

(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2019-511224

(P2019-511224A)

(43) 公表日 平成31年4月25日(2019.4.25)

(51) Int.Cl.	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A	4 B 0 6 5
C 1 2 N 15/62 (2006.01)	C 1 2 N 15/62	4 C 0 7 6
C 1 2 N 15/12 (2006.01)	C 1 2 N 15/12	4 C 0 8 4
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	4 C 0 8 5
C 1 2 N 5/10 (2006.01)	C 1 2 N 5/10	4 H 0 4 5

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 138 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2018-549166 (P2018-549166)
 (86) (22) 出願日 平成29年3月14日 (2017. 3. 14)
 (85) 翻訳文提出日 平成30年11月6日 (2018. 11. 6)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2017/050689
 (87) 国際公開番号 W02017/158339
 (87) 国際公開日 平成29年9月21日 (2017. 9. 21)
 (31) 優先権主張番号 1604378.8
 (32) 優先日 平成28年3月15日 (2016. 3. 15)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)
 (31) 優先権主張番号 1612534.6
 (32) 優先日 平成28年7月19日 (2016. 7. 19)
 (33) 優先権主張国 英国 (GB)

(71) 出願人 598176569
 キャンサー・リサーチ・テクノロジー・リ
 ミテッド
 CANCER RESEARCH TEC
 HNOLOGY LIMITED
 イギリス・イーシー1ヴィー・4エーディ
 ー・ロンドン・セント・ジョン・ストリー
 ト・407・エンジェル・ビルディング
 (71) 出願人 508020203
 ザ ユニバーシティ オブ バーミンガム
 イギリス ウェスト ミッドランド B 1
 5 2 T T バーミンガム エッジバスト
 ン
 (74) 代理人 100079108
 弁理士 稲葉 良幸

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 抗体及び関連分子並びにその使用

(57) 【要約】

本発明は、C L E C 1 4 A に選択的に結合する単離抗体に関し、前記抗体は、(a) 3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域は、(i) 配列番号 1 0 5、好ましくは配列番号 2 若しくは 4 2 のアミノ酸配列を有する可変重鎖 (V H) C D R 1、(i i) 配列番号 1 0 6、好ましくは配列番号 3 若しくは 4 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び/又は (i i i) 配列番号 1 0 7、好ましくは配列番号 4 若しくは 4 4 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域は、(i v) 配列番号 1 0 8、好ましくは配列番号 6 若しくは 4 6 のアミノ酸配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、(v) 配列番号 1 0 9、好ましくは配列番号 7 若しくは 4 7 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び/又は (v i) 配列番号 1 1 0、好ましくは配列番号 8 若しくは 4 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含むか、或いは前記抗体は、(b) 3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域は、(i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する可変重鎖 (V H) C D R 1、(i i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び/又は (i i i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3 を含み、及び/又は前記軽鎖可変領域は、(i v) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、(v) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び/又は (v i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3 を含むか、或いは前記抗体は、(c) C L E C 1 4 A への結合に関して抗体 (a) 又は (b) と競合し得る抗体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

C L E C 1 4 A に選択的に結合する単離抗体であって、

(a) 3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、 3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号 1 0 5、好ましくは配列番号 2 若しくは 4 2 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する可変重鎖 (V H) C D R 1、

(i i) 配列番号 1 0 6、好ましくは配列番号 3 若しくは 4 3 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 1 0 7、好ましくは配列番号 4 若しくは 4 4 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 3

を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域は、

(i v) 配列番号 1 0 8、好ましくは配列番号 6 若しくは 4 6 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、

(v) 配列番号 1 0 9、好ましくは配列番号 7 若しくは 4 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 1 1 0、好ましくは配列番号 8 若しくは 4 8 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 3

を含むか、或いは前記単離抗体は、

(b) 3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、 3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する可変重鎖 (V H) C D R 1、

(i i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 3

を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域は、

(i v) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、

(v) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 3

を含むか、或いは前記単離抗体は、

(c) C L E C 1 4 A への結合に関して抗体 (a) 又は (b) と競合し得る抗体である

10

20

30

40

50

、単離抗体。

【請求項 2】

(a) 配列番号 1 若しくは 4 1 の V H ドメイン及び / 又は配列番号 5 若しくは 4 5 の V L ドメインを有するか、又は

(b) C L E C 1 4 A への結合に関して抗体 (a) と競合し得る抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 3】

(a) 配列番号 2 1 の V H ドメイン及び / 又は配列番号 2 5 の V L ドメインを有するか、又は

(b) C L E C 1 4 A への結合に関して抗体 (a) と競合し得る抗体である、請求項 1 に記載の抗体。

【請求項 4】

3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号 2 若しくは 4 2 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 1、

(i i) 配列番号 3 若しくは 4 3 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 4 若しくは 4 4 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 3

を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域は、

(i v) 配列番号 6 若しくは 4 6 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 1、

(v) 配列番号 7 若しくは 4 7 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 8 若しくは 4 8 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 3

を含む、請求項 1 (c) 又は 2 (b) に記載の抗体。

【請求項 5】

3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 1、

(i i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 3

を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域は、

(i v) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 1、

(v) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 3

を含む、請求項 1 (c) 又は 3 (b) に記載の抗体。

【請求項 6】

10

20

30

40

50

請求項 1 (a) 及び / 又は 2 (a) に記載の抗体と実質的に同じエピトープに結合することができる、請求項 1 (c)、2 (b) 又は 4 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 7】

請求項 1 (b) 及び / 又は 3 (a) に記載の抗体と実質的に同じエピトープに結合することができる、請求項 1 (c)、3 (b) 又は 5 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 8】

前記実質的に相同な配列は、前記 C D R の 1 つ以上に 1、2、3 又は 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 又は欠失、好ましくは 1、2、3 又は 4 個の置換を有する、請求項 1 又は 4 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 9】

前記アミノ酸置換は、保存的置換である、請求項 8 に記載の抗体。

【請求項 10】

マウス、ヒト又はヒト化抗体である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 11】

抗体重鎖定常領域の全て又は一部分及び / 又は抗体軽鎖定常領域の全て又は一部分を含む、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 12】

I g G 抗体である、請求項 1 ~ 11 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 13】

(a) 配列番号 1 若しくは 41 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む重鎖、及び配列番号 5 若しくは 45 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む軽鎖、又は

(b) 配列番号 21 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む重鎖、及び配列番号 25 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む軽鎖を含む、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 14】

抗体の抗原結合断片である、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗体。

【請求項 15】

前記抗体の前記抗原結合断片は、F a b '、F a b、F (a b ')₂、シングルドメイン抗体、T a n d A b 二量体、F v、s c F v、d s F v、d s - s c F v、F d、線状抗体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、バイボディ、トリボディ、s c - ダイアボディ、カップ(ラムダ)ボディ、B i T E、D V D - I g、S I P、S M I P、D A R T 又は 1 つ以上の C D R を含む小抗体模倣体である、請求項 14 に記載の抗体。

【請求項 16】

治療用、診断用又はイメージング用薬剤にコンジュゲートされる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体を含むイムノコンジュゲート。

【請求項 17】

請求項 1 ~ 16 のいずれか一項に記載の抗体又はイムノコンジュゲートをコードするか、又は抗原 C L E C 1 4 A に対して指向されるキメラ抗原受容体をコードするヌクレオチド配列を含む核酸分子であって、前記 C A R は、免疫エフェクター細胞の表面上に発現されると、標的細胞表面上に発現された前記抗原 C L E C 1 4 A への結合能を有し、且つ請求項 1 に記載の少なくとも 1 つの C D R アミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む抗原結合ドメインを含む、核酸分子。

【請求項 18】

前記ヌクレオチド配列は、配列番号 11 ~ 19、31 ~ 39、54 ~ 64、101 ~ 104 のいずれか 1 つに記載されるとおりであるか、又はそれと少なくとも 60% の配列同一性を有するヌクレオチド配列である、請求項 17 に記載の核酸分子。

【請求項 19】

請求項 17 又は 18 に記載の核酸分子を含む発現ベクター。

【請求項 20】

10

20

30

40

50

請求項 17 若しくは 18 に記載の核酸分子又は請求項 19 に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

【請求項 21】

請求項 17 若しくは 18 に記載の核酸分子又は請求項 19 に記載の発現ベクターを含むウイルス。

【請求項 22】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 17 若しくは 18 に記載の核酸、請求項 19 に記載の発現ベクター、請求項 20 に記載の宿主細胞又は請求項 21 に記載のウイルスと、少なくとも 1 つの生理学的に許容可能な担体又は賦形剤とを含む組成物であって、好ましくは治療用組成物又は医薬組成物である組成物。

10

【請求項 23】

少なくとも 1 つの更なる治療用薬剤を含む、請求項 22 に記載の組成物。

【請求項 24】

- (a) 請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体、
- (b) 請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート、
- (c) 請求項 17 又は 18 に記載の核酸分子、
- (d) 請求項 19 に記載の発現ベクター、
- (e) 請求項 20 に記載の宿主細胞、
- (f) 請求項 21 に記載のウイルス、及び / 又は
- (g) 請求項 22 又は 23 に記載の組成物

20

を含むキット又は製品。

【請求項 25】

治療、イメージング又は診断に使用される、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 17 若しくは 18 に記載の核酸、請求項 19 に記載の発現ベクター、請求項 20 に記載の宿主細胞、請求項 21 に記載のウイルス、請求項 22 若しくは 23 に記載の組成物又は請求項 24 に記載のキット若しくは製品。

【請求項 26】

C L E C 1 4 A の発現に関連する疾患又は病態への対処に用いられる、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 17 若しくは 18 に記載の核酸、請求項 19 に記載の発現ベクター、請求項 20 に記載の宿主細胞、請求項 21 に記載のウイルス、請求項 22 若しくは 23 に記載の組成物又は請求項 24 に記載のキット若しくは製品。

30

【請求項 27】

C L E C 1 4 A の発現に関連する疾患又は病態に対処する方法であって、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 17 若しくは 18 に記載の核酸、請求項 19 に記載の発現ベクター、請求項 20 に記載の宿主細胞、請求項 21 に記載のウイルス、請求項 22 若しくは 23 に記載の組成物又は請求項 24 に記載のキット若しくは製品、特に有効量の前記抗体、イムノコンジュゲート、核酸、発現ベクター、宿主細胞、ウイルス、組成物、キット又は製品を、それを必要とする対象に投与することを含む方法。

40

【請求項 28】

C L E C 1 4 A の発現に関連する疾患又は病態に対処するための医薬の製造における、請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体、請求項 16 に記載のイムノコンジュゲート、請求項 17 若しくは 18 に記載の核酸、請求項 19 に記載の発現ベクター、請求項 20 に記載の宿主細胞、請求項 21 に記載のウイルス、請求項 22 若しくは 23 に記載の組成物又は請求項 24 に記載のキット若しくは製品の使用。

【請求項 29】

前記抗体、イムノコンジュゲート、核酸、発現ベクター、宿主細胞、ウイルス、組成物

50

、キット又は製品は、別個に、同時に又は逐次的に使用又は投与される1つ以上の追加的な治療用薬剤との併用製剤として提供される、請求項1～28のいずれか一項に記載の抗体、イムノコンジュゲート、核酸、発現ベクター、宿主細胞、ウイルス、組成物、キット、製品、方法又は使用。

【請求項30】

前記CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態は、血管新生、好ましくは腫瘍血管新生である、請求項1～29のいずれか一項に記載の抗体、イムノコンジュゲート、核酸、発現ベクター、宿主細胞、ウイルス、組成物、キット、製品、方法又は使用。

【請求項31】

前記CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態は、癌である、請求項1～29のいずれか一項に記載の抗体、イムノコンジュゲート、核酸、発現ベクター、宿主細胞、ウイルス、組成物、キット、製品、方法又は使用。

10

【請求項32】

前記治療用薬剤は、抗癌剤及び/又は抗血管新生剤である、請求項16又は22～31のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート、組成物、キット、製品、方法又は使用。

【請求項33】

前記抗癌剤は、アルキル化剤、トポイソメラーゼI阻害薬、トポイソメラーゼII阻害薬、RNA/DNA代謝拮抗薬、DNA代謝拮抗薬又は抗有糸分裂剤である、請求項32に記載のイムノコンジュゲート、組成物、キット、製品、方法又は使用。

【請求項34】

前記抗癌剤は、細胞傷害性部分である、請求項32に記載のイムノコンジュゲート、組成物、キット、製品、方法又は使用。

20

【請求項35】

前記細胞傷害性部分は、直接的に細胞傷害性の化学療法剤、直接的に細胞傷害性のポリペプチド、プロドラッグを細胞傷害性薬物に変換可能な部分、放射線増感剤、直接的に細胞傷害性の核酸、直接的若しくは間接的に細胞傷害性のポリペプチドをコードする核酸分子又は放射性原子である、請求項34に記載のイムノコンジュゲート、組成物、キット、製品、方法又は使用。

【請求項36】

対象の体内の新生血管構造に細胞傷害性薬剤をターゲティングする方法であって、請求項16又は32～35のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートを前記対象に投与することを含む方法。

30

【請求項37】

対象の体内の新生血管構造への細胞傷害性薬剤のターゲティングに用いられる、請求項16又は32～35のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項38】

対象の体内の新生血管構造に細胞傷害性薬剤をターゲティングするための医薬の調製又は製造における、請求項16又は32～35のいずれか一項に記載のイムノコンジュゲートの使用。

【請求項39】

前記新生血管構造は、腫瘍新生血管構造である、請求項36～38のいずれか一項に記載の方法、イムノコンジュゲート及び使用。

40

【請求項40】

前記診断用又はイメージング用薬剤は、検出可能部分であるか、又は磁性ナノ粒子、放射性核種若しくはフルオロフォアを含む、請求項16に記載のイムノコンジュゲート。

【請求項41】

対象の体内の新生血管構造、好ましくは腫瘍新生血管構造をイメージングする方法であって、

請求項40に記載のイムノコンジュゲートを前記対象に投与することと、
前記体内の前記検出可能部分をイメージングすることと

50

を含む方法。

【請求項 4 2】

対象の固形腫瘍を検出、診断及び/又は予後判定する方法であって、
請求項 4 0 に記載のイムノコンジュゲートを前記対象に投与することと、
前記体内における前記検出可能部分の存在及び/又は位置を検出することと

を含む、請求項 4 1 に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、概して、抗体、CLEC14A生物学及び関連療法、例えばキメラ抗原受容体(CAR)の分野に関する。より詳細には、本発明は、CLEC14Aに結合する抗体及び抗原CLEC14Aに対するCAR、並びにCLEC14Aを発現する細胞を標的化するための免疫エフェクター細胞におけるそれらの発現を提供する。かかる抗CLEC14A抗体及び免疫エフェクター細胞は、CLEC14Aに関連する疾患及び病態において治療的に使用される。例えば、本発明は、血管新生を阻害して、癌などの不要な血管新生に関連する疾患に対処するための製剤を提供する。本発明の抗体は、例えば、新生血管構造をイメージングすることによる腫瘍成長及び進行のモニタリング又は予測における診断上の有用性も見出され得る。本発明の抗体ベースの組成物及び方法は、イムノコンジュゲート及び他の治療的併用の使用、キット並びに方法にも及ぶ。本発明は、抗体又はCARを発現するよう宿主細胞、例えば免疫エフェクター細胞を修飾するために使用し得るかかる抗体及びCARをコードする核酸分子並びにそれを含有するベクターを更に提供する。詳細には、本発明のCARは、本発明の抗体に由来する抗原結合ドメインを含む。

【背景技術】

【0002】

CLEC14A(上皮成長因子受容体5(EGFR5)とも称される)は、血管限局的C型レクチンファミリー14(他のメンバーには、CD248/TEM1/エンドシアリン、トロンボモジュリン及びCD93が含まれる)に属する1回膜貫通型糖タンパク質である。これは、490アミノ酸(aa)長のI型1回膜貫通型タンパク質であり、シグナルペプチド(aa 1~21)、細胞外領域(aa 22~398)、膜貫通ドメイン(aa 399~421)及び細胞質ドメイン(aa 422~490)を含有する。細胞外領域は、1つのC型レクチン様ドメイン(aa 22~173)及び上皮成長因子様領域(aa 245~287)を有する。ヒト及びマウスCLEC14Aタンパク質は、67%のアミノ酸配列同一性を示し、C型レクチンドメイン及び上皮成長因子様ドメイン内の配列保存性は更に高い。CLEC14Aに関する利用可能なデータから、CLEC14Aレベル又は機能を例えば遮断抗体を用いて操作することにより、内皮遊走を調節し得ることが示唆される(国際公開第2011/027132号)。

【0003】

内皮細胞は、全ての血管の内側を覆い且つ血流と周囲組織との間の交換を調節する単細胞層を形成する。新生血管は、既存の小血管の壁から、血管新生と呼ばれる過程で内皮細胞が増殖することによって発達する。内皮細胞は、培養下に単離したときに中空の毛細血管の形成能までも更に有する。血管系が完全に発達すると、血管の内皮細胞は、通常、自然の創傷治癒における新生血管形成を除き静止したままであり、新たな血管形成はない。しかしながら、一部の腫瘍は、新しい毛細血管芽を構築するように近傍の内皮細胞を刺激する因子を分泌することにより、新しい血液供給を引き込む。血管新生は、固形腫瘍の進行において主要な役割を果たし、固形腫瘍の成長における律速過程として広く認識されている。血液供給を引き込むことができない腫瘍は、その成長が大幅に制限される。従って、不適切であるか、望ましくないか又は不要な血管新生を阻害することができれば、固形腫瘍の治療に有用であり得る。

【0004】

新生血管の発達、局所腫瘍進行及び遠隔転移発生の両方に不可欠である。実際、腫瘍

の成長及び生存は、血液供給を確保するその能力に依存し、腫瘍内皮が損傷を負うと、腫瘍が有効に根絶されることが示されている。腫瘍血管新生は、活性化した組織又は循環内皮前駆細胞による基底膜の分解、内皮細胞の増殖及び遊走、細胞外マトリックスとの相互作用、形態学的分化、細胞接着及び血管形成を伴う。従って、腫瘍血管新生の阻害は、血管新生阻害薬を単独で用いるにしろ又は標準癌治療と併用するにしろ、抗腫瘍療法の標的である。しかしながら、血管新生部位への抗腫瘍薬剤のターゲティングは、腫瘍血管新生の特異的マーカーの同定に依存する。内皮は、多くの生理学的及び病理学的過程で中心的な役割を果たし、極めて高活性の転写部位であることが知られている。内皮細胞では約1,000個の異なる遺伝子が発現するが、その多くは内皮細胞特異的でない。

【0005】

CLEC14Aは、腫瘍内皮マーカーとして同定されている（国際公開第2011/027132号）。CLEC14Aは、多くの一般的なヒト癌（乳癌、肝癌、前立腺癌、膵癌、膀胱癌及び卵巣癌を含む）の血管構造の内側を覆う内皮細胞の表面に高発現するが、健常組織の血管構造では、発現は、低いか又は検出不能である。CLEC14Aは、腫瘍組織の形成不良の血管に起こるような低なり応力条件下で誘導され、細胞外マトリックス内のMMRN2と相互作用する。CLEC14Aは、糸状仮足形成及び内皮遊走を媒介し、発芽血管新生において役割を果たし、及びマウスにおいて腫瘍成長を促進する。従って、CLEC14Aの機能又は活性を遮断又は阻害すると、血管新生、特に腫瘍血管新生が阻害されるものと予想される。従って、CLEC14Aの機能又は活性を遮断又は阻害する薬剤及びCLEC14Aを発現する細胞、特に腫瘍細胞（例えば、腫瘍血管構造）を標的化する薬剤が必要とされている。

【0006】

近年、癌を含めた様々な疾患を治療する安全且つ選択的な方法として、抗体、特にモノクローナル抗体を用いた免疫療法が登場している。抗体は、インビトロ及びインビボの両方で、且つエキソビボでも様々な診断及び予後予測分析に有効であることも分かっている。しかしながら、特定の抗原への結合能を有する抗体が全て療法上有効であるわけではない。従って、CLEC14Aに特異的に結合することのできる抗体、特にこれまでに特徴付けられているCLEC14A抗体と異なるエピトープに結合すると共に、また治療上も有効であり且つ/又はCLEC14Aの機能又は活性を遮断又は阻害する能力も有する、例えば血管新生、特に腫瘍血管新生の阻害に用いられる、例えば癌の治療に用いられる抗体が必要とされ、求められている。

【0007】

近年、T細胞又は他の免疫エフェクター細胞、例えばNK細胞におけるキメラ抗原受容体(CAR)の発現が関わる療法も開発されている。現在、当該技術分野において広く知られ、記載されているCARは、必ずしもというわけではないが、典型的には抗体に由来する抗原結合ドメインにT細胞受容体(TcR)複合体のシグナリングドメイン(又は均等物)が連結したものを含む融合タンパク質であり、好適な抗原結合ドメイン又は抗体を選択すれば、T細胞又は他の免疫エフェクター細胞を腫瘍に対して仕向けるために使用することができる。

【0008】

CARコンストラクトは、概して、抗原結合ドメインと、任意選択で、抗原結合ドメインをそれが発現するところである免疫エフェクター細胞の細胞膜から引き離して伸長させるスパーサーとして機能するヒンジドメインと、膜貫通ドメインと、細胞内シグナリングドメイン(例えば、TcR複合体のCD3分子の鎖(CD3))からのシグナリングドメイン又は均等物)と、任意選択で、CARを発現する細胞のシグナル伝達又は機能を補助し得る1つ以上の共刺激ドメインとを含む。異なるドメインは、直接又はリンカーによって連結され得る。これらの異なるドメイン及びリンカーに関して、様々な選択肢が利用可能である。従って、CLEC14Aを発現する細胞、特に腫瘍細胞を標的化することのできる、例えば血管新生、特に腫瘍血管新生の阻害に用いられる、例えば癌の治療に用いられるCARが求められている。

10

20

30

40

50

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0009】

本発明者らは、CLEC14Aに特異的且つ有効に結合する抗体（本明細書ではCRT-2及びCRT-3として知られる）を作成した。更に、実施例で更に詳細に考察するとおり、本発明者らは、前記抗体が、単独でも細胞傷害性薬物との併用（例えば、抗体薬物コンジュゲート（イムノコンジュゲートとしても知られる）として）でも有用な治療特性を有し得ることを明らかにした。特に、本発明者らは、前記抗体の抗原結合ドメインを特徴付け、前記ドメイン、より詳細には前記ドメインの可変領域（VL及びVH鎖）が、CLEC14Aを発現する細胞に対する養子細胞移入療法に用いられる有効なCARを提供し得ることを明らかにした。以下で更に詳細に説明するとおり、より詳細な実施形態において、CARは、本発明の抗体のVL及びVH鎖をベースとするか又はそれを含む、具体的にはその超可変領域又はCDR（相補性決定領域）をベースとする抗原結合ドメインを、ヒンジ、膜貫通、共刺激及び細胞内シグナリングドメインの組み合わせを含む「シグナリングテール」との組み合わせで含み得る。

10

【0010】

従って、一態様において、本発明は、CLEC14Aに選択的に結合する抗体、特に単離抗体を提供し、前記抗体は、

(a) 3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、

20

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号105、好ましくは配列番号2若しくは42のアミノ酸配列、又は1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換、付加及び/若しくは欠失を有する前述の配列番号のいずれかと実質的に相同な配列を有する可変重鎖（VH）CDR1、

(ii) 配列番号106、好ましくは配列番号3若しくは43のアミノ酸配列、又は1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換、付加及び/若しくは欠失を有する前述の配列番号のいずれかと実質的に相同な配列を有するVH CDR2、及び/又は

(iii) 配列番号107、好ましくは配列番号4若しくは44のアミノ酸配列、又は1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換、付加及び/若しくは欠失を有する前述の配列番号のいずれかと実質的に相同な配列を有するVH CDR3

30

を含み、及び/又は

前記軽鎖可変領域は、

(iv) 配列番号108、好ましくは配列番号6若しくは46のアミノ酸配列、又は1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換、付加及び/若しくは欠失を有する前述の配列番号のいずれかと実質的に相同な配列を有する可変軽鎖（VL）CDR1、

(v) 配列番号109、好ましくは配列番号7若しくは47のアミノ酸配列、又は1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換、付加及び/若しくは欠失を有する前述の配列番号のいずれかと実質的に相同な配列を有するVL CDR2、及び/又は

(vi) 配列番号110、好ましくは配列番号8若しくは48のアミノ酸配列、又は1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換、付加及び/若しくは欠失を有する前述の配列番号のいずれかと実質的に相同な配列を有するVL CDR3

40

を含むか、或いは前記抗体は、

(b) 3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号22のアミノ酸配列、又は1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換、付加及び/若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する可変重鎖（VH）CDR1、

(ii) 配列番号23のアミノ酸配列、又は1、2、3若しくは4個のアミノ酸置換、付加及び/若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR2、及

50

び / 又は

(i i i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 3 を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域は、

(i v) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、

(v) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列、又は 1、2、3 若しくは 4 個のアミノ酸置換、付加及び / 若しくは欠失を有するそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 3 を含むか、或いは前記抗体は、

(c) C L E C 1 4 A への結合に関して抗体 (a) 又は (b) と競合し得る抗体である。

【 0 0 1 1 】

一部の実施形態において、本発明は、C L E C 1 4 A に選択的に結合する抗体、特に単離抗体を提供し、前記抗体は、

(a) 3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号 1 0 5、特に配列番号 2 又は 4 2 のアミノ酸配列を有する可変重鎖 (V H) C D R 1、

(i i) 配列番号 1 0 6、特に配列番号 3 又は 4 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 1 0 7、特に配列番号 4 又は 4 4 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3

を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域は、

(i v) 配列番号 1 0 8、特に配列番号 6 又は 4 6 のアミノ酸配列を有する可変軽鎖 (V L) C D R 1、

(v) 配列番号 1 0 9、特に配列番号 7 又は 4 7 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 1 1 0、特に配列番号 8 又は 4 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含むか、或いは前記抗体は、

(b) C L E C 1 4 A への結合に関して抗体 (a) と競合し得る抗体である。

【 0 0 1 2 】

従って、一部の実施形態において、抗体は、(a) 配列番号 1 若しくは 4 1 の V H ドメイン及び / 又は配列番号 5 若しくは 4 5 の V L ドメインを有するか、又は (b) C L E C 1 4 A への結合に関して抗体 (a) と競合し得る抗体である。例えば、本抗体は、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含んでもよく、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号 1 0 5、特に配列番号 2 若しくは 4 2 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 1、

(i i) 配列番号 1 0 6、特に配列番号 3 若しくは 4 3 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 1 0 7、特に配列番号 4 若しくは 4 4 のアミノ酸配列、又はそれと

10

20

30

40

50

実質的に相同な配列を有する V H C D R 3

を含み、及び / 又は

前記軽鎖可変領域は、

(i v) 配列番号 1 0 8、特に配列番号 6 若しくは 4 6 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 1、

(v) 配列番号 1 0 9、特に配列番号 7 若しくは 4 7 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 1 1 0、特に配列番号 8 若しくは 4 8 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 3

を含む。

10

【 0 0 1 3 】

従って、一部の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 2、3、4、6、7、8、42、43、44、46、47 及び 48、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列からなる群から選択される C D R の 1 つ以上を含む。

【 0 0 1 4 】

従って、一部の好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 2、3 及び 4、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 2 つ以上を含む。特に好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 2、3 及び 4、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 3 つを含む。

【 0 0 1 5 】

従って、一部の好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 42、43 及び 44、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 2 つ以上を含む。特に好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 42、43 及び 44、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 3 つを含む。

20

【 0 0 1 6 】

追加的又は代替的实施形態において、本抗体は、配列番号 6、7 及び 8、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 2 つ以上を含む。特に好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 6、7 及び 8、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 3 つを含む。

