)充填剤または希釈剤、例えば、デンプン、ラクトース、スクロース、グルコース、マンニトール、微結晶性セルロース及びケイ酸；(b)結合剤、例えば、カルボキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリビニルピロリドン、スクロース；(c)保湿剤、例えば、グリセロール；(d)崩壊剤、例えば、寒天、炭酸カルシウム、ジャガイモまたはタピオカデンプン、アルギン酸、ある特定の複合ケイ酸塩、クロスカルメロースナトリウム及び炭酸ナトリウム；(e)溶液遅延剤、例えば、パラフィン；(f)吸収促進剤、例えば、第四級アンモニウム化合物；(g)湿潤剤、例えば、モノステアリン酸グリセロール；(h)吸着剤、例えば、カオリンやベントナイト；(i)潤滑剤、例えば、タルク、ステアリン酸カルシウム、ステアリン酸マグネシウム、固体ポリエチレングリコール、ラウリル硫酸ナトリウム；(j)抗酸化剤；(k)緩衝剤、例えば、クエン酸ナトリウムまたはリン酸ナトリウム；(l)保存剤；(m)香味剤や芳香剤などのような、各投与様式に従って従来使用されている担体から選択することができる。

【0088】

本発明の医薬組成物は、本発明のsdAb、CAR、細胞またはポリペプチドを、上記に記載されているような少なくとも1つの通常の賦形剤（または担体）と適切な純度で混合することによって得てもよい。特に、本発明のsdAb、CAR、細胞またはポリペプチドは組成物の有効成分である。

【0089】

有効成分と組み合わせる賦形剤（複数可）は、(i)前記有効成分の安定性を含む物理化学的特性、(ii)前記有効成分に望まれる薬物動態プロファイル、(iii)ガレナス製剤形態及び(iv)投与経路によって異なってもよいことは言うまでもない。

【0090】

医薬組成物は通常、有効量の本発明のsdAb、CAR、または細胞を含む。本明細書に記載されているような「治療有効用量」は、所与の条件及び投与スケジュールについて治療効果を与える用量を指す。活性物質の「治療有効量」は、必ずしも疾患または障害を治癒させるわけではないが、その見かけが先延ばしされる、妨げられるもしくは抑えられる、またはその症状が軽減される、またはその期間が修正されるもしくはそれほど深刻ではない、または患者の回復が加速されるように、この疾患または障害の治療を提供する。

【0091】

本発明の医薬組成物は、例えば、錠剤、カプセルの形態にて経腸経路（すなわち経口）によって、例えば、注射可能な溶液または懸濁液の形態にて非経口、筋肉内、経皮、静脈内の経路によって、及び例えば、ゲル、軟膏、ゲル、ローション、貼付剤、坐剤などの形態にて局所経路によって含む、任意の従来経路による投与に好適であるように製剤化されてもよい。

【0092】

いくつかの特定の実施形態では、医薬組成物は、対象に投与される直前に適切なピヒクルに溶解されてもよい凍結乾燥物または凍結乾燥粉末であってもよい。

【0093】

本発明はまた、上記で定義されたようなsdAbまたはsdAb-診断用または医療用の造影剤コンジュゲート化合物を含むことを特徴とする診断用組成物にも関する。

【0094】

本発明に係る使用

10

20

30

40

50

本発明に係る s d A b s、C A R、細胞、組成物及び構築物（すなわち、単離された核酸、ポリペプチド及び/またはベクター）は生物学的研究、生化学産業または医学を含む種々の分野で使用されてもよい。

【0095】

特に、本発明の s d A b、C A R、細胞、組成物及び構築物は、特に対象にて腫瘍のサイズを縮小する、または腫瘍の成長もしくは再成長を防止する、または免疫抑制微小環境の誘導を防止するために、がんを有するまたは有することが疑われるこれらの対象に適用される。

【0096】

一実施形態では、治療する対象は非ヒト動物、特に、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ブタ、ヒツジ、及び非ヒト霊長類のような哺乳動物である。あるいは、治療する対象は、小児、青年、または成人を含む、ヒト、特に任意の年齢のヒトであってもよい。

10

【0097】

特に、対象は L I L R B 2 の発現、特に L I L R B 2 の過剰発現を伴う疾患に冒されている。一実施形態では、対象は、がん、炎症性障害、例えば、細菌、ウイルスまたは真菌によって引き起こされるような感染症、または自己免疫疾患に罹患している。

【0098】

好ましくは、対象はがん罹患しており、一層さらに好ましくは、L I L R B 2 陽性のがんに罹患している。例えば、がんのような疾患の治療に好適な対象は、そのような対象が L I L R B 2 陽性細胞、特に L I L R B 2 陽性がん細胞、好ましくは L I L R B 2 を過剰発現するそのような細胞を保有するかどうかを調べることによって特定することができる。疾患及びがんの例は以下にさらに具体的に記載されている。

20

【0099】

本発明のさらなる目的は、L I L R B 2 受容体が関与する障害または疾患、好ましくはがんなどの治療に使用するための、及び/または薬物またはワクチンとして使用するための本発明に係る s d A b、C A R、細胞、ポリペプチド構築物または医薬組成物である。したがって、本明細書では、それを必要とする対象にて腫瘍の成長または転移の広がりを抑制する方法、及び/またはそれを必要とする患者にてがんを治療する方法が記載されている。腫瘍は、固形腫瘍または液性腫瘍、好ましくは固形腫瘍であってもよい。いくつかの実施形態では、腫瘍またはがんは L I L R B 2 を発現する、または過剰発現する。

