

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7534303号
(P7534303)

(45)発行日 令和6年8月14日(2024.8.14)

(24)登録日 令和6年8月5日(2024.8.5)

(51)国際特許分類		F I	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28
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
C 1 2 N	15/63 (2006.01)	C 1 2 N	15/63
		Z N A	
		Z	
		Z	
		請求項の数 22 (全123頁) 最終頁に続く	
(21)出願番号	特願2021-539336(P2021-539336)	(73)特許権者	508152917
(86)(22)出願日	令和1年9月12日(2019.9.12)		ザ ボード オブ リージェンツ オブ ザ
(65)公表番号	特表2022-500084(P2022-500084 A)		ユニバーシティー オブ テキサス シス
(43)公表日	令和4年1月4日(2022.1.4)		テム
(86)国際出願番号	PCT/US2019/050727		THE BOARD OF REGENTS
(87)国際公開番号	WO2020/056077		OF THE UNIVERSITY OF
(87)国際公開日	令和2年3月19日(2020.3.19)		TEXAS SYSTEM
審査請求日	令和4年7月8日(2022.7.8)		アメリカ合衆国 7 8 7 0 1 テキサス,
(31)優先権主張番号	62/730,715		オースティン, ウェスト 7 番 ストリ
(32)優先日	平成30年9月13日(2018.9.13)	(73)特許権者	ート 2 1 0
(33)優先権主張国・地域又は機関	米国(US)		521105709
前置審査			イミュン-オンコ セラピューティクス
			インコーポレイテッド
			アメリカ合衆国 9 4 3 0 3 カリフォル
			ニア州 バロアルト サン アントニオ ロ
			最終頁に続く

(54)【発明の名称】 新規の L I L R B 4 抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項 1】

(a) 重鎖相補性決定領域 (HC-CDR) 1を含むアミノ酸配列GFSLSSSYW、HC-CDR2を含むアミノ酸配列SIDSGSVGIT、およびHC-CDR3を含むアミノ酸配列ARHGDNWALD Lを含む、重鎖 (HC) 可変領域 (VH)、および

(b) 軽鎖相補性決定領域 (LC-CDR) 1を含むアミノ酸配列QSINSW、LC-CDR2を含むアミノ酸配列KASTLAS、およびLC-CDR3を含むアミノ酸配列QHGYIRGDLDNVを含む、軽鎖 (LC) 可変領域 (VL)

を含む、LILRB4に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 2】

前記抗原結合断片が、組換えScFv (単鎖可変断片) 抗体、Fab断片、F (ab') 2断片、もしくはFv断片である、請求項1記載の抗原結合断片。

【請求項 3】

前記単離されたモノクローナル抗体が、

(i) (a) 前記VHが、SEQ ID NO:226、228、230もしくは231と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含み、かつ (b) 前記VLが、SEQ ID NO:232、235、236もしくは237と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を含む、または

(ii) (a) 前記VHが、SEQ ID NO:226、228、230または231に示されるアミノ酸配列を含み、かつ (b) 前記VLが、SEQ ID NO:232、235、236または237に示されるアミノ酸配列を含む、

請求項1記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】

請求項1～3のいずれか一項記載の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

【請求項5】

請求項1～3のいずれか一項記載の抗原結合断片を含む、キメラ抗原受容体（CAR）タンパク質。

【請求項6】

請求項1～3のいずれか一項記載の単離されたモノクローナル抗体または請求項5記載のCARタンパク質をコードする、単離された核酸。

【請求項7】

請求項6記載の単離された核酸を含む、ベクター。

【請求項8】

請求項1～3のいずれか一項記載の単離されたモノクローナル抗体をコードする単離された核酸を含むベクターを含む、宿主細胞。

【請求項9】

哺乳動物細胞またはCHO細胞である、請求項8記載の宿主細胞。

【請求項10】

モノクローナル抗体を製造する方法であって、該抗体を発現するのに好適な条件下で請求項8または9に記載の宿主細胞を培養する工程、および該抗体を回収する工程を含む、方法。

【請求項11】

請求項5記載のCARタンパク質をコードする単離された核酸を含む、操作された細胞。

【請求項12】

T細胞、NK細胞、またはマクロファージである、請求項11記載の操作された細胞。

【請求項13】

請求項1～3のいずれか一項記載のモノクローナル抗体もしくはその抗原結合断片または請求項12記載の操作された細胞を含む、対象においてがんを治療するかまたはその影響を改善するための医薬。

【請求項14】

前記医薬の対象への投与により、

(i) 前記対象における腫瘍負荷が低減もしくは根絶する、

(ii) 腫瘍細胞の数が減少する、

(iii) 腫瘍サイズが縮小する、および／または

(iv) 前記対象において腫瘍が根絶する、

請求項13記載の医薬。

【請求項15】

前記がんが、血液悪性腫瘍、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性腫瘍、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、慢性骨髄性白血病、または急性骨髄性白血病（AML）、急性前骨髄球性白血病（APL）またはM3 AML、急性骨髄単球性白血病またはM4 AML、急性単球性白血病またはM5 AML、急性骨髄芽球性白血病、および真性多血症からなる群より選択される、請求項13記載の医薬。

【請求項16】

(i) 静脈内、動脈内、腫瘍内、もしくは皮下に投与される、または

(ii) トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリン、アントラサイクリン、ダウノルビシン、ヌクレオシド代謝阻害剤、シタラビン、低メチル化剤、低用量シタラビン（LDAC）、ダウノルビシンとシタラビンとの組合せ、注射用のダウノルビシンおよびシタラビンリポソーム、アザシチジン、デシタビン、オールトランスレチノイン酸（ATRA）、ヒ素、三酸化ヒ素、ヒスタミン二塩酸塩、インターロイキン-2、アルデスロイキン、ゲムツズマブオゾガマイシン、FLT-3阻害剤、ミドスタウリン、クロフ

10

20

30

40

50

アラビン、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、デシタビン、IDH1阻害剤、イボシデニブ、IDH2阻害剤、エナシデニブ、スミズンド（SMO）阻害剤、グラスデギブ、アルギナーゼ阻害剤、IDO阻害剤、エパカドスタット、BCL-2阻害剤、ベネトクラクス、白金錯体誘導体、オキサリプラチン、キナーゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、PI3キナーゼ阻害剤、BTK阻害剤、イブルチニブ、アカラブルチニブ、ザヌブルチニブ、PD-1抗体、PD-L1抗体、CTLA-4抗体、LAG3抗体、ICOS抗体、TIGIT抗体、TIM3抗体、CD40抗体、4-1BB抗体、CD47抗体、SIRP1 α 抗体もしくは融合タンパク質、E-セレクトインのアンタゴニスト、腫瘍抗原に結合する抗体、T細胞表面マーカーに結合する抗体、骨髄細胞もしくはNK細胞表面マーカーに結合する抗体、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗物質、抗腫瘍性抗生物質、植物に由来するアルカロイド、ホルモン療法薬、ホルモンアンタゴニスト、アロマターゼ阻害剤、ならびにP糖タンパク質阻害剤からなる群より選択される1つもしくは複数の薬物と組み合わせて使用される、

請求項13記載の医薬。

【請求項17】

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、

(i) それに連結された抗腫瘍薬物をさらに含む、または

(ii) リポソームもしくはナノ粒子にコンジュゲートしている、

請求項13～16のいずれか一項記載の医薬。

【請求項18】

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、それに連結された抗腫瘍薬物をさらに含み、該抗腫瘍薬物が、

(i) 光分解性リンカーもしくは酵素切断性リンカーを介して前記抗体に連結されている、かつ／または

(ii) 毒素、放射性同位体、サイトカイン、もしくは酵素である、

請求項17記載の医薬。

【請求項19】

試料中のがん細胞またはがん幹細胞を検出する方法であって、

(a) 対象由来の試料を、請求項1～3のいずれか一項記載のモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片、またはSEQ ID NO:99に示されるアミノ酸配列を含むVHおよびSEQ ID NO:103に示されるアミノ酸配列を含むVLを含むモノクローナル抗体若しくはその抗原結合断片と接触させる工程、および

(b) 該試料中のがん細胞またはがん幹細胞への該抗体の結合を検出する工程を含む、方法。

【請求項20】

前記試料が、

(i) 体液もしくは生検材料である、または

(ii) 血液、骨髄、痰、涙液、唾液、粘液、血清、尿、もしくは糞便である、

請求項19記載の方法。

【請求項21】

(i) 検出が、免疫組織化学、フローサイトメトリー、FACS、ELISA、RIA、もしくはウエスタンブロットを含む、または

(ii) 方法が、工程(a)および(b)の2回目を行い、1回目と比較した検出レベルの変化を決定することをさらに含む、

請求項19記載の方法。

【請求項22】

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、

(i) 標識をさらに含む、

(ii) ペプチドタグ、酵素、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、もしくは色素である標識をさらに含む、または

(iii) リポソームもしくはナノ粒子にコンジュゲートしている、

請求項19記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

優先権主張

本出願は、2018年9月13日に提出された米国仮出願第62/730,715号の優先権の恩恵を主張し、該仮出願の全内容は、参照により本明細書に組み入れられる。

【0002】

配列表

2019年9月9日に作成された4KB (Microsoft Windowsでの測定) の「UTFH__P0349WO__ST25」という名称のファイルに含有される配列表が電子的提出により本明細書と共に提出され、該配列表は参照により本明細書に組み入れられる。

10

【背景技術】

【0003】

背景

1. 分野

本開示は、概して、薬剤、腫瘍学、および免疫学の分野に関する。より具体的には、本開示は、LILRBに結合し、白血病を含むがんを治療することができる抗体に関する。

【0004】

2. 関連技術の説明

20

急性骨髄性白血病 (AML) は、成人の最も一般的な急性白血病であり、一般的な小児がんである。AMLに対する現行の治療は、集中的な細胞傷害性化学療法を伴い、多くの場合にこれに続いて骨髄破壊的前処置および幹細胞移植が行われる。しかしながら、治療にもかかわらず、ほとんどの患者は5年以内に疾患を再発するかまたは疾患に屈する。AMLを有効に治療するために、新たな分子標的および治療アプローチが同定されなければならない。最近、抑制性白血球免疫グロブリン様受容体 (inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptor; LILRB) および関連する免疫受容体チロシンベース抑制モチーフ (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif; ITIM) 含有受容体LAIR1は、様々な造血および固形がん細胞において腫瘍促進機能を有することが示された。ITIM含有受容体は、広範囲の免疫細胞上に発現され、ホスファターゼSHP-1、SHP-2、またはSHIPの動員によりシグナルを伝達して免疫細胞活性化の負の調節に繋がる。CTLA4およびPD-1に類似して、LILRBは免疫チェックポイント因子と考えられている。

30

【0005】

LILRBは、腫瘍免疫回避を促す多数の免疫細胞種の活性を阻害し得る。LILRB4は、単球、マクロファージ、および樹状細胞上に発現され、細胞自律的に自然免疫を阻害し、間接的な機序を通じてT細胞活性化を抑制することができる。LILRB4は、難治性および再発性疾患を含む単球性AMLの特異的なマーカーである。LILRB1~5は霊長動物およびヒト特異的である一方、2つのマウスオルソログ:ペア型免疫グロブリン様受容体B (PirB) およびgp49B1がある。関連する免疫受容体チロシンベース抑制モチーフ (ITIM) 含有受容体LAIR1は、ヒトおよびマウスの両方のバージョンのタンパク質を有する。マウスモデルの限られた価値、およびLILRB4を含むいくつかのLILRBのリガンドは未知であるという事実のため、これらの受容体の生物学的機能および臨床的意義の理解は依然として乏しいままである。

40

【発明の概要】

【0006】

概要

したがって、一局面では、本開示は、LILRB4に特異的に結合する単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片は、LILRB4に結合しているときにLILRB4の活性化をモジュレートする。ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片は、LILRB4に結合しているときにLILRB4を活性化

50

させる。ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片は、LILRB4に結合しているときにLILRB4の活性化を抑制する。ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片は、LILRB4に結合しているときにApoEのLILRB4への結合を特異的にブロックする。

【0007】

ある特定の態様では、(a) 以下の相補性決定領域 (complementary determining regions; CDR) : SEQ ID NO:1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92、99、223、225、226、228、229、230または231におけるCDR1である重鎖CDR (HC-CDR) 1と、SEQ ID NO:1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92、99、223、225、226、228、229、230または231におけるCDR2であるHC-CDR2と、SEQ ID NO:1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92、99、223、225、226、228、229、230または231におけるCDR3であるHC-CDR3とを含む重鎖 (HC) 可変領域 (VH)、およびHC-CDRのうちの1つまたは複数
10
が1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換、付加、欠失、またはその組合せを有するそのバリエーション、ならびに (b) 以下のCDR: SEQ ID NO:5、12、19、26、33、40、47、54、61、68、75、82、89、96、103、232、235、236または237におけるCDR1である軽鎖CDR (LC-CDR) 1と、SEQ ID NO:5、12、19、26、33、40、47、54、61、68、75、82、89、96、103、232、235、236または237におけるCDR2であるLC-CDR2と、SEQ ID NO:5、12、19、26、33、40、47、54、61、68、75、82、89、96、103、232、235、236または237におけるCDR3であるLC-CDR3とを含む軽鎖 (LC) 可
20
変領域 (VL)、およびLC-CDRのうちの1つまたは複数
が1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換、付加、欠失、またはその組合せを有するそのバリエーションを含む、抗体またはその抗原結合断片。ある特定の態様では、各CDRは、CDRのKabatの定義、Chothiaの定義、Kabatの定義とChothiaの定義との組合せ、AbMの定義、またはcontactの定義にしたがって定義される。

【0008】

ある特定の態様では、抗体は、SEQ ID NO:2、9、16、23、30、37、44、51、58、65、72、79、86、93、または100に示されるアミノ酸配列を有するHC-CDR1と、SEQ ID NO:3、10、17、24、31、38、45、52、59、66、73、80、87、94、または101に示されるアミノ酸配列を有するHC-CDR2と、SEQ ID NO:4、11、18、25、32、39、46、53、60、67、74、81、88、95、102、224または227に示されるアミノ酸配
30
列を有するHC-CDR3とを含む重鎖可変領域を含む。

【0009】

ある特定の態様では、抗体は、SEQ ID NO:6、13、20、27、34、41、48、55、62、69、76、83、90、97、または104に示されるアミノ酸配列を有するLC-CDR1と、アミノ酸配列SAS、KAS、GAS、ATS、DASもしくはAAS、またはSEQ ID NO:233に示されるアミノ酸配列を有するLC-CDR2と、SEQ ID NO:7、14、21、28、35、42、49、56、63、70、77、84、91、98、105または234に示されるアミノ酸配列を有するLC-CDR3とを含む軽鎖可変領域を含む。

【0010】

ある特定の態様では、抗体は、図28A~28Cおよび図30A~30Cからのクローン配列対と少なくとも約70%、80%、90%、または95%の同一性を有するアミノ酸配列を有するクローン重鎖・軽鎖対により特徴付けられる。ある特定の態様では、抗体は、SEQ ID NO:1、8、15、22、29、36、43、50、57、64、71、78、85、92、99、223、225、226、228、229、230または231に示されるアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を含む。ある特定の態様では、抗体は、SEQ ID NO:5、12、19、26、33、40、47、54、61、68、75、82、89、96、103、232、235、236または237に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を含む。ある特定の態様では、抗体は、表1および表2におけるCDRとは0、1または2つのアミノ酸が異なるCDRを有する、クローン重鎖・軽鎖対により特徴
40
付けられる。

【0011】

10

20

30

40

50

別の局面では、本開示は、表1および表2からのクローン重鎖・軽鎖CDR配列対を有する抗体と、同じエピトープについて競合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片を提供する。ある特定の態様では、抗体は、図28A～28Cおよび図30A～30Cからのクローン重鎖・軽鎖可変領域対を有する抗体と、同じエピトープについて競合する。

【0012】

ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片が結合するエピトープは、ヒトLILRB4のD1ドメインとD2ドメインの間のリンカー領域内に位置する。ある特定の態様では、エピトープは、表9に列記されている、LILRB4のアミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸のうちの少なくとも1つのアミノ酸を含む。ある特定の態様では、エピトープは、SEQ ID NO:238（ヒトLILRB4タンパク質のD1およびD2ドメイン）の、W18、G96、A97、Y98、S99、K100、Q122、S123、R124、S125、P126、H153およびQ154から選択される、アミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸のうちの少なくとも1つのアミノ酸を含む。

10

【0013】

ある特定の態様では、本明細書に記載されている単離されたモノクローナル抗体は、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である。ある特定の態様では、本明細書に記載されている単離されたモノクローナル抗体は、IgG1型、IgG2型、IgG3型またはIgG4型である。ある特定の態様では、本明細書に記載されている抗原結合断片は、組換えScFv（単鎖可変断片）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、またはFv断片である。

【0014】

20

別の局面では、本明細書において提供される単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、少なくとも1つの薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物が提供される。

【0015】

別の局面では、本明細書において提供される単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片をコードする単離された核酸が提供される。

【0016】

別の局面では、本明細書において提供される単離された核酸を含むベクターが提供される。

【0017】

30

別の局面では、本明細書において提供されるベクターを含む宿主細胞が提供される。宿主細胞は哺乳動物細胞であってもよい。宿主細胞はCHO細胞であってもよい。

【0018】

別の局面では、本明細書において提供される単離されたモノクローナル抗体をコードまたは産生するハイブリドーマが提供される。

【0019】

別の局面では、抗体を製造する方法が提供される。当該方法は、抗体を発現するのに好適な条件下で本明細書において提供される宿主細胞を培養する工程、および抗体を回収する工程を含んでもよい。

【0020】

40

別の局面では、本明細書において提供される抗原結合断片を含むキメラ抗原受容体（CAR）タンパク質が提供される。

【0021】

別の局面では、本明細書において提供されるCARタンパク質をコードする単離された核酸が提供される。

【0022】

別の局面では、本明細書において提供される単離された核酸を含む操作された細胞が提供される。ある特定の態様では、細胞は、T細胞、NK細胞、または骨髄細胞である。

【0023】

別の局面では、対象においてがんを治療するかまたはその影響を改善する方法が提供さ

50

れる。当該方法は、治療有効量の本明細書において提供される抗体もしくはその抗原結合断片または操作された細胞を対象に投与する工程を含んでもよい。ある特定の態様では、がんは急性骨髄性白血病である。ある特定の態様では、抗体またはその抗原結合断片は、静脈内、動脈内、腫瘍内または皮下に投与される。ある特定の態様では、抗体またはその抗原結合断片は、それに連結された抗腫瘍薬物（例えば、毒素、放射性同位体、サイトカイン、または酵素）を含む。ある特定の態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、リポソームまたはナノ粒子にコンジュゲートしている。

【0024】

さらに別の局面では、試料中または対象中のがん細胞またはがん幹細胞を検出する方法が提供される。ある特定の態様では、当該方法は、対象または対象由来の試料を本明細書において提供される抗体またはその抗原結合断片と接触させる工程、および対象中または試料中のがん細胞またはがん幹細胞への抗体の結合を検出する工程を含む。試料は体液または生検材料であり得る。試料は、血液、痰、涙液、唾液、粘液、血清、尿または糞便であり得る。ある特定の態様では、検出は、免疫組織化学、フローサイトメトリー、FACS、ELISA、RIAまたはウエスタンブロットを含む。ある特定の態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、標識（例えば、ペプチドタグ、酵素、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、または色素）をさらに含む。ある特定の態様では、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片は、リポソームまたはナノ粒子にコンジュゲートしている。

【0025】

特許請求の範囲および/または本明細書において「含む」という用語と組み合わせて使用された場合の「a」または「an」という語の使用は、「1つ」を意味することがあるが、それはまた、「1つまたは複数」、「少なくとも1つ」および「1つまたは1つより多い」の意味にも合致する。「約」という語は、記載された数のプラスまたはマイナス5%を意味する。

【0026】

本明細書に記載されている任意の方法または組成物は、本明細書に記載されている任意の他の方法または組成物に関して実施されてもよいことが企図されている。本開示の他の目的、特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなるであろう。しかしながら、詳細な説明および特定の例は、本発明の特定の態様を示すが、それは説明のためにのみ与えられることが理解されるべきであり、本開示の精神および範囲内で様々な変更および改良がこの詳細な説明から当業者に明らかとなるであろう。

[本発明1001]

(a) SEQ ID NO:100に示されるアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域（HC-CDR）1、

SEQ ID NO:101に示されるアミノ酸配列を有するHC-CDR2、および

SEQ ID NO:102、224または227に示されるアミノ酸配列を有するHC-CDR3を含む、重鎖（HC）可変領域（VH）、および

該HC-CDRのうちの1つまたは複数が1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換、付加、欠失、またはこれらの組合せを有する、そのバリエーション、ならびに

(b) SEQ ID NO:104に示されるアミノ酸配列を有する軽鎖相補性決定領域（LC-CDR）1、

アミノ酸配列KASまたはSEQ ID NO:233に示されるアミノ酸配列を有するLC-CDR2、および

SEQ ID NO:105または234に示されるアミノ酸配列を有するLC-CDR3

を含む、軽鎖（LC）可変領域（VL）、および

該LC-CDRのうちの1つまたは複数が1つ、2つ、または3つのアミノ酸置換、付加、欠失、またはこれらの組合せを有する、そのバリエーションを含む、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1002]

(a) 前記HC-CDR1が、SEQ ID NO:100に示されるアミノ酸配列を有し、前記HC-CDR2が、SEQ ID NO:101に示されるアミノ酸配列を有し、かつ前記HC-CDR3が、SEQ ID NO:102、224または227に示されるアミノ酸配列を有し、かつ (b) 前記LC-CDR1が、SEQ ID NO:104に示されるアミノ酸配列を有し、前記HC-CDR2が、アミノ酸配列KASまたはSEQ ID NO:233に示されるアミノ酸配列を有し、かつ前記HC-CDR3が、SEQ ID NO:105または234に示されるアミノ酸配列を有する、本発明1001の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1003]

前記単離されたモノクローナル抗体が、マウス抗体、齧歯動物抗体、ウサギ抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体、またはヒト抗体である、本発明1001の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

10

[本発明1004]

前記抗原結合断片が、組換えScFv（単鎖可変断片）抗体、Fab断片、F(ab')₂断片、またはFv断片である、本発明1001の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1005]

前記単離されたモノクローナル抗体が、ウサギ抗体またはキメラ抗体である、本発明1001の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1006]

(a) 前記VHが、SEQ ID NO:99と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有し、かつ (b) 前記VLが、SEQ ID NO:103と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する、本発明1005の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

20

[本発明1007]

(a) 前記VHが、SEQ ID NO:99に示されるアミノ酸配列を有し、かつ (b) 前記VLが、SEQ ID NO:103に示されるアミノ酸配列を有する、本発明1005の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1008]

前記単離されたモノクローナル抗体がヒト化抗体である、本発明1001の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1009]

(a) 前記VHが、SEQ ID NO:223、225、226、228、229、230または231と少なくとも約90%同一のアミノ酸配列を有し、かつ (b) 前記VLが、SEQ ID NO:232、235、236または237と少なくとも90%同一のアミノ酸配列を有する、本発明1008の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

30

[本発明1010]

(a) 前記VHが、SEQ ID NO:223、225、226、228、229、230または231に示されるアミノ酸配列を有し、かつ (b) 前記VLが、SEQ ID NO:232、235、236または237に示されるアミノ酸配列を有する、本発明1008の単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

[本発明1011]

同じエピトープについて、本発明1001～1010のいずれかの単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と競合する、単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片。

40

[本発明1012]

本発明1001～1011のいずれかの単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片と、薬学的に許容される担体とを含む、薬学的組成物。

[本発明1013]

本発明1001～1011のいずれかの単離されたモノクローナル抗体をコードする、単離された核酸。

[本発明1014]

50

本発明1013の単離された核酸を含む、ベクター。

[本発明1015]

本発明1014のベクターを含む、宿主細胞。

[本発明1016]

哺乳動物細胞である、本発明1015の宿主細胞。

[本発明1017]

CHO細胞である、本発明1015の宿主細胞。

[本発明1018]

本発明1001～1011のいずれかの単離されたモノクローナル抗体をコードまたは産生する、ハイブリドーマ。

[本発明1019]

抗体を製造する方法であって、該抗体を発現するのに好適な条件下で本発明1015の宿主細胞を培養する工程、および該抗体を回収する工程を含む、方法。

[本発明1020]

本発明1001～1011のいずれかの抗原結合断片を含む、キメラ抗原受容体（CAR）タンパク質。

[本発明1021]

本発明1020のCARタンパク質をコードする、単離された核酸。

[本発明1022]

本発明1021の単離された核酸を含む、ベクター。

[本発明1023]

本発明1021の単離された核酸を含む、操作された細胞。

[本発明1024]

T細胞、NK細胞、またはマクロファージである、本発明1023の操作された細胞。

[本発明1025]

対象においてがんを治療するかまたはその影響を改善する方法であって、治療有効量の本発明1001～1011のいずれかの抗体もしくはその抗原結合断片または本発明1023もしくは1024の操作された細胞を該対象に投与する工程を含む、方法。

[本発明1026]

前記対象における腫瘍負荷を低減または根絶する、本発明1025の方法。

[本発明1027]

腫瘍細胞の数を減少させる、本発明1025の方法。

[本発明1028]

腫瘍サイズを縮小させる、本発明1025の方法。

[本発明1029]

前記対象において腫瘍を根絶する、本発明1025の方法。

[本発明1030]

前記がんが血液悪性腫瘍である、本発明1025の方法。

[本発明1031]

前記血液悪性腫瘍が、骨髄異形成症候群、骨髄増殖性腫瘍、慢性骨髄単球性白血病（CMML）、慢性骨髄性白血病、または急性骨髄性白血病（AML）、急性前骨髄球性白血病（APL）またはM3 AML、急性骨髄単球性白血病またはM4 AML、急性単球性白血病またはM5 AML、急性骨髄芽球性白血病、および真性多血症からなる群より選択される、本発明1030の方法。

[本発明1032]

前記抗体またはその抗原結合断片が、静脈内、動脈内、腫瘍内、または皮下に投与される、本発明1025の方法。

[本発明1033]

トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリントポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリン、ダウノルビシン、ヌクレオシド代謝阻害剤、シタラビン、低メチル化剤、低用量

10

20

30

40

50

シタラビン（LDAC）、ダウノルビシンとシタラビンとの組合せ、注射用のダウノルビシンおよびシタラビンリポソーム、ヴィキセオス（登録商標）、アザシチジン、ビダーザ（登録商標）、デシタビン、オールトランスレチノイン酸（ATRA）、ヒ素、三酸化ヒ素、ヒスタミン二塩酸塩、セプレン（登録商標）、インターロイキン-2、アルデスロイキン、プロロイキン（登録商標）、ゲムツズマブオゾガマイシン、マイロターグ（登録商標）、FLT-3阻害剤、ミドスタウリン、ライダプト（登録商標）、クロファラビン、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、デシタビン、IDH1阻害剤、イボシデニブ、チブソボ（登録商標）、IDH2阻害剤、エナシデニブ、イディファ（登録商標）、スムーズンド（SMO）阻害剤、グラスデギブ、アルギナーゼ阻害剤、IDO阻害剤、エパカドスタット、BCL-2阻害剤、ベネトクラクス、ベネクレクスタ（登録商標）、白金錯体誘導体、オキサリプラチン、キナーゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、PI3キナーゼ阻害剤、BTK阻害剤、イブルチニブ、イムブルピカ（登録商標）、アカラブルチニブ、カルクエンス（登録商標）、ザヌブルチニブ、PD-1抗体、PD-L1抗体、CTLA-4抗体、LAG3抗体、ICOS抗体、TIGIT抗体、TIM3抗体、CD40抗体、4-1BB抗体、CD47抗体、SIRP1 α 抗体または融合タンパク質、E-セレクトインのアンタゴニスト、腫瘍抗原に結合する抗体、T細胞表面マーカーに結合する抗体、骨髄細胞またはNK細胞表面マーカーに結合する抗体、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗物質、抗腫瘍性抗生物質、植物に由来するアルカロイド、ホルモン療法薬、ホルモンアンタゴニスト、アロマターゼ阻害剤、ならびにP糖タンパク質阻害剤からなる群より選択される1つまたは複数の薬物を前記対象に投与する工程をさらに含む、本発明1025の方法。

10

20

[本発明1034]

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、それに連結された抗腫瘍薬物をさらに含む、本発明1025～1033のいずれかの方法。

[本発明1035]

前記抗腫瘍薬物が、光分解性リンカーを介して前記抗体に連結されている、本発明1034の方法。

[本発明1036]

前記抗腫瘍薬物が、酵素切断性リンカーを介して前記抗体に連結されている、本発明1034の方法。

[本発明1037]

前記抗腫瘍薬物が、毒素、放射性同位体、サイトカイン、または酵素である、本発明1034の方法。

30

[本発明1038]

試料中または対象中のがん細胞またはがん幹細胞を検出する方法であって、

（a）対象または対象由来の試料を、本発明1001～1011のいずれかの抗体またはその抗原結合断片と接触させる工程、および

（b）該対象中または該試料中のがん細胞またはがん幹細胞への該抗体の結合を検出する工程

を含む、方法。

[本発明1039]

前記試料が、体液または生検材料である、本発明1038の方法。

40

[本発明1040]

前記試料が、血液、骨髄、痰、涙液、唾液、粘液、血清、尿、または糞便である、本発明1038の方法。

[本発明1041]

検出が、免疫組織化学、フローサイトメトリー、FACS、ELISA、RIA、またはウエスタンブロットを含む、本発明1038の方法。

[本発明1042]

工程（a）および（b）の2回目を行い、1回目と比較した検出レベルの変化を決定することをさらに含む、本発明1038の方法。

50

[本発明1043]

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が標識をさらに含む、本発明1038の方法。

[本発明1044]

前記標識が、ペプチドタグ、酵素、磁性粒子、発色団、蛍光分子、化学発光分子、または色素である、本発明1043の方法。

[本発明1045]

前記単離されたモノクローナル抗体またはその抗原結合断片が、リボソームまたはナノ粒子にコンジュゲートしている、本発明1025～1044のいずれかの方法。

【図面の簡単な説明】【0027】

以下の図面は本明細書の一部を形成し、本発明のある特定の局面をさらに実証するために含まれる。本明細書に提示される特定の態様の詳細な説明と組み合わせてこれらの図面の1つまたは複数を参照することにより、本発明はより良好に理解されるであろう。

【0028】

【図1A】図1A～1Bは、LILRAおよびLILRBファミリーメンバーの間の配列保存を示す。図1Aは、LILRBおよびLILRAファミリーメンバーのD1ドメインの間のアミノ酸配列同一性のパーセンテージを示す。

【図1B】図1Bは、LILRBおよびLILRAファミリーメンバーのD1ドメインについての系統発生ツリーを示す。

【図2-1】図2A～2Kは、白血病細胞上に発現されるLILRB4がT細胞増殖を抑制することを示す。図2A、105人の患者由来の試料のフローサイトメトリー分析によりLILRB4表面発現を定量化した。図2B、同じAML患者（n=6）からの正常単球および新生物性単球上のLILRB4表面発現を比較した。MFI:平均蛍光強度。図2C、単球性AMLを有する患者（AML#19）から単離された自己T細胞（pT、患者T細胞）または健常ドナーから単離された同種T細胞（nT、正常T細胞）を患者AML#19からの照射LILRB4+またはLILRB4-（B4+またはB4-）初代白血病細胞と共にインキュベートした（n=3の生物学的に独立した試料、平均±s.e.m.）。異なるサブセット（CD3⁺CD8⁻CD4⁻、CD3⁺CD8⁺CD4⁺、CD3⁺CD8⁻CD4⁺、およびCD3⁺CD8⁺CD4⁻）のT細胞の絶対数を、異なる色の積重ね棒グラフで示す。図2D、健常ドナーから単離されたT細胞（E:エフェクター細胞）を、示されている照射THP-1細胞（T:標的細胞）と共に細胞同士が接触するようにしてインキュベートした。異なるE:T比でのCD3⁺T細胞の数を示す。図2E～2F、NOD-SCID IL2R γ -ヌル（NSG）マウス（n=5）におけるヒトT細胞およびi.v.移植ドキシサイクリン（Dox）誘導性lilrb4ノックアウトTHP-1細胞（GFP⁺）の生着。LV、肝臓; BM、骨髄。図2G、抗CD8の非存在下または存在下での、抗LILRB4-N297A抗体または対照抗体で処置したC57BL/6マウス（n=5）における皮下移植されたヒトLILRB4発現マウスAML C1498細胞（hlilrb4-C1498）の腫瘍成長。図2H、皮下hlilrb4-C1498腫瘍保有マウス（n=12）の生存曲線。図2I、対照マウスまたは抗LILRB4-N297A処置により治癒された腫瘍保有マウス（n=5）からの脾臓細胞の養子移植。腫瘍サイズを時間の関数としてモニターした。矢印は、白血病を排除したマウス（n=4）における3倍数のAML細胞を用いた再負荷の日を示す。図2J～2K、抗LILRB4抗体または対照IgGを用いた処置後のヒト初代単球性AML細胞を異種移植されたマウスからの骨髄中のCD45⁺LILRB4⁺細胞の代表的なフロープロットおよびパーセントの定量化（n=8の生物学的に独立した試料）。実験は、類似した結果と共に16の独立した患者試料について繰り返した。

【図2-2】図2-1の説明を参照。

【図2-3】図2-1の説明を参照。

【図2-4】図2-1の説明を参照。

【図2-5】図2-1の説明を参照。

【図2-6】図2-1の説明を参照。

【図3】図3A～3Dは、LILRB4がAML細胞の遊走および浸潤を促進することを示す。LIL

10

20

30

40

50

RB4 (wt) または細胞内ドメインを欠いたLILRB4 (intΔ) の再構成有りまたは無しで、WTおよびlilrb4-KO THP-1細胞 (GFP+) を使用した。骨髓 (BM)、肝臓 (LV)、および脾臓 (SP) における白血病細胞 (GFP+) の数をフローサイトメトリーにより決定し、末梢血における数に対して正規化した。図3A、NSGマウス (n=5) における示されているWTまたは改変THP-1細胞の短期 (20時間) 浸潤の比較。図3B~3D、抗LILRB4抗体またはIgG対照を用いた処置後のNSGマウス (n=5) におけるヒト初代単球性AML細胞の短期 (20時間) 浸潤の比較。n.s.、有意でない; p値は両側スチューデントt検定からのものであった。

【図4-1】図4A~4Mは、APOEがLILRB4の細胞外結合タンパク質であることを示す。図4A、10%のヒト血清、10%のマウス血清、またはPBS対照の存在下で活性化された示されているLILRBレポーター細胞 (GFP+) の割合 (%)。図4B、組換えAPOE (10 μg/ml) により活性化された示されているLILRBレポーター細胞の割合 (%)。図4C、野生型もしくはapoeノックアウトKOマウスまたはPBS対照から収集された10%のマウス血清により活性化されたLILRB4レポーター細胞の割合 (%)。図4D、10 μg/mlのAPOE、APOE-POPC、APOA1、またはAPOA1-POPCにより活性化されたLILRB4レポーター細胞の割合 (%)。図4E、WTおよびlilrb4-KO THP-1細胞へのHisタグ付加APOEの結合。図4F、LILRB4-ECDへのヒトHisタグ付加APOE-3の結合速度論を、マイクロスケール熱泳動 (MST) を使用して測定した。上パネル: 結合の蛍光強度 (Flu.Int.) プロットおよび回帰; 下パネル: 対応する残渣 (Resi.) 対フィットプロット。図4G、WTおよび変異体APOEタンパク質により活性化されたLILRB4レポーター細胞の割合 (%)。Mut-N、R142A/K143A/R145A/K146A/R147A/R150A; Mut-C1、残基245~299の欠失; およびMut-C2、残基279~299の欠失。図4H、APOEタンパク質により活性化された示されているLILRB4変異体レポーター細胞の割合 (%)。 (図4G~4H) において、結合に干渉する変異体に関するデータを赤色で強調している。図4I、健康ドナーから単離されたT細胞を、lilrb4またはapoe遺伝子ノックアウト無し (WT) または有り (lilrb4-KO、apoe-KO-1、apoe-KO-2) で示されている照射THP-1細胞とインキュベートした。T細胞を7日後にフローサイトメトリーにより分析した。図4J~4L、C57bl/6マウス脾臓細胞 (エフェクター細胞またはEとして) を、照射ヒトlilrb4発現 (GFP-hlilrb4) または対照 (GFP) C1498細胞 (標的細胞またはTとして) と共に、示されているE:T比でインキュベートした。細胞にWTまたはapoe-KOマウスから収集された5%の血清を添加し、抗CD3/CD28コーティングビーズと60時間培養し、次に抗CD3抗体を用いて染色した。20:1のE:Tでの試料からの代表的なフロープロット (図4J)、CD3⁺T細胞の割合 (%) (図4K)、およびapoe-KO血清のAPOE-POPCレスキューの効果 (図4L) を示す。図4M、マウス白血病C1498細胞におけるヒトlilrb4の強制発現はWTレシピエントマウスにおいて白血病細胞浸潤を増加させるが、apoe-KOレシピエントマウスにおいてはそうではない (n=5)。n.s.、有意でない; p値は両側スチューデントt検定からのものであった。

【図4-2】図4-1の説明を参照。

【図4-3】図4-1の説明を参照。

【図4-4】図4-1の説明を参照。

【図4-5】図4-1の説明を参照。

【図5-1】図5A~5Mは、LILRB4媒介性の細胞内シグナル伝達はAML細胞遊走およびT細胞抑制を制御することを示す。図5A、野生型およびlilrb4-KO THP-1細胞における3つのホスファターゼの発現およびリン酸化。図5B、初代T細胞および照射した示されているTHP-1細胞をそれぞれ下および上チャンバー中で培養した。T細胞を7日後にフローサイトメトリーにより分析した。図5C~5D、shp-2のノックアウトは、NSGマウス (n=5) においてTHP-1細胞の短期および長期浸潤を低減する。図5E、lilrb4-KOおよびWT THP-1細胞から生成されたRNA-seqデータの上流転写因子解析。黄色ドットは、JAK/STATおよびNF-κB経路に関連する転写因子を強調したものである。図5F、lilrb4-KO THP-1細胞におけるIKKα/βの減少したリン酸化。図5G、lilrb4-KO THP-1細胞の核画分における減少したNFκB。図5H~5I、NF-κB阻害剤は、LILRB4依存的にWT THP-1細胞によるT

細胞抑制を逆転させ（図5H）、MV4-11細胞の浸潤を減少させた（図5I）。図5J、健康ドナーから単離されたT細胞に、WTまたはlilrb4-KO THP-1細胞の25%の培養上清（CM）を添加した。代表的な細胞を写真撮影し（スケールバー、100 μ m）、T細胞をフローサイトメトリーにより分析した。図5K~5L、示されている濃度の組換えuPAR（uPA受容体；ウロキナーゼ受容体としても公知）（図5K）またはARG-1（アルギナーゼ-1）（図5L）タンパク質を添加した照射した示されているTHP-1細胞とT細胞を7日間インキュベートし、フローサイトメトリーにより分析した。図5M、uPAR（plaur）またはARG1の過剰発現は、lilrb4-KO MV4-11細胞の浸潤欠陥をレスキューした（n=5）。n.s.、有意でない；p値は両側スチューデントt検定からのものであった。

【図5-2】図5-1の説明を参照。

【図5-3】図5-1の説明を参照。

【図5-4】図5-1の説明を参照。

【図5-5】図5-1の説明を参照。

【図5-6】図5-1の説明を参照。

【図6】図6A~6Bは、ヒトAML患者におけるLILRB4発現および患者全生存期間と負に相関することを示す。図6A、TCGAデータベースからのAML患者（n=160）のlilrb4 mRNAレベルおよび全生存期間にわたる相関の解析。低、n=57；中、n=48；高、n=55。図6B、TCGAデータベースにおける年齢、細胞遺伝学、およびPML-RAR変異を含む交絡因子についての補正を伴う、関連性を評価するための多変量コックス回帰分析。総試料サイズは79であった。*、p<0.05を有意と考える。

【図7-1】図7A~7Fは、初代LILRB4発現AML細胞はT細胞増殖を抑制することを示す。個々の単球性AMLまたはB-ALL患者から単離された自己T細胞を同じ患者からの照射lilrb4陽性（B4+）またはlilrb4陰性（B4-）初代白血病細胞とインキュベートした。pT、患者T細胞。健康ドナーから単離された同種T細胞を、示されているAMLまたはB-ALL患者からの照射lilrb4陽性またはlilrb4陰性初代白血病細胞と共に、E:T=10:1でインキュベートした。nT、正常T細胞。抗CD3/CD28/CD137コーティングビーズおよびrhIL-2との14日間の培養後に、T細胞を抗CD3、抗CD4、および抗CD8抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した。黒のp値はCD3⁺CD8⁺細胞の有意性を指し示し、赤のp値はCD3⁺CD4⁺細胞の有意性を示す。n.s.、有意でない。

【図7-2】図7-1の説明を参照。

【図8-1】図8A~8Oは、LILRB4はインビトロでT細胞増殖を抑制することを示す。図8A、lilrb4モジュレートTHP-1細胞の調製およびフローサイトメトリーによる細胞表面上のLILRB4発現の試験の図式。WT、スクランブル化対照を用いて処理されたTHP-1細胞；lilrb4-KO、lilrb4ノックアウトTHP-1細胞；lilrb4-KO-wt、lilrb4-KO THP-1細胞上の野生型lilrb4の強制発現；lilrb4-KO-int Δ 、lilrb4-KO THP-1細胞上の細胞内ドメイン欠失変異体lilrb4の強制発現。図8B、フローサイトメトリーによるlilrb4-KO MV4-11細胞の細胞表面上のLILRB4発現の試験。図8C~8D、MV4-11細胞上のlilrb4の喪失はT細胞抑制を低減する。96ウェルトランスウェルプレートの下チャンバー中で3 μ mの細孔を有する膜により分離された上チャンバー中の照射MV4-11細胞とインキュベートされた健康ドナーから単離されたT細胞（2:1のE:T）。抗CD3/CD28コーティングビーズおよびrhIL-2との7日間の培養後に、倒立顕微鏡を使用して代表的な細胞を写真撮影し（スケールバー、100 μ m）（図8C）、T細胞を抗CD3を用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した（図8D）。n=3。図8E、MV4-11細胞上のlilrb4の喪失は細胞増殖に影響しない。図8F~8G、健康ドナーから単離されたT細胞（E:エフェクター細胞）を、示されている照射THP-1細胞（T:標的細胞）と共にトランスウェル中で直接的な接触無しで2日間インキュベートした。E:T=2:1。T細胞をBrdUを用いて30分間処理し、続いてフローサイトメトリー分析のためにBrdUおよび7-AAD染色を行った。代表的なフローサイトメトリープロットを図8Fに示し、細胞周期の状態を図8Gに要約する。T対照、T細胞をTHP-1細胞無しで培養した。図8H~8I、健康ドナーから単離されたT細胞（E:エフェクター細胞）をCFSEを用いて染色し、示されている照射THP-1細胞（T:標的細胞）とトランスウェ

ル中で直接的な接触無しで2日間インキュベートした。代表的なフローサイトメトリープロットを図8Hに示し、CFSE低染色により指し示される増殖性T細胞の割合(%)を図8Iに示す。図8J、LILRB4は、白血病細胞およびT細胞の共培養においてT細胞上のPD-1発現を増加させる。健常ドナーから単離されたT細胞(E:エフェクター細胞)を、示されている照射THP-1細胞(T:標的細胞)と共に、非接触方式で5日間インキュベートした。E:T=2:1。フローサイトメトリー分析のために抗LAG-3、抗TIM-3、抗TIGIT、抗PD-1および抗FasL抗体を用いてT細胞を染色した。代表的なフローサイトメトリープロットを示しており、蛍光強度の平均を算出し、右上角に示した(黒、WT; 赤、KO)。実験は、類似した結果と共に3回行った。図8K、抗LILRB4抗体はT細胞の増殖に対して効果を有しなかった。インビトロでの5日のIgGまたは抗LILRB4抗体の処理後のヒト初代T細胞の数を示す(n=3の生物学的に独立した試料、平均およびs.e.m.)。図8L、初代T細胞および照射THP-1細胞(E:T比、2:1)をそれぞれ下チャンバーおよび上チャンバーに置き、10 µg/mlの対照IgGまたは抗LILRB4抗体を用いて処理した。T細胞を抗CD3を用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した。図8M、抗CD3/CD28/CD137コーティングビーズを用いて刺激された初代T細胞を、WTまたはlilrb4-KO-THP-1細胞と共に、示されているE:T比で4時間共培養した。白血病細胞の細胞傷害性(Cytotoxicity)をフローサイトメトリー分析においてPI染色により決定した(n=3の生物学的に独立した試料、平均およびs.e.m.)。図8N~8O、抗CD3/CD28/CD137コーティングビーズを用いて刺激されたCD8⁺T細胞(5×10⁴個の細胞)を、GFPを安定的に発現する5×10³個のTHP-1細胞と共培養し、100 µg/mlの抗LILRB4抗体または対照IgGを用いて5日間処理した。n=4。GFP⁺白血病細胞(図8N、n=4の生物学的に独立した試料)、およびIFN γの分泌(図8O、n=3の生物学的に独立した試料、平均およびs.e.m.)の定量化を示す。n.s.、有意でない。

【図8-2】図8-1の説明を参照。

【図8-3】図8-1の説明を参照。

【図8-4】図8-1の説明を参照。

【図8-5】図8-1の説明を参照。

【図9-1】図9A~9Jは、LILRB4の阻害はヒト化免疫不全マウスにおいて白血病発症を低減することを示す。図9A~9C、WTまたはlilrb4-KO THP-1細胞(3×10⁶個の細胞/マウス)をhPBMC再増殖(repopulated) NSGマウスの皮下に移植した(WT、n=14のマウス、平均およびs.e.m.; lilrb4-KO、n=10のマウス、平均およびs.e.m.)。腫瘍サイズ(図9A)、31日目におけるレシピエントマウスの末梢血中のCD3⁺の定量(図9B)ならびにCD4⁺およびCD8⁺T細胞を示す代表的なフロープロット(図9C)を示す。図9D~9E、LILRB4は腫瘍浸潤T細胞上のPD-1発現を増加させる。WTまたはlilrb4-KO THP-1細胞をhPBMC再増殖NSGマウスの皮下に移植した。移植の3週後に、10匹のWT群マウスのうちの7匹は大きい腫瘍を有し、10匹のKO群マウスのうちの3匹は極めて小さい腫瘍を有した。抗LILRB4、抗CD3、抗PD-1または抗アルギナーゼ-1抗体を用いる免疫組織化学およびフローサイトメトリー染色のためにこれらの腫瘍を解剖した。図9D、左角の画像は、黄色の強調した領域から拡大したものである。CD3およびPD-1染色画像において、橙色の破線は腫瘍の境界を示す。黒の矢頭はPD-1陽性細胞を示す。スケールバー、100 µm。図9E、腫瘍を解剖し、腫瘍領域中の細胞をフローサイトメトリー分析のために抗CD3および抗PD-1抗体を用いて染色した。PD-1⁺T細胞の割合(%) (PD-1⁺CD3⁺細胞/CD3⁺細胞の比)を算出した。図9F~9G、THP-1細胞をhPBMC再増殖NSGマウスに移植し、マウスを対照IgGまたは抗LILRB4抗体を用いて6日後に処置した(10mg/kg; n=5)。代表的なマウスにおける26日目のT細胞数も示した。図9H~9I、ドキシサイクリン(Dox)投与前7日目のNSGマウスにおけるヒトT細胞およびi.v.移植Dox誘導性lilrb4ノックアウトTHP-1細胞(GFP⁺)の生着(n=5)。図9J、代表的なフロープロットは、エンドポイントにおいてDox供給マウスの骨髄中の生着白血病細胞においてLILRB4の欠失に成功したことを示す。n.s.、有意でない。

【図9-2】図9-1の説明を参照。

【図9-3】図9-1の説明を参照。

【図9-4】図9-1の説明を参照。

【図10】図10A~10Dは、抗LILRB4抗体は同系マウスにおいて白血病発症を低減することを示す。図10A、LILRB4-IRES-GFPを安定的に発現するマウスAML C1498細胞 (3×10^6 個の細胞/マウス)をC57bl/6マウスにs.c.移植した。抗LILRB4-N297A抗体または対照IgGを腫瘍細胞の移植後6、9、12、15、18、および21日目にi.v.注射した。2群のマウスを腫瘍細胞の移植後3、6、9、および12日目に抗CD8抗体を用いて処置して、CD8⁺T細胞枯渇を達成した。CD8⁺細胞が枯渇された場合であっても、抗LILRB4抗体は肝臓(LV、図10A)などの宿主組織への白血病細胞の浸潤を低減した(図10A)。図10B~10D、C57bl/6マウスにGFPを発現するヒトLILRB4発現マウスAML C1498細胞 (3×10^6 個の細胞/マウス)をi.v.移植した。抗LILRB4-N297A抗体(n=9のマウス)または対照IgG(n=9のマウス)を腫瘍細胞の移植後6、9、12、15および18日目にi.v.注射した。抗LILRB4抗体は、骨髄(BM)中の白血病細胞の割合(%)を減少させた(図10B)。抗LILRB4抗体は、骨髄中のCD8⁺T細胞を増加させた(図10C)。骨髄中のCD8⁺T細胞の割合(%)は、白血病細胞の割合(%)と有意に負に相関する(図10D)。n.s.、有意でない。全てのp値(ピアソンの相関からである図10Dを除く)は両側スチューデントt検定からのものであった。

【図11A】図11A~11Bは、抗LILRB4抗体はPDXマウスにおいて白血病発症を低減し、自己T細胞を回復させることを示す。図11A、16人のヒト患者(3人について図2J~Kに示す)のそれぞれからの初代末梢血または骨髄単核AML細胞 ($5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個の細胞/マウス)をNSGマウスに注射し、続いてIgGまたは抗LILRB4抗体(10mg/kg、i.v.注射により週に2回)を用いて処置した。フローサイトメトリーにより決定された場合の、移植後2~4か月における骨髄、脾臓、肝臓および末梢血を含む造血組織から回収されたヒトCD45⁺LILRB4⁺AML細胞の割合(%)を示す。図11B、フローサイトメトリーにより決定された場合の、移植後2~4か月における骨髄、脾臓、肝臓および末梢血を含む造血組織から回収された自己ヒトT細胞の割合(%)、ならびに3つのPDXにおけるマウスの骨髄中のCD3⁺CD8⁺T細胞の代表的なフロープロットを示す。n.s.、有意でない。n=20の生物学的に独立した試料を有するAML#11を除いて、全てのPDXについてn=8の生物学的に独立した試料。

【図11B】図11Aの説明を参照。

【図12-1】図12A~12Jは、LILRB4はAML細胞の浸潤を促進することを示す。図12Aおよび図12B、lilrb4を安定的に発現するマウスAML細胞、C1498(図12A)またはWEHI-3(図12B)上のヒトLILRB4発現の試験。図12C、LILRB4の強制発現は、WEHI-3などのマウスAML細胞の細胞増殖に影響しなかった(n=3)。図12D、ヒトLILRB4の強制発現は、マウスAML WEHI-3細胞の経内皮遊走を促進した(n=3)。図12E、NSGマウス(n=6)に 1×10^6 個のTHP-1細胞を注射し、直後にIgGまたは抗LILRB4抗体処置を行い、生物発光イメージングによりモニターした。図12F~12G、抗LILRB4抗体は内臓へのAML細胞浸潤を減少させた。 1×10^6 個のルシフェラーゼ発現THP-1細胞の移植後に内臓のエキスビオ生物発光イメージングのために21日目にマウスを殺した。代表的なマウスからの発光フラックス(輝度)の画像を示す(図12F)。1:GI管、2:脚、3:肺、4:脾臓、5:肝臓、6:腎臓、7:脳、8:心臓。浸潤した白血病細胞は、肝臓中に腫瘍小結節を形成した(図12G)。図12H、抗LILRB4抗体はLILRB4陰性がん細胞に対して効果を有しなかった。LILRB4はTHP-1およびMV4-11ヒトAML細胞上に発現されるが、U937細胞上に発現されない。NSGマウスにLILRB4を発現しないU937ヒトAML細胞を注射し、次に抗LILRB4抗体を用いて処置した(図12H)。IgGは対照抗体として働いた。フローサイトメトリーによるLV、BM、SP、およびPBの分析のために移植後25日目にマウスを殺した。ヒトAML細胞の存在を抗ヒトCD45抗体染色により検出した(n=3)。図12I、標的とされた免疫細胞集団はNSGマウスにおいて枯渇された。非枯渇(野生型)NSGマウスと比較して、それぞれ抗アジアロGM1抗体、クロドロン酸リポソーム、および抗Ly6G抗体を用いた処置により各々の免疫細胞サブタイプを枯渇させたNSGマウスにおけるNK細胞(CD45⁺CD49b⁺)、マクロファージ(CD11b⁺F4/80⁺)、および好中球(CD11b⁺CD11c⁺)

）頻度の低減の成功を実証する代表的なフローサイトメトリープロット。図12J、CFSE標識化MV4-11細胞（ 5×10^6 /マウス）を、各々の自然免疫細胞を枯渇させたNSGマウスに注射し、直後にIgGまたは抗LILRB4-N297A抗体処置を行った（ $n=5$ ）。注射後20時間におけるPB中のものに対して正規化されたLV、SP、およびBM中の白血病細胞（CFSE陽性）の数を示す。n.s.、有意でない。

【図12-2】図12-1の説明を参照。

【図12-3】図12-1の説明を参照。

【図12-4】図12-1の説明を参照。

【図13】図13A~13Cは、抗LILRB4は初代AML細胞の浸潤を阻害することを示す。抗LILRB4抗体またはIgG対照を用いた処置後のNSGマウス（ $n=5$ ）におけるヒト初代単球性AML細胞の浸潤の比較。図13A~13B、単球性AML患者からの初代ヒト末梢血単核細胞を注射した。図13C、異種移植された初代ヒト単球性AML細胞（ヒトCD45⁺LILRB4⁺細胞）と共にマウス肝細胞を注射した。n.s.、有意でない。全てのp値は両側スチューデントt検定からのものであった。

【図14】図14A~14Gは、AML細胞におけるAPOEの喪失はインビトロでT細胞増殖を回復させ、AML細胞遊走を抑制することを示す。イムノプロットによるapoeノックアウトTHP-1およびMV4-11細胞におけるAPOE発現の試験（図14Aおよび図14C）。初代T細胞および照射THP-1またはMV4-11細胞（E:T=2:1）をそれぞれ下および上チャンバー中でインキュベートした。7日後にT細胞を写真撮影し（図14Bおよび図14D、スケールバー、100 μ m）、フローサイトメトリーにより定量化した（図14Iおよび図14E）。図14F~G、APOEの喪失はヒトAML THP-1およびMV4-11細胞の経内皮遊走を抑制する（ $n=4$ の生物学的に独立した試料、平均およびs.e.m.）。

【図15-1】図15A~15Dは、LILRB4はSHP-2のリン酸化およびNF- κ Bシグナル伝達を上方調節することを示す。図15A、リン酸化SHP-2、リン酸化IKB、uPAR、およびARG1は、MV4-11細胞においてlilrb4-ノックアウト（KO）で下方調節された。図15B、共免疫沈降は、LILRB4はTHP-1細胞においてSHP-2と相互作用することを実証した。図15C~15D、2つの異なるNF- κ B阻害剤は、LILRB4依存的にTHP-1細胞による抑制からT細胞増殖を回復させた。THP-1細胞を様々な用量のNF- κ B阻害剤を用いて1時間、前処理した。初代T細胞および照射した前処理THP-1細胞（E:T=2:1）をそれぞれ下および上チャンバー中で培養した。7日後にT細胞を写真撮影し（図15C、スケールバー、100 μ m）、フローサイトメトリーにより分析した（図15D）。n.s.、有意でない。

【図15-2】図15-1の説明を参照。

【図16-1】図16A~16Hは、LILRB4はuPARおよびアルギナーゼ-1を上方調節してT細胞活性を抑制し、白血病遊走を促進することを示す。図16A、表面uPARは、lilrb4ノックアウトTHP-1およびMV4-11 AML細胞において下方調節された。図16B、健常ドナーから単離されたT細胞を抗CD3/CD28コーティングビーズおよびrhIL-2と培養し、示されている濃度のuPARタンパク質を3日間添加した（ $n=4$ の生物学的に独立した試料）。倒立顕微鏡を使用して代表的な細胞を写真撮影し、T細胞をフローサイトメトリーにより分析した。図16C、uPARおよびアルギナーゼ-1（ARG1）の発現は、lilrb4ノックアウトTHP-1およびMV4-11 AML細胞において下方調節される。図16D、比色法（DARG-100、BioAssay system）により決定されたアルギナーゼ活性は、lilrb4-KO THP-1およびMV4-11細胞の培養上清において減少した。図16E、初代T細胞および照射した示されているTHP-1細胞（E:T=2:1）をそれぞれ下および上チャンバー中でインキュベートし、0.002 U/Lの組換えARG1タンパク質を7日間添加した。T細胞を写真撮影した。図16F、健常ドナーから単離されたT細胞を抗CD3/CD28コーティングビーズおよびrhIL-2と培養し、示されている濃度のARG1タンパク質を3日間添加した（ $n=4$ の生物学的に独立した試料）。倒立顕微鏡を使用して代表的な細胞を写真撮影し、T細胞をフローサイトメトリーにより分析した。図16G、個々の単球性AML患者から単離された自己T細胞を同じ患者からの照射lilrb4陽性またはlilrb4陰性初代白血病細胞と10:1のE:Tでインキュベートし、組換え抗LILRB4抗体、APOE-VLDL、uPARまたはARG1を添加した。pT、患者T細胞。

抗CD3/CD28/CD137コーティングビーズおよびrhIL-2との14日間の培養後に、T細胞を抗CD3、抗CD4、および抗CD8抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した。図16H、培地への組換えuPARまたはARG1の添加は、内皮を越えるlilrb4-KO THP-1またはlilrb4-KO MV4-11細胞の遊出能力の減少をレスキューした ($n=3$)。スケールバー、100 μm 。n.s.、有意でない。全てのp値は両側スチューデントt検定からのものであった。

【図16-2】図16-1の説明を参照。

【図16-3】図16-1の説明を参照。

【図16-4】図16-1の説明を参照。

【図17A】図17A~17Bは、初代ヒト単球性AML細胞におけるSHP-2/NF- κ Bシグナル伝達ならびにuPARおよびアルギナーゼ-1発現の検出を示す。図17A、LILRB4陽性または-high CD33⁺AML細胞（赤四角）およびLILRB4陰性または-low CD33⁺AML細胞（青四角）を、Y580におけるリン酸化SHP-2、S176/S180におけるリン酸化IKK α / β 、S529におけるリン酸化NF- κ B、uPAR、およびアルギナーゼ-1（ARG1）のさらなる細胞内染色のためにゲーティングした。アイソタイプIgGを陰性対照として使用した。赤の数はLILRB4陽性または-high CD33⁺AML細胞のMFI（平均蛍光強度）を指し示し、青の数はLILRB4陰性または-low CD33⁺AML細胞のMFIを示す。図17B、LILRB4陽性またはLILRB4-high CD33⁺AML細胞と、LILRB4陰性またはLILRB4-low CD33⁺AML細胞とにおける、個々の染色の定量化。

