

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6843062号
(P6843062)

(45) 発行日 令和3年3月17日(2021.3.17)

(24) 登録日 令和3年2月25日(2021.2.25)

(51) Int.Cl.

F 1

C 12 N 15/13	(2006.01)	C 12 N 15/13
C 07 K 16/46	(2006.01)	C 07 K 16/46
C 12 Q 1/04	(2006.01)	C 12 Q 1/04
C 07 K 19/00	(2006.01)	C 07 K 19/00
C 07 K 14/725	(2006.01)	C 07 K 14/725

請求項の数 30 (全 76 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-550494 (P2017-550494)
 (86) (22) 出願日 平成28年3月25日 (2016.3.25)
 (65) 公表番号 特表2018-511319 (P2018-511319A)
 (43) 公表日 平成30年4月26日 (2018.4.26)
 (86) 國際出願番号 PCT/US2016/024361
 (87) 國際公開番号 WO2016/160622
 (87) 國際公開日 平成28年10月6日 (2016.10.6)
 審査請求日 平成31年3月25日 (2019.3.25)
 (31) 優先権主張番号 62/139,617
 (32) 優先日 平成27年3月27日 (2015.3.27)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国(US)

(73) 特許権者 504043048
 ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア
 アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1150, スイート 2300
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 CAR-T細胞免疫療法のための新規標的としてのHLA-G

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列と、軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含む単離抗体、またはその抗原結合性断片であって、アミノ酸配列：

G S H S M R Y F S A A V S R P G R G E P R F I A M G Y V D D T Q F V R F D
 S D S A C P R M E P R A P W V E Q E G P E Y W E E E T R N T K A H A Q T
 D R M N L Q T L R G Y Y N Q S E A S S H T L Q W M I G C D L G S D G R L L
 R G Y E Q Y A Y D G K D Y L A L N E D L R S W T A A D T A A Q I S K R K
 C E A A N V A E Q R R A Y L E G T C V E W L H R Y L E N G K E M L Q R A
 D P P K T H V T H H P V F D Y E A T L R C W A L G F Y P A E I I L T W Q R 10
 D G E D Q T Q D V E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q
 R Y T C H V Q H E G L P E P L M L R W K Q S S L P T I P I M G I V A G L
 V V L A A V V T G A A V A A V L W R K K S S D (配列番号30)を含む、HLA-Gのエピトープに結合し、

(1) 前記HCが、

(a) アミノ酸配列 G F N I K D T Y (配列番号1)で示されるHC C D R H 1；
 (b) アミノ酸配列 I D P A N G N T (配列番号3)で示されるHC C D R H 2；および

(c) アミノ酸配列 A R S Y Y G G F A Y (配列番号5)で示されるHC C D R H 3を含み；かつ

前記 L C が、

- (a) アミノ酸 K S V S T S G Y S Y (配列番号 1 1) で示される L C C D R L 1 ;
 (b) アミノ酸配列 L V S (配列番号 1 3) で示される L C C D R L 2 ; および
 (c) アミノ酸配列 Q H S R E L P R T (配列番号 1 5) で示される L C C D R L 3
 を含み、あるいは

(2) 前記 H C が、

- (a) アミノ酸配列 G F T F N T Y A (配列番号 2) で示される H C C D R H 1 ;
 (b) アミノ酸配列 I R S K S N N Y A T (配列番号 4) で示される H C C D R H 2
 ; および
 (c) アミノ酸配列 V R G G Y W S F D V (配列番号 6) で示される H C C D R H 3
 を含み；かつ

前記 L C が、

- (a) アミノ酸 K S V S T S G Y S Y (配列番号 1 1) で示される L C C D R L 1 ;
 (b) アミノ酸配列 R M S (配列番号 1 4) で示される L C C D R L 2 ; および
 (c) アミノ酸配列 M Q H L E Y P Y T (配列番号 1 6) で示される L C C D R L 3
 を含む、単離抗体。

【請求項 2】

前記 H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、配列番号 8 のアミノ酸配列を含み、および前記 L C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、配列番号 1 8 のアミノ酸配列を含み、または前記 H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、配列番号 1 0 のアミノ酸配列を含み、および前記 L C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、配列番号 2 0 のアミノ酸配列を含み、あるいはそれらの各々の少なくとも 9 0 % のアミノ酸同一性を有する同等物を含む、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

前記抗体が、モノクローナル抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体の群より選択され、前記抗原結合性断片が、 F a b 、 F (a b ') 2 、 F a b ' 、 s c F v 、および F v からなる群より選択される、請求項 1 から 2 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 4】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体、および任意選択で、検出可能な標識を含む、単離 e x v i v o 複合体。

【請求項 5】

請求項 4 に記載の複合体を含む単離 e x v i v o 細胞。

【請求項 6】

生物学的試料中の H L A - G を検出する i n v i t r o 方法であって、前記試料を、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体と接触させるステップと、前記抗体または前記抗原結合性断片の、 H L A - G への結合により形成された複合体を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 7】

前記試料が、細胞試料または組織試料を含み、任意選択で、前記試料が、がんを有すると診断されているか、がんを有すると疑われているか、またはがんを有する危険性がある対象から得られる、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

前記がんが、前立腺がんまたは卵巣がんからなる群より選択される、請求項 7 に記載の方法。

【請求項 9】

前記検出が、免疫組織化学 (I H C) 、ウェスタンプロット法、フローサイトメトリー、または E L I S A のうちの 1 または複数を含む、請求項 6 から 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 10】

対象、任意選択で哺乳動物から単離された試料中の病的細胞を検出する方法であって、

10

20

30

40

50

(a) 前記試料中の HLA - G に結合する、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体により形成された複合体を検出することにより、前記対象に由来する生物学的試料中の HLA - G のレベルを検出するステップであって、任意選択で、前記対象に由来する生物学的試料が、前立腺または卵巣から単離された試料のうちの 1 または複数を含む、ステップと；

(b) ステップ (a) において観察された HLA - G のレベルを、対照の生物学的試料中で観察される HLA - G のレベルと比較するステップとを含み、

HLA - G のレベルが、前記対照の生物学的試料中で観察されるレベルと比較して上昇する場合に、前記病的細胞が検出され、HLA - G のレベルが、前記対照の生物学的試料中で観察されるレベルと比較して上昇しない場合に、前記病的細胞が検出されない、方法。

【請求項 1 1】

前記検出が、免疫組織化学 (IHC) 、ウェスタンプロット法、フローサイトメトリー、または E L I S A のうちの 1 または複数を含む、請求項 1 0 に記載の方法。

【請求項 1 2】

前記哺乳動物が、マウス、ネコ科動物、イヌ科動物、ヒツジ、ウシ、サル、およびヒトの群より選択される、請求項 1 0 から 1 1 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 3】

HLA - G を検出するためのキットであって、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体と、使用のための指示とを含む、キット。

【請求項 1 4】

腫瘍試料中の HLA - G を検出する *in vitro* 方法であって、

(a) 前記試料を、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗体と接触させるステップと；

(b) 前記抗体または前記抗原結合性断片の、HLA - G への結合により形成された複合体を検出するステップとを含む、方法。

【請求項 1 5】

(a) 抗 HLA - G 抗体の抗原結合性ドメイン；(b) C D 8 ヒンジドメイン；(c) C D 8 膜貫通ドメイン；(d) C D 2 8 共刺激性シグナル伝達領域および / または 4 - 1 B B 共刺激性シグナル伝達領域；ならびに (e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む、キメラ抗原受容体 (CAR) であって、前記抗 HLA - G 抗体が、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体である、CAR。

【請求項 1 6】

検出可能なマーカーまたは精製マーカーをさらに含む、請求項 1 5 に記載の CAR。

【請求項 1 7】

請求項 1 5 または 1 6 に記載の CAR をコードする単離核酸配列またはその相補体またはそれらの各々の同等物。

【請求項 1 8】

抗 HLA - G 抗体の抗原結合性ドメインまたは HLA - G リガンドの上流に配置された K o z a k コンセンサス配列、および / あるいは抗生物質耐性ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 1 7 に記載の単離核酸。

【請求項 1 9】

請求項 1 7 または 1 8 に記載の単離核酸配列を含むベクター。

【請求項 2 0】

請求項 1 5 または 1 6 に記載の CAR ；および / または請求項 1 7 または 1 8 に記載の単離核酸；および / または請求項 1 9 に記載のベクターを含む単離細胞。

【請求項 2 1】

T 細胞または N K 細胞である、請求項 2 0 に記載の単離細胞。

10

20

30

40

50

【請求項 2 2】

請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の単離抗体をコードする単離核酸またはその相補体。

【請求項 2 3】

担体と、請求項 1 5 もしくは 1 6 に記載の C A R を含む単離細胞；および／または請求項 1 7、1 8 もしくは 2 2 に記載の単離核酸；および／または請求項 1 9 に記載のベクター；および／または請求項 2 0 もしくは 2 1 に記載の単離細胞；および／または請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体；および／または請求項 4 に記載の複合体のうちの 1 または複数とを含む、組成物。

【請求項 2 4】

10

H L A - G C A R 発現細胞を作製する方法であって、

(i) 単離細胞の集団に、請求項 1 5 または 1 6 に記載の C A R をコードする核酸配列を形質導入するステップと；

(i i) ステップ (i) の前記核酸配列の形質導入に成功した、前記単離細胞の亜集団を選択し、これにより、H L A - G C A R 発現細胞を作製するステップとを含む、方法。

【請求項 2 5】

腫瘍の増殖の阻害を必要とする対象、任意選択でヒト対象における腫瘍の増殖を阻害する、および／またはがんの処置を必要とする患者、任意選択でヒト患者におけるがんを処置するための、請求項 2 0 または 2 1 に記載の単離細胞を含む、組成物。

20

【請求項 2 6】

前記単離細胞が、処置される前記対象に対して自家である、請求項 2 5 に記載の組成物。

【請求項 2 7】

前記腫瘍が、充実性腫瘍、任意選択で、甲状腺腫瘍、卵巣腫瘍、または前立腺がん腫瘍である、および／または前記がんが、甲状腺腫瘍、卵巣腫瘍、または前立腺がん腫瘍である、請求項 2 5 または 2 6 に記載の組成物。

【請求項 2 8】

腫瘍細胞またはがん細胞が、H L A - G を発現または過剰発現させる、請求項 2 5 から 2 7 のいずれか一項に記載の組成物。

30

【請求項 2 9】

患者が、H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いのか、高くないのかを決定するための、請求項 1 から 3 のいずれか一項に記載の抗体を含む組成物であって、前記組成物が、前記患者から単離された腫瘍試料と接触させられ、前記腫瘍試料に結合した前記抗体の存在が検出されることを特徴とし、前記腫瘍試料に結合した抗体の存在は、前記患者が、前記 H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いことを指示し、前記腫瘍試料に結合した前記抗体の非存在は、前記患者が、前記 H L A - G 療法に応答する可能性が高くなことを指示す、組成物。

【請求項 3 0】

前記 H L A - G C A R 療法が、前記 H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いと決定された前記患者へと投与されることを特徴とする、請求項 2 9 に記載の組成物。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願への相互参照

この出願は、米国特許法第 § 119 (e) の下、2015年3月27日に出願された米国仮出願第 62 / 139,617 号（この内容は、その全体が参考として本明細書に援用される）への優先権を主張する。

【0 0 0 2】

50

本開示は一般に、ヒト免疫学の分野、具体的には、がんの免疫療法に関する。

【背景技術】

【0003】

本発明の背景についての以下の考察は、読者が本発明を理解する一助とするために提示するだけであり、本発明に対する先行技術を記載または構成することを容認するものではない。

【0004】

HLA-Gとは、特に、阻害性のNK細胞受容体のリガンドとして、主に、細胞傷害性の免疫細胞機能を抑制するように働く非古典的なMHCクラスI分子である。

【発明の概要】

10

【課題を解決するための手段】

【0005】

新規の抗HLA-G抗体、ならびにそれらを診断的および治療的に使用する方法が提供される。この点で、本明細書では、重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列と、軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含む単離抗体であって、アミノ酸配列: GSHSMRYFSA AVSRPGRGEP RFIAMGYVDD TQFVRFD SDS ACPRMEEPRA P WVEQEGPEYW EEEETRNTKAH AQT DRMNLQT LRGYYNQSEA SSHTLQWMIG CDLGS DGRLL RGYEQYAYDG KDYLALNEDL RSWTAADTAA QISKRK CEA A NVAEQRRAYL EGTCV EWHLA-G YLENGKEMLQ RADPPPKTHVT HHPVFDYEAT LRCWALGFYP AEIILTW QRD GEDQTQDVEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVP SGE EQRYTCH VQHEGLPEPL MLRWKQSSL P TIPIMGI VA GLVVLAAV VTGAAVAAVL WRKKSSD(配列番号30)、またはその同等物を含む、ヒトHLA-Gのエピトープに結合する単離抗体が提示される。一態様では、抗体は、少なくとも 10^{-6} Mの特異的結合アフィニティーを有する。ある特定の態様では、抗体は、少なくとも約 10^{-7} M、好ましくは、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} Mのアフィニティーで結合する。

20

【0006】

本明細書で開示されるある特定の実施形態では、抗体は、重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列と、軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含み、ここで、抗体は、HCが、以下:アミノ酸配列G FN I K D T Y(配列番号1)もしくはG F T F N T Y A(配列番号2)、またはそれらの各々の同等物を含むHC C D R H 1;および/あるいはアミノ酸配列I D P A N G N T(配列番号3)もしくはI R S K S N N Y A T(配列番号4)、またはそれらの各々の同等物を含むHC C D R H 2;および/あるいはアミノ酸配列A R S Y Y G G F A Y(配列番号5)もしくはV R G G Y W S F D V(配列番号6)、またはそれらの各々の同等物を含むHC C D R H 3のうちのいずれか1つを含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにつれからなり、ヒトHLA-Gのエピトープに結合する。

30

【0007】

40

本明細書で開示されるある特定の実施形態では、抗体は、重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列と、軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含み、ここで、抗体は、LCが、アミノ酸K S V S T S G Y S Y(配列番号11)もしくはK S L L H S N G N T Y(配列番号12)、またはそれらの各々の同等物を含むLC C D R L 1;および/あるいはアミノ酸配列L V S(配列番号13)もしくはR M S(配列番号14)、またはそれらの各々の同等物を含むLC C D R L 2;および/あるいはアミノ酸配列Q H S R E L P R T(配列番号15)もしくはM Q H L E Y P Y T(配列番号16)、またはそれらの各々の同等物を含むLC C D R L 3を含むアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにつれからなり、ヒトHLA-Gのエピトープに結合する。

50

【0008】

本開示の一部の態様は、HLA-Gに特異的な抗原結合性ドメイン（例えば、抗HLA-G抗体の抗原結合性ドメイン）を含むキメラ抗原受容体（CAR）、それらをコードする核酸のほか、それらを作製および使用するための方法に関する。

【0009】

本開示の態様は、(a) HLA-G抗体の抗原結合性ドメイン；(b) ヒンジドメイン；(c) 膜貫通ドメイン；および(d) 細胞内ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）に関する。本開示のさらなる態様は、(a) HLA-G抗体の抗原結合性ドメイン；(b) ヒンジドメイン；(c) CD28膜貫通ドメイン；(d) CD28共刺激性シグナル伝達領域、4-1BB共刺激性シグナル伝達領域、ICOS共刺激性シグナル伝達領域、およびOX40共刺激性領域から選択される、1または複数の共刺激性領域；ならびに(e) CD3ゼータシグナル伝達ドメインまたはその同等物もしくは代替物を含むキメラ抗原受容体（CAR）に関する。

10

【0010】

さらなる態様では、本開示は、(a) 抗HLA-G抗体の抗原結合性ドメイン、(b) CD8ヒンジドメイン；(c) CD8膜貫通ドメイン；(d) CD28共刺激性シグナル伝達領域および/または4-1BB共刺激性シグナル伝達領域；ならびに(e) CD3ゼータシグナル伝達ドメイン、またはその同等物もしくは代替物を含むキメラ抗原受容体（CAR）を提示する。

【0011】

20

さらなる態様では、本開示は、(a) 抗HLA-G抗体の抗原結合性ドメイン、(b) CD8ヒンジドメイン；(c) CD8膜貫通ドメイン；(d) 4-1BB共刺激性シグナル伝達領域；および(e) CD3ゼータシグナル伝達ドメイン、またはその同等物もしくは代替物を含むキメラ抗原受容体（CAR）を提示する。

【0012】

本開示のさらなる態様は、抗体をコードする単離核酸配列、ベクター、およびそれらを含有する宿主細胞に関する。

【0013】

本開示のさらなる態様は、HLA-G CARを含む単離細胞と、このような細胞を作製する方法とに関する。本開示のさらに他の方法態様は、腫瘍の増殖を阻害し、がん患者を処置するための方法であって、有効量の前記単離細胞を投与するステップを含む方法に関する。

30

【0014】

本開示のさらなる態様は、HLA-G抗体およびHLA-G CAR細胞の一方または両方の使用を介して、患者が、HLA-G CAR療法に応答する可能性が高いのか、高くなないのかを決定するための方法およびキットに関する。

【0015】

本開示のさらなる態様は、担体と、本明細書で開示される実施形態において記載される生成物のうちの1または複数とを含む組成物に関する。一部の態様では、本開示は、担体と、HLA-G抗体；および/またはHLA-G CAR；および/またはHLA-G抗体もしくはHLA-G CARをコードする単離核酸；および/またはHLA-G抗体もしくはHLA-G CARをコードする単離核酸配列を含むベクター；および/またはHLA-G CARを含む単離細胞のうちの1または複数とを含む組成物を提示する。

40

本発明は、例えば、以下の項目を提供する。

(項目1)

重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列と、軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含む単離抗体であって、アミノ酸配列：

G S H S M R Y F S A A V S R P G R G E P R F I A M G Y V D D T Q F V R F D
S D S A C P R M E P R A P W V E Q E G P E Y W E E E T R N T K A H A Q T
D R M N L Q T L R G Y Y N Q S E A S S H T L Q W M I G C D L G S D G R L L

50

R G Y E Q Y A Y D G K D Y L A L N E D L R S W T A A D T A A Q I S K R K
 C E A A N V A E Q R R A Y L E G T C V E W H L A - G Y L E N G K E M L Q
 R A D P P K T H V T H H P V F D Y E A T L R C W A L G F Y P A E I I L T W
 Q R D G E D Q T Q D V E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E
 E Q R Y T C H V Q H E G L P E P L M L R W K Q S S L P T I P I M G I V A
 G L V V L A A V V T G A A V A A V L W R K K S S D (配列番号30)、またはそ
 の同等物を含む、H L A - Gのエピトープに結合し、ここで同等物は、配列番号30に對
 して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するか、あるいは配列番号30をコードする
 ポリヌクレオチドもしくはその相補体に對して少なくとも80%同一であるか、または高
 ストリンジェンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダ
 イズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジェンシーの条件が、約
 25 ~ 約37 のインキュベーション温度；約6倍濃度のSSC ~ 約10倍濃度のSSCのハイブリ
 ダイゼーション緩衝液濃度；約0% ~ 約25%のホルムアミド濃度；および
 約4倍濃度のSSC ~ 約8倍濃度のSSCの洗浄溶液を含む、単離抗体。

(項目2)

(a) 前記HCが、CDRH3配列A R S Y Y G G F A Y (配列番号5)もしくはV R G G Y W S F D V (配列番号6)、またはそれらの各々の同等物を含むか；あるいは

(b) 前記LCが、CDRL3配列Q H S R E L P R T (配列番号15)もしくはM Q H L E Y P Y T (配列番号16)、またはそれらの各々の同等物を含むか；あるいは

(c) 前記HCが、CDRH3配列A R S Y Y G G F A Y (配列番号5)またはV R G G Y W S F D V (配列番号6)を含み、かつ、前記LCが、Q H S R E L P R T (配列番号15)もしくはM Q H L E Y P Y T (配列番号16)、またはそれらの各々の同等物を含み；

(d) 同等物が、前記配列に對して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に對して少なくとも80%同一であるか、または高ストリンジェンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジェンシーの条件が、約25 ~ 約37 のインキュベーション温度；約6倍濃度のSSC ~ 約10倍濃度のSSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0% ~ 約25%のホルムアミド濃度；および約4倍濃度のSSC ~ 約8倍濃度のSSCの洗浄溶液を含む、

項目1に記載の抗体。

(項目3)

前記HCが、CDRH2配列I D P A N G N T (配列番号3)もしくはI R S K S N N Y A T (配列番号4)、またはそれらの各々の同等物をさらに含み、同等物が、前記配列に對して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に對して少なくとも80%同一であるか、または高ストリンジェンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジェンシーの条件が、約25 ~ 約37 のインキュベーション温度；約6倍濃度のSSC ~ 約10倍濃度のSSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0% ~ 約25%のホルムアミド濃度；および約4倍濃度のSSC ~ 約8倍濃度のSSCの洗浄溶液を含む、項目1または2に記載の抗体。

(項目4)

前記HCが、CDRH1配列G F N I K D T Y (配列番号1)もしくはG F T F N T Y A (配列番号2)、またはそれらの各々の同等物をさらに含み、同等物が、前記配列に對して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に對して少なくとも80%同一であるか、または高ストリンジェンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジェンシーの条件が

10

20

30

40

50

、約25～約37のインキュベーション温度；約6倍濃度のSSC～約10倍濃度のSSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約4倍濃度のSSC～約8倍濃度のSSCの洗浄溶液を含む、項目1から3のいずれか一項に記載の抗体。

(項目5)

前記LCが、CDRL2配列LVС(配列番号13)もしくはRMS(配列番号14)またはそれらの各々の同等物をさらに含み、同等物が、前記配列に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも80%同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約25～約37のインキュベーション温度；約6倍濃度のSSC～約10倍濃度のSSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約4倍濃度のSSC～約8倍濃度のSSCの洗浄溶液を含む、項目1から4のいずれか一項に記載の抗体。

10

(項目6)

前記LCが、CDRL1配列KSVSTSGYSY(配列番号11)もしくはKSLLHSNGNTY(配列番号12)、またはそれらの各々の同等物をさらに含み、同等物が、前記配列に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも80%同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約25～約37のインキュベーション温度；約6倍濃度のSSC～約10倍濃度のSSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約4倍濃度のSSC～約8倍濃度のSSCの洗浄溶液を含む、項目1から5のいずれか一項に記載の抗体。

20

(項目7)

前記HCが、
(a)アミノ酸配列GFNIKDTY(配列番号1)もしくはGFTFNTY(配列番号2)、もしくはそれらの各々の同等物を含むHC CDRH1；および/または
(b)アミノ酸配列IDPANGNT(配列番号3)もしくはIRSKSNYYAT(配列番号4)、もしくはそれらの各々の同等物を含むHC CDRH2；および/または
(c)アミノ酸配列ARSYYGGFAY(配列番号5)もしくはVRGGYWSFDV(配列番号6)、もしくはそれらの各々の同等物を含むHC CDRH3
を含み；

30

(d)同等物が、前記配列に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも80%同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約25～約37のインキュベーション温度；約6倍濃度のSSC～約10倍濃度のSSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約0%～約25%のホルムアミド濃度；および約4倍濃度のSSC～約8倍濃度のSSCの洗浄溶液を含み；かつ/あるいは

40

前記LCが、

(a)アミノ酸配列KSVSTSGYSY(配列番号11)もしくはKSLLHSNGNTY(配列番号12)、もしくはそれらの各々の同等物を含むLC CDR1；および/または
(b)アミノ酸配列LVС(配列番号13)もしくはRMS(配列番号14)、もしくはそれらの各々の同等物を含むLC CDR2；および/または
(c)アミノ酸配列QHSRELPR(配列番号15)もしくはMQHLEYPYT

50

(配列番号 16)、もしくはそれらの各々の同等物を含む L C C D R 3 を含み；

(d) 同等物が、前記配列に対して少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも 80% 同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の S S C ~ 約 10 倍濃度の S S C のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0% ~ 約 25% のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の S S C ~ 約 8 倍濃度の S S C の洗浄溶液を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体。

10

(項目 8)

前記 H C が、

(a) アミノ酸配列 G F N I K D T Y (配列番号 1) もしくは G F T F N T Y A (配列番号 2)、もしくはそれらの各々の同等物を含む H C C D R H 1；および / または

(b) アミノ酸配列 I D P A N G N T (配列番号 3) もしくは I R S K S N N Y A T (配列番号 4)、もしくはそれらの各々の同等物を含む H C C D R H 2；および / または

(c) アミノ酸配列 A R S Y Y G G F A Y (配列番号 5) もしくは V R G G Y W S F D V (配列番号 6)、もしくはそれらの各々の同等物を含む H C C D R H 3 を含み；

(d) 同等物が、前記配列に対して少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも 80% 同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の S S C ~ 約 10 倍濃度の S S C のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0% ~ 約 25% のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の S S C ~ 約 8 倍濃度の S S C の洗浄溶液を含み；かつ / あるいは

20

前記 L C が、

(a) アミノ酸 K S V S T S G Y S Y (配列番号 11) もしくは K S L L H S N G N T Y (配列番号 12)、もしくはそれらの各々の同等物を含む L C C D R L 1；および / または

(b) アミノ酸配列 L V S (配列番号 13) もしくは R M S (配列番号 14)、もしくはそれらの各々の同等物を含む L C C D R L 2；および / または

(c) アミノ酸配列 Q H S R E L P R T (配列番号 15) もしくは M Q H L E Y P Y T (配列番号 16)、もしくはそれらの各々の同等物を含む L C C D R L 3 を含み；

(d) 同等物が、前記配列に対して少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも 80% 同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の S S C ~ 約 10 倍濃度の S S C のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0% ~ 約 25% のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の S S C ~ 約 8 倍濃度の S S C の洗浄溶液を含む、項目 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体。

40

(項目 9)

前記 H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、配列番号 8 もしくは 10 のアミノ酸配列、またはそれらの各々の同等物を含み、同等物が、前記配列に対して少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも 80% 同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレ

50

オチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の SSC ~ 約 10 倍濃度の SSC のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0 % ~ 約 25 % のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の SSC ~ 約 8 倍濃度の SSC の洗浄溶液を含む、項目 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体。

(項目 10)

前記 LC 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、配列番号 18 もしくは 20 のアミノ酸配列、またはそれらの各々の同等物を含み、同等物が、前記配列に対して少なくとも 80 % のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも 80 % 同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の SSC ~ 約 10 倍濃度の SSC のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0 % ~ 約 25 % のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の SSC ~ 約 8 倍濃度の SSC の洗浄溶液を含む、項目 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体。

(項目 11)

前記 HC 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、配列番号 8 または 10 のアミノ酸配列を含み、前記 LC 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、配列番号 18 もしくは 20 のアミノ酸配列、またはそれらの各々の同等物を含み、同等物が、前記配列に対して少なくとも 80 % のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも 80 % 同一であるか、または高ストリンジエンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジエンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の SSC ~ 約 10 倍濃度の SSC のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0 % ~ 約 25 % のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の SSC ~ 約 8 倍濃度の SSC の洗浄溶液を含む、項目 1 から 10 のいずれか一項に記載の抗体。

(項目 12)

モノクローナル抗体、キメラ抗体、またはヒト化抗体の群より選択される、項目 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗体。

(項目 13)

Fab、Fab' 2、Fab'、scFv、および Fv からなる群より選択される、項目 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体の抗原結合性断片。

(項目 14)

項目 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体、または項目 13 に記載の抗原結合性断片、および任意選択で、検出可能な標識を含む、単離 ex vivo 複合体。

(項目 15)

項目 14 に記載の複合体を含む単離 ex vivo 細胞。

(項目 16)

生物学的試料中の HLA - G を検出する方法であって、前記試料を、項目 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体、または項目 13 に記載の抗原結合性断片と接触させるステップと、前記抗体または前記抗原結合性断片の、HLA - G への結合により形成された複合体を検出するステップとを含む、方法。

(項目 17)

前記試料が、細胞試料または組織試料を含む、項目 16 に記載の方法。

(項目 18)

前記試料を、がんを有すると診断されているか、がんを有すると疑われているか、またはがんを有する危険性がある対象から得る、項目 16 に記載の方法。

(項目 19)

前記がんが、前立腺がんまたは卵巣がんからなる群より選択される、項目 18 に記載の方法。

10

20

30

40

50

(項目 20)

前記検出が、免疫組織化学（IHC）、ウェスタンプロット法、フローサイトメトリー、またはELISAのうちの1または複数を含む、項目16に記載の方法。

(項目 21)

対象から単離された試料中の病的細胞を検出する方法であって、

(a) 前記試料中のHLA-Gに結合する、項目1から12のいずれか一項に記載の抗体または抗原結合性断片により形成された複合体を検出することにより、前記対象に由来する生物学的試料中のHLA-Gのレベルを検出するステップと；

(b) ステップ(a)において観察されたHLA-Gのレベルを、対照の生物学的試料中で観察されるHLA-Gのレベルと比較するステップと
10
を含み、

HLA-Gのレベルが、前記対照の生物学的試料中で観察されるレベルと比較して上昇する場合に、前記病的細胞が検出され、HLA-Gのレベルが、前記対照の生物学的試料中で観察されるレベルと比較して上昇しない場合に、前記病的細胞が検出されない、方法。

(項目 22)

前記対象の生物学的試料が、前立腺または卵巣から単離された試料のうちの1または複数を含む、項目21に記載の方法。

(項目 23)

前記検出が、免疫組織化学（IHC）、ウェスタンプロット法、フローサイトメトリー、またはELISAのうちの1または複数を含む、項目21に記載の方法。

20

(項目 24)

前記生物学的試料を、前記対象から単離するステップをさらに含む、項目21から23のいずれか一項に記載の方法。

(項目 25)

前記対象が、哺乳動物である、項目24に記載の方法。

(項目 26)