【 0 0 1 7 】

追加的又は代替的实施形態において、本抗体は、配列番号 46、47 及び 48、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 2 つ以上を含む。特に好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 46、47 及び 48、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 3 つを含む。

30

【 0 0 1 8 】

従って、一部の実施形態において、本抗体は、配列番号 2、3 及び 4、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 3 つと、配列番号 6、7 及び 8、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 3 つとを含む。

【 0 0 1 9 】

一部の実施形態において、本抗体は、配列番号 42、43 及び 44、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 3 つと、配列番号 6、7 及び 8、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 3 つとを含む。

40

【 0 0 2 0 】

一部の実施形態において、本抗体は、配列番号 2、3 及び 4、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 3 つと、配列番号 46、47 及び 48、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 3 つとを含む。

【 0 0 2 1 】

一部の実施形態において、本抗体は、配列番号 42、43 及び 44、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 3 つと、配列番号 46、47 及び

50

48、又は前述の配列番号のいずれか1つと実質的に相同な配列の軽鎖CDRの3つを含む。

【0022】

一部の実施形態において、本抗体は、配列番号1若しくは41のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む重鎖、及び/又は配列番号5若しくは45のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む軽鎖を含む。

【0023】

一部の実施形態において、本抗体は、単鎖断片変異体(scfv)である。従って、一部の態様において、本抗体は、アミノ酸配列の配列番号9、49、50又は51、又はそれと実質的に相同な配列を含む。

10

【0024】

理論によって拘束されることを望むものではないが、上記のパート(a)に定義される抗体は、CLEC14AのC型レクチンドメイン(CLEC14Aの残基22~173)にあるエピトープへの結合能を有するものと仮定される。(アラインメントプログラムが異なると、CLEC14A内で別のドメイン位置が予測され得ることは理解されるであろう。従って、C型レクチンドメインは、より詳細には、使用するアラインメントに応じてCLEC14Aの残基22~175、CLEC14Aの23~173若しくは23~175、又は32~173若しくは32~175に位置し得る)。詳細には、抗体は、CLEC14Aの残基22~96、例えば32~96及び/又は残基109~175、例えば109~173の範囲内にあるエピトープに結合するものと思われる。従って、一部の実施形態において、本抗体は、CLEC14Aの残基97~108に結合しない。抗体がこれらのエピトープ又は領域のいずれかに結合するか否かは、ELISAなどの本明細書に記載される結合アッセイを含め、当該技術分野における標準的な技法を用いて評価することができる。

20

【0025】

好ましい実施形態において、上記のパート(a)に定義される抗体と競合し得る抗体は、上記のパート(a)に定義される抗体と実質的に同じエピトープに結合することができる。従って、一部の実施形態において、上記のパート(a)に定義される抗体と競合し得る抗体は、CLEC14Aの残基22~96、例えば32~96及び/又は残基109~175、例えば109~173の範囲内にあるエピトープに結合することができる。留意すべきことに、指定されない限り、本明細書で考察されるアミノ酸の付番は、配列番号52に記載されるヒトCLEC14Aのアミノ酸配列に関する。

30

【0026】

代替的实施形態において、本発明は、CLEC14Aに選択的に結合する抗体、特に単離抗体を提供し、前記抗体は、

(a') 3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号22のアミノ酸配列を有する可変重鎖(VH)CDR1、

(ii) 配列番号23のアミノ酸配列を有するVH CDR2、及び/又は

(iii) 配列番号24のアミノ酸配列を有するVH CDR3

40

を含み、及び/又は

前記軽鎖可変領域は、

(iv) 配列番号26のアミノ酸配列を有する可変軽鎖(VL)CDR1、

(v) 配列番号27のアミノ酸配列を有するVL CDR2、及び/又は

(vi) 配列番号28のアミノ酸配列を有するVL CDR3

を含むか、或いは前記抗体は、

(b') CLEC14Aへの結合に関して抗体(a')と競合し得る抗体である。

【0027】

従って、一部の実施形態において、抗体は、(a')配列番号21のVHドメイン及び

50

／又は配列番号 25 の V L ドメインを有するか、又は (b ') C L E C 1 4 A への結合に関して抗体 (a ') と競合し得る抗体である。例えば、本抗体は、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの重鎖可変領域と、3 つの C D R を含む少なくとも 1 つの軽鎖可変領域とを含んでもよく、

前記重鎖可変領域は、

(i) 配列番号 22 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 1、

(i i) 配列番号 23 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 2、及び／又は

(i i i) 配列番号 24 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V H C D R 3

を含み、及び／又は

前記軽鎖可変領域は、

(i v) 配列番号 26 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 1、

(v) 配列番号 27 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 2、及び／又は

(v i) 配列番号 28 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する V L C D R 3

を含む。

【 0 0 2 8 】

一部の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号 22、23、24、26、27、及び 28、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列からなる群から選択される C D R の 1 つ以上を含む。

【 0 0 2 9 】

一部の好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 22、23 及び 24、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 2 つ以上を含む。特に好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 22、23 及び 24、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 3 つを含む。

【 0 0 3 0 】

追加的又は代替的实施形態において、本抗体は、配列番号 26、27 及び 28、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 2 つ以上を含む。特に好ましい実施形態において、本抗体は、配列番号 26、27 及び 28、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 3 つを含む。

【 0 0 3 1 】

従って、一部の実施形態において、本抗体は、配列番号 22、23 及び 24、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の重鎖 C D R の 3 つと、配列番号 26、27 及び 28、又は前述の配列番号のいずれか 1 つと実質的に相同な配列の軽鎖 C D R の 3 つとを含む。

【 0 0 3 2 】

一部の実施形態において、本抗体は、配列番号 21 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む重鎖、及び／又は配列番号 25 のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を含む軽鎖を含む。

【 0 0 3 3 】

一部の実施形態において、抗体は、単鎖断片変異体 (s c F v) である。従って、一部の態様において、本抗体は、アミノ酸配列の配列番号 29、又はそれと実質的に相同な配列を含む。

【 0 0 3 4 】

理論によって拘束されることを望むものではないが、上記のパート (a ') に定義される抗体は、C L E C 1 4 A の C 型レクチンドメインにあるエピトープ (例えば、C L E C

10

20

30

40

50

14Aの残基22～173)に結合しないものと仮定される。詳細には、本抗体は、C型レクチンドメインに隣接したCLEC14Aのsushi様ドメイン(残基174～244)の領域内、例えば残基174～210、174～200、174～190の範囲内にあるエピトープに結合し得るものと思われる。

【0035】

好ましい実施形態において、上記のパート(a')に定義される抗体と競合し得る抗体は、上記のパート(a')に定義される抗体と実質的に同じエピトープに結合することができる。従って、一部の実施形態において、上記のパート(a')に定義される抗体と競合し得る抗体は、CLEC14AのC型レクチンドメインとsushi様ドメインとの間の領域内にあるエピトープに結合することができる。抗体がこれらのエピトープ又は領域のいずれかに結合するか否かは、ELISAなどの本明細書に記載される結合アッセイを含め、当該技術分野における標準的な技法を用いて評価することができる。

10

【0036】

用語「競合抗体」、は、本明細書で使用されるとき、「参照抗体」とほぼ、実質的に又は本質的に同じであるか、又は更には同じエピトープに結合する抗体を指す。「競合抗体」には、オーバーラップするエピトープ特異性を有する抗体が含まれる。従って、競合抗体は、CLEC14Aへの結合に関して参照抗体と有効に競合することが可能である。好ましくは、競合抗体は、参照抗体と同じエピトープに結合することができる。別の見方をすれば、競合抗体は、好ましくは参照抗体と同じエピトープ特異性を有する。

【0037】

「参照抗体」は、本明細書で使用されるとき、CLEC14Aのエピトープ(例えば、CLEC14A、好ましくはヒトCLEC14Aの細胞外ドメイン)に結合することができ、且つ本明細書に定義されるCDR配列の1つ以上、好ましくは本明細書に定義されるとおりのVH及びVLドメインを有する抗体である。

20

【0038】

1つ以上の競合抗体の同定は、本発明の抗体、即ち参照抗体(CRT-2及びCRT-3)の提供に鑑みると、単純な技術的事項である。競合抗体の同定が参照抗体との比較で決定されることに伴い、競合抗体を同定するためにいずれか一方又は両方の抗体が結合するエピトープを実際に決定する必要は全くないことが理解されるであろう。しかしながら、必要に応じて標準的な技法を用いてエピトープマッピングを実施することができる。

30

【0039】

例として、エピトープの同定及び定義について、本明細書では以下の方法が挙げられる。CLEC14Aのアミノ酸配列は既知であり、そのため、例えばPepscanアッセイを用いたエピトープマッピングに合成ペプチドを使用し得る。部位特異的突然変異誘発もエピトープマッピングの強力なツールであり、免疫複合体形成における単一アミノ酸の役割を評価するのに用いることができる。タンパク質フットプリント法は、エピトープが抗体-抗原複合体として結合しているときに切断から保護されるという事実に依存するものである。酵素結合免疫吸着アッセイ(ELISA)及び赤血球凝集反応及びスロットブロット法もエピトープマッピングに用い得る。抗体による抗原の結晶化は、非線状エピトープのマッピングに用い得る。かかる方法の実施プロトコルは、広く利用可能であり、当業者は、エピトープマッピングの好適な代替方法を認識しているであろう。

40

【0040】

競合抗体の同定は、抗体競合を評価し得る様々な免疫学的スクリーニングアッセイのいずれか1つを用いて容易に決定することができる。かかるアッセイは、いずれも当該技術分野の常法であり、米国特許第6,342,219号、同第6,524,583号、同第7,056,509号、同第6,887,468号、同第6,342,221号、同第6,676,941号、同第6,703,020号及び同第6,416,758号の各々が、競合抗体をどのように同定するかに関して本教示を補足する目的で参照により本明細書に具体的に援用される。

【0041】

50

例えば、調べようとする試験抗体が異なる供給源動物から入手される場合、又は更には異なるアイソタイプである場合、参照抗体と試験抗体とを混合して（又は予め吸着させておき）、CLEC14A含有組成物、好ましくはCLEC14Aを発現する細胞、CLEC14Aのファージディスプレイ、又は固定化したCLEC14Aを含有するバイオチップに適用する単純な競合アッセイを利用し得る。かかる単純な競合試験における使用には、ELISAをベースとするプロトコルが特に好適である。

【0042】

特定の実施形態において、抗原組成物を適用する前に、参照抗体（例えば、本明細書に定義するとおりのCRT2又はCRT3）を様々な量の試験抗体（例えば、1:10、1:100又は1:1000）と所定の期間にわたって予め混合してもよい。他の実施形態において、参照抗体及び様々な量の試験抗体は、単純に抗原組成物への曝露時に混合することができる。いずれの場合にも、種又はアイソタイプ二次抗体を使用することにより、結合した参照抗体のみを検出することが可能であり、その結合が、結合に関して「競合する」試験抗体の存在によって減少することになる。

10

【0043】

参照抗体と任意の試験抗体（種又はアイソタイプに関係なく）との間の抗体競合試験の実施では、初めに参照（例えば、CRT-2又はCRT-3）を例えばビオチン又は酵素若しくは放射性標識などの検出可能標識で標識して、続く同定を可能にし得る。このような場合、標識された参照抗体を調査下の試験抗体と様々な比（例えば、1:10、1:100又は1:1000）で予め混合又はインキュベートして、次に（任意選択で好適な時間が経った後に）標識された参照抗体の反応性をアッセイし、競合する可能性のある試験抗体をインキュベーションに含まなかった対照値とそれを比較し得る。

20

【0044】

アッセイは、抗体結合に基づく様々な免疫学的アッセイのいずれか1つであってよく、参照抗体は、その標識の検出により、例えばビオチン化抗体の場合にはストレプトアビジンを用いるか、又は酵素標識に関連する発色基質（ペルオキシダーゼ酵素での3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン（TMB）基質など）を用いて、又は単純に放射性標識を検出することにより検出し得る。CLEC14Aへの結合に関して参照抗体と競合する抗体は、結合した標識の減少から明らかなどおり、CLEC14Aへの参照抗体の結合を有効に又は有意に減少させることが可能であり得る。

30

【0045】

完全に無関係な抗体の存在下における（標識した）参照抗体の反応性が対照高値となり得る。対照低値は、競合が起こって標識抗体の結合が減少するであろうとき、標識した参照（例えば、CRT-2又はCRT-3）抗体を全く同じタイプの非標識抗体とインキュベートすることにより得られ得る。試験アッセイでは、試験抗体の存在下における標識抗体の反応性の有意な減少が、CLEC14Aへの結合に関して標識抗体と「競合」する試験抗体の指標となる。

【0046】

有意な減少は、「再現可能」である、即ち一貫して観察される結合の減少である。本願に関する「有意な減少」とは、約1:10～約1:100の任意の比で少なくとも約20%、より好ましくは少なくとも約25、30、35、40、45、50、55、60又は65%、更により好ましくは少なくとも約70%、約75%又は約80%の（ELISAにおける参照抗体によるCLEC14Aへの結合の）再現可能な減少として定義される。更によりストリンジентな競合活性を有する抗体は、約1:10～約1:100の任意の比で少なくとも約82%、約85%、約88%、約90%、約92%又は約95%などの（ELISA又は他の好適なアッセイにおける参照抗体によるCLEC14Aへの結合の）再現可能な減少を呈するであろう。約99%、約98%、約97%又は約96%などの参照抗体によるCLEC14Aへの結合の再現可能な減少を呈するなど、完全な又はほぼ完全な競合は、本発明の実施に決して必要ではないが、除外されないことは確かである。

40

50

【0047】

上記に記載される方法は、好適な競合アッセイのごく一例に過ぎない。当業者は、他の好適な方法及び変形例を認識しているであろう。別の競合アッセイを以下に記載する。

【0048】

フローサイトメトリーを用いて別の競合アッセイを実施する前に、幾らかの分量の試験抗体を例えばビオチン化によって標識しなければならない。ビオチン化産物の機能（細胞結合特性の維持）及び一定数のCLEC14A+細胞に対して準最大の結合をもたらす本発明のビオチン化抗体（Ab1）の最小濃度を決定する。指数関数的に成長する培養物から合計 10^6 細胞を回収し、様々な抗体濃度を伴い好適な温度で好適な時間にわたって、例えば4で1時間インキュベートする。細胞を洗浄し、好適な検出抗体と共に好適な温度で好適な時間にわたって、例えば4で更に1時間インキュベートする。洗浄後、細胞をフローサイトメトリーによって分析する。各試験抗体について、データから抗体濃度に対する蛍光強度中央値（MFI）をプロットすることにより飽和曲線を作成する。

10

【0049】

別の競合アッセイについて、CLEC14A+細胞を上記のとおり調製し、一定濃度の標識（ビオチン化）抗体（bio-Ab1）と漸増濃度の非標識競合抗体との混合物によってデュプリケートで処置し得る。一定濃度は、上記で決定されるとおりの一定数の腫瘍細胞に対して妥当な蛍光シグナルを生成する最小抗体濃度である。理想的には、nM単位のこの一定濃度は、平衡状態における処置抗体の親和性（Kd）より低いはずである。この場合、記載される方法は、競合抗体の親和性の推定に用いることができる。抗体混合物を標的細胞と好適な温度で好適な時間にわたって、例えば4で1時間インキュベートする。細胞を洗浄し、FITC標識ストレプトアビジンとインキュベートすることによりビオチン化抗体の細胞結合を明らかにする。各試験試料（bio-Ab1+Ab2）について蛍光読取り中央値からバックグラウンド蛍光（PBS-5%FCS）を差し引いた後、各Ab2濃度「c」について以下の式に従い阻害パーセンテージを計算する。

20

$$\% \text{阻害} = (1 - \text{MFI}_{\text{bio-Ab1+Ab2}} / \text{MFI}_{\text{bio-Ab1}}) \times 100$$

【0050】

上述のとおり、競合抗体は、本明細書に開示されるCDRアミノ酸配列と実質的に相同な1つ以上のCDRを含み得る。CDR配列に関して、用語「実質的に相同」は、本明細書に開示されるCDR配列と比べて1、2、3又は4個の置換、欠失又は付加、好ましくは1、2、3又は4個の置換を有する配列を意味するものと意図される。一部の実施形態において、前記置換は、保存的若しくは非保存的アミノ酸置換又はこれらの混合であってもよい。

30

【0051】

従って、一部の実施形態において、実質的に相同な配列は、本明細書に開示されるCDR領域の1つ以上に变化したアミノ酸を1、2又は3個以下、好ましくは1又は2個以下含有する配列であり得る。一部の好ましい実施形態において、前記アミノ酸置換は、保存的アミノ酸置換である。

【0052】

全ての実施形態において、実質的に相同な配列を含む抗体は、CLEC14Aと結合する能力を維持している。

40

【0053】

本発明の好ましい抗体は、3つのCDRを含む少なくとも1つの重鎖可変領域と、3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含む。これらのCDRについての例示的な好ましい配列は、本明細書に記載される。

【0054】

本明細書で使用されるとき、簡略用語「CLEC14A」は、具体的に明記されたり、又は科学用語から明らかになったりしない限り、C型レクチンドメインファミリーメンバー14A（上皮成長因子受容体5（EGFR5）としても知られる）を意味する。

50

【0055】

CLEC14Aは遊離CLEC14A、例えば組換え又は精製CLEC14Aであってもよいが、好ましくは、それは、天然形態で、例えば細胞の表面上に存在する。

【0056】

本発明の抗体は、CLEC14Aの断片、詳細には細胞外ドメインを含む又はそれからなる断片にも結合することができ、又はCLEC14A若しくはCLEC14Aの断片を含む実体に結合することができる。実際、上記に記載したとおり、本発明の抗体のエピトープはCLEC14Aの細胞外ドメインに位置するものと思われる。

【0057】

「CLEC14A」は、特に哺乳類種間でCLEC14Aが保存されていることに伴い、任意の形態のCLEC14Aも指し得る。従って本発明の抗体又は抗体断片は、ヒト、サル（例えば、カニクイザル）、雌ウシ（ウシ）、マウス、ラット、ハムスター、フェレット、モルモット及び/又はウサギCLEC14Aに例えば結合し得る。好ましくは、本発明の抗体又は抗体断片は少なくともヒトCLEC14Aに結合することになる。従って、特に明記しない限り、本明細書における「CLEC14A」といふいかなる表現も、「ヒトCLEC14A」を意味するものと読まれ得る。特定の好ましい実施形態において、本発明の抗体又は抗体断片は少なくともヒト及びサル（例えば、カニクイザル）CLEC14Aに結合することになる。他の好ましい実施形態において本発明の抗体又は抗体断片は少なくともヒト及びマウスCLEC14Aに結合することになる。他の好ましい実施形態において本発明の抗体又は抗体断片は少なくともヒト、サル及びマウスCLEC14Aに結合することになる。他の好ましい実施形態において本発明の抗体又は抗体断片は少なくともヒト、サル、モルモット及びマウスCLEC14Aに結合することになる。

【0058】

本明細書で使用されるとき、用語「CLEC14Aに結合する～」又は「抗CLEC14A」は、本発明の抗体又は抗体断片との関連において、以下の1つ以上、好ましくは、以下の2つ以上、及び最も好ましくは、以下の全ての能力を有する抗体又は抗体断片を意味する：

(a) 例えばフローサイトメトリー又は免疫組織化学によって評価されるとおりの、細胞の表面上に発現したCLEC14Aに結合する能力、

(b) 例えば非還元条件下におけるウエスタンブロットでCLEC14Aへの結合によって評価されるとおりの、コンホメーション依存的（例えば、非線状）CLEC14Aエピトープに結合する能力、

(c) 例えばELISAアッセイ又はBIAcoreアッセイによって評価されるとおりの、固体支持体上の遊離CLEC14A、例えば組換え発現したCLEC14Aに結合する能力、及び/又は

(d) 少なくともヒトCLEC14A、より好ましくはヒト及びサルCLEC14A又はヒト及びマウスCLEC14A、最も好ましくはヒト、サル及びマウスCLEC14Aに結合する能力。

【0059】

本発明の好ましい抗体又は抗体断片は、腫瘍を有する動物に投与したときに腫瘍に局在化する能力も有し得る。

【0060】

CLEC14A + 細胞への結合との関連において、本発明の抗体は、CLEC14A + 細胞に結合し、且つCLEC14A - 細胞に有意に結合しないと理解されるべきである。

【0061】

用語「CLEC14A - 細胞に有意に結合しない」は、抗体によるCLEC14A - 細胞へのいかなる結合も前記抗体の治療又は診断目的での使用を妨げないというように理解されるべきである。従って、CLEC14A - 細胞への「有意でない」結合とは、抗体によるCLEC14A - 細胞への結合が、1つ以上のCLEC14A + 細胞へのその結合と比べて弱いことを意味する。従って、正常細胞との何らかの交差反応が起こり得るが、こ

10

20

30

40

50

の結合レベルは、「バックグラウンド」結合と見なし得る。治療又は診断目的では、主に考慮すべき点は、抗体が治療又は診断適用中に接触し得るいかなる C L E C 1 4 A - 細胞よりも強く 1 種以上の C L E C 1 4 A + 細胞に結合しなければならないことである。

【 0 0 6 2 】

本発明の抗体は、「 C L E C 1 4 A 特異的」と称され得る。用語「 C L E C 1 4 A 特異的」は、抗体による C L E C 1 4 A 発現細胞への結合が前記抗体の治療又は診断目的での使用を可能にするのに十分特異的であるというように解釈されるべきである。当業者は、任意の所与の抗体が C L E C 1 4 A 特異的であるかどうかについて、標的 C L E C 1 4 A + 細胞への結合強度を 1 種以上の C L E C 1 4 A - 細胞、例えば野生型（即ち、 C L E C 1 4 A で形質転換されていない） H U V E C 細胞又は H E K 2 9 3 T 細胞への結合強度と比較することにより容易に決定し得る。

10

【 0 0 6 3 】

当業者は、 C L E C 1 4 A - 細胞と比較した C L E C 1 4 A + 細胞への結合が、フローサイトメトリーを用いるなど、当該技術分野において公知の任意の好適な手段によって評価し得ることを知っているであろう。同様に、種交差反応性は、公知の方法を用いて評価し得る。

【 0 0 6 4 】

他の好ましい特性としては、本発明の抗体が投与されたときに有意なインビボ毒性がないこと、及び有意な他のインビボ副作用がないことが挙げられる。

【 0 0 6 5 】

「 C L E C 1 4 A + 細胞」とは、その表面上に C L E C 1 4 A を好ましくは少なくともも実質的にその野生型コンホメーションで発現する細胞を意味する。 C L E C 1 4 A + 細胞は、天然で C L E C 1 4 A 陽性であってもよく、又は組換え C L E C 1 4 A を発現する形質転換体であってもよい。

20

【 0 0 6 6 】

用語「抗体」及び「免疫グロブリン」は、本明細書で使用されるとき、広義に、ポリクローナル抗体及びモノクローナル抗体を含め、抗原結合ドメインを含む任意の免疫学的結合剤又は結合分子を指す。全抗体は、重鎖の定常ドメインのタイプに応じて 5 つの主要なクラス： I g A、 I g D、 I g E、 I g G 及び I g M の 1 つに割り当てられ、本発明の抗体は、これらのクラスのいずれか 1 つであり得る。これらの幾つかは、サブクラス又はアイソタイプ、例えば I g G 1、 I g G 2、 I g G 3、 I g G 4 などにより更に分けられる。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインは、それぞれ、及び μ と呼ばれる。異なるクラスの免疫グロブリンのサブユニット構造及び三次元配置は周知である。

30

【 0 0 6 7 】

概して、抗原結合領域（即ち、抗体断片）よりむしろ全抗体が本発明に使用される場合、 I g G 及び / 又は I g M が、生理学的状況で最も一般的な抗体であるため、及び実験室セッティングでの作製が最も容易であるために好ましい。 I g G 1 抗体が特に好ましい。

【 0 0 6 8 】

哺乳類抗体の「軽鎖」は、その定常ドメインのアミノ酸配列及びその可変ドメインのフレームワーク領域における一部のアミノ酸に基づいて 2 つの明確に異なるタイプ：カッパ（ κ ）及びラムダ（ λ ）の一方に割り当てられる。本質的に、本発明の抗体における又は軽鎖定常領域の使用に優先順位はない。

40

【 0 0 6 9 】

当業者が理解するであろうとおり、用語「抗体」に包含される免疫学的結合試薬は、全抗体、二量体、三量体及び多量体抗体、二重特異性抗体、キメラ抗体、組換え及び改変抗体並びにこれらの断片を含め、あらゆる抗体及びその抗原結合断片にまで及ぶ。

【 0 0 7 0 】

従って、用語「抗体」は、抗原結合領域を有する任意の抗体様分子を指して使用され、この用語は、 F a b '、 F a b、 F (a b ') 2、シングルドメイン抗体（ D A B ）、 T

50

a n d A b 二量体、F v、s c F v (単鎖 F v)、d s F v、d s - s c F v、F d、線状抗体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片、バイボディ、トリボディ (s c F v - F a b 融合体、それぞれ二重特異性又は三重特異性)、s c - ダイアボディ、カップ (ラムダ) ボディ (s c F v - C L 融合体)、二重特異性 T 細胞エンゲイジャー (B i T E) (T 細胞を引きつける s c F v - s c F v タンデム)、デュアル可変ドメイン (D V D) - I g (二重特異フォーマット)、小型免疫タンパク質 (S I P) (ミニボディの一種)、S M I P (「 小型モジュール式免疫医薬品 (small modular immunopharmaceutical) 」 s c F v - F c 二量体、D A R T (d s 安定化ダイアボディ「デュアルアフィニティリターゲティング」)、1 つ以上の C D R を含む小型抗体模倣体など、抗原結合ドメインを含む抗体断片を含む。

10

【 0 0 7 1 】

様々な抗体ベースの構築物及び断片の調製及び使用技法は、当該技術分野において周知である (Kabat et al., 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 647-669, 1991 (参照により本明細書に具体的に援用される) を参照されたい)。特に、ダイアボディについては、国際公開第 9 3 / 1 1 1 6 1 号に詳細に記載されている。一方、線状抗体については、Zapata et al. (Protein Eng., 8(10):1057-1062, 1995) に詳細に記載されている。

【 0 0 7 2 】

抗体は、従来技法を用いて断片化することができる。例えば、F (a b ') 2 断片は、抗体をペプシンで処理することにより作成できる。得られた F (a b ') 2 断片を処理してジスルフィド架橋を還元すると F a b ' 断片が作られる。パイン消化は、F a b 断片の形成につながり得る。F a b、F a b ' 及び F (a b ') 2、s c F v、F v、d s F v、F d、d A b、T a n d A b、d s - s c F v、二量体、ミニボディ、ダイアボディ、二重特異性抗体断片及び他の断片も組換え技術によって合成することができ、又は化学的に合成することができる。抗体断片の作製技法は、当該技術分野において周知であり、記載されている。

20

【 0 0 7 3 】

抗体又は抗体断片は、天然で作製されてもよく、又は全体的若しくは部分的に合成で作製されてもよい。従って、抗体は、任意の適切な供給源、例えば組換え供給源からのものであってもよく、及び / 又はトランスジェニック動物若しくはトランスジェニック植物で又は卵で I g Y 技術を用いて作製されてもよい。従って、抗体分子は、インビトロ又はインビボで作製することができる。

30

【 0 0 7 4 】

好ましくは、抗体又は抗体断片は、3 つの C D R ドメインを含む抗体軽鎖可変領域 (V L) と、3 つの C D R ドメインを含む抗体重鎖可変領域 (V H) とを含む。前記 V L 及び V H は、概して抗原結合部位を形成する。