【図17B】図17Aの説明を参照。

【図18】図18は、LILRB4がT細胞を抑制し、白血病浸潤を促進する機序についての図式を示す。

【図19A】図19A~19Dは、白血病細胞および正常造血細胞におけるLILRB4媒介性の細胞内シグナル伝達の比較を示す。図19A~19B、APOEは白血病細胞におけるLILRB4細胞内シグナル伝達を活性化させる。示されているTHP-1細胞および初代AML（M5）細胞を終夜血清飢餓させ、次に、示されている濃度のヒト組換えAPOEタンパク質を用いて、示されている時間にわたり処理した。ホスホ-SHP-2、ホスホ-NF κ B、およびアルギナーゼ-1をウェスタンブロッティングにより調べた。図19C、正常単球またはインビトロ分化マクロファージに対するAPOEの効果。正常単球は健康ドナーから単離し、マクロファージは、インビトロでの1週間の分化後のこれらの単球から派生させた。細胞を終夜血清飢餓させ、次に、示されている濃度のヒト組換えAPOEタンパク質を用いて、示されている時間にわたり処理した。ホスホ-SHP-2、ホスホ-NF κ B、およびアルギナーゼ-1をウェスタンブロッティングにより調べた。図19D、APOEはAML細胞上でのuPAR上方調節を誘導するが、正常単球においては誘導しない。正常単球を健康ドナーから単離した。示されている初代AML細胞および正常単球を終夜血清飢餓させ、次に20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のヒト組換えAPOEタンパク質を用いて8時間処理した。表面uPARをフローサイトメトリーにより調べた。代表的なフロープロットを示しており、平均蛍光強度を右上角に示した（黒、PBS対照；赤、APOE処理）。実験は、類似した結果と共に3回行った。p値は両側スチューデントt検定からのものであった。

【図19B】図19Aの説明を参照。

【図19C】図19Aの説明を参照。

【図19D】図19Aの説明を参照。

【図20】図20A~20Bは、抗LILRB4は正常造血細胞の生着に影響しないことを示す。図20A、2人の健康ドナーからの正常単球上ならびにWTおよびlilrb4-KO THP-1細胞上のLILRB4表面発現の比較。図20B、抗LILRB4抗体は正常単球のホーミング能力に影響しなかった。ヒト正常単球（図20Aに示す）をCD14陽性選択を通じて単離した。これらの単離された単球をプールし、CFSEにより染色した。染色後に、単球（各マウスについて 5×10^6 個）をNSGマウスに注射し、直後に抗体処置を行い、次にマウス ($n=4$) を移植の20時間後に 殺した。フローサイトメトリーにより決定された末梢血中のものに対して肝臓、脾臓、および骨髄中のCFSE⁺細胞の数を正規化した。

【図21-1】図21A～21Cは、MDSC上に発現されたLILRB4はT細胞を抑制することを示す。図21A、UTSWコホートからの11の固形がん患者血液試料からフィコール密度勾配遠心分離により末梢血単核細胞を単離した。MDSC (CD14⁺HLA-DR^{low/-}) 上のLILRB4の表面発現をフローサイトメトリーにより決定した。図21B、自己T細胞を、LILRB4陽性または陰性MDSCと共に、示されているE:S比 (E、エフェクトT細胞; S、MDSC抑制細胞) で5日間T細胞培養培地 (10%のFBS、30U/mlのヒトIL-2および1:1のビーズ対細胞比の抗CD3/CD28 Dynabeadsを添加したRPMI-1640培地) 中で培養した。T細胞の代表的な写真を示した。図21C、抗LILRB4はインビトロ骨髓由来抑制細胞 (MDSC) /T細胞共培養においてT細胞からのIFN γ 分泌を増加させる。T細胞 (E:エフェクター細胞; CD3⁺) およびMDSC (S:抑制細胞; HLA-DR^{low/-}CD14⁺) を黒色腫患者の末梢血から単離した。T細胞をMDSCと5日間共インキュベートした。E:S=2:1。培養培地の上清を収集し、IFN γ のレベルをELISAにより決定した。実験は3連で行った。

10

【図21-2】図21-1の説明を参照。

【図22】図22は、ELISAによる濃度滴定 (0～10 μ g/ml) を使用したヒトLILRB4 ECDに結合する例示的なLILRB4モノクローナル抗体 (mAb) の決定を示す。X軸は抗体濃度を指し示し、Y軸はOD (450nm) における結合シグナルである。LILRB4 ECD組換えタンパク質を高吸収96ウェルプレートにコーティングした。段階希釈 (3倍) したLILRB4 mAbをコーティング/ブロッキングしたものに、二次抗体としてヤギ抗ウサギIgG F (ab)₂コンジュゲートHRPを使用して検出した。EC50の推定のためにGraphPadソフトウェアを使用し、4パラメータフィッティング曲線を使用して滴定曲線のフィッティングを行った。

20

【図23】図23A～23B。図23Aは、LILRB4細胞外ドメイン (ECD) の図式である。APOEによるLILRB4の活性化を有意に低減した2つの残基、W106およびY121の変異を示し、これらは、それぞれ第1のIgドメイン中および2つのIgドメインの間のリンカー中に位置する。図23Bは、ヒトLILRB4のIgドメイン-1 (D1ドメイン) に結合する例示的なLILRB4 mAbの決定を示す。X軸は抗体濃度を指し示し、Y軸はOD (450nm) における結合シグナルである。LILRB4 D1組換えタンパク質を高吸収96ウェルプレートにコーティングした。段階希釈 (3倍) したLILRB4 mAbをコーティング/ブロッキングしたプレートに加え、二次抗体としてヤギ抗ウサギIgG F (ab)₂コンジュゲートHRPを使用して検出した。LILRB4のD1ドメインは単独で7つのmAbによる結合のために十分である一方、D1は単独ではこのアッセイにおいてB4-193 (青色の塗りつぶし無しの三角形) による結合のために十分でない。

30

【図24】図24A～24B。図24Aは、LILRB4膜タンパク質の概略図である。細胞外ドメイン中のIgドメイン-1 (D1)、Igドメイン-2 (D2) およびストーク領域 (SR) を、D1ドメインを認識する抗体の実例と共に示す。図24Bは、B4-193の結合ドメインの決定を示す。ヒトLILRB4組換えタンパク質のLILRB4 D1ドメイン (D1)、D2ドメイン (D2)、ストーク領域 (SR)、D1+D2、D2+SR、および全長ECD (D1+D2+SR) を、高吸収96ウェルプレート上にコーティングした。段階希釈 (3倍) したB4-193を、コーティング/ブロッキングしたプレートに加え、二次抗体としてヤギ抗ウサギIgG F (ab)₂コンジュゲートHRPを使用して検出した。このアッセイにおいてB4-193のみはヒトLILRB4の全長ECDに結合する。

40

【図25】図25は、B4-193の結合に対するLILRB4上のアミノ酸Y121 (位置121におけるチロシン。この位置121におけるYのナンバリングはD1の前の追加のN末端配列の文脈におけるものであり、この位置は、先行するN末端配列無しでD1において開始するSEQ ID NO:238におけるY98と同じであることに留意されたい) の寄与を示す。野生型およびY121A変異型ヒトLILRB4 ECD組換えタンパク質を高吸収96ウェルプレートにコーティングした。段階希釈 (3倍) したmAb B4-193をコーティング/ブロッキングしたプレートに加え、二次抗体としてヤギ抗ウサギIgG F (ab)₂コンジュゲートHRPを使用して検出した。LILRB4のY121A変異は、LILRB4へのB4-193の結合を有意に減少させた。

【図26】図26は、Octetを使用して決定された例示的なLILRB4抗体についての速度論

50

的結合測定（センサーグラム）を示す。30 $\mu\text{g/mL}$ の抗体をプロテインAセンサーに4分間ロードした。キネティクスバッファー（kinetics buffer）中での短いベースライン後に、ロードしたセンサーを一連の組換えヒトLILRB4濃度（0.1～200nM）に曝露し、バックグラウンドサブトラクションを使用してセンサーのドリフティングについて補正した。全ての実験は1,000rpmでの振とうと共に行った。抗体のみをロードした参照センサーからバックグラウンド波長シフトを測定した。ForteBioのデータ解析ソフトウェアを使用して1:1結合モデルへのデータのフィッティングを行い、会合速度および解離速度を抽出した。ForteBioのデータ解析ソフトウェア7.0を使用し、比 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ によりKDを算出した。

【図27】図27は、例示的なLILRB4 mAbのエピトープ結合を示す。古典的なサンドイッチエピトープビニング実験を8チャンネルRed96において行った。第1の抗体（40 $\mu\text{g/mL}$ ）をプロテインAセンサーに4分間ロードし、センサー上の残りのFc結合部位を、関連しないウサギ抗体（20 $\mu\text{g/mL}$ ）を用いて4分間ブロッキングし、続いてセンサーをキネティクスバッファーに10秒間浸した。次にセンサーを組換えLILRB4（25 $\mu\text{g/mL}$ ）に4分間曝露した。最後に、センサーを第2の抗体（40 $\mu\text{g/mL}$ ）に4分間曝露して結合をチェックした。未加工データをForteBioのデータ解析ソフトウェア7.0を使用して処理し、競合的結合について抗体ペアを評価した。第2の抗体による追加の結合は非占有のエピトープ（非競合物「-」）を指し示し、結合がないことはエピトープブロック（競合物「+」）を示す。

【図28A】図28A～28Cは、例示的なLILRB4抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【図28B】図28Aの説明を参照。

【図28C】図28Aの説明を参照。

【図29A】図29A～29Cは、例示的なLILRB4抗体の重鎖可変領域の核酸配列を示す。

【図29B】図29Aの説明を参照。

【図29C】図29Aの説明を参照。

【図30A】図30A～30Cは、例示的なLILRB4抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。

【図30B】図30Aの説明を参照。

【図30C】図30Aの説明を参照。

【図31A】図31A～31Cは、例示的なLILRB4抗体の軽鎖可変領域の核酸配列を示す。

【図31B】図31Aの説明を参照。

【図31C】図31Aの説明を参照。

【図32】図32は、異なる濃度（0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ および10 $\mu\text{g/mL}$ ）の例示的な抗LILRB4抗体によるAPOE競合を示す。APOE活性の有効なブロックは、PBS対照と比較して低減したGFP陽性（%）として示される。

【図33】図33は、異なる濃度（0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ および10 $\mu\text{g/mL}$ ）の例示的な抗LILRB4抗体とのLILRB4レポーター細胞/K562共培養を示す。アゴニスト抗体候補は、K562細胞上のFc受容体による抗体の潜在的な架橋に起因してこのアッセイにおいてPBS対照と比較して相対的により高いGFP陽性（%）に繋がりが得る。

【図34】図34は、異なる濃度（0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ および10 $\mu\text{g/mL}$ ）のコーティングされた抗LILRB4抗体を用いて処理されたLILRB4レポーター細胞を示す。LILRB4細胞外ドメインを認識する抗体は、このアッセイにおけるプラスチック表面上の抗体の固定化に起因して、PBS対照と比較して陽性GFP（%）シグナルを示す傾向がある。

【図35】図35は、異なる濃度（0.1 $\mu\text{g/mL}$ 、1 $\mu\text{g/mL}$ および10 $\mu\text{g/mL}$ ）の可溶性の抗LILRB4抗体を用いて処理されたLILRB4レポーター細胞を示す。

【図36】図36は、フローサイトメトリーによるカニクイザルLILRB4（cynob4）発現CHO細胞に結合する例示的な抗LILRB4抗体を示す。

【図37】図37は、例示的な抗LILRB4抗体によるLILRBファミリーメンバー、LILRAファミリーメンバーの他に、カニクイザルLILRB4（cynob4）との交差反応性を示す。「+」は、特定の組換えタンパク質との抗体の結合を示す。

【図38】図38は、例示的な抗LILRB4抗体ウサギ#B4-193はTHP-1細胞によるT細胞抑制をレスキューすることを示す。

【図39A】図39A～39Cは、例示的な抗LILRB4抗体Rab-#128-3およびRab-#193はTHP-1異種移植マウスにおいて白血病発症を阻害することを示す。

【図39B】図39Aの説明を参照。

【図39C】図39Aの説明を参照。

【図40】図40は、フローサイトメトリーにより決定されたヒトLILRB4タンパク質へのh193抗体の結合を示す。各ヒストグラムバーの下のは、表8に示される特有の組換えヒト化抗体を指す。抗体39は、関連しない抗体である。抗体39およびPBSの両方は陰性対照として働く。

【図41A】図41A～41Mは、LILRB4タンパク質へのh193抗体の特異的結合を示す。図41A～41Lは、h193抗体でコーティングされたプレートにLILRレポーター細胞を加えるLILRレポーターアッセイにより決定されたh193抗体の特異性を示す。レポーター細胞の表面上のLILRメンバーのECDへのh193抗体の結合はGFPシグナルを誘導した。図41Mは、ELISAにより決定された例示的なh193抗体の特異性を示す。LILRAおよびLILRB組換えタンパク質を高吸収96ウェルプレートにコーティングした。段階希釈（5倍）mAb h193をコーティング/ブロッキングしたプレートに加え、二次抗体としてヤギ抗ヒトIgG F(ab)₂コンジュゲートHRPを使用して検出した。

【図41B】図41Aの説明を参照。

【図41C】図41Aの説明を参照。

【図41D】図41Aの説明を参照。

【図41E】図41Aの説明を参照。

【図41F】図41Aの説明を参照。

【図41G】図41Aの説明を参照。

【図41H】図41Aの説明を参照。

【図41I】図41Aの説明を参照。

【図41J】図41Aの説明を参照。

【図41K】図41Aの説明を参照。

【図41L】図41Aの説明を参照。

【図41M】図41Aの説明を参照。

【図42】図42は、フローサイトメトリーにより決定されたカニクイザルLILRB4へのh193抗体の結合を示す。各ヒストグラムバーの下のは、表8に示される特有の組換えヒト化抗体を指す。抗体39は、関連しない抗体である。抗体39およびPBSの両方は陰性対照として働く。

【図43】図43Aおよび43Bは、ApoE競合アッセイ（図43A）およびK562共培養アッセイ（図43B）を使用したh193抗体の効果を示す。各ヒストグラムバーの下のは、表8に示される特有の組換えヒト化抗体を指す。抗体39は、関連しない抗体である。抗体39およびPBSの両方は陰性対照として働く。

【図44A】図44A～44Dは、PBMC（末梢血単核細胞）におけるサイトカイン分泌のモジュレートにおけるh193抗体の効果を測定したサイトカインアレイアッセイの結果を示す。

【図44B】図44Aの説明を参照。

【図44C】図44Aの説明を参照。

【図44D】図44Aの説明を参照。

【図45A】図45A～45Dは、THP-1細胞と共培養されたPBMC細胞におけるサイトカイン分泌のモジュレートにおけるh193抗体の効果を測定したサイトカインアレイアッセイの結果を示す。

【図45B】図45Aの説明を参照。

【図45C】図45Aの説明を参照。

【図45D】図45Aの説明を参照。

【図46A】図46A～46Dは、ヒトIgGを用いて処理されたPBMCおよびヒトIgGを用いて処理されたTHP-1細胞と共培養されたPBMCにおけるサイトカイン分泌を比較したサイトカインアレイアッセイの結果を示す。

【図46B】図46Aの説明を参照。

【図46C】図46Aの説明を参照。

【図46D】図46Aの説明を参照。

【図47】図47は、図44～46のサイトカインアレイアッセイの例示的な画像（2連）を示す。

【図48】図48は、例示的なh193抗体は異種移植マウスモデルにおいて白血病発症を抑制したことを示す。

【図49A】図49A～49Dは、LILRB4およびh193の複合体の結晶構造を示す。図49A、LILRB4/h193 scFv複合体の全体構造を模式的表現で示す。h193（重鎖、橙色；軽鎖、黄色）は、LILRB4分子（マゼンタ）のD1D2ヒンジループ、ならびにD2ドメインのBCおよびC'Eループに結合する。LILRB4の部分に結合するh193の重鎖（図49B）および軽鎖（図49C）の原子相互作用の詳細を示す。相互作用に関与する残基を棒として示し、標識している。水素結合を赤の破線として示す。図49D、h193が接触したLILRB4の結合表面。h193重鎖または軽鎖と接触した残基をそれぞれ橙色または黄色としており、重鎖および軽鎖の両方により結合された重なり合う残基を緑色としている。

【図49B】図49Aの説明を参照。

【図49C】図49Aの説明を参照。

【図49D】図49Aの説明を参照。

【発明を実施するための形態】

【0029】

例示的な実施形態の説明

本発明者らは、がん治療のために使用することができるLILRB4タンパク質、ITIM含有受容体を認識する一群の新規のモノクローナル抗体を単離した。LILRB4は、一部の腫瘍細胞上、殊に白血病細胞上で上方調節され、腫瘍成長を促進する。同定された抗ヒトLILRB4抗体は、LILRB4シグナル伝達をブロックし、がんに対する免疫をモジュレートすることができる。

【0030】

本開示の以下の説明は、単に本開示の様々な態様を説明することを意図している。そのため、議論される特定の改良は本開示の範囲を限定するものと解されてはならない。本開示の範囲から離れることなく様々な均等、変更、および改良を行ってもよいことは当業者に明らかであり、そのような同等の態様は本発明に包含されることが理解される。刊行物、特許および特許出願を含む本明細書において引用されている全ての参考文献は、参照によりそれらの全体が本明細書に組み入れられる。

【0031】

I. 定義

以上の概要および以下の詳細な説明の両方は例示的および説明的なものに過ぎず、特許請求の範囲の発明を限定するものではないことが理解されるべきである。本出願において、単数形の使用は、そうでないことが具体的に記載されていない限り、複数形を包含する。本出願において、「または」の使用は、そうでないことが記載されていない限り、「および/または」を意味する。さらには、「含む」（including）の他に、「含む」（includes）および「含まれる」（included）などの他の形態の用語の使用は、限定的なものではない。また、「構成要素」または「成分」などの用語は、そうでないことが具体的に記載されていない限り、1つのユニットを含む構成要素および成分ならびに1つより多くのサブユニットを含む構成要素および成分の両方を包含する。また、「部分」（portion）という用語の使用は、部分（moiety）の一部または部分（moiety）全体を含むことができる。

【0032】

本明細書において、単数形「a」、「an」および「the」は、そうではないことを文脈が

10

20

30

40

50

明記していない限り、複数への言及を含む。

【0033】

量、時間的期間などの測定可能な値を指すときに本明細書において使用される「約」という用語は、特定された値から±10%までのバリエーションを包含することを、意図している。別のことが示されていない限り、本明細書および特許請求の範囲において使用される成分の量、分子量などの特性、反応条件などを表す全ての数は、全ての場合に「約」という用語により修飾されているものと理解されるべきである。したがって、そうでないことが示されていない限り、以下の明細書および添付の特許請求の範囲に記載されている数値的パラメータは、開示される主題により得ようとする所望の特性に応じて変化し得るおおよそのものである。少なくとも、そして特許請求の範囲への均等論の適用を制限しようとするものではなく、各数値パラメータは、少なくとも、報告された有効数字の数に照らしておよび通常の丸めの技術を適用することにより解されるべきである。発明の広範な範囲を記載する数値範囲およびパラメータはおおよそのものであるが、特定の例に記載されている数値は可能な限り精密に報告されている。しかしながら、任意の数値は、それらの各々の試験測定に見られる標準偏差の結果として必然的にもたらされるいくらかの誤差を本質的に含有する。

【0034】

「抗体」という用語は、任意のアイソタイプのインタクトな免疫グロブリン、または標的抗原への特異的結合についてインタクトな抗体と競合できるその断片を指し、例えば、キメラ抗体、ヒト化抗体、完全ヒト抗体、および二重特異性抗体を含む。「抗体」は、抗原結合タンパク質の一種である。インタクトな抗体は、一般に、少なくとも2つの全長重鎖および2つの全長軽鎖を含むが、いくつかの例では、重鎖のみを含むことができるラクダ科動物において天然に存在する抗体など、より少ない鎖を含むことができる。抗体は、単一の供給源のみに由来してもよいし、または「キメラ」であってもよい、すなわち、以下にさらに記載されているように、抗体の異なる部分が2つの異なる抗体に由来してもよい。抗原結合タンパク質、抗体、または結合断片は、ハイブリドーマにおいて、組換えDNA技術により、またはインタクトな抗体の酵素もしくは化学分解により製造することができる。別のことが示されていない限り、「抗体」という用語は、2つの全長重鎖および2つの全長軽鎖を含む抗体に加えて、その誘導体、バリエーション、断片、およびムテインを含み、これらの例は以下に記載されている。さらには、明示的に除外されていない限り、抗体は、それぞれ、モノクローナル抗体、二重特異性抗体、ミニボディ、ドメイン抗体、合成抗体（本明細書において「抗体模倣物」と称されることがある）、キメラ抗体、ヒト化抗体、ヒト抗体、抗体融合物（本明細書において「抗体コンジュゲート」と称されることがある）、およびこれらの断片を含む。いくつかの態様では、当該用語はまた、ペプチボディを包含する。

【0035】

天然の抗体構造単位は、典型的には、四量体を含む。それぞれのそのような四量体は、典型的には、2つの同一のポリペプチド鎖の対から構成され、各対は1つの全長「軽」鎖（ある特定の態様では、約25kDa）および1つの全長「重」鎖（ある特定の態様では、約50～70kDa）を有する。各鎖のアミノ末端部分は、典型的には、約100～110個またはそれより多くのアミノ酸からなる可変領域を含み、これは典型的に抗原認識に関与する。各鎖のカルボキシ末端部分は、典型的には、エフェクター機能に関与できる定常領域を画定する。ヒト軽鎖は、典型的には、κおよびλ軽鎖として分類される。重鎖は、典型的には、μ、δ、γ、α、またはεとして分類され、それぞれ、IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEとして抗体のアイソタイプを画定する。IgGは、IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含むがこれらに限定されないいくつかのサブクラスを有する。IgMは、IgM1およびIgM2を含むがこれらに限定されないサブクラスを有する。IgAは同様に、IgA1およびIgA2を含むがこれらに限定されないサブクラスにさらに分割される。全長軽鎖および重鎖内で、可変領域と定常領域は、典型的には約12個またはそれより多くのアミノ酸からなる「J」領域により連結され、重鎖は、約10個のさらなるアミノ酸からなる「D」領域も含む。例えば

、Fundamental Immunology, Ch.7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) を参照されたい(参照によりその全体が全ての目的のために組み入れられる)。各軽鎖/重鎖可変領域対は、典型的には、抗原結合部位を形成する。

【0036】

「可変領域」または「可変ドメイン」という用語は、典型的には、重鎖におけるアミノ末端のおおよそ120~130アミノ酸および軽鎖におけるアミノ末端の約100~110アミノ酸を含む、抗体の軽鎖および/または重鎖の一部分を指す。ある特定の態様では、異なる抗体の可変領域は、同じ種の抗体の間でさえもアミノ酸配列が大幅に異なる。抗体の可変領域は、典型的には、特定の抗体のその標的についての特異性を決定する。

【0037】

可変領域は、典型的には、比較的保存されたフレームワーク領域(FR)が、相補性決定領域またはCDRとも呼ばれる3つの超可変領域により連結された、同じ一般構造を呈する。各ペアの2つの鎖のCDRは、典型的には、フレームワーク領域により位置合わせされ、特定のエピトープへの結合を可能とすることができる。軽鎖および重鎖可変領域の両方は、N末端からC末端に向かって、典型的には、FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、およびFR4のドメインを含む。各ドメインへのアミノ酸の割当ては、典型的には、Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991))、Chothia & Lesk, J. Mol. Biol, 196:901-917 (1987) または Chothia et al, Nature, 342:878-883 (1989) の定義にしたがって為される。

【0038】

ある特定の態様では、抗体重鎖は、抗体軽鎖の非存在下で抗原に結合する。ある特定の態様では、抗体軽鎖は、抗体重鎖の非存在下で抗原に結合する。ある特定の態様では、抗体の結合領域は、抗体軽鎖の非存在下で抗原に結合する。ある特定の態様では、抗体の結合領域は、抗体重鎖の非存在下で抗原に結合する。ある特定の態様では、個々の可変領域は、他の可変領域の非存在下で抗原に特異的に結合する。

【0039】

ある特定の態様では、CDRの確定的記述および抗体の結合部位を構成する残基の同定は、抗体の構造の解明および/または抗体-リガンド複合体の構造の解明により達成される。ある特定の態様では、それは、当業者に公知の様々な技術のいずれか、例えばX線結晶構造解析法により達成することができる。ある特定の態様では、様々な解析方法を用いてCDR領域を同定するかまたは概ね決定することができる。そのような方法の例としては、Kabatの定義、Chothiaの定義、AbMの定義、およびcontactの定義が挙げられるがこれらに限定されない。

【0040】

Kabatの定義は、抗体における残基をナンバリングするための標準であり、典型的にはCDR領域を同定するために使用される。例えば、Johnson & Wu, Nucleic Acids Res., 28:214-8 (2000) を参照されたい。Chothiaの定義はKabatの定義と類似するが、Chothiaの定義は、ある特定の構造的ループ領域の位置を考慮に入れる。例えば、Chothia et al, J. Mol. Biol, 196:901-17 (1986); Chothia et al., Nature, 342:877-83 (1989) を参照されたい。AbMの定義は、抗体構造をモデル化するOxford Molecular Groupにより製造された統合された一連のコンピュータープログラムを使用する。例えば、Martin et al, Proc Natl Acad Sci (USA), 86:9268-9272 (1989); 「AbM (商標), A Computer Program for Modeling Variable Regions of Antibodies,」 Oxford, UK; Oxford Molecular, Ltd.を参照されたい。AbMの定義は、Samudrala et al, 「Ab Initio Protein Structure Prediction Using a Combined Hierarchical Approach,」 in PROTEINS, Structure, Function and Genetics Suppl, 3:194-198 (1999) に記載されているように、ナレッジデータベースとアブイニシオ法との組合せを使用して一次配列から抗体の三次構造をモデル化する。contactの定義は、利用可能な複合体結晶構造の解析に基づく。例えば、MacCallum et al, J. Mol. Biol, 5:732-45 (1996) を参照さ

10

20

30

40

50

りたい。

【0041】

慣習により、重鎖におけるCDR領域は典型的にはH1、H2、およびH3と称され、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に順次ナンバリングされる。軽鎖におけるCDR領域は典型的にはL1、L2、およびL3と称され、アミノ末端からカルボキシ末端の方向に順次ナンバリングされる。

【0042】

「軽鎖」という用語は、全長軽鎖、および結合特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有するその断片を含む。全長軽鎖は、可変領域ドメインVLと、定常領域ドメインCLとを含む。軽鎖の可変領域ドメインは、ポリペプチドのアミノ末端にある。軽鎖は、κ鎖およびλ鎖を含む。

10

【0043】

「重鎖」という用語は、全長重鎖、および結合特異性を付与するのに十分な可変領域配列を有するその断片を含む。全長重鎖は、可変領域ドメインVHと、3つの定常領域ドメインCH1、CH2、およびCH3とを含む。VHドメインはポリペプチドのアミノ末端にあり、CHドメインはカルボキシル末端にあり、CH3がポリペプチドのカルボキシ末端に最も近い。重鎖は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4サブタイプを含む)、IgA (IgA1およびIgA2サブタイプを含む)、IgM、およびIgEを含むいずれのアイソタイプであってもよい。

【0044】

二重特異性抗体または二機能性抗体は、典型的には、2つの異なる重鎖/軽鎖対および2つの異なる結合部位を有する人工ハイブリッド抗体である。二重特異性抗体は、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結が挙げられるがこれらに限定されない様々な方法により製造されることができる。例えば、Songsivilai et al, Clin. Exp. Immunol, 79:315-321 (1990) ; Kostelny et al., J. Immunol, 148:1547-1553 (1992) を参照されたい。

20

【0045】

「抗原」という用語は、適応免疫応答を誘導できる物質を指す。具体的には、抗原は、適応免疫応答の受容体の標的として働く物質である。典型的には、抗原は、それ自体では身体中の免疫応答を誘導できない抗原特異的受容体に結合する分子である。抗原は、通常、タンパク質および多糖であり、頻度はより低い脂質のこともある。好適な抗原としては、細菌（外膜、カプセル、細胞壁、鞭毛、線毛 (fimbriae)）、および毒素）、ウイルス、ならびに他の微生物の一部分が非限定的に挙げられる。抗原としては、腫瘍抗原、例えば、腫瘍における変異により生成される抗原も挙げられる。本明細書において使用される場合、抗原としては、免疫原およびハプテンも挙げられる

30

【0046】

本明細書において使用される「抗原結合タンパク質」（「ABP」）は、特定の標的抗原に結合する任意のタンパク質を意味する。本願において、当該特定の標的は、LILRBタンパク質またはその断片である。「抗原結合タンパク質」としては、抗体およびその抗原結合断片が非限定的に挙げられる。ペプチボディは抗原結合タンパク質の別の例である。

40

【0047】

本明細書において使用される「抗原結合断片」という用語は、抗原に特異的に結合できるタンパク質の一部分を指す。ある特定の態様では、抗原結合断片は、抗原に結合するがインタクトな天然抗体構造を含まない1つもしくは複数のCDRを含む抗体または任意の他の抗体断片に由来する。特定の態様において、抗原結合断片は、抗体に由来せず、受容体に由来する。抗原結合断片の例としては、ダイアボディ、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv断片、ジスルフィド安定化Fv断片 (dsFv)、(dsFv)₂、二重特異性dsFv (dsFv-dsFv')、ジスルフィド安定化ダイアボディ (dsダイアボディ)、一本鎖抗体分子 (scFv)、scFv二量体 (二価ダイアボディ)、多重特異性抗体、単ドメイン抗体 (sdAb)、ラクダ科動物抗体またはナノボディ、ドメイン抗体、および二価ドメイン抗体が非限定的に挙げられる

50

。ある特定の態様では、抗原結合断片は、親抗体が結合するのと同じ抗原に結合することができる。ある特定の態様では、抗原結合断片は、1つまたは複数の異なるヒト抗体に由来するフレームワーク領域にグラフトされた、特定のヒト抗体に由来する1つまたは複数のCDRを含んでもよい。特定の態様において、抗原結合断片は、受容体に由来し、1つまたは複数の変異を含有する。特定の態様において、抗原結合断片は、当該抗原結合断片が由来する受容体の天然のリガンドには結合しない。

【0048】

「Fab断片」は、1つの軽鎖ならびに1つの重鎖のCH1および可変領域を含む。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とジスルフィド結合を形成することができない。

【0049】

「Fab'断片」は、1つの軽鎖ならびにVHドメインおよびCH1ドメインを含有し、かつCH1ドメインとCH2ドメインとの間の領域も含有する1つの重鎖の部分を含み、それにより2つのFab'断片の2つの重鎖の間に鎖間ジスルフィド結合を形成してF(ab')₂分子を形成することができる。

【0050】

「F(ab')₂断片」は、2つの軽鎖ならびにCH1ドメインとCH2ドメインとの間の定常領域の部分を含む2つの重鎖を含有し、それにより鎖間ジスルフィド結合が2つの重鎖の間に形成されている。F(ab')₂断片は、したがって、2つの重鎖間のジスルフィド結合により一緒に保持された2つのFab'断片から構成される。

【0051】

「Fc」領域は、抗体のCH1およびCH2ドメインを含む2つの重鎖断片を含む。2つの重鎖断片は、2つ以上のジスルフィド結合およびCH3ドメインの疎水性相互作用により一緒に保持される。

【0052】

「Fv領域」は、重鎖および軽鎖の両方の可変領域を含むが、定常領域を欠いている。

【0053】

「一本鎖抗体」は、重鎖および軽鎖可変領域がフレキシブルリンカーにより接続されて単一のポリペプチド鎖を形成し、それが抗原結合領域を形成する、Fv分子である。一本鎖抗体は、国際特許出願公開W088/01649および米国特許第4,946,778号および同第5,260,203号にて詳細に議論されており、これらの開示は参照により組み入れられる。

【0054】

「ドメイン抗体」は、重鎖の可変領域または軽鎖の可変領域のみを含有する免疫学的に機能的な免疫グロブリン断片である。いくつかの例では、2つ以上のVH領域がペプチドリンカーにより共有結合的に連結されて、二価ドメイン抗体を作出する。二価ドメイン抗体の2つのVH領域は、同じまたは異なる抗原を標的とすることができる。

【0055】

「二価抗原結合タンパク質」または「二価抗体」は、2つの抗原結合部位を含む。いくつかの例では、2つの結合部位は同じ抗原特異性を有する。二価抗原結合タンパク質および二価抗体は二重特異性であることができる。以下を参照されたい。「多重特異性」または「多機能性」抗体以外の二価抗体は、ある特定の態様では、典型的には、同一の結合部位のそれぞれを有するものと理解される。

【0056】

「多重特異性抗原結合タンパク質」または「多重特異性抗体」は、1つより多くの抗原またはエピトープを標的とするものである。

【0057】

「二重特異性 (bispecific)」、「二重特異性 (dual-specific)」または「二機能性」の抗原結合タンパク質または抗体は、それぞれが2つの異なる抗原結合部位を有するハイブリッド抗原結合タンパク質または抗体である。二重特異性抗原結合タンパク質および抗体は、多重特異性抗原結合タンパク質抗体の一種であり、ハイブリドーマの融合またはFab'断片の連結が挙げられるがこれらに限定されない様々な方法により製造されることがで

10

20

30

40

50

きる。例えば、Songsivilai and Lachmann, 1990, Clin. Exp. Immunol.79:315-321; Kostelny et al, 1992, J. Immunol.148:1547-1553を参照されたい。二重特異性抗原結合タンパク質または抗体の2つの結合部位は、同じまたは異なるタンパク質標的に存在できる2つの異なるエピトープに結合する。

【0058】

「結合親和性」は、一般に、分子（例えば、抗体）の単一の結合部位とその結合パートナー（例えば、抗原）との非共有結合性相互作用の総計の強度を指す。別のことが示されていない限り、本明細書において使用される場合、「結合親和性」は、結合対のメンバー（例えば、抗体および抗原）間の1:1の相互作用を反映した内在性の結合親和性を指す。分子XのそのパートナーYについての親和性は、一般に、解離定数（Kd）により表すことができる。親和性は、本明細書に記載されている方法などの、当技術分野において公知の一般的な方法により測定することができる。低親和性抗体は、一般に、抗原にゆっくり結合し、かつ容易に解離する傾向がある一方、高親和性抗体は、一般に、より速く抗原に結合し、かつより長く結合したままとなる傾向がある。結合親和性を測定する様々な方法が当技術分野において公知であり、それらのいずれも本発明の目的のために使用することができる。結合親和性を測定するための特定の説明的および例示的な態様は以下に記載されている。

【0059】

特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに「特異的に結合する」または「特異的な」抗体は、あらゆる他のポリペプチドまたはポリペプチドエピトープに実質的に結合することなく、その特定のポリペプチドまたは特定のポリペプチド上のエピトープに結合する抗体である。例えば、本発明のLILRB4特異的抗体はLILRB4に特異的である。いくつかの態様では、LILRB4に結合する抗体は、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 、または $\leq 0.001\text{nM}$ （例えば 10^{-8}M 以下、例えば $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ 、例えば $10^{-9}\text{M} \sim 10^{-13}\text{M}$ ）の解離定数（Kd）を有する。

【0060】

同じエピトープについて競合する抗原結合タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合断片）の文脈において使用される場合の「競合する」という用語は、試験されている抗原結合タンパク質（例えば、抗体またはその抗原結合断片）が共通の抗原（例えば、LILRBまたはその断片）への参照抗原結合タンパク質（例えば、リガンドまたは参照抗体）の特異的結合を防止または阻害する（例えば、低減させる）アッセイにより決定される抗原結合タンパク質間の競合を意味する。ある抗原結合タンパク質が別の抗原結合タンパク質と競合するかどうかを決定するために多種類の競合結合アッセイを使用することができ、例えば、固相直接または間接ラジオイムノアッセイ（RIA）、固相直接または間接酵素免疫測定法（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（例えば、Stahli et al., 1983, Methods in Enzymology 9:242-253を参照）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（例えば、Kirkland et al., 1986, J. Immunol.137:3614-3619を参照）固相直接標識アッセイ、固相直接標識サンドイッチアッセイ（例えば、Harlow and Lane, 1988, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Pressを参照）；1～125個の標識を使用する固相直接標識RIA（例えば、Morel et al, 1988, Molec. Immunol.25:7-15を参照）；固相直接ビオチン-アビジンEIA（例えば、Cheung, et al, 1990, Virology 176:546-552を参照）；および直接標識RIA（Moldenhauer et al, 1990, Scand. J. Immunol.32:77-82）がある。典型的には、そのようなアッセイは、これらの非標識試験抗原結合タンパク質と標識参照抗原結合タンパク質のいずれかを有する、固体表面または細胞に結合した精製抗原の使用を伴う。競合阻害は、試験抗原結合タンパク質の存在下で固体表面または細胞に結合した標識の量を決定することにより測定される。通常、試験抗原結合タンパク質は過剰に存在する。競合アッセイにより同定される抗原結合タンパク質（競合抗原結合タンパク質）としては、参照抗原結合タンパク質と同じエピトープに結合する抗原結合タンパク質および立体障害が起こるように参照抗原結合タンパク質が結合するエピトープの十分に近位にある隣接するエピトープに結合する抗原結合タンパク質が挙げられる。競合

結合を決定する方法に関する追加の詳細は、本明細書において実施例にて提供される。通常、競合抗原結合タンパク質が過剰に存在する場合、それは共通の抗原への参照抗原結合タンパク質の特異的結合を少なくとも40~45%、45~50%、50~55%、55~60%、60~65%、65~70%、70~75%、または75%以上阻害する（例えば、低減させる）。いくつかの例では、結合は、少なくとも80~85%、85~90%、90~95%、95~97%、または97%以上阻害される。

【0061】

本明細書において使用される「エピトープ」という用語は、抗体が結合する抗原上の原子またはアミノ酸の特定の群を指す。エピトープは、リニアエピトープまたはコンホメーションエピトープのいずれであってもよい。リニアエピトープは、抗原のアミノ酸の連続的な配列により形成され、それらの一次構造に基づいて抗体と相互作用する。他方、コンホメーションエピトープは、抗原のアミノ酸配列の不連続部分から構成され、抗原の3D構造に基づいて抗体と相互作用する。一般に、エピトープは約5または6アミノ酸の長さである。2つの抗体は、抗原について競合結合を呈する場合、抗原内の同じエピトープに結合し得る。

【0062】

「細胞」は、本明細書において使用される場合、原核性または真核性であることができる。原核細胞としては、例えば、細菌が挙げられる。真核細胞としては、例えば、真菌、植物細胞、および動物細胞が挙げられる。動物細胞（例えば、哺乳動物細胞またはヒト細胞）の種類としては、例えば、循環/免疫系または臓器からの細胞、例えば、B細胞、T細胞（細胞傷害性T細胞、ナチュラルキラーT細胞、制御性T細胞、Tヘルパー細胞）、ナチュラルキラー細胞、顆粒球（例えば、好塩基性顆粒球、好酸性顆粒球、好中性顆粒球および過分葉好中球）、単球またはマクロファージ、赤血球細胞（例えば、網状赤血球）、肥満細胞、栓球または巨核球、および樹状細胞；内分泌系または臓器からの細胞、例えば、甲状腺細胞（例えば、甲状腺上皮細胞、濾胞傍細胞）、副甲状腺細胞（例えば、副甲状腺主細胞、好酸性細胞）、副腎細胞（例えば、クロム親和性細胞）、および松果体細胞（例えば、松果体細胞）；神経系または臓器からの細胞、例えば、グリア芽細胞（例えば、星状膠細胞およびオリゴデンドロサイト）、小膠細胞、巨大細胞性神経分泌細胞、星状細胞、ベッチャー細胞、および下垂体細胞（例えば、性腺刺激ホルモン産生細胞、副腎皮質刺激ホルモン産生細胞、甲状腺刺激ホルモン産生細胞、成長ホルモン産生細胞、およびプロラクチン産生細胞）；呼吸器系または臓器からの細胞、例えば、肺胞上皮細胞（I型肺胞上皮細胞およびII型肺胞上皮細胞）、クララ細胞、杯細胞、および肺胞マクロファージ；循環系または臓器からの細胞（例えば、心筋細胞および周細胞）；消化器系または臓器からの細胞、例えば、胃主細胞、壁細胞、杯細胞、パネート細胞、G細胞、D細胞、ECL細胞、I細胞、K細胞、S細胞、腸内分泌細胞、腸クロム親和性細胞、APUD細胞、および肝臓細胞（liver cell）（例えば、肝細胞（hepatocyte）およびクッパー細胞）；外皮系または臓器からの細胞、例えば、骨細胞（bone cell）（例えば、骨芽細胞、骨細胞（osteocyte））、および破骨細胞）、歯細胞（例えば、セメント芽細胞、およびエナメル芽細胞）、軟骨細胞（cartilage cell）（例えば、軟骨芽細胞および軟骨細胞（chondrocyte））、皮膚/毛細胞（例えば、トリコサイト、ケラチノサイト、およびメラノサイト（母斑細胞）、筋肉細胞（例えば、筋細胞）、脂肪細胞、線維芽細胞、および腱細胞；泌尿器系または臓器からの細胞（例えば、足細胞、糸球体傍細胞、糸球体内メサンギウム細胞、糸球体外メサンギウム細胞、腎臓近位尿細管刷子縁細胞、および緻密斑細胞）；ならびに生殖系または臓器からの細胞（例えば、精子、セルトリ細胞、ライディッヒ細胞、卵子、卵母細胞）が挙げられる。細胞は、正常な健常細胞、または疾患もしくは健常でない細胞（例えば、がん細胞）であることができる。細胞としては、哺乳動物接合体または幹細胞がさらに挙げられ、該幹細胞としては、胚性幹細胞、胎性幹細胞、人工多能性幹細胞、および成体幹細胞が挙げられる。幹細胞は、未分化状態を維持しながら細胞分裂の周期を経て、専門家された細胞種に分化することができる細胞である。幹細胞は、万能性幹細胞、多能性幹細胞、複能性（multipotent）幹細胞、少能性（oligopotent）幹細胞および単能性幹細胞

10

20

30

40

50

であることができ、これらのいずれも、体細胞から誘導され得る。幹細胞としてはまた、がん幹細胞を挙げることができる。哺乳動物細胞は、齧歯動物細胞、例えば、マウス、ラット、ハムスター細胞であることができる。哺乳動物細胞は、ウサギ目細胞、例えば、ウサギ細胞であることができる。哺乳動物細胞はまた、霊長動物細胞、例えば、ヒト細胞であることができる。

【0063】

「キメラ抗原受容体」または「CAR」という用語は、本明細書において使用される場合、免疫細胞、例えば、T細胞またはNK細胞を活性化させるドメインまたはシグナル伝達、例えば、T細胞シグナル伝達またはT細胞活性化ドメインに連結された抗体の抗原結合ドメイン（例えば、単鎖可変断片（scFv））を含有する人工的に構築されたハイブリッドタンパク質またはポリペプチドを指す（例えば、Kershaw et al., 上掲、Eshhar et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90 (2):720-724 (1993)、およびSadelain et al., *Curr. Opin. Immunol.* 21 (2):215-223 (2009)を参照）。CARは、モノクローナル抗体の抗原結合特性の利点を活かして、非MHC拘束方式で免疫細胞の特異性および反応性を選択された標的に向け直すことができる。非MHC拘束抗原認識は、CARを発現する免疫細胞に、抗原プロセッシングとは独立しているため腫瘍回避の主要な機構をバイパスして、抗原を認識する能力を賦与する。追加的に、T細胞において発現される場合、CARは、有利には、内因性のT細胞受容体（TCR） α 鎖および β 鎖と二量体化しない。

【0064】

本明細書において使用される場合、指定された成分に関して「本質的に含まない」は、指定された成分のいずれも意図的に組成物に配合されていないことおよび/または夾雑物としてもしくは微量においてのみ存在することを意味するために本明細書において使用される。組成物の任意の意図されない夾雑の結果としてもたらされる指定された成分の総量は、したがって、0.05%より十分に低い、好ましくは0.01%未満である。指定された成分のいかなる量も標準的な分析方法を用いて検出できない組成物が最も好ましい。

【0065】

「宿主細胞」という用語は、核酸配列で形質転換され、または形質転換されることができ、それにより対象となる遺伝子を発現する、細胞を意味する。当該用語は、対象となる遺伝子が存在する限り、形態または遺伝的構成が元の親細胞と同一であるか否かによらず、親細胞の子孫を含む。

【0066】

「同一性」という用語は、配列をアライメントして比較することにより決定される、2つ以上のポリペプチド分子または2つ以上の核酸分子の配列間の関係性を指す。「同一性パーセント」は、比較されている分子におけるアミノ酸間またはヌクレオチド間の同一の残基のパーセントを意味し、比較されている分子のうちの最小のもののサイズに基づいて算出される。これらの算出のために、アライメント中のギャップ（それがあある場合）は、好ましくは、特定の数学モデルまたはコンピュータープログラム（すなわち、「アルゴリズム」）により対処される。アライメントされた核酸またはポリペプチドの同一性を算出するために使用できる方法としては、Computational Molecular Biology, (Lesk, A. M., ed.), 1988, New York:Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D. W., ed.), 1993, New York:Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A. M., and Griffin, H. G, eds.), 1994, New Jersey:Humana Press; von Heinje, G, 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York:Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York:M. Stockton Press; and Carillo et al, 1988, *SIAM J. Applied Math.*48:1073に記載されている方法が挙げられる。

【0067】

同一性パーセントの算出において、比較される配列は、典型的には、配列間の最大のマッチを与えるようにアライメントされる。同一性パーセントを決定するために使用できる

10

20

30

40

50

コンピュータプログラムの一例は、GAPを含むGCGプログラムパッケージである（Devereux et al, 1984, Nucl. Acid Res.12:387; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.）。コンピュータアルゴリズムGAPは、配列同一性パーセントを決定すべき2つのポリペプチドまたはポリヌクレオチドをアライメントするために使用される。配列は、それらの各々のアミノ酸またはヌクレオチドの最適なマッチのためにアライメントされる（アルゴリズムにより決定される、「マッチしたスパン」）。ギャップ開始ペナルティ（平均対角の3倍として算出され、「平均対角」は使用されている比較マトリックスの対角の平均であり、「対角」は、特定の比較マトリックスにより各完璧なアミノ酸マッチに割り当てられるスコアまたは数である）およびギャップ伸張ペナルティ（通常、ギャップ開始ペナルティの1/10倍）の他に、比較マトリックス、例えばPAM 250またはBLOSUM 62がアルゴリズムと組み合わせて使用される。ある特定の態様では、標準比較マトリックス（PAM 250比較マトリックスについてDayhoff et al, 1978, Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352; BLOSUM 62比較マトリックスについてHenikoff et al., 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 89:10915-10919を参照）もアルゴリズムにより使用される。

【0068】

GAPプログラムを使用するポリペプチドまたはヌクレオチド配列の同一性パーセントの決定に用いることができるパラメーターの例は、Needleman et al, 1970, J. Mol. Biol. 48:443-453に見出すことができる。

【0069】

2つのアミノ酸配列をアライメントするためのある特定のアライメントスキームは、2つの配列の短い領域のみのマッチングをもたらすことがあり、この小さいアライメントされた領域は、2つの全長配列間に有意な関係性がない場合であっても非常に高い配列同一性を有することがある。したがって、選択されたアライメント方法（GAPプログラム）は、標的ポリペプチドの少なくとも50または他の数の連続するアミノ酸にわたるアライメントをもたらすよう、そのように所望される場合に調整することができる。

【0070】

「連結」という用語は、本明細書において使用される場合、分子内相互作用、例えば、共有結合、金属結合、および/もしくはイオン結合、または分子間相互作用、例えば、水素結合もしくは非共有結合を介した会合を指す。

【0071】

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4（LILRB4）は、ヒトにおいてLILRB4遺伝子によりコードされるタンパク質である。この遺伝子は、染色体領域19q13.4における遺伝子クラスター中に見出される白血球免疫グロブリン様受容体（LIR）ファミリーのメンバーである。コードされるタンパク質は、2つまたは4つの細胞外免疫グロブリンドメイン、膜貫通ドメイン、および2〜4つの細胞質免疫受容体チロシンベース抑制モチーフ（ITIM）を含有するLIR受容体のサブファミリーBクラスに属する。この受容体は免疫細胞上に発現され、そこで抗原提示細胞上のMHC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。この受容体はまた、抗原の捕捉および提示において機能することができる。それは、炎症応答および細胞傷害性を制御して、免疫応答を集中させかつ自己反応性を制限することを助けると考えられている。LILRB4はまた、ヒト胃がん細胞において発現され、腫瘍成長を増強し得る。異なるアイソフォームをコードする複数の転写物バリエーションがこの遺伝子について見出されている。LILRB4は、PTPN6と相互作用することが示されている。

【0072】

「機能的に連結されている」という用語は、そのように記載された成分がそれらの通常の機能を行うように構成された構成要素の並びを指す。したがって、ポリペプチドに機能的に連結された所与のシグナルペプチドは、細胞からのポリペプチドの分泌を指示する。プロモーターの場合、コーディング配列に機能的に連結されたプロモーターは、コーディング配列の発現を指示する。プロモーターまたは他の制御エレメントは、それらがその発

10

20

30

40

50

現を指示するように機能する限り、コーディング配列と連続する必要はない。例えば、プロモーター配列とコーディング配列との間に介在性の翻訳されないが転写される配列が存在してもよく、プロモーター配列はそれでもなお、コーディング配列に「機能的に連結され」ていると考えることができる。

【0073】

特許請求の範囲における「または」という用語の使用は、選択肢のみを指すことが明示的に指し示されているか、または選択肢が互いに排他的である場合を除いて、「および/または」を意味するために使用され、但し、本開示は、選択肢のみおよび「および/または」を指す定義をサポートする。本明細書において使用される場合、「別の」は、少なくとも第2のもの、またはさらなるものを意味し得る。

10

【0074】

「ポリヌクレオチド」または「核酸」という用語は、一本鎖および二本鎖の両方のヌクレオチドポリマーを含む。ポリヌクレオチドを構成するヌクレオチドは、リボヌクレオチドもしくはデオキシリボヌクレオチドまたはいずれかの種類のヌクレオチドの修飾形態であってもよい。前記修飾としては、塩基修飾、例えばブロモウリジンおよびイノシン誘導体、リボース修飾、例えば2', 3'-ジデオキシリボース、およびヌクレオチド間連結修飾、例えば、ホスホロチオエート、ホスホロジチオエート、ホスホロセレノエート、ホスホロジセレノエート、ホスホロアニロチオエート、ホスホロアニラデートおよびホスホロアミデートが挙げられる。

【0075】

「ポリペプチド」または「タンパク質」という用語は、天然タンパク質、すなわち、天然に存在する非組換え細胞により産生されるタンパク質のアミノ酸配列を有する高分子を意味し、またはそれは遺伝子操作されたもしくは組換え細胞により産生され、かつ天然タンパク質のアミノ酸配列を有する分子、または天然配列の1つもしくは複数のアミノ酸の欠失、付加、および/もしくは置換を有する分子を含む。該用語はまた、1つまたは複数のアミノ酸が、対応する天然に存在するアミノ酸およびポリマーの化学的なアナログである、アミノ酸ポリマーを含む。「ポリペプチド」および「タンパク質」という用語は、具体的には、LILRB抗原結合タンパク質、抗体、または抗原結合タンパク質の1つもしくは複数のアミノ酸の欠失、付加、および/もしくは置換を有する配列を包含する。「ポリペプチド断片」という用語は、全長天然タンパク質と比較してアミノ末端の欠失、カルボキシル末端の欠失、および/または内部の欠失を有するポリペプチドを指す。そのような断片はまた、天然タンパク質と比較して改変されたアミノ酸を含有することができる。ある特定の態様では、断片は約5~500アミノ酸の長さである。例えば、断片は、少なくとも5、6、8、10、14、20、50、70、100、110、150、200、250、300、350、400、または450アミノ酸の長さであってもよい。有用なポリペプチド断片としては、結合ドメインなどの、抗体の免疫学的に機能的な断片が挙げられる。LILRB結合抗体の場合、有用な断片としては、CDR領域、重鎖および/または軽鎖の可変ドメイン、2つのCDRを含む抗体鎖またはその可変領域のみの部分などが挙げられるがこれらに限定されない。

20

30

【0076】

本発明において有用な薬学的に許容される担体は従来のものである。Remington's Pharmaceutical Sciences, by E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 15th Edition (1975) には、本明細書において開示される融合タンパク質の薬学的送達のために好適な組成物および配合物が記載されている。一般に、担体の性質は、用いられる特定の投与方式に依存する。例えば、非経口配合物は、通常、薬学的および生理学的に許容される液体、例えば、水、生理食塩水、平衡塩溶液、水性デキストロースまたはグリセロールなどをビヒクルとして含む注射液を含む。固体組成物（例えば、粉末、丸剤、錠剤、またはカプセル形態）について、従来の非毒性固体担体は、例えば、薬学的グレードのマニトール、ラクトース、デンプンまたはステアリン酸マグネシウムを含むことができる。生物学的に中性の担体に加えて、投与される薬学的組成物は、微量の非毒性助剤物質、例えば、湿潤剤または乳化剤、防腐剤、およびpH緩衝剤など、例えば酢酸ナトリウムまたは

40

50

ソルビタンモノラウレートを含有することができる。

【0077】

本明細書において使用される場合、「対象」という用語は、ヒトまたは任意の非ヒト動物（例えば、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ブタ、ヒツジ、ウマまたは霊長類動物）を指す。ヒトには、出生前および出生後の形態が含まれる。多くの態様では、対象は人間である。対象は患者であってもよく、患者は、疾患の診断または治療のために医療提供者に現れたヒトを指す。「対象」という用語は、「個体」または「患者」と交換可能に本明細書において使用される。対象は、疾患または障害に罹患しているまたは感受性であり得るが、疾患または障害の症状を示していてもよいし、示していなくてもよい。

【0078】

「治療有効量」または「有効投与量」という用語は、本明細書において使用される場合、疾患または病態を治療するために有効な、薬物の投与量または濃度を指す。例えば、がんを治療するための本明細書に開示されるモノクローナル抗体またはその抗原結合断片の使用に関して、治療有効量は、腫瘍体積を低減すること、腫瘍の全体もしくは部分を根絶すること、腫瘍成長もしくは他の臓器へのがん細胞浸潤を阻害するかもしれないことは遅らせること、がん性状態を媒介する細胞の成長もしくは増殖を阻害すること、腫瘍細胞の転移を阻害するかもしれないことは遅らせること、腫瘍もしくはがん性状態と関連する任意の症状もしくはマーカーを改善すること、腫瘍もしくはがん性状態の発症を予防するかもしれないことは遅延させること、またはそれらのうちのいくつかの組合せが可能な、モノクローナル抗体またはその抗原結合断片の投与量または濃度である。

【0079】

本明細書において使用される病態を「治療すること」またはその「治療」には、病態を予防もしくは軽減すること、病態の発症もしくはその発症速度を遅くすること、病態を発症するリスクを低減させること、病態に関連する症状の発症を予防するもしくは遅延させること、病態に関連する症状を低減するもしくは終了させること、病態の完全もしくは部分的な退縮をもたらすこと、病態を治癒すること、またはこれらのいくつかの組合せが含まれる。

【0080】

本明細書において使用される場合、「ベクター」は、宿主細胞中に導入され、それにより形質転換された宿主細胞を生じさせる核酸分子を指す。ベクターは、宿主細胞中でその複製を可能とする核酸配列、例えば複製起点を含んでもよい。ベクターはまた、当技術分野において公知の1つまたは複数の治療遺伝子および/または選択マーカー遺伝子および他の遺伝因子を含んでもよい。ベクターは、細胞に形質導入し、細胞を形質転換させまたは細胞に感染し、それにより細胞にとって天然のもの以外の核酸および/またはタンパク質を細胞に発現させることができる。ベクターは、細胞内に核酸が入ることの達成を補助する材料、例えば、ウイルス粒子、リポソーム、タンパク質コーティングなどを含んでもよい。

【0081】

II. がん

A. がん

過剰増殖性疾患は、細胞が制御不能に増殖し始めることを引き起こす任意の疾患に関連付けることができるが、その原型的な例はがんである。がんの鍵となる構成要素の1つは、細胞の正常なアポトーシス周期が妨害され、したがって細胞の増殖を妨害する薬剤がこれらの疾患を治療するための治療剤として重要であることである。本開示において、本明細書に記載のチューブリシンアナログは、減少した細胞数をもたらすために使用されてもよく、そのため、様々な種類のがん系を治療するために潜在的に使用され得る。一部の局面では、本明細書に記載のチューブリシンアナログは、実質的に任意の悪性腫瘍を治療するために使用されてもよいことが予期される。ここで、唯一必要となるのは、がん細胞の表面上、特にがん幹細胞の表面上にLILRBが存在することである。