前記哺乳動物が、マウス、ネコ科動物、イヌ科動物、ヒツジ、ウシ、サル、およびヒトの群より選択される、項目25に記載の方法。

30

(項目 27)

項目1から12のいずれか一項に記載の抗体と同じエピトープ特異性を有する、HLA-G特異的抗体またはその抗原結合性断片。

(項目 28)

HLA-Gを検出するためのキットであって、項目1から12のいずれか一項に記載の抗体、または項目13に記載の抗原結合性断片と、使用のための指示とを含む、キット。

(項目 29)

腫瘍試料中のHLA-Gを検出する方法であって、

(a) 前記試料を、抗体または前記抗体の抗原結合性断片と接触させるステップであって、前記抗体は、重鎖(HC)免疫グロブリン可変ドメイン配列と、軽鎖(LC)免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含み、前記抗体は、

40

前記HCが、

(i) アミノ酸配列G F N I K D T Y (配列番号1)もしくはG F T F N T Y A (配列番号2)、またはそれらの各々の同等物を含むHC C D R H 1；および

(ii) アミノ酸配列I D P A N G N T (配列番号3)もしくはI R S K S N N Y A T (配列番号4)、またはそれらの各々の同等物を含むHC C D R H 2；および

(iii) アミノ酸配列A R S Y Y G G F A Y (配列番号5)もしくはV R G G Y W S F D V (配列番号6)、またはそれらの各々の同等物を含むHC C D R H 3を含み；

(iv) 同等物が、前記配列に対して少なくとも80%のアミノ酸同一性を有するか、または前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少

50

なくとも 80% 同一であるか、または高ストリンジェンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジェンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の SSC ~ 約 10 倍濃度の SSC のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0% ~ 約 25% のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の SSC ~ 約 8 倍濃度の SSC の洗浄溶液を含み；

前記 LC が、

(i) アミノ酸 K S V S T S G Y S Y (配列番号 11) もしくは K S L L H S N G N T Y (配列番号 12) 、またはそれらの各々の同等物を含む LC C D R L 1 ；および

(i i) アミノ酸配列 L V S (配列番号 13) もしくは R M S (配列番号 14) 、またはそれらの各々の同等物を含む LC C D R L 2 ；および

(i i i) アミノ酸配列 Q H S R E L P R T (配列番号 15) もしくは M Q H L E Y P Y T (配列番号 16) 、またはそれらの各々の同等物を含む LC C D R L 3 を含み；

(i v) 同等物が、前記配列に対して少なくとも 80% のアミノ酸同一性を有するか、あるいは前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドもしくはその相補体に対して少なくとも 80% 同一であるか、または高ストリンジェンシーの条件下で、前記ポリヌクレオチドもしくはその相補体とハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされ、ここで高ストリンジェンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の SSC ~ 約 10 倍濃度の SSC のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0% ~ 約 25% のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の SSC ~ 約 8 倍濃度の SSC の洗浄溶液を含む、

アミノ酸配列を含み、ヒト H L A - G のエピトープに結合する、ステップと；

(b) 前記抗体または前記抗原結合性断片の、 H L A - G への結合により形成された複合体を検出するステップとを含む、方法。

(項目 30)

(a) 抗 H L A - G 抗体の抗原結合性ドメイン； (b) C D 8 ヒンジドメイン； (c) C D 8 膜貫通ドメイン； (d) C D 2 8 共刺激性シグナル伝達領域および / または 4 - 1 B B 共刺激性シグナル伝達領域；ならびに (e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含む、キメラ抗原受容体 (C A R) 。

(項目 31)

抗 H L A - G 重鎖可変領域、および前記抗 H L A - G 抗体の前記抗原結合性ドメインを含む抗 H L A - G 軽鎖可変領域を含む、項目 30 に記載の C A R 。

(項目 32)

前記抗 H L A - G 重鎖可変領域と、前記抗 H L A - G 軽鎖可変領域との間に配置されたリンカーポリペプチドをさらに含む、項目 31 に記載の C A R 。

(項目 33)

前記抗 H L A - G 重鎖可変領域が、配列番号 1 ~ 6 またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか 1 つを含む C D R 領域を含む、項目 31 または 32 に記載の C A R 。

(項目 34)

前記抗 H L A - G 重鎖可変領域が、配列番号 7 ~ 10 またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか 1 つを含む、項目 31 または 32 に記載の C A R 。

(項目 35)

前記抗 H L A - G 軽鎖可変領域が、配列番号 11 ~ 16 またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか 1 つを含む C D R 領域を含む、項目 31 または 32 に記載の C A R 。

(項目 36)

前記抗 H L A - G 軽鎖可変領域が、配列番号 17 ~ 20 またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか 1 つを含む C D R 領域を含む、項目 31 または 32 に記載の C A R 。

(項目 37)

10

20

30

40

50

前記抗 H L A - G 重鎖可変領域および前記抗 H L A - G 軽鎖可変領域が、グリシン - セリシンリinkerによって接続される、項目 3 1 から 3 6 のいずれか一項に記載の C A R。

(項目 3 8)

検出可能なマーカーまたは精製マーカーをさらに含む、前記項目のいずれかに記載の C A R。

(項目 3 9)

同等物が、ポリペプチドに対して少なくとも 80 % のアミノ酸同一性を有するポリペプチド、または前記ポリペプチドをコードするポリヌクレオチドの相補体と高ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズするポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチドを含み、ここで高ストリンジェンシーの条件が、約 25 ~ 約 37 のインキュベーション温度；約 6 倍濃度の S S C ~ 約 10 倍濃度の S S C のハイブリダイゼーション緩衝液濃度；約 0 % ~ 約 25 % のホルムアミド濃度；および約 4 倍濃度の S S C ~ 約 8 倍濃度の S S C の洗浄溶液を含む、項目 3 3 から 3 8 のいずれか一項に記載の C A R。

(項目 4 0)

項目 3 0 から 3 9 のいずれか一項に記載の C A R をコードする単離核酸配列またはその相補体またはそれらの各々の同等物。

(項目 4 1)

抗 H L A - G 抗体の抗原結合性ドメインまたは H L A - G リガンドの上流に配置された K o z a k コンセンサス配列をさらに含む、項目 4 0 に記載の単離核酸。

(項目 4 2)

抗生物質耐性ポリヌクレオチドをさらに含む、項目 4 0 または 4 1 に記載の単離核酸配列。

(項目 4 3)

項目 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の単離核酸配列を含むベクター。

(項目 4 4)

プラスミドである、項目 4 3 に記載のベクター。

(項目 4 5)

レンチウイルスベクターである、項目 4 3 に記載のベクター。

(項目 4 6)

項目 3 0 から 3 9 のいずれか一項に記載の C A R ; および / または項目 4 0 から 4 2 のいずれか一項に記載の単離核酸 ; および / または項目 4 3 から 4 5 のいずれか一項に記載のベクターを含む単離細胞。

(項目 4 7)

T 細胞である、項目 4 6 に記載の単離細胞。

(項目 4 8)

N K 細胞である、項目 4 6 に記載の単離細胞。

(項目 4 9)

項目 1 から 2 9 のいずれか一項に記載の単離抗体をコードする単離核酸またはその相補体。

(項目 5 0)

担体と、項目 3 0 から 3 9 のいずれか一項に記載の C A R を含む単離細胞 ; および / または項目 4 0 から 4 2 もしくは 4 9 のいずれか一項に記載の単離核酸 ; および / または項目 4 3 から 4 5 のいずれか一項に記載のベクター ; および / または項目 4 6 から 4 8 もしくは 1 5 のいずれか一項に記載の単離細胞 ; および / または項目 1 から 1 2 のいずれか一項に記載の抗体 ; および / または項目 1 3 に記載の抗原結合性断片 ; および / または項目 1 4 に記載の複合体のうちの 1 または複数とを含む、組成物。

(項目 5 1)

H L A - G C A R 発現細胞を作製する方法であって、

(i) 単離細胞の集団に、項目 3 0 から 4 9 のいずれか一項に記載の C A R をコードする核酸配列を形質導入するステップと；

10

20

30

40

50

(i i) ステップ (i) の前記核酸配列の形質導入に成功した、前記単離細胞の亜集団を選択し、これにより、H L A - G C A R 発現細胞を作製するステップとを含む、方法。

(項目 5 2)

前記単離細胞が、T 細胞およびN K 細胞からなる群より選択される、項目 5 1 に記載の方法。

(項目 5 3)

腫瘍の増殖の阻害を必要とする対象における腫瘍の増殖を阻害する方法であって、前記対象へと、有効量の、項目 4 6 から 4 8 に記載の単離細胞を投与するステップを含む、方法。

10

(項目 5 4)

前記単離細胞が、処置される前記対象に対して自家である、項目 5 3 に記載の方法。

(項目 5 5)

前記腫瘍が、充実性腫瘍、任意選択で、甲状腺腫瘍、卵巣腫瘍、または前立腺がん腫瘍である、項目 5 3 または 5 4 に記載の方法。

(項目 5 6)

前記腫瘍が、充実性腫瘍である、項目 5 3 から 5 5 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 5 7)

腫瘍細胞が、H L A - G を発現または過剰発現させる、項目 5 3 から 5 6 のいずれか一項に記載の方法。

20

(項目 5 8)

処置を必要とするがん患者を処置する方法であって、対象へと、有効量の、項目 4 6 から 4 8 に記載の単離細胞を投与するステップを含む、方法。

(項目 5 9)

前記単離細胞が、処置される前記対象に対して自家である、項目 5 8 に記載の方法。

(項目 6 0)

腫瘍が、甲状腺がん、卵巣がん、または前立腺がんである、項目 5 8 または 5 9 に記載の方法。

(項目 6 1)

がん細胞が、H L A - G を発現または過剰発現させる、項目 5 8 から 6 0 のいずれか一項に記載の方法。

30

(項目 6 2)

前記対象が、ヒト患者である、項目 5 8 から 6 1 のいずれか一項に記載の方法。

(項目 6 3)

患者が、H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いのか、高くないのかを決定するための方法であって、前記患者から単離された腫瘍試料を、有効量の抗 H L A - G 抗体と接触させるステップと、前記腫瘍試料に結合した任意の抗体の存在を検出するステップとを含み、前記腫瘍試料に結合した抗体の存在は、前記患者が、前記 H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いことを指し示し、前記腫瘍試料に結合した抗体の非存在は、前記患者が、前記 H L A - G 療法に応答する可能性が高くないことを指し示す、方法。

40

(項目 6 4)

有効量の前記 H L A - G C A R 療法を、前記 H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いと決定された前記患者へと投与するステップをさらに含む、項目 6 3 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0 0 1 6】

【図 1】図 1 は、新規に作出された、ヒト H L A - G に対するモノクローナル抗体についての、フローサイトメトリーによるスクリーニングデータを示す。これらの結果に基づき、C A R T 細胞を作出するために、陽性のハイブリドーマ (3 H 1 1 - 1 2 および 4 E 3 - 1) のサブクローニングを選択した。

50

【0017】

【図2-1】図2A～2Dは、HLA-A B C対照染色を伴う、乳頭状甲状腺がんおよび正常甲状腺組織内の、HLA-G反応性についての免疫組織化学を示す。図2Aは、抗体4E3-1を使用する、低倍率(100倍)のHLA-G陽性乳頭状甲状腺癌の切片を示す。図2Bは、高倍率(250倍)の、HLA-Gについて陽性である、第2の乳頭状甲状腺癌を示す。図2Cは、正常甲状腺組織の、HLA-Gについての陰性反応性を示し(250倍)、図2Dは、正常甲状腺組織の、HLA-A B Cについての陽性反応性を示す(100倍)。

【図2-2】図2A～2Dは、HLA-A B C対照染色を伴う、乳頭状甲状腺がんおよび正常甲状腺組織内の、HLA-G反応性についての免疫組織化学を示す。図2Aは、抗体4E3-1を使用する、低倍率(100倍)のHLA-G陽性乳頭状甲状腺癌の切片を示す。図2Bは、高倍率(250倍)の、HLA-Gについて陽性である、第2の乳頭状甲状腺癌を示す。図2Cは、正常甲状腺組織の、HLA-Gについての陰性反応性を示し(250倍)、図2Dは、正常甲状腺組織の、HLA-A B Cについての陽性反応性を示す(100倍)。

【0018】

【図3】図3は、細胞膜内の第3世代の抗HLA-G CARの、DNA配列および理論構造についての概略図を示す。

【0019】

【図4】図4は、さらなる抗体スクリーニングを、図1で記載した通りに示す。

【0020】

【図5】図5は、遺伝子移入ベクターおよび導入遺伝子についての概略を描示する。遺伝子移入ベクターの骨格は、HIV-1 5'末端反復(long terminal repeat) (LTR) およびHIV-1 3'末端反復、パッケージングシグナル(+)、EF1プロモーター、内部リボソーム侵入部位(IRES)、緑色蛍光タンパク質であるZsGreen、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)、およびサルウイルス40起点(SV40)を含有する、HIVベースの、バイリストロニックのレンチウイルスベクターである、pLVX-IRES-ZsGreenである。EF-1プロモーターの存在により、HLA-Gに特異的なscFV、CD8ヒンジおよび膜貫通領域、ならびにCD28、4-1BB、およびCD3シグナル伝達ドメインを含む導入遺伝子が確実に構成的に発現される。検出タンパク質であるZsGreenの発現は、IRES領域により実行する。ベクターの組込みは、蛍光顕微鏡法を介して、細胞内のZsGreenの存在によりアッセイすることができる。

【0021】

【図6】図6は、HLA-G CAR T細胞の細胞傷害を示す。HLA-G CARを発現させるT細胞の細胞傷害は、方法において記載される、LDH細胞傷害キットを使用して決定した。アッセイの前に、T細胞は、CD3/CD8ビーズ(Stem Cell Technologies; 2mlの培地に対して30ul)を使用して活性化させた。活性化T細胞に、HLA-Gレンチウイルス粒子を用いて形質導入し、これに続き、CD3/CD8ビーズを使用して、T細胞を活性化させた。形質導入されていない活性化T細胞およびTLBR-2 Tリンパ腫細胞株を、対照として使用した。ウェル1つ当たり3,000個のSKOV3またはTLBR-2細胞を播種した。HLA-Gを形質導入されたT細胞を、20:1、10:1、5:1、および1:1の比(細胞60,000～3,000個)で、ウェルへと添加した。各データ点は、三連の測定値の平均を表す。

【0022】

【図7】図7は、HLA-G CARのタンパク質発現を示す。HLA-G CARレンチウイルス粒子を用いて形質導入されたT細胞は、HLA-G CARのタンパク質を発現させる。CARタンパク質の推定サイズは、60kDaである。CD3抗体を使用して、タンパク質を検出した。50μgのタンパク質を、ウェスタンプロットのために使用した。-アクチンを、ローディング対照として使用した。

10

30

40

50

【発明を実施するための形態】**【0023】**

本開示は、当然ながら変動しうるので、記載される特定の態様に限定されないことを理解されたい。また、本開示の範囲は、付属の特許請求の範囲だけによって限定されるので、本明細書で使用される用語法は、特定の態様について記載することだけを目的とするものであり、限定的であることを意図するものではないことも理解されたい。

【0024】

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本技術が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。本技術の実施または試行では、本明細書で記載される方法および材料と類似または同等の、任意の方法および材料を使用しうるが、ここでは、好ましい方法、デバイス、および材料について記載する。本明細書で引用される全ての技術的刊行物および特許公開は、参考によりそれらの全体において本明細書に組み込まれる。本明細書のいかなる内容も、本技術が、先行発明により、このような開示に先行する権利がないとの容認とはみなされないものとする。

【0025】

本技術の実施では、そうでないことが指示されない限りにおいて、当技術分野の技量の範囲内にある、組織培養、免疫学、分子生物学、微生物学、細胞生物学、および組換えDNAについての従来の技法を利用する。例えば、SambrookおよびRussel 1編(2001年)、Molecular Cloning: A Laboratory Manual、3版; Ausubelら編(2007年)、Current Protocols in Molecular Biologyシリーズ; Methods in Enzymologyシリーズ(Academic Press, Inc.、N.Y.); MacPhersonら(1991年)、PCR 1: A Practical Approach(Oxford University Press内、IRL Press); MacPhersonら(1995年)、PCR 2: A Practical Approach; HarlowおよびLane編(1999年)、Antibodies, A Laboratory Manual; Freshney(2005年)、Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique、5版; Gait編(1984年)、Oligonucleotide Synthesis; 米国特許第4,683,195号; HamesおよびHiggins編(1984年)、Nucleic Acid Hybridization; Anderson(1999年)、Nucleic Acid Hybridization; HamesおよびHiggins編(1984年)、Transcription and Translation; Immobilized Cells and Enzymes(IRL Press(1986年)); Perbal(1984年)、A Practical Guide to Molecular Cloning; MillerおよびCalos編(1987年)、Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(Cold Spring Harbor Laboratory); Makrides編(2003年)、Gene Transfer and Expression in Mammalian Cells; MayerおよびWalker編(1987年)、Immunochemical Methods in Cell and Molecular Biology(Academic Press, London); ならびにHerzenbergら編(1996年)、Weir's Handbook of Experimental Immunologyを参照されたい。

【0026】

範囲を含む、全ての数値表示、例えば、pH、温度、時間、濃度、および分子量は、必要に応じて、(+)もしくは(-)1.0もしくは0.1の増分、または代替的に±15%、または代替的に10%、または代替的に5%、または代替的に2%の変動で変わる概

10

20

30

40

50

数である。常に明示的に言明されているわけではないが、全ての数値表示には、「約」という用語を前置することを理解されたい。また、常に明示的に言明されているわけではないが、本明細書で記載される試薬は、単に例示的なものであり、当技術分野では、このような試薬の同等物が公知であることも理解されたい。

【0027】

明示的な列挙を伴わないが、そうでないことが意図されない限りにおいて、本技術が、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、または抗体に関する場合、このようなポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、または抗体の、同等物または生物学的同等物が、本技術の範囲内にあることが意図されることを推察されたい。

【0028】

10

定義

本明細書および特許請求の範囲で使用される場合、単数形の「ある(a)」、「ある(an)」、および「その」は、そうでないことが文脈により明確に指示されない限りにおいて、複数の指示対象を含む。例えば、「細胞」という用語は、それらの混合物を含む、複数の細胞を含む。

【0029】

本明細書で使用される場合、「動物」という用語は、例えば、哺乳動物および鳥類を含む類別である、生きている多細胞性の脊椎動物を指す。「哺乳動物」という用語は、ヒトおよび非ヒト哺乳動物の両方を含む。

【0030】

20

本明細書では、「対象」、「宿主」、「個体」、および「患者」という用語は、ヒトおよび獣医学的対象、例えば、ヒト、動物、非ヒト霊長動物、イヌ、ネコ、ヒツジ、マウス、ウマ、およびウシを指すように、互換的に使用される。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。

【0031】

本明細書で使用される場合、「抗体」という用語は、例を目的として、限定せずに述べると、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、これらの組合せと、任意の脊椎動物、例えば、ヒト、ヤギ、ウサギ、およびマウスなどの哺乳動物のほか、サメ免疫グロブリンなど、非哺乳動物種における免疫応答中に產生される同様の分子とを含む、免疫グロブリンまたは免疫グロブリン様分子をまとめて指す。そうでないことが具体的に言及されない限り、「抗体」という用語は、他の分子への結合を実質的に除外して、目的の分子（または目的の分子と酷似する分子の群）に特異的に結合する、無傷の免疫グロブリンおよび「抗体断片」または「抗原結合性断片」（例えば、目的の分子に対する結合定数が、生物学的試料中の他の分子に対する結合定数を、少なくとも 10^3 M^{-1} 超えるか、少なくとも 10^4 M^{-1} 超えるか、または少なくとも 10^5 M^{-1} 超える抗体および抗体断片）を含む。「抗体」という用語はまた、キメラ抗体（例えば、ヒト化マウス抗体）、ヘテロコンジュゲート抗体（二特異性抗体など）などの遺伝子操作形態も含む。また、Pierce Catalog and Handbook, 1994~1995年(Pierce Chemical Co., Rockford, Ill.); Kuby, J., Immunology, 3版, W. H. Freeman & Co., New York, 1997年も参照されたい。

30

【0032】

40

本明細書で使用される場合、「抗原」という用語は、抗体分子またはT細胞受容体など、特異的な体液性または細胞性免疫の産物が特異的に結合しうる、化合物、組成物、または物質を指す。抗原は、例えば、ハプテン、単純な中間代謝物、糖（例えば、オリゴ糖）、脂質、およびホルモンのほか、複合炭水化物（例えば、多糖）、リン脂質、およびタンパク質などの高分子を含む、任意の種類の分子でありうる。抗原の一般的な類別は、ウイルス抗原、細菌抗原、真菌抗原、原虫および他の寄生生物抗原、腫瘍抗原、自己免疫疾患、アレルギー、および移植片拒絶に関する抗原、毒素、ならびにその他の抗原を含むがこれらに限定されない。

50

【0033】

抗体構造との関連で、免疫グロブリンは、ジスルフィド結合により相互接続された、重(H)鎖と軽(L)鎖とを有する。ラムダ()およびカッパ()という、2つの種類の軽鎖が存在する。抗体分子の機能的活性を決定する、5つの主要な重鎖クラス(またはアイソタイプ)：IgM、IgD、IgG、IgA、およびIgEが存在する。各重鎖および軽鎖は、定常領域および可変領域(領域は「ドメイン」としてもまた公知)を含有する。組み合わせて、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とは、抗原に特異的に結合する。軽鎖可変領域および重鎖可変領域は、「相補性決定領域」または「CDR」ともまた呼ばれる、3つの超可変領域により中断される、「フレームワーク」領域を含有する。フレームワーク領域およびCDRの広がりについては、規定されている(参照により本明細書に組み込まれる、Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest、U.S. Department of Health and Human Services、1991年を参照されたい)。今日では、Kabatによるデータベースは、オンラインで維持されている。異なる軽鎖または重鎖のフレームワーク領域の配列は、種内で比較的保存されている。構成要素である軽鎖および重鎖のフレームワーク領域の組合せである、抗体のフレームワーク領域は、大部分、-シートコンフォメーションを採用し、CDRは、ループを形成し、これは、-シート構造を接続し、場合によって、その一部を形成する。したがって、フレームワーク領域は、鎖間の非共有結合的相互作用により、CDRを、適正な配向性で位置決めする足場を形成するように作用する。

【0034】

CDRは主に、抗原のエピトープへの結合を担う。各鎖のCDRは、N末端から始めて、順に番号付けされる、CDR1、CDR2、およびCDR3と称することが典型的であり、また、特定のCDRが配置される鎖により同定されることも典型的である。したがって、 V_H CDR3が、それが見出される抗体の重鎖の可変ドメイン内に位置するのに対し、 V_L CDR1は、それが見出される抗体の軽鎖の可変ドメインに由来するCDR1である。LHRに結合する抗体は、特異的 V_H 領域および V_L 領域配列を有し、したがって、特異的CDR配列を有する。異なる特異性(すなわち、異なる抗原に対する、異なる結合性部位)を伴う抗体は、異なるCDRを有する。抗体によって変動するのはCDRであるが、CDR内の限定された数のアミノ酸位置だけが、抗原への結合に直接関与する。CDR内のこれらの位置を、特異性決定残基(SDR)と呼ぶ。

【0035】

本明細書で使用される場合、「抗原結合性ドメイン」という用語は、抗原標的に特異的に結合しうる、任意のタンパク質またはポリペプチドドメインを指す。

【0036】

「キメラ抗原受容体」(CAR)という用語は、本明細書で使用される場合、抗原に結合することが可能な細胞外ドメインと、細胞外ドメインが由来するポリペプチドとは異なるポリペプチドに由来する膜貫通ドメインと、少なくとも1つの細胞内ドメインとを含む融合タンパク質を指す。「キメラ抗原受容体(CAR)」は、場合によって、「キメラ受容体」、「Tボディー」、または「キメラ免疫受容体(CIR)」と呼ばれる。「抗原に結合することが可能な細胞外ドメイン」とは、ある特定の抗原に結合しうる、任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。「細胞内ドメイン」とは、細胞内の生物学的過程の活性化または阻害を引き起こすシグナルを伝達するドメインとして機能することが公知である、任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。「膜貫通ドメイン」とは、細胞膜にわたることが公知であり、細胞外ドメインと、シグナル伝達ドメインとを連結するように機能しうる、任意のオリゴペプチドまたはポリペプチドを意味する。キメラ抗原受容体は、任意選択で、細胞外ドメインと、膜貫通ドメインとの間のリンカーとして用いられる「ヒンジドメイン」を含みうる。本明細書では、各ドメインの構成要素をコードする、非限定的な例示的ポリヌクレオチド配列、例えば、

ヒンジドメイン：IgG1重鎖ヒンジ配列、配列番号38：

10

20

30

40

50

C T C G A G G C C A A A T C T T G T G A C A A A A C T C A C A C A T G C C C A C
C G T G C C C G

膜貫通ドメイン：CD28膜貫通領域、配列番号39：

T T T T G G G T G C T G G T G G T T G G T G G A G T C C T G G C T T G C T
A T A G C T T G C T A G T A A C A G T G G C C T T T A T T A T T T C T G G G T
G

細胞内ドメイン：4-1BB共刺激性シグナル伝達領域、配列番号40：

A A A C G G G G C A G A A A G A A A C T C C T G T A T A T A T T C A A A C A A C
C A T T T A T G A G A C C A G T A C A A A C T A C T C A A G A G G A A G A T G G
C T G T A G C T G C C G A T T T C C A G A A G A A G A A G A A G G A G G G A T G T 10
G A A C T G

細胞内ドメイン：CD28共刺激性シグナル伝達領域、配列番号41：

A G G A G T A A G A G G A G C A G G C T C C T G C A C A G T G A C T A C A T G A
A C A T G A C T C C C G C C G C C C G G G C C A C C C G C A A G C A T T A
C C A G C C C T A T G C C C C A C C A C G C G A C T T C G C A G C C T A T C G C
T C C

細胞内ドメイン：CD3ゼータシグナル伝達領域、配列番号42：

【化1】

AGAGTGAAGTTCAAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGGAGTACGATGTTTGGA
CAAGAGACGTGGCCGGGACCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAAC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA
GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGGACGATGGCCTTT
ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGG
CCCTGCCCTCGCTAA

20

が開示される。

【0037】

30

各例示的なドメインの構成要素についてのさらなる実施形態は、類似の生物学的機能を有する他のタンパク質であって、上記で開示した核酸配列によりコードされるタンパク質と、少なくとも70%、または代替的に、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有するタンパク質を含む。さらに、本明細書では、このようなドメインの非限定的な例が提示される。

【0038】

40

「組成物」は典型的に、活性薬剤、例えば、化合物または組成物と、希釈剤、結合剤、安定化剤、緩衝剤、塩、親油性溶媒、保存剤、アジュバントなど、不活性（例えば、検出可能な薬剤または標識）または活性な、天然に存在するまたは天然に存在しない担体との組合せを意図し、薬学的に許容される担体を含む。担体はまた、タンパク質、ペプチド、アミノ酸、脂質、および炭水化物（例えば、单糖、二糖、三糖、四糖、およびオリゴ糖を含む糖；アルジトール、アルドン酸、エステル化糖などの誘導体化糖；ならびに多糖または糖ポリマー）などの医薬賦形剤および添加剤も含み、これらは単独または組合せで存在することが可能であり、単独または組合せにより、重量または容量で、1~99.99%を構成する。例示的なタンパク質賦形剤は、ヒト血清アルブミン（HSA）などの血清アルブミン、組換えヒトアルブミン（rH A）、ゼラチン、カゼインなどを含む。緩衝能においてもまた機能しうる、代表的なアミノ酸/抗体構成要素は、アラニン、アルギニン、グリシン、アルギニン、ベタイン、ヒスチジン、グルタミン酸、アスパラギン酸、システイン、リシン、ロイシン、イソロイシン、バリン、メチオニン、フェニルアラニン、アス

50

パルタームなどを含む。炭水化物賦形剤もまた、本技術の範囲内において意図されており、その例は、フルクトース、マルトース、ガラクトース、グルコース、D-マンノース、ソルボースなどの单糖；ラクトース、スクロース、トレハロース、セロビオースなどの二糖；ラフィノース、メレジトース、マルトデキストリン、デキストラン、デンプンなどの多糖；ならびにマンニトール、キシリトール、マルチトール、ラクチトール、キシリトール、ソルビトール（グルシトール）、およびミオイノシトールなどのアルジトールを含むがこれらに限定されない。

【0039】

本明細書で使用される「コンセンサス配列」という用語は、複数の配列のシリーズをアライメントすることにより決定されるアミノ酸または核酸配列であり、複数の配列の各対応する位置における、アミノ酸または塩基の主要な選択肢を表す、理想的な配列を規定する、アミノ酸または核酸配列を指す。複数の配列シリーズの配列に基づき、シリーズのコンセンサス配列は、配列の各々と、ゼロ、1つ、少数、またはこれを超える置換により異なりうる。複数の配列シリーズの配列に応じてまた、シリーズの、1つを超えるコンセンサス配列を決定することができる。コンセンサス配列の生成は、精緻な数学的解析下に置かれている。多様なソフトウェアプログラムを使用して、コンセンサス配列を決定することができる。

【0040】

本明細書で使用される場合、「HLA-G」という用語（B2ミクログロブリンまたはMHC-Gとしてもまた公知である）は、この名称と関連する特異的分子と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、膜結合型アイソフォーム（例えば、HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3、HLA-G4）、可溶性アイソフォーム（例えば、HLA-G5、HLA-G6、HLA-G7）、および膜結合型アイソフォームの、タンパク質分解性切断により発生する可溶性形態（例えば、sHLA-G1）を含むがこれらに限定されない、そのいくつかのアイソフォームのうちのいずれか1つを含むがこれに限定されないHLA-Gと、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。本明細書では、HLA-G配列の例を提示する。加えて、以下のGenBank受託番号：