30

【0100】

ある特定の実施形態では、これらの方法は、対象または患者に、治療有効量の本発明の s d A b、C A R、細胞、組成物、及び構築物を投与することを含む、または代わりに本質的にそれから成る、またはその上さらにそれから成る。さらなる態様では、対象は好ましくは腫瘍が L I L R B 2 を発現するかどうか、または過剰発現するかどうかを評価するために、診断によって治療について以前に選択されている。

【0101】

ヒト L I L R B 2 は、特にがんのような疾患または障害の治療に関連する標的であるので、抗 L I L R B 2 s d A b s は薬物、薬剤、またはワクチンとして使用されてもよい。本発明に係る s d A b、C A R、細胞またはポリペプチド構築物は、薬物もしくはワクチンとして、または対象における疾患、障害、もしくは状態の治療での薬物もしくはワクチンの製造のために使用することができる。いくつかの実施形態では、そのような薬物またはワクチンはがんを治療するために使用することができる。

40

【0102】

一実施形態では、本発明の s d A b、C A R、細胞、組成物及び構築物は、H L A G 及び/または A N G P T L 2 の L I L R B 2 への結合の阻害によって予防され、または治療されてもよい病状、疾患及び/または障害の治療に使用するためのものである。したがって、本発明は、L I L R B 2 への H L A G 及び/または A N G P T L 2 の結合の阻害によって予防され、または治療されてもよい病状、疾患及び/または障害の治療方法に関する。

【0103】

50

本発明はまた、L I L R B 2 受容体が関与する障害または疾患に罹患している対象を治療する方法にも関するものであり、その際、前記方法は治療有効量の本発明に係る s d A b、C A R、細胞、構築物または医薬組成物を前記対象に投与することを含む。

【0104】

特定の実施形態では、疾患または障害は、がん、好ましくは固形腫瘍であり、一層さらに好ましくは、肺癌、非小細胞肺癌（NSCLC）、膵臓癌、膵管癌、慢性リンパ球性白血病（CLL）、急性骨髄性白血病（AML）、子宮内膜癌、肝細胞癌、黒色腫、卵巣癌、乳癌、大腸癌、神経膠腫、胃癌、腎癌、精巣癌、食道癌、子宮頸癌、マウスのルイス肺癌、白血病、甲状腺癌、肝臓癌、尿路癌、及び頭頸部癌から成る群から選択される。

【0105】

したがって、本発明はまた、それを必要とする対象にて腫瘍の成長を抑制する方法、及び/または転移の成長及び/または広がりを抑制する方法にも関する。腫瘍は固形腫瘍であってもよく、または液性腫瘍であってもよい。いくつかの実施形態では、腫瘍またはがんはL I L R B 2 を発現する、または過剰発現する。

【0106】

本明細書に記載されている s d A b、C A R、細胞または医薬組成物は、例えば、小分子、放射線療法、化学療法、外科手術、特に抗癌剤を含む他の治療薬と同時にまたは順次投与されてもよい。「抗癌剤」は、例えば、がん細胞を殺傷し、がん細胞にてアポトーシスを誘導し、がん細胞の増殖速度を低下させ、転移の発生率または数を減らし、腫瘍サイズを減少させ、腫瘍増殖を抑制し、腫瘍もしくはがん細胞への血液供給の減らし、がん細胞もしくは腫瘍に対する免疫応答を促進し、がんの進行を阻止もしくは阻害し、または癌を伴う対象の寿命の増やすことによって対象にてがんが悪影響を与えることができる。さらに一般的には、これらの他の組成物は、細胞を殺傷する、または細胞の増殖を抑制するのに有効な組み合わせた量で提供することができる。

【0107】

医学の当業者に知られている従来の方法を使用して、治療される疾患の種類または疾患の部位に応じて本明細書で開示されている s d A b、組成物、構築物、またはC A R を対象に投与することができる。この組成物は、従来の経路を介して投与ことができ、例えば、非経口で（例えば、静脈内、皮下、皮内、または筋肉内の経路によって）、または経口、鼻または肺の経路によって投与することができる。

【0108】

診断及び予後における使用

シングルドメイン抗体はL I L R B 2 の精製のためのリガンドとして使用されてもよい。それらはまた、L I L R B 2 受容体の結晶化を促進するために結晶化シャペロンとして使用することもできる。

【0109】

本発明の s d A b 及びポリペプチドはまた、細胞免疫染色において、生体内または試験管内の画像化において、及び診断目的のためにも使用されてもよい。本発明はまた、L I L R B 2 を発現している細胞、好ましくはがん細胞のようなL I L R B 2 を過剰発現している細胞を診断する、画像化する、または治療するのに使用するための上記に記載されているような s d A b、コンジュゲート、または組成物にも関する。

【0110】

それらはまた、試験管内アッセイにおける生物学的試薬として、例えば、L I L R B 2 受容体を標的とする可能性がある薬物の同定、スクリーニングまたは特徴付けのための試験化合物または競合結合剤としても使用されてもよい。

【0111】

本明細書で開示されている抗L I L R B 2 s d A b は診断上使用されて、試験管内または生体外と同様に生体内での臨床試験手順の一部として組織または細胞における発現L I L R B 2 のレベルをモニターすることができ、例えば、所与の治療計画の有効性を判定することができる。

