

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号  
特許第7520003号  
(P7520003)

(45)発行日 令和6年7月22日(2024.7.22)

(24)登録日 令和6年7月11日(2024.7.11)

(51)国際特許分類		F I		
C 1 2 N	15/13 (2006.01)	C 1 2 N	15/13	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
A 6 1 P	35/00 (2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02 (2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	37/04 (2006.01)	A 6 1 P	37/04	
請求項の数 113 (全232頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-527044(P2021-527044)	(73)特許権者	391015708	
(86)(22)出願日	令和1年11月14日(2019.11.14)		ブリストル・マイヤーズ スクイブ カン	
(65)公表番号	特表2022-509942(P2022-509942		パニー	
	A)		B R I S T O L - M Y E R S S Q U I	
(43)公表日	令和4年1月25日(2022.1.25)		B B C O M P A N Y	
(86)国際出願番号	PCT/US2019/061429		アメリカ合衆国08543ニュージャー	
(87)国際公開番号	WO2020/102501		ジー州 プリンストン、ルート206ア	
(87)国際公開日	令和2年5月22日(2020.5.22)		ンド・プロビンス・ライン・ロード	
審査請求日	令和4年9月14日(2022.9.14)	(74)代理人	100145403	
(31)優先権主張番号	62/768,471		弁理士 山尾 憲人	
(32)優先日	平成30年11月16日(2018.11.16)	(74)代理人	100122301	
(33)優先権主張国・地域又は機関			弁理士 富田 憲史	
	米国(US)	(74)代理人	100170520	
(31)優先権主張番号	62/927,211		弁理士 笹倉 真奈美	
(32)優先日	令和1年10月29日(2019.10.29)	(72)発明者	ベズマン, ナタリー	
最終頁に続く		最終頁に続く		

(54)【発明の名称】 抗NKG2A抗体およびその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

ヒトナチュラルキラー細胞阻害性受容体2A群タンパク質(NKG2A)と結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、

前記抗体は、配列番号8のアミノ酸配列の重鎖可変領域(VH)の重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、HCDR2およびHCDR3ならびに配列番号9のアミノ酸配列の軽鎖可変領域(VL)の軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、LCDR2およびLCDR3を含む、

単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項2】

VHが、配列番号8のアミノ酸配列から本質的になり、VLが、配列番号9のアミノ酸配列から本質的になる、請求項1に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項3】

抗体が、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるVHおよび配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるVLを含む、請求項1に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項4】

抗体が、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるVHおよび配列番号9のアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるVLを含む、請求項1に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 5】

抗体が、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 99% 同一である V H および配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 99% 同一である V L を含む、請求項 1 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 6】

抗体が、抗体断片である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 7】

抗体断片が、F a b、F a b'、(F a b')<sub>2</sub>、F v、または s c F v 断片である、請求項 6 に記載の抗原結合断片。

## 【請求項 8】

抗体が、全長抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

## 【請求項 9】

抗体が、I g G 1 抗体である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 10】

抗体が、ヒト抗体である、請求項 1 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 11】

請求項 1 に記載の抗体と医薬上許容される担体とを含む、組成物。

## 【請求項 12】

さらなる治療剤をさらに含む、請求項 11 に記載の組成物。

## 【請求項 13】

さらなる治療剤が、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、または抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 14】

抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブである、請求項 13 に記載の組成物。

## 【請求項 15】

抗 C T L A - 4 抗体が、イピリムマブである、請求項 13 に記載の組成物。

## 【請求項 16】

さらなる治療剤が、セツキシマブである、請求項 12 に記載の組成物。

## 【請求項 17】

ヒト N K G 2 A と結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、  
前記抗体は、配列番号 10 のアミノ酸配列の H C D R 1、配列番号 11 のアミノ酸配列の H C D R 2 および配列番号 12 のアミノ酸配列の H C D R 3 ならびに配列番号 13 のアミノ酸配列の L C D R 1、配列番号 14 のアミノ酸配列の L C D R 2 および配列番号 15 のアミノ酸配列の L C D R 3 を含む、  
単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 18】

抗体が、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である V H 領域および配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である V L 領域を含む、請求項 17 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 19】

抗体が、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一である V H 領域および配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一である V L 領域を含む、請求項 17 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 20】

抗体が、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一である V H 領域および配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一である V L 領域を含む、請求項 17 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

## 【請求項 21】

抗体が、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 99% 同一である V H 領域および配列番号 9 のアミノ酸配列と少なくとも 99% 同一である V L 領域を含む、請求項 17 に記載

10

20

30

40

50

の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 22】

抗体が、抗体断片である、請求項 17 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 23】

抗体断片が、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv、または scFv 断片である、請求項 22 に記載の抗原結合断片。

【請求項 24】

抗体が、全長抗体である、請求項 17 に記載の抗体。

【請求項 25】

抗体が、IgG1 抗体である、請求項 17 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 26】

抗体が、ヒト抗体である、請求項 17 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 27】

請求項 17 に記載の抗体と医薬上許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 28】

さらなる治療剤をさらに含む、請求項 27 に記載の組成物。

【請求項 29】

さらなる治療剤が、抗PD-1 抗体、抗PD-L1 抗体、または抗CTLA-4 抗体である、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 30】

20

抗PD-1 抗体が、ニボルマブである、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 31】

抗CTLA-4 抗体が、イビリムマブである、請求項 29 に記載の組成物。

【請求項 32】

さらなる治療剤が、セツキシマブである、請求項 28 に記載の組成物。

【請求項 33】

ヒトNKGA と結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、  
前記抗体は、配列番号 8 のアミノ酸配列の VH および配列番号 9 のアミノ酸配列の VL  
を含む、  
単離された抗体またはその抗原結合断片。

30

【請求項 34】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である重鎖 (HC) および  
配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも 90% 同一である軽鎖 (LC) を含む、請求項 33  
に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 35】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一である HC および配列番号  
5 のアミノ酸配列と少なくとも 95% 同一である LC を含む、請求項 33 に記載の単離さ  
れた抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 36】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一である HC および配列番号  
5 のアミノ酸配列と少なくとも 98% 同一である LC を含む、請求項 33 に記載の単離さ  
れた抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項 37】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 99% 同一である HC および配列番号  
5 のアミノ酸配列と少なくとも 99% 同一である LC を含む、請求項 33 に記載の単離さ  
れた抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 38】

抗体が、抗体断片である、請求項 33 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 39】

抗体断片が、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv、または scFv 断片である、請

50

求項 3 8 に記載の抗原結合断片。

【請求項 4 0】

抗体が、全長抗体である、請求項 3 3 に記載の抗体。

【請求項 4 1】

抗体が、I g G 1 抗体である、請求項 3 3 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4 2】

抗体が、ヒト抗体である、請求項 3 3 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 4 3】

請求項 3 3 に記載の抗体と医薬上許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 4 4】

さらなる治療剤をさらに含む、請求項 4 3 に記載の組成物。

【請求項 4 5】

さらなる治療剤が、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、または抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 6】

抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブである、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 7】

抗 C T L A - 4 抗体が、イピリムマブである、請求項 4 5 に記載の組成物。

【請求項 4 8】

さらなる治療剤が、セツキシマブである、請求項 4 4 に記載の組成物。

【請求項 4 9】

ヒト N K G 2 A と結合する単離された抗体であって、  
前記抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列の H C および配列番号 5 のアミノ酸配列の L C を含む、  
単離された抗体。

【請求項 5 0】

請求項 4 9 に記載の抗体と医薬上許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 5 1】

さらなる治療剤をさらに含む、請求項 5 0 に記載の組成物。

【請求項 5 2】

さらなる治療剤が、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、または抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 3】

抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブである、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 4】

抗 C T L A - 4 抗体が、イピリムマブである、請求項 5 2 に記載の組成物。

【請求項 5 5】

さらなる治療剤が、セツキシマブである、請求項 5 1 に記載の組成物。

【請求項 5 6】

N K G 2 A と結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、  
前記抗体は、配列番号 8 のアミノ酸配列の重鎖可変領域 ( V H ) の重鎖相補性決定領域 1 ( H C D R 1 )、H C D R 2 および H C D R 3 ならびに配列番号 1 6 4 のアミノ酸配列の軽鎖可変領域 ( V L ) の軽鎖相補性決定領域 1 ( L C D R 1 )、L C D R 2 および L C D R 3 を含む、  
単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5 7】

V H が、配列番号 8 のアミノ酸配列から本質的になり、V L が、配列番号 1 6 4 のアミノ酸配列から本質的になる、請求項 5 6 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 5 8】

抗体が、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一である V H および配列番号

10

20

30

40

50



164のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるV Lを含む、請求項56に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項59】

抗体が、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるV Hおよび配列番号164のアミノ酸配列と少なくとも98%同一であるV Lを含む、請求項56に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項60】

抗体が、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも99%同一であるV Hおよび配列番号164のアミノ酸配列と少なくとも99%同一であるV Lを含む、請求項56に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項61】

抗体が、配列番号8のアミノ酸配列のV Hおよび配列番号164のアミノ酸配列のV Lを含む、請求項56に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項62】

抗体が、抗体断片である、請求項56に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項63】

抗体断片が、F a b、F a b'、(F a b')<sub>2</sub>、F v、またはs c F v断片である、請求項62に記載の抗原結合断片。

【請求項64】

抗体が、全長抗体である、請求項56に記載の抗体。

20

【請求項65】

抗体が、I g G 1抗体である、請求項56に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項66】

抗体が、ヒト抗体である、請求項56に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項67】

請求項56に記載の抗体と医薬上許容される担体とを含む、組成物。

【請求項68】

さらなる治療剤をさらに含む、請求項67に記載の組成物。

【請求項69】

さらなる治療剤が、抗P D - 1抗体、抗P D - L 1抗体、または抗C T L A - 4抗体である、請求項68に記載の組成物。

30

【請求項70】

抗P D - 1抗体が、ニボルマブである、請求項69に記載の組成物。

【請求項71】

抗C T L A - 4抗体が、イビリムマブである、請求項69に記載の組成物。

【請求項72】

さらなる治療剤が、セツキシマブである、請求項68に記載の組成物。

【請求項73】

ヒトN K G 2 Aと結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、  
前記抗体は、配列番号10のアミノ酸配列のH C D R 1、配列番号11のアミノ酸配列のH C D R 2および配列番号12のアミノ酸配列のH C D R 3ならびに配列番号154のアミノ酸配列のL C D R 1、配列番号14のアミノ酸配列のL C D R 2および配列番号15のアミノ酸配列のL C D R 3を含む、  
単離された抗体またはその抗原結合断片。

40

【請求項74】

抗体が、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるV H領域および配列番号164のアミノ酸配列と少なくとも90%同一であるV L領域を含む、請求項73に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項75】

抗体が、配列番号8のアミノ酸配列と少なくとも95%同一であるV H領域および配列

50

番号 1 6 4 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一である V L 領域を含む、請求項 7 3 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7 6】

抗体が、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 9 8 % 同一である V H 領域および配列番号 1 6 4 のアミノ酸配列と少なくとも 9 8 % 同一である V L 領域を含む、請求項 7 3 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7 7】

抗体が、配列番号 8 のアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % 同一である V H 領域および配列番号 1 6 4 のアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % 同一である V L 領域を含む、請求項 7 3 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

10

【請求項 7 8】

抗体が、抗体断片である、請求項 7 3 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 7 9】

抗体断片が、F a b、F a b'、(F a b')<sub>2</sub>、F v、または s c F v 断片である、請求項 7 8 に記載の抗原結合断片。

【請求項 8 0】

抗体が、全長抗体である、請求項 7 3 に記載の抗体。

【請求項 8 1】

抗体が、I g G 1 抗体である、請求項 7 3 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8 2】

20

抗体が、ヒト抗体である、請求項 7 3 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 8 3】

請求項 7 3 に記載の抗体と医薬上許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 8 4】

さらなる治療剤をさらに含む、請求項 8 3 に記載の組成物。

【請求項 8 5】

さらなる治療剤が、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、または抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 8 4 に記載の組成物。

【請求項 8 6】

抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブである、請求項 8 5 に記載の組成物。

30

【請求項 8 7】

抗 C T L A - 4 抗体が、イビリムマブである、請求項 8 5 に記載の組成物。

【請求項 8 8】

さらなる治療剤が、セツキシマブである、請求項 8 4 に記載の組成物。

【請求項 8 9】

ヒト N K G 2 A と結合する単離された抗体またはその抗原結合断片であって、  
前記抗体は、配列番号 8 のアミノ酸配列の V H および配列番号 1 6 4 のアミノ酸配列の V L を含む、  
単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9 0】

40

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である H C および配列番号 1 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 0 % 同一である L C を含む、請求項 8 9 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9 1】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一である H C および配列番号 1 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 5 % 同一である L C を含む、請求項 8 9 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9 2】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 8 % 同一である H C および配列番号 1 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 8 % 同一である L C を含む、請求項 8 9 に記載の単離

50

された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9 3】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % 同一である H C および配列番号 1 9 のアミノ酸配列と少なくとも 9 9 % 同一である L C を含む、請求項 7 7 に記載の単離された抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9 4】

抗体が、抗体断片である、請求項 8 9 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9 5】

抗体断片が、F a b、F a b'、(F a b')<sub>2</sub>、F v、または s c F v 断片である、請求項 9 4 に記載の抗原結合断片。

10

【請求項 9 6】

抗体が、全長抗体である、請求項 8 9 に記載の抗体。

【請求項 9 7】

抗体が、I g G 1 抗体である、請求項 8 9 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9 8】

抗体が、ヒト抗体である、請求項 8 9 に記載の抗体またはその抗原結合断片。

【請求項 9 9】

請求項 8 9 に記載の抗体と医薬上許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 1 0 0】

さらなる治療剤をさらに含む、請求項 9 9 に記載の組成物。

20

【請求項 1 0 1】

さらなる治療剤が、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、または抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

【請求項 1 0 2】

抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブである、請求項 1 0 1 に記載の組成物。

【請求項 1 0 3】

抗 C T L A - 4 抗体が、イピリムマブである、請求項 1 0 1 に記載の組成物。

【請求項 1 0 4】

さらなる治療剤が、セツキシマブである、請求項 1 0 0 に記載の組成物。

【請求項 1 0 5】

ヒト N K G 2 A と結合する単離された抗体であって、  
前記抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列の H C および配列番号 1 9 のアミノ酸配列の L C を含む、  
単離された抗体。

30

【請求項 1 0 6】

請求項 1 0 5 に記載の抗体と医薬上許容される担体とを含む、組成物。

【請求項 1 0 7】

さらなる治療剤をさらに含む、請求項 1 0 6 に記載の組成物。

【請求項 1 0 8】

さらなる治療剤が、抗 P D - 1 抗体、抗 P D - L 1 抗体、または抗 C T L A - 4 抗体である、請求項 1 0 7 に記載の組成物。

40

【請求項 1 0 9】

抗 P D - 1 抗体が、ニボルマブである、請求項 1 0 8 に記載の組成物。

【請求項 1 1 0】

抗 C T L A - 4 抗体が、イピリムマブである、請求項 1 0 8 に記載の組成物。

【請求項 1 1 1】

さらなる治療剤が、セツキシマブである、請求項 1 0 7 に記載の組成物。

【請求項 1 1 2】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列の H C および配列番号 5 のアミノ酸配列の L C からなる、請求項 4 9 に記載の単離された抗体。

50

## 【請求項 1 1 3】

抗体が、配列番号 7 のアミノ酸配列の H C および配列番号 1 9 のアミノ酸配列の L C からなる、請求項 1 0 5 に記載の単離された抗体。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

## 【0 0 0 1】

## 関連出願の相互参照

本出願は、2018年11月16日に出願された米国仮出願第62/768,471号および2019年10月29日に出願された米国仮出願第62/927,211号の優先権の利益を主張し、これらはいずれも参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。

10

## 【0 0 0 2】

本発明は、抗NKG2A（ナチュラルキラー細胞阻害性受容体2A群）抗体およびその医薬組成物に関する。本発明はまた、抗NKG2A抗体およびその医薬組成物を投与することによって癌などの疾患を治療するための方法を含む、そのような抗体を使用するための方法にも関する。

## 【0 0 0 3】

## E F S - W E B を介して電子的に提出された配列表の参照

本出願は、A S C I I 形式で電子的に提出された、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる、配列表を含む。2019年11月4日に作成された該A S C I I コピーは、13119-WO-PCT\_\_SL.txtという名称であり、サイズが273,467バイトである。

20

## 【背景技術】

## 【0 0 0 4】

癌は、世界的に蔓延している。Global Health Data Exchangeによると、癌は、疾患の主因の1つであり、また死亡の2番目の主因であり、世界中で死亡の約17%を引き起こしている。（"Hannah Ritchie and Max Roser, "Causes of Death - Share of deaths by cause, World, 2017", OurWorldInData.org, 2018, <https://ourworldindata.org/grapher/share-of-deaths-by-cause-2016>で入手可能）。World Health Organizationによると、2010年でさえ、癌の経済的影響は、1.16兆ドルであり、2018年では、癌は世界中で推定960万人の死亡を占めていた。（"Cancer." World Health Organization. World Health Organization, 2018, <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/cancer>で入手可能）。National Cancer Instituteの推定によると、2019年には、170万人を超える新しい患者が、癌と診断され、600,000人を超える患者が、米国内で癌により死亡する見込みである。（"Cancer Stat Facts: Cancer of Any Site." SEER Training Modules, U. S. National Institutes of Health, National Cancer Institute, 2019 <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/all.html>）。

30

## 【0 0 0 5】

従来的な癌の治療としては、その他の治療法の中でもとりわけ、外科手術、放射線療法、および化学療法が挙げられる。近年では、免疫-腫瘍学または免疫療法が、体の免疫系を使用して癌を治療する新しい選択肢として出現してきた。免疫-腫瘍学は、例えば腫瘍を直接的に標的とすることおよび/または腫瘍血液供給を破壊することを試みていた従来的な癌治療とは異なる。代わりに、免疫-腫瘍学は、患者自身の免疫系を利用して、患者の抗腫瘍免疫応答を復元または増強するのを補助するように設計されている。免疫-腫瘍学アプローチがなければ、患者自身の免疫応答は、様々な理由で腫瘍成長を妨げることにより失敗することが多い。例えば、多くの腫瘍は、患者の免疫応答を回避するための特化した機序が発達している。腫瘍細胞はまた、患者の免疫系によって認識され得る抗原の発現が失われている場合がある。他の事例では、腫瘍の急速な成長は、免疫系が腫瘍を効果的に制御する能力を凌駕することさえあり得る。（Abbas et al., "Chap. 18: Immunity t

40

50

o Tumors", in Cellular and Molecular Immunology, 9<sup>th</sup> ed. Elsevier, Inc., (2018)). 免疫系がどのように癌の発生に影響を及ぼすか、およびどのようにして免疫系を使用して癌を治療することができるかを理解することは、困難な多面的問題を提示している。例えば、多くの患者は、既存の免疫 - 腫瘍学治療には応答せず、特定の種類の白血球であるT細胞が正しく機能しなくなるT細胞消耗などの耐性機序を生じる患者もいる。(Dempke et al., Eur. J. of Cancer, 74: 55-72 (2017))。

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

患者は、現在利用可能な癌免疫療法を含む従来の治療法を改善する、癌などの疾患の改善された治療を必要としている。患者の応答率を改善し、薬物耐性を克服するために、単独または既存の薬剤との組合せのいずれかで使用される新規な免疫 - 腫瘍学薬剤に対して、大きな必要性が存在する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

本発明は、いくつかの態様において、ヒトNKG2Aタンパク質（配列番号1）と結合する単離されたモノクローナル抗体（例えば、ヒト化およびヒトモノクローナル抗体）、すなわち、抗NKG2A抗体、例えば、望ましい機能的特性を呈する抗hNKG2A抗体を提供する。一態様では、本明細書において開示される抗NKG2A抗体の望ましい機能的特性としては、免疫応答を刺激すること、例えば、癌を治療することが挙げられる。別の態様では、本明細書において開示される抗NKG2A抗体の望ましい機能的特性としては、ヒト患者を含め、ウイルスに感染した対象を治療することが挙げられる。いくつかの実施形態では、本明細書において開示される抗NKG2A抗体は、感染性疾患を治療する。別の態様では、本明細書において開示される抗NKG2A抗体は、自己免疫状態を治療する。他の実施形態では、本発明の抗NKG2A抗体は、対象において免疫応答を刺激および/または増強するため、例えば、ナチュラルキラー細胞および/またはT細胞を含む、免疫系の抗腫瘍応答を刺激および/または増強するためのアンタゴニスト抗NKG2A抗体として使用される。他の実施形態では、本発明の抗NKG2A抗体は、癌、ウイルス感染症を含む感染性疾患、および自己免疫疾患を含む、様々な状態を治療するために、その他の抗体と組み合わせて使用される。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書において開示される抗NKG2A抗体は、単独、またはその他の治療、例えば、他の免疫 - 腫瘍学治療および/もしくは化学療法および/もしくは外科手術と組み合わせてのいずれかで、癌およびウイルス感染症を含む様々な状態または疾患を治療するために使用される。他の実施形態では、本明細書において開示される抗NKG2A抗体は、サンプル中のNKG2Aタンパク質を検出するための方法において使用される。

【0008】

一態様では、本発明は、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であって、ヒトNKG2Aと特異的に結合し、以下の特性：

- (a) NKG2Aリガンド（例えば、ヒトにおけるHLA-E）のヒトNKG2Aタンパク質との結合および/もしくは相互作用を低減（例えば、遮断）すること、
  - (b) NKG2Aに媒介される阻害性シグナル伝達を逆転させること、
  - (c) ヒトNKG2Cタンパク質と結合しないか、もしくは低い親和性で結合すること、
  - (d) ヒトおよび/もしくはカニクイザルNKG2Aと結合すること、
  - (e) ナチュラルキラー細胞応答を増強すること、
  - (f) T細胞の機能的活性を増強すること、
  - (g) ヒトFcガンマ受容体（FcR）との結合が低減されていること、
  - (h) 抗腫瘍免疫応答を誘導および/もしくは増強すること、
  - (i) 抗ウイルス免疫応答を誘導および/もしくは増強すること、
- ならびに/または
- (j) ヒト対象を含む、対象において低い免疫原性を有すること

のうちの少なくとも1つを呈する、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。

【0009】

一実施形態では、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、以下の特性：

(a) 細胞結合アッセイによって測定される場合、ヒトNKG2Aタンパク質との結合に関して、約0.6 nM以下のEC<sub>50</sub>値を有すること、

(b) 細胞結合アッセイによって測定される場合、ヒトNKG2Cタンパク質との結合に関して、約9.0 nM以上のEC<sub>50</sub>値を有すること、

(c) ヒトNKG2Aタンパク質との結合に関して、ヒトNKG2Cタンパク質との結合に関する第2のEC<sub>50</sub>値よりも約15倍低いEC<sub>50</sub>値を有すること、

(d) 細胞遮断アッセイによって測定される場合、HLA-EのヒトNKG2Aタンパク質との結合および/もしくはそれとの相互作用を低減することに関して、約1.0 nM以下のIC<sub>50</sub>値を有すること、

(e) スキャッチャード解析によって測定される場合、約0.4 nM以下のK<sub>D</sub>で、ヒトNKG2Aタンパク質と結合すること、

(f) 表面プラズモン共鳴によって測定される場合、約61 nM以下のK<sub>D</sub>で、ヒトNKG2Aと結合すること、

(g) スキャッチャード解析によって測定される場合、約1.0 nM以下のK<sub>D</sub>で、カニクイザルNKG2Aと結合すること、

(h) NKG2A発現細胞と結合すると、内部移行されること、

(i) インターフェロン-ガンマ(IFN $\gamma$ )産生を増大させること、

(j) 約0.5 nM以下のEC<sub>50</sub>値で内部移行(internalization)を示すこと、ならびに/または

(k) 抗NKG2A抗体：NKG2A複合体の半減期が、約40秒以上であること

のうちの1つまたは複数を有する。いくつかの実施形態では、抗NKG2A抗体：NKG2A複合体の半減期は、表面プラズモン共鳴分析を使用して測定される。

【0010】

一実施形態では、本明細書において開示される抗NKG2A抗体またはその抗原結合断片は、ヒトNKG2Aタンパク質とヒトNKG2Aリガンド(すなわち、HLA-E)との相互作用を低減(例えば、遮断)する。

【0011】

別の態様では、本発明は、ヒトNKG2Aタンパク質と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であって、

(a) 配列番号10、11、12のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号13、14、および15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、

(b) 配列番号10、11、および12のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号154、14、および15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン、または

(c) 配列番号10、11、および12のアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン、ならびに配列番号155、14、および15のアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン

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を提供する。

【0012】

別の態様では、本発明は、ヒトNKG2Aタンパク質と特異的に結合し、重鎖および軽鎖可変領域を含む、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であって、それぞれ、

(a) 重鎖可変領域が、配列番号8もしくは配列番号167のアミノ酸配列と少なくとも約80%、少なくとも約85%、少なくとも約90%、少なくとも約95%、少なくとも約96%、少なくとも約97%、少なくとも約98%、少なくとも約99%、約100%、もしくは100%同一であるアミノ酸配列を含み、かつ/または

(b) 軽鎖可変領域が、配列番号9、配列番号164、もしくは配列番号169のアミノ

10

20

30

40

50

酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、約 100%、もしくは 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、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を提供する。

【0013】

いくつかの実施形態では、ヒト NKG2A タンパク質と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は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 9 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0014】

いくつかの実施形態では、ヒト NKG2A タンパク質と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は、配列番号 8 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 164 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0015】

いくつかの実施形態では、ヒト NKG2A タンパク質と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は、配列番号 167 のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および配列番号 169 のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。

【0016】

別の態様では、本発明は、ヒト NKG2A タンパク質と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であって、重鎖および軽鎖が、

(a) それぞれ、配列番号 7 および 5 のアミノ酸配列、

(b) それぞれ、配列番号 7 および 19 のアミノ酸配列、または

(c) それぞれ、配列番号 35 および 36 のアミノ酸配列

から本質的になる、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。

【0017】

いくつかの実施形態では、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、NKG2A タンパク質との結合について、本明細書において開示される抗 NKG2A 抗体と競合するか、またはそれと同一のエピトープと結合する。

【0018】

別の態様では、本発明は、ヒト NKG2A タンパク質と結合したときに、水素 - 重水素交換質量分析 (HDX - MS) によって判定される場合、以下のアミノ酸残基：

(a) LSIDNEEMKF (配列番号 156)；

(b) PSSWIGVFRNSSHHPW (配列番号 157)；

(c) LAFKHEIKDSDN (配列番号 158)；および

(d) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (配列番号 159)

と特異的に結合する、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。

【0019】

いくつかの実施形態では、モノクローナル抗体は、NKG2A リガンド (例えば、ヒトにおける HLA - E) のヒト NKG2A タンパク質との結合を遮断する。

【0020】

別の態様では、本発明は、ヒト NKG2A と結合したときに、HDX - MS および / またはタンパク質の迅速光化学酸化 (FPOP) エピトープマッピングによって判定される場合、以下のアミノ酸残基：

(a) LSIDNEEMKF (配列番号 156)

(b) PSSWIGVFRNSSHHPW (配列番号 157)

(c) LAFKHEIKDSDN (配列番号 158)

(d) L; および

(e) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC (配列番号 159)

と特異的に結合する、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。

【0021】

いくつかの実施形態では、抗体は、NKG2A リガンド (例えば、ヒトにおける HLA

10

20

30

40

50

- E) のヒト NKG2A タンパク質との結合を遮断する。

【0022】

いくつかの実施形態では、単離されたモノクローナル抗体は、全長抗体である。他の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体は、全長 IgG1 抗体である。いくつかの他の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体は、抗体断片である。他の実施形態では、抗体断片は、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv、または scFv 断片である。他の実施形態では、単離されたモノクローナル抗体は、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である。

【0023】

一態様では、本発明は、ヒト NKG2A タンパク質と特異的に結合する単離された全長モノクローナル抗体であって、

(a) 重鎖が、配列番号 7 のアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、約 100%、もしくは 100% 同一であるアミノ酸配列を含み、かつ/または

(b) 軽鎖が、配列番号 5 のアミノ酸配列と少なくとも約 80%、少なくとも約 85%、少なくとも約 90%、少なくとも約 95%、少なくとも約 96%、少なくとも約 97%、少なくとも約 98%、少なくとも約 99%、約 100%、もしくは 100% 同一であるアミノ酸配列を含む、

単離された全長モノクローナル抗体を提供する。

【0024】

いくつかの実施形態では、単離された全長モノクローナル抗体の重鎖は、配列番号 7 に記載されるアミノ酸配列を含み、軽鎖は、配列番号 5 に記載されるアミノ酸配列を含む。

【0025】

別の態様では、単離された全長モノクローナル抗体は、ヒト NKG2A タンパク質と特異的に結合し、ここで、重鎖は、配列番号 7 に記載されるアミノ酸配列から本質的になり、軽鎖は、配列番号 5 に記載されるアミノ酸配列から本質的になる。

【0026】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗体またはその抗原結合断片の重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域をコードする、単離された核酸分子を提供する。いくつかの実施形態では、核酸分子は、相補的 DNA (cDNA) である。

【0027】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される核酸分子を含む、発現ベクターを提供する。別の態様では、本発明は、本明細書に記載される発現ベクターが形質転換された、宿主細胞を提供する。

【0028】

別の態様では、本発明は、薬剤と連結している本明細書に記載される抗体を含む、イムノコンジュゲートを提供する。

【0029】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される宿主細胞を培養することを含む、抗体を産生させる方法を提供する。いくつかの実施形態では、方法は、宿主細胞から抗体を回収することをさらに含む。

【0030】

別の態様では、本発明は、第 2 の機能性部分と連結している本明細書に記載される抗 NKG2A 抗体を含む、二重特異性分子を提供する。

【0031】

別の態様では、本発明は、本明細書に記載される抗 NKG2A 抗体または本明細書に記載される二重特異性分子と、医薬上許容される担体および/または可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質とを含む、組成物を提供する。いくつかの実施形態では、組成物は、さらなる治療剤をさらに含む。他の実施形態では、さらなる治療剤は、抗 PD-1 抗

10

20

30

40

50



体、抗PD-L1抗体、および/または抗CTLA-4抗体である。他の実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブであり、抗CTLA抗体は、イピリムマブである。他の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、癌を治療するための医薬品として使用するものである。

#### 【0032】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗NKG2A抗体、イムノコンジュゲート、二重特異性分子、および組成物を使用して治療される癌は、膀胱癌、乳癌、子宮癌/子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、食道癌、胃腸癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌、頭頸部癌、肺癌、胃癌、生殖細胞癌、骨癌、肝臓癌、甲状腺癌、皮膚癌、中枢神経系の新生物、リンパ腫、白血病、骨髄腫、肉腫、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌 (gastric cancer)、黒色腫、腎癌、尿路上皮癌、多型神経膠芽腫、またはウイルス関連癌である。他の実施形態では、癌は、子宮頸癌、頭頸部の扁平上皮細胞癌 (HNSCC)、膵臓癌、非小細胞肺癌 - 腺癌型 (NSCLC-AD)、非小細胞肺癌 - 扁平上皮細胞型 (NSCLC-SQC)、胃癌、黒色腫、結腸直腸癌 (CRC)、子宮内膜癌、卵巣癌、腎細胞癌 (RCC)、尿路上皮癌 (UCC)、乳癌、小細胞肺癌、多型神経膠芽腫、前立腺癌 (前立腺もしくはPRCの腺癌としても知られる)、または非ホジキンリンパ腫である。

10

#### 【0033】

いくつかの実施形態では、抗NKG2A抗体は、免疫応答を増強する際に使用するものである。他の実施形態では、本発明は、癌の治療のための医薬品の製造における、本明細書に記載される抗NKG2A抗体の使用を提供する。

20

#### 【0034】

一態様では、本発明は、ヒト対象における癌を治療するかまたはその進行を遅延させるための方法であって、ヒト対象に、有効量の、本明細書に記載される抗NKG2A抗体、イムノコンジュゲート、二重特異性分子、または組成物を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、癌は、膀胱癌、乳癌、子宮癌/子宮頸癌、卵巣癌、前立腺癌、精巣癌、食道癌、胃腸癌、膵臓癌、結腸直腸癌、腎臓癌、頭頸部癌、肺癌、胃癌、生殖細胞癌、骨癌、肝臓癌、甲状腺癌、皮膚癌、中枢神経系の新生物、リンパ腫、白血病、骨髄腫、肉腫、子宮内膜癌、子宮頸癌、胃癌、黒色腫、腎癌、尿路上皮癌、多型神経膠芽腫、またはウイルス関連癌である。他の実施形態では、癌は、子宮頸癌、頭頸部の扁平上皮細胞癌 (HNSCC)、膵臓癌、非小細胞肺癌 - 腺癌型 (NSCLC-AD)、非小細胞肺癌 - 扁平上皮細胞型 (NSCLC-SQC)、胃癌、黒色腫、結腸直腸癌 (CRC)、子宮内膜癌、卵巣癌、腎細胞癌 (RCC)、尿路上皮癌 (UCC)、乳癌、小細胞肺癌、多型神経膠芽腫、前立腺癌 (前立腺もしくはPRCの腺癌としても知られる)、または非ホジキンリンパ腫である。

30

#### 【0035】

他の実施形態では、方法は、ヒト対象に、1つまたは複数のさらなる治療剤を投与することをさらに含む。いくつかの実施形態では、1つまたは複数のさらなる治療剤は、化学療法剤、放射線療法剤、および/または免疫療法剤である。他の実施形態では、1つまたは複数のさらなる治療剤は、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、および/または抗CTLA-4抗体である。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブであり、抗CTLA-4抗体は、イピリルマブ (ipilimumab) である。

40

#### 【0036】

別の態様では、本発明は、ヒト対象における免疫応答を刺激する方法であって、ヒト対象に、有効量の、本明細書に記載される抗NKG2A抗体、二重特異性分子、または組成物を投与することを含む、方法を提供する。いくつかの実施形態では、ヒト対象は、腫瘍を有し、抗腫瘍免疫応答が、刺激される。他の実施形態では、ヒト対象は、慢性ウイルス感染症を有し、抗ウイルス免疫応答が、刺激される。

#### 【0037】

別の態様では、本発明は、サンプル中のNKG2Aタンパク質の存在を検出する方法であって、サンプルを、本明細書において開示される抗体またはその抗原結合断片と、抗体

50

またはその抗原結合断片とNK G 2 Aタンパク質との間の複合体の形成を可能にする条件下において接触させることと、複合体の形成を検出することを含む、方法を提供する。方法のいくつかの実施形態では、抗体またはその抗原結合断片は、NK G 2 Cタンパク質とよりも15倍迅速に、NK G 2 Aタンパク質と複合体を形成する。

【0038】

本開示のその他の特徴および利点は、以下の詳細な説明および実施例から明らかとなるが、これらは制限と解釈されてはならない。本願を通じて引用されているすべての参考文献、GenBankおよびその他の配列エントリー、特許、および公開特許出願の内容は、参照により明示的に本明細書に組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

10

【0039】

【図1】図1A～Cは、本明細書において開示される抗NK G 2 A抗体を発見および試験するために使用した3つの方法を図示する。図1Aは、高いレベルで、ハイブリドーマ方法ならびに抗NK G 2 A抗体の発見および開発工程を図示する。図1Bは、抗体発見に使用した抗体ライブラリー生成方法を図示する。図1Cは、単一B細胞クローニング(SBC)方法を図示する。

【図2】図2は、発見された抗NK G 2 A抗体を最適化するために使用される突然変異スキャン分析を図示する。具体的には、図2は、13F3・A4 I107T抗体の変異体を生成し、そのNK G 2 Aタンパク質との結合を特徴付けるための工程を示す。この分析により、発明者らが、改善された特性を有する13F3・A4 I107T抗体の変異体を生成することが可能となり、13F3・A4 I107T抗体のNK G 2 Aタンパク質との結合に対する単一アミノ酸置換の作用に関する豊富な情報セットが得られた。図2は、それぞれ、上から下の出現順に、配列番号183～190を開示している。

20

【図3】図3は、突然変異スキャン分析を使用して生成された、単一アミノ酸置換の配列-活性関係性の解釈を可能にする、例示的なヒートマップである。図3は、配列番号191(生殖系列)および配列番号192(親)を開示している。

【図4】図4は、突然変異スキャン分析を使用して13F3・A4 I107T抗NK G 2 A抗体について分析した、CDR位置を示す。図4は、それぞれ、出現順に、配列番号30、15、192、11、および193を開示している。

【図5】図5A～Eは、13F3・A4 I107T抗体の突然変異スキャン分析を使用して生成された、LCDR1置換(配列番号194および30、それぞれ、生殖系列および親)(図5A)、LCDR3置換(配列番号195および15、それぞれ、生殖系列および親)(図5B)、HCDR1置換(配列番号196および192、それぞれ、生殖系列および親)(図5C)、HCDR2置換(配列番号42および11、それぞれ、生殖系列および親)(図5D)、ならびにHCDR3置換(配列番号193および193、それぞれ、生殖系列および親(図5E)に関するヒートマップである。

30

【図6】図6は、全長ヒトNK G 2 A(配列番号182)およびヒトNK G 2 C(配列番号3)アミノ酸配列のカノニカル配列のアラインメントを示す。アミノ酸残基のうちの約76%(233個中177個のアミノ酸残基)が、保存されており、アミノ酸残基のうちの約6%(233個中14個のアミノ酸残基)が類似であり、アミノ酸残基のうちの約18%(233個中42個のアミノ酸残基)のみが、ヒトNK G 2 AとヒトNK G 2 Cタンパク質との間で異なっている。

40

【図7】図7Aは、抗NK G 2 A抗体13F3・A4の成熟重鎖可変(VH)領域のヌクレオチド配列(配列番号166)およびアミノ酸配列(配列番号167、シグナル配列なし)を示す。VH CDR1(配列番号27)、VH CDR2(配列番号28)、およびVH CDR3(配列番号29)のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。図7Bは、13F3・A4抗体の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列(配列番号168)およびアミノ酸配列(配列番号169)を示す。VL CDR1(配列番号30)、VL CDR2(配列番号31)、およびVL CDR3(配列番号32)配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。

50

【図 8】図 8 A は、抗 N K G 2 A 抗体 2 G 6 . C 2 の成熟 V H 領域のヌクレオチド配列（配列番号 5 1）およびアミノ酸配列（配列番号 5 2）を示す。V H C D R 1（配列番号 5 5）、V H C D R 2（配列番号 5 6）、および V H C D R 3（配列番号 5 7）配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。図 8 B は、抗 N K G 2 A 抗体 2 G 6 . C 2 の成熟 V L 領域のヌクレオチド配列（配列番号 5 3）およびアミノ酸配列（配列番号 5 4）を示す。V L C D R 1（配列番号 5 8）、V L C D R 2（配列番号 5 9）、および V L C D R 3（配列番号 6 0）配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。

【図 9】図 9 A は、抗 N K G 2 A 抗体 1 1 H 9 . A 1 の成熟重鎖可変（V H）領域のヌクレオチド配列（配列番号 1 7 0）およびアミノ酸配列（配列番号 1 7 1）を示す。V H C D R 1（配列番号 4 1）、V H C D R 2（配列番号 4 2）、および V H C D R 3（配列番号 4 3）配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。図 9 B は、成熟抗 N K G 2 A 抗体 1 1 H 9 . A 1 の軽鎖可変領域のヌクレオチド配列（配列番号 1 7 2）およびアミノ酸配列（配列番号 1 7 3）を示す。V L C D R 1（配列番号 4 4）、V L C D R 2（配列番号 4 5）、および V L C D R 3（配列番号 4 6）配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。

【図 1 0】図 1 0 A は、抗 N K G 2 A 抗体 4 G 5 . D 1 の成熟 V H 領域のヌクレオチド配列（配列番号 1 7 4）およびアミノ酸配列（配列番号 1 7 5）を示す。V H C D R 1（配列番号 6 9）、V H C D R 2（配列番号 7 0）、および V H C D R 3（配列番号 7 1）配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。図 1 0 B は、4 G 5 . D 1 抗体の V L のヌクレオチド配列（配列番号 1 7 6）およびアミノ酸配列（配列番号 1 7 7）を示す。V L C D R 1（配列番号 7 2）、V L C D R 2（配列番号 7 3）、および V L C D R 3（配列番号 7 4）配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。

【図 1 1】図 1 1 A は、抗 N K G 2 A 抗体 1 G 5 . B 2 の成熟 V H 領域のヌクレオチド配列（配列番号 1 7 8）およびアミノ酸配列（配列番号 1 7 9）を示す。V H C D R 1（配列番号 8 3）、V H C D R 2（配列番号 8 4）、および V H C D R 3（配列番号 8 5）配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。図 1 1 B は、1 G 5 . B 2 抗体の V L 領域のヌクレオチド配列（配列番号 1 8 0）およびアミノ酸配列（配列番号 1 8 1）を示す。V L C D R 1（配列番号 8 6）、V L C D R 2（配列番号 8 7）、および V L C D R 3（配列番号 8 8）配列のアミノ酸配列は、灰色の枠で示されている。

【図 1 2】図 1 2 は、1 3 F 3 . A 4 抗体において評価したアミノ酸配列傾向を示す。V、D、および J 生殖系列起源が示されている。1 3 F 3 . A 4 抗体の重鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号 1 6 7）が、左側に示されており、1 3 F 3 . A 4 抗体の軽鎖可変領域のアミノ酸配列（配列番号 1 6 9）が右側に示されている。V L C D R 1（配列番号 3 0）、V L C D R 2（配列番号 3 1）、および V L C D R 3（配列番号 3 2）配列のアミノ酸配列は、下線で示されている。V H C D R 1（配列番号 2 7）、V H C D R 2（配列番号 2 8）、および V H C D R 3（配列番号 2 9）配列のアミノ酸配列は、下線で示されている。評価した配列傾向は、丸で示し、ラベルが付けられている。

【図 1 3】図 1 3 は、抗 N K G 2 A 抗体 N K G 2 A . 9 の全長アミノ酸配列を示す。軽鎖アミノ酸配列は、配列番号 5 に示されており、重鎖アミノ酸配列は、配列番号 1 6 3 に示されている（別の実施形態では不在である末端リシンを有して示されている）。図 1 3 は、N K G 2 A . 9 配列を得るために 1 3 F 3 . A 4 の V L 配列（N 3 0 S）および V H 配列（I 1 0 7 T）に対して行われた楕円で示した 2 つの突然変異を特定する。N - グリコシル化モチーフは、破線の楕円で示されている。F c 領域に行われた 3 つの突然変異（L 2 3 4 A、L 2 3 5 E、および G 2 7 3 A）は、太字の斜体で示されている。重鎖配列の末端アミノ酸リシンは、成熟配列から除去した。V L C D R 1（配列番号 1 3）、V L C D R 2（配列番号 1 4）、および V L C D R 3（配列番号 1 5）配列のアミノ酸配列は、太字かつ下線で示されている。V H C D R 1（配列番号 1 0）、V H C D R 2（配列番号 1 1）、および V H C D R 3（配列番号 1 2）配列のアミノ酸配列は、太字かつ下線で示されている。

【図 1 4】図 1 4 は、抗 N K G 2 A 抗体 N K G 2 A . 9 の全長アミノ酸配列を示す。軽鎖

アミノ酸配列は、配列番号 5 に示されており、重鎖アミノ酸配列は、配列番号 7 に示されている。

【図 1 5】図 1 5 は、抗 N K G 2 A 抗体 N K G 2 A . 1 1 の全長アミノ酸配列を示す。軽鎖アミノ酸配列は、配列番号 1 9 に示されており、重鎖アミノ酸配列は、配列番号 7 に示されている。

【図 1 6】図 1 6 は、単一 B 細胞クローニング方法 ( S B C C ) によって生成された例示的な抗体のエピトープマッピングの結果の円形プロットを示し、これらの抗体の多様性を示す。互いに交差遮断する抗体は、線で繋がれている。ベンチマーク抗体 ( 1 3 F 3 . A 4 、 Z 2 7 0 、 R D - a h N K G 2 a ( クローン 1 3 1 4 1 1 、 カタログ番号 M A B 1 0 5 9 ) 、 および R D - a h C D 9 4 ( クローン 1 3 1 4 1 2 、 カタログ番号 M A B 1 0 5 8 ) ) と比較して類似の遮断プロファイルを有するサンプル抗体を、群 1 ~ 4 、 6 ~ 7 、 および 9 に一緒にグループ分けする。サンプル抗体と類似の遮断プロファイルを有するベンチマーク抗体も、群 5 、 8 、 および 1 0 に一緒にグループ分けする。

10

【図 1 7】図 1 7 A は、 S B C C 方法を使用して生成された抗ヒト N K G 2 A 抗体の、 N K G 2 A / H L A - E 相互作用を遮断する能力を評価するためのアッセイ方法を示す。図 1 7 B は、サンプル抗体が、陽性対照 ( N K G 2 A . 9 抗体 ) および陰性対照 ( アイソタイプ ) と比較して、 N K G 2 A / H L A - E 相互作用を部分的にしか遮断しなかったかまたは遮断しなかったことを示す。

【図 1 8】図 1 8 A ~ C は、抗 N K G 2 A 抗体のヒト N K 2 G A 発現 C H O 細胞 ( 図 1 8 B ) および N K G 2 C 発現 C H O 細胞 ( 図 1 8 C ) との結合を評価するための結合アッセイ方法 ( 図 1 8 A ) を示す。図 1 8 B に示されるように、 1 3 F 3 . A 4 、 1 1 H 9 . A 1 、 および 2 E B . B 1 抗体は、ヒト N K G 2 A 発現 C H O 細胞との特異的な結合を示した。図 1 8 D ~ F は、抗 N K G 2 A 抗体による N K G 2 A / H L A - E 相互作用 ( 図 1 8 E ) および N K G 2 C / H L A - E 相互作用 ( 図 1 8 F ) の遮断を評価するために使用した遮断アッセイ方法 ( 図 1 8 D ) を示す。 1 3 F 3 . A 4 および 1 1 H 9 . A 1 抗体は、ヒト N K G 2 A 発現 C H O 細胞との特異的な結合を示し ( 図 1 8 E に示される ) 、 N K G 2 C / H L A - E 相互作用を遮断しなかった ( 図 1 8 F に示される ) 。

20

【図 1 9】図 1 9 A ~ B は、使用した結合アッセイ方法を図示し ( 図 1 9 A ) 、これにより、ヒト N K G 2 A + ナチュラルキラー細胞株 ( N K L ) と結合する抗 N K G 2 A 抗体の能力を評価した ( 図 1 9 B に示される ) 。図 1 9 C ~ D は、使用した遮断アッセイ方法を図示し ( 図 1 9 C ) 、これにより、図 1 9 D に示されるように、試験した抗 N K G 2 A 抗体が、 H L A - E のヒト N K G 2 A 発現 N K L 細胞との結合を遮断したことが示された。

30

【図 2 0】図 2 0 A ~ C は、使用した遮断アッセイ方法を図示し ( 図 2 0 A ) 、これにより、図 2 0 B ~ C に示されるように、試験した抗ヒト N K G 2 A 抗体が、 h N K G 2 A 発現 C H O 細胞における N K G 2 A / H L A - E 相互作用を遮断したことが示された。

【図 2 1】図 2 1 A ~ C は、使用した結合アッセイ方法を図示し ( 図 2 1 A ) 、これにより、図 2 1 B ~ C に示されるように、試験した抗 N K G 2 A 抗体が、ヒト N K G 2 A 発現 C H O 細胞と結合したことが示された。

【図 2 2】図 2 2 A ~ C は、使用した結合アッセイ方法を図示し ( 図 2 2 A ) 、これにより、カニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞と結合する抗 N K G 2 A 抗体の能力を評価した ( 結果は、図 2 2 B ~ C に示される ) 。

40

【図 2 3】図 2 3 A ~ B は、望ましいことに N K G 2 A / H L A - E 相互作用を遮断する抗 N K G 2 A 抗体の能力 ( 図 2 3 B ) を評価するために使用した遮断アッセイ方法を図示する ( 図 2 3 A ) 。図 2 3 C ~ D は、 N K G 2 A 発現 C H O 細胞と結合する抗 N K G 2 A 抗体の能力 ( 図 2 3 D ) を示した、使用した結合アッセイ方法 ( 図 2 3 C ) を示す。

【図 2 4】図 2 4 A ~ B は、抗 N K G 2 A 抗体がカニクイザル N K G 2 A + N K L と結合するかどうか ( 図 2 4 B ) を評価するために使用した結合アッセイ方法 ( 図 2 4 A ) を示す。図 2 4 B に示されるように、 1 1 H 9 . A 1 および 4 G 5 . D 1 抗体は、カニクイザル N K G 2 A + N K 細胞と結合しなかったが、 1 3 F 3 . A 4 抗体は、 0 . 2 n M の E C 5 0 によって示されるように、カニクイザル N K G 2 A + N K 細胞と望ましく結合した。

50

【図25】図25Aは、抗NKGA抗体がNK細胞脱顆粒化を増大したかどうかを評価するために使用したインビトロ(in vitro)方法を図示する。図25B～Cは、フローサイトメトリー分析結果のグラフであり、すべての試験した抗NKGA抗体(NKGA2A.9、NKGA2A.10、NKGA2A.11、NKGA2A.12、NKGA2A.14、NKGA2A.15、NKGA2A.5、2G6.C2、および4G5.D1抗体)が、NKGA2A+ NK細胞において、NK細胞脱顆粒化(アイソタイプ対照と比較したCD107a %の倍率変化によって測定される)を増強したことを示す。25E7.G8クローン(図25Bに示される)は、陰性対照として使用した非遮断抗体である。

【図26】図26Aは、抗NKGA2A抗体が、活性化されたNK細胞においてNKGA2A/HLA-E相互作用を遮断し、IFN- $\gamma$ 産生を増大させたことを示す、NKL細胞およびCHO/MICA/HLA-Eを使用したインビトロ実験を図示する。図26Bは、13F3.A4、11H9.A1、および4G5.D1抗体が、アイソタイプ対照(ヒトIgG1.3抗体)と比較して、IFN- $\gamma$ 産生を望ましく増大させたことを示す。25E7.G8クローンは、陰性対照として使用した。

10

【図27】図27Aは、抗NKGA2A抗体が、膵臓癌細胞株であるHs766T標的細胞において、増大したIFN- $\gamma$ であるCD8+ T細胞応答を増強させたかどうかを評価するために使用したインビトロ実験を図示する。図27Bは、アッセイ結果の図による表示であり、13F3.A4および11H9.A1抗体が、アイソタイプ対照と比較して、IFN- $\gamma$ 産生を増大させたことを示した。25E7.G8クローンは、陰性対照として使用した。

20

【図28】図28A～Bは、それぞれNKGA2A.9抗体(図28A)および13F3.A4抗体(図28B)との相互作用時のmFc-hNKGA2A-hCD94の示差的水素-重水素交換(HDX)分析の結果を示す。エピトープ配列は、図28A～Bにおいて標識されている(配列番号119～122、分析に沿って左から右に開示される)。

【図29】図29A～Bは、4つの残基(M163、F179、H184、L206)に関して、それぞれ、NKGA2A.9抗体(図29A)および13F3.A4抗体(図29B)との相互作用時のhNKGA2AにおけるFPOP保護パーセンテージを示す。

【図30】図30は、HDX-MSおよびFPOPによって判定された、mFc-hNKGA2A-hCD94配列(配列番号125)にマッピングされた、NKGA2A.9および13F3.A4抗体のエピトープを示す。太字の下線で示されるエピトープは、HDX-MSによって判定され、丸で囲んだエピトープは、FPOP分析によって判定された。

30

【図31】図31は、NKGA2A/CD94/HLA-E結晶構造で可視化された、抗NKGA2A抗体の(例えば、NKGA2A.9および13F3.A4抗体の)エピトープを示す。抗NKGA2A抗体エピトープは、黒色で示されている。

【図32】図32A～Bは、抗NKGA2A抗体(13F3.A4、NKGA2A.9、およびNKGA2A.11)の特定の部分のVH領域(上から下の出現順に、それぞれ配列番号167、8、および8)のアラインメント(図32A)、ならびにVL領域(配列番号169、9、および164、上から下の出現順に)のアラインメント(図32B)を示す。このアラインメントは、枠内に示されるコンセンサスCDR配列を有する抗NKGA2A抗体の発見をもたらした。

40

【図33】図33は、NKGA2A.9抗体が、アイソタイプと比較して、CHO/scOKT3/HLA-Eによって刺激されるNKGA2A発現Jurkat T細胞におけるNK-Bシグナル伝達の阻害を逆転させたアッセイ結果を示す。

【図34】図34Aは、健常な末梢血単核細胞(PBMC)から単離したNKGA2A+ CD8+ T細胞によるIFN- $\gamma$ 誘導に対するNKGA2A.9および抗PD-L1抗体の作用を、単独または組合せのいずれかで分析するために使用した実験方法を図示する。図34Bは、NKGA2A.9および抗PD-L1抗体の組合せが、用量依存的様式で、NKGA2A+ CD8+ T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を増強させた、この方法の結果を示す。

【図35】図35A～Bは、NKGA2A.9および/または抗PD-L1抗体が、CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1とともに共培養したヒト腫瘍から単離したNK

50

G2A<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞においてIFN- $\gamma$ 産生を増強させたこと(図35B)を示すために使用したアッセイ方法(図35A)を図示する。

【図36】図36Aは、NK G2A . 9抗体が、NK G2A発現細胞と結合した後に内部移行されたことを示すグラフである。図36Bは、NK G2A . 9抗体の結合動態を示すグラフであり、NK G2A . 9抗体が、0.5 nMのEC<sub>50</sub>で、用量依存的様式で内部移行されたことを示す。

【図37】図37A~Bは、NK G2A . 9抗体が、フローサイトメトリーによって測定されるCD107a発現%によって測定される場合、アイソタイプと比較して、用量依存的様式でNK細胞脱顆粒化を増大させたことを示すために使用した方法(図37A)を図示する。図37C~Dは、NK G2A . 9抗体が、アイソタイプと比較して、用量依存的様式で、HLA-E発現腫瘍細胞の溶解を増大させたこと(図37D)を示した使用した実験方法(図37C)を図示する。

10

【図38】図38Aは、CHO/MICA/HLA-Eとともに共培養したNKLにおけるIFN- $\gamma$ 産生に対する13F3 . A4抗体の作用を測定するために使用した方法を図示する。図38Bは、13F3 . A4抗体が、アイソタイプと比較して、NKLにおけるIFN- $\gamma$ 産生を増大させたことを示す。

【図39】図39は、10 mg/kg、3 mg/kg、および1 mg/kgの抗mNK G2A抗体(NK G2A . 3)を、単剤療法として投与し、結腸癌腫瘍モデルにおいて、腫瘍成長が阻害され、平均腫瘍体積にそれぞれ48%、56%、および30%の低減があった、用量滴定研究の結果を示す。0.3 mg/kgの用量では有効性は観察されなかった。

20

【図40】図40A~Eは、抗mNK G2Aおよび抗mPD-1抗体が、マウスモデルにおいて腫瘍成長を低減させたインビボ(in vivo)研究の結果を示し、抗mNK G2A抗体単剤療法は、CT26結腸直腸腫瘍マウスモデルにおいて単剤活性を示した。図40A~Dは、アイソタイプ(図40A)、抗mNK G2A抗体単独(図40B)、抗mPD-1抗体単独(図40C)、または抗mNK G2A抗体および抗mPD-1抗体の組合せ(図40D)で処置したマウス(n=10匹/群)における腫瘍埋込み後の様々な時点における腫瘍体積を示す。図40Eは、アイソタイプ、抗mNK G2A抗体単独、抗mPD-1抗体単独、または抗mNK G2A抗体および抗mPD-1抗体の組合せで処置したマウスにおける、時間(腫瘍埋込み後の日数)の関数としての平均腫瘍体積を示す。

【図41】図41A~Cは、抗NK G2A抗体および抗PD-1抗体が、マウス結腸癌モデルにおいて、NK(図41A)および腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞細胞毒性およびIFN- $\gamma$ を増大させたこと(図41B~C)インビボ研究の結果を示すグラフである。

30

【図42】図42A~Eは、1956マウス肉腫モデルにおける単独または組合せのいずれかでの抗mNK G2A抗体および抗mCTLA-4抗体の抗腫瘍活性を示す。図42A~Dは、アイソタイプ(図42A)、抗mCTLA-4抗体(図42B、CTLA-4 IgG2a、0.1 mg/kg)、抗mNK G2A抗体(図42C、10 mg/kg)、または抗mNK G2Aおよび抗mCTLA-4の組合せ(図42D)で処置したマウスにおける腫瘍埋込み後の様々な時点における腫瘍体積を示す。図42Eは、アイソタイプ、抗mCTLA-4単独、抗mNK G2A単独、または抗mNK G2Aおよび抗mCTLA-4の組合せで処置したマウスにおける、時間(腫瘍埋込み後の日数)の関数としての平均腫瘍体積を示す。

40

【図43】図43は、マウスリンパ腫モデルにおける抗NK G2A抗体、抗PD-1抗体、および抗LAG-3抗体、ならびにこれらの組合せの抗腫瘍活性を示す。抗NK G2A抗体を単独で投与することには、生存率10%で生存利益があった。抗NK G2A抗体と抗mPD-1抗体または抗mLAG-3抗体のいずれかとの併用療法は、それぞれ、生存率を50%および70%延長した。抗mNK G2A抗体、抗mPD-1抗体、および抗mLAG-3抗体の三重の組合せは、生存率80%で最大の利益をもたらした。

【図44】図44は、マウスCT26結腸癌モデルにおける抗mNK G2A抗体での処置の後に、NK G2A発現レベルが、脾臓および腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の両方のNK細胞において、アイソタイプと比較して低減されたことを示す。

50

【図 4 5】図 4 5 は、異なる腫瘍型における免疫組織化学によって評価される N K G 2 A 発現の結果を示す。

【図 4 6】図 4 6 は、複数の腫瘍における F I T C コンジュゲート N K G 2 A . 6 抗体の結合プロファイルを示す。

【図 4 7】図 4 7 は、免疫組織化学によって評価される、7 つの異なる腫瘍型における H L A - E 発現の結果を示す。

【図 4 8】図 4 8 は、免疫組織化学によって評価される、異なる腫瘍型における H L A - E 発現の代表的な画像を示す。

【図 4 9】図 4 9 A ~ B は、健常対照患者および癌患者にわたる可溶性 H L A - E レベルのレベルを示す。

【図 5 0】図 5 0 は、患者選択工程および本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体との併用療法を含む、本明細書において論じられる抗 N K G 2 A 抗体の臨床開発計画を示す。

【図 5 1】図 5 1 A ~ D は、B i a c o r e 分析によって判定される、N K G 2 A . 9 抗体の動態および結合親和性を示すグラフである。

【図 5 2】図 5 2 A ~ B は、スキャッチャード解析によって測定される、N K G 2 A . 9 の動態および結合親和性を示す。

【図 5 3】図 5 3 は、P 1 - 0 6 9 3 6 6 を N K G 2 A . 9 およびアイソタイプと比較した、N K 脱顆粒化アッセイの結果を示す。N K G 2 A . 9 抗体は、N K 脱顆粒化アッセイにおいて機能性を示したが、P 1 - 0 6 9 3 6 6 抗体は示さなかった。

【図 5 4】図 5 4 A ~ C は、望ましくない結合クラスターに関してインシリコ H L A 結合ツールを使用して 1 3 F 3 . A 4 抗体を分析した結果を示す。図 5 4 A ~ C は、上から下の出現順に、それぞれ、配列番号 1 9 7 ~ 2 0 4 を開示している。

【図 5 5】図 5 5 は、抗 N K G 2 A 抗体、特に、N K G 2 A . 6、N K G 2 A . 9、および N K G 2 A . 1 1 抗体の低い免疫原性リスクを示すインビトロ D C : T 細胞増殖アッセイの結果を示す。

【図 5 6】図 5 6 A ~ D は、単一サイクル動態（図 5 6 A および 5 6 C）ならびに多重サイクル動態（図 5 6 B および 5 6 D）の両方を使用して B i a c o r e によって判定される、3 7 における N K G 2 A . 9 抗体のヒト N K G 2 A - C D 9 4 ヘテロ二量体（図 5 6 A ~ B）および N K G 2 C - C D 9 4 ヘテロ二量体（図 5 6 C ~ D）との結合親和性を示す。S P R 応答は、検体の結合および解離の関数として示されている。

【図 5 7】図 5 7 は、免疫組織化学によって評価される、1 6 個の異なる腫瘍型にわたる総 H L A - E 陽性スコアの箱ひげ図を示す。総 H L A - E スコアは、腫瘍細胞における細胞質および/または膜 H L A - E 陽性率を組み合わせたパーセントとして定義される。

【発明を実施するための形態】

【0 0 4 0】

いくつかの態様では、本発明は、ヒト N K G 2 A（「h N K G 2 A」）と特異的に結合し、抗腫瘍免疫応答を刺激するアンタゴニスト活性を有する、単離された抗体、例えば、モノクローナル抗体、例えば、ヒト化、ヒト、およびキメラモノクローナル抗体を提供する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体は、特定の構造特徴、例えば、特定のアミノ酸配列を含む C D R 領域を含む。他の実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体は、ヒト N K G 2 A タンパク質との結合について、本発明の抗 N K G 2 A 抗体と競合するか、またはそれと同一もしくは類似のエピトープと結合する。

【0 0 4 1】

いくつかの態様では、本発明は、そのような抗 N K G 2 A 抗体、そのような抗 N K G 2 A 抗体またはその抗原結合断片を含むイムノコンジュゲート、および二重特異性分子、ならびに抗 N K G 2 A 抗体またはその抗原結合断片を含んで製剤化される医薬組成物を作製する方法を提供する。いくつかの態様では、本発明は、抗 N K G 2 A 抗体を、単独で、またはその他の薬剤、例えば、その他の免疫 - 腫瘍学薬剤（例えば、抗体）、化学療法、放射線療法、および/もしくは外科手術と組み合わせてのいずれかで使用して、免疫応答を増強する方法を提供する。したがって、いくつかの実施形態では、本明細書に記載される

10

20

30

40

50

抗NKGA抗体は、例えば、癌および/または感染症を安全かつ効果的に治療するためを含め、様々な状態を治療するために使用される。

#### 【0042】

免疫系の重要な役割は、正常な細胞と「外来」細胞との間の区別を行うその能力である。免疫系は、したがって、外来細胞を攻撃し、正常細胞のみを残すことができる。腫瘍は、宿主によって外来物として認識される抗原を発現する。免疫系は、免疫応答を開始するために活性化または不活性化される必要がある特定の免疫細胞上の分子である「チェックポイント」を使用する。腫瘍細胞は、これらのチェックポイントを使用して、免疫系によって攻撃されることを回避することが可能な場合がある。一部の免疫-腫瘍学薬は、チェックポイント阻害剤として作用することによって、これらのチェックポイントを標的とする。プログラム死タンパク質1(PD-1)は、T細胞が体内の他の細胞を攻撃することを防止するための制動として作用する、チェックポイント阻害剤である。PD-1は、一部の正常(および癌)細胞上のタンパク質であるプログラム死リガンド1(PD-L1)と結合した場合に、これを行う。PD-1がPD-L1と結合すると、この相互作用は、T細胞に、他の細胞を攻撃しないようにシグナルを送る。一部の癌細胞は、大量のPD-L1を有しており、これが、癌細胞が免疫攻撃を回避するのを補助している。このPD-1/PD-L1相互作用を標的とするモノクローナル抗体などの治療剤、例えば、ニボルマブ(Opdivo(登録商標))は、PD-1/PD-L1結合を遮断して、腫瘍細胞に対する身体の免疫応答を増大させることができる。

#### 【0043】

ナチュラルキラー細胞阻害性受容体2A群(NKG2A)は、NKG2C、NKG2D、およびNKG2Eも含まれるNKG2レクチン受容体ファミリーのメンバーである。(Iwaszko and Bogunia-Kubik, Arch Immunol Ther Exp, 59:353-67 (2011))。NKG2A、NKG2C、およびNKG2Eは、細胞外ドメインのアミノ酸配列に高い相同性を有し、一方で、NKG2Dは、機能的に異なる種類の受容体である。NKG2Aは、CD94とヘテロ二量体を形成する。NKG2/CD94ヘテロ二量体の中で、NKG2A/CD94は、阻害性機能を有する唯一の受容体であり、一方でNKG2C/CD94およびNKG2E/CD94は、活性化受容体である。NKG2Dもまた、活性化受容体であるが、これは、CD94とヘテロ二量体を形成せず、またNKG2DがHLA-Eと結合することもない。NKG2/CD94受容体は、ヒトにおけるヒト白血球抗原-E(HLA-E)およびマウスにおけるQa-1である非古典的主要組織適合(MHC)クラスI分子を認識する。(Braud et al, Nature, 391:795-99 (1998), Vance et al., J. Exp. Med. 188:1841-48 (1998)。NKG2A/CD94は、NKG2C/CD94よりも約6倍強い親和性で、HLA-Eと結合する。同著。NKG2Aは、ナチュラルキラー(NK)、エフェクター/メモリーCD8<sup>+</sup> T、NKT、およびガンマデルタ(γδ) T細胞に発現する。NKG2A発現は、T細胞受容体(TCR)の結合によって、およびIL-2、IL-10、IL-15、IL-18、IL-21を含む特定のサイトカインによる刺激後に誘導されるが、サイトカインがNKG2A発現を誘導する能力は、TCRの結合に依存する(Cho, Blood, 118:116-28 (2011))。NKG2Aは、細胞内阻害性シグナルを伝達する2つの免疫受容体チロシン依存性阻害性モチーフ(ITIMs)を有する。(Kabat et al, J. Immunol, 169:1948-58 (2002)、Le Drean El, Eur. J. Immunol 28:264076 (1998)。本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、NKG2Aタンパク質を阻害し、したがって、チェックポイント阻害剤として作用する。

#### 【0044】

##### 定義

本明細書において説明がより容易に理解され得るために、特定の用語をまず定義する。別途定義されない限り、本明細書に使用されるすべての技術用語および科学用語は、本開示が関連する当業者によって広く理解されているものと同じの意味を有する。さらなる定義は詳細な説明を通じて示されている。本明細書において提供される見出しは、全体として本明細書への参照によって理解することができる本開示の様々な態様を制限するもので

10

20

30

40

50



はない。したがって、すぐ下に定義されている用語は、本明細書を全体として参照することによってより完全に定義される。

【 0 0 4 5 】

本明細書において、「NK G 2 A」は、ヒトにおいてNK G 2 A 遺伝子によってコードされる、ナチュラルキラー細胞阻害性受容体 2 群タンパク質を指す。NK G 2 A はまた、例えば、CD 1 5 9 抗原様ファミリーメンバー A、NK 細胞受容体 A、NK G 2 A 活性化 NK 受容体、NK G 2 - A / B 活性化 NK 受容体、キラー細胞レクチン様受容体 C 1 (CD 1 5 9 a)、およびNK G 2 - A / NK G 2 - B I I 型内在性膜タンパク質としても知られている。

【 0 0 4 6 】

mRNA 転写産物の 5 つの変異体に対応するヒトNK G 2 A タンパク質の 3 つのアイソフォームが、特定されている。

【 0 0 4 7 】

変異体 1 (ヌクレオチド配列は配列番号 1 または 2 0 9 に記載され、アミノ酸配列は配列番号 2 に記載される) および変異体 3 (ヌクレオチド配列は配列番号 2 1 2 に記載され、アミノ酸配列は配列番号 1 8 2 に記載される) に対応するアイソフォーム 1 は、2 3 3 個のアミノ酸からなり、カノニカルNK G K 2 A 配列を表す。アイソフォーム 1 変異体 3 はまた、残基 2 9 におけるアスパラギン (N) がセリン (S) に変更された、単一ヌクレオチド多型 (SNP)、すなわち、N 2 9 S である天然に存在する変異体でもある (配列番号 1 8 2)。

【 0 0 4 8 】

変異体 2 (ヌクレオチド配列は配列番号 2 1 0 に記載され、アミノ酸配列は配列番号 2 0 6 に記載される) および変異体 4 (ヌクレオチド配列は配列番号 2 1 1 に記載され、アミノ酸配列は配列番号 2 0 7 に記載される) に対応するアイソフォーム 2 は、それぞれ、変異体 1 および変異体 3 と比較して、インフレームコーディングエクソンが欠如し、残基 9 6 ~ 1 1 3 が不在となっており、NK G 2 A アイソフォームNK G 2 - B とも称される。変異体 4 は、N 2 9 S SNP を有する。

【 0 0 4 9 】

変異体 5 (ヌクレオチド配列は配列番号 2 0 8 に記載され、アミノ酸配列は配列番号 2 0 5 に記載される) に対応するアイソフォーム 3 は、2 2 8 個のアミノ酸からなり、5 つの C 末端アミノ酸をコードする残基 2 2 9 ~ 2 3 3 が欠如している。この変異体もまた、N 2 9 S SNP を有する。

【 0 0 5 0 】

以下に、公知のヒトNK G K 2 A 変異体のアミノ酸配列を示す。

( 1 ) 変異体 1 : ヒトNK G K 2 A アイソフォーム 1 (ヌクレオチド配列は配列番号 1 または 2 0 9 (受託番号 NM 0 0 2 2 5 9 . 5) に記載され、アミノ酸配列は配列番号 2 (受託番号 NP 0 0 2 2 5 0 . 2、UniProt ID P 2 6 7 1 5 - 1) に記載される) :

【 化 1 】

```
MDNQGVYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGKNKS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50
DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100
HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150
NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200
SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYHCK HKL 233
```

( 配列番号 2 )

( 2 ) 変異体 2 : ヒトNK G K 2 A アイソフォーム 2 はまた、NK G 2 A アイソフォームNK G 2 B とも称される (ヌクレオチド配列は配列番号 2 1 0 (受託番号 NM 0 0 7 3 2 8 . 4) に記載され、アミノ酸配列は配列番号 2 0 6 (受託番号 NP 0 1 5 5 6 7 . 2、UniProt ID P 2 6 7 1 5 - 2) に記載される) :

## 【化 2】

MDNQGVIIYS D LNLPPNPKRQ QRKPKGNKNS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50  
 DFQGN DKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSRHCGH 100  
 CPEEWITYSN SCYYIGKERR TWEESLLACT SKNSSLLSID NEEEMKFLSI 150  
 ISPSSWIGVF RNSSHHPWVT MNGLA FKHEI KDS DNAELNC AVLQVNRLKS 200  
 AQCGSSIIYH CKHKL 215

(配列番号 206)

(3) 変異体 3: ヒト NKG2A アイソフォーム 1、太字かつ強調して示される N29S SNP を有する (ヌクレオチド配列は配列番号 212 (受託番号 NM\_213658.2) に記載され、アミノ酸配列は配列番号 182 (受託番号 NP\_998823.1 または AAL65234.1) に記載される):

10

## 【化 3】

MDNQGVIIYS D LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50  
 DFQGN DKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100  
 HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150  
 NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200  
 SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYHCK HKL 233

(配列番号 182)

20

(4) 変異体 4: ヒト NKG2A アイソフォーム 2 はまた、変異体 4 にも対応する (ヌクレオチド配列は配列番号 211 (受託番号 NM\_213657.2) に記載され、アミノ酸配列は配列番号 207 (受託番号 NP\_998822.1) に記載される):

## 【化 4】

MDNQGVIIYS D LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50  
 DFQGN DKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSRHCGH 100  
 CPEEWITYSN SCYYIGKERR TWEESLLACT SKNSSLLSID NEEEMKFLSI 150  
 ISPSSWIGVF RNSSHHPWVT MNGLA FKHEI KDS DNAELNC AVLQVNRLKS 200  
 AQCGSSIIYH CKHKL 215

30

(配列番号 207)

(5) 変異体 5: ヒト NKG2A アイソフォーム 3 はまた、NKG2A アイソフォーム C とも称される (ヌクレオチド配列は配列番号 208 (受託番号 NM\_001304448.1) に記載され、アミノ酸配列は配列番号 205 (受託番号 NM\_001291377.1) に記載される):

## 【化 5】

MDNQGVIIYS D LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50  
 DFQGN DKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100  
 HNNSSLNTRT QKARHCGHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150  
 NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200  
 SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYH 228

40

(配列番号 205)

以下の表は、上述の DNA およびタンパク質の受託番号および対応する配列番号の概要を提供する。

## 【0051】

【表 A】

<u>NKG2A</u> <u>変異体</u>	<u>配列番</u> <u>号</u>	<u>DNA受託番号</u> ( 別途示されない 限り、GenBank	<u>対応するタン</u> <u>パク質配列番</u> <u>号</u>	<u>タンパク質受託番号</u> (別途示されない限 り、GenBank)
1	1または 209	NM 002259.5	2	NP 002250.2、UniPr ot識別子P26715-1
2	210	NM 007328.4	206	NP 015567.2、UnitPr ot識別子P26715-2
3	212	NM 213658.2	182	NP 998823.1; AAL65234.1
4	211	NM 213657.2	207	NP 998822.1
5	208	NM 001304448.1	205	NP 001291377.1

10

## 【0052】

用語「抗体」または「免疫グロブリン」は、本明細書において同義的に使用され、ジスルフィド結合によって相互接続している少なくとも2つの重(H)鎖および2つの軽(L)鎖を含むタンパク質を指す。各重鎖は、重鎖可変領域(本明細書において、VHと略される)および重鎖定常領域(本明細書において、CHと略される)からなる。特定の抗体、例えば、天然に存在する抗体では、重鎖定常領域は、ヒンジならびに3つのドメイン、CH1、CH2、およびCH3からなる。特定の抗体、例えば、天然に存在するIgG抗体では、各軽鎖は、軽鎖可変領域(本明細書において、VLと略される)および軽鎖定常領域からなる。軽鎖定常領域は、1つのドメイン(本明細書において、CLと略される)からなる。VHおよびVL領域は、相補性決定領域(CDR)と呼ばれ、フレームワーク領域(FR)と呼ばれるより保存されている領域と散在している超可変性の領域にさらに細分され得る。各VHおよびVLは、以下の順序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4でアミノ末端からカルボキシ末端に配置される、3つのCDRおよび4つのFRから構成される。重鎖および軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する結合ドメインを含有する。抗体の定常領域は、免疫グロブリンの、宿主組織または因子、例えば、免疫系の種々の細胞(例えば、エフェクター細胞)および伝統的な補体系の第1の成分(C1q)との結合を媒介し得る。重鎖は、C末端リシンを有してもよく、または有さなくてもよい。本明細書において別途指定されない限り、可変領域のアミノ酸は、Kabatの番号付けシステムを使用して番号付けされ、定常領域のアミノ酸は、EUシステムを使用して番号付けされている。免疫グロブリンは、IgA、分泌型IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMを含めた、知られているアイソタイプのいずれかに由来し得る。IgGアイソタイプは、特定の種ではサブクラスに分けられる:ヒトでは、IgG1、IgG2、IgG3およびIgG4ならびにマウスでは、IgG1、IgG2a、IgG2bおよびIgG3。特定の実施形態では、本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、IgG1サブタイプのものである。免疫グロブリン、例えば、IgG1は、多くても2、3個のアミノ酸で互いに異なるいくつかのアロタイプで存在する。「抗体」は、例として、天然に存在する抗体および天然に存在しない抗体の両方、モノクローナルおよびポリクローナル抗体、キメラおよびヒト化抗体、ヒトおよび非ヒト抗体ならびに完全合成抗体を含む。

20

30

40

## 【0053】

本明細書において、「IgG抗体」は、天然に存在するIgG抗体の構造を有する、すなわち、それは、同じサブクラスの天然に存在するIgG抗体と同一の数の重鎖および軽鎖ならびにジスルフィド結合を有する。例えば、抗NKG2A IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4抗体は、2つの重鎖(HC)および2つの軽鎖(LC)からなり、

50

ここで、これらの2つの重鎖および軽鎖は、それぞれ、天然に存在するIgG1、IgG2、IgG3およびIgG4抗体において生じるものと同一の数および位置のジスルフィド架橋によって連結されている（抗体が、ジスルフィド結合を修飾するように突然変異されている場合を除く）。

#### 【0054】

「抗原」は、免疫応答をトリガーし、抗体が結合する、分子または物質である。抗体は、通常、そのコグネイト抗原と、 $10^{-5} \sim 10^{-11}$  M以下の解離定数( $K_D$ )によって反映される高親和性で特異的に結合するが、無関係の抗原とは高親和性で結合しない。約 $10^{-4}$  Mより大きい任意の $K_D$ は、一般に、非特異的結合を示すと考えられる。本明細書において、抗原と「特異的に結合する」抗体とは、抗原およびいくつかの事例では実質的に同一の抗原と、 $10^{-6}$  M以下の $K_D$ 、 $10^{-7}$  M以下、 $10^{-8}$  M以下、 $10^{-9}$  M以下、または $10^{-8}$  Mと $10^{-10}$  M以下との間の $K_D$ を有することを意味する高親和性で結合するが、無関係の抗原とは高親和性で結合しない抗体を指す。抗原は、所与の抗原に対して高度の配列同一性を示す場合、例えば、所与の抗原の配列に対して、少なくとも80%、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%、少なくとも96%、少なくとも97%、少なくとも98%、または少なくとも99%の配列同一性を示す場合、所与の抗原と「実質的に同一」である。例として、ヒトNKG2Aと特異的に結合する抗体は、いくつかの実施形態では、特定の非ヒト霊長類種に由来するNKG2A抗原（例えば、カニクイザルNKG2A）とも交差反応するが、その他の種に由来するNKG2A抗原ともNKG2A以外の抗原とは交差反応しない。

#### 【0055】

本明細書において、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語は、本明細書において同義的に使用され、抗原（例えば、ヒトNKG2A）と特異的に結合する能力を保持する抗体の1つまたは複数の部分を指す。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片または部分によって実施され得ることが示されている。抗体、例えば、本明細書に記載される抗NKG2A抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語内に包含される結合断片の例としては、

- (1) Fab断片（パライン切断に由来する断片）またはVL、VH、LC、およびCH1ドメインからなる類似の一価断片、
- (2) F(ab')<sub>2</sub>断片（ペプシン切断に由来する断片）またはヒンジ領域においてジスルフィド架橋によって連結された2つのFab断片を含む類似の二価断片、
- (3) VHおよびCH1ドメインからなるFd断片、
- (4) 抗体の単一のアームのVLおよびVHドメインからなるFv断片、
- (5) VHドメインからなる単ドメイン抗体(dAb)断片(Ward et al., (1989) Nature 341:544-46)、
- (6) 単離された相補性決定領域(CDR)、ならびに
- (7) 合成リンカーによって接続されていてもよい、2つ以上の単離されたCDRの組合せが挙げられる。

#### 【0056】

さらに、Fv断片の2つのドメイン、VLおよびVHは別個の遺伝子によってコードされるが、それらは、VLおよびVH領域対が、一価の分子（一本鎖Fv(scFv)）として知られる；例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426;およびHuston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883を参照のこと）を形成する単一のタンパク質鎖として作製されることを可能にする合成リンカーによる組換え方法を使用して接続され得る。そのような一本鎖抗体もまた、抗体の「抗原結合部分」または「抗原結合断片」という用語内に包含される。これらの抗体断片は、当業者に公知の従来の技術を使用して得られ、断片は、無傷の抗体と同様の方法で有用性についてスクリーニングされる。抗原結合部分は、組換えDNA技術によって、または無傷の免疫グロブリンの酵素的もしくは化学的切断によって生産され得る。

#### 【0057】

「二重特異性」または「二機能性抗体」は、2つの異なる結合特異性、例えば、2つの異なる重鎖／軽鎖対を有し、異なる抗原に対して特異性を有する2つの抗原結合部位を生じさせ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' 断片の連結を含めた種々の方法によって生産できる。例えば、Songsivilai & Lachmann, Clin. Exp. Immunol. 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)を参照のこと。

【0058】

本明細書において、用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均質な抗体の集団から得られた抗体を指す、すなわち、集団内の個々の抗体は、モノクローナル抗体の産生中に生じ得る可能性のある変異体を除き、実質的に類似であり、同一のエピトープと結合し（例えば、抗体は、単一の結合特異性および親和性を示す）、そのような変異体は、一般に、少量で存在している。「モノクローナル」という修飾語は、抗体が、実質的に均質な抗体集団から得られているという特徴を示すものであり、任意の特定の方法による抗体の産生を必要とするものではない。用語「ヒトモノクローナル抗体」は、単一の結合特異性を示し、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域および適宜定常領域を有する、実質的に均質な抗体集団に由来する抗体を指す。一実施形態では、ヒトモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ方法によって産生される。ハイブリドーマ方法を使用して、トランスジェニック非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスを、抗原に曝露し、B細胞として知られている白血球が、抗原と結合する抗体を産生し、それを、トランスジェニック非ヒト動物から回収する。単離されたB細胞を、不死化細胞と融合させて、ハイブリドーマと称されるハイブリッド細胞株を産生させる。一実施形態では、ハイブリドーマは、不死化細胞に融合されたヒト重鎖導入遺伝子および軽鎖導入遺伝子を含むゲノムを有する。

【0059】

本明細書において、用語「組換えヒト抗体」は、組換え手段によって調製され、発現され、作製されるか、または単離されたすべてのヒト抗体、例えば、（1）ヒト免疫グロブリン遺伝子のトランスジェニックまたは導入染色体またはそれから調製されたハイブリドーマである動物（例えば、マウス）から単離された抗体、（2）抗体を発現するよう形質転換された宿主細胞から、例えば、トランスフェクトーマから単離された抗体、（3）組換え、コンビナトリアルヒト抗体ライブラリーから単離された抗体および（4）ヒト免疫グロブリン遺伝子配列のその他のDNA配列へのスプライシングを含む任意のその他の手段によって調製され、発現され、作製されるか、または単離された抗体を含む。このような組換えヒト抗体は、生殖系列遺伝子によってコードされる特定のヒト生殖系列免疫グロブリン配列を利用する可変および定常領域を含むが、その後の再編成および例えば、抗体成熟の間に起こる突然変異を含む。当技術分野で公知のように（例えば、Lonberg (2005) Nature Biotech. 23(9):1117-1125を参照のこと）、可変領域は、外来抗原に対して特異的な抗体を形成するよう再編成する種々の遺伝子によってコードされる抗原結合ドメインを含有する。可変領域は、再配列に加えて、外来抗原に対する抗体の親和性を増大するよう、複数の単一アミノ酸変更（体細胞突然変異または高頻度突然変異とも呼ばれる）によってさらに修飾され得る。定常領域は、抗原にさらに応じて変化する（すなわち、アイソタイプスイッチ）。したがって、抗原に応じた、軽鎖および重鎖免疫グロブリンポリペプチドをコードする再編成され、体細胞突然変異された核酸分子は、元の核酸分子との配列同一性を有さない場合があるが、代わりに、実質的に同一または同様となる（例えば、少なくとも80%の同一性を有する）。

【0060】

本明細書において、「ヒト抗体」とは、フレームワークおよびCDR領域の両方が、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する可変領域を有する抗体を指す。さらに、抗体が定常領域を含有する場合には、定常領域はまた、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する。本明細書に記載される抗NKGA抗体は、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列によってコードされないアミノ酸残基（例えば、インビトロでのランダムもしくは部位特異的突然変異誘発によって、またはインビボでの体細胞突然変異によって導入された突然変異

による)を含み得る。しかし、用語「ヒト抗体」はマウスなどの別の非ヒト哺乳類種の生殖系列に由来するCDR配列が、ヒトフレームワーク配列にグラフトされている抗体を含むよう意図されない。本明細書において、用語「ヒト」および「完全ヒト」抗体は、同義的に使用される。

【0061】

「ヒト化抗体」とは、非ヒト抗体のCDRドメインの外側のアミノ酸の一部、ほとんどまたはすべてが、ヒト抗体に由来する対応するアミノ酸で置換されている抗体を指す。抗体のヒト化形態の一実施形態では、CDRドメインの外側のアミノ酸の一部、ほとんどまたはすべてが、ヒト抗体に由来するアミノ酸で置換されているが、1つまたは複数のCDR領域内の一部、ほとんどまたはすべてのアミノ酸は変更されていない。アミノ酸の小さい付加、欠失、挿入、置換、または修飾は、抗体が特定の抗原と結合することを防止しない限り許容される。「ヒト化抗体」は、元の抗体のものと同様の抗原特異性を保持する。

【0062】

「キメラ抗体」とは、可変領域がマウス抗体に由来し、定常領域がヒト抗体に由来する抗体などの、可変領域がある種に由来し、定常領域が別の種に由来する抗体を指す。

【0063】

本明細書において、「アイソタイプ」とは、抗体の重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス(例えば、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、およびIgG4を含む)、IgM、IgA(IgA1およびIgA2を含む)、IgD、ならびにIgE抗体)を指す。

【0064】

「アロタイプ」とは、特定のアイソタイプ群内の天然に存在する変異体を指し、これらの変異体は、2、3個のアミノ酸で異なっている。(例えば、Jefferis et al. (2009) m Abs 1:1を参照されたい)。本明細書に記載される抗NKGA抗体は、任意のアロタイプのものであり得る。本明細書において、「IgG1f」、「IgG1.1f」、または「IgG1.3f」アイソタイプと称される抗体は、それぞれ、アロタイプ「f」のIgG1、エフェクターレスIgG1.1、またはエフェクターレスIgG1.3抗体である。

【0065】

語句「抗原を認識する抗体」および「抗原に対して特異的な抗体」は、本明細書において、語句「抗原と特異的に結合する抗体」と同義的に使用される。

【0066】

本明細書において、「単離された抗体」は、他のタンパク質および細胞材料を実質的に含まない抗体を指す。

【0067】

本明細書において、「エフェクター機能」とは、抗体のFc領域とFc受容体もしくはリガンドとの相互作用、またはそれにより生じる生化学的事象を指す。例示的「エフェクター機能」は、C1q結合、補体依存性細胞傷害性(CDC)、Fc受容体結合、ADCCおよび抗体依存性細胞媒介性食作用(ADCP)などのFcR媒介性エフェクター機能ならびに細胞表面受容体(例えば、B細胞受容体;BCR)の下方制御を含む。このようなエフェクター機能は、一般に、結合ドメイン(例えば、抗体可変ドメイン)と組み合わされるFc領域を必要とする。

【0068】

「Fc受容体」または「FcR」は、免疫グロブリンのFc領域と結合する受容体である。IgG抗体と結合するFcRは、対立遺伝子変異体およびこれらの受容体の別法としてスプライシングされた形態を含めたFcRファミリーの受容体を含む。FcRファミリーは、3種の活性化(マウスではFcRI、FcRIIおよびFcRIV;ヒトではFcRIA、FcRIIAおよびFcRIIA)および1種の阻害性(FcRIIb、または同等にFcRIIB)受容体からなる。ヒトFcRの種々の例示的な特性は、当技術分野において公知である。先天性エフェクター細胞種の大部分は、1種または複数の活性化FcRおよび阻害性FcRIIbを同時に発現するが、ナ

10

20

30

40

50

チュラルキラー（NK）細胞は、1種の活性化Fc受容体（マウスではFcRIIIおよびヒトではFcRIIIA）を選択的に発現するが、マウスおよびヒトにおいて阻害性FcRIIbを発現しない。ヒトIgG1は、ほとんどのヒトFc受容体と結合し、結合する活性化Fc受容体の種類に関してマウスIgG2aと同等と考えられる。

#### 【0069】

本明細書において、「Fc領域」（結晶化可能断片（fragment crystallizable）領域）または「Fcドメイン」または「Fc」とは、免疫系の種々の細胞（例えば、エフェクター細胞）上に位置するFc受容体とのまたは伝統的な補体系の第1の成分（C1q）との結合を含めた、免疫グロブリンの宿主組織または因子との結合を媒介する抗体の重鎖のC末端領域を指す。したがって、Fc領域は、第1の定常領域免疫グロブリンドメイン（例えば、CH1またはCL）を除いた、抗体の定常領域を含む。IgG、IgAおよびIgDの抗体アイソタイプにおいて、Fc領域は、抗体の2つの重鎖の第2（CH2）および第3（CH3）の定常ドメインに由来する2つの同一なタンパク質断片を含む。IgMおよびIgEの抗体アイソトープにおいて、Fc領域は、それぞれのポリペプチド鎖に、3つの重鎖定常ドメイン（CHドメイン2～4）を含む。IgGについては、Fc領域は、免疫グロブリンドメインCH2およびCH3ならびにCH1ドメインとCH2ドメインとの間のヒンジを含む。免疫グロブリン重鎖のFc領域の境界の定義は、本明細書に定義されるように、多様であり得るが、ヒトIgG重鎖Fc領域は、IgG1についてはアミノ酸残基D221から、IgG2についてはV222から、IgG3についてはL221から、IgG4についてはP224から、重鎖のカルボキシ末端までのストレッチと定義され、この番号付けは、KabataeにおけるEU指数（Kabatae, et al., 1991）によるものである。ヒトIgG Fc領域のCH2ドメインは、アミノ酸237からアミノ酸340にわたり、CH3ドメインは、Fc領域のCH2ドメインのC末端側に位置する、すなわち、CH3ドメインは、IgGのアミノ酸341から、アミノ酸447または446（C末端リシン残基が不在の場合）または445（C末端グリシンおよびリシン残基が不在の場合）にわたる。本明細書において、Fc領域は、任意のアロタイプ変異体または変異体Fc（例えば、天然に存在しないFc）を含めた天然配列Fcであり得る。Fcはまた、単離において、または「Fc融合タンパク質」（例えば、抗体またはイムノアドヘシン）とも呼ばれる、「Fc領域を含む結合タンパク質」などのFcを含むタンパク質ポリペプチドに関連して、この領域を指し得る。

#### 【0070】

「天然配列Fc領域」または「天然配列Fc」は、自然界において見られるFc領域のアミノ酸配列と同一であるアミノ酸配列を有する。天然配列ヒトFc領域は、天然配列ヒトIgG1 Fc領域、天然配列ヒトIgG2 Fc領域、天然配列ヒトIgG3 Fc領域および天然配列ヒトIgG4 Fc領域ならびにそれらの天然に存在する変異体を含む。天然配列Fcは、Fcの種々のアロタイプを含む（例えば、Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1を参照のこと）。

#### 【0071】

用語「エピトープ」または「抗原決定基」とは、例えば、それを同定するために使用される特定の方法によって定義される場合、免疫グロブリンまたは抗体が特異的に結合する抗原（例えば、hNKGAタンパク質）上の部位を指す。エピトープは、（1）連続アミノ酸（通常、直鎖エピトープ）または（2）タンパク質の三次元フォールディングによって並置された非連続アミノ酸（通常、コンホメーションエピトープ）の両方から形成され得る。連続アミノ酸から形成されるエピトープは、通常、必ずではないが、変性溶媒に対する曝露の際に保持されるが、三次元フォールディングから形成されるエピトープは、通常、変性溶媒を用いる処理の際に失われる。エピトープは、通常、独特の空間コンホメーション中に少なくとも3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21または22個のアミノ酸を含む。

#### 【0072】

用語「エピトープマッピング」とは、抗体抗原認識に関与する分子決定基の同定のプロ

10

20

30

40

50

セスを指す。所与の抗体によって結合されるエピトープを決定する方法（すなわち、エピトープマッピング）は、当技術分野で周知であり、例えば、タンパク質に由来する（例えば、NKG2Aに由来する）重複ペプチドまたは連続ペプチドが、所与の抗体（例えば、抗NKG2A抗体）との反応性について試験される、免疫プロット法および免疫沈降アッセイが挙げられる。エピトープの空間コンホメーションを決定する方法として、当技術分野で公知の技術および本明細書に記載される技術、例えば、X線結晶解析、抗原突然変異分析、2次元核磁気共鳴、酵母ディスプレイ、および水素/重水素交換質量分析（HDX-MS）が挙げられる（例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G. E. Morris, Ed. (1996)を参照されたい）。

#### 【0073】

2種以上の抗体に関して、用語「同一エピトープと結合する」は、所与の方法によって決定されるように、抗体がアミノ酸残基の同一セグメントと結合することを意味する。本明細書に記載される抗体を用いて、抗体が「NKG2A上の同一エピトープ」と結合するか否かを調べる技術として、例えば、エピトープの原子分解を提供する抗原：抗体複合体の結晶のX線分析、HDX-MS、およびタンパク質の迅速光化学酸化（FPOP）などのエピトープマッピング方法が挙げられる。その他の方法は、抗体の抗原断片（例えば、タンパク質分解断片）との、または抗原の突然変異された変動との結合をモニタリングし、ここでは、抗原配列内のアミノ酸残基の修飾による結合の喪失が、アラニンスキャニング突然変異誘発（Cunningham & Wells (1985) Science 244:1081）または突然変異体標的配列変異体の酵母ディスプレイなど、エピトープ成分の指標と考えられることが多い。さらに、エピトープマッピングのための計算コンビナトリアル法を使用してもよい。これらの方法は、対象の抗体の、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーから特異的な短いペプチドを親和性単離する能力に依存する。同一のVHおよびVLまたは同一のCDR1、CDR2およびCDR3配列を有する抗体は、同一エピトープと結合すると予想される。