【0082】

本開示にしたがって治療され得るがん細胞としては、膀胱、血液、骨、骨髄、脳、乳房

10

20

30

40

50

、結腸、食道、胃腸、歯肉、頭、腎臓、肝臓、肺、鼻咽頭、頸部、卵巣、前立腺、皮膚、胃、膵臓、精巣、舌、子宮頸部、または子宮からの細胞が挙げられるがこれらに限定されない。加えて、がんは具体的には、これらに限定されないが以下の組織学的種類のものであってもよい：悪性新生物；癌腫；未分化癌；巨細胞および紡錘細胞癌；小細胞癌；乳頭癌；扁平細胞癌；リンパ上皮癌；基底細胞癌；毛母癌；移行細胞癌；乳頭状移行細胞癌；腺癌；悪性ガストリノーマ；胆管癌；肝細胞癌；肝細胞癌と胆管癌との複合癌；小柱腺癌；腺様嚢胞癌；腺腫様ポリプ内腺癌；腺癌、家族性大腸ポリポーシス；固形癌；悪性カルチノイド腫瘍；細気管支肺腺癌；乳頭腺癌；色素嫌性癌；好酸性癌；好酸性腺癌；好塩基性癌；明細胞腺癌；顆粒細胞癌；濾胞腺癌；乳頭濾胞腺癌；非被包性硬化性癌；副腎皮質癌；子宮内膜様癌；皮膚付属器癌；アポクリン腺癌；脂腺腺癌；耳垢腺癌；粘膜類表皮癌；嚢胞腺癌；乳頭状嚢胞腺癌；乳頭状漿液性嚢胞腺癌；粘液性嚢胞腺癌；粘液性腺癌；印環細胞癌；浸潤性管癌；髓様癌；小葉癌；炎症性癌；乳房パジェット病；腺房細胞癌；腺扁平上皮癌；扁平異形成を伴う腺癌；悪性胸腺腫；悪性卵巣間質腫瘍；悪性卵胞膜細胞腫；悪性顆粒膜細胞腫瘍；悪性アンドロblastoma；セルトリ細胞癌；悪性ライディッヒ細胞腫瘍；悪性脂質細胞腫瘍；悪性傍神経節腫；悪性乳房外傍神経節腫；褐色細胞腫；血管球血管肉腫；悪性黒色腫；無色素性黒色腫；表在性黒色腫；巨大色素性母斑内悪性黒色腫；類上皮細胞黒色腫；悪性青色母斑；肉腫；線維肉腫；悪性繊維性組織球腫；粘液肉腫；脂肪肉腫；平滑筋肉腫；横紋筋肉腫；胎児性横紋筋肉腫；肺横紋筋肉腫；間質肉腫；悪性混合腫瘍；ミューラー混合腫瘍；腎芽腫；肝芽腫；癌肉腫；悪性間葉腫；悪性ブレンナー腫瘍；悪性葉状腫瘍；滑膜肉腫；悪性中皮腫；未分化胚細胞腫；胎児性癌；悪性奇形腫；悪性卵巣甲状腺腫；絨毛癌；悪性中腎腫；血管肉腫；悪性血管内皮腫；カポジ肉腫；悪性血管周囲細胞腫；リンパ管肉腫；骨肉腫；傍骨性骨肉腫；軟骨肉腫；悪性軟骨芽腫；間葉性軟骨肉腫；骨の巨細胞腫瘍；ユーイング肉腫；悪性歯原性腫瘍；エナメル上皮歯牙肉腫；悪性エナメル芽細胞腫；エナメル芽細胞線維肉腫；悪性松果体腫；脊索腫；悪性神経膠腫；上衣腫；星状細胞腫；原形質性星状細胞腫；線維性星状細胞腫；星状芽細胞腫；膠芽腫；乏突起膠腫；希突起膠芽腫；未分化神経外胚葉；小脳肉腫；神経節芽細胞腫；神経芽腫；網膜芽腫；嗅神経腫瘍；悪性髄膜腫；神経線維肉腫；悪性神経鞘腫；悪性顆粒細胞腫瘍；悪性リンパ腫；ホジキン病；傍肉芽腫；小リンパ球性悪性リンパ腫；大細胞びまん性悪性リンパ腫；濾胞性悪性リンパ腫；菌状息肉症；他の特定の非ホジキンリンパ腫；悪性組織球増加症；多発性骨髄腫；肥満細胞肉腫；免疫増殖性小腸疾患；白血病；リンパ性白血病；形質細胞白血病；赤白血病；リンパ肉腫細胞白血病；骨髄性白血病；好塩基性白血病；好酸性白血病；単球性白血病；肥満細胞白血病；巨核芽球性白血病；骨髄性肉腫；および有毛細胞白血病。ある特定の局面では、腫瘍は、骨肉腫、血管肉腫、横紋筋肉腫、平滑筋肉腫、ユーイング肉腫、膠芽腫、神経芽腫、または白血病を含み得る。

【0083】

B. 急性骨髄性白血病

急性骨髄性白血病 (acute myelogenous leukemia) としても公知の急性骨髄性白血病 (acute myeloid leukemia: AML) または急性非リンパ性白血病 (ANLL) は、骨髄中に蓄積しかつ正常な血液細胞の産生に干渉する異常な白血球の急速な増殖により特徴付けられる骨髄系列の血液細胞のがんである。AMLは、成人が罹患する最も一般的な急性白血病であり、その発生率は年齢と共に増加する。AMLは、米国におけるがんでの死亡の約1.2%を占める比較的希少な疾患であるが、その発生率は集団の高齢化につれて増加することが予想される。

【0084】

AMLの症状は、正常な骨髄が白血病細胞で置換されて赤血球、血小板、および正常な白血球の低下を引き起こすことにより引き起こされる。これらの症状としては、疲労、息切れ、紫斑ができやすいことおよび出血しやすいこと、および感染のリスクの増加が挙げられる。いくつかのリスク因子および染色体異常が同定されているが、具体的原因は明確でない。急性白血病として、AMLは急速に進行し、治療しない場合、典型的に数週間または数ヶ月以内に致死的なものとなる。

【0085】

AMLはいくつかのサブタイプを有し、治療および予後はサブタイプ間で様々である。サブタイプに応じて、5年生存率は15～70%と様々であり、再発率は33～78%と様々である。AMLは最初に、寛解を誘導することを目的とする化学療法で治療され、患者は追加の化学療法または造血幹細胞移植を受けることに進むことがある。AMLの遺伝学における最近の研究は、どの薬物が特定の患者にとって最もよく機能し得るかの他に、その患者がどれほど長く生存しそうかを予測できる試験を利用可能とした。

【0086】

AMLのほとんどの徴候および症状は、正常な血液細胞が白血病細胞で置換されることにより引き起こされる。正常な白血球産生の欠如は、患者を感染に対して感受性とさせるが、白血病細胞自体は白血球前駆細胞に由来し、感染と戦う能力を有しない。赤血球数の低下（貧血）は、疲労、蒼白、および息切れを引き起こし得る。血小板の欠如は、軽微な外傷で紫斑ができやすいことまたは出血しやすいことに繋がり得る。

【0087】

AMLの早期の徴候は、多くの場合、不明瞭かつ非特異的であり、インフルエンザまたは他の一般的な病気のそれに類似することがある。いくつかの一般化された症状としては、発熱、疲労、体重減少または食欲不振、息切れ、貧血、紫斑ができやすいことまたは出血しやすいこと、点状出血（出血により引き起こされる皮膚下の扁平帽針頭大の斑点）、骨および関節痛、および持続性または頻繁な感染症が挙げられる。

【0088】

脾臓の腫大がAMLにおいて起こることがあるが、それは典型的に軽度かつ無症候性である。急性リンパ芽球性白血病とは対照的に、リンパ節腫脹はAMLにおいてはまれである。皮膚は、皮膚白血病の形態の時間の約10%に関与する。稀に、スウィート症候群、皮膚の腫瘍随伴炎症がAMLと共に起こることがある。

【0089】

AMLを有する一部の患者は、歯肉組織への白血病細胞の浸潤により歯肉の腫脹を経験することがある。稀に、白血病の最初の徴候は、緑色腫と呼ばれる、骨髄の外側での固形の白血病性の塊または腫瘍の発生である場合がある。時折、人は症状を示さないことがあり、白血病が常用血液試験の間に偶然発見されることがある。

【0090】

AMLの発症についての多数のリスク因子が同定されており、それらとしては、他の血液障害、化学的曝露、電離放射線、および遺伝学が挙げられる。

【0091】

骨髄異形成症候群または骨髄増殖性疾患などの「前白血病性」血液障害は、AMLに進展することがあり、正確なリスクはMDS/MPsの種類に依存する。抗がん化学療法、特にアルキル化剤への曝露は、その後にAMLを発症するリスクを増加させ得る。リスクは化学療法の約3～5年後に最も高い。他の化学療法剤、具体的にはエピドフィロトキシンおよびアントラサイクリンもまた、治療関連白血病に関連付けられている。これらの治療関連白血病は、多くの場合、白血病細胞における特定の染色体異常に関連する。ベンゼンおよび他の芳香族有機溶媒への職業上の化学的曝露は、AMLの原因として議論を呼ぶものである。ベンゼンおよびその誘導体の多くは、インビトロで発癌性であることが公知である。ベンゼンへの職業上の曝露とAMLの増加したリスクとの関連が一部の研究により示唆されているが、帰すことができるリスクが、それがあったとしても、わずかであることを他の研究は示唆している。高量の電離放射線曝露はAMLのリスクを増加させ得る。AMLについて遺伝性リスクが存在するようである。偶然のみで予測されるよりも高い率で家族内でAMLを発症する多数の症例が報告されている。いくつかの先天的条件が白血病のリスクを増加させることがあり、最も一般的なものは恐らくダウン症候群であり、これはAMLのリスクの10～18倍の増加に関連する。

【0092】

AMLの診断の最初の手掛かりは、典型的には、全血球計算での異常な結果である。過剰の異常な白血球（白血球増加症）が一般的な所見であり、白血病性芽球が時に見られるが

10

20

30

40

50

、AMLはまた、単離される血小板、赤血球の減少を示すこともあり、または低い白血球数（白血球減少症）を示すことすらある。AMLの推定診断は、循環する白血病性芽球がある場合、末梢血スミアの検査を介して行うことができるが、確定診断は、通常、十分な骨髓吸引および生検を必要とする。

【0093】

白血病の存在を診断するため、AMLを他の種類の白血病（例えば、急性リンパ芽球性白血病-ALL）から区別するため、および疾患のサブタイプ（下記を参照）を分類するために、顕微鏡法の他に、フローサイトメトリーを介して髄または血液が検査される。髄または血液の試料は、典型的には、常用の細胞遺伝学または蛍光インサイチュハイブリダイゼーションにより染色体異常についても試験される。疾患のアウトカムに影響を及ぼし得るFMS様チロシンキナーゼ3（FLT3）、ヌクレオフォスミン、およびKITなどの遺伝子における特定の変異を見つけるために遺伝子研究を行うこともできる。

【0094】

血液および骨髓スミアに対する細胞化学染色は、ALLからのAMLの区別、およびAMLの細分類において助けになる。ミエロペルオキシダーゼまたはスダンブラック染色および非特異的エステラーゼ染色の組合せは、ほとんどの場合、所望の情報を提供する。ミエロペルオキシダーゼまたはスダンブラック反応は、AMLの素性の確立およびそのALLからの区別において最も有用である。AMLにおける単球成分を同定するためおよび低分化単芽球性白血病をALLから区別するために非特異的エステラーゼ染色が使用される。

【0095】

AMLの診断および分類は困難なことがあり、有資格の血液病理医または血液学者により行われるべきである。直接的な症例では、ある特定の形態学的特徴（アウエル小体など）の存在または特定のフローサイトメトリーの結果によりAMLを他の白血病から区別することができるが、そのような特徴の非存在下では診断はより困難なことがある。

【0096】

広く使用されているWHOの基準によれば、AMLの診断は、白血病性骨髓芽球による血液および/または骨髓の20%より多くの関与を実証することにより確立される。French-American-British（FAB）分類はこれより少し厳格であり、AMLの診断のために骨髓（BM）または末梢血（PB）において少なくとも30%の芽球パーセンテージを必要とする。AMLは、異なる治療が為される「前白血病性」状態、例えば骨髓異形成または骨髓増殖性症候群から慎重に区別されなければならない。

【0097】

急性前骨髓球性白血病（APL）は最も高い治癒可能性を有し、独特の形態の治療を必要とするので、このサブタイプの白血病の診断を迅速に確立または除外することが重要である。血液または骨髓に対して行われる蛍光インサイチュハイブリダイゼーションは、APLを特徴付ける染色体の転座 [t(15;17)(q22;q12);] を容易に同定するので、この目的のために多くの場合に使用される。その転座の発がん性産物であるPML/RARA融合タンパク質の存在を分子的に検出することも必要である。

【0098】

AMLのファーストライン治療は主に化学療法からなり、2つの段階:誘導療法および寛解後（または地固め）療法に分けられる。誘導療法の目標は検出不可能なレベルまで白血病細胞の数を減少させることにより完全寛解を達成することであり、地固め療法の目標はあらゆる残留した検出不可能な疾患を取り除き、治癒を達成することである。造血幹細胞移植は、通常、誘導化学療法が失敗した場合または患者が再発した後に考慮されるが、移植はまた時に、高リスク疾患を有する患者のフロントライン療法として使用される。

【0099】

M3を除く全てのFABサブタイプは、通常、シタラビン（ara-C）およびアントラサイクリン（最も多くはダウノルビシン）を用いる誘導化学療法を与えられる。この誘導化学療法レジメンは「7+3」（または「3+7」）として公知であるが、これはシタラビンが連続する7日間連続的なIV注入として与えられ、アントラサイクリンが連続する3日間IVプッ

10

20

30

40

50

シュとして与えられるためである。70%までの患者がこのプロトコールで寛解を達成する。単独の高用量シタラビン、FLAG様レジメンまたは治験薬などの他の代替的な誘導レジメンもまた使用することができる。骨髄抑制および感染症のリスクの増加などの療法の毒性効果のため、誘導化学療法は非常に高齢の者には与えられないことがあり、選択肢としてはより強度が低い化学療法または緩和ケアを挙げることができる。

【0100】

急性前骨髄球性白血病（APL）としても公知のAMLのM3サブタイプは、ほぼ普遍的に、誘導化学療法、通常アントラサイクリンに加えて薬物オールトランスレチノイン酸（ATRA）で治療される。前骨髄球がそれらの顆粒の内容物を末梢循環中に放出した時にAPLの治療を複雑化させる播種性血管内凝固（DIC）を予防するように注意しなければならない。APLは抜きんでて治療可能であり、治療プロトコールが十分に報告されている。

10

【0101】

誘導段階の目標は完全寛解に到達することである。完全寛解は疾患が治療したことを意味せず、それはむしろ、利用可能な診断方法で疾患が検出できないことを表す。完全寛解は、新たに診断された成人の約50%~75%で得られるが、これは上記される予後因子に基づいて変化し得る。寛解の長さは元々の白血病の予後の特徴に依存する。一般に、全ての寛解は、追加の地固め療法なしでは失敗することになる。

【0102】

完全寛解が達成された後でさえ、白血病細胞は現行の診断技術で検出するには少なすぎる数で残留する可能性がある。さらなる寛解後または地固め療法が与えられない場合、ほぼ全ての患者が結局再発する。したがって、検出不可能な疾患を取り除き、かつ再発を予防する、すなわち、治療を達成するためにより多くの療法が必要である。

20

【0103】

特定の種類の寛解後療法は、患者の予後因子（上記を参照）および全般的健康状態に基づいて個別化される。予後良好白血病（すなわち、inv（16）、t（8;21）、およびt（15;17））のために、患者は、典型的には、地固め化学療法として公知の追加の3~5回の重点的な化学療法を受ける。再発のリスクが高い患者（例えば、高リスク細胞遺伝学、基礎MDS、または療法関連AMLを有する患者）について、患者が移植に忍容することができかつ好適なドナーがいる場合、同種幹細胞移植が通常推奨される。中リスクAML（低リスクまたは高リスク群に入らない正常な細胞遺伝学または細胞遺伝学的変化）のための最良の寛解後療法は明確性がより低く、患者の年齢および全体的健康状態、患者の個人的価値観、および好適な幹細胞ドナーが利用可能であるかどうかなどの特定の状況に依存する。

30

【0104】

幹細胞移植に適格でない患者について、地固めの完了後のヒスタミンジヒドロクロリド（セプレン）とインターロイキン2（プロロイキン）との組合せでの免疫療法は絶対再発リスクを14%低減させることが示されており、これは寛解が維持される可能性の50%の増加と言い換えられる。

【0105】

AMLを再発した患者について、唯一の証明された治療可能性のある療法は、それがまだ行われていない場合、造血幹細胞移植である。2000年に、モノクローナル抗体連結細胞毒性剤ゲムツズマブオゾガマイシン（マイロターゲット）が、高用量化学療法の候補ではない再発性AMLを有する60歳超の患者について米国において承認された。この薬物は2010年にその製造者、Pfizerにより市場から自主的に撤退された。再発性AMLのための治療オプションは非常に限られているので、緩和ケアが与えられることがある。

40

【0106】

幹細胞移植の候補ではない再発性AML患者、または幹細胞移植後に再発した患者は、従来の治療オプションは限られるので、臨床試験において治療を与えられることがある。治療中の剤としては、細胞毒性薬物、例えばクロファラビンの他に、標的療法、例えば、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、デシタビン、およびMDR1（多剤耐性タンパク質）の阻害剤が挙げられる。再発性急性前骨髄球性白血病（APL）について、三酸化ヒ素が

50

治験で試験されており、米国FDAにより承認されている。ATRAと同様、三酸化ヒ素はAMLの他のサブタイプでは機能しない。

【0107】

急性骨髄性白血病は治癒可能な疾患であるが、特定の患者についての治癒の可能性は多数の予後因子に依存する。AMLにおける単一の最も重要な予後因子は細胞遺伝学、または白血病細胞の染色体構造である。ある特定の細胞遺伝学的異常は非常に良好なアウトカムに関連する（例えば、急性前骨髄球性白血病における（15:17）転座）。AML患者の約半分は「正常な」細胞遺伝学を有し、彼らは中リスク群に入る。治療後の予後不良および再発の高いリスクと関連する多数の他の細胞遺伝学的異常が公知である。

【0108】

以前から存在する骨髄異形成症候群（MDS）または骨髄増殖性疾患から生じるAML（いわゆる二次性AML）はより不良な予後を有し、別の先行する悪性腫瘍の化学療法後に生じる治療関連AMLについても同様である。これらの実体の両方は、高率の不都合な細胞遺伝学的異常に関連する。

【0109】

一部の研究において、60歳より高い年齢および上昇した乳酸デヒドロゲナーゼレベルもまた不良なアウトカムに関連付けられた。ほとんどの形態のがんと同様、パフォーマンスステータス（すなわち、患者の全般的身体状態および活動性レベル）も予後において大きな役割を果たす。

【0110】

FLT3遺伝子内縦列重複（ITD）は、AMLにおいて不良な予後を付与することが示されている。より侵攻性の療法、例えば最初の寛解における幹細胞移植でのこれらの患者の治療は、長期生存を増進させないことが示されている。FLT3のITDは白血球停滞に関連することがある。2012年に、FLT3阻害剤キザルチニブが、FLT3-ITD変異を有するAML患者において、第II相臨床試験でポジティブな結果を示した。2017年には、FDAに承認された試験による検出でFLT3変異陽性（FLT3+）である新たに診断されたAML患者の治療について、化学療法と組み合わせでのFLT3阻害剤Rydapt（登録商標）（ミドスタウリン、旧PKC412）がFDAにより承認された。

【0111】

研究者たちはAMLにおけるc-KIT変異の臨床的意義を研究している。c-KITの活性を薬理的にブロックできるチロシンキナーゼ阻害剤、例えばイマチニブおよびスニチニブが利用可能であるので、これらは広く行われており、また臨床的に妥当である。予後因子または治療標的として研究されている他の遺伝子としては、CEBPA、BAALC、ERG、およびNPM1が挙げられる。

【0112】

B. 慢性骨髄単球性白血病（CMML）

CMMLは、骨髄増殖性腫瘍および骨髄異形成症候群の両方の臨床的および病理学的特徴を有する悪性造血幹細胞障害である。患者は、以前に認識されなかった血球減少（例えば、感染症、疲労、呼吸困難、点状出血、出血）の結果としてもたらされる症状もしくは合併症、皮膚病変、または脾腫に関する症状（例えば、早期満腹感、腹部膨満）を示し得る。CMMLは、骨髄異形成が付随する末梢血単球増加症により特徴付けられる。米国において、毎年約2000人のCMMLの新たな症例が診断されている。AMLへの進行は15～30%の症例において起こり（Swerdlow et al., 2017）、メジアン生存はWHO予後亜群にわたり憂鬱なものであり、初期診断後10～48か月の範囲に及ぶ。HSCTのみが、CMML患者にとって臨床的に意義のある程度までの疾患修飾性のものであり、細胞減少剤および低メチル化剤を含む他の療法は症状軽減を与える（Schuler et al., 2014）。したがって、罹病率を低減し、CMMLを有する患者の生存を長期化させるための新たな療法に対する緊急の必要性が存在する。

【0113】

C. 急性リンパ芽球性白血病（ALL）

急性リンパ芽球性白血病（ALL）または急性リンパ性白血病は、リンパ芽球として公知のがん性の未熟な白血球の過剰産生により特徴付けられる急性の形態の白血病、または白血球のがんである。ALLを有する人において、リンパ芽球が骨髄で過剰産生され、連続的に倍化し、骨髄中の正常細胞、例えば、赤血球、白血球および血小板の産生を阻害することによりおよび他の臓器に浸潤することにより損傷および死を引き起こす。ALLは小児期に最も一般的であり、発生率のピークは2～5歳、別のピークは高齢期である。

【0114】

ALLの症状は機能的な血液細胞の産生の低減を示し、その理由は、新たな機能性血液細胞を産生するために通常使用される骨髄の供給源を白血病が使い果たすことにある。これらの症状は、発熱、感染症のリスクの増加（特に、好中球減少による肺炎などの細菌感染症; そのような感染症の症状としては、息切れ、胸部の痛み、咳、嘔吐、排便または排尿習慣の変化が挙げられる）、（血小板減少による）出血傾向の増加、ならびに蒼白、頻脈（高心拍数）、疲労および頭痛を含む貧血を示す徴候を含み得る。

10

【0115】

約6,000症例が米国において毎年報告されており、他の国からの統計を得ることは難しいが、米国、イタリアおよびコスタリカにおいてより一般的であることが公知である。治療は現実的な目標であり、罹患した子供の80%より多くにおいて達成されるが、成人では20～40%のみが治療することができる。「急性」は、疾患の比較的短い時間経過を指し、多年にわたる時間経過の可能性のある慢性リンパ性白血病からそれを区別する。

【0116】

20

症状はALLに特異的でないが、医療的補助が求められるところまで悪化する。それらは、正常かつ健全な血液細胞の欠如のもたらされるが、それはそれらが悪性かつ未熟な白血球（白血球細胞）により押しのけられることによる。したがって、ALLを有する人は、赤血球（赤血球細胞）、白血球、および血小板の機能不良からの症状を経験する。異常を示す可能性がある実験室試験としては、血液数試験、腎臓機能試験、電解質試験、および肝臓酵素試験が挙げられる。

【0117】

ALLの徴候および症状は可変的であるが、骨髄置換および/または臓器浸潤から得られ、全身脱力感および疲労、貧血、めまい、頻繁なまたは原因不明の発熱および感染症、体重減少および/または食欲不振、過度の原因不明の紫斑、骨疼痛、関節痛（骨の表面または関節の関節への「芽球」細胞の拡散により引き起こされる）、息切れ、リンパ節、肝臓および/または脾臓の腫脹、下肢および/または腹部における圧痕浮腫（腫脹）、および低い血小板レベルによる皮膚のごく小さい赤色斑点または線である点状出血が挙げられる。

30

【0118】

一般に、がんは、増殖を引き起こす化学シグナルの増加または増殖を制御する化学シグナルの妨害のいずれかにより、制御されない細胞増殖に繋がりがつ身体全体に広がるDNAの損傷により引き起こされる。損傷は、融合遺伝子の形成の他に、別の遺伝子、例えばT細胞受容体遺伝子のプロモーターへのがん原遺伝子の並置を介したがん原遺伝子の調節異常を通じて引き起こされ得る。この損傷は、環境要因、例えば、化学物質、薬物または放射線により引き起こされることがあり、有糸分裂または他の正常なプロセスの間に天然に起こる（但し、細胞は、これを低減するのを助けるDNA修復の多数の機構を有する）。

40

【0119】

ALLは、動物およびヒトにおいて放射線および化学物質への曝露に関連する。高レベルの放射線曝露は、広島および長崎における原子爆弾曝露の生存者の研究により見出されたように、白血病を発症する公知のリスク因子である。動物において、ベンゼンおよび他の化学物質への曝露は白血病を引き起こし得る。疫学研究は化学物質への職場での曝露と白血病を関連付けたが、これらの研究は決定的なものではない。一部の証拠は、放射線および化学療法を用いて他のがんについて治療された個体においてその治療の結果として二次性白血病が発症し得ることを示唆する。

【0120】

50

ALLの診断は、病歴、身体検査、全血球計算、および血液スメアで始まる。症状は非常に全般的であるので、類似の症状を有する多くの他の疾患が除外されなければならない。典型的には、白血球数が多くなるほど、予後はより不良となる。症例の大部分において血液スメアで芽球細胞が見られる（芽球細胞は全ての免疫細胞株の前駆細胞（幹細胞）である）。骨髄生検はALLの決定的な証明である。

腰椎穿刺（脊椎穿刺としても公知）は、脊柱および脳に浸潤しているかどうかを示す。

【0121】

病理学的検査、細胞遺伝学（特に、フィラデルフィア染色体の存在）、および免疫表現型解析は、骨髄芽球性（好中球、好酸球、または好塩基球）またはリンパ芽球性（Bリンパ球またはTリンパ球）細胞が問題であるかどうかを確立する。RNA試験は疾患がどれほど侵襲性であるかを確立することができ、異なる変異はより短いまたはより長い生存に関連付けられている。免疫組織化学試験は、白血病細胞の表面上のTdTまたはCALLA抗原を明らかにすることがある。TdTは、プレTおよびプレB細胞の発生の早期に発現されるタンパク質である一方、CALLAは、ALLの症例の80%において、およびCMLの「急性転化」においても見出される抗原である。医療イメージング（超音波またはCTスキャンなど）は、他の臓器、一般的に、肺、肝臓、脾臓、リンパ節、脳、腎臓、および生殖器の浸潤を見つけることができる。

【0122】

急性リンパ性白血病の検出が早期であればあるほど、治療はより効果的となる。目的は永続する寛解を誘導することであり、これは身体中に検出可能ながん細胞が存在しないこととして定義される（通常、骨髄中に5%未満の芽球細胞）。急性白血病の治療は、化学療法、ステロイド、放射線療法、集中併用治療（骨髄または幹細胞移植を含む）、および成長因子を含み得る。

【0123】

化学療法は、選択される最初の治療である。ほとんどのALL患者は異なる治療の組合せを与えられる。悪性細胞が身体全体に分布することにより、手術の選択肢はない。一般に、ALLのための細胞傷害性化学療法は、様々な組合せで複数の抗白血病性薬物を組み合わせる。ALLの化学療法は3つの段階:寛解誘導、強化、および維持療法からなる。

【0124】

化学療法レジメンは集中的かつ長引くことがあるので（GMALL UKALL、HyperCVADまたはCALGBプロトコールの場合、多くは約2年; ALLについてCOGプロトコールで男性について約3年2ヶ月; 女性について2年2ヶ月（精巣は潜在的な貯蔵所であるので男性についてより長い）、多くの患者は、大静脈に静脈内カテーテルを挿入され（中心静脈カテーテルまたはヒックマンラインと称される）、またはPortacathを挿入され、これは皮膚下、通常は鎖骨近くに外科移植されるシリコンノーズを有する円錐形ポートであり、低い感染リスクおよびportacathの長期持続能力により、利用可能な最も効果的な製造物である。

【0125】

放射線療法（または放射線治療）は、高疾患負荷の痛みのある骨領域において、または骨髄移植の準備の部分（全身照射）として使用される。全脳放射線の形態の放射線もまた、脳における白血病の再発を予防するために中枢神経系の予防のために使用される。全脳予防放射線は、子供のALLの治療において使用される一般的な方法である。

CNS化学療法は好都合な結果を提供するが発生上の副作用はより小さいことが最近の研究により示された。結果として、全脳放射線の使用はより限定されている。成人白血病のほとんどの専門家はCNS予防のための放射線療法の使用を取り止めており、代わりに髄腔内化学療法を使用している。

【0126】

再発性ALLの一部のサブタイプについて、化学療法と組み合わせてプロテアーゼなどの生物学的標的に狙いを定めることは、臨床試験において有望な結果を与えている。白血病性リンパ芽球に対する組合せ効果に基づく生物学的標的の選択は、ALL治療の効果の改善

10

20

30

40

50

のための臨床試験に繋がり得る。進行中の臨床試験において、CD19-CD3二重特異性モノクローナルマウス抗体ブリナツモマブは大きな有望性を示している。

【0127】

キメラ抗原受容体 (CAR) はALLのための有望な療法として開発された。この技術は、ALLを治療する方法として細胞表面マーカーCD19を認識するように設計された単鎖可変断片 (scFv) を使用する。CD19は全てのB細胞上に見出される分子であり、患者における潜在的に悪性のB細胞集団を区別する手段として使用することができる。この療法では、マウスがCD19抗原で免疫化され、抗CD19抗体を産生する。骨髓腫細胞株に融合されたマウス脾臓細胞から発生したハイブリドーマを、CD19特異的抗体をコードするcDNAの供給源として開発することができる。cDNAがシークエンシングされ、これらの抗体の可変重鎖および可変軽鎖をコードする配列が小さいペプチドリinkerを使用して一緒にクローニングされる。この結果として得られる配列はscFvをコードする。CARのエンドドメインとなるものをコードする導入遺伝子にこれをクローニングすることができる。エンドドメインとして使用されるサブユニットには様々な構成があるが、それらは、一般に、scFvに結合するヒンジ領域、膜貫通領域、CD28などの共刺激分子の細胞内領域、およびITAMリピートを含有するCD3ゼータの細胞内ドメインからなる。頻繁に含まれる他の配列は4-1bbおよびOX40である。次に、scFvおよびエンドドメイン配列を含有する最終の導入遺伝子配列は、患者から得られ、インビトロで増幅された免疫エフェクター細胞に挿入される。先行する治験において、これらは細胞傷害を行うことができるT細胞の一種であった。エフェクター細胞へのDNAの挿入はいくつかの方法により達成することができる。最も一般的には、これは、導入遺伝子をコードするレンチウイルスを使用して行われる。シュードタイプの自己不活性化レンチウイルスは、標的細胞のゲノムDNAへの所望の導入遺伝子の安定な挿入のための効果的な方法であることが示されている。他の方法としてはエレクトロポレーションおよびトランスフェクションが挙げられるが、導入遺伝子の発現が時間と共に減少するので、これらは有効性が限られている。次に、遺伝子改変エフェクター細胞は患者に再び移植される。この処置は、典型的には、注入されるT細胞の効果を増強することが示されているシクロホスファミドなどのコンディショニングレジメントと組み合わせて行われる。この効果は、免疫学的空間ニッチの作出に帰せられている。処理は全体として、エフェクター細胞、典型的にT細胞をもたらし、これは主要組織適合複合体非依存的に腫瘍細胞抗原を認識し、かつ細胞傷害性応答を開始させることができる。

【0128】

D. 慢性リンパ芽球性白血病 (CLL)

慢性リンパ性白血病 (CLL) としても公知のB細胞慢性リンパ性白血病 (B-CLL) は、成人において最も一般的な種類の白血病 (白血球のがんの一種) である。CLLは、骨髓を起源とし、リンパ節において発生し、通常、抗体を産生することにより感染と戦うB細胞リンパ球に影響する。CLLにおいて、B細胞は制御されずに増殖し、骨髓および血液に蓄積され、そこで健常な血液細胞を押しやる。CLLは、主にリンパ節において現れる、B細胞リンパ腫の一種である小リンパ球性リンパ腫 (SLL) の1ステージである。CLLおよびSLLは同じ基礎疾患であり、現れ方のみ異なると考えられる。CLLは成人の疾患である。CLLを有すると新たに診断されるほとんど (75%より多く) の人々は50歳を超えており、大多数は男性である。しかしながら、希少な症例では、ティーンエイジャーおよび時折小児において起こることがある。これらの一部は遺伝的素因に関係することがある。

【0129】

ほとんどの人々は、高い白血球数を返す常用の血液試験の結果として症状なしに診断されるが、進行するにつれ、CLLは、腫大したリンパ節、脾臓、および肝臓、そしてやがて貧血および感染症をもたらす。早期CLLは治療されず、後期CLLは化学療法およびモノクローナル抗体で治療される。

【0130】

DNA解析により、異なる生存期間を有する2つの主要な種類のCLLが区別されている。マーカーZAP-70が陽性のCLLは8年の平均生存を有し、ZAP-70が陰性のCLLは25年より

10

20

30

40

50

長い平均生存を有する。緩徐に進行する疾患を有する多くの患者、特に高齢患者は生涯においていかなる治療も必要とせずに安心していられることがある。

【0131】

ほとんどの人々は、高い白血球数を返す常用の血液試験の結果として症状なしに診断される。より頻度は低いが、CLLは、高い白血球数を伴わずにまたは血液における疾患の証拠なしにリンパ節腫脹を示すことがある。これは小リンパ球性リンパ腫と称される。一部の個体において、新生物細胞が骨髄中で圧倒的なものとなり、疲労または虚弱を生じさせる貧血をもたらした後に初めて疾患が明らかになる。

【0132】

CLLは、通常、全血球計算（CBC）試験におけるリンパ球増加症の存在、白血球の種類の増加により最初に疑われる。これは頻繁に、日常的な通院での偶然の発見である。多くの場合、リンパ球数は血液1マイクロリットル（ μl ）当たり4000細胞より多いが、はるかに多いこともある。高齢者個体におけるリンパ球増加症の存在は、CLLについての強い疑いを生じさせるはずであり、臨床的に不必要でない限り、確認診断試験、特にフローサイトメトリーを行うべきである。

【0133】

CLLの診断は、細胞表面上の分子の普通でないが特徴的なパターンを示す血液、骨髄、または組織中のBリンパ球の異常な集団の実証に基づく。この非典型的な分子パターンとしては、細胞表面マーカー分化クラスター5（CD5）および分化クラスター23（CD23）の共発現が挙げられる。加えて、1個体内の全てのCLL細胞はクローン性、すなわち遺伝学的に同一である。實際上、これは、異常なB細胞の集団全体における互いに排他的な抗体軽鎖、 κ または λ の1つのみの検出により暗示される。正常なBリンパ球は、異なる抗体産生細胞の混合からなり、 κ 発現および λ 発現の両方の細胞の混合物をもたらす。 κ および λ 産生B細胞の正常な分布の欠如は、任意のB細胞悪性腫瘍（B細胞非ホジキンリンパ腫）の診断を確立する鍵となる構成要素であるクローン性を実証するための1つの基礎である。

【0134】

末梢血の顕微鏡検査とクローン性およびマーカー分子発現を確認するためのフローサイトメトリーによるリンパ球の分析との組合せがCLLの診断を確立するために必要とされる。両者は少量の血液で容易に達成される。フローサイトメーターは、液体中の個々の細胞上の分子の発現を調べることができる機器である。これは、該機器により認識される蛍光タグを有するマーカー分子に対する特異的抗体の使用を必要とする。CLLにおいて、リンパ球は、B細胞系列（マーカー分子である分化クラスター19（CD19）およびCD20を発現する）の遺伝学的クローンであり、マーカー分子CD5およびCD23を特徴的に発現する。これらのB細胞は顕微鏡下で正常なリンパ球に似ているが、わずかにより小さく、ガラススライドに塗り付けた時にもろく、「スマッジ」または「スメア」細胞と呼ばれる多くの壊れた細胞を生じさせる。

【0135】

MatutesのCLLスコアは、5つのマーカーの発現（CD5、CD23、FMC7、CD22および免疫グロブリン軽鎖）の非定型/混合CLLとは異なる、古典的なCLLの均質のサブグループの同定を可能とする。MatutesのCLLスコアリングシステムは、古典的なCLLと他のB細胞慢性リンパ増殖性疾患との間の鑑別診断に非常に役立つが、混合/非定型CLLとマンツル細胞リンパ腫（MCL悪性B細胞）との間の免疫学的な区別には役立たない。CLLとMCLとの識別は、CD54およびCD200などの非常用マーカーを加えることにより改善することができる。常用のマーカーの中で最も識別力のある特徴は、CD20/CD23平均蛍光強度比である。対照的に、FMC7の発現は、驚くべきことに、境界症例について誤った方向に導くことがある。

【0136】

疾患の範囲を判定する病期分類は、Rai病期分類システムまたはBinet分類（詳細を参照）により行われ、主に低血小板数または低赤血球数の存在に基づく。初期の疾患は、治療される必要はない。

10

20

30

40

50

【0137】

CLLの治療は、完全な治癒よりもむしろ、疾患およびその症状を制御することに焦点を当てている。CLLは、化学療法、放射線療法、生物学的療法、または骨髄移植により治療される。症状は、外科的に（肥大した脾臓の脾摘除術）または放射線療法（リンパ節腫大の「減量」（de-bulking））により治療される場合がある。

【0138】

初期のCLL治療は、疾患の厳密な診断および進行に応じて、さらに医療従事者の選択および経験によって異なる。多数の剤がCLL療法のために使用される。フルダラビン、シクロホスファミド、およびリツキシマブ（FCRとして公知）を含有する初期の治療レジメンは、より高い全奏効率および完全奏効率を実証している。

10

【0139】

University of Pennsylvaniaの研究者らにより実行された研究では、疾患と戦うために、遺伝子改変されたT細胞を使用してCD19タンパク質を発現する細胞を攻撃した。2013年に、研究者らは、59人の患者のうち26人が完全寛解を達成したこと、および元患者は腫瘍が残っていないままであることを発表した。

【0140】

白血病は妊娠に関連することはほとんどなく、10,000人の妊婦のうち約1人しか罹患しない。慢性リンパ性白血病の治療は多くの場合、妊娠の終了後まで延期することができる。治療が必要な場合、第2または第3三半期に化学療法を与えることで、第1三半期に治療するよりも妊娠損失または先天性欠損をもたらす可能性がより低くなる。

20

【0141】

一般に治癒不可能と考えられているが、CLLはほとんどの場合、緩徐に進行する。CLLを有する多くの人々は、長年にわたり、一部の場合には数十年間、通常の活発な生活をしている。発症が遅いため、早期のCLL介入は生存期間または生活の質を改善しないと考えられており、したがって早期CLLは一般に治療されない。代わりに、疾患パターンのあらゆる変化を検出するために状態が経時的にモニターされる。

【0142】

疾患が患者の生活の質に影響し得る程度まで進行していることを、患者の臨床症状または血球数が示す場合、CLL治療を開始する決定が為される。Rai 4病期分類システムおよびBinet分類などの臨床的「病期分類システム」は、患者を治療する時期および方法を決定するために役立ち得る。治療を開始する時期およびどのような手段によるかを決定することは多くの場合に難しいが、研究により、極めて早期に疾患を治療する生存上の利点はないことが示されている。The National Cancer Institute Working Groupは、治療開始前に満たされるべき特定のマーカーを含む、治療のためのガイドラインを発行している。

30

【0143】

併用化学療法レジメンは、新たに診断されたCLLおよび再発性CLLの両方において効果的である。アルキル化剤（シクロホスファミド）とのフルダラビンの以下の組合せは、単剤よりも高い奏効率および長い無増悪生存を生じさせる：

FC（フルダラビンおよびシクロホスファミド）；FR（フルダラビンおよびリツキシマブ）；FCR（フルダラビン、シクロホスファミド、およびリツキシマブ）；ならびにCHOP（シクロホスファミド、ドキソルビシン、ビンクリスチンおよびプレドニゾロン）。

40

【0144】

プリンアナログフルダラビンが、一次療法としてクロラムブシルより優れた奏効率を与えることが示されたが、フルダラビンの早期使用が全生存期間を改善させるという証拠はなく、一部の臨床医は、再発性疾患用にフルダラビンを取っておくことを好む。

【0145】

FCRを用いる化学免疫療法は、良好な体力により選択されたCLL患者の大規模な無作為化試験において、奏効率、無増悪生存期間、および全生存期間を改善させることを示している。これは、ファーストライン療法の選択が、CLL患者の全生存期間を改善させ得ることを実証する最初の臨床試験であった。CLLのために承認されたアルキル化剤としては、

50

ベンダムスチンおよびシクロホスファミドが挙げられる。

【0146】

標的療法は、正常細胞に害を与えないことを目的として、特定の標的においてがん細胞を攻撃する。(CD52に対する)アレムツズマブ、ならびに(CD20に対する)リツキシマブおよびオファツムマブなどのモノクローナル抗体はCLLに使用される。チロシンキナーゼ阻害剤療法もまた、CLLに使用することができる。2014年2月に、FDAは、イブルチニブに、慢性リンパ性白血病を治療するための承認を与えた。イブルチニブはブルトン型チロシンキナーゼ(BTK)阻害剤である。2014年7月に、FDAおよびEMAは、イデラリシブに、異なる種類の白血病を治療するための承認を与えた。イデラリシブは、PI3Kδ経路を標的とするPI3K阻害剤である。イデラリシブは経口摂取される。

10

【0147】

レシピエント自身の細胞を使用する自己幹細胞移植は治療的でない。若年の個体は、CLLで死亡するリスクが高い場合、同種造血幹細胞移植(HSCT)を考慮することができる。健常ドナーからの血液細胞を使用する高リスク治療である、骨髄破壊(骨髄死滅)形態の同種幹細胞移植は、治療的なことがあるが、治療関連毒性が大きい。低強度コンディショニング同種幹細胞移植と呼ばれる中間レベルは、高齢患者または虚弱患者により良好に忍容されることがある。

【0148】

「難治性」CLLは、もはや治療に対して有望に応答しない疾患である。この場合、レナリドミド、フラボピリドール、および骨髄(幹細胞)移植などのより侵襲性の療法が考慮される。モノクローナル抗体である(CD52に対する)アレムツズマブは、難治性骨髄系疾患の患者に使用されることがある。

20

【0149】

合併症としては、リヒター症候群、再発性感染症に繋がる低ガンマグロブリン血症、10~15%の患者における温式自己免疫性溶血性貧血、高悪性度リンパ腫への転換が挙げられる。慢性リンパ性白血病は、慢性リンパ性白血病を有する患者において、リヒター症候群、急速に増殖するびまん性大B細胞リンパ腫、前リンパ性白血病、ホジキンリンパ腫、または急性白血病の発生に転換することがある。その発生率は、CLL患者の約5パーセントであると推定されている。

【0150】

胃腸(GI)病変は、慢性リンパ性白血病ではほとんど起こることがない。報告された外徴の一部としては、腸重積症、小腸の細菌汚染、大腸炎、および他のものが挙げられる。通常、CLLとのGI合併症は、リヒタートランスフォーメーション後に起こる。現在までに、リヒタートランスフォーメーションのない慢性リンパ性白血病のGI病変の症例報告は2件存在している。

30

【0151】

III. モノクローナル抗体およびその製造

本明細書に記載されているモノクローナル抗体は、標準的な方法を使用して調製した後、スクリーニング、特徴付け、および機能評価を行うことができる。可変領域をシークエンシングすることができ、その後、ヒト発現ベクターにサブクローニングしてキメラ抗体遺伝子を製造し、その後それを発現させて精製することができる。これらのキメラ抗体を抗原結合、シグナル伝達のブロック、異種移植実験において試験することができる。

40

【0152】

A. 一般的方法

LILRB4に結合するモノクローナル抗体はいくつかの用途を有することが理解されるであろう。用途としては、がんの検出および診断において使用するための診断キットの製造の他に、がん療法が挙げられる。これらの文脈において、そのような抗体を診断または治療剤と連結してもよく、それらを捕捉剤または競合アッセイにおける競合物として使用してもよく、または追加の剤をそれに結合させることなくそれらを個々に使用してもよい。抗体は、以下にさらに議論されるように、変異しまたは改変されてもよい。抗体を調製す

50

るためおよび特徴付けるための方法は当技術分野において周知である（例えば、Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; U.S. Patent 4, 196,265を参照）。

【0153】

モノクローナル抗体（MAb）を生成する方法は、一般に、ポリクローナル抗体を調製する方法と同じ道筋に沿って始まる。これらの両方の方法の最初の工程は適切な宿主の免疫化である。当技術分野において周知の通り、免疫化のための所与の組成物は、その免疫原性が様々であり得る。したがって、多くの場合、宿主免疫系を増強することが必要であり、これはペプチドまたはポリペプチド免疫原をキャリアに連結させることにより達成され得る。例示的かつ好ましいキャリアは、キーホールリンペットヘモシアニン（KLH）およびウシ血清アルブミン（BSA）である。オボアルブミン、マウス血清アルブミン、またはウサギ血清アルブミンなどの他のアルブミンもまたキャリアとして使用することができる。キャリアタンパク質にポリペプチドをコンジュゲートさせるための手段は当技術分野において周知であり、グルタルアルデヒド、m-マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシスクシンイミドエステル、カルボジイミド、およびビスジアゾ化ベンジジンが挙げられる。これも当技術分野において周知の通り、アジュバントとして公知の免疫応答の非特異的刺激因子の使用により特定の免疫原組成物の免疫原性を増強させることができる。例示的かつ好ましいアジュバントとしては、完全フロイントアジュバント（殺傷した結核菌（*Mycobacterium tuberculosis*）を含有する免疫応答の非特異的刺激因子）、不完全フロイントアジュバント、および水酸化アルミニウムアジュバントが挙げられる。

【0154】

ポリクローナル抗体の製造において使用される免疫原組成物の量は、免疫原の性質の他に、免疫化のために使用される動物に応じて異なる。免疫原を投与するために様々な経路を使用することができる（皮下、筋肉内、皮内、静脈内、および腹腔内）。ポリクローナル抗体の産生は、免疫化後の様々な時点に免疫化動物の血液をサンプリングすることによりモニタリングすることができる。第2のブースター注射を与えてもよい。増強および滴定の処理は、好適な力価が達成されるまで繰り返される。所望のレベルの免疫原性が得られた場合、免疫化された動物を出血させて血清を単離および貯蔵することができ、かつ/または動物を使用してMAbを生成することができる。

【0155】

免疫化後に、抗体を産生する潜在能力を有する体細胞、具体的にはBリンパ球（B細胞）が、MAb生成プロトコールにおいて使用するために選択される。これらの細胞は、生検を行った脾臓もしくはリンパ節、または循環血液から得ることができる。次に、免疫化動物からの抗体産生Bリンパ球を不死骨髓腫細胞、一般に、免疫化された動物と同じ種の細胞またはヒトもしくはヒト/マウスキメラ細胞と融合させる。ハイブリドーマ製造融合手順において使用するために適した骨髓腫細胞株は、好ましくは、非抗体産生性であり、高い融合効率を有し、かつ所望の融合細胞（ハイブリドーマ）のみの増殖をサポートするある特定の選択培地中で増殖できなくさせる酵素欠損を有する。当業者に公知のように、数多くの骨髓腫細胞のいずれも使用することができる（Goding, pp.65-66, 1986; Campbell, pp.75-83, 1984）。

【0156】

抗体産生脾臓またはリンパ節細胞と骨髓腫細胞とのハイブリッドを生成する方法は、通常、体細胞を骨髓腫細胞と2:1の割合で混合することを含むが、割合は、細胞膜の融合を促進する1つまたは複数の（化学的または電気的）剤の存在下でそれぞれ約20:1～約1:1で変化し得る。センダイウイルス（Sendai virus）を使用する融合方法がKohler and Milstein (1975; 1976) に記載されており、ポリエチレングリコール（PEG）、例えば37%（v/v）のPEGを使用する融合方法がGeffer et al. (1977) に記載されている。電氣的に誘導される融合方法の使用も適切である（Goding, pp.71-74, 1986）。融合手順は、通常、約 1×10^{-6} ～ 1×10^{-8} の低い頻度で生存可能なハイブリッドを生じさせる。しかしながら、生存可能な融合されたハイブリッドは、選択培地中での培養により親の非融合

細胞（特に、通常無期限に分裂し続ける非融合骨髓腫細胞）から分化するため、これは問題とならない。選択培地は、一般に、組織培養培地中でのヌクレオチドのデノボ合成をブロックする剤を含有する培地である。例示的かつ好ましい剤は、アミノプテリン、メトトレキサート、およびアザセリンである。アミノプテリンおよびメトトレキサートはプリンおよびピリミジンの両方のデノボ合成をブロックする一方、アザセリンはプリンの合成のみをブロックする。アミノプテリンまたはメトトレキサートが使用される場合、ヌクレオチドの供給源としてヒポキサンチンおよびチミジンが培地に添加される（HAT培地）。アザセリンが使用される場合、培地にヒポキサンチンが添加される。B細胞供給源がエプスタインバーウイルス（EBV）形質転換ヒトB細胞株である場合、骨髓腫に融合されなかったEBV形質転換株を取り除くためにウアバインが加えられる。

10

【0157】

好ましい選択培地は、HATまたはウアバインを含むHATである。ヌクレオチドサルベージ経路を作動することができる細胞のみがHAT培地中で生存することができる。骨髓腫細胞は、サルベージ経路の鍵となる酵素、例えばヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（HPRT）を欠損し、生存することができない。B細胞はこの経路を作動することができるが、培養物中で限られた寿命を有し、一般に約2週間以内に死亡する。したがって、選択培地中で生存できる細胞のみが骨髓腫およびB細胞から形成されるハイブリッドである。今回の場合のように、融合のために使用されるB細胞の供給源がEBV形質転換B細胞の株である場合、EBV形質転換B細胞は薬物殺傷に感受性であるのでウアバインもハイブリッドの薬物選択のために使用される一方、使用される骨髓腫パートナーはウアバイン抵抗性であるように選択される。

20

【0158】

培養によりハイブリドーマの集団が提供され、そこから特定のハイブリドーマが選択される。典型的には、ハイブリドーマの選択は、マイクロタイタープレートにおいて単一クローンとなるように希釈された細胞を培養した後、個々のクローンの上清（約2〜3週間後）を所望の反応性について試験することにより行われる。アッセイは、ラジオイムノアッセイ、酵素イムノアッセイ、細胞傷害性アッセイ、ブランクアッセイドット免疫結合アッセイなど、感度が高く、簡便かつ迅速なものであるべきである。次に、選択されたハイブリドーマを連続希釈するか、またはフローサイトメトリー選別により単一細胞を選別し、クローニングして個々の抗体産生細胞株とした後、クローンを無期限に増殖させてmAbを提供することができる。細胞株は、2つの基本的な方法でMAbの製造のために活用することができる。ハイブリドーマの試料を動物（例えば、マウス）に（多くの場合、腹腔腔に）注射することができる。任意で、注射の前に炭化水素、特にプリスタン（テトラメチルペンタデカン）などの油で動物をブライミングする。ヒトハイブリドーマがこの方法で使用される場合、腫瘍拒絶を予防するために、SCIDマウスなどの免疫不全マウスに注射することが最適である。注射された動物は、融合した細胞ハイブリッドにより産生される特定のモノクローナル抗体を分泌する腫瘍を発生させる。次に、血清または腹水液などの動物の体液を採取して、高濃度でMAbを提供することができる。個々の細胞株をインビトロで培養することもでき、MAbが天然に培養培地中に分泌され、そこからMAbを高濃度で容易に得ることができる。あるいは、ヒトハイブリドーマ細胞株をインビトロで使用して細胞上清中に免疫グロブリンを産生させることができる。高純度のヒトモノクローナル免疫グロブリンを回収する能力を最適化するために、無血清培地中の増殖に細胞株を適合させることができる。

30

40

【0159】

いずれかの手段により産生されたMAbを、必要であれば、濾過、遠心分離および様々なクロマトグラフィー法、例えばFPLCまたはアフィニティークロマトグラフィーを使用してさらに精製してもよい。本開示のモノクローナル抗体の断片は、酵素、例えばペプシンまたはパパインでの消化を含む方法により、および/または化学還元によるジスルフィド結合の分解により、精製されたモノクローナル抗体から得ることができる。あるいは、本開示に包含されるモノクローナル抗体断片は、自動ペプチド合成装置を使用して合成すること

50

ができる。

【0160】

分子クローニングアプローチを使用してモノクローナル抗体を生成してもよいことも企図されている。このために、RNAをハイブリドーマ株から単離し、抗体遺伝子をRT-PCRにより得、免疫グロブリン発現ベクターにクローニングすることができる。あるいは、コンビナトリアル免疫グロブリンファージミドライブラリーを細胞株から単離されたRNAから調製し、適切な抗体を発現するファージミドをウイルス抗原を使用するパニングにより選択する。従来のハイブリドーマ技術に対するこのアプローチの利点は、単一ラウンドで約 10^4 倍多くの抗体を製造およびスクリーニングできること、およびH鎖とL鎖の組合せにより新たな特異性が生成され、それが適切な抗体を発見する可能性をさらに増加させることである。

10

【0161】

それぞれが参照することにより本明細書に組み入れられ、本開示において有用な抗体の製造を教示する、他の米国特許としては、コンビナトリアルアプローチを使用するキメラ抗体の製造を記載する米国特許第5,565,332号；組換え免疫グロブリン調製物を記載する米国特許第4,816,567号；および抗体-治療剤コンジュゲートを記載する米国特許第4,867,973号が挙げられる。

【0162】

B. 本開示の抗体

1. LILRB4に対する抗体

20

本開示による抗体またはその抗原結合断片は、第1の例では、それらの結合特異性、この場合はLILRB4についての結合特異性により定義することができる。当業者は、当業者に周知の技術を使用して所与の抗体の結合特異性/親和性を評価することにより、そのような抗体が本願の請求項の範囲内に入るかどうかを決定することができる。

【0163】

一局面では、LILRB4に特異的に結合する抗体および抗原結合断片が提供される。いくつかの態様では、LILRB4に結合しているときに、そのような抗体はLILRB4の活性化をモジュレートする。ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片は、LILRB4に結合しているときにLILRB4を活性化させる。ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片は、LILRB4に結合しているときにLILRB4の活性化を抑制する。ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片は、LILRB4に結合しているときに、ApoEとLILRB4との相互作用に特異的に干渉し、それを特異的にブロックするかまたは低減させることができる。ある特定の態様では、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片は、LILRB4のApoE媒介性の活性を阻害することができる。ある特定の態様では、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片は、ヒトLILRB4に特異的または選択的に結合する。

30

【0164】

一部の態様では、抗体または抗原結合断片は、ヒトLILRB4に特異的に結合し、かつ/またはヒトLILRB4のApoEへの結合を（例えば、実施例に開示されるようなアッセイにより）少なくとも約20%~40%、40~60%、60~80%、80~85%、またはより高い割合で実質的に阻害する。一部の態様では、抗体または抗原結合断片は、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} 、 10^{-13} M未満（より緊密に結合する）のKdを有する。いくつかの態様では、抗体または抗原結合断片は、LILRB4へのApoEの結合のブロックについて、1 μ M未満、1000nM~100nM、100nM~10nM、10nM~1nM、1000pM~500pM、500pM~200pM、200pM未満、200pM~150pM、200pM~100pM、100pM~10pM、10pM~1pMのIC₅₀を有する。

40

【0165】

いくつかの態様では、本明細書において提供される抗体または抗原結合断片は、図28A~28Cに示される重鎖、および図30A~30Cに示される軽鎖からのクローンCDR対を有する。そのような抗体は、本明細書に記載されている方法を使用して実施例セクションにおいて下記に議論されるクローンにより製造されてもよい。ある特定の態様では、各CDRは

50

、CDRのKabatの定義、Chothiaの定義、Kabatの定義とChothiaの定義との組合せ、AbMの定義、またはcontactの定義にしたがって定義される。ある特定の態様では、抗体または抗原結合断片は、表1および2からのクローン重鎖・軽鎖CDR配列対により特徴付けられる。

【0166】

ある特定の態様では、抗体は、追加の「フレームワーク」領域を含むそれらの可変配列により定義されてもよい。抗体は、図28A～28Cおよび図30A～30Bからのクローン重鎖・軽鎖アミノ酸配列対により特徴付けられる。さらには、抗体配列は、特にCDRの外側の領域において、これらの配列から変更されてもよい。例えば、アミノ酸は、所与のパーセンテージ、例えば、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%または99%の相同性で上記のものから変更されてもよく、またはアミノ酸は、保存的置換（下記に議論される）を許容することにより上記のものから変更されてもよい。以上のそれぞれは図28A～28Cおよび図30A～30Cのアミノ酸配列に適用される。別の態様では、本開示の抗体誘導体は、最大で0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、またはそれより多くの保存的または非保存的アミノ酸置換を有するが、それでもなお所望の結合および機能的特性を呈するVLおよびVHドメインを含む。

【0167】

本開示の抗体はIgGとして生成されたが、定常領域を改変してそれらの機能を変化させることが有用なことがある。抗体の定常領域は、典型的には、宿主組織または因子への抗体の結合を媒介し、該因子としては、免疫系の様々な細胞（例えば、エフェクター細胞）および古典的補体システムの第1の成分（C1q）が挙げられる。したがって、「抗体」という用語は、IgA型、IgG型、IgE型、IgD型、IgM型（およびこれらのサブタイプ）のインタクトな免疫グロブリンを含み、免疫グロブリンの軽鎖はκ型またはλ型であってもよい。軽鎖および重鎖内で、可変領域および定常領域は、約12またはそれより多くのアミノ酸の35の「J」領域により連結され、重鎖はまた、約10個のさらなるアミノ酸の「D」領域を含む。一般に、Fundamental Immunology Ch.7（Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y.（1989）を参照されたい。

【0168】

本開示は、本明細書において開示される抗体をコードする核酸にハイブリダイズする核酸をさらに含む。一般に、核酸は、本明細書において開示される抗体をコードする核酸、そしてまたLILRB4に特異的に結合する能力を維持する抗体をコードする核酸に中または高ストリンジエンシー条件下でハイブリダイズする。一本鎖形態の第1の核酸分子が温度および溶液イオン強度の適切な条件下で第2の核酸分子にアニールできる時に、第1の核酸分子は第2の核酸分子に「ハイブリダイズ可能」である（Sambrook et al., MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, 3rd ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 2001を参照）。温度およびイオン強度の条件は、ハイブリダイゼーションの「ストリンジエンシー」を決定する。典型的な中ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件は、40%のホルムアミド、5×または6×のSSCおよび0.1%のSDS、42℃である。高ストリンジエンシーのハイブリダイゼーション条件は、50%のホルムアミド、5×または6×のSSC（0.15MのNaClおよび0.015Mのクエン酸Na）、42℃、または任意でより高い温度（例えば、57℃、59℃、60℃、62℃、63℃、65℃、または68℃）である。ハイブリダイゼーションは2つの核酸が相補的配列を含有することを必要とするが、ハイブリダイゼーションのストリンジエンシーに応じて、塩基間のミスマッチが可能である。核酸にハイブリダイズするための適切なストリンジエンシーは、核酸の長さおよび相補性の程度、当技術分野において周知の変数に依存する。2つのヌクレオチド配列間の類似性または相同性の程度が大きくなればなるほど、核酸がハイブリダイズし得るストリンジエンシーはより高くなる。100ヌクレオチドより大きい長さのハイブリッドについて、融解温度を算出するための式が導出されている（前記のSambrook et al.を参照）。より短い核酸、例えばオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションについて、ミスマッチの位置がより重要となり、オリゴヌクレオチドの長さがその特異性を決定する（前