NM_002127.5 XM_006715080.1 XM_006725041.1 XM_006725700.1 XM_006725909.1

と関連するタンパク質配列は、例示的である。例は、NM_002127.5の配列：
 MVVMAPRTLFLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPG
 RGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEG
 PEYWEEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQ
 WMIGCDLGSNDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAA
 DTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGK
 EMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIILT
 WQRDGEDQTQDVETLVEVETRPAGDGTTFQKWAAVVVPSGE
 EQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWKQSSLPTIPIIMGIVAGLVV
 LAAVVTGAAVAAVLWRKKSSDである。

【0041】

上記で列挙したGenBank受託番号の各々と関連する配列は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0042】

本明細書で使用される場合、「CD8 ヒンジドメイン」という用語は、この名称と関連する特異的タンパク質断片と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、本明細書で示されるCD8 ヒンジドメインの配列と、少なくとも70%、または代替的に、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。ヒト、マウス

10

20

40

50

、および他の種の C D 8 ヒンジドメインの配列例は、P i n t o , R . D . ら (2 0 0 6 年) 、 V e t . I mmu n o l . I mmu n o p a t h o l . 、 1 1 0 卷 : 1 6 9 ~ 1 7 7 頁において提示されている。 C D 8 ヒンジドメインと関連する配列は、P i n t o , R . D . ら (2 0 0 6 年) 、 V e t . I mmu n o l . I mmu n o p a t h o l . 、 1 1 0 卷 : 1 6 9 ~ 1 7 7 頁において提示されている。このような配列の非限定的な例は、

ヒト C D 8 アルファヒンジドメイン、配列番号 3 1 :

P A K P T T T P A P R P P T P A P T I A S Q P L S L R P E A C R P A A G G A V H
T R G L D F A C D I Y

マウス C D 8 アルファヒンジドメイン、配列番号 3 2 :

K V N S T T T K P V L R T P S P V H P T G T S Q P Q R P E D C R P R G S V K G T
G L D F A C D I Y

ネコ C D 8 アルファヒンジドメイン、配列番号 3 3 :

P V K P T T T P A P R P P T Q A P I T T S Q R V S L R P G T C Q P S A G S T V E
A S G L D L S C D I Y を含む。

【 0 0 4 3 】

本明細書で使用される場合、「 C D 8 膜貫通ドメイン」という用語は、この名称と関連する特異的タンパク質断片と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、本明細書で示される C D 8 膜貫通ドメインの配列と、少なくとも 7 0 % 、または代替的に、少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性、好ましくは 9 0 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。ヒト T 細胞表面糖タンパク質 C D 8 アルファ鎖 (N C B I 基準配列 : N P _ 0 0 1 7 5 9 . 3) のアミノ酸位置 1 8 3 ~ 2 0 3 、またはマウス T 細胞表面糖タンパク質 C D 8 アルファ鎖 (N C B I 基準配列 : N P _ 0 0 1 0 7 4 5 7 9 . 1) のアミノ酸位置 1 9 7 ~ 2 1 7 、およびラット T 細胞表面糖タンパク質 C D 8 アルファ鎖 (N C B I 基準配列 : N P _ 1 1 3 7 2 6 . 1) のアミノ酸位置 1 9 0 ~ 2 1 0 と関連する断片配列は、 C D 8 膜貫通ドメインについてのさらなる配列例を提示する。列挙した N C B I の各々と関連する配列を、以下の通りに提示する :

ヒト C D 8 アルファ膜貫通ドメイン、配列番号 3 4 : I Y I W A P L A G T C G V L L L
S L V I T

マウス C D 8 アルファ膜貫通ドメイン、配列番号 3 5 : I W A P L A G I C V A L L L S
L I I T L I

ラット C D 8 アルファ膜貫通ドメイン、配列番号 3 6 : I W A P L A G I C A V L L L S
L V I T L I

【 0 0 4 4 】

本明細書で使用される場合、「 C D 2 8 膜貫通ドメイン」という用語は、この名称と関連する特異的タンパク質断片と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、本明細書で示される C D 2 8 膜貫通ドメインの配列と、少なくとも 7 0 % 、または代替的に、少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性、少なくとも 9 0 % の配列同一性、または代替的に、少なくとも 9 5 % の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。 G e n B a n k 受託番号 : X M _ 0 0 6 7 1 2 8 6 2 . 2 および X M _ 0 0 9 4 4 4 0 5 6 . 1 と関連する断片配列は、 C D 2 8 膜貫通ドメインについてのさらなる非限定的配列例を提示する。列挙した受託番号の各々と関連する配列を、配列番号 4 1 によりコードされる配列として提示する。

【 0 0 4 5 】

本明細書で使用される場合、「 4 - 1 B B 共刺激性シグナル伝達領域」という用語は、この名称と関連する特異的タンパク質断片と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、本明細書で示される 4 - 1 B B 共刺激性シグナル伝達領域の配列と、少なくとも 7 0 % 、または代替的に、少なくとも 8 0 % のアミノ酸配列同一性、好ましくは 9 0 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 9 5 % の配列同一性を共有する他の任意の分

10

20

30

40

50

子とを指す。4-1BB共刺激性シグナル伝達領域の配列例は、米国特許出願公開20130266551号A1（米国特許出願第13/826,258号として出願）において提示されている。米国特許出願第13/826,258号において開示されている、関連する4-1BB共刺激性シグナル伝達領域の配列を、以下の通りに開示する：

【0046】

4-1BB共刺激性シグナル伝達領域、配列番号37：

K R G R K K L L Y I F K Q P F M R P V Q T T Q E E D G C S C R F P E E E E G G C
E L

【0047】

本明細書で使用される場合、「CD28共刺激性シグナル伝達領域」という用語は、この名称と関連する特異的タンパク質断片と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、本明細書で示されるCD28共刺激性シグナル伝達領域の配列と、少なくとも70%、または代替的に、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。例示的な配列CD28共刺激性シグナル伝達ドメインは、米国特許第5,686,281号；Geiger, T. L.ら、Blood、98巻：2364～2371頁（2001年）；Hombach, A.ら、J Immunol、167巻：6123～6131頁（2001年）；Maher, J.ら、Nat Biotechnol、20巻：70～75頁（2002年）；Haynes, N. M.ら、J Immunol、169巻：5780～5786頁（2002年）；Haynes, N. M.ら、Blood、100巻：3155～3163頁（2002年）において提示されている。非限定的な例は、下記のCD28配列：MLRLLALNL FPSIQVTGN
K ILVKQSPMLV AYDNAVNLSKYSYNLFSRE FRASL
HKGLDSAVEVCVVG NYSQQLQVYS KTGFNCDGKL GN
ESVTFYLQ NLVYNQTDIY FCKIEVMYPPPYLDNEKSNG
TIIHVKGKHL CPSPLFPGPS KPFWVLVVVG GVLACY
SLLVTVAIFI FWVR SKRSRLLHSD YMNMTPRRPG PTR
KHYQPYA PPRDFAAAYRS（配列番号38）の残基114～220、およびそれらの同等物を含む。

【0048】

本明細書で使用される場合、「ICOS共刺激性シグナル伝達領域」という用語は、この名称と関連する特異的タンパク質断片と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、本明細書で示されるICOS共刺激性シグナル伝達領域の配列と、少なくとも70%、または代替的に、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。ICOS共刺激性シグナル伝達領域の非限定的な配列例は、米国特許出願公開第2015/0017141A1号に提示されており、下記に提示される例示的なポリヌクレオチド配列を含む。

ICOS共刺激性シグナル伝達領域、配列番号43：

A C A A A A A A G A A G T A T T C A T C C A G T G T G C A C G A C C C T A
A C G G T G A A T A C A T G T T C A T G A G A G C A G T G A A C A C A G
C C A A A A A A T C C A G A C T C A C A G A T G T G A C C C T A

【0049】

本明細書で使用される場合、「OX40共刺激性シグナル伝達領域」という用語は、この名称と関連する特異的タンパク質断片と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、本明細書で示されるOX40共刺激性シグナル伝達領域の配列と、少なくとも70%、または代替的に、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、または代替的に、90%の配列同一性、または代替的に、少なくとも95%の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。OX40共刺激性シグナル伝達領域の非限定的な配列例は、米国特許出願公開第2012/20148552A1号に開示されており、下記に提示される、例示

10

20

30

40

50

的な配列を含む。

O X 4 0 共刺激性シグナル伝達領域、配列番号 4 4 :

A G G G A C C A G A G G C T G C C C C C C G A T G C C C A C A A G C C C C
C T G G G G G A G G C A G T T T C C G G A C C C C C A T C C A A G A G G
A G C A G G C C G A C G C C C A C T C C A C C C T G G C C A A G A T C

【 0 0 5 0 】

本明細書で使用される場合、「CD3 ゼータシグナル伝達ドメイン」という用語は、この名称と関連する特異的タンパク質断片と、類似の生物学的機能を有する他の任意の分子であって、本明細書で示される CD3 ゼータシグナル伝達ドメインの配列と、少なくとも 70 %、または代替的に、少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性、好ましくは 90 % の配列同一性、より好ましくは少なくとも 95 % の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。CD3 ゼータシグナル伝達ドメインの配列例は、米国特許出願第 13 / 826,258 号において提示されている。CD3 ゼータシグナル伝達ドメインと関連する配列を、以下の通りに列挙する :

R V K F S R S A D A P A Y Q Q G Q N Q L Y N E L N L G R R E E Y D V L D K R R G
R D P E M G G K P R R K N P Q E G L Y N E L Q K D K M A E A Y S E I G M K G E R
R R G K G H D G L Y Q G L S T A T K D T Y D A L H M Q A L P P R

【 0 0 5 1 】

本明細書で使用される場合、「B 細胞」という用語は、獲得性免疫系の体液性免疫におけるリンパ球の種類を指す。B 細胞は主に、抗体を作り、抗原提示細胞として用いられ、サイトカインを放出し、抗原との相互作用による活性化の後で、メモリー B 細胞を発生させるように機能する。B 細胞は、T 細胞など、他のリンパ球から、細胞表面上の B 細胞受容体の存在により識別される。B 細胞は、単離することもでき、市販の供給源から得ることもできる。市販の B 細胞株の非限定的な例は、細胞株である、AHH-1 (ATCC (登録商標) CRL-8146 (商標))、BC-1 (ATCC (登録商標) CRL-2230 (商標))、BC-2 (ATCC (登録商標) CRL-2231 (商標))、BC-3 (ATCC (登録商標) CRL-2277 (商標))、CA46 (ATCC (登録商標) CRL-1648 (商標))、DG-75 [D.G. - 75] (ATCC (登録商標) CRL-2625 (商標))、DS-1 (ATCC (登録商標) CRL-11102 (商標))、EB-3 [EB3] (ATCC (登録商標) CCL-85 (商標))、Z-138 (ATCC #CRL-3001)、DB (ATCC CRL-2289)、Tolle do (ATCC CRL-2631)、Pfiffer (ATCC CRL-2632)、SR (ATCC CRL-2262)、JM-1 (ATCC CRL-10421)、NFS-5 C-1 (ATCC CRL-1693)；NFS-70 C10 (ATCC CRL-1694)、NFS-25 C-3 (ATCC CRL-1695)、および SUP-B15 (ATCC CRL-1929) を含む。さらなる例は、未分化大細胞リンパ腫に由来する細胞株、例えば、DEL、DL-40、FE-PD、JB6、Karpas 299、Ki-JK、Mac-2A Ply 1、SR-786、SU-DHL-1、SU-DHL-2、SU-DHL-4、SU-DHL-5、SU-DHL-6、SU-DHL-7、SU-DHL-8、SU-DHL-9、SU-DHL-10、および SU-DHL-16、DOHH-2、NU-DHL-1、U-937、Granda 519、USC-DHL-1、RL；ホジキンリンパ腫に由来する細胞株、例えば、DEV、HD-70、HDLM-2、HD-MyZ、HKB-1、KM-H2、L 428、L 540、L 1236、SBH-1、SUP-HD1、SU/RH-HD-1 を含むがこれらに限定されない。このような市販の細胞株の非限定的な例示的供給源は、American Type Culture Collection すなわち ATCC (www.atcc.org/) および German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (https://www.dsmz.de/) を含む。

【 0 0 5 2 】

10

20

30

40

50

本明細書で使用される場合、「T細胞」という用語は、胸腺内で成熟するリンパ球の種類を指す。T細胞は、細胞媒介性免疫において重要な役割を果たし、B細胞など、他のリンパ球から、細胞表面上のT細胞受容体の存在により識別される。T細胞は、単離することもでき、市販の供給源から得ることもできる。「T細胞」は、CD3を発現させる、全ての種類の免疫細胞であって、ヘルパーT細胞(CD4+細胞)、細胞傷害性T細胞(CD8+細胞)、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞(Treg)、およびガンマ-デルタT細胞を含む免疫細胞を含む。「細胞傷害性細胞」は、細胞傷害応答を媒介することが可能な細胞である、CD8+T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、および好中球を含む。市販のT細胞株の非限定的な例は、細胞株である、BCL2(AAA)Jurkat(ATCC登録商標)CRL-2902(商標)、BCL2(S70A)Jurkat(ATCC登録商標)CRL-2900(商標)、BCL2(S87A)Jurkat(ATCC登録商標)CRL-2901(商標)、BCL2 Jurkat(ATCC登録商標)CRL-2899(商標)、Neo Jurkat(ATCC登録商標)CRL-2898(商標)、TALL-104ヒト細胞傷害性T細胞株(ATCC #CRL-11386)を含む。さらなる例は、例えば、Deglisis、EBT-8、HPB-MLp-W、HUT 78、HUT 102、Karpas 384、Ki 225、My-La、Se-Ax、SKW-3、SMZ-1、およびT34などの成熟T細胞株；ならびに未成熟T細胞株、例えば、ALL-SIL、Be13、CCRF-CEM、CML-T1、DND-41、DU.528、EU-9、HD-Mar、HPB-ALL、H-SB2、HT-1、JK-T1、Jurkat、Karpas 45、KE-37、KOPT-K1、K-T1、L-KAW、Loucy、MAT、MOLT-1、MOLT-3、MOLT-4、MOLT-13、MOLT-16、MT-1、MT-ALL、P12/Ichikawa、Peer、PER0117、PER-255、PF-382、PFI-285、 RPMI-8402、ST-4、SUP-T1~SUP-T14、TALL-1、TALL-101、TALL-103/2、TALL-104、TALL-105、TALL-106、TALL-107、TALL-197、TK-6、TLBR-1、TLBR-2、TLBR-3、およびTLBR-4、CCRF-HSB-2(CCL-120.1)、J.RT3-T3.5(ATCC TIB-153)、J45.01(ATCC CRL-1990)、J.CaM1.6(ATCC CRL-2063)、RS4;11(ATCC CRL-1873)、CCRF-CEM(ATCC CRM-CCL-119)；ならびに皮膚T細胞リンパ腫細胞株、例えば、HuT78(ATCC CRM-TIB-161)、MJ[G11](ATCC CRL-8294)、HuT102(ATCC TIB-162)を含むがこれらに限定されない。REH、NALL-1、KM-3、L92-221を含むがこれらに限定されないヌル白血病細胞株は、K562赤白血病、THP-1単球性白血病、U937リンパ腫、HEL赤白血病、HL60白血病、HMC-1白血病、KG-1白血病、U266骨髄腫などの他の白血病およびリンパ腫に由来する細胞株と同様、免疫細胞の、別の市販の供給源である。このような市販の細胞株の非限定的な例示的供給源は、American Type Culture CollectionすなわちATCC(<http://www.atcc.org/>)およびGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures(<https://www.dsmz.de/>)を含む。

【0053】

本明細書で使用される場合、ナチュラルキラー細胞としてもまた公知の「NK細胞」という用語は、骨髄に由来し、生得性免疫系において極めて重要な役割を果たすリンパ球の種類を指す。NK細胞は、抗体および細胞表面上の主要組織適合性複合体の非存在下であってもなお、ウイルス感染細胞、腫瘍細胞、またはストレスを受けた他の細胞に対して、迅速な免疫応答をもたらす。NK細胞は、単離することもでき、市販の供給源から得ることもできる。市販のNK細胞株の非限定的な例は、細胞株である、NK-92(ATCC登録商標)CRL-2407(商標)、NK-92MI(ATCC登録商標)CR

L - 2408 (商標))を含む。さらなる例は、NK細胞株である、HANK1、KHYG-1、NKL、NK-Y5、NOI-90、およびYTを含むがこれらに限定されない。このような市販の細胞株の非限定的な例示的供給源は、American Type Culture CollectionすなわちATCC (<http://www.atcc.org/>) およびGerman Collection of Microorganisms and Cell Cultures (<https://www.dsmz.de/>) を含む。

【0054】

本明細書で使用される場合、「核酸配列」および「ポリヌクレオチド」という用語は、リボヌクレオチドであれ、デオキシリボヌクレオチドであれ、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指すように互換的に使用される。したがって、この用語は、一本鎖、二本鎖、または多重鎖の、DNAまたはRNA、ゲノムDNA、cDNA、DNA-RNAハイブリッド体、あるいはプリンおよびピリミジン塩基、または他の天然のヌクレオチド塩基、化学的もしくは生化学的に修飾されたヌクレオチド塩基、非天然のヌクレオチド塩基、または誘導体化ヌクレオチド塩基を含むポリマーを含むがこれらに限定されない。

【0055】

核酸配列へと適用される場合の、「～をコードする」という用語は、その天然状態にあるか、または当業者に周知の方法により操作されるときに、ポリペプチドおよび/またはその断片のmRNAを產生するように転写および/または翻訳されうる場合、ポリペプチド「をコードする」と言われるポリヌクレオチドを指す。アンチセンス鎖とは、このような核酸の相補体であり、ここから、コード配列を推定することができる。

【0056】

本明細書で使用される場合、「ベクター」という用語は、プラスミド、ウイルス、コスミド、ファージ、BAC、YACなどを含むがこれらに限定されない、異なる宿主間の移入のためにデザインされた核酸構築物を指す。一部の実施形態では、プラスミドベクターは、市販のベクターから調製することができる。他の実施形態では、ウイルスベクターは、当技術分野で公知の技法に従い、バキュロウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス、AAVなどから作製することができる。一実施形態では、ウイルスベクターは、レンチウイルスベクターである。

【0057】

本明細書で使用される「プロモーター」という用語は、遺伝子など、コード配列の発現を調節する、任意の配列を指す。プロモーターは、例えば、構成的、誘導的、抑制的、または組織特異的でありうる。「プロモーター」とは、転写の開始および速度を制御するポリヌクレオチド配列の領域である、制御配列である。プロモーターは、RNAポリメラーゼおよび他の転写因子などの調節タンパク質および分子が結合しうる遺伝子エレメントを含有しうる。

【0058】

本明細書で使用される場合、「単離細胞」という用語は一般に、組織の他の細胞から実質的に分離された細胞を指す。「免疫細胞」とは、例えば、骨髄中で產生される造血幹細胞(HSC)、リンパ球(T細胞、B細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞)、および骨髄由来細胞(好中球、好酸球、好塩基球、单球、マクロファージ、樹状細胞)に由来する白血球(white blood cell (leukocyte))を含む。「T細胞」とは、CD3を発現させる、全ての種類の免疫細胞であって、ヘルパーT細胞(CD4+細胞)、細胞傷害性T細胞(CD8+細胞)、ナチュラルキラーT細胞、調節性T細胞(Treg)、およびガンマ-デルタT細胞を含む免疫細胞を含む。「細胞傷害性細胞」とは、細胞傷害応答を媒介することが可能な細胞である、CD8+T細胞、ナチュラルキラー(NK)細胞、および好中球を含む。

【0059】

キメラ抗原受容体細胞の作製に適用される場合の、「形質導入する」または「形質導入」という用語は、外来のヌクレオチド配列を、細胞へと導入する工程を指す。一部の実施

10

20

30

40

50

形態では、この形質導入は、ベクターを介して行う。

【0060】

本明細書で使用される場合、細胞に言及して「自家」という用語は、同じ対象（レシピエントまたは宿主）から単離され、注入し戻される細胞を指す。「同種」とは、非自家細胞を指す。

【0061】

「有効（effective）量」または「有効（effective）量」とは、薬剤の量、または2つもしくはこれを超える薬剤の組合せ量であって、哺乳動物または他の対象を処置するために投与されると、疾患のためのこのような処置を施すのに十分である、量または組合せ量を指す。「有効（effective）量」とは、薬剤、疾患およびその重症度、ならびに処置される対象の年齢、体重などに応じて変動するであろう。 10

【0062】

「充実性腫瘍」とは、通例、囊胞も液体領域も含有しない、組織の異常な塊である。充実性腫瘍は、良性の場合もあり、悪性の場合もある。異なる種類の充実性腫瘍は、それらを形成する細胞型にちなんで名付けられている。充実性腫瘍の例は、肉腫、癌腫、およびリンパ腫を含む。

【0063】

「卵巣がん」という用語は、卵巣の組織内で形成されるがんの種類であり、がん内の細胞を、体の他の部分に浸潤するか、またはこれらへと拡散する能力により、宿主生物に対して病的とする、悪性の形質転換を経たがんの種類を指す。本明細書における卵巣がんは、組織学的グレードが低度なI型がんと、組織学的グレードが高度なII型がんとを含む。特に、卵巣がんは、上皮性癌、漿液性癌、明細胞癌、性索間質腫瘍、生殖細胞腫瘍、未分化胚細胞腫、混合腫瘍、続発性卵巣がん、低悪性度潜在性腫瘍を含むがこれらに限定されない。 20

【0064】

「前立腺がん」という用語は、男性生殖系内の腺である、前立腺内で発生するがんの種類を指す。本明細書における前立腺がんは、腺癌、肉腫、小細胞癌、神経内分泌腫瘍、移行上皮癌を含むがこれらに限定されない。

【0065】

「甲状腺がん」という用語は、甲状腺内で発生するがんの種類を指す。 30

【0066】

本明細書で使用される場合、「～を含むこと」という用語は、組成物および方法が、列挙される要素を含むが、他の要素を除外しないことを意味するように意図される。組成物および方法を規定するのに使用される場合の「～から本質的になること」とは、意図される使用のための組合せにとって本質的に重要な他の要素を除外することを意味するものとする。例えば、本明細書で規定される通り、要素から本質的になる組成物は、単離および精製法、ならびにリン酸緩衝食塩水、保存剤など、薬学的に許容される担体から、微量の夾雑物を除外しないであろう。「～からなること」とは、本明細書で開示される組成物を投与するための、微量を超える他の成分の要素、および実質的な方法ステップを除外することを意味するものとする。これらの移行句の各々により規定される態様は、本開示の範囲内にある。 40

【0067】

本明細書で使用される場合、「検出可能なマーカー」という用語は、直接的にまたは間接的に、検出可能なシグナルを発生させることができ、少なくとも1つのマーカーを指す。このマーカーの非網羅的なリストは、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、-ガラクトシダーゼ、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの、例えば比色定量、蛍光、発光による検出可能なシグナルを発生させる酵素、蛍光、発光色素などの発色団、電子顕微鏡法、または伝導性、電流滴定、ポルタンメトリー、インピーダンスなど、それらの電気的特性により検出される電子密度を伴う群、例えば、それらの分子が、それらの物理的および/または化学的特性の、検出可能な修飾を誘導するのに十分

なサイズである、検出可能な群を含み、このような検出は、回折、表面プラズモン共鳴、表面の変動、接触角の変化などの光学法、または原子間力分光法、トンネル効果などの物理学的方法、または^{3 2}P、^{3 5}S、もしくは^{1 2 5}Iなどの放射性分子により達成することができる。

【0068】

本明細書で使用される場合、「精製マーカー」という用語は、精製または同定に有用な、少なくとも1つのマーカーを指す。このマーカーの非網羅的なリストは、H i s、l a c Z、G S T、マルトース結合性タンパク質、N u s A、B C C P、c - m y c、C a M、F L A G、G F P、Y F P、c h e r r y、チオレドキシン、p o l y (N A N P)、V 5、S n a p、H A、キチン結合性タンパク質、S o f t a g 1、S o f t a g 3、S t r e p、またはSタンパク質を含む。適切な直接的または間接的蛍光マーカーは、F L A G、G F P、Y F P、R F P、d T o m a t o、c h e r r y、C y 3、C y 5、C y 5 . 5、C y 7、D N P、A M C A、ビオチン、ジゴキシゲニン、T a m r a、T e x a s R e d、ローダミン、A l e x a f l u o r、F I T C、T R I T C、または他の任意の蛍光色素もしくはハプテンを含む。

【0069】

本明細書で使用される場合、「発現」という用語は、ポリヌクレオチドが、m R N Aへと転写される過程および/または転写されたm R N Aが、その後、ペプチド、ポリペプチド、もしくはタンパク質へと翻訳される過程を指す。ポリヌクレオチドが、ゲノムD N Aに由来する場合、発現は、真核細胞内のm R N Aのスプライシングを含みうる。遺伝子の発現レベルは、細胞または組織試料中のm R N Aまたはタンパク質の量を測定することにより決定することができる。一態様では、1つの試料に由来する遺伝子の発現レベルを、対照または基準試料に由来する、この遺伝子の発現レベルと直接比較することができる。別の態様では、1つの試料に由来する遺伝子の発現レベルを、化合物の投与後に、同じ試料に由来するこの遺伝子の発現レベルと直接比較することができる。

【0070】

本明細書で使用される場合、「相同性」または「同一な」、「同一性」パーセントまたは「類似性」パーセントとは、2つまたはこれを超える核酸配列またはポリペプチド配列の文脈で使用される場合、2つまたはこれを超える配列または部分配列であって、同じであるか、または指定された百分率の、同じヌクレオチドもしくはアミノ酸残基を有する配列または部分配列、例えば、指定された領域（例えば、本明細書で記載される抗体をコードするヌクレオチド配列または本明細書で記載される抗体のアミノ酸配列）にわたり、少なくとも60%の同一性、好ましくは少なくとも65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、またはこれを超える同一性を有する配列または部分配列を指す。相同性は、比較を目的としてアラインメントされうる、各配列内の位置を比較することにより決定することができる。比較される配列内の位置が、同じ塩基またはアミノ酸により占有される場合、分子は、この位置において相同である。配列間の相同性の程度は、配列により共有される、マッチする位置または相同な位置の数の関数である。アラインメントおよび相同性パーセントまたは配列同一性パーセントは、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、C u r r e n t P r o t o c o l s i n M o l e c u l a r B i o l o g y (Ausubelら編、1987年)、補遺30巻、7.7.18節、表7.7.1において記載されているソフトウェアプログラムを使用して決定することができる。アラインメントのためには、デフォルトのパラメータを使用することが好ましい。好ましいアラインメントプログラムは、デフォルトのパラメータを使用するB L A S Tである。特に、好ましいプログラムは、以下のデフォルトのパラメータ：遺伝子コード = 標準；フィルター = なし；鎖 = 両方；カットオフ = 60；期待値 = 10；行列 = B L O S U M 62；記載 = 50の配列；ソート = 高スコア；データベース = 非冗長、G e n B a n k + E M B L + D D B J + P D B + G e n B a n k C D S t r a n s l a t i o n s + S w i s s P r o t e i n + S P u p d a t e + P I R を使用する、B L A S T N およびB L A S T Pで

10

20

30

40

50

ある。これらのプログラムの詳細については、以下のインターネットアドレス：n c b i . n l m . n i h . g o v / c g i - b i n / B L A S Tにおいて見出すことができる。「相同性」または「同一な」、「同一性」パーセントまたは「類似性」パーセントという用語はまた、被験配列の相補体も指すか、またはこれに適用することもできる。用語はまた、欠失および／または付加を有する配列のほか、置換を有する配列も含む。本明細書で記載される通り、好ましいアルゴリズムは、ギャップなどに対処しうる。好ましくは、同一性は、少なくとも約25アミノ酸もしくはヌクレオチドの長さである領域にわたり存在するか、またはより好ましくは少なくとも50～100アミノ酸もしくはヌクレオチドの長さである領域にわたり存在する。「非類縁の」または「非相同な」配列は、本明細書で開示される配列のうちの1つと、40%未満の同一性、または代替的に25%未満の同一性を共有する。

【0071】

「第1選択」または「第2選択」または「第3選択」という語句は、患者により受容される処置の順序を指す。第1選択治療レジメンは、最初に施される処置であるのに対し、第2または第3選択治療は、それぞれ、第1選択治療の後、または第2選択治療の後で施される。National Cancer Instituteは、第1選択治療を、「疾患または状態のための最初の処置」として規定している。がんを伴う患者では、一次処置は、手術、化学療法、放射線療法、またはこれらの治療の組合せでありうる。当業者はまた、第1選択治療を、「一次治療および一次処置」とも称する。2008年5月1日が最後の閲覧日である、www.cancer.govにおけるNational Cancer Instituteのウェブサイトを参照されたい。患者が、第1選択治療に対して、ポジティブな臨床応答を示さなかつたか、または不顕性の応答を示したか、または第1選択治療を停止しているために、患者には、その後の化学療法レジメンを施すのが典型的である。

【0072】

一態様では、抗体の「同等物」または「生物学的同等物」という用語は、抗体が、そのエピトープタンパク質またはその断片に選択的に結合する能力であって、ELISAまたは他の適切な方法により測定される能力を意味する。生物学的に同等な抗体は、基準抗体と同じエピトープに結合する、抗体、ペプチド、抗体断片、抗体の改変体、抗体の誘導体、および抗体の模倣体(mimetic)を含むがこれらに限定されない。