10

20

30

40

50

【0112】

本開示の検出方法を使用して、試験管内または生体外と同様に生体内で、例えば、臓器または組織の生検後、生体試料にて発現LILRB2のレベルを検出して細胞ががん性であるかどうかを調べることができる。本発明のsdAbによるLILRB2の検出のための試験管内または生体外の技法には、酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)、RIA、EIA及び他の「サンドイッチアッセイ」、ウエスタンブロット、フローサイトメトリー、免疫沈降、放射性免疫アッセイ、及び免疫蛍光法(例えば、IHC)が挙げられる。さらに、LILRB2ポリペプチドを検出するための生体内技法は、対象に標識した抗LILRB2 sdAbを導入することを含む。本発明のsdAbによるLILRB2の検出のための生体内技法では、sdAbは、対象におけるその存在及び位置が標準的な画像化技術によって検出され得る放射性マーカーで標識することができる。

10

【0113】

本発明はまた、対象がLILRB2の発現または活性の上昇に関連する医学的な疾患または状態を発症するリスクがあるかどうかを判定するための診断アッセイ、予後アッセイまたは予測アッセイ(例えば、LILRB2を過剰発現する前がん性またはがん性の細胞の検出)も提供する。そのようなアッセイは、予後または予測の目的で使用し、それによって、LILRB2の発現または過剰発現を特徴とするまたはそれに関連する医学的な疾患または状態の発症前に個人を予防的に治療することができる。

【0114】

本発明はまた、診断的な予後アッセイ法または予測アッセイ法も提供し、その際、本発明に係るsdAbは、抗LILRB2 sdAbによる治療に適格な対象を選択するために使用され、例えば、LILRB2は患者の選択のための生体マーカーであり、LILRB2は腫瘍細胞のような細胞にて過剰発現される。

20

【0115】

キット

本明細書に記載されているsdAb、組成物、CAR、細胞、ベクター、ポリペプチドまたは核酸構築物のいずれかが本発明によって提供されるキットに含まれてもよい。

【0116】

ある特定の実施形態では、キットは、例えば、好適な容器手段、細胞、緩衝液、細胞培地、ベクター、プライマー、制限酵素、塩などを含む。キットはまた、無菌の、薬学的に許容される緩衝液及び/または他の希釈剤を含有するための手段も含んでもよい。

30

【0117】

いくつかの実施形態では、個体から試料を採取する手段及び/または試料をアッセイする手段はキットにて提供されてもよい。

【0118】

いくつかの実施形態では、キットはさらに、がんまたは感染症を治療するための追加の薬剤を含み、追加の薬剤は本発明のキットのsdAb、組成物、CAR、細胞、ベクター、ポリペプチドもしくは核酸構築物、もしくは他の構成要素と併用されてもよく、またはキットにて別個に提供されてもよい。

【0119】

本発明のいくつかの場合では、キットはまた、例えば、化学療法及び/または他の免疫療法のような第2のがん療法も含む。キット(複数可)はLILRB2を発現または過剰発現しているがんのような特定のがんに合うように調整されてもよい。

40

【0120】

容器は、単位用量、バルクパッケージ(例えば、複数用量パッケージ)またはサブ単位用量であってもよい。一実施形態では、本発明は単回用量の投与単位について上記で定義されたようなキットに関する。本発明のキットはまた、乾燥した/凍結乾燥した二官能性分子を含む第1の受容器と、水性製剤を含む第2の受容器とを含有してもよい。本発明のある特定の実施形態では、単一区画の及び複数区画の予め充填された注射器(例えば、液体注射器及びリオシリンジ)を含有するキットが提供される。本発明のキットは好適なパ

50

パッケージに入っている。好適なパッケージングには、バイアル、ボトル、瓶、可撓性パッケージング（例えば、密封マイラーまたはプラスチック袋）などが挙げられるが、これらに限定されない。

【0121】

本明細書に記載されている s d A b、組成物、C A R、細胞、ベクター、ポリペプチドまたは核酸構築物の使用に関連する説明書には一般に、投与量、投薬スケジュール、意図された治療のための投与経路、またはそのような成分を再構成するもしくは希釈するための手段に関する情報が含まれる。本発明のキットで供給される説明書は通常、ラベルまたは添付文書（例えば、チラシまたは取扱説明書の形でキットに含まれる紙シート）に書かれた説明書である。いくつかの実施形態では、キットは本明細書に記載されている方法のいずれかに従って使用するための説明書を含むことができる。含まれる説明書は、特にがんのような本明細書に記載されている疾患の治療の文脈では、本明細書に記載されている s d A b、組成物、C A R、細胞、ベクター、ポリペプチドまたは核酸構築物の投与の説明を含むことができる。キットはさらに、その個体が L I L R 2 に関連する疾患、例えば、本明細書に記載されているものを有するかどうかを特定することに基づいて治療に好適な個体を選択する説明を含んでもよい。

10

【0122】

本発明の他の態様及び利点は、以下の実施例を検討することで明らかになるであろうが、これらの実施例は本質的に例示に過ぎず、本出願の範囲を限定するものではない。

本開示は、例えば、以下に関する。

20

[項1]

白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー2 (L I L R B 2)、好ましくはヒトL I L R B 2に特異的に結合するシングルドメイン抗体 (s d A b)。

[項2]

前記 s d A b が、白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーBメンバー1 (L I L R B 1)、好ましくはヒトL I L R B 1と結合しない、項1に記載の s d A b。

[項3]