#### 【0074】

「標的との結合について別の抗体と競合する」抗体とは、その他の抗体の標的との結合を（部分的にまたは完全に）阻害する抗体を指す。2種の抗体が、標的との結合について互いに競合するか否か、すなわち、ある抗体が、その他の抗体の標的との結合を阻害するか否か、およびどの程度阻害するかは、公知の結合競合実験、例えば、Biacore（登録商標）表面プラズモン共鳴（SPR）分析を使用して判定することができる。特定の実施形態では、抗体は、別の抗体の標的との結合と、少なくとも50%、60%、70%、80%、90%または100%競合する、阻害する。阻害または競合のレベルは、どの抗体が「ブロック抗体」であるか（すなわち、標的とともに最初にインキュベートされるコールド抗体）に応じて異なり得る。競合アッセイは、例えば、Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harb. Protoc. 2006; doi:10.1101/pdb.prot4277 or in Chapter 11 of "Using Antibodies" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, USA 1999に記載されるように実施できる。2つの抗体は、一方の抗体が、競合実験において抗原と最初に接触するかまたは他方の抗体が最初に接触するかにかかわらず、互いに、両方の方向で少なくとも50%遮断する場合に、「交差競合する」。

#### 【0075】

2つの抗体が、結合について競合または交差競合するかどうかを判定するための競合的結合アッセイには、例えば、フローサイトメトリーによる、NKG2Aを発現するT細胞との結合についての競合が含まれる。その他の方法として、SPR（例えば、Biacore（登録商標））、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イムノアッセイ（EIA）、サンドイッチ競合アッセイ（Stahli et al., Methods in Enzymology 9:242 (1983)を参照のこと）、固相直接ピオチン-アビジンEIA（Kirkland et al., J. Immunol. 137:3614 (1986)を参照のこと）、固相直接標識化アッセイ、固相直接標識化サンドイッチアッセイ（Harlow and Lane, Antibodies: A

10

20

30

40

50



Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988)を参照のこと)、1 - 125 標識を使用する固相直接標識RIA (Morel et al., Mol. Immunol. 25(1):7 (1988)を参照のこと)、固相直接ビオチン - アビジンEIA (Cheung et al., Virology 176:546 (1990))、および直接標識化RIA (Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32:77 (1990))が挙げられる。

【0076】

本明細書において、用語「特異的結合」、「選択的結合」、「選択的に結合する」および「特異的に結合する」とは、所定の抗原上のエピトープとの抗体結合を指す。いくつかの実施形態では、抗体は、(1)例えば、分析物として所定の抗原、例えば、組換えヒトNKG2Aおよびリガンドとして抗体を使用したBiacore(登録商標)SPR機器におけるSPR技術、または抗原陽性細胞との抗体の結合のスクッチャード解析によって決定される場合に、およそ $10^{-6}$  M未満、例えば、およそ $10^{-7}$  M未満、 $10^{-8}$  M未満、 $10^{-9}$  M未満、または $10^{-10}$  M、またはさらにそれより小さい平衡解離定数( $K_D$ )で結合し、(2)所定の抗原または密接に関連する抗原以外の非特異的抗原(例えば、BSA、カゼイン)との結合に対するその親和性よりも、少なくとも2倍大きい親和性で所定の抗原と結合する。したがって、「ヒトNKG2Aと特異的に結合する」抗体とは、 $10^{-6}$  M以下、例えば、およそ $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  Mまたは $10^{-10}$  M未満またはさらにそれより小さい $K_D$ で、可溶性または細胞結合型ヒトNKG2Aと結合する抗体を指す。「カニクイザルNKG2Aと交差反応する」抗体とは、 $10^{-6}$  M以下、例えば、およそ $10^{-7}$  M、 $10^{-8}$  M、 $10^{-9}$  Mまたは $10^{-10}$  M未満またはさらにそれより低い $K_D$ でカニクイザルNKG2Aと結合する抗体を指す。

【0077】

用語「 $k_a$ 」、「 $k_{assoc}$ 」、または「 $k_{on}$ 」は、本明細書において、特定の抗体 - 抗原相互作用の結合速度定数を指して、同義的に使用される。用語「 $k_d$ 」、「 $k_{dis}$ 」、または「 $k_{off}$ 」は、本明細書において、特定の抗体 - 抗原相互作用の解離速度定数を指して、同義的に使用される。用語「 $K_D$ 」は、本明細書において、平衡解離定数を指し、これは $k_a$ に対する $k_d$ の割合(すなわち、 $k_d / k_a$ )から得られ、モル濃度(M)として表される。抗体の $K_D$ 値は、当技術分野で十分に確立された方法を使用して決定できる。抗体の $K_D$ を決定するための利用可能な方法としては、例えば、Biacore(登録商標)システムなどのバイオセンサーシステムを使用した表面プラズモン共鳴(SPR)、ならびにフローサイトメトリーおよびスクッチャード解析が挙げられるが、これらに限定されない。

【0078】

用語「 $IC_{50}$ 」は、半数阻害濃度を意味し、物質、例えば抗体が、特定の生物学的または生化学的応答を阻害する効力を測定する。換言すると、 $IC_{50}$ は、効力の尺度として使用され、 $IC_{50}$ が小さいほど、物質はより強力である。抗体またはその抗原結合断片を使用したインビトロまたはインビボアッセイの文脈において、 $IC_{50}$ は、最大の生物学的または生化学的応答を50%低減させる、抗体またはその抗原結合断片の濃度を指す。

【0079】

用語「 $EC_{50}$ 」は、半数効果濃度を意味し、物質、例えば抗体が、特定の生物学的または生化学的応答を誘導する効力を測定する。 $IC_{50}$ と同様に、 $EC_{50}$ は、効力の尺度として使用され、 $EC_{50}$ が小さいほど、物質はより強力である。抗体またはその抗原結合断片を使用したインビトロまたはインビボアッセイの文脈において、 $EC_{50}$ は、最大の生物学的または生化学的応答の50%である応答を誘導する、抗体またはその抗原結合断片の濃度を指す。

【0080】

本明細書において、「受容体占有率」または「受容体の占有率」は、免疫刺激性受容体(例えば、ヒトNKG2A)と結合している抗体(例えば、本明細書に記載される抗NKG2A抗体)の量を指す。「受容体占有率パーセント(%)」または「受容体の占有率パ

ーセント(%)」は、以下の式を使用して計算することができる： $([ \text{試験の MFI} ] / [ \text{合計の MFI} ]) \times 100$ 。平均蛍光単位(MFI)における変化は、アイソタイプ対照抗体を用いたバックグラウンド染色のMFIを、結合した抗体からのMFIから差し引くことによって計算する。総受容体レベルは、飽和量の抗体を添加して、最大発現、したがって、特定の免疫刺激性受容体のMFIを判定することによって、判定される。総受容体発現を計算する代替的な方法は、受容体占有率を計算している抗体と競合しない、同じ免疫刺激性受容体に対する抗体を使用することである。

【0081】

本明細書において、物質に適用される用語「天然に存在する」は、人間によって意図的に修飾されていない、自然に存在する物質である。例えば、実験室において人によって意図的に修飾されていない、自然界における供給源から単離され得る生物(ウイルスを含む)中に存在するポリペプチドまたはポリヌクレオチド配列が天然に存在する。

【0082】

「ポリペプチド」とは、少なくとも2個の連続して連結しているアミノ酸残基を含む鎖を指し、鎖の長さには上限はない。タンパク質中の1個または複数のアミノ酸残基は、それだけには限らないが、グリコシル化、リン酸化またはジスルフィド結合などの修飾を含有し得る。「タンパク質」は、1つまたは複数のポリペプチドを含む。

【0083】

用語「核酸分子」とは、本明細書において、DNA分子およびRNA分子を含むものとする。核酸分子は、一本鎖または二本鎖であり、相補的DNA(cDNA)であってもよい。

【0084】

用語「cDNA」または「相補的DNA」は、mRNAから作製または導出された、すなわち、非コード領域が除去された、天然に存在しない核酸分子を指す。

【0085】

本明細書において、用語「保存的配列修飾」は、アミノ酸配列を含む抗体の結合特徴に有意に影響を及ぼさないかまたはそれを変化させない、アミノ酸修飾を指す。このような保存的修飾には、アミノ酸置換、付加、および欠失が含まれる。修飾は、部位特異的突然変異誘発およびポリメラーゼ連鎖反応(PCR)媒介突然変異誘発などの当技術分野で公知の標準技術によって、本発明の抗体に導入され得る。「保存的アミノ酸置換」は、アミノ酸残基の、類似の側鎖を有するアミノ酸残基との置換を指す。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当技術分野で規定されている。これらのファミリーとして、塩基性側鎖(例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン)、酸性側鎖(例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸)、非荷電極性側鎖(例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン)、非極性側鎖(例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン)、分枝側鎖(例えば、トレオニン、バリン、イソロイシン)および芳香族側鎖(例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン)を有するアミノ酸が挙げられる。特定の実施形態では、抗NKGA抗体中の予想される非必須アミノ酸残基は、同一側鎖ファミリーに由来する別のアミノ酸残基と置換される。抗原結合を排除しないヌクレオチドおよびアミノ酸保存的置換を同定する方法は、当技術分野で周知である(例えば、Brummel et al., Biochem. 32:1180-1187 (1993); Kobayashi et al. Protein Eng. 12(10):879-884 (1999);およびBurks et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:412-417 (1997)を参照のこと)。

【0086】

核酸については、用語「実質的な相同性」は、2種の核酸またはその指定された配列は、最適にアラインされ、比較される場合に、ヌクレオチドの少なくとも約80%、少なくとも約90%~95%、または、ヌクレオチドの少なくとも約98%~99.5%において適当なヌクレオチド挿入または欠失を用いて同一であることを示す。あるいは、セグメントが選択的ハイブリダイゼーション条件下で、核酸鎖の相補体とハイブリダイズする場

10

20

30

40

50

合に、実質的な相同性が存在する。

【 0 0 8 7 】

ポリペプチドについては、用語「実質的な相同性」は、2種のポリペプチドまたはその指定された配列が、最適にアラインされ、比較される場合に、アミノ酸の少なくとも約80%、少なくとも約90%~95%、または、アミノ酸の少なくとも約98%~99.5%において適当なアミノ酸挿入または欠失を用いて同一であることを示す。

【 0 0 8 8 】

2種の配列間の同一性パーセントは、配列によって共有される同一位置の数の関数であり(すなわち、相同性パーセント=(同一位置の数)/(位置の総数)×100)、2種の配列の最適アラインメントのために導入される必要があるギャップの数、各ギャップの長さを考慮する。2種の配列間の配列の比較および同一性パーセントの決定は、以下の限定されない例に記載されるように、数学的アルゴリズムを使用して達成され得る。

【 0 0 8 9 】

2種のヌクレオチド配列間の同一性パーセントは、例えば、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラムを使用して、NWSgapdna.CMPマトリックスおよび40、50、60、70または80のギャップ加重および1、2、3、4、5または6の長さ加重を使用して決定できる。2種のヌクレオチドまたはアミノ酸配列間の同一性パーセントはまた、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれているE. MeyerおよびW. Millerのアルゴリズム(CABIOS, 4:11-17 (1989))を使用し、PAM120加重残基表、12のギャップ長ペナルティーおよび4のギャップペナルティーを使用して決定できる。さらに、2種のアミノ酸配列間の同一性パーセントは、GCGソフトウェアパッケージ中のGAPプログラム中に組み込まれたNeedlemanおよびWunsch(J. Mol. Biol. (48):444-453 (1970))アルゴリズムを使用し、Blossum 62マトリックスまたはPAM250マトリックスのいずれかおよび16、14、12、10、8、6または4のギャップ加重および1、2、3、4、5または6の長さ加重を使用して決定できる。

【 0 0 9 0 】

本明細書に記載される核酸およびタンパク質配列は、例えば、関連配列を同定するための公開データベースに対する検索を実施するための「クエリー配列」としてさらに使用され得る。このような検索は、Altschul, et al. (1990) J. Mol. Biol. 215:403-10のNBLASTおよびXBLASTプログラム(バージョン2.0)を使用して実施され得る。本明細書に記載された核酸分子と相同なヌクレオチド配列を得るために、BLASTヌクレオチド検索を、NBLASTプログラム、スコア=100、ワード長=12を用いて実施できる。本明細書に記載されたタンパク質分子と相同なアミノ酸配列を得るために、BLASTタンパク質検索を、XBLASTプログラム、スコア=50、ワード長(word length)=3を用いて実施できる。比較目的でギャップ付きアラインメントを得るために、Altschul et al., (1997) Nucleic Acids Res. 25(17):3389-3402に記載されるようなギャップ付きBLASTを利用できる。BLASTおよびGapped BLASTプログラムを利用する場合には、それぞれのプログラムのデフォルトパラメーター(例えば、XBLASTおよびNBLAST)を使用できる。(例えば、National Center for Biotechnology Information (NCBI)、<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>で入手可能を参照されたい)。

【 0 0 9 1 】

核酸は、全細胞、例えば、宿主細胞中に、細胞溶解物中に、または部分精製されたかもしくはは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、アガロースゲル電気泳動および当技術分野で周知のその他のものを含めた標準技術によって、その他の細胞成分またはその他の夾雑物、例えば、その他の細胞性核酸(例えば、染色体のその他の部分)またはタンパク質から精製された場合に「単離される」かまたは「実質的に純粋にされる」。(F. Ausubel, et al., ed. Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Inter

10

20

30

40

50

science, New York (1987)を参照のこと)。

【0092】

本明細書において、用語「ベクター」は、それに連結している別の核酸を輸送可能な核酸分子を指すものとする。ある種のベクターは、「プラスミド」であり、これは、さらなるDNAセグメントがライゲーションされ得る環状二本鎖DNAループを指す。別の種類のベクターは、ウイルスベクターであり、これでは、さらなるDNAセグメントがウイルスゲノム中にライゲーションされ得る。特定のベクターは、それらが導入される宿主細胞において自己複製可能である(例えば、細菌複製起点を有する細菌ベクターおよびエピソード哺乳動物ベクター)。その他のベクター(例えば、非エピソード哺乳動物ベクター)は、宿主細胞への導入の際に宿主細胞のゲノム中に組み込まれ、それによって、宿主ゲノムとともに複製され得る。さらに、特定のベクターは、作動可能に連結されている遺伝子の発現を指示可能である。このようなベクターは、本明細書において、「組換え発現ベクター」(または単に「発現ベクター」)と呼ばれる。組換えDNA技術において有用な発現ベクターとしては、プラスミドが挙げられる。プラスミドは、ベクターの最もよく使用される形態であるので、本明細書では、「プラスミド」および「ベクター」は、同義的に使用され得る。しかし、同等の機能を果たす、ウイルスベクター(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルスおよびアデノ随伴ウイルス)などのその他の形態の発現ベクターもまた含まれる。

10

【0093】

用語「宿主細胞」または「組換え宿主細胞」は、同義的に使用され、細胞中に天然に存在しない核酸を含み、組換え発現ベクターが導入されている細胞であり得る細胞を指す。このような用語は、特定の対象細胞を指すだけでなく、このような細胞の後代も指すということは理解されなければならない。特定の修飾は、突然変異または環境的影響のいずれかによって後世において起こり得るので、このような後代は実際、親の細胞と同一ではない場合もあるが、本明細書において、用語「宿主細胞」の範囲内に依然として含まれる。

20

【0094】

「免疫応答」とは、当技術分野において理解される通りであり、一般に、外来作用物質または異常な、例えば、癌性細胞に対する、脊椎動物における生物学的応答を指し、この応答は、これらの作用物質およびそれらによって引き起こされる疾患から脊椎動物を保護する。免疫応答は、免疫系の1つまたは複数の細胞(例えば、Tリンパ球、Bリンパ球、ナチュラルキラー(NK)細胞、マクロファージ、好酸球、肥満細胞、樹状細胞、または好中球)およびこれらの細胞のいずれかまたは肝臓によって産生される可溶性高分子(抗体、サイトカイン、および補体を含む)の作用によって媒介され、これは、進入する病原体、病原体に感染した細胞もしくは組織、癌性もしくはその他の異常な細胞、または自己免疫もしくは病的炎症の場合には、例えばヒト細胞もしくは組織を含む、正常な細胞もしくは組織の、選択的標的化、それらとの結合、それらの損傷、それらの破壊、および/またはそれらの脊椎動物の身体からの排除をもたらす。免疫反応は、例えば、T細胞、例えば、CD4+もしくはCD8+ T細胞などのエフェクターT細胞もしくはヘルパーT(Th)細胞の活性化もしくは阻害、またはTreg細胞の阻害もしくは枯渇を含む。

30

【0095】

「エフェクターT」(「Teff」)細胞は、細胞溶解活性を有するT細胞(例えば、CD4+およびCD8+ T細胞)、ならびにヘルパーT(Th)細胞である。Th細胞は、サイトカインを分泌し、他の免疫細胞を活性化および指向させるが、制御性T細胞(Treg細胞)は含まれない。

40

【0096】

制御性T(「Treg」)細胞は、免疫系を調節し、自己抗原に対する寛容性を維持し、自己免疫疾患を防止する、T細胞の部分集団である。メモリーB細胞は、一次感染後に胚中心内に形成されるB細胞サブタイプであり、再感染した場合に加速されたより強力な抗体媒介免疫応答を発生させるのに重要である(二次免疫応答としても知られている)。

【0097】

50

「ナチュラルキラー」(NK)細胞は、病原体および腫瘍に対する免疫応答の重要な媒介因子であり、先天免疫系の一部である。NK細胞はまた、獲得免疫応答を制御する役割も有し、異なる状況において、T細胞応答を刺激または阻害することが示されている。NK細胞は、ウイルス感染細胞に対して急速な応答を提供し、腫瘍形成に応答する。

【0098】

本明細書において、用語「T細胞媒介性応答」とは、T細胞、例えば、エフェクターT細胞(例えば、CD8+細胞)およびヘルパーT細胞(例えば、CD4+細胞)によって媒介される応答を指す。T細胞媒介性応答は、例えば、T細胞細胞傷害性および増殖を含む。

【0099】

本明細書において、用語「細胞傷害性Tリンパ球(CTL)応答」とは、細胞傷害性T細胞によって誘導される免疫応答を指す。CTL応答は、例えば、CD8+ T細胞によって媒介される。

【0100】

「免疫調節物質(immunomodulator)」または「免疫制御物質(immunoregulator)」とは、免疫応答の調節、制御、または修飾に関与し得る作用物質、例えば、シグナル伝達経路の成分を指す。免疫応答の「調節」、「制御」、または「修飾」とは、免疫系の細胞における、またはこのような細胞(例えば、エフェクターT細胞、例えば、Th1細胞)の活性における任意の変更を指す。このような調節は、免疫系の刺激または抑制を含み、種々の細胞型の数の増大もしくは減少、これらの細胞の活性の増大もしくは減少、および/または免疫系内で起こり得る任意のその他の変化によって示され得る。阻害的および刺激的免疫調節物質の両方とも同定されており、その一部は、腫瘍微小環境において増強された機能を有し得る。いくつかの実施形態では、免疫調節物質は、T細胞の表面に位置する。「免疫調節性標的」または「免疫制御性標的」は、物質、作用物質、部分、化合物または分子による結合に対して標的化される免疫調節物質であり、その活性は、物質、作用物質、部分、化合物または分子の結合によって変更される。免疫調節性標的は、例えば、細胞の表面の受容体(「免疫調節性受容体」)および受容体リガンド(「免疫調節性リガンド」)を含む。

【0101】

「免疫療法」とは、免疫応答を誘導、増強、抑制またはそうでなければ修飾することを含む方法によって、疾患の再発に苦しむかまたはそれを起こすまたは患うリスクにある対象、例えば、ヒト対象の治療を指す。

【0102】

「免疫賦活性(immunostimulating)療法」または「免疫賦活性(immunostimulatory)療法」とは、例えば、癌を治療するための、対象における免疫応答の増大(誘導または増強)をもたらす療法を指す。

【0103】

「内因性免疫応答を増強する」とは、対象、例えば、ヒト対象における既存の免疫応答の有効性または効力を増大させることを意味する。この有効性および効力の増大は、例えば、内因性宿主免疫応答を抑制する機序を克服することによって、または内因性宿主免疫応答を増強する機序を刺激することによって達成され得る。

【0104】

本明細書において、用語「連結している」とは、2つ以上の分子の会合を指す。連結は、共有結合である場合も、非共有結合である場合もある。連結はまた、遺伝的であり(すなわち、組換えによって融合され)得る。このような連結は、化学的コンジュゲーションおよび組換えタンパク質生産などの様々な当技術分野において認識される技術を使用して達成され得る。

【0105】

本明細書において、「投与すること」は、当業者に公知の種々の方法および送達システムのいずれかを使用して、治療剤、例えば、抗NKGA抗体を含む組成物の対象への物

10

20

30

40

50

理的導入を指す。「投与すること」には、例えば、他者、例えば、1人または複数の医療従事者などによるヒト患者への投与、およびヒト患者による自己投与が含まれる。本明細書に記載される抗体の様々な投与経路は、静脈内、腹腔内、筋肉内、皮下、脊髄または例えば、注射もしくは注入によるその他の非経口投与経路を含む。本明細書において、語句「非経口投与」とは、経腸および局所投与以外の、例えば、注射による投与様式を意味し、制限するものではないが、静脈内、腹腔内、筋肉内、動脈内、くも膜下腔内、リンパ内、病巣内、関節内、眼窩内、心臓内、皮内、経気管、皮下、表皮下、関節内、嚢下、くも膜下、脊髄内、硬膜外および胸骨内注射および注入ならびにインビボエレクトロポレーションを含む。あるいは、本明細書に記載される抗体は、局所、上皮または粘膜投与経路などの非経口ではない経路によって、例えば、鼻腔内に、経口的に、経膈的に、直腸性に、舌下にまたは局所的に投与され得る。投与することは、例えば、1回、複数回および/または1回もしくは複数回の長期間にわたって実施され得る。

10

#### 【0106】

本明細書において、「補助的」投与または「組合せ」投与（共投与）には、同じかもしくは異なる剤形での化合物の同時投与または化合物の別個の投与（例えば、逐次投与）が含まれる。したがって、第1の抗体、例えば、抗NKG2A抗体、および第2、第3、またはそれ以上の抗体は、単一の製剤において同時に投与することができる。あるいは、第1および第2（またはそれ以上）の抗体は、別個の投与のために製剤化することができ、並行してまたは逐次的に投与される。「併用」療法は、本明細書において、協働様式での2つ以上の治療剤の投与を意味し、同時投薬が含まれるがこれに限定されない。具体的には、併用療法は、共投与（例えば、共製剤の投与または別個の治療用組成物の同時投与）、および連続的または逐次的投与の両方を包含するが、1つの治療剤の投与が、何らかの方法で別の治療剤の投与を左右することを条件とする。例えば、1つの治療剤は、異なる治療剤が投与され所定の期間の作用が許容された後にのみ投与することができる。（例えば、Kohrt et al. (2011) Blood 117:2423を参照されたい）。

20

#### 【0107】

例えば、抗NKG2A抗体がまず投与され、続いて（例えば、直後に続いて）第2の抗体の投与が行われてもよく、またはその逆であってもよい。一実施形態では、抗NKG2A抗体は、第2の抗体の投与の前に投与される。別の実施形態では、抗NKG2A抗体は、例えば、第2の抗体の約30分以内に投与される。このような同時投与または逐次投与は、好ましくは、治療される患者に、両方の抗体が同時に存在することをもたらす。

30

#### 【0108】

本明細書において、用語「阻害する」または「遮断する」は、同義的に使用され、部分的小および完全阻害/遮断の両方を包含する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、例えば、本明細書においてさらに記載されるように判定される場合、NKG2AのHLA-Eとの結合を、少なくとも約50%、例えば、約60%、70%、80%、90%、95%、99%、または100%阻害する。いくつかの実施形態では、抗NKG2A抗体は、例えば、本明細書においてさらに記載されるように判定される場合、NKG2AのHLA-Eとの結合を、50%以下、例えば、約40%、30%、20%、10%、5%、または1%阻害する。

40

#### 【0109】

本明細書において、「癌」は、身体中での異常な細胞の制御されない成長を特徴とする疾患の広い群を指す。未制御細胞成長または分裂は、隣接する組織へ浸潤し、リンパ系または血流によって身体の遠隔部位へ転移し得る悪性腫瘍または細胞の形成をもたらし得る。

#### 【0110】

用語「治療する」、「治療すること」および「治療」とは、本明細書において、症状の進行、発生、重症度もしくは再発、合併症、疾病と関連している状態または生化学的兆候を逆転させ、軽減し、寛解し、阻害し、または減速することを目的とした、対象で実施される任意の種類の介入もしくはプロセスまたは対象へ活性薬剤を投与することを指す。対照的に、「予防」または「防止」とは、疾患が発生するのを防ぐための、疾患を有してい

50

ない対象への投与を指す。本明細書において、「治療する」、「治療すること」、および「治療」は、予防または防止を包含しない。

【0111】

用語「有効用量」または「有効投与量」は、所望の効果を達成または少なくとも部分的に達成するのに十分な量と定義される。薬物または治療薬の「治療上有効な量」または「治療上有効な投与量」は、単独で、または別の治療薬と組み合わせて使用される場合に、疾患症状の重症度の低減、疾患症状のない期間の頻度および期間の増大または疾患苦痛による機能障害もしくは能力障害の防止によって証明される疾患退縮を促進する薬物の任意の量である。薬物の「予防的有効量」または「予防的有効投与量」は、単独で、または別の治療剤と組み合わせて、疾患を発生するか、または疾患の再発を患うリスクにある対象に投与される場合に、疾患の発生または再発を防止する薬物の量である。疾患退縮を促進する治療剤の能力または疾患の発生もしくは再発を防止する予防剤の能力は、臨床試験の際にヒト対象において、ヒトにおける有効性を予測する動物モデル系において、インビトロアッセイにおいて薬剤の活性をアッセイすることによってなど、当業者に公知の種々の方法を使用して評価することができる。

10

【0112】

本明細書に提供される方法のいずれかによる、抗NKG2A抗体単独で、または例えば、抗PD-1抗体との組合せ、抗PD-L1抗体との組合せ、もしくは抗CTLA-4抗体との組合せでの抗NKG2A抗体の有効量の投与は、例えば、腫瘍成長もしくはサイズの低減、経時的に出現する転移病変数の低減、完全寛解、部分寛解、または疾患の安定を含む、少なくとも1つの治療効果をもたらし得る。例えば、治療の方法は、抗NKG2A抗体の投与なしで達成されるものよりも、または組み合わせた抗体のうちのいずれか単独の投与で達成されるものよりも良好な、比較臨床有用率（clinical benefit rate）（ $CBR = \text{完全寛解（CR）} + \text{部分寛解（PR）} + \text{疾患の安定（SD）}$ が6ヶ月以上継続）をもたらし、例えば、臨床有用率の改善が、約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、またはそれ以上である。

20

【0113】

例として、抗癌剤は、ヒト対象を含む対象において、癌進行を減速するか、または癌退縮を促進する薬物である。いくつかの実施形態では、治療上有効な量の薬物は、癌を排除するところまで癌退縮を促進する。「癌退縮を促進すること」とは、有効量の薬物を、単独でまたは抗新生物剤と組み合わせて投与することが、患者において、腫瘍成長または大きさの低減、腫瘍の壊死、少なくとも1種の疾患症状の重症度の低下、疾患症状のない期間の頻度および期間の増大、疾患苦痛による機能障害もしくは能力障害の防止またはそうでなければ疾患症状の寛解をもたらすことを意味する。「薬理学的有効性」、「有効性」、または「効力」とは、薬物が患者において癌退縮を促進する能力を指す。「生理学的安全性」とは、薬物の投与に起因する、容認できるほど低レベルの毒性または細胞、臓器および/または生物レベルでのその他の有害な生理学的効果（有害効果）を指す。

30

【0114】

例として、腫瘍の治療に関して、薬物の治療上有効な量または投与量は、未治療の対象と比較して、腫瘍細胞成長を、少なくとも約20%、少なくとも約30%、少なくとも約40%、少なくとも約50%、少なくとも約60%、少なくとも約70%超、少なくとも約80%、または少なくとも約90%阻害する。いくつかの実施形態では、薬物の治療上有効な量または投与量は、細胞成長または腫瘍成長を完全に阻害し、すなわち、細胞成長または腫瘍成長を100%阻害する。抗体を含む、化合物の腫瘍成長を阻害する能力は、本明細書に記載されるアッセイを使用して評価することができる。あるいは、組成物のこの特性は、化合物の細胞成長を阻害する能力を調べることによって評価することができ、このような阻害は、当業者に公知のアッセイによってインビトロで測定することができる。いくつかの実施形態では、腫瘍成長の阻害は、治療の直後ではない場合があり、ある期間の後または反復投与後にしか生じない場合がある。本明細書に記載される他の実施形態では、腫瘍退縮が観察され、少なくとも約20日間、少なくとも約30日間、少なくとも約

40

50

40日間、少なくとも約50日間、もしくは少なくとも約60日間、またはそれ以上、継続される。

【0115】

本明細書において、用語「固定用量」、「一定用量」、および「一定固定用量」は、同義的に使用され、患者の体重または体表面積に関係なく、患者に投与される用量を指す。固定または一定用量は、したがって、mg/kg用量ではなく、むしろ治療剤の絶対量として提供される。

【0116】

本明細書において、用語「体重に基づく」用量または投薬とは、患者に投与される用量が、患者の体重に基づいて計算されることを意味する。例えば、60kgの患者が、3mg/kgの抗NKG2A抗体を必要とする場合、投与に適切な量の抗NKG2A抗体（すなわち、180mg）を計算し、使用することができる。

10

【0117】

「患者」という用語には、治療的または予防的処置のいずれかを受けるヒト対象および他の哺乳動物対象が含まれる。

【0118】

用語「対象」には、ヒトおよび非ヒト動物が含まれる。例えば、本明細書において開示される方法および組成物は、癌を有する対象を治療するために使用され得る。非ヒト動物には、すべての脊椎動物、例えば、非ヒト霊長類、ヒツジ、イヌ、ウシ、ニワトリを含む哺乳動物および非哺乳動物、両生類、爬虫類などが含まれる。一実施形態では、対象は、ヒト対象である。

20

【0119】

本明細書において、「1つの(a)」または「1つの(an)」実体という用語は、別途示されない限り、その実体の1つまたは複数を指し、例えば、「1つのヌクレオチド配列」は、1つまたは複数のヌクレオチド配列を表すことが理解される。したがって、「1つの(a)」または「1つの(an)」、「1つまたは複数の」、および「少なくとも1つの」という用語は、本明細書において同義的に使用することができる。

【0120】

本明細書において、「および/または」は、2つの指定された特徴または構成要素のそれぞれが、互いを伴う場合も伴わない場合もあるという具体的な開示として解釈されるものとする。したがって、用語「および/または」は、「Aおよび/またはB」といった語句において使用される場合、「AおよびB」、「AまたはB」、「A」単独、ならびに「B」単独を含む。同様に、用語「および/または」は、「A、B、および/またはC」といった語句において使用されるとき、以下：A、BおよびC；A、BまたはC；AまたはC；AまたはB；BまたはC；AおよびC；AおよびB；BおよびC；A単独；B単独；ならびにC単独のそれぞれを包含する。

30

【0121】

態様が、「含む(comprising)」という言葉を用いて本明細書に記載されている場合、別途「からなる」および/または「から本質的になる」という用語で記載される類似の態様もまた提供されることが理解される。

40

【0122】

単位、接頭辞、および記号は、別途示されない限り、国際単位系(SI)に認められた形式で示される。数値範囲は、その範囲を定める数を含む。別途示されない限り、ヌクレオチド配列は、左から右に、5'から3'の方向で記述される。アミノ酸配列は、左から右に、アミノからカルボキシの方向で記述される。

【0123】

本明細書において、用語「約」または「およそ」とは、おおよそ、大体、またはその範囲内を意味する。用語「約」が、数値範囲とともに使用されている場合、この用語は、境界を、記載されている数値の上下に拡大することにより、その範囲を修飾する。一般に、用語「約」は、数値を、記述された値の上下、例えば、10パーセント上または下(高い

50



かまたは低い)に修飾し得る。

【0124】

本明細書において提供される見出しは、本開示の様々な態様を制限するものではなく、全体として本明細書への参照によって読み取るべきである。したがって、すぐ下に定義されている用語は、本明細書を全体として参照することによってより完全に定義される。本明細書に記載される種々の態様は、以下のサブセクションにおいてさらに詳細に記載される。

【0125】

I. 抗NKG2A抗体

本開示は、いくつかの実施形態において、望ましい機能または特性を有する抗NKG2A抗体、例えば、完全ヒト、ヒト化、およびキメラ抗体について記載する。例えば、抗体は、高い親和性で、ヒトNKG2Aタンパク質と特異的に結合する。特定の実施形態では、抗体は、免疫細胞、例えば、T細胞およびNK細胞においてNKG2A媒介性阻害を遮断または逆転させる、アンタゴニスト抗体である。いくつかの実施形態では、抗ヒトNKG2A(抗hуNKG2A)抗体は、疾患、例えば、癌または感染を治療する際に治療剤として使用するのに望ましい特性を有する。

10

【0126】

本明細書に記載される特定の抗NKG2A抗体は、本明細書に記載される単離され構造的に特徴付けられている抗体13F3.A4、NKG2A.6、NKG2A.7、NKG2A.8、NKG2A.9、NKG2A.11のCDRおよび/または可変領域配列を有する抗体、ならびに本明細書に記載される抗NKG2A抗体のアミノ酸配列に対して少なくとも80%の同一性(例えば、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または少なくとも99%の同一性)を有する抗体である。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、本明細書に記載される抗NKG2A抗体の可変領域またはCDR配列に対して、少なくとも80%の同一性(例えば、少なくとも85%の同一性、少なくとも90%の同一性、少なくとも95%の同一性、または少なくとも99%の同一性)を有する。

20

【0127】

いくつかの態様では、本発明の抗体は、具体的な機能的特徴または特性によって特徴付けられる。例えば、抗体は、高い親和性で、ヒトNKG2Aと特異的に結合する。いくつかの実施形態では、抗NKG2A抗体は、NKG2AのそのリガンドHLA-Eとの結合を阻害し、これにより、HLA-Eを発現する腫瘍に対するNKおよびT細胞応答が回復する。換言すると、本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、NKG2Aタンパク質とそのリガンドであるHLA-Eとの相互作用を阻害または遮断することによって、T細胞およびNK細胞の抗腫瘍応答を刺激する。

30

【0128】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、以下の特性：  
(1) ヒトNKG2Aタンパク質と特異的に結合すること、  
(2) NKG2Aリガンド(例えば、ヒトにおけるHLA-E)のヒトNKG2Aタンパク質との結合および/もしくは相互作用を遮断もしくは低減すること(他の実施形態では、本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、NKG2Aリガンドの非ヒトNKG2Aタンパク質との結合および/もしくは相互作用を遮断もしくは低減する)、  
(3) NKG2Aに媒介される阻害性シグナル伝達を逆転させること、  
(4) ヒトNKG2Cタンパク質と結合しないか、もしくは低い親和性で結合すること、  
(5) 高い親和性で、ヒトおよびカニクイザルNKG2Aと結合すること、  
(6) マウスもしくはラットNKG2Aと結合しないか、もしくはそれに対して低い親和性を示すこと、  
(7) HLA-EのNKG2Cタンパク質との結合による活性化シグナルを妨害しないこと、  
(8) ヒトFcガンマ受容体(FcR)との結合が低減されていること、

40

50

( 9 ) 抗腫瘍免疫応答を誘導および / もしくは増強すること、  
 ( 1 0 ) T 細胞の機能的活性を増強すること (いくつかの実施形態では、例えば、H L A - E 発現腫瘍細胞の溶解によって測定される場合、細胞傷害性 T 細胞機能を増大させること)、

( 1 1 ) 例えば、ナチュラルキラー ( N K ) 細胞活性化を誘導することによって、N K 細胞の機能的活性を増強すること、

( 1 2 ) サイトカイン、例えば、I F N 産生を増大させること、ならびに / または

( 1 3 ) H D X - M S および / もしくは F P O P エピトープマッピングによって判定される場合、以下のアミノ酸残基 :

領域 1 : <sup>1 5 5</sup> L S I D N E E E M K F <sup>1 6 5</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 5 5 ~ 1 6 5

10

領域 2 : <sup>1 7 1</sup> P S S W I G V F R N S S H H P W <sup>1 8 6</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 7 1 ~ 1 8 6 、

領域 3 : <sup>1 9 2</sup> L A F K H E I K D S D N <sup>2 0 3</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 9 2 ~ 2 0 3 、

領域 4 : L ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 2 0 6 ) 、および

領域 5 : <sup>2 1 2</sup> Q V N R L K S A Q C G S S I I Y H C <sup>2 2 9</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 2 1 2 ~ 2 2 9 )

を含む不連続な領域内に位置するエピトープと特異的に結合すること、

( 1 4 ) H D X - M S によって判定される場合、以下のアミノ酸残基 :

20

領域 1 : <sup>1 5 5</sup> L S I D N E E E M K F <sup>1 6 5</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 5 5 ~ 1 6 5 ) 、

領域 2 : <sup>1 7 1</sup> P S S W I G V F R N S S H H P W <sup>1 8 6</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 7 1 ~ 1 8 6 ) 、

領域 3 : <sup>1 9 2</sup> L A F K H E I K D S D N <sup>2 0 3</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 9 2 ~ 2 0 3 ) 、および

領域 5 : <sup>2 1 2</sup> Q V N R L K S A Q C G S S I I Y H C <sup>2 2 9</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 2 1 2 ~ 2 2 9 )

を含む不連続な領域内に位置するエピトープと特異的に結合すること、

のうちの 1 つまたは複数を示す。

30

【 0 1 2 9 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体は、高い親和性で、ヒトおよびカニクイザル N K G 2 A と結合し、非霊長類 N K G 2 A 、例えば、マウスまたはラット N K G 2 A とは結合しないか、または低い親和性で結合する。具体的には、いくつかの実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体は、以下の特性 :

( a ) 細胞結合アッセイによって測定される場合、ヒト N K G 2 A タンパク質との結合に関して、約 0 . 6 n M 以下の E C <sub>50</sub> 値を有すること、

( b ) 細胞結合アッセイによって測定される場合、ヒト N K G 2 C タンパク質との結合に関して、約 9 . 0 n M 以上の E C <sub>50</sub> 値を有すること、

( c ) 細胞遮断アッセイによって測定される場合、H L A - E のヒト N K G 2 A タンパク質との結合および / もしくは相互作用を低減することに関して、約 1 . 0 n M 以下の I C <sub>50</sub> 値を有すること、

40

( d ) スキャッチャード解析によって測定される場合、約 0 . 4 n M 以下の K <sub>D</sub> で、ヒト N K G 2 A タンパク質と結合すること、

( e ) 表面プラズモン共鳴によって測定される場合、約 6 1 n M 以下の K <sub>D</sub> で、ヒト N K G 2 A タンパク質と結合すること、

( f ) スキャッチャード解析によって測定される場合、約 1 . 0 n M 以下の K <sub>D</sub> で、カニクイザル N K G 2 A タンパク質と結合すること、

( g ) N K G 2 A 発現細胞と結合すると、内部移行されること、

( h ) インターフェロン - ガンマ ( I F N ) 産生を増大させること、ならびに / または

50

( i ) 抗 N K G 2 A 抗体 : N K G 2 A タンパク質複合体の半減期が、約 4 0 秒以上であること

のうちの 1 つまたは複数を示す。

【 0 1 3 0 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体は、N K G 2 A リガンド ( ヒトにおける H L A - E ) のヒト N K G 2 A タンパク質との結合および / または相互作用を遮断する。具体的には、いくつかの実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体は、以下の特性 :

a ) 抗 N K G 2 A 抗体が、N K L については約 0 . 3 0 n M の  $I C_{50}$  および C H O - h N K G 2 A 細胞については約 1 . 0 n M の  $I C_{50}$  で、H L A - E 五量体がヒト N K G 2 A を発現する細胞と結合するのを遮断すること、

b ) H N K G 2 A - C D 9 4 - m F c またはカニクイザル N K G 2 A - C D 9 4 - m F c タンパク質と複合体を形成した抗 N K G 2 A 抗体が、ヒト H L A - E 結合を遮断することのうちの 1 つまたは複数を示す。

【 0 1 3 1 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体は、ヒト N K G 2 A に特異的である。具体的には、いくつかの実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体は、以下の特性 :

a ) 抗 N K G 2 A 抗体のヒト N K G 2 A との結合に関して、抗 N K G 2 A 抗体のヒト N K G 2 C タンパク質との結合に関する第 2 の  $E C_{50}$  値よりも約 1 5 倍低い  $E C_{50}$  値を有すること。いくつかの実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体のヒト N K G 2 A との結合に関する  $E C_{50}$  値は、約 0 . 6 n M であり、一方で抗 N K G 2 A 抗体のヒト N K G 2 C との結合に関する  $E C_{50}$  値は、約 9 . 0 n M であった。

b ) S P R 分析に基づいて、抗 N K G 2 A 抗体のヒト N K G 2 C との特異的結合がないこと、および / または

c ) フローサイトメトリーによって測定される場合、ヒト N K G 2 C および H L A - E の相互作用を遮断しないこと

のうちの 1 つまたは複数を示す。

【 0 1 3 2 】

いくつかの実施形態では、抗 N K G 2 A は、F c R 結合を低減または予防するために、不活性 F c を有する ( 例えば、抗体は、I g G 1 アイソタイプである ) 。いずれの理論によっても束縛されるものではないが、N K G 2 A は、C D 8 + T および N K 細胞上に発現される阻害性受容体であるため、N K G 2 A + C D 8 + T または N K 細胞のアゴニズムまたは枯渴を低減させることは、抗腫瘍機能に有益である。したがって、N K G 2 A および H L A - E の相互作用の遮断は、ヒト F c R と相互作用しない抗 N K G 2 A 抗体を用いて行うことができる。

【 0 1 3 3 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗 N K G 2 A は、T 細胞の抗腫瘍機能的活性を増強させる。具体的には、いくつかの実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体は、以下の特性 :

a ) 約 0 . 2 n M 以下の  $E C_{50}$  値で、C H O / s c O K T 3 / H L A - E によって刺激される N K G 2 A 発現 J u r k a t T 細胞株における N K - B シグナル伝達の阻害を逆転させること、

b ) C H O / s c O K T 3 / H L A - E / P D - L 1 と共培養した健常ドナー P B M C から単離した N K G 2 A + C D 8 T において、インターフェロン - ガンマ ( I F N - ) を誘導すること、

c ) C H O / s c O K T 3 / H L A - E / P D - L 1 と共培養したヒト腫瘍から単離した N K G 2 A + C D 8 T 細胞において、I F N - を誘導すること

のうちの 1 つまたは複数を示す。

【 0 1 3 4 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗NKGA抗体は、NK細胞の抗腫瘍機能的活性を増強させる。具体的には、いくつかの実施形態では、抗NKGA抗体は、以下の特性：

a) CHO/MICA/HLA-Eと共培養したNKL細胞において、IFN- $\gamma$ 産生を増大させること、

b) NK細胞脱顆粒化およびHLA-E発現腫瘍細胞の溶解の用量依存的増大を誘導すること

のうちの1つまたは複数を示す。

【0135】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗NKGA抗体は、NKGA発現細胞と結合した後に、内部移行される。具体的には、いくつかの実施形態では、抗NKGA抗体は、約0.5 nM低いまたはそれ以下のEC<sub>50</sub>で、内部移行を示す。いくつかの実施形態では、抗NKGA抗体は、約0.5 nM低いまたはそれ以下のEC<sub>50</sub>で、用量依存的内部移行を示す。

10

【0136】

いくつかの実施形態では、本発明の抗NKGA抗体は、抗体の化学的安定性を低減させる配列傾向が欠如している。本発明の抗NKGA抗体は、例えば、NKGA発現および/または活性と関連する癌およびその他の障害の治療および/または診断のための種々の重要な用途を有する。

【0137】

20

いくつかの実施形態では、アミノ酸配列によって本明細書において開示される抗NKGA抗体は、実施例4に記載されるように、ヒトNKGA上の特定のエピトープと結合する。

【0138】

ヒトNKGAとの結合は、当技術分野において十分に確立されている1つ以上の技術を使用して評価することができる。例えば、いくつかの実施形態において、抗体は、ヒトNKGAを発現する細胞株、例えば、ヒトNKGAをその細胞表面上に発現するようにトランスフェクトされているCHO細胞と抗体を反応させる、フローサイトメトリーアッセイによって試験される。さらに、またはあるいは、抗体の結合は、結合動態（例えば、K<sub>D</sub>値）を含め、Biacore結合アッセイにおいて試験することができる。なおも

30

他の好適な結合アッセイとしては、例えば、組換えヒトNKGAタンパク質を使用した、ELISAアッセイが挙げられる。

【0139】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗NKGA抗体またはその抗原結合断片は、高い親和性で、例えば、 $1 \times 10^{-6}$  M以下、 $1 \times 10^{-7}$  M以下、 $1 \times 10^{-8}$  M以下、 $1 \times 10^{-9}$  M以下、または $10^{-10}$  M以下のK<sub>D</sub>を含む、ナノモル規模の親和性で、ヒトNKGAタンパク質と結合する。

【0140】

本発明のいくつかの実施形態は、HDX-MSおよび/またはFPOPエピトープマッピングによって判定される場合、以下のアミノ酸残基：

40

領域1：<sup>155</sup>LSIDNEEEMKF<sup>165</sup>（配列番号2（天然のhNKGAアミノ酸配列）のアミノ酸残基155～165、

領域2：<sup>171</sup>PSSWIGVFRNSSHHPW<sup>186</sup>（配列番号2のアミノ酸残基171～186）、

領域3：<sup>192</sup>LAFKHEIKDSDN<sup>203</sup>（配列番号2のアミノ酸残基192～203）、

領域4：L（配列番号2のアミノ酸残基206）、および

領域5：<sup>212</sup>QVNRLKSAQC GSSIIYHC<sup>229</sup>（配列番号2のアミノ酸残基212～229）

を含む不連続な領域内に位置するエピトープと特異的に結合する、抗NKGAモノクロ

50

ーナル抗体またはその抗原結合部分に関する。

【 0 1 4 1 】

いくつかの実施形態では、本発明は、H D X - M S によって判定される場合、以下のアミノ酸残基：

領域 1 : <sup>1 5 5</sup> L S I D N E E E M K F <sup>1 6 5</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 5 5 ~ 1 6 5 )、

領域 2 : <sup>1 7 1</sup> P S S W I G V F R N S S H H P W <sup>1 8 6</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 7 1 ~ 1 8 6 )、

領域 3 : <sup>1 9 2</sup> L A F K H E I K D S D N <sup>2 0 3</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 9 2 ~ 2 0 3 )、および

領域 5 : <sup>2 1 2</sup> Q V N R L K S A Q C G S S I I Y H C <sup>2 2 9</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 2 1 2 ~ 2 2 9 )

を含む不連続な領域内に位置するエピトープと特異的に結合する、抗 N K G 2 A モノクローナル抗体またはその抗原結合部分を対象とする。

【 0 1 4 2 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体は、N K G 2 A / H L A - E に媒介される阻害を遮断することによって、N K 細胞機能を増強させる。別の実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体は、ヒト N K G 2 A タンパク質と結合し、抗腫瘍免疫応答、例えば、抗原特異的 T 細胞および / または N K 細胞応答を刺激する。抗 N K G 2 A 抗体が免疫応答を刺激する能力は、本明細書の実施例に記載されるように、インビボ腫瘍グラフトモデルにおけるものなど、腫瘍成長を測定することによって試験することができる。他の実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体またはその抗原結合部分は、N K G 2 A 発現 T 細胞においてサイトカイン産生 ( 例えば、インターフェロン - ガンマ ( I F N - ) ) を増大させ、かつ / またはエフェクター T 細胞および細胞傷害性 T 細胞 ( C D 8 + T 細胞としても知られる ) を含む T 細胞増殖を増大させる。

【 0 1 4 3 】

別の実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体またはその抗原結合断片は、ヒト N K G 2 A と結合し、以下の特性：

a ) H D X - M S および / もしくは F P O P エピトープマッピングによって判定される場合、以下の残基のうちの 1 つもしくは複数と結合すること：

領域 1 : <sup>1 5 5</sup> L S I D N E E E M K F <sup>1 6 5</sup> ( 配列番号 2 ( 天然の h N K G 2 A アミノ酸配列 ) のアミノ酸残基 1 5 5 ~ 1 6 5 )、

領域 2 : <sup>1 7 1</sup> P S S W I G V F R N S S H H P W <sup>1 8 6</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 7 1 ~ 1 8 6 )、

領域 3 : <sup>1 9 2</sup> L A F K H E I K D S D N <sup>2 0 3</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 1 9 2 ~ 2 0 3 )、

領域 4 : L ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 2 0 6 )、および

領域 5 : <sup>2 1 2</sup> Q V N R L K S A Q C G S S I I Y H C <sup>2 2 9</sup> ( 配列番号 2 のアミノ酸残基 2 1 2 ~ 2 2 9 )、

b ) N K G 2 A . 1 1 および 1 3 F 3 . A 4 抗体と同一のヒト N K G 2 A 上のエピトープと結合すること、

c ) ヒト N K G 2 A との結合について、N K G 2 A . 1 1 および 1 3 F 3 . A 4 抗体と競合すること、

d ) B i o c o r e によって測定される場合、約 0 . 4 n M の E C <sub>50</sub> で、ヒト N K 細胞と結合すること、

e ) B i a c o r e によって測定される場合、約 0 . 3 n M の I C <sub>50</sub> で、ヒト N K 細胞の H L A - E との結合を遮断すること、

f ) 約 1 n M 以下の E C <sub>50</sub> で、カニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞と結合すること、

g ) 約 9 . 0 n M 以上の E C <sub>50</sub> で、ヒト N K G 2 C との低い結合を有すること ( 換言すると、抗 N K G 2 A 抗体は、ヒト N K G 2 C の H L A - E との相互作用を遮断しない )、

ならびに / または

- h) C D 8 + T 細胞および N K 細胞の抗腫瘍応答を増強すること、例えば、
- i . 初代 T : C H O - O K T 3 - H L A - E - P D L 1 アッセイにおいて、I F N - 産生を増大させること、
- i i . T 細胞腫瘍浸潤リンパ球 ( T I L ) : C H O - O K T 3 - H L A - E - P D L 1 アッセイにおいて、I F N - 産生を増大させること、および / もしくは
- i i i . 初代 N K 細胞アッセイにおいて、細胞傷害性および I F N - 産生を増大させること

のうちの少なくとも 1 つを示す。

#### 【 0 1 4 4 】

いくつかの実施形態では、本発明の抗 N K G 2 A 抗体は、ヒト化および完全ヒトモノクローナル抗体を含む。他の実施形態では、抗体は、例えば、キメラモノクローナル抗体である。

#### 【 0 1 4 5 】

a . 抗 N K G 2 A モノクローナル抗体

いくつかの実施形態では、本発明の抗体は、モノクローナル抗体 1 3 F 3 . A 4、N K G 2 A . 9、および N K G 2 A . 1 1 であり、これらは、以下の実施例に記載されるように、単離され構造的に特徴付けされている。V H および V L アミノ酸配列は、配列表および配列一覧に記載されている。

#### 【 0 1 4 6 】

これらの抗体のそれぞれが、ヒト N K G 2 A に結合し得ることを踏まえ、V H および V L 配列を「混合および対応させた ( mixed and matched )」、本発明の他の抗 h N K G 2 A 結合分子を作成することができる。いくつかの実施形態では、V H および V L 鎖を混合および対応させた場合、特定の V H / V L 対合に由来する V H を、構造的に類似の V H 配列と置き換える。同様に、いくつかの実施形態では、特定の V H / V L 対合に由来する V L 配列を、構造的に類似の V L 配列と置き換える。したがって、一態様では、本開示は、ヒト N K G 2 A タンパク質と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であって、軽鎖および重鎖可変領域が、

- ( a ) それぞれ、配列番号 9 および 8 のアミノ酸配列、
- ( b ) それぞれ、配列番号 1 6 4 および 8 のアミノ酸配列、または
- ( c ) それぞれ、配列番号 1 6 9 および 1 6 7 のアミノ酸配列

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を提供する。

#### 【 0 1 4 7 】

別の態様では、本開示は、N K G 2 A . 9、N K G 2 A . 1 1、および 1 3 F 3 A . 4 抗体の重鎖および軽鎖 C D R 1、C D R 2、および C D R 3 を含む抗体を提供する。したがって、一態様では、本開示は、ヒト N K G 2 A タンパク質と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であって、抗体が、

- ( a ) それぞれ、配列番号 1 0、1 1、1 2 のアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域を含む重鎖可変ドメイン、ならびにそれぞれ、配列番号 1 3、1 4、および 1 5 のアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域を含む軽鎖可変ドメイン、
- ( b ) それぞれ、配列番号 1 0、1 1、および 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域を含む重鎖可変ドメイン、ならびにそれぞれ、配列番号 1 5 4、1 4、および 1 5 のアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域を含む軽鎖可変ドメイン、または
- ( c ) それぞれ、配列番号 1 0、1 1、および 1 2 のアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域を含む重鎖可変ドメイン、ならびにそれぞれ、配列番号 1 5 5、1 4、および 1 5 のアミノ酸配列を含む C D R 1、C D R 2、および C D R 3 領域を含む軽鎖可変ドメイン

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を提供する。

10

20

30

40

50

## 【 0 1 4 8 】

C D R 3 ドメインが、C D R 1 および / または C D R 2 ドメインとは独立して、単独で、コグネイト抗原に対する抗体の結合特異性を決定し得ること、ならびに予想通りに、共通の C D R 3 配列に基づいて同じ結合特異性を有する複数の抗体を生成することができることは、周知である。(例えば、Klimka et al., British J. of Cancer 83(2):252-260 (2000)を参照されたい。したがって、本開示は、ヒトまたは非ヒト動物に由来する抗体に由来する 1 つまたは複数の重鎖および / または軽鎖 C D R 3 ドメインを含むモノクローナル抗体であって、ヒト N K G 2 A と特異的に結合することができる、モノクローナル抗体を提供する。特定の態様では、本開示は、非ヒト抗体に由来する 1 つまたは複数の重鎖および / または軽鎖 C D R 3 ドメインを含むモノクローナル抗体であって、ヒト N K G 2 A と特異的に結合することができる、モノクローナル抗体を提供する。いくつかの実施形態内では、非ヒト抗体に由来する 1 つまたは複数の重鎖および / または軽鎖 C D R 3 ドメインを含むそのような発明的抗体は、対応する親非ヒト抗体と、( a ) 結合について競合し得る、( b ) その機能的特徴を保持する、( c ) 同一のエピトープと結合する、かつ / または ( d ) 類似の結合親和性を有する。

10

## 【 0 1 4 9 】

他の態様では、本開示は、ヒト抗体、例えば、非ヒト動物から得られたヒト抗体などに由来する 1 つまたは複数の重鎖および / または軽鎖 C D R 3 ドメインを含むモノクローナル抗体であって、ヒト抗体が、ヒト N K G 2 A と特異的に結合することができる、モノクローナル抗体を提供する。他の態様では、本開示は、第 1 のヒト抗体、例えば、非ヒト動物から得られたヒト抗体などに由来する 1 つまたは複数の重鎖および / または軽鎖 C D R 3 ドメインを含むモノクローナル抗体であって、第 1 のヒト抗体が、ヒト N K G 2 A と特異的に結合することができ、第 1 のヒト抗体に由来する C D R 3 ドメインが、N K G 2 A に対する結合特異性が欠如したヒト抗体の C D R 3 ドメインと置き換えられて、ヒト N K G 2 A と特異的に結合することができる第 2 のヒト抗体が生成される、モノクローナル抗体を提供する。いくつかの実施形態では、第 1 のヒト抗体に由来する 1 つまたは複数の重鎖および / または軽鎖 C D R 3 ドメインを含むそのような発明的抗体は、対応する親非ヒト抗体と、( a ) 結合について競合し得る、( b ) その機能的特徴を保持する、( c ) 同一のエピトープと結合する、かつ / または ( d ) 類似の結合親和性を有する。

20

## 【 0 1 5 0 】

いくつかの実施形態では、本発明は、アイソタイプとして不活性 F c ヒト I g G 1 . 3 を有する抗 h N K G 2 A 抗体を提供する。いくつかの実施形態では、そのような不活性 F c を有する抗 h N K G 2 A 抗体は、他のアイソタイプと比較して、癌の治療において優れた有効性を示す。

30

## 【 0 1 5 1 】

## b . 保存的修飾を有する抗体

特定の実施形態では、本発明の抗 N K G 2 A 抗体は、C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む重鎖可変領域、ならびに C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む軽鎖可変領域を含み、ここで、これらの C D R 配列のうちの 1 つまたは複数は、本明細書に記載される抗体 (例えば、1 3 F 3 . A 4、N K G 2 A . 9、および N K G 2 A . 1 1 抗体) に基づく指定のアミノ酸配列またはその保存的修飾を含み、それらの抗体は、本発明の抗 h N K G 2 A 抗体の所望される機能的特性を保持する。抗原結合を除去しない特定の保存的配列修飾が行われてもよいことが、当技術分野において理解される。(例えば、Brummell et al. (1993) Biochem 32:1180-8を参照されたい)。したがって、本開示は、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であって、C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む重鎖可変領域、ならびに C D R 1、C D R 2、および C D R 3 配列を含む軽鎖可変領域を含み、

40

( a ) 重鎖可変領域が、配列番号 1 2 に記載されるアミノ酸配列を含む C D R 3 配列またはその保存的修飾を含み、

( b ) 抗体またはその抗原結合部分が、ヒト N K G 2 A と特異的に結合する、

50

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。

【0152】

さらなる実施形態では、抗体は、ヒトNKG2Aとの高親和性結合、および/またはNKG2A/HLA-E相互作用を遮断する能力など、本明細書に記載される機能的特性のうちの1つまたは複数を有する。

【0153】

いくつかの実施形態では、CDR2配列を含む重鎖可変領域は、配列番号11に記載されるアミノ酸配列またはその保存的修飾を含み、CDR2配列を含む軽鎖可変領域は、配列番号14に記載されるアミノ酸配列またはその保存的修飾を含む。別の実施形態では、重鎖可変領域は、配列番号10に記載されるアミノ酸配列またはその保存的修飾を含むCDR1配列を含み、軽鎖可変領域は、配列番号13、154、または155に記載されるアミノ酸配列またはその保存的修飾を含むCDR1配列を含む。

10

【0154】

種々の実施形態では、抗NKG2A抗体は、例えば、ヒト抗体、ヒト化抗体、またはキメラ抗体である。

【0155】

c. 抗hNKG2A抗体と同一のエピトープと結合する抗体

別の実施形態では、本開示は、本発明の抗hNKG2Aモノクローナル抗体のうちのいずれかと同一のヒトNKG2Aタンパク質上のエピトープと結合する抗体(すなわち、ヒトNKG2Aタンパク質との結合について、本発明のモノクローナル抗体のうちのいずれかと交差競合する能力を有する抗体)を提供する。いくつかの実施形態では、交差競合研究の参照抗体は、標準的なヒトNKG2A結合アッセイにおけるモノクローナル抗体NKG2A.9、NKG2A.11、および13F3.A4である。例えば、組換えヒトNKG2Aタンパク質をプレートに固定化し、抗体のうちの1つを蛍光標識し、非標識化抗体が標識化抗体の結合と競合する能力を評価する、標準的なELISAアッセイを使用することができる。さらに、またはあるいは、Biacore分析を使用して、抗体が交差競合する能力を評価することができる。試験抗体が、例えば、NKG2A.9、NKG2A.11、および/または13F3.A4のヒトNKG2Aとの結合を阻害する能力は、試験抗体が、ヒトNKG2Aとの結合について、NKG2A.9、NKG2A.11、および/または13F3.A4と競合し得、したがって、NKG2A.9、NKG2A.11、および/または13F3.A4と同一のヒトNKG2A.9上のエピトープと結合することを示す。いくつかの実施形態では、NKG2A.9、NKG2A.11、および/または13F3.A4と同一のヒトNKG2A上のエピトープと結合する抗体は、ヒト化またはヒトモノクローナル抗体である。

20

30

【0156】

実施例4においてさらに論じられるように、NKG2A.9および13F3.A4の結合は、特定の残基にマッピングされている。したがって、一実施形態では、本発明は、ヒトNKG2Aタンパク質と結合したときに、水素-重水素交換質量分析(HDX-MS)によって判定される場合、以下のアミノ酸残基:

(e) LSI DNEEMKF (配列番号156);

(f) PSSWIGVFRNSSHPW (配列番号157);

(g) LAFKHEIKDSDN (配列番号158); および

(h) QVNRLKSAQQCGSSIYHC (配列番号159)

40

と特異的に結合する、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であって、モノクローナル抗体が、NKG2Aリガンド(例えば、ヒトにおけるHLA-E)のヒトNKG2Aタンパク質との結合を遮断する、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。

【0157】

別の実施形態では、本発明は、ヒトNKG2Aと結合したときに、HDX-MSおよび/またはタンパク質の迅速光化学酸化(FPOP)エピトープマッピングによって判定され

50



る場合、以下のアミノ酸残基：

- ( f ) LSIDNEEMKF ( 配列番号 1 5 6 ) ；
- ( g ) PSSWIGVFRNSSHPW ( 配列番号 1 5 7 ) ；
- ( h ) LAFKHEIKDSDN ( 配列番号 1 5 8 ) ；
- ( i ) L;および
- ( j ) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC ( 配列番号 1 5 9 )

と特異的に結合する、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であって、モノクローナル抗体が、NK G 2 A リガンド（例えば、ヒトにおけるHLA - E）のヒトNK G 2 A タンパク質との結合を遮断する、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。

10

#### 【 0 1 5 8 】

そのようなヒト化またはヒトモノクローナル抗体は、本明細書に記載されるように調製および単離することができる。例えば、本明細書において開示される抗体と同一または類似のエピトープと結合する抗hNK G 2 A抗体は、免疫処置プロトコール、例えば、本明細書に記載されるものを使用して、作製することができる。結果として得られた抗体は、ヒトNK G 2 Aとの高親和性結合について、スクリーニングすることができる。選択された抗体を、次いで、例えば、hNK G 2 Aの配列変異体が酵母細胞の表面上に提示される酵母ディスプレイアッセイにおいて、または水素 - 重水素交換実験および/もしくはF P O Pによって、研究して、抗体が結合する正確なエピトープを決定することができる。

#### 【 0 1 5 9 】

20

エピトープ決定は、当技術分野で公知の任意の方法によって行うことができる。いくつかの実施形態では、抗hNK G 2 A抗体は、hNK G 2 Aの少なくとも1つの領域内の同じ残基のうちの1つもしくは複数と接触する場合、hNK G 2 Aの少なくとも1つの領域内の残基の大半と接触する場合、hNK G 2 Aのそれぞれの領域内の残基の大半と接触する場合、hNK G 2 Aの全長にわたって接触の大半と接触する場合、hNK G 2 Aの同じ別個の領域のすべて内で接触する場合、hNK G 2 A上のいずれか1つの領域で残基のすべてと接触する場合、または同じ領域のすべてにおいて、同じ残基のすべてと接触する場合、本明細書において開示される抗hNK G 2 Aモノクローナル抗体と同一のエピトープと結合すると考えられる。エピトープ「領域」は、一次配列に沿っているが、必ずしもそれと直接隣接しているわけではない、残基のクラスターである。

30

#### 【 0 1 6 0 】

本明細書に記載される抗体を用いて「hNK G 2 A上の同一エピトープ」と結合する抗体を調べる技術として、抗原：抗体複合体の結晶のX線解析が挙げられ、これは、エピトープの原子分解を提供する。その他の方法は、抗体の抗原断片または抗原の突然変異された変動との結合をモニタリングし、ここでは、抗原配列内のアミノ酸修飾による結合の喪失は、エピトープ成分を示す。方法はまた、対象の抗体の、コンビナトリアルファージディスプレイペプチドライブラリーまたは標的タンパク質のプロテアーゼ消化物から、特定の短いペプチド（天然の三次元形態または変性された形態のいずれか）を親和性単離する能力に頼る可能性がある。そこで、ペプチドは、ペプチドライブラリーをスクリーニングするために使用される抗体に対応するエピトープの定義のためのリードと見なされる。エピトープマッピングのために、計算アルゴリズムも開発されており、コンホメーション的に不連続なエピトープをマッピングすることが示されている。

40

#### 【 0 1 6 1 】

エピトープまたはエピトープを含む領域はまた、NK G 2 Aに広がる一連の重複するペプチドとの結合についてスクリーニングすることによって特定することができる。あるいは、Jespers et al. (1994) Biotechnology;12:899の方法を使用して、同一エピトープを有する、したがって、本明細書に記載される抗NK G 2 A抗体に対して同様の特性を有する抗体の選択を導いてもよい。ファージディスプレイを使用して、まず、抗NK G 2 A抗体の重鎖を、（例えば、ヒト）軽鎖のレパートリーと対形成して、NK G 2 A結合性抗体を選択し、次いで、新規軽鎖を（例えば、ヒト）重鎖のレパートリーと対形成して、本

50

明細書に記載される抗NKG2A抗体と同一エピトープまたはエピトープ領域を有する（例えば、ヒト）NKG2A結合性抗体を選択する。あるいは、抗体の重鎖および軽鎖をコードするcDNA配列の突然変異誘発によって、本明細書に記載される抗体の変異体を得ることができる。

【0162】

Cunningham & Wells, Science 244: 1081(1989)によって記載されるようなアラニンスキャニング突然変異誘発またはNKG2A中のアミノ酸残基の点突然変異誘発のいくつかのその他の形態を使用して、抗NKG2A抗体の機能的エピトープを調べてもよい。

【0163】

特異的抗体によって結合されるエピトープまたはエピトープ領域（「エピトープ領域」は、エピトープを含むか、またはエピトープと重複する領域である）はまた、抗体の、NKG2A断片を含むペプチドとの結合を評価することによって決定してもよい。NKG2A配列（例えば、ヒトNKG2A）を包含する一連の重複するペプチドを合成し、例えば、直接ELISA、競合的ELISA（ペプチドが、抗体の、マイクロタイタープレートウェルと結合しているNKG2Aとの結合を防ぐその能力について評価される）において、またはチップ上で、結合についてスクリーニングしてもよい。このようなペプチドスクリーニング方法は、いくつかの不連続な機能的エピトープ、すなわち、NKG2Aポリペプチド鎖の一次配列に沿って連続していないアミノ酸残基を含む機能的エピトープを検出することができない場合もある。

【0164】

エピトープはまた、MSベースのタンパク質フットプリント法、例えば、HDX-MSおよびタンパク質の迅速光化学酸化（FPOP）などによって同定してもよい。HDX-MSは、例えば、Wei et al. (2014) Drug Discovery Today 19:95にさらに記載されるように実施することができ、その方法は、参照によって本明細書に具体的に組み込まれる。FPOPは、例えば、Hambley & Gross (2005) J. American Soc. Mass Spectrometry 16:2057に記載されるように実施することができ、その方法は、参照により本明細書に具体的に組み込まれる。

【0165】

抗NKG2A抗体によって結合されるエピトープはまた、X線結晶構造決定（例えば、WO2005/044853）、分子モデリング、ならびに遊離している場合および対象の抗体との複合体中に結合されている場合にはNKG2A中の不安定なアミド水素のH-D交換速度の核磁気共鳴（NMR）判定を含む、NMR分光法など、構造的な方法によって決定してもよい（Zinn-Justin et al. (1992) Biochemistry 31:11335、Zinn-Justin et al. (1993) Biochemistry 32:6884）。

【0166】

別途示されない限り、および特許請求の範囲を参照して、抗体が結合するエピトープは、HDX-MS方法によって決定されるエピトープである。

【0167】

高い親和性で結合する抗NKG2A抗体

いくつかの実施形態では、本発明の抗hNKG2A抗体は、高い親和性でhNKG2Aと結合するため、有効な治療剤となっている。種々の実施形態では、本発明の抗hNKG2A抗体は、10nM未満、5nM未満、2nM未満、1nM未満、300pM未満、または100pM未満のK<sub>D</sub>で、hNKG2Aと結合する。hNKG2Aに対する抗体の結合能力を評価するための標準アッセイとしては、ELISA、RIA、ウエスタンブロット、biolayer interferometry（BLI）、およびBiacore（商標）SPR分析（実施例10を参照されたい）が挙げられる。

【0168】

d. 抗NKG2A抗体配列変異体

本明細書において開示される抗NKG2A抗体配列変異体は、本明細書において開示される望ましい機能的特性を維持する。CDR領域は、別途示されない限り、Kabatsi

10

20

30

40

50

ステム (Kabat, et al., 1991) を使用して描写される。いくつかの実施形態では、本発明は、さらに、本明細書において開示される抗体の C D R 配列と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、または 95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 99.5 % 同一である C D R 配列を含むヒトまたはヒト化抗 h N K G 2 A 抗体を提供する。本発明はまた、本明細書において開示される抗体の重鎖および / または軽鎖可変ドメイン配列と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 99.5 % 同一である重鎖および / または軽鎖可変ドメイン配列を含む抗 h N K G 2 A 抗体、ならびに本明細書において開示される抗体の重鎖および / または軽鎖配列と少なくとも 70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、96 %、97 %、98 %、99 %、または 99.5 % 同一である全長重鎖および / または軽鎖配列を含む抗 h N K G 2 A 抗体を提供する。

10

#### 【0169】

II. 遺伝子操作された、および修飾された抗体

a. V<sub>H</sub> および V<sub>L</sub> 領域

修飾された抗体を遺伝子操作するために、出発材料として本明細書において開示される V<sub>H</sub> および / または V<sub>L</sub> 配列のうち 1 種または複数を有する抗体を使用して調製され得る、遺伝子操作された、および修飾された抗体もまた提供され、この修飾された抗体は、出発抗体から変更された特性を有し得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、一方または両方の可変領域 (すなわち、V<sub>H</sub> および / または V<sub>L</sub>) 内の、例えば、1 つもしくは複数の C D R 領域内の、および / または 1 つもしくは複数のフレームワーク領域内の 1 つまたは複数の残基を修飾することによって、遺伝子操作した。さらに、またはあるいは、本明細書に記載される抗体は、例えば、抗体のエフェクター機能 (単数または複数) を変更するために、定常領域 (単数または複数) 内の残基を修飾することによって遺伝子操作した。

20

#### 【0170】

一実施形態では、可変領域の遺伝子操作には、C D R グラフティングが含まれる。そのようなグラフティングは、非ヒト抗 h N K G 2 A 抗体、例えば、結合について、本明細書において開示される抗 h N K G 2 A 抗体と競合する、および / または本明細書において開示される選択的な抗 h N K G 2 A 抗体と同一のエピトープと結合する、抗 h N K G 2 A 抗体を、ヒト化する際に特に有用である。抗体は、主に重鎖および軽鎖 C D R 中に位置するアミノ酸残基を介して標的抗原と相互作用する。C D R は、配列が超可変であり、かつ / または構造的に定義されたループ (「超可変ループ」) を形成する。発現ベクターは、特定の参照 (「親」とも称される) 抗体に由来する C D R 配列が異なる抗体に由来するフレームワーク配列にグラフティングされたものを含むように、構築することができる (例えば、Riechmann, L. et al. (1998) Nature 332:323-327、Jones, P. et al. (1986) Nature 321:522-525、Queen, C. et al. (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86:10029-10033、Winter の米国特許第 5,225,539 号、ならびに Queen et al. の米国特許第 5,530,101 号、同第 5,585,089 号、同第 5,693,762 号、および同第 6,180,370 号を参照されたい)。いくつかの場合には、結果として得られる組換え抗体は、親抗体に類似する特性を有する。遺伝子操作された抗体は、次いで、親抗体とは異なる特性を獲得するようにさらに修飾することができる。他の場合には、親 C D R 配列をフレームワークにグラフティングすることにより、親抗体の特定の特徴が抑制され、その結果、組換え抗体はこれらの特徴をもはや有さなくなる。1 つの例示的な特徴は、抗原に対する結合親和性である。そのような場合には、遺伝子操作された抗体を、親抗体の所望される特徴を取り戻すようにさらに修飾することが有利な場合がある。

30

40

#### 【0171】

このようなフレームワーク配列は、生殖系列抗体遺伝子配列を含む公開 DNA データベースまたは公開参考文献から得ることができる。例えば、ヒト重鎖および軽鎖可変領域遺伝子の生殖系列 DNA 配列は、「V B a s e」ヒト生殖系列配列データベースに、ならび

50

にKabat, E. A., et al. (1991); Tomlinson, I. M., et al. (1992) "The Repertoire of Human Germline V<sub>H</sub> Sequences Reveals about Fifty Groups of V<sub>H</sub> Segments with Different Hypervariable Loops" J. Mol. Biol. 227:776-798; and Cox, J. P. L. et al. (1994) "A Directory of Human Germ-line V<sub>H</sub> Segments Reveals a Strong Bias in their Usage" Eur. J. Immunol. 24:827-836に見い出すことができ、それらの各々の内容は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

#### 【0172】

いくつかの実施形態では、本明細書において記載される抗体において使用するためのフレームワーク配列は、本明細書に記載される抗体によって使用されるフレームワーク配列と構造的に同様であるものである。V<sub>H</sub> CDR 1、2および3配列ならびにV<sub>L</sub> CDR 1、2および3配列は、フレームワーク配列が由来する生殖系列免疫グロブリン遺伝子において見られるものと同一配列を有するフレームワーク領域上にグラフトされ得るか、またはCDR配列は、生殖系列配列と比較した場合に最大20個の、保存的なアミノ酸置換を含むアミノ酸置換を含有するフレームワーク領域上にグラフトされ得る。例えば、特定の場合には、抗体の抗原結合能力を維持または増強するために、フレームワーク領域内の残基を突然変異させることが有益であることがわかっている（例えば、Queen et alの米国特許第5,530,101号；同5,585,089号；同5,693,762号および同6,180,370号を参照のこと）。

#### 【0173】

本明細書に記載される遺伝子操作された抗体は、例えば、抗体の特性を改善するために、例えば、抗体の免疫原性を減少させるために、V<sub>H</sub>および/またはV<sub>L</sub>内のフレームワーク残基に修飾が行われているものを含む。例えば、1つのアプローチとして、1個または複数のフレームワーク残基を、対応する生殖系列配列に「復帰突然変異」することがある。より詳しくは、体細胞突然変異を起こしている抗体は、抗体が由来する生殖系列配列とは異なるフレームワーク残基を含有し得る。このような残基は、抗体フレームワーク配列を、抗体が由来する生殖系列配列に対して比較することによって同定できる。フレームワーク領域配列をその生殖系列立体配置に戻すために、例えば、部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発によって、体細胞突然変異を生殖系列配列に「復帰突然変異する」ことができる。このような「復帰突然変異された」抗体も本開示に包含される。

#### 【0174】

別の種類のフレームワーク修飾は、T細胞エпитープを除去し、それによって、抗体の免疫原性の可能性を低減するために、フレームワーク領域内の、またはさらには1つもしくは複数のCDR領域内の1個または複数の残基を突然変異することを含む。このアプローチはまた、「脱免疫化」と呼ばれ、Carr et alによる米国特許公開第20030153043号にさらに詳細に記載されている。

#### 【0175】

別の種類の可変領域修飾は、対象の抗体の1種または複数の結合特性（例えば、親和性）を改善するためにCDR領域内のアミノ酸残基を突然変異することである。部位特異的突然変異誘発またはPCR媒介突然変異誘発を実施して、抗体結合または対象のその他の機能的特性に対して突然変異（単数または複数）および効果を導入できる。保存的修飾が導入されることが好ましい。突然変異は、アミノ酸付加、欠失または置換であり得る。いくつかの実施形態では、CDR領域内の1、2、3、4または5個以下の残基が変更される。

#### 【0176】

抗体のCDR中のメチオニン残基は、酸化され、その結果、化学的分解の可能性および結果としての抗体の効力の低減をもたらし得る。したがって、重鎖および/または軽鎖CDR中の1つまたは複数のメチオニン残基が酸化分解を受けないアミノ酸残基と置換されている抗NKG2A抗体もまた、本明細書において提供される。同様に、抗NKG2A抗体から、特に、CDR中の脱アミド化部位も除去され得る。抗原結合に干渉し得るグリコシル化を防ぐために、抗原結合ドメイン内の可能性あるグリコシル化部位が排除されてい

10

20

30

40

50

る抗体もまた、本明細書において提供される。例えば、米国特許第 5,714,350 号を参照されたい。

【0177】

#### b. 抗体マスキング

いくつかの実施形態では、本明細書において開示される抗体は、特定の細胞および/または組織との結合を制限するように修飾される。一実施形態では、そのような抗体は、抗体の抗原結合表面と特異的に結合し、抗原結合に干渉する、遮断ペプチド「マスク」を含む。いくつかの実施形態では、マスクは、プロテアーゼ切断可能リンカーによって、抗体の結合アームのそれぞれに連結されている。例えば、CytomX の米国特許第 8,518,404 号を参照のこと。プロテアーゼ切断可能リンカーを有する抗体は、非腫瘍組織と比較して、腫瘍微小環境においてプロテアーゼレベルが大幅に増大されている癌の治療にとって有用である。腫瘍微小環境における切断可能なリンカーの選択的切断によって、マスキング/遮断ペプチドの解離が可能となり、これが、抗原結合が不要な副作用を引き起こし得る末梢組織においてではなく腫瘍における抗原結合選択性を可能にする。

【0178】

別の実施形態では、(二価)抗体の両方の抗原結合表面と結合し、抗原結合を干渉する、2つの抗原結合ドメインを含む二価結合化合物(「マスキングリガンド」)が開発されている。一実施形態では、2つの結合ドメインマスクは、切断可能なリンカー、例えば、ペプチダーゼによって切断可能なリンカーによって互いに(抗体ではなく)連結される。(例えば、Tegopharm Corp の国際特許出願公開WO2010/077643を参照のこと。)マスキングリガンドは、抗体が結合するよう意図される抗原を含み得るか、もしくはそれに由来し得るか、または独立に作製され得る。(例えば、抗イディオタイプ結合断片)。このようなマスキングリガンドは、非腫瘍組織と比較して、腫瘍微小環境においてプロテアーゼレベルが大幅に増大されている癌の治療にとって有用である。腫瘍微小環境における切断可能なリンカーの選択的切断によって、2つの結合ドメインの互いからの解離が可能となり、抗体の抗原結合表面の結合力を低下させる。結果として生じる、抗体からのマスキングリガンドの解離が、抗原結合が不要な副作用を引き起こし得る末梢組織においてではなく腫瘍における抗原結合選択性を可能にする。

【0179】

#### c. Fc および修飾された Fc 領域

一実施形態では、本明細書に記載される抗体は、抗体の生物学的活性に基づいて選択される Fc 領域を含み得る。Salfeld, Nat. Biotechnol. 25:1369 (2007)。ヒト IgG は、例えば、4つのサブクラス IgG1、IgG2、IgG3、および IgG4 に分類することができる。これらのサブクラスのそれぞれは、Fc 受容体(活性化受容体 FcRI(CD64)、FcRIIA、FcRIIC(CD32a,c)、FcRIIIA および FcRIIIB(CD16a,b)、ならびに阻害性受容体 FcRIIB(CD32b)のうちの1つまたは複数との結合について、ならびに補体の第1成分(C1q)について、固有のプロファイルを有する Fc 領域を含む。ヒト IgG1 および IgG3 は、すべての Fc 受容体と結合し; IgG2 は、FcRIIA<sub>H131</sub> と結合し、FcRIIA<sub>R131</sub> FcRIIIA<sub>V158</sub> に対してより低い親和性を有し; IgG4 は、FcRI、FcRIIA、FcRIIB、FcRIIC および FcRIIIA<sub>V158</sub> と結合し; 阻害性受容体 FcRIIB は、IgG1、IgG2 および IgG3 に対して、すべてのその他の Fc 受容体よりも低い親和性を有する。(Bruhns et al. (2009) Blood 113:3716)。研究によって、FcRI は、IgG2 と結合せず、FcRIIIB は、IgG2 または IgG4 と結合しないことが示された。同著。一般に、ADCC 活性に関して、ヒト IgG1 IgG3 IgG4 IgG2。いくつかの実施形態では、例えば、ADCC が所望されるため、治療組成物における使用については、IgG2 でも IgG4 でもなく、IgG1 定常ドメインが選択される。

【0180】

本明細書に記載される抗 hNKG2A 抗体可変領域は、Fc、例えば、IgG1、Ig

10

20

30

40

50

G 2、I g G 3またはI g G 4 F cと連結され得（例えば、共有結合によって連結されるか、または融合される）、これは、例えば、I g G 1の任意のアロタイプまたはイソアロタイプ：G 1 m、G 1 m 1 ( a )、G 1 m 2 ( x )、G 1 m 3 ( f )、G 1 m 1 7 ( z )；I g G 2の任意のアロタイプまたはイソアロタイプ：G 2 m、G 2 m 2 3 ( n )；I g G 3の任意のアロタイプまたはイソアロタイプ：G 3 m、G 3 m 2 1 ( g 1 )、G 3 m 2 8 ( g 5 )、G 3 m 1 1 ( b 0 )、G 3 m 5 ( b 1 )、G 3 m 1 3 ( b 3 )、G 3 m 1 4 ( b 4 )、G 3 m 1 0 ( b 5 )、G 3 m 1 5 ( s )、G 3 m 1 6 ( t )、G 3 m 6 ( c 3 )、G 3 m 2 4 ( c 5 )、G 3 m 2 6 ( u )、G 3 m 2 7 ( v )であり得る。（例えば、Jefferis et al. (2009) mAbs 1:1）を参照のこと）。アロタイプの選択は、例えば、抗薬物抗体の形成を最小化するために、可能性ある免疫原性の懸念によって影響を受け得る。

10

#### 【 0 1 8 1 】

いくつかの実施形態では、本発明の抗NKG2A抗体は、ヒトFcRと相互作用することができない。NKG2Aは、CD8+ TおよびNK細胞上に発現される阻害性受容体であるため、NKG2A+ CD8+ TまたはNK細胞のアゴニズムまたは枯渇を回避または低減させることにより、抗腫瘍免疫が増強される。したがって、NKG2A/HLA-E相互作用の遮断は、ヒトFcRと相互作用することができない抗NKG2A抗体に所望される。

#### 【 0 1 8 2 】

##### d . 半減期の延長

20

いくつかの実施形態では、抗NKG2A抗体は、その生物学的半減期、例えば、抗体の血清半減期を増大させるように修飾される。種々のアプローチが、当技術分野において公知である。一実施形態では、抗体は、Presta et al.によって米国特許第5,869,046号および同6,121,022号に記載されるようにIgGのFc領域のCH2ドメインの2つのループからとられるサルベージ受容体結合エピトープを含有するようCH1またはCL領域内で変更される。例えば、M252Y、S254TおよびT256Eを含む組合せFc変異体は、半減期を4倍近く増大する。（Dall'Acqua et al. (2006) J. Biol. Chem. 281:23514）。FcRn結合を増大するためのその他の修飾は、Yeung et al. (2010) J. Immunol. 182:7663-7671；第6,277,375号；同6,821,505号；WO97/34631；WO2002/060919に記載されている。

30

#### 【 0 1 8 3 】

本明細書に記載の抗体の血清半減期はまた、ペグ化によって増大され得る。抗体を、例えば、抗体の生物学的（例えば、血清）半減期を増大するようペグ化してもよい。抗体をペグ化するために、通常、抗体またはその断片を、1つまたは複数のPEG基が、抗体または抗体断片と結合するようになる条件下で、PEGの反応性エステルまたはアルデヒド誘導体などのポリエチレングリコール（PEG）試薬と反応させる。好ましくは、ペグ化は、反応性PEG分子（または類似の反応性水溶性ポリマー）とのアシル化反応またはアルキル化反応によって実施される。本明細書において、用語「ポリエチレングリコール」は、モノ（C1～C10）アルコキシ-またはアリアルコキシ-ポリエチレングリコールまたはポリエチレングリコール-マレイミドなどの、その他のタンパク質を誘導体化するために使用されたPEGの任意の形態を包含するものとする。特定の実施形態では、ペグ化されるべき抗体は、非グリコシル化抗体である。タンパク質をペグ化するための方法は、技術分野で公知であり、本明細書に記載される抗体に適用され得る。（例えば、Nishimura et al.によるEP0154316およびIshikawa et al.によるEP0401384を参照のこと）。

40

#### 【 0 1 8 4 】

いくつかの場合には、抗体の半減期を、増大させるのではなく減少させることが望ましい場合がある。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、その半減期を減少させるような修飾を含む。ヒトIgG1のFcにおけるI253A（Hornick et al. (2000) J. Nucl. Med. 41:355）およびH435A/R I253AまたはH310A（Ki

50

m et al. (2000) Eur. J. Immunol. 29:2819) などの修飾は、医用画像のような迅速なクリアランスが好ましい状況において使用するために、FcRn結合を減少させ、ひいては、半減期を減少（クリアランスを増大）させ得る。（Kenanova et al. (2005) Cancer Res. 65:622も参照のこと）。クリアランスを増強するためのその他の手段として、本発明の抗原結合ドメインを、Fab断片などのFcRnと結合する能力を欠く抗体断片としてフォーマットすることが挙げられる。このような修飾は、例えば、抗体の循環半減期を2、3週間から数時間に減少させ得る。次いで、抗体断片の選択的ペグ化を使用して、所望される場合に、抗体断片の半減期を増大させることができる。（Chapman et al. (1999) Nat. Biotechnol. 17:780）。半減期を増大するために、抗体断片をまた、ヒト血清アルブミンと融合して、例えば、融合タンパク質コンストラクトにしてもよい。（Yeh et al. (1992) Proc. Nat'l Acad. Sci. 89:1904）。あるいは、ヒト血清アルブミン（HSA）と結合する、本発明の第1の抗原結合ドメインおよび第2の抗原結合ドメインを用いて、二重特異性抗体を構築してもよい。（国際特許出願公開WO 2009/127691およびその中で引用される特許参考文献を参照のこと）。あるいは、半減期を増大するために、特殊化ポリペプチド配列、例えば、「XTEN」ポリペプチド配列を抗体断片に添加することができる。（Schellenberger et al. (2009) Nat. Biotechnol. 27:1186; 国際特許出願公開WO 2010/091122）。

#### 【0185】

e. さらにFc変異体

いくつかの実施形態では、IgG1定常ドメインを使用する場合、IgG1コンストラクトのヒンジ中の可能性あるプロテアーゼ切断部位を、D221GおよびK222S修飾によって排除し、抗体の安定性を増大させることができる。（WO 2014/043344）。

#### 【0186】

Fc変異体のそのリガンド（Fc受容体）に対する親和性および結合特性は、それだけには限らないが、平衡方法（例えば、酵素結合免疫吸着測定法（ELISA）またはラジオイムノアッセイ（RIA））または速度論（例えば、BIAcore（登録商標）SPR分析）および間接結合アッセイ、競合阻害アッセイ、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）、ゲル電気泳動およびクロマトグラフィー（例えば、ゲル濾過）などのその他の方法を含めた、当技術分野で公知の種々のインビトロアッセイ法（例えば、生化学または免疫学ベースのアッセイ）によって決定され得る。これらおよびその他の方法は、調べられている1種もしくは複数の成分上の標識を使用してもよく、および/またはそれだけには限らないが、発色、蛍光、発光もしくは同位体標識を含めた種々の検出方法を利用してよい。結合親和性および速度論の詳細な説明は、抗体免疫原相互作用に焦点を当てる、Paul, W. E., ed., Fundamental Immunology, 4th Ed., Lippincott-Raven, Philadelphia (1999)に見い出すことができる。

#### 【0187】

さらにその他の実施形態では、抗体のグリコシル化は、エフェクター機能を増大または低減するよう修飾される。例えば、位置297の保存されたアスパラギン残基を突然変異し（例えば、N297A）、ひいては、補体およびFcRI結合を消滅させることによって、すべてのエフェクター機能を欠く非グリコシル化抗体を作製できる。（Bolt et al. (1993) Eur. J. Immunol. 23:403. Tao & Morrison (1989) J. Immunol. 143:2595（IgG1中のN297Qを使用して、位置297でのグリコシル化を排除する）も参照のこと）。

#### 【0188】

非グリコシル化抗体は、一般に、エフェクター機能を欠くが、その機能を回復させるよう、突然変異を導入することができる。非グリコシル化抗体、例えば、N297A/C/DまたはH突然変異に起因するものか、またはタンパク質をグリコシル化しない系（例えば、大腸菌）において産生されたものを、FcRI結合を回復させるよう、さらに突然変異することができる、例えば、S298Gおよび/またはT299A/G/もしくはH

10

20

30

40

50

(WO 2009/079242) または E 3 8 2 V および M 4 2 8 I (Jung et al. (2010) Proc. Nat'l Acad. Sci (USA) 107:604)。

【0189】

糖鎖操作はまた、Fc 領域の Asn 297 で結合している炭水化物鎖の 2, 6 シアリル含量を変更することによって、IgG コンストラクトの抗炎症特性を修飾するために使用され得、これでは、2, 6 シアリル化形態の割合の増加が、抗炎症効果の増強をもたらす。(Nimmerjahn et al. (2008) Ann. Rev. Immunol. 26:513 を参照のこと)。逆に、2, 6 シアリル化炭化水素を有する抗体の割合の減少は、抗炎症特性が望まれない場合には有用であり得る。例えば、2, 6 シアリル化形態の選択的精製によって、または酵素的修飾によって、抗体の 2, 6 シアリル化含量を修飾する方法は、米国特許出願公開第 2008/0206246 号に提供されている。その他の実施形態では、Fc 領域のアミノ酸配列は、例えば、F241A 修飾を含めることによって、2, 6 シアリル化の効果を模倣するよう修飾され得る (WO 2013/095966)。

10

【0190】

III. 抗体物理的特性

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、軽鎖または重鎖可変領域のいずれかに 1 つまたは複数のグリコシル化部位を含有する。このようなグリコシル化部位は、抗体の免疫原性の増大または変更された抗原結合による抗体薬物動態の変更をもたらし得る (Marshall et al (1972) Ann. Rev. Biochem. 41:673-702、Gala and Morrison (2004) J. Immunol. 172:5489-94、Wallick et al (1988) J. Exp. Med. 168:1099-109、Spiro (2002) Glycobiology 12:43R-56R、Parekh et al (1985) Nature 316:452-7、Mimura et al. (2000) Mol Immunol 37:697-706)。グリコシル化は、N - X - S / T 配列を含有するモチーフで起こると知られている。いくつかの実施形態では、抗 hNKG2A 抗体は、可変領域グリコシル化を含有しない。このような抗体は、可変領域中にグリコシル化モチーフを含有しない抗体を選択することによってか、またはグリコシル化領域内の残基を突然変異させることによって得ることができる。

20

【0191】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、アスパラギン異性部位を含有しない。アスパラギンの脱アミド化は、N - G または D - G 配列で起こり得、その結果、ポリペプチド鎖中にねじれを導入し、その安定性を低減する (イソアスパラギン酸効果として知られている)。

30

【0192】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、6 ~ 9.5 の pH 範囲に等電点 (pI) を有する。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、7 ~ 9.5 または 6 ~ 8 の pH 範囲に pI を有する。所望される pI 範囲内に pI を有する抗体は、その pH 範囲内に pI を有する抗体を候補群から選択すること、または特定の抗体の荷電表面残基を突然変異させることのいずれかによって、得ることができる。

【0193】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、最初のアンフォールディングの温度 (T<sub>M1</sub>) が 60 °C 超、65 °C 超、または 70 °C 超となるように選択および / または遺伝子操作される。抗体の融点は、示差走査熱量測定 (Chen et al (2003) Pharm Res 20:1952-60; Ghirlando et al (1999) Immunol Lett. 68:47-52) または円偏光二色性 (Murray et al. (2002) J. Chromatogr. Sci. 40:343-9) を使用して測定できる。

40

【0194】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、有利な分解特性、例えば、インビトロおよび / またはインビボでの緩徐な分解を有するように選択および / または遺伝子操作される。抗体の分解は、キャピラリー電気泳動 (CE) および MALDI - MS (Alexander A J and Hughes D E (1995) Anal Chem 67:3626-32) を使用して測定することができる。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、望ましい凝集特性を有するように、例えば、望ましくない免疫応答および / または変更されたかもし

50



くは望ましくない薬物動態特性を誘起し得る、インビトロおよび/またはインビボでの凝集を最小限に示す抗体が、選択および/または遺伝子操作される。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗体は、親抗体の凝集と比較して、25%以下、20%以下、15%以下、10%以下、または5%以下の凝集を示す。凝集は、サイズ排除カラム (SEC)、高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) および光散乱を含めた、いくつかの技術によって測定できる。

#### 【0195】

##### IV. 核酸分子および組換え方法

本明細書に記載される別の態様は、本明細書に記載される抗hNKGA抗体をコードする核酸分子に関する。核酸は、全細胞、例えば、宿主細胞中に、細胞溶解物中に、または部分精製されたかもしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。核酸は、アルカリ/SDS処理、CsClバンド形成、カラムクロマトグラフィー、制限酵素、アガロースゲル電気泳動、および当技術分野で周知のその他のものを含めた標準的な技術によって、その他の細胞成分またはその他の夾雑物、例えば、その他の細胞性核酸 (例えば、その他の染色体DNA、例えば、自然界では単離されたDNAと連結している染色体DNA) またはタンパク質から精製された場合に、「単離される」かまたは「実質的に純粋にされる」。(F. Ausubel, et al., ed. (1987) Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New Yorkを参照されたい)。本明細書に記載される核酸は、例えば、DNAまたはRNAであり得、イントロンを含有する場合も、含有しない場合もある。特定の実施形態では、核酸は、cDNA分子である。