【 0 0 7 5 】

「 F v 」断片は、完全な抗原認識及び結合部位を含有する最小限の抗体断片である。この領域は、緊密に非共有結合的に会合した 1 つの重鎖可変ドメインと、1 つの軽鎖可変ドメインとの二量体を有する。各可変ドメインの 3 つの超可変領域 (C D R) が相互作用して V H - V L 二量体の表面上の抗原結合部位を定義するのは、この配置にある。集合的には、6 つの超可変領域 (C D R) が抗体に抗原結合特異性を付与する。

40

【 0 0 7 6 】

しかしながら、当該技術分野では、抗体の軽鎖可変ドメインからの 3 つの C D R 及び重鎖可変ドメインからの 3 つの C D R の存在が抗原結合に必ずしも必要でないことが十分に裏付けられている。従って、上記の古典的抗体断片よりも小さい構築物が有効であることが公知である。

【 0 0 7 7 】

例えば、ラクダ科動物抗体は、広範な抗原結合レパートリーを有するが、軽鎖を欠いている。また、V H ドメイン単独又は V L ドメイン単独を含むシングルドメイン抗体による

50

結果は、これらのドメインが抗原に対して許容可能な高い親和性で結合できることを示している。従って、3つのCDRは、抗原と有効に結合することができる。更に、単一のCDR、又は2つのCDRが抗原と有効に結合することも公知である。

【0078】

特に、2つのCDRが抗原と有効に結合することができ、更には親抗体が有するより優れた特性を付与することさえできることが公知である。例えば、親抗体からの2つのCDR（VH CDR 1及びVL CDR 3領域）が親分子の抗原認識特性を保持し、しかし、より優れた腫瘍への侵入能力を有し得ることが示されている。これらのCDRドメインを適切なリンカー配列（例えば、VH FR 2からのもの）でつなぎ合わせてCDRを天然親抗体と似た方法で配向させると、むしろ一層良好な抗原認識が生じた。従って、当該技術分野では、適切なフレームワーク領域を用いて親抗体に見られるコンホメーションを維持するように配向された2つのCDRドメイン（好ましくはVHドメインからの1つ及びVLドメインからの1つ、より好ましくは2つのCDRドメインの一方がCDR 3ドメインである）を含む抗原結合抗体模倣体を構築可能であることは公知である。

10

【0079】

従って、本発明の好ましい抗体は、6つのCDR領域（軽鎖からの3つ及び重鎖からの3つ）を含み得るが、6つより少ないCDR領域及び僅か1つ又は2つのCDR領域を有する抗体が本発明に包含される。加えて、重鎖又は軽鎖のみからのCDRを有する抗体も企図される。これに関して、本発明は、CLEC 1 4 Aに選択的に結合する抗体であって、

20

(i) 配列番号2若しくは42のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR 1、

(ii) 配列番号3若しくは43のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR 2、及び/又は

(iii) 配列番号4若しくは44のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR 3、及び/又は

(iv) 配列番号6若しくは46のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVL CDR 1、

(v) 配列番号7若しくは47のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVL CDR 2、及び/又は

30

(vi) 配列番号8若しくは48のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVL CDR 3

の少なくとも1つを含む抗体を更に提供する。

【0080】

更に、CLEC 1 4 Aに選択的に結合し、且つ

(i) 配列番号22のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR 1、

(ii) 配列番号23のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR 2、及び/又は

(iii) 配列番号24のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR 3、及び/又は

40

(iv) 配列番号26のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVL CDR 1、

(v) 配列番号27のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVL CDR 2、及び/又は

(vi) 配列番号28のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVL CDR 3

の少なくとも1つを含む抗体が提供される。

【0081】

CLEC 1 4 Aに結合する本発明の好ましい抗体は、3つのCDRを含む少なくとも1

50

つの重鎖可変領域と、3つのCDRを含む少なくとも1つの軽鎖可変領域とを含み、前記重鎖可変領域は、

(a) 配列番号2若しくは42のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する可変重鎖(VH)CDR1、

(b) 配列番号3若しくは43のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR2、及び

(c) 配列番号4若しくは44のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR3、又は

(d) 配列番号22のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有する可変重鎖(VH)CDR1、

(e) 配列番号23のアミノ酸配、列又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR2、及び

(f) 配列番号24のアミノ酸配列、又はそれと実質的に相同な配列を有するVH CDR3

を含む。

【0082】

指定される重鎖CDR領域と併せて用いる好ましい軽鎖CDR領域が本明細書の他の部分に記載される。しかしながら、本発明の重鎖可変領域と併せて用いる3つのCDRを含む他の軽鎖可変領域も企図される。本発明の重鎖可変領域と組み合わせ用いることができ、且つCLEC14Aに結合する抗体を生じさせる適切な軽鎖可変領域は、当業者が容易に同定することができる。

【0083】

例えば、本発明の重鎖可変領域を単一の軽鎖可変領域又は軽鎖可変領域のレパートリーと組み合わせ、得られた抗体をCLEC14Aへの結合に関して試験することができる。本発明の重鎖可変領域と種々の軽鎖可変領域との妥当な数のかかる組み合わせがCLEC14Aとの結合能力を保持しているであろうことが予想され得る。

【0084】

同様の方法を用いて、本発明の好ましい軽鎖可変領域と組み合わせ用いる代替的な重鎖可変領域を同定し得る。

【0085】

特定の実施形態において、抗体又は抗体断片は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgE、IgM又はIgD定常領域など、重鎖定常領域の全て又は一部分を含む。好ましくは、重鎖定常領域は、IgG1重鎖定常領域又はその一部分である。更に、抗体又は抗体断片は、カッパ軽鎖定常領域若しくはラムダ軽鎖定常領域の全て若しくは一部分、又はその一部分を含むことができる。かかる定常領域の全て又は一部は、天然で産生されてもよく、又は全体的若しくは部分的に合成されてもよい。かかる定常領域の適切な配列は、当該技術分野において周知であり、報告されている。本発明の抗体に重鎖及び軽鎖からの定常領域が一揃い全て含まれる場合、かかる抗体は、典型的には本明細書では「完全長」抗体又は「全」抗体と称される。

【0086】

ある種の使用、特にインビボでの治療的使用には、Fc領域を含有する抗体が好ましい。

【0087】

好ましい実施形態において本発明の抗体は、モノクローナル抗体であり、これは、ヒト化抗体又はヒトモノクローナル抗体であってもよい。これに関して、ヒト抗体又はヒト化抗体には、概してヒト療法での使用上の潜在的な利点が少なくとも3つある。第一に、ヒト免疫系は、抗体を外来性と認識しないはずである。第二に、ヒト循環中における半減期は、天然に存在するヒト抗体と同様であり得るため、より少量且つより低頻度の用量で投与することが可能になる。第三に、エフェクター部分は、ヒトであるため、ヒト免疫系の他の部分とより良好に相互作用し得る。

10

20

30

40

50

【 0 0 8 8 】

従って、本実施例に開示される特異抗体は、公知の方法で、例えばヒト抗体のフレームワークに前記マウス抗体のCDR領域を挿入することにより「ヒト化」されてもよい。ヒト化抗体は、Verhoeyen et al (1988) Science, 239, 1534-1536及びKettleborough et al, (1991) Protein Engineering, 14(7), 773-783に記載される技法及び手法を用いて作製することができる。一部の例では、ヒト免疫グロブリンのFvフレームワーク残基が対応する非ヒト残基に置き換えられる。一般に、ヒト化抗体は、CDR領域の全て又はほとんどが非ヒト免疫グロブリンのものに対応する可変ドメインと、実質的に又は完全にヒト免疫グロブリンコンセンサス配列のものであるフレームワーク領域とを含有することになる。

10

【 0 0 8 9 】

完全ヒト抗体は、組換え技術を用いて作製し得る。典型的には、何十億もの異なる抗体を含む大規模ライブラリが使用される。例えば、マウス抗体のキメラ化又はヒト化を用いる従来技術とは対照的に、この技術は、特異抗体を作成するのに動物の免疫に依存しない。代わりに、組換えライブラリが膨大な数の予め作製された抗体変異体を含み、このライブラリが任意の抗原に特異的な抗体を少なくとも1つ有することになるものと見込まれる。従って、本発明との関連では、かかるライブラリを用いて所望の結合特性を有する競合抗体を同定することができる。ライブラリにおいて良好な結合体を効率的に見付けるため、表現型、即ち抗体又は抗体断片をその遺伝子型、即ちコード遺伝子と関係付ける様々なシステムが考案されている。最も一般的に用いられているかかるシステムは、いわゆるファージディスプレイシステムであり、ここで、抗体断片は、繊維状ファージ粒子の表面上のファージコートタンパク質との融合物として発現し、提示されると同時に、提示された分子をコードする遺伝情報を有している (McCafferty et al, 1990, Nature 348: 552-554)。特定の抗原に特異的なファージ提示抗体断片は、その抗原への結合によって選択し得る。次に、単離したファージを増幅してもよく、及び任意選択で、選択された抗体可変ドメインをコードする遺伝子を例えば完全長免疫グロブリンなどの他の抗体フォーマットに移して、当該技術分野において周知の適切なベクター及び宿主細胞を用いて多量に発現させてもよい。代替的に、「ヒト」抗体は、本質的にヒト免疫グロブリン遺伝子を含有するトランスジェニックマウスを免疫することによって作製してもよい (Vaughan et al (1998) Nature Biotechnol. 16, 535-539)。

20

30

【 0 0 9 0 】

本発明の「ヒト」及び「ヒト化」抗体は、ヒト配列によってコードされないアミノ酸残基、例えばインビトロでランダム又は部位特異的突然変異によって導入された突然変異、例えばインビトロクローニング又はPCRによって導入された突然変異を含み得る。かかる突然変異の詳細な例は、抗体の少数の残基、例えば抗体の残基の5、4、3、2又は1個以下、好ましくは例えば抗体のCDRの1つ以上を構成する残基の5、4、3、2又は1個以下における保存的置換が関わる突然変異又は他の突然変異（非保存的置換、付加及び/又は欠失）である。かかる「ヒト」及び「ヒト化」抗体の特定の例としては、潜在的に免疫原性の部位の量が減少するように標準的な修飾技法に供された抗体及び可変領域が挙げられる。

40

【 0 0 9 1 】

従って、本発明の「ヒト」及び「ヒト化」抗体は、ヒトに見られる配列に由来し且つそれに関係する配列であって、しかし、生体内でヒト抗体生殖細胞系列レパートリー内には天然に存在しないものであり得る配列を含む。加えて、本発明のヒト及びヒト化抗体は、ヒト配列から同定されるヒトコンセンサス配列又はヒト配列と実質的に相同な配列を含むタンパク質を含む。

【 0 0 9 2 】

加えて、本発明のヒト及びヒト化抗体は、それ自体がヒト抗体分子に組み合わせで見られるVH、VL、CDR又はFR領域の組み合わせに限定されない。従って、本発明のヒト及びヒト化抗体は、必ずしも天然でヒトに存在するとは限らないかかる領域の組み合わ

50

せを含んでもよく、又はそれに対応してもよい。

【0093】

一部の実施形態において、ヒト抗体は、完全ヒト抗体であってもよい。「完全ヒト」抗体とは、本明細書で使用されるとき、上記に定義するとおりの「ヒト」可変領域ドメイン及び/又はCDRを含み、実質的な非ヒト抗体配列を含まないか又はいかなる非ヒト抗体配列も含まない抗体である。例えば、「実質的な非ヒト抗体配列を含まない」ヒト可変領域ドメイン及び/又はCDRを含む抗体とは、ヒト抗体配列によってコードされないアミノ酸が5、4、3、2又は1アミノ酸以下のみある抗体、ドメイン及び/又はCDRである。従って、「完全ヒト」抗体は、ヒト抗体に典型的に存在するアミノ酸により良好に対応するように特定のアミノ酸が変更されている実質的に非ヒトの可変領域ドメイン、例えばマウス可変領域ドメインをベースとする「ヒト化」抗体とは区別される。

10

【0094】

本発明の「完全ヒト」抗体は、一本鎖抗体であるなど、いかなる他の実質的な抗体配列も含まないヒト可変領域ドメイン及び/又はCDRであってもよい。代替的に、本発明の「完全ヒト」抗体は、1つ以上のヒト抗体定常領域と一体化したか又はそれに作動可能に付加されているヒト可変領域ドメイン及び/又はCDRであってもよい。特定の好ましい完全ヒト抗体は、IgG定常領域を一揃い全て有するIgG抗体である。

【0095】

他の実施形態において、本発明の「ヒト」抗体は、一部がヒトのキメラ抗体であり得る。「一部がヒトのキメラ」抗体とは、本明細書で使用されるとき、ラット又はマウスなどの非ヒト種の定常領域に作動可能に付加されたか又はそれにグラフトされた「ヒト」可変領域ドメイン及び/又はCDRを含む抗体である。かかる一部がヒトのキメラ抗体は、例えば、前臨床試験で用いられてもよく、ここで、定常領域は、好ましくは前臨床試験で使用される動物と同じ種のものであり得る。これらの一部がヒトのキメラ抗体は、例えば、エキソピボ診断に用いられてもよく、ここで、非ヒト種の定常領域は、抗体検出の更なる選択肢を提供し得る。

20

【0096】

用語「断片」は、本明細書で使用されるとき、生物学的に関連性のある断片、例えば抗原結合に寄与する、例えば抗原結合部位の一部を形成する断片、及び/又はCLEC14A抗原の機能又は活性の阻害又は低減に寄与する断片を指す。特定の好ましい断片は、本発明の抗体の重鎖可変領域(VHドメイン)及び/又は軽鎖可変領域(VLドメイン)を含む。他の好ましい断片は、本発明の抗体の(又は本発明のVHドメインの)重鎖CDRの1つ以上、又は本発明の抗体の(又は本発明のVLドメインの)軽鎖CDRの1つ以上を含む。特定の好ましい断片は、少なくとも5アミノ酸長であり、及び少なくとも1つのCDR領域、好ましくはCDR3領域、より好ましくは重鎖CDR3領域を含む。

30

【0097】

定義される配列のいずれかの断片を含む(例えば、配列番号1、5、21、25、41又は45の断片を含む)本発明の抗体が、例えば、本発明のVH及び/又はVLドメインを含む抗体であるか、又は本発明の1つ以上のCDRを含む抗体である実施形態において、これらの領域/ドメインは、概して抗体内で分離されており、そのため、各領域/ドメインがその生物学的機能を果たすことができ、及び抗原結合への寄与が保持される。従って、VH及びVLドメインは、好ましくは、適切な足場配列/リンカー配列によって分離されており、及びCDRは、好ましくは、天然に存在する抗体及び/又は有効な改変抗体に見られるような適切なフレームワーク領域によって分離されている。従って、本発明のVH、VL及び個々のCDR配列は、好ましくは、抗原結合が実現するように適切なフレームワーク又は足場内に提供されるか又はそれに組み込まれる。かかるフレームワーク配列又は領域は、適切な足場を形成するのに適切なおりの、天然に存在するフレームワーク領域FR1、FR2、FR3及び/又はFR4に対応してもよく、又は例えば様々な天然に存在するフレームワーク領域を比較することによって同定されたコンセンサスフレームワーク領域に対応してもよい。代替的に、非抗体足場又はフレームワーク、例えばT細

40

50

胞受容体フレームワークを使用することもできる。

【0098】

フレームワーク領域に使用することのできる適切な配列は、当該技術分野において周知であり、報告されており、それらのいずれを使用してもよい。フレームワーク領域に好ましい配列は、本発明のVH及び/又はVLドメインを構成するフレームワーク領域の1つ以上(即ち、1、2、3又は4つ)、即ち配列番号1、5、21、25、41又は45内に見られるフレームワーク領域又はそれと実質的に相同なフレームワーク領域、及び詳細には抗原特異性の維持を可能にするフレームワーク領域、例えば抗体の実質的に同じであるか又は同じ三次元構造をもたらすフレームワーク領域の1つ以上である。

【0099】

本発明の抗体のフレームワーク領域との関連において、用語「実質的に相同」は、本明細書に開示されるアミノ酸配列と少なくとも60%、65%、70%又は75%、好ましくは少なくとも80%、及び更により好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列を含む。従って、本発明の実質的に相同な配列は、本発明の配列に対して単一又は複数の塩基又はアミノ酸変化(付加、置換、挿入又は欠失)を含む。アミノ酸レベルでは、好ましい実質的に相同な配列は、本発明の配列を構成するフレームワーク領域の1つ以上及び/又はCDRの1つ以上に變化したアミノ酸を1、2、3、4又は5個以下、好ましくは1、2又は3個以下、より好ましくは1又は2個以下含むに過ぎない。前記変化は、保存的若しくは非保存的アミノ酸又はそれらの混合を伴うものであってもよい。好ましくは、前記変化は、保存的アミノ酸置換である。

【0100】

従って、例えば、本発明の抗体は、配列番号1に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH配列と、配列番号5に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL配列とを含む抗原結合ドメインを含んでもよく、但し、好ましくは、配列番号2、3、4、6、7及び8のCDR配列は、保持されている(即ち、修飾されていないか又は変化していない)ものとする。

【0101】

一部の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号41に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH配列と、配列番号45に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL配列とを含む抗原結合ドメインを含んでもよく、但し、好ましくは、配列番号42、43、44、46、47及び48のCDR配列は、保持されている(即ち、修飾されていないか又は変化していない)ものとする。

【0102】

更に他の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号21に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH配列と、配列番号25に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL配列とを含む抗原結合ドメインを含んでもよく、但し、好ましくは、配列番号22、23、24、26、27及び28のCDR配列は、保持されている(即ち、修飾されていないか又は変化していない)ものとする。

【0103】

更に別の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号9に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvであってもよく、但し、配列番号2、3、4、6、7及び8のCDR配列は、保持されている(即ち、修飾されていないか又は変化していない)ものとする。

【0104】

一部の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号49に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvで

10

20

30

40

50

あってもよく、但し、配列番号 42、43、44、6、7及び8のCDR配列は、保持されている（即ち、修飾されていないか又は変化していない）ものとする。一部の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号50に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvであってもよく、但し、配列番号2、3、4、46、47及び48のCDR配列は、保持されている（即ち、修飾されていないか又は変化していない）ものとする。

【0105】

一部の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号51に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvであってもよく、但し、配列番号42、43、44、46、47及び48のCDR配列は、保持されている（即ち、修飾されていないか又は変化していない）ものとする。

10

【0106】

他の実施形態において、本発明の抗体は、配列番号29に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含むscFvであってもよく、但し、配列番号22、23、24、26、27及び28のCDR配列は、保持されている（即ち、修飾されていないか又は変化していない）ものとする。

【0107】

従って、かかる実施形態では、抗体のCDR配列は、保持されているか又は実質的に保持されていることが理解されるであろう（即ち、CDR配列は、任意選択で、抗体の結合特異性が保持される（例えば、変化しない）ように上記に記載した制約、例えば1~4アミノ酸の置換、付加又は欠失の範囲内で修飾されてもよい）。

20

【0108】

用語「実質的に相同」は、本発明のタンパク質又は核酸分子と実質的に同じ機能を実質的に同じように果たす本発明のアミノ酸の修飾又は化学的均等物も含む。例えば、任意の実質的に相同な抗体（又はそれをコードする実質的に相同な核酸）は、上記に記載したとおりのCLEC14Aへの結合能力を保持していなければならない。好ましくは、任意の実質的に相同な抗体は、例えば本明細書の他の部分で定義するとおりの抗体の機能上の能力を保持していなければならない。好ましくは、任意の実質的に相同な抗体は、その抗体によって認識されるのとCLEC14Aの同じエピトープ、例えば本明細書に記載されるとおりの本発明のCDRドメイン又は本発明のVH及びVLドメインによって認識される同じエピトープに特異的に結合する能力を保持していなければならない。同じエピトープ/抗原への結合は、当該技術分野において周知の記載されている方法により、例えば結合アッセイ、例えば競合アッセイを用いて容易に試験することができる。他の機能特性の保持も、当該技術分野において周知の記載されている方法によって容易に試験することができる。

30

【0109】

従って、当業者は、「実質的に相同な」抗体が本発明の抗体及び抗体断片と同じ結合特異性を有するかどうかを試験するために結合アッセイを用いることができ、例えば、かかる「実質的に相同な」抗体がCLEC14Aに結合できるかどうかを確かめるために、ELISAアッセイ又はBIAcoreアッセイなどの結合アッセイを容易に用いることができると理解するであろう。上記に概説したとおり、「実質的に相同な」抗体が本発明の抗体によって認識されるのとCLEC14Aの実質的に同じエピトープに特異的に結合する能力を保持しているかどうかを試験するには、競合結合アッセイを用いることができる。

40

【0110】

本発明のタンパク質の実質的に相同な配列は、限定なしに、保存的アミノ酸置換、又は例えば抗体のVH、VL若しくはCDRドメインに影響を及ぼさない変化を含み、例えば、異なるリンカー配列が使用されるscFv抗体若しくは抗原の結合に寄与しないタグ配列又は他の成分が付加されている抗体、或いはあるタイプ又はフォーマットの抗体分子又は断片を別のタイプ又はフォーマットの抗体分子又は断片に変換する変化（例えば、FabからscFvへの又は逆の変換）、或いは特定のクラス又はサブクラスの抗体分子への

50

抗体分子の変換（例えば、I g G又はそのサブクラス、例えばI g G 1又はI g G 3への抗体分子の変換）を含む。

【0111】

「保存的アミノ酸置換」は、本明細書で使用されるとき、アミノ酸残基が同様の側鎖を有する別のアミノ酸残基に置き換えられるものである。同様の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、塩基性側鎖（例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン）、非極性側鎖（例えば、グリシン、システイン、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）、分枝側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）及び芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を含め、当該技術分野において定義されている。

10

【0112】

相同性は、任意の好都合な方法によって評価し得る。しかしながら、配列間の相同性の程度の決定には、配列の多重アラインメントを行うコンピュータプログラム、例えばClustal Wが有用である。必要に応じて、Clustal WアルゴリズムをBLOSUM 62スコアリング行列、及びギャップ開始ペナルティ10、及びギャップ伸長ペナルティ0.1と共に使用することができ、そのようにして、配列の一方の全長の少なくとも50%がアラインメントに関与する2つの配列間の高次の一致が達成される。2つのアミノ酸配列間のパーセンテージ同一性を計算する他の方法も一般に当該技術分野で認められており、例えば、Computational Molecular Biology, Lesk, e.d. Oxford University Press, New York, 1988, Biocomputing: Informatics and Genomics Projectsに記載されるものが挙げられる。

20

【0113】

概して、かかる計算にはコンピュータプログラムが利用されることになる。配列のペアを比較してアラインメントするプログラム、例えばALIGN、FASTA、ギャップ付きBLAST、BLASTP、BLASTN又はGCGもこの目的に有用である。更に、欧州バイオインフォマティクス研究所のDaliサーバは、構造ベースのタンパク質配列アラインメントを提供している。

【0114】

参考として、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の相同性、配列同一性等を有する本発明に係る配列は、ALIGNプログラムをデフォルトパラメータで用いて決定し得る（例えば、インターネット上でGENESTREAMネットワークサーバ、IGH、モンペリエ、フランスにおいて利用可能）。

30

【0115】

加えて、本発明の好ましい抗体は、本発明のVH、VL又はCDRで構成されるが、本発明の抗体は、本明細書に概説するとおりの本発明の抗体のCLEC14A結合特性又は抗CLEC14A特性がなおも存在することを条件に、本発明の1つ以上のVH、VL又はCDRと本発明のものでない他のVH、VL又はCDRとの組み合わせも包含することに留意しなければならない。

【0116】

用語「重鎖相補性決定領域」（「重鎖CDR」）は、本明細書で使用されるとき、抗体分子の重鎖可変領域（VHドメイン）内にある超可変性領域を指す。重鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって重鎖CDR1、重鎖CDR2及び重鎖CDR3と呼ばれる3つのCDRを有する。重鎖可変領域は、4つのフレームワーク領域（アミノ末端からカルボキシ末端に向かってFR1、FR2、FR3及びFR4）も有する。これらのフレームワーク領域は、CDRを分離している。

40

【0117】

用語「重鎖可変領域」（VHドメイン）は、本明細書で使用されるとき、抗体分子の重鎖の可変領域を指す。

【0118】

用語「軽鎖相補性決定領域」（「軽鎖CDR」）は、本明細書で使用されるとき、抗体

50

分子の軽鎖可変領域（V Lドメイン）内にある超可変性領域を指す。軽鎖可変領域は、アミノ末端からカルボキシ末端に向かって軽鎖C D R 1、軽鎖C D R 2及び軽鎖C D R 3と呼ばれる3つのC D Rを有する。軽鎖可変領域は、4つのフレームワーク領域（アミノ末端からカルボキシ末端に向かってF R 1、F R 2、F R 3及びF R 4）も有する。これらのフレームワーク領域は、C D Rを分離している。

【0119】

用語「軽鎖可変領域」（V Lドメイン）は、本明細書で使用されるとき、抗体分子の軽鎖の可変領域を指す。

【0120】

本明細書では、C D Rの位置を定義するために、必要に応じてKabat命名法に従うことに留意しなければならない（Kabat et al., 1991（前掲）、参照により本明細書に具体的に援用される）。

10

【0121】

一部の実施形態において、本発明の抗体、例えばI g Gフォーマットの抗体は、C L E C 1 4 Aに対して高い結合親和性を有し、即ち、 1×10^{-8} M又は 1×10^{-9} M又はそれ未満の範囲の K_d を有し得る。重要なことに、かかる親和性を有する抗体は、治療上有用であることが示されている確立された範囲にある。好ましくは、本発明の抗体、例えばI g Gフォーマットの抗体は、C L E C 1 4 Aに対して、30 nM、20 nM、15 nM又は10 nM未満、より好ましくは10、9.5、9、8.5、8、7.5、7、6.5、6、5.5、5、4.5、4、3.5、3、2.5、2、1.5又は1 nM未満、最も好ましくは0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2又は0.1 nM未満の K_d に対応する結合親和性を有する。

20

【0122】

K_d を決定する任意の適切な方法を用い得る。しかしながら、好ましくは、 K_d は、インビトロで様々な濃度の抗原（C L E C 1 4 A）に対して様々な濃度の試験抗体を試験して、例えばラインウィーバー・パーク法を用いて飽和曲線を作成することによるか、又はBIAcore 1000 Evaluationソフトウェアの1：1結合モデルなど、市販の結合モデルソフトウェアを使用することにより決定される。

【0123】

K_d 値の決定に関して、標的（例えば、C L E C 1 4 A）を発現する細胞を使用した結合実験から導き出される見かけの K_d 値は、実験条件が見かけの結合親和性に影響を及ぼし得るため、親和性の絶対的な指示値と見なすことはできない点を当業者は理解するであろう。例えば、C L E C 1 4 Aの発現レベルは、細胞の培養条件に応じて変わり得ると共に、細胞型間の違いによっても異なり得る。結果的に、ある一組の実験の範囲内で得られた見かけの K_d 値を比較する方が良く、ある一組の実験で得られた K_d 値を別の一組の実験で得られた K_d 値と比較するのは、特に実験条件が大きく変わる場合に必ずしも適切でないことがある。

30

【0124】

代替的に、細胞表面滞留アッセイを実施することにより、C L E C 1 4 A陽性細胞の表面におけるオフ速度及び抗体半減期を決定してもよい（Adams et al., 1998, Br J Cancer 77: 1405-12; Le Gall et al., 1999, FEBS Lett 453: 164-8）。Le Gallの方法は、治療条件下にあるヒト患者の実際の状況をより適切に模擬することが可能である。