【0073】

明示的な列挙を伴わないが、そうでないことが意図されない限りにおいて、本開示が、ポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、または抗体に関する場合、このようなポリペプチド、タンパク質、ポリヌクレオチド、または抗体の、同等物または生物学的同等物は、本開示の範囲内にあることが意図されることを推察されたい。本明細書で使用される場合、「その生物学的同等物」という用語は、基準タンパク質、抗体、ポリペプチド、または核酸に言及する場合、「その同等物」と同義であることを意図し、所望の構造または機能性をなおも維持しながら、最小限の相同性を有する、タンパク質、抗体、ポリペプチド、または核酸を意図する。本明細書で具体的に列挙されない限りにおいて、本明細書で言及される、任意のポリヌクレオチド、ポリペプチド、またはタンパク質はまた、その同等物も含むことが想定される。例えば、同等物は、少なくとも約70%の相同性もしくは同一性、または少なくとも80%の相同性もしくは同一性、または代替的に少なくとも約85%、または代替的に少なくとも約90%、または代替的に少なくとも約95%、または代替的に98%の相同性パーセントもしくは同一性パーセントを意図し、基準タンパク質、ポリペプチド、または核酸と実質的に同等な生体活性を呈する。代替的に、ポリヌクレオチドに言及する場合、その同等物は、ストリンジエントな条件下で、基準ポリヌクレオチドまたはその相補体にハイブリダイズするポリヌクレオチドである。

【0074】

別の配列と、ある特定の百分率(例えば、80%、85%、90%、または95%)の「配列同一性」を有するポリヌクレオチドまたはポリヌクレオチド領域(またはポリペプ

10

20

30

40

50

チドもしくはポリペプチド領域)とは、アラインメントし、2つの配列を比較するときに、その百分率の塩基(またはアミノ酸)が同じであることを意味する。アラインメントおよび相同性パーセントまたは配列同一性パーセントは、当技術分野で公知のソフトウェアプログラム、例えば、Current Protocols in Molecular Biology (Ausubelら編、1987年)、補遺30巻、7.7.18節、表7.7.1において記載されているソフトウェアプログラムを使用して決定することができる。アラインメントのためには、デフォルトのパラメータを使用することが好ましい。好ましいアラインメントプログラムは、デフォルトのパラメータを使用するBLASTである。特に、好ましいプログラムは、以下のデフォルトのパラメータ: 遺伝子コード=標準; フィルター=なし; 鎖=両方; カットオフ=60; 期待値=10; 行列=BLOSUM62; 記載=50の配列; ソート=高スコア; データベース=非冗長、GenBank + EMBL + DDBJ + PDB + GenBank CDS translations + SwissProtein + SP update + PIRを使用する、BLASTNおよびBLASTPである。これらのプログラムの詳細については、以下のインターネットアドレス: ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLASTにおいて見出すことができる。

【0075】

「ハイブリダイゼーション」とは、1または複数のポリヌクレオチドが反応して、ヌクレオチド残基の塩基間の水素結合を介して安定化する複合体を形成する反応を指す。水素結合は、ワトソンクリック塩基対合により生じる場合もあり、フーグスティーン結合により生じる場合もあり、他の任意の配列特異的な形で生じる場合もある。複合体は、二重鎖構造を形成する2つの鎖、多重鎖複合体を形成する3つもしくはこれを超える鎖、自己ハイブリダイズする一本鎖、またはこれらの任意の組合せを含みうる。ハイブリダイゼーション反応は、PCR反応の開始、またはリボザイムによるポリヌクレオチドの酵素的切断など、より広範な工程内のステップを構成しうる。

【0076】

ストリングエントなハイブリダイゼーション条件の例は、約25～約37のインキュベーション温度; 約6倍濃度のSSC～約10倍濃度のSSCのハイブリダイゼーション緩衝液濃度; 約0%～約25%のホルムアミド濃度; および約4倍濃度のSSC～約8倍濃度のSSCの洗浄溶液を含む。中程度のハイブリダイゼーション条件の例は、約40～約50のインキュベーション温度; 約9倍濃度のSSC～約2倍濃度のSSCの緩衝液濃度; 約30%～約50%のホルムアミド濃度; および約5倍濃度のSSC～約2倍濃度のSSCの洗浄溶液を含む。高ストリングエンシー条件の例は、約55～約68のインキュベーション温度; 約1倍濃度のSSC～約0.1倍濃度のSSCの緩衝液濃度; 約55%～約75%のホルムアミド濃度; および約1倍濃度のSSC、0.1倍濃度のSSC、または脱イオン水の洗浄溶液を含む。一般に、ハイブリダイゼーションインキュベーション時間は、5分間～24時間であり、1つ、2つ、またはこれを超える洗浄ステップを伴い、洗浄インキュベーション時間は、約1、2、または15分間である。SSCとは、0.15MのNaClおよび15mMのクエン酸緩衝液である。他の緩衝液系を使用する、SSCの同等物も利用しうることが理解される。

【0077】

「腫瘍組織型に対応する正常細胞」とは、腫瘍組織と同じ組織型に由来する正常細胞を指す。非限定的な例は、肺腫瘍を有する患者に由来する正常肺細胞、または結腸腫瘍を有する患者に由来する正常結腸細胞である。

【0078】

本明細書で使用される「単離された」という用語は、他の材料を実質的に含まない、分子または生物学的薬剤または細胞材料を指す。一態様では、「単離された」という用語は、天然の供給源中に存在する、他のDNAもしくはRNA、またはタンパク質もしくはポリペプチド、または細胞もしくは細胞小器官、または組織もしくは器官のそれぞれから分離された、DNAもしくはRNAなどの核酸、またはタンパク質もしくはポリペプチド(

例えば、抗体またはその誘導体)、または細胞もしくは細胞小器官、または組織もしくは器官を指す。「単離された」という用語はまた、組換えDNA法により作製される場合、細胞材料、ウイルス材料、もしくは培養培地を実質的に含まない核酸もしくはペプチド、または化学合成される場合、化学的前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸もしくはペプチドも指す。さらに、「単離核酸」とは、断片としては天然に存在しておらず、天然の状態では見出されない核酸断片を含むことを意図する。本明細書では、「単離された」という用語はまた、他の細胞性タンパク質から単離されたポリペプチドを指すようにも使用され、精製ポリペプチドおよび組換えポリペプチドの両方を包含することを意図する。本明細書では、「単離された」という用語はまた、他の細胞または組織から単離された細胞または組織を指すようにも使用され、培養細胞または培養組織および操作細胞または操作組織の両方を包含することを意図する。

10

【0079】

本明細書で使用される場合、「モノクローナル抗体」という用語は、Bリンパ球の単一のクローン、または単一の抗体の軽鎖遺伝子および重鎖遺伝子をトランスフェクトした細胞により產生される抗体を指す。モノクローナル抗体は、当業者に公知の方法、例えば、ハイブリッドの抗体形成細胞を、骨髄腫細胞の、脾臓免疫細胞との融合体から作ることにより作製する。モノクローナル抗体は、ヒト化モノクローナル抗体を含む。

【0080】

「タンパク質」、「ペプチド」、および「ポリペプチド」という用語は、2つまたはこれを超えるサブユニットのアミノ酸、アミノ酸類似体、またはペプチド模倣体の化合物を指すように、互換的に、かつ、それらの最も広い意味で使用する。サブユニットは、ペプチド結合で連結することができる。別の実施形態では、サブユニットは、他の結合、例えば、エステル、エーテルなどで連結することができる。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有しなければならないが、アミノ酸の最大数には、限定がなされず、タンパク質の配列を含む場合もあり、ペプチドの配列を含む場合もある。本明細書で使用される場合、「アミノ酸」という用語は、グリシン、ならびにD光学異性体およびL光学異性体の両方、アミノ酸類似体およびペプチド模倣体を含む、天然および/または非天然もしくは合成のアミノ酸を指す。

20

【0081】

「ポリヌクレオチド」および「オリゴヌクレオチド」という用語は、互換的に使用され、デオキシリボヌクレオチドもしくはリボヌクレオチドまたはそれらの類似体である、任意の長さのヌクレオチドのポリマー形態を指す。ポリヌクレオチドは、任意の三次元構造を有することが可能であり、公知または未知の任意の機能を果たしうる。以下は、ポリヌクレオチドの非限定的な例である：遺伝子または遺伝子断片(例えば、プローブ、プライマー、ESTまたはSAGEタグ)、エクソン、イントロン、メッセンジャーRNA(mRNA)、転移RNA、リボソームRNA、RNAi、リボザイム、cDNA、組換えポリヌクレオチド、分枝状ポリヌクレオチド、プラスミド、ベクター、任意の配列の単離DNA、任意の配列の単離RNA、核酸プローブ、およびプライマー。ポリヌクレオチドは、メチル化ヌクレオチドなどの修飾ヌクレオチドおよびヌクレオチド類似体を含みうる。存在する場合、ヌクレオチド構造に対する修飾は、ポリヌクレオチドのアセンブリーの前に付与することもでき、その後に付与することもできる。ヌクレオチドの配列は、ヌクレオチド以外の構成要素で中断させることができる。ポリヌクレオチドは、標識化構成要素とのコンジュゲーションを介するなど、重合化の後でさらに修飾することができる。用語はまた、二本鎖分子および一本鎖分子の両方を指す。そうでないことが指定または要求されない限りにおいて、ポリヌクレオチドである本技術の任意の態様は、二本鎖形態と、二本鎖形態を構成することが公知であるかまたは予測される、2つの相補的な一本鎖形態の各々との両方を包含する。

30

【0082】

本明細書で使用される場合、「精製された」という用語は、絶対的な純度を要求するのではなく、相対的な用語として意図されている。したがって、例えば、精製された核酸、

40

50

ペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化合物とは、全部または一部において、タンパク質または他の夾雑物から単離された、核酸、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化合物である。一般に、本開示の範囲内の使用のための、実質的に精製されたペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化合物は、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化合物の、治療的投与のための完全医薬製剤中の、医薬担体、賦形剤、緩衝液、吸収増強剤、安定化剤、保存剤、アジュバントまたは他の共成分 (co-ingredient) との混合または製剤化の前に、調製物中に存在する、全ての高分子種のうちの 80% 超を構成する。より典型的には、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化合物は、他の製剤成分との混合の前に、精製調製物中に存在する、全ての高分子種のうちの 90% 超、しばしば 95% 超を表すように精製する。他の場合、精製調製物は、本質的に均質であることが可能であり、この場合、従来の技法では、他の高分子種は、検出可能でない。

【0083】

本明細書で使用される場合、「特異的結合」という用語は、抗体と抗原との、少なくとも 10^{-6} M の結合アフィニティーによる接触を意味する。ある特定の態様では、抗体は、少なくとも約 10^{-7} M、好ましくは、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} M のアフィニティーで結合する。

【0084】

本明細書で使用される場合、「組換えタンパク質」という用語は、組換えDNA法により作製されるポリペプチドを指し、この場合、一般に、ポリペプチドをコードするDNAを、適切な発現ベクターへと挿入し、次にこれを用いて、異種タンパク質を作製するよう、宿主細胞を形質転換する。

【0085】

本明細書で使用される場合、対象における疾患「を処置すること」またはその「処置」とは、(1) 疾患の素因があるか、もしくはその症状をいまだ提示していない対象において、症状もしくは疾患が生じることを防止すること；(2) 疾患を阻害するか、もしくはその発症を停止させること；または(3) 疾患もしくは疾患の症状を改善するか、もしくは退縮を引き起こすことを指す。当技術分野で理解される通り、「処置」とは、臨床結果を含む、有益なまたは所望の結果を得るための手法である。本技術の目的では、有益なまたは所望の結果は、検出可能であれば、検出不能であれば、1または複数の症状の緩和または改善、状態（疾患を含む）の広がりの減殺、状態（疾患を含む）の安定した（すなわち、増悪させない）状況、状態（疾患を含む）の進行の遅延または緩徐化、状態（疾患を含む）の改善または軽減、および寛解（部分的である、完全である）のうちの1または複数を含みうるがこれらに限定されない。

【0086】

本明細書で使用される場合、細胞、組織、または器官に関して、「～を過剰発現させる」という用語は、タンパク質を、対照細胞、対照組織、または器官内で産生される量を超える量まで発現させることを意味する。過剰発現するタンパク質は、宿主細胞に対して内因性の場合もあり、宿主細胞に対して外因性の場合もある。

【0087】

本明細書で使用される場合、「リンカー配列」という用語は、1～10回、または代替的に、1～約8回、または代替的に、1～約6回、または代替的に、約5もしくは4回、または代替的に、3回、または代替的に、2回反復されうる、1～10、または代替的に、8アミノ酸、または代替的に、6アミノ酸、または代替的に、5アミノ酸を含む、任意のアミノ酸配列に関する。例えば、リンカーは、3回反復されるペントペプチドからなる、最大で15アミノ酸残基を含みうる。一態様では、リンカー配列は、g l y - g l y - g l y - g l y - s e r の3つのコピーを含む、（グリシン4セリン）3の可撓性ポリペプチドリンカーである。

【0088】

本明細書で使用される場合、「エンハンサー」という用語は、発現させる核酸配列との

10

20

30

40

50

関連における、その場所および配向性に関わらず、核酸配列の転写を増進、改良、または改善する配列エレメントを表す。エンハンサーは、単一のプロモーターからの転写を増強する場合もあり、1つを超えるプロモーターからの転写を同時に増強する場合もある。転写を改良するこの機能性が、保持されるか、または実質的に保持される（例えば、野生型活性、すなわち全長配列の活性の少なくとも70%、少なくとも80%、少なくとも90%または少なくとも95%）限りにおいて、野生型エンハンサー配列の、任意の切断された、変異された、またはこれら以外の修飾された改変体もまた、上記の規定の範囲内にある。

【0089】

本明細書で使用される場合、「WPRE」または「ウッドチャック肝炎ウイルス（WH P）転写後調節エレメント」という用語は、この名称と関連する特異的ヌクレオチド断片と、類似の生物学的機能を有し、本明細書で示されるWPRE配列と、少なくとも70%、または代替的に、少なくとも80%のアミノ酸配列同一性、好ましくは90%の配列同一性、より好ましくは少なくとも95%の配列同一性を共有する他の任意の分子とを指す。例えば、WPREとは、ウッドチャック肝炎ウイルスゲノム配列（GenBank受託番号：J04514）内に存在する、ヒトB型肝炎ウイルス転写後調節エレメント（HB VPRE）と同様の領域を指し、このゲノムの配列のうちの、1093～1684位の592ヌクレオチドが、転写後調節領域に対応することを指す（Journal of Virology、72巻、5085～5092頁、1998年）。レトロウイルスベクターを使用する解析は、目的の遺伝子の3'末端非翻訳領域へと挿入されたWPREが、産生されるタンパク質の量を、5～8倍増大させることを明らかにした。また、WPREの導入が、mRNAの分解を抑制することも報告されている（Journal of Virology、73巻、2886～2892頁、1999年）。広い意味では、mRNAを安定化させることにより、アミノ酸への翻訳の効率を増大させる、WPREなどのエレメントもまた、エンハンサーであると考えられる。

略語一覧

CAR：キメラ抗原受容体

HLA：組織適合性リンパ球抗原

Ip：腹膜内

IREs：内部リボソーム侵入部位

MF1：平均蛍光強度

MOI：感染多重度

PBMC：末梢血単核細胞

PBS：リン酸緩衝食塩水

scFv：单鎖可変断片

WPRE：ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント

【0090】

上記で列挙したGenBank受託番号、UniProt参照番号、および参考文献の各々と関連する配列は、参照により本明細書に組み込まれる。

【0091】

本開示を実行するための様態

遺伝子操作されたキメラ抗原受容体（CAR）T細胞による自家処置を使用して、B細胞リンパ腫および白血病において最近得られつつある、いまだかつてない結果のために（Maude, S. L.ら（2014年）、New Engl. J. Med.、371巻：1507～1517頁；Porter, D. L.ら（2011年）、New Engl. J. Med.、365巻：725～733頁）、いくつかの研究室が、この手法を、卵巣がん、前立腺がん、および膵臓腫瘍を含む充実性腫瘍に適用し始めている。CAR改変T細胞は、モノクローナル抗体の、HLAに依存しないターゲティング特異性を、活性化T細胞の細胞溶解活性、増殖およびホーミング特性と組み合わせるが、チェックポイント抑制に応答しない。抗原を発現させる標的を直接死滅させるそれらの能力

10

20

30

40

50

のために、CAR-T細胞は、任意の抗原陽性細胞または組織に対して高度に毒性であることから、高度に腫瘍特異的な抗体を伴うCARを構築することが要件となっている。現況では、ヒト充実性腫瘍に対するCAR改変T細胞は、-葉酸受容体、メソテリン、およびMUC-CD、PSMA、ならびに他の標的に対して構築されているが、大半は、正常組織内で、ある程度の抗原オフターゲット発現を示す。これらの構築物は、患者において、同じ例外的な結果を示していないことから、充実性腫瘍に対して使用しうる、新規の標的およびCAR-T細胞の構築法を同定するためのさらなる研究に対する必要が強調される。

【0092】

したがって、本開示は、HLA-Gに特異的な抗体（または「抗HLA-G」）、ならびにその使用および作製と関連する方法および組成物を提示する。加えて、本開示は、一部の態様では、抗HLA-G抗体の抗原結合性ドメインである、HLA-Gに特異的な抗原結合性ドメインを含むキメラ抗原受容体（CAR）、ならびにその使用および作製と関連する方法および組成物を提示する。

【0093】

抗体およびそれらの使用

I. 組成物

当技術分野では、抗体の一般的構造が公知であり、ここでは、短くまとめるにとどめる。免疫グロブリンの単量体は、ジスルフィド結合により接続された、2つの重鎖と、2つの軽鎖とを含む。各重鎖は、軽鎖のうちの1つと対合し、重鎖は、軽鎖に、ジスルフィド結合により、直接結合する。各重鎖は、定常領域（抗体のアイソタイプに応じて変化する）と、可変領域とを含む。可変領域は、CDRH1、CDRH2、およびCDRH3と指定され、フレームワーク領域内で支持される、3つの超可変領域（または相補性決定領域）を含む。各軽鎖は、定常領域と、可変領域とを含み、可変領域は、フレームワーク領域により、重鎖の可変領域と同様の形で支持される、3つの超可変領域（指定されたCDRL1、CDRL2、およびCDRL3）を含む。

【0094】

重鎖と軽鎖との各対による超可変領域は、互いに協同して、標的抗原に結合することができる抗原結合性部位をもたらす。重鎖と軽鎖との対の結合特異性は、重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3の配列により規定される。したがって、特定の結合特異性をもたらす、CDR配列のセット（すなわち、重鎖および軽鎖のCDR1、CDR2、およびCDR3の配列）を決定したら、同じ抗原結合特異性を伴う、異なる抗体をもたらすために、原則として、CDR配列のセットを、任意の抗体の定常領域と連結された、他の任意の抗体のフレームワーク領域内の適切な位置へと挿入することができる。

【0095】

一態様では、本開示は、重鎖（HC）免疫グロブリン可変ドメイン配列と、軽鎖（LC）免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含む単離抗体であって、重鎖および軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、ヒトHLA-Gのエピトープに結合する抗原結合性部位を形成する単離抗体を提示する。

【0096】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の配列：（i）G F N I K D T Y（配列番号1）、（ii）G F T F N T Y A（配列番号2）、またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか1つで始まり、カルボキシ末端における、さらなる50アミノ酸、または代替的に約40アミノ酸、または代替的に約30アミノ酸、または代替的に約20アミノ酸、または代替的に約10アミノ酸、または代替的に約5アミノ酸、または代替的に約4、もしくは3、もしくは2、もしくは1アミノ酸を後続させるアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにはこれからなるCDRH1配列を含む。

【0097】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の配列：（i）I D P A N G N T（配列番

10

20

30

40

50

号3)、(i i) IRSKSNNYAT(配列番号4)、またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか1つで始まり、カルボキシ末端における、さらなる50アミノ酸、または代替的に約40アミノ酸、または代替的に約30アミノ酸、または代替的に約20アミノ酸、または代替的に約10アミノ酸、または代替的に約5アミノ酸、または代替的に約4、もしくは3、もしくは2、もしくは1アミノ酸を後続させるアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにこれからなるCDRH2配列を含む。

【0098】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の配列：(i) ARSYYGGFAY(配列番号5)、(i i) VRGGYWWSFDV(配列番号6)、またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか1つで始まり、カルボキシ末端における、さらなる50アミノ酸、または代替的に約40アミノ酸、または代替的に約30アミノ酸、または代替的に約20アミノ酸、または代替的に約10アミノ酸、または代替的に約5アミノ酸、または代替的に約4、もしくは3、もしくは2、もしくは1アミノ酸を後続させるアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにこれからなるCDRH3配列を含む。

【0099】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、下記で言及されるポリヌクレオチド配列：
 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGCAGAGCTTGTGAAGC
 CAGGGGCCTCAGTCAGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTT
 20
 CAACATTAAGACACCTATATGCAC TG GGTGAAGCAGAGG
 CCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTG
 CGAATGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAA
 GGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTAC
 CTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCT
 ATTACTGTGCTAGGAGTTACTACGGGGGGTTGCTTACTG
 GGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCCTGCA(配列番号7)によりコードされるポリペプチドもしくはその抗原結合性断片、またはそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる。

30

【0100】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、アミノ酸配列：
 QVQLQESGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQR
 PEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFQGKATITADTSSNTAY
 LQLSSLTSEDTAVYYCARSYYGGFAYWGQGTIVTVSA(配列番号8)もしくはその抗原結合性断片、またはそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる。

【0101】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、下記で言及されるポリヌクレオチド配列：
 GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCGGTGGAGGATTGGTGCAGC
 CTAAAGGATCATTGAAACTCTCATGTCGCCGCCTTGGTT
 CACCTTCAATAACCTATGCCATGCAC TG GGTCCGCCAGGCT
 CCAGGAAAGGGTTGGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTA
 AAAGTAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTGAGTGA
 AGACAGATTCAACCCTCCAGAGATGATTCAACAAAGCATG
 CTCTCTCTGCAAATGAACAAACCTGAAAACACTGAGGACACAG
 CCATTATTACTGTGAGAGGGGGTTACTGGAGCTTCGA
 TGTCCTGGGGCGCAGGGACCAACGGTCACCGTCTCCTCA(配列番号9)によりコードされるポリペプチドもしくはその抗原結合性断片、またはそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこ

40

50

れらからなる。

【0102】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、アミノ酸配列：

E V Q L Q E S G G G L V Q P K G S L K L S C A A F G F T F N T Y A M H W V R Q A P G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S Q S M L S L Q M N N L K T E D T A I Y Y C V R G G Y W S F D V W G A G T T V T V S S (配列番号10) もしくはその抗原結合性断片、またはそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる。

【0103】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の配列：(i) K S V S T S G Y S Y (配列番号11)、(ii) K S L L H S N G N T Y (配列番号12)、またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか1つで始まり、カルボキシ末端における、さらなる50アミノ酸、または代替的に約40アミノ酸、または代替的に約30アミノ酸、または代替的に約20アミノ酸、または代替的に約10アミノ酸、または代替的に約5アミノ酸、または代替的に約4、もしくは3、もしくは2、もしくは1アミノ酸を後続させるアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにこれからなるC D R L 1配列を含む。

【0104】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、L V S (配列番号13) またはその同等物で始まり、カルボキシ末端における、さらなる50アミノ酸、または代替的に約40アミノ酸、または代替的に約30アミノ酸、または代替的に約20アミノ酸、または代替的に約10アミノ酸、または代替的に約5アミノ酸、または代替的に約4、もしくは3、もしくは2、もしくは1アミノ酸を後続させるアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにこれからなるC D R L 2配列を含む。

【0105】

他の実施形態では、軽鎖可変領域は、R M S (配列番号14) またはその同等物で始まり、カルボキシ末端における、さらなる50アミノ酸、または代替的に約40アミノ酸、または代替的に約30アミノ酸、または代替的に約20アミノ酸、または代替的に約10アミノ酸、または代替的に約5アミノ酸、または代替的に約4、もしくは3、もしくは2、もしくは1アミノ酸を後続させるアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにこれからなるC D R L 2配列を含む。

【0106】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の配列：(i) Q H S R E L P R T (配列番号15)、(ii) M Q H L E Y P Y T (配列番号16)、またはそれらの各々の同等物のうちのいずれか1つで始まり、カルボキシ末端における、さらなる50アミノ酸、または代替的に約40アミノ酸、または代替的に約30アミノ酸、または代替的に約20アミノ酸、または代替的に約10アミノ酸、または代替的に約5アミノ酸、または代替的に約4、もしくは3、もしくは2、もしくは1アミノ酸を後続させるアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにこれからなるC D R L 3配列を含む。

【0107】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、ポリヌクレオチド配列：

G A T A T T G T G C T C A C A C A G T C T C C T G C T T C C T T A G C T G T A T C T C T G G G G C A G A G G G C C A C C A T C T C A T G C A G G G C C A G C A A A A G T G T C A G T A C A T C T G G C T A T A G T T A T A T G C A C T G G T A C C A A C A G A A A C C A G G A C A G C C A C C C A A A C T C C T C A T C T A T C T T G T A T C C A A C C T A G A A T C T G G G G T C C C T G C C A G G T T C A G T G G C A G T G G G T C T G G G A C A G A C T T C A C C C T C A A C A T C C A T C C T G T G G A G G G A G G G A G G A T G C T G C A A C C T A T T A C T G T C A G C A C A G T A G G G A G C T T C C T C G G A C G T T C G G T G G A G G C A C C A A 50

G C T G G A A A T C A A A (配列番号17)によりコードされるポリペプチドもしくはその抗原結合性断片、またはそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる。

【0108】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、アミノ酸配列：

D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S K S V S T S G Y S Y M H W Y
Q Q K P G Q P P K L L I Y L V S N L E S G V P A R F S G S G S G T D F T L N I H
P V E E E D A A T Y Y C Q H S R E L P R T F G G G T K L E I K (配列番号18)もしくはその抗原結合性断片、またはそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる。

10

【0109】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、ポリヌクレオチド配列：

G A T A T T G T G A T C A C A C A G A C T A C A C C C T C T G T A C C T G T C A
C T C C T G G A G A G T C A G T A T C C A T C T C C T G T A G G T C T A G T A A
G A G T C T C C T G C A T A G T A A T G G C A A C A C T T A C T T G T A T T G G
T T C C T G C A G A G G C C A G G C C A G T C T C C T C A G C T C C T G A T A T
C T C G G A T G T C C A G C C T T G C C T C A G G A G T C C C A G A C A G G T T
C A G T G G C A G T G G G T C A G G A A C T G C T T C A C A C T G A G A A T C
A G T A G A G T G G A G G C T G A G G A T G T G G G T G T T A T T A C T G T A
T G C A A C A T C T A G A A T A T C C G T A T A C G T T C G G A G G G G G G A C
C A A G C T G G A A A T A A A A (配列番号19)によりコードされるポリペプチドもしくはその抗原結合性断片、またはそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる。

20

【0110】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、アミノ酸配列：

D I V I T Q T T P S V P V T P G E S V S I S C R S S K S L L H S N G N T Y L Y W
F L Q R P G Q S P Q L L I S R M S S L A S G V P D R F S G S G S G T A F T L R I
S R V E A E D V G V Y Y C M Q H L E Y P Y T F G G G T K L E I K (配列番号20)もしくはその抗原結合性断片、またはそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる。

30

【0111】

本技術についての別の態様では、単離抗体は、以下の特徴：

(a) 軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、開示される軽鎖配列のうちのいずれかの軽鎖可変ドメインのCDRと少なくとも85%同一である、1または複数のCDRを含むこと；

(b) 重鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、開示される重鎖配列のうちのいずれかの重鎖可変ドメインのCDRと少なくとも85%同一である、1または複数のCDRを含むこと；

(c) 軽鎖免疫グロブリン可変ドメイン配列が、開示される軽鎖配列のうちのいずれかの軽鎖可変ドメインと少なくとも85%同一であること；

40

(d) H C 免疫グロブリン可変ドメイン配列が、開示される重鎖配列のうちのいずれかの重鎖可変ドメインと少なくとも85%同一であること；および

(e) 抗体が、開示される配列のうちのいずれかが結合するエピトープと重なり合うエピトープに結合すること
のうちの1または複数を含む。

【0112】

開示されるCDR配列、ならびに重鎖可変配列および軽鎖可変配列を含む例示的な抗体を、それぞれ、表1および表2に開示する。

【表1】

表1:

抗体	CDRH1	CDRH2	CDRH3	CDRL1	CDRL2	CDRL3	
3H11	配列番号 1	配列番号 3	配列番号 5	配列番号 11	配列番号 13	配列番号 15	
HLA-G 4E3	配列番号 2	配列番号 4	配列番号 6	配列番号 12	配列番号 14	配列番号 16	10

【表2】

表2:

抗体	重鎖可変領域	軽鎖可変領域
3H11	配列番号 8	配列番号 18
HLA-G 4E3	配列番号 10	配列番号 20

20

【0113】

一態様では、本開示は、3H11およびHLA-G 4E3からなる群より選択される抗体と少なくとも85%同一である単離抗体を提示する。

【0114】

一態様では、本開示は、3H11のCDRを含む単離抗体を提示する。一態様では、本開示は、3H11と少なくとも85%同一である単離抗体を提示する。

【0115】

一態様では、本開示は、HLA-G 4E3のCDRを含む単離抗体を提示する。一態様では、本開示は、HLA-G 4E3と少なくとも85%同一である単離抗体を提示する。

30

【0116】

本明細書で提示される抗体についての一部の態様では、HC可変ドメイン配列は、3H11の可変ドメイン配列を含み、LC可変ドメイン配列は、3H11の可変ドメイン配列を含む。