前記 s d A b が、配列番号3、6、9、12、15、18、21、24、27、30もしくは33に示される配列を含む、もしくはその配列で構成される、または1、2、または3のアミノ酸修飾に起因して配列番号3、6、9、12、15、18、21、24、27、30もしくは33とは異なるアミノ酸配列を含む、もしくはその配列で構成される少なくとも1つの相補性決定領域 (C D R) を含む、項1または2に記載の s d A b。

30

[項4]

前記 s d A b が3つのC D Rを含み、その際、

(a) C D R 1は、配列番号1を含む、配列番号1のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号1とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 2は、配列番号2を含む、配列番号2のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号2とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 3は、配列番号3を含む、配列番号3のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号3とは異なるアミノ酸配列を有する；または

40

(b) C D R 1は、配列番号4を含む、配列番号4のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号4とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 2は、配列番号5を含む、配列番号5のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号5とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 3は、配列番号6を含む、配列番号6のものである、または1、2、3、もしくは4のアミノ酸修飾に起因して配列番号6とは異なるアミノ酸配列を有する；または

(c) C D R 1は、配列番号7を含む、配列番号7のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号7とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

C D R 2は、配列番号8を含む、配列番号8のものである、または1、2、もしくは3のアミノ酸修飾に起因して配列番号8とは異なるアミノ酸配列を有する、且つ

50

3のいずれかに記載の s d A b。

[項 5]

前記 s d A b が 3 つの C D R を含み、C D R 1 が配列番号 1 を含む、またはそれから成り、C D R 2 が配列番号 2 を含む、またはそれから成り、C D R 3 が配列番号 3 を含む、またはそれから成る、項 1 ~ 3 のいずれかに記載の s d A b。

[項 6]

配列番号 3 4 ~ 配列番号 4 4 の配列のいずれかで定義される配列、またはそれに対して少なくとも 8 0 % の配列同一性、好ましくは少なくとも 9 0 %、9 2 %、9 4 %、9 5 %、9 6 %、9 7 %、9 8 %、9 9 % 以上のアミノ酸配列同一性を有する配列を含む、またはその配列で構成される、項 1 ~ 5 のいずれかに記載の s d A b。

10

[項 7]

配列番号 3 4 で定義される配列を含む、またはその配列で構成される、項 1 ~ 5 のいずれかに記載の s d A b。

[項 8]

前記 s d A b が、L I L R B 2 とヒト白血球抗原 - G (H L A - G) との間の相互作用を阻害する、項 1 ~ 7 のいずれかに記載の s d A b。

[項 9]

前記 s d A b が、L I L R B 2 とアンジオポエチン様 2 (A N G P T L 2) との間の相互作用を阻害する、項 1 ~ 8 のいずれかに記載の s d A b。

[項 1 0]

項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の s d A b をコードする配列を含む単離された核酸であって、好ましくは配列番号 4 5 ~ 5 5 から成る群で選択される配列によって定義される、前記単離された核酸。

20

[項 1 1]

項 1 0 に記載の単離された核酸を含むベクター。

[項 1 2]

項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の s d A b または項 8 に記載の単離された核酸を含むキメラ抗原受容体 (C A R)。

[項 1 3]

項 1 0 に記載の単離された核酸、または項 1 1 に記載のベクターを含む、または項 1 2 に記載の C A R を発現する細胞。

30

[項 1 4]

前記細胞が T 細胞、C D 4 ⁺ T 細胞、C D 8 ⁺ T 細胞、B 細胞、N K 細胞、N K T 細胞、単球及び樹状細胞から成る群から選択され、好ましくは前記細胞が T 細胞、B 細胞または N K 細胞である、項 1 3 に記載の C A R を発現する細胞。

[項 1 5]

項 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の s d A b、項 1 0 に記載の単離された核酸、項 1 1 に記載のベクター、または項 1 2 に記載の C A R、または項 1 3 もしくは 1 4 に記載の C A R を発現する細胞と、任意で薬学的に許容される担体とを含む医薬組成物。

[項 1 6]

がんの治療に使用するための、好ましくは、前記がんが L I L R B 2 を過剰発現し、さらに好ましくはがんが肺癌、非小細胞肺癌 (N S C L C)、膵臓癌、膵管癌、慢性リンパ球性白血病 (C L L)、急性骨髄性白血病 (A M L)、子宮内膜癌、肝細胞癌、黒色腫、卵巣癌、乳癌、大腸癌、神経膠腫、胃癌、腎癌、精巣癌、食道癌、子宮頸癌、マウスのルイス肺癌、白血病、甲状腺癌、肝臓癌、尿路癌及び頭頸部癌から成る群から選択される、項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の s d A b、項 1 0 に記載の単離された核酸、項 1 1 に記載のベクター、項 1 2 に記載の C A R、項 1 3 ~ 1 4 のいずれか 1 項に記載の細胞、または項 1 5 に記載の医薬組成物。

40

[項 1 7]

試験管内または生体外で腫瘍細胞または腫瘍組織上の L I L R B 2 を検出するための、

50

項 1 ~ 9 のいずれか 1 項に記載の s d A b の使用。

【実施例】

【0123】

L I L R B 2 - F c に特異的な V H H の同定。

先ず、完全フロイントアジュバント中の L I L R B 2 - F c タンパク質でアルパカを免疫し、その後、不完全フロイントアジュバント中の L I L R B 2 - F c タンパク質で 2 回追加免疫した。従来の抗体サブクラス（すなわち I g G 1）、及び V H H をアルパカ血清から分画した。血清を連続希釈し、E L I S A によって L I L R B 2 - F c タンパク質について調べた。次に、アルパカから B リンパ球を精製し、 $3, 5 \cdot 10^7$ クローンを含有するライブラリーを得た。L I L R B 2 - F c に対するディスプレイを使用したバイオス