40

【0125】

一部の実施形態において、本発明の抗体は、ヒトC L E C 1 4 A及びサルC L E C 1 4 Aの両方に結合し得る。種間、詳細にはヒトと一般的に前臨床動物モデルとして用いられる種との間のかかる交差反応性は、それにより前臨床試験から臨床使用への移行をより効果的に行うことが可能になるために有利であり得る。例えば、使用される特定の動物モデルに存在する天然C L E C 1 4 Aと交差反応する抗体を有するとは、そのモデルにおける結果がヒト患者の状況を反映している可能性が高く、従って、例えば行われるべき用量投与のより正確な評価及び任意の潜在的に関連性のある若しくは問題のある副作用が同定さ

50

れる可能性の増大が可能になることを意味する。

【0126】

例えば、本発明の抗体がヒトCLEC14A及びサルCLEC14Aの両方に結合する能力は、かかる抗体を前臨床毒性研究で試験して治療の有害な副作用を評価し、及び適切な耐用量を見出し得ることを意味する。

【0127】

加えて、ヒトCLEC14A及びマウスCLEC14Aの両方に結合する能力は、免疫適格マウスを用いたマウスモデル、例えばマウス同系モデルで本発明のかかる抗体によって示される結果が、ヒト対象における抗体の活性を代表するものである可能性がより高いことを意味する。その理由は、ヒトCLEC14Aに結合できるがマウスCLEC14Aに結合できない抗体は、マウスモデルでヒト腫瘍細胞が発現するCLEC14Aに結合するが、内因性マウスCLEC14Aに結合できないであろうことにある。これは、当然ながら、腫瘍が発現するCLEC14A及び内因性CLEC14Aが存在するであろうヒト患者の状況と異なる。

10

【0128】

好ましい実施形態において、本発明の抗体は、ヒト及びサルCLEC14Aに、且つ/又はヒト及びマウスCLEC14Aに同様の親和性、例えば10nM以下又は5nM以下、より好ましくは3nM以下又は2nM以下、より好ましくは1nM以下の K_d で結合する。

【0129】

「同様の親和性」は、ヒトCLEC14A及び他の目的とする種（例えば、サル又はマウス）の1つ以上に対する抗体の結合親和性が同等である、例えば20倍を超えない差であることも意味する。より好ましくは、結合親和性間の差は、15倍未満、より好ましくは10倍未満、最も好ましくは5、4、3又は2倍未満である。

20

【0130】

しかしながら、他の実施形態において、本発明の抗体は、サルCLEC14Aに結合しなくてもよく、及び/又はマウスCLEC14Aに結合しなくてもよい。

【0131】

従って、本発明を踏まえれば、本明細書の他の部分で考察される障害、特に望ましくない又は不要な血管新生、特に腫瘍血管新生が関わる障害又は病態のいずれかの治療におけるもの、例えば癌の治療に用いられるものを含め、種々の実施形態で様々な抗CLEC14A抗体を作製及び使用することができる。

30

【0132】

当業者は、軽鎖及び重鎖CDR、軽鎖及び重鎖可変領域、抗体、抗体断片及びイムノコンジュゲート（以下に更に詳細に記載される）など、本発明のタンパク質及びポリペプチドが、当該技術分野において周知の記載されている幾つかの方法のいずれで調製されてもよいが、最も好ましくは組換え方法を用いて調製されることを理解するであろう。

【0133】

従って、更なる実施形態において、本発明は、本明細書に記載されるとおりの本発明の抗体又はその部分若しくは断片をコードする核酸分子、或いはそれと実質的に相同な核酸分子を提供する。従って、一部の実施形態において、本発明は、配列番号12、13、14、16、17及び18から選択される1つ以上の配列、又は配列番号32、33、34、36、37及び38から選択される1つ以上の配列、又は配列番号55、56、57、59、60及び61から選択される1つ以上の配列（即ち、上記に記載されるCDRをコードする）を含む核酸分子を提供する。一部の実施形態において、本発明は、配列番号11及び15から選択される配列、又は配列番号31及び35から選択される配列、又は配列番号54及び58から選択される配列を含む（即ち、上記に記載される可変鎖をコードする）核酸分子を提供する。一部の実施形態において、本発明は、配列番号19、39、62、63及び64から選択される配列を含む（即ち、上記に記載されるscFvポリペプチドをコードする）核酸分子を提供する。

40

50

【0134】

一部の実施形態において、本発明の抗体をコードする核酸分子は、本明細書に例示される核酸分子と実質的に相同であってもよい。従って、一部の実施形態において核酸分子は、本明細書に記載されるとおりのVH配列を含む抗原結合ドメインを含むポリペプチドをコードしてもよく、ここで、前記核酸分子は、配列番号11、31若しくは54に記載されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、但し、好ましくは、配列番号2、3及び4、又は22、23及び24、又は42、43及び44のCDR配列をコードするヌクレオチド配列は保持されているものとし、例えば、ヌクレオチド配列は、配列番号12、13及び14、又は32、33及び34、又は55、56及び57を含む。

10

【0135】

従って、一部の実施形態において、核酸分子は、本明細書に記載されるとおりのVL配列を含む抗原結合ドメインを含むポリペプチドをコードしてもよく、ここで、前記核酸分子は、配列番号15、35若しくは58に記載されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、但し、好ましくは、配列番号6、7及び8、又は26、27及び28、又は46、47及び48のCDR配列をコードするヌクレオチド配列は保持されているものとし、例えば、ヌクレオチド配列は、配列番号16、17及び18、又は36、37及び38、又は59、60及び61を含む。

【0136】

更に別の実施形態において、核酸分子は、本明細書に記載されるとおりのscFvを含むポリペプチドをコードしてもよく、ここで、前記核酸分子は、配列番号19、39、49、50若しくは51に記載されるヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含み、但し、好ましくは、配列番号2、3、4、6、7及び8、又は22、23、24、26、27及び28、又は42、43、44、6、7及び8、又は2、3、4、46、47及び48、又は42、43、44、46、47及び48のCDR配列をコードするヌクレオチド配列は保持されているものとし、例えば、ヌクレオチド配列は、配列番号12、13、14、16、17及び18、又は32、33、34、36、37及び38、又は55、56、57、16、17及び18、又は12、13、14、59、60及び61、又は55、56、57、59、60及び61を含む。

20

【0137】

従って、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体の断片、又はそれと実質的に相同な配列、又はかかる断片をコードする配列を含む核酸分子が本発明の更に別の態様を形成する。

30

【0138】

本発明の抗体の軽鎖及び重鎖可変領域をコードする核酸断片は、任意の適切な方法、例えばクローニング又は合成によって誘導又は作製することができる。かかる配列は、例えば、当該技術分野において周知の記載されている方法を用いて例えばヒト生殖細胞系遺伝子から適切な配列をクローニングし、次に本発明の配列が得られるようにその生殖細胞系配列に任意の必要な修飾を行うことにより調製し得る。代替的なより高効率の方法は、適切な軽鎖又は重鎖可変領域配列をオーバーラッププライマーとして合成し、及びプライマー伸長を用いて完全配列を得ることであり得る。次に、更なるクローニング及び操作、例えば適切な発現ベクターへのクローニングに適切な制限部位を含有するプライマーでこの完全配列をPCR増幅し得る。通常、1可変領域当たり5~7個のオーバーラッププライマーが十分であり、従って、この技法は、極めて効率的で正確なものとなっている。

40

【0139】

本発明の抗体の軽鎖及び重鎖可変領域をコードする核酸断片が得られたら、これらの断片を標準的な組換えDNA技法によって更に操作して、例えば適切な定常領域ドメインを有する完全長抗体分子、又は本明細書の他の部分で考察される特定のフォーマットの抗体断片、例えばFab断片、scFv断片等に可変領域断片を変換することができる。典型的には、又はこの更なる操作手順の一環として、本発明の抗体分子をコードする核酸断片

50

は、概して本発明の抗体の作製を促進するため適切な発現ベクターに組み込まれる。

【0140】

用語「核酸配列」又は「核酸分子」は、本明細書で使用されるとき、天然に存在する塩基、糖及び糖間（骨格）連結で構成されるヌクレオシド又はヌクレオチド単量体の配列を指す。この用語には、天然に存在しない単量体又はその一部分を含む修飾又は置換配列も含まれる。本発明の核酸配列は、デオキシリボ核酸配列（DNA）又はリボ核酸配列（RNA）であってもよく、アデニン、グアニン、シトシン、チミジン及びウラシルを含めた天然に存在する塩基を含み得る。配列は、修飾塩基も含有し得る。かかる修飾塩基の例としては、アザ及びデアザアデニン、グアニン、シトシン、チミジン及びウラシル並びにキサンチン及びヒポキサンチンが挙げられる。核酸分子は、二本鎖又は一本鎖であってもよい。核酸分子は、全体的に又は部分的に合成又は組換えであってもよい。

10

【0141】

用語「実質的に相同」は、本明細書で核酸配列に関連して使用されるとき、開示される核酸配列と少なくとも60%、65%、70%又は75%、好ましくは少なくとも80%、及び更により好ましくは少なくとも85%、90%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有する配列を含む。従って、本発明の実質的に相同な配列は、本発明の配列に対して単一又は複数の塩基変化（付加、置換、挿入又は欠失）を含む。

【0142】

実質的に相同な核酸配列には、少なくとも中程度にストリンジентなハイブリダイゼーション条件下において、開示される核酸配列（又はその相補配列）にハイブリダイズする、例えば本発明の軽鎖又は重鎖CDR、本発明の軽鎖又は重鎖可変領域、又は本発明の抗体の1つ以上をコードするヌクレオチド配列にハイブリダイズする（又はその相補配列にハイブリダイズする）ヌクレオチド配列も含まれる。

20

【0143】

「少なくとも中程度にストリンジентなハイブリダイゼーション条件」とは、溶液中の2つの相補核酸分子間の選択的なハイブリダイゼーションを促進する条件が選択されることを意味する。ハイブリダイゼーションは、核酸配列分子の全て又は一部分に起こり得る。ハイブリダイズする部分は、典型的には少なくとも15（例えば、20、25、30、40又は50）ヌクレオチド長である。当業者は、核酸二重鎖、又はハイブリッドの安定性が T_m によって決まる（ T_m は、ナトリウム含有緩衝液中でナトリウムイオン濃度及び温度の関数である（ $T_m = 81.5 - 16.6 (\log_{10} [Na^+]) + 0.41 (\% (G + C) - 600 / l)$ ）又は同様の式））ことを認識するであろう。従って、ハイブリッドの安定性を決める洗浄条件におけるパラメータは、ナトリウムイオン濃度及び温度である。既知の核酸分子と同様の、しかし同一ではない分子を同定するために、1%ミスマッチが T_m の約1の低下をもたらすものと仮定され得る。例えば、>95%の同一性を有する核酸分子が求められる場合、最終洗浄温度を約5度下げることになる。これらの考慮点に基づき、当業者は、適切なハイブリダイゼーション条件を容易に選択可能であろう。好ましい実施形態では、ストリンジентなハイブリダイゼーション条件が選択される。例として、以下の条件を用いてストリンジентなハイブリダイゼーションを実現し得る：上記の式に基づいて $T_m - 5$ で5×塩化ナトリウム/クエン酸ナトリウム（SSC）/5×デンハルト溶液/1.0% SDSにおけるハイブリダイゼーション、続いて60で0.2×SSC/0.1% SDSの洗浄。中程度にストリンジентなハイブリダイゼーション条件は、42で3×SSCの洗浄ステップを含む。更なる例として、「ハイブリダイズ」する配列とは、非ストリンジентな条件下（例えば、室温で6×SSC、50%ホルムアミド）で結合（ハイブリダイズ）し、且つ低ストリンジエンシー条件下（例えば、2×SSC、室温、より好ましくは2×SSC、42）又はより高いストリンジエンシー条件下（例えば、2×SSC、65）で洗浄される配列である（SSC = 0.15M NaCl、0.015Mクエン酸ナトリウム、pH 7.2）。

30

40

【0144】

しかしながら、別の緩衝液、塩及び温度を用いて均等なストリンジエンシーを実現し得

50

ることは理解される。ハイブリダイゼーション条件に関する更なる指針については、Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N.Y., 1989, 6.3.1-6.3.6及びSambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol.3を参照し得る。

【0145】

一般的に言えば、高ストリンジェンシーの条件下でハイブリダイズする配列が好ましく、コードの縮重がなければ高ストリンジェンシー条件下でハイブリダイズするであろう配列も同様に好ましい。

【0146】

本明細書で定義されるヌクレオチド配列の縮重変異体であるヌクレオチド配列が本発明に更に包含される。遺伝子コードの縮重に起因して、複数のヌクレオチド配列が単一のアミノ酸配列をコードし得ることは理解されるであろう。これに関して、かかる縮重配列は、本発明の一部をなす。これとの関連において、本発明のヌクレオチド配列を特定の宿主生物又は細胞における発現（例えば、ヒト又はマウスにおける発現）にコドン最適化することが望ましい場合もある。これには、特定の宿主細胞/生物で優先的に発現するコドンが（特定のアミノ酸をコードするコドンから）選択されるように本発明のヌクレオチド配列を修飾することが関わり得る。かかる手順は、当該技術分野において周知であり、概してコードされるアミノ酸配列を変化させないものであり得る。従って、コドン最適化バージョンの本発明のヌクレオチド配列が本発明に更に包含される。詳細には、配列番号101～104のコドン最適化配列を含むポリヌクレオチド配列が本発明に包含される。配列番号101～104の変異体が更に包含され、ここで、前記変異体は、配列番号101～104の配列と少なくとも60%の同一性を有し、CLEC14Aへの結合能を有する抗体又はその一部分をコードする。これに関して、配列番号101及び103は、ヒト宿主又は細胞における発現にコドン最適化された配列であり、配列番号102及び104は、マウス宿主又は細胞における発現にコドン最適化された配列であり、ここで、配列番号101～104は、本発明のscFvをコードする。詳細には、配列番号101及び102は、配列番号19のそれぞれヒト及びマウス発現にコドン最適化された配列に相当し、配列番号103及び104は、配列番号39のそれぞれヒト及びマウス発現にコドン最適化された配列に相当する。

【0147】

本発明の抗体及び核酸分子は、ヒト若しくは動物の体内又はヒト若しくは動物の体から得られた組織試料内にインサイチューで存在し得る任意のかかる成分と区別される限りにおいて、概して「単離された」又は「精製された」分子である。しかしながら、配列は、ヒト又は動物の体に見られるとおりの配列に対応してもよく、又はそれと実質的に相同であってもよい。従って、用語「単離された」又は「精製された」は、本明細書で核酸分子又は配列及びタンパク質又はポリペプチド、例えば抗体に関して使用されるとき、その天然環境から単離されているか、それから精製されているか又はそれを実質的に含まない、例えば（実際にそれらが天然に存在する場合）ヒト又は動物の体から単離されているか又は精製されているときのかかる分子を指すか、又は技術的プロセスによって作製されたときのかかる分子を指し、即ち組換え及び合成的に作製された分子が含まれる。

【0148】

従って、核酸分子に関して使用されるとき、かかる用語は、他の核酸/遺伝子又はポリペプチドなど、それが天然で結び付いている材料を実質的に含まない核酸を指し得る。これらの用語は、組換えDNA技法によって作製したときに細胞材料若しくは培養培地を実質的に含まないか、又は化学的に合成したときに化学的前駆体、若しくは他の化学物質を実質的に含まない核酸も指し得る。単離又は精製された核酸は、核酸の由来である天然でその核酸に隣接する配列（即ち、核酸の5'末端及び3'末端に位置する配列）又は例えば遺伝子工学によってその核酸に隣接するように作られた配列（例えば、タグ配列又は治療的価値のない他の配列）も実質的に含まないものであり得る。

【0149】

10

20

30

40

50

従って、軽鎖 C D R 1、2 及び 3、重鎖 C D R 1、2 及び 3、軽鎖可変領域、重鎖可変領域、及び完全長抗体を含む本発明の抗体などのタンパク質又はポリペプチド分子に関して使用されるとき、用語「単離された」又は「精製された」は、典型的には、その由来である供給源からの細胞材料又は他のタンパク質を実質的に含まないタンパク質を指す。一部の実施形態において、特にそのタンパク質がヒト又は動物に投与される場合、かかる単離又は精製されたタンパク質は、組換え技術によって作製したときに培養培地を実質的に含まず、又は化学的に合成したときに化学的前駆体若しくは他の化学物質を実質的に含まない。かかる単離又は精製されたタンパク質は、上記に単離核酸分子について記載したもののなどのフランキング配列も含まないものであり得る。

【0150】

上述のとおり、本発明者らは、本発明の抗体の抗原結合ドメイン、より詳細には前記ドメインの可変領域（V L 及び V H 鎖）が、C L E C 1 4 A を発現する細胞、特に腫瘍細胞（例えば、腫瘍血管構造）に対する養子細胞移入療法における使用に有効な C A R を提供し得ることを明らかにしている。

【0151】

従って、本発明は、抗原 C L E C 1 4 A に対して指向されるキメラ抗原受容体（C A R）をコードする核酸分子を更に提供し、前記 C A R は、免疫エフェクター細胞の表面上に発現されると、標的細胞表面上に発現された抗原 C L E C 1 4 A への結合能を有し、且つ

(1) (a) V H C D R 配列であって、

(i) 配列番号 2 又は 4 2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、及び / 又は

(i i) 配列番号 3 又は 4 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 4 又は 4 4 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3

を含む V H C D R 配列、及び / 又は

(b) V L C D R 配列であって、

(i) 配列番号 6 又は 4 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、及び / 又は

(i i) 配列番号 7 又は 4 7 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 8 又は 4 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む V L C D R 配列、及び / 又は

(a) 又は (b) に記載される配列番号と実質的に相同な 1 つ以上の配列、或いは

(2) (a) V H C D R 配列であって、

(i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、及び / 又は

(i i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3

を含む V H C D R 配列、及び / 又は

(b) V L C D R 配列であって、

(i) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、及び / 又は

(i i) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含む V L C D R 配列、及び / 又は

(a) 又は (b) に記載される配列番号と実質的に相同な 1 つ以上の配列

を含む抗原結合ドメインを含む。

【0152】

一部の実施形態において、C A R は、2 つ以上の C D R、例えば 2、3、4、5 又は 6 つの C D R を含む。従って、一部の実施形態において、C A R は、1、2 若しくは 3 つの C D R を含む V H 配列及び / 又は 1、2 若しくは 3 つの C D R を含む V L 配列を含み得る。従って、一部の実施形態において、本発明は、抗原 C L E C 1 4 A に対して指向される C A R をコードする核酸分子を提供し、前記 C A R は、免疫エフェクター細胞の表面上に発現されると、標的細胞表面上に発現された抗原 C L E C 1 4 A への結合能を有し、且つ各々が 3 つの C D R 配列を含む V H 配列及び V L 配列を含む抗原結合ドメインを含み、ここで、

10

20

30

40

50

(1) 前記 V H 配列は、

(i) 配列番号 2 又は 4 2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、

(i i) 配列番号 3 又は 4 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 4 又は 4 4 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3

を含み、及び / 又は

前記 V L 配列は、

(i v) 配列番号 6 又は 4 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、

(v) 配列番号 7 又は 4 7 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 8 又は 4 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含み、又は

10

(1) (i) ~ (1) (v i) に記載される配列番号と実質的に相同な 1 つ以上の配列を含むか、或いは

(2) 前記 V H 配列は、

(i) 配列番号 2 2 のアミノ酸配列を有する V H C D R 1、

(i i) 配列番号 2 3 のアミノ酸配列を有する V H C D R 2、及び / 又は

(i i i) 配列番号 2 4 のアミノ酸配列を有する V H C D R 3

を含み、及び / 又は

前記 V L 配列は、

(i v) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列を有する V L C D R 1、

(v) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列を有する V L C D R 2、及び / 又は

(v i) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列を有する V L C D R 3

を含み、又は

20

(2) (i) ~ (2) (v i) に記載される配列番号と実質的に相同な 1 つ以上の配列を含む。

【 0 1 5 3 】

好ましい実施形態において、実質的に相同な配列は、前記 C D R に 1、2 又は 3 個のアミノ酸置換、付加又は欠失を有する。別の見方をすれば、前記 C D R 配列の 1 つ以上が任意選択で 1 ~ 3 アミノ酸の置換、付加又は欠失によって修飾されていてもよい。特に好ましい実施形態において、前記アミノ酸置換は、保存的置換である。

【 0 1 5 4 】

(1) の C D R 配列は、配列番号 1 及び 4 1 の V H 配列並びに配列番号 5 及び 4 5 の V L 配列に含まれる C D R 配列であるか、又はそれに対応する。(2) の C D R 配列は、それぞれ配列番号 2 1 及び 2 5 の V H 及び V L 配列に含まれる C D R 配列であるか、又はそれに対応する。配列番号 1、4 1、5 及び 4 5 並びに配列番号 2 1 及び 2 5 は、それぞれ上記に記載される抗体の V H 及び V L 領域のアミノ酸配列に相当する (配列番号 1 1、5 4、1 5 及び 5 8 並びに配列番号 3 1 及び 3 5 は、前記アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列に相当する) 。

30

【 0 1 5 5 】

好ましい実施形態において、C A R は、それぞれの V H 及び V L 配列の少なくとも C D R 3、例えば配列番号 4 及び 8、配列番号 4 4 及び 4 8 又は配列番号 2 4 及び 2 8 (好ましくは非修飾配列) を含む。特に好ましい実施形態において、C A R は、それぞれの V H 及び V L 配列の C D R の少なくとも 2 つ、例えば配列番号 2、3 及び 4 の少なくとも 2 つ (即ち、少なくとも 2 及び 3、2 及び 4、又は 3 及び 4) 又は配列番号 4 2、4 3 及び 4 4 の少なくとも 2 つ (即ち、少なくとも 4 2 及び 4 3、4 2 及び 4 4、又は 4 3 及び 4 4) 及び配列番号 6、7 及び 8 の少なくとも 2 つ (即ち、少なくとも 6 及び 7、6 及び 8、又は 7 及び 8) 又は配列番号 4 6、4 7 及び 4 8 の少なくとも 2 つ (即ち、少なくとも 4 6 及び 4 7、4 6 及び 4 8、又は 4 7 及び 4 8)、又はこれらの組み合わせ、或いは配列番号 2 2、2 3 及び 2 4 の少なくとも 2 つ (即ち、少なくとも 2 2 及び 2 3、2 2 及び 2 4、又は 2 3 及び 2 4) 及び配列番号 2 6、2 7 及び 2 8 の少なくとも 2 つ (即ち、少なくとも 2 6 及び 2 7、2 6 及び 2 8、又は 2 7 及び 2 8) を含む。好ましくは、前記少な

40

50

くとも2つのCDRは、非修飾である。特に好ましい実施形態において、CARは、それぞれのVH及びVL配列のCDRの全て、即ち配列番号2～4及び6～8、又は42～44及び46～48、又は配列番号22～24及び26～28を含み、好ましくは、前記CDRは、非修飾である。

【0156】

より詳細には、CARは、免疫エフェクター細胞の表面上に発現されると、CLEC14Aを発現する標的細胞に対して免疫エフェクター細胞を指向させる能力を有する。換言すれば、免疫細胞は、その効果又は機能、例えばその細胞傷害活性を前記標的細胞、特に標的癌細胞、例えば血管の内皮細胞、特に腫瘍の血管の内皮細胞に対して指向させる能力を有する。

10

【0157】

当該技術分野において公知であり及び本明細書の他の部分に記載されるとおり、抗体のVL及びVH鎖は、それぞれCDRの足場としての役割を果たすフレームワーク領域によって分離された3つのCDRを含む。従って、本発明のCARのVL及びVH配列は、フレームワーク領域によって分離された本発明の抗体のVL及びVH配列のCDR配列を含む。フレームワーク領域は、本発明の抗体のVL及びVH鎖のものであってよいが、必須というわけではない。従って、抗体のVL及びVH鎖のフレームワーク領域は、修飾されてもよく、これには、本明細書の他の部分に記載されるとおり、それらが置換されてもよいこと（従って、フレームワーク領域のアミノ酸配列が修飾及び/又は置換されてもよいこと）、例えばそれらがヒト化されてもよいことが含まれる。

20

【0158】

詳細な一実施形態において、本発明は、抗原CLEC14Aに対して指向されるキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸分子を提供し、前記CARは、免疫エフェクター細胞の表面上に発現されると、標的細胞表面上に発現された抗原CLEC14Aへの結合能を有し、且つ配列番号1若しくは41のVH配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び/又は配列番号5若しくは45のVL配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。

【0159】

更なる実施形態において、本発明は、抗原CLEC14Aに対して指向されるキメラ抗原受容体(CAR)をコードする核酸分子を提供し、前記CARは、免疫エフェクター細胞の表面上に発現されると、標的細胞表面上に発現された抗原CLEC14Aへの結合能を有し、且つ配列番号21のVH配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列、及び配列番号25のVL配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を含む抗原結合ドメインを含む。

30

【0160】

他の実施形態において、VL及びVH配列のフレームワーク領域は、修飾され、及びCARは、配列番号1若しくは41に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH配列、及び/又は配列番号5若しくは45に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL配列を含む抗原結合ドメインを含んでもよく、但し、好ましくは、配列番号2、3、4、6、7及び8並びに/又は配列番号42、43、44、46、47及び48のCDR配列は、保持されている（即ち、修飾されていないか又は変化していない）ものとする。

40

【0161】

更に他の実施形態において、VL及びVH配列のフレームワーク領域は、修飾され、及びCARは、配列番号21に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVH配列、及び/又は配列番号25に示されるとおりのアミノ酸配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するVL配列を含む抗原結合ドメインを含んでもよく、但し、好ましくは、配列番号22、23、24、26、27及び28のCDR配列は、保持されている（即ち、修

50

飾されていないか又は変化していない)ものとする。

【0162】

従って、かかる実施形態では、抗体のCDR配列は、保持されているか又は実質的に保持されていることが理解されるであろう(即ち、CDR配列は、任意選択で、抗体の結合特異性が保持される(例えば、変化しない)ように上記に記載した制約、例えば1~3アミノ酸の置換、付加又は欠失の範囲内で修飾されてもよい)。

【0163】

抗原結合ドメインは、細胞外にある(即ち、CARが免疫エフェクター細胞上に発現したとき)。従って、CARは、上記に定義するとおりの抗体ベースのVL及びVH配列を含む抗原結合ドメインを含む細胞外ドメインを含む。以下で更に詳細に説明するとおり、細胞外ドメインは、シグナル配列、より詳細には細胞膜ターゲティング配列及び特にVL鎖をベースとする細胞膜ターゲティング配列も含み得る。

10

【0164】

本発明の核酸分子を使用して、CLEC14Aを発現する細胞に対して指向される免疫エフェクター細胞(より詳細には修飾免疫エフェクター細胞)を調製し得る。かかる(修飾)免疫エフェクター細胞は、その細胞表面上にCARを発現し、且つCLEC14Aを発現する標的細胞、例えば血管の内皮細胞、特に腫瘍の血管の内皮細胞を認識するか又はそれに結合する能力を有する。従って、本核酸分子は、前記CARを発現する免疫エフェクター細胞(即ち、核酸分子によってコードされるCAR)が、CLEC14Aを発現する標的細胞に対するエフェクター活性(例えば、細胞傷害活性)の(例えば、死滅させる)能力を有するようなものである。従って、修飾免疫エフェクター細胞は、遺伝子修飾されたか若しくは操作された免疫エフェクター細胞であり、又は本発明の核酸分子が形質導入された免疫エフェクター細胞が発現する。

20

【0165】

CLEC14A特異的免疫エフェクター細胞を作成する方法において、本発明の核酸分子を導入することにより修飾される免疫エフェクター細胞は、治療しようとする対象(例えば、腫瘍を有する対象)から入手してもよい。免疫エフェクター細胞を修飾し、及び任意選択でインビトロで増殖させた後、CARを発現する修飾免疫エフェクター細胞は、対象に再導入(即ち、投与)され得る。従って、以下で更に考察する本発明の治療組成物、方法及び使用では、自己免疫エフェクター細胞が用いられ得る。代替的に、ヘテロ(即ち、ドナー若しくは同種異系又は同系若しくは異種)免疫エフェクター細胞が用いられてもよい。