【0117】

本明細書で提示される抗体についての一部の態様では、HC可変ドメイン配列は、HLA-G 4E3の可変ドメイン配列を含み、LC可変ドメイン配列は、HLA-G 4E3の可変ドメイン配列を含む。

【0118】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、ヒトHLA-Gに、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、または 10^{-12} M未満の解離定数(K_D)で結合する。本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗原結合性部位は、ヒトHLA-Gに特異的に結合する。

40

【0119】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、可溶性Fabである。

【0120】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列とは、同じポリペプチド鎖の構成要素である。本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、HC可変ドメイン配列とLC可変ドメイン配列とは、異なる

50

ポリペプチド鎖の構成要素である。

【0121】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、全長抗体である。

【0122】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、モノクローナル抗体である。

【0123】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、キメラまたはヒト化である。

【0124】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、F_ab、F(ab)'₂、F_ab'、s_cF_v、およびF_vからなる群より選択される。

【0125】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、F_cドメインを含む。本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、ウサギ抗体である。本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、ヒトもしくはヒト化抗体であるか、またはヒトにおいて非免疫原性である。

【0126】

本明細書で提示される抗体についての態様の一部では、抗体は、ヒト抗体のフレームワーク領域を含む。

10

【0127】

他の態様では、本明細書で提示される抗体のCDR内の、1または複数のアミノ酸残基を、別のアミノ酸で置換する。置換は、アミノ酸の同じファミリー内の置換であるという意味で「保存的」でありうる。天然に存在するアミノ酸は、以下の4つのファミリー：

- 1) 塩基性側鎖を伴うアミノ酸：リシン、アルギニン、ヒスチジン；
- 2) 酸性側鎖を伴うアミノ酸：アスパラギン酸、グルタミン酸；
- 3) 非荷電極性側鎖を伴うアミノ酸：アスパラギン、グルタミン、セリン、トレオニン、チロシン；
- 4) 非極性側鎖を伴うアミノ酸：グリシン、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、トリプトファン、システイン

20

に分けることができ、保存的置換は、これらのファミリー内で生じる。

30

【0128】

別の態様では、1または複数のアミノ酸残基を、抗体の1または複数のCDRに付加するか、またはこれらから欠失させる。このような付加または欠失は、CDRのNもしくはC末端、またはCDR内の位置に施す。

【0129】

抗体のCDRのアミノ酸配列を、アミノ酸の付加、欠失、または置換により変化させることにより、標的抗原に対する結合アフィニティーの増大など、多様な効果を得ることができる。

【0130】

40

このような変化させたCDR配列を含む本開示の抗体もやはり、開示される抗体と同様の特異性および感受性プロファイルで、HLA-Gに結合することを察知されたい。これは、結合アッセイにより調べることができる。

【0131】

抗体の定常領域もまた、変化させることができる。例えば、任意のアイソタイプ：IgA(IgA1、IgA2)、IgD、IgE、IgG(IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、またはIgMのFc領域を伴う抗体を提示することができる。定常領域配列の非限定的な例は、

【0132】

ヒトIgD定常領域；Uniprot：P01880 配列番号21

50

【化2】

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNPVVLACLITGYHPTSVTVWYMGQTQSPQRTFPEIQ
 RRDSYYMTSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKEIFRWPESPKAQASSVPTA
 QPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKEKEKEEKEEQUEERETKTPECPSSHQPLGVY
 LLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSIDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNG
 SQSQHSRLLTLRSLWNAGTSVCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASS
 DPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVL
 RVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDHGP MK

10

【0133】

ヒトIgG1定常領域；Uniprot：P01857 配列番号22

【化3】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

20

【0134】

ヒトIgG2定常領域；Uniprot：P01859 配列番号23

【化4】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPAPPVA
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【0135】

ヒトIgG3定常領域；Uniprot：P01860 配列番号24

【化5】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKVELKTPLGDTHTCPRC
 PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPMLSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNIFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSPGK

40

【0136】

ヒトIgM定常領域；Uniprot：P01871 配列番号25

50

【化6】

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSV
 LRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLVIAELPPKVSV
 FVPPRDGFGNPRKSKLICQATGFSRQIQVSWLREGKQVGSGVTTDQVQAEAKESG
 PTITYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPS
 FASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYSVTISWTRQNGEAVKHTHNISESHPNATFSAVGEAS
 ICEDDWNSGERFTCTVHTDLPPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESA
 10 TITCLVTGFSPADVFWQMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEE
 WNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

【0137】

ヒト Ig G 4 定常領域 ; UniProt : P01861 配列番号 26

【化7】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPALQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 20 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFL
 YSRLTVDKSRWQEGNVFCSVVMHEALHNHYTQKSLSLGK

【0138】

ヒト Ig A 1 定常領域 ; UniProt : P01876 配列番号 27

【化8】

ASPTSPKVFPQLCSTQPDGNVVIACLVQGFPQEPLSVTWSSEGQGVTAARNFPPSQD
 ASGDLYTTSSQLTPATQCLAGKSVTCHVHYTNPSQDVTPCPVPSTPPSPSTPP
 30 TPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLGEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGP
 PERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKPLTATLSKSGNTFRPEVH
 LLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTwASRQEPESQG
 TTTFAVTSILRVAEAEDWKKGDTFSCMVGVHEALPLAFTQKTIIDRLAGKPTHVNVSVV
 MAEVDGTCY

【0139】

ヒト Ig A 2 定常領域 ; UniProt : P01877 配列番号 28

【化9】

ASPTSPKVFPQLSLDSTPQDGNNVVACLVQGFPQEPLSVTWSSEGQNVTAARNFPPSQD
 ASGDLYTTSSQLTPATQCPDGKSVTCHVHYTNPSQDVTPCPVPPPPCCHPRLSL
 HRPALEDLLLGEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPEIDLCGCYSVS
 SVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNE
 LVTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTwASRQEPESQGTTFAVTSILRVA
 AEDWKKGDTFSCMVGVHEALPLAFTQKTIIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

10

20

30

40

50

【0140】

ヒト Ig カップ定常領域； UniProt : P01834 配列番号 29
 TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
 を含む。

【0141】

一部の態様では、抗体は、配列番号 7 ~ 10 またはそれらの同等物のうちのいずれか 1 つと、少なくとも 80 % 同一である重鎖定常領域を含む。

【0142】

一部の態様では、抗体は、配列番号 17 ~ 20 またはそれらの同等物のうちのいずれか 1 つと、少なくとも 80 % 同一である軽鎖定常領域を含む。

【0143】

本明細書で提示される抗体についての一部の態様では、抗体は、3H11 および HLA-G 4E3 抗体が結合するエピトープに結合する。

【0144】

本明細書で提示される抗体についての一部の態様では、HLA-G 特異的抗体は、ヒト HLA-G への結合について、3H11 および HLA-G 4E3 と競合する。

【0145】

本明細書で提示される抗体についての一部の態様では、抗体は、急速な結合、ならびに細胞への取り込みおよび / または緩徐な放出を容易とするように、構造的修飾を含有する。一部の態様では、HLA-G 抗体は、急速な結合、ならびに細胞への取り込みおよび / または緩徐な放出を容易とするように、抗体の CH2 定常重鎖領域内の欠失を含有する。一部の態様では、Fab 断片を使用して、急速な結合、ならびに細胞への取り込みおよび / または緩徐な放出を容易とする。一部の態様では、F(ab)'2 断片を使用して、急速な結合、ならびに細胞への取り込みおよび / または緩徐な放出を容易とする。

【0146】

抗体、断片、およびそれらの同等物は、使用および / または保管のための製剤をもたらすように、担体、例えば、薬学的に許容される担体または他の薬剤と組み合わせることができる。

【0147】

さらに、HLA-G またはその断片のアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにつきからなる単離ポリペプチドであって、HLA-G に結合する抗体を作出するのに有用な単離ポリペプチドのほか、それらをコードする単離ポリヌクレオチドも提供される。一態様では、単離ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、標識および / もしくは連続的ポリペプチド配列（例えば、スカシガイヘモシアニン（KLH）担体タンパク質）または、ポリヌクレオチドの場合、ポリペプチドもしくはポリヌクレオチドへと作動的にカップリングさせた配列をコードするポリヌクレオチドをさらに含む。ポリペプチドまたはポリヌクレオチドは、多様な担体、例えば、リン酸緩衝食塩水と組み合わせることができる。さらに、単離ポリペプチドまたはポリヌクレオチドを含む、宿主細胞、例えば、原核細胞または真核細胞、例えば、細菌、酵母、哺乳動物（ラット、サル、ハムスター、またはヒト）細胞が提供される。宿主細胞は、担体と組み合わせることができる。

【0148】

I I . 組成物を調製するための工程

抗体、それらの製造および使用については周知であり、例えば、Harlow, E. および Lane, D.、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory Press、Cold Spring Harbor, N.Y.、1999 年において開示されている。抗体は、当技術分野で公知の標準的な方法を使用して作出することができる。抗体の例は

10

20

30

40

50

、モノクローナル抗体、単鎖抗体、および抗体の機能的断片を含む（がこれらに限定されない）。

【0149】

抗体は、一連の宿主、例えば、ヤギ、ウサギ、ラット、マウス、ヒト、および他の宿主において產生させることができる。宿主は、標的抗原またはHLA-GのC末端断片もしくは単離ポリペプチドなど、免疫原特性を有するその断片もしくはオリゴペプチドを注射することにより免疫化することができる。宿主種に応じて、多様なアジュバントを添加および使用して、免疫学的応答を増大させることができる。このようなアジュバントは、フロイントアジュバント、水酸化アルミニウムなどのミネラルゲル、ならびにリソレシチン、フルロニックポリオール、ポリアニオン、ペプチド、油エマルジョン、スカシガイヘモシアニン、およびジニトロフェノールなどの界面活性物質を含むがこれらに限定されない。ヒトにおいて使用されるアジュバントでは、BCG（カルメット・ゲラン桿菌）およびCorynebacterium parvumが特に有用である。本開示はまた、単離ポリペプチドおよびアジュバントも提示する。

【0150】

ある特定の態様では、本開示の抗体は、ポリクローナル抗体、すなわち、異なるアミノ酸配列を有する、複数種類の抗HLA-G抗体の混合物である。一態様では、ポリクローナル抗体は、異なるCDRを有する、複数種類の抗HLA-G抗体の混合物を含む。したがって、異なる抗体を產生する細胞の混合物を培養し、結果として得られる培養物から精製された抗体を使用することができる（WO 2004/061104を参照されたい）。

【0151】

モノクローナル抗体の作製：HLA-Gに対するモノクローナル抗体は、培養物中の連續的な細胞株による抗体分子の產生をもたらす任意の技法を使用して調製することができる。このような技法は、ハイブリドーマ法（例えば、KohlerおよびMilstein、Nature、256巻：495～497頁（1975年）を参照されたい）；トリオーマ法；ヒトB細胞ハイブリドーマ法（例えば、Kozborら、Immunol. Today、4巻：72頁（1983年）を参照されたい）およびヒトモノクローナル抗体を作製するEBVハイブリドーマ法（例えば、Coleら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss, Inc.、77～96頁（1985年）を参照されたい）を含むがこれらに限定されない。ヒトモノクローナル抗体は、本技術の実施において活用することができ、ヒトハイブリドーマを使用すること（例えば、Coteら、Proc. Natl. Acad. Sci.、80巻：2026～2030頁（1983年）を参照されたい）により作製することもでき、in vitroにおいて、ヒトB細胞を、エピスタインバーウイルスで形質転換すること（例えば、Coleら、MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY、Alan R. Liss, Inc.、77～96頁（1985年）を参照されたい）により作製することもできる。例えば、抗体の領域をコードする核酸の集団を単離することができる。抗体の保存的領域をコードする配列に由来するプライマーを活用するPCRを使用して、抗体の部分をコードする配列を、集団から増幅し、次いで、抗体または可変ドメインなど、それらの断片をコードするDNAを、増幅された配列から再構築する。このような増幅された配列はまた、ファージまたは細菌上に、融合ポリペプチドを発現させ、提示するための他のタンパク質（例えば、バクテリオファージコートまたは細菌細胞表面タンパク質）をコードするDNAへと融合させることもできる。次いで、増幅された配列を発現させ、例えば、発現させた抗体またはその断片の、HLA-Gポリペプチド上に存在する抗原またはエピトープに対するアフィニティーに基づき、さらに選択または単離することができる。代替的に、抗HLA-Gモノクローナル抗体を発現させるハイブリドーマは、対象を、例えば、HLA-Gまたはその断片のアミノ酸配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにつれからなる単離ポリペプチドで免疫化し、次いで、慣例的な方法を使用して、ハイブリドーマを、対象の脾臓から単離することにより調製することができる。例えば

10

20

30

40

50

、Milsteinら(GalfreおよびMilstein、Methods Enzymol、73巻：3～46頁(1981年))を参照されたい。標準的な方法を使用してハイブリドーマをスクリーニングすることにより、特異性(すなわち、異なるエピトープに対する)およびアフィニティーを変化させたモノクローナル抗体を作製する。所望の特性、例えば、HLA-Gへの結合を伴う選択されたモノクローナル抗体は、(i)ハイブリドーマにより発現された形で使用することもでき、(ii)ポリエチレンギリコール(PEG)などの分子に結合させて、その特性を変更することもでき、(iii)モノクローナル抗体をコードするcDNAを、単離し、配列決定し、多様な形で操作することができる。一態様では、抗HLA-Gモノクローナル抗体は、ヒト重鎖導入遺伝子と、軽鎖導入遺伝子とを含むゲノムを有するトランスジェニックの非ヒト動物、例えば、トランスジェニックマウスから得られたB細胞であって、不死化細胞へと融合させたB細胞を含むハイブリドーマにより作製する。ハイブリドーマ法は、当技術分野で公知であり、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual、Cold Spring Harbor Laboratory、Cold Spring Harbor、N.Y.、349頁(1988年); Hammerlingら、Monoclonal Antibodies And T-Cell Hybridomas、563～681頁(1981年)において教示されているハイブリドーマ法を含む。
10

【0152】

ファージディスプレイ法：上記で言及した通り、本開示の抗体は、組換えDNAおよびファージディスプレイ技術の適用を介して作製することができる。例えば、抗HLA-G抗体は、当技術分野で公知の、多様なファージディスプレイ法を使用して調製することができる。ファージディスプレイ法では、機能的な抗体ドメインを、それらをコードするポリヌクレオチド配列を保有するファージ粒子の表面に提示する。所望の結合特性を伴うファージは、抗原、典型的には、固体表面またはビーズに結合させるかまたは捕捉した抗原により、直接選択することにより、レパートリーまたはコンビナトリアル抗体ライブラリー(例えば、ヒトまたはマウス)から選択する。これらの方法において使用されるファージは典型的に、fdおよびM13を含む糸状ファージであって、Fab、Fv、またはジスルフィド安定化Fv抗体ドメインを、組換えにより、ファージ遺伝子IIまたはVIタンパク質へと融合させた、糸状ファージである。加えて、方法を、Fab発現ライブラリーの構築(例えば、Huseら、Science、246巻：1275～1281頁、1989年を参照されたい)に適応させて、HLA-Gポリペプチド、例えば、ポリペプチド、またはその誘導体、断片、類似体、もしくは相同体に所望の特異性を伴うモノクローナルFab断片の迅速かつ有効な同定を可能とすることができます。本開示の単離抗体を作製するのに使用しうるファージディスプレイ法の他の例は、Hustonら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、85巻：5879～5883頁(1988年); Chaudharyら、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.、87巻：1066～1070頁(1990年); Brinkmanら、J. Immunol. Methods、182巻：41～50頁(1995年); Amesら、J. Immunol. Methods、184巻：177～186頁(1995年); Kettleboroughら、Eur. J. Immunol.、24巻：952～958頁(1994年); Persicら、Gene、187巻：9～18頁(1997年); Burtonら、Advances in Immunology、57巻：191～280頁(1994年); PCT/GB91/01134; WO90/02809; WO91/10737; WO92/01047; WO92/18619; WO93/11236; WO95/15982; WO95/20401; WO96/06213; WO92/01047(Medical Research Council); WO97/08320(Morphosys); WO92/01047(CAT/MRC); WO91/17271(Affymax); ならびに米国特許第5,698,426号、同第5,223,409号、同第5,403,484号、同第5,580,717号、同第5,427,908号、同第5,750,753号、同第5,821,050

47号、同第5, 571, 698号、同第5, 427, 908号、同第5, 516, 637号、同第5, 780, 225号、同第5, 658, 727号、および同第5, 733, 743号において開示されているファージディスプレイ法を含む。

【0153】

ジスルフィド結合を介してポリペプチドを接合させることにより、バクテリオファージ粒子の表面上にポリペプチドを提示するために有用な方法については、Lohning、米国特許第6, 753, 136号により記載されている。上記の参考文献に記載されている通り、ファージを選択した後で、ファージに由来する抗体をコードする領域を単離し、ヒト抗体を含む全抗体、または他の任意の所望の抗原結合性断片を作出し、哺乳動物細胞、昆虫細胞、植物細胞、酵母、および細菌を含む、任意の所望の宿主内で発現させるのに使用することができる。例えば、WO 92/22324; Mullinaxら、Biotechniques、12巻：864～869頁（1992年）；Sawaiら、AJR I、34巻：26～34頁（1995年）；およびBettlerら、Science、240巻：1041～1043頁（1988年）において開示されている方法など、当技術分野で公知の方法を使用して、組換えにより、Fab、Fab'、およびFab(ab')₂断片を作製する技法もまた、利用することができる。

【0154】

一般に、抗体または抗体断片は、ファージまたはファージミド粒子の表面上に存在するため、良好な結合活性を維持する変形体を同定するために、ディスプレイベクターへとクローニングされたハイブリッド抗体またはハイブリッド抗体断片を、適切な抗原に対して選択することができる。例えば、Barbas IIIら、Phage Display, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.、2001年) を参照されたい。しかし、選択および/またはスクリーニングのために、抗体断片ライブラリーを、溶解性のファージベクター（変形T7またはラムダZap系）へとクローニングすることなど、他のベクターフォーマットをこの工程のために使用しうるであろう。

【0155】

抗体作製のための代替法：抗体はまた、リンパ球集団内で、in vivoにおける產生を誘導することにより作製することもでき、組換え免疫グロブリンライブラリーまたは高度に特異的な結合試薬のパネルをスクリーニングすることにより作製することもできる（Orlandiら、PNAS、86巻：3833～3837頁（1989年）；Winter, G.ら、Nature、349巻：293～299頁（1991年））。

【0156】

代替的に、単鎖抗体を作製するための技法を使用することができる。単鎖抗体（scF_v）は、リンカーペプチド（典型的には、ほぼ5～25アミノ酸の長さ）により接続された、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む。scF_vにおける重鎖および軽鎖の可変領域は、同じ抗体から導出することもでき、異なる抗体から導出することもできる。scF_vは、組換え法を使用して、例えば、scF_vをコードするベクターの、E. coliなどの宿主生物内の発現により合成することができる。scF_vをコードするDNAは、上述の抗体の重鎖または重鎖の可変領域をコードするDNAと、その軽鎖または軽鎖の可変領域をコードするDNAとから選択されるDNAの、全アミノ酸配列または所望のアミノ酸配列をコードする部分的DNAを鋳型として使用し、その両端を規定するプライマー対を使用するPCRにより増幅を実施し、リンカーの両端を、重鎖および軽鎖のそれぞれへとライゲーションするように、ポリペプチドリンカー部分をコードするDNAと、その両端を規定するプライマー対とを組み合わせる増幅をさらに実施することにより得ることができる。scF_vをコードするDNAを含有する発現ベクターと、発現ベクターにより形質転換された宿主とは、当技術分野で公知の、従来の方法に従い得ることができる。

【0157】

また、抗原結合性断片、例えば、抗体分子のペプシン消化により作製しうるFab

10

20

30

40

50

)₂ 断片、およびF(ab')₂ 断片のジスルフィド架橋を還元することにより作出しうるF(ab)断片も、作出することができる。代替的に、F(ab)発現ライブラリーを構築して、所望の特異性を伴うモノクローナルF(ab)断片の、迅速かつ簡易な同定を可能とすることができる(Huseら、Science、256巻：1275～1281頁(1989年))。

【0158】

抗体の修飾。本開示の抗体は、抗原に対するアフィニティーを増大させるように、多量体化することができる。多量体化される抗体は、1種類の抗体の場合もあり、同じ抗原の複数のエピトープを認識する、複数の抗体の場合もある。抗体の多量体化の方法としては、IgG CH3ドメインの、2つのscF_v分子への結合、ストレプトアビジンへの結合、ヘリックス-ターン-ヘリックスモチーフの導入などを例示することができる。10

【0159】

本明細書で開示される抗体組成物は、これらの抗体のうちのいずれかと、別の薬剤との間で形成される、コンジュゲートの形態(免疫コンジュゲート)でありうる。一態様では、本明細書で開示される抗体を、放射性物質へとコンジュゲートさせる。別の態様では、本明細書で開示される抗体を、ポリエチレンギリコール(P EG)など、多様な種類の分子に結合させることができる。

【0160】

抗体のスクリーニング。所望の特異性を有する抗体を同定するスクリーニングのために、多様なイムノアッセイを使用することができる。当技術分野では、特異性が確立された、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体を使用する、競合的結合またはイムノラジオメトリックアッセイのための多数のプロトコールが周知である。このようなイムノアッセイは、HLA-Gまたはその任意の断片もしくはオリゴペプチドと、その特異的抗体との間の複合体の形成についての測定を伴うことが典型的である。2つの非干渉的HLA-Gエピトープに特異的なモノクローナル抗体を活用する、2部位型の、モノクローナルベースのイムノアッセイを使用しうるが、競合的結合アッセイもまた、利用することができる(Maddoxら、J. Exp. Med.、158巻：1211～1216頁(1983年))。

【0161】

抗体の精製。本明細書で開示される抗体は、均質性まで精製することができる。抗体の分離および精製は、従来のタンパク質分離および精製法を利用することにより実施することができる。30

【0162】

例だけを目的として述べると、抗体は、クロマトグラフィーカラム、フィルター、限外濾過、塩析、透析、調製用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、等電点電気泳動などの使用を適切に選択し、組み合わせることにより、分離および精製することができる。Strategies for Protein Purification and Characterization: A Laboratory Course Manual、Daniel R. Marshakら編、Cold Spring Harbor Laboratory Press(1996年); Antibodies: A Laboratory Manual、HarlowおよびDavid Lane編、Cold Spring Harbor Laboratory(1988年)。40

【0163】

クロマトグラフィーの例は、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、疎水性クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、および吸着クロマトグラフィーを含む。一態様では、クロマトグラフィーは、HPLCまたはFPLCなどの液体クロマトグラフィーを利用することにより実施することができる。

【0164】

一態様では、アフィニティークロマトグラフィーにおいて、プロテインAカラムまたは50

プロテインGカラムを使用することができる。他の例示的なカラムは、プロテインAカラムである、HyperD、POROS、Sephadose F.F. (Pharmacia)などを含む。

【0165】

I I I . 使用法

総論。本明細書で開示される抗体は、HLA-Gポリペプチドの位置特定および/または定量化と関連する、当技術分野で公知の方法（例えば、適切な生理学的試料中のHLA-Gポリペプチドのレベルの測定における使用のための方法、診断法における使用のための方法、ポリペプチドのイメージングにおける使用のための方法など）において有用である。本明細書で開示される抗体は、アフィニティーコロマトグラフィーまたは免疫沈降など、標準的な技法によるHLA-Gポリペプチドの単離において有用である。本明細書で開示されるHLA-G抗体は、天然のHLA-Gポリペプチドの、生物学的試料、例えば、哺乳動物の血清または細胞からの精製のほか、組換えにより作製されるHLA-Gポリペプチドであって、宿主系内で発現させるHLA-Gポリペプチドの精製も容易としうる。さらに、HLA-G抗体を使用して、ポリペプチドの存在度および発現パターンについて評価するために、HLA-Gポリペプチド（例えば、血漿、細胞溶解物、または細胞上清中）を検出することができる。本明細書で開示されるHLA-G抗体を診断的に使用して、組織内のHLA-Gレベルを、臨床検査手順の一部としてモニタリングする、例えば、所与の処置レジメンの有効性を決定することができる。検出は、本明細書で開示されるHLA-G抗体を、検出可能な物質へとカップリングすること（すなわち、物理的に連結すること）により、容易とすることができます。10

【0166】

別の態様では、本明細書では、本明細書で開示される抗体または抗原結合性断片であって、例えば、ヒトHLA-Gタンパク質またはその断片を含むペプチドに結合した抗体または抗原結合性断片を含む組成物が提示される。一態様では、ペプチドを、細胞と会合させる。例えば、組成物は、本明細書で開示される抗体または抗体断片で標識された非凝集細胞試料を含むことが可能であり、この組成物は、例えば、細胞を単離するためのアフィニティーコロマトグラフィー法において、またはフローサイトメトリー-ベースの細胞解析もしくは細胞分取のために有用である。別の例として、組成物は、本明細書で開示される抗体または抗体断片で標識された、固定組織試料または細胞スミアを含むことが可能であり、この組成物は、例えば、免疫組織化学または細胞学解析において有用である。別の態様では、抗体または抗体断片を、例えば、HLA-Gタンパク質もしくはそれらの断片、HLA-G陽性細胞、またはHLA-Gおよび他の細胞成分を含有する複合体を単離するためのELISA；アフィニティーコロマトグラフィー；または免疫沈降法において有用な固体支持体に結合させる。別の態様では、ペプチドを、固体支持体に結合させる。例えば、ペプチドを、ペプチドに特異的な二次抗体であって、例えば、サンドイッチELISAにおいて有用な二次抗体を介して、固体支持体に結合させることができる。別の例として、ペプチドを、例えば、本技術に従う抗体の単離または精製において有用な、コロマトグラフィーカラムに結合させることができる。別の態様では、ペプチドを、例えば、HLA-Gタンパク質もしくはそれらの断片、またはHLA-Gおよび他の細胞成分を含有する複合体を単離するELISAおよびアフィニティーコロマトグラフィーまたは免疫沈降法において有用な、分画された細胞の細胞内画分（sub-cellular fraction）を含有する溶解液または溶液などの溶液中に入れる。別の態様では、ペプチドを、例えば、ゲル電気泳動用のゲルまたはウェスタンプロット法に一般に使用されるマトリックス（ニトロセルロース製またはポリビニリデンジフルオリド製の膜など）などのマトリックスと会合させるが、この組成物は、電気泳動および/またはウェスタンプロット法などのイムノプロット法に有用である。30

【0167】

HLA-Gポリペプチドの検出。生物学的試料中のHLA-Gポリペプチドのレベルを検出するための例示的な方法は、生物学的試料を、対象から得るステップと、生物学的試

50

20

40

50

料を、HLA-Gポリペプチドを検出することが可能な本明細書で開示されるHLA-G抗体と接触させるステップとを伴う。

【0168】

一態様では、HLA-G抗体である、3H11、もしくはHLA-G 4E3、またはそれらの断片を、検出可能に標識する。抗体に関する「標識された」という用語は、検出可能な物質を、抗体へとカップリングすること(すなわち、物理的に連結すること)による抗体の直接的な標識のほか、直接的に標識された別の化合物との反応性による抗体の間接的な標識も包含することを意図する。間接的な標識の非限定的な例は、蛍光標識された二次抗体を使用する一次抗体の検出と、それを、蛍光標識されたストレプトアビジンにより検出しうるよう、DNAプローブを、ビオチンで末端標識することとを含む。

10

【0169】

本開示の検出法を使用して、in vitroならびにin vivoにおいて、生物学的試料中のHLA-Gポリペプチドの発現レベルを検出することができる。HLA-Gポリペプチドを検出するためのin vitro法は、酵素免疫測定アッセイ(ELISA)、ウェスタンプロット、フローサイトメトリー、免疫沈降、ラジオイムノアッセイ、および免疫蛍光(例えば、IHC)を含む。さらに、HLA-Gポリペプチドを検出するためのin vivo法は、対象へと標識された抗HLA-G抗体を導入するステップを含む。例だけを目的として述べると、抗体は、対象におけるその存在および場所を、標準的なイメージング技法により検出しうる放射性マーカーで標識することができる。一態様では、生物学的試料は、被験対象に由来するポリペプチド分子を含有する。

20

【0170】

イムノアッセイおよびイメージング。抗体ベースの技法を使用して、生物学的試料(例えば、ヒト血漿)中のHLA-Gポリペプチドレベルをアッセイするのに、本明細書で開示されるHLA-G抗体を使用することができる。例えば、組織内のタンパク質発現は、古典的な免疫組織化学(IHC)染色法で研究することができる(Jalkanen, M.ら、J. Cell. Biol.、101巻:976~985頁(1985年); Jalkanen, M.ら、J. Cell. Biol.、105巻:3087~3096頁(1987年))。タンパク質の遺伝子発現を検出するために有用な、他の抗体ベースの方法は、酵素免疫測定アッセイ(ELISA)およびラジオイムノアッセイ(RIA)などのイムノアッセイを含む。当技術分野では、適切な抗体アッセイ標識が公知であり、グルコースオキシダーゼなどの酵素標識、ならびにヨウ素(¹²⁵I、¹²¹I、¹³¹I)、炭素(¹⁴C)、硫黄(³⁵S)、トリチウム(³H)、インジウム(¹¹³In)、およびテクネシウム(⁹⁹mTc)などの放射性同位体または他の放射性薬剤、ならびにフルオレセインおよびローダミンなどの蛍光標識、ならびにビオチンを含む。