#### 【0196】

本明細書において記載される核酸は、標準分子生物学技術を使用して得ることができる。ハイブリドーマ (例えば、以下にさらに記載されるようなヒト免疫グロブリン遺伝子を保持するトランスジェニックマウスから調製されたハイブリドーマ) によって発現される抗体については、ハイブリドーマによって作製された抗体の軽鎖および/または重鎖をコードするcDNAは、標準PCR増幅またはcDNAクローニング技術によって得ることができる。免疫グロブリン遺伝子ライブラリーから (例えば、ファージディスプレイ技術を使用して) から得られる抗体については、抗体をコードする核酸は、ライブラリーから回収され得る。

#### 【0197】

V<sub>H</sub>およびV<sub>L</sub>セグメントをコードするDNA断片が得られると、例えば、可変領域遺伝子を全長抗体鎖遺伝子に、Fab断片遺伝子に、またはscFv遺伝子に変換するように、標準組換えDNA技術によってこれらのDNA断片をさらに操作できる。これらの操作では、V<sub>L</sub>またはV<sub>H</sub>をコードするDNA断片は、抗体定常領域または可動性リンカーなどの別のタンパク質をコードする別のDNA断片と作動可能に連結している。この文脈において使用されるような、用語「作動可能に連結された」は、2種のDNA断片によってコードされるアミノ酸配列がインフレームのままであるよう、2種のDNA断片が接続されることを意味する。

#### 【0198】

V<sub>H</sub>領域をコードする単離されたDNAは、V<sub>H</sub>をコードするDNAを、重鎖定常領域 (ヒンジ、CH1、CH2および/またはCH3) をコードする別のDNA分子と作動可能に連結することによって、全長重鎖遺伝子に変換され得る。ヒト重鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で公知であり (例えば、Kabat, et al., 1991を参照のこと)、これらの領域を包含するDNA断片は、標準PCR増幅によって得ることができる。重鎖定常領域は、IgG (IgG1、IgG2、IgG3またはIgG4)、IgA、IgE、IgMまたはIgD定常領域、例えば、IgG1領域であり得る。Fab断片重鎖遺伝子については、V<sub>H</sub>をコードするDNAは、重鎖CH1定常領域のみをコードする別のDNA分子と作動可能に連結され得る。

#### 【0199】

V<sub>L</sub>領域をコードする単離されたDNAは、V<sub>L</sub>をコードするDNAを、軽鎖定常領域

、C Lをコードする別のDNA分子と作動可能に連結することによって、全長軽鎖遺伝子（ならびにF a b軽鎖遺伝子）に変換され得る。ヒト軽鎖定常領域遺伝子の配列は、当技術分野で公知であり（例えば、Kabat, et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242を参照のこと）、これらの領域を包含するDNA断片は、標準PCR増幅によって得ることができる。軽鎖定常領域は、または定常領域であり得る。

#### 【0200】

s c F v 遺伝子を作製するために、V HおよびV LをコードするDNA断片を、例えば、アミノ酸配列（G l y<sub>4</sub> - S e r<sub>3</sub>）（配列番号160）をコードする可動性リンカーをコードする別の断片に作動可能に連結し、その結果、V HおよびV L配列が、可動性リンカーによって接続されたV LおよびV H領域を有する連続一本鎖タンパク質として発現され得る（例えば、Bird et al. (1988) Science 242:423-426;Huston et al. (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883;McCafferty et al., (1990) Nature 348:552-554を参照のこと）。

#### 【0201】

##### V. 抗体の生成

本発明の種々の抗体、例えば、選択された本明細書に開示される抗h N K G 2 A抗体と同一のエピトープと結合するものは、Kohler and Milstein, Nature 256: 495 (1975)によって記載される標準的な体細胞ハイブリダイゼーション技術などの種々の公知の技術を使用して産生することができる。モノクローナル抗体を産生するためのその他の技術、例えば、Bリンパ球のウイルス性または発癌性形質転換、ヒト抗体遺伝子のライブラリーを使用するファージディスプレイ技術も使用できる。

#### 【0202】

ハイブリドーマを調製するための例示的な動物系は、マウス系である。マウスにおけるハイブリドーマ産生は、十分に確立された手順である。免疫処置プロトコールおよび融合のために免疫処置された脾細胞を単離するための技術は、当技術分野で公知である。融合パートナー（例えば、マウス骨髄腫細胞）および融合手順も公知である。

#### 【0203】

本明細書に記載されるキメラまたはヒト化抗体は、上記のように調製したマウスモノクローナル抗体の配列に基づいて調製できる。標準分子生物学技術を使用して、重鎖および軽鎖免疫グロブリンをコードするDNAを、対象のマウスハイブリドーマから得、非マウス（例えば、ヒト）免疫グロブリン配列を含有するよう遺伝子操作できる。例えば、当技術分野で公知の方法を使用して、キメラ抗体を作製するために、マウス可変領域をヒト定常領域に連結できる（例えば、Cabilly et al.の米国特許第4, 816, 567号を参照のこと）。ヒト化抗体を作製するために、当技術分野で公知の方法を使用して、ヒトフレームワーク中にマウスC D R領域を挿入できる（例えば、Winterの米国特許第5, 225, 539号およびQueen et al.の米国特許第5, 530, 101号；同5, 585, 089号；同5, 693, 762号および同6, 180, 370号を参照のこと）。

#### 【0204】

一実施形態では、本明細書に記載される抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。このようなヒトN K G 2 Aに対して向けられたヒトモノクローナル抗体は、マウス系ではなくヒト免疫系の部分を保持する、トランスジェニックまたはトランスクロモソミック（transchromosomal）マウスを使用して作製できる。これらのトランスジェニックおよびトランスクロモソミック（transchromosomal）マウスは、本明細書において、それぞれH u M A bマウスおよびK Mマウスと呼ばれるマウスを含み、本明細書において、まとめて「ヒトI gマウス」と呼ばれる。

#### 【0205】

H u M A bマウス（登録商標）（M e d a r e x , I n c .）は、再編成されていないヒト重鎖（ $\mu$ および $\gamma$ ）および軽鎖免疫グロブリン配列をコードするヒト免疫グロブリ

10

20

30

40

50

ン遺伝子ミニ遺伝子座 (miniloci) を、内因性  $\mu$  および 鎖遺伝子座を不活性化する標的化された突然変異とともに含有する (例えば、Lonberg, et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859を参照のこと)。したがって、マウスは、マウス I g M または の発現の低下を示し、免疫処置に応じて、導入されたヒト重鎖および軽鎖 導入遺伝子は、クラススイッチおよび体細胞突然変異を受けて、高親和性ヒト I g G モノクローナル抗体を生成する (Lonberg, N. et al. (1994)、前掲; Lonberg, N. (1994) Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101; Lonberg, N. and Huszar, D. (1995) Intern. Rev. Immunol. 13: 65-93 および Harding, F. and Lonberg, N. (1995) Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546に概説されている)。HuMa b マウスの調製および使用ならびにこのようなマウスによって保持されるゲノム修飾は、Taylor, L. et al. (1992) Nucleic Acids Research 20:6287-6295; Chen, J. et al. (1993) International Immunology 5: 647-656; Tuailon et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:3720-3724; Choi et al. (1993) Nature Genetics 4:117-123; Chen, J. et al. (1993) EMBO J. 12: 821-830; Tuailon et al. (1994) J. Immunol. 152:2912-2920; Taylor, L. et al. (1994) International Immunology 6: 579-591; および Fishwild, D. et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851 にさらに記載されており、それらの開示内容は、その全文が参照により本明細書に組み込まれる。(また、すべてLonbergおよびKayの米国特許第5, 545, 806号; 同5, 569, 825号; 同5, 625, 126号; 同5, 633, 425号; 同5, 789, 650号; 同5, 877, 397号; 同5, 661, 016号; 同5, 814, 318号; 同5, 874, 299号; および同5, 770, 429号; Surani et al.の米国特許第5, 545, 807号; すべてLonbergおよびKayのPCT公開番号WO 92/03918、WO 93/12227、WO 94/25585、WO 97/13852、WO 98/24884 およびWO 99/45962 ならびにKorman et al.のPCT公開番号WO 01/14424を参照のこと)。

#### 【0206】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、導入遺伝子および導入染色体上にヒト免疫グロブリン配列を保持するマウス、例えば、ヒト重鎖導入遺伝子およびヒト軽鎖導入染色体を保持するマウスを使用して作製される。本明細書において「KMマウス」と呼ばれるこのようなマウスは、Ishida et al.のPCT公開WO 02/43478に詳細に記載されている。

#### 【0207】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスジェニック動物系が、当技術分野で利用可能であり、本明細書に記載される抗hNKG2A抗体を作製するために使用できる。例えば、Xenomouse (Abgenix, Inc.) と呼ばれる代替トランスジェニック系を使用でき、このようなマウスは、例えば、Kucherlapati et al.の米国特許第5, 939, 598号; 同6, 075, 181号; 同6, 114, 598号; 同6, 150, 584号および同6, 162, 963号に記載されている。

#### 【0208】

さらに、ヒト免疫グロブリン遺伝子を発現する代替トランスクロモソミック (transchromosomic) 動物系は、当技術分野で利用可能であり、本明細書に記載される抗nk g 2 a抗体を作製するために使用できる。例えば、「TCマウス」と呼ばれる、ヒト重鎖導入染色体 (transchromosome) およびヒト軽鎖導入染色体の両方を保持するマウスを使用でき、このようなマウスは、Tomizuka et al. (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 722-727に記載されている。さらに、ヒト重鎖および軽鎖導入染色体 (transchromosome) を保持するウシが、当技術分野で記載されており (Kuroiwa et al. (2002) Nature Biotechnology 20:889-894)、本明細書に記載される抗hNKG2A抗体を作製するために使用できる。

#### 【0209】

ヒト抗体、例えば、ヒト抗hNKG2A抗体を作製するための当技術分野において記載されるさらなるマウス系として、(i) 内因性マウス重鎖および軽鎖可変領域が、相同組

10

20

30

40

50

換えによって、内因性マウス定常領域に作動可能に連結された、ヒト重鎖および軽鎖可変領域と置換されており、その結果、マウスにおいてキメラ抗体（ヒトV / マウスC）が作製され、次いで、その後、標準組換えDNA技術を使用して完全ヒト抗体に変換される、VELOCIMMUNE（登録商標）マウス（Regeneron Pharmaceuticals, Inc.）ならびに（ii）マウスが再編成されていないヒト重鎖可変領域、しかし単一の再変性されたヒト共通軽鎖可変領域を含有するMeMo（登録商標）マウス（Merus Biopharmaceuticals, Inc.）が挙げられる。このようなマウスおよび抗体を作製するためのその使用は、例えば、WO 2009 / 15777、US 2010 / 0069614、WO 2011 / 072204、WO 2011 / 097603、WO 2011 / 163311、WO 2011 / 163314、WO 2012 / 148873、US 2012 / 0070861およびUS 2012 / 0073004に記載されている。

10

#### 【0210】

本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体はまた、ヒト免疫グロブリン遺伝子のライブラリーをスクリーニングするためのファージディスプレイ法を使用して調製できる。ヒト抗体を単離するためのこのようなファージディスプレイ法は、当技術分野で確立されている。（例えば、Ladner et al.の米国特許第5,223,409号；同5,403,484号；および同5,571,698号；Dower et al.の米国特許第5,427,908号および同5,580,717号；McCafferty et al.の米国特許第5,969,108号および同6,172,197号；ならびにGriffiths et al.の米国特許第5,885,793号；同6,521,404号；同6,544,731号；同6,555,313号；同6,582,915号および同6,593,081号を参照のこと）。

20

#### 【0211】

本明細書に記載されるヒトモノクローナル抗体はまた、免疫処置の際にヒト抗体応答が生じ得るようヒト免疫細胞が再構成されている重症複合免疫不全（SCID）を有するマウスを使用して調製することができる。このようなマウスは、例えば、Wilson et al.の米国特許第5,476,996号および同5,698,767号に記載されている。

#### 【0212】

##### 免疫処置

ヒトNKG2Aに対する完全ヒト抗体を作製するために、例えば、Lonberg et al. (1994) Nature 368(6474): 856-859、Fishwild et al. (1996) Nature Biotechnology 14: 845-851、およびWO 98 / 24884によって、その他の抗原について記載されるように、ヒト免疫グロブリン遺伝子を含有するマウスまたはトランスジェニックもしくはトランスクロモソーマルマウス（例えば、HCo12、HCo7、もしくはKMマウス）を、NKG2A抗原および/またはNKG2Aを発現する細胞の精製または濃縮された調製物を用いて免疫処置することができる。あるいは、マウスを、ヒトNKG2AをコードするDNAを用いて免疫処置することができる。好ましくは、マウスは、第1の注入の際に6～16週齢とする。例えば、マウスを腹腔内に免疫処置するために、組換えヒトNKG2A抗原の精製または濃縮された調製物（例えば、5 μg～50 μg）を使用することができる。NKG2A抗原の精製または濃縮された調製物を使用する免疫処置により抗体が生じない場合には、NKG2Aを発現する細胞、例えば、細胞株を用いてマウスを免疫処置して、免疫応答を促進することもできる。

30

40

#### 【0213】

HuMAbトランスジェニックマウスは、最初に、Rib iアジュバント中の抗原を用いて腹腔内または皮下（SC）で免疫処置し、続いて、Rib iアジュバント中の抗原を用いて隔週でIP / SC免疫処置（最大合計10回）することができる。免疫応答は、後眼窩出血によって得られている血漿サンプルを用いて、免疫処置プロトコルの過程にわたってモニタリングできる。血漿は、ELISAおよびFACSによってスクリーニングでき（以下に記載されるように）、抗NKG2Aヒト免疫グロブリンの十分な力価を有するマウスを融合のために使用できる。マウスを、抗原を用いて静脈内に追加免疫し、3日

50

後に、殺し、脾臓およびリンパ節を採取できる。各免疫処置のために2～3回の融合が実施され得る。各抗原について、6から24匹の間のマウスが、免疫処置され得る。いくつかの実施形態では、HC o 7、HC o 1 2およびKM系統が使用される。さらに、HC o 7およびHC o 1 2導入遺伝子は両方とも、2種の異なるヒト重鎖導入遺伝子を有する(HC o 7 / HC o 1 2)単一マウスと一緒に育種され得る。

#### 【0214】

NKG2Aタンパク質に対するモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマの作製

本明細書に記載されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマを作製するために、免疫処置されたマウスから脾細胞および/またはリンパ節細胞を単離し、マウス骨髓腫細胞系統などの適当な不死化細胞系統と融合できる。得られたハイブリドーマを抗原特異的抗体の産生についてスクリーニングできる。例えば、50% PEGを用いて、免疫処置マウス由来の脾臓リンパ球の単細胞懸濁液を、Sp2/0非分泌性マウス骨髓腫細胞(ATCC、CRL 1581)と融合できる。細胞を、およそ $2 \times 10^5$ で平底マイクロタイタープレートにプレATINGし、続いて、10%胎児クローン血清、18%「653」コンディショニング培地、5%オリゲン(Origen)(IGEN)、4mM L-グルタミン、1mM ビルビン酸ナトリウム、5mM HEPES、0.055mM 2-メルカプトエタノール、50ユニット/mlペニシリン、50mg/mlストレプトマイシン、50mg/mlゲンタマイシンおよび1X HAT(Sigma)を含有する選択培地で2週間インキュベートする。およそ2週間後、細胞をHATがHTと置換されている培地で培養できる。次いで、個々のウェルを、ヒトモノクローナルIgMおよびIgG抗体についてELISAによってスクリーニングできる。広範なハイブリドーマ成長が起これると、10～14日後に普通に培地を観察できる。抗体を分泌するハイブリドーマを再プレATINGし、再度スクリーニングでき、ヒトIgGについて依然として陽性である場合に、制限希釈によってモノクローナル抗体を少なくとも2回サブクロニングできる。次いで、安定なサブクローンをインビトロで培養して、特性決定のために組織培養培地において少量の抗体を作製できる。

#### 【0215】

モノクローナル抗体を精製するために、選択されたハイブリドーマを、モノクローナル抗体精製のために2リットルのスピナーフラスコ中で成長させることができる。プロテインA-セファロース(Pharmacia、Piscataway、N.J.)を用いるアフィニティークロマトグラフィーの前に、上清を濾過し、濃縮できる。溶出されたIgGを、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーによって調べ、純度を確実にすることができる。バッファー溶液は、PBSに交換でき、1.43吸光係数を使用してOD280によって濃度を決定できる。モノクローナル抗体をアリコートにし、-80で保存できる。

#### 【0216】

VI. 抗体の製造

NKG2Aに対するモノクローナル抗体を産生するトランスフェクトーマの作製

配列が提供される特異的抗体およびその他の関連NKG2A抗体の両方を含めた、本発明の抗体は、例えば、当技術分野で周知の組換えDNA技術および遺伝子トランスフェクション方法の組合せを使用して宿主細胞トランスフェクトーマにおいて産生させることができる(Morrison, S. (1985) Science 229:1202)。

#### 【0217】

例えば、抗体またはその抗体断片を発現させるために、部分または全長軽鎖および重鎖をコードするDNAを、標準分子生物学技術(例えば、PCR増幅または対象の抗体を発現するハイブリドーマを使用するcDNAクローニング)によって得ることができ、遺伝子が、転写および翻訳制御配列に作動可能に連結されるように、DNAを発現ベクター中に挿入することができる。これに関連して、用語「作動可能に連結された」は、ベクター内の転写および翻訳制御配列が、抗体遺伝子の転写および翻訳を調節するというその意図される機能を果たすよう、抗体遺伝子がベクター中にライゲーションされることを意味す

るものとする。発現ベクターおよび発現制御配列は、使用される発現宿主細胞と適合するよう選択される。抗体軽鎖遺伝子および抗体重鎖遺伝子は、別個のベクター中に挿入されてもよく、または両遺伝子は、同一発現ベクター中に挿入される。抗体遺伝子は、標準方法（例えば、抗体遺伝子断片上の相補的制限部位およびベクターの連結または制限部位が存在しない場合には平滑末端連結）によって、発現ベクター（単数または複数）中に挿入される。本明細書に記載される抗体の軽鎖および重鎖可変領域を使用し、 $V_H$ セグメントがベクター内の $C_H$ セグメント（単数または複数）と作動可能に連結され、 $V_L$ セグメントが、ベクター内の $C_L$ セグメントと作動可能に連結されるように、それらを所望のアイソタイプの重鎖定常および軽鎖定常領域をすでにコードする発現ベクター中に挿入することによって任意の抗体アイソタイプの全長抗体遺伝子を作製できる。さらに、またはあるいは、組換え発現ベクターは、宿主細胞からの抗体鎖の分泌を促進するシグナルペプチドをコードし得る。抗体鎖遺伝子は、シグナルペプチドが、抗体鎖遺伝子のアミノ末端とインフレームで連結されるように、ベクター中にクローニングできる。シグナルペプチドは、免疫グロブリンシグナルペプチドまたは異種シグナルペプチド（すなわち、非免疫グロブリンタンパク質由来のシグナルペプチド）であり得る。

#### 【0218】

組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子に加えて、宿主細胞における抗体鎖遺伝子の発現を制御する調節配列を保持し得る。用語「調節配列」とは、プロモーター、エンハンサーおよび抗体鎖遺伝子の転写または翻訳を制御するその他の発現制御エレメント（例えば、ポリアデニル化シグナル）を含む。このような調節配列は、例えば、Goeddel (Gene Expression Technology, Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990)) に記載されている。調節配列の選択を含めた発現ベクターの設計は、他の因子の中でもとりわけ、形質転換されるべき宿主細胞の選択、所望のタンパク質の発現のレベルなどの因子に応じて変わり得ることが、当業者には明らかであろう。哺乳動物宿主細胞発現のための好ましい調節配列としては、哺乳動物細胞における高レベルのタンパク質発現を指示するウイルスエレメント、例えば、サイトメガロウイルス (CMV)、サルウイルス 40 (SV40)、アデノウイルス（例えば、アデノウイルス主要後期プロモーター (AdMLP)、およびポリオーマウイルス由来のプロモーターおよび/またはエンハンサーが挙げられる。あるいは、ユビキチンプロモーターまたは - グロビンプロモーターなどの非ウイルス調節配列を使用してもよい。なおさらに、SV40 初期プロモーター由来の配列およびヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型の長い末端反復配列を含有する、SR プロモーター系などの異なる供給源に由来する配列からなる調節エレメント (Takebe, Y. et al. (1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

#### 【0219】

組換え発現ベクターは、抗体鎖遺伝子および調節配列に加えて、宿主細胞におけるベクターの複製を調節する配列（例えば、複製の起点）などのさらなる配列および選択マーカー遺伝子を保持し得る。選択マーカー遺伝子は、ベクターが導入されている宿主細胞の選択を促進する（例えば、すべて Axel et al. による米国特許第 4,399,216 号、同 4,634,665 号および同 5,179,017 号を参照のこと）。例えば、通常、選択マーカー遺伝子は、G418、ハイグロマイシンまたはメトトレキサートなどの薬物に対する耐性を、ベクターが導入されている宿主細胞に付与する。例示的な選択マーカー遺伝子として、ジヒドロホレートラクターゼ (DHFR) 遺伝子（メトトレキサート選択/増幅とともに、dhfr - 宿主細胞において使用するのための）および neo 遺伝子 (G418 選択のための) が挙げられる。

#### 【0220】

軽鎖および重鎖の発現のために、重鎖および軽鎖をコードする発現ベクター（単数または複数）を、標準技術によって宿主細胞にトランスフェクトする。用語「トランスフェクション」の種々の形態は、原核生物または真核生物宿主細胞への外因性 DNA の導入のためによく使用される様々な技術、例えば、エレクトロポレーション、リン酸カルシウム沈殿、DEAE - デキストラントランスフェクションなどを包含する。原核生物または真核

10

20

30

40

50

生物宿主細胞のいずれかにおいて本明細書に記載される抗体を発現させることは理論上可能であるが、真核細胞、最も好ましくは、哺乳動物宿主細胞における抗体の発現が、最も好ましいが、これは、このような真核細胞、特に、哺乳動物細胞は、適切にフォールディングされ、免疫学的に活性な抗体を組み立て、分泌する可能性が原核細胞よりも高いからである。抗体遺伝子の原核生物発現は、活性な抗体の高効率の産生にとっては有効ではないと報告されている (Boss, M. A. and Wood, C. R. (1985) *Immunology Today* 6:12-13)。本発明の抗体はまた、酵母の糖鎖操作株においても産生することができる。(ピキア・パストリス (*Pichia pastoris*)). Li et al. (2006) *Nat. Biotechnol.* 24:210)。

【 0 2 2 1 】

本明細書に記載される組換え抗体を発現させるための例示的な哺乳動物宿主細胞として、CHO細胞 (例えば、R. J. Kaufman and P. A. Sharp (1982) *Mol. Biol.* 159:601-621に記載されるように、ジヒドロホレートレダクターゼ (DHFR) 選択マーカーとともに使用される、Urlaub and Chasin, (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220に記載される dhfr - CHO細胞を含む)、NSO骨髓腫細胞、COS細胞、およびSP2細胞が挙げられる。特に、NSO骨髓腫細胞とともに使用するためには、別の例示的な発現系として、WO 87 / 0 4 4 6 2、WO 89 / 0 1 0 3 6 および EP 3 3 8 , 8 4 1 に開示されるGS遺伝子発現系がある。抗体遺伝子をコードする組換え発現ベクターは、哺乳動物宿主細胞中に導入され、抗体は、宿主細胞を、宿主細胞における抗体の発現、またはより好ましくは、宿主細胞が成長した培養培地への抗体の分泌を可能にするのに十分な期間培養することによって産生される。抗体は、標準タンパク質精製法を使用して培養培地から回収できる。

【 0 2 2 2 】

本発明の抗体ポリペプチド鎖のNおよびC末端は、よく観察される翻訳後修飾によって予測される配列とは異なることもある。例えば、C末端リシン残基は、抗体重鎖から失われていることが多い。(Dick et al. (2008) *Biotechnol. Bioeng.* 100:1132)。N末端グルタミン残基およびより少ない程度であるが、グルタミン酸残基は、治療用抗体の軽鎖および重鎖の両方でピログルタミン酸残基に変換されることが頻繁にある。(Dick et al. (2007) *Biotechnol. Bioeng.* 97:544;Liu et al. (2011) *JBC* 286:11211;Liu et al. (2011) *J. Biol. Chem.* 286:11211)。

【 0 2 2 3 】

本発明の種々の抗hNKG2A抗体のアミノ酸配列は、配列表に提供されている。上記で論じられた理由から、C末端リシンは、重鎖または重鎖定常ドメインについて、配列表の配列の多くには含まれていない。しかしながら、代替的な実施形態では、本発明の抗hNKG2A抗体のそれぞれの重鎖、および/またはそのような抗体またはその重鎖もしくは軽鎖をコードする遺伝子コンストラクトは、重鎖のC末端に、このさらなるリシン残基を含む。

【 0 2 2 4 】

VII. アッセイ

本明細書に記載される抗体は、NKG2Aとの結合について、例えば、標準ELISAによって試験することができる。例えば、マイクロタイタープレートを、PBS中1~2 μg/mLの精製されたNKG2Aでコーティングし、次いで、PBS中5%ウシ血清アルブミンを用いてブロッキングする。各ウェルに抗体の希釈物 (例えば、NKG2A免疫処置マウスから得た血漿の希釈物) を添加し、37 °Cで1~2時間インキュベートする。プレートをPBS/Tweenを用いて洗浄し、次いで、西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) とコンジュゲートしている二次試薬 (例えば、ヒト抗体、またはそれ以外はヒト重鎖定常領域を有する抗体、ヤギ抗ヒトIgG Fc特異的ポリクローナル試薬) とともに37 °Cで1時間インキュベートする。洗浄した後、プレートをABTS基質 (Moss Inc, product: ABTS - 1000) を用いて発色させ、OD415~495で分光光度計によって分析する。次いで、免疫処置されたマウスから得た血清を、NKG2Aを発現しない対照細胞株とではなく、ヒトNKG2Aを発現する細胞株との結合につ

いてフローサイトメトリーによってさらにスクリーニングする。手短には、抗NK G 2 A抗体の結合を、NK G 2 A発現性CHO細胞を1 : 20希釈の抗NK G 2 A抗体とともにインキュベートすることによって評価する。細胞を洗浄し、結合を、PE標識された抗ヒトIg G Abを用いて検出する。FACSscanフローサイトメトリー(Becton Dickinson、San Jose、CA)を使用してフローサイトメトリー分析を実施する。最高の力価を発生するマウスが、融合に使用されることが好ましい。マウス抗HNK G 2 A抗体を検出しようとする場合には、類似の実験を、抗マウス検出抗体を使用して行ってもよい。

#### 【0225】

上記のようなELISAなどを使用して、抗体、ひいては、NK G 2 A免疫原と陽性の反応性を示す抗体を産生するハイブリドーマについてスクリーニングできる。好ましくは、高親和性でNK G 2 Aと結合する抗体を産生するハイブリドーマを、サブクロニングし、さらに特性決定できる。細胞バンクを作製するために、抗体精製のために、親細胞の反応性を保持する(ELISAによって)各ハイブリドーマから1つのクローンを選択できる。

#### 【0226】

抗NK G 2 A抗体を精製するために、モノクローナル抗体精製のために2リットルのスピナーフラスコ中で選択されたハイブリドーマを成長させることができる。プロテインA-セファロース(Pharmacia、Piscataway、NJ)を用いるアフィニティークロマトグラフィーの前に、上清を濾過し、濃縮できる。溶出されたIg Gを、ゲル電気泳動および高性能液体クロマトグラフィーによって調べ、純度を確実にすることができる。バッファー溶液は、PBSに交換でき、1.43吸光係数を使用してOD<sub>280</sub>によって濃度を決定できる。モノクローナル抗体をアリコートにし、-80℃で保存できる。

#### 【0227】

選択された抗NK G 2 Aモノクローナル抗体が独特のエピトープと結合するか否かを調べるために、市販の試薬(Pierce、Rockford、IL)を使用して各抗体をビオチン化できる。ビオチン化MAb結合は、ストレプトアビジン標識されたプローブを用いて検出できる。上記のように、NK G 2 AコーティングされたELISAプレートを使用して、非標識モノクローナル抗体およびビオチン化モノクローナル抗体を使用する競合研究を実施できる。

#### 【0228】

精製された抗体のアイソタイプを調べるために、特定のアイソタイプの抗体に対して特異的な試薬を使用してアイソタイプELISAを実施できる。例えば、ヒトモノクローナル抗体のアイソタイプを調べるために、1μg/mLの抗ヒト免疫グロブリンを用いてマイクロタイタープレートのウェルを、4℃で一晩コーティングできる。1% BSAを用いてブロッキングした後、プレートを、1μg/mL以下の試験モノクローナル抗体または精製されたアイソタイプ対照と周囲温度で1~2時間反応させる。次いで、ウェルをヒトIg G 1またはヒトIg M特異的アルカリホスファターゼがコンジュゲートしているプローブのいずれかと反応させる。プレートを上記のように発色させ、分析する。

#### 【0229】

モノクローナル抗体の、NK G 2 Aを発現する生存細胞との結合を調べるために、フローサイトメトリーを使用できる。手短には、膜結合性NK G 2 Aを発現する細胞株(標準成長条件下で成長させた)を、0.1% BSAを含有するPBS中、ある濃度のモノクローナル抗体と4℃で1時間混合する。洗浄した後、細胞を、一次抗体染色と同一条件下でフィコエリスリン(PE)標識された抗Ig G抗体と反応させる。サンプルを光および側方散乱特性を使用するFACSscan機器によって分析して、単細胞でゲート開閉し、標識された抗体の結合を調べる。フローサイトメトリーアッセイ(に加えて、または代わりに)、蛍光顕微鏡を使用する代替アッセイを使用してもよい。上記のように細胞を正確に染色し、蛍光顕微鏡によって調べることができる。この方法によって、個々の細胞の可視化が可能となるが、抗原の密度に応じて減少した感受性を有し得る。



## 【0230】

抗hNKG2A抗体は、ウエスタンブロッティングによってNKG2A抗原との反応性についてさらに試験できる。手短には、NKG2Aを発現する細胞から細胞抽出物を調製し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動に付すことができる。電気泳動後、分離された抗原をニトロセルロースメンブランにトランスファーし、20%マウス血清を用いてブロッキングし、試験されるべきモノクローナル抗体を用いてプロービングする。抗IgGアルカリホスファターゼを使用してIgG結合を検出し、BCIP/NBT基質錠剤を用いて発色させることができる(Sigma Chem. Co., St. Louis, MO)。

## 【0231】

種々の抗NKG2A抗体の結合親和性、交差反応性、および結合動態を解析するための方法としては、当技術分野において公知の標準アッセイ、例えば、Biolayer Interferometry (BLI) 分析、およびBiacore SPR機器を使用したBiacore SPR分析が挙げられる。

## 【0232】

一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、ヒトNKG2Aの細胞外領域と特異的に結合する。一実施形態では、抗体は、NKG2Aの細胞外ドメイン内の特定のドメイン(例えば、機能的ドメイン)と結合する。一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、ヒトNKG2Aの細胞外領域およびカニクイザルNKG2Aの細胞外領域と特異的に結合する。一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、高い親和性で、ヒトNKG2Aと結合する。

## 【0233】

## V I I I . 多重特異性分子

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗体は、多重特異性、例えば、二重特異性または三重特異性の分子である。多重特異性抗原結合分子、例えば、多重特異性抗体は、それぞれが異なるエピトープに対して特異的な2つ以上の抗原結合部位を含む。異なるエピトープは、同じ抗原または異なる抗原の一部であり得る。一実施形態では、一方の抗原結合部位は、ヒトNKG2Aに特異的であり、他方は、異なる抗原に特異的である。一実施形態では、本明細書に記載される抗hNKG2A抗体またはその抗原結合断片は、少なくとも2つの異なる結合部位または標的分子と結合する二重特異性分子を生成するように、異なる結合特異性を有する別の抗原結合分子、例えば、別のペプチドまたはタンパク質(例えば、別の抗体もしくは抗体断片または受容体のリガンド)と連結している。一実施形態では、本明細書に記載される抗体は、2つを上回る異なる結合部位および/または標的分子と結合する多重特異性分子を生成するように、誘導体化されるか、または1つを上回る他の抗原結合分子と連結している。したがって、少なくとも1つのNKG2Aに対する第1の結合特異性および第2の標的エピトープに対する第2の結合特異性を含む二重特異性分子が、本明細書において提供される。二重特異性分子が多重特異性である本明細書に記載される一実施形態では、分子は、第3の結合特異性をさらに含み得る。

## 【0234】

一実施形態では、本明細書に記載される二重特異性分子は、結合特異性として少なくとも1種の抗体または例えば、Fab、Fab'、Fab'<sub>2</sub>、Fvもしくは一本鎖Fvを含めたその抗体断片を含む。参照によりその開示内容が明確に組み込まれるLadner et al. 米国特許第4,946,778号に記載されるように、抗体はまた、軽鎖または重鎖二量体またはFvもしくは一本鎖コンストラクトなどのその任意の最小断片であり得る。

## 【0235】

ヒトモノクローナル抗体が好ましいが、本明細書に記載される二重特異性抗体において利用することができるその他の抗体には、マウスモノクローナル抗体、キメラモノクローナル抗体およびヒト化モノクローナル抗体がある。

## 【0236】

本明細書に記載される二重特異性抗体は、当技術分野において公知の方法を使用して、構成要素としての結合特異性をコンジュゲートすることによって調製することができる。

例えば、二重特異性分子の各結合特異性を、別個に作製し、次いで、互いにコンジュゲートできる。結合特異性がタンパク質またはペプチドである場合には、共有結合コンジュゲーションのために種々のカップリングまたは架橋剤を使用できる。架橋剤の例として、プロテインA、カルボジイミド、N - スクシンイミジル - S - アセチル - チオアセテート (SATA)、5, 5' - ジチオビス (2 - ニトロ安息香酸) (DTNB)、o - フェニレンジマレイミド (oPDM)、N - スクシンイミジル - 3 - (2 - ピリジルジチオ) プロピオネート (SPDP) およびスルホスクシニミジル 4 - (N - マレイミドメチル) シクロヘキサン - 1 - カルボキシレート (スルホ - SMCC) が挙げられる (例えば、Karpovsky et al. (1984) J. Exp. Med. 160:1686; Liu, MA et al. (1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648を参照のこと)。その他の方法として、Paulus (1985) Behring Int. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan et al. (1985) Science 229:81-83) および Glennie et al. (1987) J. Immunol. 139: 2367-2375) に記載されるものが挙げられる。好ましいコンジュゲート剤として、SATAおよびスルホ - SMCCがあり、両方とも、Pierce Chemical Co. (Rockford, IL) から入手可能である。

【0237】

結合特異性が抗体である場合には、それらを、2つの重鎖のC末端ヒンジ領域のスルフヒドリル結合によってコンジュゲートできる。特に好ましい実施形態では、ヒンジ領域は、コンジュゲーションに先立って奇数のスルフヒドリル残基、好ましくは、1を含有するよう修飾される。

【0238】

あるいは、両結合特異性は、同一ベクター中にコードされ、同一宿主細胞において発現され、アセンブルされ得る。この方法は、二重特異性分子が、(mAb x mAb)、(mAb x Fab)、(Fab x F(ab')<sub>2</sub>)、または(リガンド x Fab) 融合タンパク質などの結合特異性の組合せを有する場合に、特に有用である。本明細書に記載される二重特異性分子は、1つの一本鎖抗体および結合決定基を含む一本鎖分子または2つの結合決定基を含む一本鎖二重特異性分子であり得る。二重特異性分子は、少なくとも2つの一本鎖分子を含み得る。二重特異性分子を調製するための方法は、例えば、米国特許第5, 260, 203号; 同5, 455, 030号; 同4, 881, 175号; 同5, 132, 405号; 同5, 091, 513号; 同5, 476, 786号; 同5, 013, 653号; 同5, 258, 498号および同5, 482, 858号に記載されている。

【0239】

二重特異性分子の、その特異的標的との結合は、ELISA、ラジオイムノアッセイ (RIA)、FACS分析、生物検定法 (例えば、成長阻害) またはウエスタンブロットアッセイを使用するなど、当技術分野で認識される方法を使用して確認することができる。これらのアッセイは各々、一般に、対象の複合体に対して特異的な標識試薬 (例えば、抗体) を使用することによって、特に対象とされるタンパク質 - 抗体複合体の存在を検出する。

【0240】

#### IX. 組成物

医薬上許容される担体と一緒に製剤化された、1種または複数の本明細書に記載される抗NKG2A抗体またはその抗原結合断片 (単数または複数) を含有する組成物、例えば、医薬組成物が、さらに提供される。したがって、本発明の組成物は、本明細書に記載されるCDR配列、重鎖および/もしくは軽鎖可変領域配列、または全長重鎖および/もしくは軽鎖配列を有するヒトまたはヒト化抗hNKG2A抗体 (またはその抗原結合断片) を含む。本発明の組成物はまた、配列表に記載される配列の変異体である配列を有する抗hNKG2A抗体も含む。例えば、そのような抗体は、配列表に記載されるCDR配列、重鎖および/もしくは軽鎖可変領域配列、または全長重鎖および/もしくは軽鎖配列と少なくとも70%、75%、80%、85%、90%、または95%、96%、97%、98%、または99%同一である配列を含み得る。

【0241】

このような組成物はまた、（例えば、２種以上の異なる）本明細書に記載される抗体またはイムノコンジュゲートまたは二重特異性分子のうち１種または組合せを含み得る。例えば、本明細書に記載される医薬組成物は、標的抗原上の異なるエピトープと結合するか、または補完的活性を有する抗体（またはイムノコンジュゲートもしくは二重特異性抗体）の組合せを含み得る。

#### 【０２４２】

本明細書に記載される医薬組成物はまた、併用療法として、すなわち、その他の薬剤と組み合わせた抗NKGA抗体として投与できる。例えば、併用療法は、少なくとも１種のその他の抗癌剤および／またはT細胞刺激（例えば、活性化）剤と組み合わせた、本明細書に記載される抗NKGA抗体を含み得る。併用療法において使用され得る治療薬の例は、本明細書に記載される抗体の使用に関する節において以下により詳細に記載される。

10

#### 【０２４３】

いくつかの実施形態では、本明細書において開示される医薬組成物は、癌の治療のために使用されるその他の化合物、薬物および／または薬剤を含み得る。このような化合物、薬物および／または薬剤として、例えば、所与の癌に対する免疫応答を刺激する化学療法薬、小分子薬または抗体が挙げられる。いくつかの実施形態では、医薬組成物は、抗hNKGAに特異的な第１の抗体および第２の抗体を含む。

#### 【０２４４】

いくつかの実施形態では、第１の抗体および第２の抗体は、固定用量（すなわち、固定比）で組成物中に存在する。他の実施形態では、固定用量は、少なくとも約１：２００～少なくとも約２００：１、少なくとも約１：１５０～少なくとも約１５０：１、少なくとも約１：１００～少なくとも約１００：１、少なくとも約１：７５～少なくとも約７５：１、少なくとも約１：５０～少なくとも約５０：１、少なくとも約１：２５～少なくとも約２５：１、少なくとも約１：１０～少なくとも約１０：１、少なくとも約１：５～少なくとも約５：１、少なくとも約１：４～少なくとも約４：１、少なくとも約１：３～少なくとも約３：１、または少なくとも約１：２～少なくとも約２：１の抗hNKGA抗体mg対第２の抗体mgである。いくつかの実施形態では、固定用量は、少なくとも約１：１、約１：２、約１：３、約１：４、約１：５、約１：６、約１：７、約１：８、約１：９、約１：１０、約１：１５、約１：２０、約１：３０、約１：４０、約１：５０、約１：６０、約１：７０、約１：８０、約１：９０、約１：１００、約１：１２０、約１：１４０、約１：１６０、約１：１８０、または約１：２００の抗hNKGA抗体対第２の抗体である。いくつかの実施形態では、固定用量は、少なくとも約２：１、約３：１、約４：１、約５：１、約６：１、約７：１、約８：１、約９：１、約１０：１、約１５：１、約２０：１、約３０：１、約４０：１、約５０：１、約６０：１、約７０：１、約８０：１、約９０：１、約１００：１、約１２０：１、約１４０：１、約１６０：１、約１８０：１、または約２００：１の第１の抗体mg対第２の抗体mgである。例えば、一実施形態では、抗hNKGA抗体および第２の抗体は、実施例に記載されるように投与される。

20

30

#### 【０２４５】

さらなる抗体としては、例えば、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗TIGIT抗体、抗OX40（CD134、TNFRSF4、ACT35、および／もしくはTXGP1Lとしても知られる）抗体、抗LAG-3抗体、抗CD73抗体、抗CD137抗体、抗CD27抗体、または抗CSF-1R抗体のうちの１つまたは複数挙げられる。

40

#### 【０２４６】

本明細書において、「医薬上許容される担体」として、生理学的に適合する、ありとあらゆる溶媒、分散媒、コーティング、抗菌剤および抗真菌剤、等張剤および吸収遅延剤などが挙げられる。いくつかの実施形態では、担体は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊髄または上皮投与（例えば、注射または注入による）に適している。いくつかの実施形態では、担体は、静脈内投与に好適である。他の実施形態では、担体は、皮下投与に好適で

50

ある。いくつかの実施形態では、抗NKGA抗体を含む組成物は、ヒアルロナンを一時的に分解する組換えヒトヒアルロニダーゼ酵素(rHuPH20)を含むHalozymerのENHANCE(登録商標)薬物送達技術を使用して皮下送達される。いくつかの実施形態では、ENHANCE(登録商標)薬物送達技術は、静脈内投与と比較してより迅速な組成物の皮下投与を可能にする。他の実施形態では、投与経路に応じて、化合物を、酸および化合物を不活性化し得るその他の天然条件作用から保護するために、材料において、活性化化合物、すなわち、抗体、免疫複合体または二重特異性分子をコーティングしてもよい。

#### 【0247】

本明細書に記載される医薬化合物は、1種または複数の医薬上許容される塩を含み得る。「医薬上許容される塩」とは、親化合物の所望の生物活性を保持し、何らかの望ましくない毒物学的影響を付与しない塩を指す(例えば、Berge, S.M., et al. (1977) J. Pharm. Sci. 66:1-19を参照のこと)。このような塩の例として、酸付加塩および塩基付加塩が挙げられる。酸付加塩として、塩酸、硝酸、リン酸、硫酸、臭化水素酸、ヨウ化水素酸、亜リン酸などといった非毒性無機酸に由来するものならびに脂肪族モノおよびジカルボン酸、フェニル置換アルカン酸、ヒドロキシアルカン酸、芳香族酸、脂肪族および芳香族スルホン酸などといった非毒性有機酸に由来するものが挙げられる。塩基付加塩として、ナトリウム、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどといったアルカリ土類金属に由来するものならびにN, N'-ジベンジルエチレンジアミン、N-メチルグルカミン、クロロプロカイン、コリン、ジエタノールアミン、エチレンジアミン、プロカインなどといった非毒性有機アミンに由来するものが挙げられる。

#### 【0248】

本明細書に記載される医薬組成物はまた、医薬上許容される抗酸化物質を含み得る。医薬上許容される抗酸化物質の例として、(1)アスコルビン酸、システイン塩酸塩、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウムなどといった水溶性抗酸化物質、(2)パルミチン酸アスコルビル、ブチル化ヒドロキシアニソール(BHA)、ブチル化ヒドロキシトルエン(BHT)、レシチン、没食子酸プロピル、 $\alpha$ -トコフェロールなどといった油溶性抗酸化物質および(3)クエン酸、エチレンジアミン四酢酸(EDTA)、ソルビトール、酒石酸、リン酸などといった金属キレート化剤が挙げられる。

#### 【0249】

本明細書に記載される医薬組成物において使用され得る、適した水性および非水性担体の例として、水、エタノール、ポリオール(グリセロール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコールなどといった)およびそれらの適した混合物、オリーブオイルなどの植物油およびオレイン酸エチルなどの注射用有機エステルが挙げられる。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティング材料の使用によって、分散物の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって維持できる。

#### 【0250】

これらの組成物はまた、保存料、湿潤剤、乳化剤および分散剤などのアジュバントを含み得る。微生物の存在の防止は、滅菌法手順、前掲によって、また種々の抗菌剤および抗真菌剤、例えば、パラベン、クロロブタノール、フェノールソルビン酸などを含めることの両方によって確実にできる。糖、塩化ナトリウムなどといった等張剤を組成物中に含めることが望ましい場合もある。さらに、モノステアリン酸アルミニウムおよびゼラチンなどの吸収を遅延する薬剤を含めることによって、注射用医薬品形態の長期の吸収を引き起こすことができる。

#### 【0251】

医薬上許容される担体として、滅菌水溶液または分散物および滅菌注射用溶液または分散物の即時調製のための滅菌分散剤が挙げられる。本明細書における例示的な医薬上許容される担体としては、さらに、間質的薬物分散剤、例えば、可溶性中性活性ヒアルロニダーゼ糖タンパク質(sHASEGP)、例えば、ヒト可溶性PH-20ヒアルロニダーゼ糖タンパク質、例えば、rHuPH20(HYLENEX(商標)、Baxter Int

10

20

30

40

50

ernational, Inc.) が挙げられる。rHuPH20を含む、特定の例示的な sHASEGP および使用法は、米国特許公開第 2005/0260186 号および同第 2006/0104968 号に記載されている。一態様では、sHASEGP は、1 つまたは複数のさらなるグリコサミノグリカナーゼ、例えば、コンドロイチナーゼと組み合わせられる。

#### 【0252】

医薬上活性な物質のためのこのような媒体および薬剤の使用は、当技術分野で公知である。任意の従来の媒体または薬剤が、活性化化合物と不適合である場合を除いて、本明細書に記載される医薬組成物におけるその使用が考慮される。補足活性化化合物も、組成物中に組み込まれ得る。

#### 【0253】

治療用組成物は、通常、製造および貯蔵の条件下で無菌で、安定でなくてはならない。組成物は、溶液、マイクロエマルジョン、リポソームまたは高薬物濃度に適したその他の秩序構造として製剤化できる。担体は、例えば、水、エタノール、ポリオール（例えば、グリセロール、プロピレングリコールおよび液体ポリエチレングリコールなど）およびそれらの適した混合物を含有する、溶媒または分散媒であり得る。適切な流動性は、例えば、レシチンなどのコーティングの使用によって、分散物の場合には必要な粒径の維持によって、また界面活性剤の使用によって維持できる。多くの場合、組成物中に、等張剤、例えば、糖、マンニトール、ソルビトールまたは塩化ナトリウムなどのポリアルコールを含めることが好ましいであろう。組成物中に吸収を遅延する薬剤、例えば、モノステアリン酸塩およびゼラチンを含めることによって、注射用組成物の長期吸収を引き起こすことができる。

#### 【0254】

滅菌注射用溶液は、必要に応じて、上記で列挙された成分のうち 1 種または組合せとともに、適当な溶媒中に必要な量の活性化化合物を組み込むことと、それに続く、滅菌精密濾過によって調製できる。一般に、分散物は、基本分散媒および上記のものから必要なその他の成分を含有する滅菌ビヒクル中に活性化化合物を組み込むことによって調製される。滅菌注射用溶液を調製するための滅菌散剤の場合には、調製の好ましい方法として、その前もって滅菌濾過された溶液から有効成分および任意のさらなる所望の成分の粉末が得られる、真空乾燥およびフリーズドライ（凍結乾燥）がある。

#### 【0255】

単一投与形を生産するための担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、治療されている対象および特定の投与様式に応じて変わる。単一投与形を生産するための担体材料と組み合わせられ得る有効成分の量は、一般に、治療効果を生産する組成物の量となる。医薬上許容される担体との組合せにおいて、この量は、100 パーセントのうち、有効成分の約 0.01 パーセント～約 99 パーセント、例えば、約 0.1 パーセント～約 70 パーセント、例えば、有効成分の約 1 パーセント～約 30 パーセントの範囲となり得る。

#### 【0256】

いくつかの実施形態では、組成物は、抗 NKG2A 抗体、例えば、NKG2A.9 を含む。組成物は、静脈内投与のための滅菌で非発熱性の単回使用の保存剤不含等張水溶液である。組成物は、未希釈または注入前に 0.9% 塩化ナトリウム注射で必要とされるタンパク質濃度にさらに希釈して投与されてもよい。いくつかの実施形態では、抗 NKG2A 抗体は、以下の賦形剤を含む：L-ヒスチン（histine）、L-ヒスチジン塩酸塩一水和物、スクロース、ペンテト酸（ジエチレントリアミン五酢酸としても知られる、ポリソルベート 80、および注射用水。

#### 【0257】

投与計画は、最適の所望の応答（例えば、治療的応答）を提供するように調整される。例えば、単回ボラスを投与してもよく、いくつかの分割用量を経時的に投与してもよく、または治療状況の緊急事態によって示されるように、用量を比例的に低減または増大してもよい。投与の容易性および投与形の均一性のための投与単位形に非経口組成物を製剤化

10

20

30

40

50

することは特に有利である。本明細書において、投与単位形とは、治療されている対象の単位投与量として適している物理的に別個の単位を指し、各単位は、必要な医薬担体と関連して所望の治療効果を生産するよう算出された所定の量の活性化合物を含有する。本明細書に記載される投与単位形の仕様は、(a) 活性化合物の独特の特徴および達成されるべき特定の治療効果ならびに(b) 個体における感受性の治療のためのこのような活性化合物の配合の技術分野に固有の制限によって決定され、それらに直接左右される。

#### 【0258】

抗体の投与のために、投薬量は、約0.0001~100mg/宿主体重1kg、より通例的には、0.01~5mg/宿主体重1kgの範囲に及び得る。例えば、投薬量は、0.3mg/体重1kg、1mg/体重1kg、3mg/体重1kg、5mg/体重1kg、もしくは10mg/体重1kg、または1~10mg/kgの範囲内であり得る。あるいは、抗体の投与は、2mg~800mgの範囲に及び得る一定用量、例えば、25mg、80mg、200mg、または400mgの用量である。例示的な治療計画は、1週間に1回、2週間に1回、3週間に1回、4週間に1回、1ヶ月間に1回、2ヶ月間に1回、3ヶ月間に1回、4ヶ月間に1回、5ヶ月間に1回、または6ヶ月間に1回の投与を必要とする。いくつかの実施形態では、治療計画は、初回用量、および続いて、間欠的な投薬間隔で、異なる用量の維持用量を含む。

10

#### 【0259】

いくつかの実施形態では、異なる結合特異性を有する2つ以上のモノクローナル抗体が同時に投与され、その場合には、投与されるそれぞれの抗体の投薬量は、示された範囲内に入る。いくつかの実施形態では、治療用抗体は、複数の状況で投与される。単一投薬間の間隔は、例えば、毎週、3週間ごと、4週間ごと、毎月、3ヶ月ごと、または毎年であり得る。間隔はまた、患者における標的抗原に対する抗体の血液レベルを測定することによって示されるように、不規則である場合もある。いくつかの実施形態では、投薬量は、約1~1000μg/mL、いくつかの方法では、約25~300μg/mLの血漿抗体濃度を達成するよう調整される。

20

#### 【0260】

いくつかの実施形態では、抗体は、持続放出製剤として投与されてもよい。持続放出製剤による投与は、必要とする投与の頻度が低くなり得る。投与量および頻度は、患者における抗体の半減期に応じて変わる。投与の投与量および頻度は、治療が予防的であるか、治療的であるかに応じて変わり得る。予防的適用では、比較的少ない投与量が、比較的頻繁ではない間隔で長期間にわたって投与される。一部の患者は、生涯治療を受け続ける。いくつかの実施形態では、比較的短い間隔で比較的高い投薬量が、治療的処置のために投与される。いくつかの実施形態では、比較的高い投薬量は、疾患の進行が低減または停止されるまで、例えば、患者が、疾患の症状の部分的または完全な寛解を示すまで、投与される。いくつかの実施形態では、予防的処置は、治療的処置の後に患者に投与される。

30

#### 【0261】

本明細書に記載される医薬組成物中の有効成分の実際の投与量レベルは、患者にとって毒性ではなく、特定の患者、組成物および投与様式について所望の治療応答を達成するのに有効である有効成分の量を得るよう変えてもよい。選択される投与量レベルは、使用される本明細書に記載される特定の組成物またはそのエステル、塩もしくはアミドの活性、投与経路、投与の時間、使用されている特定の化合物の排出速度、治療期間、使用される特定の組成物と組み合わせて使用されるその他の薬物、化合物および/または材料、治療されている患者の年齢、性別、体重、状態、全身の健康および先の病歴および医薬の技術分野において周知の同様の因子を含めた種々の薬物動態因子に応じて変わる。

40

#### 【0262】

本明細書に記載される抗NKGA抗体の「治療上有効な投与量」は、好ましくは、疾患症状の重症度の減少、疾患症状のない期間の頻度および期間の増大、または疾患苦痛による機能障害もしくは能力障害の防止をもたらす。癌に関連して、治療上有効な用量は、好ましくは、癌に関連する身体症状のさらなる増悪を防止する。癌の症状は、当技術分野

50

で周知であり、例えば、普通ではない黒子の特徴、非対称、境界、色および／または直径を含めた黒子の外観の変化、新規に着色した皮膚領域、異常な黒子、爪の下の黒くなった領域、乳房のしこり、乳頭の変化、乳房嚢胞、乳房疼痛、死亡、体重減少、脱力感、過度の疲労、摂食障害、食欲の喪失、慢性の咳、息切れの悪化、喀血、血尿、血便、悪心、嘔吐、肝臓転移、肺転移、骨転移、腹部膨満、鼓腸、腹膜腔中の流体、膣出血、便秘、腹部膨隆、結腸の穿孔、急性腹膜炎（感染、発熱、疼痛）、疼痛、吐血、多量の発汗、発熱、高血圧症、貧血、下痢、黄疸、めまい、悪寒、筋痙攣、結腸転移、肺転移、膀胱転移、肝臓転移、骨転移、腎臓転移および膵臓転移、嚥下困難などが挙げられる。治療効果は、本発明の抗hNKG2Aモノクローナル抗体の最初の投与の直後に観察することができる場合があるか、または所定の期間および／もしくは一連の投薬の後にしか観察されない場合がある。そのような遅延効果は、処置の数ヶ月後、例えば、最大6、9、または12ヶ月後にしか観察されない場合がある。

10

#### 【0263】

疾患の早期または先行する徴候が存在する場合に望まれ得るような治療上有効な用量は、癌の発生を防ぐかまたは遅延し得る。したがって、前記のうちいずれかをモニタリングする任意の臨床または生化学アッセイを使用して、特定の治療が、癌を治療するための治療上有効な用量であるか否かを調べてもよい。当業者ならば、対象の大きさ、対象の症状の重症度および特定の組成物または選択された投与経路のような因子に基づいてこのような量を決定できるであろう。

#### 【0264】

20

本明細書に記載される組成物は、当技術分野で公知の1種または複数の種々の方法を使用して、1種または複数の投与経路によって投与できる。当業者には明らかであろうが、投与経路および／または投与様式は、所望の結果に応じて変わる。本明細書に記載される抗体の例示的な投与経路として、静脈内、筋肉内、皮内、腹腔内、皮下、脊髄または例えば、注射もしくは注入によるその他の非経口投与経路が挙げられる。

#### 【0265】

あるいは、本明細書に記載される抗体は、局所、上皮または粘膜投与経路、例えば、鼻腔内、経口、経膣、直腸性、舌下にまたは局所になど、非経口ではない経路によって投与できる。

#### 【0266】

30

留置用剤、経皮パッチおよびマイクロカプセル化送達系を含めた徐放性製剤など、活性化合物を、化合物を迅速な放出から保護する担体を用いて調製できる。エチレン酢酸ビニル、ポリ酸無水物、ポリグリコール酸、コラーゲン、ポリオルトエステルおよびポリ乳酸などの生分解性、生体適合性ポリマーを使用できる。このような製剤を調製するための多数の方法が、特許権をとられているか、または一般的に、当業者に公知である。例えば、Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, ed., Marcel Dekker, Inc., New York, 1978を参照のこと。

#### 【0267】

治療用組成物は、当技術分野において公知の医療デバイスを用いて投与することができる。例えば、好ましい実施形態では、本明細書に記載される治療用組成物は、米国特許第5,399,163号、同5,383,851号、同5,312,335号、同5,064,413号、同4,941,880号、同4,790,824号、または同4,596,556号に開示されるデバイスなどの注射針なし皮下注射デバイスを用いて投与することができる。本明細書に記載される抗NKG2A抗体で使用するための周知の留置用剤およびモジュールの例として、制御された速度で医薬を分配するための埋込み可能な微量注入ポンプを開示する米国特許第4,487,603号が挙げられる。；皮膚を通して医薬を投与するための治療用装置を開示する同4,486,194号；正確な注入速度で医薬を送達するための医薬注入ポンプを開示する同4,447,233号；連続薬物送達のための可変流動埋込み可能注入器具を開示する同4,447,224号；マルチチャンバーコンパートメントを有する浸透圧薬物送達システムを開示する同4,439,196号；

40

50

および浸透圧薬物送達システムを開示する同 4, 475, 196 号が挙げられる。これらの特許は、参照により本明細書に組み込まれる。多数のその他のこのような留置用剤、送達系およびモジュールが、当業者に公知である。

#### 【0268】

特定の実施形態では、本明細書に記載される抗 hNKG2A 抗体は、インビボでの適切な分布を確実にするよう製剤化することができる。例えば、血液脳関門 (BBB) は、多数の高親水性化合物を排除する。本明細書に記載される治療用化合物が、BBB を通過することを確実にするために (必要に応じて)、それらを、例えば、リポソーム中に製剤化することができる。リポソームを作製する方法については、例えば、米国特許第 4,522,811 号、同 5,374,548 号、および同 5,399,331 号を参照されたい。リポソームは、特定の細胞または臓器中に選択的に輸送され、したがって、標的化された薬物送達を増強する 1 つまたは複数の部分を含み得る (例えば、V.V. Ranade (1989) J. Clin. Pharmacol. 29:685 を参照のこと)。例示的標的化部分として、葉酸またはピオチン (例えば、Low et al. の米国特許第 5,416,016 号を参照のこと); マンノシド (Umezawa et al., (1988) Biochem. Biophys. Res. Commun. 153:1038); 抗体 (P.G. Bloeman et al. (1995) FEBS Lett. 357:140; M. Owais et al. (1995) Antimicrob. Agents Chemother. 39:180); 界面活性剤プロテイン A 受容体 (Briscoe et al. (1995) Am. J. Physiol. 1233:134); p120 (Schreier et al. (1994) J. Biol. Chem. 269:9090) が挙げられ、K. Keinänen; M.L. Laukkanen (1994) FEBS Lett. 346:123; J.J. Killian; I.J. Fidler (1994) Immunomethods 4:273 も参照のこと。

#### 【0269】

本明細書に記載される抗体組成物 (例えば、ヒト抗体、二重特異性もしくは多重特異性分子、またはイムノコンジュゲート) および使用のための説明書を含む、キットもまた、本明細書に記載の範囲内に含まれる。キットは、少なくとも 1 つのさらなる試薬、または 1 つもしくは複数の本明細書に記載されるさらなるヒト抗体をさらに含み得る。キットは、キットの内容物の意図される使用を示す表示を含み得る。用語表示は、キット上にもしくはキットとともに供給されるか、またはそうでなければキットに添付されている任意の文書または記録材料を含む。

#### 【0270】

##### X. 使用の方法

本明細書に記載される抗体、抗体組成物および方法は、例えば、NKG2A / HLA-E 相互作用を遮断することによる免疫応答の増強を含む、多数のインビトロおよびインビボでの用途がある。一実施形態では、本明細書に記載される抗 NKG2A 抗体は、モノクローナルヒトまたはヒト化抗体である。一実施形態では、本明細書に記載される抗 hNKG2A 抗体 (例えば、13F3.A4、NKG2A.9、および NKG2A.11) は、インビトロもしくはエキソビボで培養液中の細胞に、または種々の疾患において免疫性を増強するためにヒト対象に、投与することができる。具体的な実施形態では、抗 hNKG2A 抗体は、アンタゴニスト抗体である。対象において免疫応答を修飾する方法であって、対象において免疫応答が増強、刺激、または上方制御されるように、対象に、本明細書に記載される抗 NKG2A 抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、方法が、本明細書において提供される。一実施形態では、本明細書に記載される方法に従って抗 hNKG2A 抗体を投与することにより、T 細胞および / または NK 細胞応答が増強される。一実施形態では、本明細書に記載される方法に従って抗 hNKG2A 抗体を投与することにより、腫瘍に対する抗原特異的 T 細胞応答が刺激、増強、または上方制御される。T 細胞は、Teff 細胞、例えば、CD4+ Teff 細胞、CD8+ Teff 細胞、ヘルパー T (Th) 細胞、および細胞傷害性 T (Tc) 細胞であり得る。腫瘍は、固形腫瘍または液体腫瘍、例えば、血液悪性腫瘍であり得る。特定の実施形態では、腫瘍は、免疫原性腫瘍である。特定の実施形態では、腫瘍は、非免疫原性である。特定の実施形態では、腫瘍は、PD-L1 陽性である。特定の実施形態では、腫瘍は、PD-L1 陰性である。対象はまた、ウイルスを有する対象であり得、ウイルスに対する免疫応答が増強される。



一実施形態では、本明細書に記載される方法に従って抗hNKG2A抗体を投与することにより、NK細胞応答が刺激、増強、または上方制御される。

【0271】

一実施形態では、方法は、ヒト対象における免疫応答の増強をもたらす、そのような増強は、望ましい効果を有する。一実施形態では、ヒト対象は、免疫応答、例えば、T細胞媒介性免疫応答を増強することによって治療することができる障害を有するヒト患者である。具体的な実施形態では、ヒト患者は、癌を有する。一実施形態では、本明細書に記載される抗hNKG2A抗体は、対象の抗原と一緒に投与できるか、または抗原が、治療されるべき対象、例えば、腫瘍を有するかもしくはウイルスを有する対象においてすでに存在していてもよい。抗NKG2A抗体を、別の薬剤と一緒に投与する場合には、2種は、別個に投与することも、同時に投与することもできる。

10

【0272】

対象において腫瘍細胞の成長を阻害するための方法であって、腫瘍細胞の成長が、対象、例えば、ヒト対象において阻害されるように、対象に、本明細書に記載される抗hNKG2A抗体を投与することを含む、方法が、さらに提供される。また、対象において慢性ウイルス感染を治療する方法であって、慢性ウイルス感染が、対象、例えば、ヒト対象において治療されるように、対象に、本明細書に記載される抗NKG2A抗体を投与することを含む、方法も提供される。

【0273】

いくつかの実施形態では、抗NKG2A抗体は、補助療法、アジュバント療法、またはネオアジュバント療法として、対象、例えば、ヒト患者に投与される。いくつかの実施形態では、抗NKG2A抗体を用いた癌を有する対象の治療は、現在の標準治療と比較して長期間耐久性のある応答、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10年またはそれ以上の長期間の生存、少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、または10年またはそれ以上の再発のない生存をもたらす得る。特定の実施形態では、抗hNKG2A抗体を用いた癌を有する対象の治療は、例えば、1、2、3、4、5、6、7、8、9、もしくは10年間またはそれ以上、癌の再発を予防するか、または癌の再発を遅延させる。抗NKG2A治療は、第1選択肢、第2選択肢、またはそれ以降の選択肢の治療として使用することができる。

20

【0274】

本明細書に記載されるこれらおよびその他の方法は、以下にさらに詳述される。

30

【0275】

癌

癌を有する対象を治療するための方法であって、対象が治療されるように、例えば、癌性腫瘍の成長が阻害もしくは低減される、および/または腫瘍が退縮するように、対象に、本明細書に記載される抗hNKG2A抗体を投与することを含む、方法が、本明細書において提供される。抗NKG2A抗体を単独で使用して、癌性腫瘍の成長を阻害することができる。あるいは、抗NKG2A抗体は、別の薬剤、例えば、以下に記載されるような、その他の免疫原性剤、標準癌治療、またはその他の抗体とともに使用することができる。PD-1の阻害剤、例えば、抗PD-1または抗PD-L1抗体との組合せもまた、提供される。CTLA-4の阻害剤、例えば、抗CTLA-4抗体との組合せもまた、提供される。PD-1の阻害剤およびCTLA-4の阻害剤との組合せもまた、提供される。ICOSのアゴニスト抗体との組合せもまた、提供される。

40

【0276】

一態様では、対象における癌を治療する方法であって、対象に、治療有効量の本明細書に記載される抗NKG2A抗体を投与することを含む、方法が、本明細書において提供される。一実施形態では、抗NKG2A抗体は、キメラ抗体、ヒト抗体、またはヒト化抗NKG2A抗体であり得る。一実施形態では、本明細書に記載される癌を治療する方法は、

(a) LSIDNEEMKF (配列番号156) ;

(b) PSSWIGVFRNSSHPW (配列番号157) ;

50

( c ) LAFKHEIKDSDN ( 配列番号 1 5 8 ) ; および

( d ) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC ( 配列番号 1 5 9 )

のうちの 1 つまたは複数のアミノ酸残基においてヒト N K G 2 A と接触する抗 N K G 2 A 抗体を投与することを含む。

【 0 2 7 7 】

別の実施形態では、本明細書に記載される癌を治療する方法は、

( a ) LSIDNEEMKF ( 配列番号 1 5 6 ) ;

( b ) PSSWIGVFRNSSHPW ( 配列番号 1 5 7 ) ;

( c ) LAFKHEIKDSDN ( 配列番号 1 5 8 ) ;

( d ) L; および

( e ) QVNRLKSAQQCGSSIIYHC ( 配列番号 1 5 9 )

のうちの 1 つまたは複数のアミノ酸残基においてヒト N K G 2 A と接触する抗 N K G 2 A 抗体を投与することを含む。

【 0 2 7 8 】

別の実施形態では、方法は、癌を治療するために N K G 2 A . 9 抗体を投与することを含む。別の実施形態では、方法は、癌を治療するために 1 3 F 3 . A 4 抗体を含む組成物を投与することを含む。別の実施形態では、方法は、癌を治療するために N K G 2 A . 1 1 抗体を投与することを含む。別の実施形態では、方法は、癌を治療するために N K G 2 A . 9 抗体を含む組成物を投与することを含む。別の実施形態では、方法は、癌を治療するために N K G 2 A . 1 1 抗体を含む組成物を投与することを含む。別の実施形態では、方法は、癌を治療するために 1 3 F 3 . A 4 抗体またはその変異体を投与することを含む。別の実施形態では、方法は、癌を治療するために 1 3 F 3 . A 4 抗体またはその変異体を含む組成物を投与することを含む。

【 0 2 7 9 】

癌の例として、扁平上皮癌、小細胞肺癌 ( S C L C ) 、非小細胞肺癌 ( N S C L C ) 、扁平 N S C L C 、神経膠腫、胃腸癌、腎癌 ( 例えば、明細胞癌 ) 、卵巣癌、肝臓癌、結腸直腸癌、子宮内膜癌、腎臓癌 ( 例えば、腎細胞癌 ( R C C ) ) 、前立腺癌 ( 例えば、ホルモン難治性前立腺癌 ) 、甲状腺癌、神経芽細胞腫、膵臓癌、神経膠芽腫 ( 多型神経膠芽腫 ) 、子宮頸癌、胃癌、膀胱癌、肝細胞腫、乳癌、結腸癌腫および頭頸部癌 ( または癌腫 ) 、胃癌 ( gastric cancer ) 、生殖細胞腫瘍、小児肉腫、副鼻腔ナチュラルキラー、黒色腫 ( 例えば、皮膚または眼球内悪性黒色腫などの転移性悪性黒色腫 ) 、骨癌、皮膚癌、子宮癌、肛門領域の癌、精巣癌、卵管の癌腫、子宮内膜の癌腫、子宮頸部の癌腫、膣の癌腫、外陰部の癌腫、食道の癌、小腸の癌、内分泌系の癌、上皮小体腺の癌、副腎の癌、柔組織の肉腫、尿道の癌、陰茎の癌、小児の固形腫瘍、尿管の癌、腎盂の癌腫、中枢神経系 ( C N S ) の新生物、原発性 C N S リンパ腫、腫瘍血管新生、脊髄の軸の腫瘍、脳癌、例えば、脳幹神経膠腫、下垂体腺腫、カポジ肉腫、類表皮癌、扁平上皮癌、T細胞リンパ腫、アスベストによって誘導されるものを含めた環境誘導性癌、ウイルス関連癌 ( 例えば、ヒトパピローマウイルス ( H P V ) 関連腫瘍 ) および 2 種の主要な血液細胞システムのいずれか、すなわち、骨髄系細胞株 ( 顆粒球、赤血球、血小板、マクロファージおよび肥満細胞を産生する ) またはリンパ球系細胞株 ( B 、 T 、 N K および形質細胞を産生する ) に由来する血液悪性腫瘍、例えば、すべての種類の白血病、リンパ腫および骨髄腫、例えば、急性白血病 ( A L L ) 、急性骨髄性白血病 ( A M L ) 、慢性リンパ性白血病 ( C L L ) および慢性骨髄性白血病 ( C M L ) 、未分化 A M L ( M 0 ) 、骨髄芽球性白血病 ( M 1 ) 、骨髄芽球性白血病 ( M 2 ; 細胞成熟を伴う ) 、前骨髄球性白血病 ( M 3 または M 3 変異体 [ M 3 V ] ) 、骨髄単球性白血病 ( M 4 または好酸球増加症を伴う M 4 変異体 [ M 4 E ] ) 、単球性白血病 ( M 5 ) 、赤白血病 ( M 6 ) 、巨核芽球性白血病 ( M 7 ) 、単離された顆粒球性肉腫および緑色腫などの急性、慢性、リンパ性および / または骨髄性白血病 ; ホジキンリンパ腫 ( H L ) 、非ホジキンリンパ腫 ( N H L ) 、B細胞リンパ腫、T細胞リンパ腫、リンパ形質細胞性リンパ腫、単球様 B 細胞リンパ腫、粘膜関連リンパ球系組織 ( M A L T ) リンパ腫、未分化 ( 例えば、K i 1 + ) 大細胞型リンパ腫、成人 T 細胞リンパ腫 /

10

20

30

40

50

白血病、マンツル細胞リンパ腫、血管免疫芽細胞性T細胞リンパ腫、血管中心性リンパ腫、腸管T細胞リンパ腫、原発性縦隔B細胞リンパ腫、前駆体Tリンパ芽球性リンパ腫、Tリンパ芽球性およびリンパ腫/白血病(T-Lbly/T-ALL)、末梢T細胞リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫、移植後リンパ増殖性障害、真性組織球性リンパ腫、原発性中枢神経系リンパ腫、原発性滲出性リンパ腫、リンパ芽球性リンパ腫(LBL)、リンパ球系統の造血器腫瘍、急性リンパ性白血病、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、バーキットリンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性組織球性リンパ腫(DHL)、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆体Bリンパ芽球性リンパ腫、皮膚T細胞リンパ腫(CTLC)(菌状息肉症またはセザリー症候群とも呼ばれる)およびワルデンストレーム高ガンマグロブリン血症を伴うリンパ形質細胞性リンパ腫(LPL)などのリンパ腫; IgG骨髄腫、軽鎖骨髄腫、非分泌性骨髄腫、くすぶり型骨髄腫(低悪性度骨髄腫とも呼ばれる)、孤立性形質細胞腫および多発性骨髄腫、慢性リンパ性白血病(CLL)、ヘアリー細胞リンパ腫などの骨髄腫; 骨髄系統の造血器腫瘍、線維肉腫および横紋筋肉腫(rhabdomyosarcoma)を含めた間葉系起源の腫瘍; セミノーマ、奇形癌腫、星状細胞腫、シュワン腫を含めた中枢および末梢神経の腫瘍; 線維肉腫、横紋筋肉腫(rhabdomyosarcoma)および骨肉腫を含めた間葉系起源の腫瘍; ならびに黒色腫、色素性乾皮症、ケラトア坎トーマ、セミノーマ、甲状腺濾胞性癌および奇形癌腫を含めたその他の腫瘍、リンパ球系統の造血器腫瘍、例えば、それだけには限らないが、小細胞および大脳様細胞型を含めたT前リンパ球性白血病(T-PLL)などのT細胞障害を含めたT細胞およびB細胞腫瘍; 好ましくは、T細胞型の大顆粒リンパ球性白血病(LGL); a/d T-NHL肝脾リンパ腫; 末梢/成熟T細胞リンパ腫(多形性および免疫芽球性亜種); 血管中心性(鼻腔の)T細胞リンパ腫; 頭頸部の癌、腎癌、直腸癌、甲状腺の癌; 急性骨髄系リンパ腫ならびに前記の癌の任意の組合せが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態では、本明細書に記載される方法はまた、転移性癌、難治性癌(例えば、遮断性CTLA-4および/またはPD-1抗体を用いる、例えば、これまでの免疫療法に対して難治性の癌)および再発性癌の治療のために使用してもよい。

#### 【0280】

一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、単剤療法として投与される。一実施形態では、抗hNKG2Aアゴニスト抗体は、唯一の免疫賦活性薬剤として投与される。一実施形態では、抗hNKG2Aは、別の薬剤とともに患者に投与される。一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、免疫原性剤とともに投与される。一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、癌ワクチンとともに投与される。いくつかの実施形態では、癌ワクチンは、癌性細胞、精製された腫瘍抗原(組換えタンパク質、ペプチドおよび炭水化物分子を含む)、細胞、および免疫刺激性サイトカインをコードする遺伝子を用いてトランスフェクトされた細胞を含む(He et al (2004) J. Immunol. 173:4919-28)。いくつかの実施形態では、癌ワクチンは、ペプチド癌ワクチンであり、これは、いくつかの実施形態では、個別化されたペプチドワクチンである。いくつかの実施形態では、ペプチド癌ワクチンは、多価長鎖ペプチド、多重ペプチド、ペプチドカクテル、ハイブリッドペプチド、またはペプチドパルス樹状細胞ワクチンである(例えば、Yamada et al., Cancer Sci, 104:14-21, 2013を参照されたい)。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、アジュバントとともに投与される。使用される腫瘍ワクチンの限定されない例として、gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1、および/もしくはチロシナーゼのペプチドなどの黒色腫抗原のペプチド、またはサイトカインGM-CSFを発現するようトランスフェクトされた腫瘍細胞が挙げられる。腫瘍に対するワクチン接種のための多数の実験戦略が考案されている(Rosenberg, S., 2000, Development of Cancer Vaccines, ASCO Educational Book Spring: 60-62; Logothetis, C., 2000, ASCO Educational Book Spring: 300-302; Khayat, D. 2000, ASCO Educational Book Spring: 414-428; Foon, K. 2000, ASCO Educational Book Spring: 730-738を参照のこと; DeVita et al. (eds.), 1997, Cancer: Principles and Practice of Oncology, Fifth Edition中のRestifo, N. and Sznol, M., Cancer Vaccines, Ch. 61, pp. 3023-3043も参照のこと)

10

20

30

40

50

。これらの戦略のうちの1つでは、ワクチンは、自己または同種腫瘍細胞を使用して調製される。これらの細胞性ワクチンは、腫瘍細胞がGM-CSFを発現するよう形質導入される場合に最も有効であるとわかっている。GM-CSFは、腫瘍ワクチン接種のための抗原提示の強力なアジュバントであるとわかっている。Dranoff et al. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90: 3539-43。

#### 【0281】

その他の癌ワクチンは、ヒトパピローマウイルス (HPV)、肝炎ウイルス (HBVおよびHCV)、ならびにカポジヘルペス肉腫ウイルス (KHSV) のようなヒト癌に関わるウイルスに由来するタンパク質である。いくつかの実施形態では、NKG2A阻害とともに使用される腫瘍特異的抗原の別の形態として、腫瘍組織自体から単離された精製された熱ショックタンパク質 (HSP) がある。これらの熱ショックタンパク質は、腫瘍細胞に由来するタンパク質の断片を含有し、これらのHSPは、腫瘍免疫を誘発するための抗原提示細胞への送達で高度に効率的である (Suot & Srivastava (1995) Science 269: 1585-1588; Tamura et al. (1997) Science 278:117-120)。

#### 【0282】

いくつかの実施形態では、樹状細胞は、抗原特異的応答をブライムするために使用される強力な抗原提示細胞である。樹状細胞は、エキソビボで生産され、種々のタンパク質およびペプチド抗原ならびに腫瘍細胞抽出物を搭載させることができる (Nestle et al. (1998) Nature Medicine 4: 328-332)。樹状細胞はまた、同様にこれらの腫瘍抗原を発現するよう遺伝的手段によって形質導入できる。DCはまた、免疫処置を目的として腫瘍細胞と直接融合されている (Kugler et al. (2000) Nature Medicine 6:332-336)。ワクチン化の方法として、より強力な抗腫瘍応答を活性化 (放出) するよう、樹状細胞免疫処置を、抗NKG2A抗体と効果的に組み合わせることができる。

#### 【0283】

いくつかの実施形態では、抗hNKG2Aは、標準治療、例えば、外科手術、放射線照射、および/または化学療法とともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、化学療法剤とともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、カルボプラチン、シスプラチン、パクリタキセル、nab-パクリタキセル、ゲムシタビン、またはFOLFEXのうちの1つまたは複数とともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、カルボプラチンまたはnab-パクリタキセルとともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、カルボプラチンおよびパクリタキセルとともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、カルボプラチンおよびシスプラチンとともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、シスプラチンおよびペメトレキセドとともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、シスプラチンおよびゲムシタビンとともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、FOLFEXとともに投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、FOLFIRIとともに投与される。一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、黒色腫の処置のためにダカルバジンとともに投与される。いくつかの実施形態では、シスプラチンは、4週間に1回の100mg/mlの用量として、静脈内投与される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、ドキソルビシン (アドリアマイシン)、シスプラチン硫酸ブレオマイシン、カルムスチン、クロラムブシル、ダカルバジン、および/またはシクロホスファミドヒドロキシ尿素とともに投与される。いくつかの実施形態では、アドリアマイシンは、21日間に1回の60mg/ml ~ 75mg/mlの用量として静脈内投与される。一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、少なくとも1つの薬物での治療に耐性であるヒト患者に投与され、ここで、抗hNKG2A抗体の投与は、少なくとも1つの薬物に対する耐性を低減、軽減、または抑制する。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、アゴニスト抗体、例えば、抗ICOS抗体とともに投与される。

#### 【0284】

上述の併用療法は、互いに種々の組合せで投与することができ、組合せ投与 (2つ以上の治療剤が、同じかまたは別個の製剤に含まれる) および別個の投与が包含され、別個の

10

20

30

40

50

投与の場合には、本発明の抗体の投与は、さらなる治療剤および／またはアジュバントの投与の前、それと同時、および／またはその後に、生じ得る。本発明の抗体は、放射線療法と組み合わせて使用することもできる。

#### 【 0 2 8 5 】

いくつかの実施形態では、そのような組合せの別の例は、インターロイキン - 2 ( I L - 2 ) と組み合わせて投与される抗 h N K G 2 A 抗体である。いくつかの実施形態では、抗 h N K G 2 A 抗体および I L - 2 の組合せは、腎細胞癌および黒色腫の治療のためを含む、種々の癌を治療するためのものである。いくつかの実施形態では、本明細書において論じられる抗 h N K G 2 A 抗体は、種々の癌を治療するために、I L - 2 経路アゴニストと組み合わせられる。組合せとしては、種々の I L - 2 経路アゴニスト、例えば、WO 2 0 1 2 / 0 6 5 0 8 6 ( N e k t a r T h e r a p e u t i c s ) および WO 2 0 1 5 / 1 2 5 1 5 9 ( N e k t a r T h e r a p e u t i c s ) に記載されるものが挙げられ、これらの内容は、参照によりその全体が組み込まれる。WO 2 0 0 6 / 1 3 8 5 7 2 ( N e k t a r T h e r a p e u t i c s ) は、分解可能な連結を有するコンジュゲートおよびそのようなコンジュゲートを調製するのに有用な重合試薬、ならびに重合試薬およびコンジュゲートを作製する方法を提供し、参照によりその全体が組み込まれる。

10

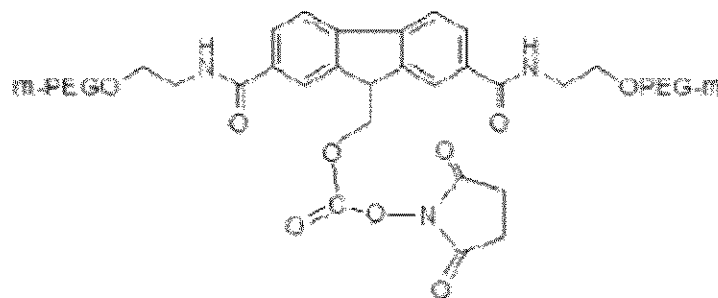
#### 【 0 2 8 6 】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗 h N K G 2 A 抗体、例えば、N K G 2 A . 9、N K G 2 A . 1 1、または 1 3 F 3 . A 4 抗体と、I L - 2 経路アゴニスト、例えば、N K T R - 2 1 4 との組合せは、癌を治療するために患者に投与される。以下により詳細に記載されるように、N K T R - 2 1 4 は、以下の構造 ( m P E G <sub>2</sub> - C 2 - f o m c - 2 0 K - N - ヒドロキシスクシンイミデート誘導体、2 0 k D a (「m P E G <sub>2</sub> - C 2 - f m o c - 2 0 K - N H S」) :

20

#### 【 0 2 8 7 】

#### 【 化 6 】



30

を有する、平均でおよそ 6 つの F M O C (フルオレニルメチルオキシカルボニルクロリド) に基づくポリエチレングリコール ( P E G ) 試薬を、以下の 1 3 2 アミノ酸配列を有するタンパク質にコンジュゲートすることによって産生される。

40

#### 【 化 7 】

```
PTSSSTKKTQDLQLEHLLLDLQMLNGINNYKNPKLTRMLTFKFFYMPKKATELKHLLQCLEE 60
ELKPLEEVLNLAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEEFLNRW 120
ITFSQSIIISTLT 132
```

( 配列番号 1 6 1 )

#### 【 0 2 8 8 】

WO 2 0 1 2 / 0 6 5 0 8 6 は、I L - 2 部分と、ポリエチレングリコールまたはその

50

誘導体を含む1つまたは複数の非ペプチド水溶性ポリマーとのコンジュゲートを提供する。具体的には、WO 2012/065086の実施例2（段落202～204）は、上記に示されたmPEG2-C2-fmoc-20K-NHS構造を得るためのmPEG2-C2-fmoc-20K-NHSを用いたIL-2のペグ化について記載している。WO 2015/125159の実施例1（段落63～66）は、RSLAIL-2（NKTR-214）が得られるmPEG2-C2-fmoc-20K-NHSを用いたIL-2のペグ化のための規模拡大したアプローチについて記載している。NKTR-214は、抗腫瘍効果を促進するためにこれらの細胞を増殖させるために、特定の免疫細胞（例えば、CD8+ T細胞およびNK細胞）に見出されるタンパク質であるCD122（インターロイキン-2受容体ベータサブユニット、IL-2Rとしても知られる）を標的とするように設計されたサイトカインである。

10

#### 【0289】

いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、抗血管新生剤と組み合わせて投与される。

#### 【0290】

細胞死によって本明細書に記載される抗hNKG2A抗体との相乗作用をもたらし得るその他の併用療法としては、放射線照射、外科手術、およびホルモン欠乏がある。

#### 【0291】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗hNKG2A抗体は、二重特異性抗体とともに投与される。二重特異性抗体を使用して、2種の異なる抗原を標的とすることができる。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、腫瘍細胞を治療するために、FcまたはFc受容体を発現するエフェクター細胞を標的とする二重特異性抗体と組み合わせて使用される（例えば、米国特許第5,922,845号および同5,837,243号を参照のこと）。例えば、抗Fc受容体/抗腫瘍抗原（例えば、Her-2/neu）二重特異性抗体が、マクロファージを腫瘍の部位へと標的化するために使用されている。いくつかの実施形態では、これらの応答のT細胞アームは、抗hNKG2A抗体の機能的活性によって増大される。いくつかの実施形態では、抗原は、腫瘍抗原および樹状細胞特異的細胞表面マーカーと結合する二重特異性抗体の使用によって、DCに直接送達される。いくつかの実施形態では、抗hNKG2A抗体は、腫瘍によって発現される免疫抑制タンパク質を低減または不活性化する抗体、例えば、抗TGF-β抗体、抗IL-10抗体、および抗Fasリガンド抗体と組み合わせて使用される。

20

30

#### 【0292】

#### 感染性疾患

別の態様では、本明細書に記載される発明は、ヒト対象を含む対象における感染性疾患を治療する方法であって、対象が感染性疾患について治療されるように、対象に、抗hNKG2A抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、方法を提供する。他の実施形態では、抗NKG2A抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体である。

#### 【0293】

本明細書において論じられるその腫瘍の治療と同様に、本明細書に記載される抗hNKG2A抗体は、慢性ウイルス感染症を治療するためを含め、病原体、毒素、および自己抗原に対する免疫応答を増強するために、単独で、またはアジュバントとして、ワクチンと組み合わせて、投与することができる。この治療的アプローチが特に有用であり得る病原体の例として、現在有効なワクチンが存在しない病原体または従来のワクチンが完全に有効とまではいかない病原体が挙げられる。これらの病原体は、それだけには限らないが、HIV、肝炎（A、BおよびC）、インフルエンザ、ヘルペス、ジアルジア、マラリア、リーシュマニア、黄色ブドウ状球菌（*staphylococcus aureus*）、緑膿菌（*Pseudomonas aeruginosa*）が挙げられる。

40

#### 【0294】

本明細書に記載される方法によって治療可能な感染症を引き起こす病原性ウイルスの例として、HIV、肝炎（A、BまたはC）、ヘルペスウイルス（例えば、VZV、HSV

50

- 1、H A V - 6、H S V - I I および C M V、エプスタイン・バーウイルス)、アデノウイルス、インフルエンザウイルス、フラビウイルス、エコーウイルス、ライノウイルス、コクサッキーウイルス、コロナウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、ムンプスウイルス、ロタウイルス、麻疹ウイルス、風疹ウイルス、パルボウイルス、ワクシニアウイルス、H T L V ウイルス、デングウイルス、パピローマウイルス、軟属腫ウイルス、ポリオウイルス、狂犬病ウイルス、J C ウイルスおよびアルボウイルス脳炎ウイルスが挙げられる。

【 0 2 9 5 】

本明細書に記載される方法によって治療可能な感染症を引き起こす病原性細菌の例として、クラミジア、リケッチア細菌、マイコバクテリア、ブドウ球菌、連鎖球菌、肺炎球菌 (pneumococci)、髄膜炎菌および淋菌、クレブシエラ、プロテウス、セラチア、シ

10

【 0 2 9 6 】

本明細書に記載される方法によって治療可能な感染症を引き起こす病原性真菌の例として、カンジダ (Candida) (アルビカンス (albicans)、クルゼイ (krusei)、グラブラータ (glabrata)、トロピカリス (tropicalis) など)、クリプトコッカス・ネオフォルマン

20

【 0 2 9 7 】

本明細書に記載される方法によって治療可能な感染症を引き起こす病原性寄生生物の例として、赤痢アメーバ (Entamoeba histolytica)、大腸バランチジウム (Balantidium coli)、フォーラーネグレリア (Naegleria fowleri)、アcantアアメーバ属 (Acanthamoeba) の種、ランブル鞭毛虫 (Giardia lamblia)、クリプトスポリジウム属 (Cryptosporidium) の種、ニューモシスチス・カリニ (Pneumocystis carinii)、三日熱マラリア原虫 (Plasmodium vivax)、ネズミバベシア (Babesia microti)、トリパノソマ・ブルセイ (Trypanosoma brucei)、トリパノソマ・クルージ (Trypanosoma cruzi)、ドノバンリーシュマニア (Leishmania donovani)、トキソプラズマ原虫 (Toxoplasma gondii)、ブラジル鉤虫 (Nippostrongylus brasiliensis) が挙げられる。

30

【 0 2 9 8 】

対象に抗 h N K G 2 A 抗体を投与する本明細書に記載される方法は、サイトカイン治療 (例えば、インターフェロン、G M - C S F、G - C S F、I L - 2)、または腫瘍抗原の提示の増強を提供する二重特異性抗体療法などのその他の形態の免疫療法と組み合わせることができる (例えば、Holliger (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448、Poljak (1994) Structure 2: 1121-1123を参照されたい)。

【 0 2 9 9 】

40

自己免疫反応

いくつかの態様では、抗 N K G 2 A 抗体は、自己免疫応答を増大させる。腫瘍細胞およびペプチドワクチンを使用した抗腫瘍応答の誘導により、多くの抗腫瘍応答には、抗自己反応性が関与することがわかっている (van Elsas et al. (2001) J. Exp. Med. 194:481-489、Overwijk, et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 96: 2982-2987、Hurwitz, (2000) 前掲、Rosenberg & White (1996) J. Immunother Emphasis Tumor Immunol 19 (1): 81-4)。したがって、抗 N K G 2 A 抗体は、疾患の治療のためのこれらの自己タンパク質に対する免疫応答を効率的に生成するワクチン接種プロトコルを考案するために、これらの自己タンパク質とともに使用される。例えば、アルツハイマー病は、脳内でのアミロイド沈着における A ペプチドの不適切な蓄積を伴い、アミロイド

50

に対する抗体応答により、これらのアミロイド沈着を除去することができる (Schenk et al., (1999) Nature 400: 173-177)。

#### 【0300】

他の自己タンパク質もまた、アレルギーおよび喘息の治療については I g E およびリウマチ性関節炎については T N F など、標的として使用することができる。最終的には、種々のホルモンに対する抗体応答が、抗 N K G 2 A 抗体の使用によって誘導され得る。生殖ホルモンに対する抗体応答の中和は、受胎調節に使用できる。ホルモンおよび特定の腫瘍の成長に必要とされる他の可溶性因子に対する抗体応答の中和は、さらなるワクチン接種標的である。

#### 【0301】

抗 N K G 2 A 抗体の使用についての上記のような類似の方法は、アルツハイマー病における A を含むアミロイド沈着、T N F などのサイトカインおよび I g E など他の自己抗原の不適切な蓄積を有する患者を治療するための治療的自己免疫応答の誘導に使用できる。

#### 【0302】

いくつかの態様では、本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体は、対象の抗原 (例えば、ワクチン) とともに抗 N K G 2 A 抗体を投与して、抗原特異的免疫応答を刺激するために使用される。したがって、対象における抗原に対する免疫応答を増強する方法であって、対象における抗原に対する免疫応答が増強されるように、対象に、( i ) 抗原、および ( i i ) 抗 N K G 2 A 抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、方法が、本明細書において提供される。抗体は、ヒト抗ヒト N K G 2 A 抗体 (例えば、本明細書に記載されるヒト抗 N K G 2 A 抗体のうちのいずれか) であり得る。いくつかの実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体は、キメラ抗体またはヒト化抗体である。抗原は、例えば、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原または病原体に由来する抗原であり得る。このような抗原の限定されない例として、本明細書で論じられた腫瘍抗原 (または腫瘍ワクチン) または本明細書に記載されるウイルス、細菌もしくはその他の病原体に由来する抗原などの本明細書の節において論じられたものが挙げられる。

#### 【0303】

特定の実施形態では、抗 N K G 2 A 抗体が結合するエピトープを含むペプチドまたは融合タンパク質が、抗 N K G 2 A 抗体の代わりに、または抗 N K G 2 A 抗体に加えて、ワクチンとして使用される。

#### 【0304】

インビボおよびインビトロで、本明細書に記載される、抗体組成物 (例えば、ヒトモノクローナル抗体、多重特異性および二重特異性分子およびイムノコンジュゲート) を投与する適した経路は、当技術分野で周知であり、当業者ならば選択できる。例えば、抗体組成物は、静脈内または皮下経路によって投与できる。使用される組成物の適した投与量は、対象の年齢および体重ならびに抗体組成物の濃度および / または製剤化に応じて変わる。

#### 【0305】

これまでに記載したように、本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体は、1 種またはその他の複数の治療薬、例えば、細胞傷害性薬剤、放射性毒性薬剤 (radiotoxic agent) または免疫抑制剤と同時投与できる。抗 N K G 2 A 抗体は、薬剤と連結できる (免疫複合体として) か、または薬剤と別個に投与できる。後者の場合には (別個の投与)、抗 N K G 2 A 抗体を、薬剤の前に、後に、もしくは同時に投与することができるか、またはその他の公知の療法、例えば、抗癌療法、例えば、化学療法および / もしくは放射線照射と共投与することができる。このような治療薬として、中でも、それ自体では、患者にとって毒性または準毒性であるレベルでのみ有効である、ドキソルビシン (アドリマイシン)、シスプラチン、プレオマイシン硫酸塩、カルムスチン、クロラムブシル、ダカルバジンおよびシクロホスファミドヒドロキシ尿素などの抗腫瘍、抗新生物薬剤が挙げられる。シスプラチンは、100 mg / ml の用量で 4 週間に 1 回静脈内に投与され、アドリマイシンは、60 ~ 75 mg / ml の用量で 21 日間に 1 回静脈内に投与される。本明細書に記載さ

10

20

30

40

50



れる抗NKGA抗体またはその抗原結合断片の、化学療法剤との共投与は、ヒト腫瘍細胞に細胞傷害性効果をもたらす異なる機序によって作動する2種の抗癌剤を提供する。そのような共投与は、薬物に対する耐性の発生、または抗体と非反応性にする腫瘍細胞の抗原性の変化に起因する問題を解決し得る。

