

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-511319

(P2018-511319A)

(43) 公表日 平成30年4月26日(2018.4.26)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C12N 15/09 (2006.01)	C12N 15/00 A	2G045
C07K 16/46 (2006.01)	C07K 16/46 ZNA	4B029
C12Q 1/04 (2006.01)	C12Q 1/04	4B063
C07K 19/00 (2006.01)	C07K 19/00	4B065
C07K 14/725 (2006.01)	C07K 14/725	4C087

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 78 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)
 (85) 翻訳文提出日 平成29年11月22日 (2017. 11. 22)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2016/024361
 (87) 国際公開番号 W02016/160622
 (87) 国際公開日 平成28年10月6日 (2016. 10. 6)
 (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 米国 (US)

(71) 出願人 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 900
 15, 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) 【要約】

ヒトHLA-GのCAR細胞ターゲティングおよび抗体が、がん処置の新規の方法として記載される。HLA-G CAR細胞は、患者において、安全かつ有効であり、HLA-Gを発現させるヒト腫瘍を処置するのに使用しうることが提起される。一局面において、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が提供され、この抗体は、配列番号30のアミノ酸配列またはその同等物を含むHLA-Gのエピトープに結合する。

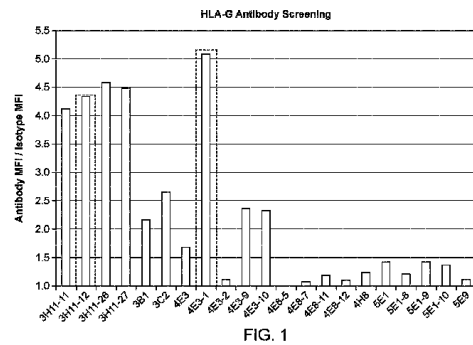


FIG. 1

【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であって、アミノ酸配列：

GSHSMRYFSA AVSRPGRGEP RFIAMGYVDD TQFVRFDS
 SDS ACPRMEPRAP WVEQEGPEYW EEETRNTKAH AQT
 DRMNLQT LRGYYNQSEA SSHTLQWMIG CDLGSDGRL
 RGYEQYAYDG KDYLALNEDL RSWTAADTAA QISKRRK
 CEAA NVAEQRRAYL EGTCVEWHLA - G YLENGKEMLQ
 RADPPKTHVT HHPVFDYEAT LRCWALGFYP AEIILT
 WRD GEDQTQDVEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVP SGE
 EQRYTCH VQHEGLPEPL MLRWKQSSLP TIPIMGI VA
 GLVVLAAV VTGA AVAAVL WRKKSSD（配列番号30）、またはその

の同等物を含む、HLA - Gのエピトープに結合し、ここで同等物は、配列番号30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、単離抗体。

【請求項 2】

（a）前記HCが、CDRH3配列ARSY YGGFAY（配列番号5）もしくはVRGGYWSFDV（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QHSRELPRT（配列番号15）もしくはMQHLEYPYT（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ARSY YGGFAY（配列番号5）またはVRGGYWSFDV（配列番号6）を含み、かつ、前記LCが、QHSRELPRT（配列番号15）もしくはMQHLEYPYT（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、

請求項1に記載の抗体。

【請求項 3】

前記HCが、CDRH2配列IDPANGNT（配列番号3）もしくはIRSKSNNYAT（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、請求項1または2に記載の抗体。

【請求項4】

前記HCが、CDRH1配列GFNIKDTY（配列番号1）もしくはGFTFNTYA（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、請求項1から3のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項5】

前記LCが、CDRL2配列LVS（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、請求項1から4のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項6】

前記LCが、CDRL1配列KSVSTSGYSY（配列番号11）もしくはKSLHLHNGNTY（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、請求項1から5のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項7】

前記HCが、

(a) アミノ酸配列GFNIKDTY（配列番号1）もしくはGFTFNTYA（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IRSKSNNYAT（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ARSYYGGFA Y（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；

40

(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

50

前記 LC が、

(a) アミノ酸配列 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 LC CDR1; 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 LC CDR2; 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 LC CDR3 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、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

前記 HC 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 HC CDRH1; 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 HC CDRH2; 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 HC CDRH3 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; かつ / あるいは

前記 LC 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 LC CDR L1; 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 LC CDR L2; 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 LC CDR L3 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、請求項 1 から 6 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 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 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、請求項 1 から 8 のいずれか一項に記載の抗体。

10

【請求項 10】

前記 L C 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 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、請求項 1 から 9 のいずれか一項に記載の抗体。

20

【請求項 11】

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 または 10 のアミノ酸配列を含み、前記 L C 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 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、請求項 1 から 10 のいずれか一項に記載の抗体。

30

【請求項 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、請求項 1 から 11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

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 12 のいずれか一項に記載の抗体の抗原結合性断片。

40

【請求項 14】

請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体、または請求項 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 e x v i v o 複合体。

【請求項 15】

請求項 14 に記載の複合体を含む単離 e x v i v o 細胞。

【請求項 16】

生物学的試料中の H L A - G を検出する方法であって、前記試料を、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体、または請求項 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、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。

50

【請求項 17】

前記試料が、細胞試料または組織試料を含む、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 16 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 18 に記載の方法。

【請求項 20】

前記検出が、免疫組織化学 (I H C)、ウェスタンブロット法、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 16 に記載の方法。

10

【請求項 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 H L A - G に結合する、請求項 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 H L A - 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 H L A - G のレベルを、対照の生物学的試料中で観察される H L A - G のレベルと比較するステップと

を含み、

H L A - 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、H L A - 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。

20

【請求項 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、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 23】

前記検出が、免疫組織化学 (I H C)、ウェスタンブロット法、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 21 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 21 から 23 のいずれか一項に記載の方法。

30

【請求項 25】

前記対象が、哺乳動物である、請求項 24 に記載の方法。

【請求項 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、請求項 25 に記載の方法。

【請求項 27】

請求項 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、H L A - G 特異的抗体またはその抗原結合性断片。

40

【請求項 28】

H L A - G を検出するためのキットであって、請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体、または請求項 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。

【請求項 29】

腫瘍試料中の H L A - 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 (H C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列と、軽鎖 (L C) 免疫グロブリン可変ドメイン配列とを含み、前記抗体は、

前記 H C が、

50

(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 H C C D R H 1 ; および

(i i) 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 H C C D R H 2 ; および

(i i i) 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 H C C D R H 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、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 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 ;

前記 L C 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 L C 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 L C 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 L C 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 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、

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。

【請求項 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) 。

【請求項 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、請求項 30 に記載の C A R 。

【請求項 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、請求項 31 に記載の C A R 。

【請求項 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、請求項 31 または 32 に記載の C A R 。

【請求項 34】

10

20

30

40

50

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、請求項 31 または 32 に記載の C A R。

【請求項 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、請求項 31 または 32 に記載の C A R。

【請求項 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、請求項 31 または 32 に記載の C A R。

【請求項 37】

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 - セリンリンカーによって接続される、請求項 31 から 36 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 38】

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

【請求項 39】

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、請求項 33 から 38 のいずれか一項に記載の C A R。

【請求項 40】

請求項 30 から 39 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。

【請求項 41】

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、請求項 40 に記載の単離核酸。

【請求項 42】

抗生物質耐性ポリヌクレオチドをさらに含む、請求項 40 または 41 に記載の単離核酸配列。

【請求項 43】

請求項 40 から 42 のいずれか一項に記載の単離核酸配列を含むベクター。

【請求項 44】

プラスミドである、請求項 43 に記載のベクター。

【請求項 45】

レンチウイルスベクターである、請求項 43 に記載のベクター。

【請求項 46】

請求項 30 から 39 のいずれか一項に記載の C A R；および / または請求項 40 から 42 のいずれか一項に記載の単離核酸；および / または請求項 43 から 45 のいずれか一項に記載のベクターを含む単離細胞。

【請求項 47】

T 細胞である、請求項 46 に記載の単離細胞。

【請求項 48】

N K 細胞である、請求項 46 に記載の単離細胞。

【請求項 49】

請求項 1 から 29 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 50】

担体と、請求項 30 から 39 のいずれか一項に記載の C A R を含む単離細胞；および /

10

20

30

40

50

または請求項 40 から 42 もしくは 49 のいずれか一項に記載の単離核酸；および／または請求項 43 から 45 のいずれか一項に記載のベクター；および／または請求項 46 から 48 もしくは 15 のいずれか一項に記載の単離細胞；および／または請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の抗体；および／または請求項 13 に記載の抗原結合性断片；および／または請求項 14 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 51】

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 30 から 49 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；

(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。

10

【請求項 52】

前記単離細胞が、T細胞およびNK細胞からなる群より選択される、請求項 51 に記載の方法。

【請求項 53】

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、請求項 46 から 48 に記載の単離細胞を投与するステップを含む、方法。

【請求項 54】

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 53 に記載の方法。

20

【請求項 55】

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、請求項 53 または 54 に記載の方法。

【請求項 56】

前記腫瘍が、充実性腫瘍である、請求項 53 から 55 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 57】

腫瘍細胞が、H L A - G を発現または過剰発現させる、請求項 53 から 56 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 58】

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、請求項 46 から 48 に記載の単離細胞を投与するステップを含む、方法。

30

【請求項 59】

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 58 に記載の方法。

【請求項 60】

腫瘍が、甲状腺がん、卵巣がん、または前立腺がんである、請求項 58 または 59 に記載の方法。

【請求項 61】

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 58 から 60 のいずれか一項に記載の方法。

40

【請求項 62】

前記対象が、ヒト患者である、請求項 58 から 61 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 63】

患者が、H L A - G C A R 療法に应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 療法に应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 療法に应答する可能性が高くないことを指し示す、方法。

【請求項 64】

50

有効量の前記HLA-G CAR療法を、前記HLA-G CAR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、請求項63に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

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日に提出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。

【0002】

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】

【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 ACPRMEPRAP WVEQEGPEYW EEETRNTKAH AQT
 DRMNLQT LRGYYNQSEA SSHTLQWMIG CDLGSDGRL
 RGYEQYAYDG KDYLALNEDL RSWTAADTAA QISKRK
 CEAA NVAEQRRAYL EGTCEWHLA-G YLENGKEMLQ
 RADPPKTHVT HHPVFDYEAT LRCWALGFYP AEIILT
 WRD GEDQTQDVEL VETRPAGDGT FQKWA AVVP SGE
 EQRYTCH VQHEGLPEPL MLRWKQSSLP TIPIMGI VA
 GLVVLAAV VTGA AVAAVL 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のアフィニティで結合する。