10

【0124】

B 8、C 7、及び C 9 の N b は r h L I L R B 2 の線状エピトープを認識する。

本発明者らは先ず、生成された N b が L I L R B 1 受容体に対する交差反応性を示さずに L I L R B 2 受容体に特異的であるかどうかを検討した。そのために、還元条件でウエスタンブロッティングを行った。精製された二量体 r h L I L R B 2 - F c、単量体 r h L I L R B 2 及び単量体 r h L I L R B 1 のタンパク質を使用してさまざまな N b の抗原

特異性を比較した。N b の特異性を、対照抗体 H - 3 0 0 (L I L R B 1、- 2、- 4、- 5、- 6 に特異的)、4 2 D 1 (L I L R B 2 に特異的)、G H I / 7 5 (L I L R B 1 に特異的)、及び H P - F 1 (L I L R B 1 に特異的) に対して評価した。H - 3 0 0 ポリクローナル抗体 (L I L R B 1、- 2、- 4、- 5、及び - 6 タンパク質に特異的) で標識した膜は、r h L I L R B 2 - F c 及び r h L I L R B 2 のサイズにそれぞれ対応する約 1 0 5 k D a 及び 7 7 k D a のバンドを示した (図 2)。4 2 D 1 モノクローナル抗体 (L I L R B 2 - F c 受容体に特異的) と共にインキュベートした膜は、r h L I L R B 2 - F c のサイズに対応する 1 0 5 k D a に固有のバンドを示し、7 7 k D a にはバンドがないということは、4 2 D 1 m A b が r h L I L R B 2 を認識しなかったことを示している。G H I / 7 5 及び H P - F 1 のモノクローナル抗体と共にインキュベートした膜は r h L I L R B 1 のサイズに対応する 8 4 k D a のバンドを示した。1 5 の N b のうち、B 8、C 7 及び C 9 のみが r h L I L R B 2 - F c の分子量に対応する約 1 0 5 k D a のバンドを示し (図 3)、r h L I L R B 2 の D 1 及び D 2 ドメインの分子量に対応する約 7 7 k D a のバンドも示した。さらに、B 8 及び C 7 の N b とのインキュベートは 8 4 k D a 付近のバンド示さなかった。これは B 8 及び C 7 の N b が r h L I L R B 1 に結合しないことを意味する。それでも、C 9 N b は 8 4 k D a 付近に弱いバンドを示し、C 9 の特異性が r h L I L R B 2 受容体に完全には限定されていないことを示唆している。まとめると、これらのデータは、N b が N b を誘導するのに使用された免疫原である変性二量体 L I L R B 2 - F c (D 1 - D 2 - F c) タンパク質、と同様に変性単量体 L I L R B 2 (D 1 - D 2 - D 3 - D 4 ドメイン) タンパク質を認識することができることを実証した。ウエスタンブロット実験については、c - M y c < . 9 E 1 0 > 純粋 (E - B i o s c i e n c e , R e f 1 4 - 6 7 8 4 - 8 2) 抗体を使用した。

20

30

40

【0125】

L I L R B 2 形質導入 D 1 . 1 細胞株上の L I L R B 2 受容体に対する N b の特異性。

次に、本発明者らは、得られた N b が立体構造の L I L R B 2 受容体に結合することができるかどうかを決定しようとした。彼らは立体構造 L I L R B 2 受容体に対する 1 5 の N b の結合特異性を評価した。そのために、本発明者らは I n v e c t y s によって生成された L I L R B 2 - D 1 . 1 形質導入細胞株に対する N b の特異性を評価した。この目的のために、L I L R B 2 - D 1 . 1 細胞株を N b と共にインキュベートし、4 2 D 1 対照 A b と比較した。図 4 に示すように、L I L R B 2 - D 1 . 1 細胞の 6 2 . 6 % が 4 2

50

D 1 対照 A b によって標識された。興味深いことに、L I L R B 2 - D 1 . 1 細胞株の 9 3 . 2 %、7 6 . 4 %、7 5 . 2 % はそれぞれ B 8、C 9、C 7 の N b で標識されたのに対して (図 7)、L I L R B 2 - D 1 . 1 細胞株の 4 0 % 未満が A 2 のような他の N b によって標識された (データは示さず)。本発明者らは、B 8、C 7 及び C 9 によって認識されるエピトープは 4 2 D 1 対照抗体及び他の N b のエピトープよりもアクセスしやすいという仮説を立てた。フローサイトメトリーについては、M y c タグに対するマウスモノクローナル抗体 [9 E 1 0] - フィコエリトリン (A b c a m , R e f : a b 7 2 4 6 8) を使用した。