30

【0171】

生物学的試料中のHLA-Gポリペプチドレベルについてアッセイすることに加えて、HLA-Gポリペプチドレベルはまた、in vivoにおいて、イメージングにより検出することもできる。HLA-Gポリペプチドレベルについてのin vivoイメージングのために、抗HLA-G抗体と共に組み込みうる標識は、X線造影法、NMR、またはESRにより検出可能な標識を含む。X線造影法に適する標識は、バリウムまたはセシウムなどの放射性同位体であって、検出可能な放射線を放出するが、対象に対して明白に有害ではない放射性同位体を含む。NMRおよびESRに適するマーカーは、対象となる³⁵SC、クローネンのための養分を標識することにより、HLA-G抗体へと組み込みうる、重水素など、検出可能な特徴的なスピンを伴うマーカーを含む。

40

【0172】

放射性同位元素(例えば、¹³¹I、¹¹³In、⁹⁹mTc)、放射線不透過物質、または核磁気的共鳴により検出可能な材料など、適切な検出可能なイメージング部分で標識されたHLA-G抗体を、対象へと導入(例えば、非経口、皮下、または腹腔内)する。当技術分野では、対象のサイズと、使用されるイメージングシステムとが、診断画像を作製するのに必要とされるイメージング部分の数量を決定することが理解されるであろう

50

。ヒト対象のための放射性同位元素部分の場合、注射される放射能の量は通常、 ^{99}mTc 約 5 ~ 20 ミリキュリーの範囲となる。次いで、標識された HLA - G 抗体は、特異的な標的ポリペプチドを含有する細胞の場所に、優先的に蓄積されるであろう。例えば、*in vivo* における腫瘍イメージングについては、S. W. Burchielら、*Tumor Imaging: The Radiochemical Detection of Cancer*、13 (1982年) において記載されている。

【0173】

一部の態様では、急速な結合、ならびに細胞への取込みおよび / または緩徐な放出を容易とする構造的修飾を含有する HLA - G 抗体は、*in vivo* イメージング検出法において有用である。一部の態様では、HLA - G 抗体は、急速な結合、ならびに細胞への取込みおよび / または緩徐な放出を容易とするように、抗体の CH2 定常重鎖領域内の欠失を含有する。一部の態様では、Fab 断片を使用して、急速な結合、ならびに細胞への取込みおよび / または緩徐な放出を容易とする。一部の態様では、F(ab)'2 断片を使用して、急速な結合、ならびに細胞への取込みおよび / または緩徐な放出を容易とする。

【0174】

HLA - G 抗体の診断的使用。本明細書で開示される HLA - G 抗体組成物は、診断および予後診断法において有用である。したがって、本開示は、対象における、HLA - G に関連する医学的状態の診断において、本明細書で開示される抗体を使用するための方法を提示する。本明細書で開示される抗体は、それらが、HLA - G ポリペプチドに対して、高レベルのエピトープ結合特異性および高結合アフィニティーを有するように選択することができる。一般に、抗体の結合アフィニティーが高いほど、標的ポリペプチドを除去せずに、非特異的に結合した材料を除去するように、イムノアッセイにおいて、よりストリンジエントな洗浄条件を実施することができる。したがって、診断アッセイにおいて有用な本技術の HLA - G 抗体は通例、少なくとも 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、または 10^{-12} M の結合アフィニティーを有する。ある特定の態様では、診断試薬として使用される HLA - G 抗体は、標準的な条件下、少なくとも 12 時間、少なくとも 5 時間、少なくとも 1 時間、または少なくとも 30 分間で、平衡に達するのに十分な動態会合速度 (kinetic on-rate) を有する。

【0175】

本技術の一部の方法は、抗 HLA - G 抗体のポリクローナル調製物およびポリクローナル抗 HLA - G 抗体の組成物を診断試薬として利用し、他の方法は、モノクローナル単離物を利用する。上記で記載した方法に従い調製されたヒト抗 HLA - G ポリクローナル抗体を利用する方法では、調製物は、HLA - G 抗体、例えば、標的ポリペプチドに対する、異なるエピトープ特異性を伴う抗体の取合せを含有することが典型的である。本開示の抗 HLA - G モノクローナル抗体は、近縁の抗原の存在下または潜在的存在下で、単一の抗原を検出するために有用である。

【0176】

本開示の HLA - G 抗体を、任意の種類の生物学的試料についての診断試薬として使用することができる。一態様では、本明細書で開示される HLA - G 抗体は、ヒト生物学的試料についての診断試薬として有用である。HLA - G 抗体を使用して、様々な標準的アッセイフォーマットで、HLA - G ポリペプチドを検出することができる。このようなフォーマットは、免疫沈降、ウェスタンプロット法、ELISA、ラジオイムノアッセイ、フローサイトメトリー、IHC、および免疫測定アッセイを含む。Harlow および Lane、*Antibodies, A Laboratory Manual*、(Cold Spring Harbor Publications, New York, 1988年)；米国特許第 3,791,932 号；同第 3,839,153 号；同第 3,850,752 号；同第 3,879,262 号；同第 4,034,074 号；同第 3,791,932 号；同第 3,817,837 号；同第 3,839,153 号；同第 3,850,752 号；同第 3,850,578 号；同第 3,853,987 号；同第 3,867,50

17号；同第3, 879, 262号；同第3, 901, 654号；同第3, 935, 074号；同第3, 984, 533号；同第3, 996, 345号；同第4, 034, 074号；および同第4, 098, 876号を参照されたい。生物学的試料は、対象の任意の組織（生検材料を含む）、細胞、または体液から得ることができる。

【0177】

HLA-G抗体の予後診断的使用。本開示はまた、対象に、HLA-Gポリペプチドの発現または活性の増大と関連する医学的疾患または状態を発症する危険性があるのかどうかを決定するための予後診断（または予測）アッセイ（例えば、前がん性細胞の検出）も提示する。このようなアッセイを、予後診断または予測の目的で使用して、これにより、HLA-Gポリペプチドの発現を特徴とするかまたはこれと関連する、医学的疾患または状態の発症の前に、個体を予防的に処置することができる。

10

【0178】

本開示の別の態様は、対象におけるHLA-Gの発現を決定して、これにより、この対象に適切な治療用または予防用化合物を選択するための方法を提示する。

【0179】

代替的に、予後診断アッセイを活用して、発生中のがんおよび／または充実性腫瘍、例えば、甲状腺がんを有するか、またはこれらを発症する危険性がある対象を同定することができる。したがって、本開示は、HLA-Gポリペプチドの発現レベルの上昇と関連する疾患または状態を同定するための方法であって、被験試料を対象から得、HLA-Gポリペプチドを検出し、ここで、HLA-Gポリペプチドのレベルの、対照試料と比較した上昇の存在により、HLA-Gポリペプチドの発現レベルの上昇と関連する疾患または状態を有するか、またはこれらを発症する危険性がある対象が予測される方法を提示する。一部の態様では、HLA-Gポリペプチドの発現レベルの上昇と関連する疾患または状態は、発生中のがんおよび／または充実性腫瘍からなる群より選択される。

20

【0180】

別の態様では、本開示は、対象を、HLA-Gポリペプチド発現の増大と関連する障害または状態のための化合物で有効に処置しうるのかどうかを決定するための方法であって、生物学的試料を対象から得、HLA-G抗体を使用して、HLA-Gポリペプチドを検出する方法を提示する。対象から得られる生物学的試料中の、HLA-Gポリペプチドの発現レベルを決定し、無病である対象から得られる生物学的試料中で見出されるHLA-Gの発現レベルと比較する。疾患または状態を有することが疑われる対象から得られた試料中のHLA-Gポリペプチドレベルの、健常対象から得られた試料と比較した上昇は、被験対象における、HLA-G関連疾患または状態を示す。

30

【0181】

HLA-Gポリペプチドの発現レベルの上昇により、疾患を伴う対象が、特定の種類の治療または処置に応答する可能性が高いのかどうかが示されることが公知である疾患状態は、いくつか存在する。したがって、生物学的試料中のHLA-Gポリペプチドを検出する方法を、例えば、対象が、治療または処置に応答する可能性について評価する予後診断法として使用することができる。対象に由来する適切な組織または体液試料中のHLA-Gポリペプチドレベルを決定し、適切な対照、例えば、同じ疾患を伴うが、処置に対して良好に応答した対象におけるレベルと比較する。

40

【0182】

一態様では、本開示は、薬剤（例えば、薬物、化合物、または低分子）の、HLA-Gポリペプチドの発現に対する影響をモニタリングする方法を提示する。このようなアッセイは、基礎的な薬物スクリーニングおよび臨床試験において適用することができる。例えば、薬剤がHLA-Gポリペプチドレベルを低下させる有効性は、HLA-Gの発現の増大を呈する対象、例えば、がんと診断された患者についての臨床試験においてモニタリングすることができる。HLA-Gポリペプチドの発現に影響を及ぼす薬剤は、薬剤を投与し、応答を観察することにより同定することができる。このようにして、HLA-Gポリペプチドの発現パターンを、対象の、薬剤への生理学的応答を示す、マーカーとして用い

50

ることができる。したがって、この応答状態は、対象の、薬剤による処置の前、およびこの間の多様な時点において決定することができる。

【0183】

本開示のさらなる態様は、患者が、H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いのか、高くないのかを決定するための方法に関する。具体的な実施形態では、この方法は、患者から単離された腫瘍試料を、有効量のH L A - G 抗体と接触させるステップと、腫瘍試料に結合した任意の抗体の存在を検出するステップとを含む。さらなる実施形態では、腫瘍試料に結合した抗体の存在は、患者が、H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いことを指し示し、腫瘍試料に結合した抗体の非存在は、患者が、H L A - G 療法に応答する可能性が高くないことを指し示す。一部の実施形態では、方法は、有効量のH L A - G C A R 療法を、H L A - G C A R 療法に応答する可能性が高いと決定された患者へと投与する、さらなるステップを含む。

10

【0184】

I V . キット

本明細書で明示される通り、本開示は、H L A - G の発現レベルを決定するための診断法を提示する。特定の一態様では、本開示は、これらの方法を実施するためのキットのほか、組織を回収し、かつ／またはスクリーニングを実施し、かつ／または結果を解析することなど、本開示の方法を実行するための指示も提示する。

【0185】

キットは、本明細書で開示されるH L A - G 抗体組成物（例えば、モノクローナル抗体）と、使用のための指示とを含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる。キットは、例えば、痰、血清、血漿、リンパ、囊胞液、尿、糞便、脳脊髄液、腹水、または血液を含むがこれらに限定されない、例えば、任意の体液であり、身体組織についての生検試料を含む生物学的試料中のH L A - G ポリペプチドの存在を検出するために有用である。被験試料はまた、腫瘍細胞、腫瘍に隣接する正常細胞、腫瘍組織型に対応する正常細胞、血液細胞、末梢血リンパ球、またはこれらの組合せでもありうる。上記で記載した方法で使用される被験試料は、アッセイフォーマットと、検出法の性格と、アッセイされる試料として使用される、組織、細胞、または抽出物とに基づき変化するであろう。当技術分野では、細胞のタンパク質抽出物または膜抽出物を調製するための方法が公知であり、活用されるシステムと適合性の試料を得るために、たやすく適応させることができる。

20

【0186】

一部の態様では、キットは、生物学的試料中のH L A - G ポリペプチドに結合することが可能な、1または複数のH L A - G 抗体（例えば、H L A - G 抗体である、3 H 1 1 またはH L A - G 4 E 3と同じ抗原結合特異性を有する抗体またはその抗原結合性断片）と；試料中のH L A - G ポリペプチドの量を決定するための手段と；試料中のH L A - G ポリペプチドの量を、標準物質と比較するための手段とを含みうる。H L A - G 抗体のうちの1または複数は、標識することができる。キットの構成要素（例えば、試薬）は、適切な容器内にパッケージングすることができる。キットは、キットを使用して、H L A - G ポリペプチドを検出するための指示をさらに含みうる。ある特定の態様では、キットは、1) 例えば、固体支持体へと接合させた第1の抗体であって、H L A - G ポリペプチドに結合する第1の抗体と；任意選択で；2) H L A - G ポリペプチドまたは第1の抗体に結合し、検出可能な標識へとコンジュゲートさせた異なる第2の抗体とを含む。

30

【0187】

キットはまた、例えば、緩衝剤、保存剤またはタンパク質安定化剤も含みうる。キットは、検出可能な標識を検出するために必要な構成要素、例えば、酵素または基質をさらに含みうる。キットはまた、アッセイし、被験試料と比較しうる、1つの対照試料または対照試料のシリーズも含有しうる。キットの各構成要素は、個別の容器内に封入することができ、多様な容器の全ては、キットを使用して実施されるアッセイの結果を解釈するための指示と共に、単一のパッケージ内にあってよい。本開示のキットは、キットの容器上ま

40

50

たは容器内に書面を含有しうる。書面は、キット内に含有される試薬を、どのようにして使用するのかについて記載する。

【0188】

適宜、これらの示唆されるキットの構成要素は、当業者による使用に好都合なように、パッケージングすることができる。例えば、これらの示唆されるキットの構成要素は、溶液中または液体分散物などとして提供することができる。

【0189】

V. 担体

抗体はまた、多くの異なる担体に結合させることもできる。したがって、本開示はまた、抗体と、活性または不活性の、別の物質とを含有する組成物も提示する。周知の担体の例は、ガラス、ポリスチレン、ポリプロピレン、ポリエチレン、デキストラン、ナイロン、アミラーゼ、天然および修飾セルロース、ポリアクリルアミド、アガロース、およびマグネタイトを含む。本開示の目的では、担体の性格は、可溶性の場合もあり、不溶性の場合もある。当業者は、結合性抗体に適する他の担体について知っているか、または慣例的な実験を使用して、このような担体を確認することができるであろう。

10

【0190】

キメラ抗原受容体およびそれらの使用

I. 組成物

本開示は、細胞外、膜貫通および細胞内ドメインを含む細胞活性化部分を含むか、またはこれらから本質的になる H L A - G に結合するキメラ抗原受容体 (C A R) を提示する。細胞外ドメインは、他に抗原結合性ドメインと称する、標的特異的な結合性エレメントを含む。細胞内ドメインまたは細胞質ドメインは、共刺激性シグナル伝達領域およびゼータ鎖部分を含む。 C A R は、任意選択で、最大で 3 0 0 アミノ酸、好ましくは 1 0 ~ 1 0 0 アミノ酸、より好ましくは 2 5 ~ 5 0 アミノ酸のスペーサードメインをさらに含みうる。

20

【0191】

抗原結合性ドメイン。ある特定の態様では、本開示は、 H L A - G に特異的な抗原結合性ドメインを含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおこれからなる C A R を提示する。一部の実施形態では、抗原結合性ドメインは、抗 H L A - G 抗体の抗原結合性ドメインを含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおこれからなる。さらなる実施形態では、抗 H L A - G 抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、抗 H L A - G 抗体の抗原結合性ドメインを含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおこれからなる。

30

【0192】

一部の実施形態では、抗体の重鎖可変領域は、配列番号 7 ~ 1 0 またはそれらの各々の同等物を含むか、またはこれらから本質的になるか、またはこれらからなり、かつ／あるいは配列番号 1 ~ 6 またはそれらの各々の同等物を含む、1 または複数の C D R 領域を含む。一部の実施形態では、抗体の軽鎖可変領域は、配列番号 1 7 ~ 2 0 またはそれらの各々の同等物を含むか、またはこれらから本質的になるか、またはこれらからなり、かつ／あるいは配列番号 1 1 ~ 1 6 またはそれらの各々の同等物を含む、1 または複数の C D R 領域を含む。

40

【0193】

膜貫通ドメイン。膜貫通ドメインは、天然の供給源から導出することもでき、合成の供給源から導出することもできる。供給源が、天然である場合、ドメインは、任意の膜結合タンパク質または膜貫通タンパク質に由来しうる。本開示で特に使用される膜貫通領域は、 C D 8 、 C D 2 8 、 C D 3 、 C D 4 5 、 C D 4 、 C D 5 、 C D 5 、 C D 9 、 C D 1 6 、 C D 2 2 、 C D 3 3 、 C D 3 7 、 C D 6 4 、 C D 8 0 、 C D 8 6 、 C D 1 3 4 、 C D 1 3 7 、 C D 1 5 4 、 T C R に由来しうる。代替的に、膜貫通ドメインは、合成であることが可能であり、この場合、膜貫通ドメインは主に、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含むであろう。フェニルアラニン、トリプトファン、およびバリンの三残基の組 (t r

50

plete) が、合成の膜貫通ドメインの各末端において見出されることが好ましい。任意選択で、好ましくは、2~10アミノ酸の間の長さの、短鎖オリゴペプチドリンカー、またはポリペプチドリンカーは、CARの膜貫通ドメインと、細胞質シグナル伝達ドメインとの連結を形成しうる。グリシン-セリンの二残基の組(doublet)は、特に適切なリンカーをもたらす。

【0194】

細胞質ドメイン。CARの細胞質ドメインまたは細胞内シグナル伝達ドメインは、CARが配置された免疫細胞の、従来のエフェクター機能のうちの少なくとも1つの活性化を担う。細胞内シグナル伝達ドメインとは、エフェクター機能シグナルを伝達し、免疫細胞を、その特異的機能を果たすように導く、タンパク質の部分を指す。シグナル伝達ドメインの全体を使用することもでき、切断部分が、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分である限りにおいて、その切断部分を使用することもできる。TCRおよび共受容体のほか、それらの誘導体または改变体の細胞質配列は、CARにおける使用のための細胞内シグナル伝達ドメインとして機能しうる。本開示で特に使用される細胞内シグナル伝達ドメインは、FcR、TCR、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD66dに由来しうる。TCRを介して発生するシグナルは、単独では、T細胞の完全な活性化には不十分であるので、二次または共刺激性シグナルもまた、要求されうる。したがって、CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、リンパ球機能関連抗原1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、またはCD83に特異的に結合するリガンドを含むがこれらに限定されない共刺激性シグナル伝達分子の細胞内領域もまた、CARの細胞質ドメインに組み入れることができる。

【0195】

一部の実施形態では、キメラ抗原受容体の細胞活性化部分は、CD8タンパク質、CD28タンパク質、4-1BBタンパク質、およびCD3-ゼータタンパク質からなる群より選択される、1または複数のタンパク質またはそれらの断片を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる、T細胞シグナル伝達ドメインである。

【0196】

具体的な実施形態では、CARは、抗HLA-G抗体の抗原結合性ドメイン、CD8ヒンジドメイン、CD8膜貫通ドメイン、共刺激性シグナル伝達領域、およびCD3ゼータシグナル伝達ドメインを含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおこれらからなる。さらなる実施形態では、共刺激性シグナル伝達領域は、CD28共刺激性シグナル伝達領域および4-1BB共刺激性シグナル伝達領域の一方または両方を含む。

【0197】

一部の実施形態では、CARは、検出可能なマーカーまたは精製マーカーをさらに含みうる。

【0198】

I I . CARを調製するための工程

本明細書ではまた、HLA-G CAR発現細胞を作製する方法であって、(i) 単離細胞の集団に、本明細書で記載されるCARをコードする核酸配列を形質導入するステップと；(ii)ステップ(i)の前記核酸配列の形質導入に成功した、前記単離細胞の亜集団を選択し、これにより、HLA-G CAR発現細胞を作製するステップとを含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにこれらからなる方法も提示される。一態様では、単離細胞は、T細胞およびNK細胞からなる群より選択される。

【0199】

本開示の態様は、HLA-G CARを含む単離細胞と、このような細胞を作製する方法とに関する。細胞は、原核細胞または真核細胞である。一態様では、細胞は、T細胞またはNK細胞である。真核細胞は、任意の好ましい種に由来することが可能であり、例え

10

20

30

40

50

ば、動物細胞、ヒト、ネコ科動物、またはイヌ科動物細胞などの哺乳動物細胞でありうる。

【0200】

具体的な実施形態では、単離細胞は、抗 H L A - G 抗体の抗原結合性ドメイン、C D 8 ピンジドメイン、C D 8 膜貫通ドメイン、C D 2 8 共刺激性シグナル伝達領域および/または4 - 1 B B 共刺激性シグナル伝達領域、ならびにC D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらこれらからなる外因性C A R を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらこれからなる。ある特定の実施形態では、単離細胞は、T 細胞、例えば、動物T 細胞、哺乳動物T 細胞、ネコ科動物T 細胞、イヌ科動物T 細胞、またはヒトT 細胞である。ある特定の実施形態では、単離細胞は、N K 細胞、例えば、動物N K 細胞、哺乳動物N K 細胞、ネコ科動物N K 細胞、イヌ科動物N K 細胞、またはヒトN K 細胞である。

【0201】

ある特定の実施形態では、H L A - G C A R 発現細胞を作製する方法であって、(i) 単離細胞の集団に、H L A - G C A R をコードする核酸配列を形質導入するステップと；(i i) ステップ(i) の前記核酸配列を形質導入することに成功した、細胞の亜集団を選択するステップとを含むか、または代替的にこれらから本質的になる方法が開示される。一部の実施形態では、単離細胞は、T 細胞、動物T 細胞、哺乳動物T 紵胞、ネコ科動物T 細胞、イヌ科動物T 細胞またはヒトT 細胞であり、これにより、H L A - G C A R T 細胞を作製する。ある特定の実施形態では、単離細胞は、N K 細胞、例えば、動物N K 細胞、哺乳動物N K 細胞、ネコ科動物N K 細胞、イヌ科動物N K 細胞、またはヒトN K 細胞であり、これにより、H L A - G C A R N K 細胞を作製する。

【0202】

単離細胞の供給源。本明細書で開示される細胞の拡大および遺伝子改変の前に、細胞を、対象(例えば、自家療法を伴う実施形態における) から得ることもでき、市販の培養物から得ることもできる。

【0203】

細胞は、対象におけるいくつかの供給源であって、末梢血单核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位に由来する組織、腹水、胸水、脾臓組織、および腫瘍を含む供給源から得ることができる。

【0204】

当技術分野では、対象となる細胞を単離する方法が周知であり、本出願にたやすく適応させることができ；例示的な方法については、下記の実施例で記載する。本開示と関連する使用のための単離法は、L i f e T e c h n o l o g i e s D y n a b e a d s (登録商標) システム；S T E M c e l l T e c h n o l o g i e s E a s y S e p (商標) 、R o b o S e p (商標) 、R o s e t t e S e p (商標) 、S e p M a t e (商標) ；M i l t e n y i B i o t e c M A C S (商標) 細胞分離キット、ならびに他の市販の細胞分離および単離キットを含むがこれらに限定されない。免疫細胞の特定の亜集団は、ビーズまたはこのようなキットで利用可能な他の結合剤であって、固有の細胞表面マーカーに特異的なビーズまたは結合剤を使用することにより単離することができる。例えば、M A C S (商標) C D 4 + およびC D 8 + M i c r o B e a d s を使用して、C D 4 + およびC D 8 + T 細胞を単離することができる。

【0205】

代替的に、細胞は、T 細胞については、細胞株である、B C L 2 (A A A) J u r k a t (A T C C (登録商標) C R L - 2 9 0 2 (商標)) 、B C L 2 (S 7 0 A) J u r k a t (A T C C (登録商標) C R L - 2 9 0 0 (商標)) 、B C L 2 (S 8 7 A) J u r k a t (A T C C (登録商標) C R L - 2 9 0 1 (商標)) 、B C L 2 J u r k a t (A T C C (登録商標) C R L - 2 8 9 9 (商標)) 、N e o J u r k a t (A T C C (登録商標) C R L - 2 8 9 8 (商標)) を含むがこれらに限定されず；N K 細胞については、細胞株である、N K - 9 2 (A T C C (登録商標) C R L - 2 4 0 7 (商標)) 、N

10

20

30

40

50

K - 9 2 M I (A T C C (登録商標) C R L - 2 4 0 8 (商標)) を含むがこれらに限定されない、市販の細胞培養物を介して得ることができる。

【 0 2 0 6 】

ベクター。C A R は、ベクターを使用して調製することができる。本開示の態様は、H L A - G C A R をコードする単離核酸配列と、C A R をコードする単離核酸配列およびその相補体ならびにそれらの各々の同等物を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにはこれらからなるベクターとに関する。

【 0 2 0 7 】

一部の実施形態では、単離核酸配列は、抗H L A - G 抗体の抗原結合性ドメイン、C D 8 ヒンジドメイン、C D 8 膜貫通ドメイン、C D 2 8 共刺激性シグナル伝達領域および/または4 - 1 B B 共刺激性シグナル伝達領域、ならびにC D 3 ゼータシグナル伝達ドメインを含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにはこれらからなるC A R をコードする。具体的な実施形態では、単離核酸配列は、(a) 抗H L A - G 抗体の抗原結合性ドメインに続き、(b) C D 8 ヒンジドメイン、(c) C D 8 膜貫通ドメインに続き、(d) C D 2 8 共刺激性シグナル伝達領域および/または4 - 1 B B 共刺激性シグナル伝達領域に続き、(e) C D 3 ゼータシグナル伝達ドメインをコードする配列を含むか、または代替的にこれらから本質的になるか、またはなおさらにはこれらからなる。

【 0 2 0 8 】

一部の実施形態では、単離核酸配列は、抗H L A - G 抗体の抗原結合性ドメインをコードする配列の上流におけるK o z a k コンセンサス配列を含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにはこれらからなる。一部の実施形態では、単離核酸は、抗生物質耐性を付与するポリヌクレオチドを含む。

【 0 2 0 9 】

一部の実施形態では、単離核酸配列は、ベクター内に含まれる。ある特定の実施形態では、ベクターは、プラスミドである。他の実施形態では、ベクターは、ウイルスベクターである。具体的な実施形態では、ベクターは、レンチウイルスベクターである。

【 0 2 1 0 】

例示的なベクターの調製および前記ベクターを使用するC A R 発現細胞の作出については、下記の実施例で詳細に論じる。まとめると、天然または合成の、C A R をコードする核酸の発現は、C A R ポリペプチドまたはその部分をコードする核酸を、プロモーターへと作動可能に連結し、構築物を、発現ベクターへと組み込むことにより達成することが典型的である。ベクターは、真核細胞における複製および組込みに適しうる。当技術分野では、ベクターおよび/または外因性核酸を含む細胞を作製するための方法が周知である。例えば、S a m b r o o k ら (2 0 0 1 年、M o l e c u l a r C l o n i n g : A L a b o r a t o r y M a n u a l 、C o l d S p r i n g H a r b o r L a b o r a t o r y 、N e w Y o r k) を参照されたい。

【 0 2 1 1 】

一態様では、「ベクター」という用語は、非分裂細胞および/または緩徐に分裂する細胞に、感染および形質導入し、標的細胞のゲノムへと組み込む能力を保持する組換えベクターを意図する。いくつかの態様では、ベクターは、野生型ウイルスに由来するか、またはこれに基づく。さらなる態様では、ベクターは、野生型レンチウイルスに由来するか、またはこれに基づく。このようなベクターの例は、限定せずに述べると、ヒト免疫不全症ウイルス (H I V) 、ウマ伝染性貧血ウイルス (E I A V) 、サル免疫不全症ウイルス (S I V) 、およびネコ免疫不全症ウイルス (F I V) を含む。代替的に、マウス白血病ウイルス (M L V) など、他のレトロウイルスを、ベクター骨格のためのベースとして使用しうることも想定される。本開示に従うウイルスベクターが、特定のウイルスの構成要素に必ずしも制約されることは明らかであろう。ウイルスベクターは、2つまたはこれを超える、異なるウイルスに由来する構成要素を含むことが可能であり、また、合成の構成要素も含みうる。ベクターの構成要素を操作して、標的細胞への特異性など、所望の特徴

10

20

30

40

50

を得ることができる。

【0212】

本開示の組換えベクターは、靈長動物および非靈長動物に由来する。靈長動物レンチウイルスの例は、ヒト後天性免疫不全症候群（AIDS）の原因作用物質である、ヒト免疫不全症ウイルス（HIV）、およびサル免疫不全症ウイルス（SIV）を含む。非靈長動物のレンチウイルス群は、原型的な「遅発性ウイルス」である、ビスナ／マエディウイルス（VMV）のほか、類縁の、ヤギ関節炎脳炎ウイルス（CAEV）、ウマ伝染性貧血ウイルス（EIAV）、ならびに、より近年になって記載された、ネコ免疫不全症ウイルス（FIV）およびウシ免疫不全症ウイルス（BIV）を含む。当技術分野では、先行技術による組換えレンチウイルスベクターが公知であり、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、米国特許第6,924,123号；同第7,056,699号；同第7,07,993号；同第7,419,829号；および同第7,442,551号を参照されたい。

【0213】

米国特許第6,924,123号は、ある特定のレトロウイルス配列が、標的細胞ゲノムへの組込みを容易とすることについて開示する。この特許は、各レトロウイルスゲノムがgag、pol、およびenvと呼ばれる遺伝子であって、ビリオンタンパク質および酵素をコードする遺伝子を含むことについて教示する。これらの遺伝子は、両方の末端において、末端反復（LTR）と呼ばれる領域で挟まれている。LTRは、プロウイルスの組込みおよび転写を担う。LTRはまた、エンハンサー-プロモーター配列としても用いられる。言い換えると、LTRは、ウイルス遺伝子の発現を制御しうる。レトロウイルスRNAによるカプシド形成は、ウイルスゲノムの5'末端に配置されたプロサイ配列により生じる。LTR自体は、U3、R、およびU5と呼ばれる3つのエレメントに分けうる、同一な配列である。U3は、RNAの3'末端に固有の配列に由来する。Rは、RNAの両方の末端において反復される配列に由来し、U5は、RNAの5'末端に固有の配列に由来する。3つのエレメントのサイズは、異なるレトロウイルスの間で大幅に変動しうる。ウイルスゲノムでは、ポリ（A）付加部位（終結）は、右側のLTR内のRとU5との間の境界にある。U3は、細胞性タンパク質と、場合によって、ウイルス転写活性化タンパク質とに応答性の、プロモーター配列および複数のエンハンサー配列を含む、プロウイルスの転写制御エレメントの大半を含有する。