【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GFNIKDTY(配列番号1)もしくはGFTFNTYA(配列番号2)、またはそれらの各々の同等物を含むHC CDRH1；および/あるいはアミノ酸配列IDPANGNT(配列番号3)もしくはIRSKSNNTYA(配列番号4)、またはそれらの各々の同等物を含むHC CDRH2；および/あるいはアミノ酸配列ARSYGGFAY(配列番号5)もしくはVRGGYWSFDV(配列番号6)、またはそれらの各々の同等物を含むHC CDRH3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、またはなおさらにこれからなり、ヒトHLA-Gのエピトープに結合する。

10

20

30

40

50

【0007】

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KSVSTSGYSY（配列番号11）もしくはKSLLSHNGNTY（配列番号12）、またはそれらの各々の同等物を含むLC CDR1；および/あるいはアミノ酸配列LVS（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含むLC CDR2；および/あるいはアミノ酸配列QHSRELPRT（配列番号15）もしくはMQHLEYPYT（配列番号16）、またはそれらの各々の同等物を含むLC CDR3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、またはなおさらにこれからなり、ヒトHLA-Gのエピトープに結合する。

10

【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。

20

【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。

30

【0011】

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、およびそれらを含む宿主細胞に関する。

【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。

40

【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療法に应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

50

と、H L A - G 抗体；および/またはH L A - G C A R；および/またはH L A - G 抗体もしくはH L A - G C A Rをコードする単離核酸；および/またはH L A - G 抗体もしくはH L A - G C A R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H L A - G C A R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。

【図面の簡単な説明】

【0016】

【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)のサブクローンを選択した。

10

【0017】

【図2-1】図2 A ~ 2 Dは、H L A - 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、H L A - G反応性についての免疫組織化学を示す。図2 Aは、抗体4 E 3 - 1を使用する、低倍率(100倍)のH L A - G陽性乳頭状甲状腺癌の切片を示す。図2 Bは、高倍率(250倍)の、H L A - Gについて陽性である、第2の乳頭状甲状腺癌を示す。図2 Cは、正常甲状腺組織の、H L A - Gについての陰性反応性を示し(250倍)、図2 Dは、正常甲状腺組織の、H L A - A B Cについての陽性反応性を示す(100倍)。

【図2-2】図2 A ~ 2 Dは、H L A - 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、H L A - G反応性についての免疫組織化学を示す。図2 Aは、抗体4 E 3 - 1を使用する、低倍率(100倍)のH L A - G陽性乳頭状甲状腺癌の切片を示す。図2 Bは、高倍率(250倍)の、H L A - Gについて陽性である、第2の乳頭状甲状腺癌を示す。図2 Cは、正常甲状腺組織の、H L A - Gについての陰性反応性を示し(250倍)、図2 Dは、正常甲状腺組織の、H L A - A B Cについての陽性反応性を示す(100倍)。

20

【0018】

【図3】図3は、細胞膜内の第3世代の抗H L A - G C A Rの、D N A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。

30

【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、H I V - 1 5'末端反復(long terminal repeat)(L T R)およびH I V - 1 3'末端反復、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)、緑色蛍光タンパク質であるZ s G r e e n、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ベースの、バイシストロニックのレンチウイルスベクターである、p L V X - I R E S - Z s G r e e nである。E F - 1 プロモーターの存在により、H L A - Gに特異的なs c F V、C D 8ヒンジおよび膜貫通領域、ならびにC D 2 8、4 - 1 B B、およびC D 3 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Z s G r e e nの発現は、I R E S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Z s G r e e nの存在によりアッセイすることができる。

40

【0021】

【図6】図6は、H L A - G C A R T細胞の細胞傷害を示す。H L A - G C A R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、L D H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、C D 3 / C D 8ビーズ(Stem Cell Technologies; 2 mlの培地に対して30 ul)を使用して活性化させた。活性化T細胞に、H L A - Gレンチウイルス粒子を用いて形質導入し、これに続き、C D 3 / C D 8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

50

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、ウェスタンブ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。

【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もので、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、本明細書に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、参照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こ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し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についての従来技法を利用する。例えば、SambrookおよびRussell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)、Ge

10

20

30

40

50

ne 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 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。

10

【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。

20

【0028】

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。

30

【0030】

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对象、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産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 $10^3 M^{-1}$ を超えるか、少なくとも $10^4 M^{-1}$ を超えるか、または少なくとも $10^5 M^{-1}$ を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 Yor

40

50

k、1997年も参照されたい。

【0032】

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關与する抗原、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。

10

【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、Kabata, 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、Kabata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、 β -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、 β -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。

20

30

【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關与する。CDR内のこれらの位置を、特異性決定残基(SDR)と呼ぶ。

40

【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

50

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：I g G 1 重鎖ヒンジ配列、配列番号 38：

C T C G A G C 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：C D 2 8 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 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 T C T G G G T
G

細胞内ドメイン：4 - 1 B B 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 A T G T
G A A C T G

細胞内ドメイン：C D 2 8 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 C G C C G C C C C G G G C 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：C D 3 ゼータシグナル伝達領域、配列番号 42：

【化 1】

AGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAA
CCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGA
CAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACC
CTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACA
GTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTT
ACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGG
CCCTGCCCCCTCGCTAA

が開示される。

【0037】

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】

「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

10

20

30

40

50

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、単糖、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（rHA）、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、ソルボースなどの単糖；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。

10

【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ン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。

20

【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：

30

NM__002127.5 XM__006715080.1 XM__006725041.1 XM__006725700.1 XM__006725909.1

40

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：

MVVMAPRTLFLLLSGALTLTETWAGSHSMRYFSAAVSRPG
RGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSAACPRMEPRAPWVEQEG
PEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEASSHTLQ
WMIGCDLGS DGRLLRGYEQYAYDGKDYLLNEDLRSWTA
ATAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCEVWLHRYLENGK
EMLQRADPPKTHVTHHPVFDYEATLRCWALGFYPAEIIIT
WQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFFQKWA AVVVP SGEEQR
YTCHVQHEGLPEPLMLLRWKQSSLP T I P I M G I V A G L V V L A A

50

V V T G A A V A A V L W R K K S S D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、および他の種のCD8 ヒンジドメインの配列例は、Pinto, R. D.ら(2006年)、*Vet. Immunol. Immunopathol.*、110巻：169~177頁において提示されている。CD8 ヒンジドメインと関連する配列は、Pinto, R. D.ら(2006年)、*Vet. Immunol. Immunopathol.*、110巻：169~177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CD8アルファヒンジドメイン、配列番号31：

PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVH
TRGLDFACDIY

マウスCD8アルファヒンジドメイン、配列番号32：

KVNSTTTTKPVLRTSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSAVKGT
GLDFACDIY

ネコCD8アルファヒンジドメイン、配列番号33：

PVKPTTTPAPRPPTQAPIITTSQRVSLRPGTCCQPSAGSTVE
ASGLDLSCDIYを含む。

【0043】

本明細書で使用される場合、「CD8 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CD8 膜貫通ドメインの配列と、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T細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖(NCBI基準配列：NP_001759.3)のアミノ酸位置183~203、またはマウスT細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖(NCBI基準配列：NP_001074579.1)のアミノ酸位置197~217、およびラットT細胞表面糖タンパク質CD8アルファ鎖(NCBI基準配列：NP_113726.1)のアミノ酸位置190~210と関連する断片配列は、CD8 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NCBIの各々と関連する配列を、以下の通りに提示する：

ヒトCD8アルファ膜貫通ドメイン、配列番号34：IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

マウスCD8アルファ膜貫通ドメイン、配列番号35：IWAPLAGICVALLLSLIIITLI

ラットCD8アルファ膜貫通ドメイン、配列番号36：IWAPLAGICAVLLLSLVITLI

【0044】

本明細書で使用される場合、「CD28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CD28膜貫通ドメインの配列と、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、少なくとも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。GenBa

10

20

30

40

50

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子とを指す。4 - 1 B B 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 2 0 1 3 0 2 6 6 5 5 1 号 A 1 (米国特許出願第 1 3 / 8 2 6 , 2 5 8 号として出願) において提示されている。米国特許出願第 1 3 / 8 2 6 , 2 5 8 号において開示されている、関連する 4 - 1 B B 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：

【 0 0 4 6 】

4 - 1 B B 共刺激性シグナル伝達領域、配列番号 3 7 :

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

【 0 0 4 7 】

本明細書で使用される場合、「C D 2 8 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 C D 2 8 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子とを指す。例示的な配列 C D 2 8 共刺激性シグナル伝達ドメインは、米国特許第 5 , 6 8 6 , 2 8 1 号 ; G e i g e r , T . L . ら、B l o o d、9 8 巻 : 2 3 6 4 ~ 2 3 7 1 頁 (2 0 0 1 年) ; H o m b a c h , A . ら、J I m m u n o l、1 6 7 巻 : 6 1 2 3 ~ 6 1 3 1 頁 (2 0 0 1 年) ; M a h e r , J . ら、N a t B i o t e c h n o l、2 0 巻 : 7 0 ~ 7 5 頁 (2 0 0 2 年) ; H a y n e s , N . M . ら、J I m m u n o l、1 6 9 巻 : 5 7 8 0 ~ 5 7 8 6 頁 (2 0 0 2 年) ; H a y n e s , N . M . ら、B l o o d、1 0 0 巻 : 3 1 5 5 ~ 3 1 6 3 頁 (2 0 0 2 年) において提示されている。非限定的な例は、下記の C D 2 8 配列 : M L R L L L A L N L F P S I Q V T G N K I L V K Q S P M L V A Y D N A V N L S C K Y S Y N L F S R E F R A S L H K G L D S A V E V C V V Y G N Y S Q Q L Q V Y S K T G F N C D G K L G N E S V T F Y L Q N L Y V N Q T D I Y F C K I E V M Y P P P Y L D N E K S N G T I I H V K G K H L C P S P L F P G P S K P F W V L V V V G G V L A C Y S L L V T V A F I I F W V R S K R S R L L H S D Y M N M T P R R P G P T R K H Y Q P Y A P P R D F A A Y R S (配列番号 3 8) の残基 1 1 4 ~ 2 2 0、およびそれらの同等物を含む。

【 0 0 4 8 】

本明細書で使用される場合、「I C O S 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 I C O S 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子とを指す。I C O S 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 2 0 1 5 / 0 0 1 7 1 4 1 A 1 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。

I C O S 共刺激性シグナル伝達領域、配列番号 4 3 :

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、例示的な配列を含む。

OX40共刺激性シグナル伝達領域、配列番号44：

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 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

【0050】

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

【0051】

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)、Toledo(ATCC CRL-2631)、Pfeiffer(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 Ply1、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-

10

20

30

40

50

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、HDL M - 2、HD - MyZ、HKB - 1、KM - H2、L 428、L 540、L1236、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。

【0052】

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、Deglis、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、NAL-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骨髓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 Microorgani

10

20

30

40

50

sms 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)CRL-2408(商標))を含む。さらなる例は、NK細胞株である、HANK1、KHYG-1、NKL、NK-YS、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。

10

【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。

20

【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を産生するように転写および/または翻訳される場合、「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。