【 0 1 2 6 】

単球によって発現される L I L R B 2 受容体に対する N b の特異性

10

単球は、その表面で単量体または二量体の L I L R B 2 受容体を強く発現し、マクロファージ L I L R B 2 の発現を研究するための関連モデルである。したがって、本発明者らは健常ドナー P B M C から精製された単球に対する抗 L I L R B 2 N b の特異性を評価した。単球は、抗 C D 1 4、抗 L I L R B 1 A b、及び抗 L I L R B 2 N b で標識することによって表現型を決定した。単球の 3 8 % が 4 2 D 1 対照 A b について陽性であり、5 % が無関係な N b (例えば、I L T 4 ではない抗原に対してアルパカで産生された N b) について陽性だった。抗 L I L R B 2 N b によって 5 0 % を超える単球が標識された : A 2 N b で 6 8 . 3 %、B 8 N b で 5 0 . 8 %、C 7 N b で 6 2 %、C 9 N b で 5 8 . 1 %、D 8 N b で 5 3 . 5 %、G 3 N b で 5 7 % 及び G 1 0 N b で 4 6 . 7 % (図 5)。それでも、単球は D 1 2、F 5、及び H 1 2 の N b について陰性だった (データは示さず)。要するに、本発明者らは、B 8、C 7 及び C 9 の N b が単量体または二量体のいずれかの L I L R B 2 受容体内の線状エピトープに強く特異的であると判定した。試験管内での L I L R B 2 - D 1 . 1 で生成された細胞株または生体外での単球に対する L I L R B 2 エピトープのアクセス可能性は、N b よりも対照 A b 4 2 D 1 の方が難しくてもよい。4 2 D 1 モノクローナル抗体に対するこの弱い結合は、抗 L I L R B 2 N b、特に B 8、C 7、及び C 9 の N b に影響を与えない立体障害に関連している可能性がある。

20

【 0 1 2 7 】

N b 抗 L I L R B 2 は L I L R B 2 / H L A - G の相互作用を阻害する。

L I L R B 2 受容体は H L A - G 及び A N G P T L 2 のいずれかと相互作用して免疫細胞応答を阻害し、それぞれ腫瘍の発生を誘導する。次に、本発明者らは免疫細胞機能を回復し、腫瘍増殖を防ぐために、抗 L I L R B 2 がこれらの相互作用を遮断することができるかどうかを検討した。L I L R B 2 / H L A - G 相互作用の阻害を研究するために、本発明者らは先ず、N b の遮断能力を評価するための E L I S A アッセイを設計した。この目的で、r h L I L R B 2 - F c タンパク質をマイクロタイタープレートにコーティングしたのち、N b の存在下または非存在下で H L A - G 6 タンパク質と同時インキュベートした。r h - L I L R B 2 - F c 受容体は可溶性 H L A - G 6 アイソフォームに対して強い親和性を有することが実証されている。図 6 に示すように、アイソタイプ対照モノクローナル抗体は、H L A - G 6 / L I L R B 2 相互作用 (2 4 % の遮断) を妨害し、同様に遮断が報告されていなかった H - 3 0 0 ポリクローナル抗体 (2 6 % の遮断) も妨害する。しかしながら、抗 L I L R B 2 モノクローナル遮断抗体 2 7 D 6 は H L A - G 6 と L I L R B 2 受容体との間の相互作用を強力に無効にした (1 0 0 % の遮断)。抗 L I L R B 2 N b に関して、本発明者らは 7 つの N b (A 2、C 7、C 9、D 8、E 7、F 5 及び G 1 0) が相互作用を弱く阻害し (< 3 0 %)、3 つの N b が部分的阻害 : D 1 2 (4 4 . 8 %)、G 3 (3 9 . 4 %) 及び H 1 2 (5 0 %) を示したのに対して、B 8 N b は H L A - G 6 / L I L R B 2 相互作用を完全に阻害する (1 0 0 % の遮断) ことを特定した。

30

40

【 0 1 2 8 】

B 8 N b は L I L R B 2 / A N G P T L 2 の相互作用を部分的に阻害する

L I L R B 2 / A N G P T L 2 の相互作用が腫瘍の発生を促進することが実証された。

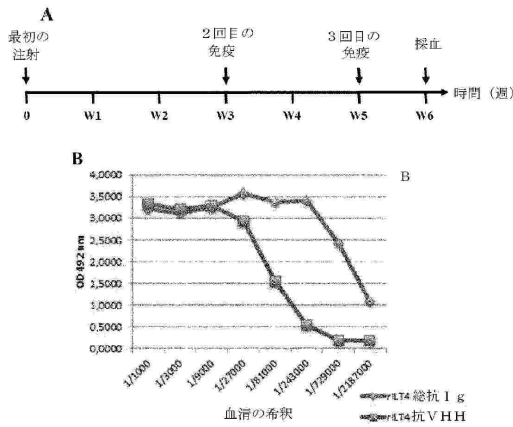
50

実際、がん細胞によって発現される L I L R B 2 受容体と A N G P T L 2 タンパク質のオートクリン発現との間の相互作用は腫瘍増殖、腫瘍アポトーシスの阻害、及び腫瘍細胞の分化をもたらす。抗 L I L R B 2 N b がこの相互作用を遮断することができるかどうかを判定するために、本発明者らは r h L I L R B 2 - F c と A N G P T L 2 タンパク質との間の相互作用を評価する E L I S A を設定した。前述のように、r h L I L R B 2 - F c タンパク質をマイクロタイタープレートにコーティングしたのち、抗 L I L R B 2 の抗体または N b の存在下または非存在下で r h A N G P T L 2 と同時インキュベートした。一部の N b は、L I L R B 2 / A N G P T L 2 の相互作用を部分的に遮断した (< 2 4 % の結合阻害) (データは示さず)。B 8 N b は N b を含まない対照と比べてこの相互作用を強力に遮断した (5 1 . 4 % の結合阻害) 一方で、A 2、H 1 2、及び G 1 0 は弱い遮断 (それぞれ 2 4 %、2 0 %、及び 8 %) を示した (図 7)。