#### 【0306】

本明細書に記載される抗体組成物（例えば、ヒト抗体、二重特異性もしくは多重特異性分子、またはイムノコンジュゲート）および使用のための説明書を含む、キットもまた、本明細書に記載の範囲内に含まれる。キットは、少なくとも1種のさらなる試薬または1種もしくは複数のさらなる本明細書に記載されるヒト抗NKGA抗体（例えば、第1のヒト抗体とは別個のNKGA抗原中のエピトープと結合する相補活性を有するヒト抗体）をさらに含有し得る。キットは、通常、キットの内容物の意図される使用を示す表示を含む。用語表示は、キット上にもしくはキットとともに供給された、またはそうでなければキットに添付されている任意の文書または記録材料を含む。

#### 【0307】

##### 併用療法

一態様では、抗hNKGA抗体を、1つまたは複数のさらなる薬剤、例えば、免疫応答を刺激するのに有効である抗体とともに投与し、それによって、ヒト対象を含む対象において免疫応答を増強、刺激、または上方制御する、併用治療の方法、例えば、癌の治療のための方法が、本明細書において提供される。個体における癌を治療するかまたはその進行を遅延させるための方法であって、個体に、別の抗癌剤または癌療法とともに抗hNKGA抗体（例えば、NKGA.9、NKGA.11、および13F3.A4）を投与することを含む、方法が、本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、抗hNKGA抗体は、上述のように、化学療法もしくは化学療法剤、または放射線療法もしくは放射線療法剤とともに投与され得る。いくつかの実施形態では、抗hNKGA抗体は、アゴニスト抗体、例えば、抗hICOS抗体とともに投与され得る。いくつかの実施形態では、抗hNKGA抗体は、標的化療法または標的化療法剤とともに投与され得る。いくつかの実施形態では、抗hNKGA抗体は、免疫療法または免疫療法剤、例えば、モノクローナル抗体とともに投与され得る。

#### 【0308】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗hNKGA抗体は、(i)別の共刺激受容体のアゴニスト、および/または(ii)T細胞における阻害性シグナルのアンタゴニストと組み合わせることができる。いくつかの実施形態では、抗hNKGA抗体とアゴニストおよび/またはアンタゴニストを含む併用療法は、対象における抗原特異的T細胞応答の増強をもたらす。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗hNKGA抗体は、免疫応答を増大させるために、免疫グロブリンスーパーファミリー(IgSF)のメンバーである共刺激性および共阻害性分子を標的とする薬剤とともに投与され得る。いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗hNKGA抗体は、共刺激性または共阻害性分子のリガンドを標的とする薬剤とともに投与され得る。共刺激性または共阻害性受容体と結合する膜結合リガンドのファミリーとして、B7ファミリーがあり、これは、B7-1、B7-2、B7-H1(PD-L1)、B7-DC(PD-L2)、B7-H2(ICOS-L)、B7-H3、B7-H4、B7-H5(VISTA)、およびB7-H6を含む。共刺激または共阻害性受容体と結合する膜結合リガンドの別のファミリーとして、同種TNF受容体ファミリーメンバーと結合するTNFファミリーの分子があり、これは、CD40、CD40L、OX-40、OX-40L、CD70、CD27L、CD30、CD30L、4-1BBL、CD137/4-1BB、TRAIL/Apo2-L、TRAILR1/DR4、TRAILR2/DR5、TRAILR3、TRAILR4、OPG、RANK、RANKL、TWEAKR/Fn14、TWEAK、BAFFR、EDAR、XEDAR、TACI、APRIL、BCMA、LT-R、LIGHT、DcR3、HVEM、VEGI/TL1A、TRAMP/DR3、EDAR、EDA1、XEDAR、EDA2、TNFR1、リンホトキシン/TNF、TNFR

2、TNF、LT R、リンホトキシン 1 2、FAS、FASL、RELT、DR6、TROY、NGFRを含む。

【0309】

別の態様では、抗hNKGA抗体は、免疫応答を刺激するため、例えば、増殖性疾患、例えば、癌を治療するために、T細胞活性化を阻害するサイトカイン（例えば、IL-6、IL-10、TGF-、VEGF、もしくはその他の「免疫抑制性サイトカイン」）のアンタゴニスト、またはT細胞活性化を刺激するサイトカインと組み合わせて使用することができる。

【0310】

一態様では、T細胞応答は、本明細書に記載される抗hNKGA抗体と、(i) T細胞活性化を阻害するタンパク質（例えば、免疫チェックポイント阻害剤）、例えば、CTLA-4、PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG-3、TIM-3、ガレクチン9、CEACAM-1、BTLA、CD69、ガレクチン-1、TIGIT、CD113、GPR56、VISTA、2B4、CD48、GARP、PD1H、LAIR1、TIM-1、およびTIM-4のアンタゴニスト、ならびに(ii) T細胞活性化を刺激するタンパク質、例えば、B7-1、B7-2、CD28、4-1BB(CD137)、4-1BBL、CD40、ICOS-L、OX40、OX40L、GITR、GITRL、CD70、CD27、DR3、およびCD28Hのアゴニストのうちの1つまたは複数との組合せによって、刺激される。

【0311】

上述のタンパク質のうちのいずれかを調節し、癌を治療するために、抗hNKGA、例えば本明細書に記載されるものと組み合わせることができる、例示的な薬剤としては、YERVOY（登録商標）/イピリムマブもしくはトレメリムマブ（CTLA-4に対する）、ガリキシマブ（B7.1に対する）、BMS-936558（PD-1に対する）、ピディリズマブ/CT-011（PD-1に対する）、KEYTRUDA（登録商標）/ペンブロリズマブ/MK-3475（PD-1に対する）、AMP224（B7-DC/PD-L2に対する）、BMS-936559（B7-H1に対する）、MPDL3280A（B7-H1に対する）、CP-870893もしくはダセツズマブ/SGN-40（CD40-Kirkwood et al. (2012) CA Cancer J. Clin. 62:309、Vanderheide & Glennie (2013) Clin. Cancer Res. 19:1035）、AMG557（B7H2に対する）、MGA271（B7H3に対する-WO11/109400）、IMP321（LAG-3に対する）、ウレルマブ/BMS-663513およびPF-05082566（CD137/4-1BBに対する）、バルリルマブ/CDX-1127（CD27に対する）、MED-6383およびMED-6469（OX40に対する）、RG-7888（OX40Lに対する-WO06/029879）、アタシセプト（TACIに対する）、ムクモナブ-CD3（CD3に対する）、イピルムマブ（ipilimumab）（CTLA-4に対する）が挙げられる。したがって、一実施形態では、抗hNKGA抗体（例えば、NKGA.9）は、抗PD-1抗体（例えば、ニボルマブ）および/または抗CTLA-4抗体（例えば、イピリムマブ）と組み合わせられる。

【0312】

癌の治療のために抗hNKGA抗体と組み合わせることができるその他の分子として、NK細胞上の阻害性受容体のアンタゴニストまたはNK細胞上の活性化受容体のアゴニストが挙げられる。例えば、抗hNKGA抗体を、KIRのアンタゴニスト（例えば、リリルマブ（lirilumab））と組み合わせることができる。

【0313】

併用療法のためのさらにその他の薬剤として、マクロファージまたは単球を阻害または枯渇させる薬剤、それだけには限らないが、RG7155（WO11/70024、WO11/107553、WO11/131407、WO13/87699、WO13/119716、WO13/132044）またはFPA-008（WO11/140249、WO13/169264、WO14/036357）を含めたCSF-1Rアンタゴニス

10

20

30

40

50

ト抗体などのCSF-1Rアンタゴニストが挙げられる。

【0314】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗hNKGA抗体は、正の共刺激性受容体とライゲーションするアゴニスト剤、阻害性受容体によるシグナル伝達を減弱する遮断剤、ならびに一種または複数の、抗腫瘍T細胞の頻度を全身的に増大させる薬剤、腫瘍微小環境内の別個の免疫抑制経路を克服する（例えば、阻害性受容体の関与（例えば、PD-L1/PD-1相互作用）を遮断するか、Tregを枯渇もしくは阻害するか（例えば、抗CD25モノクローナル抗体）（例えば、ダクリズマブ）を使用してもしくはエキソピボ抗CD25ビーズ枯渇によって）、代謝酵素、例えば、IDOを阻害するか、またはT細胞アネルギーもしくは消耗を逆転/防止する）薬剤、ならびに先天性免疫活性化および/または腫瘍部位における炎症をトリガーする薬剤のうちの一種または複数と一緒に、使用される。

10

【0315】

例えば、腫瘍成長を阻害するよう、または抗ウイルス性応答を刺激するよう、対象において免疫応答が刺激されるように、対象に、抗hNKGA抗体ならびにPD-1アンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体、PD-L1アンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体、CTLA-4アンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体および/またはLAG3アンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体などの1種または複数のさらなる免疫賦活性抗体を投与することを含む、対象において免疫応答を刺激するための方法が本明細書において提供される。一実施形態では、対象は、抗hNKGA抗体およびアンタゴニスト抗PD-1抗体を投与される。一実施形態では、対象は、抗hNKGA抗体およびアンタゴニスト抗PD-L1抗体を投与される。一実施形態では、対象は、抗hNKGA抗体およびアンタゴニスト抗CTLA-4抗体を投与される。一実施形態では、少なくとも1種のさらなる免疫賦活性抗体（例えば、アンタゴニスト抗PD-1、アンタゴニスト抗PD-L1、アンタゴニスト抗CTLA-4および/またはアンタゴニスト抗LAG3抗体）は、ヒト抗体である。あるいは、少なくとも1種のさらなる免疫賦活性抗体は、例えば、キメラまたはヒト化抗体（例えば、マウスまたはハムスター抗PD-1、抗PD-L1、抗CTLA-4および/または抗LAG3抗体から調製された）であり得る。

20

【0316】

抗hNKGA抗体およびアンタゴニストPD-1抗体を対象に投与することを含む、過剰増殖性疾患（例えば、癌）を治療するための方法が、本明細書において提供される。いくつかの実施形態では、癌は、非小細胞肺癌（NSCLC）または結腸直腸癌（CRC）である。いくつかの実施形態では、癌は、（i）HLA-Eレベルの上昇、および/または（ii）高い腫瘍突然変異量を有する腫瘍によって特徴付けられる。特定の実施形態では、抗hNKGA抗体は、治療量以下の用量で投与され、抗PD-1抗体は、治療量以下の用量で投与され、または両方が、治療量以下の用量で投与される。免疫賦活性薬剤を用いた過剰増殖性疾患の治療と関連する有害事象を変更するための方法もまた、本明細書において提供される。一実施形態では、方法は、抗hNKGA抗体および治療用量以下の抗PD-1抗体を、対象に投与することを含む。いくつかの実施形態では、対象は、ヒトである。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ヒトモノクローナル抗体である。

30

40

【0317】

いくつかの実施形態では、当技術分野において公知である抗PD-1抗体が、本明細書に記載される抗NKGA抗体と組み合わせて、本明細書に記載される方法において使用される。高い親和性でPD-1と特異的に結合する種々のヒトモノクローナル抗体が、米国特許第8,008,449号に開示されている。米国特許第8,008,449号に開示されている抗PD-1ヒト抗体は、以下の特徴のうちの1つまたは複数を示すことが実証されている：（a）Biacoreバイオセンサーシステムを使用して表面プラズモン共鳴によって判定される場合、 $1 \times 10^{-7}$  M以下の $K_D$ で、ヒトPD-1と結合すること、（b）ヒトCD28、CTLA-4、またはICOSと実質的に結合しないこと、（c

50

）混合リンパ球反応（MLR）アッセイにおいて、T細胞増殖を増大させること、（d）MLRアッセイにおいて、インターフェロン- $\gamma$ 産生を増大させること、（e）MLRアッセイにおいて、IL-2分泌を増大させること、（f）ヒトPD-1およびカニクイザルPD-1と結合すること、（g）PD-L1および/またはPD-L2のPD-1との結合を阻害すること、（h）抗原特異的メモリー応答を刺激すること、（i）抗体応答を刺激すること、ならびに（j）インビボで腫瘍細胞成長を阻害すること。本発明において使用可能な抗PD-1抗体としては、ヒトPD-1と特異的に結合し、前述の特徴のうちの少なくとも1つ、いくつかの実施形態では少なくとも5つを示す、モノクローナル抗体が挙げられる。

#### 【0318】

その他の抗PD-1モノクローナル抗体は、例えば、米国特許第6,808,710号、同第7,488,802号、同第8,168,757号、および同第8,354,509号、米国公開第2016/0272708号、ならびにPCT公開WO2012/145493、WO2008/156712、WO2015/112900、WO2012/145493、WO2015/112800、WO2014/206107、WO2015/35606、WO2015/085847、WO2014/179664、WO2017/020291、WO2017/020858、WO2016/197367、WO2017/024515、WO2017/025051、WO2017/123557、WO2016/106159、WO2014/194302、WO2017/040790、WO2017/133540、WO2017/132827、WO2017/024465、WO2017/025016、WO2017/106061、WO2017/19846、WO2017/024465、WO2017/025016、WO2017/132825、およびWO2017/133540に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が組み込まれる。

#### 【0319】

いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブ（OPDIVO（登録商標）、5C4、BMS-936558、MDX-1106、およびONO-4538としても知られている）、ペンブロリズマブ（Merck、KEYTRUDA（登録商標）、ランブロリズマブ、およびMK-3475としても知られている、WO2008/156712を参照のこと）、PDR001（Novartis、WO2015/112900を参照のこと）、MEDI-0680（AstraZeneca、AMP-514としても知られている、WO2012/145493を参照のこと）、セミピリマブ（Regeneron、REGN-2810としても知られている、WO2015/112800を参照のこと）、JS001（TAIZHOU JUNSHI PHARMA、Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)を参照のこと）、BGB-A317（Beigene、WO2015/35606および米国第2015/0079109号を参照のこと）、INCISHR1210（Jiangsu Hengrui Medicine、SHR-1210としても知られている、WO2015/085847、Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)を参照のこと）、TSR-042（Tesarobio pharmaceutical、ANB011としても知られている、WO2014/179664を参照のこと）、GLS-010（Wuxi/Harbin Gloria Pharmaceuticals、WBP3055としても知られている、Si-Yang Liu et al., J. Hematol. Oncol. 10:136 (2017)を参照のこと）、AM-0001（Armo）、STI-1110（Sorrento Therapeutics、WO2014/194302を参照のこと）、AGEN2034（Agenus、WO2017/040790を参照のこと）、MGA012（Macrogenics、WO2017/19846を参照のこと）、またはIBI308（Innovent、WO2017/024465、WO2017/025016、WO2017/132825、およびWO2017/133540を参照のこと）である。

#### 【0320】

10

20

30

40

50

一実施形態では、抗PD-1抗体は、ニボルマブである。ニボルマブは、PD-1リガンド(PD-L1およびPD-L2)との相互作用を選択的に防止し、それによって、抗腫瘍T細胞機能の下方制御を遮断する、完全ヒトIgG4(S228P)PD-1免疫チェックポイント阻害剤抗体である(米国特許第8,008,449号、Wang et al., 2014 Cancer Immunol Res. 2(9):846-56)。

#### 【0321】

別の実施形態では、抗PD-1抗体は、ペンブロリズマブである。ペンブロリズマブは、ヒト細胞表面受容体PD-1(プログラム死-1またはプログラム細胞死-1)を対象とするヒト化モノクローナルIgG4(S228P)抗体である。ペンブロリズマブは、例えば、米国特許第8,354,509号および同第8,900,587号に記載されている。

#### 【0322】

開示される方法において使用可能な抗PD-1抗体としてはまた、ヒトPD-1と特異的に結合し、ヒトPD-1との結合について、本明細書において開示される任意の抗PD-1抗体、例えば、ニボルマブと交差競合する、単離された抗体が挙げられる(例えば、米国特許第8,008,449号および同第8,779,105号、WO2013/173223を参照されたい)。いくつかの実施形態では、抗PD-1抗体は、本明細書に記載される抗PD-1抗体、例えば、ニボルマブと同一のエピトープと結合する。抗原との結合について交差競合する抗体の能力は、これらのモノクローナル抗体が、抗原の同一のエピトープ領域と結合し、他の交差競合する抗体のその特定のエピトープ領域との結合を立体的に妨害することを示す。これらの交差競合する抗体は、PD-1の同一のエピトープ領域との結合を踏まえると、参照抗体、例えば、ニボルマブのものと非常に類似する機能的特性を有することが予測される。交差競合する抗体は、標準的なPD-1結合アッセイ、例えば、Biacore分析、ELISAアッセイ、またはフローサイトメトリーにおいて、ニボルマブと交差競合する能力に基づいて容易に特定することができる(例えば、WO2013/173223を参照されたい)。

#### 【0323】

特定の実施形態では、ヒトPD-1との結合について、ヒトPD-1抗体、ニボルマブと交差競合するか、またはそれと同一のエピトープ領域と結合する抗体は、モノクローナル抗体である。ヒト対象への投与に関して、これらの交差競合する抗体は、キメラ抗体、遺伝子操作された抗体、またはヒト化もしくはヒト抗体である。そのようなキメラ、遺伝子操作、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体は、当技術分野において周知の方法によって調製および単離することができる。

#### 【0324】

開示される発明の方法において使用可能な抗PD-1抗体としてはまた、上述の抗体の抗原結合部分が挙げられる。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって実施され得ることが十分に示されている。

#### 【0325】

開示される方法または組成物における使用に好適な抗PD-1抗体は、高い特異性および親和性でPD-1と結合し、PD-L1およびまたはPD-L2の結合を遮断し、PD-1シグナル伝達経路の免疫抑制作用を阻害する、抗体である。本明細書において開示される組成物または方法のいずれにおいても、抗PD-1「抗体」は、PD-1受容体と結合し、リガンド結合の阻害および免疫系の上方制御に関して完全抗体のものと類似の機能的特性を示す、抗原結合部分または断片を含む。特定の実施形態では、抗PD-1抗体またはその抗原結合部分は、ヒトPD-1との結合について、ニボルマブと交差競合する。

#### 【0326】

抗hNKGA抗体およびアンタゴニストPD-L1抗体を対象に投与することを含む、過剰増殖性疾患(例えば、癌)を治療するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、抗hNKGA抗体は、治療量以下の用量で投与され、抗PD-L1抗体は、治療量以下の用量で投与され、または両方が、治療量以下の用量で投与され

10

20

30

40

50

る。抗NKGA抗体および治療量以下の用量の抗PD-L1抗体を対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患の治療と関連する有害事象を変更するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、ヒト配列モノクローナル抗体であり、抗hNKGA抗体は、ヒト化モノクローナル抗体、例えば、本明細書において開示される抗体のCDRまたは可変領域を含む抗体である。

#### 【0327】

当技術分野において公知である抗PD-L1抗体を、本開示の方法において使用することができる。本開示の方法において有用な抗PD-L1抗体の例は、米国特許第9,580,507号に開示される抗体を含む。米国特許第9,580,507号に開示されている抗PD-L1ヒトモノクローナル抗体は、以下の特徴のうちの1つまたは複数を示すことが実証されている：(a) Biacore バイオセンサーシステムを使用してSPRによって判定される場合、 $1 \times 10^{-7}$  M以下の $K_D$ で、ヒトPD-L1と結合すること、(b) 混合リンパ球反応(MLR)アッセイにおいて、T細胞増殖を増大させること、(c) MLRアッセイにおいて、インターフェロン- $\gamma$ 産生を増大させること、(d) MLRアッセイにおいて、IL-2分泌を増大させること、(e) 抗体応答を刺激すること、ならびに(f) T細胞、エフェクター細胞、および/または樹状細胞上に対する制御性T細胞の作用を逆転させること。本発明において使用可能な抗PD-L1抗体としては、ヒトPD-L1と特異的に結合し、前述の特徴のうちの少なくとも1つ、いくつかの実施形態では少なくとも5つを示す、モノクローナル抗体が挙げられる。

#### 【0328】

特定の実施形態では、抗PD-L1抗体は、BMS-936559(12A4、MDX-1105としても知られている、例えば、米国特許第7,943,743号およびWO2013/173223を参照のこと)、アテゾリズマブ(Roche、TECENTRIQ(登録商標)、MPDL3280A、RG7446としても知られている、米国第8,217,149号を参照されたい)、またHerbst et al. (2013) J Clin Oncol 31(suppl):3000も参照されたい)、デュルバルマブ(AstraZeneca、IMFINZI(商標)、MED-4736としても知られている、WO2011/066389を参照されたい)、アベルマブ(Pfizer、BAVENCIO(登録商標)、MSB-0010718Cとしても知られている、WO2013/079174を参照されたい)、STI-1014(Sorrento、WO2013/181634を参照されたい)、CX-072(Cytomx、WO2016/149201を参照されたい)、KN035(3D Med/Alphamab、Zhang et al., Cell Discov. 7:3 (March 2017)を参照されたい)、LY3300054(Eli Lilly Co、例えば、WO2017/034916を参照されたい)、またはCK-301(Checkpoint Therapeutics、Gorelik et al., AACR:Abstract 4606 (Apr 2016)を参照されたい)である。

#### 【0329】

特定の実施形態では、PD-L1抗体は、アテゾリズマブ(TECENTRIQ(登録商標))である。アテゾリズマブは、完全ヒト化IgG1モノクローナル抗PD-L1抗体である。

#### 【0330】

特定の実施形態では、PD-L1抗体は、デュルバルマブ(IMFINZI(商標))である。デュルバルマブは、ヒトIgG1カッパモノクローナル抗PD-L1抗体である。

#### 【0331】

特定の実施形態では、PD-L1抗体は、アベルマブ(BAVENCIO(登録商標))である。アベルマブは、ヒトIgG1ラムダモノクローナル抗PD-L1抗体である。

#### 【0332】

他の実施形態では、抗PD-L1モノクローナル抗体は、28-8、28-1、28-12、29-8、5H1、またはこれらの任意の組合せである。

10

20

30

40

50

## 【0333】

開示される方法において使用可能な抗PD-L1抗体としてはまた、ヒトPD-L1と特異的に結合し、ヒトPD-L1との結合について、本明細書において開示される任意の抗PD-L1抗体、例えば、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、および/またはアベルマブと交差競合する、単離された抗体も挙げられる。いくつかの実施形態では、抗PD-L1抗体は、本明細書に記載される抗PD-L1抗体のうちのいずれか、例えば、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、および/またはアベルマブと同一のエピトープと結合する。抗原との結合について交差競合する抗体の能力は、これらの抗体が、抗原の同一のエピトープ領域と結合し、他の交差競合する抗体のその特定のエピトープ領域との結合を立体的に妨害することを示す。これらの交差競合する抗体は、PD-L1の同一のエピトープ領域との結合を踏まえると、参照抗体、例えば、アテゾリズマブおよび/またはアベルマブのものと非常に類似する機能的特性を有することが予測される。交差競合する抗体は、標準的なPD-L1結合アッセイ、例えば、Biacore分析、ELISAアッセイ、またはフローサイトメトリーにおいて、アテゾリズマブおよび/またはアベルマブと交差競合する能力に基づいて容易に特定することができる（例えば、WO2013/173223を参照されたい）。

10

## 【0334】

特定の実施形態では、ヒトPD-L1との結合について、ヒトPD-L1抗体、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、および/またはアベルマブと交差競合するか、またはそれと同一のエピトープ領域と結合する、抗体は、モノクローナル抗体である。ヒト対象への投与に関して、これらの交差競合する抗体は、キメラ抗体、遺伝子操作された抗体、またはヒト化もしくはヒト抗体である。そのようなキメラ、遺伝子操作、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体は、当技術分野において周知の方法によって調製および単離することができる。

20

## 【0335】

開示される発明の方法において使用可能な抗PD-L1抗体としてはまた、上述の抗体の抗原結合部分が挙げられる。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって実施され得ることが十分に示されている。

## 【0336】

開示される方法または組成物における使用に好適な抗PD-L1抗体は、高い特異性および親和性でPD-L1と結合し、PD-1の結合を遮断し、PD-1シグナル伝達経路の免疫抑制作用を阻害する、抗体である。本明細書において開示される組成物または方法のいずれにおいても、抗PD-L1「抗体」は、PD-L1と結合し、受容体結合の阻害および免疫系の上方制御に関して完全抗体のものと類似の機能的特性を示す、抗原結合部分または断片を含む。特定の実施形態では、抗PD-L1抗体またはその抗原結合部分は、ヒトPD-L1との結合について、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、および/またはアベルマブと交差競合する。

30

## 【0337】

一実施形態では、本発明の抗hNKGA抗体は、第3の免疫療法剤（例えば、抗ICOS抗体、例えば、ICOS.33 IgG1f S267E（米国特許第10,251,945号に記載されている）、ニボルマブおよびイピリムマブと組み合わせられる）と組み合わせて、PD-1/PD-L1シグナル伝達のアンタゴニスト、例えば、PD-1アンタゴニスト（例えば、ニボルマブ、MDX1106としても知られ、WO06/121168に記載されている）、またはPD-L1アンタゴニストと組み合わせられる。一実施形態では、第3の免疫療法剤は、CTLA-4アンタゴニスト抗体である。特定の実施形態では、抗CTLA-4抗体は、YERVOY（登録商標）（イピリムマブまたは抗体10D1、PCT公開WO01/14424に記載される）またはトレメリムマブ（前のチシリムマブ、CP-675,206）である。一実施形態では、第3の免疫療法剤は、GITRアンタゴニストまたはOX-40アンタゴニスト、例えば、本明細書において開示される抗GITRまたは抗OX40抗体である。一実施形態では、第3の免疫療法剤は、G

40

50

I T R アゴニスト、例えば、アゴニスト G I T R 抗体である。好適な G I T R 抗体としては、例えば、BMS - 9 8 6 1 5 3、BMS - 9 8 6 1 5 6、TRX - 5 1 8 (WO 0 6 / 1 0 5 0 2 1、WO 0 9 / 0 0 9 1 1 6)、および MK - 4 1 6 6 (WO 1 1 / 0 2 8 6 8 3) が挙げられる。一実施形態では、第 3 の免疫療法剤は、I D O アンタゴニストである。好適な I D O アンタゴニストとして、例えば、INC B - 0 2 4 3 6 0 (WO 2 0 0 6 / 1 2 2 1 5 0、WO 0 7 / 7 5 5 9 8、WO 0 8 / 3 6 6 5 3、WO 0 8 / 3 6 6 4 2)、インドキシモド (indoximod)、または NLG - 9 1 9 (WO 0 9 / 7 3 6 2 0、WO 0 9 / 1 1 5 6 6 5 2、WO 1 1 / 5 6 6 5 2、WO 1 2 / 1 4 2 2 3 7) が挙げられる。

#### 【0338】

本明細書に記載される抗 h N K G 2 A 抗体および C T L A - 4 アンタゴニスト抗体を対象に投与することを含む、過剰増殖性疾患（例えば、癌）を治療するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、抗 h N K G 2 A 抗体は、治療量以下の用量で投与され、抗 C T L A - 4 抗体は、治療量以下の用量で投与され、または両方が、治療量以下の用量で投与される。抗 h N K G 2 A 抗体および治療量以下の用量の抗 C T L A - 4 抗体を対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患の治療と関連する有害事象を変更するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。

#### 【0339】

当技術分野において公知である抗 C T L A - 4 抗体を、本開示の方法において使用することができる。本発明の抗 C T L A - 4 抗体は、C T L A - 4 のヒト B 7 受容体との相互作用を破壊するように、ヒト C T L A - 4 と結合する。C T L A - 4 の B 7 との相互作用により、C T L A - 4 受容体を有する T 細胞の不活性化をもたらすシグナルが伝達されるため、この相互作用の破壊は、そのような T 細胞の活性化を効果的に誘導、増強、または延長し、それによって、免疫応答を誘導、増強、または延長する。

#### 【0340】

高い親和性で C T L A - 4 と特異的に結合するヒトモノクローナル抗体は、米国特許第 6 , 9 8 4 , 7 2 0 号に開示されている。その他の抗 C T L A - 4 モノクローナル抗体は、例えば、米国特許第 5 , 9 7 7 , 3 1 8 号、同第 6 , 0 5 1 , 2 2 7 号、同第 6 , 6 8 2 , 7 3 6 号、および同第 7 , 0 3 4 , 1 2 1 号、ならびに国際公開 WO 2 0 1 2 / 1 2 2 4 4 4、WO 2 0 0 7 / 1 1 3 6 4 8、WO 2 0 1 6 / 1 9 6 2 3 7、および WO 2 0 0 0 / 0 3 7 5 0 4 に記載されており、これらのそれぞれは、参照によりその全体が本明細書に組み込まれる。本発明に有用な抗 C T L A - 4 抗体としては、ヒト C T L A - 4 と特異的に結合し、前述の特徴のうちの少なくとも 1 つ、少なくとも 2 つ、または少なくとも 3 つを示す、モノクローナル抗体が挙げられる。

#### 【0341】

特定の実施形態では、C T L A - 4 抗体は、イピリムマブ (Y E R V O Y (登録商標)、MDX - 0 1 0、1 0 D 1 としても知られる、米国特許第 6 , 9 8 4 , 7 2 0 号を参照されたい)、MK - 1 3 0 8 (M e r c k)、AGEN - 1 8 8 4 (A g e n u s I n c .、WO 2 0 1 6 / 1 9 6 2 3 7 を参照されたい)、またはトレメリムマブ (A s t r a Z e n e c a、チシリムマブ、CP - 6 7 5 , 2 0 6 としても知られる、WO 2 0 0 0 / 0 3 7 5 0 4 および Ribas, Update Cancer Ther. 2(3): 133-39 (2007) を参照されたい) である。具体的な実施形態では、抗 C T L A - 4 抗体は、イピリムマブである。

#### 【0342】

具体的な実施形態では、C T L A - 4 抗体は、本明細書において開示される方法において使用するためにはイピリムマブである。イピリムマブは、C T L A - 4 のその B 7 リガンドとの結合を遮断し、それによって、T 細胞活性化を刺激し、進行性黒色腫を有する患者において全生存期間 (OS) を向上させる、完全ヒト I g G 1 モノクローナル抗体である。

#### 【0343】

10

20

30

40

50



具体的な実施形態では、C T L A - 4 抗体は、トレメリムマブである。

【 0 3 4 4 】

具体的な実施形態では、C T L A - 4 抗体は、M K - 1 3 0 8 である。

【 0 3 4 5 】

具体的な実施形態では、C T L A - 4 抗体は、A G E N - 1 8 8 4 である。

【 0 3 4 6 】

開示される方法において使用可能な抗 C T L A - 4 抗体はまた、ヒト C T L A - 4 と特異的に結合し、ヒト C T L A - 4 との結合について、本明細書において開示される任意の抗 C T L A - 4 抗体、例えば、イピリムマブおよび / またはトレメリムマブと交差競合する、単離された抗体を含む。いくつかの実施形態では、抗 C T L A - 4 抗体は、本明細書に記載される抗 C T L A - 4 抗体のうちのいずれか、例えば、イピリムマブおよび / またはトレメリムマブと同一のエピトープと結合する。抗原との結合について交差競合する抗体の能力は、これらの抗体が、抗原の同一のエピトープ領域と結合し、他の交差競合する抗体のその特定のエピトープ領域との結合を立体的に妨害することを示す。これらの交差競合する抗体は、C T L A - 4 の同一のエピトープ領域との結合を踏まえると、参照抗体、例えば、イピリムマブおよび / またはトレメリムマブのものと非常に類似する機能的特性を有することが予測される。交差競合する抗体は、標準的な C T L A - 4 結合アッセイ、例えば、B i a c o r e 分析、E L I S A アッセイ、またはフローサイトメトリーにおいて、イピリムマブおよび / またはトレメリムマブと交差競合する能力に基づいて容易に特定することができる (例えば、W O 2 0 1 3 / 1 7 3 2 2 3 を参照されたい)。

【 0 3 4 7 】

特定の実施形態では、ヒト C T L A - 4 との結合について、ヒト C T L A - 4 抗体、イピリムマブおよび / またはトレメリムマブと交差競合するか、またはそれと同一のエピトープ領域と結合する、抗体は、モノクローナル抗体である。ヒト対象への投与に関して、これらの交差競合する抗体は、キメラ抗体、遺伝子操作された抗体、またはヒト化もしくはヒト抗体である。そのようなキメラ、遺伝子操作、ヒト化、またはヒトモノクローナル抗体は、当技術分野において周知の方法によって調製および単離することができる。

【 0 3 4 8 】

開示される発明の方法において使用可能な抗 C T L A - 4 抗体としてはまた、上述の抗体の抗原結合部分が挙げられる。抗体の抗原結合機能は、全長抗体の断片によって実施され得ることが十分に示されている。

【 0 3 4 9 】

開示される方法または組成物における使用に好適な抗 C T L A - 4 抗体は、高い特異性および親和性で C T L A - 4 と結合し、C T L A - 4 の活性を遮断し、C T L A - 4 のヒト B 7 受容体との相互作用を破壊する、抗体である。本明細書において開示される組成物または方法のいずれにおいても、抗 C T L A - 4 「抗体」は、C T L A - 4 と結合し、C T L A - 4 のヒト B 7 受容体との相互作用の阻害および免疫系の上方制御に関して完全抗体のものと類似の機能的特性を示す、抗原結合部分または断片を含む。特定の実施形態では、抗 C T L A - 4 抗体またはその抗原結合部分は、ヒト C T L A - 4 との結合について、イピリムマブおよび / またはトレメリムマブと交差競合する。

【 0 3 5 0 】

一実施形態では、本発明の抗 h N K G 2 A 抗体は、第 3 の免疫療法剤との組合せで、抗 C T L A - 4 抗体と組み合わせられる。一実施形態では、第 3 の免疫療法剤は、G I T R アнтаゴニストまたは O X - 4 0 アнтаゴニスト、例えば、本明細書において開示される抗 G I T R または抗 O X 4 0 抗体である。一実施形態では、第 3 の免疫療法剤は、G I T R アゴニスト、例えば、アゴニスト G I T R 抗体である。好適な G I T R 抗体としては、例えば、B M S - 9 8 6 1 5 3、B M S - 9 8 6 1 5 6、T R X - 5 1 8 ( W O 0 6 / 1 0 5 0 2 1、W O 0 9 / 0 0 9 1 1 6 )、および M K - 4 1 6 6 ( W O 1 1 / 0 2 8 6 8 3 ) が挙げられる。一実施形態では、第 3 の免疫療法剤は、I D O アнтаゴニストである。好適な I D O アнтаゴニストとして、例えば、I N C B - 0 2 4 3 6 0 ( W O 2 0 0 6 /

10

20

30

40

50

1 2 2 1 5 0、W O 0 7 / 7 5 5 9 8、W O 0 8 / 3 6 6 5 3、W O 0 8 / 3 6 6 4 2 )、インドキシモド ( indoximod )、または N L G - 9 1 9 ( W O 0 9 / 7 3 6 2 0、W O 0 9 / 1 1 5 6 6 5 2、W O 1 1 / 5 6 6 5 2、W O 1 2 / 1 4 2 2 3 7 ) が挙げられる。  
【 0 3 5 1 】

抗 h N K G 2 A 抗体および抗 L A G - 3 抗体を対象に投与することを含む、過剰増殖性疾患 ( 例えば、癌 ) を治療するための方法が、本明細書において提供される。さらなる実施形態では、アゴニスト抗 h N K G 2 A 抗体は、治療量以下の用量で投与され、抗 L A G - 3 抗体は、治療量以下の用量で投与され、または両方が、治療量以下の用量で投与される。抗 h N K G 2 A 抗体および治療量以下の用量の抗 L A G - 3 抗体を対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患の治療と関連する有害事象を変更するための方法が、本明細書において提供される。特定の実施形態では、対象は、ヒトである。特定の実施形態では、抗 h N K G 2 A 抗体は、ヒト配列モノクローナル抗体であり、抗 h N K G 2 A 抗体は、ヒト化モノクローナル抗体、例えば、本明細書において開示される抗体の C D R または可変領域を含む抗体である。抗 L A G 3 抗体の例として、米国特許公開 U S 2 0 1 1 / 0 1 5 0 8 9 2 および W O 2 0 1 4 / 0 0 8 2 1 8 に記載されている、抗体 2 5 F 7、2 6 H 1 0、2 5 E 3、8 B 7、1 1 F 2 または 1 7 E 5 の C D R もしくは可変領域を含む抗体が挙げられる。一実施形態では、抗 L A G - 3 抗体は、B M S - 9 8 6 0 1 6 である。使用できる、その他の抗 L A G - 3 抗体として、U S 2 0 1 1 / 0 0 7 0 2 3 または I M P - 3 2 1 に記載される I M P 7 3 1 が挙げられる。これらの抗体のうちのいずれかのものと同一のエピトープと競合する、および / またはそれと結合する抗 L A G - 3 抗体も、併用治療において使用され得る。

10

20

【 0 3 5 2 】

特定の実施形態では、抗 L A G - 3 抗体は、 $5 \times 10^{-8}$  M 以下の  $K_D$  でヒト L A G - 3 と結合するか、 $1 \times 10^{-8}$  M 以下の  $K_D$  でヒト L A G - 3 と結合するか、 $5 \times 10^{-9}$  M 以下の  $K_D$  でヒト L A G - 3 と結合するか、または  $1 \times 10^{-8}$  M ~  $1 \times 10^{-10}$  M 以下の  $K_D$  でヒト L A G - 3 と結合する。

【 0 3 5 3 】

本明細書に記載される抗 h N K G 2 A 抗体、ならびに L A G - 3 および / または C T L A - 4 および / または P D - 1 および / または P D - L 1 などの 1 つまたは複数の第 2 の標的抗原に対する他のアンタゴニスト、例えば、アンタゴニスト抗体の投与は、患者における癌性細胞に対する免疫応答を増強する。本開示の抗体を使用して成長が阻害され得る癌として、通常免疫療法に応答性である癌が挙げられる。本明細書に記載される併用療法を用いる治療のための癌の例としては、抗 h N K G 2 A 抗体を用いた単剤療法の考察において上述されたものが挙げられるが、これらに限定されない。

30

【 0 3 5 4 】

特定の実施形態では、本明細書において論じられる治療用抗体の組合せを、医薬上許容される担体中の単一組成物として同時に、または医薬上許容される担体中の各抗体を有する別個の組成物として同時に投与できる。別の実施形態では、治療用抗体の組合せを逐次に投与できる。例えば、抗 C T L A - 4 抗体および抗 h N K G 2 A 抗体は、抗 C T L A - 4 抗体を最初に投与し、抗 h N K G 2 A 抗体を 2 番目に投与するか、または抗 h N K G 2 A 抗体を最初に投与し、抗 C T L A - 4 抗体を 2 番目に投与するなど、逐次投与することができる。さらに、またはあるいは、抗 P D - 1 抗体および抗 h N K G 2 A 抗体は、抗 P D - 1 抗体を最初に投与し、抗 h N K G 2 A 抗体を 2 番目に投与するか、または抗 h N K G 2 A 抗体を最初に投与し、抗 P D - 1 抗体を 2 番目に投与するなど、逐次投与することができる。さらに、またはあるいは、抗 P D - L 1 抗体および抗 h N K G 2 A 抗体は、抗 P D - L 1 抗体を最初に投与し、抗 h N K G 2 A 抗体を 2 番目に投与するか、または抗 h N K G 2 A 抗体を最初に投与し、抗 P D - L 1 抗体を 2 番目に投与するなど、逐次投与することができる。さらに、またはあるいは、抗 L A G - 3 抗体および抗 h N K G 2 A 抗体は、抗 L A G - 3 抗体を最初に投与し、抗 h N K G 2 A 抗体を 2 番目に投与するか、または抗 h N K G 2 A 抗体を最初に投与し、抗 L A G - 3 抗体を 2 番目に投与するなど、逐次

40

50

投与することができる。

【0355】

さらに、2以上の用量の併用療法が逐次投与される場合には、逐次投与の順序は、各投与時点で逆転させることができ、同一順序で維持することができる、逐次投与は、同時投与またはその任意の組合せと組み合わせることができる。例えば、抗CTLA-4抗体および抗hNKG2A抗体の組合せの第1の投与は、同時であり得、第2の投与は、抗CTLA-4抗体が第1および抗hNKG2A抗体が第2で逐次であり得、第3の投与は、抗hNKG2A抗体が第1および抗CTLA-4抗体が第2で逐次であり得る、など。さらに、またはあるいは、組合せ抗PD-1抗体および抗hNKG2A抗体の第1の投与は、同時であり得、第2の投与は、抗PD-1抗体が最初で抗hNKG2A抗体が2番目の逐次であり得、第3の投与は、抗hNKG2A抗体が最初で抗PD-1抗体が2番目の逐次であり得る、などである。さらに、またはあるいは、組合せ抗PD-L1抗体および抗hNKG2A抗体の第1の投与は、同時であり得、第2の投与は、抗PD-L1抗体が最初で抗hNKG2A抗体が2番目の逐次であり得、第3の投与は、抗hNKG2A抗体が最初で抗PD-L1抗体が2番目の逐次であり得る、などである。さらに、またはあるいは、組合せ抗LAG-3抗体および抗hNKG2A抗体の第1の投与は同時であり得、第2の投与は、抗LAG-3抗体が最初で抗hNKG2A抗体が2番目の逐次であり得、第3の投与は、抗hNKG2A抗体が最初で抗LAG-3抗体が2番目の逐次であり得る、などである。別の代表的な投薬スキームは、抗hNKG2Aが最初で抗CTLA-4抗体（および/または抗PD-1抗体および/または抗PD-L1抗体および/または抗LAG-3抗体）が2番目の逐次である第1の投与を含み得、その後の投与は同時であってもよい。

【0356】

一実施形態では、唯一の免疫療法剤としての抗hNKG2A抗体、または抗hNKG2A抗体と1つもしくは複数のさらなる免疫療法抗体（例えば、抗CTLA-4および/もしくは抗PD-1および/もしくは抗PD-L1および/もしくは抗LAG-3抗体）との組合せを、癌性細胞などの免疫原性剤、精製された腫瘍抗原（組換えタンパク質、ペプチド、および炭水化物分子を含む）、細胞、ならびに免疫刺激性サイトカインをコードする遺伝子がトランスフェクトされた細胞（He et al. (2004) J. Immunol. 173:4919-28）とさらに組み合わせることができる。使用できる腫瘍ワクチンの限定されない例として、gp100、MAGE抗原、Trp-2、MART1および/もしくはチロシナーゼのペプチドなどの黒色腫抗原のペプチドまたはサイトカインGM-CSFを発現するようトランスフェクトされた腫瘍細胞が挙げられる。（以下にさらに論じられる）。ICOSアゴニストならびに1種または複数のさらなる抗体（例えば、CTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断）はまた、標準癌治療とさらに組み合わせることができる。例えば、ICOSアゴニストならびに1種または複数のさらなる抗体（例えば、CTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3遮断）を、化学療法治療計画と組み合わせることができる。一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、黒色腫の治療のために、ダカルバジンと組み合わせた、抗CTLA-4抗体および/または抗PD-1抗体および/または抗PD-L1抗体および/または抗LAG-3抗体とともに、患者に投与される。一実施形態では、抗hNKG2A抗体は、黒色腫を含む、癌の治療のために、インターロイキン-2（IL-2）と組み合わせた、抗CTLA-4抗体および/または抗PD-1抗体および/または抗PD-L1抗体および/または抗LAG-3抗体とともに、患者に投与される。細胞傷害性によるCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3アンタゴニズムを伴うかまたは伴わずに、組合せの抗hNKG2A抗体で相乗作用をもたらし得るその他の併用療法としては、放射線照射、外科手術、またはホルモン欠乏が挙げられる。別の実施形態では、血管新生阻害剤を、抗hNKG2A抗体ならびにCTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3アンタゴニズムと組み合わせることができる。

【0357】

10

20

30

40

50

一実施形態では、唯一の免疫治療薬として抗hNKG2A抗体を使用でき、または抗hNKG2A抗体およびCTL A - 4および/またはPD - 1および/またはPD - L1および/またはLAG - 3遮断抗体の組合せをまた、腫瘍細胞に対するFc またはFc受容体発現性エフェクター細胞を標的とする二重特異性抗体と組み合わせて使用することができる。例えば、米国特許第5,922,845号および同5,837,243号参照。2種の別個の抗原を標的とするよう二重特異性抗体を使用できる。

#### 【0358】

一実施形態では、唯一の免疫治療薬として抗hNKG2A抗体を使用でき、または抗hNKG2A抗体およびさらなる免疫賦活性薬剤、例えば、抗CTL A - 4抗体および/または抗PD - 1抗体および/または抗PD - L1抗体および/または抗LAG - 3抗体の組合せを、リツキサン（登録商標）（リツキシマブ）、ヘルセプチン（登録商標）（トラスツズマブ）、ペキサール（登録商標）（トシツモマブ）、ゼバリン（登録商標）（イブリツモマブ）、キャンパス（登録商標）（アレムツズマブ）、L y m p h o c i d e（登録商標）（エブルツズマブ（eprtuzumab））、アバスチン（登録商標）（ペバシズマブ）およびT a r c e v a（登録商標）（エルロチニブ）などの抗新生物剤とともに使用できる。例として、理論に捉われようとは思わないが、抗癌抗体または毒素とコンジュゲートしている抗癌抗体を用いる治療は、癌細胞死（例えば、腫瘍細胞）につながり得、これは、免疫賦活性薬剤、例えば、抗NKG2A抗体、抗TIGIT抗体、抗CTL A - 4抗体、抗PD - 1抗体、抗PD - L1抗体、抗ICOS抗体および/または抗LAG - 3抗体によって免疫応答媒介性を増強し得る。一実施形態では、過剰増殖性疾患（例えば、癌腫瘍）の治療は、抗癌剤、例えば、抗体を、同時にまたは逐次またはそれらの任意の組合せで、抗NKG2A抗体および適宜、さらなる免疫賦活性薬剤、例えば、抗CTL A - 4抗体および/または抗PD - 1抗体および/または抗PD - L1抗体および/または抗LAG - 3抗体と組み合わせて含み得、これは、宿主による抗腫瘍免疫応答を増強し得る。

#### 【0359】

抗NKG2A抗体を、抗CTL A - 4および/または抗PD - 1および/または抗PD - L1および/または抗LAG - 3抗体を伴うかまたは伴わずに、対象に投与することを含む、免疫賦活性薬剤を用いる過剰増殖性疾患（例えば、癌）の治療と関連する有害事象を低減、緩和、または抑制するための方法が、本明細書において提供される。一実施形態では、方法は、患者に非吸収性ステロイドを投与することによって、免疫賦活性治療用抗体誘導性大腸炎または下痢の罹患率を低減する。本明細書において、「非吸収性ステロイド」は、広範な初回通過代謝を示し、その結果、肝臓における代謝後に、ステロイドのバイオアベイラビリティが低い、すなわち、約20%未満であるグルココルチコイドである。本明細書に記載される一実施形態では、非吸収性ステロイドは、ブデソニドである。ブデソニドは、経口投与後に広範に、主に肝臓によって代謝される局所活性糖質コルチコイドである。ENTOCORT EC（登録商標）（A s t r a - Z e n e c a）は、回腸および結腸全体への薬物送達を最適化するために開発されたブデソニドのpHおよび時間依存性経口製剤である。ENTOCORT EC（登録商標）は、回腸および/または上行結腸が関与する軽度から中程度のクローン病の治療のために米国において承認されている。クローン病の治療のためのENTOCORT EC（登録商標）の通常の経口投与量は、6~9mg/日である。ENTOCORT EC（登録商標）は、腸管において放出され、その後、腸粘膜において吸収され、保持される。腸粘膜標的組織を通過すると、ENTOCORT EC（登録商標）は、肝臓においてシトクロムP450系によって、無視できるほどのグルココルチコイド活性を有する代謝産物に広範に代謝される。したがって、バイオアベイラビリティは低い（約10%）。ブデソニドの低いバイオアベイラビリティは、あまり広範ではない初回通過代謝を有するその他のグルココルチコイドと比較して改善された治療可能比をもたらす。ブデソニドは、全身活性化コルチコステロイドよりも少ない視床下部 - 下垂体抑制を含め、より少ない有害作用しかもたらさない。しかし、ENTOCORT EC（登録商標）の慢性投与は、全身性高コルチコイド症（hypercorticism）および副腎抑制などの全身グルココルチコイド作用をもたらし得る。PDR 58th

10

20

30

40

50

ed. 2004; 608-610を参照のこと。

【0360】

一実施形態では、非吸収性ステロイドとともに、CTLA-4および/またはPD-1および/またはPD-L1および/またはLAG-3アンタゴニストを伴うか、または伴わない抗NKG2A抗体を、サリチル酸とさらに組み合わせることができる。サリチル酸として、例えば、スルファサラジン(AZULFIDINE(登録商標)、Pharmacia & Upjohn); オルサラジン(DIPENTUM(登録商標)、Pharmacia & Upjohn); バルサラジド(COLAZAL(登録商標)、Salix Pharmaceuticals, Inc.); およびメサラミン(ASACOL(登録商標)、Procter & Gamble Pharmaceuticals; PENTASA(登録商標)、Shire US; CANASA(登録商標)、Axcandipharma, Inc.; ROWASA(登録商標)、Solvay)などの5-ASA薬剤が挙げられる。

10

【0361】

本明細書に記載される方法に従って、抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/またはLAG-3抗体および非吸収性ステロイドを伴うか、または伴わない、抗NKG2A抗体と組み合わせて投与されるサリチル酸として、免疫賦活性抗体によって誘発される大腸炎の発生率の低減を目的とした、サリチル酸および非吸収性ステロイドの任意の重複または逐次投与が挙げられる。したがって、例えば、本明細書に記載される免疫賦活性抗体によって誘発される大腸炎の発生率を低減するための方法は、サリチル酸および非吸収性を同時にまたは逐次投与すること(例えば、サリチル酸は、非吸収性ステロイドの6時間後に投与される)、またはその任意の組合せを包含する。さらに、サリチル酸および非吸収性ステロイドを、同一経路によって(例えば、両方を経口投与する)、または異なる経路によって(例えば、サリチル酸を経口投与し、非吸収性ステロイドを直腸に投与する)投与でき、これは、抗NKG2A抗体および抗CTLA-4および/または抗PD-1および/または抗PD-L1および/または抗LAG-3抗体を投与するために使用される経路(単数または複数)とは異なり得る。

20

【0362】

本明細書に記載される抗NKG2A抗体および組合せ抗体療法を、治療されている適応症(例えば、癌)に対するその特定の有用性について選択されるその他の周知の療法とともに使用してもよい。本明細書に記載される抗NKG2A抗体の組合せを、公知の医薬上許容される薬剤(単数または複数)と逐次使用してもよい。

30

【0363】

一実施形態では、本明細書に記載される抗NKG2A抗体および組合せ抗体療法は、放射線照射、化学療法(例えば、カンプトテシン(CPT-11)、5-フルオロウラシル(5-FU)、シスプラチン、ドキソルピシン、イリノテカン、パクリタキセル、ゲムシタピン、シスプラチン、パクリタキセル、カルボプラチン-パクリタキセル(タキソール)、ドキソルピシン、5-fuまたはカンプトテシン+ap021/TRAIL(6X combo)を使用する)、1種または複数のプロテアソーム阻害剤(例えば、ボルテゾミブまたはMG132)、1種または複数のBcl-2阻害剤(例えば、BH3I-2'(bcl-x1阻害剤)、インドールアミンジオキシゲナーゼ-1(IDO1)阻害剤(例えば、INCB24360)、AT-101(R-(-)-ゴシポール誘導体)、ABT-263(小分子)、GX-15-070(オバトクラックス(obatoclax))またはMCL-1(骨髄系白血病細胞分化タンパク質-1)アンタゴニスト)、iAP(アポトーシスタンパク質の阻害剤)アンタゴニスト(例えば、smac7、smac4、小分子smacミメティック、合成smacペプチド(Fulda et al., Nat Med 2002;8:808-15)、ISIS23722(LY2181308)またはAEG-35156(GEM-640))、HDAC(ヒストンデアセチラーゼ)阻害剤、抗CD20抗体(例えば、リツキシマブ)、血管新生阻害剤(例えば、ベバシズマブ)、VEGFおよびVEGFRを標的化する抗血管新生剤(例えば、アパスチン(登録商標))、合成トリテルペノ

40

50

イド (Hyer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808を参照のこと)、c - F L I P (細胞性 F L I C E 阻害性タンパク質)モジュレーター (例えば、P P A R (ペルオキシソーム増殖因子活性化受容体)の天然および合成リガンド、5809354または5569100)、キナーゼ阻害剤 (例えば、ソラフェニブ)、トラスツズマブ、セツキシマブ、テムシロリムス、ラパマイシンおよびテムシロリムスなどのmT O R 阻害剤、ボルテゾミブ、J A K 2 阻害剤、H S P 9 0 阻害剤、P I 3 K - A K T 阻害剤、レナリドマイド (Lenalidomide)、G S K 3 阻害剤、I A P 阻害剤および/または遺伝毒性薬物などのさらなる治療と組み合わせて (例えば、同時または別個に) 使用できる。

#### 【0364】

本明細書に記載される抗N K G 2 A 抗体および組合せ抗体療法は、1種または複数の抗増殖性細胞傷害性薬剤と組み合わせてさらに使用できる。抗増殖性細胞傷害性薬剤として使用してもよい化合物のクラスとして、それだけには限らないが、以下が挙げられる：

#### 【0365】

アルキル化剤 (制限するものではないが、ナイトロジェンマスタード、エチレンイミン誘導体、アルキルスルホネート、ニトロソ尿素およびトリアゼンを含む)：ウラシルマスタード、クロルメチン、シクロホスファミド (C Y T O X A N (商標))ホスファミド、メルファラン、クロラムブシル、ピポプロマン、トリエチレンメラミン、トリエチレンチオホスホラミン、ブスルファン、カルムスチン、ロムスチン、ストレプトゾシン、ダカルバジンおよびテモゾロミド。

#### 【0366】

代謝拮抗剤 (制限するものではないが、葉酸アンタゴニスト、ピリミジン類似体、プリン類似体およびアデノシンデアミナーゼ阻害剤を含む)：メトトレキサート、5 - フルオロウラシル、フロクスウリジン、シタラビン、6 - メルカププリン、6 - チオグアニン、フルダラビンホスフェート、ペントスタチンおよびゲムシタビン。

#### 【0367】

当技術分野で公知のその他のマイクロチューブリン分解防止剤に加えて、抗N K G 2 A 抗体、制限するものではないが、タキサン、バクリタキセル (バクリタキセルは、T A X O L T M として市販されている)、ドセタキセル、ディスコデルモリド (D D M)、ジクチオスタチン (D C T)、ペロルシド (Peloruside) A、エポチロン、エポチロン A、エポチロン B、エポチロン C、エポチロン D、エポチロン E、エポチロン F、フラノエポチロン D、デスオキシエポチロン B 1、[ 17 ] - デヒドロデスオキシエポチロン B、[ 18 ] デヒドロデスオキシエポチロン B、C 12, 13 - シクロプロピル - エポチロン A、C 6 - C 8 架橋エポチロン A、トランス - 9, 10 - デヒドロエポチロン D、シス - 9, 10 - デヒドロエポチロン D、16 - デスメチルエポチロン B、エポチロン B 10、ディスコデルモリド (discoderomolide)、パツピロン (patupilone) (E P O - 906)、K O S - 862、K O S - 1584、Z K - E P O、A B J - 789、X A A 296 A (ディスコデルモリド (discoderomolide))、T Z T - 1027 (ソブリドチン)、I L X - 651 (タシドチン塩酸塩 (tasidotin hydrochloride))、ハリコンドリノ B、エリブリンメシル酸塩 (Eribulin mesylate) (E - 7389)、ヘミアステリン (H T I - 286)、E - 7974、クリプトフィシン、L Y - 355703、マイタンシノイドイムノコンジュゲート (D M - 1)、M K C - 1、A B T - 751、T 1 - 38067、T - 900607、S B - 715992 (イスピネシブ (ispinesib))、S B - 743921、M K - 0731、S T A - 5312、エリユテロピン、17 - アセトキシ - 2 - エトキシ - 6 - オキソ - B - ホモ - エストラ - 1, 3, 5 (10) - トリエン - 3 - オール、シクロストレブチン、イソラウリマリド、ラウリマリド、4 - エピ - 7 - デヒドロキシ - 14, 16 - ジデメチル - (+) - ディスコデルモリドおよびクリプトチロン (cryptothilone) 1 と組み合わせるための適した抗増殖性薬剤。

#### 【0368】

いくつかの実施形態では、本明細書に記載される抗N K G 2 A 抗体抗体を用いる治療とともに、またはそれに先立って、例えば、患者に、ホルモンおよびステロイド (合成類似

10

20

30

40

50

体を含む)、例えば、17 $\alpha$ -エチニルエストラジオール、ジエチルスチルベストロール、テストステロン、プレドニゾン、フルオキシメステロン、プロピオン酸ドロモスタノロン、テストラクトン、メゲストロールアセテート、メチルプレドニゾン、メチル-テストステロン、プレドニゾン、トリラムシノロン、クロロトリアニセン、ヒドロキシprogesterone、アミノグルテチミド、エストラムスチン、メドロキシprogesteroneアセテート、リュープロリド、フルタミド、トレミフェン、ZOLADEX (商標)を投与することによって、異常に増殖性の細胞を静止状態にすることが望ましい場合がある。本明細書に記載される方法または組成物を使用する場合には、鎮吐剤などの、臨床設定において腫瘍成長または転移の調節において使用されるその他の薬剤も、望まれるように投与できる。

10

#### 【0369】

化学療法薬の安全および有効な投与のための方法は、当業者に公知である。さらに、その投与は標準的な文献に記載される。例えば、多数の化学療法薬の投与は、その開示内容が、参照により本明細書に組み込まれる、Physicians' Desk Reference (PDR)、例えば、1996年版(Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA)に記載されている。

#### 【0370】

化学療法薬(単数または複数)および/または放射線療法を、当技術分野で公知の治療用プロトコルに従って投与できる。化学療法薬(単数または複数)および/または放射線療法の投与は、治療されている疾患およびその疾患に対する化学療法薬(単数または複数)および/または放射線療法の公知の効果に応じて変わり得るということは、当業者には明らかであろう。また、熟練した臨床医の知識に従って、患者に対する投与された治療薬の観察された効果を考慮して、また投与された治療薬に対する疾患の観察された応答を考慮して、治療プロトコル(例えば、投与の投与量および時間)を変えることができる。

20

#### 【0371】

結果

腫瘍応答は、例えば、NCIによって確立された、修正されたResponse Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST)によって、判定される。

#### 【0372】

標的病変部に関して、治療法に対する応答として、以下のものを挙げることができる。

30

#### 【0373】

40

50

【表 B - 1】

完全な応答(CR) (RECIST V1.1)	すべての標的病変部の消滅。いずれの病的リンパ節も(標的または非標的にかかわらず)、短い方の軸が10mm未満まで低減していなければならない。
部分的応答(PR) (RECIST V1.1)	標的病変部の直径の合計の少なくとも30%の減少、ベースラインの合計直径を参照と見なす。
疾患の進行(PD) (RECIST V1.1)	標的病変部の直径の合計の少なくとも20%の増大、研究中の最小合計(ベースライン合計が研究中で最小となった場合はそれを含む)を参照と見なす。20%の相対的増大に加えて、合計は、少なくとも5mmの絶対的増大も示す必要がある。(注記:1つまたは複数の新たな病変部の出現も、進行と見なす)。
疾患の安定(SD) (RECIST V1.1)	PRと認められるのに十分な縮小もPDと見なされるのに十分な増大もない。研究中の最小合計直径を参照と見なす。
免疫関連の完全な応答(irCR) (irRECIST)	すべての標的病変部の消滅。いずれの病的リンパ節も(標的または非標的にかかわらず)、短い方の軸が10mm未満に低減していなければならない。
免疫関連の部分的応答(irPR) (irRECIST)	標的病変部およびすべての新たな測定可能な病変部の直径の合計(例えば、腫瘍量の変化の割合)の少なくとも30%の減少、ベースラインの合計直径を参照と見なす。注記:新たな測定可能な病変部の出現は、全体的な腫瘍量に含まれるが、直径の合計が、最下点と比較して20%以上増大するまでは疾患の進行として自動的に認められることはない。

10

20

30

【表 B - 2】

免疫関連の疾患の進行(irPD) (irRECIST)	腫瘍量(例えば、標的病変部およびすべての新たな測定可能な病変部の直径の合計)の少なくとも20%の増大、研究中の最小合計を参照と見なす(ベースライン合計が研究中で最小となった場合はそれを含む)。20%の相対的増大に加えて、合計は、少なくとも5mmの絶対的増大も示す必要がある。疾患の進行について免疫関連の基準を使用した腫瘍評価は、新たな測定可能な病変部の寄与も組み込む。評価ごとのそれぞれの腫瘍量変化の正味の割合は、前からあった病変部および出現した場合は新しい病変部の両方のサイズおよび成長動態が含まれる。
免疫関連の疾患の安定(irSD) (irRECIST)	irPRと認められるのに十分な縮小もirPDと見なされるのに十分な増大もない。研究中の最小合計直径を参照と見なす。

40

## 【0374】

非標的病変部に関して、治療法に対する応答として、以下のものを挙げることができる。

50



【 0 3 7 5 】

【表 C】

完全な応答(CR) (RECIST V1.1)	すべての非標的病変部の消滅。いずれのリンパ節も、病的なサイズでない必要がある(短い方の軸が10mm未満)。 。
非CR/非PD (RECIST V1.1)	1つまたは複数の非標的病変部の持続。
疾患の進行(PD) (RECIST V1.1)	既存の非標的病変部の明白な進行。1つまたは複数の新たな病変部の出現もまた、進行と見なす。
免疫関連の完全な応答(irCR) (irRECIST)	すべての非標的病変部の消失。いずれのリンパ節も、サイズが病的でない必要がある(短い方の軸が10mm未満)。 。
免疫関連の疾患の進行(irPD) (irRECIST)	非標的病変部の数またはサイズの増大は、腫瘍量が20%増大しない限り/または増大する(例えば、標的病変部の最低点の直径およびすべての新たな測定可能な病変部の直径の合計が、必要とされる量で増大する)までは、疾患の進行に相当しない。非標的病変部は、疾患の安定および部分的応答の定義で考察されない。

10

20

【 0 3 7 6 】

本明細書に開示される方法により治療される患者は、好ましくは、癌の少なくとも1つの兆候における改善を経験する。一実施形態では、改善は、測定可能な腫瘍病変部の数および/またはサイズの低減によって測定される。別の実施形態では、病変部は、胸部×線またはCTもしくはMRIフィルムで測定できる。別の実施形態では、細胞学または組織学を使用して、治療法に対する応答性を評価できる。

30

【 0 3 7 7 】

一実施形態では、治療される患者は、完全な応答(CR)、部分的な応答(PR)、安定な疾患(SD)、免疫関連の全疾患(immune-related complete disease)(irCR)、免疫関連の部分的な応答(irPR)または免疫関連の安定な疾患(irSD)を示す。別の実施形態では、治療される患者は、腫瘍縮小および/または成長速度の減少、すなわち、腫瘍成長の抑制を経験する。別の実施形態では、望ましくない細胞増殖が、低減または阻害される。さらに別の実施形態では、以下のうちの1種または複数が生じ得る：癌細胞の数が低減され得る、腫瘍サイズが低減され得る、末梢器官への癌細胞浸潤が阻害、妨害、減速または停止され得る、腫瘍転移が減速または阻害され得る、腫瘍成長が阻害され得る、腫瘍の再発が防止または遅延され得る、癌と関連する症状のうちの1種または複数がある程度緩和され得る。

40

【 0 3 7 8 】

他の実施形態では、本明細書において提供される方法のうちのいずれかによる有効量の抗NKG2A抗体(または抗NKG2A抗体と、少なくとも1つのさらなる抗体、例えば、抗PD-1抗体もしくは抗CTLA-4抗体との組合せ)の投与は、腫瘍サイズの低減、経時的に出現する転移病変部数の低減、完全な寛解、部分的な寛解、または疾患の安定をもたらす。さらに他の実施形態では、治療の方法は、抗NKG2A抗体単独(または組合せの抗体のうちのいずれか単独)で達成されるものよりも良好な比較臨床有用率(CBR = CR + PR + 6ヶ月以上のSD)をもたらす。他の実施形態では、臨床有用率の改善

50

は、抗NKG2A抗体単独（または組合せの抗体のうちのいずれか単独）と比較して、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、またはそれ以上である。

#### 【0379】

##### ワクチンアジュバント

本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、抗NKG2A抗体と対象の抗原（例えば、ワクチン）との共投与によって、抗原特異的免疫応答を増強させるために使用することができる。したがって、対象における抗原に対する免疫応答を増強する方法であって、対象における抗原に対する免疫応答が増強されるように、対象に、(i) 抗原、および(ii) 抗NKG2A抗体またはその抗原結合断片を投与することを含む、方法が、本明細書において提供される。抗原は、例えば、腫瘍抗原、ウイルス抗原、細菌抗原、または病原体に由来する抗原であり得る。このような抗原の限定されない例として、上記で論じられた腫瘍抗原（もしくは腫瘍ワクチン）、または上記のウイルス、細菌、もしくはその他の病原体に由来する抗原など、上記のセクションにおいて論じられたものが挙げられる。

#### 【0380】

##### 検出および診断

別の態様では、サンプル中のヒトNKG2A抗原の存在を検出するか、またはヒトNKG2A抗原の量を測定するための方法であって、サンプルおよび対照サンプルを、ヒトNKG2Aと特異的に結合する抗NKG2A抗体、例えば、モノクローナル抗ヒトNKG2A抗体、またはその抗原結合断片と、抗体またはその断片とヒトNKG2Aとの間で複合体の形成を可能にする条件下において接触させることを含む、方法が、本明細書において提供される。次いで、複合体の形成を検出し、ここで、対照サンプルと比較した、サンプル間の複合体形成の相違が、サンプル中のヒトNKG2A抗原の存在を示す。さらに、本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、イムノアフィニティー精製によってヒトNKG2Aを精製するために使用できる。

#### 【0381】

以下の実施例によって本開示をさらに例示するが、これは、制限と解釈されてはならない。本願を通じて引用された、すべての図およびすべての参考文献の内容、Genbank配列、特許および公開特許出願は、参照により本明細書に明確に組み込まれる。

#### 【実施例】

#### 【0382】

以下は、本発明の抗NKG2A抗体、組成物、および方法の非限定的な例である。種々の他の実施形態を、本明細書に提供される一般的な説明と矛盾することなく実施することができることが理解される。

#### 【実施例1】

#### 【0383】

##### 抗hNKG2A抗体の生成

完全ヒトおよびキメラ抗NKG2Aモノクローナル抗体、ならびに抗NKG2A抗体と同一のエピトープと結合するおよび/またはその結合を交差遮断する完全ヒトおよびキメラ抗体が、本開示において記載されている。本発明者らは、ヒトおよびカニクイザルNKG2A発現細胞と特異的に結合するが、ヒトおよびカニクイザルNKG2C発現細胞とは特異的に結合しない、抗体を所望していた。本明細書に記載される抗NKG2A抗体は、この実施例に記載されるいくつかの方法を使用して、生成することができる。

#### 【0384】

##### 抗NKG2A抗体の生成、スクリーニング、および選択の方法

##### 1. ハイブリドーマ方法および開発

ハイブリドーマ方法を使用して、抗NKG2A抗体を、ヒト抗体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを使用して生成した。ヒトIgGトランスジェニックKunming(KM)マウスを、BAF3(マウス前駆B細胞株)-ヒトNKG2A(BAF3-hNKG2A)およびhCD94細胞の形質膜、またはhNKG2A-hCD94-mFc

タンパク質で、足蹠注射によって免疫処置した。これらのマウスのリンパ節を採取し、電流パルスを使用して細胞膜の透過性を増大させ、例えば、DNAを細胞内に導入することを可能にする、C y t o P u l s e エレクトロポレーション機器を使用して、ハイブリドーマを生成した。ヒトNK G 2 A に特異的な抗体を、C H O - S - ヒトNK G 2 A と結合するそれらの能力に関してF l u o r e s c e n t M i c r o v o l u m e A s s a y T e c h n o l o g y ( F M A T ) による一次スクリーニングで選択した。蛍光活性化細胞分取 ( F A C S ) 分析による二次的な確認スクリーニングを行って、C H O - S トランスフェクタント細胞の細胞表面上に発現されるヒトNK G 2 A と特異的に結合するモノクローナル抗体を特定した。

【 0 3 8 5 】

10

図 1 A に示されるように、工程 1 0 1 において、骨髓腫細胞株に融合したリンパ節細胞の 4 0 個の融合体から、1 5 3 個の抗体クローンを得た。

【 0 3 8 6 】

続いて、工程 1 0 2 において、ハイブリドーマ上清を、H L A - E 五量体 ( 蛍光標識した M H C - ペプチド複合体、P r o I m m u n e ) のヒトNK G 2 A 発現細胞との結合を遮断するそれらの能力に関して、試験した。このアッセイにより、H L A - E 五量体のヒトNK G 2 A 発現細胞との結合を遮断することができた抗体が特定され、さらなる開発のための抗体クローンの数が、1 5 3 個から 2 8 個の抗体クローンへと狭まった。

【 0 3 8 7 】

次に、精製された抗体のヒトまたはカニクイザルNK G 2 A 発現細胞またはNK G 2 C 発現細胞との結合によって、抗原特異性を判定した。具体的には、工程 1 0 3 において、H L A - E / NK G 2 A 相互作用を遮断した 2 8 個の抗体クローンを、精製された抗体のヒトNK G 2 A 発現細胞との結合によってさらにスクリーニングし、h C D 9 4 またはh NK G 2 C 発現細胞との結合に対してスクリーニングした。この工程では、3 つの抗体クローン ( 1 3 F 3 . A 4 、 1 1 H 9 . A 4 、および 4 G 5 . D 1 ) が発見され、これらをさらなる調査のために選択した。

20

【 0 3 8 8 】

工程 1 0 4 では、3 つの抗体クローン ( 1 3 F 3 . A 4 、 1 1 H 9 . A 4 、および 4 G 5 . D 1 ) を、カニクイザルNK G 2 A 発現チャイニーズハムスター卵巣 ( C H O ) 細胞に対する交差反応性に関してスクリーニングした。

30

【 0 3 8 9 】

工程 1 0 5 では、本明細書の実施例に記載されている種々の機能的アッセイおよびエピソードピニング実験を使用して、抗NK G 2 A 抗体を特徴付けた。

【 0 3 9 0 】

工程 1 0 6 では、さらなる抗体最適化および突然変異スキャン分析により、本明細書に記載される所望される機能的特性を有するさらなる抗NK G 2 A 抗体の発見が可能となった。

【 0 3 9 1 】

## 2 . 抗体ライブラリー生成方法

抗体を生成するためのハイブリドーマ方法に加えて、抗体ライブラリー方法も使用して、さらなる抗NK G 2 A 抗体を生成した。この方法により、P 1 - 0 6 9 3 6 6 抗体を含む抗NK G 2 A 抗体が生成され、それらは、ヒトおよびカニクイザルの両方のNK G 2 A 発現細胞株との望ましい特異的結合を示したが、有利なことにヒトNK G 2 C 発現細胞との結合が観察されなかった。

40

【 0 3 9 2 】

この抗体ライブラリー生成方法では、図 1 B に示されるように、工程 1 0 7 において、ヒト抗体を発現する 9 匹のトランスジェニックマウスに、組換えhNK G 2 A - h C D 9 4 - m F c 融合タンパク質およびカニクイザルNK G 2 A を発現する細胞株に由来する形質膜で免疫処置を行った。工程 1 0 8 では、免疫処置した動物のリンパ節を採取し、これを使用して免疫抗体ライブラリーを生成した。このライブラリーを、酵母表面ディスプレイ

50

イによって発現させ、蛍光活性化細胞分取 (FACS) を使用して、hNKG2A - hCD94 - mFc組換えタンパク質と結合したが、hNKG2C - hCD94 - mFc組換えタンパク質とは結合しなかった抗体を分取した。工程109では、得られた集団を、次世代シーケンシング (NGS) を使用して配列決定し、対象の抗体を合成し、アッセイにおいて試験した。工程110では、機能の特徴付けを行った。例えば、P1 - 069366抗体を特徴付けるために、FACSによって、抗体の、ヒトNKG2A - CD94、カニクイザルNKG2A、またはヒトNKG2C - CD94を発現するように遺伝子操作したCHO細胞株との結合を測定した。さらに、エピトープマッピングを、例えば、本明細書の実施例に記載されるように、NKG2A . 9抗体を含め、13F3 . A4抗体および変異体に対して行った。

10

#### 【0393】

#### 3. 単一B細胞クローニング (SBCC) 方法

抗NKG2A抗体を生成するためのハイブリドーマ方法および抗体ライブラリー方法とともに、第3の方法を使用して、200個を上回るさらなる抗NKG2A抗体を生成した。

#### 【0394】

抗huNKG2A抗体を、ヒト抗体遺伝子を発現するトランスジェニックマウスを使用して生成した。このSBCC方法を使用して、200個を上回るヒト抗NKG2Aモノクローナル抗体を生成した。図1Cに示されるように、工程111において、ヒトIgGトランスジェニック (KM) マウスに、それぞれヒトNKG2AおよびカニクイザルNKG2Aを発現するBAF3細胞株の形質膜、ならびにhNKG2A - hCD94 - mFcタンパク質で、足蹠注射によって免疫処置した。工程112では、これらのマウスのリンパ節を採取し、得られた細胞を、SBCC方法に使用した。工程113では、 $10 \times 10^6$ 個のリンパ節細胞を、リンパ節から単離した。工程114において、抗原特異的B細胞選択/分取は、細胞表面のヒトIgG発現に基づき、主として、フローサイトメトリーを使用して抗原陽性 (Ag+) B細胞を分取した。免疫処置した動物のリンパ節を採取し、それを使用して、抗原特異的B細胞、すなわち、NKG2Aに特異的なB細胞を単離した。

20

#### 【0395】

本発明者らのFACS染色戦略は、蛍光標識/ビオチン化した可溶性標的抗原の使用を必要とし、B細胞特異的な細胞表面に発現されるマーカー、例えば、マウスCD19、マウスB220、およびヒトIgGのパネルを含んでいた。この多重パラメーターのFACSにより、NKG2A特異的B細胞の特定および分取の成功がもたらされた。選択的なFACS染色により、hNKG2A - hCD94 - mFc組換えタンパク質が陽性であるが、hNKG2C - CD94 - Fc組換えタンパク質は陽性でないB細胞の単離がもたらされた。これらの分取したB細胞に由来するヒトIgG VHおよびVK遺伝子を、ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) によって増幅させ、組換えヒトIgG1として分子的に発現させた。このようにして生成した抗体を、結合アッセイ、例えば、ELISA、HTRF、およびFACSで試験した。

30

#### 【0396】

NKG2Aと特異的に結合するが、NKG2Cタンパク質とは特異的に結合しない抗体を生成することが、目標であった。本発明者らは、NKG2Aと特異的に結合するいくつかの抗体を特定し、NKG2C陰性であったものをいくつか特定した。カニクイザルおよびヒトNKG2A交差反応性でありNKG2C陰性であった非常に少数の (希少な) B細胞クローンを特定した。NGSを、SBCCで得られたB細胞クローンに行って、ヒトIgG VHおよびVKの配列決定データを生成した。選択したNKG2A特異的抗体のパネルを、さらなるアッセイに関して試験した。しかしながら、これらのクローンはいずれも、ヒトNKG2A / HLA - E相互作用を十分に遮断しなかったため、これらの抗体は、以下の実施例3 (2) においてさらに詳細に論じられるように、さらなる開発には続かなかった。

40

#### 【実施例2】

#### 【0397】

50

### 突然変異スキャンおよびその他の抗体最適化

突然変異スキャンを行い、そこで、単一部位突然変異のライブラリーにより、NKG2A・11抗体(13F3・A4 VH I107T、VK N30Pとしても知られる)を含む、抗NKG2A抗体のさらなる変異体を生成した。

#### 【0398】

図2は、突然変異スキャン分析を図示する。高スループット配列決定をタンパク質ディスプレイと組み合わせることで、より従来のアプローチでは負担となるような規模で、すべての可能性のある単一部位CDR突然変異体の相対的な適合性の同時測定が可能となった。高深度突然変異スキャンニングアプローチは、Araya et al., Trends in Biotechnology 29: 435-442 (2001)、Forsynth et al., mAbs 5:523-53 (2013)、およびWrenbeck et al. (2017) Curr. Opin. Struct. Biol. 45:36に記載されている。

#### 【0399】

まず、工程201において、抗体の突然変異を生成するための対象の抗体を選択した。具体的には、13F3・A4 I107T抗NKG2A抗体を選択した。13F3・A4 I107Tハイブリドーマ抗体のNGK2Aとの結合パトープを、高深度突然変異スキャンを使用して調査した。第2に、工程202において、scFv(一本鎖)ライブラリーを作製し、そこで軽鎖CDR1領域(LCDR1)、軽鎖CDR3領域(LCDR3)、ならびに重鎖CDR1~3領域(HCDR1、HCDR2、およびHCDR3)におけるそれぞれの個々のアミノ酸置換を、NNKオリゴヌクレオチドを使用して生成した。この単一突然変異体のライブラリーを、次世代シーケンシング(NGS)技術を使用して配列決定した。この単一突然変異体のライブラリーを生成する際、それぞれのCDR配列について、それぞれの位置にNNKコドン(N=A、C、G、Tであり、K=G、Tである)を個別に組み込んだ複数のオリゴヌクレオチドを設計した。これらの縮重コドンの使用により、NNKコドンを組み込んだ位置において20個すべての天然に存在するアミノ酸(加えて終止コドン)をコードすることが可能となった。Kabata定義を、AbM定義を使用した(Abhinandan and Martin (2008) Mol. Immunol. 45:3832、Swindells et al. (2017) J. Mol. Biol. 429:356) HCDR1を除くすべてのCDRに使用し、HCDR3の102位は、分析に含まれなかった。第3に、工程203において、mRNAディスプレイ(Xu L et al. (2002) Chemistry & Biology 9: 933、Roberts RW and JW Szostak (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94:12297、Kurz et al. (2000) Nucleic Acids Res. 28(18): E83)を使用して、DNAライブラリーを、1回のインビトロ転写および翻訳によって取得し、この間に、コーディングmRNAを、ピューロマイシン連結を介してそれ自体のscFvタンパク質分子と融合させた。選択の間、ビオチン標識したhNKG2A-hCD94-mFc融合タンパク質と結合したすべてのscFvを、磁気ストレプトアビジンビーズによって捕捉し、溶出させ、PCRによって増幅させた(工程205)。工程204に示されるように、ヒトNKG2Aと結合しなかった抗体は、さらなる試験および開発に選択しなかった。最後に、工程206では、工程202で生成された初期ライブラリーおよび工程205で溶出されたDNAを、次世代シーケンシング(NGS)を使用して配列決定した。

#### 【0400】

次世代シーケンシング(NGS)データ分析: NGSデータ分析の間、NGSから得られた末端対合の順方向および逆方向に読み取った配列を、FLASH(Magoc and Salzberg (2011) Bioinformatics 27:2957)を使用してアセンブリし、突然変異したアミノ酸の集団、突然変異位置、および同一性によって、ビンニングした。品質の悪かった配列および複数の突然変異部位を含むものはすべて、分析から排除した。次に、選択後集団におけるそれぞれの配列の頻度を、開始集団における頻度で除して、濃縮比(ER)を得た。換言すると、濃縮比は、NKG2A結合サンプル(工程205)における特定の配列変異体の計数を、初期ライブラリー(工程202)における計数で除算したものである。これを、次いで、親13F3・A4 I107T抗体の濃縮比に対して正規化した。

#### 【0401】

【数 1】

$$\text{濃縮比} = \frac{\text{選択後（工程 205）の頻度}}{\text{開始ライブラリー（工程 202）の頻度}}$$

→ それぞれの位置における親の値に対して正規化

この方式で、本明細書において論じられる C D R 領域におけるすべての単一アミノ酸置換の N K G 2 A 結合に対する作用を、評価した。図 3 は、突然変異スキャンデータ分析を使用して生成された、単一アミノ酸置換の配列 - 活性関係性の解釈を可能にする、例示的なヒートマップである。親クローンの H C D R 1 配列（A b M 定義）5 0 1 が示されており、配列 5 0 2 における位置もまた示されている。一般に、この方法におけるエラーは、およそ 2 倍である。したがって、0.5 ~ 2 の濃縮比（E R）値は、中立の置換、すなわち、N K G 2 A タンパク質との結合特性を維持する置換であると考えられる。2 を上回る E R 値は、結合に関して望ましいかまたは好ましいと考えられ、0.5 未満の E R 値は、結合に関して望ましくないと考えられる。例として、3 5 位における親クローン N から S への置換は、5.16 の E R 値をもたらし、これは、2 よりも大きいため、望ましいまたは好ましい置換の例である。

10

【0402】

20

突然変異スキャン方法を使用して分析した C D R 位置を、図 4 に示す。本明細書において論じられるように、K a b a t 定義を、A b M 定義を使用した H C D R 1 を除くすべての C D R に使用した。望ましい生物物理学的特性を有する抗 N K G 2 A 抗体を開発するために、突然変異スキャンデータを使用して、1 3 F 3 . A 4 I 1 0 7 T 抗体と類似する N K G 2 A タンパク質との結合を保持するであろうアミノ酸置換を特定することによって、L C D R 1 における「N S」脱アミド化の化学的傾向を除去した。この分析に基づいて、図 5 A に示されるように、L C D R 1 における N 3 0 P を、好ましい（望ましい）置換として選択し、N K G 2 A . 1 1 抗体（1 3 F 3 V H I 1 0 7 T V K N 3 0 P としても知られる）を生成した。この分子を合成し、ヒト I g G 1 . 3 f F c 領域およびヒト定常カッパ（軽鎖）を有する I g G 発現ベクターにクローニングした。さらなる下流の特徴付けのために、I g G タンパク質を発現させた。

30

【0403】

突然変異スキャン分析により、図 5 A ~ E に示され、以下の表 1 に概説されるように、N K G 2 A タンパク質との結合に対する 1 3 F 3 . A 4 I 1 0 7 T 抗 N K G 2 A 抗体における単一アミノ酸置換の作用に関する豊富な情報セットが得られた。

【0404】

表 1-NKG2A と結合する抗体の能力を維持するかまたは増大させる、13F3.A4 I107T 抗 NKG2A 抗体の CDR 配列における単一部位突然変異

40

50

【表 1 - 1】

CDR領域	位置 (HCDR1がAbM 定義に従うこと を除き、Kabat定 義に従う)	NKG2Aとの結合を 維持するかまたは増 大させる好ましい置 換 (ヒートマップは、図 5A～Eに示される)	親アミノ酸配列を含む、NKG2Aと の結合を維持するアミノ酸  (ヒートマップは、図5A～Eに示され る)
LCDR1	24、X <sub>1</sub>		G、A、C、S、T、V、L、I、M、K、 R(親)、H、F、Y、W、N、D、E、Q
	25、X <sub>2</sub>	C、T、V、M	P、G、A(親)、S、L、I、F、Y、N 、E、Q
	26、X <sub>3</sub>		P、G、A、C、S(親)、T、V、L、I 、M、K、R、H、F、Y、W、N、D、E 、Q
	27、X <sub>4</sub>	G	P、A、C、S、T、V、L、I、M、K、 R、H、F、Y、W、N、D、E、Q(親)
	28、X <sub>5</sub>	L	P、A、C、S、T、V、I、M、K、R、 H、F、Y、W、N、D、E、Q、G(親)
	29、X <sub>6</sub>	C、H、F、N、D、E	P、G、A、S、T、V、L、I(親)、M 、K、R、Y、W、Q
	30、X <sub>7</sub>	P	G、A、C、S、T、V、L、I、M、K、 H、F、Y、W、N(親)、D、E、Q
	31、X <sub>8</sub>	P、G、C、D、E	A、S(親)、T、L、I、M、H、F、Y 、W、N、Q
	32、X <sub>9</sub>	V、I、F、Y、D、E	G、A(親)、C、S、T、L、M、H、W 、N
	33、X <sub>10</sub>		A、C、T、V、L(親)、I
	34、X <sub>11</sub>	E	A(親)、T、V

10

20

30

40

50

【表 1 - 2】

LCDR3	89、X <sub>12</sub>		Q (親)
	90、X <sub>13</sub>	D	A、S、T、K、N、E、Q (親)
	91、X <sub>14</sub>	C、M、H、W、N	A、T、L、F (親)
	92、X <sub>15</sub>		P、A、C、S、I、H、F、Y、W、N (親)、D、E、Q
	93、X <sub>16</sub>	V、D、E	G、A、C、S (親)、T、L、I、M、K、R、H、F、Y、W、N、Q
	94、X <sub>17</sub>		M、H、F、Y (親)、W
	95、X <sub>18</sub>		P (親)、G、A、S、M、D、E、Q
	96、X <sub>19</sub>		C、L (親)、F、W
	97、X <sub>20</sub>		G、A、C、S、T (親)、V、I、M、K、H、F、Y、W、N、D、E、Q
HCDR1	26、X <sub>21</sub>		G (親)
	27、X <sub>22</sub>		F (親)
	28、X <sub>23</sub>	V	G、A、C、S、T (親)、L、I、M、K、R、H、F、Y、N、D、E、Q
	29、X <sub>24</sub>		F (親)
	30、X <sub>25</sub>	G、N	P、A、C、S (親)、M、K、R、H、D、E、Q
	31、X <sub>26</sub>	G、A、V	S (親)、T、E、Q
	32、X <sub>27</sub>		H (親)
	33、X <sub>28</sub>	C	A、S (親)、M、K、R
	34、X <sub>29</sub>		M (親)
	35、X <sub>30</sub>	G、A、S	T、V、N (親)、D

10

20

30

40

50



【表 1 - 3】

HCDR2	50、X <sub>31</sub>	S、Q	G、A(親)、C、L、M、K、F、D
	51、X <sub>32</sub>	A	S、V、L、I(親)、M、N、E、Q
	52、X <sub>33</sub>		S(親)
	52a、X <sub>34</sub>	C	S(親)
	53、X <sub>35</sub>	Q	S(親)
	54、X <sub>36</sub>		S(親)
	55、X <sub>37</sub>	F、Y、W	A、C、S(親)、T、M、R、H
	56、X <sub>38</sub>		Y(親)
	57、X <sub>39</sub>		I(親)
	58、X <sub>40</sub>		G、A、S、M、K、R、H、F、Y(親)、N、E、Q
	59、X <sub>41</sub>		G、S、T、V、M、R、H、F、Y(親)、W、N、Q
	60、X <sub>42</sub>	H、Q	P、G、A(親)、C、S、T、V、L、I、M、K、R、F、Y、W、N、D、E
	61、X <sub>43</sub>		P、G、A、C、S、T、V、L、I、M、K、R、H、F、Y、W、N、D(親)、E、Q
	62、X <sub>44</sub>		P、G、A、C、S(親)、T、V、L、I、M、K、R、H、F、Y、W、N、D、E、Q
	63、X <sub>45</sub>		P、G、A、C、S、T、V(親)、L、I、M、K、R、H、F、Y、W、N、D、E、Q
	64、X <sub>46</sub>		P、G、A、C、S、T、V、L、I、M、K(親)、R、H、F、Y、W、N、D、E、Q
	65、X <sub>47</sub>		P、G(親)、A、C、S、T、V、L、I、M、K、R、H、F、Y、W、N、D、E、Q

10

20

30

【表 1 - 4】

HCDR3	95、X <sub>48</sub>		E(親)
	96、X <sub>49</sub>		M、E(親)
	97、X <sub>50</sub>		W(親)
	98、X <sub>51</sub>		G(親)
	99、X <sub>52</sub>		S、L(親)、H
	100、X <sub>53</sub>		P(親)
	100a、X <sub>54</sub>		F(親)
	101、X <sub>55</sub>		D(親)

40

完全な高深度突然変異スキャニングデータを使用することで、当業者であれば、図 5 A ~ E のデータに示されるように、多数のアミノ酸位置が突然変異に耐受であること、すなわち、アミノ酸置換をこれらの位置に行うことができ、NKG2A タンパク質と特異的に結

50

合する所望される機能的能力を依然として維持できることを理解するであろう。当業者であれば、特定の位置、例えば、L C D R 8 9 位（図 5 B に示される）、ならびに H C D R 2 6 位、2 7 位、2 9 位、3 2 位、および 3 4 位（図 5 C に示される）；H C D R 5 2 位、5 2 a 位、5 3 位、5 4 位、5 6 位、5 7 位（図 5 D に示される）；および H D C R 9 5 位、9 6 位、9 7 位、9 8 位、9 9 位、1 0 0 位、1 0 0 a 位、および 1 0 1 位（図 5 E に示される）が、最も保存されており、これらの位置における単一または数個のアミノ酸型のみにより、N K G 2 A タンパク質との結合が維持されたことを理解するであろう。当業者であれば、このデータを使用して、N K G 2 A タンパク質との結合を維持するアミノ酸置換を設計することができるであろう。

【実施例 3】

【0405】

所望される機能的特徴を示さなかった数百個の抗体を分析した後の、予想外なそのような特徴を有する抗 N K G 2 A 抗体の発見。

（1）抗 N K G 2 A 抗体の発見、設計、および実験的試験

数百個の抗 N K G 2 A 抗体の開発は、これらの抗体が本明細書に記載される特定の所望される機能的特性を示していなかったため、追求しなかった。所望される機能的特性を有する抗 N K G 2 A 抗体の発見におけるこの困難は、図 6 に例示されるように、ヒト N K G 2 A タンパク質とヒト N K G 2 C タンパク質との間の高度な配列相同性に部分的に起因していた。V e c t o r N T I ソフトウェアおよび A l i g n X プログラムを使用して、配列アラインメントを行った。図 6 は、アミノ酸残基のうちの 7 6 %（2 3 3 個中 1 7 7 個のアミノ酸残基）が、保存されており、アミノ酸残基のうちの 6 %（2 3 3 個中 1 3 個のアミノ酸残基）が、ヒト N K G 2 A タンパク質のカノニカル配列（配列番号 1 8 2）とヒト N K G 2 C タンパク質（h N K G 2 C、配列番号 3）との間で類似であることを示す。

【0406】

2 0 個の異なるアミノ酸が自然界で発生すること、アミノ酸が、異なるクラスにあるように一緒にグループ分けでき、したがって、それらの物理化学的特性に基づいて「類似」であることは、当技術分野において周知である。物理化学的に類似であるアミノ酸は、そうでないものよりも互換可能である、すなわち、置換可能であることが多い。以下の表は、例えば、側鎖によって定義される類似の特徴を有するアミノ酸のグループ分けを提供する。

【0407】

10

20

30

40

50

【表 D】

アミノ酸の特徴		例		
極性	極性、正電荷	アルギニン	Arg	R
		ヒスチジン	His	H
		リシン	Lys	K
	極性、負電荷	アスパラギン酸	Asp	D
		グルタミン酸	Glu	E
	極性、中性	セリン	Ser	S
		トレオニン	Thr	T
		アスパラギン	Asn	N
		グルタミン	Gln	Q
非極性	非極性脂肪族	アラニン	Ala	A
		バリン	Val	V
		ロイシン	Leu	L
		イソロイシン	Ile	I
		メチオニン	Met	M
	非極性芳香族	フェニルアラニン	Phe	F
		チロシン	Tyr	Y
		トリプトファン	Trp	W
			プロリン	Pro
		グリシン	Cys	C
特別な特徴		アスパラギン/ アスパルテート グルタミン/ グルタメート	Asx  Glx	

\*グリシンは側鎖を有さず、分類は単純ではない。グリシンは、通常、ループまたはコイル領域内のタンパク質表面に見られ、それによって、これらの位置でポリペプチド鎖に高い可動性をもたらす。

## 【0408】

まとめると、ヒトNKG2AおよびヒトNKG2Cは、およそ82%の同じかまたは類似のアミノ酸配列を共有している。ヒトNKG2AとヒトNKG2Cとの間のこの高度な配列相同性により、高い親和性および特異性でNKG2Aタンパク質と結合するだけでなく、親和性および特異性が低いかまたはなしでNKG2Cタンパク質と結合する、抗NKG2A抗体を発見することは非常に困難なプロセスとなっていた。

## 【0409】

驚くべきことに、本発明者らは、13F3.A4抗体が、本明細書に詳細に記載される特定の所望される機能的特徴を示したことを発見した。図7A～Bは、13F3.A4抗NKG2A抗体の重鎖可変領域（図7A）および軽鎖可変領域（図7B）のアミノ酸配列を示す。例えば、癌を治療するための所望される機能的特徴を示す抗NKG2A抗体を発見することの難しさを示すと、当初は有望なリード抗体であると考えられていた13F3.A4抗体のいくつかの変異体でさえも、最終的には所望される機能的特性を示さなかった。表2は、13F3.A4抗体の変異体を含め、生成して機能的に特徴付けた特定の抗NKG2A抗体をまとめている。NKG2A.9抗体を含め、13F3.A4抗体の特定の变異体が、予想外なことに、本明細書に記載される所望される機能的特徴を示した。