30

【0166】

免疫エフェクター細胞は、CLEC14Aを発現する標的細胞に対する免疫応答能を有する任意の免疫細胞であってよい。より詳細には、免疫エフェクター細胞は、標的細胞を無効にするか、損傷させるか又は欠失させる、即ち標的細胞の生存能力を低下させるか又は阻害する、好ましくは標的細胞を死滅させる(換言すれば、標的細胞を低い生存能にするか又は生存不能にする)能力を有する。従って、免疫エフェクター細胞は、好ましくは細胞傷害性免疫エフェクター細胞である。

【0167】

用語「細胞傷害性」は、「細胞溶解性」と同義語であり、本明細書では、標的細胞において溶解又はアポトーシスによる細胞死の誘導能を有する細胞を指して使用される。

40

【0168】

用語「免疫エフェクター細胞」は、本明細書で使用されるとき、成熟した又は完全に分化した免疫エフェクター細胞のみならず、幹細胞(より詳細には造血幹細胞、HSC)、又はHSCに由来する細胞を含め、その前駆(又はプロジェニター)細胞も含む。従って、免疫エフェクター細胞は、T細胞、NK細胞、NKT細胞、好中球、マクロファージ、又は対象への投与時に成熟免疫エフェクター細胞に分化する、造血組織、例えば骨髄、臍帯血、若しくは血液、例えば動員末梢血に由来するCD34+細胞集団内に含まれるHSCに由来する細胞であってよい。以下で更に詳細に説明するとおり、好ましい実施形態

50

において、免疫エフェクター細胞は、T細胞又はNK細胞である。初代細胞、例えば治療しようとする対象又はドナー対象から単離された細胞は、任意選択で細胞培養ステップ（例えば、細胞を増殖させるための）を介して用いられても、又は他の培養細胞若しくは細胞株（例えば、NK92細胞株などのNK細胞株）が用いられてもよい。

【0169】

用語「抗原CLEC14Aに対して指向される」は、「CLEC14Aに特異的」又は「抗CLEC14A」と同義語であり、即ち、それは、単純にCARがCLEC14Aへの特異的結合能を有することを意味する。詳細には、CARの抗原結合ドメインは、CLEC14Aへの特異的結合能を（より詳細にはCARが免疫エフェクター細胞の表面上に発現したときに）有する。特異的結合は、非標的抗原（この場合、CLEC14A以外の抗原）への非特異的結合と区別され得る。従って、本発明に係るCARを発現する免疫エフェクター細胞は、CLEC14Aを発現する標的細胞に特異的に結合して、それに対する細胞傷害性を呈する（例えば、それを死滅させる）ように仕向け直される。別の言い方をすれば、免疫エフェクター細胞は、細胞傷害性をCLEC14A発現標的細胞に仕向け直すように修飾される。

10

【0170】

ある実施形態において、CLEC14Aへの特異的結合とは、抗原結合ドメイン（又は抗原結合ドメインを含むCAR）が約 $10^5 M^{-1}$ 以上、例えば少なくとも $10^6 M^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}$ 、又は $10^8 M^{-1}$ の親和性又はKa（即ち、平衡会合定数）でCLEC14A（又はより詳細にはその細胞表面上にCLEC14Aを発現する標的細胞）に結合するか、又はそれと会合することを意味し得る。

20

【0171】

CARの抗原結合ドメインが標的細胞の表面上にあるその標的抗原に結合すると、CAR含有細胞に活性化刺激が送られ、エフェクター細胞シグナリング経路の誘導がもたらされる。従って、標的抗原への結合は、増殖、サイトカイン産生、食作用、溶解活性及び/又はMHC非依存的様式で標的細胞の細胞死を媒介することのできる分子の産生を惹起し得る。CD3 又はFcR 由来のシグナリングドメインのみを含む細胞内ドメインを含むCARは、強力な免疫細胞活性化及びエフェクター機能シグナルを送り得るが、そうしたCARは、併せて共刺激シグナルが存在しない場合に免疫エフェクター細胞の生存及び増殖を促進するシグナルを生じさせるのに十分でないこともある。従って、CARが1つ以上の共刺激シグナリングドメインを含有することが好ましい場合もある。

30

【0172】

従って、本発明のCARは、概して、以下のとおりの3、4又は好ましくは5つのドメインを含む：

(1) 上記に定義するおりの配列番号1及び5、又は41及び45、又は21及び25をベースとするか又はそれに由来するVH及びVL配列を含む、CLEC14Aへの特異的結合能を有する抗原結合ドメイン、

(2) 任意選択で、抗原結合ドメインを免疫エフェクター細胞の表面から引き離して伸長させるヒンジドメイン、

(3) CARをエフェクター細胞にアンカリングし、且つ抗原結合ドメインを含む細胞外ドメインを細胞内シグナリングドメインに連結する膜貫通ドメイン、

40

(4) シグナリングドメインを含む細胞内ドメイン、及び任意選択で又は好ましくは、

(5) 1つ以上の共刺激シグナリングドメイン。

【0173】

CARは、(6)シグナル配列（即ち、ターゲティングドメイン）、及び詳細にはCARを免疫エフェクター細胞の細胞膜にターゲティングする配列を更に含み得る。これは、概して、抗原結合ドメインの隣又はその近くに、概して抗原結合ドメインの上流に、CAR分子/コンストラクトの末端に位置することになる。

【0174】

従って、CARは、1つ以上のシグナリングドメインを含む細胞内ドメインに任意選択

50

のヒンジドメイン及び膜貫通ドメインを介して連結した、抗原結合ドメインと、存在する場合にはシグナル配列とを含む細胞外ドメインを含み得ることが分かる。一態様において、細胞内ドメイン又は任意選択のヒンジ、膜貫通及び細胞内ドメインは、CARコンストラクトにおける「シグナリングテール」と見なされ得る。従って、CARコンストラクトにおけるドメインの並び順は、N末端からC末端に、細胞外ドメイン - 任意選択のヒンジドメイン - 膜貫通ドメイン - 細胞内ドメインである。細胞外及び細胞内ドメイン内では、別個のドメインが任意の並び順で配置されてもよい。しかしながら、好ましくは、並び順は、細胞外ドメインではシグナル配列 - 抗原結合ドメインである。一実施形態において、細胞内ドメイン内では、並び順は、共刺激ドメイン - 細胞内シグナリングドメインであってもよい。別の実施形態において、並び順は、細胞内シグナリングドメイン - 共刺激ド

10

20

30

40

50

【0175】

本発明のCARにおいて、本発明の抗体の可変領域配列に由来する「抗原結合ドメイン」は、それが上記に定義するとおりのVL及びVH配列を含む限り、様々な形態で提供されてもよい。従って、それは、天然又は合成抗体配列であってもよく、又はそれに対応してもよい。従って、本発明の核酸分子中の抗原結合ドメインをコードするヌクレオチド配列は、天然配列に由来してもよく、若しくはそれに対応してもよく、又は遺伝子操作産物をコードしてもよい。従って、抗原結合ドメインは、可変領域（抗体軽鎖及び重鎖可変領域、VL及びVH領域）を含む本発明の抗体の断片、例えばFv又はFab又はFab₂であってもよく（又はより正確には、それに対応してもよく）、又は軽鎖可変領域と重鎖可変領域とは、単鎖となるように且ついずれの向きでも（例えば、VL-VH又はVH-VL）互いにつながり合わせることができる。上記で考察したとおり、VL及びVH配列は、修飾されてもよい。詳細には、フレームワーク領域が修飾されてもよい（例えば、抗原結合ドメインをヒト化するため、例えば置換されてもよい）。

【0176】

好ましい実施形態において、結合ドメインは、本発明の抗体に由来する、例えば配列番号9、29、49、50又は51をベースとするか、又はそれに由来する一本鎖抗体（scFv）である。

【0177】

好ましい一実施形態において、VL及びVHは、リンカー配列によって互いに連結される。より正確には、これは、「可変領域リンカー配列」と称することができ、重鎖可変領域を軽鎖可変領域につなぐアミノ酸配列であって、同じ軽鎖及び重鎖可変領域を含む抗体と同じ標的分子に対する特異的結合親和性を保持しているポリペプチドが得られるように、2つのサブ結合ドメインの相互作用に適合するスペーサー機能を提供するアミノ酸配列である。リンカー配列は、分子の適切なスペーシング及びコンホメーションを与えるために用いられ得る。

【0178】

従って、一実施形態において、scFvは、配列番号5若しくは45のVL配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列に連結した配列番号1若しくは41のVH配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を好ましくはVL-VHの並び順で含む。

【0179】

更なる実施形態において、scFvは、配列番号25のVL配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列に連結した配列番号21のVH配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を好ましくはVL-VHの並び順で含む。

【0180】

別の実施形態において、scFvは、配列番号5若しくは45のVL配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有する配列に連結した配列番号1若しくは41のVH配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有する配列を好ましくはVL-VHの並び順で含む。上述のとおり、これには、CDR配列が上記に定義するとおり留まるという

条件、及び好ましくはC D R配列が変化していないという条件が課される。

【0181】

更なる実施形態において、s c F vは、配列番号25のV L配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有する配列に連結した配列番号21のV H配列、又はそれと少なくとも60%の配列同一性を有する配列を好ましくはV L - V Hの並び順で含む。上述のとおり、これには、C D R配列が上記に定義するとおり留まるという条件、及び好ましくはC D R配列が変化していないという条件が課される。

【0182】

より好ましくは、V L配列は、リンカー配列によってV Hに連結する。リンカー配列は、1~30、より好ましくは1~25、1~22又は1~20アミノ酸長であってもよい。リンカーは、可動性リンカーであってもよい。好適なリンカーは、容易に選択することができ、1アミノ酸(例えば、G l y)~20アミノ酸、2アミノ酸~15アミノ酸、3アミノ酸~12アミノ酸、例えば4アミノ酸~10アミノ酸、5アミノ酸~9アミノ酸、6アミノ酸~8アミノ酸又は7アミノ酸~8アミノ酸など、好適な長さのいずれであってもよく、1、2、3、4、5、6若しくは7アミノ酸又はそれを超えるものであってもよい。

10

【0183】

例示的可動性リンカーとしては、グリシンポリマー(G)n、グリシン-セリンポリマー(式中、nは、少なくとも1の整数である)、グリシン-アラニンポリマー、アラニン-セリンポリマー及び当該技術分野において公知の他の可動性リンカーが挙げられる。グリシン及びグリシン-セリンポリマーは、比較的構造化されておらず、従って本明細書に記載されるC A Rなどの融合タンパク質のドメイン間における中性の繋留基としての役割を果たすことが可能であり得る。代表的な実施形態において、リンカー配列は、(G₄S)₃(配列番号65)であり得る。

20

【0184】

従って、代表的な実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号1のV H、配列番号65のリンカー及び配列番号5のV Lを順番に含む、配列番号9のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0185】

別の代表的な実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号41のV H、配列番号65のリンカー及び配列番号5のV Lを順番に含む、配列番号49のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

30

【0186】

更に別の代表的な実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号1のV H、配列番号65のリンカー及び配列番号45のV Lを順番に含む、配列番号50のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0187】

なおも別の代表的な実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号41のV H、配列番号65のリンカー及び配列番号45のV Lを順番に含む、配列番号51のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

40

【0188】

代表的な実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号1のV H及び配列番号5のV Lを含む、配列番号10のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み得る。従って、本発明の核酸分子は、配列番号20を含むヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

50

【0189】

別の代表的な実施形態において、本発明の核酸分子は、配列番号21のVH及び配列番号25のVLを含む、配列番号30のアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み得る。従って、本発明の核酸分子は、配列番号40を含むヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を含み得る。

【0190】

一部の実施形態において、VH及びVL領域は、それぞれ配列番号11及び15のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされ得る。

10

【0191】

一部の実施形態において、VH及びVL領域は、それぞれ配列番号54及び58のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされ得る。

【0192】

一部の実施形態において、VH及びVL領域は、それぞれ配列番号31及び35のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされ得る。

【0193】

別の実施形態において、VH及びVL領域は、それぞれ配列番号11及び15又はそれぞれ配列番号54及び58のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも60%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされ得る。上記のとおり、これには、ヌクレオチド配列によってコードされるCDR配列が上記に定義するとおり留まるという条件、及び好ましくはCDR配列が変化していないという条件が課される。

20

【0194】

更に別の実施形態において、VH及びVL領域は、それぞれ配列番号31及び35のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも60%のヌクレオチド配列同一性を有するヌクレオチド配列を含むヌクレオチド配列によってコードされ得る。上記のとおり、これには、ヌクレオチド配列によってコードされるCDR配列が上記に定義するとおり留まるという条件、及び好ましくはCDR配列が変化していないという条件が課される。

30

【0195】

VL及びVH配列は、必要に応じて、フレームワーク領域の1つ以上を少なくとも1つのヒトフレームワーク領域に対応するように修飾することによってヒト化されてもよい。「ヒトフレームワーク領域」は、ヒト免疫グロブリン可変領域の野生型（即ち、天然に存在する）フレームワーク領域、一態様では免疫原性が低下するようにその領域内のアミノ酸の約50%未満（例えば、好ましくは約45%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、又は1%未満）が欠失しているか又は置換されている（例えば、対応する位置に非ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域の1つ以上のアミノ酸残基を有する）ヒト免疫グロブリン可変領域の改変されたフレームワーク領域、又はその領域内のアミノ酸の約50%未満（例えば、45%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、又は5%未満）が欠失しているか又は置換されている（例えば、露出した残基の位置にあり、且つ/又は対応する位置にヒト免疫グロブリンフレームワーク領域の1つ以上のアミノ酸残基を有する）非ヒト免疫グロブリン可変領域の改変されたフレームワーク領域を指す。

40

【0196】

従って、詳細な実施形態において、CDRのアミノ酸配列を保持するか又は実質的に保持しつつ、配列番号1、21及び41のVH配列並びに配列番号5、25及び45のVL配列のフレームワーク領域が修飾されてもよい（より具体的には、フレームワーク領域のアミノ酸配列が修飾されてもよい）。

50

【0197】

従って、別の実施形態において、CARにおけるVH配列のフレームワーク領域は、配列番号1、21及び41のフレームワーク領域と少なくとも60%のアミノ酸配列同一性を有し、及び/又はCARにおけるVL配列のフレームワーク領域は、配列番号5、25及び45のフレームワーク領域と少なくとも60%のアミノ酸配列同一性を有する。

【0198】

上述のとおり、CAR、より詳細にはその細胞外ドメインは、シグナル配列（又はターゲティングドメイン）も含み得る。かかる配列は、概して分子（コンストラクト）のN端側末端に提供されることになり、同時翻訳で又は翻訳後に分子のトランスファーを誘導する役割を果たし得る。詳細には、シグナル配列は、CARを免疫エフェクター細胞の細胞膜にターゲティングする配列であり得る。これは、抗原結合ドメインに、概して抗原結合ドメインの上流で、CAR分子/コンストラクトのN端側末端に直接的又は間接的に（例えば、リンカー配列を介して）連結されてもよい。リンカー配列は、上記で可変領域リンカーに関して記載したとおりのリンカーであってもよい。一実施形態において、シグナル配列は、抗原結合ドメインのN端側末端、例えばVL配列のN端側末端に直接連結される。

10

【0199】

CARの抗原結合ドメインには、任意選択でヒンジドメインが続く。CARにおけるヒンジ領域は、概して膜貫通ドメインと抗原結合ドメインとの間にある。特定の実施形態において、ヒンジ領域は、免疫グロブリンヒンジ領域であり、野生型免疫グロブリンヒンジ領域又は改変された野生型免疫グロブリンヒンジ領域、例えばトランケート型ヒンジ領域であってもよい。使用し得る他の例示的ヒンジ領域としては、CD8、CD4、CD28及びCD7などの1型膜タンパク質の細胞外領域に由来するヒンジ領域が挙げられ、これは、それらの分子からの野生型ヒンジ領域であってもよく、又は改変されていてもよい。好ましくは、ヒンジ領域は、ヒトCD8、CD4、CD28又はCD7のヒンジ領域であるか、又はそれに由来する。ヒンジ領域は、代替的に（且つ同義的に）スペーサー又はスペーサー領域と称される。

20

【0200】

「改変された野生型ヒンジ領域」、又は「改変されたヒンジ領域」、又は「改変されたスペーサー」は、(a)30%以下のアミノ酸変化（例えば、25%、20%、15%、10%、又は5%以下のアミノ酸変化、例えば置換又は欠失）を有する野生型ヒンジ領域、(b)30%以下のアミノ酸変化（例えば、25%、20%、15%、10%、又は5%以下のアミノ酸変化、例えば置換又は欠失）を有する少なくとも10アミノ酸長（例えば、少なくとも12、13、14又は15アミノ酸長）の野生型ヒンジ領域の一部分、又は(c)コアヒンジ領域（4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15、又は少なくとも4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14若しくは15アミノ酸長であってもよい）を含む野生型ヒンジ領域の一部分を指す。本明細書に記載されるキメラ抗原受容体において改変された野生型ヒンジ領域がCLEC14A特異的結合ドメインと別の領域（例えば、膜貫通ドメイン）との間に置かれてそれらを結び付けるとき、それにより、キメラ融合タンパク質は、CLEC14Aへの特異的結合を維持することが可能になる。

30

40

【0201】

特定の実施形態において、野生型免疫グロブリンヒンジ領域における1つ以上のシステイン残基が1つ以上の他のアミノ酸残基（例えば、1つ以上のセリン残基）に置換されてもよい。代替的に又は追加的に、改変された免疫グロブリンヒンジ領域は、野生型免疫グロブリンヒンジ領域のプロリン残基が別のアミノ酸残基（例えば、セリン残基）によって置換されていてもよい。

【0202】

CH₂及びCH₃定常領域ドメインを含むヒンジ領域が、CARにおける使用に関して当該技術分野において記載されている（例えば、配列番号72に示されるとおりの、「F

50

c ヒンジ」又は「I g G ヒンジ」と称される C H₂ C H₃ ヒンジ)。しかしながら、ヒンジドメインが免疫グロブリンをベースとするか又はそれに由来するとき、それは C H₃ ドメインを含まないことが好ましく、例えば、それは、C H₂ ドメイン又はその断片若しくは一部を含み、又はそれからなり、C H₃ を含まないものであり得る。

【0203】

好ましい一実施形態において、ヒンジドメインは、配列番号66のアミノ酸配列(CD8のヒンジドメインに相当する)、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するか、又はそれを含む。

【0204】

別の好ましい実施形態において、ヒンジドメインは、配列番号67のアミノ酸配列(短縮型I g G ヒンジに相当する、)又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するか、又はそれを含む。

【0205】

ヒンジドメインは、リンカー配列によって膜貫通ドメインに付加されてもよく、リンカー配列は、上記に定義するとおりのリンカー配列であり得る。例示的リンカー配列は、K D P K (配列番号68)である。リンカー配列を有する短縮型I g G ヒンジが配列番号69に示される。かかる配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列が本発明のC A Rに含まれてもよい。より詳細には、かかる配列が細胞外ドメイン(例えば、s c F v部分)と膜貫通ドメインとの間に含まれてもよい。

【0206】

膜貫通ドメインは、任意の膜貫通タンパク質の膜貫通ドメインをベースとしてもよく、又はそれに由来してもよい。典型的には、それは、C D 8、C D 2 8、C D 4、C D 3 C D 4 5、C D 9、C D 1 6、C D 2 2、C D 3 3、C D 6 4、C D 8 0、C D 8 6、C D 1 3 4、C D 1 3 7及びC D 1 5 4、好ましくはヒトの前記タンパク質の膜貫通ドメインであってもよく、又はそれに由来してもよい。一実施形態において、膜貫通ドメインは、C D 8、C D 2 8、C D 4又はC D 3、好ましくはヒトC D 2 8、C D 4又はC D 3の膜貫通ドメインであってもよく、又はそれに由来してもよい。別の実施形態において膜貫通ドメインは合成であってもよく、その場合、それは、ロイシン及びバリンなどの強疎水性の残基を含み得る。

【0207】

好ましい実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号70のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するC D 8膜貫通ドメインである。この膜貫通配列は、配列番号66、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列に示されるとおりのC D 8由来ヒンジドメインに更に付加されてもよい。

【0208】

別の実施形態において、膜貫通ドメインは、配列番号71のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒトC D 2 8の膜貫通ドメインであってもよい。

【0209】

「細胞内シグナリングドメイン」は、標的抗原への有効なC A R結合のメッセージを免疫エフェクター細胞の内部に伝達して、エフェクター細胞機能、例えば活性化、サイトカイン産生、増殖及びC A Rが結合した標的細胞への細胞傷害性因子の放出を含めた細胞傷害活性、又は細胞外C A Rドメインへの抗原結合によって生じる他の細胞応答を生じさせることに関与するC A Rタンパク質の一部を指す。用語「エフェクター機能」は、細胞の特殊化した機能を指す。例えば、T細胞のエフェクター機能は、細胞溶解活性又はサイトカインの分泌を含めたヘルプ若しくは活性であり得る。従って、用語「細胞内シグナリングドメイン」は、タンパク質のうちのエフェクター機能シグナルを伝達する一部分であって、細胞が特殊化した機能を果たすように指図する一部分を指す。細胞内シグナリングドメイン全体を用いることができるが、多くの場合、ドメイン全体を使用する必要はない。細胞内シグナリングドメインのトランケートされた一部分が使用される限りにおいて、そ

10

20

30

40

50

れがエフェクター機能シグナルを伝達するのであれば、かかるトランケートされた一部分をドメイン全体の代わりに使用し得る。用語の細胞内シグナリングドメインには、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナリングドメインの任意のトランケートされた一部分が含まれることが意図される。細胞内シグナリングドメインは、「シグナル伝達ドメイン」としても知られ、典型的にはヒトCD3又はFcR鎖の一部分に由来する。

【0210】

加えて、免疫エフェクター細胞の完全な活性化を可能にするか又はそれを増強するため、CARに二次ドメイン又は共刺激ドメインが提供されてもよい。従って、細胞内シグナリングドメインが抗原依存的一次活性化を惹起してもよく（即ち、一次細胞質シグナリング配列であってもよく）、及び共刺激ドメインが抗原非依存的に作用して二次シグナル又は共刺激シグナルを提供してもよい（二次細胞質シグナリング配列）。一次細胞質シグナリング配列は、一次活性化を阻害的に調節することを含め、調節し得る。共刺激的に作用する一次細胞質シグナリング配列は、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ、即ちITAMとして知られるシグナリングモチーフを含有し得る。

10

【0211】

本発明において使用し得る一次細胞質シグナリング配列を含有するITAMの例としては、TCR、FcRγ、FcR、CD3、CD3、CD3、CD5、CD22、CD79a、CD79b及びCD66dに由来するものが挙げられる。特定の詳細な実施形態において、細胞内シグナリングドメインは、CD3又はFcR、好ましくはヒトCD3又はFcRに由来する。

20

【0212】

好ましい代表的な実施形態において、細胞内シグナリングドメインは、好ましくはヒトCD3ドメイン、より好ましくは配列番号73のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒトCD3ドメインである。

【0213】

用語「共刺激シグナリングドメイン」又は「共刺激ドメイン」は、共刺激分子の細胞内ドメインを含むCARの一部分を指す。共刺激分子は、抗原受容体又はFc受容体以外の細胞表面分子であり、抗原への結合時に免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の効率的な活性化及び機能に典型的に必要な二次シグナルをもたらす。かかる共刺激分子の例としては、CD27、CD28、4-1BB（CD137）、OX40（CD134）、CD30、CD40、ICOS（CD278）、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2及びCD83と特異的に結合するリガンド、より詳細にはかかる分子の細胞内ドメインが挙げられる。しかしながら、一部の実施形態では、共刺激分子は、リガンドへの結合時に免疫エフェクター細胞（例えば、T細胞）の刺激を妨げる二次シグナルをもたらす。例えば及び以下で更に詳細に考察するとおり、2つ以上のCARを含む免疫エフェクター細胞を提供することが有用であってもよく、ここで、第2のCARは、非標的細胞上、例えば非腫瘍細胞上に提示されたリガンドへの結合能を有し、従って第2の（又は更なる）CARがそのリガンドに結合した場合、それによって免疫エフェクター細胞の刺激を妨げる負のシグナルがもたらされる。かかる共刺激分子の例としては、PD-1及びCTLA4が挙げられる。好ましくは、これらの分子は、ヒトである。従って、例示的な又は好ましい共刺激ドメインは、4-1BB、CD28又はOX40（CD134）に由来するが、本明細書に記載されるCARで使用するための他の共刺激ドメインが企図される。共刺激ドメインは、単独で用いられても又は組み合わせで用いられてもよい（即ち、1つ以上の共刺激ドメインが含まれてもよい）。1つ以上の共刺激シグナリングドメインを含めることにより、CARを発現する免疫エフェクター細胞の有効性及び増殖が増進し得る。

30

40

【0214】

細胞内シグナリングドメイン及び共刺激シグナリングドメインは、任意の並び順でタンデムに膜貫通ドメインのカルボキシル末端に連結されてもよい。

50

【0215】

好ましい実施形態において、共刺激ドメインは、配列番号74のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有する4-1BBの細胞内ドメインである。

【0216】

別の実施形態において、共刺激ドメインは、配列番号75のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するヒトCD28の細胞内ドメイン、及び/又は配列番号76のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有するOX40(CD134)共刺激ドメインであってもよく、又はそれを含んでもよい。

10

【0217】

本発明の好ましい実施形態において、CAR(又はより詳細にはその「シグナリングテール」)は、任意選択のCD8からのヒンジドメイン又はCH3ドメインを含まないトランケート型IgGヒンジドメイン、CD8膜貫通ドメイン、4-1BB共刺激ドメイン及びCD3細胞内シグナリングドメインを含む。

【0218】

他の実施形態においてCAR(又はその「シグナリングテール」)は、任意選択のCD8からのヒンジドメイン又はCH3ドメインを含まないトランケート型IgGヒンジドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CD28細胞内ドメイン及び/又はOX40共刺激ドメイン、並びにCD3細胞内シグナリングドメインを含む。

20

【0219】

更に、本発明のポリヌクレオチドは、1)CD28からの膜貫通及び共刺激ドメイン並びにCD3からの細胞内シグナリングドメイン、2)CD8からの膜貫通ドメイン、4-1BBからの共刺激ドメイン及びCD3からの細胞内シグナリングドメイン、3)CD8からの膜貫通ドメイン、OX40からの共刺激ドメイン及びCD3からの細胞内シグナリングドメイン、4)CD28からの膜貫通ドメイン、CD28及び4-1BBからの共刺激ドメイン並びにCD3からの細胞内シグナリングドメイン、5)CD28からの膜貫通ドメイン、CD28及びOX40からの共刺激ドメイン並びにCD3からの細胞内シグナリングドメイン、6)CD8からの膜貫通ドメイン、4-1BB及びOX40からの共刺激ドメイン並びにCD3からの細胞内シグナリングドメイン、7)CD8からの膜貫通ドメイン、CD28からの共刺激ドメイン及びCD3からの細胞内シグナリングドメイン、8)CD8からの膜貫通ドメイン、CD28及び4-1BBからの共刺激ドメイン並びにCD3からの細胞内シグナリングドメイン、又は9)CD8からの膜貫通ドメイン、CD28及びOX40からの共刺激ドメイン並びにCD3からの細胞内シグナリングドメインを含むCARをコードしてもよい。詳細には、CD8からの膜貫通ドメインを含むコンストラクトのいずれか1つは、同様にCD8に由来するヒンジ又はスペーサドメインを更にも含む。