30

【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、パキウウイルス、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。

40

【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、骨髄中で産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

50

髄由来細胞（好中球、好酸球、好塩基球、単球、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。一部の実施形態では、この形質導入は、ベクターを介して行う。

10

【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（efficacious）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。

20

【0062】

「充実性腫瘍」とは、通例、嚢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、組織学的グレードが高度なII型がんを含む。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。

30

【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。

40

【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

50

圏内にある。

【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可能な、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、西洋ワサビペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、 α -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、ボルタンメトリー、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な方法、または ^{32}P 、 ^{35}S 、もしくは ^{125}I などの放射性分子により達成することができる。

10

【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、His、lacZ、GST、マルトース結合性タンパク質、NusA、BCCP、c-myc、CaM、FLAG、GFP、YFP、cherry、チオレドキシニン、poly(NANP)、V5、Snap、HA、キチン結合性タンパク質、Softag 1、Softag 3、Strep、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、FLAG、GFP、YFP、RFP、dTomato、cherry、Cy3、Cy5、Cy5.5、Cy7、DNP、AMCA、ピオチン、ジゴキシゲニン、Tamra、Texas Red、ローダミン、Alexa fluor、FITC、TRITC、または他の任意の蛍光色素もしくはハプテンを含む。

20

【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、mRNAへと転写される過程および/または転写されたmRNA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DNAに由来する場合、発現は、真核細胞内のmRNA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mRNA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。

30

【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、本明細書に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に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

40

50

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=BL0SUM62；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+SwissProttein+SUpdate+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。「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一つと、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ったか、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、ストリンジェントな条件下で、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、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 + Swiss Protein + S P u p d a t e + P I R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、ワトソクリック塩基対合により生じる場合もあり、フーグステ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】

ストリンジェ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。高ストリンジェンシー条件の例は、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、0.15 MのNaClおよび15 mM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ということが理解される。

10

20

30

40

50

【 0 0 7 7 】

「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。

【 0 0 7 8 】

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

20

【 0 0 7 9 】

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産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。

【 0 0 8 0 】

「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。

30

【 0 0 8 1 】

「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

40

50

に付与することもでき、その後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の両方を包含する。

【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、ペプチド、タンパク質、生物学的複合体、または他の活性化化合物とは、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、従来技法では、他の高分子種は、検出可能でない。

10

20

【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、次にこれを使用して、異種タンパク質を作製するように、宿主細胞を形質転換する。

30

【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、検出不能であれ、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(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(部分的であれ、完全であれ)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。

40

【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】

50

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、gly-gly-gly-gly-ser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(WHP)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(HBVPRE)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

MFI: 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: 単鎖可変断片

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】

10

20

30

40

50

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、 α -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。

10

【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。

20

【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。

30

【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可能な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。

40

【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】

50

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、以下の配列：(i) GFNIKDTY (配列番号1)、(ii) GFTFNTYA (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) IDPANGNT (配列番号3)、(ii) IRSKSNNTYA (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。

10

【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)、(ii) VRGGYWSFDV (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。

20

【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：
 CAGGTGCAGCTGCAGGAGTCAAGGGGCAGAGCTTGTGAAGC
 CAGGGGCCCTCAGTCAAGTTGTCTGCAACAGCTTCTGGCTT
 CAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGTGAAGCAGAGG
 CCTGAACAGGGCCTGGAGTTGGATTGGAAGGATTGATCCTG
 CGAATGGTAATACTAATAATGACCCGAAGTTCCAGGGCA
 GGCCACTATAACAGCAGACACATCCTCCAACACAGCCTAC
 CTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACTGCCGTCT
 ATTACTGTGCTAGGAGTTACTACGGGGGGTTTGTCTTACTG
 GGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (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

40

【0100】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、アミノ酸配列：
 QVQLQESGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQR
 PEQGLEWIGRIDPANGNTKYDPKFKQKATITADTSSNTAY
 LQLSSLTSEDTAVYYCARSYYGGFAYWGQGLVTVSA (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：
 GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGC

50

CTAAAGGATCATTGAAACTCTCATGTGCGCCCTTTGGTTT
CACCTTCAATACCTATGCCATGCACTGGGTCCGCCAGGCT
CCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTGCTCGCATAAAGAAAGTA
AAAGTAATAATTATGCAACATAATTATGCCGATTCAGTGA
AGACAGATTCCACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATG
CTCTCTCTGCAAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGGACACAG
CCATTTATTACTGTGTGAGAGGGGGTTACTGGAGCTTCGA
TGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (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
れらからなる。

10

【0102】

一部の実施形態では、重鎖可変領域は、アミノ酸配列：

EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSCAAFGFTFNTYAMHWVRQA
PGKGLEWVARIRSKSNNTYATYYADSVKDRFTISRDDSQSM
LSLQMNNLKTEDTAIYYCVRGGYWSFDVWGA GTTVTVSS (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)KSVSTSGYSY (配
列番号11)、(ii)KSLLSHNGNTY (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CDR
L1配列を含む。

20

【0104】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、LVS (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1
0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CDRL2配列を含む。

30

【0105】

他の実施形態では、軽鎖可変領域は、RMS (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CDRL2配列を含む。

40

【0106】

一部の実施形態では、軽鎖可変領域は、以下の配列：(i)QHSRELPRT (配列
番号15)、(ii)MQHLEYPYT (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CDRL3配
列を含む。

50

【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 A 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
 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。

10

【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。

20

【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 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 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。

30

【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。

40

【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；

50

(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。

【 0 1 1 2 】

開示される C D R 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:

10

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

20

【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

【 0 1 1 3 】

一態様では、本開示は、3 H 1 1 および H L A - G 4 E 3 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。

30

【 0 1 1 4 】

一態様では、本開示は、3 H 1 1 の C D R を含む単離抗体を提示する。一態様では、本開示は、3 H 1 1 と少なくとも 85 % 同一である単離抗体を提示する。

【 0 1 1 5 】

一態様では、本開示は、H L A - G 4 E 3 の C D R を含む単離抗体を提示する。一態様では、本開示は、H L A - G 4 E 3 と少なくとも 85 % 同一である単離抗体を提示する。

【 0 1 1 6 】

本明細書で提示される抗体についての一部の態様では、H C 可変ドメイン配列は、3 H 1 1 の可変ドメイン配列を含み、L C 可変ドメイン配列は、3 H 1 1 の可変ドメイン配列を含む。

40

【 0 1 1 7 】

本明細書で提示される抗体についての一部の態様では、H C 可変ドメイン配列は、H L A - G 4 E 3 の可変ドメイン配列を含み、L C 可変ドメイン配列は、H L A - G 4 E 3 の可変ドメイン配列を含む。

【 0 1 1 8 】

本明細書で提示される抗体について一部の態様では、抗体は、ヒト H L A - G に、 10^{-4} M、 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10}

50

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。

【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、異なるポリペプチド鎖の構成要素である。

10

【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、Fab、F(ab)'₂、Fab'、scF_v、およびF_vからなる群より選択される。

20

【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、Fc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。

【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：

30

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

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。

40

【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】

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

50

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

【化2】

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLAACLITGYHPTSVTVTWYMGTSQSPQRTFPEIQ
RRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPEPKAQASSVPTA
QPQAEGSLAKATTAPATTRNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVY
LLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNG
SQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLASS
DPPEAASWLLCEVSGFSPPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVL
RVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSyvTDHGPMK

10

20

【0133】

ヒトIgG1定常領域；Uniprot：P01857 配列番号22

【化3】

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG
SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

【0134】

ヒトIgG2定常領域；Uniprot：P01859 配列番号23

【化4】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVA
GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQFNSTFRVVSVLTVVHQQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

【0135】

ヒトIgG3定常領域；Uniprot：P01860 配列番号24

【化5】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRC
 PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSGDSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNIFSCSVMHREALHNRFTQKSLSLSPGK

10

【0136】

ヒトIgM定常領域；Uniprot：P01871 配列番号25

【化6】

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSV
 LRGGKYAATSQVLLPSKDVMOGTDEHVVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS
 FVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESG
 PTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDTAIRVFAIPPS
 FASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEAS
 ICEDDWNSGERFTCTVHTDLPSPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESA
 TITCLVTGFSPADVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEEE
 WNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

20

【0137】

ヒトIgG4定常領域；Uniprot：P01861 配列番号26

【化7】

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEFLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFL
 YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKSLSLSLGK

30

【0138】

ヒトIgA1定常領域；Uniprot：P01876 配列番号27

40

【化8】

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQGV TARNFPPSQD
 ASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCVPVSTPPTSPSTPP
 TPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLL GSEANLTCTLTGLRDASGVTFTWTPSSGKSAVQGP
 PERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVH
 LLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREK YLTWASRQEPSQG
 TTTFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVV
 MAEVDGTCY

10

【0139】

ヒトIgA2定常領域；Uniprot：P01877 配列番号28

【化9】

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESGQNV TARNFPPSQD
 ASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCVPPPPPCCHPRLSL
 HRPALDLLL GSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGP PERDLCGCYSVS
 SVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNE
 LVTLTCLARGFSPKDVLRWLQGSQELPREK YLTWASRQEPSQGT TTTFAVTSILRVA
 AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

20

【0140】

ヒトIgCα定常領域；Uniprot：P01834 配列番号29

TVAAPS VFI FPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQW
 KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEK
 HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

を含む。

30

【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-G4E3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-G4E3と競合する。

40

【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。

【0146】

50

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、またはなおさらにこれ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。

10

【0148】

II. 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、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）。

20

【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産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、プ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。

30

【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、異なる抗体を産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（WO2004/061104を参照されたい）。

40

【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、培養物中の連続的な細胞株による抗体分子の産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

50

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、エプ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、またはなおさらにこ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、Milsteinら（Galfrè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)ポリエチレングリコール（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。

【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、F_v、またはジ

スルフィド安定化F_v抗体ドメインを、組換えにより、ファージ遺伝子IIIまたはVII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、またはその誘導體、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る。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ら); 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5,821,047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、WO92/22324; Mullinaxら、BioTechniques、12巻:864~869頁(1992年); Sawaiら、AJRI、34巻:26~34頁(1995年); およびBetter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F(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改変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(改変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。

10

20

30

40

50

【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*における産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。

10

20

【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 $F(ab')_2$ 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Fab断片も、作出することができる。代替的に、Fab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Fab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。

30

【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、ポリエチレングリコール（PEG）など、多様な種類の分子に結合させることができる。

40

【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（19

50

83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。

【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)。

10

【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。

20

【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、Sephacrose F.F. (Pharmacia) などを含む。

【0165】

III. 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、アフィニティーク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る。

30

40

【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

50

ニティーク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；アフィニティークロマトグラフィー；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、ク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ク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ブ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ライド製の膜など)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/またはウェスタンブロット法などのイムノブロット法に有用である。