## 【0410】

【表 2 - 1】

表2-抗NKG2A抗体および機能的特徴			
親ハイブリドーマクローン	組換え抗体の名称	抗体アイソタイプ	説明および機能的特徴
11H9.A4	NKG2 A.5	IgG1f	CHO-hNKG2A/HLA-E遮断アッセイにおいて試験 CHO-カニクイザルNKG2A結合アッセイにおいて試験。 NKG2A.5は、カニクイザルNKG2A発現CHO細胞との結合の不良を示し、さらなる開発は行わなかった。 図9A～9Bは、11H9抗体の重鎖および軽鎖可変領域配列を示す。
11H9.A4	NKG2 A.5	IgG1.3f	CHO-hNKG2A/HLA-E遮断アッセイにおいて試験 CHO-カニクイザルNKG2A結合アッセイにおいて試験。カニクイザルNKG2A発現CHO細胞との結合の不良を示し、さらなる開発は行わなかった。

10

20

30

40

50

【表 2 - 2】

13F3.A4	NKG2 A.6	IgG1.3f および IgG1f	<p>CHO-hNKG2A/HLA-E遮断アッセイにおいて試験。NKG2A.6(例えば、NKG2A.9およびNKG2A.11の親抗体)は、hNKG2A/HLA-E相互作用を遮断した。</p> <p>CHO-カニクイザルNKG2A結合アッセイにおいて試験。NKG2A.6(例えば、NKG2A.9およびNKG2A.11の親抗体)は、カニクイザルNKG2Aと結合した</p> <p>アッセイ結果に基づいて、NKG2A.6-IgG1.3f抗体を、さらに開発し、例えば、NKG2A.9およびNKG2A.11-IgG1.3f抗体の発見および開発につながった。</p>
13F3.A4	NKG2 A.6	IgG2.5	<p>ヒトIgG2-C131Sを有する抗NKG2A 13F3.A4(コドン最適化)</p> <p>いずれのアッセイにおいても試験せず</p>
13F3.A4 VH-I10 7T、VK- N30S	NKG2 A.9	IgG1.3f	<p>VH-I107T FW逆転および脱アミド化部位を除去するためのVK-N30Sを有する13F3.A4(コドン最適化)</p> <p>本明細書の実施例において記載されるように、多数の機能的アッセイにおいて発見および特徴付けし、驚くべきことに、所望される機能的特徴を示した。</p> <p>図15は、NKG2A.9抗体の軽鎖および重鎖アミノ酸配列を示す。</p>

10

20

30

40

50

【表 2 - 3】

13F3.A4 VH-I10 7T、VK- N30Q	NKG2 A.10	IgG1.3f	VH-I107T FW逆転および脱アミド化部位を除去するためのVK-N30Qを有する13F3.A4 CHO-hNKG2A/HLA-E遮断およびCHO-hNKG2A結合アッセイにおいて試験
13F3.A4 VH-I10 7T、VK- N30P	NKG2 A.11	IgG1.3f	VH-I107T FW逆転および脱アミド化部位を除去するためのVK-N30Pを有する13F3.A4 CHO-hNKG2A/HLA-E遮断およびCHO-hNKG2A結合アッセイにおいて試験
13F3.A4 VH-I10 7T	NKG2 A.12	IgG1.3f	VH-I107T FW逆転を有する13F3.A4 CHO-hNKG2A/HLA-E遮断およびCHO-hNKG2A結合アッセイにおいて試験
13F3.A4 VK-N3 0S	NKG2 A.13	IgG1.3f	脱アミド化部位を除去するためのN30Sを有する13F3.A4 NKG2A.13抗体は十分な収率を有さなかったため、いずれのアッセイにおいても試験せず。
13F3.A4 VK-N3 0Q	NKG2 A.14	IgG1.3f	脱アミド化部位を除去するためのN30Qを有する13F3.A4 CHO-hNKG2A/HLA-E遮断およびCHO-hNKG2A結合アッセイにおいて試験

10

20

【表 2 - 4】

13F3.A4 VK-N3 0P	NKG2 A.15	IgG1.3f	脱アミド化部位を除去するためのN30Pを有する13F3.A4 CHO-hNKG2A/HLA-E遮断およびCHO-hNKG2A結合アッセイにおいて試験
		IgG1.3f および	CHO-カニクイザルNKG2A結合アッセイにおいて試験。 抗体は、カニクイザルNKG2A発現CHO細胞との結合の不良を示し、さらなる開発は行わなかった。 抗体はまた、NKG2A陰性発現細胞の機能性の増大も示し、これにより、抗体がNKG2A/HLA-E経路に直接的に影響を及ぼさなかったことが示唆された。
2G6.C2	NKG2 A.16	IgG1f- Fab6H	図8A～Bは、2G6.C2抗体の重鎖(図8A)および軽鎖(図8B)アミノ酸配列を示す。

30

40

50

【表 2 - 5】

13F3 VH-I107T 、VK-N30S-Y4 9S	NKG2 A.18	IgG1.3f	疎水性パッチ突然変異体を生成して、望ましくない凝集レベルの低減を試みた。疎水性パッチ突然変異体は、いずれのアッセイにおいても試験しなかった。
13F3 VH-I107T 、VK-N30S-Y9 4T	NKG2 A.19		
13F3 VH-I107T 、VK-N30S-Y9 4A	NKG2 A.20		
13F3 VH-I107T 、VK-N30S-Y9 4N	NKG2 A.21		
13F3 VH-Y56T -I107T、VK-N3 0S	NKG2 A.22		
13F3 VH-I57T- I107T、VK-N30 S	NKG2 A.23		
13F3 VH-Y58N -I107T、VK-N3 0S	NKG2 A.24		
13F3 VH-Y58S -I107T、VK-N3 0S	NKG2 A.25		

10

20

30

【表 2 - 6】

27H4.D4	NKG2A .17	mIgG1- D265A	27H4.D4は、マウスIgG1-D265Aおよびマウスカッパ定常領域を有するキメラ抗体であるNKG2A.17として再発現させた。 27H4.D4抗体は、対象の抗NKG2A抗体の存在下においてNKG2A受容体と結合するように生成した、すなわち、標的抗体と同じ抗原(ここでは、NKG2A)と結合するが同じエピトープと結合しないように生成した、非競合抗体である。これにより、対象の抗NKG2A抗体の存在下におけるNK G2A受容体の発現の測定が可能となった。
---------	--------------	-----------------	--

40

## 【 0 4 1 1 】

本明細書に記載される理由から、また望ましくない機能的特徴に起因してさらなる開発に選択しなかった多数の抗NKG2A抗体によって示されるように、所望される機能的特性を有する抗NKG2A抗体を生成および発見することは、極めて困難なプロセスであっ

50

た。例えば、抗NKGA抗体開発の進行した段階であっても、当初は有望なリード抗体と考えられていた2G6・C2、4G5・D1、11H9・A4、および1G5・B2抗体は、所望される機能的特性のすべてを示したわけではなかったため、最終的にはさらなる開発に選択しなかった。図8A～Bは、2G6・C2抗体の重鎖および軽鎖可変領域の配列を示す。図9A～Bは、11H9・A4抗体の重鎖および軽鎖可変領域の配列を示す。図10A～Bは、4G5・D1抗体の重鎖および軽鎖可変領域の配列を示す。図11A～Bは、1G5・B2抗体の重鎖および軽鎖可変領域の配列を示す。これらの例は、本明細書に記載されるその他のものの中でもとりわけ、NKGAタンパク質と特異的に結合しNKGCタンパク質とは特異的に結合しないことを含め、所望される機能的特徴を有する抗NKGA抗体を生成することの困難さを示す。本明細書に説明されるように、所望される機能的特性を有する抗NKGA抗体の発見におけるこの困難は、ヒトNKGAタンパク質とヒトNKGCタンパク質との間の高度な配列相同性に起因していた。

10

#### 【0412】

13F3・A4抗体の変異体を、発見し、さらに特徴付けた。図12～13に示されるように、配列の傾向を13F3・A4抗体において評価した。完全ヒト抗NKGAモノクローナル抗体NKGA・9の可変配列は、VH-I107T生殖系列逆突然変異およびVK-N30残基の脱アミド化傾向を軽減するためのVK-N30S突然変異を有する13F3・A4ハイブリドーマに由来していた。定常領域は、IgG1f骨格(IgG1・3)に由来し、抗体のFc受容体およびC1qとの結合を最小化または排除するために、重鎖における3つの突然変異：L234A、L235E、およびG237Aを含む。M34酸化は、可能性のある酸化リスクとして特定されたが、後続の加速安定性研究に基づいてリスク除去された。NKGA・9抗体の全長アミノ酸配列を、図14に示す。NKGA・9抗体を、選択し、安定性および有効性を示すために、単独で、および例えば、癌を治療するための他の薬剤と組み合わせて、本明細書に記載される多数の機能的アッセイにおいて試験した。

20

#### 【0413】

NKGA・11抗体の全長アミノ酸配列を、図15に示す。NKGA・11は、VH-I107Tフレームワーク逆転および脱アミド化部位を除去するためのVK-N30Pを有する13F3・A4に由来する。NKGA・9(N30S)とNKGA・11(N30P)の間には、軽鎖における1つのアミノ酸の相違があり、重鎖にはアミノ酸の相違はなかった。NKGA・9およびNKGA・11は、類似の熱安定性および可溶性特性を有する。NKGA・9は、NKGA・11よりも良好な熱可逆性および良好な免疫原性を有する(インシリコで)。NKGA・9の免疫原性は、実施例16および26においてより詳細に記載されている。

30

#### 【0414】

(2) 単一B細胞クローニング方法を使用して生成した数百個の抗体は、所望される機能的特徴が欠如していた

図16は、B細胞クローニング方法によって生成された例示的な抗体のエピトープビニング結果の円形プロットを示す。エピトープビニングは、「インタンデム(in-tandem)形式」を使用して、Octet HTX機器において行った。まず、hNKGA-hCD94-mFc融合タンパク質を、Octetセンサーチップに捕捉した。次に、必要に応じて、残りの捕捉部位を遮断した。第3に、抗原を、上清から、単一B細胞クローニングで得られた抗体で飽和させた。最後に、参照抗体の結合を試験した。エピトープビニング実験を、添加、先に参照抗体で飽和させ、次いで単一B細胞クローニングで得られた抗体を含む上清の結合を調べるという逆の順序で反復した。このエピトープビニングにより、エピトープにおける高い多様性に対応する、結合および遮断挙動における高い多様性が示された。図16は、互いに交差遮断する抗体を線で接続して示すことによって、エピトープビニングの結果を示す。ベンチマーク抗体(13F3・A4、Z270、RD-a hNKGA(クローン131411、カタログ番号MAB1059)、およびRD-a hCD94(クローン131412、カタログ番号MAB1058))と比較して類似の遮

40

50



断プロファイルを有するサンプル抗体を、群 1 ~ 4、6 ~ 7、および 9 に一緒にグループ分けする。サンプル抗体と類似の遮断プロファイルを有するベンチマーク抗体も、群 5、8、および 10 に一緒にグループ分けする。同じ群の抗体は、同様に互いに交差遮断し得る可能性があるが、これはこれらの実験では試験しなかった。サンプル抗体は、互いに対して試験せず、ベンチマーク抗体は、交差遮断に関して互いに対して試験しなかった。

#### 【0415】

NKG2A / HLA - E 相互作用を遮断する、単一 B 細胞クローニング方法を使用して生成した抗ヒト NKG2A 抗体の能力を、評価した。図 17A に示されるように、 $1 \times 10^6$  個のヒト NKG2A 発現 CHO 細胞を、 $100 \mu\text{L}$  の上清または  $10 \mu\text{g} / \text{mL}$  の生成された抗体とともに、4 で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、蛍光標識した HLA - E 五量体 (Proimmune) で染色して、細胞表面上の結合した HLA - E を検出した。細胞は、BD LSRFortessa で新しく読み取った。図 17B は、HLA - E のヒト NKG2A 発現 CHO 細胞との結合を遮断する、B 細胞クローニングによって生成した抗ヒト NKG2A 抗体の能力を示す。NKG2A . 9 抗体は、陽性対照としての機能を果たし、アイソタイプは、陰性対照としての機能を果たした。SBCC 方法を使用して生成した数百個の抗体は、NKG2A / HLA - E 相互作用を部分的にのみ遮断したか、または遮断しなかった。これらの数百個の抗体でさらなる開発に選択したものはなく、所望される機能的特徴を有する抗 NKG2A 抗体を発見することの難しさの根拠を提供する。

#### 【0416】

(3) 望ましいことに NKG2A / HLA - E 相互作用を遮断し、NKG2C / HLA E 相互作用を遮断しなかった、抗ヒト NKG2A 抗体

NKG2A / HLA - E および NKG2C / HLA - E 相互作用を遮断する抗ヒト NKG2A 抗体の能力を評価した。図 18D に示されるように、 $1 \times 10^6$  個のヒト NKG2A 発現 CHO 細胞を、滴定量の抗 NKG2A 抗体とともに、4 で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、蛍光標識した HLA - E 五量体 (Proimmune) で染色して、細胞表面上の結合した HLA - E を検出した。細胞は、BD LSRFortessa で新しく読み取った。図 18E ~ F は、HLA - E のヒト NKG2A 発現または NKG2C 発現 CHO 細胞との結合の遮断に関する、抗 NKG2A 抗体の HLA - E 遮断曲線および IC<sub>50</sub> を示す。13F3 . A4 および 11H9 . A1 抗体は、望ましいことに、ヒト NKG2A 発現 CHO 細胞との特異的結合を示し (図 18E)、望ましいことに、NKG2C / HLA - E 相互作用を遮断しなかった (図 18F)。しかしながら、2EB . B1 抗体は、望ましくないことに、ヒト NKG2C 発現 CHO 細胞と結合し、NKG2C / HLA - E 相互作用を遮断した。したがって、2EB . B1 抗体は、さらなる開発には選択しなかった。

#### 【0417】

ナチュラルキラー細胞 (NKL) における NKG2A / HLA - E 相互作用を遮断する抗 NKG2A 抗体の能力もまた、評価した。図 19C に示されるように、 $1 \times 10^6$  個の内因的に発現するヒト NKL 細胞を、滴定量の抗 NKG2A 抗体とともに、4 で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、蛍光標識した HLA - E 五量体 (Proimmune) で染色して、細胞表面上の結合した HLA - E を検出した。細胞は、BD LSRFortessa で新しく読み取った。図 19D は、HLA - E のヒト NKG2A 発現 NKL 細胞との結合の遮断に関する、抗 NKG2A 抗体の HLA - E 遮断曲線および IC<sub>50</sub> 値を示す。13F3 . A4、11H9 . A1、4G5 . D1、および IG5 . B2 抗体は、NKL 細胞において、それぞれ、0.2 nM、0.1 nM、0.3 nM、および 0.4 nM の IC<sub>50</sub> 値で、NKG2A / HLA - E 相互作用の遮断を示した。

#### 【0418】

NKG2A / HLA - E 相互作用を遮断するさらなる抗ヒト NKG2A 抗体の能力を評価した。図 20A に示されるように、 $1 \times 10^6$  個のヒト NKG2A 発現 CHO 細胞を、滴定量の抗 NKG2A 抗体 ( $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ ) とともに、4 で 30 分間インキュベート

した。細胞を洗浄し、蛍光標識したHLA-E五量体(Proimmune)で染色して、細胞表面上の結合したHLA-Eを検出した。細胞は、BDLSRFortessaで新しく読み取った。図20B~Cは、HLA-EのヒトNKG2A発現CHO細胞との結合を遮断する能力に関する、抗ヒトNKG2A抗体のHLA-E遮断曲線およびIC<sub>50</sub>値を示す。図20Bに示されるように、NKG2A.9、NKG2A.10、NKG2A.11、NKG2A.12、NKG2A.14、およびNKG2A.15抗体は、すべてが、比較的低いIC<sub>50</sub>値(それぞれ、0.1nM、0.05nM、0.1nM、0.1nM、0.2nM、および0.1nM)を示し、これにより、抗体が、NKG2A/HLA-E相互作用を遮断したことが示された。同様に、図20Cに示されるように、NKG2A.5、4G5.D1、および1G5.B2抗体は、それぞれ、0.3nM、0.9nM、および0.7nMの比較的低いIC<sub>50</sub>値を示した。したがって、これらの抗体を、さらなる開発に選択した。しかしながら、本明細書に記載されるように、NKG2A.5および4G5.D1抗体は、後に、カニクイザルNKG2Aタンパク質との結合が良好でないことに起因して、さらなる開発から除外した。

#### 【0419】

しかしながら、図20Cに示されるように、25E7.G8抗体(黒塗りの円形で示されている)は、約4nMという比較的高いIC<sub>50</sub>値によって示されるように、NKG2A/HLA-E相互作用を遮断しなかった。したがって、25E7.G8抗体は、さらなる開発には選択しなかった。

#### 【0420】

(4)ヒトNKG2A発現CHO細胞との望ましい特異的結合を示した抗NKG2A抗体。

図18Aに示されるように、 $1 \times 10^6$ 個のヒトNKG2A発現またはヒトNKG2C発現CHO細胞を、滴定量の抗NKG2A抗体とともに、4で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、蛍光標識したヤギ抗ヒトIgG-PE二次抗体で、4で30分間染色して、細胞表面上の結合した抗体を検出した。細胞は、BDLSRFortessaで新しく読み取った。図18B~Cは、抗NKG2A抗体のヒトNKG2A発現またはNKG2C発現CHO細胞との、結合曲線およびEC<sub>50</sub>(nM)を示す。13F3.A4、11H9.A1、および2EB.B1抗体は、それぞれ、0.7nM、0.7nM、および0.3nMのEC<sub>50</sub>値によって示されるように、ヒトNKG2A発現CHO細胞との特異的な結合を示した。

#### 【0421】

図21Aに示されるように、 $1 \times 10^6$ 個のヒトおよびカニクイザルNKG2A発現CHO細胞を、滴定量の抗体(10μg/ml)とともに、4で30分間インキュベートした。細胞を洗浄し、蛍光標識したヤギ抗ヒトIgG-PE二次抗体で、4で30分間染色して、細胞表面上の結合した抗体を検出した。細胞は、BDLSRFortessaで新しく読み取った。図21B~Cは、抗ヒトNKG2A抗体のヒトNKG2A発現CHO細胞との、結合曲線およびEC<sub>50</sub>値を示す。

#### 【0422】

図21Bに示されるように、NKG2A.9、NKG2A.10、NKG2A.11、NKG2A.12、NKG2A.14、およびNKG2A.15抗体は、すべてが、比較的低いEC<sub>50</sub>値(それぞれ、0.1nM、0.1nM、0.1nM、0.2nM、0.1nM、および0.1nM)を示し、これにより、抗NKG2A抗体が、望ましいことに、ヒトNKG2A発現CHO細胞において、NKG2A受容体と特異的に結合したことが示された。同様に、図21Cに示されるように、NKG2A.5、4G5.D1、および1G5.B2抗体は、比較的低いEC<sub>50</sub>値(それぞれ、0.3nM、0.6nM、および0.6nM)を示し、これにより、抗体がNKG2A受容体と結合したことが示された。したがって、NKG2A.9、NKG2A.10、NKG2A.11、NKG2A.12、NKG2A.14、NKG2A.15、NKG2A.5、4G5.D1、および1G5.B2は、この段階で、さらなる開発に選択した。

#### 【0423】

( 5 ) カニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞と結合した抗 N K G 2 A 抗体

カニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞と結合した抗 N K G 2 A 抗体の能力を評価した。図 2 2 A に示されるように、 $1 \times 10^6$  個のカニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞を、滴定量の抗 N K G 2 A 抗体 ( $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) とともに、4 で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、蛍光標識した H L A - E 五量体 ( P r o i m m u n e ) で染色して、細胞表面上の結合した H L A - E を検出した。細胞は、B D L S R F o r t e s s a で新しく読み取った。図 2 2 B ~ C は、抗ヒト N K G 2 A 抗体のカニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞との、結合曲線および  $E C_{50}$  値を示す。

【 0 4 2 4 】

図 2 2 B に示されるように、N K G 2 A . 9、N K G 2 A . 10、N K G 2 A . 11、N K G 2 A . 12、N K G 2 A . 14、および N K G 2 A . 15 抗体は、すべてが、比較的低い  $E C_{50}$  値 (それぞれ、 $1.2 \text{ nM}$ 、 $1.3 \text{ nM}$ 、 $1.4 \text{ nM}$ 、 $1.2 \text{ nM}$ 、 $1.2 \text{ nM}$ 、および  $1.5 \text{ nM}$ ) を示し、これにより、抗 N K G 2 A 抗体が、カニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞において、N K G 2 A 受容体と結合したことが示された。

【 0 4 2 5 】

図 2 2 C に示されるように、N K G 2 A . 5、4 G 5 . D 1、および 1 G 5 . B 2 抗体は、それぞれ、 $172 \text{ nM}$ 、約  $314 \text{ nM}$ 、および  $21 \text{ nM}$  の比較的高い  $E C_{50}$  値によって示されるように、カニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞との結合の不良を示した。したがって、これら 3 つの抗体は、さらなる開発に選択しなかった。2 G 6 . C 2 抗体は、 $0.6 \text{ nM}$  の  $E C_{50}$  値を有し、これは、望ましいことに、カニクイザル N K G 2 A 発現 C H O 細胞との特異的な結合を示し、したがって、2 G 6 . C 2 抗体を、さらなる開発に選択した。

【 0 4 2 6 】

N K G 2 A 受容体と特異的に結合し、N K G 2 A / H L A - E 相互作用を遮断する 2 G 6 . C 2 抗体の能力を、この実施例 3 ( 3 ) および 3 ( 4 ) において記載されるものと同じの方法を使用して、図 2 3 A および 2 3 C に示されるように、評価した。2 G 6 . C 2 抗体は、N K G 2 A / H L A - E 相互作用を遮断するその能力が、例えば、図 2 3 B に示されるように、N K G 2 A . 9 抗体については  $1.1 \text{ nM}$  および 2 G 6 . C 2 抗体については  $1.3 \text{ nM}$  という類似の  $I C_{50}$  値によって示されるように、N K G 2 A . 9 抗体に匹敵していた。同様に、2 G 6 . C 2 抗体は、ヒト N K G 2 A 発現 C H O 細胞における N K G 2 A 受容体と結合するその能力が、例えば、図 2 3 D に示されるように、N K G 2 A . 9 抗体については  $0.8 \text{ nM}$  および 2 G 6 . C 2 抗体については  $1 \text{ nM}$  という類似の  $E C_{50}$  値によって示されるように、N K G 2 A . 9 抗体に匹敵していた。

【 0 4 2 7 】

望ましいことに N K G 2 A / H L A - E 相互作用を遮断し、N K G 2 A 受容体と結合することができるにもかかわらず、2 G 6 . C 2 抗体は、N K G 2 A 陰性 ( - ) N K 細胞間で機能性を非特異的に増強したため、2 G 6 . C 2 はさらなる開発に選択しなかった。これは、癌を治療するのに所望される本明細書に記載される機能的特徴を有する抗 N K G 2 A 抗体を開発することの難しさを示す。

【 0 4 2 8 】

( 6 ) ヒト N K G 2 A + ナチュラルキラー細胞株 ( N K L ) と結合した抗 N K G 2 A 抗体

図 1 9 A に示されるように、 $1 \times 10^6$  個の N K G 2 A を内因的に発現するヒト N K L 細胞を、滴定量の抗 N K G 2 A 抗体とともに、4 で 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、蛍光標識したヤギ抗ヒト I g G - P E 二次抗体で、4 で 30 分間染色して、細胞表面上の結合した抗体を検出した。細胞は、B D L S R F o r t e s s a で新しく読み取った。図 1 9 B は、抗 N K G 2 A 抗体のヒト N K G 2 A 発現 N K L 細胞との、結合曲線および  $E C_{50}$  値 (  $\text{nM}$  ) を示す。1 3 F 3 . A 4、1 1 H 9 . A 1、4 G 5 . D 1、および I G 5 . B 2 抗体の  $E C_{50}$  値は、それぞれ、 $0.2 \text{ nM}$ 、 $0.1 \text{ nM}$ 、 $0.2 \text{ nM}$ 、および  $0.3 \text{ nM}$  であり、これらの値は、これらの抗 N K G 2 A 抗体が、望ましいことに、N K G 2 A + ナチュラルキラー細胞と特異的に結合したことを示した。

## 【 0 4 2 9 】

## ( 7 ) カニクイザル N K G 2 A + N K L と結合した抗 N K G 2 A 抗体

図 2 4 A に示されるように、カニクイザルから単離した  $1 \times 10^6$  個の末梢血単核細胞 ( P B M C ) を、滴定量の抗 N K G 2 A 抗体とともに、4 で 3 0 分間インキュベートした。細胞を洗浄し、蛍光標識したヤギ抗ヒト I g G - P E 二次抗体で、4 で 3 0 分間染色して、細胞表面上の結合した抗体を検出した。細胞は、B D L S R F o r t e s s a で新しく読み取った。図 2 4 B は、抗 N K G 2 A 抗体のカニクイザル N K G 2 A 発現 N K 細胞との、結合曲線および E C <sub>50</sub> 値 ( n M ) を示す。図 2 4 B に示されるように、1 1 H 9 . A 1 および 4 G 5 . D 1 抗体は、それぞれ、2 8 n M および 3 8 n M の E C <sub>50</sub> 値によって示されるように、カニクイザル N K G 2 A + N K 細胞と結合しなかった。したがって、カニクイザル N K G 2 A + N K 細胞との結合の欠如に起因して、1 1 H 9 . A 1 および 4 G 5 . D 1 抗体は、例えば、癌を治療するためのさらなる開発から除外した。1 3 F 3 . A 4 抗体は、望ましいことに、0 . 2 n M の E C <sub>50</sub> 値によって示されるように、カニクイザル N K G 2 A + N K 細胞と結合した。したがって、1 3 F 3 . A 4 抗体は、望ましい結合機能性を示し、さらなる修飾および開発に選択した。

10

## 【 0 4 3 0 】

## ( 8 ) ナチュラルキラー ( N K ) 細胞の脱顆粒化応答を増強した抗 N K G 2 A 抗体

健康ヒトドナーに由来する末梢血単核細胞 ( P B M C ) を使用したインビトロ実験において、活性化 N K 細胞における抗 N K G 2 A 抗体による N K G 2 A / H L A - E 相互作用の遮断は、N K 細胞脱顆粒化を増大させた。N K 細胞がそれらの標的、例えば腫瘍細胞を排除する機序の 1 つは、溶解酵素パーフォリンおよびグランザイムを含む顆粒の指向的分泌をもたらす複雑な多段階プロセスを通じたものである。この顆粒からの分子の指向的分泌の細胞プロセスは、脱顆粒化として知られている。N K 細胞が、例えば、標的腫瘍細胞に、分泌性溶解顆粒を放出した後、パーフォリンは、標的腫瘍細胞膜に細孔を生成し、グランザイムは、次いで、標的腫瘍細胞の細胞質にアクセスし、腫瘍細胞死 ( アポトーシスとしても知られる ) を誘導する。このプロセス中に、リソソーム膜タンパク質 - 1 ( L A M P - 1 、 C D 1 0 7 A としても知られる ) は、N K 細胞の表面へと輸送され、それによって、抗体結合にアクセス可能となり、したがって、脱顆粒化において活性となっている N K 細胞を特定することが可能となる。本発明者らは、次いで、腫瘍細胞死の増大をもたらす脱顆粒化プロセスにおける N K 細胞活性化および N K 細胞機能性の増強に対する本明細書において開示される抗 N K G 2 A 抗体の作用を測定した。このプロセスは、図 2 5 A に部分的に図示されている。N K 細胞内の X は、N K G 2 A が H L A - E と相互作用する際の阻害性シグナルを示す。N K 細胞内の濃い円は、顆粒を表す。

20

30

## 【 0 4 3 1 】

正常な P B M C ドナーから単離された N K 細胞を、組換えヒト ( r h ) インターロイキン - 2 ( I L - 2 ) で一晩活性化した。具体的には、N K 細胞を、F i c o l l 勾配およびヒト N K 細胞単離キット ( M i l t e n y i B i o t e c h ) を使用してヒト全血から単離した。N K 細胞を、r h I L - 2 ( 4 0 0 I U / m l ) とともに一晩培養した。活性化の後に、細胞生存率は、細胞カウンターによって判定すると、9 0 % を上回っていた。N K 細胞、次いで、H L A - E を発現する  $5 \times 10^4$  個のヒト B - リンパ芽球様標的細胞株 7 2 1 . 2 2 1 とともに、抗ヒト N K G 2 A 抗体 ( N K G 2 A . 9 、 N K G 2 A . 1 0 、 N K G 2 A . 1 1 、 N K G 2 A . 1 4 、 N K G 2 A . 1 5 、 N K G 2 A . 5 、 2 G 6 . C 2 、 4 G 5 . D 1 、 2 5 E 7 . G 8 ) およびアイソタイプ抗体 ( ヒト I g G 1 . 3 ) の存在下で 4 時間共培養した。次いで、細胞を回収し、以下のマーカーで染色した：抗ヒト C D 3 、抗ヒト C D 5 6 、生 / 死、および抗ヒト C D 1 0 7 a 、ならびに非競合抗ヒト N K G 2 A 抗体 ( 2 7 H 4 . D 4 クローン ) 。細胞は、B D L S R F o r t e s s a ( 商標 ) で新しく取得した。続いて、N K G 2 A + または N K G 2 A - N K 細胞間の脱顆粒化パーセント ( C D 1 0 7 % ) を、F l o w J o V e r s i o n 1 0 ( フローサイトメトリーソフトウェア ) で分析した。倍率増大を、アイソタイプ対照に対する C D 1 0 7 a % の増大によって計算した。

40

50

## 【 0 4 3 2 】

抗ヒトNK G 2 Aモノクローナル抗体の存在下において、フローサイトメトリーによるCD 1 0 7 a発現によって測定すると、NK細胞脱顆粒化の増大があった。NK細胞応答の増大は、NK G 2 A陰性( - )NK細胞では観察されなかったため、これにより、抗体の作用が、NK G 2 A発現NK細胞に特異的であったことが示された。

## 【 0 4 3 3 】

図2 5 B ~ Cは、フローサイトメトリー分析の図による表示であり、陰性対照として含まれた2 5 E 7 . G 8クローン(非遮断抗体)を除き、すべての試験した抗NK G 2 A抗体(NK G 2 A . 9、NK G 2 A . 1 0、NK G 2 A . 1 1、NK G 2 A . 1 2、NK G 2 A . 1 4、NK G 2 A . 1 5、NK G 2 A . 5、2 G 6 . C 2、および4 G 5 . D 1抗体)が、NK G 2 A + NK細胞において、NK細胞脱顆粒化(アイソタイプ対照と比較したCD 1 0 7 a %の倍率変化によって測定される)を増強させたことを示す(図2 5 Bに示される)。(換言すると、2 5 E 7 . G 8抗体は、NK G 2 A / H L A - E経路を遮断しないため、NK細胞脱顆粒化を増大させないであろうことが予測されていた)。

## 【 0 4 3 4 】

具体的には、1 0 μ g / m lの固定濃度のNK G 2 A . 9抗体を用いて複数のドナーに由来するNK細胞を評価したときに、NK G 2 A +発現NK細胞には、ヒトI g G 1 . 3アイソタイプ対照と比較して、脱顆粒化パーセントにおよそ2倍の増大があった。図2 5 Cに示されるように、NK G 2 A . 9、NK G 2 A . 1 0、NK G 2 A . 1 1、NK G 2 A . 1 2、NK G 2 A . 1 4、NK G 2 A . 1 5、NK G 2 A . 5、および4 G 5 . D 1抗体については、NK細胞応答の増大は、NK G 2 A陰性( - )(本明細書においてNK G 2 A - と称される)NK細胞では観察されなかったため、これにより、CD 1 0 7 %の増大は、NK G 2 A発現NK細胞に特異的であったことが示された。換言すると、抗NK G 2 A抗体のうちのいくつか(NK G 2 A . 9、NK G 2 A . 1 0、NK G 2 A . 1 1、NK G 2 A . 1 2、NK G 2 A . 1 4、NK G 2 A . 1 5、NK G 2 A . 5、4 G 5 . D 1抗体)について、NK G 2 A陽性( + )(本明細書においてNK G 2 A + と称される)NK細胞における脱顆粒化の増強、およびNK G 2 A陰性( - )NK細胞における脱顆粒化増強の欠如により、NK G 2 A受容体発現が機能性の増強に必要であったことが示された。この結果の1つの例外は、図2 5 Cに示されるように、2 G 6 . C 2抗体であり、これは、NK G 2 A陰性( - )NK細胞においてさえも、NK細胞脱顆粒化の増強を示した。換言すると、2 G 6 . C 2抗体による脱顆粒化の増強は、NK G 2 A / H L A - E相互作用に特異的ではなかった。したがって、2 G 6 . C 2抗体は、さらなる調査には選択しなかった。

## 【 0 4 3 5 】

まとめると、NK G 2 A . 9、NK G 2 A . 1 0、NK G 2 A . 1 1、NK G 2 A . 1 2、NK G 2 A . 1 4、NK G 2 A . 1 5、NK G 2 A . 5、および4 G 5 . D 1抗体は、驚くべきことに、また望ましいことに、NK G 2 A発現NK細胞において、アイソタイプ対照と比較して、脱顆粒化を特異的に増強させた。図2 5 Bに示されるように、NK G 2 A . 9抗体に関して、この増強された脱顆粒化は、アイソタイプ対照と比較して、およそ2倍であった。しかしながら、その他の抗NK G 2 A抗体は、所望される機能的特徴を示さなかったため、さらなる開発には選択しなかった。例えば、2 G 6 . C 2抗体は、NK G 2 A陰性( - )発現細胞の機能性の増強をもたらし、これにより、2 G 6 . C 2抗体が、NK G 2 A / H L A - E相互作用に直接的に影響を及ぼさなかったことが示唆された。P 1 - 0 6 9 3 6 6抗体もまた、NK脱顆粒化アッセイにおいて機能性を示さなかった。図5 3に示されるように、P 1 0 0 6 9 3 6 6抗体は、NK G 2 A + NK細胞内で類似のCD 1 0 7 + %を有し、アイソタイプであった。したがって、2 G 6 . C 2およびP 1 - 0 6 9 3 6 6抗体は、NK細胞において脱顆粒化を増強させなかったため、さらなる開発には選択しなかった。

## 【 0 4 3 6 】

( 9 )インターフェロン - ガンマ( I F N )産生の増大であるNK細胞応答を増強させ

10

20

30

40

50

た抗NKG2A抗体

抗ヒトNKG2A抗体は、CHO/MICA/HLA-E (HLA-E、およびNK細胞活性化受容体NKG2DのリガンドであるMICAを発現するように遺伝子操作されたCHO細胞)と共培養したNKL細胞においてIFN- $\gamma$ 産生を増大させた。図26Aに示されるように、NKL細胞およびCHO/MICA/HLA-Eを使用したインビトロ実験において、活性化NK細胞(MICA-NKG2D経路による)における抗NKG2A抗体によるNKG2A/HLA-E相互作用の遮断は、望ましいことに、IFN- $\gamma$ 産生を増大させた。本発明者らは、まず、活性化されたNKL細胞が、標的細胞、CHO/MICA/HLA-E細胞を殺滅することができるように、CHO細胞にトランスフェクトしたMICAを使用してNKL細胞を活性化した。MICAは、NK細胞の表面上に発現される活性化受容体NKG2Dによって認識されるリガンドとして機能する。抗体は、NKLおよびCHO/MICA/HLA-E細胞の共培養物を使用して、アッセイにおいて評価した。このアッセイにおいて、CHO細胞上のMICAは、NKG2AによってNKL細胞を活性化するように機能し(正のシグナル)、CHO細胞上のHLA-Eの発現は、NKG2A発現NKL細胞を阻害する(負のシグナル)。アッセイでは、抗NKG2A抗体が、NKG2A/HLA-E相互作用を遮断し、望ましいことに、IFN- $\gamma$ 産生を増大させるかどうかを試験した。

【0437】

具体的には、NKL細胞を、10  $\mu$ g/mLの抗ヒトNKG2A抗体またはアイソタイプ対照抗体の存在下において、4:1のエフェクター細胞対標的細胞の比(E:T)で、CHO/MICA/HLA-Eと共培養した。37°Cのインキュベーターで一晩刺激した後に、IFN- $\gamma$ 産生を、ELISAによって上清において測定した。図26Bに示されるように、13F3.A4、11H9.A1、および4G5.D1抗体が、望ましいことに、アイソタイプ対照(ヒトIgG1.3)と比較して、IFN- $\gamma$ 産生を増大させたことを示す。NKG2A/HLA-E相互作用を遮断しない抗ヒトNKG2A抗体である25E7.G8抗体は、陰性対照として使用し、予想した通り、アイソタイプ対照と比較して、IFN- $\gamma$ 産生を増大させなかった。

【0438】

(10) IFN- $\gamma$ 産生の増大であるCD8<sup>+</sup> T細胞応答を増強させた抗NKG2A抗体

抗ヒトNKG2A抗体は、膵臓癌細胞株Hs766Tと共培養したCD8<sup>+</sup> T細胞においてIFN- $\gamma$ 産生を増大させた。

【0439】

正常ドナーに由来する末梢血単核細胞(PBMC)を、プレート結合CD3(OKT3)およびrIL-15とともに3日間活性化して、CD8<sup>+</sup> T細胞においてNKG2Aの発現を増大させた。図27Aに示されるように、CD8<sup>+</sup> T細胞を、10  $\mu$ g/mLの抗ヒトNKG2A抗体またはアイソタイプ対照抗体(ヒトIgG1.3)の存在下において、1:1のエフェクター細胞対標的細胞の比(E:T)で、Hs766T標的細胞(マイトマイシンCで処置)と共培養した。37°Cで5日間刺激した後、IFN- $\gamma$ 産生を、ELISAによって上清において測定した。

【0440】

図27Bに示されるように、13F3.A4および11H9.A1抗体は、アイソタイプ対照と比較して、IFN- $\gamma$ 産生を増大させた。NKG2A/HLA-E相互作用を遮断しない抗ヒトNKG2A抗体である25E7.G8抗体は、陰性対照として使用し、予想した通り、アイソタイプ対照と比較して、IFN- $\gamma$ 産生を増大させなかった。具体的には、Hs766Tは、HLA-Eを内因的に発現する膵臓癌細胞株である。健常ドナーPBMCに由来するCD8<sup>+</sup> T細胞は、一般に、低いレベルのNKG2Aを発現する。しかしながら、抗CD3およびIL-15刺激により、本発明者らは、これらの細胞におけるNKG2A発現を増大させることができた。この系において、CD8<sup>+</sup> T細胞は、NKG2Aを発現し、標的Hs766T細胞は、HLA-Eを発現する。13F3.A4および11H9.A1抗体は、NKG2A/HLA-E相互作用を遮断し、CD8<sup>+</sup> T

10

20

30

40

50

細胞の細胞傷害機能性を増大させ、これは、I F N - 産生の増大によって示された。

【 0 4 4 1 】

( 1 1 ) N K G 2 A . 9 抗体を含め、1 3 F 3 . A 4 抗体および変異体は、安全なレベルの望ましくない抗体凝集を示した

抗体凝集体は、細胞培養物における抗体発現、産物精製、または抗体薬製品としての保管中に不可逆的に形成される変性した抗体分子のクラスターである。凝集のプロセスは、複雑であり、抗体の生化学的および生物物理学的特性、ならびに抗体が処理および保管中に曝露される物理化学的環境によって影響を受ける。抗体凝集は、通常は露出されていないエピトープを露出させ、免疫原性の増大につながり得る。抗体産物の精製プロセスは、低い凝集レベル、例えば、2 %未満の可溶性凝集体を達成することを目指している。加速安定性研究（強制分解研究としても知られる）を、1 3 F 3 . A 4 抗体の8つの変異体（N K G 2 A . 9、N K G 2 A . 1 3、N K G 2 A . 1 8、N K G 2 A . 1 9、N K G 2 A . 2 1、N K G 2 A . 2 2、N K G 2 A . 2 3、およびN K G 2 A . 2 4）に行って、1 ヶ月間、4 および2 5 におけるこれらの抗体の凝集傾向を確認した。N K G 2 A . 2 0 の安定性は、材料の入手可能性の制限に起因して、4 でのみ試験した。2 0 m M ヒスチジン（p H 6 . 0）、2 6 0 m M スクロース、5 0 μ M D T P A、および0 . 0 5 % ポリソルベート8 0 を含む製剤を、すべての抗体の試験製剤として使用した。可溶性凝集体を、サイズ排除クロマトグラフィー（S E C）分析によってモニタリングした。試験した濃度は、材料の入手可能性に基づいた。S E Cにより、複数のピークが観察されたN K G 2 A . 1 9を除き、すべての抗体で同様の凝集傾向が明らかとなった。任意の他の機序に束縛されるものではないが、N K G 2 A . 1 9は、試験した材料のバッチにおける相当レベルのプロテアーゼの存在に起因して、分解を受けた可能性がある。

【 0 4 4 2 】

全体として、凝集レベル（2 5 での1 ヶ月保管後に2 %未満の可溶性凝集体）は、試験したその他の抗体について、p H 6 . 0 で製剤化することに対する好適性を示した。物理的安定性データは、2 5 での1 ヶ月間の保管後に2 %未満の可溶性凝集体を示し、これにより、抗N K G 2 A 抗体を有する試験した製剤が、試験した濃度において、薬物物質に許容可能な保管安定性を付与する予備的な製剤として好適だったことが示された。

【 0 4 4 3 】

【表 E】

NKG2A配列	試験した濃度(mg/mL)	可溶性凝集体(%)	
		4℃で1ヶ月間	25℃で1ヶ月間
NKG2A.9	150	0.7	0.8
NKG2A.18	90	未検出	1.2
NKG2A.19	54	分解されたサンプル	
NKG2A.20	6	1.2	未試験
NKG2A.21	43	1.3	1.9
NKG2A.22	120	0.8	1.2
NKG2A.23	130	0.8	1.1
NKG2A.24	120	0.8	1.1

【 0 4 4 4 】

( 1 2 ) N K G 2 A . 9 抗体は、N K G 2 C タンパク質と比べてN K G 2 A に対して高い親和性で結合した

N K G 2 A . 9 抗体の、N K G 2 C タンパク質を上回る、N K G 2 A タンパク質に対する特異性を、B i a c o r e T 2 0 0 S P R 機器を使用して、動態および親和性を判定することによって評価した。N K G 2 A タンパク質およびN K G 2 C タンパク質の細胞外

ドメインを、それぞれ、CD94の細胞外ドメインとのヘテロ二量体として調製した。アッセイ温度は37℃であり、泳動緩衝液は、0.05% Tween-20および1g/L牛血清アルブミン(BSA)を補充したHEPES緩衝食塩水(10mM HEPES、150mM NaCl)、pH7.4であった。NKGA.9抗体を、抗ヒトFc捕捉試薬(Southern Biotechカタログ番号2081-01)を事前に固定化したCM4センサーチップに捕捉した。NKGA-CD94およびNKGC-CD94ヘテロ二量体を、検体として、それぞれ、2つの5連続3倍希釈系列において、捕捉された抗体上に流した。一方の濃度系列を、単一サイクル動態に使用し、もう一方は、多重サイクル動態に使用した。多重サイクル動態分析については、2番目に高い濃度を、二連に注入した。NKGA-CD94の最高濃度は、250nMであり、NKGC-CD94の最高濃度は、1.5μMであった。すべてのデータは、二重参照し、Biacore T200 Evaluationソフトウェアバージョン3.1を使用して、質量移行を用いて1:1結合モデルに適合させた。

#### 【0445】

一般に、本明細書において論じられるように、2つの動態パラメーターにより、結合親和性が決定する。第1のパラメーターは、複合体がどれほど速く形成されるか(結合速度、 $k_a$ )であり、第2のパラメーターは、複合体がどれほど速く解離または崩壊するか(解離速度、 $k_d$ )である。いずれの動態パラメーターも、平衡解離定数( $K_D$ )に集約することができ、これは、 $k_d/k_a$ として定義される。この比較Biacore実験により、両方の相互作用パラメーター：NKGA.9抗体/NKGTタンパク質複合体がどれほど速く形成されたか( $k_a$ )およびそれがどれほど速く崩壊したか( $k_d$ )に対処した。

#### 【0446】

この比較Biacore実験において、NKGA.9抗体は、NKGAタンパク質に対して、NKGCタンパク質よりも15倍強力な結合を示した(NKGAとの結合に関して $3.9 \times 10^{-8}$  Mの $K_D$ 、これに対してNKGCとの結合に関して $5.7 \times 10^{-7}$  Mの $K_D$ )。換言すると、NKGA.9抗体は、NKGAタンパク質とよりも15倍弱いNKGCタンパク質との結合を示した。これらの結果により、NKGA.9抗体は、以下の表に要約されるように、NKGCタンパク質と比較して、NKGAタンパク質に対して高い選択性を有したことが示された。NKGA.9抗体のNKGAタンパク質との強力な結合は、より高速な結合速度( $k_a$ )、すなわち、NKGA.9抗体/NKGAタンパク質複合体が、NKGA.9抗体/NKGCタンパク質複合体と比較して、どれほど高速に形成されるか、によって作動されていた。換言すると、NKGA.9抗体は、NKGCタンパク質とよりも15倍迅速に、NKGAタンパク質と複合体を形成した。

#### 【0447】

表:NKGA.9抗体の、NKGAおよびNKGCタンパク質に対する親和性の比較

【表F】

リガンド	サンプル	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	$K_D$ 比(NKGC/NKGA)
NKGA.9	hNKGAヘテロ二量体	$3.9 \times 10^5$	$1.5 \times 10^{-2}$	$3.9 \times 10^{-8}$	
NKGA.9	hNKGCヘテロ二量体	$2.4 \times 10^4$	$1.4 \times 10^{-2}$	$5.7 \times 10^{-7}$	15

#### 【0448】

図56A~Dは、単一サイクル動態(図56Aおよび56C)ならびに多重サイクル動態(図56Bおよび56D)の両方を使用してBiacoreによって判定される、37℃におけるNKGA.9抗体のヒトNKGA-CD94ヘテロ二量体(図56A~B



）およびNK G 2 C - C D 9 4ヘテロ二量体（図5 6 C ~ D）との結合親和性を示す。S P R 応答は、検体の結合および解離に関して示されている。

【0 4 4 9】

他の実施形態では、NK G 2 A . 9 抗体は、NK G 2 C タンパク質とよりも1 4 倍迅速に、1 3 倍迅速に、1 2 倍迅速に、1 1 倍迅速に、1 0 倍迅速に、9 倍迅速に、8 倍迅速に、7 倍迅速に、6 倍迅速に、5 倍迅速に、4 倍迅速に、3 倍迅速に、または2 倍迅速に、NK G 2 A タンパク質と複合体を形成する。

【0 4 5 0】

（1 3）抗NK G 2 A 抗体の驚くべきかつ望ましい機能的特性の概要

まとめると、本発明者らは、予想外なことに、例えば、癌の治療のための種々の所望される機能的特性を示した特定の抗NK G 2 A 抗体を発見した。特定の実施形態では、これらの抗NK G 2 A 抗体には、所望される機能的特性を示さなかった数百個の抗体から特定および選択された、1 3 F 3 . A 4 抗体クローンならびにNK G 2 A . 9 およびNK G 2 A . 1 1 抗体を含む変異体が含まれる。具体的には、NK G 2 A . 9 抗体は、1 3 F 3 . A 4 - V H - I 1 0 7 T - N 3 0 S I g G 1 . 3 としても知られる抗hNK G 2 A 抗体であり、本明細書において、「NK G 2 A . 9」抗体と称される。残基V H - 1 0 7 T における突然変異（生殖系列に逆転したフレームワーク突然変異）および脱アミド化能を低くし免疫原性リスクを低減させるための残基V K - N 3 0 S における突然変異により、NK G 2 A . 9 抗体の発見がもたらされた。本明細書に記載され、図1 3 に示されるように、種々の配列傾向を、1 3 F 3 . A 4 抗体において評価し、これが、例えば、NK G 2 A . 9 抗体の最適化および開発につながった。

【0 4 5 1】

本明細書の実施例においてさらに詳細に記載されるように、NK G 2 A . 9 抗体を含め、抗NK G 2 A 抗体は、例えば、以下の驚くべきかつ望ましい機能的特徴を示した：

- a ) NK G 2 A / H L A - E 相互作用を遮断したこと、
- b ) NK G 2 A に媒介される阻害性シグナル伝達を逆転させたこと、
- c ) ヒトNK G 2 C タンパク質を発現する細胞と結合しなかったか、もしくは低い親和性で結合したこと、
- d ) 高い親和性で、ヒトおよびカニクイザルNK G 2 A を発現する細胞と結合したこと、ならびに / または
- e ) ヒトおよびカニクイザルNK G 2 A + ナチュラルキラー細胞と結合したこと、
- f ) 例えば、インターフェロン - ガンマ ( I F N ) の増大であるナチュラルキラー細胞応答を増強したこと、ならびに / または
- g ) 例えば、I F N 産生の増大であるC D 8 + T 細胞応答を増強したこと、ならびに / または
- h ) NK G 2 C タンパク質とよりも迅速にNK G 2 A タンパク質と複合体を形成したこと、いくつかの実施形態では、NK G 2 C タンパク質とよりも1 5 倍迅速にNK G 2 A タンパク質と複合体を形成したこと。

【0 4 5 2】

NK G 2 A . 9 抗体を、単独および本明細書の実施例に記載されるようにさらなる抗体と組み合わせて、特徴付けし、試験した。NK G 2 A . 9 抗体は、高い親和性および特異性で、ヒトNK G 2 A タンパク質と結合した。NK G 2 A . 9 のNK G 2 A タンパク質との結合のE C 5 0 値は、以下の通りであり、NK G 2 A . 9 のNK G 2 A タンパク質との結合を示した。

【0 4 5 3】

10

20

30

40

50

【表 G】

細胞株	EC <sub>50</sub>
NKL(ヒトNKG2AがNK細胞株において内因的に発現される)	0.4 nM
CHO-ヒトNKG2A(ヒトNKG2AがCHO細胞に異所的に発現される)	0.6 nM
CHO-カニクイザルNKG2A(カニクイザルNKG2AがCHO細胞に異所的に発現される)	1.2 nM

10

## 【0454】

NKG2A . 9 の NKG2C タンパク質との結合の EC<sub>50</sub> 値は、以下の通りであり、望ましいことに、NKG2A . 9 のヒトNKG2Cタンパク質との結合の欠如が示された。

## 【0455】

【表 H】

細胞株	EC <sub>50</sub>
CHO-ヒトNKG2C(ヒトNKG2CがCHO細胞に異所的に発現される)	9.0 nM
CHO-カニクイザルNKG2C(カニクイザルNKG2CがCHO細胞に異所的に発現される)	0.8 nM

20

## 【0456】

細胞遮断アッセイにおいてNKG2A / HLA - E 相互作用の遮断を示したNKG2A . 9 の IC<sub>50</sub> 値は、以下の通りであった：

## 【0457】

【表 I】

細胞株	IC <sub>50</sub>
NKL	0.3 nM
CHO-ヒトNKG2A	1.0 nM

30

## 【0458】

EC<sub>50</sub> 値は、NKG2A . 9 抗体が、NKG2A / HLA - E 相互作用を遮断したことを示した。NKG2A . 9 抗体の EC<sub>50</sub> 値は、ヒトNKG2Aタンパク質との結合が、ヒトNKG2Cタンパク質とよりも約15倍低かったことを示した(NKG2Aについては0.6 nM、対してNKG2Cについては9.0 nM)。さらに、NKG2A . 9 抗体のヒトNKG2Cとの特異的結合は、SPR実験において観察されなかった。対照的に、NKG2A . 9 抗体がカニクイザルNKG2AおよびカニクイザルNKG2Cタンパク質と結合する EC<sub>50</sub> 値は、類似であった(NKG2Aについては1.2 nM、対してNKG2Cについては0.8 nM)。NKG2A . 9 抗体は、本明細書において論じられる条件下においてフローサイトメトリーによって評価される場合、ヒトNKG2C / HLA - E 相互作用を遮断しなかった。マウスまたはラットNKG2Aとの結合は、初代NK細胞でのフローサイトメトリーによって観察されなかった。

40

## 【0459】

50

本発明者らは、スキャッチャード解析を使用して、NK G 2 A . 9 の結合親和性を測定した。NK G 2 A . 9 については、図 5 2 A ~ B に示されるように、CHO - hNK G 2 A および CHO - カニクイザルNK G 2 A の飽和細胞結合およびスキャッチャード解析により、それぞれ、約 0 . 4 nM および 1 . 0 nM の特異的結合親和性 (  $K_D$  値 ) が確立された。具体的には、IODO - GEN (登録商標) 固相ヨウ素化試薬 ( 1 , 3 , 4 , 6 - テトラクロロ - 3 a - 6 a - ジフェニルグリコウリル、Pierce、カタログ 2 8 6 0 1 ) を使用して、NK G 2 A . 9 を  $^{125}I$  - Na ( 1 mCi、PerkinElmer カタログ NEZ 0 3 3 H 0 0 1 MC ) で放射ヨウ素標識した。過剰なヨウ素を、脱塩カラム ( Pierce、カタログ 4 3 2 4 3 ) を使用して除去した。標識した抗体の画分を採取し、Wizard 1 4 7 0 ガンマカウンターで放射活性について分析した。それぞれの画分における  $^{125}I$  - NK G 2 A . 9 濃度を、Invitrogen の Qubit フルオロメーターを用いて計算した。放射性純度を、ピークタンパク質および放射活性画分の薄層クロマトグラフィーによって確立した。放射ヨウ素標識した NK G 2 A . 9 のヒトまたはカニクイザルNK G 2 A 過剰発現 CHO 細胞との結合を、CHO ヒトまたはカニクイザルNK G 2 A 細胞を  $^{125}I$  - NK G 2 A . 9 の滴定物とともにインキュベートすることによって示した。100 倍モル過剰の非標識抗体の滴定物の存在下における結合によって非特異的結合を決定し、これを総 CPM から差し引いて特異的結合を計算した。CPM に対する  $^{125}I$  - NK G 2 A . 9 の濃度の線形標準曲線を使用して、特異的活性、最大の nM での  $^{125}I$  - NK G 2 A . 9 の結合を外挿し、それによって細胞 1 個当たりの受容体数を計算した。スキャッチャード解析の結果は、NK G 2 A . 9 が、0 . 4 nM の平衡解離定数 (  $K_D$  ) で CHO - hNK G 2 A と、および 0 . 1 nM の  $K_D$  で CHO - cynoNK G 2 A トランスフェクタントと、特異的に結合したことを示した。NK G 2 A . 9 Fab を、サルNK G 2 A - CD 9 4 - mFc (発現を達成する短縮型コンストラクト) を固定化した CM 4 チップに流すことによって、SPR により、カニクイザルNK G 2 A に対する NK G 2 A . 9 の相対結合親和性を判定した。第 2 のフローセルに連結したヒト NK G 2 A - CD 9 4 - mFc は、対照としての機能を果たした。別のフローセルは、参照減算のためにブランクのままにした。測定は、Biacore T 2 0 0 機器において、37 で、0 . 0 5 % Tween - 2 0 および 1 g / L BSA を補充した Hepes 緩衝食塩水 ( 1 0 mM HEPES、1 5 0 mM NaCl )、pH 7 . 4 を泳動緩衝液として使用して、行った。NK G 2 A . 9 Fab の濃度系列を、異なるフローセルに注入した。すべてのデータは、二重参照し、Biacore T 2 0 0 Evaluation ソフトウェアバージョン 3 . 1 を使用して、1 : 1 ラングミュアモデルに適合させた。このアッセイにおいて、NK G 2 A . 9 Fab のヒトNK G 2 A との一価結合は、カニクイザルNK G 2 A との結合よりもおよそ 26 倍強力であった。以下の表に示されるように、SPR によって測定されるヒトNK G 2 A についての  $K_D$  値は、61 nM であり、SPR によって測定されるカニクイザルNK G 2 A についての  $K_D$  値は、1 6 0 0 nM であった。これらの  $K_D$  値は、NK G 2 A . 9 Fab が、組換えカニクイザルNK G 2 A と結合するが、ヒトNK G 2 A のものと類似の結合レベル ( 飽和レベル ) を達成するにはより高い Fab 濃度を使用しなければならないことを示した。

【 0 4 6 0 】

【表 J】

	hNKG2A-CD94			cyNKG2A-CD94	$K_D$ 比(カニクイザル/ヒト)
検体	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)	$K_D$ (nM)	
NKG2A.9 Fab	$3.4 \times 10^5$	$2.0 \times 10^{-2}$	61 nM	1600 nM	約26

【実施例 4】

【 0 4 6 1 】

抗 NK G 2 A 抗体のエピトープマッピング

当技術分野において公知の方法を使用して、抗NKG2A抗体、具体的には、13F3・A4およびNKG2A・9抗体が結合するNKG2Aの領域を探索した。水素/重水素交換質量分析(HDX-MS)およびタンパク質の迅速光化学酸化(FPOP)を使用して、13F3・A4およびNKG2A・9抗体とのhNKG2Aの結合エピトープを探索した。

#### 【0462】

mFc-hNKG2A-hCD94/NKG2A・9に対するHDX-MS実験により、mFc-NKG2A-CD94に関して95%の配列カバレッジを得た。FPOP測定により、NKG2Aに対して99%の配列カバレッジを得た。NKG2Aの総配列カバレッジは、HDX-MSおよびFPOPのデータセットを組み合わせると100%であった。同様に、mFc-hNKG2A-hCD94/13F3に対するHDX-MS実験により、mFc-NKG2A-CD94に関して95%の配列カバレッジを得た。FPOP測定により、NKG2Aに対して99%の配列カバレッジを得た。NKG2Aの総配列カバレッジは、HDX-MSおよびFPOPのデータセットを組み合わせると100%であった。

10

#### 【0463】

この実施例においてより詳細に論じられるように、本発明の特定の実施形態は、HDX-MSおよび/またはFPOPエピトープマッピングによって判定される場合、およそ以下のアミノ酸残基：

領域1：<sup>155</sup>LSIDNEEEMKF<sup>165</sup>（配列番号2（天然のhNKG2Aアミノ酸配列）のアミノ酸残基155～165、

20

領域2：<sup>171</sup>PSSWIGVFRNSSSHHPW<sup>186</sup>（配列番号2のアミノ酸残基171～186）、

領域3：<sup>192</sup>LAFKHEIKDSDN<sup>203</sup>（配列番号2のアミノ酸残基192～203）、

領域4：L（配列番号2のアミノ酸残基206）、および

領域5：<sup>212</sup>QVNRLKSAQCGSSIIYHC<sup>229</sup>（配列番号2のアミノ酸残基212～229）

に及ぶ不連続な領域内に位置するエピトープと特異的に結合する、抗NKG2Aモノクローナル抗体またはその抗原結合部分に関する。

30

#### 【0464】

いくつかの実施形態では、本発明は、HDX-MSによって判定される場合、以下のアミノ酸残基：

領域1：<sup>155</sup>LSIDNEEEMKF<sup>165</sup>（配列番号2のアミノ酸残基155～165）、

領域2：<sup>171</sup>PSSWIGVFRNSSSHHPW<sup>186</sup>（配列番号2のアミノ酸残基171～186）、

領域3：<sup>192</sup>LAFKHEIKDSDN<sup>203</sup>（配列番号2のアミノ酸残基192～203）、および

領域5：<sup>212</sup>QVNRLKSAQCGSSIIYHC<sup>229</sup>（配列番号2のアミノ酸残基212～229）

40

からなる不連続な領域内に位置するエピトープと特異的に結合する、抗NKG2Aモノクローナル抗体またはその抗原結合部分を対象とする。

#### 【0465】

エピトープマッピング実験の準備。

エピトープマッピング実験の前に、非変性実験を行って、組換えmFc-hNKG2A-hCD94ならびにmFc-NKG2A-CD94および親13F3 FabまたはNKG2A・9 Fabのタンパク質複合体（15 μM、1：1のモル比）について、共通のペプチドの一覧を得た。HDX-MS実験では、5 μLのそれぞれのサンプル（mFc-hNKG2A-hCD94またはFabを有するmFc-hNKG2A-hCD94）

50

を、55  $\mu\text{L}$  の酸化重水素 ( $\text{D}_2\text{O}$ ) 緩衝液 (10 mM リン酸緩衝液、 $\text{D}_2\text{O}$ 、 $\text{pD}$  7.0) 中に希釈して、標識反応を開始した。反応は、異なる期間：20 秒間、1 分間、10 分間、および 4 時間行った。それぞれの標識反応期間の終わりに、反応停止緩衝液 (4 M 塩酸グアニジン ( $\text{GdnCl}$ ) および 0.4 M トリス (2-カルボキシエチル) ホスフィン ( $\text{TCEP}$ ) を含む 100 mM リン酸緩衝液、 $\text{pH}$  2.5、1:1、体積/体積) を添加することによって、反応を停止させ、反応停止したサンプル 50  $\mu\text{L}$  を、分析のために Waters HDX-MS システムに注入した。共通の消化性ペプチドの重水素取込みレベルを、Fab の不在下または存在下でモニタリングした。

#### 【0466】

HDX-MS による 13F3 および NKG2A.9 のエピトープマッピング

10

HDX-MS。HDX-MS は、骨格アミドの水素原子の重水素交換の速度および程度をモニタリングすることによって、溶液中のタンパク質立体構造および立体構造動態を探求する (R. Huang and G. Chen, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 406: 6541-58 (2014)、Wei et al., *Drug Discovery Today*, 19: 95-102 (2014))。HDX のレベルは、骨格アミドの水素原子の溶媒接触可能性およびタンパク質の水素結合に依存する。HDX 時のタンパク質の質量増大は、MS によって正確に測定することができる。この技術を酵素消化と組み合わせた場合、ペプチドレベルでの構造特性を分解することができ、表面に露出しているペプチドを内部に折り畳まれているものと区別することが可能となる。典型的には、重水素標識および後続の反応停止処理の実験を行い、続いて、酵素消化、ペプチド分離、および MS 分析を行う。

20

#### 【0467】

図 28A は、NKG2A.9 抗体との相互作用時の mFc-hNKG2A-hCD94 の示差的 HDX を示す。図 28B は、13F3.A4 との相互作用時の mFc-NKG2A-CD94 の示差的 HDX を示す。図 28A~B におけるデータは、エピトープが、NKG2A.9 および 13F3.A4 抗体で同じであったことを示し、具体的には、mFc-NKG2A-CD94 における NKG2A9 抗体に対する HDX-MS データ分析は、NKG2A9 および 13F3.A4 親モノクローナル抗体で、同一のエピトープを共有していることを示し、そのエピトープは、hNKG2A の以下の 4 つの不連続な領域である (残基番号は、天然の hNKG2A 配列に対応する) :

領域 1 :  $^{155}\text{LSIDNEEEMKF}^{165}$  (配列番号 2 のアミノ酸残基 155 ~ 165 )、

30

領域 2 :  $^{171}\text{PSSWIGVFRNSSHHPW}^{186}$  (配列番号 2 のアミノ酸残基 171 ~ 186 )、

領域 3 :  $^{192}\text{LAFKH EIKDSDN}^{203}$  (配列番号 2 のアミノ酸残基 192 ~ 203 )、および

領域 5 :  $^{212}\text{QVNRLKSAQCGSSIIYHC}^{229}$  (配列番号 2 アミノ酸残基 212 ~ 229 )。

#### 【0468】

mFc-hNKG2A-hCD94 配列にマッピングしたエピトープおよび結晶構造。

FPOP。タンパク質の迅速光化学酸化 (FPOP) は、ヒドロキシル ( $\text{OH}$ ) ラジカルによって誘導される酸化をマッピングすることによって、構造情報を判定するためのタンパク質フットプリント技術である。 (Li et al., *Analytical Chemistry*, 2017, 89, 2250-2258) 。ヒドロキシルラジカルに誘導される酸化の程度は、アミノ酸側鎖の溶媒露出性および露出したアミノ酸の化学特性に直接的に依存する。レーザー活性化により過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) から生じるヒドロキシルラジカルは、高度に反応性であり、骨格切断を引き起こすことなく、側鎖の共有結合による不可逆的修飾をもたらす。FPOP を酵素消化および MS 分析と併用することにより、タンパク質-タンパク質相互作用に起因して、側鎖の溶媒露出性の変化をペプチドレベルで評価することが可能である。残基レベルの情報は、MS/MS により選択されたペプチド領域の気相断片化によって達成することができる。この技術は、HDX に対する補完的な情報を提供する。

40

50

## 【 0 4 6 9 】

F P O Pによるエピトープマッピングを、m F c - N K G 2 A - C D 9 4および親 1 3 F 3 F a bと複合体を形成したm F c - N K G 2 A - C D 9 4 ( 1 5 μ M、1 : 1のモル比)に行った。同様に、F P O Pによるエピトープマッピングを、m F c - N K G 2 A - C D 9 4およびN K G 2 A . 9 F a bと複合体を形成したm F c - N K G 2 A - C D 9 4 ( 1 5 μ M、1 : 1のモル比)に行った。

## 【 0 4 7 0 】

1 3 F 3 . A 4およびN K G 2 A . 9抗体の両方のエピトープマッピングのために、フッ化クリプトン ( K r F ) エキシマレーザーを使用して、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の光分解によってヒドロキシルラジカルを生成し、励起波長は、任意のレーザーに誘導されるタンパク質の立体構造変化を回避するために248 nmに設定した。標識の直前に、5 μ Lのヒスチジンおよび5 μ LのH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を、タンパク質アリコートに添加した。タンパク質溶液の最終容積は、50 μ Lであり、ヒスチジンの最終濃度は、500 μ Mであり、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>の最終濃度は、15 mMであった。サンプルを、次いで、紫外線 ( U V ) 透過ウインドウを有する溶融石英チュービングに注入した。レーザーエネルギーを、7 . 4 H zの周波数で70 m J / パルスに調節した。F P O Pおよびレーザーなし対照の実験の両方を、三連に行った。それぞれの複製物を、11 μ Lの反応停止溶液 ( 50 n Mのカタラーゼおよび20 mMのメチオニン) を含む微量遠心チューブに収集した。サンプルを変性させ、還元し、アルキル化し、脱グリコシル化し、トリプシンで消化させた後、液体クロマトグラフィー ( L C ) / M S分析を行った。トリプシンペプチドの酸化レベルを、N K G 2 A . 9 F a bの不在下または存在下でモニタリングした。

## 【 0 4 7 1 】

F P O P実験において、h N K G 2 Aにおける4つの残基M 1 6 3、F 1 7 9、H 1 8 4、およびL 2 0 6が、親 1 3 F 3 F a bとの結合時に、酸化レベルに有意な低減 ( P 値 < 0 . 0 2 5 ) を示した。同様に、F P O P実験において、h N K G 2 Aにおける4つの残基M 1 6 3、F 1 7 9、H 1 8 4、およびL 2 0 6が、N K G 2 A 9との結合時に、酸化レベルに有意な低減 ( P 値 < 0 . 0 2 5 ) を示した。

## 【 0 4 7 2 】

1 3 F 3 . A 4およびN K G 2 A . 9抗体のいずれについても、F a bの結合時のF P O P保護パーセンテージは、次のように計算した：

## 【 0 4 7 3 】

## 【 数 2 】

$$\frac{(\text{hNKG2Aにおける相対FPOP差\%}) - (\text{hNKG2A/Fab複合体における相対FPOP差\%})}{\text{hNKG2Aにおける相対FPOP差\%}} \times 100$$

## 【 0 4 7 4 】

図 2 9 Aは、N K G 2 A . 9との相互作用時のh N K G 2 Aにおける4つの残基 ( M 1 6 3、F 1 7 9、H 1 8 4、L 2 0 6 ) の保護パーセンテージを示す。図 2 9 Bは、1 3 F 3 . A 4との相互作用時のh N K G 2 Aにおける4つの残基 ( M 1 6 3、F 1 7 9、H 1 8 4、L 2 0 6 ) のF P O P保護パーセンテージを示す。

## 【 0 4 7 5 】

m F c - N K G 2 A - C D 9 4配列にマッピングしたエピトープおよび結晶構造。

図 3 0に示されるように、H D X - M SおよびF P O Pによって判定したN K G 2 A . 9および1 3 F 3 . A 4抗体のエピトープを、m F c - h N K G 2 A - h C D 9 4配列にマッピングした。m F c - h N K G 2 A - h C D 9 4配列において、m F cは、マウス F c領域であり、これが、リンカー配列A S I E G R ( 配列番号 1 2 3 ) ( 破線の枠で示される ) によって、h N K G 2 Aの細胞外ドメインと連結しており、これが、リンカー配列G G S G G S ( 配列番号 1 2 4 ) ( 破線の枠で示される ) によってヒト C D 9 4タンパク質であるh C D 9 4に連結されている。

## 【 0 4 7 6 】

図 3 1 に示されるように、抗 N K G 2 A 抗体エピトープ（例えば、N K G 2 A . 9 および 1 3 F 3 . A 4 抗体のエピトープ）は、N K G 2 A / C D 9 4 / H L A - E 結晶構造で可視化することができる。具体的には、図 3 1 は、N K G 2 A / C D 9 4 / H L A - E 結晶構造における抗 N K G 2 A 抗体エピトープ（黒色で示される）を示す（H L A - E と複合体を形成したヒト C D 9 4 / N K G 2 A の結晶構造は、Petrie et al., J. Exp. Med. 205: 725-35 (2008) によって公開されており、これは、参照によりその全体が組み込まれる）。H L A - E 結晶構造は、実線の楕円で示され、C D 9 4 結晶構造は、破線の楕円で示される。

## 【 0 4 7 7 】

まとめると、本明細書において論じられる H D X - M S および F P O P 実験に基づいて、N K G 2 A . 9 および 1 3 F 3 . A 4 抗体が結合する N K G 2 A エピトープは、以下の不連続な結合領域を含む：

領域 1：L S I D N E E E M K F（配列番号 2 のアミノ酸残基 1 5 5 ~ 1 6 5）、

領域 2：P S S W I G V F R N S S H H P W（配列番号 2 のアミノ酸残基 1 7 1 ~ 1 8 6）、

領域 3：L A F K H E I K D S D N（配列番号 2 のアミノ酸残基 1 9 2 ~ 2 0 3）、

領域 4：L（配列番号 2 のアミノ酸残基 2 0 6）、および

領域 5：Q V N R L K S A Q C G S S I I Y H C（配列番号 2 のアミノ酸残基 2 1 2 ~ 2 2 9）。

## 【 0 4 7 8 】

他の実施形態では、本明細書において論じられる H D X - M S 実験に基づいて、N K G 2 A . 9 および 1 3 F 3 . A 4 抗体が結合する N K G 2 A エピトープは、以下の不連続な結合領域を含む：

領域 1：L S I D N E E E M K F（配列番号 2 のアミノ酸残基 1 5 5 ~ 1 6 5）、

領域 2：P S S W I G V F R N S S H H P W（配列番号 2 のアミノ酸残基 1 7 1 ~ 1 8 6）、

領域 3：L A F K H E I K D S D N（配列番号 2 のアミノ酸残基 1 9 2 ~ 2 0 3）、および

領域 5：Q V N R L K S A Q C G S S I I Y H C（配列番号 2 のアミノ酸残基 2 1 2 ~ 2 2 9）。

## 【実施例 5】

## 【 0 4 7 9 】

## エピトープビニング実験

（ 1 ） P 1 - 0 6 9 3 6 6 抗体は 1 3 F 3 . A 4 を交差遮断した

P 1 - 0 6 9 3 6 6 および 1 3 F 3 . A 4 のエピトープビニング実験を、「サンドイッチ形式」を使用して S P R によって行ったが、この形式では、抗体 1 を、B i a c o r e T 1 0 0 C M 5 チップに固定化し、組換えヒト N K G 2 A - C D 9 4 タンパク質を、B i a c o r e T 1 0 0 C M 5 チップに流して結合させた後、抗体 2 をチップに流す。具体的には、1 3 F 3 . A 4 または P 1 - 抗体を、アミン結合によって、C M 5 センサーチップに固定化した。組換え N K G 2 A タンパク質の溶液を、センサーチップに流すと、P 1 - 0 6 9 3 6 6 および 1 3 F 3 . A 4 の両方の抗体との結合が観察された。次いで、競合抗体の溶液を、チップに流し、さらなる結合を測定した（N K G 2 A との共結合を示す）。最後に、センサーチップを、結合した N K G 2 A および競合抗体を除去する M g C l 2 の溶液を使用して再生させた。実験は、2 5 で行った。分析のために、参照フローセルとの非特異的結合を、解析フローセルとの結合から除算した。P 1 - 0 6 9 3 6 6 抗体を、フローセル 2 に直接固定化した。次いで、2 0 0 n M の N K G 2 A を、フローセル 2 に流し、およそ 6 0 0 R U の結合が観察された。続いての 1 3 F 3 . A 4 抗体、P 1 - 0 6 9 3 6 6 抗体、または緩衝液（H B S - P）の注入では、結合シグナルの増大は生じなかった。1 3 F 3 . A 4 抗体を、フローセル 3 に固定化した。次いで、2 0 0 n M の N K G 2 A を、フローセル 3 に流し、およそ 9 0 0 R U の結合が観察された。続いての P 1 -

10

20

30

40

50

069366抗体、13F3.A4抗体、または緩衝液(HBS-P)の注入では、結合シグナルの増大は生じなかった。結論として、P1-069366抗体は、エピトープピニング実験の結果に基づくと、13F3.A4を交差遮断すると思われた。

#### 【0480】

(2) 13F3.A4、2G6.C2は、互いに、ならびにHLA-Eを、ヒトNKG2A-CD94と結合するのを遮断した。

「サンドイッチ形式」を使用してOctet HTX機器で行った別のエピトープピニングおよび遮断実験では、13F3.A4抗体、2G6.C2抗体、ならびにHLA-Eを、ヒトNKG2Aとの同時結合について試験した。抗体およびビオチン化HLA-Eを、別個のOctetセンサーチップに捕捉した。次に、必要に応じて、残りの捕捉部位を遮断し、ヒトNKG2A-CD94を結合させた。続いて、13F3.A4抗体、2G6.C2抗体、およびHLA-Eの、事前に結合させたNKG2A-CD94との結合を、試験し、これらの3つのサンプルの対での組合せをすべて調べた。これらのエピトープピニング実験により、13F3.A4および2G6.C2抗体が、互いに、ならびにHLA-Eを、ヒトNKG2A-CD94との結合から遮断することが示された。

#### 【0481】

(3) 2G6.C2抗体の結合活性

Octet実験はまた、2G6.C2抗体が、ヒトNKG2A-CD94と結合するだけでなく、カニクイザルNKG2A-CD94-mFcコンストラクトとも結合することも示した。2G6.C2抗体の、ヒトNKG2A-CD94およびNKG2C-CD94ヘテロ二量体との結合の動態を、37℃でBiacore T200機器において、抗hFc抗体を事前に固定化したCM4チップに抗体を捕捉し、抗原を適切な濃度範囲で検体として流すことによって、測定した。すべてのデータは、二重参照し、Biacore T200 Evaluationソフトウェアバージョン3.1を使用して、1:1結合モデルに適合させた。Biacore実験により、以下に要約されるように、2G6.C2抗体が、13F3.A4抗体よりも弱い結合親和性を有すること、およびそれがNKG2Cとのいくつかの交差反応性を有することが、示された。

#### 【0482】

#### 【表K】

捕捉	検体	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)	抗体/検体複合体の半減期(秒)
2G6.C2	hNKG2A-CD94	$4.0 \times 10^5$	$3.6 \times 10^{-2}$	$9.1 \times 10^{-8}$	19
2G6.C2	hNKG2C-CD94	$2.8 \times 10^4$	$3.0 \times 10^{-2}$	$1.1 \times 10^{-6}$	23

#### 【実施例6】

#### 【0483】

さらなる抗NKG2A抗体の発見

図32A~Bに示されるように、特定の抗NKG2A抗体(13F3.A4、NKG2A.9、およびNKG2A.11)の重鎖および軽鎖可変領域を、Clustal 2.1ソフトウェアを使用してアラインメントした。このアラインメントは、以下のコンセンサスCDR配列を有する抗NKG2A抗体の発見をもたらした。

10

20

30

40

50



## 【化 8】

- HCDR1: SHSMN (配列番号 1 0)
- HCDR2: AISSSSSYIYYADSVKG (配列番号 1 1)
- HCDR3: EEWGLPFDY (配列番号 1 2)
- LCDR1: RASQGISSALA (NKG2A, 9 抗体について、配列番号 1 3) ;  
RASQGIPSALA (NKG2A, 1 1 抗体について、配列番号 1 5 4) ; または  
RASQGINLSALA (1 3 F 3, A 4 抗体について、配列番号 1 5 5)
- LCDR2: DASSLKS (配列番号 1 4)
- LCDR3: QQFNSYPLT (配列番号 1 5)

10

## 【実施例 7】

## 【0484】

Fc ガンマ受容体 (FcγR) 結合を低減または防止するための不活性 Fc (IgG1, 3) を有する NKG2A, 9 抗体の開発

NKG2A は、CD8+ T および NK 細胞上に発現される阻害性受容体であるため、本発明者らは、NKG2A+ CD8+ T または NK 細胞のアゴニズムまたは枯渇を回避または低減させることにより、抗腫瘍免疫が増強されると考えている。したがって、NKG2A/HLA-E 相互作用の遮断は、ヒト FcγR と相互作用することができない抗 NKG2A 抗体に所望される。

20

## 【0485】

以下の研究 1 に要約されるように、本発明者らは、1956 肉腫モデルにおいて、腫瘍成長阻害を媒介することにおけるアイソタイプの役割を評価した。NKG2A, 2 抗体は、抗腫瘍活性における Fc の役割を評価するための mIgG2a または mIgG1-D265A アイソタイプとして生成されたマウス代理抗体である。

## 【0486】

## 【表 L】

マウス腫瘍モデル研究1

目的	腫瘍モデル	レシピエント マウス	モノクロー ナル抗体	処置計画	腫瘍成長阻害 % (アイソタイプ 対照と比較 )
抗mNKG2A.2 IgG2a NKG2A.2 IgG1-D265A アイソタイプの有効性	1956肉腫	C57Bl/6 n=10匹/群	NKG2A.2 (mIg2a) NKG2A.2 (mIgG1-D265A)	0日目:マウス1匹当たり1×10 <sup>6</sup> 個の細胞、皮下(SC)  6、9、12日目:それぞれのアイソタイプ、10mg/kg、腹腔内(IP)	21日目 NKG2A.2-g1 D265A: 41%  NKG2A.2-g2a: 0%

30

40

## 【0487】

埋込み後 21 日目に、NKG2A, 2 - mIgG1-D265A は、アイソタイプ対照と比較して、腫瘍成長を 41% 阻害した。換言すると、不活性 Fc を含む抗 mNKG2A

50

m A b ( m N K G 2 A . 2 m I g G 1 - D 2 6 5 A ) での腫瘍保持マウスの処置は、強力な抗腫瘍活性をもたらした。しかしながら、N K G 2 A . 2 m I g G 2 a を投与した場合、抗体は、腫瘍成長を阻害しなかった。換言すると、マウス F c R ( m N K G 2 A . 2 m I g G 2 a ) と相互作用することができる F c を有する N K G 2 A . 2 抗体を試験した場合、腫瘍は、インビボで急速に成長した。

【 0 4 8 8 】

I g G 4 F c を有する抗 h N K G 2 A m A b を試験した場合、特に、強力な刺激の存在下において、N K 細胞応答が阻害された。

【 0 4 8 9 】

まとめると、これらのデータは、不活性 F c ヒト I g G 1 . 3 の有益な機能が、N K G 2 A . 9 抗体の好ましいアイソタイプであったことを示した。

【実施例 8】

【 0 4 9 0 】

N K G 2 A . 9 抗体は、T 細胞の機能的活性を増強させた

このアッセイでは、N K G 2 A . 9 抗体を、C H O / s c O K T 3 / H L A - E ( 一本鎖 O K T 3 およびリガンド H L A - E を発現するように遺伝子操作されているチャイニーズハムスター卵巣細胞 ) によって刺激した N K G 2 A 発現 J u r k a t T 細胞株において、N K - B シグナル伝達の阻害を逆転させるその機能的活性に関して試験した。N K G 2 A 発現 J u r k a t エフェクター細胞を、C H O / s c O K T 3 / H L A - E 標的細胞とともに、1 : 1 のエフェクター細胞対標的細胞の比 ( E : T ) で、共培養した。N K G 2 A . 9 抗体またはアイソタイプ抗体 ( ヒト I g G 1 . 3 ) を、滴定濃度で、共培養物に添加した。37 で 4 時間の刺激の後、B i o - G l o R e a g e n t ( 1 0 0  $\mu$  l / ウェル ) および E n V i s i o n プレートリーダーを使用して、ルシフェラーゼ活性を定量した。相対ルシフェラーゼ単位 ( R L U ) データを、G r a p h P a d I n c から

【 0 4 9 1 】

N K G 2 A . 9 抗体は、N K G 2 A / H L A - E に媒介される T 細胞応答の阻害を逆転させた。具体的には、図 3 3 に示されるように、N K G 2 A . 9 抗体は、0 . 2 n M の E C <sub>50</sub> 値で、C H O / s c O K T 3 / H L A - E によって刺激される N K G 2 A 発現 J u r k a t T 細胞株における N K - B シグナル伝達の阻害を逆転させた。

【実施例 9】

【 0 4 9 2 】

単独または抗 P D - L 1 モノクローナル抗体と組み合わせた N K G 2 A . 9 抗体の I F N - 産生

N K G 2 A . 9 抗体は、C H O / s c O K T 3 / H L A - E / P D - L 1 ( 一本鎖 O K T 3 およびリガンド H L A - E および P D - L 1 を発現するように遺伝子操作されているチャイニーズハムスター卵巣細胞 ) と共培養した、健常ドナーの P B M C から単離した N K G 2 A <sup>+</sup> C D 8 T において、I F N - を誘導した。増強された I F N - 産生は、T 細胞機能性の増強の尺度である。効果は、N K G 2 A . 9 を抗 P D - L 1 モノクローナル抗体と組み合わせた場合に有意に増幅された。

【 0 4 9 3 】

簡単に述べると、図 3 4 A に示されるように、健常 P B M C から単離した T 細胞を、N K G 2 A . 9 抗体および抗 P D - L 1 抗体 ( B M S - 9 3 6 6 5 9 ) 、またはこれらの組合せの存在下において、4 日間、照射した C H O / s c O K T 3 / H L A - E / P D - L 1 とともにインキュベートした。T 細胞を、F i c o l l 勾配およびヒト T 細胞単離キット ( E a s y S e p ( 商標 ) H u m a n T C e l l I s o l a t i o n K i t , S t e m c e l l T e c h n o l o g i e s ) を使用して、ヒト全血から単離した。細胞生存率は、細胞カウンター ( N e x c e l c o m C e l l o m e t e r A u t o 2 0 0 0 ) によって判定すると、9 0 % を上回っていた。1 . 5  $\times$  1 0 <sup>5</sup> 個の細胞を、r h I L - 1 5 ( 5 n g / m l ) を含有する培地において、アイソタイプ対照抗体 ( ヒト I g G

1.3) またはNK G2A.9 および/もしくは抗ヒトPD-L1 抗体(BMS-936659)のいずれかの存在下において、 $2.5 \times 10^4$  個の照射した(67,000 RADで80分間、Rad Source Irradiator、RS-2000 Biological System) CHO/OKT3/HLA-E/PD-L1 細胞とともに、4日間共培養した。

(CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1 細胞は、一本鎖OKT3ならびにリガンドHLA-EおよびPD-L1を発現するように遺伝子操作されているチャイニーズハムスター卵巣細胞である)。培養の4日目に、細胞を採取し、抗ヒトCD4、抗ヒトCD8、生/死、抗ヒトNK G2A(27H4クローン)で染色した。IFN- $\gamma$  産生を、BD Cytotoxicity/Permeability (商標) キットを使用して、細胞内サイトカイン染色によって評価した。固定された細胞を、BD LSRT Fortessa (商標) で読み取った。NK G2A+ またはNK G2A- CD8<sup>+</sup> T細胞間でのIFN- $\gamma$  のパーセントを、FlowJoによって計算した。

#### 【0494】

図34Bに示されるように、NK G2A.9 抗体を抗PD-L1 抗体と組み合わせた場合に、NK G2A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞によるIFN- $\gamma$  産生の用量依存的増強が、観察された。注目すべきことにIFN- $\gamma$  産生の増大は、NK G2A<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞においては観察されず、これにより、NK G2A.9 抗体の作用が、NK G2A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞に特異的かつ固有であったことが示された。

#### 【0495】

NK G2A.9 抗体はまた、CHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1 と共培養したヒト腫瘍から単離したNK G2A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞においてもIFN- $\gamma$  を誘導した。効果は、NK G2A.9 抗体を抗PD-L1 モノクローナル抗体(BMS-936659)と組み合わせた場合に有意に増幅された。簡単に述べると図35A~Bに示されるように、腎細胞癌、黒色腫、または子宮内膜腫瘍サンプルに由来する腫瘍浸潤リンパ球(TIL)を、NK G2A.9 抗体、抗PD-L1、またはこれらの組合せの存在下において、4日間、照射したCHO/scOKT3/HLA-E/PD-L1 と共培養した。NK G2A.9 抗体は、対照モノクローナル抗体と比べてNK G2A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILによるIFN- $\gamma$  レベルを増大させなかったが、一方で抗PD-L1 抗体は、アイソタイプ対照抗体と比べて、NK G2A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> TILによるIFN- $\gamma$  レベルを刺激した( $P = 0.01$ )。図35Bに示されるように、アイソタイプ対照と比較して( $P = 0.003$ )、ならびに抗PD-L1 単独と比較して( $P = 0.04$ )、NK G2A.9 抗体および抗PD-L1 mAbの組合せで、最大のIFN- $\gamma$  応答が観察された。

#### 【実施例10】

#### 【0496】

NK G2A.9 抗体は、望ましいことに、NK G2A発現細胞と結合した後に、内部移行される

上述の実施例に記載されるように、本発明者らは、ヒトCD8<sup>+</sup> T またはNK細胞をNK G2A.9 抗体とともにインキュベートした後に、NK G2Aの表面発現の下方制御を観察した。NK G2A.9 抗体が、細胞内に内部移行されたかどうかを判定するために、Alexa Fluor 488 標識NK G2A.9 抗体またはアイソタイプ対照モノクローナル抗体(KLHヒトIgG1 抗体)を、NK L細胞に添加し、細胞内および表面に結合したモノクローナル抗体のレベルを、測定した。抗体の内部移行は、抗体の受容体との標的結合を示す。図36Aに示されるように、NK G2A.9 抗体は、1時間以内に内部移行を示し、20時間にわたって増大した。NK G2A.9 抗体は、NK L細胞に徐々に内部移行され、20時間で約40%の内部移行のプラトーレベルに達した。用量応答形式でNK G2A.9 抗体の内部移行を定量するために、pH感受性色素アッセイを、NK L細胞を使用して行った。図36Bに示されるように、2時間で、NK G2A.9 抗体は、0.5 nMのEC<sub>50</sub>で用量依存的内部移行を示した。

#### 【実施例11】

## 【 0 4 9 7 】

NK G 2 A . 9 抗体は、ナチュラルキラー細胞脱顆粒化およびHLA - E 発現腫瘍細胞の溶解を増大させた

正常ドナーに由来するP B M Cを使用したインビトロ実験において、活性化NK細胞における抗NK G 2 A 抗体によるNK G 2 A / H L A - E 相互作用の遮断は、NK細胞脱顆粒化の増大をもたらした。図3 7 Aに示されるように、正常なP B M Cドナーから単離されたNK細胞を、組換えヒト( r h ) I L - 2で一晩活性化した。NK細胞を、次いで、HLA - Eを発現するヒトB - リンパ芽球様標的細胞株7 2 1 . 2 2 1と共培養した。図3 7 Bに示されるように、NK G 2 A . 9 抗体は、フローサイトメトリーによりC D 1 0 7 a 発現%によって測定される場合、アイソタイプと比較して、用量依存的様式で、NK細胞脱顆粒化を増大させた。NK G 2 A / H L A - E に媒介されるNK細胞細胞傷害性の阻害の逆転を、インビトロで評価した。図3 7 Cに示されるように、ヒト口腔癌細胞株H S C - 3を、その内因性HLA - E発現に基づいて選択した。NK L細胞を、NK G 2 A . 9 またはアイソタイプ対照抗体(ヒトI g G 1 . 3 ) の存在下において、2 0 : 1 のエフェクター対標的の比で、カルセインA M (細胞透過性色素)で標識したH S C - 3 標的細胞と共培養した。2 時間後に放出されたカルセインの量を測定し、これを使用して標的細胞溶解のレベルを示した。図3 7 Dに示されるように、NK G 2 A . 9 抗体は、アイソタイプと比較して、用量依存的様式で、HLA - E 発現腫瘍細胞の溶解を増大させた。

## 【実施例 1 2】

## 【 0 4 9 8 】

1 3 F 3 . A 4 抗体は、NK細胞機能性の増強を示した

図3 8 Aは、C H O / M I C A / H L A - E と共培養したNK L細胞におけるI F N - 産生に対する1 3 F 3 . A 4 抗体の作用を測定するために使用した方法を図示する。NK G 2 A . 9 抗体と同様に、図3 8 Bは、1 3 F 3 . A 4 抗体が、アイソタイプと比較して、C H O / M I C A / H L A - E ( M I C A およびH L A - E を発現するように遺伝子操作されているチャイニーズハムスター卵巣細胞) と共培養したナチュラルキラーリンパ球( N K L ) におけるI F N - 産生を増大させたことを示す。

## 【実施例 1 3】

## 【 0 4 9 9 】

NK G 2 A . 9 の結合親和性の比較

hNK G 2 A - hC D 9 4 との結合に関するNK G 2 A . 9、Z 2 7 0、およびモナリズマブの動態および結合親和性の比較を、B i a c o r e T 2 0 0 バイオセンサー機器、ならびにヒトNK G 2 A およびC D 9 4 の細胞外ドメインのヘテロ二量体を使用して、行った。温度は3 7 °C であり、泳動緩衝液は、0 . 0 5 % T w e e n - 2 0 および1 g / L B S A を補充したH e p e s 緩衝食塩水( 1 0 m M H E P E S , 1 5 0 m M N a C l )、p H 7 . 4 であった。抗体を、抗ヒトF c 捕捉試薬( S o u t h e r n B i o t e c h カタログ番号2 0 8 1 - 0 1 ) を事前に固定化したC 1 センサーチップに捕捉した。ヒトNK G 2 A の細胞外ドメインを、最高濃度2 5 0 n M で2 つの5 連続3 倍濃度系列において、捕捉した抗体に検体として流した。一方の濃度系列を、単一サイクル動態に使用し、もう一方は、多重サイクル動態に使用し、8 3 n M で二連に注入した。すべてのデータは、二重参照し、B i a c o r e T 2 0 0 E v a l u a t i o n ソフトウェアバージョン3 . 1 を使用して、1 : 1 結合モデルに適合させた。独立して2 回行い、2 回目はそれぞれのモノクローナル抗体について、異なるフローセルを使用した。したがって、4 つのK<sub>D</sub>測定値を得た。該当する場合、動態適合および安定状態適合の両方を使用して、データを分析した。

## 【 0 5 0 0 】

図5 1 A ~ D は、単一サイクルおよび多重サイクルの両方の動態を使用して四連測定においてB i a c o r e によって判定した、3 7 °C におけるNK G 2 A . 9 抗体のヒトNK G 2 A - C D 9 4 ヘテロ二量体との結合親和性を示す。図5 1 A ~ D は、秒単位での時間に対するNK G 2 A - C D 9 4 結合の応答単位( R U ) を示す。

10

20

30

40

50

## 【 0 5 0 1 】

NKG2A . 9 抗体は、このアッセイにおいて、以下の表に要約されるように、Z270 ( $K_D = 25 \text{ nM} \pm 3 \text{ nM}$ 、平均  $\pm$  標準偏差) およびモノリズマブ ( $K_D = 26 \text{ nM} \pm 3 \text{ nM}$ ) よりも高い親和性 ( $K_D = 16 \text{ nM} \pm 0.4 \text{ nM}$ ) を示した。NKG2A . 9 の全体的な親和性は、このアッセイにおいて、実施例 3 における NKG2A . 9 Fab を使用した実験よりも高く、この差は、結合速度 ( $k_a$ ) がより高速であるが、解離速度 ( $k_d$ ) は非常に類似していることに起因し得る。このアッセイにおけるより高速な結合速度 ( $k_a$ ) は、より最適化された条件、特に、ヒト対力ニクイザル NKG2A の試薬の制限が低いために使用したフラットセンサーチップの使用を反映している可能性がある。

## 【 0 5 0 2 】

表-NKG2A抗体の親和性および抗体/検体複合体の半減期の比較

【表 M】

捕捉した抗体	検体	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (nM)	抗体/検体複合体の半減期 (秒、s)
NKG2A.9	hNKG2A-hCD94	$1.1 \times 10^6 \pm 0.1 \times 10^6$	$1.7 \times 10^{-2} \pm 0.2 \times 10^{-2}$	$16.0 \text{ nM} \pm 0.4 \text{ nM}$	37~45秒
Z270		$8 \times 10^6$	$2 \times 10^{-1}$	$25 \text{ nM} \pm 3 \text{ nM}$	3秒~4秒
モノリズマブ		$7 \times 10^6$	$2 \times 10^{-1}$	$26 \text{ nM} \pm 3 \text{ nM}$	3秒~4秒