記のSambrook et al.を参照)。

【0169】

(表1) 重鎖CDRアミノ酸配列

抗体/鎖	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
B4-15-1	GFTINSAH	2	STTGGPS	3	ARDGPGNNIDMDL	4
B4-15-2	GIDLTNYA	9	ITGSSNT	10	ASNPDSHNANGV	11
B4-116-1	GFSFSSTYC	16	IHGVSTNNR	17	ARSDTDYEWGLSL	18
B4-116-2	GFSFSSTYC	23	IHGVSTNNR	24	ARSDTDYEWGLSL	25
B4-116-3	GFSLSNNG	30	IYVGS GTT	31	ARGFGVGDWQEWFFDL	32
B4-116-4	GFSLSNNG	37	IYVGS GTT	38	ARGFGVGDWQEWFFDL	39
B4-55-1	GFSLS SYA	44	IGTGTTT	45	VRNDVYWAFNL	46
B4-55-2	GFSLS SYA	51	IGTGTTT	52	VRNDVYWAFNL	53
B4-19	GFSIS TYA	58	IGTG GSA	59	ARNDIYWAFGL	60
B4-49	GFDFSSSGW	65	IYSGRSGST	66	ARALYVDYVDYDYIDL	67
B4-72-1	GFSLS SY Y	72	INTG GSA	73	ARGWSRGDL	74
B4-72-2	GFSLS SY Y	79	INTG GSA	80	ARGWSRGDL	81
B4-86	GFSFSSSYW	86	IGTGSGS	87	VRGAGYSSYRL	88
B4-87	GFSFISTYW	93	IYTGSGSGST	94	ARALYVDYVDYDYIDL	95
B4-193	GFSLSSSYW	100	IDSGSVGIT	101	SVRHGDNWALDL	102
h193-H1	GFSLSSSYW	100	IDSGSVGIT	101	VRHGDNWALDL	224
h193-H2	GFSLSSSYW	100	IDSGSVGIT	101	VRHGDNWALDL	224
h193-H3	GFSLSSSYW	100	IDSGSVGIT	101	ARHGDNWALDL	227
h193-H4	GFSLSSSYW	100	IDSGSVGIT	101	ARHGDNWALDL	227
h193-H5	GFSLSSSYW	100	IDSGSVGIT	101	ARHGDNWALDL	227
h193-H6	GFSLSSSYW	100	IDSGSVGIT	101	ARHGDNWALDL	227
h193-H7	GFSLSSSYW	100	IDSGSVGIT	101	ARHGDNWALDL	227

【0170】

(表2) κ 軽鎖CDRアミノ酸配列

10

20

30

40

50

抗体/鎖	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
B4-15-1	QNRGGS	6	SAS	na	QSTIYSISDIGA	7
B4-15-2	QSVYDNN	13	SAS	na	QSYGITNKNYNNS	14
B4-116-1	ESIGSR	20	KAS	na	QCAGQSSTWA	21
B4-116-2	ESIGSR	27	KAS	na	QCAGQSSTWA	28
B4-116-3	ESISNY	34	KAS	na	QAYWGTSTMA	35
B4-116-4	ESISNY	41	KAS	na	QAYWGTSTMA	42
B4-55-1	QSVVNNNA	48	KAS	na	QGGYYIGISDYP	49
B4-55-2	QSVVNNNA	55	KAS	na	QGGYYIGISDYP	56
B4-19	EGIRNW	62	GAS	na	QGGVYSSSIYGYP	63
B4-49	QSTGIR	69	ATS	na	QYSYGGSSYVFD	70
B4-72-1	ESVDNW	76	DAS	na	LGVFHDGINNA	77
B4-72-2	QNVYDDDT	83	DAS	na	LGVFHDGINNA	84
B4-86	ESVSNW	90	GAS	na	QQGYDWDNIDNA	91
B4-87	ENIGSR	97	AAS	na	QCSYYGSTYVFG	98
B4-193	QSINSW	104	KAS	na	QHGYIRGDLDNV	105
h193-K1	QSINSW	104	KASTLAS	233	HGYIRGDLDNV	234
h193-K2	QSINSW	104	KASTLAS	233	HGYIRGDLDNV	234
h193-K3	QSINSW	104	KASTLAS	233	HGYIRGDLDNV	234
h193-K4	QSINSW	104	KASTLAS	233	HGYIRGDLDNV	234

10

20

【0171】

(表3) LILRB4抗体の配列番号

抗体	重鎖可変領域(CDR1, CDR2, CDR3) A.A. SEQ ID NO.	軽鎖可変領域(CDR1, CDR2, CDR3) A.A. SEQ ID NO.	重鎖可変領域(CDR1, CDR2, CDR3) N.A. SEQ ID NO.	軽鎖可変領域(CDR1, CDR2, CDR3) N.A. SEQ ID NO.
B4-15-1	1 (2, 3, 4)	5 (6, SAS, 7)	106 (107, 108, 109)	110 (111, tctgcatcc, 112)
B4-15-2	8 (9, 10, 11)	12 (13, SAS, 14)	113 (114, 115, 116)	117 (118, tctgcatcc, 119)
B4-116-1	15 (16, 17, 18)	19 (20, KAS, 21)	120 (121, 122, 123)	124 (125, aaggcatcc, 126)
B4-116-2	22 (23, 24, 25)	26 (27, KAS, 28)	127 (128, 129, 130)	131 (132, aaggcatcc, 133)
B4-116-3	29 (30, 31, 32)	33 (34, KAS, 35)	134 (135, 136, 137)	138 (139, aaggcatcc, 140)
B4-116-4	36 (37, 38, 39)	40 (41, KAS, 42)	141 (142, 143, 144)	145 (146, aaggcatcc, 147)
B4-55-1	43 (44, 45, 46)	47 (48, KAS, 49)	148 (149, 150, 151)	152 (153, aaggcttcc, 154)
B4-55-2	50 (51, 52, 53)	54 (55, KAS, 56)	155 (156, 157, 158)	159 (160, aaggcttcc, 161)
B4-19	57 (58, 59, 60)	61 (62, GAS, 63)	162 (163, 164, 165)	166 (167, ggtgcatcc, 168)
B4-49	64 (65, 66, 67)	68 (69, ATS, 70)	169 (170, 171, 172)	173 (174, gctacatcc, 175)
B4-72-1	71 (72, 73, 74)	75 (76, DAS, 77)	176 (177, 178, 179)	180 (181, gatgcatcc, 182)
B4-72-2	78 (79, 80, 81)	82 (83, DAS, 84)	183 (184, 185, 186)	187 (188, gatgcatcc, 189)
B4-86	85 (86, 87, 88)	89 (90, GAS, 91)	190 (191, 192, 193)	194 (195, ggtgcatcc, 196)
B4-87	92 (93, 94, 95)	96 (97, AAS, 98)	197 (198, 199, 200)	201 (202, gctgcatcc, 203)
B4-193	99 (100, 101, 102)	103 (104, KAS, 105)	204 (205, 206, 207)	208 (209, aaggcgctcc, 210)

30

40

【0172】

(表4) ヒト化193 (h193) 抗体重鎖の配列番号

重鎖	可変領域(CDR1, CDR2, CDR3) A.A. SEQ ID NO.
h193-H1	223 (100, 101, 224)
h193-H2	225 (100, 101, 224)
h193-H3	226 (100, 101, 227)
h193-H4	228 (100, 101, 227)
h193-H5	229 (100, 101, 227)
h193-H6	230 (100, 101, 227)
h193-H7	231 (100, 101, 227)

【0173】

(表5) ヒト化193 (h193) 抗体軽鎖の配列番号

軽鎖	可変領域(CDR1, CDR2, CDR3) A.A. SEQ ID NO.
h193-K1	232 (104, 233, 234)
h193-K2	235 (104, 233, 234)
h193-K3	236 (104, 233, 234)
h193-K4	237 (104, 233, 234)

【0174】

2. 例示的なエピトープおよび競合する抗原結合タンパク質

別の局面では、本開示は、抗LILRB4抗体が結合するエピトープを提供する。

【0175】

いくつかの態様では、本明細書に記載されている抗体が結合するエピトープは有用である。ある特定の態様では、本明細書において提供されるエピトープは、LILRB4に結合する抗体または抗原結合タンパク質を単離するために利用することができる。ある特定の態様では、本明細書において提供されるエピトープは、LILRB4に結合する抗体または抗原結合タンパク質を生成するために利用することができる。ある特定の態様では、エピトープまたは本明細書において提供されるエピトープを含む配列は、LILRB4に結合する抗体または抗原結合タンパク質を生成するために免疫原として利用することができる。ある特定の態様では、本明細書に記載されているエピトープまたは本明細書に記載されているエピトープを含む配列は、LILRB4の生物学的活性に干渉するために利用することができる。

【0176】

いくつかの態様では、エピトープのいずれかに結合する抗体またはその抗原結合断片は特に有用である。いくつかの態様では、本明細書において提供されるエピトープは、抗体が結合している時にLILRB4の生物学的活性をモジュレートする。いくつかの態様では、本明細書において提供されるエピトープは、抗体が結合している時にLILRB4を活性化させる。いくつかの態様では、本明細書において提供されるエピトープは、抗体が結合している時にLILRB4の活性化を抑制する。いくつかの態様では、本明細書において提供されるエピトープは、抗体が結合している時にApoEとLILRB4との相互作用をブロックする。

【0177】

いくつかの態様では、抗体と接触するまたは抗体が覆い隠す残基を含有するドメイン/領域は、LILRB4中の特定の残基を変異させることおよび変異されたLILRB4タンパク質に抗体が結合できるかどうかを判定することにより同定することができる。多数の個々の変異を作製することにより、結合に直接的な役割を果たす残基または変異が抗体と抗原との結合に影響できるように抗体に十分に近接する残基を同定することができる。これらのアミノ酸の知識から、抗原結合タンパク質と接触するまたは抗体により覆われる残基を含有する抗原のドメインまたは領域を解明することができる。そのようなドメインは、抗原結合タンパク質の結合エピトープを含むことができる。

【0178】

別の局面では、本開示は、LILRB4への特異的結合について、本明細書に記載されてい

るエピトープに結合する例示される抗体または抗原結合断片の1つと競合する抗原結合タンパク質を提供する。そのような抗原結合タンパク質はまた、本明細書において例示される抗体または抗原結合断片の1つと同じエピトープ、またはオーバーラップエピトープに結合することができる。例示される抗体と競合するまたは同じエピトープに結合する抗原結合タンパク質は、類似の機能的特性を示すことが予想される。例示される抗体としては、表1および2に含まれる重鎖および軽鎖の可変領域およびCDRを有するものなど、上記される抗体が挙げられる。ある特定の態様では、エピトープは、ヒトLILRB4のD1およびD2ドメインの間のリンカー領域内に位置する。ある特定の態様では、エピトープは、表9に列記されている、アミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸のうちの少なくとも1つのアミノ酸を含む。ある特定の態様では、エピトープは、SEQ ID NO:238（ヒトLILRB4タンパク質のD1およびD2ドメイン）の、W18、G96、A97、Y98、S99、K100、Q122、S123、R124、S125、P126、H153およびQ154から選択される、アミノ酸配列の1つまたは複数のアミノ酸のうちの少なくとも1つのアミノ酸を含む。

【0179】

C. 抗体配列の操作

様々な態様において、発現の向上、交差反応性の向上、またはオフターゲット結合の減少などの様々な理由のために、同定された抗体の配列を操作することを選択することができる。以下は、抗体操作のための関連技術の一般的議論である。

【0180】

ハイブリドーマを培養した後、細胞を溶解し、トータルRNAを抽出することができる。ランダムな六量体をRTで使用してRNAのcDNAコピーを生成させた後、全てのヒト可変遺伝子配列を増幅することが期待されるPCRプライマーのマルチプレックス混合物を使用してPCRを行うことができる。PCR生成物をpGEM-T Easyベクターにクローニングした後、標準的なベクタープライマーを使用する自動化されたDNAシーケンシングによりシーケンシングすることができる。ハイブリドーマ上清から回収され、Protein Gカラムを使用してFPLCにより精製された抗体を使用して結合および中和のアッセイを行うことができる。クローニングベクターからの重鎖および軽鎖Fv DNAをIgGプラスミドベクターにサブクローニングすることにより組換え全長IgG抗体を生成させ、293 Freestyle細胞またはCHO細胞にトランスフェクトし、抗体を293細胞またはCHO細胞の上清から回収および精製することができる。

【0181】

最終cGMP製造方法と同じ宿主細胞および細胞培養方法において製造された抗体の迅速な利用可能性は、方法開発プログラムの期間を低減させる潜在能力を有する。Lonzaは、CHO細胞において少量（50gまで）の抗体を迅速に製造するための、CDACF培地中で生育されたプールされたトランスフェクタントを使用する一般的方法を開発した。真の一過性システムよりは若干遅いが、利点として、より高い生成物濃度ならびに産生細胞株と同じ宿主およびプロセスの使用が挙げられる。流加モードで稼働した使い捨てバイオリアクター：使い捨てバッグバイオリアクター培養（作動体積5L）における、モデル抗体を発現するGS-CHOプールの増殖および生産性の例では、トランスフェクション9週間以内に回収抗体濃度2g/Lが達成された。

【0182】

抗体分子は、例えば、mAbのタンパク質分解切断により製造される断片（F(ab')、F(ab')₂など）、または、例えば組換え手段を介して製造可能な一本鎖免疫グロブリンを含む。そのような抗体誘導体は一価である。一態様では、そのような断片は、互いに組み合わせることができ、または他の抗体断片もしくは受容体リガンドと組み合わせて「キメラ」結合分子を形成させることができる。顕著なことに、そのようなキメラ分子は、同じ分子の異なるエピトープに結合できる置換基を含有してもよい。

【0183】

1. 抗原結合の改変

関連する態様では、抗体は、開示される抗体の誘導体、例えば、開示される抗体中のCD

10

20

30

40

50

R配列と同一のCDR配列を含む抗体（例えば、キメラ抗体、またはCDRグラフト抗体）である。あるいは、抗体分子中への保存的变化の導入などの改変を行うことが望まれる場合がある。そのような変更の実施において、アミノ酸のハイドロパシー指数が考慮されうる。タンパク質への相互作用性生物学的機能の付与におけるハイドロパシーアミノ酸指数の重要性は、当技術分野において一般に理解されている（Kyte and Doolittle, 1982）。アミノ酸の相対的なハイドロパシーの特徴は、結果として得られるタンパク質の二次構造に寄与し、そしてそれがタンパク質と他の分子（例えば、酵素、基質、受容体、DNA、抗体、抗原など）の相互作用を規定することが認められている。

【0184】

同様のアミノ酸の置換は親水性に基づいて効果的に行うことができることも当技術分野において理解されている。参照することにより本明細書に組み入れられる米国特許第4,554,101号には、隣接するアミノ酸の親水性により支配されるタンパク質の最大の局所的な平均の親水性はタンパク質の生物学的特性と互に関連することが述べられている。米国特許第4,554,101号に詳述されるように、以下の親水性の値がアミノ酸残基に割り当てられている:塩基性アミノ酸:アルギニン(+3.0)、リシン(+3.0)、およびヒスチジン(-0.5);酸性アミノ酸:アスパラギン酸(+3.0±1)、グルタミン酸(+3.0±1)、アスパラギン(+0.2)、およびグルタミン(+0.2);親水性非イオン性アミノ酸:セリン(+0.3)、アスパラギン(+0.2)、グルタミン(+0.2)、およびスレオニン(-0.4)、硫黄含有アミノ酸:システイン(-1.0)およびメチオニン(-1.3);疎水性非芳香族アミノ酸:バリン(-1.5)、ロイシン(-1.8)、イソロイシン(-1.8)、プロリン(-0.5±1)、アラニン(-0.5)、およびグリシン(0);疎水性芳香族アミノ酸:トリプトファン(-3.4)、フェニルアラニン(-2.5)、およびチロシン(-2.3)。

【0185】

アミノ酸は、類似の親水性を有する別のアミノ酸を置換して、生物学的または免疫学的に改変されたタンパク質を生じさせることができることが理解されている。そのような変更では、親水性の値が±2以内のアミノ酸の置換が好ましく、±1以内のものが特に好ましく、±0.5以内のものが特によりいっそう好ましい。

【0186】

上記に概要を述べたように、アミノ酸置換は、一般に、アミノ酸側鎖置換基の相対的な類似性、例えば、疎水性、親水性、電荷、サイズなどに基づく。様々な以上の特徴を考慮に入れた例示的な置換は当業者に周知であり、以下が挙げられる:アルギニンおよびリシン;グルタミン酸およびアスパラギン酸;セリンおよびスレオニン;グルタミンおよびアスパラギン;およびバリン、ロイシンおよびイソロイシン。

【0187】

本開示はまた、アイソタイプ改変を企図している。異なるアイソタイプを有するようにFc領域を改変することにより、異なる機能を達成することができる。例えば、IgG₁への変更は抗体依存性細胞傷害を増強することができ、クラスAへの切換えは組織分布を向上させることができ、クラスMへの切換えは結合価を向上させることができる。

【0188】

改変された抗体は当業者に公知の任意の技術により調製することができ、該技術としては、標準的な分子生物学技術を通じた発現、またはポリペプチドの化学合成が挙げられる。組換え発現の方法はこの文献中の他の箇所で行われる。

【0189】

2. Fc領域の改変

本明細書において開示される抗体は、Fc領域内に改変を含むようにも操作することができ、これは典型的には、抗体の1つまたは複数の機能的特性、例えば、血清半減期、補体結合、Fc受容体結合、および/またはエフェクター機能（例えば、抗原依存性の細胞傷害）を変化させるためのものである。さらには、本明細書において開示される抗体は、これもまた抗体の1つまたは複数の機能的特性を変化させるために、化学的に修飾することができ（例えば、1つまたは複数の化学的部分を抗体に結合させることができる）、または

そのグリコシル化を変化させるように修飾することができる。これらの態様のそれぞれは以下にさらに詳細に記載されている。Fc領域中の残基のナンバリングは、KabatのEUインデックスのものである。本明細書において開示される抗体はまた、変化したエフェクター機能を提供するように改変された（またはブロックされた）Fc領域を有する抗体を含む。例えば、米国特許第5,624,821号；WO2003/086310；WO2005/120571；WO2006/0057702を参照されたい。そのような改変を使用して、免疫系の様々な反応を増強させまたは抑制することができ、診断および療法において有益な効果を有し得る。Fc領域の変更としては、アミノ酸変化（置換、欠失および挿入）、グリコシル化または脱グリコシル化、および複数のFcの付加が挙げられる。Fcの変更はまた、治療的抗体において抗体の半減期を変化させることができ、これはより少ない頻度の投薬、したがって簡便性の増加および材料の使用の減少を可能とする。この変異は、ヒンジ領域中の重鎖ジスルフィド架橋間の不均質性を無くすることが報告されている。

【0190】

一態様では、CH1のヒンジ領域は、ヒンジ領域中のシステイン残基の数が増加または減少するように改変される。このアプローチは米国特許第5,677,425号にさらに記載されている。CH1のヒンジ領域中のシステイン残基の数を変更することにより、例えば、軽鎖および重鎖のアセンブリーが促進されて、抗体の安定性が増加または減少する。別の態様では、抗体は、その生物学的半減期を増加させるように改変される。様々なアプローチが可能である。例えば、米国特許第6,277,375号に記載されているように、以下の変異の1つまたは複数を導入することができる：T252L、T254S、T256F。あるいは、生物学的半減期を増加させるために、米国特許第5,869,046号および同第6,121,022号に記載されているように、抗体をCH1またはCL領域内で変化させて、IgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループからのサルベージ受容体結合エпитープを含有させることができる。さらに他の態様では、Fc領域は、抗体のエフェクター機能を変化させるために、異なるアミノ酸残基で少なくとも1つのアミノ酸残基を置換することにより変更される。例えば、抗体がエフェクターリガンドについて変化した親和性を有するが親抗体の抗原結合能力を保持するように、アミノ酸残基234、235、236、237、297、318、320および322から選択される1つまたは複数のアミノ酸を異なるアミノ酸残基で置換することができる。親和性を変更させるエフェクターリガンドは、例えば、Fc受容体または補体のC1成分であり得る。このアプローチは、米国特許第5,624,821号および同第5,648,260号にさらに詳細に記載されている。

【0191】

別の例では、アミノ酸位置231および239内の1つまたは複数のアミノ酸残基が変更されて、それにより抗体の補体結合能力が変更される。このアプローチは、PCT公開WO94/29351にさらに記載されている。さらに別の例では、Fc領域は、以下の位置：238、239、243、248、249、252、254、255、256、258、264、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438または439の1つまたは複数のアミノ酸を改変することにより、抗体依存性細胞傷害（ADCC）を媒介する抗体の能力を増加もしくは減少させるためおよび/またはFcγ受容体についての抗体の親和性を増加もしくは減少させるために改変される。このアプローチは、PCT公開WO00/42072にさらに記載されている。さらに、FcγRI、FcγRII、FcγRIIIおよびFcγRnについてのヒトIgG1上の結合部位がマッピングされており、また向上した結合性を有するバリエーションが記載されている。位置256、290、298、333、334および339における特定の変異は、FcγRIIIに対する結合を向上させることが示された。さらに、以下の組合せの変異体は、FcγRIII結合を向上させることが示された：T256A/S298A、S298A/E333A、S298A/K224AおよびS298A/E333A/K334A。

【0192】

一態様では、Fc領域は、残基243および264を改変することにより、エフェクター機能を媒介する抗体の能力を減少させかつ/または抗炎症特性を増加させるために改変される。一態様では、抗体のFc領域は、位置243および264における残基をアラニンに変更することにより改変される。一態様では、Fc領域は、残基243、264、267および328を改変することにより、エフェクター機能を媒介する抗体の能力を減少させかつ/または抗炎症特性を増加させるために改変される。さらに別の態様では、抗体は特定のグリコシル化パターンを含む。例えば、非グリコシル化された抗体を調製することができる（すなわち、抗体はグリコシル化を欠いている）。抗体のグリコシル化パターンを変化させて、例えば、抗原についての抗体の親和性またはアビディティを増加させることができる。そのような改変は、例えば、抗体配列内のグリコシル化部位の1つまたは複数を変化させることにより達成することができる。例えば、可変領域フレームワークグリコシル化部位の1つまたは複数の除去をもたらし、それによりその部位におけるグリコシル化を取り除く1つまたは複数のアミノ酸置換を行うことができる。そのようなグリコシル化は、抗原についての抗体の親和性またはアビディティを増加させ得る。例えば、米国特許第5,714,350号および同第6,350,861号を参照されたい。

【0193】

グリコシル化パターンが低フコシル化または非フコシル化されたグリカンを含む抗体も調製することができ、低フコシル化された抗体または非フコシル化された抗体は、グリカン上のフコシル残基の量が低減されている。抗体はまた、増加した量の二分岐GlcNac構造を有するグリカンを含んでもよい。そのような変化したグリコシル化パターンは、抗体のADCC能力を増加させることが実証されている。そのような改変は、例えば、特定のグリコシル化パターンを有する糖タンパク質を産生するようにグリコシル化経路が遺伝子操作された宿主細胞中で抗体を発現させることにより達成することができる。これらの細胞は当技術分野において記載されており、本発明の組換え抗体を発現し、それにより変化したグリコシル化を有する抗体を製造するための宿主細胞として使用することができる。例えば、細胞株Ms704、Ms705、およびMs709はフコシルトランスフェラーゼ遺伝子、FUT8（ α （1,6）-フコシルトランスフェラーゼ）を欠いており、それによりMs704、Ms705、およびMs709細胞株中で発現された抗体は、糖鎖上にフコースを欠いている。Ms704、Ms705、およびMs709 FUT8-/-細胞株は、2つの置換ベクターを使用するCHO/DG44細胞におけるFUT8遺伝子の標的破壊により作出された（米国特許出願公開第20040110704号を参照されたい。別の例として、EP1176195には、フコシルトランスフェラーゼをコードする機能的に破壊されたFUT8遺伝子を有する細胞株であって、そのような細胞株中で発現された抗体が、 α -1,6結合関連酵素を低減させまたは取り除くことにより低フコシル化を呈する細胞株が記載されている。EP1176195にはまた、抗体のFc領域に結合するN-アセチルグルコサミンにフコースを加える酵素活性が低いまたは該酵素活性を有しない細胞株、例えばラット骨髄腫細胞株YB2/0（ATCC CRL 1662）が記載されている。PCT公開W003/035835には、バリエーションCHO細胞株、Lec13細胞が記載されており、これはAsn（297）連結糖鎖にフコースを結合させる能力が低減されており、その宿主細胞中で発現される抗体の低フコシル化ももたらす。改変されたグリコシル化プロファイル

を有する抗体はまた、PCT公開W006/089231に記載されているように、ニワトリ卵において製造することができる。あるいは、改変されたグリコシル化プロファイルを有する抗体は、植物細胞、例えばアオウキクサ属（*Lemna*）植物細胞中で製造することができる（米国特許第7,632,983号）。植物系における抗体の製造方法は、米国特許第6,998,267号および同第7,388,081号に開示されている。PCT公開W099/54342には、糖タンパク質修飾性グリコシルトランスフェラーゼ（例えば、 β （1,4）-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII（GnTIII））を発現するように操作された細胞株が記載されており、操作された細胞株中で発現された抗体は、増加した二分岐GlcNac構造を呈し、抗体のADCC活性の増加をもたらす。

【0194】

あるいは、フコシダーゼ酵素を使用して抗体のフコース残基を切り離すことができ、例

例えば、フコシダーゼ α -L-フコシダーゼは抗体からフコシル残基を除去する。本明細書において開示される抗体は、哺乳動物様またはヒト様グリコシル化パターンを有する糖タンパク質を産生するように遺伝子操作された下等真核生物宿主細胞、特に真菌宿主細胞、例えば酵母および糸状真菌中で製造された抗体をさらに含む。現在使用されている哺乳動物細胞株に対するこれらの遺伝子改変された宿主細胞の特定の利点は、細胞中で産生される糖タンパク質のグリコシル化プロファイルを制御する能力であり、それにより特定のN-グリカン構造が支配的である糖タンパク質の組成物を製造することができる（例えば、米国特許第7,029,872号および同第7,449,308号を参照）。これらの遺伝子改変された宿主細胞は、支配的に特定のN-グリカン構造を有する抗体を製造するために使用されている。

【0195】

加えて、真菌、例えば酵母または糸状真菌は、フコシル化糖タンパク質を産生する能力を欠いているので、そのような細胞中で産生された抗体は、フコシル化糖タンパク質を産生するための酵素経路を含むように細胞がさらに改変されない限り、フコースを欠く（例えば、PCT公開W02008112092を参照）。特定の態様では、本明細書において開示される抗体は、下等真核宿主細胞中で製造され、フコシル化および非フコシル化ハイブリッドおよび複合体N-グリカンを含む抗体をさらに含み、該N-グリカンとしては、二分岐および多アンテナ（multiantennary）種が挙げられ、GlcNAc (1-4) Man3GlcNAc2; Gal (1-4) GlcNAc (1-4) Man3GlcNAc2; NANA (1-4) Gal (1-4) GlcNAc (1-4) Man3GlcNAc2などのN-グリカンが挙げられるがこれらに限定されない。特定の態様では、本明細書において提供される抗体組成物は、GlcNAcMan5GlcNAc2; GalGlcNAcMan5GlcNAc2; およびNANAGalGlcNAcMan5GlcNAc2からなる群より選択される少なくとも1つのハイブリッドN-グリカンを有する抗体を含んでもよい。特定の局面では、ハイブリッドN-グリカンは、組成物中の支配的なN-グリカン種である。さらなる局面では、ハイブリッドN-グリカンは、組成物中のハイブリッドN-グリカンの約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%を構成する特定のN-グリカン種である。

【0196】

特定の態様では、本明細書において提供される抗体組成物は、GlcNAcMan3GlcNAc2; GalGlcNAcMan3GlcNAc2; NANAGalGlcNAcMan3GlcNAc2; GlcNAc2Man3GlcNAc2; GalGlcNAc2Man3GlcNAc2; Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2; NANAGal2GlcNAc2Man3GlcNAc2; およびNANA2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2からなる群より選択される少なくとも1つの複合体N-グリカンを有する抗体を含む。特定の局面では、複合体N-グリカンは、組成物中の支配的なN-グリカン種である。さらなる局面では、複合体N-グリカンは、組成物中の複合体N-グリカンの約30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99%、または100%を構成する特定のN-グリカン種である。特定の態様では、N-グリカンはフコシル化されている。一般に、フコースは、N-グリカンの還元末端においてGlcNAcと α 1,3連結しており、N-グリカンの還元末端においてGlcNAcと α 1,6連結しており、N-グリカンの非還元末端においてGalと α 1,2連結しており、N-グリカンの非還元末端においてGlcNAcと α 1,3連結しており、またはN-グリカンの非還元末端においてGlcNAcと α 1,4連結している。

【0197】

したがって、上記糖タンパク質組成物の特定の局面では、グリコフォームは、 α 1,3連結または α 1,6連結フコースであって、Man5GlcNAc2 (Fuc)、GlcNAcMan5GlcNAc2 (Fuc)、Man3GlcNAc2 (Fuc)、GlcNAcMan3GlcNAc2 (Fuc)、GlcNAc2Man3GlcNAc2 (Fuc)、GalGlcNAc2Man3GlcNAc2 (Fuc)、Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2 (Fuc)、NANAGal2GlcNAc2Man3GlcNAc2 (Fuc)、およびNANA2Gal2GlcNAc2Man3GlcNAc2 (Fuc) からなる群より選択されるグリコフォームを生じさせ; α 1,3連結または α 1,4連結フコースであって、GlcNAc (Fuc) Man5GlcNAc2、GlcNAc (Fuc) Man3GlcNAc2、GlcNAc2 (Fuc1-2) Man3GlcNAc2、GalGlcNAc2 (Fuc1-2) Man3GlcNAc2、Gal2GlcNAc2 (Fuc1-2) Man3GlcNAc2、NANAGal2GlcNAc2 (Fuc1-2) Ma

10

20

30

40

50

n3GlcNAc2、およびNANA2Gal2GlcNAc2 (Fuc1-2) Man3GlcNAc2からなる群より選択されるグリコフォームを生じさせ; または α 1,2連結フコースであって、Gal (Fuc) GlcNAc2Man3GlcNAc2、Gal2 (Fuc1-2) GlcNAc2Man3GlcNAc2、NANAGal2 (Fuc1-2) GlcNAc2Man3GlcNAc2、およびNANA2Gal2 (Fuc1-2) GlcNAc2Man3GlcNAc2からなる群より選択されるグリコフォームを生じさせる。

【0198】

さらなる局面では、抗体は高マンノースN-グリカンを含み、これには、Man8GlcNAc2、Man7GlcNAc2、Man6GlcNAc2、Man5GlcNAc2、Man4GlcNAc2、またはMan3GlcNAc2 N-グリカン構造からなるN-グリカンが含まれるがこれらに限定されない。上記のさらなる局面では、複合体N-グリカンは、フコシル化および非フコシル化された二分岐および多アンテナの種をさらに含む。本明細書において使用される場合、「N-グリカン」および「グリコフォーム」という用語は交換可能に使用され、N連結オリゴサッカリド、例えば、ポリペプチドのアスパラギン残基へのアスパラギン-Nアセチルグルコサミン連結により結合したものを指す。N連結糖タンパク質は、タンパク質中のアスパラギン残基のアミド窒素に連結したN-アセチルグルコサミン残基を含有する。

【0199】

D. 一本鎖抗体

単鎖可変断片 (scFv) は、短い (通常、セリン、グリシン) リンカーと共に連結した免疫グロブリンの重鎖および軽鎖の可変領域の融合物である。このキメラ分子は、定常領域の除去およびリンカーペプチドの導入にもかかわらず、元々の免疫グロブリンの特異性を保持する。この改変は、通常、変化されないまま特異性を残す。これらの分子は歴史的に、単一のペプチドとして抗原結合ドメインを発現することが高度に簡便であるファージディスプレイを促進するために作出された。あるいは、scFvは、ハイブリドーマに由来するサブクローニングされた重鎖および軽鎖から直接的に作出することができる。単鎖可変断片は、完全抗体分子中に見出され、したがって抗体を精製するために使用される一般的な結合部位 (例えば、タンパク質A/G) である定常Fc領域を欠いている。プロテインLは κ 軽鎖の可変領域と相互作用するので、これらの断片は、多くの場合、プロテインLを使用して精製/固定化することができる。

【0200】

フレキシブルリンカーは、一般に、ヘリックスおよびターン促進性アミノ酸残基、例えば、アラニン、セリンおよびグリシンから構成される。しかしながら、他の残基もまた機能することができる。Tang et al. (1996) は、タンパク質リンカーライブラリーから一本鎖抗体 (scFv) 用に特化したリンカーを迅速に選択する手段としてファージディスプレイを使用した。重鎖および軽鎖可変ドメイン用の遺伝子が可変組成物の18アミノ酸ポリペプチドをコードするセグメントにより連結されたランダムリンカーライブラリーが構築された。scFvレパートリー (約 5×10^6 個の異なるメンバー) が糸状ファージ上に提示され、ハプテンでの親和性選択に供された。選択されたバリエーションの集団は結合活性の有意な増加を呈したが、かなりの配列多様性を保持した。1054種の個々のバリエーションのスクリーニングは、可溶性形態で効率的に製造された触媒活性scFvをその後にもたらした。配列解析により、選択されたテザーの唯一の共通の特徴としてV_HのC末端の後のリンカーの2残基における保存されたプロリンおよび他の位置における多数のアルギニンおよびプロリンが明らかになった。

【0201】

本開示の組換え抗体はまた、受容体の二量体化または多量体化を可能とする配列または部分を伴ってもよい。そのような配列としては、J鎖との組合せで多量体の形成を可能とする、IgAに由来する配列が挙げられる。別の多量体化ドメインはGal4二量体化ドメインである。他の態様では、鎖は、2つの抗体の組合せを可能とする剤、例えばビオチン/アビジンで修飾されてもよい。

【0202】

別の態様では、一本鎖抗体は、非ペプチドリinkerまたは化学ユニットを使用して受容

体の軽鎖および重鎖を連結することにより作出することができる。一般に、軽鎖および重鎖は別個の細胞において製造され、精製され、その後適切な方法で連結されて一緒にされる（すなわち、適切な化学的架橋を介して重鎖のN末端が軽鎖のC末端に取り付けられる）。

【0203】

2つの異なる分子の官能基を結び付ける分子架橋を形成させるために架橋試薬、例えば、安定化剤および凝固剤が使用される。しかしながら、同じアナログの二量体もしくは多量体または異なるアナログから構成されるヘテロマー複合体を作出できることが企図されている。工程毎の方法で2つの異なる化合物を連結させるために、望ましくないホモポリマー形成を取り除くヘテロ二機能性架橋剤を使用することができる。

10

【0204】

例示的なヘテロ二機能性架橋剤は2つの反応性基を含有し、1つは第一級アミン基（例えば、N-ヒドロキシスクシンイミド）と反応し、他方はチオール基（例えば、ピリジルジスルフィド、マレイミド、ハロゲンなど）と反応する。第一級アミン反応性基を通じて、架橋剤は1つのタンパク質（例えば、選択された抗体または断片）のリシン残基と反応してもよく、チオール反応性基を通じて、第1のタンパク質に既に結び付けられた架橋剤は、他のタンパク質（例えば、選択的な剤）のシステイン残基（遊離スルフヒドリル基）と反応する。

【0205】

血液中で合理的な安定性を有する架橋剤が用いられることが好ましい。ターゲティング剤と治療/予防剤とをコンジュゲートさせるための使用に成功することができる多種類のジスルフィド結合含有リンカーが公知である。立体障害を受けるジスルフィド結合を含有するリンカーはインビボでより大きな安定性を与えて、作用部位に達する前のターゲティングペプチドの放出を防ぐことがある。したがって、これらのリンカーは連結剤の一群である。

20

【0206】

別の架橋試薬はSMPTであり、これは隣接するベンゼン環およびメチル基により「立体障害を受ける」ジスルフィド結合を含有する二機能性架橋剤である。ジスルフィド結合の立体障害は、組織および血液中に存在し得るグルタチオンなどのチオレートアニオンによる攻撃から結合を保護する機能を果たし、それにより、結合した剤の標的部位への送達の前のコンジュゲートの脱連結の防止を助けると考えられる。

30

【0207】

多くの他の公知の架橋試薬と同様に、SMPT架橋試薬は、システインのSHまたは第一級アミン（例えば、リシンのイブシロンアミノ基）などの官能基を架橋する能力を与える。別の可能な種類の架橋剤としては、切断性ジスルフィド結合を含有するヘテロ二機能性の光反応性フェニルアジド、例えばスルホスクシンイミジル-2-（p-アジドサリチルアミド）エチル-1,3'-ジチオプロピオネートが挙げられる。N-ヒドロキシ-スクシンイミジル基は第一級アミノ基と反応し、フェニルアジドは（光分解により）任意のアミノ酸残基と非選択的に反応する。

【0208】

障害を受ける架橋剤に加えて、障害を受けないリンカーも本発明にしたがって用いることができる。保護されたジスルフィドを含有または生成するとは考えられない他の有用な架橋剤としては、SATA、SPDP、および2-イミノチオランが挙げられる（Wawrzynczak & Thorpe, 1987）。そのような架橋剤の使用は当技術分野においてよく理解されている。別の実施形態は、フレキシブルリンカーの使用を伴う。

40

【0209】

米国特許第4,680,338号には、アミン含有ポリマーおよび/またはタンパク質とのリガンドのコンジュゲートを製造するため、特に、キレーター、薬物、酵素、検出可能な標識などとの抗体コンジュゲートを形成させるために有用な二機能性リンカーが記載されている。米国特許第5,141,648号および同第5,563,250号には、様々な穏やかな条件下で切

50

断可能な不安定な結合を含有する切断性コンジュゲートが開示されている。このリンカーは、対象となる剤がリンカーに直接的に結合されて、切断が活性剤の放出をもたらし得る点で特に有用である。特定の使用としては、遊離アミノまたは遊離スルフヒドリル基をタンパク質、例えば抗体、または薬物に付加することが挙げられる。

【0210】

米国特許第5,856,456号は、融合タンパク質、例えば一本鎖抗体を調製するためのポリペプチド構成要素の接続に使用するためのペプチドリンカーを提供する。リンカーは最大約50アミノ酸の長さであり、荷電アミノ酸（好ましくはアルギニンまたはリシン）の後にプロリンの少なくとも1つの存在を含有し、かつより大きな安定性および低減された凝集により特徴付けられる。米国特許第5,880,270号には、様々な免疫診断および分離技術において有用なアミノオキシ含有リンカーが開示されている。

【0211】

E. 精製

ある特定の態様では、本開示の抗体は精製されてもよい。「精製された」という用語は、本明細書において使用される場合、他の成分から単離可能な組成物であって、タンパク質がその天然に得られ得る状態と比べて任意の程度まで精製された組成物を指すことが意図される。したがって、精製されたタンパク質はまた、それが天然に存在し得る環境から解放されたタンパク質を指す。「実質的に精製された」という用語が使用される場合、この指定は、タンパク質またはペプチドが組成物の主成分を形成し、例えば、組成物中のタンパク質の約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約95%、またはそれより多くを構成する組成物を指す。

【0212】

タンパク質精製技術は当業者に周知である。これらの技術は、1つのレベルでは、ポリペプチドおよび非ポリペプチド画分への細胞環境の粗分別を伴う。他のタンパク質からポリペプチドを分離したら、クロマトグラフィーおよび電気泳動技術を使用して対象となるポリペプチドをさらに精製し、部分的または完全な精製（または均一までの精製）を達成することができる。純粋なペプチドの調製に特に適した分析方法は、イオン交換クロマトグラフィー、排除クロマトグラフィー、ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動である。タンパク質精製のための他の方法としては、硫酸アンモニウム、PEG、抗体など、または熱変性による沈殿の後の遠心分離；ゲル濾過、逆相、ヒドロキシルアパタイトおよびアフィニティークロマトグラフィー；ならびにそのような技術および他の技術の組合せが挙げられる。

【0213】

本開示の抗体の精製において、原核または真核発現系においてポリペプチドを発現させ、変性条件を使用してタンパク質を抽出することが望ましい場合がある。ポリペプチドは、ポリペプチドのタグ付き部分に結合する親和性カラムを使用して他の細胞成分から精製することができる。当技術分野において一般に公知のように、様々な精製工程を実行する順序は変更してもよく、またはある特定の工程を省略してもよく、それでもなお実質的に精製されたタンパク質またはペプチドの調製のための好適な方法をもたらすと考えられる。

【0214】

一般的に、完全抗体は、抗体のFc部分に結合する剤（すなわち、プロテインA）を利用して分画される。あるいは、抗原を使用して適切な抗体を同時に精製および選択してもよい。そのような方法は、多くの場合、カラム、フィルターまたはビーズなどの支持体に結合した選択剤を利用する。抗体を支持体に結合させ、汚染物を除去し（例としては例えば、洗浄除去し）、条件（塩、熱など）を適用することにより抗体を放出させる。

【0215】

タンパク質またはペプチドの精製の程度を定量化する様々な方法は本開示に照らして当業者に公知であろう。これらには、例えば、活性画分の比活性を決定すること、またはSDS/PAGE解析により画分内のポリペプチドの量を評価することが含まれる。画分の純度を評価する別の方法は、画分の比活性を算出し、それを初期抽出物の比活性と比較し、した

がって純度の程度を算出することである。活性の量を表すために使用される実際の単位は、当然、精製にしたがって選択された特定のアッセイ技術、および発現されたタンパク質またはペプチドが検出可能な活性を呈するか否かに依存する。

【0216】

ポリペプチドの泳動は、異なる条件のSDS/PAGEを用いることで、時に著しく、変化し得ることが公知である (Capaldi et al., 1977)。したがって、異なる電気泳動条件下で、精製または部分精製された発現産物の見かけの分子量は変化し得ることが理解されるであろう。

【0217】

V. がんの治療

A. 配合物および投与

本開示は、抗IL1RB4抗体およびそれを生成するための抗原を含む薬学的組成物を提供する。当該組成物は、予防または治療有効量の抗体またはその断片、および薬学的に許容される担体を含む。特定の態様では、「薬学的に許容される」という用語は、動物、より具体的にはヒトにおいて使用するために連邦もしくは州政府の規制機関により承認され、または米国薬局方もしくは他の一般に認識される薬局方に列記されることを意味する。「担体」という用語は、治療剤がそれと共に投与される希釈剤、賦形剤、またはビヒクルを指す。そのような薬学的担体は、無菌の液体、例えば水および油であってもよく、石油、動物、野菜または合成起源のもの、例えば、ピーナッツ油、大豆油、鉱油、ゴマ油などが挙げられる。水は、薬学的組成物が静脈内に投与される場合の特定の担体である。食塩水溶液および水性デキストロスおよびグリセロール溶液もまた液体担体、特に注射溶液用の液体担体として用いることができる。他の好適な薬学的賦形剤としては、デンプン、グルコース、ラクトース、スクロース、ゼラチン、麦芽、コメ、小麦粉、チョーク、シリカゲル、ステアリン酸ナトリウム、モノステアリン酸グリセロール、タルク、塩化ナトリウム、乾燥スキムミルク、グリセロール、プロピレン、グリコール、水、エタノールなどが挙げられる。

【0218】

所望の場合、組成物は、微量の湿潤剤もしくは乳化剤、またはpH緩衝剤も含有することができる。これらの組成物は、溶液、懸濁液、エマルション、錠剤、丸剤、カプセル、粉末、持続放出配合物などの形態をとることができる。経口配合物は、標準的な担体、例えば、薬学的グレードのマニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、セルロース、炭酸マグネシウムなどを含むことができる。好適な薬学的剤の例は、「Remington's Pharmaceutical Sciences」に記載されている。そのような組成物は、患者への適切な投与のための形態を提供するように好適な量の担体と共に、好ましくは精製された形態の、予防または治療有効量の抗体またはその断片を含有する。配合物は投与方式に適すべきであり、投与方式は、経口、静脈内、動脈内、頬内、鼻腔内、噴霧、気管支吸入、または機械的換気による送達であり得る。

【0219】

本明細書に記載されている本開示の抗体は、非経口投与のために配合することができ、例えば、皮内、静脈内、筋肉内、皮下、腫瘍内または腹腔内経路を介した注射のために配合することができる。抗体は、代替的に、粘膜に直接的に局所経路により、例えば、点鼻、吸入、またはネブライザーにより投与されてもよい。薬学的に許容される塩としては、酸の塩および無機酸、例えば塩酸もしくはリン酸、または有機酸、例えば、酢酸、シュウ酸、酒石酸、マンデル酸などと形成された塩が挙げられる。遊離カルボキシル基と形成された塩はまた、無機塩基、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、または水酸化第二鉄、および有機塩基、例えば、イソプロピルアミン、トリメチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来してもよい。

【0220】

人為的獲得受動免疫として公知である抗体の受動的移入は、一般に、静脈注射の使用を伴う。抗体の形態は、静脈内 (IVIg) または筋肉内 (IG) の使用のためのプールされたヒ

10

20

30

40

50

ト免疫グロブリンとして、免疫化されたまたは疾患から回復しているドナーからの高力価ヒトIVIGまたはIGとして、およびモノクローナル抗体（MAb）としての、ヒトまたは動物の血漿または血清であり得る。そのような免疫は、一般に、短期間しか続かず、過敏反応、および血清病、特に非ヒト起源のガンマグロブリンからの血清病の潜在的なリスクもある。しかしながら、受動免疫は即時の保護を提供する。抗体は、注射のために好適な、すなわち無菌の注射針を通過可能な担体中に配合される。

【0221】

一般に、本開示の組成物の成分は、例えば、気密密封容器、例えば、活性剤の量を示すアンプルまたはサシェ中に、例えば、凍結乾燥粉末または無水濃縮物として別々にまたは単位投与剤形中に一緒に混合されて供給される。組成物が注入により投与される場合、無菌の薬学的グレードの水または食塩水を含有する注入ボトルを用いて分配することができる。組成物が注射により投与される場合、成分が投与の前に混合され得るように注射用の滅菌水または食塩水のアンプルを提供することができる。

【0222】

本開示の組成物は、中性または塩の形態として配合することができる。薬学的に許容される塩としては、アニオン、例えば、塩酸、リン酸、酢酸、シュウ酸、酒石酸などに由来するアニオンと形成された塩、およびカチオン、例えば、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、水酸化第二鉄、イソプロピルアミン、トリエチルアミン、2-エチルアミノエタノール、ヒスチジン、プロカインなどに由来するカチオンと形成された塩が挙げられる。

【0223】

B. 細胞療法

別の局面では、本開示は、キメラ抗原受容体（CAR）を発現する免疫細胞を提供する。一部の態様では、CARは、本明細書において提供される抗原結合断片を含む。一態様では、CARタンパク質は、N末端からC末端へと、リーダーペプチド、抗LILRB4重鎖可変ドメイン、リンカードメイン、抗LILRB4軽鎖可変ドメイン、ヒトIgG1-CH2-CH3ドメイン、スペーサー領域、CD28膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内共刺激シグナル伝達およびCD3ζ細胞内T細胞シグナル伝達ドメインを含む。

【0224】

有効量の本開示の免疫細胞を投与する工程を含む、免疫療法の方法もまた提供される。一態様では、医学的疾患または障害は、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の移植により治療される。本開示のある特定の態様では、がんまたは感染症は、免疫応答を誘発する免疫細胞集団の移植により治療される。個体に有効量の抗原特異的な細胞療法を投与する工程を含む、個体においてがんを治療するかまたはその進行を遅延させる方法が本明細書において提供される。

【0225】

免疫細胞は、T細胞（例えば、制御性T細胞、CD4+T細胞、CD8+T細胞、もしくはγδT細胞）、NK細胞、インバリアントNK細胞、NKT細胞、またはマクロファージであってもよい。免疫細胞を製造および操作する方法の他に、養子細胞療法のために該細胞を使用および投与する方法もまた本明細書において提供され、養子細胞療法の場合、細胞は自己または同種であってもよい。そのため、免疫細胞は、がん細胞のターゲティングなどの免疫療法として使用されてもよい。

【0226】

免疫細胞は、対象、特にヒト対象から単離されてもよい。免疫細胞は、健常ヒト対象、健常ボランティア、または健常ドナーから得ることができる。免疫細胞は、目的の対象、例えば、特定の疾患もしくは病態を有することが疑われる対象、特定の疾患もしくは病態に対する素因を有することが疑われる対象、または特定の疾患もしくは病態に対する療法を受けている対象から得ることができる。免疫細胞は、それらが対象において存在する任意の位置から収集することができ、該位置としては、血液、臍帯血、脾臓、胸腺、リンパ節、および骨髄が挙げられるがそれに限定されない。単離された免疫細胞は直接的に使用

されてもよく、または、凍結などにより、ある期間にわたり貯蔵することができる。

【0227】

免疫細胞は、それらが存在する任意の組織から濃縮/精製されてもよく、該組織としては、血液（血液バンクまたは臍帯血バンクにより収集された血液を含む）、脾臓、骨髄、外科的処置の間に除去および/または露出された組織、ならびに生検手順を介して得られた組織が挙げられるがそれに限定されない。免疫細胞が濃縮、単離、および/または精製される由来となる組織/臓器は、生存対象および非生存対象の両方から単離されてもよく、非生存対象は臓器ドナーである。特定の態様では、免疫細胞は、血液、例えば、末梢血または臍帯血から単離される。一部の局面では、臍帯血から単離された免疫細胞は、CD4またはCD8陽性T細胞抑制により測定されるものなどの、増強した免疫調節能力を有する。特定の局面では、免疫細胞は、増強した免疫調節能力のために、プールされた血液、特にプールされた臍帯血から単離される。プールされた血液は、2つ以上の供給源、例えば、3、4、5、6、7、8、9、10、またはより多くの供給源（例えば、ドナー対象）からのものであってもよい。

10

【0228】

免疫細胞の集団は、療法を必要とするか、または低減した免疫細胞活性と関連する疾患を患っている対象から得ることができる。そのため、細胞は、療法を必要とする対象にとって自己である。代替的に、免疫細胞の集団は、ドナー、好ましくは組織適合性のマッチしたドナーから得ることができる。免疫細胞集団は、末梢血、臍帯血、骨髄、脾臓、または免疫細胞が対象もしくはドナー中で存在する任意の他の臓器/組織から回収することができる。免疫細胞は、対象および/またはドナーのプール、例えば、プールされた臍帯血から単離することができる。

20

【0229】

免疫細胞の集団が対象とは別個のドナーから得られる場合、ドナーは好ましくは同種であり、但し、得られる細胞は、対象に導入することができるという点で対象適合性である。同種ドナー細胞は、ヒト白血球抗原（HLA）適合性であってもよく、またはそうでなくてもよい。対象適合性とするために、同種細胞は、免疫原性を低減するように処理され得る。

【0230】

免疫細胞は、操作されたTCRおよび/またはキメラ抗原受容体（CAR）などの抗原受容体を発現するように遺伝子操作され得る。例えば、宿主細胞（例えば、自己または同種T細胞）は、がん抗原に対する抗原特異性を有するT細胞受容体（TCR）を発現するように改変される。特定の態様では、NK細胞は、TCRを発現するように操作される。NK細胞は、CARを発現するようにさらに操作されてもよい。異なる抗原に対するものなどの複数のCARおよび/またはTCRは、T細胞またはNK細胞などの単一の細胞種に加えられてもよい。

30

【0231】

改変の好適な方法は、当該技術分野において公知である。例えば、Sambrook et al., 上掲;およびAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994を参照。例えば、細胞は、Heemskerk et al. (2008) およびJohnson et al. (2009) に記載の形質導入技術を使用してがん抗原に対する抗原特異性を有するT細胞受容体（TCR）を発現するように形質導入されてもよい。

40

【0232】

一部の態様では、細胞は、1つまたは複数の抗原受容体をコードする遺伝子操作を介して導入された1つまたは複数の核酸、およびそのような核酸の遺伝子操作された生成物を含む。一部の態様では、核酸は、異種、すなわち、細胞または細胞から得られる試料中に通常存在せず、例えば、例えば操作されている細胞において、および/またはそのような細胞が由来する生物において通常見出されない、別の生物または細胞から得られるものである。一部の態様では、核酸は、天然に見出されない（例えば、キメラの）核酸などの、天然に存在しないものである。

50

【0233】

C. 併用療法

追加の抗がん療法と組み合わせて本開示の抗体を使用する併用治療を提供することも望ましいことがある。これらの療法は、1つまたは複数の疾患パラメーターの低減を達成するために効果的な合わせた量で提供される。この方法は、例えば、両方の剤を含む単一の組成物または薬理的配合物を使用して、または1つの組成物が抗体を含みかつ他の組成物が他の剤を含む2つの別個の組成物または配合物と細胞/対象を同時に接触させることにより、細胞/対象を両方の剤/療法と同時に接触させることを伴い得る。

【0234】

あるいは、抗体は、数分から数週に及ぶ間隔で他の治療に先立ってもよく、またはその後であってもよい。一般に、各送達の時点の間に長い期間が過ぎないようにして、療法が細胞/対象に対して有利に組合せ効果をなおも発揮できることを確実にする。そのような例では、細胞を両方のモダリティーと互いに約12~24時間以内、互いに約6~12時間以内、または約12時間のみの遅延時間で接触させることが企図される。しかしながら、いくつかの状況では、治療の期間を大幅に延長させて、各投与の間に数10日間（例えば、2、3、4、5、6、または7）から数週間（例えば、1、2、3、4、5、6、7、または8）が過ぎるようにすることが望ましいことがある。

【0235】

抗体または他の療法のいずれかを複数回投与することが所望されることも考えられる。以下に例示されるように、抗体を「A」とし、他の療法を「B」とする様々な組合せを用いることができる。

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

【0236】

他の組合せが企図されている。細胞を殺傷し、細胞増殖を阻害し、転移を阻害し、血管新生を阻害し、またはそれ以外に腫瘍細胞の悪性表現型を後退させもしくは低減させるために、本発明の方法および組成物を使用して、標的細胞または部位を抗体および少なくとも1つの他の療法と接触させることができる。これらの療法は、がん細胞を殺傷するかまたはその増殖を阻害するために効果的な合わせた量で提供される。この方法は、細胞/部位/対象を剤/療法と同時に接触させることを伴ってもよい。

【0237】

本開示の抗体との併用療法のために企図されている特定の剤としては、化学療法および造血幹細胞移植が挙げられる。化学療法は、シタラビン（ara-C）およびアントラサイクリン（最も多くの場合、ダウノルビシン）、高用量シタラビン単独、誘導化学療法、通常アントラサイクリンに加えてオールトランスレチノイン酸（ATRA）、地固め療法の完了後のヒスタミンジヒドロクロリド（セプレン）およびインターロイキン2（プロロイキン）、高用量化学療法の候補ではない再発性AMLを有する60歳を超える年齢の患者のためのゲムツズマブオゾガマイシン（マイロターゲット）、クロファラビンの他に、標的療法、例えば、キナーゼ阻害剤、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、デシタビン、およびMDR1（多剤耐性タンパク質）の阻害剤、または三酸化ヒ素もしくは再発性急性前骨髄球性白血病（APL）を含んでもよい。

【0238】

ある特定の態様では、併用療法のための剤は、トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリン、トポイソメラーゼ阻害剤、アントラサイクリン、ダウノルビシン、ヌクレオシド代謝阻害剤、シタラビン、低メチル化剤、低用量シタラビン（LDAC）、ダウノルビシンとシタラビンとの組合せ、注射用のダウノルビシンおよびシタラビンリポソーム、ヴィキセオス（登録商標）、アザシチジン、ピダーザ（登録商標）、デシタビン、オールトランス

10

20

30

40

50

レチノイン酸（ATRA）、ヒ素、三酸化ヒ素、ヒスタミン二塩酸塩、セブレン（登録商標）、インターロイキン-2、アルデスロイキン、プロロイキン（登録商標）、ゲムツズマブ、オゾガマイシン、マイロターグ（登録商標）、FLT-3阻害剤、ミドスタウリン、ライダブト（登録商標）、クロファラビン、ファルネシルトランスフェラーゼ阻害剤、デシタビン、IDH1阻害剤、イボシデニブ、チブソボ（登録商標）、IDH2阻害剤、エナシデニブ、イディファ（Idhifa）（登録商標）、スーズンド（SMO）阻害剤、グラスデギブ、アルギナーゼ阻害剤、IDO阻害剤、エパカドスタット、BCL-2阻害剤（BCL-2 inhibitor）、ベネトクラクス、ベネクレクスタ（登録商標）、白金錯体誘導体、オキサリプラチン、キナーゼ阻害剤、チロシンキナーゼ阻害剤、PI3キナーゼ阻害剤、BTK阻害剤、イブルチニブ、イムブルピカ（登録商標）、アカラブルチニブ、カルクエンス（登録商標）、ザヌブルチニブ、PD-1抗体、PD-L1抗体、CTLA-4抗体、LAG3抗体、ICOS抗体、TIGIT抗体、TIM3抗体、CD40抗体、4-1BB抗体、CD47抗体、SIRP1 α 抗体または融合タンパク質、E-セレクチンのアンタゴニスト、腫瘍抗原に結合する抗体、T細胞表面マーカーに結合する抗体、骨髄細胞またはNK細胞表面マーカーに結合する抗体、アルキル化剤、ニトロソウレア剤、代謝拮抗物質、抗腫瘍性抗生物質、植物に由来するアルカロイド、ホルモン療法薬、ホルモンアンタゴニスト、アロマターゼ阻害剤、ならびにP糖タンパク質阻害剤からなる群より選択される1つまたは複数の薬物である。

【0239】

VI. 抗体コンジュゲート

本開示の抗体は、少なくとも1つの剤と連結させて抗体コンジュゲートを形成させることができる。診断または治療剤としての抗体分子の有効性を増加させるために、少なくとも1つの所望の分子または部分を連結させまたは共有結合させまたは複合体化させることが慣例として為されている。そのような分子または部分は、少なくとも1つのエフェクターまたはレポーター分子であってもよいがこれらに限定されない。エフェクター分子は、所望の活性、例えば細胞傷害活性を有する分子を含む。抗体に取り付けられたエフェクター分子の非限定的な例としては、毒素、抗腫瘍剤、治療酵素、放射性核種、抗ウイルス剤、キレート剤、サイトカイン、成長因子、およびオリゴまたはポリヌクレオチドが挙げられる。対照的に、レポーター分子は、アッセイを使用して検出され得る任意の部分として定義される。抗体にコンジュゲートされたレポーター分子の非限定的な例としては、酵素、放射性標識、ハプテン、蛍光標識、リン光性分子、化学発光分子、発色団、光親和性分子、有色粒子またはリガンド、例えばビオチンが挙げられる。

【0240】

抗体-薬物コンジュゲートが、がん治療法の開発に対するブレイクスルーアプローチとして登場した。抗体-薬物コンジュゲート（ADC）は、細胞殺傷性薬物に共有結合的に連結されたモノクローナル抗体（MAb）を含む。このアプローチは、抗原標的に対するMAbの高い特異性を高度に強力な細胞傷害性薬物と組み合わせしており、濃縮されたレベルの抗原を有する腫瘍細胞にペイロード（薬物）を送達する「武装化」（armed）MAbを結果としてもたらす。薬物の標的指向性送達はまた、正常組織におけるその曝露を最小化して、毒性の減少および治療指数の向上を結果としてもたらす。FDAによる2011年のアドセトリス（登録商標）（ブレンツキシマブベドチン）および2013年のカドサイラ（登録商標）（トラスツズマブエムタンシンまたはT-DM1）という2つのADC薬物の承認により該アプローチは検証された。がん治療のための臨床試験の様々なステージにある30種より多くのADC薬物候補が現在存在する（Leal et al., 2014）。抗体操作およびリンカー-ペイロード最適化がより成熟するにつれて、新たなADCの発見および開発は、このアプローチに好適な新たな標的の同定および検証ならびに標的指向性MAbの生成にますます依存するようになっている。ADC標的についての2つの基準は、腫瘍細胞における上方調節された/高いレベルの発現および堅牢な内部移行である。