30

【0220】

本発明に係るかかるCARは、上記に定義するとおりのscFv抗原結合ドメインを含んでもよく、且つscFvの上流に位置する細胞膜ターゲティング配列を更にも含む。

40

【0221】

従って、本発明のCARは、特定の代表的な実施形態において、上記に定義するとおりのシグナリングテールに加えて、配列番号9、19、49、50若しくは51の配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有する配列を有する細胞外ドメインを含んでもよい。

【0222】

従って、本発明に係る代表的なCARは、配列番号10若しくは30のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するアミノ酸を有してもよく、又はそれを含んでもよい。

50

【0223】

本発明の核酸分子は、配列番号20若しくは配列番号40のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも95%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を含んでもよい。

【0224】

本開示は、CARポリペプチド及びその断片を提供する。詳細には、本発明は、上記に定義したとおりの本発明の核酸分子によってコードされるCARを提供する。用語「ポリペプチド」、「タンパク質」及びは、同義的に使用され、いかなる特定の長さにも限定されないアミノ酸のポリマーを意味する。この用語は、ミリスチル化、硫酸化、グリコシル化、リン酸化及びシグナル配列の付加又は欠失などの修飾を除外しない。用語「ポリペプチド」、又は「タンパク質」、又は「ペプチド」は、1つ以上のアミノ酸鎖を意味し、ここで、各鎖は、ペプチド結合によって共有結合的に連結されたアミノ酸を含み、及び前記ポリペプチド又はタンパク質は、天然タンパク質、即ち、天然に存在する及び特に非組換えの細胞によって産生されるタンパク質、又は遺伝子操作された若しくは組換えの細胞によって産生されるタンパク質の配列を有する、非共有結合的に及び/又はペプチド結合によって共有結合的に共に連結された複数の鎖を含み、及び天然タンパク質のアミノ酸配列を有する分子、又は天然配列の1つ以上のアミノ酸からの欠失、それへの付加、及び/又はその置換を有する分子を含むことができる。用語「ポリペプチド」及び「タンパク質」は、特に本開示のCAR又は本明細書に開示されるとおりのCARの1つ以上のアミノ酸からの欠失、それへの付加、及び/又はその置換を有する配列を包含する。

10

【0225】

上記から明らかなおり、CARの様々なドメインは、その由来である分子の天然配列に対して1つ以上のアミノ酸配列修飾を含み得る。例えば、CARの結合親和性及び/又は他の生物学的特性を改良することが望ましい場合もある。例えば、CAR、又はその結合ドメイン、若しくは刺激性シグナリングドメインのアミノ酸配列変異体は、CAR又はそのドメインをコードするポリヌクレオチドに適切なヌクレオチド変化を導入することによって調製されてもよい。かかる修飾には、例えば、CARのアミノ酸配列内にある残基からの欠失、及び/又はそれへの挿入、及び/又はその置換が含まれる。最終的なCARに至るように欠失、挿入及び置換の任意の組み合わせを行うことができ、但し、最終的なコンストラクトは、結合ドメインによるCLEC14Aへの特異的結合又は細胞内シグナリングドメイン及び/若しくは共刺激ドメインによるシグナル伝達の増加など、所望の特性を有するものとする。アミノ酸変化は、グリコシル化部位の数又は位置の変化など、CARの翻訳後プロセスも改変し得る。上記に記載される変形例及び改良例のいずれも本発明のCARに包含され得る。

20

30

【0226】

詳細な実施形態において、CARの様々なドメイン(VL及びVH配列以外)は、その由来であるタンパク質のドメインの天然配列と少なくとも80%同一、少なくとも85%、少なくとも90%、少なくとも95%同一、又は少なくとも98%又は99%同一のアミノ酸配列を有し得る。従って、詳細な実施形態において、ドメインは、配列番号66~76のいずれかと少なくとも80%、85%、90%、95%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列を有し得る。

40

【0227】

当業者であれば、遺伝子コードの縮重の結果として、本明細書に記載されるとおりのCARをコードし得るヌクレオチド配列が多数あることを理解するであろう。

【0228】

核酸分子は、宿主細胞、特に免疫エフェクター細胞に、その細胞で発現させるmRNAとして又はDNAとして導入されてもよい。ベクターを使用して核酸分子を細胞にトランスファーしてもよく、又はトランスファー用の核酸を作製(例えば、トランスファー用のmRNAを作製、又は細胞へのトランスファー用発現ベクターを調製するための核酸分子を作製)してもよい。

【0229】

50

従って、本発明の更なる態様は、本明細書に定義するとおりの本発明の核酸分子を含むベクターを提供する。

【0230】

ベクターは、例えば、mRNA発現ベクター、クローニングベクター又は免疫細胞へのトランスファー用の発現ベクター、例えばウイルスベクターであってもよい。

【0231】

従って、本発明の別の態様は、本明細書に定義するとおりの本発明の核酸分子又はベクターを含むウイルスを提供する。

【0232】

本発明の別の態様は、本明細書に定義するとおりの本発明の核酸分子又はベクター（又はCAR）を含む宿主細胞、特に免疫エフェクター細胞を提供する。

【0233】

好ましい実施形態において免疫エフェクター細胞は、T細胞又はNK細胞であってもよい。

【0234】

また、宿主細胞、特にCLEC14A特異的免疫エフェクター細胞を作成する方法も提供され、前記方法は、本明細書に定義するとおりの本発明の核酸分子又はベクターを宿主細胞、特に免疫エフェクター細胞に導入することを含む。

【0235】

かかる方法は、核酸分子又はベクターの導入前及び/又は導入後に細胞を刺激することと、その増殖を誘導することとを含んでもよい。

【0236】

本発明の核酸分子及びベクターを宿主細胞に導入して本発明の抗体又はCARを作製してもよい。従って、本発明のなお別の態様は、本発明の抗体又はCARを作製する方法であって、前記抗体が発現する条件下で本発明の核酸分子又はベクターを含む宿主細胞を培養することと、そのように作製された前記分子を回収することとを含む方法である。

【0237】

ベクター又はコンストラクト（核酸分子）は、化学的トランスフェクション剤（リン酸カルシウム、分枝状有機化合物、リボソーム又はカチオン性ポリマーなど）、電気穿孔、セルスクイーキング、ソノポレーション、光学的トランスフェクション、流体力学的デリバリー、又はウイルス形質導入を含め、種々の手段によって本発明の細胞に導入することができる。好ましい実施形態において、ベクター又はコンストラクトは、ウイルス形質導入によって導入される。これは、CARのより持続的な発現を可能にし得る。しかしながら、状況によっては、例えば臨床試験では、又は臨床的状况によっては、CARタンパク質の発現期間がより一過性であることが望ましい場合もある。かかる状況では、核酸分子をmRNAとして免疫エフェクター細胞に送達することが望ましい場合もある。mRNA作製のmRNA発現ベクターは、当該技術分野において公知の方法に従って（例えば、Gateway技術を用いて）調製してもよく、当該技術分野において公知である（例えば、pCIpA102、Saeboe-Larssen et al, 2002, J. Immunol. Methods 259, p 191-203及びpCIpA120-G、Waelchli et al, 2011, PLoS ONE 6 (11) e27930）。

【0238】

mRNAは、例えば、インビトロ転写によってインビトロで作製することができる。次に、mRNAは、例えばネイキッドmRNAとして、例えば電気穿孔によって免疫エフェクター細胞に導入されてもよい（例えば、Almasbak et al., Cytotherapy 2011, 13, 629-640、Rabinovich et al., Hum. Gene Ther., 2009, 20, 51-60及びBeatty et al., Cancer Immunol. Res. 2014, 2, 112-120に記載されるとおり）。代替的に、mRNAは、リボソーム又はカチオン性分子等によるなど、他の手段によって導入されてもよい。細胞に導入された異種核酸分子は、エピソーム発現し得るか、又は細胞のゲノムに好適な遺伝子座で組み込まれ得る。

【0239】

10

20

30

40

50

本発明の免疫エフェクター細胞、例えばT細胞がインビボでネガティブ選択を受け易くなる遺伝子セグメントを含むことは、本発明の範囲内である。「ネガティブ選択」とは、個体のインビボ条件が変化する結果として注入細胞を除去し得ることを意味する。ネガティブ選択可能な表現型は、投与された薬剤、例えば化合物に対する感受性を付与する遺伝子（例えば、いわゆる自殺遺伝子）の挿入によって生じ得る。ネガティブ選択可能な遺伝子は、当該技術分野において公知であり、とりわけ、以下：ガンシクロビル感受性を付与する単純ヘルペスウイルスI型チミジンキナーゼ（H S V - I T K）遺伝子（Wigler et al., Cell 11 (1):223-232, 1977）、細胞性ヒポキサンチンホスフリボシルトランスフェラーゼ（hypoxanthinephosphoribosyltransferase）（H P R T）遺伝子、細胞性アデニンホスホリボシルトランスフェラーゼ（A P R T）遺伝子、細菌性シトシンデアミナーゼ（Mullen et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33-37 (1992)）が挙げられる。

10

【0240】

一部の実施形態において、遺伝子修飾された免疫エフェクター細胞、例えばT細胞に、インビトロでのネガティブ選択可能な表現型の細胞の選択を可能にするポジティブマーカを含むことが有用であり得る。ポジティブ選択可能マーカは、宿主細胞に導入すると優勢な表現型を発現して、その遺伝子を保因する細胞のポジティブ選択を可能にする遺伝子であり得る。この種の遺伝子は、当該技術分野において公知であり、とりわけ、ハイグロマイシンB耐性を付与するハイグロマイシン-Bホスホトランスフェラーゼ遺伝子（h p h）、抗生物質G418耐性をコードするTn5からのアミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ遺伝子（neo又はaph）、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（D H F R）遺伝子、アデノシンデアミナーゼ遺伝子（A D A）及び多剤耐性（M D R）遺伝子が挙げられる。他のポジティブ選択可能マーカとしては、形質導入細胞の選別を可能にする細胞膜内又は細胞膜上に発現するタンパク質をコードする遺伝子、例えば蛍光活性化細胞選別（F A C S）を用いた形質導入細胞の選択を可能にし得るGFPなどの蛍光タンパク質をコードする遺伝子を挙げることができる。任意の好適なポジティブ選択可能マーカを本発明に使用することができる。

20

【0241】

好ましくは、ポジティブ選択可能マーカとネガティブ選択可能エレメントとは、ネガティブ選択可能エレメントが失われると必然的にポジティブ選択可能マーカの喪失も付随するように連結される。更により好ましくは、ポジティブ選択可能マーカとネガティブ選択可能マーカとは、一方が失われると不可避免的に他方の喪失につながるように融合される。上記に記載される所望のポジティブ選択特徴及びネガティブ選択特徴の両方を付与するポリペプチドを発現産物として生じる融合ポリヌクレオチドの例は、ハイグロマイシンホスホトランスフェラーゼチミジンキナーゼ融合遺伝子（H y T K）である。この遺伝子の発現により、インビトロでのポジティブ選択用のハイグロマイシンB耐性及びインビボでのネガティブ選択用のガンシクロビル感受性を付与するポリペプチドが生じる。Lupton S. D., et al, Mol. and Cell. Biology 11:3374-3378, 1991を参照されたい。

30

【0242】

一部の実施形態において、本発明のCAR発現ベクターからポリペプチドを発現させて、免疫エフェクター細胞におけるCARの発現の検出を可能にすることが望ましい場合もある。従って、CARをコードするヌクレオチド配列と同じ（又は異なるプロモーターの）制御下にある更なるポリペプチドの発現を検出することにより、ベクターによる免疫エフェクター細胞の形質導入の成功及びCAR分子の発現の成功を同定することが可能であり得る。詳細には、本発明のCAR分子は、CD34分子又は修飾CD34分子、例えばトランケート型CD34分子を更に含んでもよく、かかる分子は、周知の技法、例えば好適な抗体及び標識を用いた免疫蛍光法によるその検出を可能にする細胞外部分を含む。詳細な実施形態において、本発明のベクターは、配列番号77のヌクレオチド配列、又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有するヌクレオチド配列を更に含んでもよい。別の見方をすれば、ベクターは、配列番号78のアミノ酸配列、又はそれと少なくとも80%の配列同一性を有する配列を更にコードしてもよい。

40

50

【0243】

「免疫エフェクター細胞」は、1つ以上のエフェクター機能（例えば、細胞傷害性細胞死滅活性、サイトカインの分泌、ADCC及び/又はCDCの誘導）を有する免疫系の任意の細胞である。従って、代表的な免疫エフェクター細胞としては、Tリンパ球、詳細には細胞傷害性T細胞（CTL；CD8+ T細胞）及びヘルパーT細胞（HTL；CD4+ T細胞）が挙げられる。他のT細胞集団、例えばナイーブT細胞及びメモリーT細胞も本明細書において有用である。他の免疫エフェクター細胞としては、NK細胞、NKT細胞、好中球及びマクロファージが挙げられる。上述のとおり、免疫エフェクター細胞にはエフェクター細胞のプロジェニターも含まれ、かかるプロジェニター細胞は、インピボ又はインピトロで免疫エフェクター細胞への分化を誘導することができる。

10

【0244】

T細胞、特にCD8+ T細胞及びNK細胞が、本発明に係る好ましい免疫エフェクター細胞に相当する。

【0245】

用語「NK細胞」は、大型の顆粒性リンパ球を指し、天然では抗原特異的受容体（例えば、T細胞受容体又はB細胞受容体）を含まない一般的なリンパ系プロジェニターに由来する細胞傷害性リンパ球である。NK細胞は、そのCD3⁻、CD56⁺表現型によって区別され得る。従って、この用語には、本明細書で使用されるとき、任意の公知のNK細胞又は任意のNK様細胞又はNK細胞の特徴を有する任意の細胞が含まれる。従って、初代NK細胞が用いられてもよく、又は代替的实施形態では、予め単離及び培養されている当該技術分野において公知のNK細胞が用いられてもよい。従って、NK細胞株が用いられてもよい。幾つもの異なるNK細胞が公知であって文献に報告されており、それらのいずれを使用することもでき、又は細胞株は、初代NK細胞から例えばウイルス形質転換によって調製されてもよい（Vogel et al. 2014, Leukaemia 28:192-195）。好適なNK細胞としては（決して限定されることはないが）、NK-92に加え、NK-YS、NK-YT、MOTN-1、NKL、KHYG-1、HANK-1、又はNKG細胞株が挙げられる。好ましい実施形態において、細胞は、NK-92細胞（Gong et al. 1994, Leukemia 8:652-658）又はその変異体である。元のNK-92細胞の幾つもの異なる変異体が調製されており、非免疫原性のNK-92変異体を含め、記載があり又は利用可能である。任意のかかる変異体を使用することができ、それらは、用語「NK-92」に含まれる。他の細胞株の変異体も使用することができる。

20

30

【0246】

免疫エフェクター細胞が治療的に使用される非自己細胞である（即ち、ドナー細胞である）場合、それが非免疫原性であり、従ってそれが対象への投与時に療法における細胞の使用に影響を与えるか、それに干渉するか、又はそれを妨げる免疫応答を生じさせないことが好ましい。

【0247】

NK細胞は、天然で非免疫原性であり得るが、NK細胞又は他の免疫エフェクター細胞が非免疫原性となるように修飾されてもよい。天然で非免疫原性のNK細胞は、MHC分子を発現しないか、若しくはMHC分子をごく弱くのみ発現することになり、又は免疫応答を刺激しない非機能性MHC分子を発現し得る。免疫原性であろう免疫エフェクター細胞は、MHC分子の発現を消失させるか、又はその表面上でMHC分子をごく弱くのみ発現するように修飾されてもよい。代替的に、かかる細胞は、非機能性MHC分子を発現するように修飾されてもよい。

40

【0248】

機能性MHC分子の発現を妨げる任意の手段が包含される。従って、これには、MHC複合体の分子をロックアウト又はロックダウンすることが含まれてもよく、及び/又はこれには、MHC分子への適切な輸送及び/又は細胞表面におけるMHC分子の又は複合体全体の正しい発現を防ぐ修飾が含まれてもよい。

【0249】

50

詳細には、本発明の細胞の表面における1つ以上の機能性MHCクラスIタンパク質の発現を妨げることができる。一実施形態において、細胞は、HLA陰性のヒト細胞、従って1つ以上のHLA分子、例えばHLA MHCクラスI複合体の分子の発現が妨げられている(例えば、ノックアウトされている)細胞であってもよい。

【0250】

好ましい実施形態において、MHCクラスIの妨害は、成熟MHCクラスI複合体の成分である β_2 -ミクログロブリン(β_2m)をコードする遺伝子をノックアウトすることにより行われてもよい。 β_2m の発現は、 β_2m 遺伝子の標的化した破壊を通じて、例えば β_2m プロモーターの(それによりプロモーターを不活性化させる)、又は β_2m タンパク質をコードする遺伝子内での部位特異的突然変異誘発により、 β_2m タンパク質の発現を防ぐ不活性化突然変異、例えば遺伝子内におけるフレームシフト突然変異又は中途「終止」コドンを導入して消失させてもよい。代替的に、部位特異的突然変異誘発を用いて、細胞表面に活性MHCタンパク質を形成する能力を有しない非機能性 β_2m タンパク質を作成してもよい。このように、 β_2m タンパク質又はMHCは、細胞内に保持されてもよく、又は細胞表面に存在するが、非機能性であってもよい。

10

【0251】

代替的に、免疫エフェクター細胞は、対象への投与前に照射されてもよい。理論によって拘束されることを望むものではないが、細胞を照射することにより、細胞が対象の体内に一過性にのみ存在することになり、従って対象の免疫系がその細胞に対して免疫応答を仕掛ける時間が減少するものと思われる。かかる細胞は、機能性のその細胞表面にMHC分子を発現し得るが、それらは、非免疫原性であると見なすこともできる。照射は、任意の線、線若しくは線源からであってもよく、又はX線照射若しくは紫外線であってもよい。増殖を抑止するには5~10Gyの放射線量が十分であり得るが、しかしながら、他の好適な放射線量は、1~10、2~10、3~10、4~10、6~10、7~10、8~10若しくは9~10Gy又はそれより高い線量、例えば11、12、13、14、15又は20Gyであり得る。代替的に、細胞が「自殺遺伝子」を発現するように修飾されてもよく、それにより細胞を外部刺激に応答して誘導的に死滅させ又はその複製を防ぐことが可能になる。

20

【0252】

従って、本発明に係る免疫エフェクター細胞は、その増殖する可能性又は能力の低下により、即ちその増殖能の低下により、非免疫原性となるように修飾されてもよい。

30

【0253】

本発明の修飾された免疫エフェクター細胞は、他の方法で修飾に供して、例えばそれにより細胞の機能又は挙動の他の側面を改変又は修飾し、及び/又は他のタンパク質を発現させてもよい。例えば、細胞は、細胞を体内の特定の組織又は位置にターゲティングするか又はその局在化を改善する役割を果たすホーミング受容体、又は局在化受容体を発現するように修飾されてもよい。

【0254】

例えば、本発明のベクター又は核酸を形質導入したか又は形質導入しようとする免疫エフェクター細胞に更なる修飾を行うことが望ましい場合もある。詳細には、CLEC14Aに対するその応答を延ばすか又は増強する免疫細胞に対する修飾が望ましい場合もある。例えば、腫瘍によってTGF β が分泌され、これは、T細胞の誘導を抑制し得ることが知られている。これに関して、本発明の修飾免疫エフェクター細胞、例えばT細胞(即ち、本発明の核酸又はベクターを形質導入したもの)が、TGF β の効果例えばドミナントネガティブTGF β 受容体IIの発現によって中和する能力を有することが望ましい場合もある。追加的に又は代替的に、本発明の免疫エフェクター細胞には、サイトカイン、例えばIL-15、又はIL-2、IL-7、IL-12等をコードする核酸が形質導入されてもよく、これにより細胞のエフェクター機能を増強し得る。いずれの追加的な核酸配列もCAR分子と同じ又は異なるベクターから発現させることができる。

40

【0255】

50

更に、本発明の免疫エフェクター細胞が本発明の核酸又はベクターを2つ以上含み得ることが理解されるであろう。詳細には、本発明の免疫エフェクター細胞は、各々が異なるCAR分子を発現する2、3、4若しくは5個又はそれを超える本発明の核酸又はベクターを含んでもよい。従って、本発明の免疫エフェクター細胞は、例えばCLEC14A上の同じ又は異なる位置でCLEC14Aに結合する能力を有する異なるCAR分子を含んでもよい。

【0256】

従って、一部の実施形態において、本発明の免疫エフェクター細胞は、以下に記載される核酸分子の2つ以上、例えば以下に記載される核酸分子の2、3又は4つ、例えば(1)を含む抗原結合ドメインをコードする核酸分子、及び(2)を含む抗原結合ドメインを

10

コードする核酸分子などを含み、ここで、前記核酸分子の各々は、抗原CLEC14Aに対して指向されるCARをコードし、前記CARは、免疫エフェクター細胞の表面上に発現されると、標的細胞表面上に発現された抗原CLEC14Aへの結合能を有し、且つ

(1)(a) VHCDR配列であって、

(i) 配列番号2又は42のアミノ酸配列を有するVHCDR1、及び/又は

(ii) 配列番号3又は43のアミノ酸配列を有するVHCDR2、及び/又は

(iii) 配列番号4又は44のアミノ酸配列を有するVHCDR3

を含むVHCDR配列、及び/又は

(b) VLCDR配列であって、

(i) 配列番号6又は46のアミノ酸配列を有するVLCDR1、及び/又は

(ii) 配列番号7又は47のアミノ酸配列を有するVLCDR2、及び/又は

(vi) 配列番号8又は48のアミノ酸配列を有するVLCDR3

を含むVLCDR配列、及び/又は

(a)又は(b)に記載される配列番号と実質的に相同な1つ以上の配列、或いは

(2)(a) VHCDR配列であって、

(i) 配列番号22のアミノ酸配列を有するVHCDR1、及び/又は

(ii) 配列番号23のアミノ酸配列を有するVHCDR2、及び/又は

(iii) 配列番号24のアミノ酸配列を有するVHCDR3

を含むVHCDR配列、及び/又は

(b) VLCDR配列であって、

(i) 配列番号26のアミノ酸配列を有するVLCDR1、及び/又は

(ii) 配列番号27のアミノ酸配列を有するVLCDR2、及び/又は

(iii) 配列番号28のアミノ酸配列を有するVLCDR3

を含むVLCDR配列、及び/又は

(a)又は(b)に記載される配列番号と実質的に相同な1つ以上の配列

を含む抗原結合ドメインを含む。一部の実施形態において、本発明の免疫エフェクター細胞は、発現した本発明のCARに加えて、少なくとも1つの他の受容体、特に外因性受容体(例えば、複数の受容体)を含んでもよく、それらは、コンビナトリアル手法において標的細胞(例えば、CLEC14Aを発現する腫瘍細胞、例えば腫瘍血管構造)への結合のためにCARと共に用いられ得る。従って、かかる手法では、標的細胞に対する免疫応答を刺激するのにCAR及び少なくとも1つの他の受容体の両方が標的細胞に結合する必要があり得る(例えば、CAR/受容体の各々は、免疫細胞刺激の部分的なシグナルを提供し得るに過ぎず、単独では免疫細胞刺激に不十分であるが、一緒になると免疫エフェクター細胞刺激が可能であり得る)。本発明の免疫エフェクター細胞がT細胞である場合、T細胞を刺激するのに、CLEC14Aに結合する1つ又は複数のCARと、CLEC14A発現細胞上のそのリガンドに結合する少なくとも1つの他の受容体とが必要であり得る。少なくとも1つの他の受容体は、更なるCAR分子であってもよい。

20

30

40

【0257】

この実施形態の変形例において、本発明の免疫エフェクター細胞内のCARは、誘導的に発現し得る。詳細には、この実施形態では、免疫エフェクター細胞上に発現する少なく

50

とも1つの他の受容体のその標的への結合がCAR分子の発現を可能にし、又はそれを制御し得る。従って、この場合、CAR発現が起こる前に少なくとも1つの他の受容体はそのリガンドに結合する必要がある、従って免疫エフェクター細胞刺激には、少なくとも1つの他の受容体のそのリガンドへの結合と、続くCARの標的細胞への結合とが必要である。かかる特定のシステムは、SynNotch受容体の追加的な発現を含んでもよく、これは、目的の抗原、例えばCD19に対する細胞外リガンド結合ドメイン及び直交性の転写因子（例えば、TetR又はGal4）で操作されるものである。目的の抗原が結合すると、SynNotch受容体のテールから直交性の転写因子が切断され、CARの発現が活性化する。従って、本発明の免疫エフェクター細胞は、CLEC14A以外の抗原、詳細にはCLEC14A以外の腫瘍関連抗原に結合する受容体をコードする核酸又はベクターを更に含んでもよい。

10

【0258】

代替的に、本発明のCARに加えて更なる受容体を本発明の免疫エフェクター細胞上に発現させるコンビナトリアル手法も用いることができ、ここで、前記更なる受容体は、オプターゲット細胞又は組織（例えば、非腫瘍細胞）への結合能を有する。この場合、更なる受容体はそのリガンドに結合する場合、負のシグナルが生じ、免疫細胞刺激（例えば、T細胞刺激）が妨げられる。

【0259】

更なる組み合わせ手法は、本発明のCARと組み合わせる更なる受容体を使用してもよく、ここで、両方の受容体異なる標的に結合し、異なる効果を誘導して腫瘍を治療する。従って、両方の抗腫瘍効果は、互いに完全に独立していてもよく、しかし、一緒になると腫瘍に対して有効な療法を呈し得る。これに関して、本発明のCARは、TCR療法と組み合わせる用いられてもよく、ここで、免疫細胞に、本発明のCARと、腫瘍細胞上（例えば、特定のタイプの腫瘍細胞上又は任意の腫瘍細胞上）に存在し得る特定のMHC/ペプチドの組み合わせへの結合能を有するTCRとをコードする1つ以上の核酸分子が形質導入され得る。代替的に、CARをコードする核酸を形質導入された免疫細胞と、TCRをコードする核酸を形質導入された別個の免疫細胞集団とが別々に、逐次的に又は同時に提供されてもよい。本発明のCAR及び腫瘍MHC/ペプチドの組み合わせを認識するTCRをコードする1つ以上の核酸を用いた遺伝子療法治療も想定される。

20

【0260】

本発明は、本明細書に記載されるとおりのCARを発現する免疫エフェクター細胞の作製方法を提供する。一実施形態において、本方法は、免疫エフェクター細胞が本明細書に記載されるとおりの1つ以上のCARを発現するように、対象から単離した免疫エフェクター細胞をトランスフェクト又は形質導入することを含む。特定の実施形態において、免疫エフェクター細胞は、対象から単離され、インビトロでの更なる操作なしに核酸分子を導入することにより修飾される。かかる細胞は、次に対象に直接再投与することができる。更なる実施形態において、免疫エフェクター細胞は、初めにインビトロで増殖するように活性化及び刺激された後、CARを発現するように修飾される。これに関して、免疫エフェクター細胞は、遺伝子修飾される（即ち、本明細書に記載されるとおりのCARを発現するように形質導入又はトランスフェクトされる）前又はその後に培養されてもよい。

30

40

【0261】

T細胞は、末梢血単核細胞、骨髄、リンパ節組織、臍帯血、胸腺組織、感染部位からの組織、腹水、胸水、脾臓組織及び腫瘍を含め、幾つもの供給源から入手することができる。特定の実施形態において、T細胞は、FICOLL（商標）分離法など、当業者に公知の任意の技法を用いて対象から収集された血液ユニットから入手することができる。一実施形態において、対象の循環血液からの細胞がアフエレーシスによって入手される。アフエレーシス産物は、典型的には、T細胞、単球、顆粒球、B細胞、他の有核白血球細胞、赤血球細胞及び血小板を含めたリンパ球を含有する。一実施形態において、アフエレーシスによって収集された細胞は洗浄することにより血漿画分が除去され、後の処理のために細胞が適切な緩衝液又は培地中に置かれ得る。本発明の一実施形態において、細胞は、PBSで