$K_D$  は、4 回の測定から平均した。標準偏差は、該当する場合に示す。

## 【 0 5 0 3 】

1 つの抗体結合部位が 1 つの NKG2A - CD94 ヘテロ二量体に結合するなどの 1 : 1 複合体の半減期は、抗体 / 検体複合体 (ここでは、抗体 : NKG2A - CD94 複合体) の量の半分が解離するのにかかる時間である。半減期は、数学的に、 $1 \ln(2) / k_d$  と記述することができる。抗体 : NKG2A - CD94 複合体の半減期は、NKG2A . 9 については、Z270 およびモノリズマブ (3 ~ 4 秒) のいずれよりも、およそ 12 倍長かった (41 秒)。

## 【 0 5 0 4 】

細胞表面における一価結合 (例えば、低い抗原発現に起因して) の条件下では、NKG2A . 9 は、したがって、Z270 およびモノリズマブよりも長い期間、NKG2A - CD94 複合体と結合することができる。本発明者らは、抗体 / NKG2A - CD94 複合体のこの長い半減期により、リガンド遮断効率の増大が可能であると考ええる。換言すると、モノリズマブ / NKG2A - CD94 または Z270 / NKG2A - CD94 と比較して長い NKG2A . 9 / NKG2A - CD94 複合体の半減期は、モノリズマブまたは Z270 と比較して、より良好に NKG2A / HLA - E 相互作用を遮断する NKG2A . 9 抗体の能力の根拠を提供する。

## 【実施例 14】

## 【 0 5 0 5 】

インビトロにおける抗 mNKG2A 抗体の特性

抗 mNKG2A 代理抗体である NKG2A . 2 (20D5 クローン、eBioscience、mIgG1 - D265A) および NKG2A . 3 (7E6 クローン、mIgG1 - D265A) は、インビトロで評価した場合、NKG2A . 9 抗体と類似の機能的特性を有していたため、これらの抗体は、概念の証明、作用機序 (MOA)、およびヒト用量

10

20

30

40

50

予測研究のための代理抗体として機能することが可能である。抗NKG2Aマウス抗体NKG2A．2およびNKG2A．3は、以下の機能的特性を有していた：

1) mNKG2A発現CHO細胞との結合に関するEC<sub>50</sub>値が、0．2 nM (NKG2A．2) および0．3 nM (NKG2A．3) であったこと。

2) Qa-1b四量体のmNKG2A発現CHO細胞との結合の遮断に関するIC<sub>50</sub>値が、0．3 nM (NKG2A．2) および0．4 nM (NKG2A．3) であったこと。

(Qa-1bは、ヒトにおけるHLA-Eの社内相同体である。したがって、これは、CHO hNKG2A / HLA-E遮断アッセイに匹敵する)。

3) NKG2A．2およびNKG2A．3が、NKG2A<sup>-/-</sup> NKまたはCD8<sup>+</sup> T細胞とは結合しなかったため、mNKG2Aと特異的に結合したこと。

4) NKG2A．2およびNKG2A．3抗体が、マウスNK細胞脱顆粒化の用量依存的増大を誘導したこと。

#### 【実施例15】

##### 【0506】

抗mNKG2A抗体は、単独またはその他の薬剤との組合せの両方で、インビボで抗腫瘍活性を誘導した

(1) 抗mNKG2A抗体は、マウスモデルにおいて、単剤療法として抗腫瘍活性を誘導した

抗mNKG2Aモノクローナル抗体(NKG2A．2およびNKG2A．3抗体を含む)は、以下の研究2に要約されるように、単一の薬剤として投与した場合に、CT26結腸癌、1956肉腫、およびA20 B細胞リンパ腫皮下(SC)モデルにおいて、腫瘍成長を阻害した。

##### 【0507】

10

20

30

40

50

【表 N - 1】

## マウス腫瘍モデル研究2～4の概要

研究 番号	目的	腫瘍モデル	レシピ エント マウス	モノクローナル 抗体	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照と比較)
2	抗mNK G2A.3の 用量滴 定	CT26結腸 癌	BALB/c n=10匹/ 群	NKG2A.3 (mIg G1-D265A)  抗PD-1抗体(mI Gg1 D265A)	0日目:マウス1匹 当たり $1 \times 10^6$ 個の 細胞、SC 6、10、13、17、2 0日目: NKG2A 10、3、1 、0.3mg/kg、腹腔 内( IP) PD-1(mPD1-4h2-m g1-D265A、ニボル マブのマウス代 理物)、10mg/kg、I P  それぞれの抗体 を、10mg/kg、IP で投与	20日目 <b>NKG2A.3(10mg/kg)+抗P D-1抗体:96%</b> <b>NKG2A.3(1mg/kg)+抗PD -1抗体:96%</b> <b>抗PD-1抗体:88%</b> NKG2A.3(3mg/kg)+抗PD- 1抗体:76% NKG2A.3(0.3mg/kg)+抗P D-1抗体:71% NKG2A.3 (3 mg/kg): 56 % NKG2A.3(10 mg/kg): 49 % NKG2A.3(1 mg/kg): 31% NKG2A.3(0.3 mg/kg): 0 %
3	その他 のチェ ックポ イント 阻害剤 と組み 合わせ た抗mN KG2A.3 の有効 性	CT26結腸 癌	BALB/c n=10匹/ 群	NKG2A.3 (mIg G1-D265A)  抗PD-1抗体(mIg G1 D265A)  抗TIGIT抗体(mI g2a)	0日目:マウス1匹 当たり $1 \times 10^6$ 個の 細胞、SC 6、10、13、17、2 0日目: それぞれの抗体 を、10mg/kg、IP で投与	24日目 <b>NKG2A.3+抗PD-1抗体( クローン4H2、mIgGg1- D265aA:91%</b> <b>NKG2A.3+抗TIGIT抗体( クローン4H2、mIgG1-D2 65A:88%</b> NKG2A.3: 42% 抗PD-1抗体:61% 抗TIGIT抗体:78%

10

20

30

40

50

【表 N - 2】

4	皮下リンパ腫モデルにおいて、チェックポイント阻害剤と組み合わせた抗mNKG2A.2の有効性	A20 B細胞リンパ腫	BALB/c n=10匹/群	NKG2A.2 (mIgG1-D265A) 抗PD-1抗体(mIgG1-D265A) 抗TIGIT抗体(mIg2a)	0日目:マウス1匹当たり $5 \times 10^6$ 個の細胞、SC 6、9、12、15、18日目: それぞれの抗体を、10mg/kg、IPで投与	23日目 NKG2A.3+抗PD-1抗体:94% 抗PD-1抗体:75% NKG2A.3: 58% NKG2A.3+抗TIGIT抗体:51% 抗TIGIT抗体:32%
						研究の終了時に腫瘍がないマウス 抗NKG2A A+抗PD-1抗体:9匹中8匹が、研究の終了時に腫瘍がない(TF)マウスである 抗NKG2A抗体+抗TIGIT抗体:9匹中4匹がTF 抗PD-1抗体:9匹中3匹がTF 抗NKG2A抗体:9匹中1匹がTF 抗TIGIT抗体:9匹中0匹がTF アイソタイプ:9匹中0匹がTF

10

20

30

## 【0508】

図39に示されるように、CT26腫瘍モデルを用いた用量滴定研究(上述の研究番号2)において、NKG2A.3抗体は、10mg/kg、3mg/kg、および1mg/kgの用量で投与した場合に、腫瘍サイズを低減させた(それぞれ、平均腫瘍体積に48%、56%、および30%の低減)。

40

## 【0509】

(2)抗mPD-1および抗mNKG2A抗体の組合せは、複数のマウス腫瘍モデルにおいて、いずれか単独の薬剤だけと比較して、抗腫瘍活性を増強させた。

抗NKG2A(mNKG2A.3-mG1-D265A(7E6クローン))および抗PD-1抗体(PD1-4H2-mG1-D265A、6A1クローン)での共遮断は、抗NKG2Aモノクローナル抗体単独により単剤活性が示されたモデルにおいて、腫瘍成長を低減した。抗mPD-1および抗mNKG2A抗体の組合せは、CT26腫瘍モデルにおいて、いずれか単一の薬剤のみよりも高い抗腫瘍活性を示した。

## 【0510】

CT26モデルにおいて、抗mNKG2Aまたは抗mPD-1抗体での単剤処置は、そ

50



れぞれ、平均腫瘍体積を43%および61%低減した。NKG2AおよびPD-1の共遮断は、比較的強力な腫瘍成長の阻害をもたらし、10匹中7匹のマウスが、研究の終了時に腫瘍なし(TF)となり(図40D)、平均腫瘍体積に91%の減少があった(図40E)。図40A~Dは、アイソタイプ(図40A)、抗mNKG2A抗体単独(図40B)、抗mPD-1抗体単独(図40C)、または抗mNKG2A抗体および抗mPD-1抗体の組合せ(図40D)で処置したマウス(n=10匹/群)における腫瘍埋込み後の様々な時点における腫瘍体積を示す。図40Eは、アイソタイプ、抗mNKG2A抗体単独、抗mPD-1抗体単独、または抗mNKG2A抗体および抗mPD-1抗体の組合せで処置したマウスにおける、時間(腫瘍埋込み後の日数)の関数としての平均腫瘍体積を示す。

#### 【0511】

同様の効果が、以下の研究3および4に要約されるように、1956肉腫またはA20リンパ腫SC腫瘍を接種したマウスにおいて観察された。

#### 【0512】

マウス腫瘍モデル研究3および4の概要

#### 【表0-1】

研究番号	目的	腫瘍モデル	レシピエントマウス	モノクローナル抗体	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照と比較)
3	その他のチェックポイント阻害剤と組み合わせた抗mNKG2A.3の有効性	CT26結腸癌	BALB/c n=10匹/群	NKG2A.3 (mIgG1-D265A)  抗PD-1抗体(mIgG1 D265A)  抗TIGIT抗体(mIg2a)	0日目:マウス1匹当たり $1 \times 10^6$ 個の細胞、SC 6、10、13、17、20日目: それぞれの抗体を、10mg/kg、IPで投与	24日目 NKG2A.3+抗PD-1抗体:91% NKG2A.3+抗TIGIT抗体(10A7クローン、mIgG1-D265A):88% NKG2A.3: 42% 抗PD-1抗体:61% 抗TIGIT抗体:78%
4	皮下リンパ腫モデルにおいて、チェックポイント阻害剤と組み合わせた抗mNKG2A.2の有効性	A20 B細胞リンパ腫	BALB/c n=10匹/群	NKG2A.2 (mIgG1-D265A)  抗PD-1(mIgG1-D265A)抗体  抗TIGIT(mIg2a)抗体	0日目:マウス1匹当たり $5 \times 10^6$ 個の細胞、SC 6、9、12、15、18日目: それぞれの抗体を、10mg/kg、IPで投与	23日目 NKG2A.3+抗PD-1抗体:94% 抗PD-1抗体:75% NKG2A.3: 58% NKG2A.3+抗TIGIT抗体:51% 抗TIGIT抗体:32%

10

20

30

40

50

【表 O - 2】

						研究の終了時に腫瘍がないマウス NKG2A+抗PD-1抗体: 9匹中8匹が、研究の終了時に腫瘍がない(TF)マウスである NKG2A+抗TIGIT抗体: 9匹中4匹がTF 抗PD-1抗体: 9匹中3匹がTF NKG2A: 9匹中1匹がTF 抗TIGIT抗体: 9匹中0匹がTF アイソタイプ: 9匹中0匹がTF
--	--	--	--	--	--	---

10

20

## 【0513】

NKG2A/PD-1共遮断は、抗NKG2Aモノクローナル抗体単独(NKG2A.3-mG1-D265A(7E6クローン)またはNKG2A.2-mg1-D265A(4F12クローン))が単剤活性を示さなかったモデルにおいてさえも、腫瘍成長阻害を改善した。M109肺腫瘍モデルにおいて、抗NKG2Aおよび抗PD-1抗体の共遮断は、以下の研究5に要約されるように、アイソタイプ対照と比較して、平均腫瘍体積に72%の減少をもたらした。

## 【0514】

【表 P】

マウス腫瘍モデル研究5の概要

研究番号	目的	腫瘍モデル	レシピエントマウス	モノクローナル抗体	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照と比較)
5	抗mPD-1と組み合わせた抗mNKG2A.2の有効性	M109肺癌	BALB/c n=10匹/群	NKG2A.2 (mIgG1-D265A)  抗PD-1抗体(mIgG1-D265A)	0日目:マウス1匹当たり $2 \times 10^5$ 個の細胞、SC 7、10、13日目:それぞれの抗体を、10mg/kg、IPで投与	25日目 NKG2A+抗PD-1抗体:72% 抗PD-1抗体:17% 抗NKG2A抗体:11%

30

40

## 【0515】

BR5.1卵巣腫瘍モデルにおいて、NKG2AおよびPD-1の共遮断は、以下の研究6に要約されるように、アイソタイプ対照と比較して、平均腫瘍体積に36%の減少をもたらした。

## 【0516】

50

## 【表 Q】

マウス腫瘍モデル研究6の概要

研究番号	目的	腫瘍モデル	レシピエントマウス	モノクローナル抗体	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照と比較)
6	抗mPD-1と組み合わせた抗mNKG2A.2の有効性	BR5.1卵巣	FVB/NJ n=15匹/群	NKG2A.2 (mIgG1-D265A)  PD-1 (mIgG1-D265A)	0日目:断片化された腫瘍SC  5、8、11、14、17日目: NKG2A.2 10 mg/kg IP PD-1 5 mg/kg IP	26日目 NKG2A+PD-1: 36% NKG2A: 5% PD-1: 0%

10

## 【0517】

本発明者らは、以下の研究7に示されるように、MC38結腸癌モデルにおいて、抗mNKG2A単独も抗mPD-1との組合せでも活性を観察しなかった。

## 【0518】

20

## 【表 R】

マウス腫瘍モデル研究7の概要

研究番号	目的	腫瘍モデル	レシピエントマウス	モノクローナル抗体	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照と比較)
7	抗mPD-1を伴う抗mNKG2A.3の有効性	MC38結腸腺癌	C57Bl/6 n=10匹/群	NKG2A.3 (mIgG1-D265A)  PD-1 (mIgG1-D265A)	0日目:マウス1匹当たり1e6個の細胞、SC 6、8日目: それぞれの抗体を、10mg/kg、IPで投与	有効性は観察されなかった

30

## 【0519】

(3) 抗NKG2Aおよび抗PD-1抗体は、マウスナチュラルキラー(NK)細胞およびCD8腫瘍浸潤リンパ球(TIL)の抗腫瘍活性および機能性を増強させた。

NKG2A/PD-1共遮断の有効性は、CD8<sup>+</sup>T細胞およびNK細胞の両方に依存していた。CT26保持マウスを、抗mNKG2Aおよび抗mPD-1モノクローナル抗体での処置の前に、CD8<sup>+</sup>TまたはNK細胞のいずれかを枯渇させた。抗mNKG2A(NKG2A.3、7E6クローン、mIgG1-D265A)/抗mPD-1(4H2クローン、mIgG1-D265A)抗体で処置したマウスは、以下の研究8に要約されるように、枯渇モノクローナル抗体を受容しなかったマウス(平均腫瘍体積 $778 \pm 686 \text{ mm}^3$ )と比較して、CD8<sup>+</sup>T細胞(191%の増大、平均腫瘍体積 $2271 \pm 699 \text{ mm}^3$ )またはNK細胞(94%の増大、平均腫瘍体積 $1509 \pm 800 \text{ mm}^3$ )のいずれかを枯渇させた場合に、平均腫瘍体積の増大を有した。

40

## 【0520】

マウス腫瘍モデル研究8の概要

50

【表 S】

研究番号	目的	腫瘍モデル	レシピエントマウス	モノクローナル抗体	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照と比較)
8	NKおよびCD8 T細胞の枯渇	CT26結腸癌	BALB/c n=10匹/群	NKG2A.3 (mIgG1-D265A)  PD-1 (mIgG1-D265A)  抗アシアロGM1(e-Bioscience) 抗CD8a(53.6.7、BioXCell)	0日目:マウス1匹当たり1e6個の細胞、SC  5、12、19日目:抗アシアロGM1(50μg/マウス)または抗CD8a(200μg/マウス)、IP  6、10、13、17、20日目:それぞれの抗体を、10mg/kg、IPで投与	21日目 NKG2A.3+PD-1: 60% NKG2A.3+PD-1+抗アシアロGM1:22% NKG2A.3+PD-1+抗CD8:0%

10

20

## 【0521】

NKG2A/PD-1共遮断は、NKおよびCD8+ T TILの機能性を増強させた。4回のモノクローナル抗体の投与後（処置開始後12日目）に、NKおよびCD8+ T TILを、フローサイトメトリーによって分析した。抗mNKG2A/抗mPD-1処置は、図41Aに示されるように、アイソタイプ対照処置群と比べて、CD107a+ NK細胞の頻度の増大をもたらした。CT26モデルにおける免疫表現型決定研究により、抗NKG2Aおよび抗PD-1抗体での共遮断が、NKおよび腫瘍特異的CD8+ T細胞の細胞傷害性およびIFN- $\gamma$ の統計学的に有意な増大を示したことが示された。抗mNKG2A/抗mPD-1処置は、CD107a+ NK細胞の頻度の増大をもたらし、アイソタイプ対照処置群と比べて、およそ1.5倍の増大であった。細胞傷害性CD8+ T細胞の頻度における類似の増大が、図41Bに示されるように、腫瘍特異的AH-1+ CD8+ T細胞で確認され、アイソタイプ対照処置群と比べて、CD107a+ グランザイムB+ AH1+ CD8+ T細胞におよそ13倍の増大があった。NKG2A/PD-1共遮断はまた、IFN- $\gamma$ 産生AH-1+ CD8+ T細胞の頻度も増大させ、図41Cに示されるように、アイソタイプ対照処置群と比べて、IFN- $\gamma$ + AH-1+ CD8+ T細胞におよそ5.5倍の増大があった。

30

## 【0522】

まとめると、抗NKG2Aおよび抗PD-1抗体は、単独または組合せのいずれかで、腫瘍特異的AH-1+ CD8+ T細胞の中で、細胞傷害性CD8+ T細胞の頻度を増大させた。抗NKG2Aおよび抗PD-1抗体の投与は、CTモデルにおいて、NKおよび腫瘍特異的CD8+ T細胞の細胞傷害性およびIFN- $\gamma$ を増大させた。

40

## 【0523】

(4) 抗mPD-1抗体は、マウス肉腫モデルにおいて、抗mNKG2Aと組み合わせた場合に、抗mLAG-3または抗mTIGIT抗体との組合せと比較して、より高い程度に腫瘍成長を阻害した。

抗LAG-3および抗PD-1抗体によるPD-1と、抗TIGIT抗体との二重遮断は、マウス腫瘍モデルにおいて、単剤処置と比較して、腫瘍成長を相乗的に遅延させることが、これまでに示されている。(Woo et al., "Immune inhibitory molecules LAG-

50

3 and PD-1 synergistically regulate T-cell function to promote tumoral immune escape." Cancer Res 72:917-27 (2012)、Johnston RJ et al., "The immunoreceptor TIGIT regulates antitumor and antiviral CD8 (+) T cell effector function." Cancer Cell 26:923-937 (2014)。

【 0 5 2 4 】

本発明者らは、以下の研究 9 に要約されるように、抗 m P D - 1 抗体を抗 m N K G 2 A ( N K G 2 A . 3 、 7 E 6 クローン、m I g G 1 - D 2 6 5 a ) 、抗 m L A G - 3 ( 1 A 5 クローン、m I g G 1 - D 2 6 5 A ) 、または抗 m T I G I T ( 1 0 A 7 クローン、m I g G 1 - D 2 6 5 A ) 抗体と組み合わせることの、1 9 5 6 肉腫モデルにおける腫瘍成長制御に対する作用を、試験した。

10

【 0 5 2 5 】

マウス腫瘍モデル研究9の概要

20

30

40

50

【表 T】

研究 番号	目的	腫瘍モデル	レシピエント マウス	モノクロー ナル抗体	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照と 比較)
9	抗mNKG 2A.3およ びその他 のチェッ クポイン ト阻害剤 と組み合 わせた抗 mPD-1の 有効性	1956肉腫	C57Bl/6 n=10匹/群	NKG2A.3 (mIgG1-D265A)  抗PD-1抗体(mIgG1- D265A)  TIGIT (mIgG1- D265A)  抗LAG-3抗体(mIgG1-D265A)	0日目:マウス1匹 当たり1×10 <sup>6</sup> 個 の細胞、SC  6、9、12、15、18日目: それぞれの抗体 を、10mg/kg、IP で投与	27日目 NKG2A.3+抗PD-1抗体:97% 抗PD-1抗体+抗LAG-3抗体:91% 抗PD-1抗体:77% 抗PD-1抗体+抗TIGIT抗体:72% NKG2A.3-D265A: 24% 抗LAG-3-D265A抗体:0% 抗TIGIT-D265A抗体:0%  研究の終了時に腫瘍がないマウス(TF) NKG2A+PD-1:10匹中6匹がTF LAG-3+PD-1:10匹中4匹がTF PD-1:10匹中2匹がTF PD-1+TIGIT:10匹中1匹がTF NKG2A:10匹中1匹がTF LAG-3:10匹中0匹がTF TIGIT:10匹中0匹がTF アイソタイプ:10匹中0匹がTF

10

20

30

## 【0526】

PD-1/NKG2A二重遮断は、1)抗PD-1/抗LAG-3抗体(10匹中4匹のマウスが腫瘍なし)および2)抗PD-1/抗TIGIT抗体(10匹中1匹のマウスが腫瘍なし)の組合せと比較して、最も強力な抗腫瘍効果(10匹中6匹のマウスが腫瘍なし)を示した。

## 【0527】

抗mNKG2A抗体を、複数のマウス腫瘍モデルにおいて抗腫瘍効果を増強させるために、抗mCTLA-4および抗LAG-3抗体を含むその他のチェックポイント阻害剤と組み合わせた。1956モデルにおいて、抗mNKG2A抗体は、抗mCTLA-4と組み合わせた場合に強い活性を示し、研究10に要約される研究および図42A~Eに示されるように、アイソタイプ対照と比較して、平均腫瘍成長体積に87%の低減があり、1

40

50

0 匹中 3 匹のマウスが、腫瘍なしであった。

【 0 5 2 8 】

マウス腫瘍モデル研究 10 の概要

【 表 U 】

研究 番号	目的	腫瘍モデル	レシピエント マウス	モノクローナル抗体(アイソ タイプは括弧 内に示す)	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照 と比較)
10	低用量のその他のチェックポイント阻害剤と組み合わせた抗mNKG2A.3の有効性	1956肉腫	C57Bl/6 n=10匹/群	NKG2A.3 (mIgG1-D265A)  抗PD-1抗体(mIgG1- D265A)  抗CTLA-4抗体(mIgG2a)	0日目:マウス1匹当たり $1 \times 10^6$ 個の細胞、SC  6、9、12日目: NKG2A: 10 mg/kg、IP 抗PD-1抗体:0.3 mg/kg、IP 抗CTLA-4抗体:0.1 mg/kg、IP	22日目 NKG2A.3+抗CTLA-4抗体:86% NKG2A.3+抗PD-1抗体:76% 抗CTLA-4 mIgG2a抗体:51% NKG2A.3: 26% 抗PD-1 mIgG1 D265A抗体:25%

10

20

【 0 5 2 9 】

図 4 2 A ~ E は、1 9 5 6 マウス肉腫モデルにおける単独または組合せのいずれかでの抗 m N K G 2 A 抗体 ( 1 0 m g / k g ) および抗 m C T L A - 4 抗体 ( 0 . 1 m g / k g ) の抗腫瘍活性を示す。図 4 2 A ~ D は、アイソタイプ ( 図 4 2 A )、抗 m C T L A - 4 抗体 ( 図 4 2 B、C T L A - 4 I g G 2 a、0 . 1 m g / k g )、抗 m N K G 2 A 抗体 ( 図 4 2 C、1 0 m g / k g )、または抗 m N K G 2 A および抗 m C T L A - 4 の組合せ ( 図 4 2 D ) で処置したマウスにおける腫瘍埋込み後の様々な時点における腫瘍体積を示す。図 4 2 E は、アイソタイプ、抗 m C T L A - 4 単独、抗 m N K G 2 A 単独、または抗 m N K G 2 A および抗 m C T L A - 4 の組合せで処置したマウスにおける、時間 ( 腫瘍埋込み後の日数 ) の関数としての平均腫瘍体積を示す。

30

【 0 5 3 0 】

A 2 0 リンパ腫静脈内モデルにおいて、抗 N K G 2 A 抗体単独では、生存率 1 0 % で生存利益があった。抗 m P D - 1 抗体または抗 m L A G - 3 抗体のいずれかとの併用療法は、それぞれ、生存利益を 5 0 % および 7 0 % に拡大した。抗 m N K G 2 A 抗体、抗 m P D - 1 抗体、および抗 m L A G - 3 抗体の三重の組合せは、以下の研究 1 1 に要約され、図 4 3 に示されるように、生存率 8 0 % で最大の利益をもたらした。

【 0 5 3 1 】

マウス腫瘍モデル研究 11 の概要

40

【表 V】

研究 番号	目的	腫瘍モ デル	レシピエン トマウス	モノクローナ ル抗体(アイソ タイプは括弧 内に示す)	処置計画	腫瘍成長阻害% (アイソタイプ対照と 比較)
11	静脈内リンパ腫モデルにおいて、チェックポイント阻害剤と組み合わせた抗mNKG2A.3の処置後の生存率	A20 B細胞リンパ腫	BALB/c n=10匹/群	NKG2A.3 (mIgG1-D265A)  抗PD-1抗体(mIgG1-D265A)  抗LAG-3(mIgG1-D265A)	0日目:マウス1匹当たり $2 \times 10^5$ 個の細胞、IV  4、7、10、13、16日目: それぞれの抗体を、10mg/kg、IPで投与	60日目における生存率%: 抗NKG2A+抗PD-1+抗LAG-3抗体:80%、 $P < 0.0001$  抗NKG2A+抗LAG-3抗体:70%、 $P = 0.0004$  抗NKG2A+抗PD-1抗体:50%、 $P = 0.006$  抗LAG-3抗体:40%、 $P = 0.001$  抗PD-1抗体:20%、 $P < 0.0001$  抗NKG2A抗体:10%、 $P = 0.028$ (P値はアイソタイプ対照と比較)

10

20

30

## 【0532】

図43は、A20全身性リンパ腫モデルにおける抗mNKG2A、抗PD-1、抗LAG3抗体の、単独および組合せの両方の抗腫瘍活性を示す。具体的には、図43は、アイソタイプ、抗mNKG2A、抗mPD-1、抗LAG3単独またはこれらの組合せで処置したマウス(n=10匹/群)における、腫瘍埋込み後の様々な時点における生存パーセントを示す。

## 【0533】

まとめると、これらのデータは、抗NKG2A、抗PD-1、抗CTLA-4、および抗LAG-3抗体でのコンビナトリアル遮断が、マウス腫瘍成長の低減において増強された有効性を有することを示した。

40

## 【0534】

(5)インビボ投与した抗mNKG2Aモノクローナル抗体は、マウスNK細胞の表面NKG2Aを下方制御した

抗mNKG2Aモノクローナル抗体(NKG2A.3(7E6クローン)、mIgG1-D265A)での処置の後に、NKG2Aの発現レベルは、図44に示されるように、脾臓およびTILNK細胞の両方において、アイソタイプと比較して、低減された。図44は、マウスCT26結腸癌モデルの脾臓および腫瘍において、最初の処置後5日目に測定した、NKG2A+ NK細胞におけるNKG2A発現NK細胞のパーセントを示す。本発明者らは、抗NKG2A抗体の投与後にNKG2A発現の下方制御を観察し、これは、それを標的結合のマーカーとして使用することができることを示す。下方制御とは、

50



表面 N K G 2 A 発現の下方制御を指す。標的結合は、抗 N K G 2 A 抗体が N K G 2 A 受容体と結合することを意味する。

【 0 5 3 5 】

本明細書において論じられる内部移行データと合わせると、これらのデータは、N K G 2 A 下方制御が、N K G 2 A . 9 抗体の標的結合マーカーとしての機能を果たすことを裏付ける。

【実施例 1 6】

【 0 5 3 6 】

生物物理学的特性、親和性、およびエピトープマッピング、ならびに免疫原性

本明細書に記載されるように、完全ヒト抗 N K G 2 A モノクローナル抗体 N K G 2 A . 9 の可変配列は、V H - I 1 0 7 T 生殖系列逆突然変異および V K - N 3 0 アミノ酸残基の脱アミド化傾向を軽減するための V K - N 3 0 S 突然変異を有する 1 3 F 3 . A 4 ハイブリドーマに由来する。定常領域は、I g G 1 f 骨格 ( I g G 1 . 3 ) に由来し、抗体の F c 受容体および C 1 q との結合を最小化または排除するために、重鎖における 3 つの突然変異：L 2 3 4 A、L 2 3 5 E、および G 2 3 7 A を含む。N K G 2 A . 9 抗体は、1 3 F 3 - V H - I 1 0 7 T - V H - N 3 0 S I g G f 1 . 3 および N K G 2 A . 9 I g G f 1 . 3 としても知られている。以下の表は、E x p i C H O ー過的発現系に由来する材料の分析に基づく N K G 2 A . 9 抗体の生物物理学的特徴を要約する。

【 0 5 3 7 】

10

20

30

40

50

【表 W - 1】

特性	方法	結果
同一性	SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動)	重鎖および軽鎖のバンドを確認した 脱グリコシル化分子量(MW)=143,683ダルトン(Da)(予測値)
	LC-MS/MSペプチドマップ	*重鎖(HC):観測値48,893Da、推定値48,900Da、予測値48,900Da *軽鎖(LC)=観測値23,207Da、推定値23,211Da、予測値23,210Da  99%を上回る配列およびジスルフィド構造をペプチドマッピングおよび質量分析によって確認した。アイソフォームおよび重鎖におけるN-297グリコシル化を確認した。
純度/均一性	CE-SDS(キャピラリー電気泳動ドデシル硫酸ナトリウム)	非還元(NR):97.0%モノマー、不純物は、2.1% HL(重鎖-重鎖-軽鎖)、0.4%HL(重鎖-軽鎖)、0.1% HH(重鎖-重鎖)、0.3%を含む 還元(R):LC 29.5%、HC 69.8%、NGHC 0.7% 98.1%モノマー
	SEC(サイズ排除クロマトグラフィー)	95.2%(146 kDa), 2.63% (505 kDa), 1.6% (109 kDa) 86.4%は35.5分に主ピーク、13.6%は主ピーク前
	SE-MALS(サイズ排除クロマトグラフィーと多角度光散乱分析との組合せ)	GOF (78%), G1F (17%), G2F (1%), Man5 (4%) 主ピークpI=8.9(59%)、酸性種35%、塩基性種7%、pI範囲8.6~9.1
	HIC-HPLC(疎水性相互作用クロマトグラフィー-高速液体クロマトグラフィー)	
	CE(キャピラリー電気泳動、グリカン) cIEF(キャピラリー等電点電気泳動法)	

10

20

30

40

50

【表 W - 2】

化学的修飾	LC-MS/MS(液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析)ペプチドマップ	非常に低い
親和性ヒト NKG2A**	Biacore	$K_D=36\text{nM}$ (1:1の結合モデル); $37^\circ\text{C}$ で、 $k_a(1/\text{Ms})=3.0\times 10^5$ 、 $k_d(1/\text{s})=1.1\times 10^{-2}$ ;カニクイザルNKG2Aと交差反応
熱安定性および可逆性	DSC(示差走査比色計)(保管緩衝液中に希釈)	$T_{m1} = 68^\circ\text{C}$ 、 $T_{m2} = 75^\circ\text{C}$ 、 $T_{m3} = 83^\circ\text{C}$ $68^\circ\text{C}$ での可逆性=92%、 $75^\circ\text{C}$ =49%

10

\*脱グリコシル化および部分的還元方法を軽鎖および重鎖の質量の確認に使用した。

\*\*ヒトNKG2A-CD94ヘテロ二量体(hNKG2A-CD94-mFc)を結合研究の抗原として使用した。

## 【0538】

NKG2A . 9 抗体の生物物理学的特性は、好ましいものであった。NKG2A . 9 抗体の同一性を、SDS-PAGEおよび質量分析による分析によって確認した。抗体の純度は、サイズ排除クロマトグラフィー(SEC)によって試験すると、98%を上回った。単一のNグリコシル化部位が、重鎖のN297において確認され、グリカンプロファイルは、CHO細胞において発現されるIgG1モノクローナル抗体のグリカンプロファイルと一致したグリカンプロファイルであった。フコシル化グリカン(G0f、G1f、G2f、およびMan5)のみが、それらに確認された。NKG2A . 9 抗体は、良好な熱安定性および可逆性を有し、すなわち、抗体は、熱ストレス下においてその構造の完全性を保持し、ストレスを解放した場合に中等度の再フォールディング特性を有した。

20

## 【実施例17】

## 【0539】

## 前臨床薬物動態研究

薬物動態データは、NKG2A . 9 抗体の有効性を裏付けた。カニクイザルへの静脈内(IV)投与後に、NKG2A . 9 は、 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 以上の用量で、線形抗体薬物動態(PK)特徴を示し、予測されるヒト半減期( $T_{1/2}$ )は16日であった。血中における完全(99%)受容体占有率(RO)を達成するための安定状態トラフ濃度( $C_{trough,ss}$ )を標的とするヒト有効用量は、4週間ごとに $2.5\text{mg}/\text{kg}$  IVと算出された。皮下(SC)投与後の用量は、ヒトにおけるSCバイオアベイラビリティ(典型的には50~100%)および緩徐なSC吸収率により $C_{trough,ss}$ が改善されるかどうかに応じて変動し得る。

30

## 【0540】

製剤化の取り組みにより、プラットフォーム製剤アプローチを、すぐに使用できる(RTU)製剤に使用することができることが示された。高い( $150\text{mg}/\text{mL}$ )濃度および予測されたヒト有効用量( $2.5\text{mg}/\text{kg}$ )でのNKG2A . 9 抗体の予備的な粘度および安定性評価は、皮下投与が、最適化された製剤条件下において可能であり得ることを示す。

40

## 【0541】

毒性学データは、NKG2A . 9 抗体が、安全に投与できることを示した。カニクイザルにおける $0\text{mg}/\text{kg}$ 、 $0.5\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、および $50\text{mg}/\text{kg}$ の用量は、十分に耐容され、異常は特定されなかった。43日目における受容体占有率( $0.1\text{mg}/\text{kg}$ 、 $10\text{mg}/\text{kg}$ 、および $50\text{mg}/\text{kg}$ でそれぞれ36%、84%、および97%)ならびに標的結合(表面NKG2Aの下方制御)は、すべての用量で示された。下方制御とは、表面NKG2A発現の下方制御を指す。本発明者らは、抗体の投与後

50

にNKG2A発現の下方制御を観察し、これは、それを標的結合のマーカーとして使用することができる（すなわち、抗NKG2A抗体は、NKG2A受容体と結合する）ことを示す。

#### 【実施例18】

#### 【0542】

マウスにおける抗mNKG2A.3の薬物動態

薬物動態研究を、C57BL6マウスへの静脈内（IV）または腹腔内（IP）投与後に、NKG2A.9抗体と類似の特性を有する抗mNKG2Aマウス代理物（NKG2A.3）を用いて、行った。表3は、この研究から得られた薬物動態パラメーターを要約する。

#### 【0543】

#### 【表3】

**表3:C57BL6マウスへの静脈内および腹腔内投与後の抗mNKG2Aマウス代理物(NKG2A.3)の薬物動態パラメーター(平均±標準偏差(SD)、n=4または5匹)\***

投与の経路	用量 (mg/kg)	Cmax (nM)	Tmax (時間)	AUCtot ( $\mu\text{M} \times \text{日}$ )	T1/2 (日)	CLT (mL/日/kg)	Vss (mL/kg)
IV (非腫瘍保持)	0.3	24 ± 6.8	0.25 ± 0*	0.075 ± 0.01	3.2 ± 0	26 ± 3.5	121 ± 16
	1	79 ± 7.8	0.25 ± 0*	0.38 ± 0.036	3.9 ± 0	17 ± 1.7	108 ± 15
	10	940 ± 32	0.25 ± 0*	7.3 ± 2.0	9.4 ± 2	9.7 ± 2	128 ± 19
IP (腫瘍保持)	0.1	6.9 ± 0.8	2 ± 0	0.014 ± 0.00	n.a.	n.a.	n.a.
	10	993 ± 87	2 ± 0	8.0 ± 1.1	n.a.	n.a.	n.a.

注記:PKパラメーターは、血清薬物濃度-時間データの非コンパートメント解析を使用して得た。n.a.は該当なしを示す。

\*血清薬物レベルは、連続マイクロサンプリングから得たものであり、理論上の希釈係数17または実験により判定した希釈係数20のいずれかについて補正した。\*\*初回サンプリング時点。

#### 【0544】

NKG2A.3抗体は、マウスにおいて非線形薬物動態を示した。1:3:30の静脈内用量比で、曲線下面積（AUC）比は、1:5.1:97であった。終末期半減期は、用量を0.3mg/kgから10mg/kgに増大させると、3.2日間から9.4日間に増大した。同様に、1:100のIP用量比で、AUC比は、0.1~10mg/kgで1:571であった。加えて、抗薬物抗体（ADA）の形成は、NKG2A.3のPKに有意に影響を及ぼさなかった。まとめると、これらのデータは、NKG2A.3抗体が、マウスにおいて標的に媒介される薬物消長（TMD）を受けたことを示した。

#### 【0545】

IPバイオアベイラビリティは、10mg/kgにおけるAUC値をIV経路とIP経路の間で比較した場合、完全であった。加えて、腫瘍保持マウスと非腫瘍保持マウスとの間、ならびにC57BL6マウスとBALB/cマウスとの間で、全身曝露に明らかな違いはなかった。

#### 【0546】

さらに、単回用量PK/薬力学（PD）研究を、CT26モデルにおいてNKG2A.3抗体を用いて行い、薬物レベルおよび受容体占有率（RO）の時間過程を、循環中およ

び腫瘍の両方において判定した。平均の腫瘍対血清薬物濃度比は、 $0.10 \pm 0.07$  ( $N = 33$ ) であり、血中および腫瘍浸潤リンパ球 (TIL) における RO は、 $1 \text{ mg/kg}$  のマウス有効用量で、完全であった。

【実施例 19】

【0547】

カニクイザルにおける NKG2A.9 抗体の薬物動態

本発明者らは、 $0.5 \text{ mg} \sim 50 \text{ mg/kg}$  の用量範囲で、カニクイザルにおける NKG2A.9 抗体の薬物動態特徴を特徴付けた。単回用量毒物動態 (TK) / PD および耐容性研究から得られた NKG2A.9 抗体の PK パラメーターを、以下の表 4 に要約する。

【0548】

【表 4】

表4:カニクイザルへの静脈内投与後のNKG2A.9抗体の薬物動態パラメーター(平均±標準偏差、N=3匹)

用量 (mg/kg)	Cmax (nM)	Tmax (時間)	AUC0-42d ( $\mu\text{M} \times \text{日}$ )	T1/2 (日)	CLT (mL/日/kg)	Vss (mL/kg)
0.5	$0.11 \pm 0.01$	$0.5 \pm 0^*$	$1 \pm 0.2$	$14 \pm 6$	$3.1 \pm 0.9$	$53 \pm 7$
10	$2.5 \pm 0.29$	$0.5 \pm 0^*$	$22 \pm 4$	$18 \pm 3^{**}$	$2.4 \pm 0.5$	$57 \pm 6$
50	$9.8 \pm 2.5$	$0.5 \pm 0^*$	$101 \pm 18$	$23 \pm 4$	$2.5 \pm 0.5$	$77 \pm 12$

注記:PKパラメーターは、血清薬物濃度-時間データの非コンパートメント解析を使用して得た。\*初回サンプリング時点。

\*\*ADAにより影響を受ける2つの薬物濃度は、T1/2計算に含めなかった。

【0549】

AUC0-42d は、 $0.5 \text{ mg/kg} \sim 50 \text{ mg/kg}$  の IV 用量で用量に比例しており、半減期は 14 日間から 23 日間の範囲に及んだ。加えて、PK 結果は、1 匹のサルにおいてのみ、ADA によって影響を受けた。さらに、サル血中 RO データの PK / PD モデリングにより、血清薬物 EC50 が、 $20 \pm 5.4 \text{ nM}$  であったことが判明し、これは、 $31 \pm 5.4 \text{ nM}$  のインビトロ EC50 と一致する。

【0550】

結論として、研究は、抗 NKG2A 抗体が、良好な受容体占有率を示し、カニクイザルにおいて十分に耐容性であったことを示した。

【実施例 20】

【0551】

NKG2A.9 抗体のヒト薬物動態

NKG2A.9 抗体のヒト PK は、サルにおけるものと同じとなることが想定される。結果として、以下の表 5 に要約されるように、NKG2A.9 抗体の予測されるヒト静脈内用量は、 $10 \text{ mg/kg}$  となり、ヒトにおける NKG2A.9 抗体の予測される半減期は、16 日間となる。

【0552】

10

20

30

40

50

## 【表 5】

表5:NKG2A.9抗体の予測されるヒト薬物動態パラメーター

IV用量 (mg/kg)	AUC <sub>tot</sub> ( $\mu\text{M} \times \text{日}$ )	T <sub>1/2</sub> (日)	CLT (mL/日/kg)	V <sub>ss</sub> (mL/kg)
10	24	16	2.7	61

## 【実施例 2 1】

## 【0553】

## ヒト有効用量の予測

NKG2A.9抗体のヒト有効用量を、ROに基づくアプローチを使用して、予測した。マウスおよびサルにおけるROならびにマウス抗腫瘍有効性を含む、利用可能なインビトロおよびインビボ前臨床データを、評価した。抗mPD-1と組み合わせた最大抗腫瘍効果は、1956およびCT26同系モデルにおいて、3~4日ごとに1mg/kgを合計5用量(Q3/4D x 5)投与する投与計画で示され、10mg/kgまでの用量で、有効性にさらなる改善はなかった。重要なことに、1mg/kgにおいて、血中および腫瘍(すなわち、TIL)の両方において、NKG2A受容体は完全に占有されており、完全なROを示した。加えて、サル血中ROデータのPK/PDモデリングにより、インビトロおよびインビボのRO EC<sub>50</sub>間で、一致が明らかとなり、これは、インビトロEC<sub>50</sub>を使用して、インビボROを予測することができることを示唆した。まとめると、NKG2A.9抗体のヒト有効用量は、1nMのインビトロヒトRO EC<sub>50</sub>を使用して、トラフにおける血中99% ROを標的とすることによって、予測される。マウスにおいてNKG2A.3で観察された平均の腫瘍対血清薬物濃度比は、約0.10であったため、ヒト腫瘍生検サンプルにおいて抗OX40抗体(BMS-986178)で同様の比が観察されたという事実と合わせると、トラフにおける血中99% ROを標的とすることにより、処置期間全体で腫瘍において約90% ROが得られるであろう。結果として、予測されるヒト有効用量は、4週間ごとに2.5mg/kgの投与となる。この用量では、予測されるヒト安定状態AUCおよびC<sub>trough</sub>は、マウスにおける1mg/kg Q3/4D x 5の最大有効用量で達成される曝露をカバーする。

## 【実施例 2 2】

## 【0554】

## NKG2A.9抗体の安定性および製剤化

製剤化の取り組みにより、プラットフォーム製剤アプローチを、NKG2A.9抗体のすぐに使用できる(RTU)製剤の開発に使用することができることが示された。150mg/mLでの予備的な粘度および安定性の評価は、NKG2A.9抗体を、最適化された製剤化条件下において、皮下投与により投与することができることを示した。

## 【0555】

凍結解凍安定性研究および加速安定性研究を含む製剤の評価を、以下の表6に要約されるように、25mg/mLの濃度でNKG2A.9抗体に関して行った。

## 【0556】

10

20

30

40

50

【表 6】

表6: プラットフォーム製剤中25mg/mLにおけるNKG2A.9抗体の安定性

特性	方法	結果
凍結/解凍(F/T)(-80℃で1時間、室温(RT)で1時間、5回)	UV, SEC	F/T安定性のリスクは判明しなかった
可溶性/濃度プロファイル	UV, SEC	プラットフォーム緩衝液(20mM ヒスチジン、pH6.0、260mMスクロース、0.05mM DTPA、0.05%ポリソルベート80)中少なくともとも25mg/mLで
加速安定性 プラットフォーム製剤中25mg/mLにおいて、4℃、25℃、および40℃で3ヶ月間	UV、SEC、cIEF、LC-MS/MSペプチドマッピング、機能性(フローサイトメトリー)	40℃で3ヶ月間=LMWにおける5%の増大* 40℃で3ヶ月間=HMWにおける4%の増大* 40℃で3ヶ月間=酸性変異体の12%/月の増大 40℃で3ヶ月間=VSNK領域におけるN326の脱アミド化の18%の増大(配列番号162)

10

20

\*LMW=低分子量、HMW=高分子量

## 【0557】

プラットフォーム製剤(20mMヒスチジン緩衝液pH6.0、260mMスクロース、50μMペンテト酸、0.05%ポリソルベート80)中25mg/mLにおいて、凍結-解凍ストレス(5回のサイクル)中に物理的安定性の問題は観察されなかった。25mg/mLにおいてプラットフォーム緩衝液での加速安定性研究を、4、25、および40で行った。試験した条件下で3ヶ月間にわたり、機能的活性に影響を及ぼさない微小な化学修飾が、NKG2A.9抗体のCDR領域で観察された。NKG2A.9抗体におけるこれらの微小な化学修飾としては、例えば、上昇した温度における溶液の保管に起因して予測される、抗体の結合活性に悪影響を及ぼさなかった、アミノ酸残基の酸化、脱アミド化、および異性体化における変化が含まれる。FcのVSNK領域(配列番号162)におけるN326の脱アミド化が、ストレス条件下において観察され(40で3ヶ月後に約18%)、これは、IgG1モノクローナル抗体に典型的である。25で3ヶ月間の保管の後、脱アミド化が観察され、約1.4%で許容可能であった。物理的安定性の問題も機能的活性の消失も、試験した条件下で3ヶ月間にわたって、観察されなかった。

30

## 【0558】

粘度(見かけの粘度=7.3センチポアズ(cP))または凝集(0.4%の可溶性凝集体)の問題は、150mg/mLまでのNKG2A.9抗体濃度で観察されなかった。物理的安定性の問題は、プラットフォーム製剤中150mg/mLにおいて、凍結-解凍ストレス(5回のサイクル)中に観察されなかった。プラットフォーム製剤中150mg/mLにおいて、NKG2A.9抗体を、以下の表7に要約されるように、4、25、および40で、3ヶ月間、加速安定性に供した。

40

## 【0559】

50

## 【表 7】

表7:プラットフォーム製剤中150mg/mLにおけるNKG2A.9抗体の安定性

特性	方法	結果
可溶性/濃度プロファイル	UV、SEC、粘度 (粘度計)	プラットフォーム緩衝液(20mMヒスチジン、pH 6.0、260mMスクロース、0.05mM DTPA、0.05 %ポリソルベート80)中少なくとも150mg/mLで見かけの粘度=7.3±0.1CP
加速安定性 プラットフォーム製剤中150 mg/mLにおいて、4℃、25℃ 、および40℃で3ヶ月間	UV, SEC	4℃で3ヶ月間C=LMWにおける0.1%の増大 4℃で3ヶ月間=HMWにおける0.8%の増大 25℃で1ヶ月間=LMWにおける0.4%の増大 25℃で1ヶ月間=HMWにおける0.8%の増大 1ヶ月を超えると25℃および40℃で有意な凝集 およびクリッピングが観察された

10

## 【 0 5 6 0 】

微小な物理的安定性の問題が、4 で3ヶ月後および25 で1ヶ月後の安定性に観察された(いずれの温度でも高分子量凝集体、HMWの0.8%の増大)。クリッピングおよび物理的不安定性が、1ヶ月を上回る保管の後に、25 および40 の上昇温度で観察された。上昇温度でより長い期間の保管後に確認された不安定性は、評価に使用した発見ロットのわずかな汚染によって説明できる可能性がある。

20

## 【実施例 2 3】

## 【 0 5 6 1 】

NKG2A.9抗体の組織分布

20個の凍結ヒト組織パネルにおけるNKG2A.9抗体を使用した免疫組織化学は、時折の単核細胞発現を示したが、予想外の結合はなかった。主として脾臓において、単核細胞の小サブセットに強力な染色があり、扁桃腺、子宮、胃、小腸、胸腺、および肝臓における単核細胞の染色はわずかであった。

## 【実施例 2 4】

## 【 0 5 6 2 】

カニクイザルにおけるNKG2A.9の単回用量薬物動態、毒物動態、耐容性、および薬力学研究

30

カニクイザルは、完全抗体のNKG2Aとの結合が類似しているため、前臨床毒物学種である。加えて、NKG2A.9抗体を使用したサル組織の免疫組織化学的分析は、ヒトのものに類似しており、単核細胞の少サブセットにおいて陽性染色を示す。本明細書において論じられるように、NKG2A.9抗体は、サルにおいてはNKG2AおよびNKG2Cの両方と結合するが、ヒトにおいてはNKG2Aに選択的に結合し、NKG2Cには結合しない。NKG2Cは、活性化受容体であるため、サルにおいて、免疫応答の上方制御(NKG2A遮断に起因する)および免疫応答の下方制御(NKG2C遮断に起因する)が同時に存在し得ることが可能である。

40

## 【 0 5 6 3 】

NKG2A.9抗体を、0mg/kg、0.5mg/kg、10mg/kg、および50mg/kgで、カニクイザル(1群当たりn=3匹、性別混合)に単回静脈内用量として投与し、動物を、42日間観察した。研究のエンドポイントには、臨床観察、体重、臨床病理、薬物動態および毒物動態、抗薬物抗体(ADA)の形成、RO、表面NKG2A発現、およびPBMC免疫組織型決定が含まれた。すべての動物に、サル免疫不全ウイルス(SIV)GagおよびNefで免疫処置し、2つの別個のアデノウイルス-5ベクターにおいて発現させて、可能性のあるPDエンドポイント(22日目におけるSIV反応性T細胞[四量体]アッセイ、22日目における抗原に対するエキソピボT細胞応答)として、免疫応答の増強を評価した。これは、剖検も組織病理もない非終端研究であった。

50



## 【 0 5 6 4 】

すべての用量は、最大 5 0 m g / k g ( A U C <sub>0 - 4 2 d a y s</sub> 1 0 1 μ M ・ 日 ) の投薬量で耐容性であった。以下の表 8 に要約されるように、N K G 2 A . 9 抗体関連の臨床兆候も、体重の変化も、または N K G 2 A . 9 抗体関連の血液学もしくは臨床化学における変化もなかった。

## 【 0 5 6 5 】

## 【表 8】

**表8:NKG2A.9抗体の結果の概要:サルにおける単回用量IV TK、耐容性、およびPD(n=3匹/群)**

研究のエンドポイント	NKG2A.9抗体関連結果
臨床兆候	なし
体重	有意な変化なし
血液学、臨床化学	有意な変化なし
受容体占有率	1日目、4時間:0.5mg/kg、10mg/kg、および50mg/kgで、それぞれ、81%、99%、および100% 43日目:0.5mg/kg、10mg/kg、および50mg/kgで、それぞれ、36%、84%、および97%
表面NKG2Aの下方制御(標的結合のマーカー)	1日目(投薬4時間後):表面発現は、0.5mg/kg、10mg/kg、および50mg/kgで、50%、52%、および58%(投薬前と比べて)であった 43日目:表面発現は、0.5mg/kg、10mg/kg、および50mg/kgで、それぞれ、65~80%、47~107%、および41~51%であった
免疫処置に対する応答	SIV GagまたはNefに対するエキソピボリコール応答に変化はなかった。NefおよびGag特異的(四量体+)CD8+細胞のパーセンテージのNKG2A.9に媒介される明らかな減少傾向があった。抗原特異的CD8+ T細胞集団内で、TEM細胞のパーセンテージに明らかな減少傾向があった。
毒物動態	50mg/kgで、C <sub>max</sub> は、1日目、0.5時間で9.8 μ Mであり、AUC <sub>0-42d</sub> は、101 μ M ・ 日であった。
抗薬物抗体(ADA)	ADAが、最初の時点である8日目に開始して、1匹の動物において観察された(10mg/kg)。

## 【 0 5 6 6 】

ADAが、最初の時点である8日目に開始して、1匹の動物において観察された(10 mg / k g )。薬物動態 / 毒物動態は、評価した用量範囲において線形であった。5 0 m g / k g の高用量では、C<sub>max</sub>は、9 . 8 μ M ( 1 日 目 、 0 . 5 時 間 ) であり、A U C <sub>0 - 4 2 d a y s</sub> は、1 0 1 μ M ・ 日であった。まとめると、単回用量サル研究は、最大 5 0 m g / k g の投薬量での単回用量投与に関して、R O、標的結合のマーカーとしてN K G 2 A の表面発現の下方制御、およびいずれの有害所見もない許容可能なT K ( A U C <sub>0 - 4 2 d a y s</sub> 1 0 1 μ M ・ 日 ) を示した。

## 【実施例 2 5】

## 【 0 5 6 7 】

## サイトカイン放出アッセイ

インビトロサイトカイン放出アッセイを、可溶性N K G 2 A . 9 抗体および15人のヒトドナーに由来する全血を使用して行った。N K G 2 A . 9 抗体での処置が、サイトカイン放出症候群の安全性リスクを有するかどうかを判定するために、75個のサイトカイン / ケモカインのLuminesxパネルによって、サイトカインおよびケモカインを評価した。アッセイしたN K G 2 A . 9 関連のヒトサイトカインまたはケモカインの誘導は、観察されなかった。

## 【実施例 26】

## 【0568】

## 抗NKG2A抗体の免疫原性リスク評価

治療用抗体は、患者において治療用抗体に対する免疫応答を誘起する可能性を有する。この免疫応答は、通常、ヒト抗ヒト抗体（H A H A）応答によるものなど、抗薬物抗体（A D A）の生成によって顕在化し、これは、曝露を変化させ、治療機能を中和し、および/またはさらには患者に重篤な臨床上的結果をもたらす可能性がある。免疫系によって「自己ではない」として認識される治療用抗体の「外来性」が、M H CクラスII媒介型A D A免疫応答の主要な作動因子であると考えられる。本明細書に記載される安全かつ有効な抗NKG2A抗体が、低い免疫原性を有するかまたは免疫原性を有さないことが、重要である。いくつかの抗NKG2Aモノクローナル抗体のヒト免疫原性の可能性を、インシリコHLA結合ツールによって、およびDC：T細胞増殖アッセイによってインビトロで、評価した。本明細書において論じられるように、NKG2A．9抗体を、インシリコHLA結合ツールによって評価される場合、低いヒト免疫原性傾向を有するように遺伝子操作した。種々の抗NKG2A抗体（NKG2A．6、NKG2A．9、およびNKG2A．11抗体）が、抗体に対するヒトにおいて望ましくない免疫応答を誘起するリスクは、インビトロDC：T細胞増殖アッセイに基づいて、低いと判定された。

10

## 【0569】

1．インシリコHLA結合分析を使用して、低い免疫原性リスクを有するように抗NKG2A抗体を遺伝子操作した

20

T細胞活性化および増殖は、免疫応答を生じるために必要な工程である。具体的には、ペプチド抗原のHLAクラスII結合が、高親和性IgG抗体に媒介される免疫応答の発生における重要な工程である。インシリコHLA結合ツール（IEDB）（例えば、Wang P, et al., PLoS Comput Biol.4(4) (2008)を参照されたい）を使用して、本発明者らは、アミノ酸配列をオーバーラップする15個のペプチドに分割し、27個のHLA DRB1対立遺伝子の結合を、IEDBデータベースに提出されたすべての他のペプチドに対して、ランク付けすることによって（ヒト集団の約95%をカバーする）、モノクローナル抗体のCDR領域を分析した。所与のHLA対立遺伝子に関して、上位10パーセントにランク入りするペプチドは、「結合因子」と考えられ、対立遺伝子の50%について結合因子を示す領域を、「結合クラスター」と表記する。生物学的分子内の「結合因子」または「結合クラスター」は、免疫原性の発生における作動因子であると考えられる（S inu, P et al., Clinical & Developmental Immunology Vol. 2013 (2013)）。

30

## 【0570】

図54Aに示されるように、13F3．A4抗体は、2つのHLA結合クラスターを含み、VH CDR2領域およびVL CDR2領域にまたがる複数のペプチドが、最大70%または27個中19個のHLA call II DRB1対立遺伝子と結合することが予測された（図54Aにおいて配列の下に網掛けの数字で示される）。本明細書において論じられるように、「結合クラスター」は、対立遺伝子のうちの50%について結合因子を示す領域であり、網掛けの数字6は、対立遺伝子のうちの60%が結合を示し、したがって、「結合クラスター」であることを意味する。

40

## 【0571】

加えて、図54Bに示され、本明細書に記載されるように、VH-I107Tフレームワーク逆転（すなわち、107位においてイソロイシンをトレオニンと置換すること）により、13F3．A4抗体から結合クラスターが除去された。13F3．A4抗体のこのI107T置換を選択した、例えば、107位のイソロイシンを、NKG2A．9抗体において選択した（107位のTは、図54Bの2行目に矢印によって示される）。

## 【0572】

図54Cに示され、本明細書に記載されるように、13F3．A4抗体の免疫原性の可能性を操作し最小限にするために、13F3．A4抗体の軽鎖CDR1において、30位のアスパラギン（N）（図54Cの1行目）を、プロリン（P）（図54cの2行目）、

50

グルタミン（Ｑ）（図５４Ｃの３行目）、またはセリン（Ｓ）（図５４Ｃの４行目）に操作した。Ｎ３０Ｓ置換（図５４Ｃの４行目に示される）は、ＨＬＡ結合の可能性を示さなかったため（網掛け領域において「０」で示される）、それを選択した。１３Ｆ３．Ａ４抗体のこのＮ３０Ｓ置換（３０位におけるＮ）を、ＮＫＧ２Ａ．９抗体に含めるために選択した（３０位におけるＳ）。図５４Ｂ～Ｃでは、明確さのために、１３Ｆ３．Ａ４の配列の特定の位置だけが示されている。

#### 【０５７３】

２．抗ＮＫＧ２Ａ抗体（ＮＫＧ２Ａ．６、ＮＫＧ２Ａ．９、およびＮＫＧ２Ａ．１１）の免疫原性リスクは、インビトロＤＣ：Ｔ細胞増殖アッセイ結果に基づくことが低かった

ＨＬＡクラスⅡ分子がペプチド抗原に結合した後、治療用抗体に対する免疫応答の発生における次の重要な工程は、ＣＤ４＋Ｔ細胞の活性化である。このＴ細胞活性化は、抗原提示細胞における同種ペプチド－ＭＨＣ複合体（ＨＬＡ）の認識の結果として生じる。Ｔ細胞活性化および増殖（複数のその他の因子の中でもとりわけ）は、免疫応答の発生に必要である。インビトロで、多様なドナーセットを使用した末梢血単核細胞（ＰＢＭＣ）に基づく免疫原性予測アッセイを使用して、分子が、これらの特定の活性化ＣＤ４＋Ｔ細胞をエキソビボで刺激する能力によって、免疫原性となる可能性があるかどうかを判定する。

#### 【０５７４】

インビトロＤＣ：Ｔ細胞増殖アッセイ（例えば、Joubert MK, et al., PLOS ONE 11(8) (2016)に記載される方法を参照されたい）を、いくつかの抗ヒトＮＫＧ２Ａ抗体（ＮＫＧ２Ａ．６、ＮＫＧ２Ａ．９、およびＮＫＧ２Ａ．１１抗体）に関して行って、これらの抗体のヒト免疫原性の可能性をさらに評価した。簡単に述べると、健康志願者に由来するＰＢＭＣを、Ｆｉｃｏｌｌ（ＧＥ Ｈｅａｌｔｈｃａｒｅ）によって単離した。勾配遠心分離およびヒトリンパ球抗原（ＨＬＡ）クラスⅡを、ポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）増幅およびオリゴヌクレオチドプローブ（ＰｒｏＩｍｍｕｎｅ）でのハイブリダイゼーションを使用して特徴付けた。世界人口の頻度にはほぼ一致するＨＬＡクラスⅡ型から構成される４０人のＰＢＭＣドナーのパネルを、アッセイ実施に使用した。

#### 【０５７５】

陰性ピーズに基づく方法（Ｉｎｔｅｌｌｉｃｙｔ）を使用してＰＢＭＣから単離した単球を、Ｉｌ－４およびＧＭ－ＣＳＦを含有するＤＣ培地（Ｌｏｎｚａ）において培養して、未成熟樹状細胞（ＤＣ）を生成し、抗ヒトＮＫＧ２Ａ抗体（ＮＫＧ２Ａ．６、ＮＫＧ２Ａ．９、およびＮＫＧ２Ａ．１１抗体）ならびに品質制御タンパク質で４時間パルスした後、ＴＮＦ－α、ＩＬ－１β、ＩＬ－６、およびＰＧＥ２を含有する培地において、２日間のＤＣ成熟工程を行った。

#### 【０５７６】

パルスしたＤＣを、カルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（ＣＦＳＥ）（Ｉｎｖｉｔｒｏｇｅｎ）で標識した自家ＰＢＭＣに添加して、増殖をモニタリングし、７日間、ｐｅｎ－ｓｔｒｅｐ（Ｇｉｂｃｏ）を含有するＤＣ培地（Ｌｏｎｚｏ）において９６ウェルプレートに１ウェル当たり２００，０００個の細胞で６連に播種した後、培地を洗い流し、細胞を、抗ヒトＣＤ４ ＡＰＣ（ＢＤ Ｂｉｏｓｃｉｅｎｃｅｓ）モノクローナル抗体で標識した。未結合の抗ＣＤ４モノクローナル抗体細胞を洗浄工程により除去した後、細胞を、ＰＢＳ中３．７％ホルマリン（Ｓｉｇｍａ）で固定し、フローサイトメトリーによって分析して、増殖ＣＤ４＋Ｔ細胞のパーセンテージを判定した。

#### 【０５７７】

図５５に示されるように、ＮＫＧ２Ａ．９は、このインビトロＤＣ：Ｔ細胞アッセイにおいて、４０人のドナー中３人（７．５％）のみで、培地でパルスした樹状細胞と比較して、ＣＤ４＋Ｔ細胞増殖応答をもたらした。この結果は、対照モノクローナル抗体（ペバシズマブ）の１２．５％のＣＤ４＋増殖と同等であり、これは、臨床において非常に低い免疫原性を有することが示されている（「低対照」）（Saffari F., et al., Int J Cancer Manag.; 11(11)(2018)）。「高対照」抗体（ＡＴＲ－１０７）は、ドナーのうちの

10

20

30

40

50

70%においてCD4+増殖を示し、臨床試験において76%という高いADA率を有することが示されている (Hua, F., et al., The Journal of Clinical Pharmacology, 54: 14-22 (2014))。

#### 【0578】

NKG2A.11もまた、40人のドナーのうち3人においてのみCD4+増殖応答をもたらした。NKG2A.6抗体は、いずれのドナーにおいてもCD4+増殖応答をもたらさなかった。このアッセイに関して高および低対照抗体の反復可能なデータは、5~10%の変動係数% (CV%)を示す。したがって、これらのモノクローナル抗体のいずれも、低い免疫原性リスクに有意な差はない。まとめると、NKG2A.6、NKG2A.9、およびNKG2A.11抗体が、抗体に対するヒトにおいて望ましくない免疫応答を誘起するリスクは、インビトロDC:T細胞増殖アッセイに基づいて、低いと判定された。

10

#### 【実施例27】

#### 【0579】

サルにおける単回用量静脈内毒物動態、耐容性、および薬力学研究

NKG2A.9抗体は、0.5mg/kg、10mg/kg、および50mg/kgで単回用量としてカニクイザルに静脈内投与した場合、十分に耐容性であり (AUC<sub>0-42 days</sub> 101 μM・日)、臨床病理による異常は特定されなかった。

#### 【0580】

具体的には、この研究は、サル免疫不全ウイルスタンパク質gagおよびnefを発現するアデノウイルス血清型5 (Ad5) ベクター (それぞれ、Ad5-gagおよびAd5-nef) を用いて免疫処置した後に、(1) NKG2A.9への全身曝露を判定するため、および(2) NKG2A.9に対する薬力学的応答を評価するために、単回用量としてサルに静脈内投与した場合のNKG2A.9抗体の可能性のある毒性を判定するために行った。NKG2A.9抗体を、0mg/kg (ビヒクル)、0.5mg/kg、10mg/kg、または50mg/kgの用量で、3匹のタンパク質ナイーブのサルの群 (性別ごとに1匹または2匹) に、緩徐なボラス注射として静脈内投与した。用量は、20mMヒスチジン、260mMスクロース、pH6.0のビヒクル/担体において、0.25mL/kg、0.5mL/kg、または2.5mL/kgで投与した。2つのAd5ベクターを、後部四頭筋または尾側大腿に、0.5mLでおよそ3.3×10<sup>9</sup>個のウイルス粒子を含む1回の注射で、筋肉内投与した。評価の基準としては、生存期間、毒物動態、臨床観察、体重、臨床病理評価、ならびに免疫毒性学および薬力学的評価 (抗薬物抗体、末梢血リンパ球表現型判定、ナチュラルキラーおよびT細胞活性化、NefおよびGagに対するエキソビポリコール応答、抗原特異的T細胞表現型判定、ならびにNKG2A受容体占有率および受容体発現) が挙げられる。サルは、投薬後6週間の期間にわたって観察した後、ストックに戻した。

20

30

#### 【0581】

NKG2A.9抗体AUC (0-T) およびC<sub>max</sub>曝露は、評価した用量レベルで、用量比例様式で増大した。静脈内投与の後、雄性における全身曝露は、すべての用量レベルにおいて、雌性におけるものと同等であった。全身曝露値には実質的な性別による違いがなかったため、すべての結果および結論は、性別をまとめたデータに基づいた。NKG2A.9抗体を10mg/kgで与えた9匹のサルのうちの1匹は、抗薬物抗体を生じ、抗薬物抗体による影響を受けた同じサルは、他のサルと比較して、より急速な薬物濃度の低下を示した。

40

#### 【0582】

NKG2A.9抗体の毒物動態の概要を、以下に示す。

#### 【0583】

毒物動態の概要-性別合算平均値

【表 X】

パラメーター	NKG2A.9抗体用量		
	0.5 mg/kg	10 mg/kg	50 mg/kg
Cmax; $\mu$ g/mL	16.8	380	1,470
AUC(0~1008時間);	3,620	79,000	365,000

## 【0584】

10

すべての動物が生存し、研究の終了時にストックに戻した。NKG2A.9抗体は、すべての用量で十分に耐容性であり、臨床観察、体重、または臨床病理に対する作用はなかった。末梢血T細胞、ヘルパーT細胞、細胞傷害性T細胞、B細胞、NK細胞、活性化CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、エフェクターメモリーCD8<sup>+</sup>T細胞、またはNK細胞濃縮リンパ球のパーセンテージに、NKG2A.9に媒介される変化はなかった。gagおよびnefペプチドに対するエキソピボリコール応答もまた、変化しなかった。抗原特異的CD8<sup>+</sup>T細胞のパーセンテージは変化しなかったが、すべての用量にわたって高い変動性があった。

## 【0585】

20

1日目の投薬の4時間後に、NK細胞濃縮リンパ球における群平均NKG2A受容体占有率は、0.5 mg/kg、10 mg/kg、および50 mg/kgのNKG2A.9で、それぞれ、試験前と比べて、81%、99%、および100%であった。43日目までに、0.5 mg/kgのNKG2A.9を投薬したサルについて、受容体占有率は、21%~45%の範囲に減少し、10 mg/kgのNKG2A.9を投薬したサルについては、受容体占有率は、72%~95%の範囲に減少した。1日目の投薬の4時間後までに、NK細胞濃縮リンパ球における群平均NKG2A受容体発現は、0.5 mg/kg、10 mg/kg、および50 mg/kgのNKG2A.9で、それぞれ、試験前と比べて、50%、52%、および58%であり、これは、NKG2A.9を投薬した後の受容体の内部移行または下方制御を示した。43日目までに、NKG2A受容体発現は、0.5 mg/kg、10 mg/kg、および50 mg/kgのNKG2A.9抗体で、それぞれ、65%~80%、47%~99%、および41%~46%の範囲に及んだ。

30

## 【0586】

結論として、NKG2A.9抗体は、50 mg/kg以下で単回静脈内投与した後、サルによって十分に耐容性であった（平均性別合計AUC[0-1008h] 365,000  $\mu$ g·h/mL）。受容体占有率および低減された受容体発現は、試験したすべての用量で観察された。

## 【実施例28】

## 【0587】

カニクイザルにおける1ヶ月の間欠用量皮下および静脈内毒性研究

40

1ヶ月研究を行って、(1)任意の所見の可能性のある可逆性を評価するため、(2)NKG2A.9に対する全身曝露を判定するため、および(3)ヒトにおけるNKG2A.9の使用を裏付けるデータを提供するために、週1回1ヶ月間カニクイザルに投与した場合のNKG2A.9抗体の可能性のある毒性を判定した。NKG2A.9を、0 mg/kg（ビヒクル）、10 mg/kg、または100 mg/kgの用量で、5匹のサル/性別/群の3つの群に皮下注射によって投与した。10 mg/kgまたは100 mg/kgのNKG2A.9の皮下投薬用の製剤には、2000 U/mLのrHuPH20が含まれた。加えて、NKG2A.9を、1 mg/kgの用量で、5匹のサル/性別の単一の群に静脈内注射（緩徐なボラス）によって投与した。すべての用量は、20 mMヒスチジン、250 mMスクロース、0.05 mMジエチレントリアミン五酢酸（DTPA）、および0.05%（w/v）ポリソルベート-80（PS-80）、pH6のビヒクルにおい

50

て、2 mL / kg で投与した。

#### 【0588】

評価の基準には、生存期間、毒物動態、臨床観察、体重、目視による推定食物消費量、身体検査（呼吸器および神経学を含む）ならびに眼科検査、臨床病理評価、免疫表現型判定、ナチュラルキラー（NK）細胞活性化、受容体発現（RE）、受容体占有率（RO）、器官重量、ならびに肉眼および顕微での病理分析が含まれた。予定されていた剖検を、1週間に1回で1ヶ月間、合計5用量の投薬後（3匹/性別/群）、および8週間の回復期間後（2匹/性別/群）に行った。

#### 【0589】

22日目に、平均NKG2A.9全身曝露（AUC [0 - 168 h]）は、10 mg / kg ~ 100 mg / kg で用量に比例して増大した。いずれの用量でも、実質的な性別による差はなかった。NKG2A.9の蓄積を、すべての用量レベルで反復投与後に観察し、平均全身曝露（AUC [0 - 168 h]）は、1日目のおよそ2.5倍 ~ 2.9倍であった。処置により生じた抗薬物 / NKG2A.9抗体の存在は、1 mg / kg（静脈内）、10 mg / kg（皮下）、または100 mg / kg（皮下）で、8日目および / またはそれ以降に、それぞれ、10匹中1匹、10匹中2匹、および10匹中3匹のサルにおいて検出され、これらは、NKG2A.9に対する平均全身曝露に実質的な影響を有さなかった。

#### 【0590】

NKG2A.9抗体の毒物動態の概要を、以下の表に示す。

#### 【0591】

#### 【表Y】

パラメーター	期間	NKG2A.9用量		
		1 mg/kg	10 mg/kg	100 mg/kg
		(静脈内)	(皮下、2000U/mL rHuPH20を含む)	(皮下、2000U/mL rHuPH20を含む)
Cmax (μg/mL)	1日目	29.4	143	1,270
	22日目	49.3/49.9	416/372	3,120/3,100
AUC(0~168時間) (μg・h/mL)	1日目	1,960	19,200	170,000
	22日目	4,820/4,850	55,500/52,700	425,000/424,000

<sup>a</sup>値は、すべての利用可能なサル/8日目(すなわち、1日目の投薬から168時間後)および / またはそれ以降に検出された検出可能な処置により生じた抗NKG2A.9抗体(ADA)のないサルのみから得られたデータを用いて計算した。

#### 【0592】

NKG2A.9関連の死亡はなく、すべてのサルは、予定されている剖検まで生存した。NKG2A.9は、臨床観察、体重、目視による推定食物消費量、心臓血管、神経学、眼科、臨床病理、または組織病理のパラメーターに対する作用がなく、すべての用量で十分に耐容性であった。

#### 【0593】

T細胞（総T、ヘルパーT、もしくは細胞傷害性T）、B細胞、またはNK細胞の数、またはNK細胞濃縮末梢血細胞集団の活性化に、NKG2A.9関連の変化はなかった。

#### 【0594】

NK細胞における用量依存的な受容体占有率（RO）が、初回投薬の4時間後に、観察された（1 mg / kg、10 mg / kg、および100 mg / kgのNKG2A.9で、

それぞれ、84%、95%、および100%）。その後、29日目までのすべての時点で、群平均RO範囲は、1mg/kgおよび10mg/kgで、それぞれ、72%~84%および94%~98%であり、100mg/kgでは最大(100%)ROであった。ROは、100mg/kgでは、完全であり、回復段階(85日目まで)の間持続したが、ROの部分的な消失が、1mg/kgおよび10mg/kgで観察された。1mg/kgでは、ROの部分的な消失が、71日目から85日目に観察され(39%の群平均RO)、これは、血清NKGA-9濃度の4μg/mL未満への下落と関連していた。10mg/kgでは、占有率の部分的な消失は、85日目に観察され(74%の群平均RO)、これは、血清NKGA-9濃度の50μg/mL未満への下落と関連していた。

【0595】

NKGA-9によるNKG2の結合は、受容体内部移行の結果として、部分的な下方制御をもたらすことが知られている。投薬段階中のNK細胞上のNKG2 REの非用量依存的低減はなく(すべての用量で、試験前の値の36~75%の全体的な範囲)、1mg/kgでは回復段階中の回復が最小限であり、10mg/kgまたは100mg/kgでは回復はなかった。

【0596】

結論として、NKGA-9は、100mg/kg/週で、1ヶ月間、カニクイザルによって十分に耐容性であり(平均AUC 425, 000μg·h/mL)、すべての用量で強力な標的結合の根拠があった。カニクイザルにおけるNKGA-9に媒介されるNK細胞NKGA/HLA-E相互作用のインビボ遮断は、免疫細胞の活性化を誘導せず、疾患のない生理学的環境において、NKGA経路の寄与が欠如しているかまたは最小限であることを示唆する。耐容性および解剖学的または臨床的病理所見の欠如に基づいて、有害事象が観察されないレベル(NOAEL)は、100mg/kgであると考えられたため、これは、最も高い非重度毒性用量(HNSTD)とも考えられる。

【実施例29】

【0597】

腫瘍におけるNKGA発現の免疫組織化学的分析

本発明者らは、NKGA-9抗体の活性が、NKGAの阻害性活性を低減させ、腫瘍部位における細胞傷害性の増強をもたらすと考えている。その結果、腫瘍優先順位付けの基準には、NKGAおよびHLA-Eの発現が含まれた。

【0598】

可能性のある腫瘍兆候を特定するため、選択した腫瘍型におけるNKGAの予備プロファイリングを、凍結切片においてFITCコンジュゲートNKGA-6(NKGA-9抗体の親クローン)を用いて評価した。NKGAは、単核細胞の少しの割合に存在し、主として、図45に示されるように、腫瘍間質に分布していた。図45は、FITCコンジュゲートNKGA-6抗体および陰性対照試薬(抗KLHヒトIgG1, 1-FITC)で染色した市販入手したヒト腫瘍サンプルにおけるNKGA染色の代表的な例を示す。図45において、「子宮頸」は、子宮頸癌を示し、「頭頸部」は、頭頸部扁平上皮細胞癌を示し、「膀胱」は、膀胱癌を示し、NSCLC-Adcは、非小細胞肺癌腺癌を示す。「St」は、腫瘍間質であり、「Tup」は、腫瘍上皮細胞である。

【0599】

凍結腫瘍切片における免疫組織化学によるNKGA発現の画像分析を行った。HALO(商標)ソフトウェアを使用した「ホットスポット」画像分析を、サンプル1つ当たり3つのスポットに行った。アイソタイプ対照での染色を、FITCコンジュゲートNKGA-6抗体での染色から差し引いた。この画像分析により、図46に示されるように、子宮頸癌および頭頸部癌における比較的高いNKGAの存在度、膀胱癌および非小細胞肺癌における中等度の発現、ならびに膵臓癌および結腸直腸癌における低い発現が明らかとなった。図46は、様々な腫瘍型にわたるNKGA発現レベルを示す。Y軸は、1.15mm<sup>2</sup>のスポット当たりの陽性細胞数を表し、結果は、平均+標準誤差として示す。

【実施例30】

## 【0600】

7つの腫瘍型におけるHLA-E発現の免疫組織化学的分析

HLA-E発現を評価するために、市販の抗HLA-E抗体（クローンMEM-E/02）を、ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織における免疫組織化学について検証した。HLA-Eは、試験した腫瘍サンプルにおいて広く発現していた。陽性染色が、腫瘍上皮および間質の両方で観察された。HALO（商標）ソフトウェアを使用した全スライド画像分析により、図47に示されるように、HNSCCおよびNSCLCにおける比較的高いHLA-Eの存在度、ならびに膵臓癌および結腸直腸癌（CRC）における低い存在度が明らかとなった。図47は、13個のHPV+頭頸部扁平上皮細胞癌（NNSCC/HPV+）、11個のHPV-頭頸部扁平上皮細胞癌（HNSCC/HPV-）、10個の非小細胞肺癌腺癌（NSCLC-ADC）、10個のHNSCC、10個の非小細胞肺扁平上皮細胞癌（NSCLC-SCC）、6個の膵臓癌、および10個の結腸直腸癌（CRC）サンプルにおける、HALOソフトウェアを使用したHLA-E発現の全スライド画像分析の結果を示す。HLA-Eの免疫反応性は、次のように計算した：「茶色」の全面積×「茶色」の平均OD/組織の全面積。データは、mm<sup>2</sup>に対して正規化した。結果を、平均+標準誤差として示す。

10

## 【0601】

腫瘍上皮細胞において、陽性染色は、主として、細胞質であった。注目すべき膜染色もまた、一部の腫瘍細胞において示された。腫瘍間質においては、陽性染色は、主として、単核細胞および間質細胞のサブセットに分布しており、同様に、一部の事例では微小血管および好中球に分布していることもあった。一般に、間質におけるHLA-E発現は、ほぼすべての事例で存在していた。しかしながら、腫瘍上皮細胞における発現は、試験したすべての腫瘍型において、サンプルごとに有意に変動していた。図48に示されるように、高レベルの腫瘍上皮発現は、ほとんどの事例で見られたが、陰性または非常に低い発現が、少数の事例で見られた。図48において、「St」は、腫瘍間質であり、「Tup」は、腫瘍上皮細胞である。図48は、複数の腫瘍におけるHLA-E発現の代表的な画像を示す。HPV+頭頸部扁平上皮細胞癌（NNSCC/HPV+）、非小細胞肺癌腺癌（NSCLC-ADC）、非小細胞肺扁平上皮細胞癌（NSCLC-SCC）、および結腸癌（CRC）に由来するFFPE切片に対する検証された市販のモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学。

20

30

## 【0602】

ウイルス由来の腫瘍を有する患者：ウイルス感染は、C型肝炎慢性感染患者において観察されたように、NK細胞においてNKG2A発現を誘導し得る。（Harrison RJ et al., "Association of NKG2A with treatment for chronic hepatitis C virus infection." Clin Exp Immunol 161:306-14 (2010)）。加えて、NKG2A+CD8<sup>+</sup>T細胞の頻度は、HPV-16+頭頸部癌を有する患者に由来するTILでは、HPV-16腫瘍と比較して高くなることが示された。（van Hall T, et al. "NKG2A checkpoint receptor expression on tumor-infiltrating CD8+ T cells restrains efficacy of immunotherapy." Cancer Res Supplement; Abstract 2999 (2017)）。本発明者らは、HPV+およびHPV-の頭頸部腫瘍に由来する生検間で、IHCによりHLA-E発現を測定することによって、頭頸部腫瘍におけるHPVステータスと、NKG2A/HLA-E経路の発現との間の関係を評価した。本発明者らの比較的少数のサンプルにおける最初の評価では、IHCによるHLA-E発現は、図48に示されるように、HPV+サンプルとHPV-サンプルとの間で有意差はなかったことが示された。本発明者らは、HPV+およびHPV-の頭頸部腫瘍に由来する生検間で、IHCによりCD8（NKG2A発現の代理物）およびHLA-E発現を測定することによって、頭頸部腫瘍におけるHPVステータスおよびNKG2A/HLA-E経路の発現を試験した。本発明者らはまた、さらなる腫瘍型およびより大きなサンプルサイズでIHC分析を継続したが、この分析は、以下の実施例31に記載されている。

40

## 【実施例31】

50



## 【 0 6 0 3 】

## 17 個の腫瘍型における H L A - E 発現の免疫組織化学的分析

本発明者らは、免疫組織化学的 ( I H C ) 評価によって、17 個の腫瘍型にわたって H L A - E 発現をプロファイリングした。本発明者らは、高レベルの H L A - E を発現する腫瘍型について、癌患者が、本明細書に記載される抗 N K G 2 A 抗体での抗腫瘍処置に対して応答する可能性が最も高いと考える。

## 【 0 6 0 4 】

H L A - E 発現を評価するために、免疫組織化学 ( I H C ) を、十分に特徴付けられている市販のモノクローナル抗体 ( クローン M E M / 0 2 ) を用いて、子宮頸、膀胱、乳房、結腸直腸腺癌 ( C R C )、子宮内膜、頭頸部扁平上皮細胞癌 ( H N S C C )、胃、膠芽腫 ( G B M )、黒色腫、非ホジキンリンパ腫 ( 濾胞性リンパ腫 )、卵巣、腎細胞 ( R C C )、膵臓、前立腺、小細胞肺癌 ( S C L C )、非小細胞肺腺癌 ( N S C L C - A D )、および非小細胞肺扁平上皮細胞癌 ( N S C L C - S Q C ) を含む、17 個の腫瘍型 / サブタイプに由来するホルマリン固定パラフィン包埋 ( F F P E ) 切片に行った。腫瘍型 / サブタイプ当たり 14 ~ 43 個のサンプルがあった。染色したスライドを、研究病理学者が評価して、組織または細胞型を特定した。すべてのスライドを、組織エレメントおよび染色の適切さに関して判断した。従来的 / 手作業によるスコア付けを、研究病理学者が行った。

## 【 0 6 0 5 】

結果は、H L A - E 発現が、様々な適応症にわたって、腫瘍細胞、免疫、および内皮細胞コンパートメントにおいて観察されたことを示した。腫瘍細胞において、陽性染色は、ヒト腫瘍型にわたって主として細胞質にあり、表面形質膜に認められた発現は限られていた。総 H L A - E 発現は、拡散的な腫瘍細胞陽性から、不均一な発現に及び、一部の事例では H L A - E 発現は低いまたはほとんどなかった。図 57 は、免疫組織化学によって評価される、17 個の異なる腫瘍型にわたる総 H L A - E 陽性スコアの箱ひげ図を示す。総 H L A - E スコアは、腫瘍細胞における細胞質および / または膜 H L A - E 陽性率を組み合わせたパーセントとして定義される。図 57 を生成するために使用したデータを、以下の表に示す。

## 【 0 6 0 6 】

10

20

30

40

50

【表 Z - 1】

腫瘍型	サンプル(N)	総腫瘍HLA-E陽性スコア <sup>1</sup>	総腫瘍HLA-E陽性パーセンテージ <sup>2</sup>	平均	中央値	標準偏差	25パーセンタイル	75パーセンタイル
膀胱癌	20	17	85%	37.3	40.0	30.4	11.5	52.5
乳癌	20	14	70%	16.3	7.5	22.9	0	21.25
多型神経膠芽腫	19	16	84.21%	9.9	5.0	15.1	2	10
胃癌	20	17	85%	32.7	15.0	36.4	2.75	58.75
腎臓癌、明細胞腎細胞	20	15	75%	20.4	9.0	23.4	1.5	37.5
NSCLC-AD	40	38	95%	35.8	25.0	33.6	6	61.25
NSCLC-SCC	40	37	92.50%	39.1	30.0	32.0	10	65
黒色腫	20	18	90%	32.0	10.0	35.0	1.88	62.5
子宮内膜癌	20	19	95%	27.3	12.5	31.9	3	41.25
卵巣癌	20	20	100%	25.0	16.5	25.0	9.88	25
CRC	39	38	97.44%	30.2	20.0	28.7	8	47.5

【表 Z - 2】

NHL、濾胞性リンパ腫	20	20	100%	58.3	61.3	26.3	32.38	77.5
HNSC C	40	39	97.50%	48.7	46.5	30.9	19	76.25
前立腺癌	20	20	100%	5.4	4.5	4.4	2.38	5.5
子宮頸癌	20	20	100%	54.7	62.5	27.2	28.75	75
脾臓	43	41	95.35%	44.1	42.5	33.7	10	72.5
SCLC	14	9	64.29%	14.9	4.5	20.6	0	23.75
<sup>1</sup> 「総腫瘍HLA-E陽性スコア」を計算するために、HLA-E値に対して1%カットオフを使用した。換言すると、腫瘍の1%以上がHLA-E陽性(細胞質および/または膜HLA-E)であった場合に、サンプルを「陽性」として標識した。 <sup>2</sup> 「総腫瘍HLA-E陽性パーセンテージ」は、腫瘍型におけるHLA-E陽性患者のパーセンテージである。								

図57において、箱ひげ図の箱のそれぞれは、25パーセンタイルにおける総腫瘍HLA-E陽性値を示し、箱のそれぞれの中央線は、中央値であり、箱のそれぞれの上限は、75パーセンタイルの値を示す。

#### 【0608】

結論として、腫瘍適応症にわたって、またその中で、動的な総HLA-E発現範囲が存在した。本発明者らは、腫瘍細胞において高いHLA-E発現を有する癌患者が、本明細書に記載される抗NKG2A抗体での抗腫瘍処置に対して応答する可能性がより高いと考える。非ホジキンリンパ腫（濾胞性リンパ腫）、子宮頸、HNSCC、膵臓、NSCLC、および膀胱腫瘍は、最も高い総HLA-E発現レベルを有し、したがって、これらの癌を有する患者は、本明細書に記載される抗NKG2A抗体での抗腫瘍処置に対して応答する可能性が最も高い。この研究により、臨床開発において、例えば、HNSCC、RCC、NSCLC、およびCRC癌を含むように適応症の選択肢を優先順位付けするのを補助するための腫瘍プロファイリングデータが得られた。

10

#### 【0609】

前立腺、GBM、およびSCLCは、最も低いHLA-E発現レベルを示した。いずれにせよ、本発明者らは、低いHLA-E発現を有する腫瘍型を有する患者もまた、本明細書に記載される抗NKG2A抗体での抗腫瘍処置に応答するであろうと考える。この研究を、以下により詳細に記載する。

#### 【0610】

材料および方法

20

組織サンプル

全体として、2つのサンプルセットから17個の癌型/サブタイプを研究した。結腸直腸腺癌（CRC）、頭頸部扁平上皮細胞癌（HNSCC）、非小細胞肺腺癌（NSCLC-AD）、非小細胞肺扁平上皮細胞癌（NSCLC-SQC）、膵臓癌、および小細胞肺癌（SCLC）を含む、6つの腫瘍型/サブタイプの完全サイズのFFPEスライドを、1腫瘍型当たり14~24個のサンプルを用いて研究した。FFPE組織サンプルを、種々の市販組織供給業者（BioIVT、Detroit、MI；BioChain Institute Inc. Newark、CA；Conversant Biologicals Inc、Huntsville、AL；Cooperative Human Tissue Network、Philadelphia、PA；Indivumed GmbH、Lewisburg、PA；The MT Group Inc. Van Nuys、CA；TriStar Technology Group LLC、Rockville、MD）から入手した。さらに、膀胱、乳房、GBM、胃、RCC、NSCLC-AD、NSCLC-SQC、黒色腫、子宮内膜、卵巣、CRC、HNSCC、前立腺、子宮頸、膵臓癌、および非ホジキンリンパ腫（濾胞性リンパ腫）を含む16個の腫瘍型/サブタイプを含む多重腫瘍ブロック（MTB）を、20症例/腫瘍型で、研究した。それぞれのMTBは、FFPEブロック当たり単一の適応症の5症例、および陽性対照として1つの過形成扁桃腺を含んだ。MTBは、BMSのために、Folio Biosciences（現Discovery Life Sciences）によって作製された。

30

#### 【0611】

抗体および試薬

40

- ・マウスモノクローナル抗体抗ヒトHLA-E、クローンMEM/02（Abcam、Cambridge、MA、カタログab2216、ロットGR251472-15）
- ・マウスIgG1アイソタイプ、クローン11711（R&D Systems、Minneapolis、MN、カタログMAB002、ロットIX2415091）
- ・結合ポリマー精査検出（Leica Biosystems、Buffalo Grove、IL、カタログDS9800、ロット46396および46794）
- ・結合エピトープ賦活2（Leica Biosystems、Buffalo Grove、IL、カタログAR9640、ロットER20180）
- ・タンパク質遮断、無血清（Agilent Technologies、Santa C

50

l a r a、C A、カタログ X 0 9 0 9、ロット 1 0 1 1 7 1 7 2 ) ヒトガンマグロブリン ( S i g m a - A l d r i c h、S t . L o u i s、M O、カタログ G - 4 3 8 6、ロット S L V M 0 5 2 4 V )

#### 【 0 6 1 2 】

##### I H C 方法

4  $\mu$ m の F F P E 切片を調製し、パラフィンに浸漬し、使用するまで 4 で保管した。M T B のために、4  $\mu$ m の切片を切り出し、使用するまで真空密封バッグにおいて 4 で保管した。それぞれのアイソタイプ対照を含むすべての I H C アッセイは、L e i c a B o n d R X プラットフォームを使用した自動化 I H C 用に最適化した。同じ過形成ヒト扁桃腺組織ブロックに由来する F F P E 切片を、すべての I H C 実行の陽性対照として使用した。

10

#### 【 0 6 1 3 】

免疫染色のために、F F P E スライドを焼成し、キシレンにおいて脱パラフィン処理し、勾配エタノール系列に通して再水和させた後、日常的な組織学手順を行った。抗原賦活は、L e i c a B o n d R X 機器において行った。自動化 I H C 染色手順を、L e i c a B o n d R X において室温で行った。簡単に述べると、スライドを、1 0 分間ペルオキシダーゼブロックでブロッキングした後、非特異的タンパク質ブロックで 2 0 分間ブロッキングした。一次抗体を、6 0 分間インキュベートした後、精査リンカーとともに 3 0 分間インキュベートした。次いで、スライドを、3 0 分間、精査ポリマーとともにインキュベートした。最後に、スライドを D A B 基質 - 色素原溶液と 6 分間反応させ、L e i c a ヘマトキシリンで 8 分間対比染色し、次いで、日常的な組織学手順に従って、脱水し、清浄し、P e r m o u n t とともにカバーガラスをかけた。

20

#### 【 0 6 1 4 】

免疫染色した後、すべてのスライドを、A p e r i o A T 2 全スライドスキャナー ( L e i c a B i o s y s t e m s I m a g i n g、V i s t a、C A ) を使用して 2 0 倍でスキャンし、画像を、A p e r i o e S l i d e M a n a g e r S o f t w a r e で保管および整理した。

#### 【 0 6 1 5 】

##### 病理評価および手作業でのスコア付け方法

研究病理学者が、スライドを評価して、組織の適切さおよび染色の品質を判定した。研究病理学者は、H L A - E I H C 染色したスライドを手作業でスコア付けし、アイソタイプおよび陽性対照スライドを評価した。病理評価は、腫瘍含量を判定し、腫瘍型を確認するために、H & E 評価からなっていた。H L A - E 免疫組織化学 ( I H C ) 染色スライドは、腫瘍および免疫細胞陽性率に関して、全スライドのスキャン画像を使用して手作業でスコア付けした。アイソタイプ対照スライドにおいてバックグラウンド染色は観察されなかった。腫瘍細胞 ( T C )、免疫細胞 ( I C )、および内皮細胞における H L A - E 発現を、評価した。細胞質 H L A - E および膜 H L A - E のパーセンテージを記録した。総 H L A - E スコアは、H L A - E 発現の重要な報告できるデータであり、これは、腫瘍細胞における細胞質および / または膜 H L A - E の陽性率を合わせたもので構成され、総腫瘍細胞に対する H L A - E 陽性パーセントとして報告した。H L A - E 陽性免疫細胞および内皮の主要な地理的位置とともに、H L A - E 免疫細胞陽性パーセントもまた、評価した。

30

40

#### 【 0 6 1 6 】

##### 結果

H L A - E は、過形成扁桃腺において拡散的に陽性であった。H L A - E 膜 / 細胞質染色は、腺窩上皮、胚中心、および毛包間帯に認められ、外套帯で強度が最も強かった。腫瘍組織において、特異的 H L A - E 発現が、腫瘍細胞、免疫細胞、および内皮細胞において観察された。H L A - E の細胞質および膜の局在化が、適応症全体で腫瘍細胞内で認められ、弱い ( 強度 1 + ) ~ 強い ( 強度 3 + ) の強度の動的範囲を示した。H L A - E 発現は、ヒト腫瘍型にわたって主として細胞質にあり、形質膜に認められた発現は限られてい