【0241】

抗体コンジュゲートはまた、診断剤としての使用のために好ましい。抗体診断は、一般に、2つのクラス内に入り、すなわち、インビトロ診断、例えば様々なイムノアッセイに

10

20

30

40

50

において使用するためのもの、および一般に「抗体指向性イメージング」(antibody-directed imaging)として公知の、インビボ診断プロトコールにおいて使用するためのものである。多くの適切なイメージング剤が当技術分野において公知であり、抗体へのそれらの取付け方法についても同様である(例えば、米国特許第5,021,236号、同第4,938,948号、および同第4,472,509号を参照)。使用されるイメージング部分は、常磁性イオン、放射活性同位体、蛍光色素、NMRで検出可能な物質、およびX線イメージング剤であり得る。

【0242】

常磁性イオンの場合、例として、クロム(III)、マンガン(II)、鉄(III)、鉄(II)、コバルト(II)、ニッケル(II)、銅(II)、ネオジム(III)、サマリウム(III)、イッテルビウム(III)、ガドリニウム(III)、バナジウム(II)、テルビウム(III)、ジスプロシウム(III)、ホルミウム(III)および/またはエルビウム(III)などのイオンが挙げられ、ガドリニウムが特に好ましい。X線イメージングなどの他の文脈で有用なイオンとしては、ランタン(III)、金(III)、鉛(II)、および特にビスマス(III)が挙げられるがこれらに限定されない。

【0243】

治療および/または診断への応用のための放射活性同位体の場合、アスタチン²¹¹、¹⁴炭素、⁵¹クロム、³⁶塩素、⁵⁷コバルト、⁵⁸コバルト、銅⁶⁷、¹⁵²Eu、ガリウム⁶⁷、³水素、ヨウ素¹²³、ヨウ素¹²⁵、ヨウ素¹³¹、インジウム¹¹¹、⁵⁹鉄、³²リン、レニウム¹⁸⁶、レニウム¹⁸⁸、⁷⁵セレンウム、³⁵硫黄、テクニシウム^{99m}および/またはイットリウム⁹⁰が挙げられる。¹²⁵Iは、多くの場合、ある特定の態様における使用のために好ましく、テクニシウム^{99m}および/またはインジウム¹¹¹もまた、多くの場合、低いエネルギーおよび長距離検出のための好適性により好ましい。放射性標識された本開示のモノクローナル抗体は、当技術分野における周知の方法にしたがって製造することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ヨウ化ナトリウムおよび/またはカリウムならびに化学的酸化剤、例えば次亜塩素酸ナトリウム、または酵素酸化剤、例えばラクトペルオキシダーゼと接触させることによりヨウ素化することができる。本開示によるモノクローナル抗体は、リガンド交換法により、例えば、過テクネチウム酸(pertechnate)を第一スズ溶液で還元し、還元したテクネチウムをSephadexカラムにキレートさせ、かつこのカラムに抗体を適用することにより、テクネチウム^{99m}で標識されてもよい。あるいは、例えば、過テクネチウム酸、還元剤、例えば SnCl_2 、緩衝溶液、例えばフタル酸ナトリウム-カリウム溶液、および抗体をインキュベートすることにより、直接的な標識化技術を使用してもよい。金属イオンとして存在する放射性同位体を抗体に結合させるために多くの場合に使用される中間体官能基は、ジエチレントリアミンペンタ酢酸(DTPA)またはエチレンジアミンテトラ酢酸(EDTA)である。

【0244】

コンジュゲートとして使用するために企図されている蛍光標識としては、Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、フルオレセインイソチオシアネート、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、Rhodamine Green、Rhodamine Red、Renographin、ROX、TAMRA、TET、テトラメチルローダミン、および/またはTexas Redが挙げられる。

【0245】

本開示において企図されている別の種類の抗体コンジュゲートは、主にインビトロでの使用のために意図されるものであり、その場合、抗体は、二次結合リガンドおよび/または発色基質との接触により有色生成物を生成する酵素(酵素タグ)に連結されている。好適な酵素の例としては、ウレアーゼ、アルカリホスファターゼ、(ホースラディッシュ)水素ペルオキシダーゼまたはグルコースオキシダーゼが挙げられる。好ましい二次結合リガンドは、ビオチンならびにアビジンおよびストレプトアビジン化合物である。そのような

10

20

30

40

50

標識の使用は当業者に周知であり、例えば、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,277,437号、同第4,275,149号および同第4,366,241号に記載されている。

【0246】

抗体への分子の部位特異的取付けのさらに別の公知の方法は、ハプテンベースの親和性標識との抗体の反応を含む。本質的に、ハプテンベースの親和性標識は抗原結合部位中のアミノ酸と反応し、それによりこの部位を破壊しかつ特定の抗原反応をブロックする。しかしながら、これは抗体コンジュゲートによる抗原結合の損失をもたらすので、有利でないことがある。

【0247】

アジド基を含有する分子もまた、低強度紫外光により生成される反応性ニトレン中間体を通じてタンパク質への共有結合を形成するために使用されてもよい (Potter and Haley, 1983)。特に、プリンヌクレオチドの2-および8-アジドアナログは、粗細胞抽出物のヌクレオチド結合タンパク質を同定するための部位指向性光プローブ (site-directed photoprobe) として使用されている (Owens & Haley, 1987; Atherton et al, 1985)。2-および8-アジドヌクレオチドは、精製されたタンパク質のヌクレオチド結合ドメインをマッピングするためにも使用されており (Khatoon et al, 1989; King et al, 1989; Dholakia et al, 1989)、抗体結合剤として使用することができる。

【0248】

抗体のそのコンジュゲート部分への取付けまたはコンジュゲートのためのいくつかの方法が当技術分野において公知である。いくつかの取付け方法は、例えば、抗体に取り付けられた有機キレート剤、例えば、ジエチレントリアミンペンタ酢酸無水物 (DTPA); エチレントリアミンテトラ酢酸; N-クロロ-p-トルエンスルホンアミド; および/またはテトラクロロ-3 α -6 α -ジフェニルグリコウリル (diphenylglycouril) -3を用いる金属キレート錯体の使用を伴う (米国特許第4,472,509号および同第4,938,948号)。モノクローナル抗体はまた、カップリング剤、例えばグルタルアルデヒドまたは過ヨウ素酸塩の存在下で酵素と反応させてもよい。フルオレセインマーカースとのコンジュゲートは、これらのカップリング剤の存在下でまたはイソチオシアネートとの反応により調製される。米国特許第4,938,948号では、モノクローナル抗体を使用して乳房腫瘍のイメージングが達成されており、検出可能なイメージング部分は、リンカー、例えばメチル-p-ヒドロキシベンズイミデートまたはN-スクシンイミジル-3-(4-ヒドロキシフェニル) プロピオネートを使用して抗体に結合されている。

【0249】

他の態様では、抗体の組合せ部位を変化させない反応条件を使用して免疫グロブリンのFc領域中にスルフヒドリル基を選択的に導入することによる免疫グロブリンの誘導体化が企図される。この方法論にしたがって製造される抗体コンジュゲートは、向上した寿命、特異性および感度を呈することが開示されている (米国特許第5,196,066号; 参照することにより本明細書に組み入れられる)。レポーターまたはエフェクター分子がFc領域中の炭化水素残基にコンジュゲートされるエフェクターまたはレポーター分子の部位特異的取付けもまた文献に開示されている (O' Shannessy et al, 1987)。このアプローチは、現在臨床評価されている診断的および治療的に有望な抗体を製造することが報告されている。

【0250】

VII. 免疫検出法

またさらなる態様では、本開示は、LILRB関連がんを結合し、精製し、除去し、定量化しおよびそれ以外に一般に検出するための免疫検出法に関する。そのような方法は伝統的な意味で応用することができるが、別の使用は、ワクチンおよび他のウイルスストックの品質管理およびモニタリングであり、それらにおいては、本開示による抗体をウイルス中のH1抗原の量または完全性 (すなわち、長期安定性) を評価するために使用することができる。あるいは、適切な/所望の反応性プロファイルについて様々な抗体をスクリーニングするために方法を使用してもよい。

【0251】

少数を挙げると、いくつかの免疫検出法としては、酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）、ラジオイムノアッセイ（RIA）、イムノラジオメトリックアッセイ、フルオロイムノアッセイ、化学発光アッセイ、生物発光アッセイ、およびウエスタンブロットが挙げられる。特に、LILRBの検出および定量的ための競合アッセイも提供される。様々な有用な免疫検出法の工程が、例えば、Doolittle and Ben-Zeev（1999）、Gulbis and Galand（1993）、De Jager et al.（1993）、およびNakamura et al.（1987）などの科学文献に記載されている。一般に、免疫結合法は、LILRB関連がんを含有することが疑われる試料を得ること、および、場合により、免疫複合体の形成を可能とするために効果的な条件下で、本開示による第1の抗体と試料を接触させることを含む。

10

【0252】

これらの方法は、試料からのLILRBまたはLILRB関連がん細胞を検出または精製する方法を含む。抗体は、好ましくは、固体支持体、例えば、カラムマトリックスの形態の固体支持体に連結され、かつ、LILRB関連がん細胞を含有することが疑われる試料は、固定化された抗体に適用される。望ましくない成分はカラムから洗浄されて、固定化された抗体に免疫複合体化したLILRB発現細胞を残し、次に該複合体は、カラムから生物または抗原を除去することにより回収される。

【0253】

免疫結合法はまた、試料中のLILRB関連がん細胞または関連成分を検出しかつその量を定量化するためならびに結合処理の間に形成された任意の免疫複合体の検出および定量的のための方法を含む。ここでは、LILRB関連がん細胞を含有することが疑われる試料を得、かつ試料をLILRBまたはその成分に結合する抗体と接触させた後、特定の条件下で形成された免疫複合体を検出しかつその量を定量化する。抗原検出に関して、分析される生体試料は、LILRB関連がんを含有することが疑われる任意の試料、例えば、組織切片もしくは検体、ホモジナイズされた組織抽出物、血液および血清などの体液、または糞便もしくは尿などの分泌物であってもよい。

20

【0254】

免疫複合体（一次免疫複合体）の形成を可能とするために効果的な条件下かつそのために十分な期間にわたり選択された生体試料を抗体と接触させることは、一般に、単純に抗体組成物を試料に加え、かつ抗体が免疫複合体を形成する、すなわちLILRBに結合するために十分な長さの期間にわたって混合物をインキュベートすることである。この時間の後、試料-抗体組成物、例えば、組織切片、ELISAプレート、ドットブロットまたはウエスタンブロットは、一般に、あらゆる非特異的に結合した抗体種を除去するために洗浄され、一次免疫複体内に特異的に結合した抗体のみが検出されることを可能とする。

30

【0255】

一般に、免疫複合体形成の検出は当技術分野において周知であり、多数のアプローチの適用を通じて達成され得る。これらの方法は、一般に、標識またはマーカー、例えば、放射性タグ、蛍光タグ、生物学的タグ、および酵素タグのいずれかの検出に基づく。そのような標識の使用に関する特許としては、米国特許第3,817,837号、同第3,850,752号、同第3,939,350号、同第3,996,345号、同第4,277,437号、同第4,275,149号および同第4,366,241号が挙げられる。当然、当技術分野において公知のように、二次結合リガンド、例えば、二次抗体および/またはビオチン/アビジンリガンド結合の構成の使用を通じて追加の利点が見出され得る。

40

【0256】

検出に用いられる抗体は、検出可能な標識にそれ自体が連結されてもよく、その場合、単純にこの標識を検出することにより、組成物中の一次免疫複合体の量を決定することが可能となる。あるいは、一次免疫複体内に結合した第1の抗体は、該抗体に結合親和性を有する第2の結合リガンドにより検出されてもよい。これらの場合、第2の結合リガンドは、検出可能な標識に連結されてもよい。第2の結合リガンドは多くの場合、それ自体が抗体であり、その場合それは「二次」抗体と称されることがある。二次免疫複合体の形成

50

を可能とするために効果的な条件下かつそのために十分な期間にわたり、一次免疫複合体を、標識された二次結合リガンド、または抗体と接触させる。次に、二次免疫複合体は、一般に、あらゆる非特異的に結合した標識された二次抗体またはリガンドを除去するために洗浄された後、二次免疫複合体中に残った標識が検出される。

【0257】

さらなる方法は、2工程アプローチによる一次免疫複合体の検出を含む。上記のように、二次免疫複合体を形成するために、該抗体に結合親和性を有する抗体などの第2の結合リガンドが使用される。洗浄後、これもまた免疫複合体（三次免疫複合体）の形成を可能とするために効果的な条件下かつそのために十分な期間にわたり、第2の抗体と結合親和性を有する第3の結合リガンドまたは抗体と二次免疫複合体を接触させる。第3のリガンドまたは抗体は検出可能な標識に連結され、そのように形成される三次免疫複合体の検出を可能とする。この系は、これが所望される場合、シグナル増幅を提供し得る。

【0258】

免疫検出の1つの方法は2つの異なる抗体を使用する。標的抗原を検出するために第1のビオチン化抗体が使用され、次に複合体化したビオチンに結合したビオチンを検出するために第2の抗体が使用される。その方法では、試験される試料は最初に、第1の工程の抗体を含有する溶液中でインキュベートされる。標的抗原が存在する場合、抗体の一部は抗原に結合してビオチン化抗体/抗原複合体を形成する。次に、ストレプトアビジン（またはアビジン）、ビオチン化DNA、および/または相補的ビオチン化DNAの連続溶液中でのインキュベーションにより抗体/抗原複合体を増幅させ、各工程では抗体/抗原複合体に追加のビオチン部位が付加される。好適なレベルの増幅が達成されるまで増幅工程を繰り返し、それが達成された時点で、ビオチンに対する第2の工程の抗体を含有する溶液中で試料がインキュベートされる。この第2の工程の抗体は、例えば、色原体基質を使用する組織酵素学により抗体/抗原複合体の存在を検出するために使用できる酵素により標識される。好適に増幅されると、巨視的に可視的なコンジュゲートを産生することができる。

【0259】

免疫検出の別の公知の方法は、イムノPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）の方法論を利用する。PCR法は、ビオチン化DNAとのインキュベーションまでCantorの方法に類似するが、複数ラウンドのストレプトアビジンおよびビオチン化DNAのインキュベーションを使用する代わりに、抗体を解放させる低pHまたは高塩の緩衝液でDNA/ビオチン/ストレプトアビジン/抗体複合体が洗浄される。次に、結果として得られる洗浄溶液を使用して、適切な対照と共に好適なプライマーを用いるPCR反応が実行される。少なくとも理論上は、単一の抗原分子を検出するために、PCRの非常に大きい増幅能力および特異性を利用することができる。

【0260】

1. ELISA

最も単純かつ直接的な意味において、イムノアッセイは結合アッセイである。ある特定の好ましいイムノアッセイは、当技術分野において公知の様々な種類の酵素連結免疫吸着アッセイ（ELISA）およびラジオイムノアッセイ（RIA）である。組織切片を使用する免疫組織化学検出もまた特に有用である。しかしながら、検出はそのような技術に限定されないこと、およびウエスタンブロットティング、ドットブロットティング、FACS分析などもまた使用されてもよいことが容易に理解されるであろう。

【0261】

1つの例示的なELISAでは、本開示の抗体は、タンパク質親和性を呈する選択された表面、例えば、ポリスチレンマイクロタイタープレート中のウェルに固定化される。次に、LILRB関連がん細胞を含有することが疑われる試験組成物がウェルに加えられる。結合および非特異的に結合した免疫複合体を除去するための洗浄後に、結合した抗原を検出することができる。検出は、検出可能な標識に連結された別の抗LILRB抗体を加えることにより達成することができる。この種類のELISAは単純な「サンドイッチELISA」である。検出はまた、第2の抗LILRB4抗体を加えた後、第2の抗体に結合親和性を有する、検出可能

な標識に連結された第3の抗体を加えることにより達成されてもよい。

【0262】

別の例示的なELISAでは、LILRB4関連がん細胞を含有することが疑われる試料をウェル表面に固定化させた後、本開示の抗LILRB4抗体と接触させる。結合および非特異的に結合した免疫複合体を除去するための洗浄の後に、結合した抗LILRB4抗体が検出される。最初の抗LILRB4抗体が検出可能な標識に連結されている場合、免疫複合体は直接的に検出されてもよい。ここでもまた、免疫複合体は、第1の抗LILRB4抗体に結合親和性を有する第2の抗体（第2の抗体は検出可能な標識に連結されている）を使用して検出されてもよい。

【0263】

用いられるフォーマットにかかわらず、ELISAは、ある特定の特徴、例えば、コーティング、インキュベーションおよび結合、非特異的に結合した種を除去するための洗浄、および結合した免疫複合体の検出を共通して有する。これらを以下に記載する。

【0264】

抗原または抗体のいずれかでのプレートのコーティングでは、一般に、終夜または特定された時間にわたり、プレートのウェルを抗原または抗体の溶液とインキュベートする。次に、プレートのウェルを洗浄して、不完全に吸着した材料を除去する。次に、試験抗血清に関して抗原として中性である非特異的タンパク質でウェルのあらゆる残っている利用可能な表面を「コーティング」する。これらには、ウシ血清アルブミン（BSA）、カゼインまたは粉乳の溶液が含まれる。コーティングにより、固定化表面上の非特異的な吸着部位のブロッキングが可能となり、したがって表面上への抗血清の非特異的結合により引き起こされるバックグラウンドが低減される。

【0265】

ELISAにおいて、直接的な手順よりもむしろ、二次または三次検出を使用することが恐らくより慣例的である。したがって、ウェルにタンパク質または抗体を結合させ、非反応性材料でコーティングしてバックグラウンドを低減させ、洗浄して未結合の材料を除去した後、免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能とするために効果的な条件下で、試験される生体試料を固定化表面に接触させる。次に、免疫複合体の検出は、標識された二次結合リガンドまたは抗体、および標識された三次抗体または第3の結合リガンドと組み合わせた二次結合リガンドまたは抗体を必要とする。

【0266】

「免疫複合体（抗原/抗体）形成を可能とするために効果的な条件下」は、条件が、好ましくは、抗原および/または抗体を溶液、例えば、BSA、ウシガンマグロブリン（BGG）またはリン酸緩衝生理食塩水（PBS）/Tweenで希釈することを含むことを意味する。これらの加えられる剤はまた、非特異的なバックグラウンドの低減を補助する傾向がある。

【0267】

「好適な」条件はまた、インキュベーションが、効果的な結合を可能とするために十分な温度または期間行われることを意味する。インキュベーション工程は、典型的には、約1から2時間から4時間程度、好ましくは25℃～27℃程度の温度で行われ、または約4℃程度で終夜行われてもよい。

【0268】

ELISAにおける全てのインキュベーション工程後、接触させた表面を洗浄して、複合体化していない材料を除去する。好ましい洗浄手順は、PBS/Tween、またはホウ酸緩衝液などの溶液での洗浄を含む。試験試料と元々結合した材料との特異的免疫複合体の形成、およびその後の洗浄後、微量の免疫複合体の存在さえも決定することができる。

【0269】

検出手段を提供するために、第2または第3の抗体は、検出を可能とするための会合した標識を有する。好ましくは、これは、適切な発色基質とインキュベートすると呈色を生成する酵素である。したがって、例えば、さらなる免疫複合体形成の発生に有利に働く期間および条件下（例えば、PBS-TweenなどのPBS含有溶液中、室温で2時間のインキュベ-

10

20

30

40

50

ション)でウレアーゼ、グルコースオキシダーゼ、アルカリホスファターゼまたは水素ペルオキシダーゼコンジュゲート抗体と第1および第2の免疫複合体を接触させまたはインキュベートすることが望まれる。

【0270】

標識された抗体とのインキュベーション、および未結合の材料を除去するためのその後の洗浄後、例えば、発色基質、例えば、尿素、またはブロモクレゾールパープル、または2,2'-アジノ-ジ-(3-エチル-ベンズチアゾリン-6-スルホン酸(ABTS)、または酵素標識としてペルオキシダーゼの場合は H_2O_2 とのインキュベーションにより標識の量が定量化される。次に、例えば可視スペクトル分光光度計を使用して、発色の程度を測定することにより定量化が達成される。

10

【0271】

2. ウエスタンブロット

ウエスタンブロット(あるいはタンパク質イムノブロット)は、組織ホモジネートまたは抽出物の所与の試料中の特定のタンパク質を検出するために使用される分析技術である。それは、ポリペプチドの長さにより(変性条件)またはタンパク質の3D構造(天然/非変性条件)により天然または変性タンパク質を分離するためにゲル電気泳動を使用する。次に、タンパク質を膜(典型的にニトロセルロースまたはPVDF)に転写し、標的タンパク質に特異的な抗体を使用してプロービング(検出)する。

【0272】

試料は、全組織からまたは細胞培養物から採ることができる。ほとんどの場合、ブレンダーを使用して(大きい試料体積の場合)、ホモジナイザーを使用して(小さい体積)、または超音波処理により、固体組織を最初に機械的に壊す。上記の機械的方法の1つにより細胞を破碎してもよい。しかしながら、細菌、ウイルスまたは環境試料がタンパク質の供給源であり得、ウエスタンブロッティングは細胞研究のみに制限されないことが注意されるべきである。細胞の溶解を促しかつタンパク質を可溶化するために、組み合わせた界面活性剤、塩、および洗浄剤を用いてもよい。それ自体の酵素による試料の消化を防止するために、プロテアーゼおよびホスファターゼ阻害剤が多くの場合に加えられる。組織調製は多くの場合、タンパク質の変性を回避するために低温で行われる。

20

【0273】

ゲル電気泳動を使用して試料のタンパク質を分離する。タンパク質の分離は、等電点(p_i)、分子量、電荷、またはこれらの因子の組合せにより為され得る。分離の性質は、試料の処理およびゲルの性質に依存する。これは、タンパク質を決定するために非常に有用な方法である。単一の試料から二次元にタンパク質を広げる二次元(2-D)ゲルを使用することもできる。タンパク質は、第1の次元において等電点(中性の総電荷となるpH)にしたがって、および第2の次元において分子量にしたがって分離される。

30

【0274】

タンパク質を抗体検出のためにアクセス可能なものとするために、それらをゲル内からニトロセルロースまたはポリビニリデンジフルオリド(PVDF)で作られた膜上に移動させる。膜をゲルの上に置き、積み重ねた濾紙をその上に置く。積み重ねた全体を緩衝溶液に入れると、緩衝溶液は毛管作用により紙の上方向に移動し、それと共にタンパク質を運ぶ。タンパク質を転写する別の方法はエレクトロブロッティングと呼ばれ、電流を使用してタンパク質をゲルからPVDFまたはニトロセルロース膜中に引き寄せる。タンパク質は、ゲル内での編成を維持しながらゲル内から膜上に移動する。このブロッティング処理の結果として、タンパク質は検出のために薄い表面層上に露出される(下記を参照)。非特異的タンパク質結合特性(すなわち、全てのタンパク質に等しく結合する)のために両方の種類の膜が選択される。タンパク質の結合は、疎水性相互作用の他に、膜とタンパク質との電荷相互作用に基づく。ニトロセルロース膜はPVDFよりも安価であるがはるかにもなく、プロービングの繰返しに良好に耐えることができない。ゲルから膜へのタンパク質の転写の均一性および全体的な有効性は、クマシーブリリアントブルーまたはボンソーS色素で膜を染色することによりチェックすることができる。タンパク質が転写されたら、標

40

50

識された一次抗体を使用して、または未標識の一次抗体の後に一次抗体のFc領域に結合する標識されたプロテインAまたは二次標識抗体を使用する間接的検出を使用してタンパク質が検出される。

【0275】

3. 免疫組織化学

本開示の抗体はまた、免疫組織化学（IHC）による研究のために調製された新鮮凍結組織ブロックおよび/またはホルマリン固定、パラフィン包埋組織ブロックのいずれとも組み合わせて使用することができる。これらの粒子検体から組織ブロックを調製する方法は、様々な予後因子の先行するIHC研究において使用されて成功しており、当業者に周知である（Brown et al, 1990; Abbondanzo et al, 1990; Allred et al, 1990）。

10

【0276】

簡潔に述べれば、凍結切片は、小さいプラスチックカプセル中の50ngの凍結「粉碎」組織を室温でリン酸緩衝生理食塩水（PBS）中で再水和させ、遠心分離によって粒子をペレット化し、それらを粘性の包埋媒体（OCT）中に再懸濁し、カプセルを倒立させかつ/もしくは遠心分離によって再度ペレット化し、-70℃のイソペンタン中でスナップ冷却し、プラスチックカプセルを切断しかつ/もしくは凍結した円筒状の組織を取り出し、クライオスタットミクロトームチャック上に円筒状の組織を固定し、かつ/またはカプセルから25～50個の連続切片を切り出すことによって調製することができる。あるいは、凍結組織試料全体を連続切片の切り出しのために使用してもよい。

【0277】

20

永久切片は、50mgの試料をプラスチック微量遠心チューブ中で再水和させ、ペレット化し、10%のホルマリン中で再懸濁して4時間固定化し、洗浄/ペレット化し、温めた2.5%の寒天中に再懸濁し、ペレット化し、氷冷水で冷却して寒天を固化させ、組織/寒天ブロックをチューブから取り出し、ブロックをパラフィンで浸潤させかつ/もしくは包埋し、かつ/または最大50個の連続永久切片を切り出すことを伴う類似の方法によって調製することができる。ここでもまた、組織試料全体を置換してもよい。

【0278】

4. 免疫検出キット

またさらなる態様では、本開示は、上記される免疫検出法と共に使用するための免疫検出キットに関する。抗体はLILRB関連がん細胞を検出するために使用することができるため、抗体をキット中に含めることができる。したがって、免疫検出キットは、好適な容器手段中に、LILRBに結合する第1の抗体、および任意で免疫検出試薬を含む。

30

【0279】

ある特定の態様では、抗体は、固体支持体、例えば、カラムマトリックスおよび/またはマイクロタイタープレートのウェルに予め結合させてもよい。キットの免疫検出試薬は、所与の抗体に会合または連結された検出可能な標識などの様々な形態のいずれか1つとすることができる。二次結合リガンドに会合または連結された検出可能な標識も企図されている。例示的な二次リガンドは、第1の抗体に結合親和性を有する二次抗体である。

【0280】

本発明のキットにおいて使用するためのさらなる好適な免疫検出試薬は、第1の抗体に結合親和性を有する第2の抗体と共に、第2の抗体に結合親和性を有する第3の抗体（第3の抗体は検出可能な標識に連結されている）を含む、2成分試薬を含む。上記の通り、多数の例示的な標識が当技術分野において公知であり、全てのそのような標識を本開示と関連して用いることができる。

40

【0281】

キットは、検出アッセイのための標準曲線の作成に使用できるように、標識化されていても未標識でもよい、LILRBの好適に分注された組成物をさらに含んでもよい。キットは、抗体-標識コンジュゲートを、完全にコンジュゲートされた形態か、中間体の形態か、またはキットの使用者によってコンジュゲートされる別々の部分として、含有してもよい。キットの構成要素は、水性媒体中または凍結乾燥形態のいずれかにパッケージ

50

化することができる。

【0282】

キットの容器手段は、一般に、少なくとも1つのバイアル、試験管、フラスコ、ボトル、シリンジまたは他の容器手段を含み、その中に抗体を入れるか、または好ましくは適切に分注することができる。本開示のキットはまた、典型的には、抗体、抗原、および任意の他の試薬容器を、市販用に厳重に密閉して含有するための手段を含む。そのような容器としては、射出成形またはブロー成形されたプラスチック容器を挙げることができ、所望のバイアルをその中に保持する。

【0283】

5. フローサイトメトリーおよびFACS

本開示の抗体はまた、フローサイトメトリーまたはFACSにおいて使用されてもよい。フローサイトメトリーは、細胞計数、細胞選別、バイオマーカー検出およびタンパク質操作を含む、多くの検出アッセイにおいて用いられるレーザーまたはインピーダンスベースの技術である。該技術では、細胞を流体のストリームに懸濁し、それらを電子的検出装置に通過させることで、1秒当たり数千までの粒子の物理的および化学的特徴の同時の多パラメータ分析が可能となる。フローサイトメトリーは、診断障害 (diagnosis disorders)、殊に血液がんにおいて日常的に使用されるが、基礎研究、臨床プラクティスおよび臨床試験において多くの他の応用を有する。

【0284】

蛍光活性化細胞選別 (FACS) は、特殊化された種類のサイトメトリーである。それは、各細胞の特定の光散乱および蛍光特徴に基づいて、1つの時点に1つの細胞で、生物学的細胞の不均質な混合物を2つ以上の容器に選別する方法を提供する。一般に、該技術は、液体の狭い急速に流れるストリームの中心において連行された細胞懸濁液を伴う。流れは、細胞の直径に比べて細胞間の大きい分離があるように構成される。振動機構により、細胞のストリームは個々の小滴に分断される。ストリームが小滴に分断される直前に、流れは蛍光測定ステーションを通過し、そこで各細胞の蛍光が測定される。電気的荷電リングが、ストリームが小滴に分断される正にその点に置かれる。電荷が、蛍光強度が測定される直前においてリングベース (ring based) に置かれており、小滴がストリームから壊れる (breaks form) 際に反対電荷が小滴上に捕捉される。荷電した小滴は次に、静電偏向システムを通して落下し、該システムは、小滴をそれらの電荷に基づいて容器に分流させる。

【0285】

フローサイトメトリーまたはFACSにおいて使用されるある特定の態様では、本開示の抗体は、フルオロフォアを用いて標識され、次に目的の細胞に結合させられ、それがフローサイトメーターにおいて分析され、またはFACS機械により選別される。

【実施例】

【0286】

VIII. 実施例

以下の実施例は、本発明の好ましい態様を実証するために含めたものである。以下の実施例に開示される技術は、本発明の実施において良好に機能することが本発明者らにより発見された技術を提示するものであり、したがってその実施のための好ましい様式を構成すると考えることができることが当業者により理解されるべきである。しかしながら、開示される特定の態様において多くの変更を行うことができ、それでもなお本発明の精神および範囲から離れることなく同様または類似の結果を得ることができることを当業者は本開示に照らして理解するべきである。

【0287】

実施例1

マウス。C57 BL/6JおよびNOD-SCID IL2R γ ヌル (NSG) マウスはUniversity of Texas Southwestern Medical Center (UTSW) の動物コア施設から購入し、そこにおいて維持した。以前に記載³¹されたようなapoeノックアウト (apoe-KO、Apoe^{tm1Unc}) マウスはJackson Laboratoryから購入した。動物研究は、UT Southwestern Instit

utional Animal Care and Use Committee (IACUC) の監督の下で承認され、実行された。各実験について、同じ性別および年齢をマッチさせた（4～8週）マウスを使用し、各群に無作為に割り当て、腫瘍サイズ測定およびインビボluminaイメージング実験について、マウスの処置条件を盲検とした。各群におけるマウスの最小数を以前の関連研究からの結果に基づいて算出した。皮下腫瘍モデルについて、腫瘍サイズを（幅×幅×長さ）cm³により算出した。UTSW IACUCにより許容される最大の腫瘍測定は、腫瘍の直径において2cmである。

【0288】

細胞培養。293T細胞は、10%のウシ胎仔血清（FBS）を添加したダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）中、37℃、5%のCO₂および正常レベルのO₂において培養した。ヒト臍静脈/血管内皮細胞（HUVEC）（ATCC、CRL-1730）は、増殖因子、サイトカインおよびサプリメントを加えた内皮細胞増殖培地（EGM-BulletKit、Lonza）中、37℃、5%のCO₂および正常レベルのO₂において培養した。ヒト単球性AML細胞、THP-1（ATCC、TIB-202）、MV4-11（ATCC、CRL-9591）、およびU937（ATCC、CRL-1593.2）、ならびにマウスAML細胞、WEHI-3（ATCC、TIB-68）は、10%のFBSを添加したRoswell Park Memorial Institute（RPMI）1640中、37℃、5%のCO₂および正常レベルのO₂において培養した。マウスAML細胞、C1498（ATCC、TIB-49）は、10%のFBSを添加したDMEM中、37℃、5%のCO₂および正常レベルのO₂において培養した。全ての細胞系は、mycoplasma-contamination kit（R&D Systems）を使用して通常通りに試験した。

【0289】

初代ヒト白血病細胞。初代ヒトAMLおよびB-ALL試料は、UTSWの組織バンクから得た。UTSWにおけるInstitutional Review Boardにより審査および承認されたプロトコールの下でインフォームドコンセントを得た。UTSWコホートは、French-American-British（FAB）分類によるAMLサブタイプ、最小の成熟を伴う急性骨髄芽球性白血病（M1、n=9）、成熟を伴う急性骨髄芽球性白血病（M2、n=34）、急性前骨髄球性白血病（M3、n=10）、急性骨髄単球性白血病（M4、n=34）、急性単球性白血病（M5、n=25）、急性赤血球性白血病（M6、n=2）、および急性巨核芽球性白血病（M7、n=1）の代表的な105人のAML患者、ならびに未分化型白血病（AUL；n=1）および一過性骨髄増殖性障害（TAM；n=2）を有する患者を含んでいた。試料を10%のDMSOを含むFBS中で凍結し、液体窒素中で貯蔵した。

【0290】

ヒト正常単球およびマクロファージ。ヒト正常単球（CD14⁺細胞）は正常末梢血の単核細胞画分から AutoMACS Pro Separation System（Miltenyi Biotech、Auburn、CA）により単離した。簡潔に述べれば、バフィコートはInterstate Blood Bank（Memphis、TN）から購入し、単核細胞層をFicoll Hypaque（17144003、GE Lifesciences）密度勾配分離により分離した。単核細胞を赤血球細胞溶解緩衝液を用いて処理して赤血球細胞を除去し、次にCD14マイクロビーズにコンジュゲートしている抗体（130-050-201、Miltenyi Biotech、Auburn、CA）と4℃で15分間インキュベートした。CD14陽性細胞を次に製造者のプロトコールにしたがって陽性選択プログラムを使用して単離した。6ウェルプレートの各ウェル当たり100万個のCD14⁺細胞をマクロファージ培養培地、10%のヒトAB血清（MT35060CI、Fisher Scientific）、1%のNEAA（11-140-050、Fisher）、2μMのL-アラニン-L-グルタミン（SH3003402、Fisher）を添加したイスコフ改変ダルベッコ培地（IMDM）（12440053、Thermo fisher）にプレーティングし、7日間培養した。インキュベーション後に、細胞のほとんどはプラスチック表面に接着しており、CD14およびマクロファージに特異的な他のマーカーについて陽性に染色された。

【0291】

TCGA解析。データはTCGA急性骨髄性白血病データベース（バージョン:2016年8月16日）から得た。患者をAMLサブタイプ（FAB分類）M0（未分化型急性骨髄芽球性白血病）（n=16）、M1（n=42）、M2（n=39）、M3（n=16）、M4（n=35）、M5（n

=18)、M6 (n=2)、M7 (n=3) に分類し、2人の症例はサブタイプにより分類されなかった。示されている遺伝子のmRNAレベルをRNA-seq (polyA+IlluminaHiSeq) により決定した。RESM正規化数を報告しており、UCSC Xena (xena.ucsc.edu) を用いてデータを解析および可視化した。全生存期間の解析のために、利用可能な生存データを有する160人の患者を、高、中、または低遺伝子発現を有するかどうかに基づいて3つの群に分離し、次にXena Kaplan Meier plot (<http://xena.ucsc.edu/survival-plots/>) により解析した。

【0292】

フローサイトメトリー。抗ヒトCD45-PE (BD Pharmingen、HI30、1:100)、CD45-FITC (BD Pharmingen、HI30、1:100)、CD45-APC (BD Pharmingen、HI30、1:100)、抗ヒトCD34-FITC (BD Pharmingen、55582、1:100)、抗ヒトCD19-PE (eBioscience、HIB19、1:100)、抗ヒトCD20-PE (BD Pharmingen、555623、1:100)、抗ヒトCD11b-APC (eBioscience、ICRF44、1:100)、抗ヒトLILRB4-APC (eBioscience、ZM4.1、1:100)、抗ヒトLILRB4-PE (Biolegend、ZM4.1、1:100)、抗ヒトCD14-APC (eBioscience、61D3、1:100)、抗ヒトCD33-APC (Biolegend、P67.6、1:100)、抗ヒトCD4-APC (eBioscience、RPA-T4、1:100)、抗ヒトCD3-FITC (BioLegend、HIT3a、1:100)、抗ヒトCD3-Pacific Blue (BD Pharmingen、S P34-2、1:100) 抗ヒトCD8-PE (BD Pharmingen、555367、1:100)、抗ヒトCD28-APC (eBioscience、CD28.2、1:100)、抗ヒトCD40L-APC (eBioscience、24-31、1:100)、抗ヒトPD1-APC (Biolegend、EH12.2H7、1:100)、抗ヒトTIM3-APC (eBioscience、F38-2E2、1:100)、抗ヒトTIGIT-APC (eBioscience、MBSA43、1:100)、抗ヒトLAG3-APC (eBioscience、3DS223H、1:100)、抗ヒトFasL-PE (eBioscience、24-31、1:100)、抗uPAR-APC (Biolegend、VIM5、1:100)、抗マウスCD3-APC (BioLegend、17A2、1:200)、抗マウスCD8a-PE (BioLegend、53-6.7、1:200)、抗マウスCD45-PE (BD Pharmingen、30-F11、1:200)、抗マウスCD49b-APC (eBioscience、DX5、1:200)、抗マウスCD49f-PE (eBioscience、GoH3、1:200)、抗マウスCD11b-APC (BioLegend、M1/71、1:200)、抗マウスCD11b-PE (BioLegend、M1/71、1:200)、抗マウスCD11c-APC (eBioscience、N418、1:200)、抗マウスF4/80-APC (BioLegend、BM8、1:200)、抗Hisタグ-APC (R&D systems、AD1.1.10、1:400)、およびIgGアイソタイプ対照APC (eBioscience、P3.6.2.8.1、1:400) 抗体を含む一次抗体を使用した。細胞を分析のためにCaliburまたは分析および選別のためにFACSAriaのいずれかに流した。フローデータをFlowjoソフトウェアにより解析した。NSGマウスにおけるヒト造血生着の分析のために、以前に報告されたプロトコルに従った。PI染色を使用して、分析および選別において死細胞を除去した。細胞内染色のために、本発明者らは、eBioscienceの固定/メタノールの2工程プロトコルに従った。簡潔に述べれば、ヒト初代AML細胞をLILRB4 (抗LILRB4-Alexa Fluor 647、Biolegend、ZM4.1、1:100) およびCD33 (抗ヒトCD33-FITC、Biolegend、HIM3-4、1:100) およびfixable cell viability色素eFluor 450 (Bioscience、Cat# 65-0863-14、1:100) の表面発現について染色し、続いて固定 (IC固定緩衝液、eBioscience、Cat# 00-8222) およびメタノール処理を行った。その後、フローサイトメトリー分析のために細胞を抗p-SHP-2 (Y580) -PE (Cell signaling、Cat# 13328S、1:100)、抗pIKK α / β (S176/180) (16A6) (Cell signaling、Cat# 2697、1:100)、抗NF κ B (S529) -PE (eBioscience、B33B4WP、1:100)、抗uPAR-PE (Biolegend、VIM5、1:100)、抗アルギナーゼ-1 (D4E3M) (Cell signaling、Cat# 93668、1:100)、ウサギIgGアイソタイプ対照-PE (Cell signaling、Cat# 5742、1:100)、マウスIgGアイソタイプ対照-PE (eBioscience、m2a-15F8、1:100) および抗ウサギIgG-PE (Jackson Immunoresearch Lab、Cat# 111-116-144、1:400) により細胞内抗原について染色した。

【0293】

ウイルスの構築および感染。レトロウイルスパッケージングのために、プラスミド構築

10

20

30

40

50

物XZ201-IRES-GFPおよびXZ201-ヒト*lilrb4* (*hlilrb4*) -IRES-GFPをPCL-ECO (2:1) と混合し、続いてLipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用して293T細胞にトランスフェクトした。レンチウイルスパッケージングのために、CRISPR/Cas-9ベースのgRNA (ガイドRNA) 構築物およびpLentiLox3.7-ルシフェラーゼ-IRES-GFP、ZsGreen-*hlilrb4*およびZsGreen-*hlilrb4-intΔ*、pLVX-plaur-IRES-tdTomato、pLVX-arg1-IRES-tdTomatoを含む遺伝子過剰発現用の他の構築物をpsPAX2およびpMD2.G (Addgene) と4:3:1の比で混合し、Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を使用して293T細胞にトランスフェクトした。ウイルス含有上清をトランスフェクションの48~72時間後に収集し、以前に記載されたように感染のために使用した。

【0294】

10

AML細胞におけるCRISPR/Cas9ベースの遺伝子ノックアウト。ヒトAML細胞をドキシサイクリン誘導性Cas9発現レンチウイルス (pCW-Cas9、Addgene 50661) に感染させた。1 μg/mlのピューロマイシン選択後に、生存した細胞を、選別のためにpuro-mcherryをGFPで置き換えることによりpSLQ1651 (Addgene 51024) から改変されたプラスミドにより産生されたsgRNA発現レンチウイルスに感染させた。オンラインツール (<http://crispr.mit.edu>) により設計されたスクランブル対照sgRNA (sgRNA 5'- GAACGACTAGTTAGGCGTGTA -3' (SEQ ID NO: 211))

、*lilrb4*標的指向性sgRNA

(sgRNA1

20

5'- TGTTACTATCGCAGCCCTGT -3' (SEQ ID NO: 212); sgRNA2 5'- GTAGGTCCCCCGTGCACTG -3' (SEQ ID NO: 213); sgRNA3 5'- CCTGTGACCTCAGTGCACGG -3' (SEQ ID NO: 214))

、*apoe*標的指向性sgRNA

(sgRNA1

5'- CTTTGGGATTACCTGCGC -3' (SEQ ID NO: 215); sgRNA2 5'- AACTGGCACTGGGTCGCTTT -3' (SEQ ID NO: 216))

30

、*shp-1*標的指向性sgRNA

(sgRNA1

5'- TAAGACCTACATCGCCAGCC -3' (SEQ ID NO: 217); sgRNA2 5'- GAAGAACTTGCACCAGCGTC -3' (SEQ ID NO: 218))

、*shp-2*標的指向性sgRNA

(sgRNA1

5'- GAGACTTCACACTTCCGTT -3' (SEQ ID NO: 219); sgRNA2 5'- TACAGTACTACAACTCAAGC -3' (SEQ ID NO: 220))

40

、*ship*標的指向性sgRNA

(sgRNA1 5'-

CACGCAGAGCGCGTATGCCC -3' (SEQ ID NO: 221); sgRNA2 5'- TGGCAACATCACCCGCTCCA -3' (SEQ ID NO: 222))

を個々にsgRNAプラスミドにクローニングした。1 μg/mlのドキシサイクリン (Sigma、

50

Cat# PHR1789) を用いた1週間の処理後に、これらの細胞を抗LILRB4抗体を用いて染色し、LILRB4陰性細胞をlilrb4ノックアウト細胞として選別した。apoe、shp-1、shp-2およびshpノックアウト細胞について、GFP⁺細胞を単一細胞/ウェルとして96ウェルプレートに選別した。細胞を拡大増殖した後、ノックアウト細胞をウエスタンブロッティングにより検証した。遺伝子ノックアウトを達成するためのCRISPR/Cas9のインビボ誘導のために、本発明者らは、記載されているようにドキシサイクリンをマウスに与えた。簡潔に述べれば、Cas9/lilrb4-sgRNAトランスフェクトTHP-1細胞移植の7日後に、マウスを胃管栄養法を介して2mg/マウスのドキシサイクリンを用いて1日毎に5日間処置して、生着した白血病細胞におけるCas9発現を達成した。ノックアウトをフローサイトメトリーにより検証した。

10

【0295】

白血病細胞およびT細胞共培養アッセイ。共培養アッセイにおいて、健康ドナー末梢血 (PB009-1-0、AllCells) から単離されたヒトT細胞 (5×10^4 個/ウェル) を照射 (28 Gy) した示されているヒト白血病細胞とU底96ウェルプレート中で混合した。白血病細胞とのT細胞の非接触共培養のために、白血病細胞をU底96ウェルプレート中のトランスウェルインサート (細孔径、3 μ M、#09-761-80、Thermo Fisher) の上チャンバーで培養した。健康ドナーから単離されたT細胞を96ウェルトランスウェルプレートの下チャンバーに置いた。照射した示されている白血病細胞 (指し示さない場合はE:T比=2:1) を上チャンバーに加え、示されている抗体、タンパク質および試薬を用いて処理した。5~7日間の抗CD3/CD28コーティングビーズ (11161D、Thermo Fisher) および50U/mlのrhIL-2との培養後に、倒立顕微鏡を使用して代表的な細胞を写真撮影し、T細胞を抗CD3抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した。

20

【0296】

初代AMLまたはB-ALL試料について、患者白血病細胞をAMLおよびB-ALLについてそれぞれCD33⁺およびCD19⁺として選別した。これらの白血病細胞を同じ患者からの自己CD3⁺T細胞または健康ドナーからの同種T細胞と培養した (E:T比=2:1)。抗CD3/CD28コーティングビーズ (11161D、Thermo Fisher) および50U/mlのrhIL-2との14日間の培養後に、倒立顕微鏡を使用して代表的な細胞を写真撮影し、T細胞を抗CD3、抗CD4および抗CD8抗体を用いて染色し、フローサイトメトリーにより分析した。

【0297】

細胞傷害性アッセイのために、健康ドナーのPBMCから単離されたヒトCD8⁺T細胞 (5×10^4 個/ウェル) を96ウェルプレート中で抗CD3/CD28/CD137コーティングビーズ (11163D、Thermo Fisher) を用いて2日間刺激した。次に、示されている 5×10^3 個の白血病細胞および50~500 μ g/mlの抗LILRB4抗体または対照IgGを加えた。細胞数を3連のウェルにおいて7日目に決定した。あるいは、示されている白血病細胞をT細胞と共に、示されているE:T比にて3連のウェルで4~6時間培養した。抗CD3および抗CD8を使用してヒトCTL細胞を検出し、示されている生存THP-1細胞は、GFPについて陽性であり、PIについて陰性であった。刺激されたCTL細胞および抗LILRB4またはIgGを用いて処理されたTHP-1細胞の共培養物からの細胞上清を使用し、ヒトサイトカインアレイ (AAH-CYT-6、RayBiotech) を使用してサイトカイン産生を調べた。

30

【0298】

マウス白血病/T細胞共培養のために、野生型C57bl/6からの脾臓細胞を 2.5×10^4 個の照射 (28Gy) マウス白血病C1498細胞とU底96ウェルプレート中で60時間共培養した。抗CD3/CD28コーティングビーズ (11452D、Thermo Fisher)、50U/mlの組換えヒトIL-2、および野生型C57bl/6マウスからまたはapoe-KOマウスからの5%の血清を培地に加えた。一部の実験において、50 μ g/mlの脂質結合APOEタンパク質 (APOE-POPC) を培地に加えた。APOE組換えタンパク質の脂質化は、記載されたように実行した。

40

【0299】

経内皮遊走アッセイ。内皮細胞を通して郵送するAML細胞の能力を測定するために、 3×10^5 個のHUVCE細胞をトランスウェル膜 (細孔径は8 μ mである) 上で培養した。3日

50

後に、 1×10^5 個の示されている白血病細胞を上チャンバーに播種した。示されている実験において、白血病細胞を上チャンバー中で抗体またはタンパク質を用いて処理した。18h後に、下チャンバー中の細胞を計数した。

【0300】

白血病細胞の短期浸潤アッセイおよび造血幹/前駆細胞（HSPC）のホーミングアッセイ。細胞（ 5×10^6 細胞/マウス）をNSGマウスの静脈内に注射した。動物を白血病細胞の注射の直後に10mg/kgの抗LILRB4抗体または対照IgGを用いて処置した。マウスを20時間後に殺した。末梢血、骨髓、肝臓、および脾臓を回収し、単細胞懸濁液をフローサイトメトリーにより調べた。CFSE、GFPまたは抗ヒトCD45および抗ヒトCD33などの示されているマーカーを使用して、示されている実験における標的白血病細胞を検出した。レシ

10

【0301】

マウス白血病細胞の浸潤能力を試験するために、 5×10^6 個のC1498-GFP-hLILRB4細胞またはC1498-GFPを野生型C57BL/6JまたはAPOEヌルマウスの静脈内に注射した。マウスを20h後に殺した。GFPを使用してフローサイトメトリーにより白血病細胞を検出した。レシ

【0302】

HSPCのホーミング能力を試験するために、 1×10^7 個のヒト臍帯血単核細胞をNSGマウスの静脈内に注射した。マウスを単核細胞の注射の直後に10mg/kgの抗LILRB4抗体または対照IgGを用いて処置し、20時間後に殺した。抗ヒトCD45および抗ヒトCD34を使用してフローサイトメトリーによりヒトHSPCを検出した。同様に、正常ヒト単球の浸潤能力を試験するために、健康ドナーPBMCからの 5×10^6 個のCD14陽性選択単球をCFSEにより標識し、NSGマウスの静脈内に注射した。マウスを単球の注射の直後に10mg/kgの抗LILRB4抗体または対照IgGを用いて処置し、20時間後に殺した。CFSE陽性細胞をフロー

20

【0303】

自然免疫細胞枯渇。NK細胞枯渇を白血病細胞移植の3日前に50 μ lの抗アジアロGM1抗体（CL8955、Cedarlane）のi.p.注射により行ったところ、NSGマウスの循環中のCD45+CD49b+NK細胞の>90%の枯渇が結果としてもたらされた。NSGマウスをクロドロシ酸（ジクロロメチレンビスホスホン酸）リボソーム（SKU8909、Clodrosome）（白血病細胞移植の3日前の200 μ lのストック溶液）を用いて処置することによりマクロファージを枯渇させたところ、NSGマウスの循環中のCD45+CD11b+F4/80+マクロファージの>70%の枯渇が結果としてもたらされた。白血病細胞移植後-3、-2、-1、および0日目の200 μ gの抗Ly-6G mAb（BP0075-1、Bioxcell）のi.p.注射によりNSGマウスを好中球減少性としたところ、NSGマウスの循環中のCD45.1⁺CD11b⁺CD11c⁺好中球の>80%の枯渇が結果としてもたらされた。

30

【0304】

ヒトAML異種移植。異種移植は、本質的に^{2, 3, 6, 7}に記載されているように行った。簡潔に述べれば、6~8週齢NSGマウスを移植のために使用した。 1×10^6 個のヒト白血病細胞を各マウスのi.v.注射のために200 μ lのPBSに再懸濁した。マウスの静脈内に直ちに10mg/kgの抗LILRB4抗体または対照IgGを与えた。移植の3~4週後に、末梢血、骨髓、脾臓、および肝臓を生着について評価した。白血病成長を発光イメージング（最大、 3×10^8 p/秒/cm²/sr；最少、 5×10^6 p/秒/cm²/sr）により経時的にモニターした。生存曲線実験のために、瀕死動物を安楽死させた時にマウスの死を記録した。初代患者由来異種移植片（PDX）について、各NSGマウスに尾静脈注射を介して、白血病細胞ならびに正常造血幹前駆細胞および自己T細胞などの他の正常コンパートメントを含有する $5 \sim 10 \times 10^6$ 個のヒト初代末梢血または骨髓単核細胞を与えた。マウスの静脈内に直ちに10mg/kgの抗LILRB4抗体または対照IgGを与え、安楽死まで週に2回処置した。AML#11について、白血

40

50

病細胞移植の7日後にマウスの静脈内に10mg/kgの抗LILRB4抗体または対照IgGを与え、安楽死まで週に2回処置した。白血病成長を末梢血中のヒト細胞のフローサイトメトリーにより経時的にモニターした。マウス組織中のヒト白血病細胞が1%を超えている場合に初代AML細胞の生着が成功したとみなした。移植の1~4か月後に、末梢血、骨髄、脾臓、および肝臓を生着について評価した。

【0305】

hPBMChito化モデルのために、 1×10^7 個のヒトPBMChitoを各NSGマウスの静脈内に注射した。移植の3週後に、マウスはヒトT細胞の30~50%の生着を有していた。移植後3週目に、野生型、lilrb4-KO THP-1細胞またはルシフェラーゼを安定的に発現するTHP-1細胞(THP-1-Luc-GFP細胞)を含む、 1×10^6 個のヒトAML THP-1細胞を皮下に移植した。マウスの静脈内に直ちに10mg/kgの抗LILRB4抗体または対照IgGを与え、安楽死まで週に2回処置した。腫瘍成長を発光イメージング(最大、 1×10^8 p/秒/cm²/sr; 最少、 5×10^6 p/秒/cm²/sr)により経時的にモニターした。腫瘍サイズをキャリパー測定(幅×幅×長さ)により決定した。誘導性lilrb4ノックアウト実験のために、 1×10^6 個のCas9/lilrb4-sgRNAトランスフェクトTHP-1細胞をi.v.により各NSGマウスに注射し、直後に健康ドナーからの 0.5×10^6 個の単離されたヒト正常T細胞のi.v.注射を行った。THP-1およびT細胞移植の7日後に、

マウスを胃管栄養法を介して2mg/マウスのドキシサイクリンを用いて1日毎に5日間処置して、生着したTHP-1細胞におけるCas9発現を達成した。移植後3週目に、末梢血、骨髄、脾臓、および肝臓を生着について評価した。

【0306】

ヒト臍帯血(hCB)異種移植モデルのために、 2×10^4 個のヒトCD34⁺hCB細胞を各NSGマウスの静脈内に注射した。移植の6週後に、マウスはヒト細胞の10~50%の生着を有していた。ルシフェラーゼを安定的に発現する 1×10^6 個のTHP-1細胞(THP-1-Luc-GFP細胞)を静脈内に移植した。マウスの静脈内に直ちに10mg/kgの抗LILRB4抗体または対照IgGを与えた。腫瘍成長を発光イメージング(最大、 1×10^8 p/秒/cm²/sr; 最少、 5×10^6 p/秒/cm²/sr)により経時的にモニターした。ヒト正常血液細胞の系列をフローサイトメトリーにより分析した。

【0307】

マウスAML同種移植。マウスAML同種移植の手順は、ヒトAML異種移植のそれに類似するものであった。簡潔に述べれば、6~8週齢の野生型C57bl/6マウスを移植のために使用した。ヒトLILRB4を発現する 1×10^6 個のマウス白血病細胞を各マウスの静脈内または皮下移植のために200 μlのPBSに再懸濁した。白血病細胞移植の7日後にマウスの静脈内に10mg/kgの抗LILRB4-N297A抗体または対照IgGを与え、安楽死まで週に2回処置した。移植の3週後に、末梢血、骨髄、脾臓、および肝臓を生着について評価した。皮下移植マウスについて、腫瘍サイズをキャリパー測定(幅×幅×長さ)により決定した。生存曲線実験のために、瀕死動物を安楽死させた時にマウスの死を記録した。CD8⁺T枯渇のために、白血病細胞移植の3日後に10mg/kgの抗CD8抗体(YTS 169.4.2、Bioxcell)をi.v.注射し、3日毎にさらに2回処置した。抗LILRB4抗体処置が腫瘍またはLILRB4に対する腫瘍特異的メモリーT細胞を生成するかどうかを決定するために、本発明者らは、抗LILRB4処置マウスからの脾臓細胞(5×10^6 個/マウス)の正常レシピエントC57bl/6マウスへの養子導入を実行した。5匹の移植マウスのうちの4匹は対照C1498-GFPマウス白血病細胞を拒絶し、これらのマウスは3倍高い数(3×10^6 個/マウス)のC1498-GFP白血病細胞を用いる再負荷に対して感受性でなかった。一方、ナイーブマウスからの脾臓細胞の養子導入を伴う5匹のマウスのうちのいずれも対照C1498-GFPマウス白血病細胞を拒絶しない。

【0308】

キメラ受容体レポーターアッセイ。安定なキメラ受容体レポーター細胞システムを記載されているように構築して、個々のLILRB、PirB、gp49B1およびLILRB4部位変異体のECDに結合し、アダプターDAP-12を通じてシグナル伝達してNFATプロモーターを活性化

10

20

30

40

50

させるペア型免疫グロブリン様受容体 β のキメラ融合細胞内ドメインの活性化または阻害を誘発するリガンドの能力を試験した。アゴニストまたはアンタゴニストがECDに結合してキメラシグナル伝達ドメインを活性化または抑制する場合、GFP発現においてそれぞれ増加または減少が観察される。競合アッセイを使用してLILRB4ブロック抗体をスクリーニングした。簡潔に述べれば、APOEタンパク質(C102、Novoprotein; 10 μ g/ml)またはヒトAB血清(10%、PBS中に希釈)を96ウェルプレートに37°Cで3時間予備コーティングした。PBSを用いる2回の洗浄後に、 2×10^4 個のLILRB4レポーター細胞を各ウェルに播種した一方、示されている抗LILRB4抗体を培養培地に加えた。16時間後に、GFP⁺レポーター細胞の割合(%)をフローサイトメトリーにより分析した。活性化の閾値は、陰性対照処理の2倍である。

【0309】

高速タンパク質液体クロマトグラフィー(FPLC)および質量スペクトル。PBS中の10%のヒトAB血清を16/60 Superdex 200ゲル濾過カラムにロードし、PBSおよび2mMのEDTAを用いて溶出させた。80の画分(40ml)を収集し、各画分(0.5ml)をキメラ受容体レポーターアッセイにより分析した。活性画分(#26~30)をPAGEゲルにロードし、UTSWプロテオミクスコアにおけるタンパク質同定のためのLC-MS/MS分析(Orbitrap Elite)に進めた。検証のために使用した組換えまたは精製タンパク質は、ZA2G(MBS145455、MyBioSource)、AMBP(13141-H08H1、Sino Biological Inc)、TTHY(12091-H08H、Sino Biological Inc)、PEDF(11104-H08H、Sino Biological Inc)、A2MG(MBS173010、MyBioSource)、HEMO(MBS143111、MyBioSource)、ANGT(MBS173525、MyBioSource)、A1AT(MBS173006、MyBioSource)、S100A9(pro-814、Prospecbio)、HORN(EBP08267、Biotrend USA)、VTD B(CSB-EP009306HU、Biotrend USA)、LRG1(pro-141、Prospecbio)、A1BG(RPE570Hu01、Cloud-Clone Corp)、CRSP3(RD172262100、BioVendor)、APOA1(16-16-120101-LEL、Athens Research&Technology)、APOA2(16-16-120102、Athens Research&Technology)、APOA4(16-16-120104、Athens Research&Technology)、APOB(16-16-120200、Athens Research&Technology)、APOC1(16-16-120301、Athens Research&Technology)、APOC2(16-16-120302、Athens Research&Technology)、APOC3(16-16-120303、Athens Research&Technology)、hAPOE(16-16-120500、Athens Research&Technology)、mAPOE(CJ05、Novoprotein)、APOE2(350-12、Peprotech)、APOE3(350-02、Peprotech)、APOE4(350-04、Peprotech)、PODXL2(1524-EG-050、R&D systems)、CD44(12211-H08H、Sino Biological Inc)、HCK(PV6128、Thermo Fisher)、VEGFR3(10806-H08H、Sino Biological Inc)、NRG3(16071-H08H、Sino Biological Inc)、PI16(H00221476-P01、Novusbio)、hMAG(8940-MG-050、R&D systems)、mMAG(8580-MG-100、R&D systems)、CNTF(303-CR-050、R&D systems)、ANGPTL-7(914-AN-025/CF、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 1 \beta 1$ (7064-AB-025、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 2 \beta 1$ (5698-AB-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 2 \beta 3$ (7148-AB-025、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 3 \beta 1$ (2840-A3-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 4 \beta 1$ (5668-A4-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 4 \beta 7$ (5397-A3-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 5 \beta 1$ (3230-A5-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 5 \beta 3$ (3050-AV-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 5 \beta 5$ (2528-AV-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 5 \beta 6$ (CT039-H2508H、Sino Biological Inc)、min tegrin- $\alpha 5 \beta 6$ (CT051-M2508H、Sino Biological Inc)、インテグリン- $\alpha 5 \beta 8$ (4135-AV-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 6 \beta 4$ (5497-A6-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 8 \beta 1$ (CT016-H2508H、Sino Biological Inc)、インテグリン- $\alpha 9 \beta 1$ (5438-A9-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 10 \beta 1$ (5895-AB-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha 11 \beta 1$ (6357-AB-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha E \beta 7$ (5850-A3-050、R&D systems)、インテグリン- $\alpha X \beta 2$ (CT017