10

20

【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に、DNAプローブを、ビオチンで末端標識することを含む。

30

【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)、ウェスタンブロット、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。

40

【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: 3087~3

50

096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(^{125}I 、 ^{121}I 、 ^{131}I)、炭素(^{14}C)、硫黄(^{35}S)、トリチウム(^3H)、インジウム(^{112}In)、およびテクネシウム($^{99\text{m}}\text{Tc}$)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ダミンなどの蛍光標識、ならびにビオチンを含む。

【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 scF_v クロー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。

10

【0172】

放射性同位元素(例えば、 ^{131}I 、 ^{112}In 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$)、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。ヒト対象のための放射性同位元素部分の場合、注射される放射線の量は通常、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 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。

20

【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。

30

【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、よりストリンジェ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

40

50

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な存在下で、単一の抗原を検出するために有用である。

10

【0176】

本開示のHLA-G抗体を、任意の種類 of 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、ウェスタンブロット法、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3,867,517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。

20

【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。

30

【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。

40

【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

50

、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。

【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を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。

10

【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。

20

【0183】

本開示のさらなる態様は、患者が、HLA-G CAR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HLA-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、HLA-G CAR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、HLA-G療法に反応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HLA-G CAR療法を、HLA-G CAR療法に反応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。

30

【0184】

IV. キット

本明細書で明示される通り、本開示は、HLA-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。

40

【0185】

キットは、本明細書で開示されるHLA-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HLA-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

50

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。

【0186】

一部の態様では、キットは、生物学的試料中のHLA-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HLA-G抗体（例えば、HLA-G抗体である、3H11またはHLA-G 4E3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HLA-Gポリペプチドの量を決定するための手段と；試料中のHLA-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。HLA-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、HLA-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、HLA-Gポリペプチドに結合する第1の抗体と；任意選択で；2）HLA-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。

10

【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であってよい。本開示のキットは、キットの容器上ま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。

20

【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。

30

【0190】

キメラ抗原受容体およびそれらの使用

40

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HLA-Gに結合するキメラ抗原受容体（CAR）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。CARは、任意選択で、最大で300アミノ酸、好ましくは10~100アミノ酸、より好ましくは25~50アミノ酸のスペーサドメインをさらに含みうる。

【0191】

抗原結合性ドメイン。ある特定の態様では、本開示は、HLA-Gに特異的な抗原結合

50

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、またはなおこれらなる。

【 0 1 9 2 】

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。

10

【 0 1 9 3 】

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 i p l e t) 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 ~ 1 0 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、C A R 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 (d o u b l e t) は、特に適切なリンカーをもたらす。

20

【 0 1 9 4 】

細胞質ドメイン。C A R 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、C A R 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。T C R および共受容体のほか、それらの誘導体または改変体の細胞質配列は、C A R 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、F c R、T C R、C D 3、C D 5、C D 2 2、C D 7 9 a、C D 7 9 b、C D 6 6 d に由来しうる。T C R 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、C D 2 7、C D 2 8、4 - 1 B B (C D 1 3 7)、O X 4 0、C D 3 0、C D 4 0、P D - 1、I C O S、リンパ球機能関連抗原 1 (L F A - 1)、C D 2、C D 7、L I G H T、N K G 2 C、B 7 - H 3、または C D 8 3 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、C A R の細胞質ドメインに組み入れることができる。

30

40

【 0 1 9 5 】

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、C D 8 タンパク質、C D 2 8 タンパク質、4 - 1 B B タンパク質、および C D 3 - 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

50

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む。

10

【0198】

II. 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、本明細書に記載される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。

20

【0200】

具体的な実施形態では、単離細胞は、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、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、またはなおさらにこれらからなる外因性CAR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らからなる。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、NK細胞、例えば、動物NK細胞、哺乳動物NK細胞、ネコ科動物NK細胞、イヌ科動物NK細胞、またはヒトNK細胞である。

30

【0201】

ある特定の実施形態では、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、HLA-G 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細胞であり、これにより、HLA-G CAR T細胞を作製する。ある特定の実施形態では、単離細胞は、NK細胞、例えば、動物NK細胞、哺乳動物NK細胞、ネコ科動物NK細胞、イヌ科動物NK細胞、またはヒトNK細胞であり、これにより、HLA-G CAR NK細胞を作製する。

40

【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】

50

細胞は、対象におけるいくつかの供給源であって、末梢血単核細胞、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、Life Technologies Dynabeads（登録商標）システム；STEMcell Technologies EasySep（商標）、RoboSep（商標）、RosetteSep（商標）、SepMate（商標）；Miltenyi Biotec MACS（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、MACS（商標）CD4+およびCD8+ MicroBeadsを使用して、CD4+およびCD8+ T細胞を単離することができる。

10

【0205】

代替的に、細胞は、T細胞については、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））を含むがこれらに限定されず；NK細胞については、細胞株である、NK-92（ATCC（登録商標）CRL-2407（商標））、NK-92MI（ATCC（登録商標）CRL-2408（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。

20

【0206】

ベクター。CAR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、HLA-G CARをコードする単離核酸配列と、CAR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、またはなおさらにこれからなるベクターとに関する。

30

【0207】

一部の実施形態では、単離核酸配列は、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、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、またはなおさらにこれらからなるCAR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HLA-G抗体の抗原結合性ドメインに続き、(b)CD8 ヒンジドメイン、(c)CD8 膜貫通ドメインに続き、(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に続き、(e)CD3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、またはなおさらにこれらからなる。

40

【0208】

一部の実施形態では、単離核酸配列は、抗HLA-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Kozakコンセンサス配列を含むか、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。

【0209】

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。

50

【0210】

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CAR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、CARをコードする核酸の発現は、CAR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み込みに適しうる。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、Sambrookら(2001年、Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)を参照されたい。

10

【0211】

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(HIV)、ウマ伝染性貧血ウイルス(EIAV)、サル免疫不全症ウイルス(SIV)、およびネコ免疫不全症ウイルス(FIV)を含む。代替的に、マウス白血病ウイルス(MLV)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ない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、所望の特徴を得ることができる。

20

【0212】

本開示の組換えベクターは、霊長動物および非霊長動物に由来する。霊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。非霊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。

30

【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み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、ポ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、プロウイルスの組み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

40

50

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）へとプロセッシングされる。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。

10

【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しこともできる。当業者には、関与する技法が公知である。

20

【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 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。

30

【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ブロット法、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およびウェスタンブロット）または本明細書に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イルスの産生を伴わずに、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

40

50

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プサイ機能配列、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、ウイルスの産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(HTLV)env遺伝子産物をコードする遺伝子、前述のenv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env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。

【0219】

パッケージング工程では、パッケージングプラスミドと、LHR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、293細胞(ATCC番号: CRL1573、ATCC、Rockville, Md.)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スフェクトして、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、一過性にトランスフェ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スフェ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。

【0220】

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、293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スフェ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。

【0221】

T細胞の活性化および拡大: 所望のCAR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6,352,694号;同第6,534,055号;同第6,905,680号;同第6,692,964号;同第5,858,358号;同第6,887,466号;同第6,905,681号;同第7,144,575号;同第

7, 067, 318号; 同第7, 172, 869号; 同第7, 232, 566号; 同第7, 175, 843号; 同第5, 883, 223号; 同第6, 905, 874号; 同第6, 797, 514号; 同第6, 867, 041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。ex vivoにおけるHLA-G抗原による刺激は、選択されたCARを発現させる細胞垂集団を活性化させ、拡大することができる。代替的に、細胞は、HLA-G抗原との相互作用により、in vivoにおいて活性化させることができる。

【0222】

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、Life Technologies Dynabeads (登録商標) システム活性化および拡大キット; BD Biosciences Phosflow (商標) 活性化キット、Miltenyi Biotec MACS (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。免疫細胞の特定の垂集団は、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、-CD3 / -CD28 Dynabeads (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。

10

【0223】

III. 使用法

20

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/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、HLA-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、またはなおさらにこれらなる。さらなる実施形態では、この単離細胞は、HLA-G CAR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NK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、HLA-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。

30

【0224】

本明細書で開示されるCAR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。

【0225】

40

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。

【0226】

IV. 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、HLA-G CARを含む単離細胞、任意の抗HLA-G抗体またはCAR細胞のための単離核酸、ベクター、単離細胞、抗HLA-G)のうちの1または複数とを含む組成物に関する。

【0227】

50

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、本明細書に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；EDTA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。

10

【0228】

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、連続的に行うこともでき、間欠的に行うこともできる。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。

【0229】

当技術分野で公知であり、例えば、PCT/US2011/064191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うことができる。

20

【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、MyBioSource.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GSHSMRYFSA AVSRPGRGEP RFIAMGYVDD TQFVRFDSDS ACPRMEPRAP WVEQEGPEYW EEETRNTKAH AQTDRMNLQT LRGYYNQSEA SSHTLQWMIG CDLGSDGRLR RGYEQYAY DG KDYLALNEDL RSWTAADTAA QISKRKCEAA NVAEQRRAYL EGTCEVWHLA-G YLENGKEMLQ RADPPKTHV T HHPVFDYEAT LRCWALGFYP AEIILT WQRD GEDQT QDVEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVP SGEEQRYTCH V QHEGLPEPL MLRWKQSSLP T IPI MGI VAGLVVLA AV VTGA AVA AVL WRKKSSD（配列番号30）の配列を有する。

30

40

【0232】

免疫化手順

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、最高力価を示すマウスの静脈内に、5回目の免疫化

50

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、滅菌リン酸緩衝食塩水の100 μ l溶液中の10 μ gを注射した。

【0233】

ハイブリドーマの作出

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(HybridMAX、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数(MFI)を示すハイブリドーマを、限界希釈法によるサブクロニングのために選択した。次いで、サブクロンを、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。

10

【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、高い平均蛍光指数(MFI)をもたらすハイブリドーマをサブクロニングし、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のサブクロンは、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。

20

【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ンは、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-G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であろう。

30

【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

40

50

(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遺伝子を含む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

NovaBlue 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、一晚にわたるT₄ DNA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(Ψ)、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)を含む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に、適切な制限酵素で消化する。次いで、NovaBlue 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を含むレンチウイルスプラスミドで形質転換する。

10

【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、一晚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、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に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む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 DMEM 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。

20

30

【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-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を含む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、磁氣的に活性化させた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、磁氣的に結合した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、新鮮な完全培地中で洗浄する。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コア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