50

た。総HLA-E発現は、拡散的な腫瘍細胞陽性から、不均一な発現に及び、一部の事例ではHLA-E発現は低いかまたは非常に低かった。図59に示されるように、子宮頸、HNSCC、膵臓、NSCLC、膀胱、および非ホジキンリンパ腫腫瘍は、総HLA-E発現レベルが最も高く、一方で前立腺、GBM、およびSCLCは、最も低かった。RCCは、試験した腫瘍型の中で膜HLA-Eの発現レベルが最も高かったが、総HLA-Eレベルは比較的低かった。

#### 【0617】

##### 結論

結論として、データは、種々の腫瘍適応症にわたって、またその中で、動的な総HLA-Eの発現範囲を示した。子宮頸、HNSCC、膵臓、NSCLC、膀胱腫瘍は、総HLA-E発現レベルが最も高く、一方で前立腺、GBM、およびSCLCは、最も低い発現頻度を示した。この研究により、本明細書に記載される抗NKG2A抗体の臨床開発において、例えば、HNSCC、RCC、NSCLC、およびCRC癌を含むように適応症の選択肢を優先順位付けするのを補助するための腫瘍プロファイリングデータが得られた。いくつかの実施形態では、本発明者らは、低いHLA-E発現を有する腫瘍型を有する患者もまた、本明細書に記載される抗NKG2A抗体での抗腫瘍処置に応答するであろうと考える。

#### 【実施例32】

#### 【0618】

可溶性HLA-Eの高い血清レベルを有する患者

黒色腫を有する癌患者は、健常ドナーと比較して、高い力価の血清中の可溶性HLA-Eを示す。(Allard M et al., "Serum soluble HLA-E in melanoma: a new potential immune-related marker in cancer," PLoS One, 6:e21118 (2011))。

#### 【0619】

NSCLCを有する患者におけるニボルマブの臨床試験から得られた最近のデータ(Checkmate 063)は、高いsHLA-Eを有する患者が、ニボルマブに対する低い応答率を有することを示唆している。(Rebmann V et al., "Soluble HLA-G and -E (sHLA-G/E) as potential biomarkers of clinical outcomes in patients (pts) with advanced, refractory squamous (SQ) NSCLC treated with nivolumab (NIVO): CheckMate 063", Cancer Res; AM2017-CT126 (2017))。

#### 【0620】

本発明者らは、腫瘍において高いHLA-E発現レベルを有する患者が、単独または例えばニボルマブとの組合せのいずれかで、NKG2A.9抗体を含む、本明細書に記載される抗NKG2A抗体での処置により利益を得られる可能性が高いと考える。いくつかの実施形態では、医療従事者は、特定のレベルのHLA-E、例えば可溶性HLA-Eを有する患者を、本明細書に記載される抗NKG2A.9抗体での治療に選択する。他の実施形態では、医療従事者は、特定のレベルのCD8+発現(NKG2A発現の代理物として)を有する患者を、本明細書に記載される抗NKG2A.9抗体での治療に選択する。

#### 【0621】

sHLA-E(LLQ: 11 pg/mL)を測定するための選択的および感受性SIA-MOAに基づくイムノアッセイを開発し、これを使用して、2つの独立したサンプルセットを試験した:(A)健常対照に由来する血清および血漿(n=17人)および6つの癌型の患者(癌型1つ当たりn=10人の患者)を含む第1のセット(図49A)、ならびに(B)100人の健常対照および100人の肺癌患者の第2のセット(図49B)。いずれのセットにおいても、患者間の変動性が観察され、健常ドナーおよび癌患者で範囲は類似であった。このアッセイにより、このアッセイを使用したニボルマブに対する応答の予測マーカーとして、可溶性HLA-Eレベルを確認する。

#### 【0622】

図49に示されるように、それぞれの腫瘍型内で、HLA-E発現に関して有意な患者間変動性が、観察された。本発明者らは、高い腫瘍HLA-Eおよび高いCD8+(NK

10

20

30

40

50

G 2 A 発現の代理物として C D 8 + を使用) を有する患者が、C D 8 + T および N K 細胞の抗腫瘍活性を回復させるための N K G 2 A 阻害により利益を得られると考える。

【実施例 3 3】

【0 6 2 3】

N K G 2 A . 9 抗体を用いたフェーズ 1 / フェーズ 2 研究

本発明者らは、癌を治療するための安全かつ有効な治療法を開発するために、N K G 2 A . 9 抗体を用いてフェーズ I / I I 研究を行う。いずれの機序によっても束縛されるものではないが、治療法は、P D - L 1 耐性 / 不応性腫瘍において、チェックポイント阻害剤に対する T 細胞応答を回復させ、かつ / または N K 濃縮固形腫瘍において N K 活性を増強させる。

【0 6 2 4】

臨床開発計画を、以下の表 9 に要約する。

【0 6 2 5】

【表 9】

表9:抗NKG2A抗体の臨床開発計画

ニボルマブを伴う抗NKG2A抗体	
ニボルマブと組み合わせた抗NKG2A抗体でのチェックポイント遮断は、抗PD-L1療法に耐性もしくは不応性であるか、または抗PD-L1療法に対する不良な応答が関連する腫瘍において、利益を拡張し、応答を深める相乗作用がある。	<u>患者の選択:</u> 公知の抗PD-1活性を有するが完全な応答に満たない、かつHLA-Eおよび/もしくはCD8(NKG2A発現の代理物として)の高い発現を有する、炎症性もしくは高TMB腫瘍を有すること、ならびに/またはウイルス性の原因が関係し、かつCD8(NKG2A代理物)および/もしくはHLA-Eの高い発現がある、腫瘍を有すること、ならびに/または抗PD-1処置後に再発し、CD8(NKG2A代理物)および/もしくは総腫瘍HLA-Eの高い発現を有する、腫瘍を有すること。
他のI-O剤および多重チェックポイントの組合せを伴う抗NKG2A抗体	
複数のチェックポイント阻害剤と組み合わせた抗NKG2A抗体は、冗長なチェックポイント経路によりI-O耐性を克服し、臨床利益を最適化する。	<u>患者の選択:</u> 複数の免疫チェックポイントタンパク質の発現を有する炎症性または高TMB腫瘍を有すること

【0 6 2 6】

N K G 2 A . 9 抗体の臨床開発は、ヒトにおける初回 ( F I H ) フェーズ 1 / 2 研究で開始する。初回単剤療法用量漸増を行って、安全性、最大耐用量 ( M T D ) または最大投与用量、P K、P D、および臨床活性の予備評価を判定する。静脈内投与経路を、まず、研究において使用し、皮下投与は研究の他のアームで使用する。あるいは、静脈内投与経路を使用してもよい。ずらして開始することにより、図 5 0 に例示されるように、並行した用量漸増が、ニボルマブと組み合わせた N K G 2 A . 9 抗体で生じる。安全性、M T D、または最大投与用量、P K、P D、および臨床活性の予備評価を、次に、併用療法で評価する。三重チェックポイント遮断の組合せもまた、用量漸増中に評価し、これには、N K G 2 A . 9 抗体、ニボルマブ、およびレマトリマブ ( 抗 L A G - 3 )、抗 T I M - 3、抗 T I G I T、イピリムマブ、C T L A - 4 N F、もしくは P r o b o d y を含むがこれらに限定されない他のチェックポイント阻害剤、または例えば、その他の治療法の中でもとりわけ、化学療法、シグナル伝達剤、例えば、セツキシマブを含むその他の抗癌療法

が含まれる。

【0627】

漸増および拡大コホートの患者／腫瘍の選択は、The Cancer Genome Atlas (TCGA) 発現プロファイル、内部ニボルマブ試験から得られた発現プロファイル、CD8レベル(NKG2Aレベルの代理物として)に関する腫瘍サンプルのプロファイリング、ならびにウイルスにより誘導される腫瘍を含む、腫瘍および血清サンプルのHLA-Eに関するプロファイリングの進行中の分析に基づくであろう。例えば、患者の選択は、図50に例示されるように、腫瘍がCD8+(NKG2Aの代理物として)およびHLA-E+である患者を選択することに基づくであろう。別の実施形態では、患者の選択はまた、高い炎症または腫瘍突然変異量を有する腫瘍に基づくであろう。

10

【0628】

この研究に登用される患者は、単独またはニボルマブと組み合わせた抗NKG2Aでの治療が、腫瘍におけるCD8+ TおよびNK細胞の数または機能的活性を増大させるという仮説を試験するために、治療前および治療中の生検、ならびに末梢血サンプル系列を提供する必要がある。腫瘍免疫微小環境におけるそのような変化が、臨床応答と相関するかどうかを分析するために、特定の注意が払われる。薬力学研究により、標的結合、T細胞活性化、NKG2A表面発現の変化、IFN-、および血清sHLA-Eのマーカーを評価する。NKG2A陽性およびHLA-E+腫瘍(非小細胞肺癌(NSCLC)、腎細胞癌(RCC)、および頭頸部扁平上皮細胞癌(HNSCC)を含むがこれらに限定されない)、ならびにウイルス起源の腫瘍(頭頸部、子宮頸、肝細胞癌)を有する対象が、含まれてもよい。対象は、抗PD-1/PD-L1療法に耐性/不応性である腫瘍、または抗PD-1/PD-L1療法に非感受性となることが報告されている腫瘍を有し得る。あるいは、対象は、PD-1/PD-L1治療に対してナイーブであってもよい。

20

【0629】

配列表を、以下の表に提供する。

【0630】

30

40

50

【表 10 - 1】

配列表		
配列番号	名称	配列
1	ヒト NKG2A ヌクレオ チド配列 (CCDS86 25.1)	ATGGATAACC AAGGAGTAAT CTACTCAGAC CTGAATCTGC CCCCAAACCC 50 AAAGAGGCAG CAACGAAAAC CTAAAGGCAA TAAAAACTCC ATTTTAGCAA 100 CTGAACAGGA AATAACCTAT GCGGAATTAA ACCTTCAAAA AGCTTCTCAG 150 GATTTTCAAG GGAATGACAA AACCTATCAC TGCAAAGATT TACCATCAGC 200 TCCAGAGAAG CTCATTGTTG GGATCCTGGG AATTATCTGT CTTATCTTAA 250 TGGCCTCTGT GGTAAAGATA GTTGTTATTC CCTCTACATT AATACAGAGG 300 CACAACAATT CTCCCTGAA TACAAGAACT CAGAAAGCAC GTCATTGTGG 350 CCATTGTCCT GAGGAGTGGG TTACATATTG CAACAGTTGT TACTACATTG 400 GTAAGGAAAG AAGAACTTGG GAAGAGAGTT TGCTGGCCTG TACTTCGAAG 450 AACTCCAGTC TGCTTTCTAT AGATAATGAA GAAGAAATGA AATTCTGTGC 500 CATCATTTCA CCATCCTCAT GGATTGGTGT GTTTCGTAAC AGCAGTCATC 550 ATCCATGGGT GACAATGAAT GGTTCGCTT TCAAACATGA GATAAAAGAC 600 TCAGATAATG CTGAACCTAA CTGTGCAGTG CTACAAGTAA ATCGACTTAA 650 ATCAGCCCAG TGTGGATCTT CAATAATATA TCATTGTAAG CATAAGCTTT 700 AG 702
2	ヒト NKG2A アミノ酸 配列 (GenBan k NP_0022 50.2)	MDNQGVYSD LNLPPNFKR QQRKPKGNKNS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPE KLIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100 HNMSSLNTRT QKARHCGHC FEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150 NSSLLSIDNE EEMKFLSII SPSSWIGVERN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200 SDNAELNCAV LQVNRKSA QCGSSIIYHCK HKL 233
3	ヒト NKG2C アミノ酸 配列 (GenBan k; CAA0492 2.1)	MSKQRGTFSE VSLAQDPRRQ QREPKGNKSS ISGTEQEIFY VELNLQNPSL 50 NHQGIDKIYD CQGLLPPEK LTAEVLGIIIC IVLMAVTLKT IVLIPFLEQN 100 NSSPNTRTQK ARHCGHCPSE WITYSNSCY YIGKERRTWEE SLLACTSKNS 150 SLLSIDNEEE MKFLASILPS SWIGVFRNSS HHPWVTINGL AFKHKIKDSD 200 NAE LNCAVLQ VNRLKSAQCG SSMIYBCKHK L 231
NKG2A.9 抗体 (VH-I107T フレームワーク逆転および脱アミド化部位を除去するための VK-N30S を有する 13F3.A4 抗体) 配列番号 4~17, 163)		
4	NKG2A.9 軽鎖ヌク	gccatccagt tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga 50

10

20

30

40

50



【表 10 - 2】

配列表		
配列番号	名称	配列
	レオチド配列 (C末端「tag」終止コードを含む)	cagagtcacc atcacttgcc gggcaagtea gggcatttec agtgctttag 100 cctgggtatca gcagaaacca gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat 150 gcctccagtt tgaaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtggatc 200 tgggacagat ttcaactetca ccatacagcag cctgcagcct gaagattttg 250 caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac cttcggccaa 300 gggacacgac tggagattaa acgtacggtg gctgcaccat ctgtcttcat 350 ctctccgccca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt 400 gcctgctgaa taacttctat ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagtg 450 gataaacgcc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga 500 cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag 550 cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatacagggc 600 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645
5	NKG2A.9 軽鎖アミノ酸配列	AIQLTQSPFS LSASVGERVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLSKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQMKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
6	NKG2A.9 重鎖ヌクレオチド配列 (NKG2A.11-G1.3f 重鎖ヌクレオチド配列と同じ) (C末端「tag」終止コードを含む)	gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggg ctgggtcaagc cggggggggtc 50 cctgagactc tcctgtgcag cctctggatt caccttcagt tcccatagta 100 tgaactgggt ccgccaggct ccaggggaagg ggcctggagtg ggtctcagcc 150 ataagtagta gtagtagtta catatactac gcagactcag tgaagggccg 200 attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctcaactgtat ctgcaaatga 250 acagccctgag agcccgaggac acggctgtgt attactgtgc gagagaagag 300 tggggggctac cctttgacta ctggggccag ggaaccctgg tcaccgtctc 350 ctacagctagc accaagggcc catcggtctt cccctcggca cctcctcca 400 agagcacctc tgggggcaca gcggccctgg gctgcctggt caaggactac 450 ttccccgaac cgggtgacggt gtctgtggaac teaggcgccc tgaccagcgg 500 cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc tactcctca 550

10

20

30

40

50

【表 10 - 3】

配列表		
配列番号	名称	配列
		gcagcgtggt gaccgtgcc tccagcaget tgggcaccea gacctacatc 600 tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aaggtggaca agagagttga 650 gcccaaatct tctgacaaaa ctccacatg cccaccgtgcc cagcaactg 700 aagccgaagg ggccccgtca gtcttctctct tcccccaaa acccaaggac 750 accctcatga tctcccgac cctgagggtc acatgcgtgg tggtaggagt 800 gagccacgaa gaccctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg gacggcgtgg 850 aggtgcatga tgccaagaca aagcccgagg agggagcagta caacagcacg 900 tacagtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg 950 caaggagtac aagtgcagg tctccaaaca agccctccca gccccatcg 1000 agaaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 1050 accctgcccc catcccgga ggagatgacc aagaaccagg tcagcctgac 1100 ctgcctggtc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga 1150 gcaatgggca gccggagaac aactacaaga ccacgectcc cgtgctggac 1200 tccgacggct ccttcttctt ctatagcaag ctccaccgtg acaagagcag 1250 gtggcagcag gggaaacgtt tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctgtc 1300 acaaccacta caccgagaag agcctctccc tgtccccggg ttga 1344
7	NKG2A.9 重鎖アミ ノ酸配列 (NKG2A. 11-G1.3f 重鎖アミ ノ酸配列 と同じ) (末端リ シンは不 在であ る)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWQO GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKFSNT KVDKRVFPA CDKHTTCEFC FAPBAEGAPS VFLEFPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLRPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNNHYTQK SLSLSPG 447
163	NKG2A.9 重鎖アミ ノ酸配列	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWQO GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY

10

20

30

40

50

【表 10 - 4】

配列表		
配列番号	名称	配列
	(NKG2A.11-G1.3F 重鎖アミノ酸配列と同じ)  (末端リシンを有して示す)	150 FEPEPTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPFC PAPEAEGAPS VFLFPFKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTFPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 447
8	NKG2A.9 重鎖可変ドメイン  (NKG2A.11 重鎖可変ドメインと同じ)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYVCAREE 100 WGLPFDYWGG GTLVTVSS 118
9	NKG2A.9 軽鎖可変ドメイン	AIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SALANYQQKP GKAPKLLIYD 58 ASSLKSGVPS RFSQSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTGLEIK 107
10	NKG2A.9 VH CDR1	SHSMN 5
11	NKG2A.9 VH CDR2	AISSSSSYIY YADSVKG 17
12	NKG2A.9 VH CDR3	EEWGLPFDY 9
13	NKG2A.9 VL CDR1	RASQGISSAL A 11
14	NKG2A.9 VL CDR2	DASSLKS 7
15	NKG2A.9 VL CDR3	QQFNSYPLT 9
16	NKG2A.9 重鎖定常ドメイン	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPTVS WNSGALTSGV 50 HTFPFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCFAPAEAGA PSVFLFPFKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS 150

10

20

30

40

50

【表 10 - 5】

配列表		
配列番号	名称	配列
		HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNNHYT QKSLSLSPG 329
17	NKG2A.9 軽鎖定常 ドメイン	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFVPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NQQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
NKG2A.11 抗体(13F3.A4 VH-II07T, VK-N30P)(VH-II07T フレームワーク逆転および脱アミ ド化部位を除去するための VK-N30P を有する 13F3.A4)(配列番号 18~21、164~165) (配列番号 6~7(それぞれ、NKG2A.11 重鎖配列スクレオチドおよびアミノ酸配列))		
18	NKG2A.1 1 軽鎖ス クレオチ ド配列  (C 末端 「tag」 終止コ ドンを含 む)	gccatccagt tgaccacagtc tccatccctcc ctgtctgcat ctgtaggaga 50 cagagtcacc atcacttgcc gggaagtcga gggcattccc agtgcttttag 100 cctgggtatca gcagaaacca gggaaagctc ctaagctcct gatctatgat 150 gccatccagtt tgaaaagtgg ggtcccatca aggttcagcg gcagtgagtc 200 tgggacagat ttcactctca ccatcagcag cctgcagcct gaagattttg 250 caacttatta ctgtcaacag tttaatagtt accctctcac ctccggccaa 300 gggacacgac tggagattaa acgtacggcg gctgcacccat ctgtcttcat 350 cttcccgcca tctgatgagc agttgaaatc tggaaactgcc tctgttgtgt 400 gccctgctgaa taacttctat ccagagaggg ccaaagtaca gtggaagggtg 450 gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga 500 cagcaaggac agcacctaca gccctcagcag caccctgacg ctgagcaaa 550 cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct ggaagtcac ccatcagggc 600 ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gtttag 645
19	NKG2A.1 1 軽鎖ア ミノ酸配 列	XIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 AGSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSFVTKSFN RGEC 214

10

20

30

40

50

【表 10 - 6】

配列表		
配列番号	名称	配列
164	NKG2A.1 I 軽鎖可 変ドメイ ンアミノ 酸配列	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
165	NKG2A.1 I 軽鎖定 常ドメイ ンアミノ 酸配列	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLISKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
20	オステオ ネクチン シグナル ヌクレオ チド配列	atgagggcctt ggatctctctt tctgctctgc ctggccgggc gcgccttggc 50 c 51
21	オステオ ネクチン シグナル アミノ酸 配列	MRAWIFFLLC LAGRALA 17
NKG2A.6 抗体(13F3.A4 抗体)(配列番号 22～36、166～169)		
22	13F3.A4 重鎖のシ グナルア ミノ酸配 列	MELGLRWVFL VAILEGVQC 19
23	13F3.A4 VH(重鎖 可変領域 ヌクレオ チド配 列)  (57 スク レオチド のシグナ ル配列を 含む)	ATGGAAGTGG GGCTCCGCTG GGTTCCTT GTTGCTATTT TAGAAGGTGT -57 CCAGTGT -7  GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CGGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT TCCCATAGTA 100 TGAAGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCC 150 ATAAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAAGAG 300 TGGGGGGCTAC CCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAATCCTGG TCACCGTCTC 350 CTCA 354
166	13F3.A4 VH(重鎖 可変領域)	GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CGGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT TCCCATAGTA 100

10

20

30

40

50

【表 10 - 7】

配列表		
配列番号	名称	配列
	ヌクレオチド配列) (シグナル配列なし)	TGAACTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GCCTGGAGTG GGTCTCAGCC 150 ATAAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCAACATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAAGAG 300 TGGGGGCTAC CCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAATCCTGG TCACCGTCTC 350 CTCA 354
24	13F3.A4 VH 重鎖 可変領域 アミノ酸 配列 (19 アミ ノ酸のシ グナル配 列を含 む)	MELGLRWVFL VAILEGVQC -19  EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA FGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVNGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSS 118
167	13F3.A4 VH アミ ノ酸配列 (シグナ ル配列な し)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA FGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVNGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSS 118
25	13F3.A4 VL スク レオチド 配列 (66 スク レオチド のシグナ ル配列を 含む)	ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT -66 CCCAGGTGCC AGATGT -16  GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAAAC AGTGCTTTAG 100 CTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACCTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCTCTCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
168	13F3.A4 VL スク レオチド 配列 (シグナ ル配列な し)	GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAAAC AGTGCTTTAG 100 CTTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACCTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCTCTCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
26	13F3.A4	MDMRVPAQLL GLLLLWLPQA RC -22

10

20

30

40

50

【表 10 - 8】

配列表		
配列番号	名称	配列
	VL (軽鎖可変領域アミノ酸配列) (22 アミノ酸のシグナル配列を含む)	AIQLTQSPSS LSASVGDRV ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
169	I3F3.A4 VL アミノ酸配列 (シグナル配列なし)	AIQLTQSPSS LSASVGDRV ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
27	I3F3.A4 VH CDR1	SHSMN 5
28	I3F3.A4 VH CDR2	ATSSSSSYIY YADSVKG 17
29	I3F3.A4 VH CDR3	EEWGLFFDY 9
30	I3F3.A4 VL CDR1	RASQGINSAL A 11
31	I3F3.A4 VL CDR2	DASSLKS 7
32	I3F3.A4 VL CDR3	QQFNSYPLT 9
33	I3F3.A4 CH 重鎖定常領域	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFP AVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVENESNGQP ENNYKTTTPV LDSOGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFPSCSV MHEALNNHYT QKSLSLSPGK 330
34	I3F3.A4 CL 軽鎖定常領域	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSL TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107

10

20

30

40

50

【表 10 - 9】

配列表		
配列番号	名称	配列
35	13F3.A4 重鎖アミノ酸配列 (シグナル配列なし)  末端リシンは不在であり得る。	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWQO GILVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKKVEPKS CDKHTCPPC PARELLGGPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNMYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWMNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFECVSMH EALHNNHYTQK SLSLSPG(K) 448
36	13F3.A4 軽鎖アミノ酸配列 (シグナル配列なし)	AIQLTQSFSS LSASVGDRTV ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSQVPS RFSSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSSLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.5 抗体(11H9.A1 抗体(配列番号 37～50、170-173))		
37	11H9.A1 VH (重鎖可変領域ヌクレオチド配列)  (57 スクレオチドのシグナル配列を含む)	ATGGAACTGG GGCTCCGCTG GGTTCCTT GTTGCTATTT TAGAAGGTGT -57 CCACTGT -7  GAGGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CTGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATAGCA 100 TGAAGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCATCC 150 ATTAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCAGTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGACTACTA 300 TGGTTCGGGG AGATTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT 350 CTCCTCA 357
170	11H9.A1 VH (重鎖可変領域ヌクレオチド配列)	GAGGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CTGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATAGCA 100 TGAAGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCATCC 150 ATTAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCAGTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGACTACTA 300

10

20

30

40

50



【表 10 - 10】

配列表		
配列番号	名称	配列
	(シグナル配列なし)	TGCTTCGGGG AGATTTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC TGGTCACCGT 350 CTCCTCA 357
38	11H9.A1 VH(重鎖 可変領域 アミノ酸 配列)  (19 アミ ノ酸のシ グナル配 列を含 む)	MELGLRWVFL VAILEGVQC -19  EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS 50 TSSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLL 100 WFGEIFDYWG QGTLLTVSS 119
171	11H9.A1 VH(重鎖 可変領域 アミノ酸 配列)  (シグナ ル配列な し)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS 50 TSSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLL 100 WFGEIFDYWG QGTLLTVSS 119
39	11H9.A1 VL(軽鎖 可変領域 ヌクレオ チド配 列)  (66ヌク レオチド のシグナ ル配列を 含む)	ATGGACATGA GGGTCCCCGC TCAGCTCCTG GGGCTTCTGC TGCTCTGGCT -66 CCCAGGTGCC AGATGT -16  GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAGC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTAAATAGTT ACCCGATCAC CTTGGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
172	11H9.A1 VL(軽鎖 可変領域 ヌクレオ チド配 列) (シグナ ル配列な し)	GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAGC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTAAATAGTT ACCCGATCAC CTTGGGCCAA

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 1 1】

配列表		
配列番号	名称	配列
		300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321 MDMRVPAQLL GLLLLWLPGA RC -22
40	11H9.A1 VL (軽鎖可変領域アミノ酸配列)  (22 アミノ酸のシグナル配列を含む)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPITFGQ 100 GTRLEIK 107
173	11H9.A1 VL (軽鎖可変領域アミノ酸配列)  (シグナル配列なし)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPITFGQ 100 GTRLEIK 107
41	11H9.A1 VH CDR1	SYSMN 5
42	11H9.A1 VH CDR2	SISSSSSYIY YADSVKG 17
43	11H9.A1 VH CDR3	LLWFGEIFDY 10
44	11H9.A1 VL CDR1	RASQGISSAL A 11
45	11H9.A1 VL CDR2	DASSLKS 7
46	11H9.A1 VL CDR3	QQFNSYPIT 9
47	11H9.A1 CH 重鎖定常領域	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAAIGCLVK DYFFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSVVT VPSSSLGTQT YICNVNKKPS NTKVDKRVET 100 KSCDKHTICP PCPAPELLGG PSVFLPPPK KDTLMISRTPEVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTFPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNCK 200 EYKCKVGNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSEFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFPSCSY MHEALNNHYT QKSLSLSPGK 330
48	11H9.A1 CL 軽鎖定常領域	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYFPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107

10

20

30

40

50

【表 10 - 12】

配列表		
配列番号	名称	配列
49	11H9.A1 重鎖 (シグナル配列なし)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMNWRQA PGKGLEWVSS 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLL 100 WFGEIFDYWG QGTLVTSSA STKGPSVFPPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150 YFPEPVTQSW NSGALTSGVH TFFAVLQSSG LYSLSVSVTV PSSSLGTQTY 200 ICNVNHHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLEPPKPK 250 DTLMISRTPE VTCVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300 TYRVVSVLTQV LQDQWLNQKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQFREPQV 350 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 400 DSGLSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVN HEALHNHYTQ KSLSLSPGK 449
50	11H9.A1 軽鎖 (シグナル配列なし)	AIQLTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ FNSYPITFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VIACEVTHQG 200 LSSEPTKSFN RGEC 214
NKG2A.16 抗体(2G6.C2 抗体)(配列番号 51~64)		
51	2G6.C2 VH(重鎖 可変領域 ヌクレオ チド配 列)	GAGGTGCAAC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTACAGC GGGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGAGC CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCAATAGCA 100 TGAAGTGGAT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTGACACAC 150 ATTAGTAGTG GTAGCAGTTT CATATACTAC GCAGACTCTG TGAAGGGCCG 200 ATTACCATC TCCAGAGACA ATGCCAAGAA CTCTCTGTCT CTGCAATGA 250 ACAGCCTGAG AGACGAAGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGATGAC 300 TGGGGAATTG ATGCTTTTAA TATCTGGGGC CAAGGGACAA TGGTCACCGT 350 CTCTTCA 357
52	2G6.C2 VH(重鎖 可変領域 アミノ酸 配列)	EVQLVESGGG LVQGGGSLRL SCAASGFTFS SNSMNWRQA PGKGLEWVAH 50 ISSGSSFIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRDED TAVYYCARDH 100 WGIDAFNIWG QGTMVTVSS 119
53	2G6.C2 VL(軽鎖 可変領域 ヌクレオ チド配 列)	GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTCCTTAG 100 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT

10

20

30

40

50

【表 10 - 13】

配列表		
配列番号	名称	配列
	チド配列)	150 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCAGGCC AGGTTCASTG GCAGTGGGTC 200 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG 250 CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGATATTAC TTTGGGCCCT 300 GGGACCAAAG TGGATATCAA A 321
54	2G6.C2 VL(軽鎖 可変領域 アミノ酸 配列)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISLEP EDFAVYYCQQ RSNWIFTFGP 100 GTKVDIK 107
55	2G6.C2 VH CDR1	SNSMN 5
56	2G6.C2 VH CDR2	HISGGSSFIY YADSVKG 107
57	2G6.C2 VH CDR3	DDWGIDAFNI 10
58	2G6.C2 VL CDR1	RASQSVSSSL A 11
59	2G6.C2 VL CDR2	DASNRAT 7
60	2G6.C2 VL CDR3	QQRSNWIFT 9
61	2G6.C2 CH 重鎖定常 領域	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVFP 100 KSCDKHTTCP PCPARELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTF EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
62	2G6.C2 CL 軽鎖定常 領域	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
63	2G6.C2 重鎖	EVQLVESGGG LVQRGGSLRL SCAASGFTFS SNMNNWIRQA PGKGLEWVAH 50 ISSGSSFIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLS LQMNSLRDED TAVYYCARD 100 WGIDAFNIWG QGTMVTVSSA STKGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TFFAVLQSSG LYSLSVTVV FSSSLGTQTY

10

20

30

40

50

【表 10 - 14】

配列表		
配列番号	名称	配列
		200 ICNVNHHKPSN TKVDKRVERK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250 DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQVNS 300 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPVL 400 DSDGSFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSFGK 459
64	2G6.C2 軽鎖	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFGSGSGSTD FTLTISSLEP EDFAVIYCQQ RSNWIFTFGP 100 GTKVDIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY BREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYERMK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
4G5.D1 抗体(配列番号 65～78、174～177)		
65	4G5.D1 VH(重鎖 可変領域 ヌクレオ チド配 列)  (57ヌク レオチド のシグナ ル配列を 含む)	ATGAACACCC TGTGGTTCCTT CCTCCTCCTG GTGGCAGCTC CCAGATGGGT -57 CCTGTGCC -7 CAGATGCAGC TGCAGGAGTC GGGCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTGGGAGAC 50 CCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCGTCAGC AGTGGTCGTT 100 ACTACTGGAG TTGGATCCGG CAGCCCCCGG GGAAGGGACT GGAGTGGATT 150 GGGTATATCT ATTACAGTGG GAGCACCAAC TACAACCCCT CCCTCAAGAG 200 TCGAGTCACC ATATCAGTAG ACACGTCCAA GAACCAAGTC TCCCTGAAGC 250 TGACCTCTGT GACCGCTGCG GACACGGCCG TGTATTACTG TGCGAGAGAG 300 GGTGGAGACT ACTACTACTA CAATATGGAC GTCTGGGGCC CAGGGACCAC 350 GGTCACCGTC TCCTCA 367
174	4G5.D1 VHヌク レオチド 配列  (シグナ ル配列な し)	CAGATGCAGC TGCAGGAGTC GGGCCCAGGA CTGGTGAAGC CTTGGGAGAC 50 CCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCGTCAGC AGTGGTCGTT 100 ACTACTGGAG TTGGATCCGG CAGCCCCCGG GGAAGGGACT GGAGTGGATT 150 GGGTATATCT ATTACAGTGG GAGCACCAAC TACAACCCCT CCCTCAAGAG 200 TCGAGTCACC ATATCAGTAG ACACGTCCAA GAACCAAGTC TCCCTGAAGC 250 TGACCTCTGT GACCGCTGCG GACACGGCCG TGTATTACTG TGCGAGAGAG 300

10

20

30

40

50

【表 10 - 15】

配列表		
配列番号	名称	配列
		GGTGGAGACT ACTACTACTA CAATATGGAC GTCTGGGGCC CAGGGACCAC 350 GGTCACCGTC TCCTCA 367
66	4G5.D1 VH アミノ酸 配列  (19アミ ノ酸のシ グナル配 列を含 む)	MKHLWFFLLL VAAPRWLS -19  QMQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSVS SGRYYWSWIR QPPKGLEWI 50 GYIYYSGSTN YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYYCARE 100 GGDYYYNMD VWGPGTTVTV SS 122
175	4G5.D1 VH アミノ酸 配列  (シグナ ル配列な し)	QMQLQESGPG LVKPSSETLSL TCTVSGGSVS SGRYYWSWIR QPPKGLEWI 50 GYIYYSGSTN YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSVTAA DTAVYYCARE 100 GGDYYYNMD VWGPGTTVTV SS 122
67	4G5.D1 VLヌク レオチド 配列  (60ヌク レオチド のシグナ ル配列を 含む)	ATGGAAACCC CAGCGCAGCT TCTCTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA -60 TACCACCGGA -10  GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT 100 TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT 150 GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG 200 GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT 250 TTGCAGTGTA TTACTGTCAG CAGTATGGTA GCTCACCGTA CACTTTTGGC 300 CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA 324
176	4G5.D1 VLヌク レオチド 配列  (シグナ ル配列な し)	GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCAGCTACT 100 TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT 150 GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG 200 GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT 250 TTGCAGTGTA TTACTGTCAG CAGTATGGTA GCACACCGTA CACTTTTGGC 300 CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA 324

10

20

30

40

50

【表 10 - 16】

配列表		
配列番号	名称	配列
68	4G5.D1 VL アミ ノ酸配列  (20 アミ ノ酸のシ グナル配 列を含 む)	METPAQLLFL LLLWLFDTTG -20  EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY 50 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPYTFG 100 QGKLEIK 108
177	4G5.D1 VL アミ ノ酸配列  (シグナ ル配列な し)	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY 50 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGSSPYTFG 100 QGKLEIK 108
69	4G5.D1 VH CDR1	SGRYYS 8
70	4G5.D1 VH CDR2	YIYYSGSTNY NPSLKS 16
71	4G5.D1 VH CDR3	EGGDYNNM DV 12
72	4G5.D1 VL CDR1	RASQSVSSSY LA 12
73	4G5.D1 VL CDR2	GASSRAT 7
74	4G5.D1 VL CDR3	QYGSPPY 9
75	4G5.D1 CH 重鎖 定常領域	ASTKGFSVFEP LAFSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNKKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDMLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALNNHYT QKSLSLSPGK 330
76	4G5.D1 CL 軽鎖定常 領域	RTVAAPSVFI FPPSDQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYLSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107

10

20

30

40

50

【表 10 - 17】

配列表		
配列番号	名称	配列
77	4G5.D1 重鎖	QMQLQESGPG LVKPFETLSL TCTVSGGSVS SCRYYWSNIR QPPGKGLEWI 50 GYIYYSGSTN YNPSLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTSTVTA DTAVYYCARE 100 GGDYYYNMD VWGPGTTVTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST SGGTAALGCL 150 VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFFAVLQ SSGLYSLSSV VTFPSSSLGT 200 QTYICNVNHK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPFCPAPELL GGPVFLFFP 250 KFKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKE NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ 300 YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALFAPIEKT ISKAKGQPRE 350 PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTFP 400 FVLDSGDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP 450 GK 452
78	4G5.D1 軽鎖	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQQK PGQAPRLLIY 50 GASSRATGIP DRFSGSGSGT DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGGSPYTFG 100 QGTKLEIKRT VAAPGVFIIP PSDEQLKSGT ASVVCLLNNF YPBREAKVQWK 150 VDNALQSGNS QESVTEQDSK DSTYSLSSLT TLSKADYEKH KVIACEVTHQ 200 GLSSPVTKSF NRGEK 215
1G5.B2 抗体(配列番号 79～92、178～181)		
79	1G5.B2 VH ヌクレオチド 配列  (57 ヌクレオチド のシグナル配列を含む)	ATGGAGTTTG GGCTGAGCTG GGTTTTCTCTC GTTGCTCTTT TAAGAGGTGT -57 CCAGTGT -7 CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT GACTATGCTA 100 TGCACCTGGGT CCGCCAGACT CCAGGCAGGG GGCTGGAGTG GCTGACATTT 150 ATATCATATG ATGGAAGCAA TAAATACCAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200 ATTCAACATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTTT CTGCAATGA 250 ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTTT ATTACTGTGC GAGAGATTCC 300 TGGGATCGGG GGTACTTCGA TCTCTGGGGC CGTGGCACCC TGGTCACTGT 350 CTCCTCA 357
178	1G5.B2 VH ヌクレオチド 配列  (シグナ	CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT GACTATGCTA 100 TGCACCTGGGT CCGCCAGACT CCAGGCAGGG GGCTGGAGTG GCTGACATTT 150

10

20

30

40

50



【表 10 - 18】

配列表		
配列番号	名称	配列
	ル配列なし)	ATATCATATG ATGGAAGCAA TAAATACCAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200 ATTCAACCATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTTT CTGCAAATGA 250 ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTTT ATTACTGTGC GAGAGATTCC 300 TGGGATCGGG GGTACTTCGA TCTCTGGGGC CGTGGCACCC TGGTCACTGT 350 CTCCTCA 357
80	1G5.B2 VH アミノ酸 配列  (19 アミ ノ酸のシ グナル配 列を含 む)	MEFGLSNVFL VALLRGVQC ~19  QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS DYAMHWVRQT PGRGLEWLT 50 ISYDGSNKYH ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDS 100 WDRGYFDLWG RGLTVTVSS 119
179	1G5.B2 VH アミノ酸 配列  (シグナ ル配列な し)	QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS DYAMHWVRQT PGRGLEWLT 50 ISYDGSNKYH ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDS 100 WDRGYFDLWG RGLTVTVSS 119
81	1G5.B2 VL スク レオチド 配列  (60 スク レオチド のシグナ ル配列を 含む)	ATGGAAGCCC CAGCTCAGCT TCTCTTCCTC CTGCTACTCT GGCTCCCAGA ~60 TACCACCGGA -10  GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG 100 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT 150 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCAGGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC 200 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG 250 CAGTTTATTA CTGTCAAGCAG CSTAGCAACT GGTGGACGTT CGGCCAAGGG 300 ACCAAGGTGG AAATCAA 318
180	1G5.B2 VL スク レオチド 配列  (シグナ ル配列な し)	GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTTAGC AGCTACTTAG 100 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT CATCTATGAT 150 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCAGGCC AGGTTCAGTG GCAGTGGGTC 200 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT GAAGATTTTG

10

20

30

40

50

【表 10 - 19】

配列表		
配列番号	名称	配列
		250 CASTTTATTA CTGTCAGCAG CGTAGCAACT GGTGGACGTT CGGCCAAGGG 300 ACCAAGGTGG AAATCAAA 318
82	1G5.B2 VL アミ ノ酸配列  (20 アミ ノ酸のシ グナル配 列を含 む)	MEAPAQLLFL LLLWLFDTTG -20  EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWWTFGQG 100 TKVEIK 106
181	1G5.B2 VL アミ ノ酸配列  (シグナ ル配列な し)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNWWTFGQG 100 TKVEIK 106
83	1G5.B2 VH CDR1	DYAMH 5
84	1G5.B2 VH CDR2	FISYDGSNKY HADSVKG 17
85	1G5.B2 VH CDR3	DSWDRGYFDL 10
86	1G5.B2 VL CDR1	RASQSVSSYL A 11
87	1G5.B2 VL CDR2	DASNRAT 7
88	1G5.B2 VL CDR3	QQRSNWWT 8
89	1G5.B2 CH 重鎖 定常領域	ASTKGPSVFEP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFFEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHNKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCFAPPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDQVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSRDE LTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFCSEV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
90	1G5.B2 CL 軽鎖定常	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK

10

20

30

40

50

【表 10 - 20】

配列表		
配列番号	名称	配列
	領域	100 SFNRGEC 107
91	IG5.B2 重鎖 (シグナル配列なし)	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS DYAMHWVRQT FGRGLEWLT 50 ISYDGSNKYH ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDS 100 WDRGYFDLWG RGTLVTVSSA STRGPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150 YFPEPVTVSW NSGALTSGVH TTPAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY 200 ICNVNHHKPSN TKVDKRVKPK SCDKTHTCPP CPAPELLGGP SVFLFPPKPK 250 DTLMISRTPV VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKPREEQYNS 300 TYRVVSVLTV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQPREPQV 350 YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE MNYKTTTPVL 400 DSGSEFFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALNNHYTQ KSLSLSPGK 449
92	IG5.B2 軽鎖(シグナル配列なし)	EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP GQAPRLLIYD 50 ASNRRATGIPA RFGSGSGSTD FTLTISLLEP EDFAVYYCQ RSNWWTFGQG 100 TKVEIKRTVA APSVFIPPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNEYR REAKVQWKVD 150 NALQSGNSQE SVTEQDSKDS TYSLSSTLTL SKADYEKKHV YACEVTHQGL 200 SSPVTKSFNR GEC 213
P1-069366 抗体(配列番号 93~104)		
93	P1- 069366 VH (重鎖可 変領域ア ミノ酸配 列)	QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYAMHWVRQA FGKGLEWVAV 50 ISYDGSYKEY ADSVKGRFTI SRDSSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARAQ 100 ISEYFDYWGQ GTLVTVSS 118
94	P1- 069366 VL (軽鎖可 変領域ア ミノ酸配 列)	DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA 50 AGSLQSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISLQF EDFATYYCQ YNSYPLTFGQ 100 GTKVEIK 107
95	P1- 069366 VH	SYAMH 5

10

20

30

40

50

【表 10 - 21】

配列表		
配列番号	名称	配列
	CDR1	
96	P1- 069366 VH CDR2	VISYDGSYKEYADSVKG
97	P1- 069366 VH CDR3	AQISEYFDY
98	P1- 069366 VL CDR1	RASQGISSWLA
99	P1- 069366 VL CDR2	AASSLQS
100	P1- 069366 VL CDR3	QQYNSYPLT
101	P1- 069366 CH 重鎖 定常領域	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFFAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKHTTCP PCPAPAEAGA PSVLEFPKPK KDTLMISRTF EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLNQDNLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTTPV LQSDGSEFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG 329
102	P1- 069366 CL 輕鎖定常 領域	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSIYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
103	P1- 069366 重鎖 シグナル 配列なし	QVQLVESGGG VVQPGRSRLR SCAASGFTFS SYAMHWVRQA PGKGLEWVAV 50 ISYDGSYKEY ADSVKGRFTI SRDSSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARAQ 100 ISEYFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVKPKS CDKHTCTPPC PAFPAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSH EDPVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDNLNGKEY KCKVSNKALP AFIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDI AV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 447

10

20

30

40

50

【表 10 - 22】

配列表		
配列番号	名称	配列
104	P1-069366 軽鎖 シグナル 配列なし	DIQMTQSPSS LSASVGDRTV ITCRASQGIS SWLAWYQQKP EKAPKSLIYA 50 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ YNSYPLTFGQ 100 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.17 抗体 (キメラ抗 NKG2A 27H4.D4) (mG1-5265A アイソタイプ) (配列番号 105~118)		
105	27H4.D4 VH (重鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	CAGGTGCAAC TAGTGGAGTC TGGGGGAGGC TTGGTCAAGC CTGGAGGGTC 50 CCTCAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGGTT CACCTTCAGT GACTTCTACA 100 TGAGCTGGAT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GATTTCATAC 150 ATTAGTAGTA GTGATTTTAC CATATACTAC GCAGACTCTG TGGAGGGCCG 200 ATTCAACATC TCCAGGGACA ACGCCAAGAA CTCACTGTTT CTGCAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAAGAGGG 300 AGCCTTCCTT TCAACTACGA TATGGACGTC TGGGSCCAAG GGACCACGGT 350 CACCGTCTCC TCA 363
106	27H4.D4 VH (重鎖可 変領域ア ミノ酸配 列)	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFYMSWIRQA FKGLEWISY 50 ISSSDFTIYY ADSVEGRFTI SRDPAKNSLF LQMNSLRAED TAVYYCARRG 100 SLPPNYDMDV WGQGTITVTVS S 121
107	27H4.D4 VL (軽鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	GACATCCAGA TGACCCAGTC TCCATCTTCC GTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCTCTTGTC GGGCGAGTCA GGGTATTAGC AGCTACTTAG 100 CCTGGTATCA GCATAAACCA GGGAAAGCCC CTAAGCTCCT GATCTATGCT 150 GCATCCAGTT TGCAAAGTGG GGTCCTATCA AGGTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGCT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTACTA TTGTCAACAG GCTAATAGTT TCCCGCTCAC TTTCGGCGGA 300 GGGACCAAGG TGGAGATCAA A 321
108	27H4.D4 VL (軽鎖可 変領域ア ミノ酸配 列)	DIQMTQSPSS VSASVGDRTV ITCRASQGIS SYLAWYQHQP GKAPKLLIYA 50 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTA FTLTISSLQP EDFATYYCQQ ANSFPLTFGG 100 GTKVEIK 107

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 2 3】

配列表		
配列番号	名称	配列
109	27H4.D4 VH CDR1	DFYMS 5
110	27H4.D4 VH CDR2	YISSSDFTIY YADSVEG 17
111	27H4.D4 VH CDR3	RGSLPFNYDM DV 12
112	27H4.D4 VL CDR1	RASQGISSYL A 11
113	27H4.D4 VL CDR2	AASSLQS 7
114	27H4.D4 VL CDR3	QQANSEPLT 9
115	27H4.D4 CH 重鎖 定常領域	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VFSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPELLGG PSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VTLHQLDLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VITLPPSRDE LTKNQVSLTLC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK 330
116	27H4.D4 CL 輕鎖定常 領域	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLSKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
117	27H4.D4 重鎖 シグナル 配列なし	QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS DFYMSWIRQA PGKGLEWISY 50 ISSSDFTIYY ADSVEGRFTI SRDNAKNSLF LQMNSLRAED TAVYYCARRG 100 SLPFFNYDMOV WGQGTITVTVS SASTKGPSVF PLAPSSKSTS GGTAALGCLV 150 RDYFPEPVTV WNSGALTSG VHTFPAVLQS SGLYSLSSVV TVPSSSLGTQ 200 TYICNVNHKP SNTKVDKKVE PKSCDKTHTC PCPAPELLG GPSVFLFPPK 250 PKDTLMISRT PEVTCVVVDV SHEDPEVKFN WYVDGVEVHN AKTKPREEQY 300 NSTYRVVSVL TVLHQLDLNG KEYKCKVSNK ALPAPIEKTI SKAKGQPREP 350 QVYITLPPSRD ELTKNQVSLT CLVKGFYPSD IAVEWESNGQ PENNYKTTPP 400 VLSDGSFFFL YSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPG 450 K 451
118	27H4.D4	DIQMTQSPSS VSASVGRVT ISCRASQGIS SYLAWYQHQP GKAPKLLIYA

10

20

30

40

50

【表 10 - 24】

配列表		
配列番号	名称	配列
	軽鎖 シグナル 配列なし	50 ASSLQSGVPS RFSGSGSGTA FTLTISSLQP EDFATYYCQQ ANSFPLTFGG 100 GTKVEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.10 抗体 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30Q) (VH-I107T フレームワーク逆転および脱アミド化部位を除去するための VK-N30Q を有する 13F3.A4) (配列番号 126~127)		
126	NKG2A.1 0 重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPA 173
127	NKG2A.1 0 軽鎖	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIQ SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.12 抗体 (13F3.A4 VH-I107T) (VH-I107T フレームワーク逆転を有する 13F3.A4 抗体) (配列番号 128~129)		
128	NKG2A.1 2 重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTWSN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSIGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKHTTCPPC PAPAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVVDVSHD DPEVKFNWYV DGEVHNNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNNHYTQK SLSLSFGK 448
129	NKG2A.1 2 軽鎖	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV

10

20

30

40

50

【表 10 - 25】

配列表		
配列番号	名称	配列
		150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKKH VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.14 抗体 (13F3.A4 VK-N30Q) (脱アミド化部位を除去するための N30Q を有する 13F3.A4 抗体) (配列番号 130~131)		
130	NKG2A.1 4 重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWQ GILVTSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CMVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKHTCPCP PAPEAEGAPS VFLEPPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
131	NKG2A.1 4 軽鎖	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASGGIQ SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKKH VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.15 抗体 (13F3.A4 VK-N30P) (脱アミド化部位を除去するための N30P を有する 13F3.A4 抗体) (配列番号 132~133)		
132	NKG2A.1 5 重鎖	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWQ GILVTSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CMVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKHTCPCP PAPEAEGAPS VFLEPPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
133	NKG2A.1	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASGGIP SALAWYQQKP GKAPKLLIYD

10

20

30

40

50



【表 10 - 26】

配列表		
配列番号	名称	配列
	5 軽鎖	50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.18 抗体 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30S-Y49S)(配列番号 134~135)		
134	NKG2A.18 VH (重鎖可変領域ヌクレオチド配列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TAVIYCAREE 100 WGLPFDYWQG GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVPEPKS CDKHTTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
135	NKG2A.18 LH (軽鎖可変領域ヌクレオチド配列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLISD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.19 抗体 (13F3.A4 VH-I107T, VK-N30S-Y94T)(配列番号 136~137)		
136	NKG2A.19 VH (重鎖可変領域ヌクレオチド配列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDIAKNSLY LQMNSLRAED TAVIYCAREE 100 WGLPFDYWQG GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVPEPKS CDKHTTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 10 - 27】

配列表		
配列番号	名称	配列
		448
137	NKG2A.19 LH (軽鎖可変領域ヌクレオチド配列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSTPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKKH VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2 A.20 抗体 (13F3.A4 VH-II07T, VK-N30S-Y94A)(配列番号 138~139)		
138	NKG2A.20 VH (重鎖可変領域ヌクレオチド配列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FFAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKHTCTPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSH EPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
139	NKG2A.20 VH (軽鎖可変領域ヌクレオチド配列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSAPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKKH VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.21 抗体 (13F3.A4 VH-II07T, VK-N30S-Y94N)(配列番号 140~141)		
140	NKG2A.21 VH (重鎖可変領域ヌクレオチド配列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FFAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKHTCTPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSH EPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK

10

20

30

40

50

【表 10 - 28】

配列表		
配列番号	名称	配列
		448
141	NKG2A.2 1 LH (軽鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSNPFTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.22 抗体 (I3F3.A4 VH-Y56T-I107T, VK-N30S)(配列番号 142~143)		
142	NKG2A.2 2 VH (重鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSTIYY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKHTCPCP PAPEAEGAPS VFLPPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSH DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD 400 SDGSEFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
143	NKG2A.2 2 LH (軽鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSNPFTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.23 抗体 (I3F3.A4 VH-I57T-I107T, VK-N30S)(配列番号 144~145)		
144	NKG2A.2 3 VH (重鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYTY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVTP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKHTCPCP PAPEAEGAPS VFLPPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSH DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTTPVLD

10

20

30

40

50

【表 10 - 29】

配列表		
配列番号	名称	配列
		400 SDGSFFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNNHYTQK SLSLSPGK 448
145	NKG2A.2 3 LH (軽鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.24 抗体 (13F3.A4 VH-Y58N-I107T, VK-N30S)(配列番号 146~147)		
146	NKG2A.2 4 VH (重鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYINY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLEPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTFPVLD 400 SDGSFFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNNHYTQK SLSLSPGK 448
147	NKG2A.2 4 LH (軽鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNIFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.25 抗体 (13F3.A4 VH-Y58S-I107T, VK-N30S)(配列番号 148~149)		
148	NKG2A.2 5 VH (重鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYISY ADSVKGRFTI SRDPAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVPEKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLEPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY

10

20

30

40

50

【表 10 - 30】

配列表		
配列番号	名称	配列
		350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ SNVFSCSVHM EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
149	NKG2A.2 5 LH (軽鎖可 変領域ヌ クレオチ ド配列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISLQPF EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYSLSTLT LSKADYEKKH VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214
NKG2A.13-G1.3f(配列番号 150~151)		
150	NKG2A.1 3-G1.3f (軽鎖配 列)	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS FSGSGSGTDF TLTISLQPE DFATYYCQQF NSYPLTFGQG 100 TRLEIKRTVA APSVFIFPPS DEQLKSGTAS VVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ SVTEQDSKDS TYSLSTLT LSKADYEKKH VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 213
151	NKG2A.1 3-G1.3f (重鎖配 列)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGPTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRTI SRDRAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGFSVFPLA FSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVMN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVF SSSLGTQTYI 200 CNVNHKFSNT KVDKRVPEKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVVDVSH EPREVKENWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVHM EALHNHYTQK SLSLSPGK 448
mNKG2A.3-mG1-D265A(配列番号 152~153)		
152	mNKG2A. 3-mG1- D265A (軽鎖配 列)	DIVMTQSPSS LAVSAGDKVT INCKSSQTLF SGRYNYLAWY QKQTGGAPKL 50 LIYYTSTRHT GVPGRFIGSG SGTDFTLTIN NLQTEDLGNY YQQQHYSTPY 100 TFGAGTNLEI RRADAAPTVS IFPPSSEQLT SGGASVVCFL NNEFYFKDINV 150 KWKIDGSRQ NGVLNSWTDQ DSKDSYSSMS STLTLTKDEY ERHNSYTCEA 200 THKTSTSPIV KSFNRNEC 218
153	mNKG2A. 3-mG1- D265A (重鎖配 列)	QVQLKQSGAE LVKPGASVKI SCKTSGYTFT DGYMHWVEQN PGQGLEWIGR 50 IDPDSGYTMY NQKFQDKATL TRDKSSSTVY MELRSLTSED SAVYYCAINY 100 GRWYFDFWG QGTQVTVSSA KTTTPPSVYPL APGSAQAQTN MVTLGCLVKG 150 YFPEPVTVMN NSGSLSSGVH TFPAVLQSDI YTLSSSVTVF SSTWPSSETV 200 CNVAHPASST KVDKKIVPRD CGCKPCICTV PEVSSVFIFP PKPKDVLIT 250 LTPKVTCTVV AISKDDPEVQ FSWFVDDVEV HTAQTPREE QFNSTFRSVS 300 ELPIMHQDWL NGKEFKCRVN SAAFPAPIEK TISKTGRPK APQVYTIPPP 350 KEQMAKDKVS LTCMITDFFP EDITVEWQWN GQPAENYKNT QPIMDTGGSY 400 FVYSKLVNQK SNWEAGNTFT CSVLHEGLHN HHTKSLSHS PGK 443
154		RASQGIPSA A 11
155		RASQGINSA A 11
156		LSIDNEEMKF 10

10

20

30

40

50

【表 10 - 31】

配列表		
配列番号	名称	配列
157		PSEWIGVERN SSHHPW 16
158		LAFKHEIKDS DN 12
159		QVNRLKSAQQ CGSSIIYHC 19
160		GGGGSGGGGS GGGGS 15
161		FTSSSTKKTK LQLEHLLLDL QMILNGINNY KNPKLTRMLT FKFYMPKKAT 50 ELKHLQCLEE ELKPLEEVLN LAQSKNFHLR PRDLISNINV 1VLELKGSET 100 TFMCEYADET ATIVEFLNRW ITFSQSIIST LT 132
162		VSNK 4
163		EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDANKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPPDYWGQ GTLVTVSSAS TRGFVSFFLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVTVF SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLEPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGEYPSDIAV EWESNGQFEN NYKTTFFVLD 400 SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNYTQK SLSLSPGK 448
164		AIQLTQSPFS LSASVGRVT ITCRASQGIF SALAWYQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFGSGSGTD FTLTISLQF EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
165		RTVAAPSVFI FPFSDQLKS GTASVVCLLN NFYFREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107
166		GAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CGGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT TCCCATAGTA 100 TGAAGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCAGCC 150 ATAAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACGTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGAGAAGAG 300 TGGGGGCTAC CCTTTGACTA CTGGGGCCAG GGAATCCTGG TCACCGTCTC 350 CTCA 354
167		EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDANKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPPDYWGQ GILVTVSS 118
168		GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAAAC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAAAGTGG GGTCCCATCA AGGTTTCAGC GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCCTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTTATTA CTGTCAACAG TTAAATAGTT ACCCTCTCAC CTTGGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
169		AIQLTQSPFS LSASVGRVT ITCRASQGIN SALAWYQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFGSGSGTD FTLTISLQF EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107
170		GAGGTGCAGT TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC CTGGTCAAGC CTGGGGGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCAG CCTCTGGATT CACCTTCAGT AGCTATAGCA 100 TGAAGTGGGT CCGCCAGGCT CCAGGGAAGG GGCTGGAGTG GGTCTCATCC 150 ATTAGTAGTA GTAGTAGTTA CATATACTAC GCAGACTCAG TGAAGGGCCG 200 ATTCACCATC TCCAGAGACA ACGCCAAGAA CTCACGTGTAT CTGCAAATGA 250 ACAGCCTGAG AGCCGAGGAC ACGGCTGTGT ATTACTGTGC GAGACTACTA 300 TGGTTCGGGG AGATTTTGA CTACTGGGGC CAGGGAACCC

10

20

30

40

50

【表 10 - 32】

配列表		
配列番号	名称	配列
		TGGTCACCGT 350 CTCCTCA 357
171		EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGPTFS SYSMNWVRQA PGKGLEWVSS 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCARLL 100 WFGEIFDYWG QGTLVTVSS 119
172		GCCATCCAGT TGACCCAGTC TCCATCCTCC CTGTCTGCAT CTGTAGGAGA 50 CAGAGTCACC ATCACTTGCC GGGCAAGTCA GGGCATTAGC AGTGCTTTAG 100 CCTGGTATCA GCAGAAACCA GGGAAAGCTC CTAAGCTCCT GATCTATGAT 150 GCCTCCAGTT TGAAGAGTGG GGTCCCATCA AGGTTTCAGCG GCAGTGGATC 200 TGGGACAGAT TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTGCAGCCT GAAGATTTTG 250 CAACTATTA CTGTCAACAG TTTAATAGTT ACCCGATCAC CTTCGGCCAA 300 GGGACACGAC TGGAGATTAA A 321
173		AIQLTQSPSS LSASVGRVIT ITCRASQGIS SALAWYQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLRSGVPS RFGSGSGSTD FTLTISLQP EDFATYYCQQ FNSYPITFGQ 100 GTRLEIK 107
174		CAGATGCAGC TGCAGGAGTC GGGCCCAAGGA CTGGTGAAGC CTTCGGAGAC 50 CCTGTCCCTC ACCTGCACTG TCTCTGGTGG CTCGCTCAGC AGTGGTCGTT 100 ACTACTGGAG TTGGATCCGG CAGCCCCCGG GGAAGGGACT GGAGTGGATT 150 GGGTATATCT ATTACAGTGG GAGCACCAAC TACAACCCCT CCCTCAAGAG 200 TCGAGTCACC ATATCAGTAG ACACGTCCAA GAACCAAGTC TCCCTGAAGC 250 TGACCTCTGT GACCGCTGCG GACACGGCCG TGTATTACTG TCGCAGAGAG 300 GGTGGAGACT ACTACTACTA CAATATGGAC GTCTGGGGCC CAGGGACCAC 350 GGTCAACGTC TCCTCA 366
175		QMQLQESGPG LVKPSLTL LCTVSGGSGVS SGRIYWSWIR QPFGKLEWI 50 GIYYVSGSTN YNPGLKSRVT ISVDTSKNQF SLKLTISVTAA DTAVYYCARE 100 GGDYIYNMD VNGPGTIVTV SS 122
176		GAAATTGTGT TGACGAGTC TCCAGGCACC CTGTCTTTGT CTCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCAGCTACT 100 TAGCCTGGTA CCAGCAGAAA CCTGGCCAGG CTCCCAGGCT CCTCATCTAT 150 GGTGCATCCA GCAGGGCCAC TGGCATCCCA GACAGGTTCA GTGGCAGTGG 200 GTCTGGGACA GACTTCACTC TCACCATCAG CAGACTGGAG CCTGAAGATT 250 TTGCAGTGT TTAAGTGCAG CAGTATGGTA GCTCACCCTA CACTTTTGGC 300 CAGGGGACCA AGCTGGAGAT CAAA 324
177		EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SSYLAWYQK PQAPRLIY 50 GASSRATGIP DRFGSGSGST DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYSSPYTPG 100 QSTKLEIK 108
178		CAGGTGCAGC TGGTGGAGTC TGGGGGAGGC GTGGTCCAGC CTGGGAGGTC 50 CCTGAGACTC TCCTGTGCGC CCTCTGGATT CACCTTCAGT GACTATGCTA 100 TGCAGTGGGT CCGCCAGACT CCAGGCAGGG GGCTGGAGTG GCTGACATTT 150 ATATCATATG ATGGAAGCAA TAAATACCAC GCAGACTCCG TGAAGGGCCG 200 ATTCAACATC TCCAGAGACA ATTCCAAGAA CACGCTGTTT CTGCAAAATGA 250 ACAGTCTGAG AGCTGAGGAC ACGGCTGTTT ATTACTGTGC GAGAGATTCC 300 TGGGATCGGG GGTACTTCGA TCTCTGGGGC CGTGGCACCC TGGTCACTGT 350 CTCCTCA 357
179		QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGPTFS DYAMHWVRQT PGRGLEWLT 50 ISYDGSNKH ADSVKGRFTI SRDNKNTLF LQMNSLRAED TAVYYCARDS 100 WDRGYFDLWG RGLTVTVSS 119
180		GAAATTGTGT TGACACAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT CTCAGGGGA 50 AAGAGCCACC CTCTCTGCA GGGCCAGTCA GAGTGTAGC AGCTACTTAG 100 CCTGGTACCA ACAGAAACCT GGGCAGGCTC CAGGCTCCT CATCTATGAT 150 GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCAGCC AGGTTTCAGT GCAGTGGGTC 200 TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CTAGAGCCT GAAGATTTTG 250

10

20

30

40

50

【表 10 - 33】

配列表		
配列番号	名称	配列
		CAGTTTATTA CTGTCAQCAG CGTAGCAACT GGTGCACGTT CGGCCAAGGG 300 ACCAAGGTGG AAATCAAA 318
181		EIVLTQSPAT LSLSPGERAT LSCRASQSVS SYLAWYQQKP QAPRLLIYD 50 ASNRATGIPA RFSGSGSGTD FTLTISSLEP EDFAVYYCQQ RSNNWTFGGG 100 TKVEIK 106
182		MDNQGVYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100 HNNSSLNTRT QKARHCQHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150 NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200 SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYHCK HKL 233
183		XEWGLPFD 8
184		EXWGLPFD 8
185		EEXGLPFD 8
186		EEWXL PFD 8
187		EEWXPFD 8
188		EEWGLXFD 8
189		EEWGLPXD 8
190		EEWGLPFX 8
191		GTFSSYSMN 9
192		GTFSSSHSMN 10
193		EEWGLPFD 8
194		RASQGSNSAL A 11
195		QQFNNTPLT 9
196		GTFSSYSMN 10
197		EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SRSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNARKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVMN 160
198		AIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEI 106
199		LQMNSLRAED TAVYYCAREE WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA 50 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVMN 80
200		LQMNSLRAED TAVYYCAREE WGLPFDYWGQ GILVTVSSAS TKGPSVFPLA 50 PSSKSTSGGT AALGCLVKDY FPEPVTVMN 80
201		AIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP 80
202		AIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP 80
203		AIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP 80
204		AIQLTQSPSS LSASVGDRVIT ITCRASQGIN SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP 80
205	NP 0012 91377.1	MDNQGVYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSTLIQR 100 HNNSSLNTRT QKARHCQHCP EEWITYSNSC YYIGKERRTW EESLLACTSK 150 NSSLLSIDNE EEMKFLSIIS PSSWIGVFRN SSHHPWVTMN GLAFKHEIKD 200 SDNAELNCAV LQVNRLKSAQ CGSSIIYHCK HKL 233
206	NP 0155 67.2	MDNQGVYSD LNLPPNPKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSRHCGH 100 CFEWITYSN SCYYIGKERR TWEESSLACT SKNSSLLSID NEEEMKFLSI 150 ISPSSWIGVF RNSSHPWVT MNGLAFKHEI KPSDSEELNC AVLQVNRLKS 200 AQCGSSIIYH CKHKL

10

20

30

40

50



【表 10 - 34】

配列表		
配列番号	名称	配列
207	NP_998822.1	215 MDNQGVVYSD LNLPPNFKRQ QRKPKGNKSS ILATEQEITY AELNLQKASQ 50 DFQGNDKTYH CKDLPSAPEK LIVGILGIIC LILMASVVTI VVIPSRHCGH 100 CPEEWITYSN SCYYIGKERR TWEESSLACT SKNSSLLSID NEEEMKFLSI 150 ISPSWIGVF RNSSHHFWVT MNGLAFKHEI KDSDNAELNC AVLQVNRLKS 200 AQCGSSIIYH CKHKL 215
208	NM_001304448.1	ACAGTTGAGA GGAGTTTGAG TGGAGATTCA GGGCCATTTT AGTATCTTCT 50 GTAGGACAGA GGTCAGCAAG CATGCCCCAG AGGTACAGAT GTATATGTCT 100 CCCAGGAAGT CTCTGTGGGT GAAGGACTGA TCTCAAGTTG TGGCTGACAC 150 TAGTTAAAGC CAAGTTAGAG GGCTGTTTCA GGGTCTACAT TGAGACTACA 200 GTTGATATGC CTACCTCCTG AGACACTAGT GTGTGAGTCT CCTCCTGGGC 250 CCCTGGGCAA ATGGTTTTGG CAGCATGACC AAGGCCTAAA TGGGGCTGAA 300 GGCAAGCACA GGAGGATGGG TCCCTTTTCA GGTCTGGAGA TGGGAATCACT 350 GTTGCTATAG CAGGCCTTTT TATGAGACTA ACCTGGCCTC TCCACTAAAG 400 GATGTGTGAC TTTCTGGGGA CAGAAGAGTA CAGTCCCTGA CATCACACAC 450 TGCAGAGATG GATAACCAAG GAGTAATCTA CTCAGACCTG AATCTGCCCC 500 CAAAACCCAAA GAGGCAGCAA CGAAAACCTA AAGGCAATAA AAGCTCCATT 550 TTAGCAACTG AACAGGAAAT AACCTATGCG GAATTAACCC TTCAAAAAGC 600 TTCTCAGGAT TTCAAGGGA ATGACAAAAC CTATCACTGC AAAGATTTAC 650 CATCAGCTCC AGAGAAGCTC ATTGTTGGGA TCCTGGGAAT TATCTGTCTT 700 ATCTTAATGG CCTCTGTGGT AACGATAGTT GTTATTCCTT CTACATTAAT 750 ACAGAGGCAC AACAATTCTT CCCTGAATAC AAGAACTCAG AAAGCACGTC 800 ATTGTGGCCA TTGTCCTGAG GAGTGGATTA CATATTCCAA CAGTTGTTAC 850 TACATTGGTA AGGAAAGAAG AACTTGGGAA GAGAGTTTGC TGGCCTGTAC 900 TTCGAAGAAC TCCAGTCTGC TTTCTATAGA TAATGAAGAA GAAATGAAAT 950 TTCTGTCCAT CATTTACCA TCCTCATGGA TTGGTGTGTT TCGTAACAGC 1000 AGTCATCATC CATGGGTGAC AATGAATGGT TTGGCTTTCA AACATGAGAT 1050 AAAAGACTCA GATAATGCTG AACTTAACCTG TGCAGTGCTA CAAGTAAATC 1100 GACTTAAATC AGCCCACTGT GGATCTTCAA TAATATATCA TTAACCTTGT 1150 TAATTTAATA CAATTTACAA CACACCTGC 1179
209	NM_002259.5	CCACTCTTGA CTCACTCTGA GCCTTCACAG GGCAGTCTGC GAAGATTGCA 50 GGCATTGTTT GTTCTTGTCT TGGATTTATG CCTTTAAATT TCACCTTTTA 100 TTACACAGCT ATAGCAGGCC TTTTATGAG ACTAACCTGG CCTCTCCACT 150 AAAGGATGTG TGACTTTCTG GGGACAGAAG AGTACAGTCC CTGACATCAC 200 AACTGACAGA GATGGATAAC CAAGGAGTAA TCTACTCAGA CCTGAATCTG 250 CCCCAAAACC CAAAGAGGCA GCAACGAAAA CCTAAAGGCA ATAAAAACTC 300 CATTTTAGCA ACTGAACAGG AAATAACCTA TCGGGAATTA AACCTTCAAA 350 AAGCTTCTCA GGATTTTCAA GGGAAATGACA AAACCTATCA CTGCAAAAGAT 400 TTACCATCAG CTCCAGAGAA GCTCATTTGT GGGATCCTGG GAATTATCTG 450 TCTTATCTTA ATGGCCTCTG TGGTAACGAT AGTTSTATT CCCTCTACAT 500 TAATACAGAG GCACACAAAT TCTTCCCTGA ATACAAGAAC TCAGAAAGCA 550 CGTCATTGTG GCCATTGTCC TGAGGAGTGG ATTACATATT CCAACAGTTG 600 TTAATACATT GGTAAAGGAA GAAGAAGTTG GGAAGAGAGT TTGCTGGCCT 650 GTACTTCGAA GAAGTCCAGT CTGCTTTCTA TAGATAATGA AGAAGAAATG 700 AAATTTCTGT GCATCATTTT ACCATCCTCA TGGATTGGTG TGTTCGTAA 750 CAGCAGTCAT CATCCATGGG TGACAATGAA TGGTTTGGCT TTCAAACATG 800 AGATAAAAGA CTCAGATAAT GCTGAACCTA ACTGTGCAGT GCTACAAGTA 850 AATCGACTTA AATCAGCCCA GTGTGGATCT

10

20

30

40

50

【表 10 - 35】

配列表		
配列番号	名称	配列
		TCAATAATAT ATCATTGTAA 900 GCATAAGCCT TAGAGGTAAA GCGTTTGCAT TTGCAGTGCA TCAGATAAAT 950 TGTATATTTT TAAAAATAGA AATATATTAT GATTGCATAA ATCTTAAAT 1000 GAATTATGTT ATTTGCTCTA ATAAGAAAAA TCTAAATCAA TTATTGAAAC 1050 AGGATACACA CAATTACTAA AGTACAGACA TCCTAGCATT TGTGTCTGGG 1100 TCATTTTGCT CAACATGGTA TTTGTGGTTT TCAGCCTTTC TAAAAGTTGC 1150 ATGTTATGTG AGTCAGCTTA TAGGAAGTAC CAAGAACAGT CAAACCCATG 1200 GAGACAGAAA GTAGAATAGT GGTGCGCAAT GTCTGAGGGA GGTGAAATA 1250 GGAGATGACC TCTAATGAT AGAACGTTAC TTTGTGTCGT GATGAAAACT 1300 TTCTAAATTT CAGTAGTGGT GATGGTTGTA ACTCTGCGAA TATACTAAAC 1350 ATCATTGATT TTAAATCATT TTAAGTGCAT GAAATGTATG CTTTGTACAC 1400 GACACTTCAA TAAAGCTATC CAGAAAAAAA AAAAAA 1436
210	NM_0073 28.4	CCACCTCTGA CTCACCTGA GCCTTCACAG GGCAGTCTGC GAAGATTGCA 50 GGCATTGTTT GTTCTTGCT TGGATTTATG CCTTTAAATT TCACCTTTTA 100 TTACACAGCT ATAGCAGGCC TTTTATGAG ACTAACCTGG CCTCTCCACT 150 AAAGGATGTG TGACTTTCTG GGGACAGAAG AGTACAGTCC CTGACATCAC 200 AACTGCAGA GATGGATAAC CAAGGAGTAA TCTACTCAGA CCTGAATCTG 250 CCCCCAAACC CAAAGAGGCA GCAACGAAAA CCTAAAGGCA ATAAAACTC 300 CATTTTAGCA ACTGAACAGG AAATAACCTA TCGCGAATTA AACCTTCAAA 350 AAGCTTCTCA GGATTTTCAA GGAATGACA AAACCTATCA CTGCAAGAT 400 TTACCATCAG CTCCAGAGAA GGTCTATTGT GGGATCCTGG GAATTATCTG 450 TCTTATCTTA ATGGCCTCTG TGGTAACGAT AGTTGTTATT CCTCACGTC 500 ATTGTGGCCA TTGCTCTGAG GAGTGGATTA CATATTCCAA CAGTTGTTAC 550 TACATTGGTA AGGAAAGAAG AACTTGGGAA GAGAGTTTGC TGGCCTGTAC 600 TFCGAAGAAC TCCAGTCTGC TTTCTATAGA TAATGAAGAA GAAATGAAAT 650 TTCTGTCCAT CATTCACCA TCCTCATGGA TTGGTGTGTT TCGTAACAGC 700 AGTCATCATC CATGGGTGAC AATGAATGGT TTGGCTTICA AACATGAGAT 750 AAAAGACTCA GATAATGCTG AACTTAACTG TGCAGTGCTA CAAGTAAATC 800 GACTTAAATC AGCCCAGTGT GGATCTTCAA TAATATATCA TTGTAAGCAT 850 AAGCTTTAGA GGTAAAGCGT TTGCATTGC AGTGATCAG ATAAATTGTA 900 TATTTCTTAA AATAGAAATA TATTATGATT GCATAAATCT TAAATGAAT 950 TATGTTATTT GCTCTAATAA GAAAAATCTA AATCAATTAT TGAACACGGA 1000 TACACACAAT TACTAAAGTA CAGACATCCT AGCATTGTG TCGGGCTCAT 1050 TTTGCTCAAC ATGGTATTG TGGTTTTCAG CTTTCTAAA AGTTGCATGT 1100 TATGTGAGTC AGCTTATAGG AAGTACCAAG AACAGTCAAA CCCATGGAGA 1150 CAGAAAGTAG AATAGTGGT GCCAATGTCT GAGGGAGGTT GAAATAGGAG 1200 ATGACCTCTA ACTGATAGAA CGTTACTTTG TGTCTGATG AAAACTTTCT 1250 AAATTTTCACT AGTGGTGATG GTTGTAACTC TGCGAATATA CTAAACATCA 1300 TTGATTTTAA ATCATTTTAA GTGCATGAAA TGTATGCTTT GTACACGACA 1350 CTTCAATAAA GCTATCCAGA AAAAAAAAAA AA 1382
211	NM_2136 57.2	GCATGCCCCA GAGGTACAGA TGTATATGTC TCCCAGGAAG TCTCTGTGGG 50 TGAAGGACTG ATCTCAAGTT GTGGCTGACA CTAGTTAAAG CCAAGTTAGA 100 GGGCTGTTTC AGGGTCTACA TTGAGACTAC AGTTGATATG CCTACCTCCT 150 GAGACACTAG TGTGTGAGTC TCCTCCTGGG CCCCTGGGCA AATGGTTTTG 200 GCAGCATGAC CAAGGCCTAA ATGGGGCTGA AGGCAAGCAC AGGAGGATGG 250 GTCCCTTTTC AGGTCTGGAG ATGGAATCAC TGTGCTATA GCAGGCCCTT 300 TTATGAGACT AACCTGGCCT CTCCTACTAA GGATGTGTGA CTTTCTGGGG 350 ACAGAAGAGT ACAGTCCCTG ACATCACACA

10

20

30

40

50

【表 10 - 36】

配列表		
配列番号	名称	配列
		CTGCAGAGAT GGATAACCAA 400 GGAGTAATCT ACTCAGACCT GAATCTGCCC CCAAACCCAA AGAGGCAGCA 450 ACGAAAAACCT AAAGGCAATA AAAGCTCCAT TTTAGCAACT GAACAGGAAA 500 TAACCTATGC GGAATTAAAC CTTCAAAAAG CTTCTCAGGA TTTCAAGGG 550 AATGACAAAA CCTATCACTG CAAAGATTTA CCATCAGCTC CAGAGAAGCT 600 CATTGTGGG ATCCTGGGAA TTATCTGTCT TATCTTAATG GCCTCTGTGG 650 TAACGATAGT TGTATTCC TCACGTCATT GTGGCCATTG TCCTGAGGAG 700 TGGATTACAT ATTCACACAG TTGTTACTAC ATGGGTAAGG AAAGAAGAAC 750 TTGGGAAGAG AGTTTGCTGG CCTGTACTTC GAAGAAGCTCC AGTCIGCTTT 800 CTATAGATAA TGAAGAAGAA ATGAAATTTT TGTCCATCAT TTCACCATCC 850 TCATGGATTG GTGTGTTTCG TAACAGCAGT CATCATCCAT GGGTGACAAT 900 GAATGGTTTG GCTTCAAAAC ATGAGATAAA AGACTCAGAT AATGCTGAAC 950 TTAAGTGTGC AGTGCTACAA GTAAATCGAC TTAAATCAGC CCAGTGTGGA 1000 TCTTCAATAA TATATCATTG TAAGCATAAG CTTTAGAGGT AAAGCGTTTG 1050 CATTTCAGT GCATCAGATA AATTGTATAT TTCTTAAAT AGAAATATAT 1100 TATGATTGCA TAAATCTTAA AATGAATTAT GTTATTTGCT CTAATAAGAA 1150 AATTCTAAAT CAATTATTGA AACAGGATAC ACACAATTAC TAAAGTACAG 1200 ACATCCTAGC ATTTGTGTCG GGCTCATTTT GCTCAACATG GTATTTGTGG 1250 TTTTCAGCCT TTCTAAAGT TGCATGTTAT GTGAGTCAGC TTATAGGAAG 1300 TACCAAGAAC AGTCAAAACC ATGGAGACAG AAAGTAGAAT AGTGGTTGCC 1350 AATGTCTGAG GGAGGTTGAA ATAGGAGATG ACCTCTAACT GATAGAACGT 1400 TACTTTGTGT CGTGATGAAA ACTTTCTAAA TTTCAGTAGT GGTGATGGTT 1450 GTAAGTCTGC GAATATACTA AACATCATTG ATTTTAAATC ATTTTAAAGT 1500 CATGAAATGT ATGCTTTGTA CACGACACTT CAATAAAGCT ATCCAGAAAA 1550 AAAAAAAAAA AAA 1563
212	NM_2136 58.2	GCATGCCCCA GAGGTACAGA TGTATATGTC TCCCAGGAAG TCTCTGTGGG 50 TGAAGGACTG ATCTCAAGTT GTGGCTGACA CTAGTTAAAG CCAAGTTAGA 100 GGGCTGTTTC AGGGTCTACA TTGAGACTAC AGTTGATATG CCTACCTCCT 150 GAGACACTAG TGTGTGAGTC TCCTCCTGGG CCCCTGGGCA AATGGTTTTG 200 GCAGCATGAC CAAGGCCATA ATGGGGCTGA AGGCAAGCAC AGGAGGATGG 250 GTCCCTTTTC AGGTCTGGAG ATGGAATCAC TGTGTCTATA GCAGGCCCTT 300 TTATGAGACT AACCTGGCCT CTCCACTAAA GGATGTGTGA CTTTCTGGGG 350 ACAGAAGAGT ACAGTCCCTG ACATCACACA CTGCAGAGAT GGATAACCAA 400 GGAGTAATCT ACTCAGACCT GAATCTGCCC CCAAACCCAA AGAGGCAGCA 450 ACGAAAAACCT AAAGGCAATA AAAGCTCCAT TTTAGCAACT GAACAGGAAA 500 TAACCTATGC GGAATTAAAC CTTCAAAAAG CTTCTCAGGA TTTCAAGGG 550 AATGACAAAA CCTATCACTG CAAAGATTTA CCATCAGCTC CAGAGAAGCT 600 CATTGTGGG ATCCTGGGAA TTATCTGTCT TATCTTAATG GCCTCTGTGG 650 TAACGATAGT TGTATTCC TCTACATTAA TACAGAGGCA CAACAATTCT 700 TCCCTGAATA CAAGAACTCA GAAAGCACGT CATTGTGGCC ATTGTCTGTA 750 GGAGTGGATT ACATATCCCA ACAGTTGTTA CTACATTGGT AAGGAAAGAA 800 GAACTTGGGA AGAGAGTTTG CTGGCCTGTA CTTGGAAGAA CTCCAGTCTG 850 CTTTCTATAG ATAATGAAGA AGAAATGAAA TTTCTGTCCA TCATTTCACC 900 ATCCTCATGG ATTGGTGTGT TTCGTAACAG CAGTCATCAT CCATGGGTGA 950 CAATGAATGG TTTGGCTTTC AAACATGAGA TAAAGACTC AGATAATGCT 1000 GAACTTAACT GTGCAGTGCT ACAAGTAAAT CGACTTAAAT CAGCCCAGTG 1050 TGGATCTTCA ATAATATATC ATTGTAAGCA TAAGCTTTAG AGGTAAAGCG 1100 TTTGCATTG CAGTGCATCA GATAAATTGT ATATTTCTTA AAATAGAAAT 1150 ATATTATGAT TGCATAAATC

10

20

30

40

50

【表 1 0 - 3 7】

配列表		
配列番号	名称	配列
		TTAAAAATGAA TTATGTTATT TGCTCTAATA 1200 AGAAAATTCT AAATCAATTA TTGAAACAGG ATACACACAA TTAGTAAAGT 1250 ACAGACATCC TAGCATTGTG GTCGGGCTCA TTTTGCTCAA CATGGTATTT 1300 GTGGTTTTCA GCCTTTCTAA AAGTTGCATG TTATGTGAGT CAGCTTATAG 1350 GAAGTACCAA GAACAGTCAA ACCCATGGAG ACAGAAAGTA GAATAGTGGT 1400 TGCCAATGTC TGAGGGAGGT TGAATAGGA GATGACCTCT AACTGATAGA 1450 ACGTTACTTT GTGTCGTGAT GAAAACCTTC TAAATTCAG TAGTGGTGAT 1500 GGTGTGTAAC CTGCGAATAT ACTAAACATC ATTGATTTT AATCATTTTA 1550 AGTGCATGAA ATGTATGCTT TGTACACGAC ACTTCAATAA AGCTATCCAG 1600 AAAAAAAAAA AAAAAAA 1617

10

【 0 6 3 1】

【表 1 1】

表2.NKG2A.9モノクローナル抗体(13F3-VH-I107T-Vk-N30S IgG1.3としても知られる)(以降、「NKG2A.9抗体」と称される)のV <sub>H</sub> 、V <sub>L</sub> 、C <sub>H</sub> 、C <sub>L</sub> 、重鎖、および軽鎖アミノ酸配列	
	アミノ酸配列(配列番号)
重鎖可変ドメイン(V <sub>H</sub> )	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWGQ GTLVTVSS 118 (配列番号8)
軽鎖可変ドメイン(V <sub>L</sub> )	AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIK 107 (配列番号9)
重鎖定常ドメイン(C <sub>H</sub> )  (C末端リシン(K)は示されないが、一部の実施形態では含まれる場合がある)	ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV 50 HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKRVEP 100 KSCDKTHTCP PCPAPEAEGA PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS 150 HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN STYRVVSVLT VLHQDWLNGK 200 EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKGQPREPQ VYTLPPSREE MTKNQVSLTC 250 LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW 300 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPG 329 (配列番号16)
軽鎖定常ドメイン(C <sub>L</sub> )	RTVAAPSVFI FPPSDEQLKS GTASVVCLLN NFYPREAKVQ WKVDNALQSG 50 NSQESVTEQD SKDSTYSLSS TLTLKADYE KHKVYACEVT HQGLSSPVTK 100 SFNRGEC 107 (配列番号17)

20

30

40

50

【表 1 2】

重鎖  (C末端リシン(K)は示されないが、一部の実施形態では含まれる場合がある)	EVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SHSMNWVRQA PGKGLEWVSA 50 ISSSSSYIYY ADSVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRAED TAVYYCAREE 100 WGLPFDYWQ GTLVTVSSAS TKGPSVFPLA PSSKSTSGGT AALGCLVKDY 150 FPEPVTVSWN SGALTSGVHT FPAVLQSSGL YSLSSVVTVP SSSLGTQTYI 200 CNVNHKPSNT KVDKRVEPKS CDKTHTCPPC PAPEAEGAPS VFLFPPKPKD 250 TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST 300 YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY 350 TLPPSREEMT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPPVLD 400 SDGSFFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPG 447  (配列番号7)
	軽鎖  AIQLTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQGIS SALAWYQQKP GKAPKLLIYD 50 ASSLKSGVPS RFGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ FNSYPLTFGQ 100 GTRLEIKRTV AAPSVFIFPP SDEQLKSGTA SVVCLLNNFY PREAKVQWKV 150 DNALQSGNSQ ESVTEQDSKD STYLSSTLT LSKADYEKHK VYACEVTHQG 200 LSSPVTKSFN RGEC 214  (配列番号5)

10

20

【 0 6 3 2 】

【表 1 3】

表3.NKG2A.9抗体の6つのCDRドメインのアミノ酸配列					
アミノ酸配列(配列番号)					
VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
SHSMN  (配列番号10)	AISSSSSYI YYADSVKG  (配列番号11)	EEWGLPFDY  (配列番号12)	RASQGISSALA  (配列番号13)	DASSLKS  (配列番号14)	QQFNSYPLT  (配列番号15)

30

【 0 6 3 3 】

40

50

【表 1 4】

表4.NKG2A.11抗体の6つのCDRドメインのアミノ酸配列					
アミノ酸配列(配列番号)					
VH CDR 1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
SHSMN  (配列番号10)	AISSSSSYI YYADSVKG  (配列番号11)	EEWGLPFDY  (配列番号12)	RASQGIPSALA  (配列番号154)	DASSLKS  (配列番号14)	QQFNSYPLT  (配列番号15)

10

【 0 6 3 4】

【表 1 5】

表5.13F3.A4抗体の6つのCDRドメインのアミノ酸配列					
アミノ酸配列(配列番号)					
VH CDR1	VH CDR2	VH CDR3	VL CDR1	VL CDR2	VL CDR3
SHSMN  (配列番号10)	AISSSSSYI YYADSVKG  (配列番号11)	EEWGLPFDY  (配列番号12)	RASQGINSALA  (配列番号155)	DASSLKS  (配列番号14)	QQFNSYPLT  (配列番号15)

20

30

40

50

【図面】

【 図 1 A 】

1/86

WO 2020/102501

PCT/US2019/061429

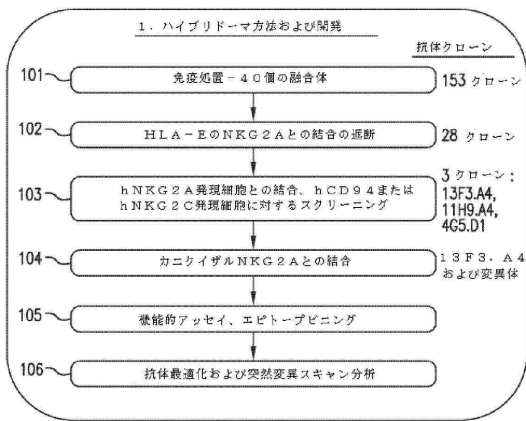


FIG.1A

【 図 1 B 】

## 2. 抗体ライブラリー

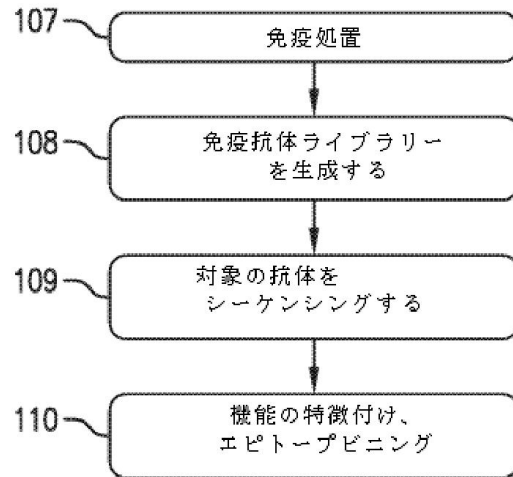


FIG. 1 B

【 ㊦ 1 C 】

2/86

WO 2020/102501

PCT/US2019/061429

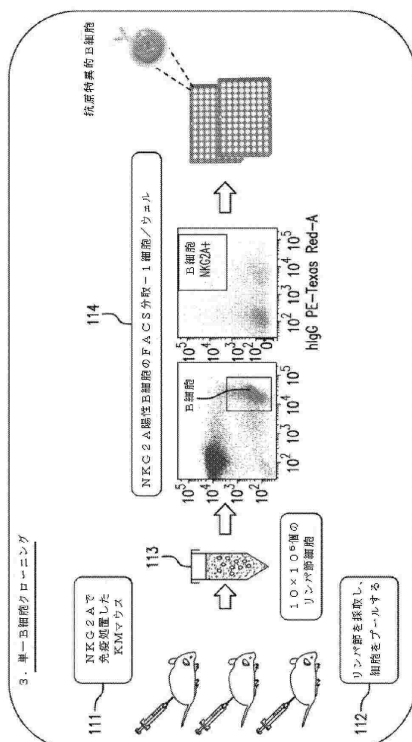


FIG. 1C

【圖 2】

3/86

WO 2020/102501

PCT/US2019/061429

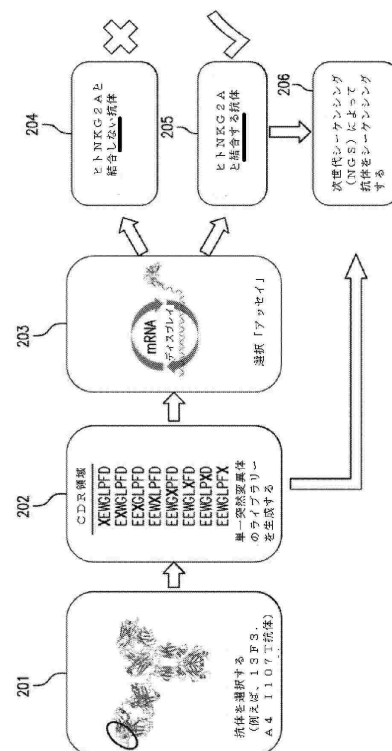


FIG. 2

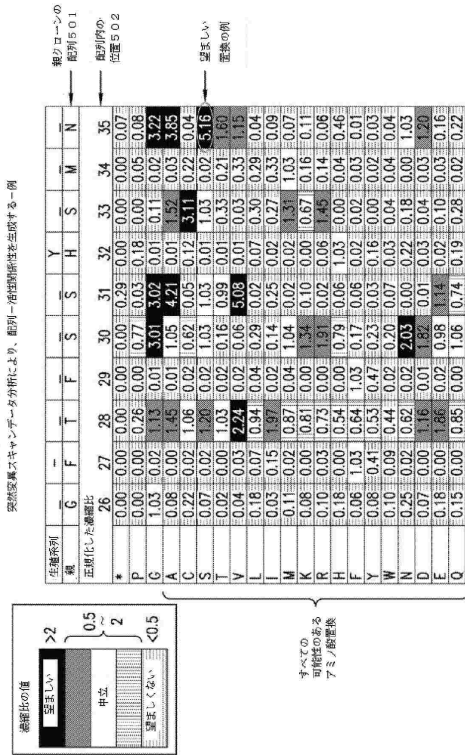


FIG.3

13F3 1107T 抗MKG2 A抗体の突然変異スキャン-分析したCDR位置

生体系列	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
LCDR1	R	A	S	Q	G	I	N	S	A	L	A
LCDR2	なし										
LCDR3	89	90	91	92	93	94	95	96	97		
	Q	Q	F	N	S	Y	P	L	T		
重鎖											
HCDR1*	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	
	G	F	T	F	S	S	H	S	M	N	
HCDR2	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
	A	I	S	S	S	Y	I	Y	A	D	S
HCDR3	95	96	97	98	99	100	100a	101			
	E	E	W	G	L	P	F	D			