10

20

30

40

50

-H2508H、Sino Biological Inc) および正常マウス血清 (NS03L、Millipore sigma) であった。

【0310】

バイオレイヤー干渉法。LILRB4-FcとAPOE2、APOE3、およびAPOE4との間の結合相互作用解析をOctet RED96 (ForteBio、Pall Corporation) で行った。全ての相互作用研究は、protein A dip-and-read biosensors (ForteBio) を用いて行った。全ての結合実験は、Octet Redおよびキネティクスバッファーを使用して30℃で行った。LILRB4-Fcコーティングバイオセンサー (25 µg/mlのLILRB4-Fcを420秒間ロードした) をキネティクスバッファー中で洗浄した後に、APOEの会合 (300秒) および解離 (600秒) をモニターした。LILRB4-Fcのみをロードした参照センサーからバックグラウンド波長シフトを測定した。

10

【0311】

表面プラズモン共鳴 (SPR)。Biacore 2000およびCM5チップを使用し、以前に記載された方法²を使用して、hFcに融合したLILRB4細胞外ドメインへの組換えAPOEの結合を解析した。組換えプロテインA (Pierce) をGEのアミンカップリングキットを使用して2つのフローセルに予め固定化した。LILRB4-hFcを、プロテインAにより捕捉されるべきフローセルのうちの1つに注入した。捕捉されたLILRB4-hFcを含有する試料フローセルからの各結合センサーグラムをプロテインA連結細胞対照について補正した。結合反応を誘導した抗原溶液の各注入、およびランニングバッファーを注いだ解離期間の後に、10mMのNa₃PO₄ (pH2.5) および500mMのNaClを含有する再生溶液の注入によりプロテインA表面を再生させた。結合したAPOE有りおよび無しの全ての捕捉されたLILRB4-hFcを完全に除去し、別のサイクルを開始した。全ての測定は、30 µL/分の流速と共に25℃で行った。

20

【0312】

マイクロスケール熱泳動 (MST)。MST実験は、80%のLEDおよび20%のIRレーザー出力を使用してMonolith NT.115システム (NanoTemper Technologies) で行った。レーザーのオンおよびオフ時間をそれぞれ30秒および5秒に設定した。組換えLILRB4-EC Dタンパク質 (SinoBio) を4488-NHS (NanoTemper Technologies) を用いて標識し、5.9nMの最終濃度において適用した。2倍希釈系列をPBS中の非標識His-APOE (C106、Novoprotein) について調製し、各希釈点を同様にLILRB4-ECD溶液に移した。His-APOEの最終濃度は、0.36nM~12 µMの範囲に及んだ。測定のために試料を標準処理キャピラリー (NanoTemper Technologies) に満たした。

30

【0313】

ウェスタンブロットティングおよび共免疫沈降。細胞全体を、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche Diagnostics) を添加したLaemmli試料緩衝液 (Sigma-Aldrich) に溶解した。試料をSDS-PAGEゲル (Bio-Rad) 上で分離し、タンパク質検出のためにニトロセルロース膜 (Bio-Rad) に転写させた。抗SHP-1 (Cell signaling、3759、1:1000)、抗ホスホ-SHP-1 Tyr564 (Cell signaling、8849、1:500)、抗ホスホ-SHP-1 Tyr564 (Invitrogen、PA537708、1:500)、抗SHP-2 (Cell signaling、3397、1:1000)、抗ホスホ-SHP-2 Tyr580 (Cell signaling、3703、1:500)、抗SHIP1 (Cell signaling、2727、1:1000)、抗ホスホ-SHIP1 Tyr1020 (Cell signaling、3941、1:500)、抗NFκB p65 (Cell signaling、8242、1:1000)、抗IKKα (Cell signaling、11930、1:1000)、抗IKKβ (Cell signaling、8943、1:1000)、抗ホスホ-IKKα/β Ser176/180 (Cell signaling、2697、1:500)、抗IκBα (Cell signaling、4814、1:1000)、抗ホスホ-IκBα Ser32 (Cell signaling、2859、1:500)、抗ラミン-B2 (Cell signaling、12255、1:1000) および抗アルギナーゼ-1 (Cell signaling、9819、1:1000)、抗uPAR (Invitrogen、MON R-4-02、1:500)、抗LILRB4 (Santa cruz、sc-366213、1:200)、抗APOE (Creative diagnostics、DCABH-2367、1:250)、抗β-アクチン (Sigma-Aldrich、A2066、1:1000) および抗α-チューブリン (Sigma-Aldrich、MABT205、1:1000) を含む一次抗体の他に、ホースラディッ

40

50

シュペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲート二次抗体 (Cell signaling、7074、1:1,000、および7076、1:1,000) ならびに化学発光基質 (Invitrogen) を使用した。NE-PE R nuclear/cytoplasmic extraction kit (Thermo fisher、78833) またはplasma membrane protein extraction kit (Abcam、ab65400) を使用して特定の細胞コンパートメントの分画を実行した。さらなる免疫沈降およびウエスタンブロッティングのために細胞膜画分からのタンパク質を抗LILRB4抗体およびdynabeads protein A (Thermo fisher、10001D) とさらにインキュベートした。

【0314】

免疫組織化学。ヘマトキシリン染色および免疫染色を腫瘍のパラフィン切片に対して行った。使用した抗体は、LILRB4 (実験室で製造、1:100)、CD3 (Abcam、ab16669、1:100)、PD-1 (Thermo Fisher、J116、14-9989-82、1:100) およびアルギナーゼ-1 (Cell signaling、9819S、1:100) に対するものであった。Hamamatsu Nano Zoomer 2.0-HT (Meyer instruments Inc.、Houston、TX) を使用して画像を可視化し、NPDview2ソフトウェア (Hamamatsu、Japan) で見た。

【0315】

サイトカイン抗体アレイおよびアルギナーゼ活性アッセイ。白血病細胞から分泌されたタンパク質を調べるために、培養上清を120種のヒトタンパク質の半定量検出のためにヒトサイトカイン抗体アレイ (AAH-CYT-1000、RayBio) に適用した。Image J (NIH) を定量化のために使用した。QuantiChrom Arginase assay kit (DARG-100、BioAssay system) により、示されている白血病細胞の培養上清におけるアルギナーゼ活性を決定した。

【0316】

RNA-seq解析。Qiagen RNeasy Mini Kitを用いて選別された細胞からRNAを精製し、次に製造者の説明書にしたがってSuperScript III Reverse Transcriptase (Invitrogen) を用いて逆転写させた。RNA-seqはUTSW Genomics and Microarray Core Facilityにおいて行った。Covaris S2超音波処理装置を使用してcDNAを超音波処理し、KAPA High Throughput Library Preparation Kitを用いてライブラリーを調製した。試料を末端修復させ、3'端をアデニル化させ、マルチプレックスアダプターを用いてバーコード付加した。PCR増幅したライブラリーをAmpureXPビーズを用いて精製し、Agilent 2100 Bioanalyzerで検証した。正規化およびプールの前に、Qubit (Invitrogen) により試料を定量化し、次にPE100 SBS v3試薬を使用してIllumina Hiseq 2500機械に投入して51bpのシングルエンドリードを生成した。マッピングの前に、リードをトリミングして末端中の低品質領域を除去した。トリミングされたリードを、IlluminaからのUCSC iGenomes GTFファイルを用いてTopHat v2.0.1227を使用してヒトゲノム (HM19) に対してマッピングした。

【0317】

データの正規化および解析の方法は、他の箇所に提示されるように、技術的ばらつきなどのシステムの挙動の一部の局面を特徴付ける「内部標準」の使用に基づく。 $\log_2$ (変化倍率) > 2 、 $P < 0.01$ および $RPKM > 0.1$ を有する遺伝子を、2つの条件間で有意に差次的に発現されるとみなし、経路解析および上流転写因子解析のために使用した。経路解析は、DAVID (david.ncifcrf.gov/tools.jsp) を使用して実行した。上流転写因子解析は、QIAGENのIngenuityツール ([ワールドワイドウェブingenuity.com/](http://www.ingenuity.com/)) を使用して実行した。

【0318】

APOEとのLILRB4の分子ドッキング。APOEとのLILRB4の分子ドッキングは、Insight IIパッケージのZDOCKproモジュールで行った。ZDOCKを実行するための概要的プロトコールは、それぞれプログラムZDOCKおよびRDOCKにおいて実行される幾何学形状サーチおよびエネルギーサーチと記載されている算出の2つの連続する工程を含む。LILRB4結晶構造 (3P2T) およびAPOE3構造 (2L7B) をPDBデータベースから得た。上位50のZDOCKポーズをRDOCK精密化にサブミットした。ZDOCKおよびRDOCKの両方において高い

10

20

30

40

50

スコアを有するポーズをLILRB4/APOE相互作用解析用の候補複合体として選択した。

【0319】

統計解析。4つの独立した実験または示されている独立した試料からの代表的なデータをドットプロット（平均±s.e.m.）または箱ひげプロット（メジアン値（線）、25～75パーセンタイル（箱の外輪郭）ならびに最小および最大値（ひげ））として提示する。2試料比較についての統計的有意性は、両側スチューデントt検定により算出した。生存についての統計的有意性は、ログランク検定により算出した。TCGAデータの多変量解析は、コックス回帰により解析した。差異は $p < 0.05$ の場合に統計的に有意と考えた。n.s.、有意でない；p値は精密な値として表される。ピアソンの相関分析は、RStudioソフトウェア（R Foundation）を用いて行った。

【0320】

LILRB4およびh193複合体の調製。LILRB4の細胞外ドメイン（成熟タンパク質の残基1～196）をコードするDNAをNdeIおよびXhoI制限部位を有するベクターpET21a（Novagen）にクローニングし、大腸菌（E.coli）株BL21（DE3）（Novagen）中で発現させた。37℃のシェーカーインキュベーター中、対応する抗生物質（100 μg/mlのアンプシリン）を含有するLB培地中で細菌を培養した。培養物が0.8～1.0のOD₆₀₀に達した時に1 mMのイソプロピル β-D-1-チオガラクトピラノシド（IPTG）を加えることにより発現を誘導し、次に培養を4～6h続けた後に回収した。遠心分離された細胞をPBS緩衝液（20 mMのNa₃PO₄、280 mMのNaCl、6 mMのKCl、pH7.4）に懸濁し、ホモジナイザー（JNB10, China）を使用して破碎した。組換えタンパク質の封入体を精製し、一部の改変と共に記載されているように再フォールディングさせた。簡潔に述べれば、封入体のアリコートを手すりフォールディング緩衝液（100 mMのTris-HCl、2 mMのEDTA、400 mMのL-アルギニン、0.5 mMの酸化グルタチオンおよび5 mMの還元グルタチオン、pH8.0）中に4℃で8h滴下で希釈した。再フォールディングしたタンパク質を濃縮し、Amicon 8400濃縮装置を使用して20 mMのTris-HClおよび50 mMのNaClを含有するpH8.0の溶液に緩衝液交換した。その後に、HiLoad（登録商標）16/60 Superdex（登録商標）75 PGカラム（GE Healthcare）上の上述の同じ交換緩衝液中でのゲル濾過クロマトグラフィーによりタンパク質をさらに精製した。適格ピーク分画タンパク質をさらなる研究または結晶化のために濃縮した。h193-scFvをVL-（GGGGG）4-VHとして構築し、NdeIおよびXhoI制限部位を有するベクターpET21a（Novagen）にクローニングした。scFvを封入体として大腸菌（Escherichia coli）中で過剰発現させ、その後にLILRB4タンパク質として上記のように再フォールディングおよび精製を行った。LILRB4およびh193-scFvを次に1:2のモル比で混合し、氷上で1hインキュベートした。LILRB4およびh193-scFv複合体をHiLoad（登録商標）16/60 Superdex（登録商標）75 PG（GE Healthcare）クロマトグラフィーによりさらに精製し、任意の過剰なLILRB4からLILRB4/Hu193-scFv複合体を精製した。

【0321】

LILRB4/h193複合体の結晶化。LILRB4/h193-scFv複合体結晶をシッティングドロップでの蒸気拡散により成長させた。5 mg/mlまたは10 mg/mlの計1 μlの複合体タンパク質溶液を等体積のリザーバー溶液と混合した。結晶を1% w/vのTryptone、0.05 MのHEPE SナトリウムpH7.0、20% w/vのポリエチレングリコール3,350中18℃で成長させた。凍結保護剤として17%のグリセロール（vol/vol）を添加したリザーバー溶液中の液体窒素中で結晶を凍結した。X線回折データを100 Kで収集し、HKL2000を用いてインデックス付け、統合およびスケリングした。それぞれLILRB4（PDB:3P2T）および抗体（PDB:4OQT）の構造をサーチモデルとして用いて、CCP4プログラムスイートのPhaserを使用して分子置換法により複合体構造を解明した。それぞれREFMAC5およびCOOTを使用して初期拘束剛体精密化および手動モデル構築を行い、Phenixを使用してさらに精密化した。

【0322】

実施例2

10

20

30

40

50

白血病細胞上に発現されるLILRB4はT細胞増殖を抑制する。AML発症および免疫調節の新規の機序を同定するために、本発明者らは、TCGAデータベースにおいて報告されたような既知の共刺激性受容体および共抑制性受容体の遺伝子発現ならびにAML患者の全生存期間にわたる関係性を解析した。AML患者の生存との負の相関についてリストの上位に順位付けされた、単球細胞上 (Kang et al., 2016; Hirayasu and Arase, 2015; Trowsdale et al., 2015) ならびに単球性AML細胞上 (FAB M4およびM5 AMLサブタイプ) (Dobrowolska et al., 2013) に制限的に発現される免疫抑制受容体である白血球免疫グロブリン様受容体B4 (LILRB4) のタンパク質発現、およびそれをコードするmRNAの発現 (図2Aおよび図6A)。重要なことに、LILRB4タンパク質レベルは、正常単球の表面上よりも新生物性単球の表面上でより高かった (図2B)。

10

【0323】

先行する研究は、LILRB4の細胞外ドメインはT細胞活性を阻害することを報告した (Vlad et al., 2010)。AML細胞上に発現されるLILRB4はT細胞抑制機能を有するのかどうかを試験するために、本発明者らは、LILRB4陽性白血病細胞、LILRB4陰性白血病細胞、または自己T細胞もしくは健康ドナーからのT細胞のいずれかを含む正常造血細胞を共培養した。LILRB4陽性単球性AML細胞のみがT細胞増殖を有意に抑制した (図2Cおよび図7A~7F)。本発明者らは次に、ヒト単球性AML THP-1およびMV4-11細胞からlilrb4を欠失させたところ、AML細胞のT細胞抑制能力はlilrb4ノックアウト (lilrb4-KO) で有意に低減し、野生型lilrb4 (lilrb4-KO-wtとして) の強制発現により回復されるが、欠失した細胞内ドメインを有する変異体lilrb4 (lilrb4-KO-intΔとして) によっては回復されないことを見出した (図2Dおよび図8A~8E)。さらに、野生型THP-1細胞およびヒトT細胞を別々のトランスウェル中で培養した場合、LILRB4媒介性のT細胞阻害もまた観察され、抗LILRB4ブロック抗体によりレスキューされることもできた (図8F~8L)。LILRB4のブロックは、細胞傷害性T細胞の増加、AML細胞の減少、およびT細胞サイトカイン放出の増加を結果としてもたらした (図8M~8O)。これらのインビトロデータは、細胞外ドメイン (Vlad et al., 2010) ではなく、AML細胞におけるLILRB4の細胞内シグナル伝達がT細胞活性の抑制のために要求されることを示唆する。

20

【0324】

次に、本発明者らは、ヒト化マウス異種移植モデルおよび免疫適格マウスモデルを使用して、免疫チェックポイントブロックにおけるLILRB4の機能を調べた。lilrb4-KO THP-1細胞はそうではなかったが、THP-1細胞の皮下移植は、ヒトT細胞再構成マウスにおいてAML発症を結果としてもたらし、それは抗LILRB4処置によりブロックされた (Mosier et al., 1988) (図9A~9G)。ヒト化マウスにおいて確立された播種性白血病モデルにおけるドキシサイクリン誘導性LILRB4欠失もまた、白血病発症を損なわせ、T細胞を回復させた (図2E~2Fおよび図9H~9J)。追加的に、本発明者らは、ヒトLILRB4発現マウスC1498 AML細胞 (hlilrb4-C1498) をC57BL/6マウスに皮下移植して、同系免疫適格マウスモデルを確立した。Fcエフェクター機能からの抗腫瘍効果を除外するために、本発明者らは、Fcグリコシル化部位N297A変異を有する抗LILRB4を用いて腫瘍保有マウスを処置した (Ha et al., 2011)。LILRB4ブロックは、腫瘍負荷を効果的に低下させ、生存を長期化させ、CD8⁺T細胞の枯渇は抗LILRB4抗体の抗腫瘍効果を排除した (図2G~2H)。これらの結果は、LILRB4の腫瘍サポート効果は宿主T細胞阻害に依存することを示唆する。抗LILRB4抗体処置は腫瘍特異的メモリーT細胞を生成させた (図2I)。類似した結果が播種性hlilrb4-C1498同系マウスモデルにおいて得られた (図10A~10D)。最後に、LILRB4のブロックは、初代ヒト単球性AML由来異種移植において白血病発症を有意に低減し (図2J~2K)、生着可能な自己ヒトT細胞の数を増加させた。合わせると、インビトロおよびインビボの結果は、単球性AML細胞におけるLILRB4シグナル伝達はT細胞媒介性の抗腫瘍免疫を抑制することを示す。

30

40

【0325】

LILRB4はAML細胞の遊走および浸潤を促進する。単球性AMLの特徴的な特性の1つは、腫瘍細胞の髄外浸潤の増強である (Straus et al., 1980)。本発明者らは、LILRB4の

50

抗体ブロックは、骨髄、肝臓、および脳を含む内臓への白血病浸潤の有意な減少を結果としてもたらすことを観察した。抗LILRB4抗体処置は、CD8⁺T細胞を枯渇したC57BL/6マウスにおいて皮下C1498腫瘍のサイズを縮小させなかったが（図2G）、抗LILRB4抗体を用いた処置は、肝臓への白血病細胞浸潤の減少に繋がった（図10A）。本発明者らは、T細胞阻害に加えて、LILRB4は白血病浸潤を促進するという仮説を立てた。この仮説を試験するために、本発明者らは、経内皮遊走およびホーミングアッセイを行い、白血病細胞上のLILRB4発現と比べて白血病浸潤をモニターした。LILRB4を枯渇したヒトAML THP-1細胞は、LILRB4を発現する細胞よりもインビトロでより低い経内皮遊走を有した。lilrb4の欠失は、造血臓器へのAML細胞のホーミングおよび生着を低減して、異種移植マウスの生存の長期化および体重損失の遅延を結果としてもたらした。対照的に、マウスAML C1498またはWEHI-3細胞におけるヒトLILRB4の強制発現は反対の効果を有した（図12A～12D）。抗体媒介性のLILRB4ブロックは、LILRB4発現AML細胞においてlilrb4ノックアウトと同じ効果を示した（図12E～12G）。この効果は、白血病細胞におけるLILRB4発現およびその細胞内シグナル伝達に依存していたが、抗体のFcエフェクター機能には依存していなかった（図3Aおよび図12H～12J）。さらには、LILRB4ブロックは、初代単球性AML細胞の浸潤能力を低減した（図3B～3Dおよび図13A～13C）。結果は、循環性LILRB4⁺AML芽球の頻度はLILRB4⁻AML芽球の頻度より有意に低いこと（Dobrowolska et al., 2013）、およびLILRB4⁺慢性リンパ球性白血病細胞はリンパ系組織関与と関連すること（Colovai et al., 2007）を示す先行研究と合致している。LILRB4⁺AML細胞が遊走する傾向がある骨髄、肝臓、および脳は、ある特定の免疫的特権を有することが公知である（Crispe et al., 2006; Carson et al., 2006; Fujisaki et al., 2001）。そのため、単球性AML細胞の髄外浸潤の増強をサポートするLILRB4媒介性の遊走はまた、免疫回避に寄与する可能性がある。

【0326】

APOEはLILRB4の細胞外結合タンパク質である。AML細胞の免疫抑制および遊走機能の抗LILRB4抗体ブロックは、LILRB4のそれらの機能はリガンド依存性であることを示唆する。インテグリン- $\alpha_v\beta_3$ は、マウスLILRB4オルソログであるgp49B1のリガンドとして以前に同定された（Castells et al., 2001）。しかしながら、異なるインテグリン- $\alpha\beta$ 複合体はヒトLILRB4レポーター細胞を活性化させなかった。驚くべきことに、ヒト血清およびマウス血清は、LILRB4レポーターを活性化させることができたが、他のLILRB4のレポーターを活性化させることはできなかった（図4A）。タンパク質液体クロマトグラフィー分画、続いてレポーターアッセイおよび質量分析を通じて、本発明者らは、LILRB4およびマウスPirBのレポーターを特異的に活性化させるAPOEを同定した（図4B）。野生型マウスからの血清はLILRB4レポーターを活性化させたが、APOEヌルマウスからの血清はそうではなかった（図4C）。追加的に、リポソーム再構成APOEタンパク質（APOE-POPC）および脂質非含有APOEの両方はLILRB4レポーター細胞を活性化させた（図4D）。THP-1細胞へのAPOEの結合は、lilrb4-KOにより有意に減少した（図4E）。LILRB4への組換えAPOEの特異的結合は、マイクロスケール熱泳動（MST）、表面プラズモン共鳴（SPR）、およびバイオレイヤー干渉法（Octet）を使用して確認された。解離定数は、MSTにより決定された場合に210nMであった（図4F）。変異誘発研究は、APOEのN末端ドメイン、ならびにLILRB4の第1のIgドメイン中のP35およびW106ならびに2つのIgドメインの間のリンカー領域中のY121は、LILRB4のAPOE媒介性の活性化のために不可欠であることを示した（図4G～4H）。

【0327】

APOEは免疫抑制受容体LILRB4を活性化させるという発見は、APOEの十分に立証されている免疫抑制機能と合致している（Grainger et al., 2004; Ali et al., 2005）。LILRB4のT細胞抑制活性はAPOEに依存するのかどうかを決定するために、本発明者らは、対照またはapoeノックアウトヒトAML細胞と共培養されたT細胞の増殖を調べた。APOEを欠失したAML細胞は、T細胞の増殖を回復させ、白血病細胞の遊走を抑制した（図4Iおよび図14）。さらに、共培養におけるT細胞の割合（%）は、LILRB4異所性発現C1498細

胞を野生型マウス血清を用いて処理した場合に、apoeノックアウトマウス血清を用いて処理されたものと比較して有意により低かった（図4J～4K）。マウス脾臓細胞およびLILRB4発現AML細胞の共培養へのリポソーム再構成APOEの追加は、T細胞の割合（%）を減少させた（図4L）。さらには、LILRB4の発現は、野生型マウスにおいて骨髄および肝臓へのC1498細胞の浸潤を有意に増加させたが、APOEヌルレシピエントにおいてはそうではなかった（図4M）。これらのデータは、APOEはヒト単球性AML細胞上のLILRB4を活性化させて、T細胞増殖を抑制し、AML細胞遊走をサポートすることを示す。

【0328】

LILRB4媒介性の細胞内シグナル伝達はAML細胞遊走およびT細胞抑制を制御する。本発明者らは、T細胞抑制および白血病浸潤のために要求されるLILRB4の下流のシグナル伝達を同定することを試みた。ホスファターゼSHP-1、SHP-2、およびSHIPは、LILRB4の細胞内ドメインにリクルートされ得る（Kang et al., 2016）。SHP-1およびSHIPのリン酸化のレベルはそうではなかったが、SHP-2のリン酸化のレベルは、野生型細胞よりもlilrb4-KO AML細胞においてより低かった（図5Aおよび図15A）。SHP-1またはSHIPの喪失はそうではなかったが、SHP-2の喪失はTHP-1細胞によるT細胞抑制を逆転させ（図5Bおよび図15B）、THP-1細胞の短期および長期浸潤を減少させた（図5C～5D）。結果は、SHP-2はLILRB4シグナル伝達のメディエーターであることを示唆する。

【0329】

Ingenuity Pathway Analysisは、SHP-2により正に調節される（You et al., 2001）、NF- κ B経路における鍵となる転写因子NF κ B1およびRELA（DiDonato et al., 2012）の活性は、lilrb4の喪失により最も著しく阻害されることを示した（図5E）。これと一貫して、IKK α / β のリン酸化および核NF- κ Bのレベルは、lilrb4-KO AML細胞において減少した（図5F～5Gおよび図15A）。NF- κ Bシグナル伝達の阻害は、LILRB4依存的にT細胞抑制を回復させ、AML細胞浸潤を低減した（図5H～5Iおよび図15C～15D）。したがって、LILRB4活性化の効果はNF- κ B経路を通じて媒介され、これはAMLサブタイプの中でも単球性AMLにおいて特に堅牢である（Baumgartner et al., 2002）。

【0330】

AML細胞はトランスウェルにおいてT細胞増殖を阻害するという結果（図2D）と合致して、野生型THP-1細胞からの培養上清はT細胞活性を抑制したが、lilrb4-KO細胞からの培養上清はそうではなかった（図5J）。lilrb4-KO細胞の培養上清よりもWT THP-1細胞の培養上清において高く存在するタンパク質の中で（図16A）、uPARは単球性AML細胞により高発現される（Bene et al., 2004）。NF- κ Bの標的であるuPARは、がんの浸潤、転移、生存、および血管新生を促進することが周知である（Su et al., 2016; Wang et al., 2000）。組換えuPARの追加は、lilrb4-KO THP-1細胞と共培養されたT細胞の増殖を用量依存的に減少させた（図5K）。uPARのこの活性は、AML細胞における下流のエフェクターにより媒介された可能性があり、何故ならば、uPARは直接的にT細胞増殖を有効に減少させないからである（図16B）。

【0331】

uPARのように、アルギナーゼ-1（ARG1）の発現は、野生型細胞よりもlilrb4-KO AML細胞において有意により低かった（図16C～16D）。ARG1は、uPAR媒介性のシグナル伝達により上方調節され、T細胞増殖を阻害し（Hu et al., 2014; Ilkovitch and Lopez, 2009）、免疫抑制機能のためにAPOE（Baitsch et al., 2011）およびNF- κ B（Hagemann et al., 2008）により上昇し得る。本発明者らは、ARG1はLILRB4-NF- κ B-uPARシグナル伝達の鍵となる下流のエフェクターであるという仮説を立てた。ARG1は、AML細胞により分泌されてT細胞活性を阻害し得る²⁷。組換えARG1は、lilrb4-KO、apoe-KO、およびshp-2-KO AMLまたは初代AML細胞との共培養においてT細胞増殖を減少させた（図5Lおよび図16E～16G）。追加的に、uPARまたはARG1のいずれかの追加および過剰発現は、それぞれインビトロおよびインビボでlilrb4-KO AML細胞の遊走能力をレスキューした（図16Hおよび図5M）。合わせると、結果は、LILRB4/SHP-2/NF- κ B/uPAR/ARG1は、免疫活性を抑制し、白血病遊走をサポートする単球性AML細胞におけるシグ

ナル伝達経路であることを示す（図17～18）。

【0332】

LILRB4のターゲティングは、単球性AML細胞の特異的攻撃に繋がり得るだけでなく、T細胞、そして多分単球/マクロファージを含む複数の免疫細胞種を再活性化させ得る（Kang et al., 2016）。重要なことに、LILRB4シグナル伝達が白血病細胞におけるものと異なり得る（図19）正常単球細胞上にLILRB4は制約されて発現されること（Kang et al., 2016）、およびLILRB4ブロックは正常な造血機能に有意に干渉しなかったこと（図20A～20B）から、LILRB4のターゲティングは最小の毒性を有し得る。最後に、LILRB4はまた、ある特定の他の種類のがんおよび骨髄由来抑制細胞、寛容原性樹状細胞、および腫瘍関連マクロファージ上に発現される（Kang et al., 2016; de Goeje et al., 2015; Chang et al., 2002; Suciu-Foca et al., 2007）。LILRB4のターゲティングは、そのため、がん治療における免疫療法およびターゲティング療法の組合せを可能にし得る。

【0333】

本発明者らはまた、LILRB4は、固形がん患者から（form）単離された骨髄由来抑制細胞（MDSC）上に発現されることを見出した（図21A）。LILRB4の発現は、MDSCの自己T細胞抑制能力と正に相関している（図21B）。本発明者らは、MDSC/T細胞共培養において抗LILRB4処理を行い、抗LILRB4処理は、共培養されたT細胞のIFN γ 分泌を増加させることを見出した（図21C）。

【0334】

実施例3

本発明者らは次に、ヒトLILRB4細胞外ドメイン（ECD）に対するウサギモノクローナル抗体（mAb）のバッチを生成した。例示的なLILRB4抗体の重鎖および軽鎖可変領域のアミノ酸および核酸配列を図28A～28C、図29A～29C、図30A～30Cおよび図31A～31Cに示す。LILRB4 ECDに結合する8つの例示的なLILRB4 mAbについてのELISA結合結果を図22および表6に示す。Octetを使用して決定された例示的なLILRB4抗体についての速度論的結合測定（センサーグラム）を図26および表7に示す。

【0335】

図23Aに示されるように、LILRB4 ECDは2つのIgドメインD1およびD2を有する。その変異がAPOEによるLILRB4の活性化を有意に低減した2つの残基、W106およびY121は、それぞれ、第1のIgドメインD1中、および2つのIgドメインの間のリンカーまたはヒンジ領域中に位置する。図23Bに示されるように、LILRB4 ECDに結合する8つの例示的なmAbの中で、B4-193を除く7つのmAbはLILRB4のD1ドメインに結合する。

【0336】

（表6）ELISAによりアッセイされたヒトLILRB4に結合するLILRB4抗体のEC₅₀

抗体	EC ₅₀ (nM)
B4-15-1	0.99
B4-116-1	2.58
B4-116-2	1.7
B4-49	1.01
B4-72-2	0.29
B4-86	1.02
B4-87	2.54
B4-193	1.81

【0337】

（表7）Octetバイオセンサーチップを使用して決定されたLILRB4抗体の速度論的結合定数

10

20

30

40

50

抗体	Kd	Kon	Koff	R ²
B4-116-1	8.20E-10	2.31E+05	1.89E-04	0.9972
B4-116-2	4.95E-10	2.05E+05	1.01E-04	0.9983
B4-49	2.33E-11	1.11E+05	2.58E-06	0.834
B4-87	2.38E-10	7.04E+04	1.68E-05	0.9991
B4-86	3.44E-10	7.96E+04	2.74E-05	0.9992
B4-72-2	3.73E-09	4.26E+04	1.59E-04	0.6988
B4-193	1.33E-10	1.31E+05	1.74E-05	0.9997

10

【0338】

本発明者らは次に、ヒトLILRB4組換えタンパク質のLILRB4 D1ドメイン（D1）、D2ドメイン（D2）、ストーク領域（SR）、D1+D2、D2+SRおよび全長ECD（D1+D2+SR）を使用して、B4-193の結合ドメインを決定した。図24Bに示されるように、この特定のELISAアッセイにおいて、B4-193のみはヒトLILRB4の全長ECDに結合する。

【0339】

本発明者らは次に、野生型およびY121A変異型ヒトLILRB4 ECD組換えタンパク質を使用して、B4-193の結合に対するLILRB4上のアミノ酸Y121の寄与を判定した。図25に示されるように、LILRB4のY121A変異は、LILRB4へのB4-193の結合を有意に減少させた。

20

【0340】

本発明者らは、APOE競合アッセイ（図32）、LILRB4レポーター細胞/K562共培養アッセイ（図33）、ならびにLILRB4レポーター細胞アッセイ（図34および図35）を用いて、LILRB4活性のモジュレートにおける例示的なLILRB4 mAbの効果を測定した。

【0341】

本発明者らはまた、例示的な抗LILRB4抗体によるLILRBファミリーメンバー、LILRAファミリーメンバーの他に、カニクイザルLILRB4（cynoB4）との交差反応性を試験した（図36および図37）。

【0342】

図38に示されるように、例示的な抗LILRB4抗体B4-193は、THP-1細胞によるT細胞抑制をレスキューする。

30

【0343】

図39A～39Cに示されるように、例示的な抗LILRB4抗体128-3およびB4-193は、マウスの体重に対する有意な有害効果無しで、THP-1異種移植マウスにおいて白血病発症を阻害する。

【0344】

実施例4

本発明者らは、B4-193をベースとして、一群のヒト化抗LILRB4抗体をさらに生成した。ヒト化B4-193抗体（h193）の重鎖および軽鎖可変領域ならびにそのCDRのアミノ酸配列を図28B～28C、図30B～30C、表4および表5に示す。本発明者らは、フローサイトメトリー、ELISAおよびOctetアッセイを使用してヒトLILRB4へのh193抗体の結合を測定し、その結果を図40および表8に示す。

40

【0345】

（表8）h193抗体はヒトLILRB4に結合する

50

抗体番号 (図40～ 43に示さ れている)	重鎖 (H)	軽鎖 (K)	ELISA EC50 (ng/ml)	ELISA EC50 (nM)	Octet Kd (M)	Octet Kon (1/Ms)	Octet Koff (1/s)
19	H3	K1	293.8	1.96	2.03E-09	1.45E+05	2.94E-04
20	H3	K2	272.1	1.81	1.67E-09	1.50E+05	2.50E-04
21	H3	K3	218.8	1.46	2.16E-09	1.45E+05	3.13E-04
22	H3	K4	221.7	1.48	2.39E-09	1.51E+05	3.61E-04
23	H4	K1	461.4	3.07	5.83E-09	1.25E+05	7.31E-04
24	H4	K2	466.5	3.11	4.41E-09	1.35E+05	5.95E-04
25	H4	K3	523.8	3.49	4.98E-09	1.28E+05	6.38E-04
26	H4	K4	435.5	2.9	5.30E-09	1.38E+05	7.33E-04
27	H5	K1	>1000	>6	/	/	/
28	H5	K2	>1000	>6	/	/	/
29	H5	K3	>1000	>6	/	/	/
30	H5	K4	>1000	>6	/	/	/
31	H6	K1	314.3	2.09	2.61E-09	1.44E+05	3.76E-04
32	H6	K2	261.5	1.74	2.38E-09	1.52E+05	3.62E-04
33	H6	K3	320	2.13	2.33E-09	1.48E+05	3.45E-04
34	H6	K4	343.8	2.29	2.39E-09	1.60E+05	3.81E-04
35	H7	K1	161.7	1.08	1.05E-09	1.41E+05	1.48E-04
36	H7	K2	144.6	0.96	1.01E-09	1.43E+05	1.44E-04
37	H7	K3	162.7	1.08	9.84E-10	1.43E+05	1.40E-04
38	H7	K4	183.3	1.22	9.49E-10	1.46E+05	1.39E-04

【0346】

本発明者らはまた、h193抗体によるLILRBファミリーメンバー、LILRAファミリーメンバーの他に、カニクイザルLILRB4 (cynoB4) との交差反応性を試験した (図41A～41Mおよび図42)。結果は、h193抗体は、LILRB4を除いてLILRAファミリーメンバーともLILRBファミリーメンバーとも交差反応しないことを示した。H193抗体はまた、異なる程度でカニクイザルLILRB4タンパク質に結合することができる。

【0347】

本発明者らは、ApoE競合アッセイおよびK562共培養アッセイを使用してh193抗体のアンタゴニスト効果およびアゴニスト効果をさらに測定した。図43A (ApoE競合アッセイ) および図43B (K562細胞共培養アッセイ) に示されるように、ほとんどのh193抗体は、ApoEにより誘導されるLILRB4活性を阻害した。

【0348】

本発明者らはまた、サイトカインアレイアッセイを使用して、サイトカイン放出のモジュレートにおけるh193抗体の効果を測定した (図44～47)。簡潔に述べれば、h193抗体 (20ug/ml) を用いてヒトPBMC (1.5×10^6 細胞/ml) を48時間処理し、次にサイトカインアレイに供して120種のサイトカインのレベルを測定した。別のアッセイにおいて、ヒトPBMCをTHP-1細胞 (0.3×10^6 細胞/ml) と共培養した後に、h193抗体を用いて処理した。ヒトIgGを陰性対照として使用した。図44A～44Dに示されるように、h193抗体処理は、PBMCのみにおいて、ある特定の免疫調節および炎症プロセスサイトカインの分泌を減少させた。図45A～45Dに示されるように、h193抗体処理は、THP-1細胞と共培養されたPBMCにおいて、ある特定の免疫調節および炎症プロセスサイトカインの分泌を増加させた。

【0349】

異種移植マウスモデルにおいて、h193抗体は白血病の発症を抑制した（図48）。

【0350】

実施例5

この実施例は、LILRB4/h193複合体の結晶化を通じて、LILRB4およびh193抗体の間の相互作用の分子基盤を示す。LILRB4のD1およびD2ドメインならびにh193抗体の単鎖Fv断片（scFv）を大腸菌中の封入体として発現させ、インビトロリフォールディング法により可溶性タンパク質をそれぞれ得た。その後、結晶スクリーニングのためにLILRB4-D1/D2/h193 scFv複合体を調製し、複合体の構造を2.0 Åの分解能において分子置換により決定した。

【0351】

全体構造は、h193抗体が主にLILRB4のD1とD2との間のリンカー領域に結合することを明らかにする（図49A）。この抗体は、重鎖（V_H）および軽鎖（V_L）の両方を利用してLILRB4と相互作用し、これは、h193抗体V_HおよびV_L領域中の3つ全てのCDRループ（V_L中のCDR2ループを除く）を伴う（図49Aおよび表9）。具体的には、h193抗体は、LILRB4分子のD1D2ヒンジループ、ならびにD2ドメインのBCループおよびC'Eループに結合する。LILRB4 D1およびD2ドメインのヒンジループ中の残基K100、G96、およびS99は、HCDR1（S32）領域ならびにHCDR2（S59およびD53）領域の両方における残基と3つの水素結合を形成し（図49B）、D2ドメインのBCループ中の残基R124は、2つの水素結合を形成することによりV_H中のHCDR3の残基H101と相互作用するだけでなく、V_L中の残基I93（LCDR3）との1つの水素結合にも寄与する（図49C）。さらに、LILRB4-D2のBCループ中のH153は、2つの水素結合を形成することによりHCDR3ループのR94と接触する（図49C）。LILRB4-D2のBCループ中の残基Q122およびC'Eループ中のQ154は、LCDR1ループの残基W32およびN30と3つの水素結合を形成する（図49C）。以上を合わせると、LILRB4の3つのループは、複数の水素結合相互作用を含む一連の接触を通じてh193抗体により標的とされる。顕著なことに、h193抗体結合との重要な接触に寄与する残基Q122およびH153は、全てのLILR分子の中でもLILRB4に特有である。これは、LILRB4へのh193抗体の特異的結合に寄与し得る。

【0352】

（表9）h193とLILRB4との間の相互作用

10

20

30

40

50

	h193	LILRB4	接触
重鎖	S31	H185	2
	S32	K100, H185, S99	12(1), 2, 7
	Y33	S99	4
	W34	R124, S125, S99	13, 4, 3
	D53	A97, Y98, S99	1, 5, 12(2)
	S54	S99	3
	G55	G96, A97, Y98, S99	2, 5, 5, 2
	S56	W18, M94, G96, A97, Y98	5, 2, 7(1), 13(1), 1
	V57	F178, L182, E67, A97, Y98	3, 1, 4, 10(1), 3
	G58	A97	1
	I59	S125, M127, Y98	2, 1, 4
	Y61	S125, P126, H176	4, 5, 2
	H101	R124	12(2)
	G102	R124	6(1)
	D103	K100, R124	1, 1
	W105	T102, Q122, S123, R124	3, 7, 9, 35
			総接触数: 224
軽鎖	S28	G149	2
	N30	Q122, G149, Q154	3(1), 2, 5(1)
	W32	T102, Q122	1, 10(1)
	G91	R124	3
	Y92	Q122, R124, H153	1, 6, 11
	I93	R124, S125, P126, H153	10(1), 5, 4, 1
	R94	P126, A150, Q152, H153	4, 1, 5, 13(2)
			総接触数: 87

10

20

【0353】

数は、CCP4スイートのContactプログラムにより解析された、抗体残基とLILRB4残基との間の原子間接触の数を表す（距離カットオフは4.5 Åである）。

【0354】

括弧内の数は、抗体残基とLILRB4残基との間の水素結合の数を表す。

30

【0355】

本出願に開示および権利主張される全ての方法は、本開示に照らして過度の実験なしに製造および実施することができる。本発明の組成物および方法を好ましい態様に関して記載したが、本発明の概念、精神、および範囲から離れることなく、本明細書に記載の方法に対しておよび方法の工程または工程の並びにおいてバリエーションが適用されてもよいことは当業者に明らかである。より具体的には、同じまたは類似の結果を達成しながら、本明細書に記載の剤を、化学的および生理学的に関連するある特定の剤と置き換え得ることが明らかである。当業者に明らかな全てのそのような類似の置換物および改変は、添付の特許請求の範囲により定義される本発明の精神、範囲、および概念に含まれると考えられる。

40

【0356】

参考文献

以下の参考文献は、本明細書に記載されているものに対して例示的な手順または他の詳細な補足を提供する程度まで、参照により本明細書に具体的に組み入れられる。

- 1 Curran, E. K., Godfrey, J. & Kline, J. Mechanisms of Immune Tolerance in Leukemia and Lymphoma. *Trends Immunol*, doi:10.1016/j.it.2017.04.004 (2017).
- 2 Kang, X. *et al.* Inhibitory leukocyte immunoglobulin-like receptors: Immune checkpoint proteins and tumor sustaining factors. *Cell Cycle* **15**, 25-40, doi:10.1080/15384101.2015.1121324 (2016).
- 3 Hirayasu, K. & Arase, H. Functional and genetic diversity of leukocyte immunoglobulin-like receptor and implication for disease associations. *Journal of human genetics*, doi:10.1038/jhg.2015.64 (2015). 10
- 4 Trowsdale, J., Jones, D. C., Barrow, A. D. & Traherne, J. A. Surveillance of cell and tissue perturbation by receptors in the LRC. *Immunol Rev* **267**, 117-136, doi:10.1111/imr.12314 (2015).
- 5 Dobrowolska, H. *et al.* Expression of immune inhibitory receptor ILT3 in acute myeloid leukemia with monocytic differentiation. *Cytometry B Clin Cytom* **84**, 21-29, doi:10.1002/cyto.b.21050 (2013). 20
- 6 Vlad, G. *et al.* Membrane and soluble ILT3 are critical to the generation of T suppressor cells and induction of immunological tolerance. *Int Rev Immunol* **29**, 119-132, doi:10.3109/08830180903281185 (2010).
- 7 Mosier, D. E., Gulizia, R. J., Baird, S. M. & Wilson, D. B. Transfer of a functional human immune system to mice with severe combined immunodeficiency. *Nature* **335**, 256-259, doi:10.1038/335256a0 (1988).
- 8 Ha, S. *et al.* Isolation and characterization of IgG1 with asymmetrical Fc glycosylation. *Glycobiology* **21**, 1087-1096, doi:10.1093/glycob/cwr047 (2011). 30
- 9 Straus, D. J. *et al.* The acute monocytic leukemias: multidisciplinary studies in 45 patients. *Medicine (Baltimore)* **59**, 409-425 (1980).
- 10 Colovai, A. I. *et al.* Expression of inhibitory receptor ILT3 on neoplastic B cells is associated with lymphoid tissue involvement in chronic lymphocytic leukemia. *Cytometry B Clin Cytom* **72**, 354-362, doi:10.1002/cyto.b.20164 (2007).

- 11 Crispe, I. N. *et al.* Cellular and molecular mechanisms of liver tolerance. *Immunol Rev* **213**, 101-118, doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00435.x (2006).
- 12 Carson, M. J., Doose, J. M., Melchior, B., Schmid, C. D. & Ploix, C. C. CNS immune privilege: hiding in plain sight. *Immunol Rev* **213**, 48-65, doi:10.1111/j.1600-065X.2006.00441.x (2006).
- 13 Fujisaki, J. *et al.* In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* **474**, 216-219, doi:10.1038/nature10160 (2011). 10
- 14 Castells, M. C. *et al.* gp49B1-alpha(v)beta3 interaction inhibits antigen-induced mast cell activation. *Nat Immunol* **2**, 436-442, doi:10.1038/87749 (2001).
- 15 Grainger, D. J., Reckless, J. & McKilligin, E. Apolipoprotein E modulates clearance of apoptotic bodies in vitro and in vivo, resulting in a systemic proinflammatory state in apolipoprotein E-deficient mice. *J Immunol* **173**, 6366-6375 (2004).
- 16 Ali, K., Middleton, M., Pure, E. & Rader, D. J. Apolipoprotein E suppresses the type I inflammatory response in vivo. *Circ Res* **97**, 922-927, doi:10.1161/01.res.0000187467.67684.43 (2005). 20
- 17 DiDonato, J. A., Mercurio, F. & Karin, M. NF-kappaB and the link between inflammation and cancer. *Immunol Rev* **246**, 379-400, doi:10.1111/j.1600-065X.2012.01099.x (2012).
- 18 You, M., Flick, L. M., Yu, D. & Feng, G. S. Modulation of the nuclear factor kappa B pathway by Shp-2 tyrosine phosphatase in mediating the induction of interleukin (IL)-6 by IL-1 or tumor necrosis factor. *J Exp Med* **193**, 101-110 (2001).
- 19 Baumgartner, B. *et al.* Increased IkappaB kinase activity is associated with activated NF-kappaB in acute myeloid blasts. *Leukemia* **16**, 2062-2071, doi:10.1038/sj.leu.2402641 (2002). 30
- 20 Bene, M. C. *et al.* CD87 (urokinase-type plasminogen activator receptor), function and pathology in hematological disorders: a review. *Leukemia* **18**, 394-400, doi:10.1038/sj.leu.2403250 (2004).
- 21 Su, S. C., Lin, C. W., Yang, W. E., Fan, W. L. & Yang, S. F. The urokinase-type plasminogen activator (uPA) system as a biomarker and therapeutic target in human malignancies. *Expert Opin Ther Targets* **20**, 551-566, doi:10.1517/14728222.2016.1113260 (2016). 40

- 22 Wang, Y. *et al.* Identification of a novel nuclear factor-kappaB sequence involved in expression of urokinase-type plasminogen activator receptor. *Eur J Biochem* **267**, 3248-3254 (2000).
- 23 Hu, J. *et al.* uPAR induces expression of transforming growth factor beta and interleukin-4 in cancer cells to promote tumor-permissive conditioning of macrophages. *Am J Pathol* **184**, 3384-3393, doi:10.1016/j.ajpath.2014.08.003 (2014).
- 24 Ilkovitch, D. & Lopez, D. M. Urokinase-mediated recruitment of myeloid-derived suppressor cells and their suppressive mechanisms are blocked by MUC1/sec. *Blood* **113**, 4729-4739, doi:10.1182/blood-2008-08-176438 (2009). 10
- 25 Baitsch, D. *et al.* Apolipoprotein E induces antiinflammatory phenotype in macrophages. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **31**, 1160-1168, doi:10.1161/atvbaha.111.222745 (2011).
- 26 Hagemann, T. *et al.* "Re-educating" tumor-associated macrophages by targeting NF-kappaB. *J Exp Med* **205**, 1261-1268, doi:10.1084/jem.20080108 (2008).
- 27 Mussai, F. *et al.* Acute myeloid leukemia creates an arginase-dependent immunosuppressive microenvironment. *Blood* **122**, 749-758, doi:10.1182/blood-2013-01-480129 (2013). 20
- 28 de Goeje, P. L. *et al.* Immunoglobulin-like transcript 3 is expressed by myeloid-derived suppressor cells and correlates with survival in patients with non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* **4**, e1014242, doi:10.1080/2162402x.2015.1014242 (2015).
- 29 Chang, C. C. *et al.* Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat Immunol* **3**, 237-243, doi:10.1038/ni760 (2002).
- 30 Suci-Foca, N. *et al.* Soluble Ig-like transcript 3 inhibits tumor allograft rejection in humanized SCID mice and T cell responses in cancer patients. *J Immunol* **178**, 7432-7441 (2007). 30
- 31 Piedrahita, J. A., Zhang, S. H., Hagaman, J. R., Oliver, P. M. & Maeda, N. Generation of mice carrying a mutant apolipoprotein E gene inactivated by gene targeting in embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* **89**, 4471-4475 (1992).
- 32 Zheng, J. *et al.* Inhibitory receptors bind ANGPTLs and support blood stem cells and leukaemia development. *Nature* **485**, 656-660, doi:10.1038/nature11095 (2012).
- 33 Kang, X. *et al.* The ITIM-containing receptor LAIR1 is essential for acute myeloid leukaemia development. *Nat Cell Biol* **17**, 665-677, doi:10.1038/ncb3158 (2015). 40

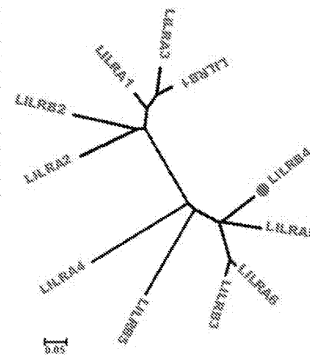
- 34 Deng, M. *et al.* A motif in LILRB2 critical for Angptl2 binding and activation. *Blood* **124**, 924-935, doi:10.1182/blood-2014-01-549162 (2014).
- 35 Zheng, J. *et al.* Ex vivo expanded hematopoietic stem cells overcome the MHC barrier in allogeneic transplantation. *Cell Stem Cell* **9**, 119-130, doi:10.1016/j.stem.2011.06.003 (2011).
- 36 Lu, Z. *et al.* Fasting selectively blocks development of acute lymphoblastic leukemia via leptin-receptor upregulation. *Nat Med* **23**, 79-90, doi:10.1038/nm.4252 (2017). 10
- 37 Zhang, C. C., Kaba, M., Iizuka, S., Huynh, H. & Lodish, H. F. Angiopoietin-like 5 and IGFBP2 stimulate ex vivo expansion of human cord blood hematopoietic stem cells as assayed by NOD/SCID transplantation. *Blood* **111**, 3415-3423, doi:blood-2007-11-122119 [pii] 10.1182/blood-2007-11-122119 [doi] (2008).
- 38 Zheng, J., Huynh, H., Umikawa, M., Silvany, R. & Zhang, C. C. Angiopoietin-like protein 3 supports the activity of hematopoietic stem cells in the bone marrow niche. *Blood* **117**, 470-479, doi:10.1182/blood-2010-06-291716 (2011). 20
- 39 Cawthorne, C., Swindell, R., Stratford, I. J., Dive, C. & Welman, A. Comparison of doxycycline delivery methods for Tet-inducible gene expression in a subcutaneous xenograft model. *J Biomol Tech* **18**, 120-123 (2007).
- 40 Denisov, I. G., Grinkova, Y. V., Lazarides, A. A. & Sligar, S. G. Directed self-assembly of monodisperse phospholipid bilayer Nanodiscs with controlled size. *J Am Chem Soc* **126**, 3477-3487, doi:10.1021/ja0393574 (2004).
- 41 Swerdlow, S., Campo, E., Harris, N.L., Jaffe, E.S., Pileri, S.A., Stein, H., Thiele, J., Arber, D., Hasserjian, R., and Le Beau, M. (2017). WHO classification of tumors of haematopoietic and lymphoid tissues (WHO). 30
- 42 Schuler, E., Schroeder, M., Neukirchen, J., Strupp, C., Xicoy, B., Kundgen, A., Hildebrandt, B., Haas, R., Gattermann, N., and Germin, U. (2014). Refined medullary blast and white blood cell count based classification of chronic myelomonocytic leukemias. *Leuk Res* **38**, 1413-1419.