40

50

細胞培養容器内で、 100 IU/mL のIL-2を補充された完全培地中、 1 mL 当たりの細胞 1.0×10^6 個の密度で維持し、これに、 $\alpha\text{-CD3}/\alpha\text{-CD28}$ 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、 $5\% \text{ CO}_2$ インキュベーター内、 37°C 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 1 mL 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、 $4\text{ }\mu\text{g/mL}$ の最終濃度で添加する。プレートを、 32°C 、 $800 \times g$ 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、 100 IU/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、 $5\% \text{ CO}_2$ の加湿されたインキュベーター内、 37°C 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、 $400\text{ }\mu\text{g/mL}$ 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 1 mL 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、 $15\text{ }\mu\text{M}$ で、標的細胞試料へと添加し、次いで、これを、 $5\% \text{ CO}_2$ の加湿されたインキュベーター内、 37°C で、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、 $365 \times g$ および 20°C で、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、 $485/20\text{ nm}$ および $528/20\text{ nm}$ の励起および発光で、蛍光について評価する。

【0242】

Luminesx 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。

10

【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。

20

【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

CARは、HLA-Gに特異的に結合する、細胞外抗原結合性部分またはscFVからなる。scFVは、CD8ヒンジ領域を介して、CD8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CD28、4-1BB、およびCD3ζ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scFV配列は、合成により、Genewiz Gene Synthesis Services (Piscataway, NJ)が合成した。プラスミドを精製し、一晚にわたるT₄ DNAリガーゼ反応(New England Biosciences; Ipswich, MA)を介して、HIV-1 5'および3'末端反復(LTR)、パッケージングシグナル(Ψ)、EF1プロモーター、内部リボソーム侵入部位(IRES)、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-1ベースのサイストロニックレンチウイルスベクター(pLVX-IRES-ZsGreen, 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、CARを含有するレンチウイルスプラスミドで形質転換する。

30

【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、HEK293T細胞を、10%の透析FCSを補充した、20mLのDMEM中に150cm²の組織培養処理フラスコ1つ中の細胞 4.0×10^6 個で播種し、加湿された5%CO₂インキュベーター内、37℃で、一晚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、HEK293T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FCSを補充した、20mLのDMEM中、37℃で、2時間にわたりインキュベートする。HEK293T細胞に、pLVX-B7-H4-CAR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。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に、特許権

40

50

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HEK293T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DMEM 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℃、1,250rpmで、5分間にわたり遠心分離するのにつき、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%BSAを補充したPBS中に再懸濁させる。次いで、レンチウイルスを、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、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、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。蛍光タンパク質マーカーであるZsGreen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CD4⁺およびCD8⁺末梢血T細胞の精製、活性化、および濃縮

Ficoll-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氣的に単離するのに、T細胞濃縮キット(Stem Cell Technologies)を使用する。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

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。細胞をスピンドウンし、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。

【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

10

20

30

40

50

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、1,250 rpm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、650 nmで吸光度補正して、プレートを、450 nmで読み取る。

【0250】

ウェスタンブロット法

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、 α -アクチンについて再プローブする。

【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。0.2 mLの接種物を使用して、200 μ lのリン酸緩衝食塩水(PBS)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

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

HLA-G CARを形質導入されたT細胞は、ウェスタンブ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。 α -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

10

20

30

40

50

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】

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。

10

【0256】

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垂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。

20

【0258】

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。

【0259】

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。

30

【0260】

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 2 0 1】

HLA-G 配列**CDRH1**

GFNIKDTY (配列番号 1)

GFTFNTYA (配列番号 2)

CDRH2

IDPANGNT (配列番号 3)

IRSKSNYAT (配列番号 4)

CDRH3

ARSYYGGFAY (配列番号 5)

VRGGYWSFDV (配列番号 6)

HC1

AGGTGCAGCTGCAGGAGTCAGGGGCAGAGCTTGTGAAGCCAGGGGCCTCAGTCA
 AGTTGTCCTGCACAGCTTCTGGCTTCAACATTAAGACACCTATATGCACTGGGT
 GAAGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGAAGGATTGATCCTGCGAA
 TGGTAATACTAAATATGACCCGAAGTTCAGGGCAAGGCCACTATAACAGCAGA
 CACATCCTCCAACACAGCCTACCTGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACACT
 GCCGTCTATTACTGTGCTAGGAGTTACTACGGGGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAG
 GGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA (配列番号 7)

QVQLQESGAELVKPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHVVKQRPEQGLEWIGRIDPANG
 NTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLSSLTSEDTAIVYYCARSYYGGFAYWGQGL
 VTVSA (配列番号 8)

HC2

GAGGTGCAGCTGCAGGAGTCTGGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTG
 AACTCTCATGTGCCGCTTTGGTTTCACCTTCAATACCTATGCCATGCACTGGGT
 CCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAAATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAG
 TAATAATTATGCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCTCC
 AGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTCTCTGCAAATGAACAACCTGAAAACCTGAG

10

20

30

40

【化 2 0 2】

GACACAGCCATTTATTACTGTGTGAGAGGGGGTTACTGGAGCTTCGATGTCTGGG
GCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA (配列番号 9)

EVQLQESGGGLVQPKGSLKLSCAAFGFTFNTYAMHWVRQAPGKGLEWVARIRSKS
NNYATYYADSVKDRFTISRDDSQSMLSLQMNNLKTEDTAIYYCVRGGYWSFDVWG
AGTTVTVSS (配列番号 10)

CDRL1

10

KSVSTSGYSY (配列番号 11)

KSLLSNGNTY (配列番号 12)

CDRL2

LVS (配列番号 13)

RMS (配列番号 14)

20

CDRL3

QHSRELPRT (配列番号 15)

MQHLEYPYT (配列番号 16)

LC 1

GATATTGTGCTCACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAGGG
CCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACATCTGGCTATAGTTATAT
GCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTCCTCATCTATCTTGTA
TCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAG
ACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCTATTACTG
TCAGCACAGTAGGGAGCTTCCTCGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAAT
CAAA (配列番号 17)

30

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPLLIYLVSNL
ESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPRTFGGGTKLEIK (配列番号

40

18)

LC2

【化 2 0 3】

GATATTGTGATCACACAGACTACACCCCTCTGTACCTGTCACCTCCTGGAGAGTCAG
 TATCCATCTCCTGTAGGTCTAGTAAGAGTCTCCTGCATAGTAATGGCAACACTTA
 CTTGTATTGGTTCCTGCAGAGGCCAGGCCAGTCTCCTCAGCTCCTGATATCTCGG
 ATGTCCAGCCTTGCCTCAGGAGTCCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGGTCAGGA
 ACTGCTTTCACACTGAGAATCAGTAGAGTGGAGGCTGAGGATGTGGGTGTTTATT
 ACTGTATGCAACATCTAGAATATCCGTATACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGG
 AAATAAAA (配列番号 19)

10

DIVITQTTSPVPVTPGESVSISCRSSKSLLSHNGNTYLYWFLQRPQGQSPQLLISRMSSLA
 SGVPDRFSGSGSGTAFTLRISRVEAEDVGVVYCMQHLEYPYTFGGGKLEIK (配列番号 20)

Ig

ヒトIgD定常領域 , Uniprot: P01880 配列番号 21

APTKAPDVFPIISGCRHPKDNSPVVLAELITGYHPTSVTVTWYMGTSQSPQRTFPEIQ
 RRDSYYMTSSQLSTPLQQRQGEYKCVVQHTASKSKKEIFRWPESPKAQASSVPTA
 QPQAEGSLAKATTAPATRNTGRGGEEKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVY
 LLTPAVQDLWLRDKATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHSNG
 SQSQHSRLTLPRSLWNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAQAPVKLSLNLLASS
 DPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPPQPGSTTFWAWSVL
 RVPAPPSPQPATYTCVVSHEDSRTLLNASRSLEVSIVTDHGPMK

20

ヒトIgG1定常領域 , Uniprot: P01857 配列番号 22

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAK
 TKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
 PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG
 SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

30

ヒトIgG2定常領域 , Uniprot: P01859 配列番号 23

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVA
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR

40

【化 2 0 4】

EEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVY
 TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFL
 YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

ヒトIgG3定常領域, Uniprot: P01860 配列番号 24

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKPSNTKVDKRVELKTPLGDTTHTCPRC
 PEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPP
 KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFKWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEM
 TKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQQGNIFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSPGK

10

ヒトIgM定常領域, Uniprot: P01871 配列番号 25

GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYKNNSDISSTRGFPSV
 LRGGKYAATSQVLLPSKDVMQGTDEHVCKVQHPNGNKEKNVPLPVIAELPPKVS
 FVPPRDGFFGNPRKSKLICQATGFSPRQIQVSWLREGKQVGSVTTDQVQAEAKESG
 PTTYKVTSTLTIKESDWLGQSMFTCRVDHRGLTFQQNASSMCVPDQDAIRVFAIPPS
 FASIFLTKSTKLTCLVTDLTTYDSVTISWTRQNGEAVKTHTNISESHPNATFSAVGEAS
 ICEDDWNSGERFTCTVTHDLP SPLKQTISRPKGVALHRPDVYLLPPAREQLNLRESA
 TITCLVTGFSPADV FVQWMQRGQPLSPEKYVTSAPMPEPQAPGRYFAHSILTVSEE
 WNTGETYTCVAHEALPNRVTERTVDKSTGKPTLYNVSLVMSDTAGTCY

20

30

ヒトIgG4定常領域, Uniprot: P01861 配列番号 26

ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ
 SSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVNHDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPSCPAPEFLG
 GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPR
 EEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
 YSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

40

ヒトIgA1定常領域, Uniprot: P01876 配列番号 27

ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACL VQGFFPQEPLSVTWSESGQGV TARNFPPSQD
 ASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCVPSTPPTPSPSTPP

【化 2 0 5】

TPSPSCCHPRLSLHRPALEDLLLSEANLTCTLTGLRDASGVFTFTWTPSSGKSAVQGP
 PERDLCGCYSVSSVLPGCAEPWNHGKTFTCTAAYPESKTPLTATLSKSGNTFRPEVH
 LLPPPSEELALNELVTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYL TWASRQEPSQG
 TTTFAVTSILRVA AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRLAGKPTHVNVSVV
 MAEVDGTCY

ヒトIgA2定常領域 , Uniprot: P01877 配列番号 28

10

ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACL VQGFPPQEPLSVTWSESGQNV TARNFPSSQD
 ASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKHYTNPSQDVTVPCPVPPPPCCHPRLSL
 HRPALDLLLSEANLTCTLTGLRDASGATFTWTPSSGKSAVQGP PERDLCGCYSVS
 SVLPGCAQPWNHGETFTCTAAHPELKTPLTANITKSGNTFRPEVHLLPPPSEELALNE
 LVTLTCLARGFSPKDVLVRWLQGSQELPREKYL TWASRQEPSQGT TTTFAVTSILRVA
 AEDWKKGDTFSCMVGHEALPLAFTQKTIDRMAGKPTHVNVSVVMAEVDGTCY

ヒトIgカッパ定常領域 , Uniprot: P01834 配列番号 29

20

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE
 QDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