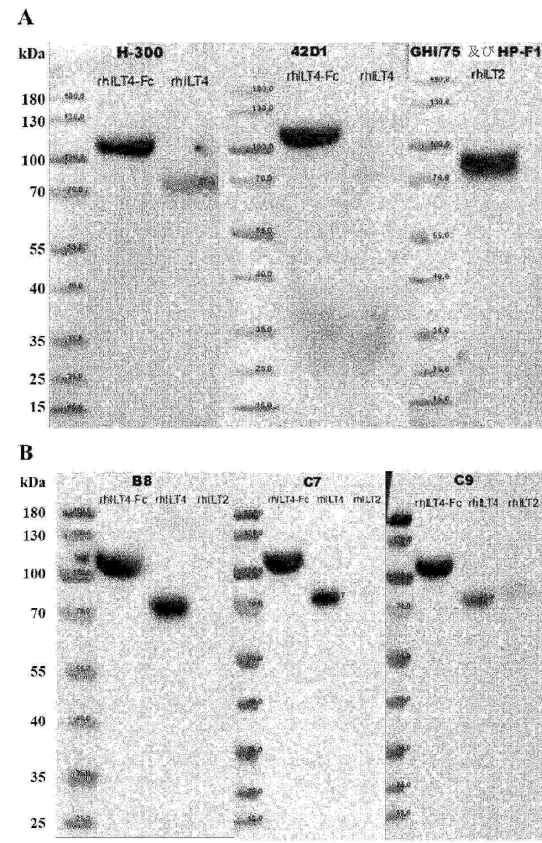
10

【 図 面 】

【 図 1 】

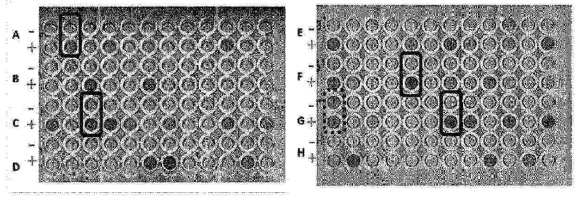


【 図 2 】



20

C (-) IgG1 (+) ILT4 1µg/ml

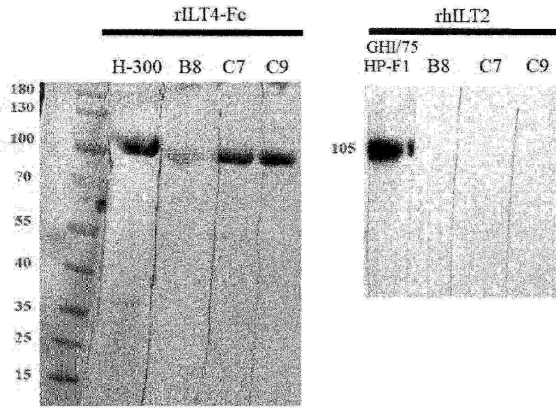


30

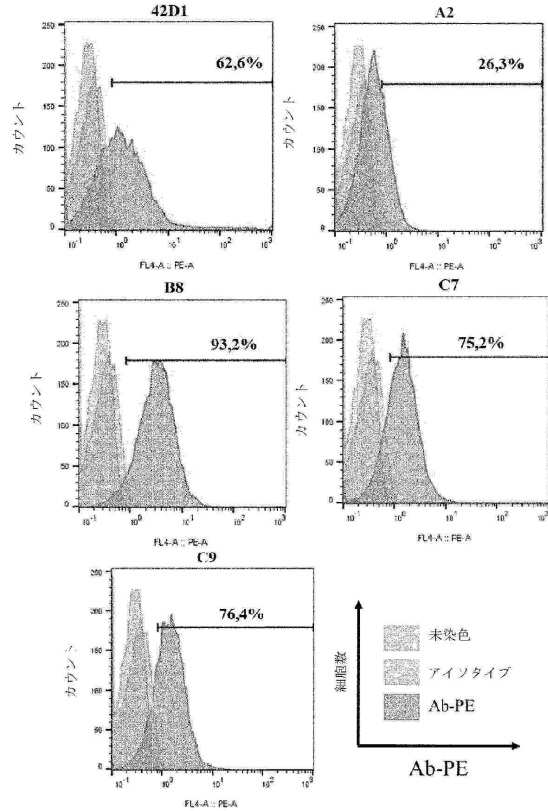
40

50

【 図 3 】



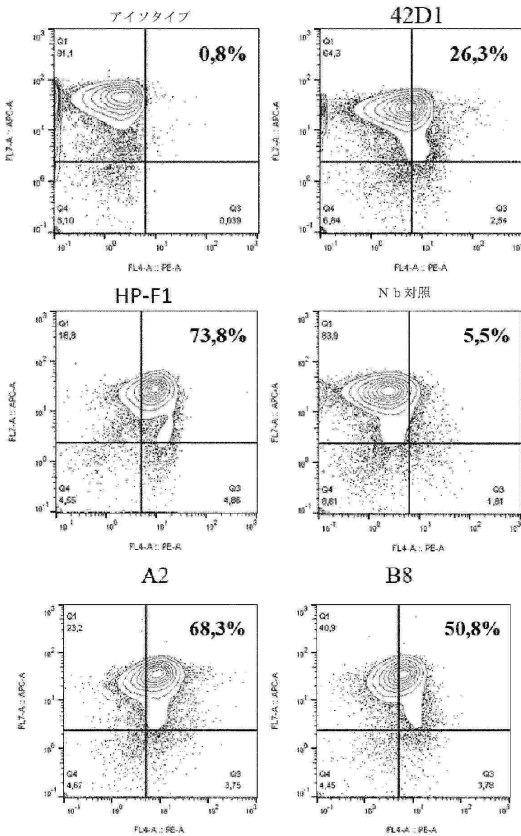
【 図 4 】



10

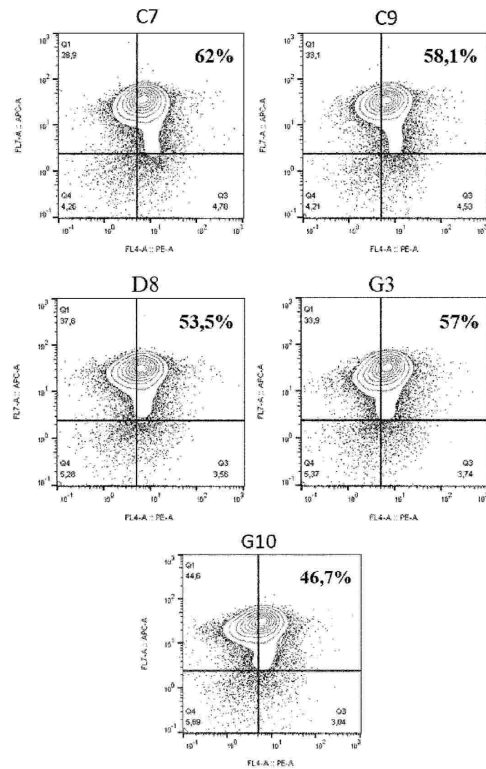
20

【 図 5 - 1 】



【 図 5 - 2 】

(続き)

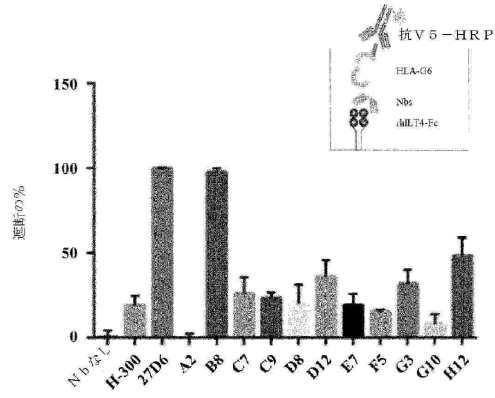


30

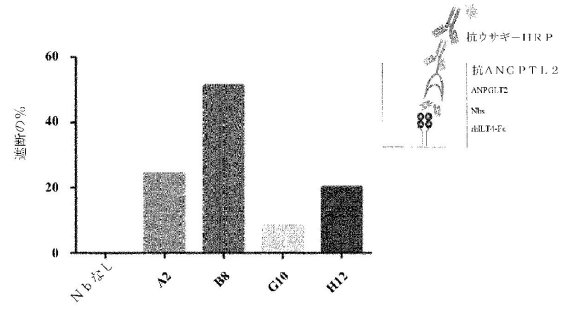
40

50

【図6】



【図7】



【配列表】

[0007627687000001.app](#)

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 N 5/10 (2006.01)
 C 1 2 N 1/15 (2006.01)
 C 1 2 N 1/19 (2006.01)
 C 1 2 N 1/21 (2006.01)
 C 1 2 N 5/0781(2010.01)
 C 1 2 N 5/0783(2010.01)
 C 1 2 N 5/0784(2010.01)
 C 1 2 N 5/0786(2010.01)
 A 6 1 K 39/395(2006.01)
 A 6 1 K 35/17 (2025.01)
 G 0 1 N 33/53 (2006.01)
 C 1 2 N 15/12 (2006.01)
 A 6 1 P 35/00 (2006.01)
 A 6 1 P 35/02 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10
 C 1 2 N 1/15
 C 1 2 N 1/19
 C 1 2 N 1/21
 C 1 2 N 5/0781
 C 1 2 N 5/0783
 C 1 2 N 5/0784