50

洗浄される。代替的实施形態において、洗浄溶液は、カルシウム及び/又はマグネシウム不含であり、又は全てではないにしろ、多くの二価カチオンが不含である。当業者であれば理解するであろうとおり、洗浄ステップは、当業者に公知の方法により、例えば半自動フロースルー遠心機を使用することにより達成し得る。例えば、Cobe 2991細胞プロセッサ、Baxter CytoMateなどである。洗浄後、細胞は、種々の生体適合性緩衝液又は緩衝液含有若しくは不含の他の生理食塩水に再懸濁されてもよい。特定の実施形態において、細胞を直接再懸濁した培養培地中でアフエーシス試料の望ましくない成分を除去してもよい。

【0262】

特定の実施形態において、T細胞は、末梢血単核細胞(PBMC)から、赤血球を溶解し、及び例えばPERCOLL(商標)グラジエントを用いた遠心によって単球を枯渇させることにより単離される。ポジティブ又はネガティブ選択技法により、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+、及びCD45RO+ T細胞などの特定のT細胞サブ集団を更に単離することができる。例えば、ネガティブ選択によるT細胞集団のエンリッチメントは、ネガティブ選択される細胞にユニークな表面マーカーに対する抗体の組み合わせを用いて達成することができる。本明細書において用いられる1つの方法は、ネガティブ選択される細胞に存在する細胞表面マーカーに対するモノクローナル抗体のカクテルを使用するネガティブ磁気的免疫接着若しくはフローサイトメトリーによる細胞選別及び/又は選択である。例えば、ネガティブ選択によってCD4+細胞をエンリッチするために、モノクローナル抗体カクテルは、典型的には、CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR、及びCD8に対する抗体を含む。フローサイトメトリー及び細胞選別は、本発明で使用する目的の細胞集団の単離にも用いられ得る。

【0263】

PBMCは、本明細書に記載されるとおりの方法を用いた遺伝子修飾に直接使用し得る。特定の実施形態において、PBMCを単離した後、Tリンパ球が更に単離され、及び特定の実施形態では、細胞傷害性Tリンパ球及びヘルパーTリンパ球の両方は、遺伝子修飾及び/又は増殖の前又はその後のいずれかにナイーブ、メモリー及びエフェクターT細胞のサブ集団に選別され得る。CD8+細胞は、標準方法を用いて入手することができる。一部の实施形態において、CD8+細胞は、ナイーブ、セントラルメモリー及びエフェクター細胞へと、それらのタイプのCD8+細胞の各々に関連する細胞表面抗原を同定することによって更に選別される。実施形態において、メモリーT細胞は、CD8+末梢血リンパ球のCD62L+及びCD62L-の両方のサブセットに存在する。PBMCは、抗CD8抗体及び抗CD62L抗体による染色後にCD62L-CD8+画分とCD62L+CD8+画分とに選別される。一部の实施形態において、セントラルメモリーTCMの表現型マーカーの発現には、CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3及びCD127が含まれ、グランザイムB陰性である。一部の实施形態において、セントラルメモリーT細胞は、CD45RO+、CD62L+、CD8+ T細胞である。一部の实施形態において、エフェクターT細胞は、CD62L、CCR7、CD28及びCD127が陰性であり、且つグランザイムB及びパーフォリンが陽性である。一部の实施形態において、ナイーブCD8+ Tリンパ球は、CD62L、CCR7、CD28、CD3

【0264】

T細胞などの免疫エフェクター細胞は、単離後に修飾することができ、又は免疫エフェクター細胞は、修飾する前にインビトロで活性化及び増殖させる(又はプロジェニターの場合には分化させる)ことができる。別の実施形態において、T細胞などの免疫エフェクター細胞は、核酸分子の導入によって修飾され、次にインビトロで活性化及び増殖される。T細胞の活性化及び増殖方法は、当該技術分野において公知であり、例えば、米国特許第6905874号、米国特許第6867041号、米国特許第6797514号、国際公開第2012079000号に記載されている。概して、かかる方法は、IL-2など

10

20

30

40

50

の適切なサイトカインを含む培養培地中において、概してビーズ又は他の表面に付着させた抗CD3及び抗CD28抗体などの刺激剤及び共刺激剤にPBM C又は単離T細胞を接触させることを含む。同じビーズに付着した抗CD3及び抗CD28抗体が「サロゲート」抗原提示細胞(APC)としての役割を果たす。他の実施形態において、T細胞は、米国特許第6040177号、米国特許第5827642号及び国際公開第2012129514号に記載されるものなどの方法を用いて、支持細胞並びに適切な抗体及びサイトカインで増殖するよう活性化させ、及び刺激してもよい。

【0265】

一実施形態において、CD34+細胞は、本発明に係るCARコード核酸分子によって形質転換又はトランスフェクトされる。特定の実施形態において、修飾された(例えば、トランスフェクト又は形質転換された)CD34+細胞は、対象、概して細胞の単離元となった対象への投与後にインビボで成熟免疫エフェクター細胞に分化する。別の実施形態において、CD34+細胞は、核酸分子の導入前又は導入後に、当該技術分野において公知の方法により、以下のサイトカイン: Flt-3リガンド(FL)、幹細胞因子(SF)、巨核球増殖分化因子(TPO)、IL-3及びIL-6の1つ以上によってインビボで刺激されてもよい。

10

【0266】

本発明は、以下に更に詳細に記載するとおりの療法に用いられる修飾免疫エフェクター細胞であって、本明細書に開示されるとおりのCARを発現する修飾免疫エフェクター細胞を提供する。例えば、修飾免疫エフェクター細胞は、癌、特に固形腫瘍と診断された患者から入手された末梢血単核細胞(PBM C)から調製されてもよい。

20

【0267】

修飾免疫エフェクター細胞の保存、例えば凍結保存、及び/又はヒト若しくは他の対象で使用するための調製に標準的手順が用いられ得る。

【0268】

CARを発現する免疫エフェクター細胞は、公知の技法による養子免疫療法のための方法及び組成物において利用することができる。一部の実施形態において、細胞は、初めに細胞をその培養培地から回収し、次に細胞を洗浄し、投与に好適な媒体及び容器システム(「薬学的に許容可能な」担体)中に治療有効量で濃縮することにより製剤化される。好適な注入媒体は任意の等張性媒体製剤、典型的には、通常、生理食塩水、Normosol R(Abbott)又はPlasma-Lyte A(Baxter)であってよいが、また水又は乳酸加リンゲル中5%デキストロースも利用することができる。注入媒体にはヒト血清アルブミンを添加することができる。組成物中の細胞の治療有効量は、少なくとも2つの細胞(例えば、少なくとも1つのCD8+ セントラルメモリーT細胞及び少なくとも1つのCD4+ ヘルパーT細胞サブセット)であり、又はより典型的には 10^2 細胞超、及び最大 10^6 、最大 10^8 又は 10^9 細胞以下であり、及び 10^{10} 細胞超であり得る。細胞の数は、組成物に含まれる細胞のタイプと同様に、組成物の最終的な使用目的に依存することになる。本明細書に提供される使用には、細胞は、概してリットル以下、500ml以下、更には250ml又は100ml以下の体積である。従って、望ましい細胞の密度は、典型的には 10^6 細胞/ml超であり、概して 10^7 細胞/ml超、概して10細胞/ml以上である。臨床的に関連性のある免疫細胞数は、累積で 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 又は 10^{12} 細胞以上になる複数回の注入に分割することができる。例えば、2、3、4、5、6回又はそれを超えて別々の注入が24又は48時間の間隔を置いて、又は3、4、5、6又は7日おきに患者に投与されてもよい。注入は、1週間、2週間若しくは1カ月の間隔、又は6週間、又は2、3、4、5若しくは6カ月の間隔を置いてもよい。また、年1回の注入が投与され得る可能性もある。本発明の一部の態様において、注入される細胞は、全て特定の標的抗原(即ち、CLEC14A)に仕向け直されるため、 10^6 /キログラム(1患者当たり $10^6 \sim 10^9$)の範囲の少ない数の細胞が投与されてもよい。細胞組成物は、これらの範囲内の投薬量で複数回投与されてもよい。必要に応じて、治療は、免疫応答の誘導を増進させるため、マイトジェン(例えば、

30

40

50

PHA)若しくはリンホカイン、サイトカイン、及び/又はケモカイン(例えば、IFN-、IL-2、IL-12、TNF-、IL-18及びTNF-、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES等)の投与も含み得る。

【0269】

CARを発現する本発明の免疫エフェクター細胞は、単独で投与されても、又は希釈剤及び/又はIL-2又は他のサイトカイン又は細胞集団などの成分と組み合わせた他の医薬組成物として投与されてもよい。簡潔に言えば、本発明の医薬組成物は、本明細書に記載されるとおりの、CARを発現する免疫エフェクター細胞集団、例えばT細胞を1つ以上の薬学的又は生理学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤との組み合わせで含む得る。かかる組成物は、中性緩衝生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水などの緩衝液；グルコース、マンノース、スクロース又はデキストラン類、マンニトールなどの炭水化物；タンパク質；ポリペプチド又はグリシンなどのアミノ酸；抗酸化剤；EDTA又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)；及び保存剤を含んでもよい。本発明の組成物は、好ましくは、静脈内投与用に製剤化され、以下に詳細に記載する。

10

【0270】

CARをコードするベクターに用いられるインピボ選択可能マーカに関連して他の部分に指摘されるとおり、細胞が本発明の核酸分子で修飾される前、その後又はそれと同時に、CARを含有する免疫エフェクター細胞に誘導性カスパーゼ9又はチミジンキナーゼなどの自殺遺伝子を形質導入することにより、有害事象を最小限に抑えることができる。

20

【0271】

本明細書に記載されるCARを発現する免疫エフェクター細胞を投与することにより対象に誘導される免疫応答には、感染細胞を死滅させる能力を有する細胞傷害性T細胞によって媒介される細胞性免疫応答、調節性T細胞及びヘルパーT細胞応答が含まれ得る。B細胞を活性化させる能力を有し、従って抗体産生をもたらすヘルパーT細胞によって主に媒介される体液性免疫応答も含まれ得る。

【0272】

「有効量」が示されるとき、組成物の正確な投与量は、医師が患者(対象)の年齢、体重、悪性病変の程度及び全般的な状態の個々の違いを考慮して判断し得る。特定の患者に最適な投薬量及び治療レジームは、医学分野の当業者が対象を疾患の徴候に関してモニタし、それに応じて治療を調整することにより、容易に判断することができる。

30

【0273】

用語「標的細胞」は、本発明の修飾免疫エフェクター細胞によって死滅又は消失させようとする任意の細胞を指す。上述のとおり、これは、概して、CLEC14Aを発現する内皮細胞(例えば、腫瘍、好ましくは固形腫瘍内にある内皮細胞、例えば癌細胞)であり得る。

【0274】

可能な発現ベクターとしては、そのベクターが使用する宿主細胞と適合性を有する限り、限定はされないが、コスミド、プラスミド又は修飾ウイルス(例えば、複製欠損レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス)が挙げられる。発現ベクターは、「宿主細胞の形質転換に好適」であり、これは、発現ベクターが本発明の核酸分子と、核酸分子に作動可能に連結した、発現に使用する宿主細胞に基づき選択された調節配列とを含有することを意味する。作動可能に連結したとは、核酸が核酸の発現を可能にする方法で調節配列に連結されていることを意味するものと意図される。

40

【0275】

従って、本発明は、本発明の核酸分子又はその断片と、本発明の核酸分子によってコードされるタンパク質配列の転写及び翻訳に必要な調節配列とを含有する組換え発現ベクターを企図する。

【0276】

好適な調節配列は、細菌、真菌、ウイルス、哺乳類又は昆虫遺伝子を含めた種々の供給

50

源に由来し得る。適切な調節配列の選択は、以下で考察するとおり選択の宿主細胞に依存し、当業者は、容易に実現し得る。かかる調節配列の例としては、翻訳開始シグナルを含め、転写プロモーター及びエンハンサー又はRNAポリメラーゼ結合配列、リボソーム結合配列が挙げられる。加えて、選択の宿主細胞及び用いられるベクターに応じて、複製起点、追加的なDNA制限部位、エンハンサー及び転写誘導能を付与する配列などの他の配列が発現ベクターに組み込まれ得る。

【0277】

本発明の組換え発現ベクターは、本発明の組換え分子で形質転換又はトランスフェクトされた宿主細胞の選択を促進する選択可能マーカー遺伝子を含んでもよい。選択可能マーカー遺伝子の例は、特定の薬物に対する耐性を付与するネオマイシン及びハイグロマイシン、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ、ホタルルシフェラーゼ又は免疫グロブリン若しくはその一部分、例えば免疫グロブリンの、好ましくはIgGのFc部分などのタンパク質をコードする遺伝子である。選択可能マーカー遺伝子の転写は、 β -ガラクトシダーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ又はホタルルシフェラーゼなどの選択可能マーカータンパク質の濃度の変化によってモニタされる。選択可能マーカー遺伝子が、ネオマイシン耐性などの抗生物質耐性を付与するタンパク質をコードする場合、形質転換細胞は、G418で選択することができる。選択可能マーカー遺伝子が組み込まれた細胞は生存し得るが、他の細胞は死滅し得る。これにより、本発明の組換え発現ベクターの発現を可視化してアッセイし、詳細には突然変異が発現及び表現型に及ぼす効果を決定することが可能になる。選択可能マーカーは、目的の核酸と別個のベクターで導入してもよいことが理解されるであろう。

10

20

【0278】

組換え発現ベクターは、組換えタンパク質の発現の増加、組換えタンパク質の溶解度の増加をもたらす融合部分をコードし、及びアフィニティー精製においてリガンドとして作用することにより標的組換えタンパク質の精製を補助する遺伝子を含んでもよい（例えば、精製及び/又は同定を可能にする適切な「タグ」、例えばHisタグ又はmycタグが存在してもよい）。例えば、標的組換えタンパク質にタンパク質分解切断部位を加えることにより、融合タンパク質の精製後に組換えタンパク質を融合部分と分離することが可能となり得る。典型的な融合発現ベクターとしては、それぞれグルタチオンS-トランスフェラーゼ(GST)、マルトースE結合タンパク質、又はプロテインAを組換えタンパク質に融合するpGEX (Amrad Corp.、メルボルン、オーストラリア)、pMal (New England Biolabs、ピバリー、MA)及びpRIT5 (Pharmacia、ピスカタウェイ、NJ)が挙げられる。

30

【0279】

組換え発現ベクターを宿主細胞に導入して形質導入宿主細胞を作製することができる。用語「～を形質導入された」、「～で形質転換された」、「～をトランスフェクトされた」、「形質転換」及び「トランスフェクション」は、当該技術分野において公知の多くの可能な技法の1つによる細胞への核酸（例えば、ベクター）の導入を包含することが意図される。用語「形質転換宿主細胞」は、本明細書で使用されるとき、本発明の組換え発現ベクターで形質転換されているグリコシル化能を有する細胞も含むように意図される。原核細胞は、例えば電気穿孔又は塩化カルシウム媒介形質転換によって核酸で形質転換することができる。例えば、核酸は、リン酸カルシウム又は塩化カルシウム共沈殿、DEAE-デキストラン媒介トランスフェクション、リポフェクション、電気穿孔又はマイクロインジェクションなどの従来技術を用いて哺乳類細胞に導入することができる。宿主細胞の形質転換及びトランスフェクションに好適な方法については、Sambrook et al., 1989 (前掲)及び他の実験テキストを参照することができる。

40

【0280】

好適な宿主細胞としては、多様な真核生物宿主細胞及び原核細胞が挙げられる。例えば、本発明のタンパク質（例えば、抗体）は、酵母細胞又は哺乳類細胞で発現させてもよい。加えて、本発明のタンパク質は、大腸菌 (*Escherichia coli*) などの原核細胞で発現さ

50

せてもよい。

【0281】

本発明の実施に好適な酵母及び真菌宿主細胞としては、限定はされないが、サッカロミセス・セレビスエ (*Saccharomyces cerevisiae*)、ピキア属 (*Pichia*) 又はクルイベロミセス属 (*Kluyveromyces*) 及びアスペルギルス属 (*Aspergillus*) の様々な種が挙げられる。酵母 *S. cerevisiae* で発現させるベクターの例としては、pYepSec1、pMFa、pJRY88、及びpYES2 (Invitrogen Corporation、サンディエゴ、CA) が挙げられる。酵母及び真菌の形質転換プロトコルは、当業者に周知である。

【0282】

本発明の実施に好適な哺乳類細胞としては、とりわけ、COS (例えば、ATCC 番号 CRL 1650 又は 1651)、BHK (例えば、ATCC 番号 CRL 6281)、CHO (ATCC 番号 CCL 61)、HeLa (例えば、ATCC 番号 CCL 2)、293 (ATCC 番号 1573)、NS-1細胞、NS0 (ATCC CRL-11177)、及びPer.C6 (登録商標) (Crucell、ライデン、オランダ) を挙げることができる。哺乳類細胞における発現を指図するのに好適な発現ベクターは、概して、プロモーター (例えば、ポリオーマ、アデノウイルス2、サイトメガロウイルス及びシミアンウイルス40などのウイルス性物質に由来するもの)、並びに他の転写及び翻訳制御配列を含む。哺乳類発現ベクターの例としては、pCDM8及びpMT2PCが挙げられる。

10

【0283】

本明細書に提供される教示を踏まえれば、適切なタイプの発現ベクターを植物、鳥類及び昆虫細胞に導入するためのプロモーター、ターミネーター及び方法も容易に達成することができる。例えば、一実施形態の範囲内において、本発明のタンパク質は、植物細胞から発現させてもよい。

20

【0284】

本発明の実施に好適な昆虫細胞としては、カイコガ属 (*Bombyx*)、トリコプルシア属 (*Trichoplusia*) 又はスポドプテラ属 (*Spodoptera*) の種からの細胞及び細胞株が挙げられる。培養昆虫細胞 (SF 9細胞) におけるタンパク質の発現に利用可能なバキュロウイルスベクターとしては、pAc系列及びpVL系列が挙げられる。

【0285】

代替的に、本発明のタンパク質は、ラット、ウサギ、ヒツジ及びブタなどの非ヒトトランスジェニック動物で発現させてもよい (米国特許第4,736,866号)。

30

【0286】

本発明のタンパク質は、固相合成又は均一溶液中での合成など、タンパク質化学において周知の技法を用いた化学合成によって調製されてもよい。

【0287】

タンパク質などの他の分子にコンジュゲートした本発明の抗体及びタンパク質を含むN末端又はC末端融合タンパク質 (例えば、イムノコンジュゲート) は、組換え技術を用いて融合することにより調製されてもよい。得られた融合タンパク質は、本明細書に記載されるとおりの選択のタンパク質若しくはマーカータンパク質、又はタグタンパク質に融合した本発明の抗体若しくはタンパク質を含有する。本発明の抗体及びタンパク質は、公知の技法によって他のタンパク質にコンジュゲートされてもよい。例えば、タンパク質は、国際公開第90/10457号に記載されるとおりのヘテロ二官能性チオール含有リンカー、N-スクシンイミジル-3-(2-ピリジルジチオプロピオン酸) 又はN-スクシンイミジル-5チオ酢酸を用いてカップリングされてもよい。融合タンパク質又はコンジュゲートの調製に使用し得るタンパク質の例としては、免疫グロブリン、ホルモン、成長因子、レクチン、インスリン、低密度リポタンパク質、グルカゴン、エンドルフィン、トランスフェリン、ボンベシン、アシアロ糖タンパク質、グルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST)、赤血球凝集素 (HA) 及びトランケート型 myc などの細胞結合タンパク質が挙げられる。

40

【0288】

50

上記で及び以下の実施例で更に詳細に考察するとおり、本発明者らは、本発明の抗体が血管新生に効果を及ぼすことを明らかにしている。従って、本発明の抗体（その融合タンパク質及びコンジュゲート、例えばイムノコンジュゲート等を含む）、CAR、核酸分子（前記核酸分子を含むベクター、特に発現ベクターを含む）及び免疫エフェクター細胞は、療法において有用性がある。従って、本発明の更なる態様は、以下を含む：

本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR（即ち、CARポリペプチド）、核酸分子（例えば、CARをコードするもの、例えば発現ベクター）又は免疫エフェクター細胞と、少なくとも1つの生理学的に許容可能な担体又は賦形剤とを含む組成物、特に治療用組成物又は医薬組成物、

療法、特に養子細胞移入療法に用いられる、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR（即ち、CARポリペプチド）、核酸分子（例えば、CARをコードするもの、例えば発現ベクター）若しくは免疫エフェクター細胞又は組成物、

CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態への対処に用いられる、例えば血管新生、詳細には腫瘍血管新生を阻害するための、例えば癌の治療に用いられる、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR（即ち、CARポリペプチド）、核酸分子（例えば、CARをコードするもの、例えば発現ベクター）若しくは免疫エフェクター細胞又は組成物、

CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態に対処する方法、例えば血管新生、詳細には腫瘍血管新生の阻害方法、例えば癌を治療する方法であって、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR（即ち、CARポリペプチド）、核酸分子（例えば、CARをコードするもの、例えば発現ベクター）、免疫エフェクター細胞又は組成物、特に有効量の前記抗体、CAR、核酸分子、細胞又は組成物を、それを必要とする対象に投与することを含む方法、及び

CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態に対処するための、例えば血管新生、詳細には腫瘍血管新生を阻害するための、例えば癌を治療するための医薬（又は組成物）の製造のための、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR（即ち、CARポリペプチド）、核酸分子（例えば、CARをコードするもの、例えば発現ベクター）又は免疫エフェクター細胞の使用。

【0289】

誤解を避けるため、本発明には、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR（即ち、CARポリペプチド）、核酸分子（例えば、CARをコードするもの、例えば発現ベクター）、免疫エフェクター細胞又は組成物をインビトロ又はエキソビボで組織又は細胞に投与することを含む、血管新生（例えば、腫瘍血管新生）を阻害するインビトロ又はエキソビボ方法も含まれることも理解されるであろう。細胞は、樹立細胞株であっても、又は個体から取り出された細胞であってもよい。組織又は細胞は、好ましくは哺乳類組織又は細胞（例えば、内皮組織又は細胞）であり、及び最も好ましくはヒト組織又は細胞である。方法がエキソビボ方法である場合、薬剤は、エキソビボで血管新生モデルに投与されてもよい。好適な血管新生アッセイとしては、内皮細胞増殖、遊走及び侵入アッセイ、スポンジアッセイ及び大動脈リングアッセイが挙げられる。更なる血管新生アッセイについては以下及び実施例に記載する。

【0290】

「対処する」により、その方法を用いて障害の症状を軽減し得る（即ち、その方法が対症療法的に用いられる）か、又は障害を治療し得るか、又は障害を予防し得る（即ち、その方法が予防的に用いられる）という意味が含まれる。

【0291】

CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態により、CLEC14Aを発現する細胞に関連する任意の疾患又は病態が含まれる。例えば、細胞は、不要な細胞であり得る。不要な細胞とは、宿主におけるその存在が望ましくない任意の細胞であり得る。従って、CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態とは、CLEC14Aを発現し且つ不要な細胞の存在によって特徴付けられる任意の病態、例えばCLEC14Aを発現するかかる不

10

20

30

40

50

要な細胞の存在によって病変の少なくとも一部が媒介される任意の生物学的又は医学的病態又は障害であるであり得る。病態は、不要な細胞の存在によって引き起こされることもあり、又は不要な細胞の存在が病態の影響であることもある。

【0292】

CLEC14Aの発現により、細胞上若しくは細胞内に又は細胞から調製された抽出物内にCLEC14Aタンパク質を検出することが可能であるか、又はCLEC14A mRNAの検出によってポリペプチドの発現を推測し得るという意味が含まれる。細胞におけるCLEC14Aの発現を確認するために種々のアッセイを実施し得る。かかるアッセイとしては、例えば、特定のタンパク質（即ち、CLEC14A）の存在を免疫学的手段（ELISA及びウエスタンブロット）によって検出するなど、当業者に周知の生化学アッセイ、又はノーザンブロッティング、RT-PCR及びPCRなど、CLEC14A mRNAの存在を検出するための当業者に周知の分子生物学アッセイが挙げられる。

10

【0293】

上述のとおり、本発明者らは、CLEC14Aが内皮細胞マーカーであることを見出し、従って、本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、免疫エフェクター細胞及び組成物が、不要であるか、望ましくないか又は不適切な血管新生が関わる任意の疾患又は病態への対処において特に有用となり得ることが理解されるであろう。かかる病態には、腫瘍/癌、乾癬、月経過多、子宮内膜症、関節炎（炎症性及びリウマチ性の両方）、黄斑変性症、パジェット病、網膜症及びその血管合併症（増殖性並びに未熟児のもの及び糖尿病性網膜症）、良性血管増殖、線維化、肥満症及び炎症が含まれる。

20

【0294】

用語「血管新生の阻害」は、血管新生の速度又はレベルを低減することを意味するものと意図される。低減は、血管新生の速度又はレベルの約10%、又は約20%、又は約30%、又は約40%の低レベルの低減であってもよい。好ましくは、低減は、血管新生の速度又はレベルの約50%、又は約60%、又は約70%、又は約80%の低減の中レベルの低減である。より好ましくは、低減は、血管新生の速度又はレベルの約90%、又は約95%、又は約99%、又は約99.9%の高レベルの低減である。最も好ましくは、阻害には、血管新生の消失又はその検出不能なレベルに至るまでの低減も含まれ得る。血管新生の速度又はレベルを決定する方法及びアッセイ、従って抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、免疫エフェクター細胞又は組成物が血管新生を阻害するかどうか、及びそれがどの程度であるかを決定する方法及びアッセイは、当該技術分野において公知であり、実施例を含め、本明細書に更に詳細に記載される。

30

【0295】

典型的には、阻害される血管新生は、腫瘍血管新生である。従って、個体は、腫瘍血管新生を阻害することによって治療し得る固形腫瘍を有してもよく、即ち、固形腫瘍は、新生血管の生成に関連する。用語「腫瘍」は、限定はされないが、乳房、卵巣、肝臓、膀胱、前立腺、腎臓、膵臓、胃、食道、肺及び甲状腺の腫瘍を含め、あらゆる形態の新生物性細胞成長を指すものと理解されるべきである。

【0296】

典型的には、腫瘍は、望ましくない新生血管構造形成に関連する。望ましくない新生血管構造形成を低減すると腫瘍の進行を止めることができ、腫瘍サイズ及び成長の臨床的に有用な低減につながり得る。従って、腫瘍血管新生の阻害は、腫瘍の治療、例えば腫瘍の（更なる）成長の防止、腫瘍の広がり（転移）の防止又は腫瘍サイズの低減に用いることができる。

40

【0297】

好ましくは、本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、免疫エフェクター細胞、方法及び組成物は、ヒトの治療に使用され、その場合、抗体、CAR、又は免疫エフェクター細胞は、ヒトCLEC14Aへの結合能を有し、又は核酸分子又は発現ベクターは、ヒトCLEC14Aへの結合能を有する抗体又はCARをコードする。しかしながら、本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、免疫エフェクター細胞、方法及び組成

50

物が非ヒト哺乳類の治療に使用されるものであるとき、抗体、CAR又は免疫エフェクター細胞が他の種からのCLEC14Aへの結合能を有する場合、又は核酸分子又は発現ベクターが、他の種からのCLEC14Aへの結合能を有する抗体又はCARをコードする場合は好ましいことは理解される。