HLA-G

GSHSMRYFSA AVSRPGRGEP RFIAMGYVDD TQFVRFDSDS ACPRMEPRAP
 WVEQEGPEYW EEETRNTKAH AQTDRMNLQT LRGYYNQSEA SSHTLQWMIG
 CDLGSDGRLL RGYEQYAYDG KDYLALNEDL RSWTAADTAA QISKRKCEAA
 NVAEQRRAYL EGTCVEWHLA-G YLENGKEMLQ RADPPKTHVT HHPVFDYEAT
 LRCWALGFYP AEIILTWQRD GEDQTQDVEL VETRPAGDGT FQKWA AVVVP
 SGEEQRYTCH VQHEGLPEPL MLRWKQSSLP TIPIMGI VAGLVVLA AV
 VTGAAVA AVL WRKKSSD (配列番号 30)

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:

PAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIY

40

マウスCD8アルファヒンジドメイン , 配列番号 32:

KVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIY

【化 2 0 6】

ネコCD8アルファヒンジドメイン , 配列番号 : 33:

PVKPTTTPAPRPPTQAPITTSQRVSLRPGTCQPSAGSTVEASGLDLSCDIY

ヒトCD8アルファ膜貫通ドメイン , 配列番号 : 34:

IYIWAPLAGTCGVLLLSLVIT

マウスCD8アルファ膜貫通ドメイン , 配列番号 : 35:

IWAPLAGICVALLLSLITLI

ラットCD8アルファ膜貫通ドメイン , 配列番号 : 36:

IWAPLAGICAVLLLSLVITLI

4-1BB共刺激性シグナル伝達領域 , 配列番号 : 37:

KRGRKLLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL

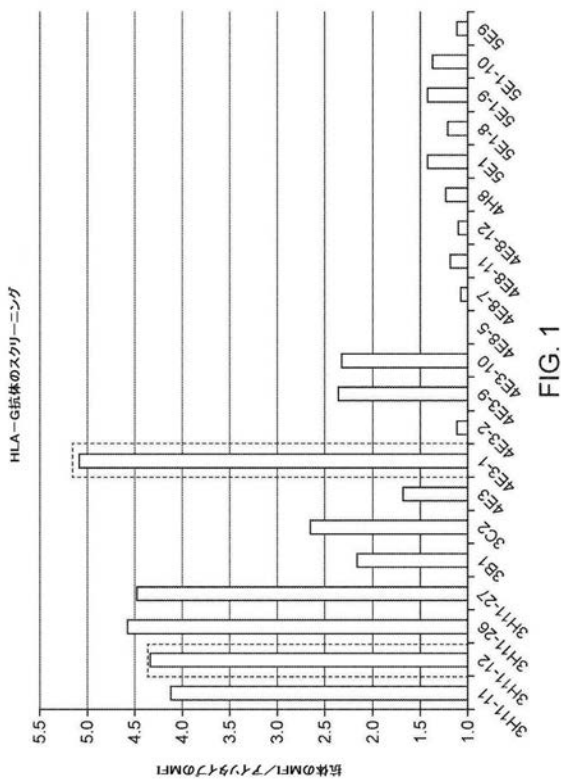
CD3ゼータシグナル伝達ドメイン , 配列番号 : 38:

RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPENGGKPRRKNPQ
EGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALP
PR

10

20

【 図 1 】



【 図 2 A 】



FIG. 2A

【 図 2 B 】

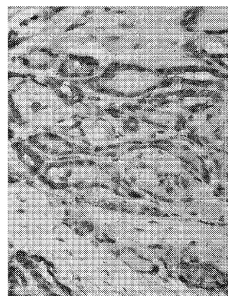


FIG. 2B

【 図 2 C 】

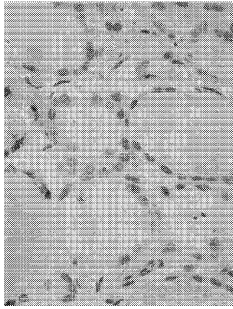


FIG. 2C

【 図 2 D 】

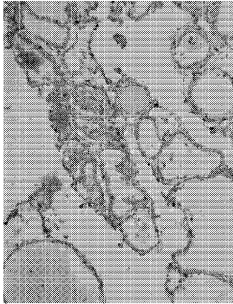


FIG. 2D

【 図 3 】

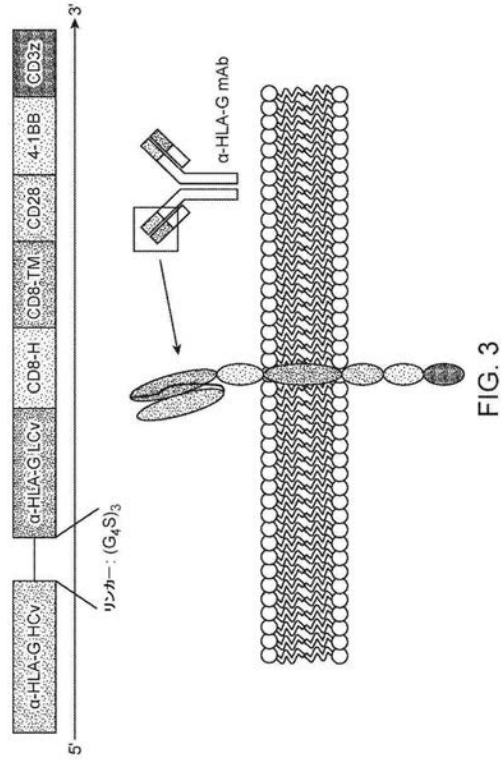


FIG. 3

【 図 4 】

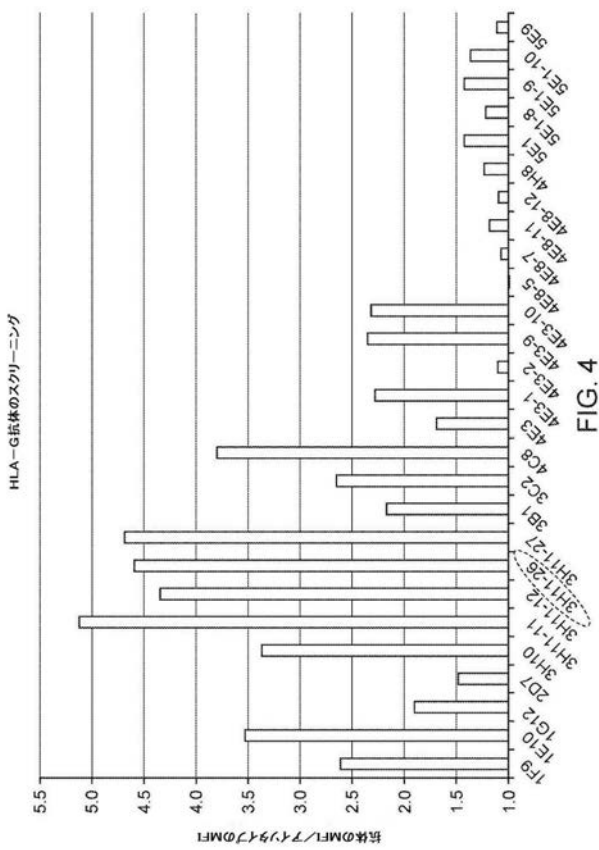


FIG. 4

【 図 5 】

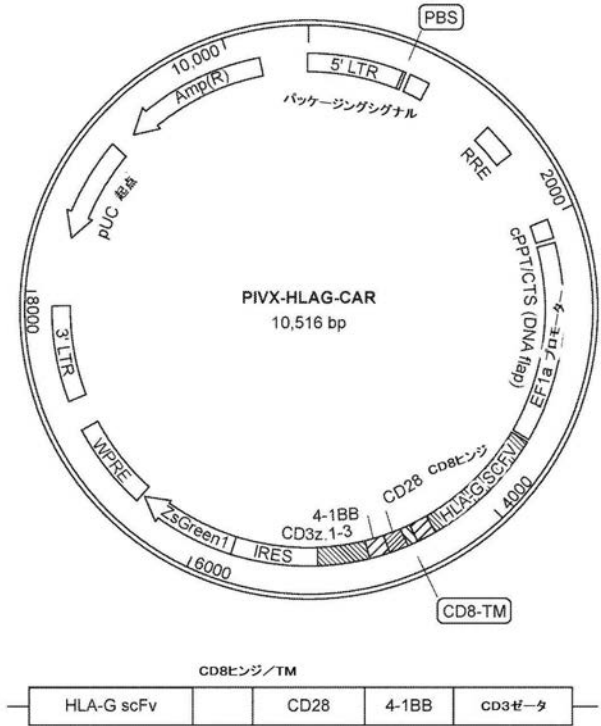


FIG. 5

【 図 6 】

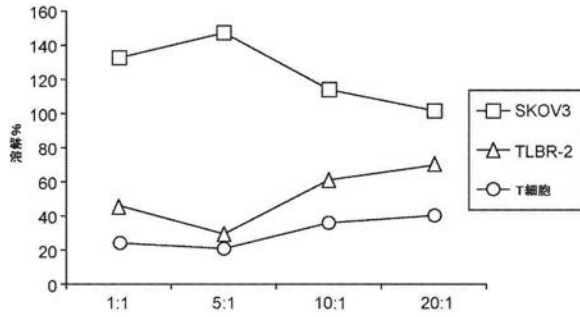
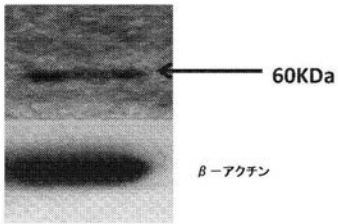


FIG. 6

【 図 7 】

FIG. 7



【 配列表 】

[2018511319000001.xml](#)

【 手続補正書 】

【 提出日 】 平成29年12月18日 (2017.12.18)

【 手続補正 1 】

【 補正対象書類名 】 明細書

【 補正対象項目名 】 配列表

【 補正方法 】 追加

【 補正の内容 】

【 配列表 】

[2018511319000001.app](#)

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US 16/24361
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(8) - G01N 33/53, G01N 33/537, G01N 33/543 (2016.01) CPC - G01N 33/564, A61K 38/00, A61K 2039/505 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC(8)- G01N 33/53, G01N 33/537, G01N 33/543 (2016.01) CPC- G01N 33/564, A61K 38/00, A61K 2039/505 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched USPC- 435/7.92, 530/388.1, 435/535 (keyword search, terms below) Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) PubWEST (USPT, PGPB, EPAB, JPAB), Google Patents/Scholar Search Terms Used: HLA-G, antibody, detection, tumor, diagnosis, GFNIKDTY, IDPANGNT, QHSRELPRT, KSVSTSGYSY, LVS, ARSYGJCJFAY		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X -- A	"Soluble HLA-A, -B, -C and -G molecules induce apoptosis in T and NK CD8+ cells and inhibit cytotoxic T cell activity through CD8 ligation" (Contini et al.) Eur. J. Immunol. 2003. 33: 125-134; pg 132, col 1, para 1.	1 -- 2-3, 29
A,P	Product Datasheet, HLA G Antibody (www.novusbio.com) [retrieved on 28 September 2016 from http://www.novusbio.com/PDFs/NBP1-43123-0.1mg.pdf] (updated 01 March 2016 v.20.1); page 1, 3	1
A	UniProt entry P17693 [retrieved on 28 September 2016 from http://www.uniprot.org/uniprot/P17693] (22 January 2014) whole doc.	1
A	US 2005/0196397 A1 (Scheiflinger et al.) 08 September 2005 (08.09.2005) abstract, para [0061], SEQ ID NO: 102	2-3, 29
A	US 2005/0064518 A1 (Albone et al.) 24 March 2005 (24.03.2005) abstract, para [0026], SEQ ID NO: 55	2-3, 29
A	US 2002/0015973 A1 (Librach et al.) 07 February 2002 (07.02.2002) para [0026]	29
A,E	US 2016/0272724 A1 (Loustau et al.) 22 September 2016 (22.09.2016) whole doc.	1-3, 29
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 28 September 2016		Date of mailing of the international search report 24 OCT 2016
Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-8300		Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/24361

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

This application contains the following inventions or groups of inventions which are not so linked as to form a single general inventive concept under PCT Rule 13.1. In order for all inventions to be examined, the appropriate additional examination fees must be paid.