【0214】

構造遺伝子である、gag、pol、およびenv自体に関しては、gagは、ウイルスの内部構造タンパク質をコードする。gagタンパク質は、タンパク質分解により、成熟タンパク質MA（マトリックス）、CA（カプシド）、およびNC（ヌクレオカプシド）へとプロセシングされる。pol遺伝子は、ゲノムの複製を媒介するDNAポリメラーゼ、関連するRNase Hおよびインテグラーゼ（IN）を含有する逆転写酵素（RT）をコードする。

【0215】

ウイルスベクター粒子を作製するためには、ベクターのRNAゲノムを、宿主細胞内で、それをコードするDNA構築物から発現させる。ベクターゲノムによりコードされない粒子の構成要素は、宿主細胞内で発現する、さらなる核酸配列（通例、gag / pol遺伝子およびenv遺伝子の一方または両方を含む「パッケージング系」）により、トランスでもたらされる。ウイルスベクター粒子の作製のために要求される配列のセットは、一過性トランスフェクションにより宿主細胞へと導入することもでき、宿主細胞ゲノムへと組み込むこともでき、諸方法を組み合わせた形でもたらすこともできる。当業者には、関与する技法が公知である。

【0216】

本開示における使用のためのレトロウイルスベクターは、Lentigen Corp. 製の、InvitrogenのpLentiシリーズ、version 4、6、および6.2の「ViraPower」系；City of Hope Research

10

20

30

40

50

Instituteの研究室で作出され、使用されているpHIV-7-GFP; Clontech製の「Lenti-X」レンチウイルスベクターである、pLVX; Sigma-Aldrich製のpLKO.1-puro; Open Biosystems製のpLemir; およびCharite Medical School, Institute of Virology (CBF), Berlin, Germanyの研究室で作出され、使用されているpLVを含むがこれらに限定されない。

【0217】

外因性核酸を、宿主細胞へと導入するか、または、そうではなく、細胞を、本開示の阻害剤へと曝露するのに使用される方法に関わらず、宿主細胞内の組換えDNA配列の存在を確認するために、様々なアッセイを実施することができる。このようなアッセイは、例えば、サザンおよびノーザンプロット法、RT-PCRならびにPCRなど、当業者に周知の「分子生物学」アッセイ；例えば、免疫学的手段（ELISAおよびウェスタンプロット）または本明細書で記載されるアッセイにより、特定のペプチドの存在または非存在を検出して、本開示の範囲内に収まる薬剤を同定するアッセイなどの「生化学」アッセイを含む。

【0218】

パッケージングベクターおよび細胞株。CARは、パッケージングベクターおよび細胞株を使用することにより、レトロウイルスパッケージング系へとパッケージングすることができる。パッケージングプラスミドは、レトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、アデノウイルスベクター、およびアデノ随伴ウイルスベクターを含むがこれらに限定されない。パッケージングベクターは、遺伝子物質の、細胞への送達を容易とするエレメントおよび配列を含有する。例えば、レトロウイルス構築物は、複製能力のないレトロウイルスベクターをパッケージングするのに要求される全てのビリオンタンパク質をトランスでコードする、複製能力のないレトロウイルスゲノムに由来する、少なくとも1つのレトロウイルスヘルパーDNA配列を含む、パッケージングプラスミドであり、複製能力のあるヘルパーウィルスの產生を伴わずに、高力価で、複製能力のないレトロウイルスベクターをパッケージングすることが可能なビリオンタンパク質を作製するためのレトロウイルス構築物である。レトロウイルスDNA配列は、ウイルス5'LTRの、天然のエンハンサーおよび/またはプロモーターをコードする領域を欠き、ヘルパーゲノムをパッケージングする一因となるブサイ機能配列、および3'LTRの両方を欠くが、外来のポリアデニル化部位、例えば、SV40ポリアデニル化部位と、ウイルスの產生が所望される細胞型内の効率的な転写を導く外来のエンハンサーおよび/またはプロモーターとをコードする。レトロウイルスは、モロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)、ヒト免疫不全症ウイルス(HIV)、またはテナガザル白血病ウイルス(GALV)などの白血病ウイルスである。外来のエンハンサーおよびプロモーターは、ヒトサイトメガロウイルス(HCMV)最初期(IE)エンハンサーおよびプロモーター、モロニーマウス肉腫ウイルス(MMSV)のエンハンサーおよびプロモーター(U3領域)、ラウス肉腫ウイルス(RSV)のU3領域、脾臓病巣形成ウイルス(Spleen Focus Forming Virus)(SFFV)のU3領域、または天然のモロニーマウス白血病ウイルス(MMLV)プロモーターへと接続されたHCMV IEエンハンサーでありうる。レトロウイルスパッケージングプラスミドは、プラスミドベースの発現ベクターによりコードされる、2つのレトロウイルスヘルパーDNA配列からなることが可能であり、この場合、例えば、第1のヘルパー配列は、同種指向性(ecotropic)であるMMLVまたはGALVのgagおよびpolタンパク質をコードするcDNAを含有し、第2のヘルパー配列は、envタンパク質をコードするcDNAを含有する。宿主範囲を決定するenv遺伝子は、異種指向性(xenotropic)、両種指向性(amphotropic)、同種指向性、多種指向性(polytropic)(ミンク病巣形成)、もしくは10A1マウス白血病ウイルスenvタンパク質、またはテナガザル白血病ウイルス(GALV)envタンパク質、ヒト免疫不全症ウイルスenv(gp160)タンパク質、水疱性口内炎ウイルス(VSV)Gタンパク質、ヒトI型およびII型T細胞白血病(

10

20

30

40

50

H T L V) e n v 遺伝子産物をコードする遺伝子、前述の e n v 遺伝子のうちの 1 もしくは複数の組合せに由来するキメラエンベロープ遺伝子、または前述の e n v 遺伝子生成物の細胞質ドメインおよび膜貫通ドメインをコードするキメラエンベロープ遺伝子、および所望の標的細胞上の特異的表面分子を指向するモノクローナル抗体に由来しうる。

【 0 2 1 9 】

パッケージング工程では、パッケージングプラスミドと、L H R を発現させるレトロウイルスベクターとを、ヒト胎児性腎細胞、例えば、2 9 3 細胞 (A T C C 番号 : C R L 1 5 7 3 、 A T C C 、 R o c k v i l l e 、 M d .) など、ウイルスを産生することが可能な、哺乳動物細胞の第 1 の集団へと一過性に共トランسفエクトして、高力価の組換えレトロウイルス含有上清を作製する。本発明の別の方法では、次いで、この、一過性にトランسفエクトされた細胞の第 1 の集団を、哺乳動物の標的細胞、例えば、ヒトリンパ球と共に培養して、標的細胞に、外来遺伝子を、高効率で形質導入する。本発明のさらに別の方法では、上記で記載した一過性にトランسفエクトされた細胞の第 1 の集団に由来する上清を、哺乳動物の標的細胞、例えば、ヒトリンパ球または造血幹細胞とインキュベートして、標的細胞に、外来遺伝子を、高効率で形質導入する。

【 0 2 2 0 】

別の態様では、パッケージングプラスミドを、ヒト胎児性腎細胞、例えば、2 9 3 細胞など、ウイルスを産生することが可能な、哺乳動物細胞の第 1 の集団内で安定的に発現させる。レトロウイルスまたはレンチウイルスベクターは、選択可能なマーカーによる共トランسفエクションまたは偽型ウイルスの感染により、細胞へと導入する。いずれの場合にも、ベクターは、組み込まれる。代替的に、ベクターは、エピソームで維持されたプラスミドに導入することができる。高力価の組換えレトロウイルス含有上清が作製される。

【 0 2 2 1 】

T 細胞の活性化および拡大：所望の C A R を発現させる T 細胞の遺伝子的改変の前であれ、後であれ、細胞は、米国特許第 6 , 3 5 2 , 6 9 4 号；同第 6 , 5 3 4 , 0 5 5 号；同第 6 , 9 0 5 , 6 8 0 号；同第 6 , 6 9 2 , 9 6 4 号；同第 5 , 8 5 8 , 3 5 8 号；同第 6 , 8 8 7 , 4 6 6 号；同第 6 , 9 0 5 , 6 8 1 号；同第 7 , 1 4 4 , 5 7 5 号；同第 7 , 0 6 7 , 3 1 8 号；同第 7 , 1 7 2 , 8 6 9 号；同第 7 , 2 3 2 , 5 6 6 号；同第 7 , 1 7 5 , 8 4 3 号；同第 5 , 8 8 3 , 2 2 3 号；同第 6 , 9 0 5 , 8 7 4 号；同第 6 , 7 9 7 , 5 1 4 号；同第 6 , 8 6 7 , 0 4 1 号において記載されている方法など、一般に公知の方法を使用して、活性化させ、拡大することができる。e x v i v o における H L A - G 抗原による刺激は、選択された C A R を発現させる細胞亜集団を活性化させ、拡大することができる。代替的に、細胞は、H L A - G 抗原との相互作用により、i n v i v o において活性化させることができる。

【 0 2 2 2 】

当技術分野では、対象となる細胞を活性化させる方法が周知であり、本出願にたやすく適応させることができ；例示的な方法については、下記の実施例で記載する。本開示と関連する使用のための単離法は、L i f e T e c h n o l o g i e s D y n a b e a d s (登録商標) システム活性化および拡大キット；B D B i o s c i e n c e s P h o s f l o w (商標) 活性化キット、M i l t e n y i B i o t e c M A C S (商標) 活性化 / 拡大キット、および対象となる細胞の活性化部分に特異的な、他の市販の細胞キットを含むがこれらに限定されない。免疫細胞の特定の亜集団は、ビーズまたはこのようなキットにおいて利用可能な他の薬剤を使用することにより活性化させるかまたは拡大することができる。例えば、- C D 3 / - C D 2 8 D y n a b e a d s (登録商標) を使用して、単離 T 細胞の集団を活性化させ、拡大することができる。

【 0 2 2 3 】

I I I . 使用法

治療的適用。本開示の方法態様は、それを必要とする対象における腫瘍の増殖を阻害し、かつ / またはそれを必要とするがん患者を処置するための方法に関する。一部の実施形態では、腫瘍は、充実性腫瘍である。一部の実施形態では、腫瘍 / がんは、甲状腺腫瘍 /

10

20

30

40

50

甲状腺がん、乳房の腫瘍／乳がん、卵巣腫瘍／卵巣がん、または前立腺腫瘍／前立腺がんである。一部の実施形態では、腫瘍またはがんは、H L A - G を発現または過剰発現させる。ある特定の実施形態では、これらの方法は、対象または患者へと、有効量の単離細胞を投与するステップを含むか、または代替的にこれから本質的になるか、またはなおさらにはこれからなる。さらなる実施形態では、この単離細胞は、H L A - G C A R を含む。なおさらなる実施形態では、単離細胞は、T 細胞またはN K 細胞である。一部の実施形態では、単離細胞は、処置される対象または患者に対して自家である。さらなる態様では、腫瘍は、H L A - G 抗原を発現させ、対象は、本明細書で記載される診断法などの診断法により、治療のために選択されている。

【 0 2 2 4 】

10

本明細書で開示されるC A R 細胞は、単独で投与することもでき、希釈剤、公知の抗がん治療剤、および／またはサイトカインもしくは免疫刺激性である他の細胞集団など、他の構成要素と組み合わせて投与することもできる。これらは、第1選択治療、第2選択治療、第3選択治療、またはさらなる治療として投与することができる。さらなる治療の非限定的な例は、化学療法剤または生物学的薬剤を含む。適切な処置レジメンは、主治医または主治獣医が決定する。

【 0 2 2 5 】

本発明の医薬組成物は、処置または防止される疾患に適切な形で投与することができる。投与の数量および頻度は、患者の状態、ならびに患者の疾患の種類および重症度などの因子により決定されるが、適切な投与量は、臨床試験により決定することができる。

20

【 0 2 2 6 】

I V . 担体

本発明のさらなる態様は、担体と、本明細書で開示される実施形態において記載される生成物（例えば、H L A - G C A R を含む単離細胞、任意の抗H L A - G 抗体またはC A R 細胞のための単離核酸、ベクター、単離細胞、抗H L A - G ）のうちの1または複数とを含む組成物に関する。

【 0 2 2 7 】

略述すると、特許請求される組成物のうちのいずれか1つを含むがこれに限定されない、本発明の医薬組成物は、1または複数の、薬学的または生理学的に許容される担体、希釈剤、または賦形剤と組み合わせた、本明細書で記載される標的細胞集団を含みうる。このような組成物は、中性緩衝食塩水、リン酸緩衝食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロースまたはデキストラン、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチドまたはグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；E D T A またはグルタチオンなどのキレート剤；アジュバント（例えば、水酸化アルミニウム）；および保存剤を含みうる。本開示の組成物は、経口、静脈内、局所、経腸、および／または非経口投与のために製剤化することができる。ある特定の実施形態では、本開示の組成物を、静脈内投与のために製剤化する。

30

【 0 2 2 8 】

細胞または組成物の投与は、単回用量で行うこともでき、処置の過程を通して、連続的に行なうこともでき、間欠的に行なうこともできる。最も有効な投与手段および投与量を決定する方法は、当業者に公知であり、治療のために使用される組成物、治療目的、および処置される対象と共に変動するであろう。主治医が選択する用量レベルおよびパターンにより、単回投与を実行することもでき、複数回投与を実行することもできる。当技術分野では、適切な投与製剤および薬剤を投与する方法が公知である。さらなる態様では、本発明の細胞および組成物を、他の処置と組み合わせて投与することができる。

40

【 0 2 2 9 】

当技術分野で公知であり、例えば、P C T / U S 2 0 1 1 / 0 6 4 1 9 1 において記載されている方法を使用して、細胞および細胞集団を、宿主へと投与する。本発明の細胞または組成物のこの投与は、実験的およびスクリーニングアッセイのための、所望の疾患、障害、または状態についての動物モデルを作出するために行なうことができる。

50

【0230】

以下の例は、本開示を実行に移す、多様な場合に使用しうる手順を例示する。

【実施例】

【0231】

(実施例1 - マウス抗ヒトHLA-Gモノクローナル抗体の作出)

抗原

HLAクラスI組織適合性抗原のアルファ鎖G抗原は、MybiosoSource.com (型番: MBS717410) から購入した。これは、細菌内で作られた組換えタンパク質であり、HISタグ、50KDの分子量(90%純度)、およびGSHSHSMRYFS
A A V S R P G R G E P R F I A M G Y V D D T Q F V R F D S D S A C P R M
E P R A P W V E Q E G P E Y W E E E T R N T K A H A Q T D R M N L Q T L
R G Y Y N Q S E A S S H T L Q W M I G C D L G S D G R L L R G Y E Q Y A Y
D G K D Y L A L N E D L R S W T A A D T A A Q I S K R K C E A A N V A E
Q R R A Y L E G T C V E W H L A - G Y L E N G K E M L Q R A D P P K T H V
T H H P V F D Y E A T L R C W A L G F Y P A E I I L T W Q R D G E D Q T
Q D V E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C H V
Q H E G L P E P L M L R W K Q S S L P T I P I M G I V A G L V V L A A V
V T G A A V A A V L W R K K S S D (配列番号30)の配列を有する。

【0232】

免疫化手順

20

Harlan Laboratories から購入された、4週齢の雌BALB/cマウスを、完全フロイントアジュバント(初回および2回目の免疫化)または不完全フロイントアジュバント(3回目および4回目の免疫化)で乳化させた10μgの抗原により、2週間ごとに4回免疫化した。マウスに、免疫化1回当たり、マウスの背部における、3つの個別のスポットへと分けられた、合計25μgの抗原/アジュバントを皮内注射した。最終回の免疫化の10日後、血液試料を得、抗原でコーティングしたプレート上のELISA手順により滴定した。次いで、最高力値を示すマウスの静脈内に、5回目の免疫化ブーストを、アジュバントを伴わずに施したが、この場合、側方尾静脈を介して、滅菌リソ酸緩衝食塩水の100μl溶液中の10μgを注射した。

【0233】

ハイブリドーマの作出

30

4日後、これらのマウスを屠殺し、ハイブリドーマ手順のために、脾臓を摘出した。脾臓細胞を、ペニシリン/ストレプトマイシン抗生物質を含有する RPMI-1640 培地溶液中に分散させた後で、PEG (HybriMAX、分子量: 1450、型番: p7181、Sigma) を使用して、脾臓細胞を、マウスNSO細胞と融合させた。次いで、HAT選択を使用して、融合した細胞だけを増殖させた。次いで、ハイブリドーマ細胞を増殖させるウェルからの上清を、まず、抗原でコーティングしたプレートに対するELISAにより、次いで、HLA-G陽性および陰性のヒト腫瘍細胞株 (JAR栄養膜癌)についてのフローサイトメトリーによりスクリーニングした。正で高値の平均蛍光指數(MFI)を示すハイブリドーマを、限界希釈法によるサブクローニングのために選択した。次いで、サブクローンを、フローサイトメトリーにより再度調べ、液体窒素中で凍結させ、2Lの容器中で拡大してから、抗体を、タンデム(tandon)のプロテインAまたはGおよびイオン交換クロマトグラフィー法により精製した。次いで、精製された抗体を、バイアルに入れ、使用するまで、-20°で保管した。

40

【0234】

フローサイトメトリーの手順およびデータ

抗原でコーティングしたプレートに対するELISAにより陽性であることが見出されたハイブリドーマからの上清を使用して、フローサイトメトリーを使用するスクリーニング法を、HLA-G陽性細胞株 (JEG-3栄養膜癌) および陰性細胞株 (K562、Jurkat) に対して実施した。次いで、高い平均蛍光指數(MFI)をもたらすハイブ

50

リドーマをサブクローニングし、HLA-Gに対する選択的陽性度 (selective positivity) について再スクリーニングした。下記の図1に示される通り、親ハイブリドーマである、3H11および4E3のサブクローニングは、HLA-Gを発現させるJEG-3細胞株に対して、高MFIをもたらし続けた。これらのデータから、下記で記載される通りに、CAR-T細胞を作出するのに、3H11-12および4E3-1を選択した。

【0235】

選択された抗体による免疫組織化学

抗体である4E3およびそのサブクローニングは、標準的な免疫組織化学手順および抗原回復法を使用してHLA-G陽性組織を染色することを見出した。図2A～2Dに示す通り、乳頭状甲状腺癌など、抗原陽性腫瘍の細胞質および細胞膜のいずれにおいても、HLA-Gの陽性度が見られた(図2A、2B)が、そのHLAの発現を保持する(図2D)正常甲状腺組織では、HLA-Gは陰性であった(図2C)。免疫組織化学を使用する、HLA-Gについてのコンパニオン診断抗体の利用可能性は、来るべき臨床試験において、HLA-G CAR-T細胞療法から利益を得る可能性が高い患者の同定を可能とするであろう。

【0236】

(実施例2-HLA-G CAR-T細胞の作出)

単鎖HLA-G抗体遺伝子の構築および合成

本発明者らの研究室で作出された、2つの高結合性抗HLA-G抗体(4E3-1および3H11-12)のDNA配列は、MCLAB(South San Francisco、CA)から得た。両方の抗体を試験して、下記で記載されるアッセイにおいて、どの抗体が、最も有効なCARをもたらすのかを決定する。下記で示される通り、以下のタンデム遺伝子：コザックコンセンサス配列；CD8シグナルペプチド；抗HLA-G重鎖可変領域；(グリシン4セリン)3可撓性ポリペプチドリンカー；それぞれの抗HLA-G軽鎖可変領域；CD8ヒンジおよび膜貫通ドメイン；ならびにCD28、4-1BB、およびCD3細胞内共刺激性シグナル伝達ドメインからなる、第2世代または第3世代(図3)のCARベクターを構築する。ヒンジドメイン、膜貫通ドメイン、およびシグナル伝達ドメインのDNA配列は、Carl Juneによる特許(US20130287748A1を参照されたい)から確認される。抗HLA-G CAR遺伝子は、GeneWiz, Inc. (South Plainfield, NJ)が、ベクター宿主にアンピシリン耐性を付与する、bla遺伝子を含有するpUC57ベクター骨格内で合成する。

【0237】

CAR遺伝子の、レンチウイルスプラスミドへのサブクローニング

Novablu Singles(商標)化学的コンピテントE.coli細胞を、抗HLA-GプラスミドcDNAで形質転換する。形質転換されたE.coli細胞の増殖後、CARプラスミドを精製し、一晩にわたるT₄DNAリガーゼ反応(New England Biosciences; Ipswich, MA)を介して、HIV-1末端反復LTR)、パッケージングシグナル()、EF1プロモーター、内部リボソーム侵入部位(IRES)、およびウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(WPRE)を含有するHIV-1ベースのレンチウイルスベクターへと挿入されるよう、適切な制限酵素で消化する。次いで、Novablu Singles(商標)化学的コンピテントE.coli細胞を、結果として得られる、抗HLA-Gを含有するレンチウイルスプラスミドで形質転換する。

【0238】

レンチウイルス粒子の作製

トランスフェクションの前に、HEK293T細胞を、10mLのcomplete-Tet-DMEM中に、100mmの組織培養処理プレート1枚当たりの細胞4.0×10⁶個で播種し、加湿された5%CO₂インキュベーター内、37で、一晩にわたりイ

10

20

30

40

50

ンキュベートする。80～90%コンフルエントに達したら、HEK293T細胞に結合するプラスミド含有ナノ粒子の形成を容易とするよう特許権のある反応緩衝液およびポリマーに加えて、HEK293T細胞に、CAR遺伝子のレンチウイルスプラスミドと、レンチウイルスのエンベロープ構成要素およびカプシド構成要素を形成するのに必要な遺伝子を含有するレンチウイルスパッケージングプラスミドとを共トランスフェクトする。トランスフェクトされたHEK293T細胞培養物を、37で、4時間にわたりインキュベートした後で、トランスフェクション培地を、新鮮なcomplete Tet D MEM 10mLで置きかえる。次いで、HEK293T細胞を、さらなる48時間にわたりインキュベートし、その後、細胞上清を採取し、主要なレンチウイルスカプシドタンパク質である、p24に対するサンドイッチELISAを介して、レンチウイルス粒子について調べる。レンチウイルス含有上清をアリコートに分け、標的であるCD4⁺およびCD8⁺T細胞に形質導入するために使用するまで、-80で保管する。

【0239】

ヒトCD4⁺およびCD8⁺末梢血T細胞の精製、活性化、および濃縮

Ficoll-Paque Plus (GE Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK)を伴う密度勾配遠心分離により濃縮された末梢血単核細胞(PBMC)を、0.5%のウシ血清アルブミン(BSA)および2mMのEDTAを含有するPBSを伴う遠心分離により回収および洗浄する。CD4⁺およびCD8⁺T細胞についてポジティブ選択するように、磁気的に活性化させたLSカラムを使用して、これらのヒトT細胞サブセットを単離するのに、MACS CD4⁺およびCD8⁺MicroBeads (Miltenyi Biotec; San Diego, CA)キットを使用する。次いで、磁気的に結合したT細胞を、MACS磁気分離器から取り出し、LSカラムからフラッシュ洗浄し、新鮮な完全培地で洗浄する。CD4⁺およびCD8⁺T細胞集団の純度は、Life Technologies Acoustic Attune (登録商標) Cytometerを使用するフローサイトメトリーにより評価し、必要な場合、USCのフローサイトメトリー施設で実施される蛍光活性化細胞分取により濃縮する。CD4⁺およびCD8⁺T細胞を、適切な細胞培養容器内で、100IU/mLのIL-2を補充された完全培地中、1mL当たりの細胞 1.0×10^6 個の密度で維持し、これに、-CD3/-CD28 Human T-cell Dynabeads (Life Technologies; Carlsbad, CA)を添加して、培養T細胞を活性化させる。T細胞に、CAR-レンチウイルス粒子を用いて形質導入する前に、5%CO₂インキュベーター内、37で、2日間にわたりインキュベートする。

【0240】

CD4⁺CD8⁺T細胞のレンチウイルス形質導入

活性化T細胞を回収し、死細胞を、Ficoll-Hypaque密度勾配遠心分離、またはMACS Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec; San Diego, CA)の使用により除去する。6ウェルプレートに、活性化T細胞を、完全培地1mL当たりの細胞 1.0×10^6 個の濃度で播種する。種々のウェルに対して、HLA-G CAR含有レンチウイルス粒子を、細胞懸濁液へと、1、5、10、および50など、感染多重度(MOI)を変化させて添加する。レンチウイルス粒子と、標的細胞表面との間の相互作用を容易とすることにより、形質導入を支援するカチオン性ポリマーであるポリブレンを、4μg/mLの最終濃度で添加する。プレートを、32、800×gで、1時間にわたり遠心分離する。遠心分離後、レンチウイルス含有培地を吸引し、細胞ペレットを、100IU/mLのIL-2を伴う、新鮮な完全培地中に再懸濁させる。細胞を、5%CO₂の加湿されたインキュベーター内、37で一晩にわたり静置する。形質導入の3日後、細胞をペレット化させ、IL-2および400μg/mLのジェネティシン(G418スルフェート)(Life Technologies; Carlsbad, CA)を伴う、新鮮な完全培地中に再懸濁させる。HLA-G CAR改変T細胞は、フローサイトメトリーおよびサザンプロット解析により評価

10

20

30

40

50

して、形質導入手順の成功を裏付ける。in vitroおよびin vivoアッセイの前に、HLA-G CAR T細胞を、FACSにより濃縮し、in vivo研究のために、1:1に混合する。

【0241】

カルセイン放出細胞傷害アッセイによる、CARの有効性についてのin vitro評価

HLA-G抗原陽性および陰性ヒト細胞株を、回収し、洗浄し、完全培地中に1mL当たりの細胞 1.0×10^6 個の濃度で再懸濁させる。カルセイン-アセトキシメチル(AM)を、15μMで、標的細胞試料へと添加し、次いで、これを、5%CO₂の加湿されたインキュベーター内、37度、30分間にわたりインキュベートする。染色した陽性および陰性標的細胞を、2回洗浄し、遠心分離により、完全培地中に再懸濁させ、ウェル1つ当たりの細胞 1.0×10^4 個で、96ウェルプレートへと添加する。HLA-G CAR T細胞を、完全培地中に、50:1、5:1、および1:1のエフェクター対標的細胞比で、プレートへと添加する。完全培地および2%のtriton X-100を伴う完全培地中に懸濁させた染色標的細胞を、それぞれ、自発的放出対照および最大放出対照として用いる。プレートを、365×gおよび20度、2分間にわたり遠心分離してから、インキュベーターに戻して、3時間にわたり静置する。次いで、プレートを、10分間にわたり遠心分離し、細胞上清を、黒色のポリスチレン製96ウェルプレート上のそれぞれのウェルへとアリコートに分け、Bio-Tek(登録商標)Synergy(商標)HTマイクロプレートリーダー上、それぞれ、485/20nmおよび528/20nmの励起および発光で、蛍光について評価する。

【0242】

Luminesバイオアッセイによるヒトサイトカインの定量化。

研究室で慣例的に実施される標準的な手順を使用して、HLA-G CAR改変T細胞ならびにHLA-G陽性および陰性腫瘍細胞株の上清を、CAR T細胞活性化の尺度としてのサイトカインの分泌について測定する。バックグラウンドの活性を同定するために、非活性化ヒトT細胞を使用して、データを、培地単独および培養物と比較する。IL-2、IFN-g、IL-12、および他の関連するサイトカインの濃度を、インキュベーション工程中の時間にわたり測定する。

【0243】

2つのHLA-G陽性がん異種移植片モデルにおける、CAR T細胞有効性についてのin vivo評価

2つの異なるヒト腫瘍細胞株異種移植片腫瘍モデルを使用して、HLA-G CAR T細胞を、in vivoにおいて、さらに評価する。いずれのモデルについても、 5×10^6 個のHLA-G陽性またはHLA-G陰性充実性腫瘍細胞株の注射により、充実性腫瘍を、6~8週齢の雌ヌードマウスの皮下において確立する。腫瘍が、0.5cmの直径に達したら、マウス(n=5)の群を、in vitro研究の結果に基づき、最も活性のHLA-G抗体から構築された1または 3×10^7 個の、陰性対照としてのヒトT細胞またはHLA-G CAR T細胞で、静脈内において処置する。次いで、腫瘍容量を、キャリパーにより、毎週3回測定し、容量増大曲線を作成して、実験的処置の、対照を上回る有効性を裏付ける。

【0244】

HLA-Gは、HLA-A、HLA-B、HLA-Cの発現を喪失して、免疫認識を回避するヒト充実性腫瘍を処置するためのCAR T細胞開発にとって、傑出した標的であることが見出されている。これは、妊娠中の胎盤を例外として、正常組織内の発現が最小限であり、したがって、患者におけるオフターゲットの陽性度および毒性が極めて限定的であるはずである。

【0245】

(実施例3 - 抗HLA-G CAR T細胞)

CARレンチウイルス構築物の構築

10

20

30

40

50

C A Rは、H L A - Gに特異的に結合する、細胞外抗原結合性部分またはs c F Vからなる。s c F Vは、C D 8 ヒンジ領域を介して、C D 8 膜貫通領域を含む細胞質シグナル伝達ドメイン、ならびにC D 2 8 、4 - 1 B B、およびC D 3 z に由来するシグナル伝達ドメイン(図5)へと接続される。シグナル伝達ドメインを含むs c F V配列は、合成により、Gene wiz Gene Synthesis Services (Piscataway、N J)が合成した。プラスミドを精製し、一晩にわたるT₄ DNAリガーゼ反応(New England Biosciences; Ipswich、MA)を介して、H I V - 1 5' および3' 末端反復(LTR)、パッケージングシグナル()、E F 1 プロモーター、内部リボソーム侵入部位(I R E S)、ウッドチャック肝炎ウイルス転写後調節エレメント(W P R E)、およびサルウイルス40起点(S V 4 0)を含有するH I V - 1ベースのバイリストロニックレンチウイルスベクター(p L V X - I R E S - Z s G reen、Clontech、Signal Hill、CA)へと挿入されるように、適切な制限酵素で消化する。次いで、NovaBlue Single s(商標)化学的コンピテントE. coli細胞を、結果として得られる、C A Rを含有するレンチウイルスプラスミドで形質転換する。