【図面】

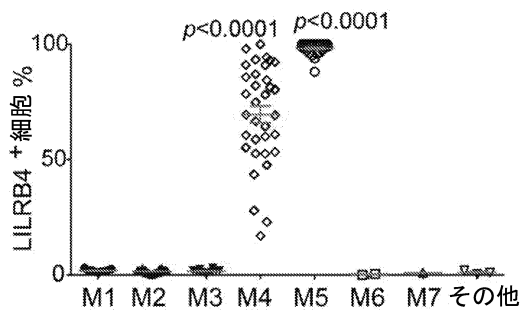
【図 1 A】

	LILRA1	LILRA3	LILRB1	LILRA2	LILRB2	LILRA4	LILRB5	LILRA6	LILRB3	LILRA5	LILRB4
LILRA1		87	89	74	78	37	59	63	62	62	61
LILRA3			90	76	75	52	53	58	56	57	54
LILRB1				79	76	45	56	59	60	60	58
LILRA2					70	36	55	66	58	58	50
LILRB2						50	53	60	59	57	54
LILRA4							60	66	64	67	65
LILRB5								68	66	66	70
LILRA6									94	93	91
LILRB3										81	80
LILRA5											82
LILRB4											

【図 1 B】

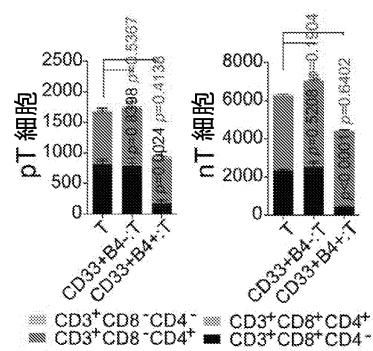


【図 2 - 1】

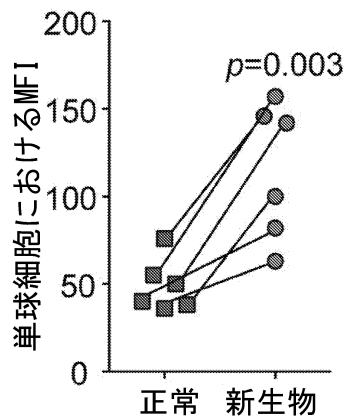


A

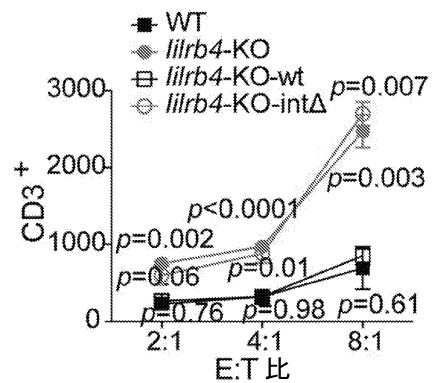
【図 2 - 2】



C



B



D

10

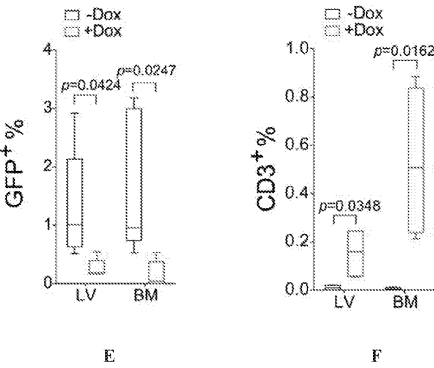
20

30

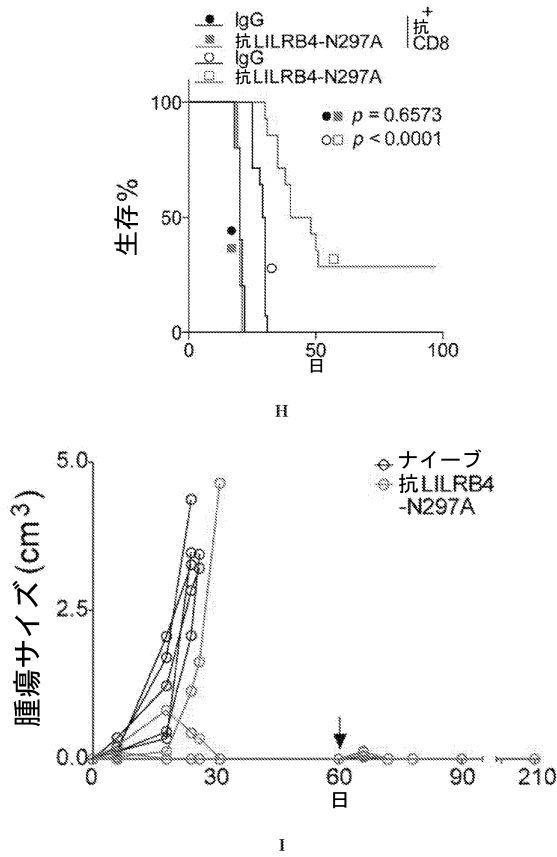
40

50

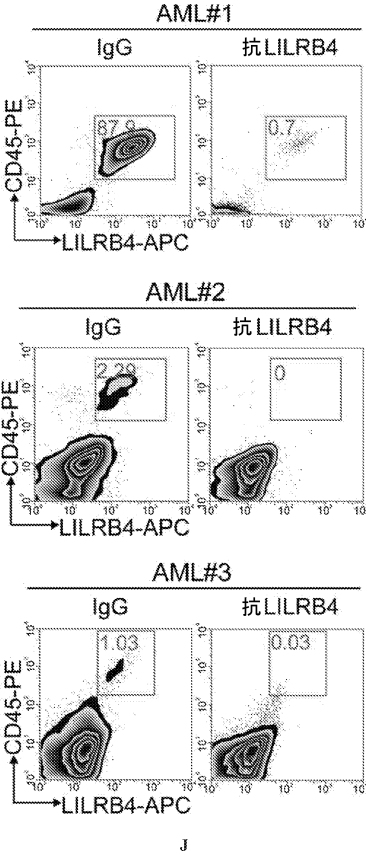
【図 2 - 3】



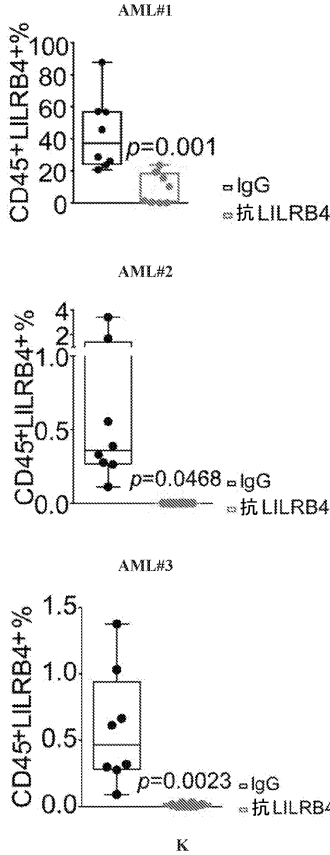
【図 2 - 4】



【図 2 - 5】



【図 2 - 6】



10

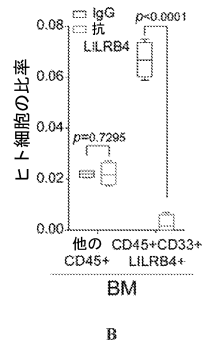
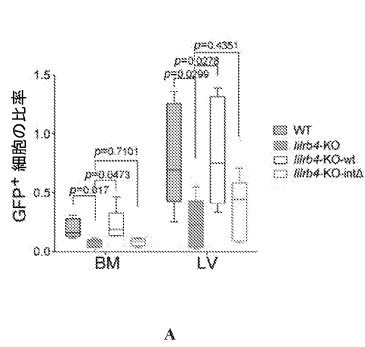
20

30

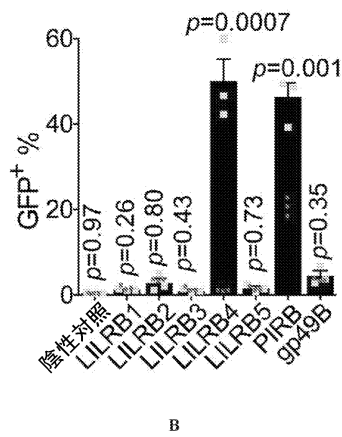
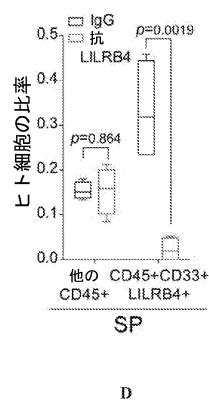
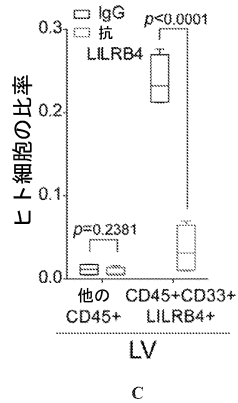
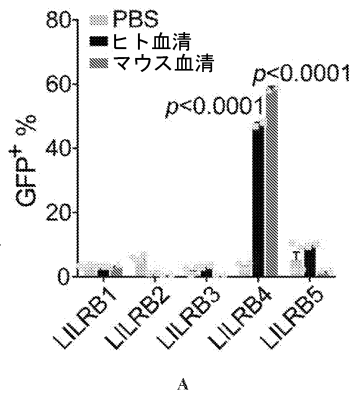
40

50

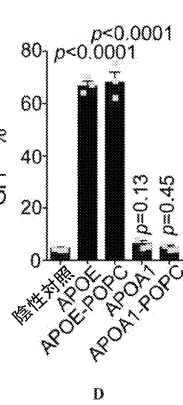
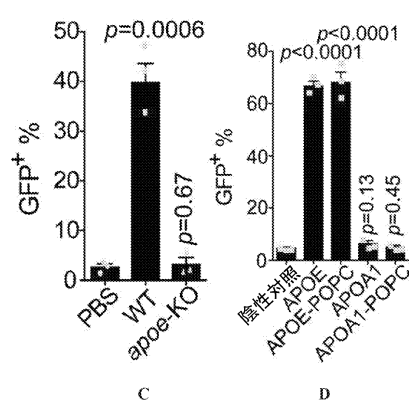
【図 3】



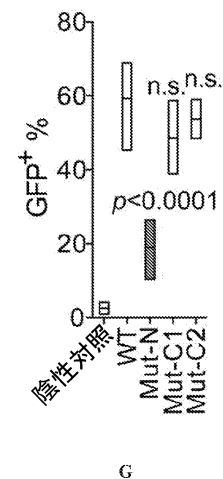
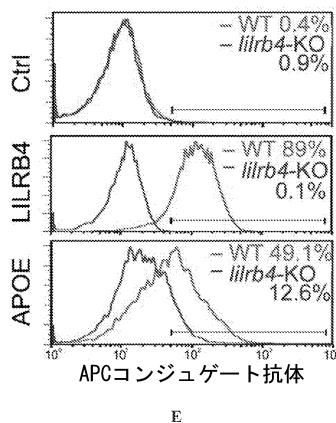
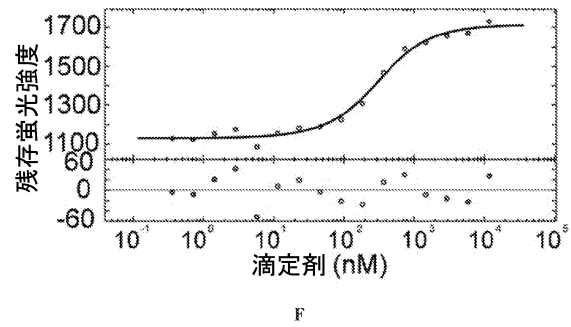
【図 4 - 1】



【図 4 - 2】



【図 4 - 3】



10

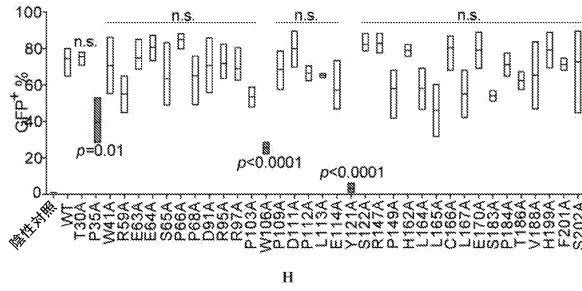
20

30

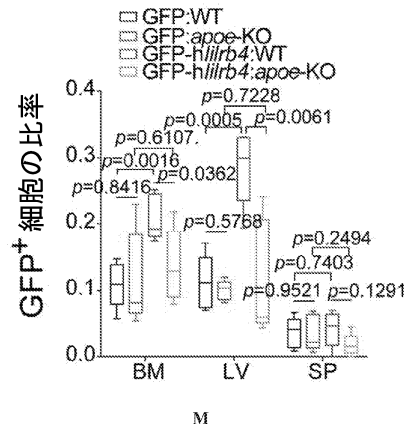
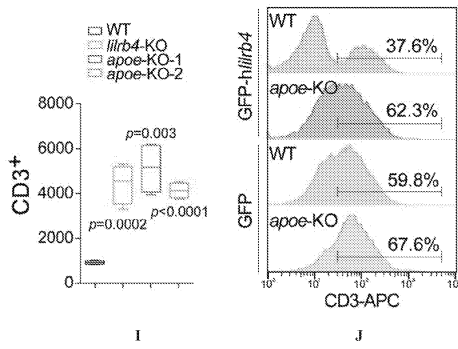
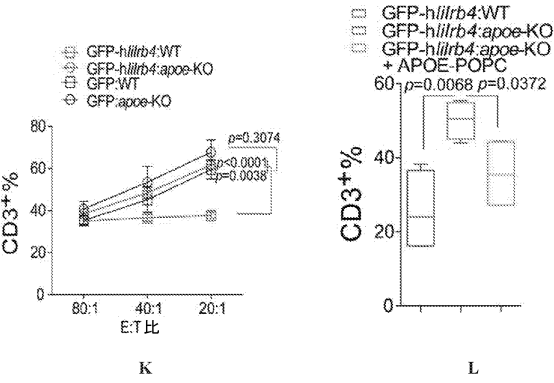
40

50

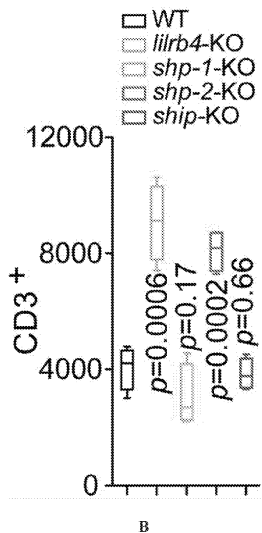
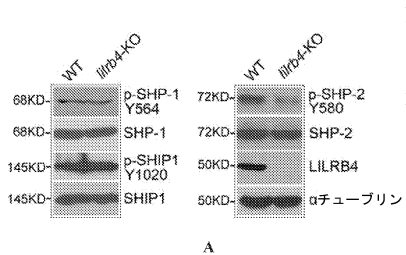
【図 4 - 4】



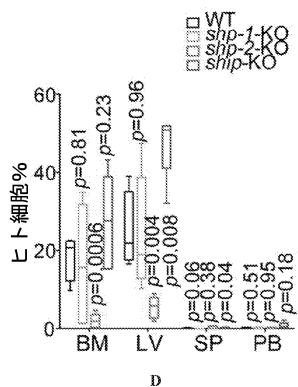
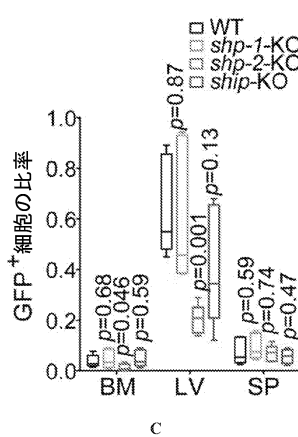
【図 4 - 5】



【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



10

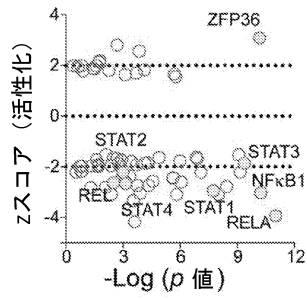
20

30

40

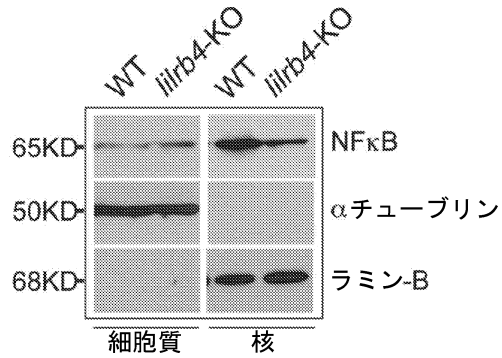
50

【図 5 - 3】

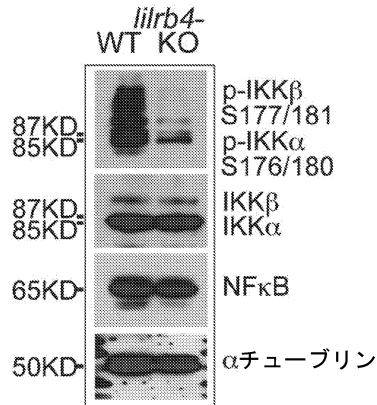


E

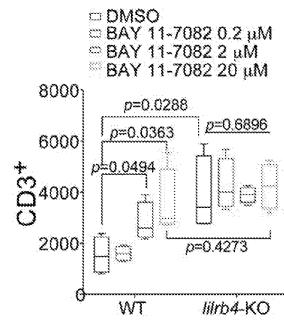
【図 5 - 4】



G

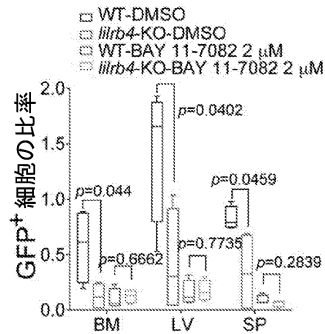


F



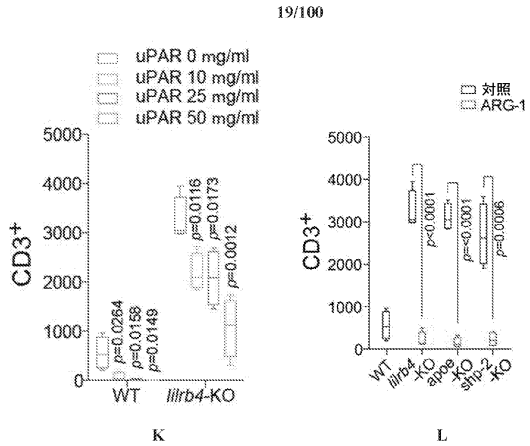
H

【図 5 - 5】



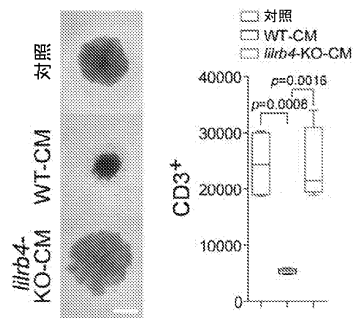
I

【図 5 - 6】

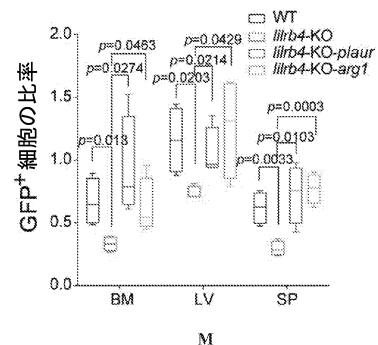


K

L



J



M

10

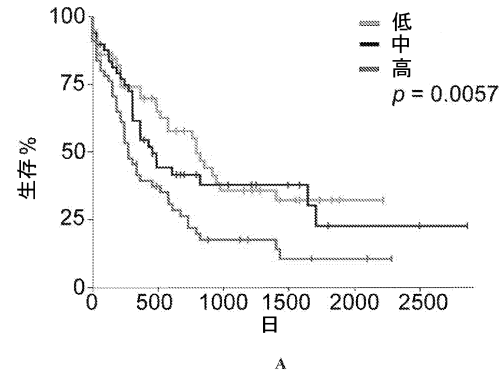
20

30

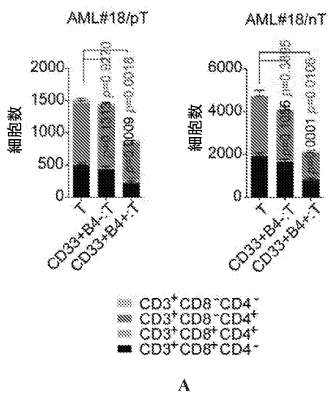
40

50

【図 6】

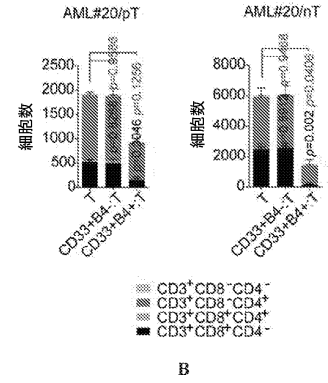


【図 7 - 1】



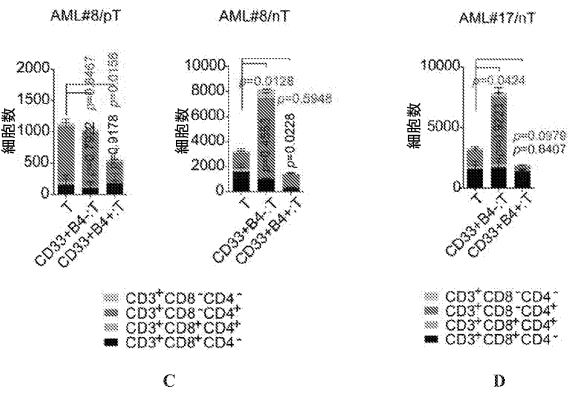
	ハザード比(95% CI)	p-値
LILRB4 (中 対 低)	1.518 (0.593, 3.887)	0.3843
LILRB4 (高 対 低)	2.339 (1.095, 4.999)	0.0283 *
年齢 (60歳以上 対 60歳未満)	3.720 (1.895, 7.302)	0.0001 *
細胞遺伝学 (異常 対 正常)	0.761 (0.375, 1.545)	0.4497
PML-RAR (変異 対 正常)	0.835 (0.451, 1.548)	0.5675

B



B

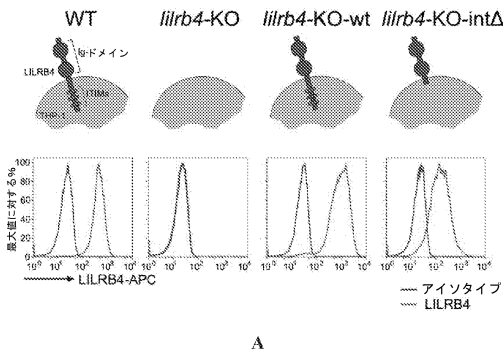
【図 7 - 2】



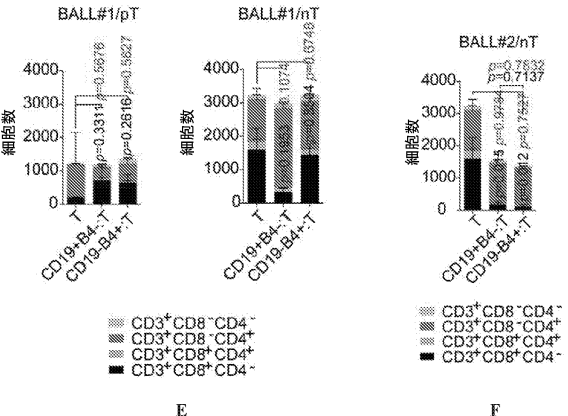
C

D

【図 8 - 1】

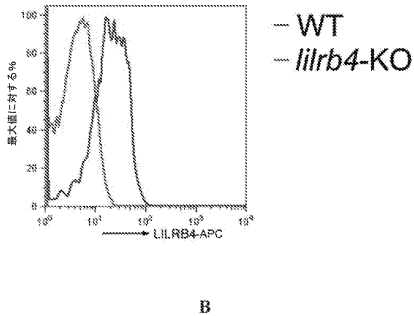


A



E

F



B

10

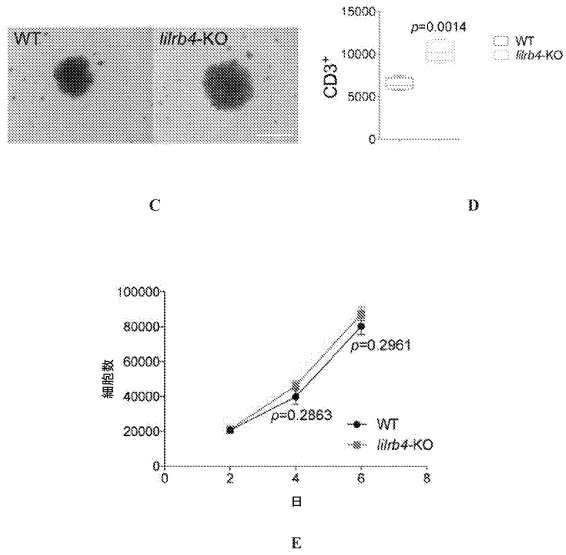
20

30

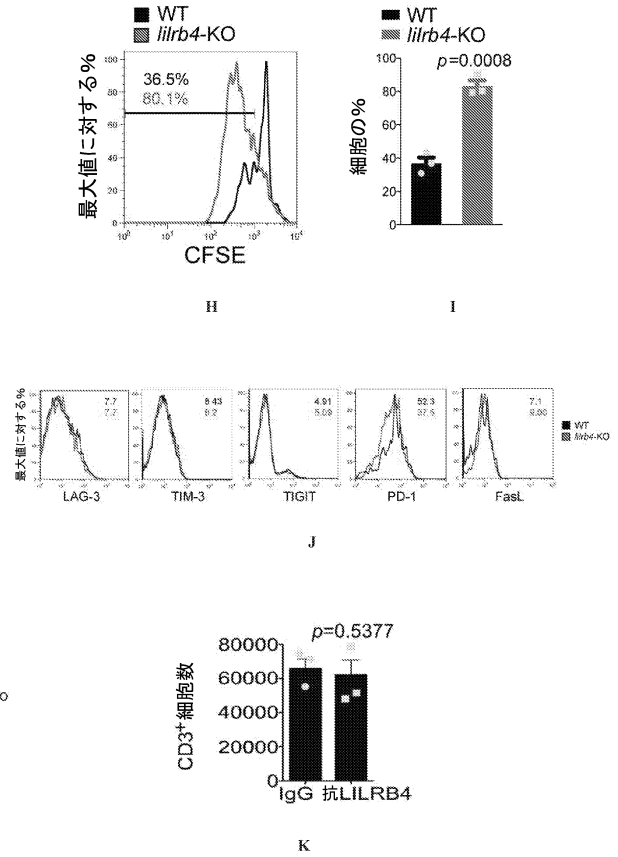
40

50

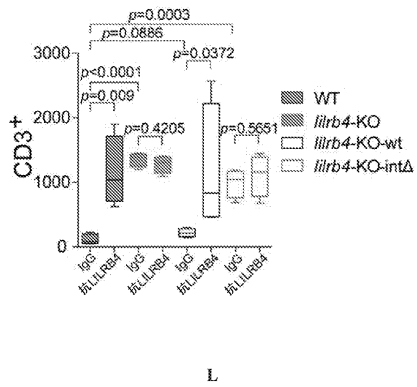
【図 8 - 2】



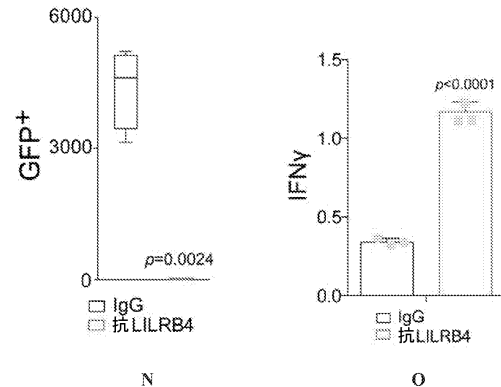
【図 8 - 3】



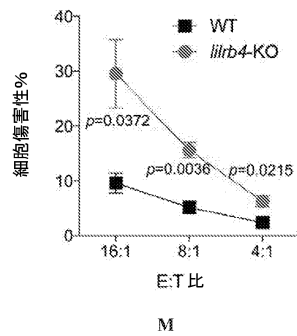
【図 8 - 4】



【図 8 - 5】



【図 8 - 6】



10

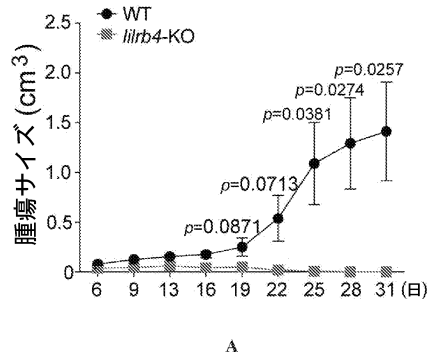
20

30

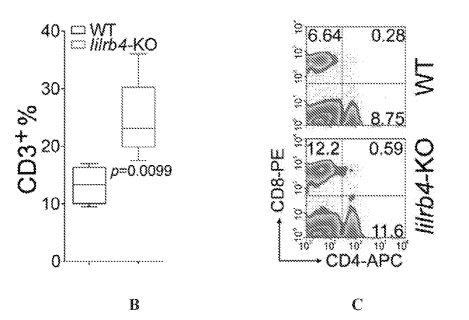
40

50

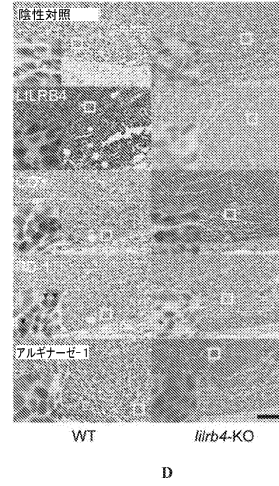
【図 9 - 1】



【図 9 - 2】

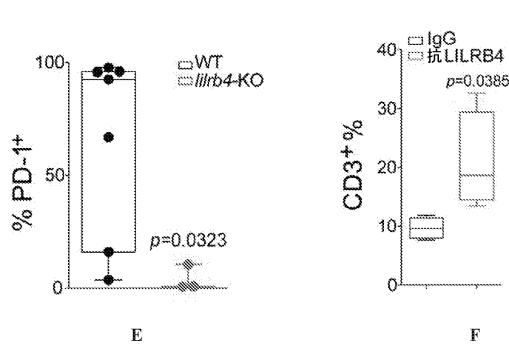


10

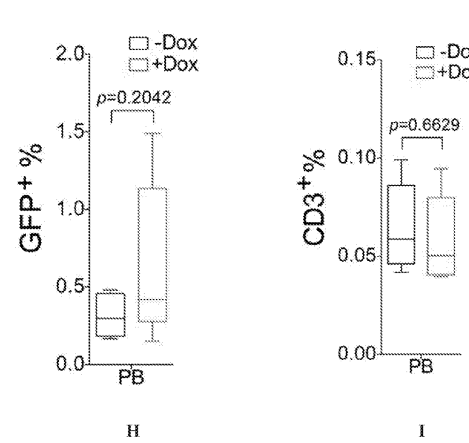


20

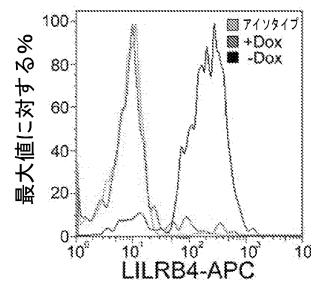
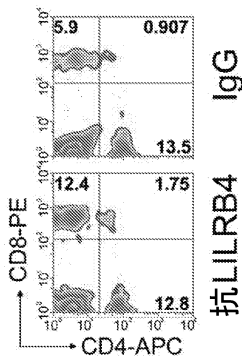
【図 9 - 3】



【図 9 - 4】



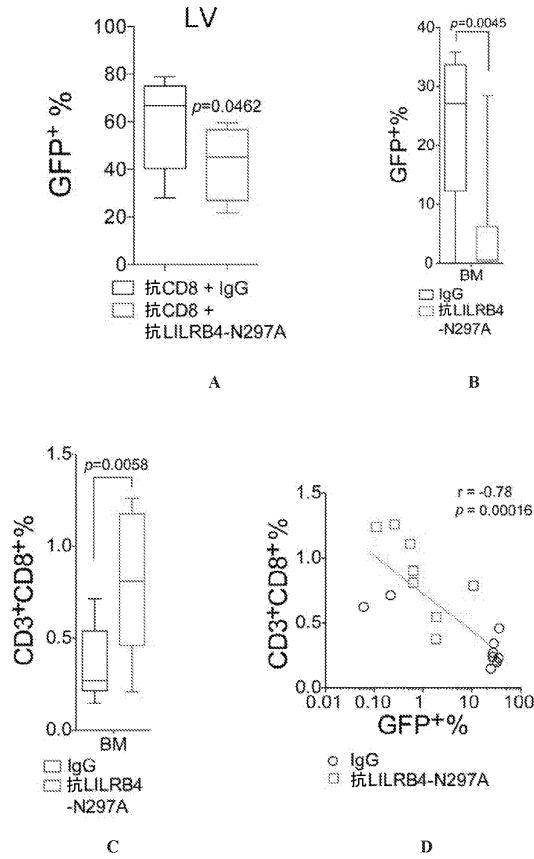
30



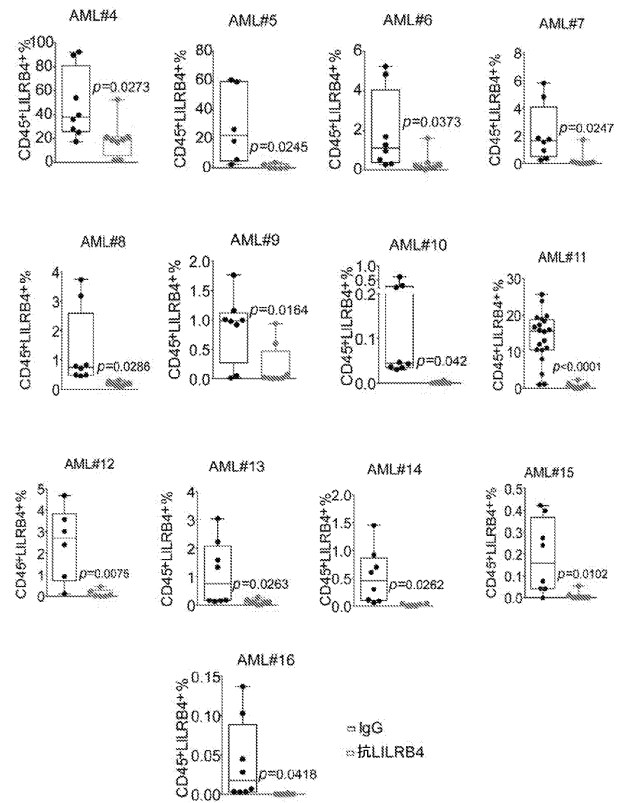
40

50

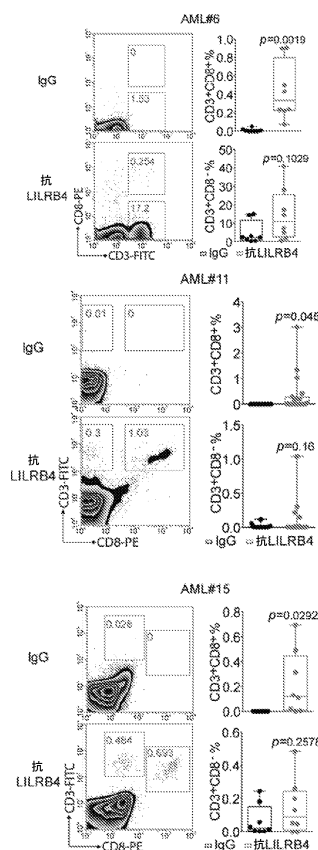
【図 10】



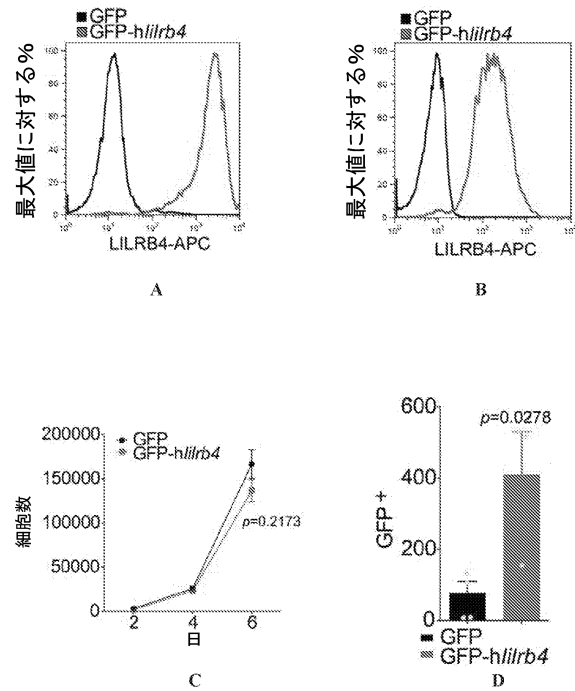
【図 11 A】



【図 11 B】



【図 12 - 1】



10

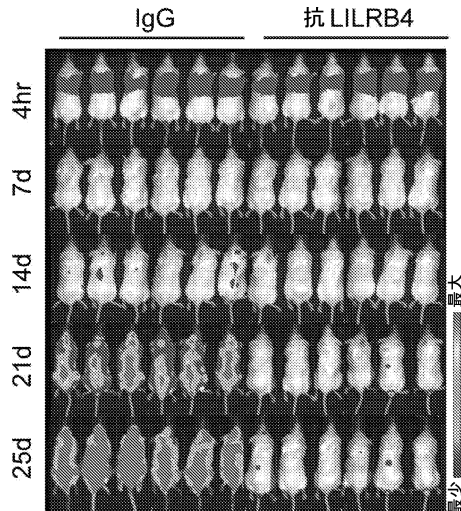
20

30

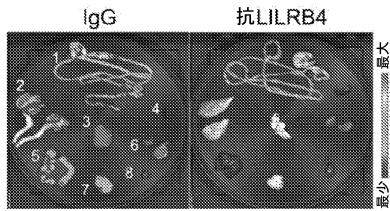
40

50

【図 1 2 - 2】



E

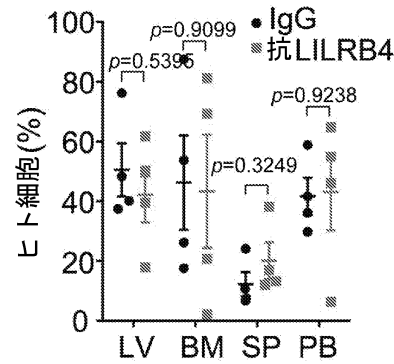


F

【図 1 2 - 3】

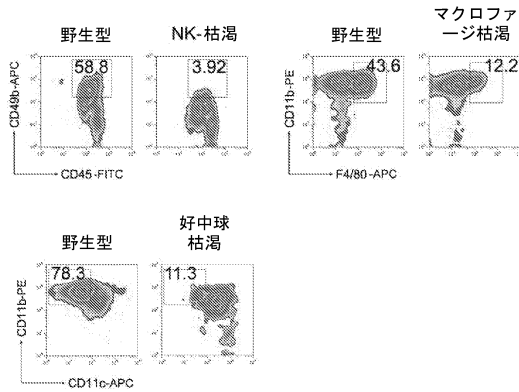


G

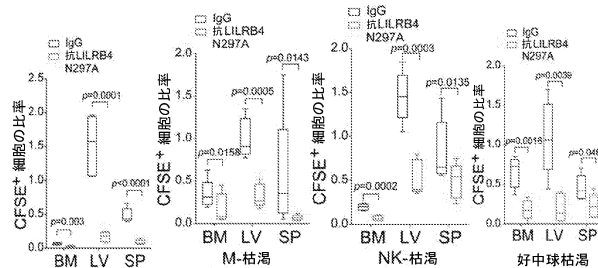


H

【図 1 2 - 4】

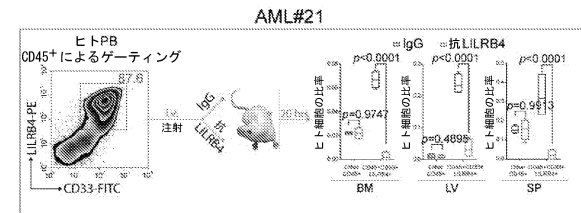


I

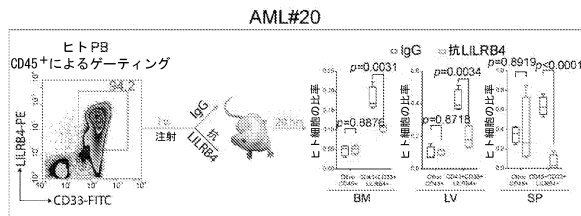


J

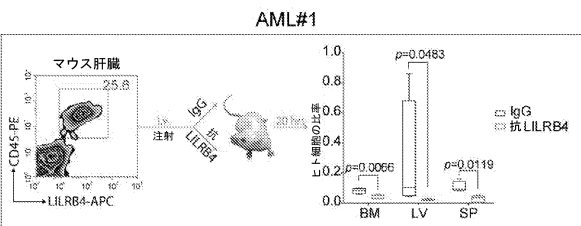
【図 1 3】



A



B



C

10

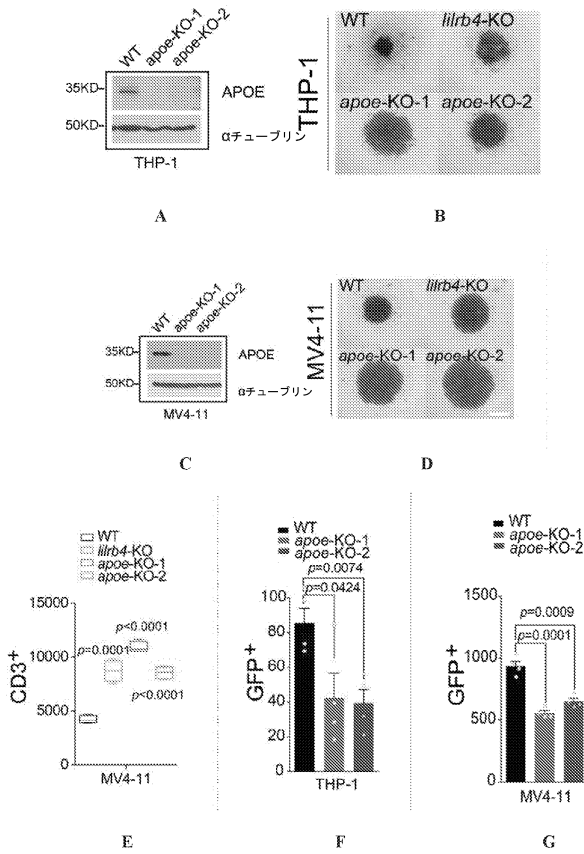
20

30

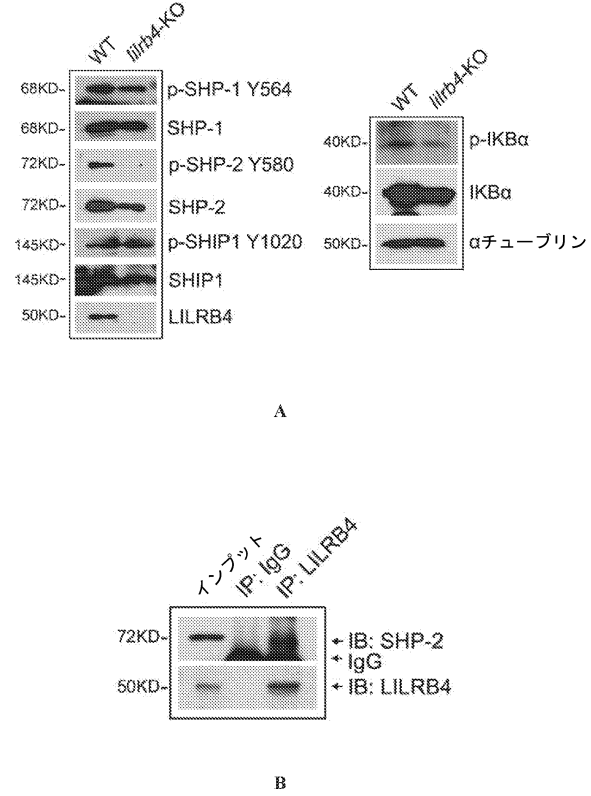
40

50

【図 1 4】



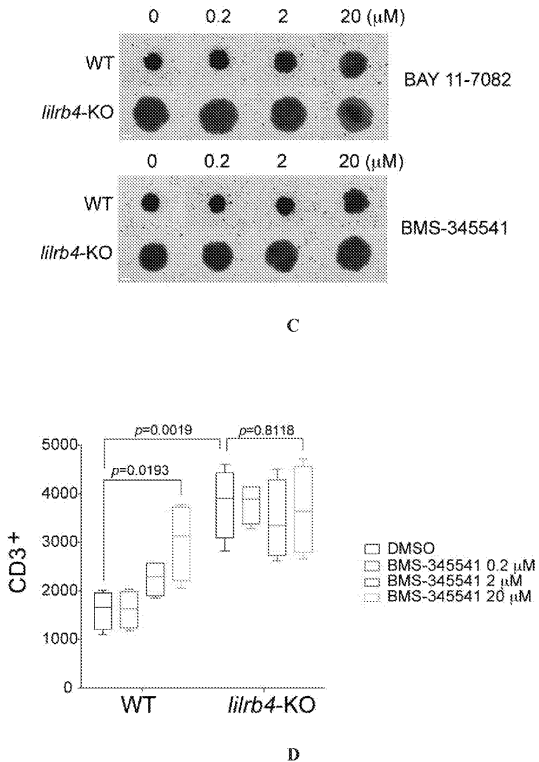
【図 1 5 - 1】



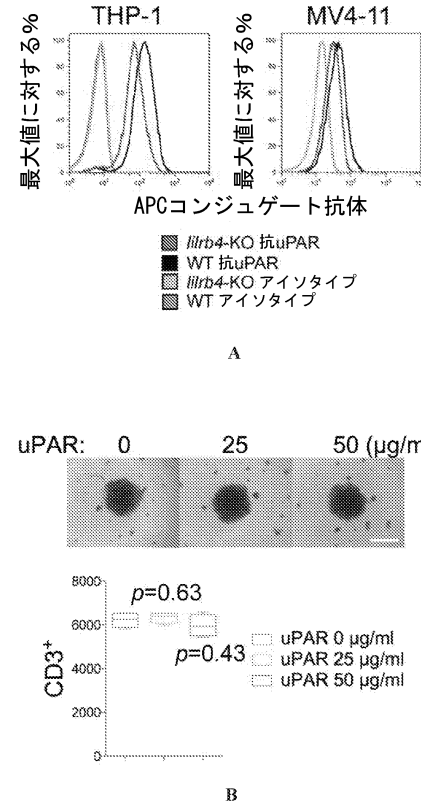
10

20

【図 1 5 - 2】



【図 1 6 - 1】

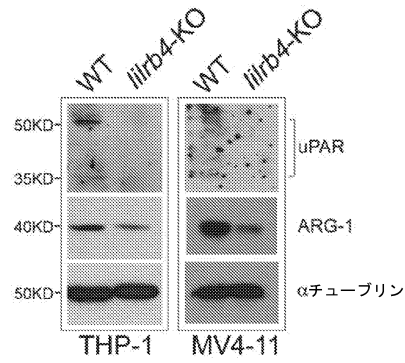


30

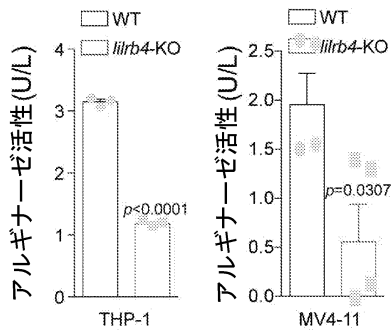
40

50

【図 16-2】

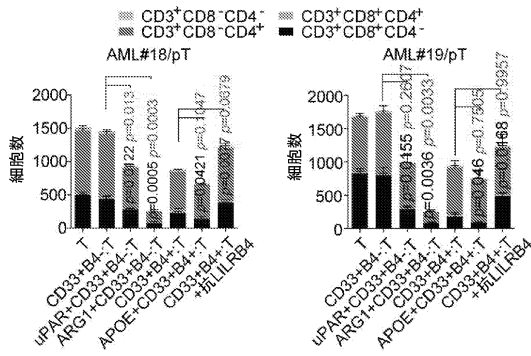


C

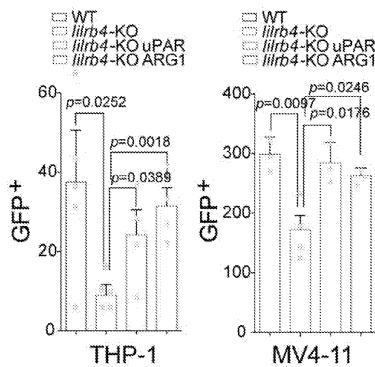


D

【図 16-4】

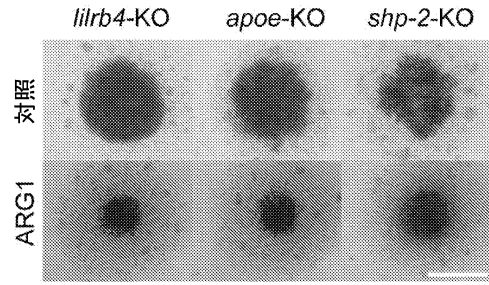


G

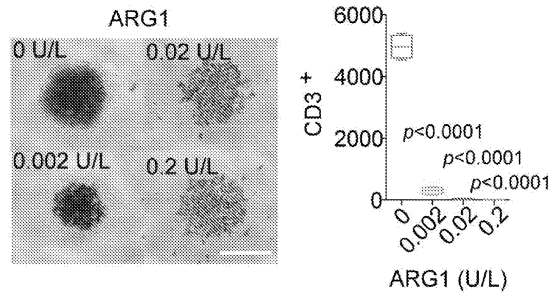


H

【図 16-3】

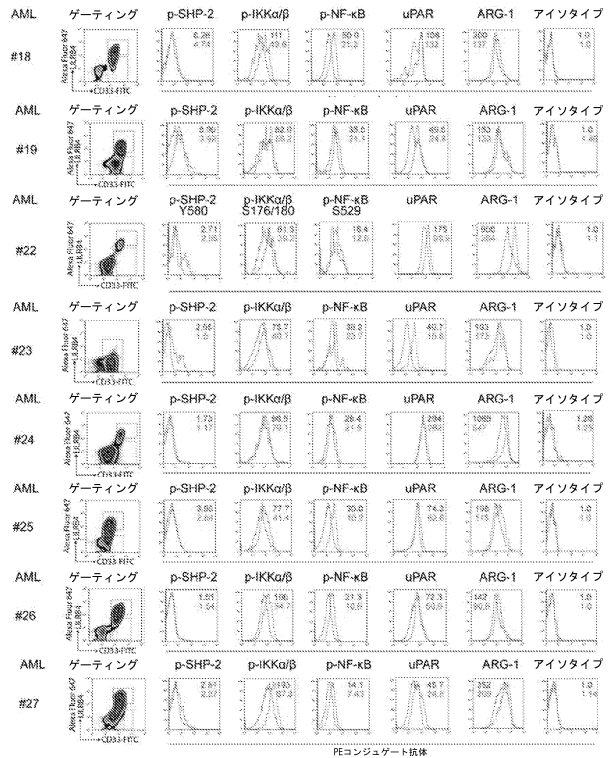


E



F

【図 17A】



10

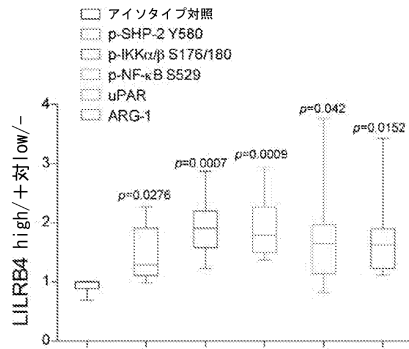
20

30

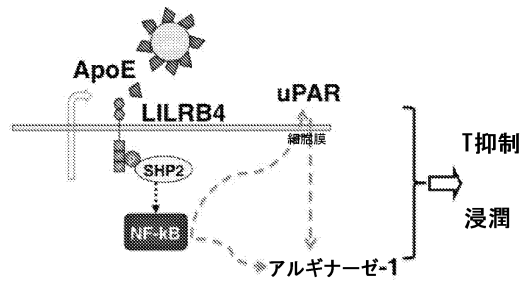
40

50

【図 17 B】

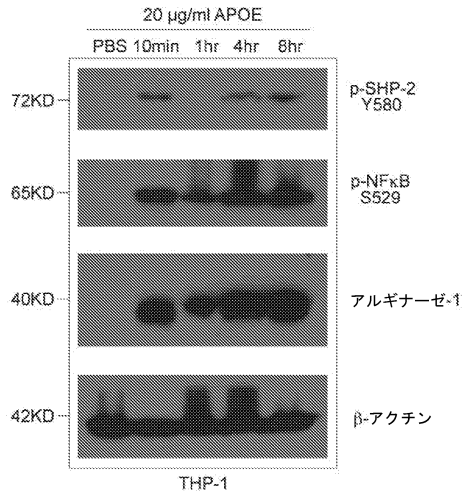


【図 18】

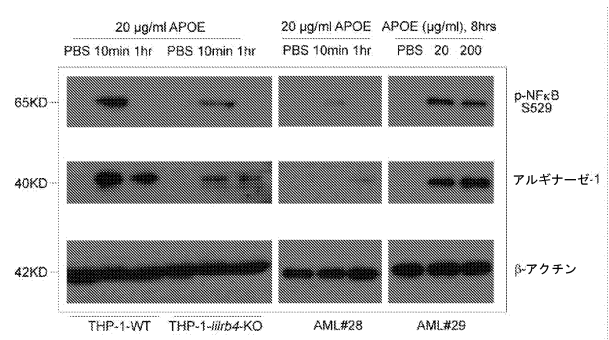


10

【図 19 A】



【図 19 B】



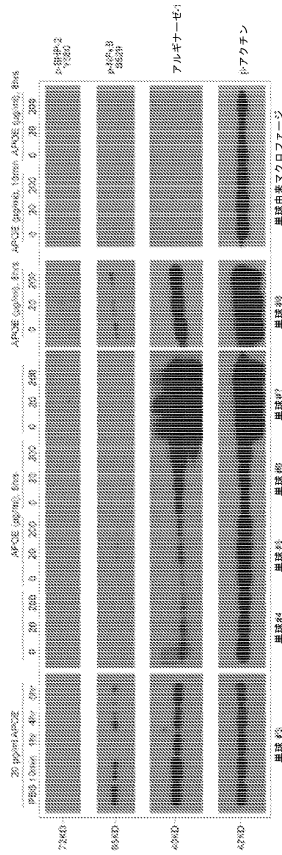
20

30

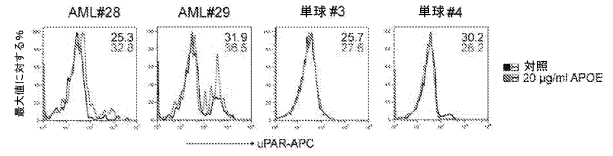
40

50

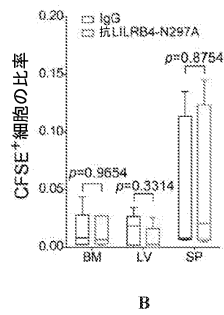
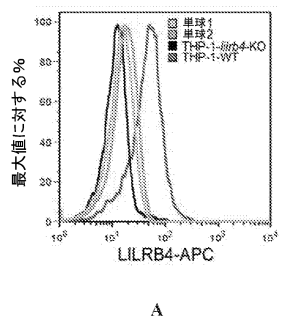
【図 19 C】



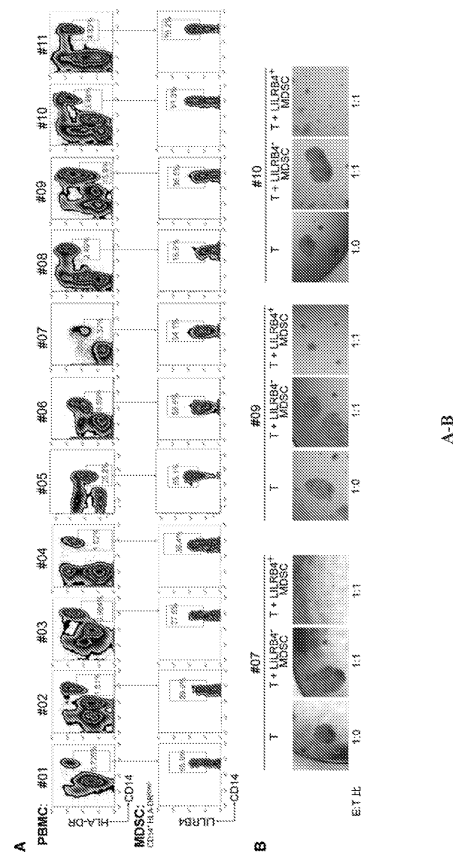
【図 19 D】



【図 20】



【図 21 - 1】



10

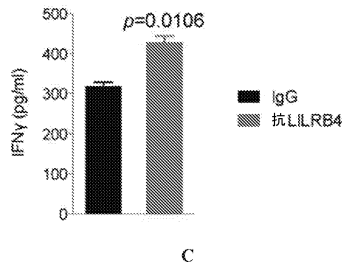
20

30

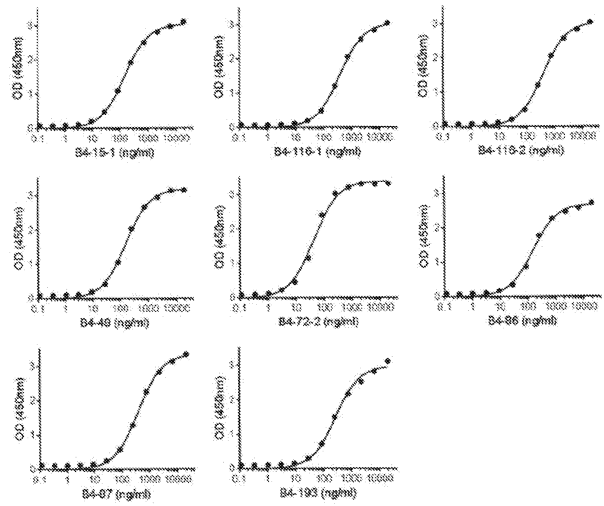
40

50

【図 2 1 - 2】

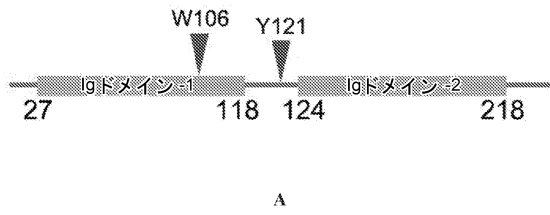


【図 2 2】

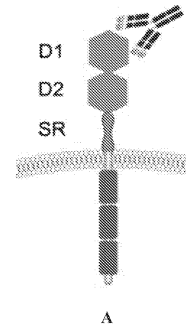


10

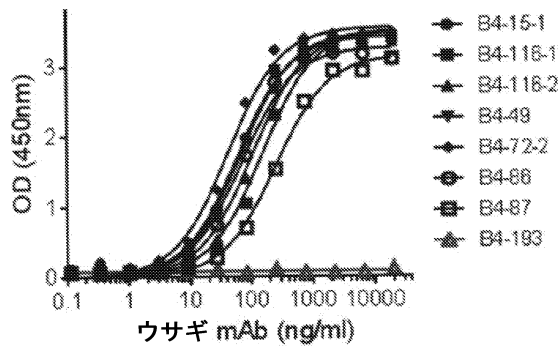
【図 2 3】



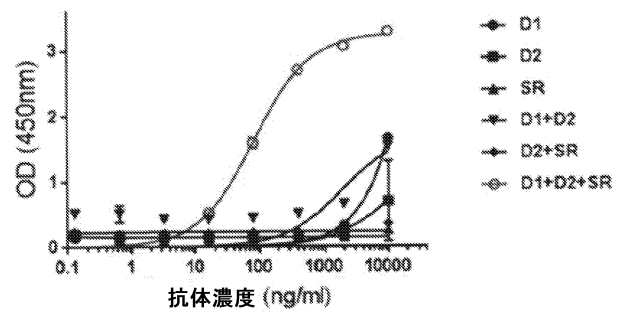
【図 2 4】



20



B

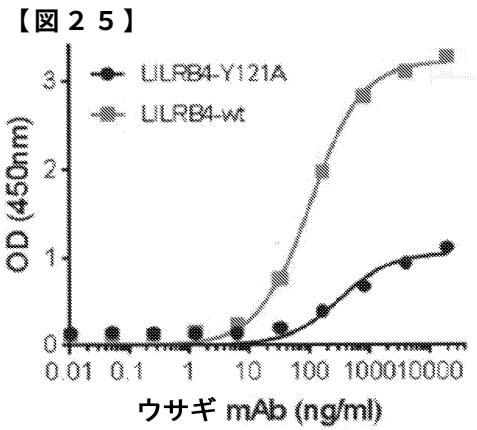


B

30

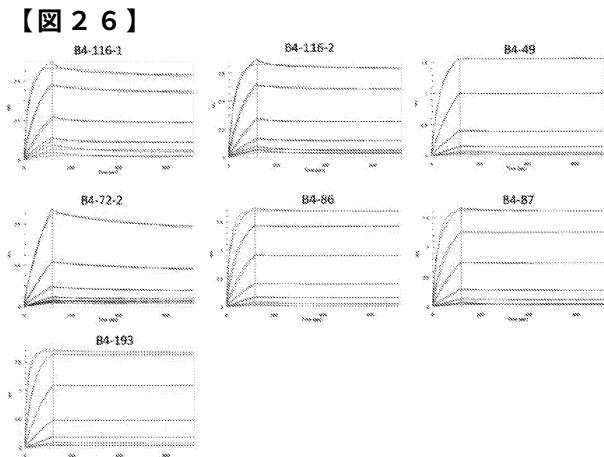
40

50



【図 2 7】

	エビトープビン							
	ビン1	ビン2	ビン3	ビン4	ビン5	ビン6	ビン7	ビン8
ペア	B4-116-1	B4-116-2	B4-49	B4-86	B4-87	B4-15-1	B4-193	B4-72-2
B4-116-1	+	+	+	+	+	-	-	+
B4-116-2	+	+	+	+	+	-	-	+
B4-49	+	+	+	+	+	+	-	+
B4-86	+	+	+	+	+	+	-	+
B4-87	+	+	+	+	+	+	-	+
B4-15-1	-	-	+	+	+	+	+	-
B4-193	-	-	-	-	+	+	+	+
B4-72-2	+	+	-	-	+	+	+	+



【図 2 8 A】

>B4-15-1-VH (SEQ ID NO: 1)

EQSLEESGGLEESGGRLVTPGTLPLTCTASGFTINSAHMSWVRQAPGKLEWIGFSTTGSPSYANWAKGRFTIS
RTSTTVLDLEITSPTIEDATYFCARDGPGNNIDMDLWGQGLTVTIS

>B4-15-2-VH (SEQ ID NO: 8)

QSVEESGGRLVTPGTLPLTCTVSGIDLTYAINWVRQAPGEGLEYIGITIGSSNTFYASWAKGRFTISKSTSTVDLKI
TSPTTEDTGTYFCASNPDShNANGVWGQGLTVTVSS

>B4-116-1-VH (SEQ ID NO: 15)

EQSVEESGGDLVKPGASLTLTCAASGFSFSTYCMCWVRQAPGKLEWIGIACIHGVSTNNRWYASWPKGRFTISK
SSTTVTLQMTSLTAADATYFCARSDTDYEWGLSLWGPGLTVTIS

>B4-116-2-VH (SEQ ID NO: 22)

EQSVEESGGDLVKPGASLTLTCAASGFSFSTYCMCWVRQAPGKLEWIGIACIHGVSTNNRWYASWPKGRFTISK
SSTTVTLQMTSLTAADATYFCARSDTDYEWGLSLWGPGLTVTIS

>B4-116-3-VH (SEQ ID NO: 29)

QSVKESGGRLVTPGTLPLTCTVSGFSLNNGMSWVRQAPGKLEWIGIIVVSGTTDYATWAKGRFTISRSTTV
DLKMTSLTTEDTATYLCARGFGVDWQEWFFDLWGPGLTVTIS

>B4-116-4-VH (SEQ ID NO: 36)

QSLEESGGRLVTPGTLPLTCTVSGFSLNNGMSWVRQAPGKLEWIGIIVVSGTTDYASWPKGRFTISRSTTV
LKMTSLTTEDTATYLCARGFGVDWQEWFFDLWGPGLTVTVSS

>B4-55-1-VH (SEQ ID NO: 43)