Group I+: claims 1-3 and 29, drawn to an isolated antibody that binds to an epitope of HLA-G and to a method of using said antibody to detect HLA-G in a tumor sample. The antibody and detection method may be searched to the extent that the antibody comprises HC and LC,
 - wherein the HC comprises: CDRH1 sequence SEQ ID NO: 1, CDRH2 sequence SEQ ID NO: 3, CDRH3 sequence SEQ ID NO: 5, and
 - wherein the LC comprises: CDRL1 sequence SEQ ID NO: 11, CDRL2 sequence SEQ ID NO: 13, CDRL3 sequence SEQ ID NO: 15, i.e. claims 1-3 and 29, limited to SEQ ID NOs: 1, 3, 5, 11, 13, 15. Additional antibodies will be searched upon the payment of additional fees. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antibodies. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. An exemplary election would be an anti-HLA-G antibody that encompasses an HC and LC,
 - wherein the HC comprises: CDRH1 sequence SEQ ID NO: 2, CDRH2 sequence SEQ ID NO: 3, CDRH3 sequence SEQ ID NO: 5, and
 - wherein the LC comprises: CDRL1 sequence SEQ ID NO: 11, CDRL2 sequence SEQ ID NO: 13, CDRL3 sequence SEQ ID NO: 15, i.e. claim 29, limited to SEQ ID NOs: 2, 3, 5, 11, 13, 15.

Group II+: Claims 30-36, drawn to a HLA-G chimeric antigen receptor (CAR). Group II+ will be searched upon payment of additional fees. The HLA-G CAR may be searched for an additional fee and election as such, for example, to the extent that the binding domain of an anti-HLA-G antibody comprises: an anti-HLA-G heavy chain variable region CDR region of SEQ ID NO: 1 (claim 33), a heavy chain of SEQ ID NO: 8 (claim 34), an anti-HLA-G light chain variable region CDR region of SEQ ID NO: 11 (claim 35), and a light chain of SEQ ID NO: 18 (claim 36), i.e. claims 30-36, limited to SEQ ID NOs: 1, 8, 11, and 18. Applicants must specify the claims that encompass any additionally elected antibodies. Failure to clearly identify how any paid additional invention fees are to be applied to the "+" group(s) will result in only the first claimed invention to be searched. Another exemplary election would be a HLA-G CAR comprising a binding domain of an anti-HLA-G antibody that comprises: an anti-HLA-G heavy chain variable region CDR region of SEQ ID NO: 2 (claim 33), a heavy chain of SEQ ID NO: 10 (claim 34), an anti-HLA-G light chain variable region CDR region of SEQ ID NO: 11 (claim 35), and a light chain of SEQ ID NO: 18 (claim 36), i.e. claims 30-36, limited to SEQ ID NOs: 2, 10, 11, and 18.

Group III: Claims 63-64, drawn to a method for determining if a patient is likely to respond to HLA-G CAR therapy.

The inventions listed as Groups I+, II+, and III do not relate to a single general inventive concept under PCT Rule 13.1 because, under PCT Rule 13.2, they lack the same or corresponding special technical features for the following reasons:

Special Technical Features

Group I+ requires an antibody that binds to an epitope of SEQ ID NO: 30, the antibody comprising specific HC CDRH1, CDRH2, CDRH3 sequences and HL CDRL1, CDRL2, CDRL3 sequences, not required by Groups II+ and III. The technical feature of each of the inventions listed as Group I+ is the specific antibody sequences recited therein. Each invention requires antibody HC and LC sequences, not required by any of the other inventions.

Group II+ requires a CAR comprising (a) an antigen binding domain of an anti-HLA-G antibody; (b) a CD8 alpha hinge domain; (c) a CD8 alpha a transmembrane domain; (d) a CD28 costimulatory signaling region and/or a 4-1BB costimulatory signaling region; and (e) a CD3 zeta signaling domain, not required by Groups I+ and III. The technical feature of each of the inventions listed as Group II+ is the specific antibody sequences recited therein. Each invention requires antibody HC and LC sequences, not required by any of the other inventions.

Group III requires method steps for determining whether a patient is likely to respond to HLA-G CAR therapy, not required by Groups I+ and II+.

Common Technical Features

The feature shared by Groups I+, II+ and III is an anti-HLA-G antibody.

Another feature shared by Groups I+ and III are the method steps of: contacting a tumor sample with an anti-HLA-G antibody, and detecting binding of the antibody (claims 29, 63)

The feature shared by the inventions listed as Group I+ is claim 29, a method of detecting HLA-G in a tumor sample comprising (a) contacting the sample with an antibody or an antigen binding fragment of the antibody, wherein the antibody comprises a heavy chain (HC) immunoglobulin variable domain sequence and a light chain (LC) immunoglobulin variable domain sequence, wherein the antibody binds to an epitope of human HLA-G comprising the amino acid sequence; and (b) detecting a complex formed by the binding of the antibody or antigen binding fragment to HLA-G.

However, these shared technical features do not represent a contribution over prior art, because the shared technical features are taught by US 2002/0015973 A1 to Librach et al. (hereinafter "Librach").

Librach discloses an anti-HLA-G antibody (para [0019] "It is yet a further object of the invention to provide specific antibodies to HLA-G."), wherein the antibody comprises a heavy chain (HC) immunoglobulin variable domain sequence and a light chain (LC) immunoglobulin variable domain sequence (para [0040] "An exemplary immunoglobulin, antibody, structural unit comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD)").

---continued on next sheet---

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 18/24361

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Librach further discloses method steps of: contacting a tumor sample with an anti-HLA-G antibody, and detecting binding of the antibody (para [0026] "The invention provides a method for detecting HLA-G in a biological sample comprising the steps of: (a) depositing a biological sample on a support having an immobilized anti-HLA-G antibody bound thereto, wherein the immobilized anti-HLA-G antibody binds to a first region of HLA-G; (b) contacting the support having the biological sample deposited thereon with an HLA-G label, wherein the label binds to a second region of HLA-G; and (c) detecting the label"; para [0034] "The inventive method may be used to diagnose or detect an HLA-G indicative condition ... Such HLA-G indicative conditions may include, ... increased risk of adverse fetal outcome, cancer, or increased risk of cancer development"; para [0211] "Certain cancerous states, such as breast cancer, can be screened using a kit according to the invention. Thus, to ascertain whether a tissue sample may be cancerous or has potential to become cancerous, an HLA-G detection assay can be conducted. The appropriate tissue sample is collected, in this case from a breast tissue biopsy.").

Librach further discloses [claim 29] a method of detecting HLA-G in a tumor sample comprising (a) contacting the sample with an antibody or an antigen binding fragment of the antibody (para [0026] "The invention provides a method for detecting HLA-G in a biological sample comprising the steps of: (a) depositing a biological sample on a support having an immobilized anti-HLA-G antibody bound thereto"), wherein the antibody comprises a heavy chain (HC) immunoglobulin variable domain sequence and a light chain (LC) immunoglobulin variable domain sequence (para [0040] "An exemplary immunoglobulin, antibody, structural unit comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD)"), wherein the antibody binds to an epitope of human HLA-G comprising the amino acid sequence (para [0026] "the immobilized anti-HLA-G antibody binds to a first region of HLA-G"); and (b) detecting a complex formed by the binding of the antibody or antigen binding fragment to HLA-G (para [0026] "(b) contacting the support having the biological sample deposited thereon with an HLA-G label, wherein the label binds to a second region of HLA-G; and (c) detecting the label").

As the technical features were known in the art at the time of the invention, they cannot be considered special technical features that would otherwise unify the groups.

Another feature shared by the inventions listed as Group I+ is the isolated antibody of claim 1.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by Librach in view of UniProt/KB Accession No. P17693 (hereinafter 'P17693').

Librach discloses [claim 1] an isolated antibody comprising a heavy chain (HC) immunoglobulin variable domain sequence and a light chain (LC) immunoglobulin variable domain sequence (para [0040] "An exemplary immunoglobulin, antibody, structural unit comprises a tetramer. Each tetramer is composed of two identical pairs of polypeptide chains, each pair having one "light" (about 25 kD) and one "heavy" chain (about 50-70 kD)"), wherein the antibody binds to an epitope of HLA-G (para [0019] "It is yet a further object of the invention to provide specific antibodies to HLA-G"; para [0026] "the immobilized anti-HLA-G antibody binds to a first region of HLA-G").

Librach does not teach wherein the epitope of HLA-G comprises the amino acid sequence of SEQ ID NO: 30. However, P17693 discloses SEQ ID NO: 30 (sequence of P17693, amino acids 25-338, exhibit 100% identity to SEQ ID NO: 30). Given that the sequence of P17693 corresponds to the sequence for HLA-G (P17693 sequence description), and the antibody of Librach targets and binds to HLA-G, one of ordinary skill in the art would have found it obvious that the epitope bound by the antibody of Librach can comprise the sequence of P17693.

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

Another feature shared by Groups II+ and III is a HLA-G chimeric antigen receptor (CAR). More specifically, the feature shared by the inventions listed as Group II+ is the CAR of claim 30.

However, this shared technical feature does not represent a contribution over prior art, because the shared technical feature is taught by US 2015/0017141 A1 to The Trustee of the University of Pennsylvania et al. (hereinafter 'Univ Penn') in view of Librach.