【0246】

レンチウイルス粒子の作製

トランスフェクションの前に、H E K 2 9 3 T細胞を、10%の透析F C Sを補充した、20mLのD M E M中に150cm²の組織培養処理フラスコ1つ中の細胞4.0×10⁶個で播種し、加湿された5%CO₂インキュベーター内、37で、一晩にわたりインキュベートする。80~90%コンフルエントに達したら、H E K 2 9 3 T細胞を、加湿された5%CO₂インキュベーター内のペニシリン/ストレプトマイシンを伴わない、1%の透析F C Sを補充した、20mLのD M E M中、37で、2時間にわたりインキュベートする。H E K 2 9 3 T細胞に、p L V X - B 7 - H 4 - C A Rプラスミドと、レンチウイルスのエンベロープ構成要素およびカプシド構成要素を形成するのに必要な遺伝子を含有するレンチウイルスパッケージングプラスミドとを共トランスフェクトする。H E K 2 9 3 T細胞に結合するプラスミド含有ナノ粒子の形成を容易とするように、特許権のある反応緩衝液およびポリマーもまた添加する。トランスフェクトされたH E K 2 9 3 T細胞培養物を、37で、24時間にわたりインキュベートした後で、トランスフェクション培地を、新鮮な完全D M E M 20mLで置きかえる。レンチウイルス上清を、24時間ごとに、3日間にわたり回収し、上清を、4、1,250r p mで、5分間にわたり遠心分離するのに続き、濾過滅菌および超遠心分離機内、4、20,000gで、2時間にわたる遠心分離を行う。濃縮されたレンチウイルスは、7%のトレハロースおよび1%B S Aを補充したP B S中に再懸濁させる。次いで、レンチウイルスを、標的であるC D 4 + およびC D 8 + T細胞に形質導入するために使用するまで、アリコート中、-80で保管する。24時間後に採取された細胞上清を、主要なレンチウイルスカプシドタンパク質である、p 2 4に対するサンドイッチE L I S Aを介して、レンチウイルス粒子について調べる。蛍光タンパク質マーカーであるZ s G reenの、蛍光顕微鏡下における可視化により決定されるトランスフェクション効率は、30%~60%の間であると推定された。

【0247】

ヒトC D 4 + およびC D 8 + 末梢血T細胞の精製、活性化、および濃縮

F i c o l l - P a que P l u s (G E H e a l t h c a r e ; L i t t l e C h a l f o n t、B u c k i n g h a m s h i r e、U K)を伴う密度勾配遠心分離により濃縮された末梢血单核細胞(P B M C)を、0.5%のウシ血清アルブミン(B S A)および2mMのE D T Aを含有するP B Sを伴う遠心分離により回収および洗浄する。C D 4 + およびC D 8 + T細胞についてのネガティブ選択を使用して、これらのヒトT細胞サブセットを磁気的に単離するのに、T細胞濃縮キット(Stem C e l l T e c h n o l o g i e s)を使用する。C D 4 + およびC D 8 + T細胞集団の純度は、L i f e T e c h n o l o g i e s A c o u s t i c A t t u n e(登録商標)C y t o

10

20

30

40

40

50

meterを使用するフローサイトメトリーにより評価し、蛍光活性化細胞分取により濃縮する。1:1に混合されたCD4+およびCD8+T細胞を、適切な細胞培養容器内で、100IU/mLのIL-2を補充された完全な50%のクリック培地/50%のRPMI-1640培地中、1mL当たりの細胞 1.0×10^6 個の密度で維持し、これに、-CD3/-CD28 Human T-cell activatorビーズ(Stem Cell Technologies)を添加して、培養T細胞を活性化させる。次いで、T細胞に、CARレンチウイルス粒子を用いて形質導入する前に、5%CO₂インキュベーター内、37で、2日間にわたりインキュベートする。

【0248】

CD4+CD8+T細胞のレンチウイルス形質導入

10

活性化T細胞を回収し、死細胞を、Ficoll-Hyque密度勾配遠心分離、またはMACS Dead Cell Removal Kit (Miltenyi Biotec; San Diego, CA)の使用により除去する。6ウェルプレートに、活性化T細胞を、完全培地中、1mL当たりの細胞 1.0×10^6 個の濃度で播種する。細胞に、細胞へのトランスフェクション補助剤である、Lentiblast (Oz Biosciences, San Diego, CA)を補充したレンチウイルス粒子を用いて形質導入する。次いで、形質導入された細胞を、加湿された5%CO₂インキュベーター内、37で、24時間にわたりインキュベートする。細胞をスピンダウンし、培地を交換するのに続き、T-cell activatorビーズ(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)を添加する。

20

【0249】

細胞傷害アッセイ

CAR T細胞の細胞傷害は、乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)細胞傷害キット(Thermo Scientific, Carlsbad, CA)を使用して決定する。活性化T細胞を回収し、 1×10^6 個の細胞に、上記で記載したHLA-G CARレンチウイルス構築物を形質導入する。T-cell activatorビーズ(Stem Cell Technologies, San Diego, CA)を使用して、2日間にわたり細胞を活性化させてから、細胞傷害アッセイを行う。製造元のプロトコールに従い、標的細胞の最適数を決定する。アッセイのために、適切な標的細胞を、5%CO₂インキュベーター内、37で、24時間にわたり、96ウェルプレート内で三連で平板培養するのに続き、活性化CAR T細胞を、20:1、10:1、5:1、および1:1の比で添加し、5%CO₂インキュベーター内、37で、24時間にわたりインキュベートする。細胞を、37で、45分間にわたり溶解させ、1,250rpmで、5分間にわたり遠心分離する。次いで、上清を、未使用の96ウェルプレートへと移すのに続き、反応混合物を、30分間にわたり添加する。停止溶液を使用して、反応を停止させ、650nmで吸光度補正して、プレートを、450nmで読み取る。

30

【0250】

ウェスタンプロット法

RIPA緩衝液を使用して、HLA-CARを発現させるT細胞を溶解させる。タンパク質濃度は、ブラッドフォード法により推定する。50マイクログラムのタンパク質溶解物を、12%の還元ポリアクリルアミドゲル上で泳動させるのに続き、ニトロセルロース膜へと移す。膜は、0.05%のTweenを補充したTBS中に5%の脱脂粉乳中で、1時間にわたりブロッキングする。次いで、CD3に特異的な抗体(1:250)を使用して、膜を、4で、一晩にわたりインキュベートする。3回の洗浄の後、膜を、二次抗体中でインキュベートし、化学発光を使用して、バンドを検出する。膜をストリッピングし、-アクチンについて再プローブする。

40

【0251】

in vivo腫瘍退縮アッセイ

Foxn1ヌルマウスに、HLA-Gを発現させる悪性卵巣がん細胞株であるSKOV3を注射する。0.2mLの接種物を使用して、200uLのリン酸緩衝食塩水(PBS)

50

) 中の 2×10^6 個の SKOV3 細胞を、マウスの左脇腹へと注射する。 CD3 / CD28 activator 複合体 (Stem Cell Technologies, San Diego, CA) で、T 細胞を、2 日間にわたり活性化させる。次いで、活性化 T 細胞に、HLA - G CAR レンチウイルス粒子を用いて形質導入するのに続き、CD3 / CD28 activator 複合体により、さらに 2 日間にわたり活性化する。HLA - G CAR を発現させる活性化 T 細胞 (2.5×10^6 個) を、腫瘍接種後 7 日目に、マウスへと注射する。ノギスを使用して、毎週 2 回、腫瘍サイズを評価し、容量を計算する。

【 0252 】

HLA - G CAR T 細胞についての細胞傷害

10

卵巣細胞株である SKOV3 (図 6) を使用して、HLA - G CAR T 細胞の細胞溶解活性について検討した。SKOV3 は、FACS 解析により決定される通り、HLA - G を発現させる。HLA - G CAR T 細胞を、20 : 1, 10 : 1, 5 : 1, および 1 : 1 のエフェクター細胞対標的細胞比で、SKOV3 へと添加した。10 : 1 の比で、HLA - G CAR T 細胞は、42 % の溶解率で、標的 SKOV3 細胞の溶解の増大を示す。これと比較して、非形質導入 T 細胞は、試験した比のいずれでも、SKOV3 細胞を溶解させなかった。

【 0253 】

HLA - G CAR のタンパク質発現

20

HLA - G CAR を形質導入された T 細胞は、ウェスタンプロット法により示される (図 7) 通り、CAR のタンパク質を発現させる。CAR の推定サイズは、約 60 kDa である。 - アクチンを、ローディング対照として使用した。CAR のために使用されるシグナル伝達ドメインをターゲティングする、CD3 抗体を使用して、CAR タンパク質を検出した。

【 0254 】

均等物

そうでないことが規定されない限りにおいて、本明細書で使用される全ての科学技術用語は、本技術が属する技術分野の当業者により一般に理解される意味と同じ意味を有する。

【 0255 】

30

本明細書で例示的に記載される本技術は、本明細書では具体的に開示されない、任意の 1 または複数の要素、1 または複数の限定の非存在下で、適切に実施することができる。したがって、例えば、「～を含むこと (comprising) 」、「～を含むこと (including) 」、「～を含有すること」などの用語は、広く、限定を伴わずに読み取られるべきものである。加えて、本明細書で利用される用語および表現は、限定的な用語ではなく、記載的な用語として使用されており、このような用語および表現の使用において、示され、記載される特徴の、任意の均等物またはそれらの部分を除外する意図は存在しないが、特許請求される本技術の範囲内では、多様な改変が可能であることが認識されている。

【 0256 】

40

したがって、本明細書で提示される材料、方法、および例は、好ましい態様を表すものであり、例示的なものであり、本技術の範囲に対する限定として意図されるものではないことを理解すべきである。

【 0257 】

本明細書では、本技術について、広く、かつ、一般的に記載してきた。一般的開示の中に収まるより狭い種および亜属的群分けの各々もまた、本技術の一部を形成する。これは、本技術についての一般的記載であって、排除される材料が、本明細書で具体的に列挙されるのかどうかに関わらず、任意の対象物を属から除外する条件または否定的限定を伴う記載を含む。

【 0258 】

50

加えて、マーカッシュ群との関係で、本技術の特徴または態様について記載する場合、当業者は、本技術が、これにより、マーカッシュ群の任意の個々のメンバーまたはメンバーの亜群との関係でもまた記載されることを認識するであろう。

【 0 2 5 9 】

本明細書で言及される、全ての刊行物、特許出願、特許、および他の参考文献は、各々が参照により個別に組み込まれた場合と同じ程度に、参照によりそれらの全体において明示的に組み込まれる。矛盾する場合は、定義を含む本明細書が支配する。

【 0 2 6 0 】

他の態様は、以下の特許請求の範囲において明示される。

【化 201】

HLA-G 配列**CDRH1**

GFNIKDTY (配列番号 1)

GFTFNTYA (配列番号 2)

CDRH2

IDPANGNT (配列番号 3)

IRSKSNNYAT (配列番号 4)

CDRH3

ARSYYGGFAY (配列番号 5)

VRGGYWSFDV (配列番号 6)

HC1

AGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCA
 AGTTGTCCCTGCACAGCTCTGGCTTCAACATTAAAGACACCTATATGCACTGGGT
 GAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAA
 TGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGA
 CACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACT
 GCCGTCTATTACTGTGCTAGGAGTTACTACGGGGGTTGCTTACTGGGGCCAAG
 GGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号 7)

QVQLQESGAELVKPGASVJKLSCASGFNIKDTYMHVKQRPEQGLEWIGRIDPANG
 NTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCARSYYGGFAYWGQGTL
 VTVSA (配列番号 8)

HC2

GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTG
 AAACTCTCATGTGCCGCCTTGGTTACCTTCAATACCTATGCCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTGGAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAG
 TAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCACTGAAAGACAGATTACCATCTCC
 AGAGATGATTACAAAGCATGCTCTCTGCAAATGAACAAACCTGAAAAGTGAG

10

20

30

40

【化 2 0 2】

GACACAGCCATTATTACTGTGTGAGAGGGGGTTACTGGAGCTCGATGTCTGGG
 GCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 9)

EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSAAFGFTENTYAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKS
 NNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLSLQMNNLKTEDTAIYYCVRGGYWSFDVWG
 AGTTVTVSS (配列番号 10)

CDRL1 10

KSVSTSGYSY (配列番号 11)

KSLLHSNGNTY (配列番号 12)

CDRL2

LVS (配列番号 13)

RMS (配列番号 14)

CDRL3 20

QHSRELPRT (配列番号 15)

MQHLEYPYT (配列番号 16)

LC 1

GATATTGTGCTCACACAGTCTCCTGCTTCCTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGG
 CCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTTATAT
 GCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATCTTGTA 30
 TCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTAGTGGCAGTGGTCTGGACAG
 ACTTCACCCCTAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTG
 TCAGCACAGTAGGGAGCTCCTCGGACGTTGGAGGACCAAGCTGGAAAT
 CAAA (配列番号 17)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIYLVSNL
 ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPRTFGGGTKLEIK (配列番号

18) 40

LC2

【化 2 0 3 】

GATATTGTGATCACACAGACTACACCCCTCTGTACCTGTCACTCCTGGAGAGTCAG
 TATCCATCTCCTGTAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTA
 CTTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATCTCGG
 ATGTCCAGCCTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTCAGTGGCAGTGGGTAGGA
 ACTGCTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTATT
 ACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTATACGTTGGAGGGGGACCAAGCTGG
 AAATAAAA (配列番号 19) 10

DIVITQITPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYWFLQRPGQSPQLLISRMSSLA
 SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPYTFGGGTKLEIK (配列番号 20)

Ig

ヒトIgD定常領域 , Uniprot: P01880 配列番号 21

APTKAPDVFPHSGCRHPKDNSPVVLA CLITGYHPTSVTVWYMGTSQPQRTFPEIQ
 RRDSYYMTSSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTA
 QPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGEEKKKEKEKEEEQERERETKTPECPSHTQPLGVY
 LLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSIDLKDAHTLWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNG
 SQSQHRSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPQLPQLMALREPAAQAPVKLSLNLLASS
 DPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVL
 RVPAPPSPQPATYCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSYVTDHGP MK

ヒトIgG1定常領域 , Uniprot: P01857 配列番号 22 30

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ヒトIgG2定常領域 , Uniprot: P01859 配列番号 23 40

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECPPCPAPPVA
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR

【化 0 4】

EEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKGQPREPVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPMULDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ヒトIgG3定常領域 , Uniprot: P01860 配列番号 24

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSAGTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHPNSNTKVDKVELKTPGDTTHTCP
 10
 PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKGQPREPVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPMULDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

ヒトIgM定常領域 , Uniprot: P01871 配列番号 25

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFP
 20
 SVPVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVVKVQHPNGNKEKNVPLVIAELPPKVS
 FVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSQVTTDQVQAEAKESG
 PTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPS
 FASIFLTKSTKLTCVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHNISESHPNATFSAVGEAS
 ICEDDWNSGERFTCTVTHDLPPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESA
 TITCLVTGFSPADVFWQMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEE
 WNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

ヒトIgG4定常領域 , Uniprot: P01861 配列番号 26

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTYTCNVNDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG
 GPSVFLPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSRLTVVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK

ヒトIgA1定常領域 , Uniprot: P01876 配列番号 27

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSSEGQGVTA
 40
 NFPPSQD
 ASGDLYTTSQLPATQCLAGKSVTCHVHYTNPSQDVTVPCPVPSTPP
 PSPSTPP

【化205】

TPSPSCCHPRLSLHRALEDELLLGEANLTCTLTGLRDASGVFTWTPSSGKSAVQGP
 PERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKPLTATLSKSGNTFRPEVH
 LLPPPSEELALNELVLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTwASRQEPEPSQG
 TTTFAVTSILRVAEAEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIIDRLAGKPTHVNVSVV
 MAEVDGTCY

ヒトIgA2定常領域 , Uniprot: P01877 配列番号 28 10

ASPTSPKVFPQLSLDSTPQDGNNVVACLVQGFFPQEPLSVTWSSEGQNVTARNFPPSQD
 ASGDLYTTSSQLTPATQCPDGKSVTCHVHYTNPSQDVTPCPVPPPPCCHPRLSL
 HRALEDELLLGEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGPPERDLCGCYSVS
 SVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNE
 LVLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYLTwASRQEPEPSQGTTFAVTSILRVA
 AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

ヒトIgカッパ定常領域 , Uniprot: P01834 配列番号 29 20

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HLA-G

GSHSMRYFSA AVSRPGRGEP RFIAMGYVDD TQFVRFDSDS ACPRMEPRAP
 WVEQEGPEYW EEETRNTKAH AQTDRMNLQT LRGYYNQSEA SSHTLQWMIG
 CDLGSDGRLL RGYEQYAYDG KDYLALNEDL RSWTAADTAA QISKRKCEAA
 NVAEQRRAYL EGTCVEWHLA-G YLENGKEMLQ RADPPKTHVT HHPVFDYEAT 30
 LRCWALGFYP AEHILTWQRD GEDQTQDVEL VETRPAGDGT FQKWAADVVP
 SGEEQRYTCH VQHEGLPEPL MLRWKQSSLT TIPIMGI VAGLVVLA
 VTGAAVAAVL WRKKSSD (配列番号 30)

CARの構成要素

ヒトCD8アルファヒンジドメイン , 配列番号 31:

PAKPTTPAPRPPPTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY

マウスCD8アルファヒンジドメイン , 配列番号 32:

KVNSTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY

40

【化 2 0 6】

ネコCD8アルファヒンジドメイン 配列番号 33:

PVKPTTPAPRPTQAPITTSQRVSLRPGTQPSAGSTVEASGLDLSCDIY

ヒトCD8アルファ膜貫通ドメイン 配列番号 341

IYIWAPLAGTCGVLLSLVIT

マウスCD8アルファ膜貫通ドメイン 配列番号 351

IWAPLAGICVALLSJUTTI

ラットCD8アルファ膜貫通ドメイン 配列番号 36

IWAPI AGICAVILLI VITILLI

4-1 BB共刺激性シグナル伝達領域 配列番号 : 37

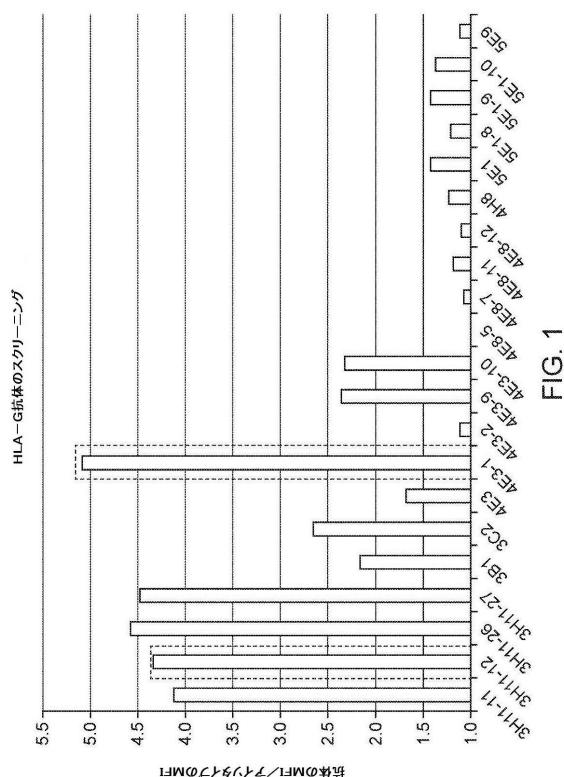
KRGRKKLIYIEKOPENRPVOTTOEEEDGCSCREPEEEEGGCET

CD3ギー・タシグナル伝達ドメイン 配列番号 38

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQLP
PR

10

(1)



(2 A)

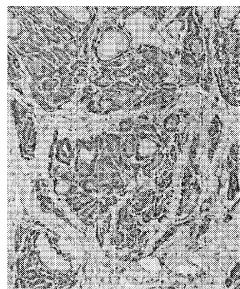


FIG. 2A

【 2 B 】

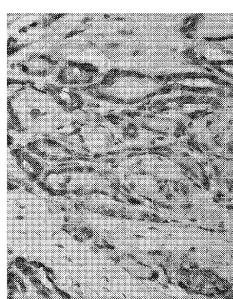


FIG. 2B

【図2C】

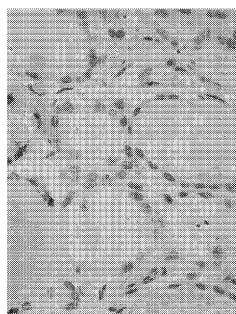


FIG. 2C

【図2D】

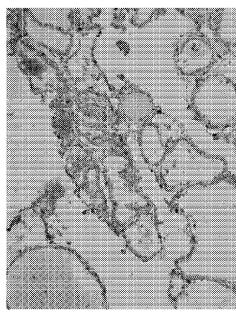


FIG. 2D

【 図 3 】

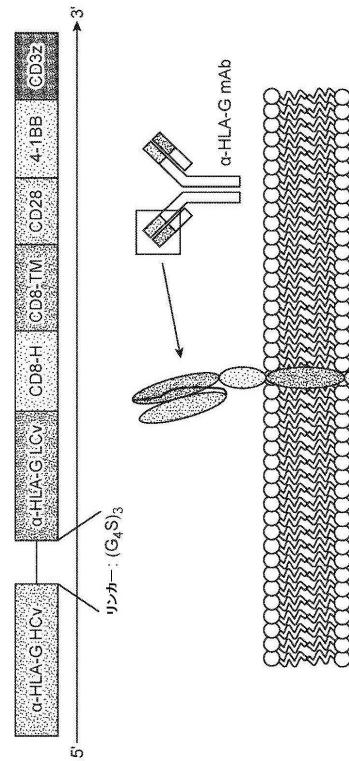


FIG. 3

【 図 4 】

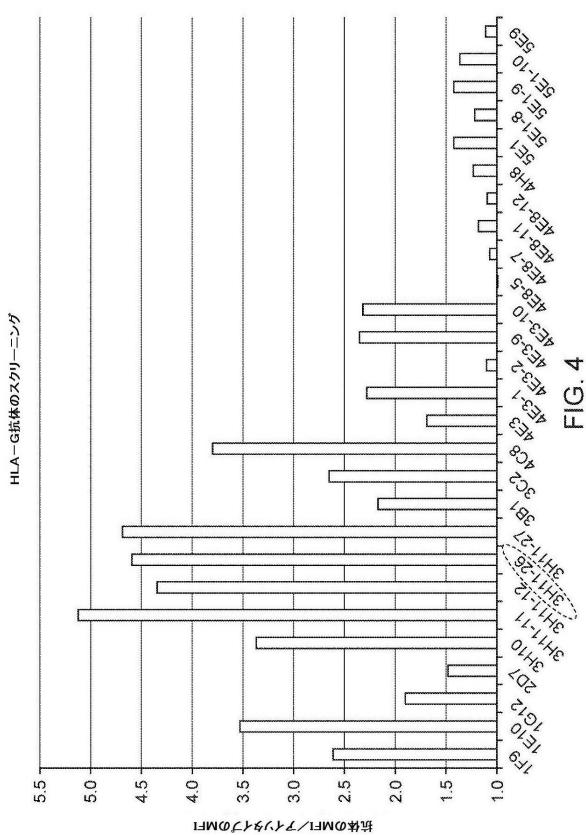


FIG. 4

【 四 5 】

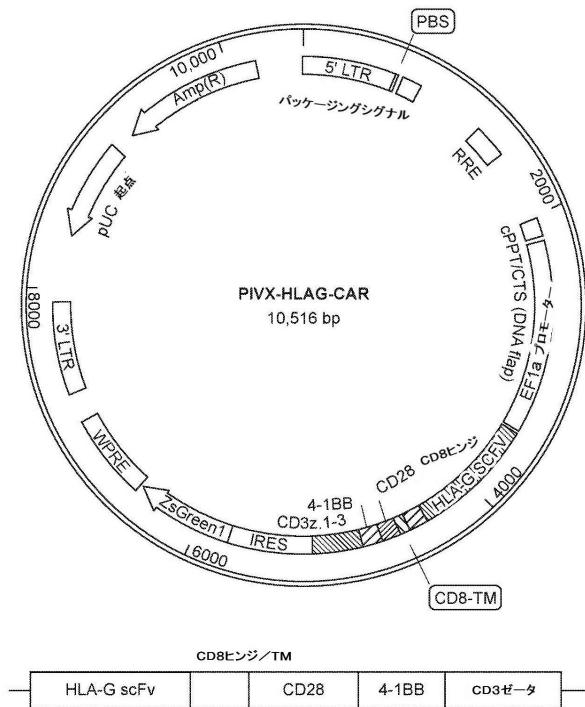


FIG. 5

【図6】

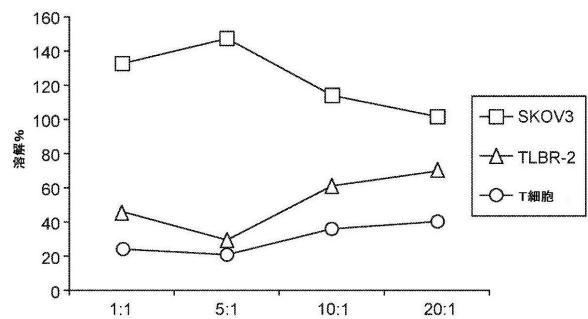
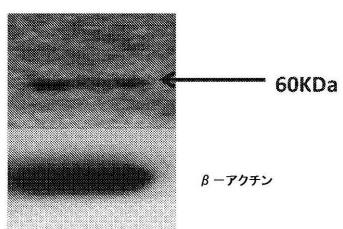


FIG. 6

【図7】

FIG. 7



【配列表】

[0006843062000001.app](#)

[0006843062000002.xml](#)

フロントページの続き

			F I	
C 1 2 N	7/01	(2006.01)	C 1 2 N	7/01
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
C 1 2 N	5/0783	(2010.01)	C 1 2 N	5/0783
C 0 7 K	14/705	(2006.01)	C 0 7 K	14/705
C 1 2 M	1/34	(2006.01)	C 1 2 M	1/34
C 1 2 N	5/07	(2010.01)	C 1 2 N	5/07
C 0 7 K	16/28	(2006.01)	C 0 7 K	16/28
G 0 1 N	33/53	(2006.01)	G 0 1 N	33/53
G 0 1 N	33/574	(2006.01)	G 0 1 N	33/574
G 0 1 N	33/48	(2006.01)	G 0 1 N	33/574
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	G 0 1 N	33/48
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	G 0 1 N	33/48
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 P	35/00
			A 6 1 K	35/17
			A 6 1 K	35/12

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 エプスタイン, アラン エル.

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリー
ト 1150, スイート 2300, ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア 気付

(72)発明者 フー, ペイシェン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 90015, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリー
ト 1150, スイート 2300, ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア 気付

審査官 馬場 亮人

(56)参考文献 特表2014-508290 (JP, A)

特表2013-544250 (JP, A)

特表平11-503320 (JP, A)

特表2014-507118 (JP, A)

特表2012-531401 (JP, A)

特表2012-530106 (JP, A)

NUNES, L. M. et al., Association between the HLA-G molecule and lymph node metastasis
in papillary thyroid cancer, Human Immunology, 2012年12月20日, Vol.74, pp.447-
451AGAUGUE, S. et al., Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived
suppressor cells and cytokine balance in favor of Th2 versus Th1/Th17, BLOOD, 201
1年 6月30日, Vol.117, No.26, pp.7021-7031MENIER, C. et al., Characterization of Monoclonal Antibodies Recognizing HLA-G or HLA-
E: New Tools to Analyze the Expression of Nonclassical HLA Class I Molecules, Human Im
munology, 2003年, Vol.64, pp.315-326CONTINI, P. et al., Soluble HLA-A, -B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and N
K CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation, Eur. J. Immun

ol. , 2 0 0 3 年 , Vol.33 , pp.125-134

ISHITANI, A. & GERAGHTY, D. E. , Alternative splicing of HLA-G transcripts yields proteins with primary structures resembling both class I and class II antigens , Proc, Natl. Acad. Sci. USA , 1 9 9 2 年 5 月 , Vol.89 , pp.3947-3951

ODUM, N. et al. , Homotypic aggregation of human cell lines by HLA class II- , class Ia- and HLA-G-specific monoclonal antibodies , Eur. J. Immunol. , 1 9 9 1 年 , Vol.21 , pp.21 21-2131

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 1 2 N 1 5 / 1 3

A 6 1 K 3 5 / 1 2

A 6 1 K 3 5 / 1 7

A 6 1 P 3 5 / 0 0

C 0 7 K 1 4 / 7 0 5

C 0 7 K 1 4 / 7 2 5

C 0 7 K 1 6 / 2 8

C 0 7 K 1 6 / 4 6

C 0 7 K 1 9 / 0 0

C 1 2 M 1 / 3 4

C 1 2 N 1 / 1 5

C 1 2 N 1 / 1 9

C 1 2 N 1 / 2 1

C 1 2 N 5 / 0 7

C 1 2 N 5 / 0 7 8 3

C 1 2 N 5 / 1 0

C 1 2 N 7 / 0 1

C 1 2 Q 1 / 0 4

G 0 1 N 3 3 / 4 8

G 0 1 N 3 3 / 5 3

G 0 1 N 3 3 / 5 7 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

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)

G e n B a n k / E M B L / D D B J / G e n e S e q

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

P u b M e d