SSVEESGGRLVTPGTLPLTCTVSGFSLSSYAMWVRQAPGKLEWIGIIGTGTTTYATWVNGRFTISKSTSTVDL
KMTSLTTEDTATYFCVRNDVYAFNLWGQGLTVTVSS

>B4-55-2-VH (SEQ ID NO: 50)

SSVEESGGRLVTPGTLPLTCTVSGFSLSSYAMWVRQAPGKLEWIGIIGTGTTTYATWVNGRFTISKSTSTVDL
KMTSLTTEDTATYFCVRNDVYAFNLWGQGLTVTVSS

>B4-19-VH (SEQ ID NO: 57)

EQSVEESGGGLVTPGGTLTCTASGFSISTYAMWVRQAPGEGLEYIGICITGGSAFYAIWAKGRFTISRSTTVDL
KMTSLTTEDTATYFCARNDIYAFGLWGQGLTVTVSS

10

20

30

40

50

【図 2 8 B】

>B4-49-VH (SEQ ID NO: 64)

QSLEESGGDLVKPGASLTLTCTASGDFDSSSGWICWVRQAPGKGLIACIYSGRSGSTYYASWAKGRVTISKTSSTT
VTLQMTSLTAADTATYFCARALVYDYVDYIDLWGPGLTVTVSS

>B4-72-1-VH (SEQ ID NO: 71)

EQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYYMSWVRQAPGRGLEIYIGVINTGSGSAVYATWTKGRFTISRSTTVSD
LKMTGLTTEDTATYFCARGWSRGDLWGQGLTVTISS

>B4-72-2-VH (SEQ ID NO: 78)

EQSVEESGGRLVTPGTPLTLTCTASGFSLSYYMSWVRQAPGRGLEIYIGVINTGSGSAVYATWTKGRFTISRSTTVSD
LKMTGLTTEDTATYFCARGWSRGDLWGQGLTVTISS

>B4-86-VH (SEQ ID NO: 85)

EQSVESGGDLVKPEGSLLTCTVSGFSFSSSYWICWVRQAPGKGLEWIGICTGSGSTYYGWSWAKGRFTISKTSSTT
VTLQMTSLTAADTATYFCVRGAGYSYRLWGPGLTVTISS

>B4-87-VH (SEQ ID NO: 92)

QSVKESGGDLVKPGASLTLTCTASGFSFISTYWICWVRQAPGKGLIACIYTGSGSTYYASWAKGRFTISKTSSTT
VTLQNLSLTAADTATYFCARALVYDYVDYIDLWGPGLTVTVSS

>B4-193-VH (SEQ ID NO: 99)

EQSVEESGGDLVKPGTSLTLTCKMSGFSLSSSYWICWVRQAPGKGLEWIGIDSGSVGITYYATWAKGRFTISRSTS
LNTVTLQMTSLTGADTAMYFSVRHGDNWALDLWGQGLTVTISS

>h193-VH1 (SEQ ID NO: 223)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYWICWVRQAPGKGLEWIGSIDSGSVGITYYATWAKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGDNWALDLWGQGLTVTVSS

>h193-VH2 (SEQ ID NO: 225)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYWICWVRQAPGKGLEWVSSIDSGSVGITYYATWAKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGDNWALDLWGQGLTVTVSS

>h193-VH3 (SEQ ID NO: 226)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYWISWVRQAPGKGLEWIGSIDSGSVGITYYATWAKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGDNWALDLWGQGLTVTVSS

【図 2 8 C】

>h193-VH4 (SEQ ID NO: 228)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYWISWVRQAPGKGLEWVSSIDSGSVGITYYATWAKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGDNWALDLWGQGLTVTVSS

>h193-VH5 (SEQ ID NO: 229)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYWISWVRQAPGKGLEWIGSIDSGSVGITYYATWAKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGDNWALDLWGQGLTVTVSS

>h193-VH6 (SEQ ID NO: 230)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYWISWVRQAPGKGLEWIGSIDSGSVGITYYATWAKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGDNWALDLWGQGLTVTVSS

>h193-VH7 (SEQ ID NO: 231)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSYYWISWVRQAPGKGLEWIGSIDSGSVGITYYATWAKGRFTISRDN
SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGDNWALDLWGQGLTVTVSS

10

20

【図 2 9 A】

>B4-15-1-VH (SEQ ID NO: 106)

GAGCAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGTCTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCT
GACACTCACTGCACAGCTCTGGATTACCATCAATAGCGCCACATGTCTTGGGTCGCCAGGCTCCAGGG
AAGGGGCTGGAATGGATCGGATTAGTACTACTGGTGGTCCCTCATATTACGCGAACTGGGCAAAAGGCCGA
TTCACCATCTCCAGAACCTCGACACCGGTGGATCTGGAGATCACCAAGTCCGACAATCGAGGACACGGCCACCT
ATTTCTGTGCCAGAGATGGTCTGTAATAATATTGATATGAGTCTGTGGGCCCAAGGCACCTGGTCACCAT
CACCTCA

>B4-15-2-VH (SEQ ID NO: 113)

CAGTCGGTGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACTGCACAGTCTCT
GGAATCGACCTCACTAATATGCAATAAAGTGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAATACATCGGA
ACCAATTAGTGGTAGTAACACATTCTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAACCTCGA
CCACGGTGGATCGAAAAATCACCAAGTCCGACAACCTGAGGACACGGGCACCTATTTCTGTGCCAGTAATCCTGA
TAGTCACAACGCTAATGCGCTGTGGGGCCAAAGGCACCTGGTCACCGTCTCCTCA

>B4-116-1-VH (SEQ ID NO: 120)

GAGCAGTCGGTGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCTGACACTCACTGCGCAGC
CTCTGGATTCTCCTCAGTAGCACCTACTGCATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGG
ATCGCATGCAATCATGGTGTAAAGTACTAATAATAGATGGTACGCGAGCTGGCCGAAAGGCCGATTACCATCT
CCAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAAATGACCAAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTACTTCTG
TGCGAGAAGTGACACTGACTATGAGTGGGGTCTTTCTTGTGGGGCCAGGCACCTGGTCACCATCTCTTCA

>B4-116-2-VH (SEQ ID NO: 127)

GAGCAGTCGGTGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCTGACACTCACTGCGCAGC
CTCTGGATTCTCCTCAGTAGCACCTACTGCATGTGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGCTGGAGTGG
ATCGCATGCAATCATGGTGTAAAGTACTAATAATAGATGGTACGCGAGCTGGCCGAAAGGCCGATTACCATCT
CCAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAAATGACCAAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTACTTCTG
TGCGAGAAGTGACACTGACTATGAGTGGGGTCTTTCTTGTGGGGCCAGGCACCTGGTCACCATCTCTTCA

>B4-116-3-VH (SEQ ID NO: 134)

CAGTCGGTGGAAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACTGCACCGTCTCT
GGATTCTCCCTCAGTAAACATGGAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGG
AATCATTTATGTGGGAGTGGTACCAAGACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCT
TCGACCACGGTGGATCTGAAAAATGACCAAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTATGTGCGAGAGGT
TTGGTGTGGGGATTGGCAAGAATGGTTTTTGTATCTCTGGGGCCAGGCACCTGGTCACCATCTCTTCA

【図 2 9 B】

>B4-116-4-VH (SEQ ID NO: 141)

CAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACTGCACCGTCTCTG
GATTCTCCCTCAGTAACAATGGAATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAAGGGGCTGGAGTGGATCGGA
ATCATTTATGTTGGGAGTGGTACCACAGACTACGCGAGCTGGCCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCT
CGACCACGGTGGATCTGAAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTATGTGCCAGAGGTTT
TGGTGTTGGGGATTGGCAAGATGGTTTTTGTATCTCTGGGGCCAGGCACCTGGTCACCGTCTCTTCT

>B4-55-1-VH (SEQ ID NO: 148)

AGCAGTTCGGTGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACTGCACAGTC
TCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATC
GGAATCATTTGGTACTGTTACCAACACATACTACGCGACCTGGGTGAATGGTGCATTACCATCTCCAAACCT
CGACCACGGTGGACCTGAAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGTCAGAAATG
ATGTTATTGGGCGTTTAATTTGTGGGGCCAAAGGCACCTGGTCACCGTCTCTTCA

>B4-55-2-VH (SEQ ID NO: 155)

AGCAGTTCGGTGAGGAGTCCGGGGTCCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACTGCACAGTC
TCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTATGCAATGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATC
GGAATCATTTGGTACTGTTACCAACACATACTACGCGACCTGGGTGAATGGTGCATTACCATCTCCAAACCT
CGACCACGGTGGACCTGAAAAATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACCTATTTCTGTGTCAGAAATG
ATGTTATTGGGCGTTTAATTTGTGGGGCCAAAGGCACCTGGTCACCGTCTCTTCA

>B4-19-VH (SEQ ID NO: 162)

GAGCAGTCGGTGAGGAGTCCGGGAGGAGCCTGGTAACGCCTGGAGGAACCTGACACTCACTGACAGC
CTCTGGATTCTCCATCAGTACCTATGCAATGATCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGGAGGGGCTGGAATACATC
GGATGCAATGGTACTGGTGGTAGCGATTCTACGCGATCTGGGCAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCT
CGACCACGGTGGATCTGAAGATGACCAGTCTGACAACCGAGGACACGGCCACATATTTCTGTGCCAGAAATG
ATATTTATTGGGCGTTTGCCATTGTTGGGGCCAAAGGCACGCTGGTCACCGTCTCTTCA

>B4-49-VH (SEQ ID NO: 169)

GAGCAGTCGTTGGAGGAGTCCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGGCATCCTGACACTCACTGCACAGCC
TCTGGATTGCACTTTAGTAGTAGTGGTTGGATATGTTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGAAGTGGATTG
ATCGCATGCAATTTATAGTGTGCGAGTGGTAGCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGAGTCAACATCT
CCAAAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAGATGACCAAGTCTGACAGCCGCGGACACGGCCACCTATTTCTG
TGCGAGAGCCCTCTATGTTGATTATGTTGATTATAGATTGTTGGGGCCAGGCACCTGGTCACCG
TCTCTCA

30

40

50

【図 2 9 C】

>B4-72-1-VH (SEQ ID NO: 176)

GAGCAGTCGGTGGAGGAGTCGGGGGTCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGCC
TCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGACTGGAATACATCG
GAGTCATTAACTAGTGGTAGCGCAGTCTACGCGACCTGGACAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTC
GACCACGGTGGATCTGAAAATGACCGTCTGACAACCGAGGACACGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGATG
GAGTAGGGGTGACTGTGGGGCCAAGGCACCTGGTCACCATCTCCTCA

>B4-72-2-VH (SEQ ID NO: 183)

GAGCAGTCGGTGGAGGAGTCGGGGGTCGCTGGTCACGCCTGGGACACCCCTGACACTCACCTGCACAGCC
TCTGGATTCTCCCTCAGTAGCTACTACATGAGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAGGGGACTGGAATACATCG
GAGTCATTAACTAGTGGTAGCGCAGTCTACGCGACCTGGACAAAAGGCCGATTACCATCTCCAGAACCTC
GACCACGGTGGATCTGAAAATGACCGTCTGACAACCGAGGACACGCCACCTATTCTGTGCCAGAGGATG
GAGTAGGGGTGACTGTGGGGCCAAGGCACCTGGTCACCATCTCCTCA

>B4-86-VH (SEQ ID NO: 190)

GAGCAGTCGGTGGAGGAGTCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGAGGGATCCCTGACACTCACCTGCACAGTCT
GGATTCTCCTCAGTAGCAGCTACTGGATATGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATC
GGATGCATTGGTACTGGTAGTGGTACTTACTACGGGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCAAA
ACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAAATGACCAGTCTGACAGCCGCGACACGGCCACCTATTCTGTGTGA
GAGGGGCTGGTTATAGTCTTATAGTTGTGGGGGCCAGGCACCCCTGGTCACCATCTCCTCA

>B4-87-VH (SEQ ID NO: 197)

CAGTCGGTGAAGGAGTCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGCGATCCCTGACACTCACCTGCACAGCCTCT
GGATTCTCCTCATTAGCAGCTACTGGATATGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGGCTGGAATGGATC
GCATGCATTATACTGGTGGTAGTGGTAGCACTTACTACGCGAGCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCTCCA
AAACCTCGTCGACCACGGTGACTCTGCAACTGAACAGTCTGACAGCCGCGACACGGCCACCTATTCTGTGC
GAGAGCCCTCTATGTTGATTATGTTGATTATAGATTATAGATTGTGGGGCCAGGCACCCCTGGTCACCGTCT
CCTCA

>B4-193-VH (SEQ ID NO: 204)

GAGCAGTCGGTGGAGGAGTCGGGGGAGACCTGGTCAAGCCTGGGACATCCCTGACACTCACTTGTAATAATG
TCTGGATTCTCCCTCAGTAGCAGCTATTGGATATGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGGAATGG
ATCGGATGCATCGATAGTGGTAGTGTGGTATCACTTACTACGCGACCTGGGCGAAAGGCCGATTACCATCT
CCAGAAGCACCAGCCTAAACACGGTGACTCTGCAAAATGACCAGTCTGACAGCGCGGACACGGCCATGTATT
TCTCTGTGAGGATGTGTGATAATTGGGCTTGGATTGTGGGGCCAGGCACCCCTGGTCACCATCTCCTCA

【図 3 0 A】

>B4-15-1-VK (SEQ ID NO: 5)

ELDLTQTPASVSEPVGGTGTIKCQASQNRGGSIAWYQQKPGQPPKLLIYASTLASGVPSPRFSGSGYTEFTLTISGV
QCADAGTYQCSTIYISDIGAFGGGTEVVVK

>B4-15-2-VK (SEQ ID NO: 12)

ELVMTQTPASVSEPVGGTGTIKCQASQSVYDNNLAWYQQKPGQPPKLLIYASTLASGVPSPRFSGSGYTEFTLTIS
GVCEADAATYYCQSYGITNKNNNYNSFGGGTEVVVK

>B4-116-1-VK (SEQ ID NO: 19)

ELDLTQTPASVSEPVGGTGTIKCQASESIGSRILAWYQQKPGQRPKLLIYKASTLASGVPSPRFSGSGYTEFTLTISDL
CADVAAYYCQAGQSSTWAFGGGTEVEIK

>B4-116-2-VK (SEQ ID NO: 26)

ELVMTQTPASVEAVVGGTGTIKCQASESIGSRILAWYQQKPGQRPKLLIYKASTLASGVPSPRFSGSGYTEFTLTISDL
ECADVAAYYCQAGQSSTWAFGGGTEVVVK

>B4-116-3-VK (SEQ ID NO: 33)

ELVMTQTPASVSEPVGGTGTIKCQASESINYLWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKSGSGYTEFTLTISDL
CADAATYYCQAYWGTSTMAFGGGTEVEIN

>B4-116-4-VK (SEQ ID NO: 40)

ELVMTQTPASVSEPVGGTGTIKCQASESINYLWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVSSRFKSGSGYTEFTLTISDL
CADAATYYCQAYWGTSTMAFGGGTEVEIN

>B4-55-1-VK (SEQ ID NO: 47)

ELVMTQTPAPVSAAVGGTGTINCCQASQSVNNNLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVPSPRFKSGSGAQFTL
TISGVQCDDAATYYCQGGYYIGISDYPFGGGTEVVVK

>B4-55-2-VK (SEQ ID NO: 54)

ELDLTQTPSSVSAVGGTGTIVISCCSQSVVNNNLSWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVPSPRFKSGSGAQFTLI
SGVQCDDAATYYCQGGYYIGISDYPFGGGTEVEIK

>B4-19-VK (SEQ ID NO: 61)

ELDLTQTPASVSEPVGGTGTINCCQASEGIRNWLAWYQQKPGQPPKLLIYGASTLESQVSPSRFKSGSGYTEFTLTIRG
VQCDDAATYYCQGGVYSSIIYGYPFGGGTELEIK

【図 3 0 B】

>B4-49-VK (SEQ ID NO: 68)

ELDLTQTPASVEAAVGGTGTIKCQASQSTGIRLAWYQQKPGQPPKLLIYATSNLASGVSSRFKSGSGYTEFTLTISD
LECADAATYYCQSYYSYGVDFGGGTEVEIK

>B4-72-1-VK (SEQ ID NO: 75)

ELDLTQTPASVSEPVGGTGTIKCQASESVDNWLAWYQQKPGQPPKLLIYDASKLASGVPDRFSGSGGTQFTLTISG
VQCDDAATYYCLGVFHDGINNAFGGGTEVEIK

>B4-72-2-VK (SEQ ID NO: 82)

ELDMTQTPSPVSAAVGGTGTIKCQSSQNVYDDTLWYQQKPGQPPKLLIYDASKLASGVPDRFSGSGGTQFTLT
ISGVQCDDAATYYCLGVFHDGINNAFGGGTEVEIK

>B4-86-VK (SEQ ID NO: 89)

ELDMTQTPASVSEPVGGTGTIKCQASESVSNLAWYQQKPGQRPKLLIYGASTLESQVSPRFSGSGYTEFTLTISN
LECADAATYYCQGYDWDNIDNAFGGGTEVVVK

>B4-87-VK (SEQ ID NO: 96)

ELDLTQTPASVEAAVGGTGTIKCQASENIGSRILAWYQQKPGQPPKLLIYAASNLASGVSSRFKSGRGTQFTLTISDL
ECADAAIYYCQCSYYGSTVYFGGGTEVEIK

>B4-193-VK (SEQ ID NO: 103)

ELVLTQTPASVSEPVGGTGTIKCQASQINSWLAWYQQKPGQPPKLLIYKASTLASGVPSPRFSASGSGYTEFTLTITGV
QCDDAATYYCQHGYIRGDLDNVFGGGTEVVVK

>h193-VK1 (SEQ ID NO: 232)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCQASQINSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSPRFSGSGYTEFTLTISL
QPDDFATYYCQHGYIRGDLDNVFGGGTKVEIK

>h193-VK2 (SEQ ID NO: 235)

DLVMTQSPSTLSASVGDRTVITCQASQINSWLAWYQQKPGKPPKLLIYKASTLASGVSSRFSGSGYTEFTLTISL
QPDDVATYYCQHGYIRGDLDNVFGGGTKVEIK

>h193-VK3 (SEQ ID NO: 236)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQINSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSPRFSGSGYTEFTLTISL
QPDDFATYYCQHGYIRGDLDNVFGGGTKVEIK

【図 3 0 C】

>h193-VK4 (SEQ ID NO: 237)

DIQMTQSPSTLSASVGDRTVITCRASQINSWLAWYQQKPGKAPKLLIYKASTLASGVPSPRFSGSGYTEFTLTISL
QPDDAATYYCQHGYIRGDLDNVFGGGTKVEIK

10

20

30

40

50

【図 3 1 A】

>B4-15-1-VK (SEQ ID NO: 110)

GAGCTCGATCTGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTCAGAATAGGGGCGGTAGCATAGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATC
TATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTACAGCGGCAGTGGATATGGACAGAGTTCACTC
TCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGCCAATTACTATTATAGTATAAGTAT
ATTGGGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA

>B4-15-2-VK (SEQ ID NO: 117)

GAGCTCGTGATGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGTGAG
GCCAGTCAGAGTGTATTAGTAACTAGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATC
TCTATTCTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTACAGCGGCAGTGGATATGGACAGAGTTCACTC
TCTCACCATCAGCGGCGTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTATTGTCAAAGCTATGGTATTACTAATAAGA
ATAATTATAATAGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA

>B4-116-1-VK (SEQ ID NO: 124)

GAGCTCGATCTGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAGCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTCAGAGCATTGGTAGTAGATTAGCTGGTATCAACAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATC
TACAAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTACAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTC
TCACCGTCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGTTGCCGTTACTATTGTCAATGCGCTGGTCAGAGTAGTACTTG
GGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA

>B4-116-2-VK (SEQ ID NO: 131)

GAGCTCGTGATGACCCAGACACACGCCTCCGTGGAGGCAGTTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTCAGAGCATTGGTAGTAGATTAGCTGGTATCAACAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATC
TACAAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTACAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTC
TCACCGTCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGTTGCCGTTACTATTGTCAATGCGCTGGTCAGAGTAGTACTTG
GGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA

>B4-116-3-VK (SEQ ID NO: 138)

GAGCTCGTGATGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAGCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTGAAGCATTAGCAACTACTTATCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT
ATAAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCT
CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGCCTATTGGGGTACTTCTACTATGG
CTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA

【図 3 1 C】

>B4-72-1-VK (SEQ ID NO: 180)

GAGCTCGATCTGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTGAAGCGTTGACAACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAACTCCTGATCT
ACGATGCATCAAATGGCATCTGGGGTCCAGATAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT
CACCATCAGCGGCTGCAAGTGTGCAGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGCGCTTTTCATGATGGTATTAAATA
ATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA

>B4-72-2-VK (SEQ ID NO: 187)

GAGCTCGATATGACCCAGACACCATCGCCGCTGTCTGACGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
TCCAGTCAGAATGTTATGATGACGATACTTTATCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAACTCCT
GATCTACGATGCATCCAAATGGCATCTGGGGTCCAGATAGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACACAGTTCACTCT
CACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGCAGATGCTGCCACTTACTACTGTCTAGGCGCTTTTCATGATGGTA
TTAATAATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA

>B4-86-VK (SEQ ID NO: 194)

GAGCTCGATATGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTGAAGCGTTAGCAACTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATC
TATGGTGCATCCACTCTGGAATCTGGGGTCCCATCGCGGTTACAGCGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTC
TCACCATCAGCAACTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACAGGGTTATGATTGGGATAATAT
CGATAATGCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA

>B4-87-VK (SEQ ID NO: 201)

GAGCTCGATCTGACCCAGACACACGCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTGAGAACTTGGTAGATTAGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT
ATGCTGCATCAATCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTAGATCTGGGACACAGTTCACTCT
CACCATCAGCGACCTAGAGTGTGCCGATGCTGCCAATTACTACTGTCAATGTAGTTATTATGGTAGTACTTATG
TTTTTGGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA

>B4-193-VK (SEQ ID NO: 208)

GAGCTCGTGCTGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAGCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTCAGAGTATCAACAGTTGGTTAGCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT
ACAAGGCGTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTACAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCT
CACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAACATGGCTATTCTGGTGTATCTTG
ATAATGTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGTGGTCAAA

【図 3 1 B】

>B4-116-4-VK (SEQ ID NO: 145)

GAGCTCGTGATGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAGCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTGAAGCATTAGCAACTACTTATCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT
ATAAGGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAAATCACTCT
CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGCCTATTGGGGTACTTCTACTATGG
CTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAC

>B4-55-1-VK (SEQ ID NO: 152)

GAGCTCGTGATGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAGCCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAACTGCCAG
GCCAGTCAGAGTGTGTTAATAATAATGCTTATCTTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCC
TGATCTACAAGGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGGCAGAGTT
CACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTATTATTGTCAAAGCGGTTATTATTGGTA
TTAGTGACTACTCTTTTCGGCGGCGGACCGAGGTGGTGGTCAAA

>B4-55-2-VK (SEQ ID NO: 159)

GAGCTCGATCTGACCCAGACACACTCCTCCGTGTCTGAGCCTGTGGGAGGCACAGTCAGCATCAGTTGCCAGT
CCAGTCAGAGTGTGTTAATAATAATGCCCTATCTTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCT
GATCTACAAGGCTTCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGGCAGAGTTC
CACTCTCACCATCAGCGGCGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTATTATTGTCAAAGCGGTTATTATTGGTAT
TAGTGACTATCCTTTTCGGCGGCGGACCGAGGTGGAAATCAAA

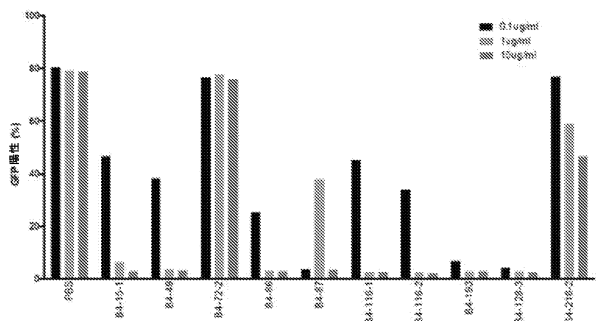
>B4-19-VK (SEQ ID NO: 166)

GAGCTCGATCTGACCCAGACACACGCCTCCGTGTCTGAACCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAACTGCCAG
CCAGTGAGGGCATTAGGAAGCTGGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAGCTCCTGATCT
ATGGTGCATCCACTCTGGAATCTGGGGTCCCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCT
CACCATCAGAGGTGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGGCGGTGTTATAGTAGTAGTATT
TATGGTTATCTTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA

>B4-49-VK (SEQ ID NO: 173)

GAGCTCGATCTGACCCAGACTCCAGCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATCAAGTGCCAG
GCCAGTCAGAGCACTGGTATTAGATTAGCCTGGTATCAGCAGAAACAGGGCAGCCTCCCAAACTCCTGATGT
ATGCTACATCCAATCTGGCATCTGGGGTCTCATCGCGGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACAGAGTTCACTCT
CACCATCAGCGACCTGGAGTGTGCCGATGCTGCCACTTACTACTGTCAAGGCGGTGTTATAGTAGTAGTATG
TTTTTGATTTTCGGCGGAGGGACCGAGGTGGAAATCAAA

【図 3 2】



10

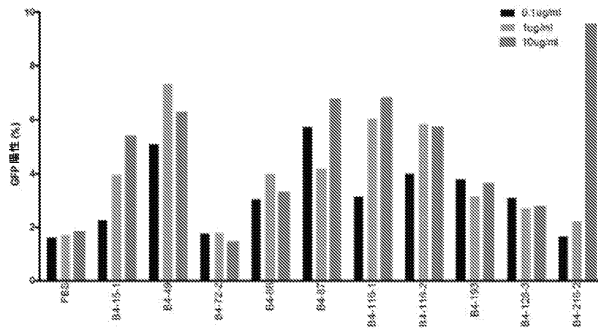
20

30

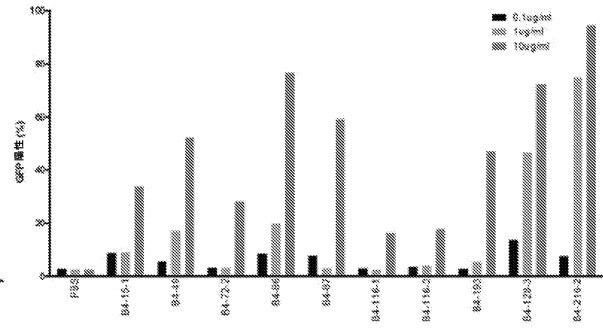
40

50

【図 3 3】

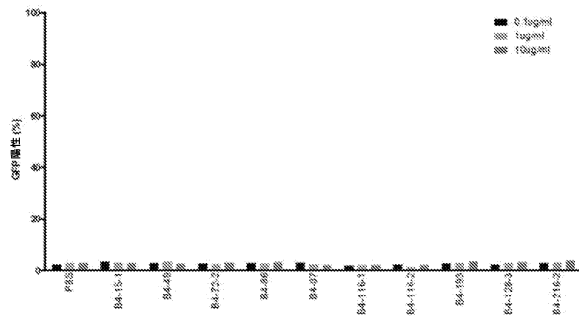


【図 3 4】

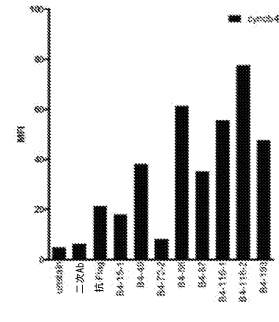


10

【図 3 5】



【図 3 6】

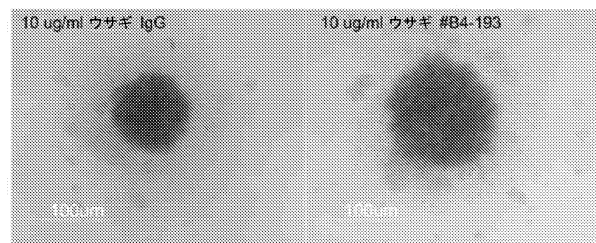


20

【図 3 7】

		ウサギmAb (バッチ2)								
		1	2	3	4	5	6	7	8	9
		15-1	116-1	116-2	48	72-2	86	87	193	128-3
LURB	LURB1	+						+		
	LURB2									
	LURB3									
	LURB4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	LURB5									
LURA	LURA1	/								
	LURA2	/					+			
	LURA3	/								
	LURA4	/								
	LURA5	/	+	+	+		+	+		
	LURA6	/					+			
ymab4		+	+	+	+	+	+	+	+	

【図 3 8】

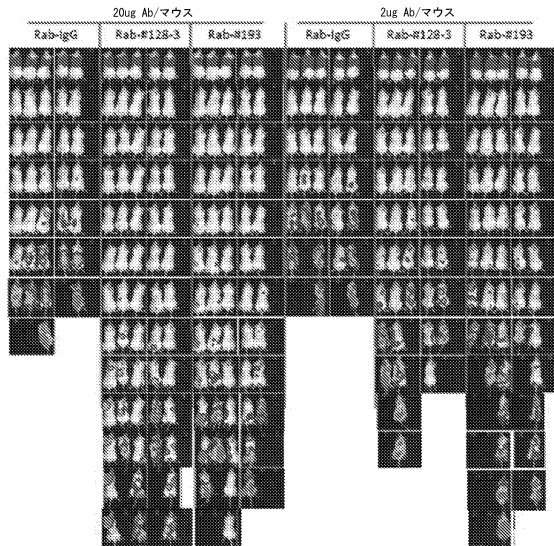


30

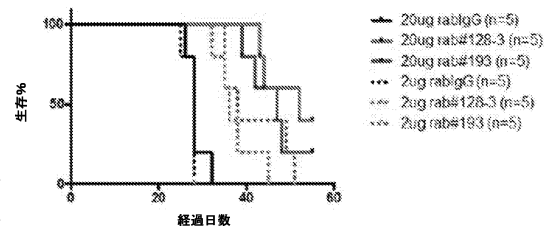
40

50

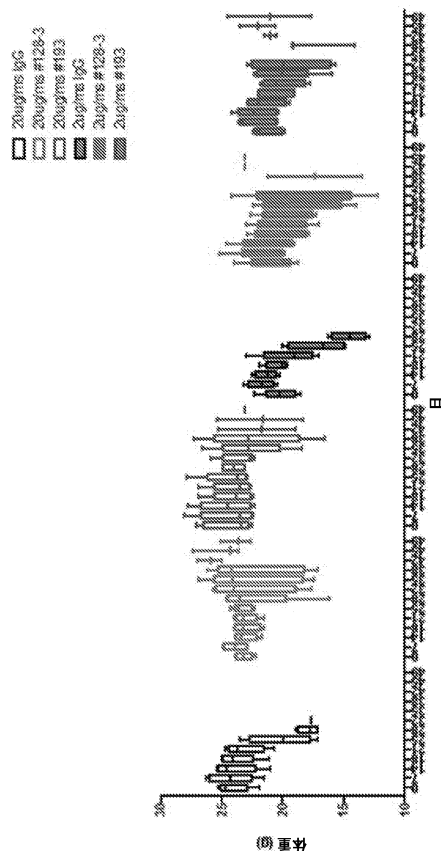
【図 3 9 A】



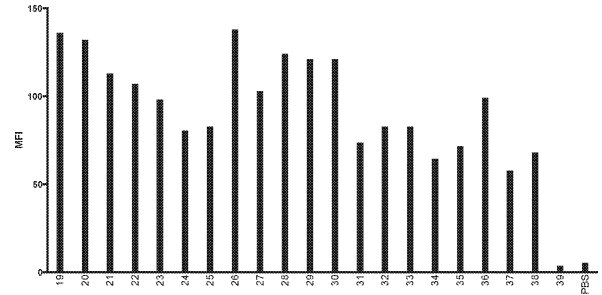
【図 3 9 B】



【図 3 9 C】



【図 4 0】



10

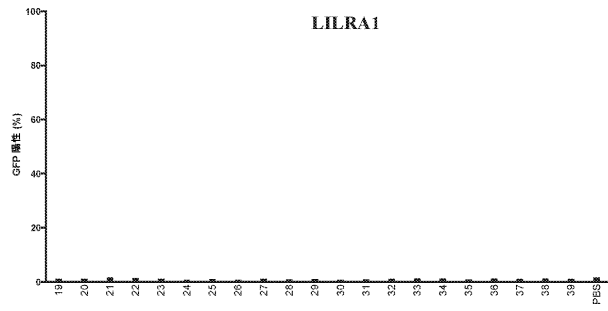
20

30

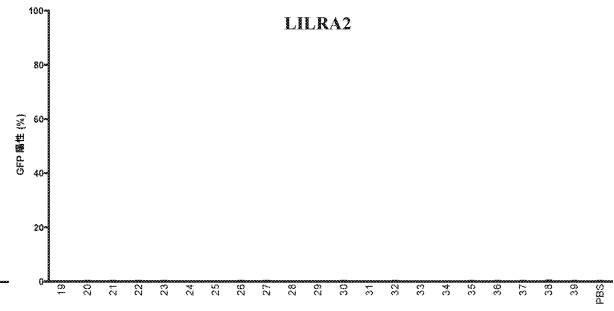
40

50

【図 4 1 A】

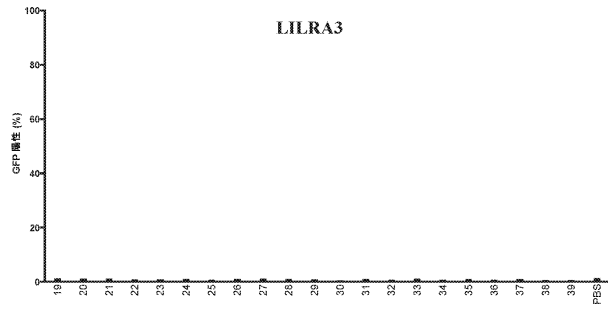


【図 4 1 B】

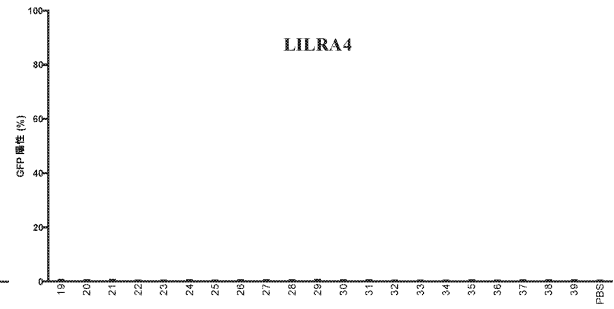


10

【図 4 1 C】

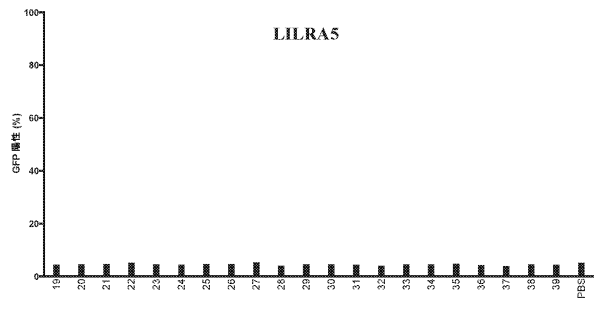


【図 4 1 D】

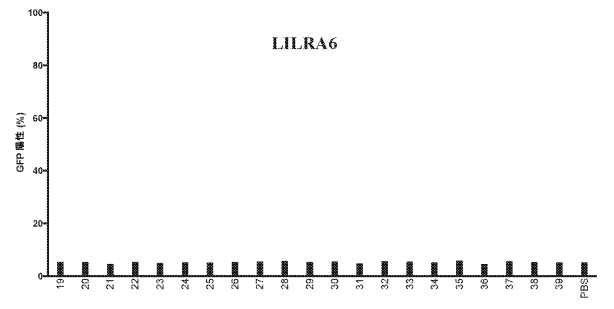


20

【図 4 1 E】



【図 4 1 F】

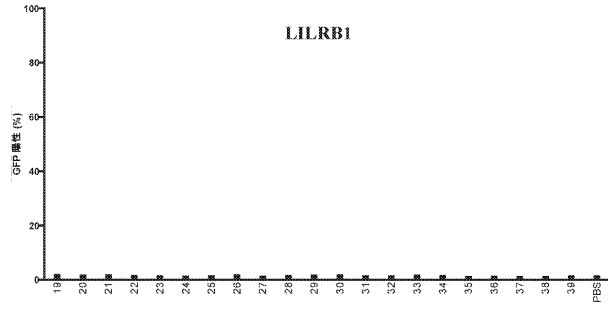


30

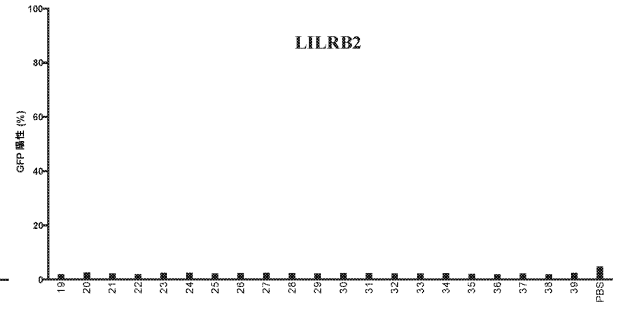
40

50

【図 4 1 G】

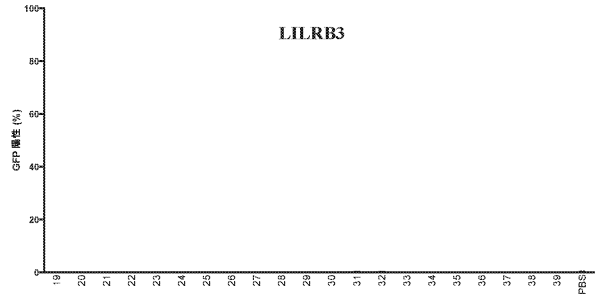


【図 4 1 H】

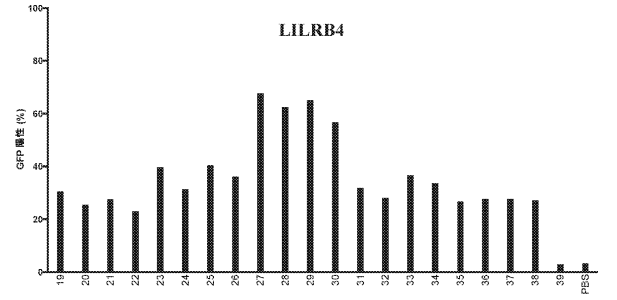


10

【図 4 1 I】

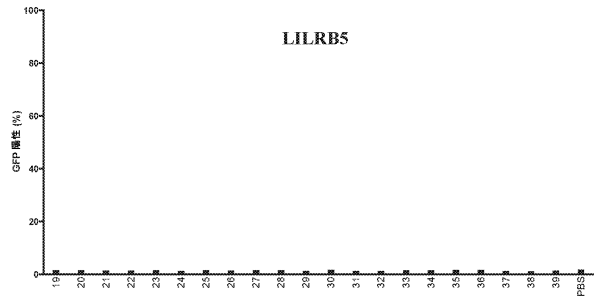


【図 4 1 J】

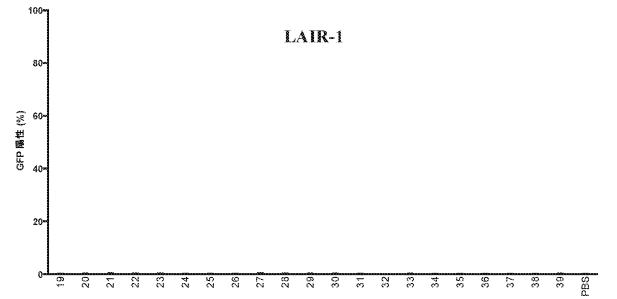


20

【図 4 1 K】



【図 4 1 L】

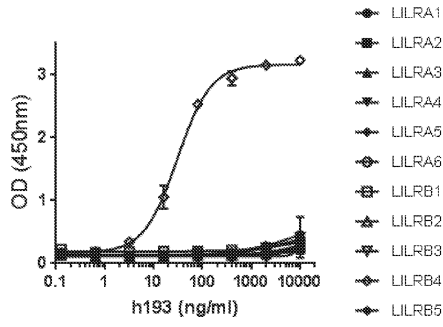


30

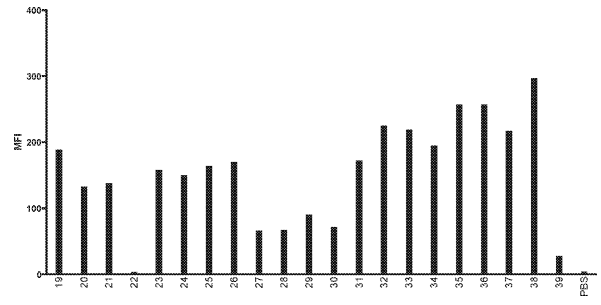
40

50

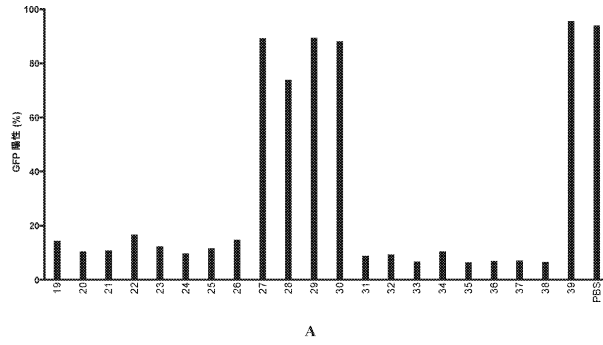
【図 4 1 M】



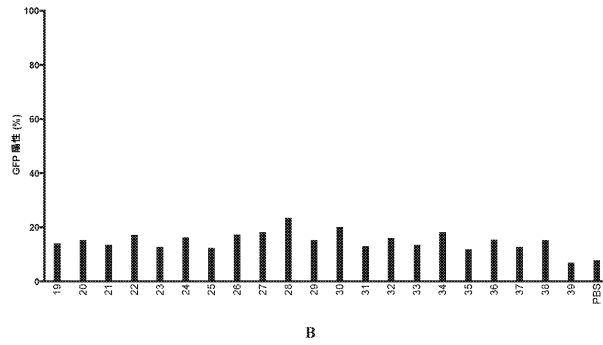
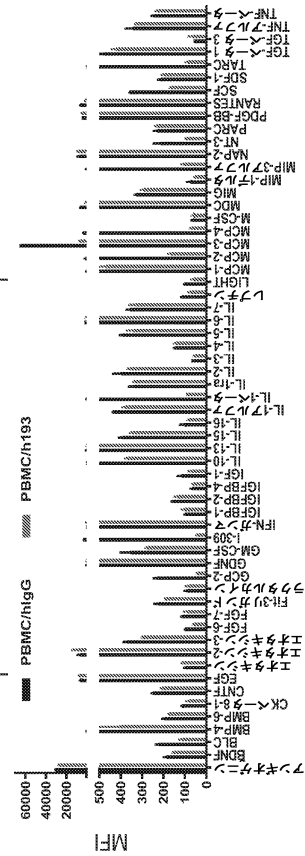
【図 4 2】



【図 4 3】



【図 4 4 A】



10

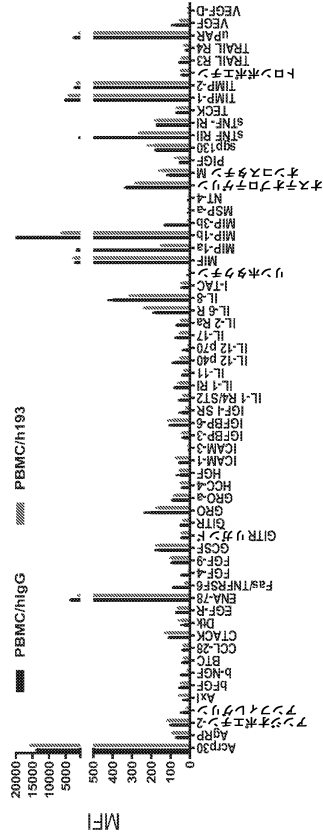
20

30

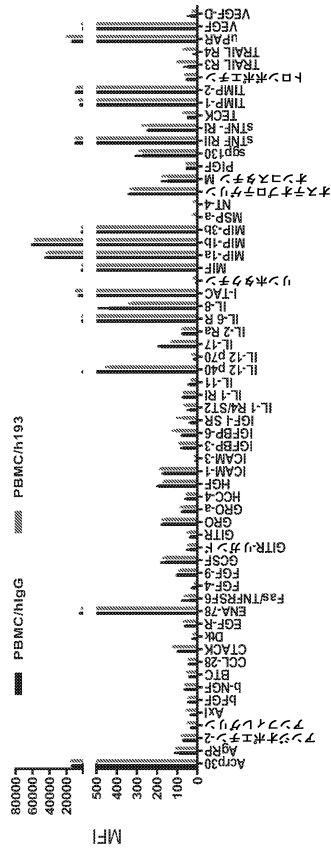
40

50

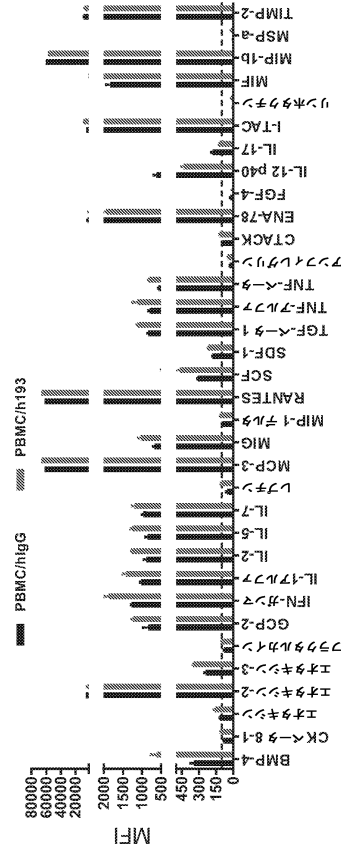
【図 4 4 B】



【図 4 5 B】



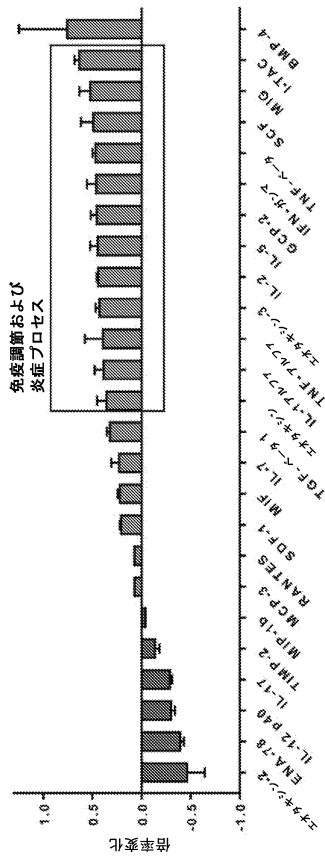
【図 4 5 C】



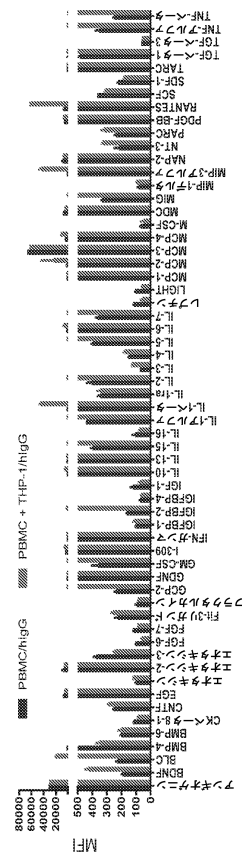
10

20

【図 4 5 D】



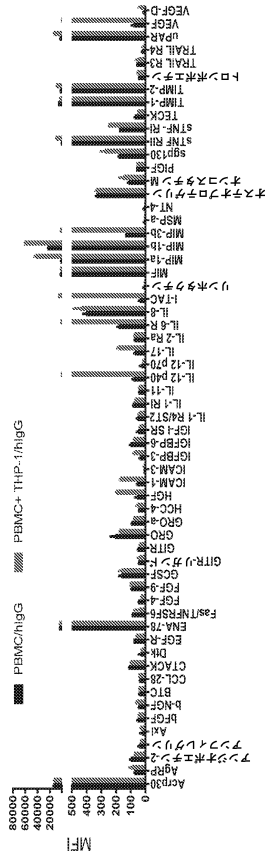
【図 4 6 A】



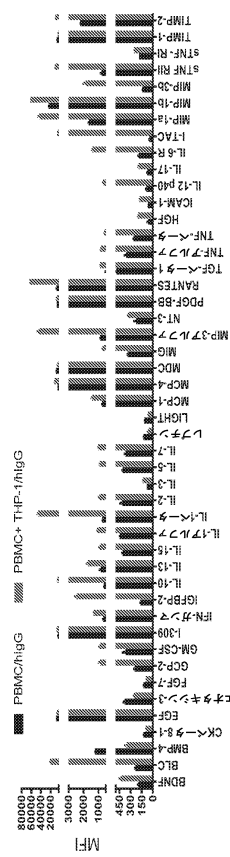
30

40

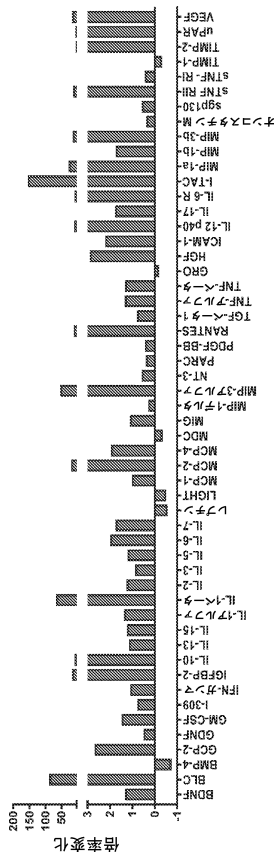
【図 4 6 B】



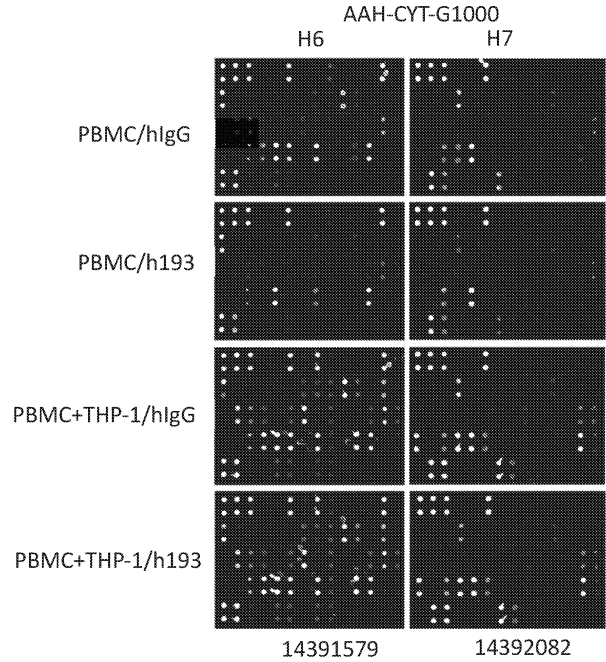
【図 4 6 C】



【図 4 6 D】



【図 4 7】



10

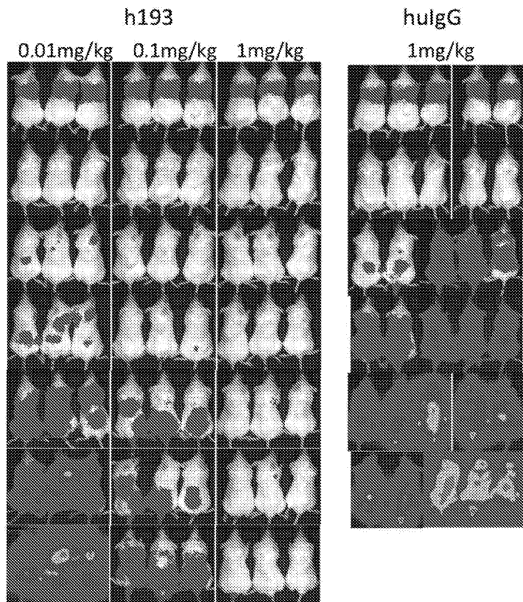
20

30

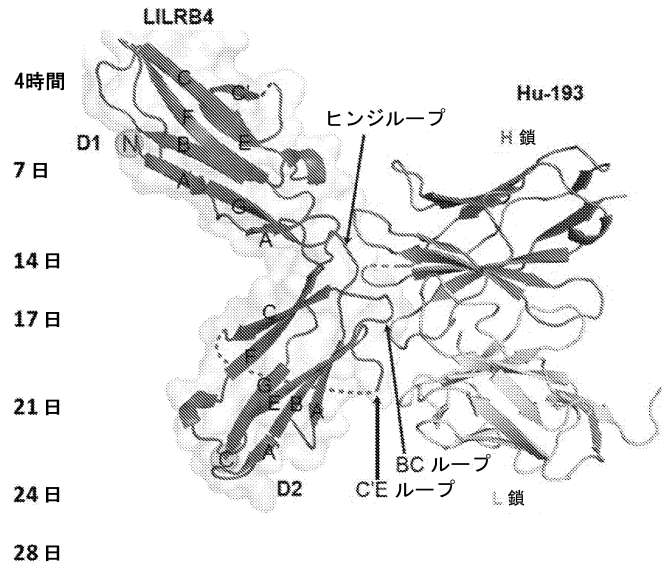
40

50

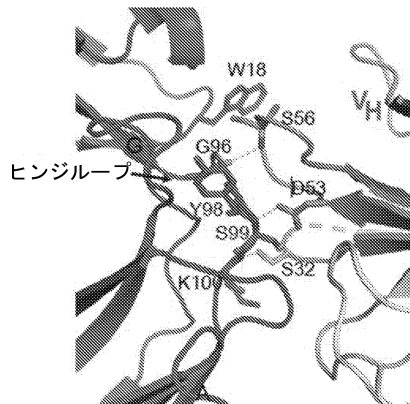
【図 4 8】



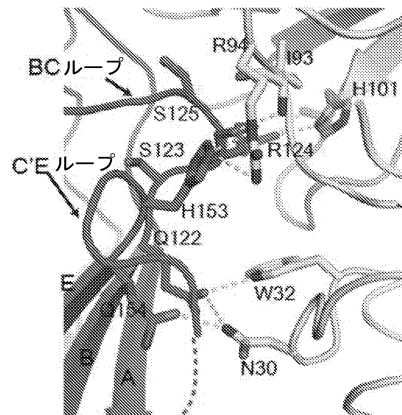
【図 4 9 A】



【図 4 9 B】



【図 4 9 C】



10

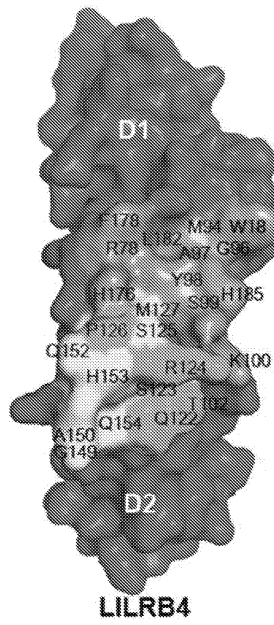
20

30

40

50

【図 49 D】



10

【配列表】

0007534303000001.app

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 P 21/08 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
A 6 1 K 35/17 (2015.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/02 (2006.01)
A 6 1 K 45/00 (2006.01)
A 6 1 P 43/00 (2006.01)
A 6 1 K 47/68 (2017.01)
A 6 1 K 49/16 (2006.01)
A 6 1 K 51/12 (2006.01)
A 6 1 K 38/19 (2006.01)
A 6 1 K 38/43 (2006.01)
G 0 1 N 33/574 (2006.01)
G 0 1 N 33/53 (2006.01)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)

F I

C 1 2 N 5/10
C 1 2 P 21/08
A 6 1 K 39/395 T
A 6 1 K 35/17
A 6 1 P 35/00
A 6 1 P 35/02
A 6 1 K 45/00
A 6 1 P 43/00 1 2 1
A 6 1 K 47/68
A 6 1 K 49/16
A 6 1 K 51/12 1 0 0
A 6 1 K 38/19
A 6 1 K 38/43
G 0 1 N 33/574 A
G 0 1 N 33/53 Y
G 0 1 N 33/543 5 9 7
G 0 1 N 33/543 5 4 5 A
G 0 1 N 33/543 5 4 1 Z

ード 7 9 5

(74)代理人 100102978
 弁理士 清水 初志
 (74)代理人 100205707
 弁理士 小寺 秀紀
 (74)代理人 100160923
 弁理士 山口 裕孝
 (74)代理人 100119507
 弁理士 刑部 俊
 (74)代理人 100142929
 弁理士 井上 隆一
 (74)代理人 100148699
 弁理士 佐藤 利光
 (74)代理人 100128048
 弁理士 新見 浩一
 (74)代理人 100129506
 弁理士 小林 智彦
 (74)代理人 100114340
 弁理士 大関 雅人
 (74)代理人 100121072
 弁理士 川本 和弥

(72)発明者 アン ジチャン

アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州 ヒューストン ファニン 7 0 0 0 スイート 1 2 0 0
 ユーティー ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン内

(72)発明者 チャン チェンチェン

アメリカ合衆国 7 5 3 9 0 テキサス州 ダラス ハリー ハイNZ ブールバード 5 3 2 3 ユー
 ティー サウスウェスタン メディカル センター内

(72)発明者 チャン ニンギャン

アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州 ヒューストン ファニン 7 0 0 0 スイート 1 2 0 0
 ユーティー ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン内

(72)発明者 ギイ シュン

アメリカ合衆国 7 7 0 3 0 テキサス州 ヒューストン ファニン 7 0 0 0 スイート 1 2 0 0

- ユーティー ヘルス サイエンス センター アット ヒューストン内
(72)発明者 ドン ミ
アメリカ合衆国 75390 テキサス州 ダラス ハリー ハイน์ズ ブールバード 5323 ユー
ティー サウスウェスタン メディカル センター内
- (72)発明者 ヒュアン タオ
アメリカ合衆国 94303 カリフォルニア州 パロアルト サン アントニオ ロード 795 イ
ミューン-オンコ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 リュー チャン
アメリカ合衆国 94303 カリフォルニア州 パロアルト サン アントニオ ロード 795 イ
ミューン-オンコ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- (72)発明者 リアオ エックス. シャーリーン
アメリカ合衆国 94303 カリフォルニア州 パロアルト サン アントニオ ロード 795 イ
ミューン-オンコ セラピューティクス インコーポレイテッド内
- 審査官 藤澤 雅樹
- (56)参考文献 国際公開第2018/022881 (WO, A2)
米国特許出願公開第2018/0086829 (US, A1)
国際公開第2018/148494 (WO, A1)
国際公開第2018/089300 (WO, A1)
米国特許出願公開第2015/0110714 (US, A1)
特表2009-540828 (JP, A)
- (58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)
C07K 16/00
C12N 15/00
CAplus/REGISTRY (STN)
MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)