\*Kabat定義を、AbM定義を使用したHCDR1を除くすべてのCDRに使用した。

FIG.4

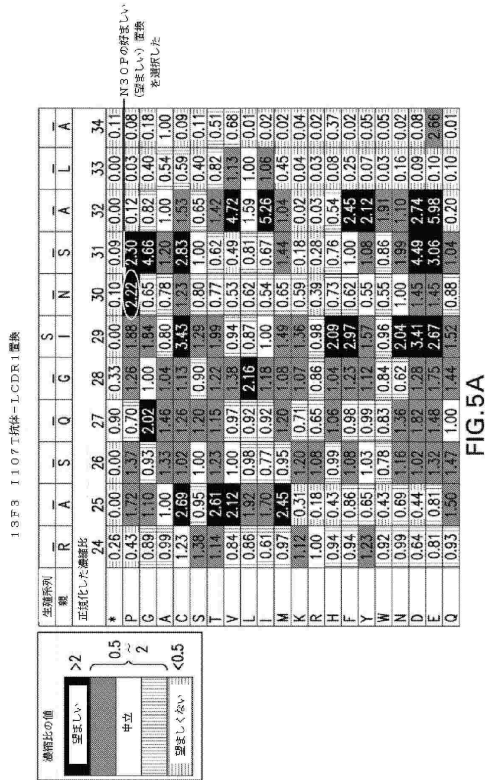


FIG.5A

13F3 1107T抗体-LCDR3置換

生体系列	89	90	91	92	93	94	95	96	97
*	0.00	0.81	0.00	0.09	0.13	0.38	0.00	0.00	0.00
P	0.07	0.17	0.02	1.58	0.20	0.27	1.00	0.06	0.04
G	0.02	0.37	0.21	0.47	0.60	0.08	1.11	0.06	0.71
A	0.02	0.56	0.68	0.63	1.25	0.11	0.76	0.05	0.71
C	0.01	0.14	2.01	1.76	1.80	0.21	0.15	0.59	0.70
S	0.02	0.86	0.26	0.56	1.00	0.10	0.84	0.04	1.01
T	0.02	0.73	0.62	0.49	1.52	0.11	0.49	0.09	1.00
V	0.03	0.30	0.28	0.37	2.39	0.27	0.19	0.10	0.74
L	0.02	0.46	0.65	0.35	1.38	0.34	0.18	1.00	0.49
I	0.07	0.15	0.19	0.52	1.65	0.36	0.17	0.26	0.55
M	0.02	0.14	3.26	0.40	1.18	0.73	0.56	0.30	0.85
K	0.06	0.94	0.11	0.30	0.58	0.08	0.31	0.03	0.60
R	0.03	0.17	0.05	0.23	0.59	0.11	0.16	0.02	0.41
H	0.36	0.33	2.04	0.99	1.08	0.74	0.28	0.12	0.62
F	0.02	0.09	1.00	0.95	1.51	0.95	0.11	1.66	0.55
Y	0.02	0.16	0.10	0.90	1.63	1.00	0.07	0.11	0.61
W	0.03	0.11	2.53	1.08	1.50	0.51	0.10	0.76	0.55
N	0.02	1.75	2.14	1.00	0.99	0.15	0.31	0.19	0.98
D	0.03	11.50	0.32	1.85	2.36	0.05	1.69	0.04	1.67
E	0.39	1.15	0.36	1.99	2.95	0.05	1.04	0.02	0.90
Q	1.00	1.00	0.42	0.62	1.53	0.21	0.61	0.12	0.83

FIG.5B



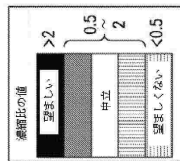
WO 2020/102501

8/86

PCT/US2019/061429

生種系列 種	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
正規化した類似比										
*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.29	0.00	0.00	0.00	0.07
P	0.00	0.00	0.26	0.00	0.77	0.03	0.18	0.00	0.05	0.08
G	1.03	0.02	1.13	0.01	3.01	3.02	0.01	0.11	0.02	3.22
A	0.08	0.00	1.45	0.01	1.05	4.21	0.01	1.52	0.03	3.85
C	0.22	0.02	1.06	0.02	0.62	0.05	0.12	3.11	0.22	0.04
S	0.07	0.02	1.20	0.02	1.03	1.03	0.01	1.03	0.02	5.16
T	0.02	0.00	1.03	0.02	0.16	0.99	0.01	0.33	0.21	1.19
V	0.04	0.03	2.24	0.02	0.06	5.08	0.01	0.03	0.33	1.19
L	0.18	0.07	0.94	0.04	0.29	0.02	0.07	0.50	0.29	0.04
I	0.03	0.15	1.97	0.02	0.14	0.25	0.02	0.27	0.33	0.09
M	0.11	0.02	0.87	0.04	1.04	0.02	0.02	1.31	1.03	0.07
K	0.08	0.00	0.81	0.00	1.34	0.10	0.00	0.67	0.16	0.11
R	0.10	0.03	0.73	0.00	1.91	0.02	0.06	1.45	0.14	0.06
H	0.18	0.00	0.54	0.00	0.79	0.06	1.03	0.00	0.04	0.46
F	0.06	1.03	0.64	1.03	0.17	0.06	0.02	0.02	0.03	0.01
Y	0.08	0.41	0.53	0.47	0.23	0.03	0.16	0.00	0.02	0.03
W	0.10	0.09	0.44	0.02	0.20	0.07	0.03	0.04	0.04	0.04
N	0.25	0.02	0.62	0.02	2.03	0.00	0.22	0.18	0.00	1.03
D	0.07	0.00	1.16	0.01	1.82	0.01	0.03	0.04	0.03	1.20
E	0.18	0.00	1.86	0.02	0.98	1.14	0.02	0.10	0.03	0.16
Q	0.15	0.00	0.85	0.00	1.06	0.74	0.19	0.28	0.02	0.22

FIG.5C



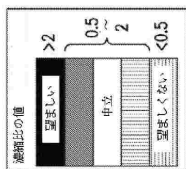
WO 2020/102501

10/86

PCT/US2019/061429

生種系列 種	95	96	97	98	99	100	100a	101
正規化した類似比								
*	0.00	0.70	0.28	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P	0.03	0.01	0.00	0.01	0.02	1.36	0.00	0.03
G	0.01	0.27	0.05	1.36	0.03	0.01	0.02	0.04
A	0.03	0.03	0.01	0.03	0.18	0.02	0.01	0.02
C	0.04	0.05	0.13	0.30	0.17	0.02	0.47	0.03
S	0.02	0.03	0.01	0.02	0.50	0.01	0.15	0.02
T	0.04	0.02	0.00	0.02	0.03	0.04	0.03	0.03
V	0.04	0.09	0.01	0.07	0.02	0.02	0.16	0.03
L	0.06	0.03	0.14	0.04	1.36	0.04	0.37	0.02
I	0.04	0.02	0.02	0.04	0.02	0.03	0.13	0.01
M	0.03	0.93	0.02	0.03	0.11	0.01	0.09	0.02
K	0.14	0.10	0.02	0.02	0.00	0.03	0.03	0.03
R	0.02	0.01	0.07	0.04	0.02	0.01	0.02	0.03
H	0.03	0.03	0.02	0.02	1.19	0.02	0.02	0.03
F	0.03	0.06	0.02	0.04	0.21	0.01	1.36	0.03
Y	0.05	0.03	0.02	0.03	0.11	0.01	0.33	0.02
W	0.05	0.05	1.36	0.14	0.05	0.03	0.04	0.04
N	0.01	0.03	0.00	0.02	0.15	0.03	0.05	0.04
D	0.14	0.28	0.01	0.02	0.05	0.02	0.00	1.36
E	1.36	1.36	0.01	0.06	0.01	0.02	0.01	0.04
Q	0.01	0.03	0.00	0.01	0.14	0.00	0.00	0.03

FIG.5E



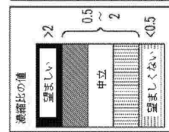
WO 2020/102501

9/86

PCT/US2019/061429

生種系列 種	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65
正規化した類似比																
*	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
P	0.12	0.03	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
G	0.88	0.37	0.05	0.07	0.07	0.28	0.35	0.04	0.02	1.89	0.83	0.76	0.85	0.80	1.52	0.97
A	1.07	2.00	0.02	0.00	0.05	0.33	0.82	0.02	0.03	1.59	0.41	0.97	0.96	0.79	1.23	0.88
C	0.52	0.43	0.11	2.11	0.22	0.46	0.90	0.10	0.05	0.42	0.49	0.93	0.25	0.68	0.85	1.13
S	2.05	0.57	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07	0.07	0.07	0.86	0.51	1.07	1.07	1.07	1.07	1.07
T	0.25	0.42	0.23	0.08	0.05	0.27	0.34	0.09	0.08	0.36	0.55	0.74	1.07	1.07	1.07	1.07
V	0.85	1.03	0.01	0.01	0.13	0.05	0.11	0.07	0.25	0.26	0.47	0.80	1.07	1.07	1.07	1.07
L	0.16	1.07	0.13	0.20	0.17	0.38	0.44	0.03	1.07	0.17	0.37	0.19	0.87	0.84	0.80	1.07
N	1.34	0.70	0.04	0.05	0.22	0.61	0.06	0.26	0.84	0.53	0.31	0.85	0.33	1.32	1.15	1.23
K	1.63	0.00	0.00	0.05	0.27	0.13	0.07	0.00	0.34	0.51	0.41	0.87	0.89	1.15	0.57	1.07
R	0.18	0.18	0.28	0.27	0.23	0.48	0.62	0.02	0.23	0.53	0.50	0.27	0.86	0.29	0.63	0.85
H	0.06	0.08	0.00	0.00	0.08	0.58	0.06	0.00	0.33	0.72	2.01	0.33	1.15	1.23	1.07	1.07
F	0.59	0.04	0.01	0.01	0.05	0.04	0.58	0.42	0.03	0.56	0.73	0.22	0.33	1.15	1.23	1.07
Y	0.27	0.03	0.00	0.02	0.03	0.02	0.58	0.69	0.21	0.67	1.19	1.68	1.20	0.95	1.15	1.12
W	0.03	0.05	0.04	0.03	0.05	0.03	0.40	0.20	0.19	0.24	0.30	0.47	0.96	1.00	0.75	1.07
N	0.36	1.45	0.07	0.13	0.11	0.27	0.47	0.03	0.11	1.78	0.53	0.76	1.14	0.98	0.80	1.07
D	1.07	0.03	0.00	0.03	0.01	0.00	0.02	0.02	0.04	0.42	0.39	1.25	1.07	1.49	0.80	1.07
E	0.07	0.37	0.02	0.00	0.00	0.03	0.02	0.02	0.03	0.69	0.32	0.78	1.07	1.49	0.80	1.07
Q	2.11	0.09	0.00	0.00	0.00	2.63	0.00	0.13	0.05	0.08	0.85	0.62	2.29	0.04	1.55	1.07

FIG.5D



WO 2020/102501

11/86

PCT/US2019/061429

全長ヒトNKG2CおよびヒトNKG2Cアミノ酸配列のライニングメント

hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ISGTEQEFQ	VELNLQPSL	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2C	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50
hNKG2A	NSKRGTFEE	VSEAOTPKRQ	DRKPKGKSS	ILAEQETTY	AEELNQKASQ	50

## 【図 7 A】

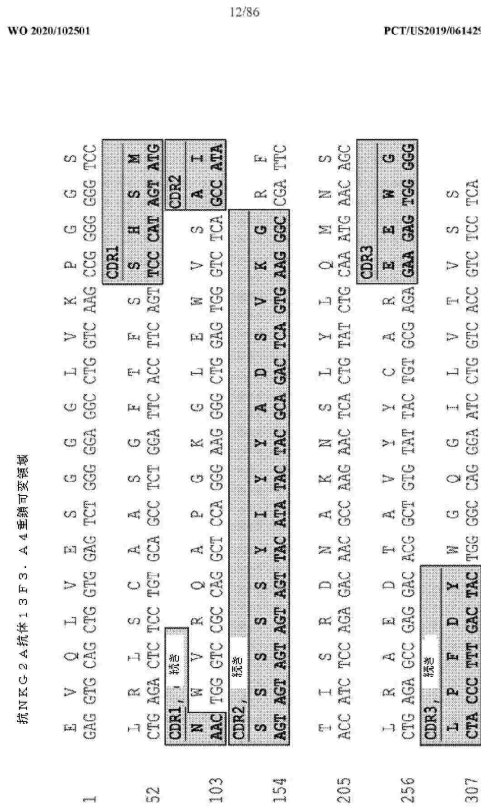


FIG.7A

## 【図 7 B】

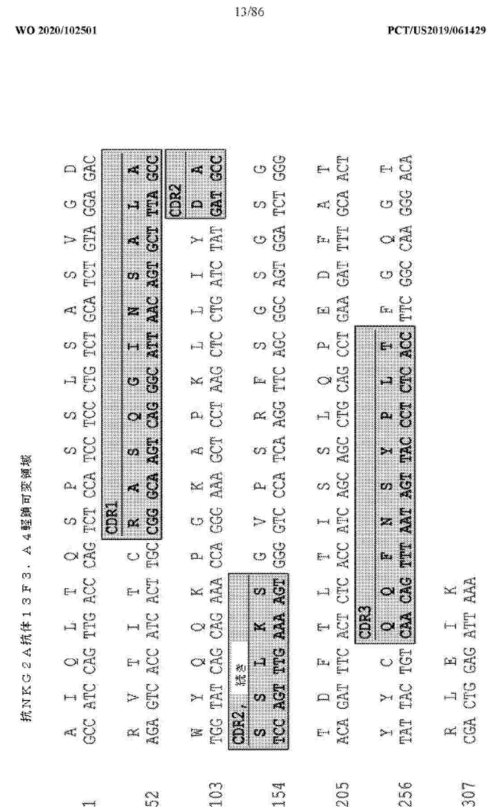


FIG.7B

## 【図 8 A】

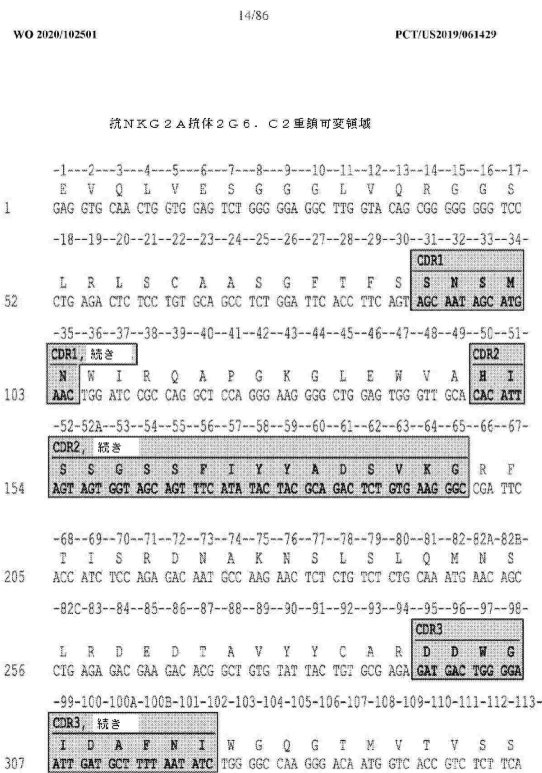


FIG.8A

## 【図 8 B】

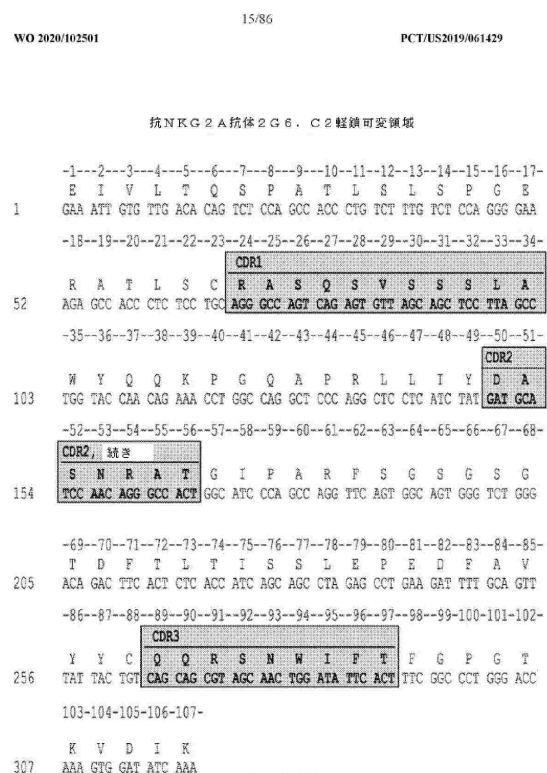


FIG.8B

【 9 A 】

WO 2020/102501

16/86

PCT/US2019/061429

抗NKG2A抗体11H9-A1重鎖可変領域

1 E V Q L V E S G G L V K P G G S  
CAG CTG CAG TTG CTG CAG TCT GGG GGA GGC CTG GTC AGC CCT GGG GGG TCC  
52 L R L S C A A S G F T F S  
CTG AGA CTC TCC TGT GCA GCC TCT GGA TTC ACC TTC AGT AGC TAT ACC AGT  
103 CDR1, 補足 S Y S M  
AAC TGG GTC CGC CAG GCT CCA GGG AAG GGG CTG GAG TGG GTC TCA TCC ATT  
CDR2, 補足 S I  
154 S S S Y I Y A D S V K G R F  
AGT AGT AGT AGT TAC ATA TAC TAC GCA GAC TCA GTG AAG GGC CGA TTC  
205 T I S R D N A K N S L Y L Q M N S  
ACC ATC TCC AGA GAC AAC GCC AAG AAC TCA CTG TAT CTG CAA ATG AAC AGC  
256 L R A E D T A V Y Y C A R  
CTG AGA GCC GAG GAC ACG GCT GTG TAT TAC TGT GGG AGA CTA TGA TGG TTC  
CDR3, 補足 L L W F  
307 G E I F D Y W G Q G T L V T V S S  
GGG CAG ATT TTT GAC TAC TGG GGC CAG GGA ACC CTG GTC ACC GTC TCC TCA

FIG.9A

【 9 B 】

WO 2020/102501

17/86

PCT/US2019/061429

抗NKG2A抗体11H9-A1輕鎖可変領域

1 A I Q L T Q S P S S L S A S V G D  
GCC ATC CAG TTG ACC CAG TCT CCA TCC TCC CTG TCT GCA TCT GTA GGA GAC  
52 R V T I T C  
AGA GTC ACC ATC ACT TGC CCG GCA AGT CAG GGC ATT AGC AGT GGT TTA GCC  
CDR1, 補足 R A S Q G I S A L A  
103 W Y Q Q K P G K A P K L L I Y  
TGG TAT CAG CAG AAA CCA GGG AAA GCT CCT AAG CTC CTG ATC TAT GAT GCC  
CDR2, 補足 S S L K S G V P S R F S G S G S G  
154 TCC ACT TTG AAA ACT GGG GTC CCA TCA AGG TTC ACC GGC AGT GGA TCT GGG  
S S L K S G V P S R F S G S G S G  
205 T D F T L T I S S L Q P E D F A T  
ACA GAT TTC ACT CTC ACC ATC ACC AGC CTG CAG CCT GAA GAT TTT GCA ACT  
CDR3, 補足 Q Q F N S Y P I T F G Q G T  
256 TAT TAC TGT CAA CAG TTT AAT AGT TAC CCG ATC ACC TTC GGC CAA GGC ACA  
R L E I K  
307 CGA CTG GAG ATT AAA

FIG.9B

【 10 A 】

WO 2020/102501

18/86

PCT/US2019/061429

抗NKG2A抗体4G5-D1重鎖可変領域

1 Q M Q L Q E S G P G L V K P S E T  
CAG ATG CAG CTG CAG GAG TCG GGC CCA GGA CTG GTG AAG CCT TCG GAG ACC  
52 L S L T C T V S G G S V  
CTG TCC CTC ACC TGC ACT GTC TCT GGT GGC TCC GTC AGC AGT GGT CGT TAC  
CDR1, 補足 S S G R Y  
103 Y W S W I R Q P P G K G L E W I G  
TAC TGG AGT TGG ATC CGG CAG CCC CGG AAG GGA CTG GAG TGG ATT GGG  
CDR2  
154 Y I Y Y S G S T N Y N P S L K S R  
TAT ATC TAT TAC AGT GGG AGC ACC AAC TAC AAC CCC TCC CTC AAG AGT CGA  
205 V T I S V D T S K N Q F S L K L T  
GTC ACC ATA TCA GTA GAC ACG TCC AAG AAC CAG TTC TCC CTG AAG CTG ACC  
CDR3, 補足 E G G  
256 TCT GTG ACC GCT GCG GAC ACG GGC GTG TAT TAC TGT GGG AGA GAG GGT GGA  
CDR3, 補足 D Y Y Y Y N M D V W G P G T T V T  
307 GAC TAC TAC TAC TAC AAT ATG GAC GTC TGG GGC CCA GGG ACC ACG GTC ACC  
V S S  
358 GTC TCC TCA

FIG.10A

【 10 B 】

WO 2020/102501

19/86

PCT/US2019/061429

抗NKG2A抗体4G5-D1輕鎖可変領域

1 E I V L T Q S P G T L S L S P G E  
GAA ATT GTG TTG AGC CAG TCT CCA GGC ACC CTG TCT TTG TCT CCA GGG GAA  
52 R A T L S C  
AGA GCC ACC CTC TCC TGC AGG GCC AGT CAG AGT GTT AGC AGC AGC TAC TTA  
CDR1, 補足 A W Y Q Q K P G Q A P R L L I Y G  
103 GCC TGG TAC CAG CAG AAA CCT GGC CAG GCT CCC AGG CTC CTC ATC TAT TAT GGT  
CDR2, 補足 A S S R A T G I P D R F S G S G S  
154 GCA TCC AGC AGG GCC ACT GGC ATC CCA GAC AGG TTC AGT GGC AGT GGC TCT  
A S S R A T G I P D R F S G S G S  
205 G T D F T L T I S R L E P E D F A  
GGG ACA GAC TTC ACT CTC ACC ATC AGC AGA CTG GAG CCT GAA GAT TTT GCA  
CDR3, 補足 Q Q Y G S S P Y T F G Q G  
256 V Y Y C Q Q Y G S S P Y T  
GTG TAT TAC TGT CAG CAG TAT GGT AGC TCA CCG TAC ACT TTT GGC CAG GGC  
T K L E I K  
307 ACC AAG CTG GAC ATC AAA

FIG.10B

10

20

30

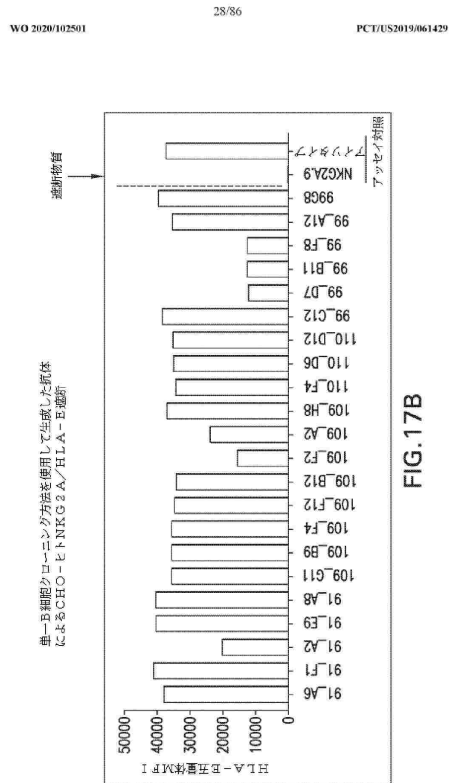
40

50





【図 17 B】



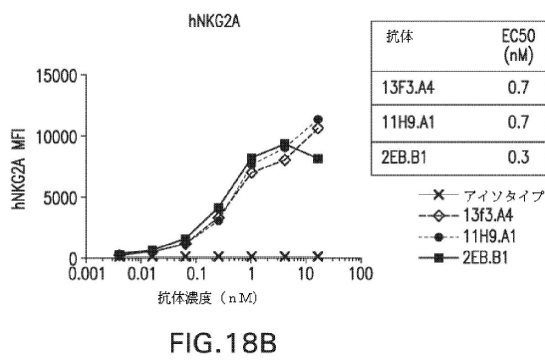
【図 18 A】



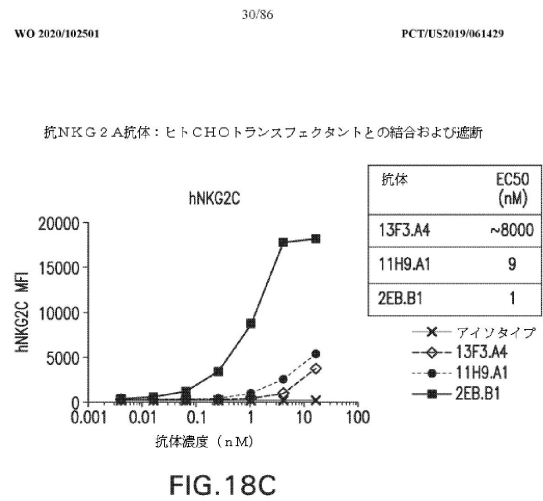
10

20

【図 18 B】



【図 18 C】



30

40

50

【図 18 D】

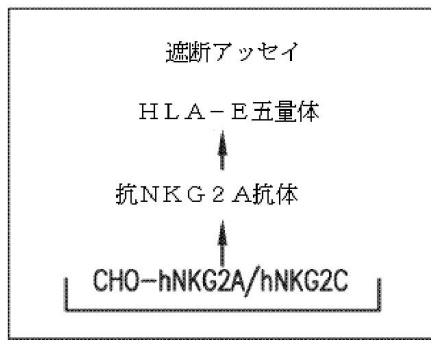


FIG.18D

【図 18 E】

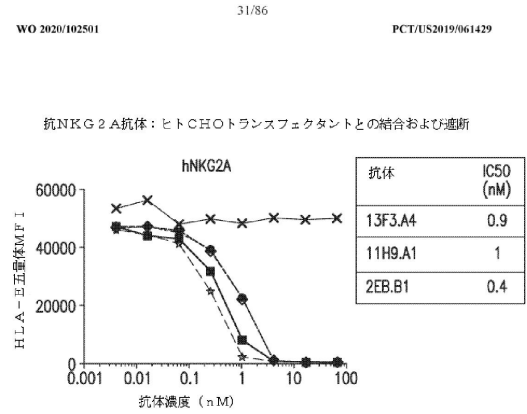


FIG.18E

10

【図 18 F】

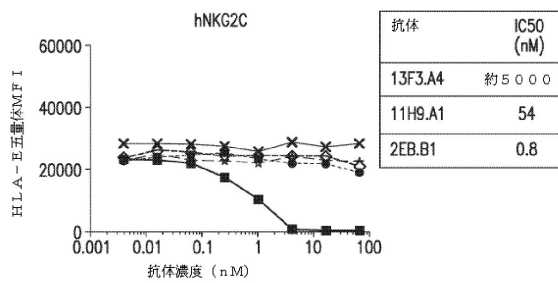


FIG.18F

【図 19 A】

WO 2020/102501

32/86

PCT/US2019/061429

抗NKG2A抗体：ヒトNKG2A+ナチュラルキラー細胞株 (NKL) との結合および遮断

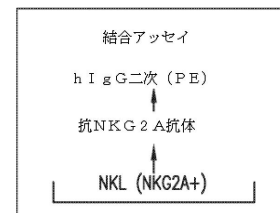


FIG.19A

20

30

40

50

## 【図 19 B】

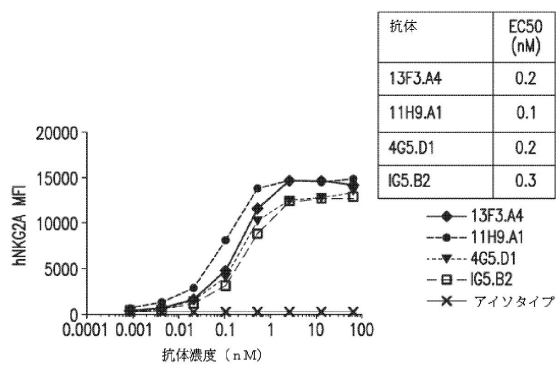


FIG.19B

## 【図 19 C】

WO 2020/102501

33/86

PCT/US2019/061429

抗NKG2A抗体：ヒトNKG2A+ナチュラルキラー細胞株 (NKL) との結合および遮断

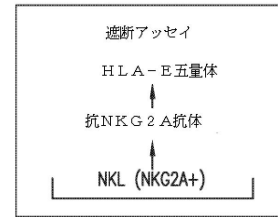


FIG.19C

10

## 【図 19 D】

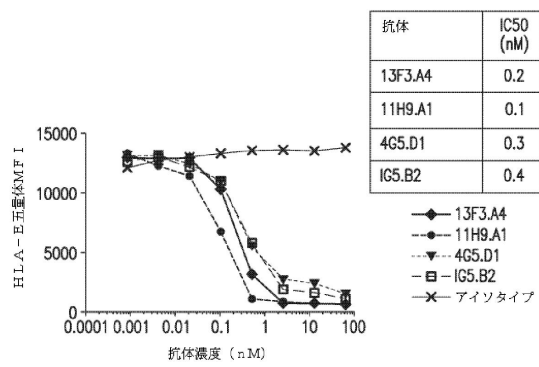


FIG.19D

## 【図 20 A】

WO 2020/102501

34/86

PCT/US2019/061429

hNKG2A発現CHO細胞においてNKG2A/HLA-E相互作用を遮断する抗NKG2A抗体の能力

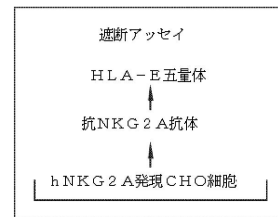


FIG.20A

20

30

40

50



【図 20 B】

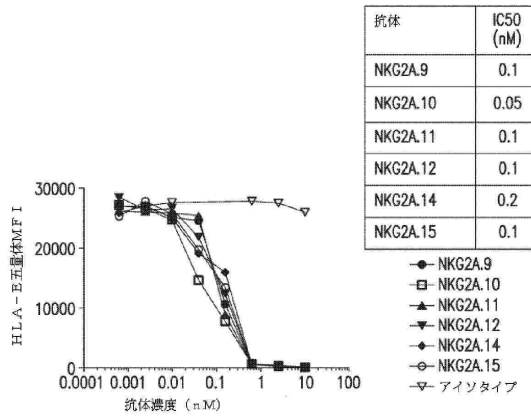


FIG.20B

【図 20 C】

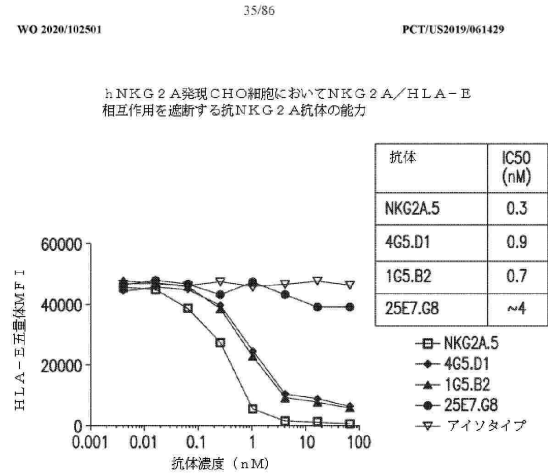


FIG.20C

【図 21 A】

抗NKG 2 A抗体のh NKG 2 A発現CHO細胞との結合

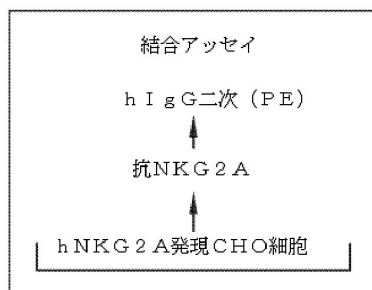


FIG.21A

【図 21 B】

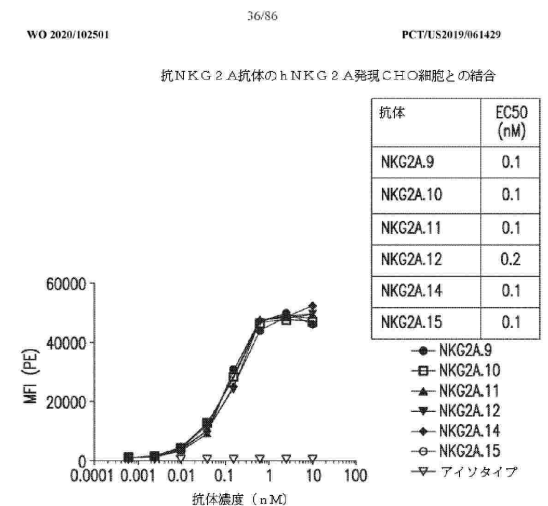


FIG.21B

10

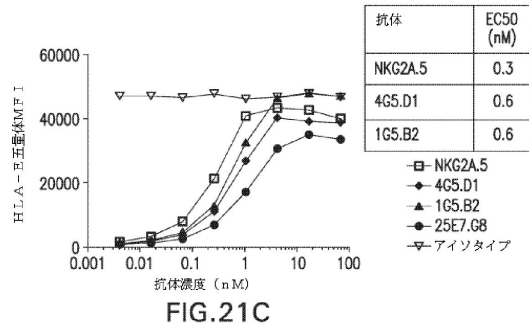
20

30

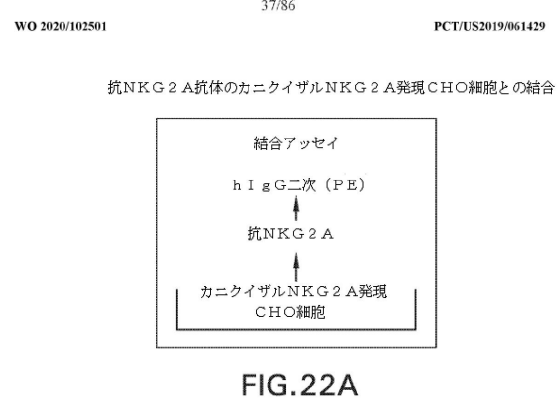
40

50

【図 2 1 C】

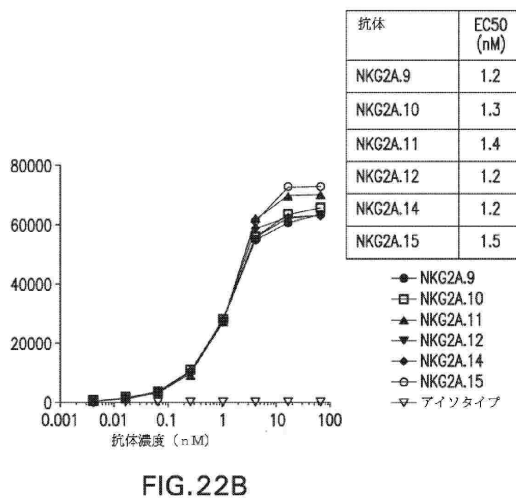


【図 2 2 A】

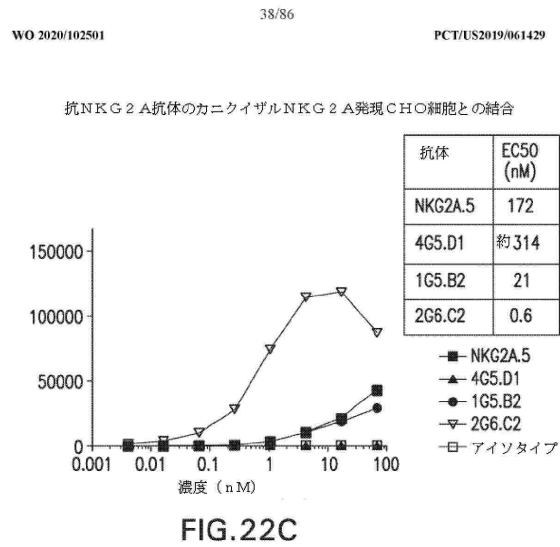


10

【図 2 2 B】



【図 2 2 C】



20

30

40

50

## 【図 2 3 A】

ヒトNKG2A発現CHO細胞と結合し、  
NKG2A/HLA-E相互作用を遮断する、2G6.C2抗体の能力

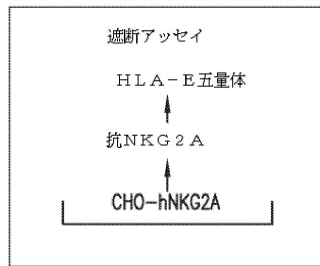


FIG.23A

## 【図 2 3 B】

WO 2020/102501

39/86

PCT/US2019/061429

ヒトNKG2A発現CHO細胞と結合し、  
NKG2A/HLA-E相互作用を遮断する、2G6.C2抗体の能力

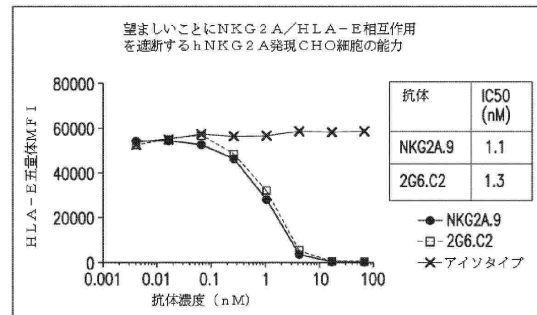


FIG.23B

## 【図 2 3 C】

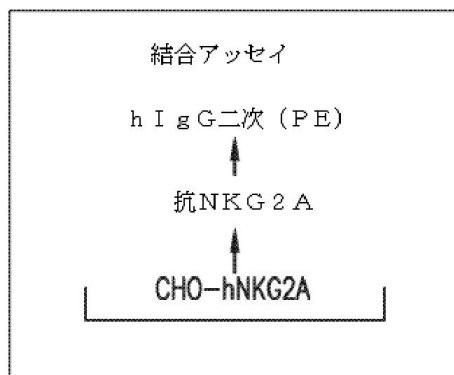


FIG.23C

## 【図 2 3 D】

WO 2020/102501

40/86

PCT/US2019/061429

ヒトNKG2A発現CHO細胞と結合し、  
NKG2A/HLA-E相互作用を遮断する、2G6.C2抗体の能力

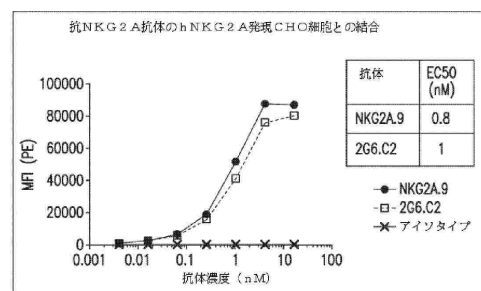


FIG.23D

10

20

30

40

50

## 【図 2 4 A】

WO 2020/102501

41/86

PCT/US2019/061429

カニクイザルNK細胞と結合した抗NKG2A抗体

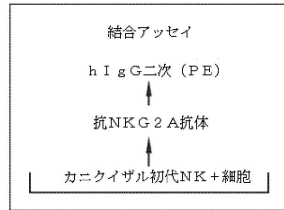


FIG.24A

## 【図 2 4 B】

WO 2020/102501

43/86

PCT/US2019/061429

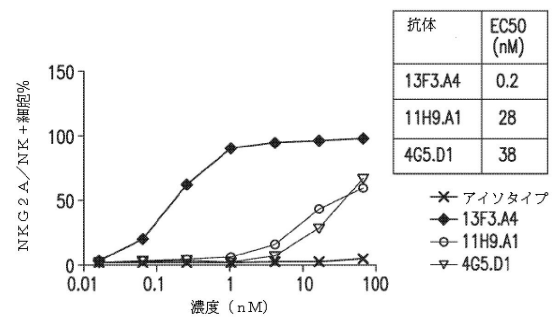


FIG.24B

10

## 【図 2 5 A】

WO 2020/102501

42/86

PCT/US2019/061429

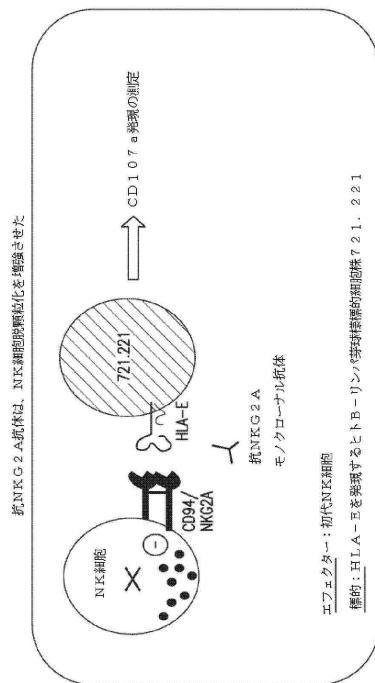


FIG.25A

## 【図 2 5 B】

WO 2020/102501

43/86

PCT/US2019/061429

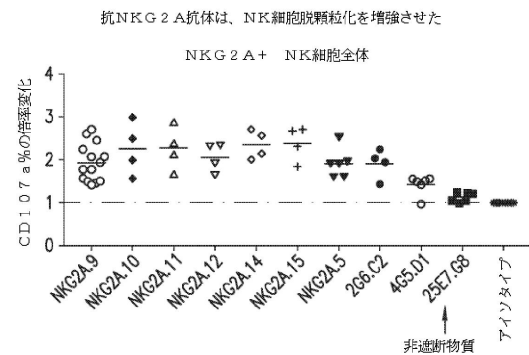


FIG.25B

20

30

40

50

## 【図 25C】

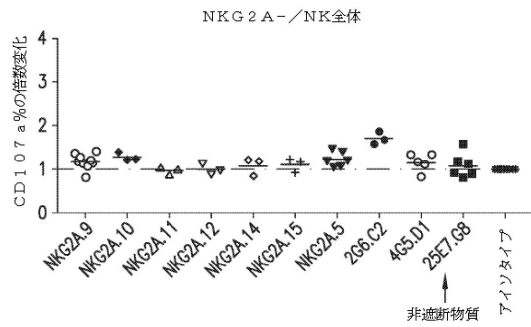


FIG. 25C

## 【図 26A】

WO 2020/102501

44/86

PCT/US2019/061429

抗NKG2A抗体は、インターフェロン-ガンマ (IFN $\gamma$ )  
産生であるNK細胞応答を増強させた

IFN $\gamma$ 産生

エフェクター: NKL

標的: CHO/MICA/HLA-E

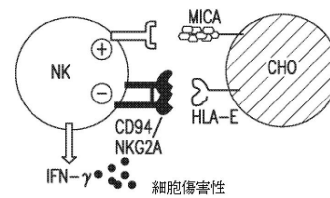


FIG. 26A

10

## 【図 26B】

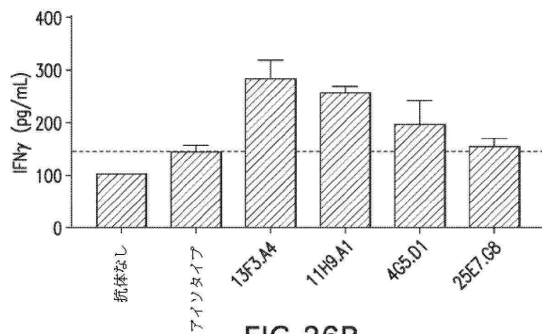


FIG. 26B

## 【図 27A】

WO 2020/102501

45/86

PCT/US2019/061429

抗NKG2A抗体は、IFN $\gamma$ 産生の増大である  
CD8+ T細胞応答を増強させた

エフェクター: CD8+ T細胞

標的: HS766T  
(膵臓癌細胞株)

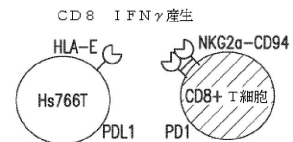


FIG. 27A

20

30

40

50

【図 27 B】

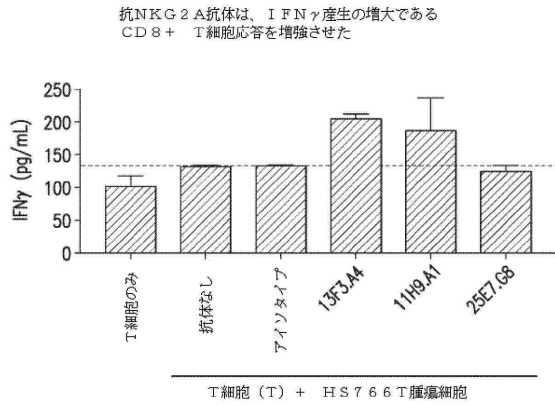
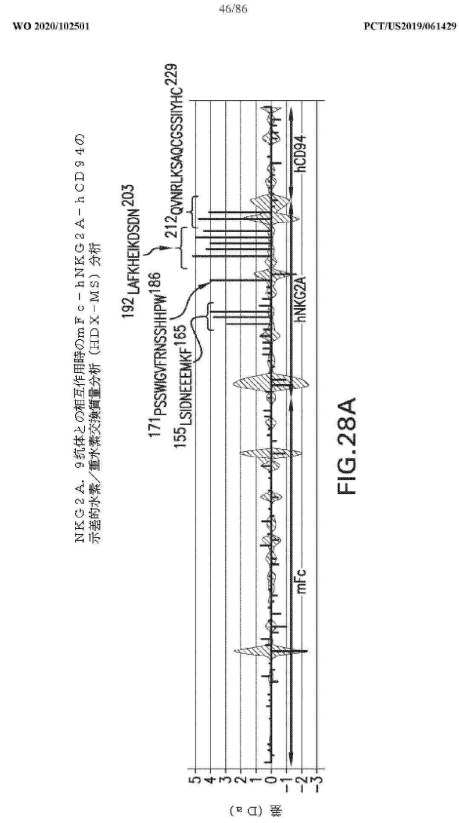
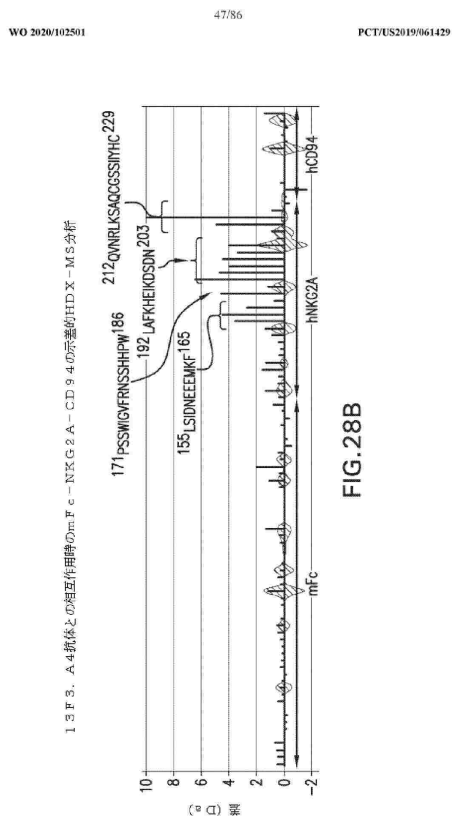


FIG.27B

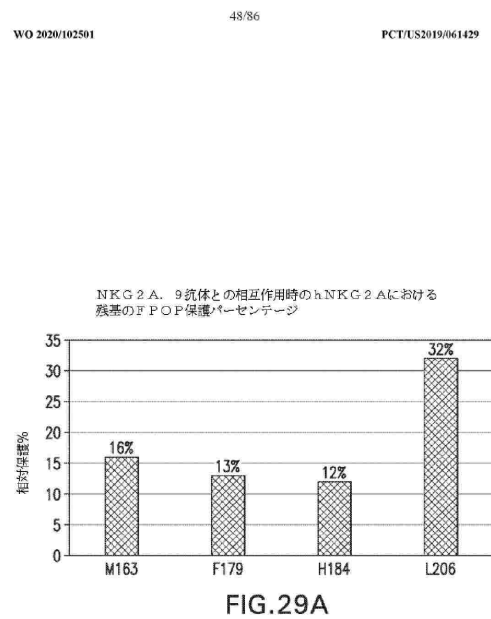
【図 28 A】



【図 28 B】



【図 29 A】



10

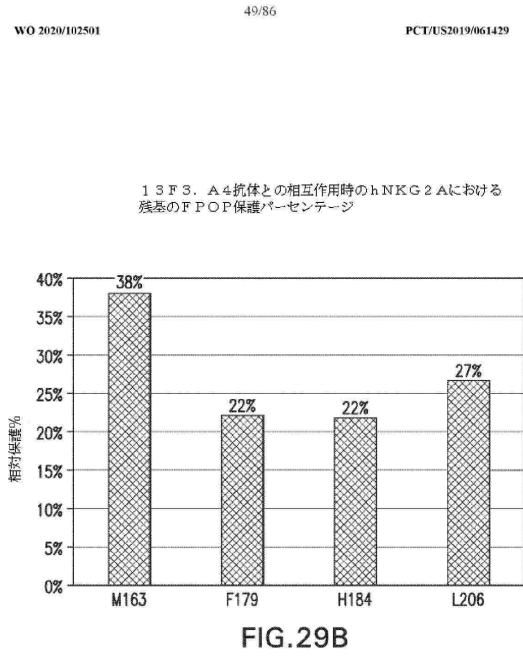
20

30

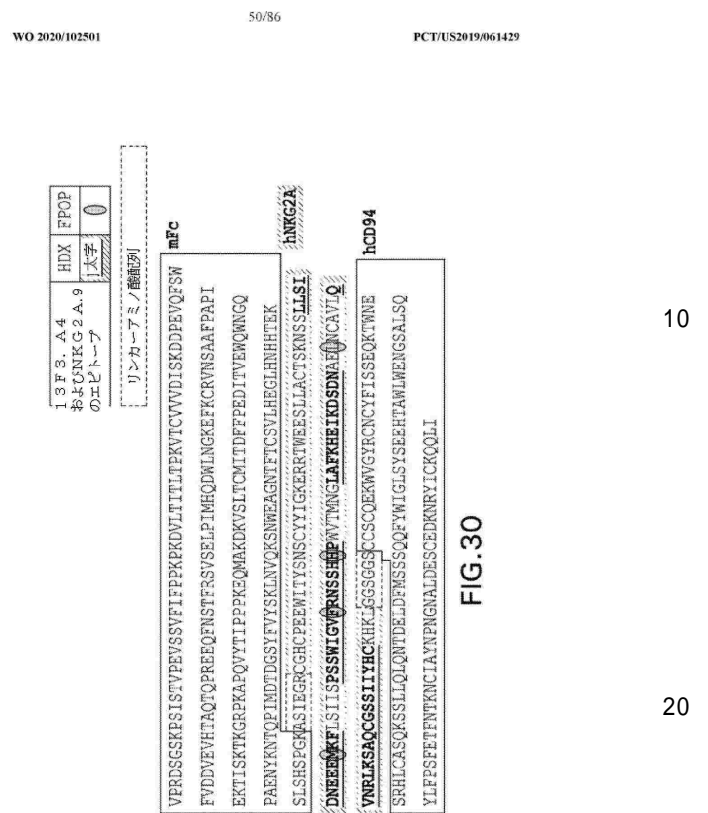
40

50

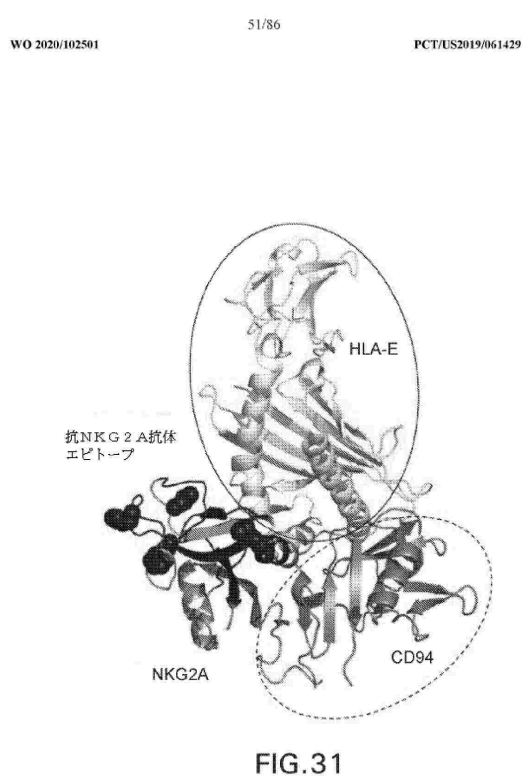
【図 29 B】



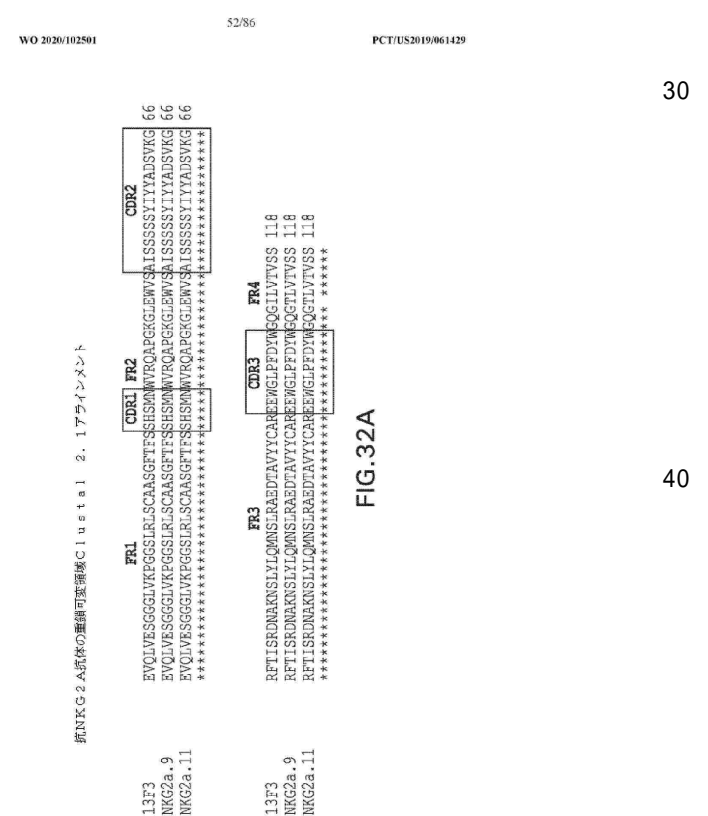
【図 30】



【図 31】



【図 32 A】



【図 32 B】



## 【図 3 2 B】

WO 2020/102501

53/86

PCT/US2019/061429

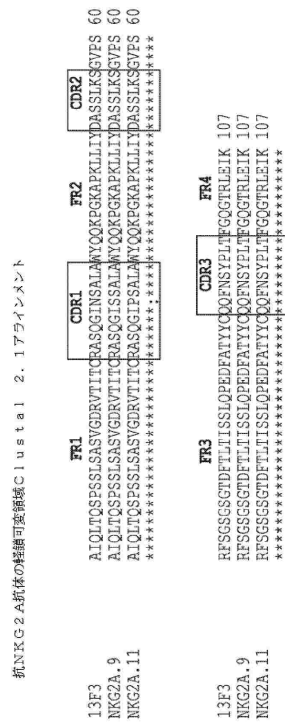


FIG.32B

## 【図 3 3】

WO 2020/102501

54/86

PCT/US2019/061429

NKG2A.9は、CHO/s c O K T 3 / H L A - E で刺激したNK2A.9発現 Jurkat細胞において、NK- $\kappa$ Bシグナル伝達の阻害を逆転させた

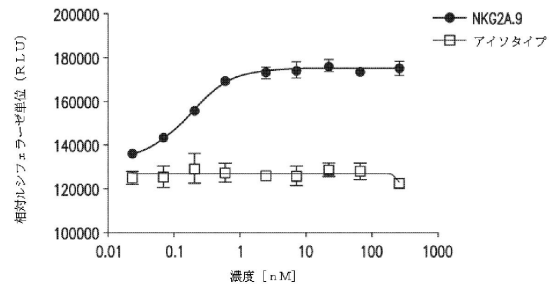


FIG.33

## 【図 3 4 A】

WO 2020/102501

55/86

PCT/US2019/061429

NKG2A.9および抗PD-L1抗体は、CHO/s c O K T 3 / H L A - E / P D - L 1 と共培養したNK2A.9<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞によるIFN- $\gamma$ 誘導を増強させた

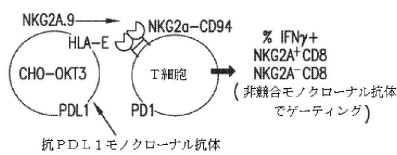


FIG.34A

## 【図 3 4 B】

NKG2A.9および抗PD-L1抗体は、CHO/s c O K T 3 / H L A - E / P D - L 1 と共培養したNK2A.9<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞によるIFN- $\gamma$ 誘導を増強させた

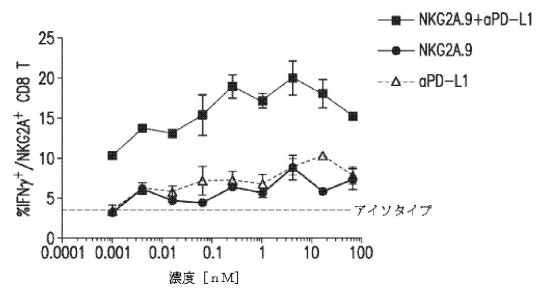


FIG.34B

10

20

30

40

50



## 【図 35 A】

WO 2020/102501

56/86

PCT/US2019/061429

NKG2A. 9 および抗PD-L1抗体は、CHO/s cOKT3/HLA-E/PD-L1と共培養した腫瘍浸潤NKG2A<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> T細胞によるIFN- $\gamma$ 産生を増強させた

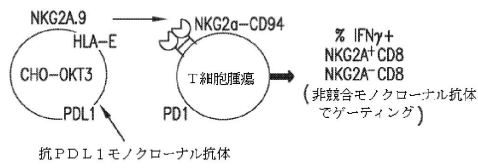
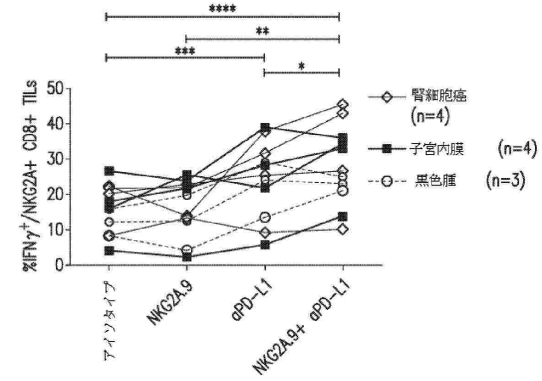


FIG.35A

## 【図 35 B】



対応のあるt検定 \*\*\*\*p<0.0001, \*\*\*p<0.0005, \*\*p<0.005, \*p<0.05  
— 群の比較を表す

FIG.35B

## 【図 36 A】

WO 2020/102501

57/86

PCT/US2019/061429

NKG2A. 9抗体は、NKG2A発現細胞と結合した後に内部移行される

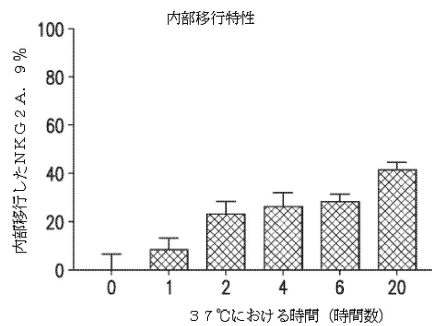


FIG.36A

## 【図 36 B】

NKG2A. 9抗体は、NKG2A発現細胞と結合した後に内部移行される

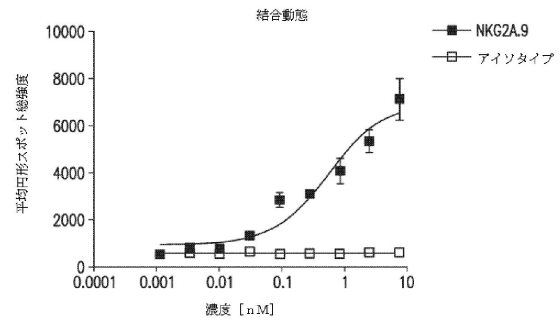


FIG.36B

10

20

30

40

50

## 【図 37 A】

WO 2020/102501

58/86

PCT/US2019/061429

NKG2A.9抗体は、NK細胞脱顆粒化およびHLA-E発現頭頸部腫瘍細胞の溶解を増強させた

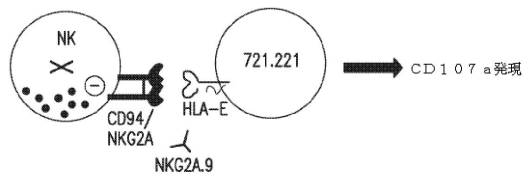


FIG.37A

## 【図 37 B】

NKG2A.9抗体は、NK細胞脱顆粒化およびHLA-E発現頭頸部腫瘍細胞の溶解を増強させた

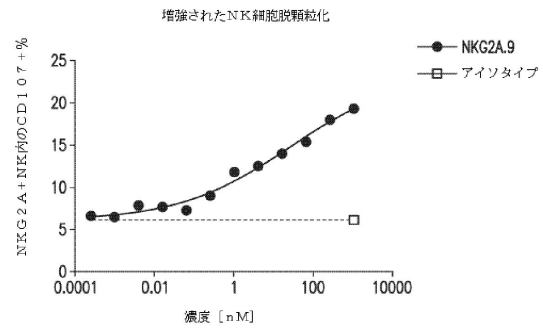


FIG.37B

10

## 【図 37 C】

WO 2020/102501

59/86

PCT/US2019/061429

NKG2A.9抗体は、NK細胞脱顆粒化およびHLA-E発現頭頸部腫瘍細胞の溶解を増強させた

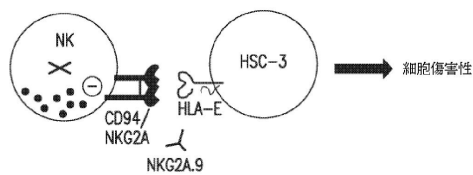


FIG.37C

## 【図 37 D】

NKG2A.9抗体は、NK細胞脱顆粒化およびHLA-E発現頭頸部腫瘍細胞の溶解を増強させた

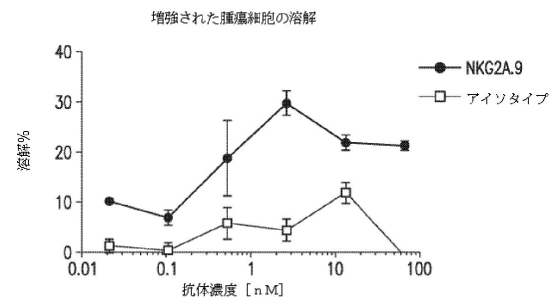


FIG.37D

20

30

40

50

## 【図 38 A】

WO 2020/102501

60/86

PCT/US2019/061429

13F3.A4抗体は、ナチュラルキラー細胞の機能的活性を増強させた

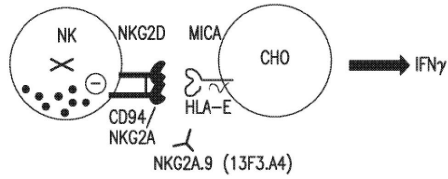


FIG.38A

## 【図 38 B】

13F3.A4抗体は、ナチュラルキラー細胞の機能的活性を増強させた

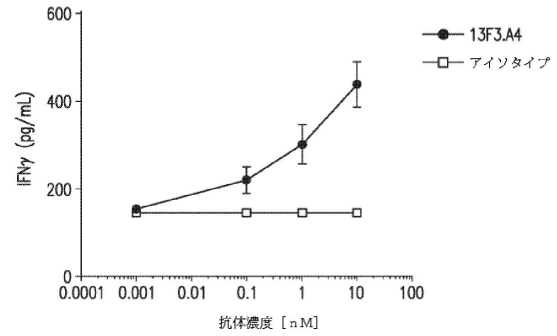


FIG.38B

## 【図 39】

WO 2020/102501

61/86

PCT/US2019/061429

抗mNKG2A抗体単剤療法は、CT26結腸癌腫瘍モデルにおいて腫瘍成長を阻害した

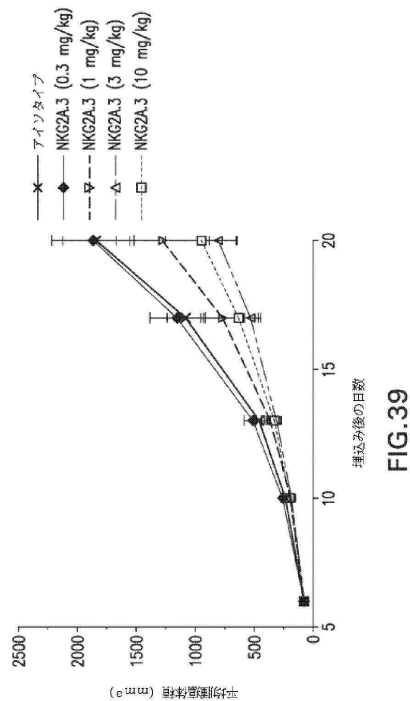


FIG.39

## 【図 40 A】

WO 2020/102501

62/86

PCT/US2019/061429

抗mNKG2Aおよび抗mPD-1抗体の組合せにより、CT26マウスモデルにおいて腫瘍成長が低減された

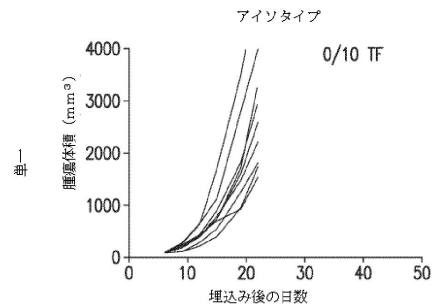


FIG.40A

10

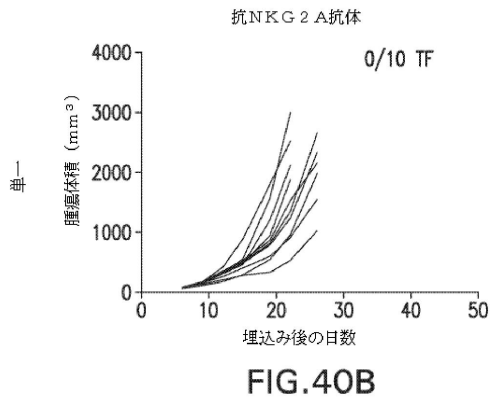
20

30

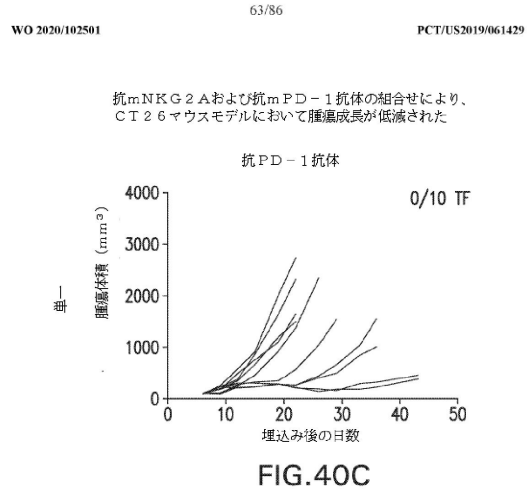
40

50

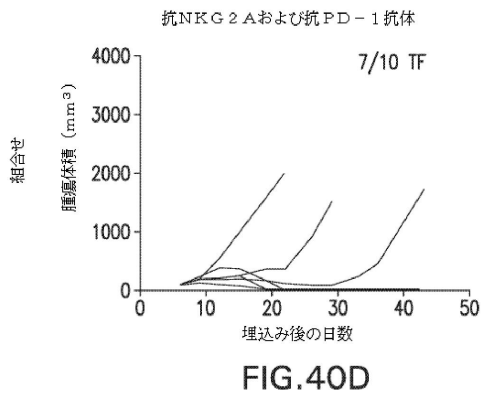
【図 40 B】



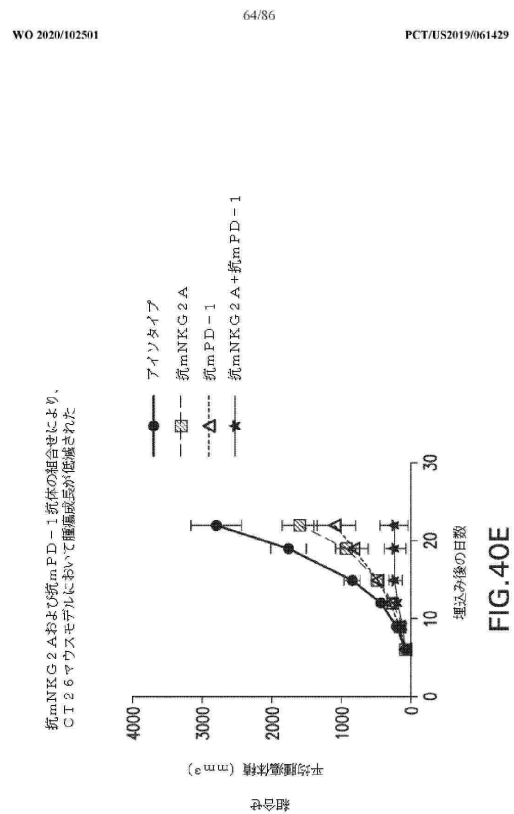
【図 40 C】



【図 40 D】



【図 40 E】



10

20

30

40

50

## 【図 4 1 A】

WO 2020/102501

65/86

PCT/US2019/061429

抗mNKG2Aおよび抗mPD-1抗体は、CT26マウス結腸癌において、NKおよび腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞傷害性ならびにIFN- $\gamma$ を増大させた

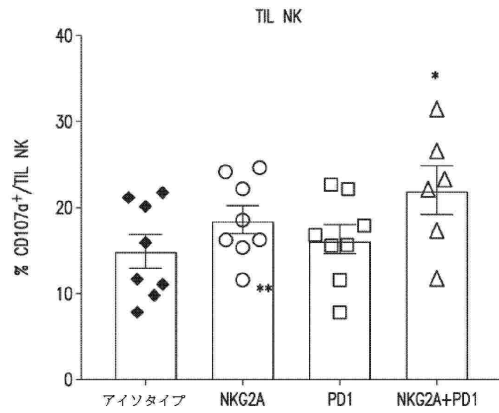


FIG.41A

## 【図 4 1 B】

WO 2020/102501

66/86

PCT/US2019/061429

抗mNKG2Aおよび抗mPD-1抗体は、CT26マウス結腸癌において、NKおよび腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞傷害性ならびにIFN- $\gamma$ を増大させた

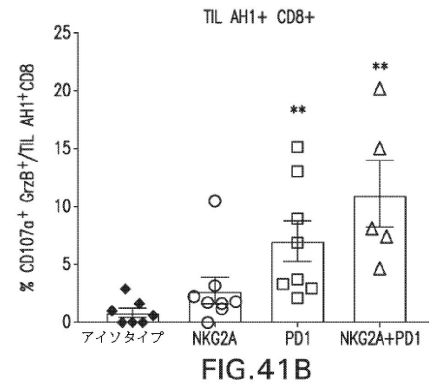


FIG.41B

## 【図 4 1 C】

抗mNKG2Aおよび抗mPD-1抗体は、CT26マウス結腸癌において、NKおよび腫瘍特異的CD8<sup>+</sup>T細胞の細胞傷害性ならびにIFN- $\gamma$ を増大させた

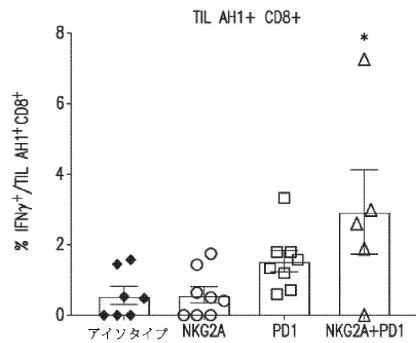


FIG.41C

## 【図 4 2 A】

WO 2020/102501

67/86

PCT/US2019/061429

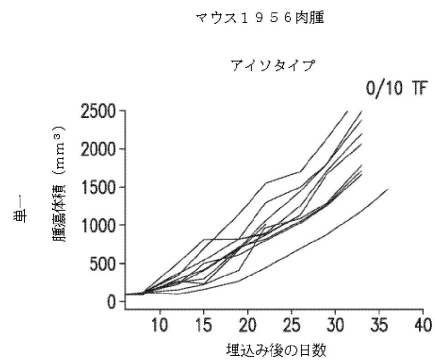


FIG.42A

10

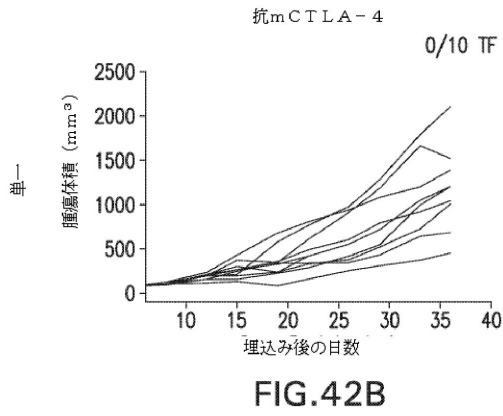
20

30

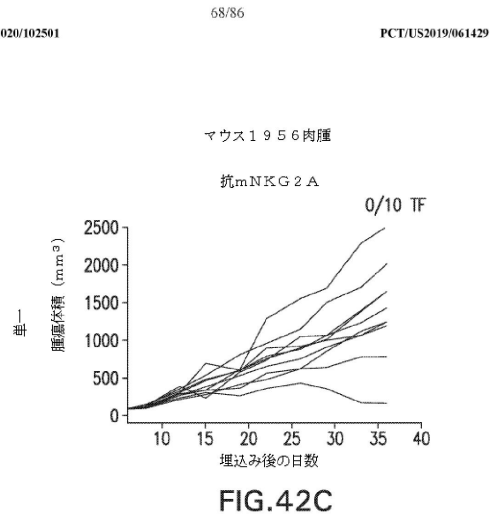
40

50

【図 4 2 B】

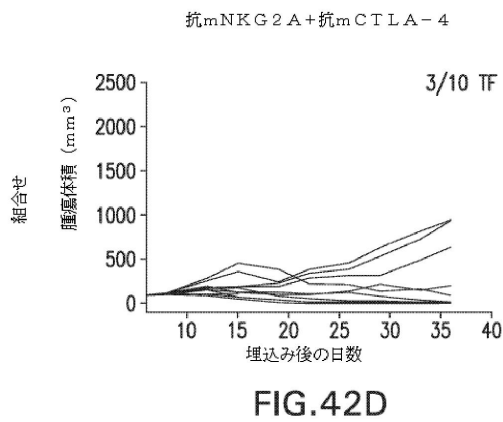


【図 4 2 C】

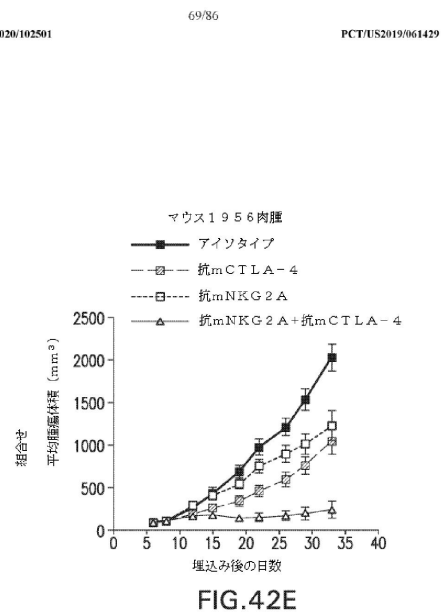


10

【図 4 2 D】



【図 4 2 E】



20

30

40

50

【図 4 3】

WO 2020/102501

70/86

PCT/US2019/061429

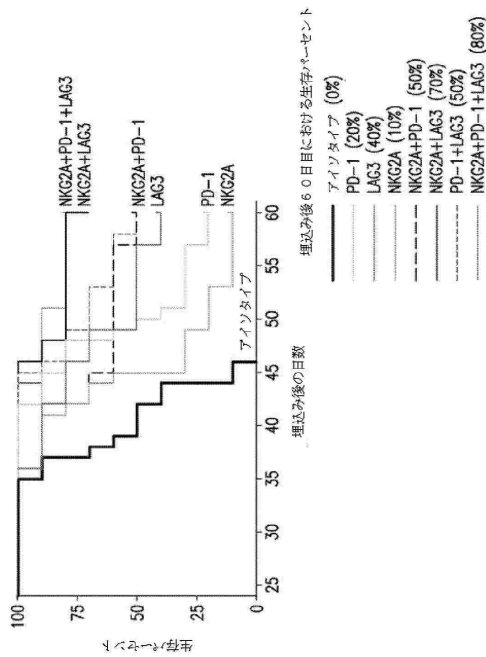


FIG. 43

【図 4 4】

WO 2020/102501

71/86

PCT/US2019/061429

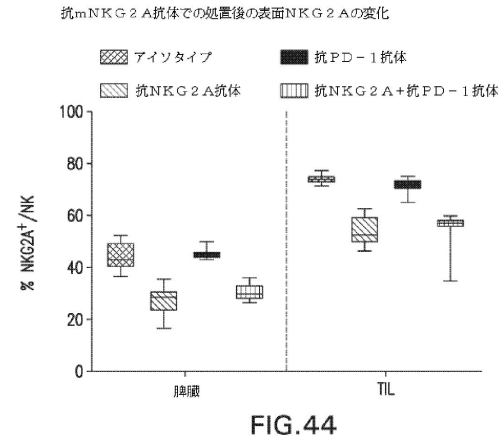


FIG. 44

【図 4 5】

WO 2020/102501

72/86

PCT/US2019/061429

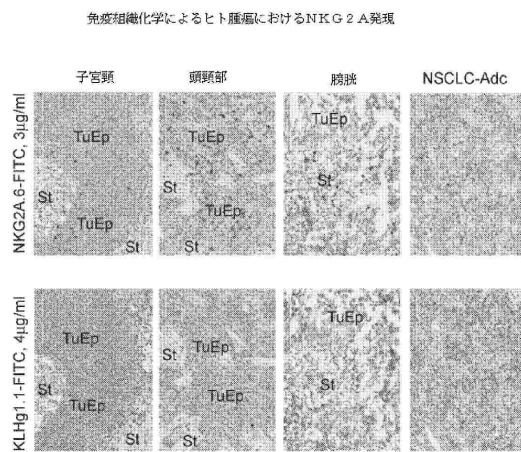


FIG. 45

【図 4 6】

WO 2020/102501

73/86

PCT/US2019/061429

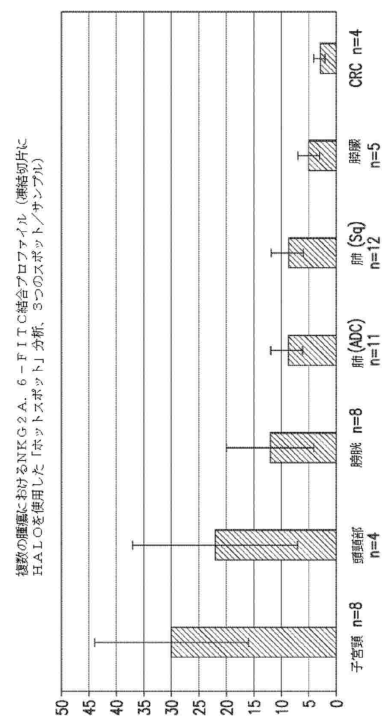


FIG. 46

10

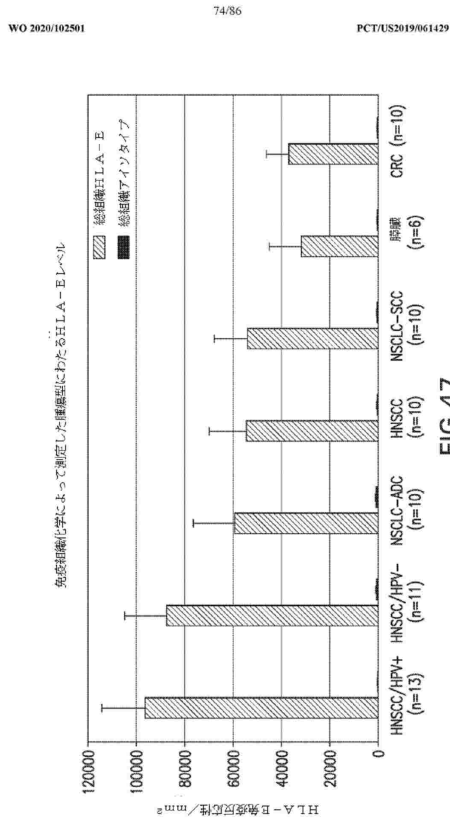
20

30

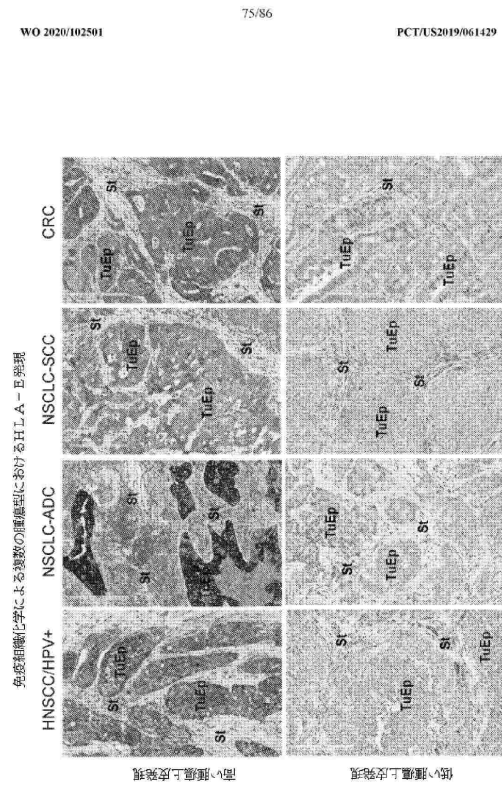
40

50

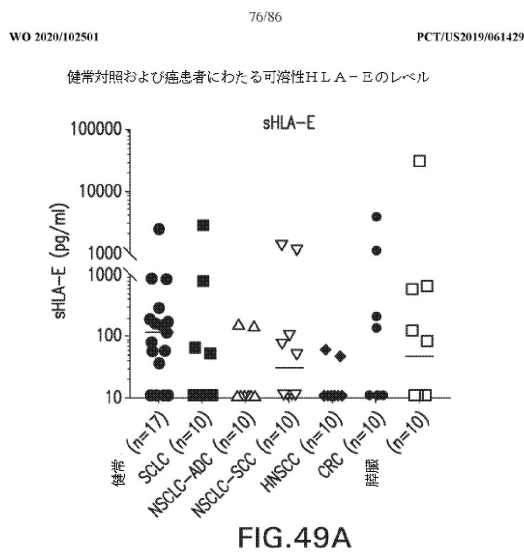
【図 4 7】



【図 4 8】

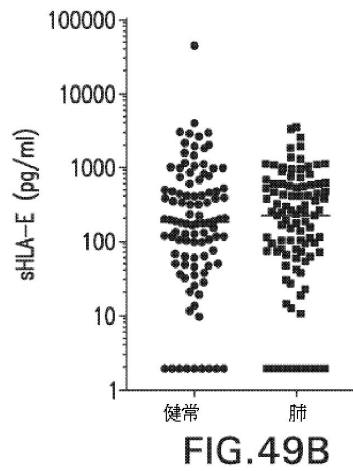


【図 4 9 A】



【図 4 9 B】

健常対照および癌患者にわたる可溶性HLA-Eのレベル



10

20

30

40

50



【 図 5 0 】

【 図 5 1 】

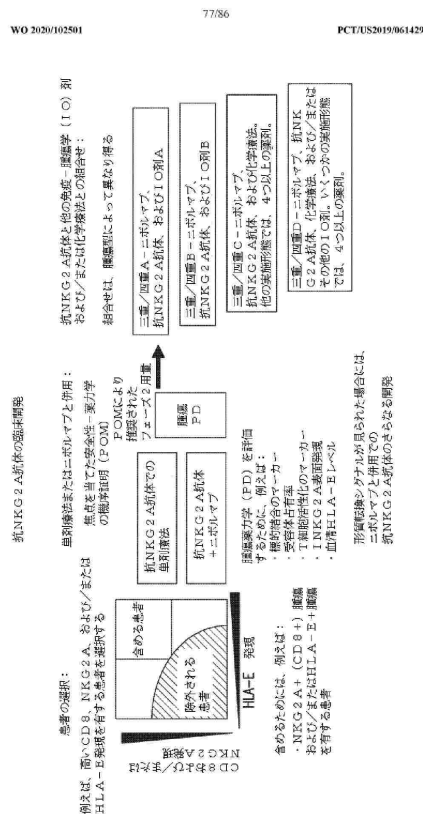
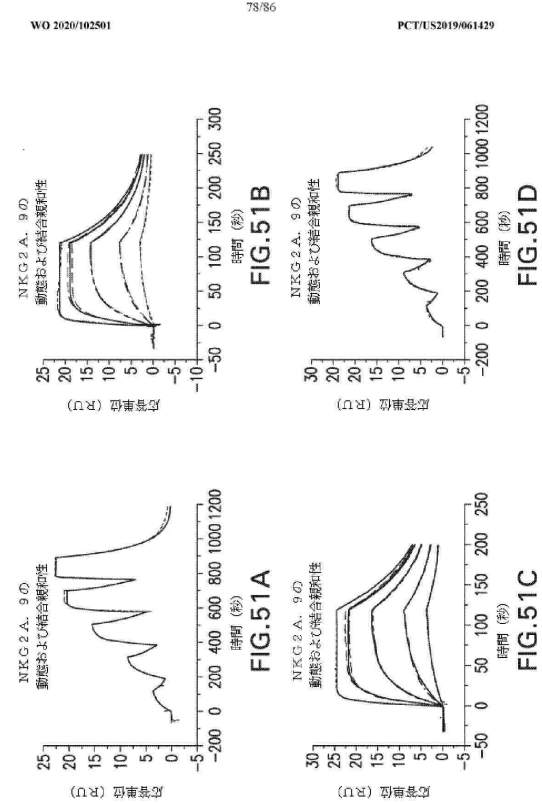


FIG. 50



時間 (秒)

FIG. 51A

時間 (秒)

FIG. 51B

FIG. 51C

FIG. 51D

【 図 5 2 A 】

【 図 5 2 B 】

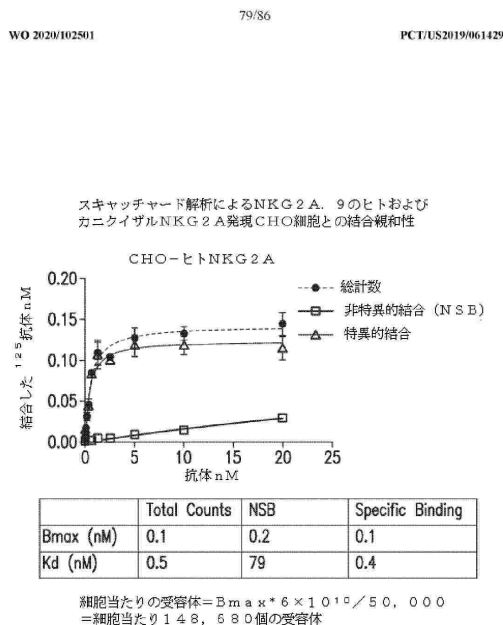


FIG.52A

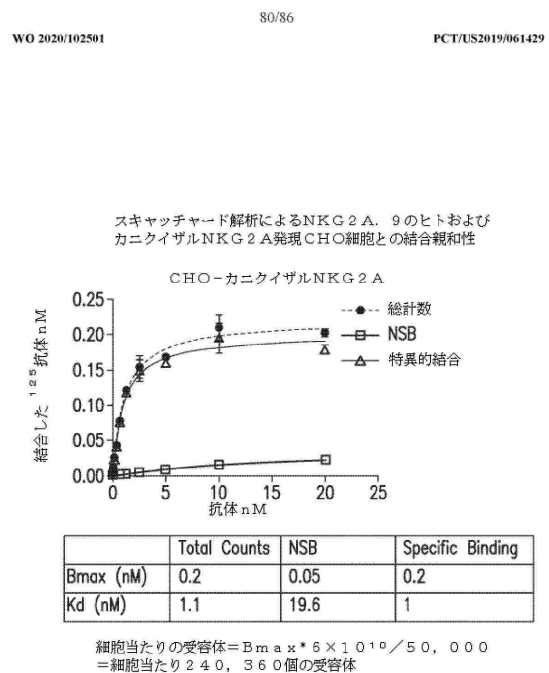


FIG.52B

10

20

30

40

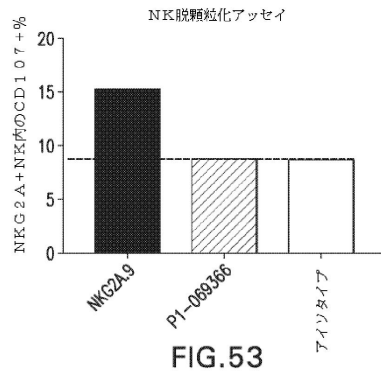
50

【図 5 3】

WO 2020/102501

81/86

PCT/US2019/061429

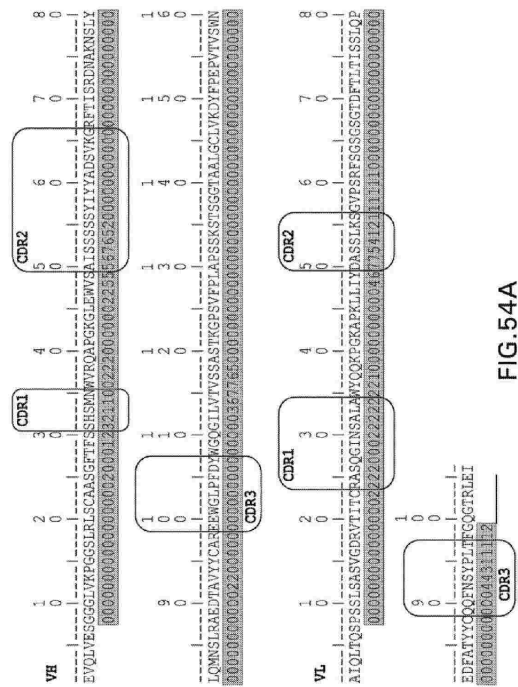


【図 5 4 A】

WO 2020/102501

82/86

PCT/US2019/061429

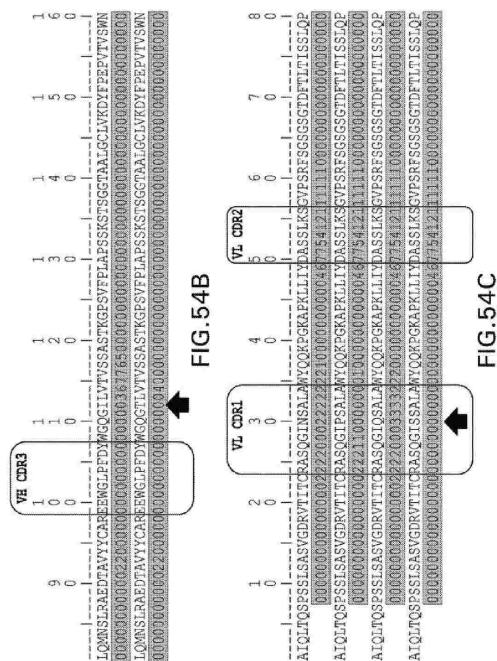


【図 5 4 B C】

WO 2020/102501

83/86

PCT/US2019/061429

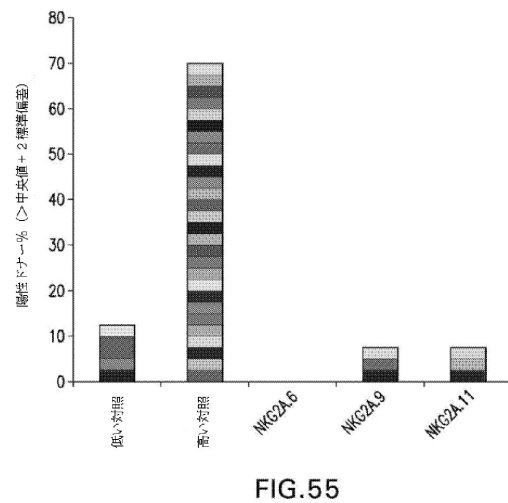


【図 5 5】

WO 2020/102501

84/86

PCT/US2019/061429



10

20

30

40

50



## フロントページの続き

## (51)国際特許分類

F I

A 6 1 K 45/00 (2006.01)

A 6 1 K 45/00

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395

T

## (33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

アメリカ合衆国 9 4 4 0 4 カリフォルニア州フォスター・シティ、ガル・アベニュー 7 8 6

## (72)発明者 コーマン, アラン ジェイ

アメリカ合衆国 9 4 6 1 1 カリフォルニア州ビードモント、オークランド・アベニュー 1 2 0 7

## (72)発明者 デシュパンデ, シュリカント

アメリカ合衆国 9 4 5 5 5 カリフォルニア州フレモント、リーマー・テラス 5 9 1 0

## (72)発明者 ジャタキア, エイミー ディ

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0、ブリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

## (72)発明者 ホアン, リチャード ワイ

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、ブリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

## (72)発明者 チェン, グオドン

アメリカ合衆国 0 8 5 4 3 ニュージャージー州プリンストン、ルート 2 0 6 アンド・プロビンス・ライン・ロード、ブリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

## (72)発明者 レイクストロー, ジンジャー シー

アメリカ合衆国 0 2 1 4 2 マサチューセッツ州ケンブリッジ、ビニー・ストリート 1 0 0、ブリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

## (72)発明者 ヘニング, カーラ アン

アメリカ合衆国 9 5 0 3 5 カリフォルニア州ミルピタス、カーティス・アベニュー 1 3 1

## (72)発明者 ランガン, バンギブラム エス

アメリカ合衆国 9 4 5 2 3 カリフォルニア州ブレザント・ヒル、ローラリー・プレイス 1 5 6

## (72)発明者 ベー, クリスティーネ

アメリカ合衆国 9 4 1 1 4 カリフォルニア州サンフランシスコ、セブンティーンズ・ストリート 4 5 9 8

## (72)発明者 シャオ, シアン

アメリカ合衆国 9 4 0 6 3 カリフォルニア州レッドウッド・シティ、ベイ・ロード 7 0 0、ブリストル - マイヤーズ・スクイブ・カンパニー内

審査官 斉藤 貴子

## (56)参考文献 特表 2 0 0 9 - 5 4 1 4 4 9 ( J P , A )

国際公開第 2 0 1 7 / 1 2 5 5 3 2 ( W O , A 1 )

特表 2 0 1 1 - 5 1 0 0 4 7 ( J P , A )

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

## (58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N

C 0 7 K

A 6 1 K

A 6 1 P

G 0 1 N

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

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