 C 1 2 N 5/0786
 A 6 1 K 39/395 N
 A 6 1 K 39/395 T
 A 6 1 K 35/17
 G 0 1 N 33/53 D
 G 0 1 N 33/53 Y
 C 1 2 N 15/12
 A 6 1 P 35/00
 A 6 1 P 35/02

(72)発明者 ユノー, リーズ

フランス 7 8 9 6 0 ヴォワザン - ル - ブルトヌー、アレ・モーリス・ユトリロ 2

(72)発明者 ラングラード - デモイエン, ピエール

フランス 9 2 2 0 0 ヌイイ - シュル - セーヌ、プランス・ドゥ・バガテル 1

(72)発明者 コーマルタン, ジュリアン

フランス 7 8 1 1 0 ル・ヴェジネ、プランス・デュ・マルシェ 1 4

審査官 團野 克也

(56)参考文献 米国特許出願公開第 2 0 1 9 / 0 1 9 4 3 2 7 (U S , A 1)

国際公開第 2 0 1 9 / 1 4 4 0 5 2 (W O , A 1)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 4 4 7 2 8 (W O , A 2)

国際公開第 2 0 1 6 / 1 1 1 9 4 7 (W O , A 2)

Hui-Ming CHEN, locking immunoinhibitory receptor LILRB2 reprograms tumor-associated myeloid cells and promotes antitumor immunity, The Journal of Clinical Investigation, 米国, 2018年10月22日, 128(12), pp.5647-5662, <https://doi.org/10.1172/JCI97570>

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

I P C C 0 7 K 1 6 / 0 0 - 1 6 / 4 6

C 1 2 N 1 5 / 0 0 - 1 5 / 9 0

DB名 C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E
/ E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q

P u b M e d