Univ Penn discloses [claim 30] a chimeric antigen receptor (CAR) (para [0006] "The invention provides an isolated nucleic acid sequence encoding a chimeric antigen receptor (CAR)"; para [0116] "The present invention provides a chimeric antigen receptor (CAR)" comprising:

- (a) an antigen binding domain (para [0006] "the CAR comprises an antigen binding domain");
- (b) a CD8 alpha hinge domain (para [0043] "Preferably, the hinge domain comprises the CD8.alpha. hinge domain"; para [0166] "a transmembrane domain comprising the hinge and transmembrane domain of CD8a");
- (c) a CD8 alpha transmembrane domain (para [0166] "a transmembrane domain comprising the hinge and transmembrane domain of CD8a");
- (d) a CD28 costimulatory signaling region and/or a 4-1BB costimulatory signaling region (para [0013] "In one embodiment, the nucleic acid sequence of the CAR further comprises a costimulatory signaling region comprising the intracellular domain of a costimulatory molecule selected from the group consisting of CD27, CD28, 4-1BB"); and
- (e) a CD3 zeta signaling domain (para [0007] "In one embodiment, the nucleic acid sequence of the CAR further comprises a CD3zeta signaling domain").

—continued on next sheet—

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/24361

Continuation of:

Box NO III. Observations where unity of invention is lacking

Univ Penn does not teach that the antigen binding domain is the antigen binding domain of an anti-HLA-G antibody. However, Univ Penn does teach that the CAR comprises an antigen binding domain engineered to target a tumor antigen (para [0113] "The CAR of the invention can be engineered to comprise an extracellular domain having an antigen binding domain"; para [0123] "In one embodiment, the CAR of the invention can be engineered to target a tumor antigen of interest by way of engineering a desired antigen binding domain that specifically binds to an antigen on a tumor cell"; para [0227] "the invention includes the use of any antigen binding domain in the CAR to generate a CAR-mediated T-cell response specific to the antigen binding domain. For example, the antigen binding domain in the CAR of the invention can target a tumor antigen for the purposes of treat cancer"). Librach discloses an anti-HLA-G antibody (para [0019] "It is yet a further object of the invention to provide specific antibodies to HLA-G") and further teaches that HLA-G expression is indicative of cancer (para [0211] "HLA-G secretion from various cell types may be indicative of cancer. Certain cancerous states, such as breast cancer, can be screened using a kit according to the invention. Thus, to ascertain whether a tissue sample may be cancerous or has potential to become cancerous, an HLA-G detection assay can be conducted"). Given that Librach teaches that HLA-G is a tumor antigen that is indicative of cancer, and Univ Penn teaches that the CAR can comprise an antigen binding domain that binds to a tumor antigen, one of ordinary skill in the art would have found it obvious wherein the antigen binding domain of the CAR of Univ Penn can be the HLA-G antibody of Librach.

As the technical feature was known in the art at the time of the invention, it cannot be considered a special technical feature that would otherwise unify the groups.

The inventions listed as Groups I+, II+, and III therefore lack unity of invention under PCT Rule 13 because they do not share a same or corresponding special technical feature.

Note: Claim 34 is objected to because SEQ ID NOs: 7 and 9 are nucleic acid sequences instead of amino acid sequences. For the purposes of this ISA Search and Written Opinion, claim 34 is construed as follows:

34. The CAR of claim 31 or 32, wherein the anti-HLA-G heavy chain variable region comprises any one of SEQ ID NOs: 8 and 10 or an equivalent of each thereof

Note: Claim 36 is objected to because SEQ ID NOs: 17 and 19 are nucleic acid sequence, instead of amino acid sequences. For the purposes of this ISA Search and Written Opinion, claim 36 is construed as follows:

36. The CAR of claim 31 or 32, wherein the anti- HLA-G light chain variable region comprising any one of SEQ ID NOs: 18 and 20 or an equivalent of each thereof

Item 4 (continued)

Claims 4-28 and 37-62 are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JS 16/24361

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)	
This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:	
1. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. <input type="checkbox"/>	Claims Nos.: because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. <input checked="" type="checkbox"/>	Claims Nos.: 4-28 and 37-62 because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).
Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)	
This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows: - Please see extra sheet for Box NO III. Observations where unity of invention is lacking -	
1. <input type="checkbox"/>	As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. <input type="checkbox"/>	As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. <input type="checkbox"/>	As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. <input checked="" type="checkbox"/>	No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.: 1-3, 29, limited to SEQ ID NO: 1, 3, 5, 11, 13, 15
Remark on Protest	<input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee. <input type="checkbox"/> The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation. <input type="checkbox"/> No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 16/24361

Box No. 1 Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
- a. forming part of the international application as filed:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 on paper or in the form of an image file.
- b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
- c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

(51)Int.Cl.	F I	テーマコード(参考)
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	4 H 0 4 5
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	F
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	D
G 0 1 N 33/574 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	D
G 0 1 N 33/48 (2006.01)	G 0 1 N 33/574	A
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	G 0 1 N 33/48	M
A 6 1 K 35/17 (2015.01)	G 0 1 N 33/48	P
A 6 1 K 35/12 (2015.01)	A 6 1 P 35/00	
	A 6 1 K 35/17	A
	A 6 1 K 35/12	

(81)指定国 AP(BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, T J, TM), EP(AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, R O, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, H N, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG , NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US

(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 9 0 0 1 5, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1 1 5 0, スイート 2 3 0 0, 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, ベイシェン

アメリカ合衆国 カリフォルニア 9 0 0 1 5, ロサンゼルス, サウス オリーブ ストリート 1 1 5 0, スイート 2 3 0 0, ユニバーシティ オブ サザン カリフォルニア 気付

F ターム(参考) 2G045 AA13 AA16 AA24 AA26 BA13 BA14 BB20 BB24 CA18 CA19
CA23 CA25 CA26 CB01 CB02 CB03 CB04 CB17 DA13 DA14
DA30 DA36 FA16 FA29 FA34 FB01 FB02 FB03 FB08 FB12
FB15 GC10 GC15
4B029 AA07 BB11 BB17 FA12
4B063 QA01 QA05 QA19 QQ02 QQ08 QQ79 QR48 QR72 QR77 QS33
QX01
4B065 AA92X AA92Y AA95X AB01 AC14 BA02 CA24 CA25
4C087 AA01 AA02 AA03 BB37 BB65 NA14 ZB26
4H045 AA11 AA20 AA30 BA10 BA41 CA40 DA50 DA76 EA28 EA51
EA54 FA74

专利名称(译)	HLA-G作为CAR T细胞免疫疗法的新靶标		
公开(公告)号	JP2018511319A	公开(公告)日	2018-04-26
申请号	JP2017550494	申请日	2016-03-25
[标]申请(专利权)人(译)	南加利福尼亚大学		
申请(专利权)人(译)	南加州大学		
[标]发明人	エプスタインアランエル フーペイシエン		
发明人	エプスタイン, アラン エル. フー, ペイシエン		
IPC分类号	C12N15/09 C07K16/46 C12Q1/04 C07K19/00 C07K14/725 C12N7/01 C12N1/19 C12N1/21 C12N1/15 C12N5/10 C12N5/0783 C07K14/705 C12M1/34 C12N5/07 C07K16/28 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/48 A61P35/00 A61K35/17 A61K35/12		
CPC分类号	C07K16/2833 A61K39/001111 A61K39/395 A61K2039/5156 A61P35/00 C07K14/7051 C07K14/70517 C07K14/70521 C07K14/70575 C07K2317/34 C07K2317/622 C07K2319/02 C07K2319/03 C07K2319 /33 C12N5/0638 C12N2510/00 G01N33/56977 G01N33/57434 G01N33/57449 G01N33/57492 G01N2333/70539		
FI分类号	C12N15/00.A C07K16/46.ZNA C12Q1/04 C07K19/00 C07K14/725 C12N7/01 C12N1/19 C12N1/21 C12N1/15 C12N5/10 C12N5/0783 C07K14/705 C12M1/34.F C12N5/07 C07K16/28 G01N33/53.D G01N33/574.D G01N33/574.A G01N33/48.M G01N33/48.P A61P35/00 A61K35/17.A A61K35/12		
F-TERM分类号	2G045/AA13 2G045/AA16 2G045/AA24 2G045/AA26 2G045/BA13 2G045/BA14 2G045/BB20 2G045 /BB24 2G045/CA18 2G045/CA19 2G045/CA23 2G045/CA25 2G045/CA26 2G045/CB01 2G045/CB02 2G045/CB03 2G045/CB04 2G045/CB17 2G045/DA13 2G045/DA14 2G045/DA30 2G045/DA36 2G045 /FA16 2G045/FA29 2G045/FA34 2G045/FB01 2G045/FB02 2G045/FB03 2G045/FB08 2G045/FB12 2G045/FB15 2G045/GC10 2G045/GC15 4B029/AA07 4B029/BB11 4B029/BB17 4B029/FA12 4B063 /QA01 4B063/QA05 4B063/QA19 4B063/QQ02 4B063/QQ08 4B063/QQ79 4B063/QR48 4B063/QR72 4B063/QR77 4B063/QS33 4B063/QX01 4B065/AA92X 4B065/AA92Y 4B065/AA95X 4B065/AB01 4B065/AC14 4B065/BA02 4B065/CA24 4B065/CA25 4C087/AA01 4C087/AA02 4C087/AA03 4C087 /BB37 4C087/BB65 4C087/NA14 4C087/ZB26 4H045/AA11 4H045/AA20 4H045/AA30 4H045/BA10 4H045/BA41 4H045/CA40 4H045/DA50 4H045/DA76 4H045/EA28 4H045/EA51 4H045/EA54 4H045 /FA74		
代理人(译)	夏木森下 饭田TakashiSatoshi 石川大介 山本健作		
优先权	62/139617 2015-03-27 US		
其他公开文献	JP2018511319A5		
外部链接	Espacenet		

摘要(译)

CAR细胞靶向和人HLA-G的抗体被描述为癌症治疗的新方法。提出HLA-G CAR细胞在患者中是安全有效的，并且可用于治疗表达HLA-G的人肿瘤。在一个方面，提供了分离的抗体，其包含重链(HC)免疫球蛋白可变域序列和轻链(LC)免疫球蛋白可变域序列，其中所述抗体包含SEQ ID NO: 30的氨基酸序列或其等同物。至HLA-G的表位，包括HLA-G。

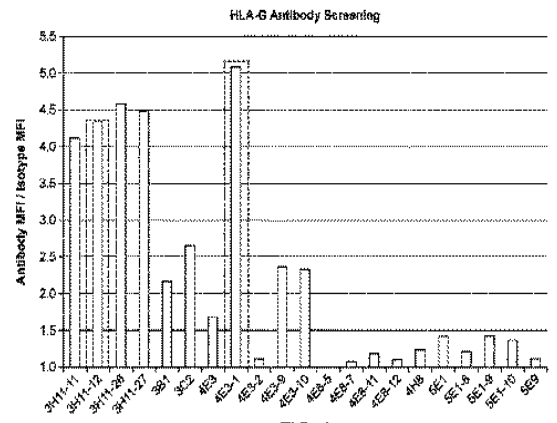


FIG. 1