【0298】

上記で考察したとおり、CLEC14Aは、特定の腫瘍細胞（例えば、内皮細胞）に発現し、本発明の抗体は、CLEC14A+細胞に局在化する。結果的に、本発明の抗体は、CLEC14A+細胞が存在する身体部位（例えば、腫瘍）を標的化することができ、そのため、抗体は、標的部位で作用することができる。詳細には、抗体が腫瘍血管のCLEC14A+内皮細胞に局在化する能力とは、本発明の抗体が、CLEC14A+腫瘍細胞が存在する身体部位を標的化することができ、そうして抗体が標的部位で作用することができることを意味する。

10

【0299】

実施例に示すとおり、本発明の抗体は、それ自体、即ちネイキッド抗体として、例えばCLEC14Aの機能又は活性を阻害、低減又は遮断することにより抗CLEC14A+細胞効果（例えば、血管新生の阻害効果又は抗癌効果）を有し得る。ネイキッド抗体として作用するこの能力は有利であり、従って一部の実施形態では、本発明の組成物、使用及び方法は、いかなる他の活性薬剤、例えば治療用活性薬剤にもコンジュゲートしていない本発明の抗体を利用する。

【0300】

血管新生阻害薬抗VEGFモノクローナル抗体ベバシズマブは、標準的な化学療法と併用して投与されるとき、幾つもの固形腫瘍について臨床転帰を改善することが公知である。用いられている併用としては、ベバシズマブとイリノテカン、フルオロウラシル及びロイコボリンとの併用、ベバシズマブとFOLFOX4（オキサリプラチン、5-フルオロウラシル及びロイコボリンのレジメン）との併用、ベバシズマブとパクリタキセルとの併用、及びベバシズマブとパクリタキセル及びカルボプラチンとの併用が挙げられる。

20

【0301】

従って、当業者であれば、本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、組成物及び免疫エフェクター細胞は、いかなる他の治療用薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）が存在しなくても臨床的に有効であり得るが、本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、組成物及び免疫エフェクター細胞を更なる治療用薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）と併せて投与することが有利であり得ることを理解するであろう。

30

【0302】

従って、本発明の更なる実施形態において、本方法は、少なくとも1つの更なる又は追加的な治療用薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）を個体に投与することも含み得る。本方法は、抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター又は免疫エフェクター細胞と、更なる治療用薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）とを含有する医薬組成物を個体に投与することを含み得る。しかしながら、本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、組成物又は免疫エフェクター細胞と、更なる治療用薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）とは別個に、例えば別個の投与経路によって投与されてもよいことは理解される。加えて、本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、組成物又は免疫エフェクター細胞と、少なくとも1つの更なる治療用薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）とは、逐次的に又は（実質的に）同時に投与することができる。それらは、同じ医薬製剤中又は医薬中であって投与されてもよく、又はそれらは別個に製剤化され、投与されてもよい。

40

【0303】

詳細な実施形態において、本発明は、CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態に対処する方法、例えば血管新生、詳細には腫瘍血管新生の阻害方法、例えば癌を治療する方法を提供し、前記方法は、それを必要とする対象に対し、本明細書に定義するのとおり

50

本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、免疫エフェクター細胞又は組成物、特に有効量の前記抗体、細胞又は組成物を投与することと、1つ以上の追加的な活性（例えば、療法用）薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）とを別個に、同時に又は逐次的に投与することを含む。

【0304】

別の見方をすれば、CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態への対処に用いられる、例えば血管新生、特に腫瘍血管新生の阻害に用いられる、例えば癌の治療に用いられる1つ以上の追加的な活性（例えば、療法用）薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）と併用して使用される本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、免疫エフェクター細胞又は組成物が提供される。

10

【0305】

従って、CLEC14Aの発現に関連する疾患又は病態に対処するための、例えば血管新生、詳細には腫瘍血管新生を阻害するための、例えば癌を治療するための1つ以上の追加的な活性薬剤（例えば、療法用）薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）と併用して使用される医薬の製造における、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター又は免疫エフェクター細胞の使用が提供される。

【0306】

従って、一実施形態において本医薬は、1つ以上の追加的な活性（例えば、療法用）薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）を更に含んでもよい。

【0307】

本医薬は、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター又は免疫エフェクター細胞と、1つ以上の追加的な活性（例えば、療法用）薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）との両方を含む単一の組成物の形態であってもよく、又はこれは、それらを別個に（例えば、同時に又は逐次的に）投与するように含むキット又は製品の形態であってもよい。

20

【0308】

一部の実施形態において、更なる療法用薬剤は、抗癌剤である。更なる抗癌剤は、メクロレタミン（HN₂）、シクロホスファミド、イホスファミド、メルファラン（L-サルコリシン）及びクロラムブシルなどのナイトロジェンマスタード類；ヘキサメチルメラミン、チオテパなどのエチレンイミン類及びメチルメラミン類；ブスルファンなどのスルホン酸アルキル類；カルムスチン（BCNU）、ロムスチン（CCNU）、セムスチン（メチル-CCNU）及びストレプトゾシン（ストレプトゾトシン）などのニトロソウレア類；及びデカルバジン（decarbazine）（DTIC；ジメチルトリアゼノイミダゾールカルボキサミド）などのトリアゼン類を含めたアルキル化剤；メトトレキサート（アメトプテリン）などの葉酸類似体；フルオロウラシル（5-フルオロウラシル；5-FU）、フロクスウリジン（フルオロデオキシウリジン；FdR）及びシタラビン（シトシンアラビノシド）などのピリミジン類似体；及びメルカプトプリン（6-メルカプトプリン；6-MP）、チオグアニン（6-チオグアニン；TG）及びペントスタチン（2'-デオキシコホルマイシン）などのプリン類似体及び関連阻害薬を含めた代謝拮抗薬；ビンブラスチン（VLB）及びピンクリスチンなどのピンカルカロイド；エトポシド及びテニポシドなどのエピポドフィロトキシン類；ダクチノマイシン（アクチノマイシンD）、ダウノルピシン（ダウノマイシン；ルビドマイシン）、ドキシソルピシン、プレオマイシン、プリカマイシン（ミトラマイシン）及びマイトマイシン（マイトマイシンC）などの抗生物質；L-アスパラギナーゼなどの酵素；及びインターフェロンアルフェノム（interferon alfa）などの生物学的反応修飾物質を含めた天然産物；シスプラチン（cis-DDP）及びカルボプラチンなどの白金配位錯体；ミトキサントロン及びアントラサイクリンなどのアントラセンジオン；ヒドロキシウレアなどの置換尿素；プロカルバジン（N-メチルヒドラジン、MIH）などのメチルヒドラジン誘導体；及びミトタン（o,p'-DDD）及びアミノグルテチミドなどの副腎皮質抑制薬を含めた他の薬剤；タキソール及び類似体/誘導体；細胞周期阻害薬；ボルテゾミブ（Velcade（登録商標））などのプロテオ

30

40

50

ソーム阻害薬；イマチニブ（Glivec（登録商標））などのシグナルトランスダクターゼ（signal transductase）（例えば、チロシンキナーゼ）阻害薬、COX-2阻害薬、並びにフルタミド及びタモキシフェンなどのホルモン作動薬／拮抗薬から選択され得る。

【0309】

臨床で用いられている抗癌剤は、典型的には作用機序によって分類される：アルキル化剤、トポイソメラーゼI阻害薬、トポイソメラーゼII阻害薬、RNA/DNA代謝拮抗薬、DNA代謝拮抗薬及び抗有糸分裂剤。米国NIH/国立癌研究所のウェブサイトは、122個の化合物を挙げており（http://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/searches/standard_mechanism.html）、その全てを本発明の抗体、組成物又は免疫エフェクター細胞と併せて使用し得る。それらには、アサレイ（Asaley）、AZQ、BCNU、ブスルファン、カルボキシフタラート白金（carboxyphthalatoplatinum）、CBDA、CCNU、CHIP、クロラムブシル、クロロゾトシン、シスプラチナム、クロメソン、シアノモルホリノドキシソルピシン、シクロジソン、ジアンヒドロガラクトール、フルオロドパン（flurodopan）、ヘブスルファム、ヒカントン、メルファラン、メチルCCNU、マイトマイシンC、ミトゾラミド（mitozolamide）、ナイトロジェンマスタード、PCNU、ピペラジン、ピペラジンジオン、ピポプロマン、ポルフィロマイシン、スピロヒダントインマスタード、テロキシロン、テトラプラチン、ピコプラチン（SP-4-3）（cis-アミンジクロロ（2-メチルピリジン）Pt（II））、チオテパ、トリエチレンメラミン、ウラシルナイトロジェンマスタード、Yoshi-864を含めたアルキル化剤；アロコルヒチン、ハリコンドリンB、コルヒチン、コルヒチン誘導体、ドラスタチン10、メイトンシン、リゾキシソル、タキソール、タキソール誘導体、チオコルヒチン、トリチルシステイン、硫酸ピンブラスチン、硫酸ピンクリスチンを含めた抗有糸分裂剤；カンプトテシン、カンプトテシンNa塩、アミノカンプトテシン、20種のカンプトテシン誘導体、モルホリノドキシソルピシンを含めたトポイソメラーゼI阻害薬；ドキシソルピシン、アモナファイド、m-AMSA、アントラピラゾール誘導体、ピラゾロアクリジン、ピサントレンHCL、ダウノルピシン、デオキシドキシソルピシン、ミトキサントロン、メノガリル、N,N-ジベンジルダウノマイシン、オキサントラゾール、ルビダゾン、VM-26、VP-16を含めたトポイソメラーゼII阻害薬；L-アラノシン、5-アザシチジン、5-フルオロウラシル、アシピシン、3種のアミノプテリン誘導体、アンチフォール、ベーカーズ可溶性アンチフォール、ジクロルアリルローソン（dichlorallyl lawsone）、プレキナル、フトラフル（プロドラッグ）、5,6-ジヒドロ-5-アザシチジン、メトトレキサート、メトトレキサート誘導体、N-（ホスホノアセチル）-L-アスパラギン酸（PALA）、ピラゾフリン、トリメトトレキサートを含めたRNA/DNA代謝拮抗薬；3-HP、2'-デオキシ-5-フルオロウリジン、5-HP、-TGDR、グリシン酸アフィディコリン、ara-C、5-アザ-2'-デオキシシチジン、-TGDR、シクロシチジン、グアナゾール、ヒドロキシウレア、イノシングリコジアルデヒド、マクベシンII、ピラゾロイミダゾール、チオグアニン及びチオプリンを含めたDNA代謝拮抗薬が含まれる。

【0310】

一部の好ましい実施形態では、少なくとも1つの更なる抗癌剤は、シスプラチン；カルボプラチン；ピコプラチン；5-フルオロウラシル（5-fluorouracil）；パクリタキセル；マイトマイシンC；ドキシソルピシン；ゲムシタピン；トムデックス；ペメトトレキサド；メトトレキサート；イリノテカン、フルオロウラシル及びロイコボリン；オキサリプラチン、5-フルオロウラシル及びロイコボリン；並びにパクリタキセル及びカルボプラチンから選択される。

【0311】

更なる抗癌剤が特定の腫瘍型に特に有効であることが示されている場合、本発明の抗体、CAR、核酸分子、発現ベクター、組成物又は免疫エフェクター細胞がその更なる抗癌剤と併用してその特定の腫瘍型の治療に使用されることが好ましい場合もある。

【0312】

10

20

30

40

50

一部の実施形態において、抗血管新生化合物は、以下のいずれか1つから選択され得る：ベパシズマブ（Avastin（登録商標））；イトラコナゾール；カルボキシアミドトリアゾール；TNP-470（フマギリンの類似体）；CM101；IFN- γ ；IL-12；血小板因子4；スラミン；SU5416；トロネボスポンジン；VEGFR拮抗薬；血管新生抑制ステロイド+ヘパリン；軟骨由来血管新生阻害因子；マトリックスメタロプロテアーゼ阻害薬；アンジオスタチン；エンドスタチン；2-メトキシエストラジオール；テコガラシ；テトラチオモリブデート；サリドマイド；プロラクチン；VEGFR3阻害薬；リノミド；タスキニモド；ラニビズマブ；ソラフェニブ；（Nexavar（登録商標））；スニチニブ（Sutent（登録商標））；パゾパニブ（Votrient（登録商標））；及びエペロリムス（Afinitor（登録商標））。

10

【0313】

一部の実施形態において、更なる治療用薬剤は、特に本発明の免疫エフェクター細胞と併用して使用される免疫チェックポイント阻害薬であってもよい。かかる阻害薬は、概して、免疫細胞と標的細胞（例えば、腫瘍細胞）との間の相互作用（この相互作用は、免疫細胞の刺激を妨げるか又は下方制御する）を遮断することによって機能する。詳細には、チェックポイント阻害薬は、T細胞上に発現するタンパク質と腫瘍細胞上に発現するタンパク質との間の相互作用（この相互作用はT細胞の刺激を妨げるか又は低減し得る）を妨げるか又は低減する。チェックポイント阻害薬は、例えばPD1とPDL1との間の相互作用を妨げてよく、詳細にはPD1に結合する薬剤で構成されてもよい。代替的に、チェックポイント阻害薬は、CTLA-4に結合してもよい。かかるチェックポイント阻害薬は、当該技術分野において周知であり、ペンブロリズマブ（Pembrolizumab）、ニボルマブ又はイピリムマブなどのモノクローナル抗体が含まれる。

20

【0314】

更なる活性薬剤は、スフィンゴシン-1-リン酸アゴニスト、例えばFTY720であってもよく、これは、スフィンゴシン-1リン酸受容体からのシグナルを遮断することによってリンパ系器官におけるリンパ球を隔離する能力を有する。このように、かかる化合物は、IL-7及びIL-15などのサイトカインに関する競合を制限することができ、従って投与された免疫エフェクター細胞の高い増殖を可能にし得る。詳細には、かかる化合物は本発明の核酸、発現ベクター、CAR又は免疫エフェクター細胞より前、例えば少なくとも12時間、24時間、36時間又は48時間前に投与されてもよい。

30

【0315】

代替的に又は追加的に、本発明の抗体は、本明細書に記載されるとおりの追加的な治療用分子、例えば毒素又は他の抗癌分子又は抗血管新生剤とコンジュゲートされているために抗CLEC14A+細胞効果（例えば、血管新生の阻害効果又は抗癌効果）を有し得る。

【0316】

これに関して、実施例に示すとおり、本発明の一部の抗体は、それが結合した状態になる細胞にインターナライズされる能力を有する。従って、本発明の一部の実施形態において、抗体は、インターナライズされる能力を有する。抗体分子に付加された任意の他の薬剤が抗体分子と共にインターナライズされるはずであるため、この特性は、イムノコンジュゲートにおける使用に特に有利であり得る。他の実施形態では、有意なインターナライゼーションは見られない。

40

【0317】

従って、更なる実施形態において、本発明は、抗体又は断片が少なくとも1つの他の治療用又は診断用薬剤に作動可能に付加されている様々なコンジュゲート抗体及びその断片（本明細書に定義するとおり）を提供する。用語「イムノコンジュゲート」は、抗体（その断片を含む）と別の有効な薬剤との作動可能な会合を定義して広義に用いられ、いかなる特定のタイプの作動可能な会合にも限定されることは意図されず、特に化学的「コンジュゲーション」に限定されない。組換え融合タンパク質が特に企図される。送達剤又はターゲティング剤が標的に結合可能であり、且つ送達時に治療用又は診断用薬剤が十分に機

50

能性である限り、その付加方法は好適であろう。

【0318】

従って、一部の実施形態において、本発明の抗体は、イムノコンジュゲートであってもよく、及び/又は本明細書に定義される方法、組成物及び使用において用いられる本発明の抗体は、イムノコンジュゲート、即ち追加的な治療用分子、例えば毒素又は他の抗癌分子又は抗血管新生剤、又は診断用分子にコンジュゲートした（即ち、カップリング、付加又は連結された）抗体である。

【0319】

癌療法などのための抗体-薬物コンジュゲート（ADC）については、Carter & Senter (2008), *Cancer J.* 14(3): 154-69及びChari et al (2014) *Angewandte Chemie International Edition* 53: 3751（参照により本明細書に援用される）によってレビューされており、本発明のイムノコンジュゲートがかかる抗体-薬物コンジュゲートを含むと見なされ得ることが理解されるであろう（米国特許第5,773,001号；米国特許第5,767,285号；米国特許第5,739,116号；米国特許第5,693,762号；米国特許第5,585,089号；米国特許出願公開第2006/0088522号；米国特許出願公開第2011/0008840号；米国特許第7,659,241号；Hughes (2010) *Nat Drug Discov* 9: 665, Lash (2010); *In vivo: The Business & Medicine Report* 32-38; Mahato et al (2011) *Adv Drug Deliv Rev* 63: 659; Jeffrey et al (2006) *BMCL* 16: 358; *Drugs R D* 11(1): 85-95も参照されたい）。ADCは、概して、腫瘍細胞上に存在する標的に対するモノクローナル抗体、細胞傷害性薬物及び抗体を薬物に付加させるリンカーを含む。

10

20

【0320】

従って、更なる態様において本発明は、本発明の抗体と細胞傷害性部分とを含むイムノコンジュゲート（例えば、抗体-薬物コンジュゲート）を提供する。

【0321】

細胞傷害性部分は、新生血管構造の細胞又は新生血管構造に近接した且つそれに関連する細胞にとって直接的又は間接的に毒性であり得る。「直接的に細胞傷害性である」により、その部分がそのまま細胞傷害性のものであるという意味が含まれる。「間接的に細胞傷害性である」により、その部分が、それ自体は細胞傷害性でないが、例えば更なる分子に対するその作用によるか、又はそれに対する更なる作用によって細胞傷害性を誘導し得るものであるという意味が含まれる。例えば、間接的に細胞傷害性の部分は、免疫細胞（例えば、細胞傷害性T細胞などの細胞傷害性免疫細胞）を動員するように作用して、それにより細胞傷害効果を間接的に誘導する。

30

【0322】

典型的には、細胞傷害性部分は、直接的に細胞傷害性の化学療法剤、直接的に細胞傷害性のポリペプチド、プロドラッグを細胞傷害性薬物に変換可能な部分、放射線増感剤、直接的に細胞傷害性の核酸、直接的若しくは間接的に細胞傷害性のポリペプチドをコードする核酸分子又は放射性原子から選択される。かかる細胞傷害性部分の例、並びに抗体と細胞傷害性部分とを含むコンジュゲートの作製方法は、国際公開第02/36771号、国際公開第2004/046191号及び国際公開第2011/027132号（参照により本明細書に援用される）に提供されている。

40

【0323】

一部の実施形態において、細胞傷害性部分は、細胞傷害性化学療法剤である。抗癌剤など、細胞傷害性化学療法剤は、当該技術分野において周知であり、上記に記載されるものが挙げられる。

【0324】

これまでに細胞傷害性化学療法剤などの上述の様々な細胞傷害性部分が抗体及び他のターゲティング剤に付加されており、従って、これらの薬剤を含む本発明のイムノコンジュゲートは、当業者が容易に作製し得る。例えば、カルボジイミドコンジュゲーション（Baminger & Wilchek (1980) *Methods Enzymol.* 70, 151-159）を用いて、ドキシソルピシン

50

を含めた種々の薬剤を抗体にコンジュゲートし得る。細胞傷害性部分を抗体にコンジュゲートするための他の方法も用いることができる。例えば、適切な反応物の過ヨウ素酸ナトリウム酸化と、続く還元的アルキル化とを用いることができ、同様にグルタルアルデヒド架橋法も用いることができる。ポリペプチドの架橋方法は、当該技術分野において公知であり、国際公開第2004/046191号に記載されている。しかしながら、本発明の化合物の作製にいずれの方法を選択するかに関わらず、抗体がそのターゲティング能力を維持していること、及び付加された部分とその関連機能を維持していることを決定しなければならないことが認識されている。

【0325】

本発明の一部の実施形態において、細胞傷害性部分は、本発明者らが細胞死につながる任意の部分を含むものとする細胞傷害性ペプチド又はポリペプチド部分であってもよい。細胞傷害性ペプチド及びポリペプチド部分は、当該技術分野において周知であり、例えば、リシン、アブリン、シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 外毒素、組織因子などが挙げられる。これらを抗体などのターゲティング部分に連結する方法も当該技術分野において公知であり、例えば、従来ポリペプチド架橋方法及び組換えDNA技法を用いた融合ポリペプチドとしての化合物の作製が挙げられる。細胞傷害性薬剤としてのリシンの使用は、Burrows & Thorpe (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 8996-9000に記載され、及び腫瘍の局所的血液凝固及び梗塞につながる組織因子の使用は、Ran et al (1998) *Cancer Res.* 58, 4646-4653及びHuang et al (1997) *Science* 275, 547-550によって記載されている。Tsai et al (1995) *Dis. Colon Rectum* 38, 1067-1074は、モノクローナル抗体にコンジュゲートされたアブリンA鎖について記載している。他のリボソーム不活性化タンパク質は、国際公開第96/06641号に細胞傷害性薬剤として記載されている。シュードモナス属 (*Pseudomonas*) 外毒素も細胞傷害性ポリペプチド部分として使用し得る (Aiello et al (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 10457-10461)。

【0326】

TNF、INF及びIL-2など、特定のサイトカインも細胞傷害性薬剤として有用であり得る。

【0327】

特定の放射性原子も、十分な線量が送達される場合に細胞傷害性であり得る。従って、一部の実施形態において細胞傷害性部分は、使用時に細胞傷害性となるのに十分な量の放射活性を標的部位に送達する放射性原子を含んでもよい。好適な放射性原子としては、リン-32、ヨウ素-125、ヨウ素-131、インジウム-111、レニウム-186、レニウム-188又はイットリウム-90、又は隣接する細胞、細胞小器官若しくは核酸を破壊するのに十分なエネルギーを放出する任意の他の同位体が挙げられる。好ましくは、本発明の化合物における同位体及び放射性原子密度は、標的部位、好ましくは標的部位にある細胞及びその細胞小器官、特に核に4000 cGy (好ましくは少なくとも6000、8000又は10000 cGy) より高い線量が送達されるようなものである。

【0328】

放射性原子は、公知の方法で抗体に付加し得る。例えば、EDTA又は別のキレート剤を抗体に付加し、それを用いて ^{111}In 又は ^{90}Y を付加してもよい。チロシン残基を ^{125}I 又は ^{131}I で標識してもよい。

【0329】

一部の実施形態において、細胞傷害性部分は、放射線増感剤であってもよい。放射線増感剤としては、フルオロピリミジン類、チミジン類似体、ヒドロキシウレア、ゲムシタピン、フルダラビン、ニコチンアミド、ハロゲン化ピリミジン類、3-アミノベンズアミド、3-アミノベンゾジアミド (3-aminobenzodiamide)、エタニクサドール (etanixadole)、ピモニダゾール及びミソナダゾールが挙げられる (例えば、McGinn et al (1996) *J. Natl. Cancer Inst.* 88, 1193-11203; Shewach & Lawrence (1996) *Invest. New Drugs* 14, 257-263; Horsman (1995) *Acta Oncol.* 34, 571-587; Shenoy & Singh (1992) *Clin. Invest.* 10, 533-551; Mitchell et al (1989) *Int. J. Radiat. Biol.* 56, 827-836; I

liakis & Kurtzman (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 1235-1241 ; Brown (1989) *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 16, 987-993 ; Brown (1985) *Cancer* 55, 2222-2228を参照されたい)。

【 0 3 3 0 】

一部の実施形態において細胞傷害性部分は、組織因子の細胞外ドメインなど、凝血促進因子であってもよい (Rippmann et al (2000) "Fusion of the tissue factor extracellular domain to a tumour stroma specific single-chain fragment variable antibody results in an antigen-specific coagulation-promoting molecule." *Biochem J.* 349: 805-12; Huang et al (1997) "Tumor infarction in mice by antibody-directed targeting of tissue factor to tumor vasculature." *Science.* 275(5299): 547-550.

10

【 0 3 3 1 】

一部の実施形態において、細胞傷害性部分は、間接的に細胞傷害性のポリペプチドであってもよい。特に好ましい実施形態において、間接的に細胞傷害性のポリペプチドは、酵素活性を有し、且つ比較的非毒性のプロドラッグを細胞傷害性薬物に変換することのできるポリペプチドである。ターゲティング部分が抗体である場合、この種のシステムは、A D E P T (抗体指向性酵素プロドラッグ療法) と称されることが多い。このシステムは、ターゲティング部分が酵素部分を患者の体内の所望の部位 (例えば、腫瘍に関連する新生血管組織の部位) に置き、及び酵素がその部位に局在化する時間を与えた後、酵素の基質であるプロドラッグを投与して、触媒作用の最終産物が細胞傷害性化合物となることが必要である。この手法の目的は、所望の部位における薬物濃度を最大化し、及び正常組織における薬物濃度を最小限に抑えることである (Senter et al (1988) "Anti-tumor effects of antibody-alkaline phosphatase conjugates in combination with etoposide phosphate" *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 4842-4846 ; Bagshawe (1987) *Br. J. Cancer* 56, 531-2 ; 及び Bagshawe, et al (1988) "A cytotoxic agent can be generated selectively at cancer sites" *Br. J. Cancer.* 58, 700-703) ; Bagshawe (1995) *Drug Dev. Res.* 34, 220-230及び国際公開第 2 0 0 4 / 0 4 6 1 9 1 号が、本発明との関連において好適であり得る様々な酵素 / プロドラッグの組み合わせについて記載している。

20

【 0 3 3 2 】

典型的には、プロドラッグは、細胞傷害性薬物と比べて比較的非毒性である。典型的には、プロドラッグは、好適なインビトロ細胞毒性試験で計測したときに 1 0 % 未満の毒性、好ましくは 1 % 未満の毒性を有する。

30

【 0 3 3 3 】

用語「プロドラッグ」は、本願において使用されるとき、親薬物と比較して活性が低く、且つ酵素的に活性化され又はより高活性の親形態に変換されることが可能な前駆体又は誘導体形態の薬学的に活性な物質を指す (例えば、D. E. V. Wilman "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" *Biochemical Society Transactions* 14, 375-382 (615th Meeting, Belfast 1986) 及び V. J. Stella et al. "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery" *Directed Drug Delivery* R. Borchardt et al (ed.) pages 247-267 (Human a Press 1985)を参照されたい)。

【 0 3 3 4 】

プロドラッグを細胞傷害性薬物に変換することが可能な部分は、化合物の残りの部分から分離された状態で活性であると思われるが、それが活性である必要があるのは、(a) それが化合物の残りの部分と組み合わせになったとき、及び (b) 化合物が標的細胞に付着するか、隣接するか又はインターナライズされたときのみである。

40

【 0 3 3 5 】

細胞傷害性部分は、照射時に細胞傷害性になるもの又は細胞傷害性部分を放出するものであってもよい。例えば、ホウ素 - 1 0 同位体は、適切に照射されると細胞傷害性の粒子を放出する (米国特許第 4 , 3 4 8 , 3 7 6 号 ; Primus et al (1996) *Bioconjug. Chem.* 7: 532-535)。

【 0 3 3 6 】

50

同様に、細胞傷害性部分は、フォトリンなどの光線力学療法において有用なものであってもよい（例えば、Dougherty et al (1998) J. Natl. Cancer Inst. 90, 889-905を参照されたい）。

【0337】

一部の実施形態において細胞傷害性部分は、細胞傷害性免疫細胞（例えば、T細胞）などの免疫細胞に特異的に結合するものなどの抗体である。従って、この場合、本発明の化合物は、非対称IgG様抗体（例えば、トリオマブ（triomab）/クアドローマ、Trion Pharma/Fresenius Biotech；ノブ・イントゥ・ホール、Genentech；Cross MAb、Roche；静電的にマッチした抗体、AMGEN；LUZ-Y、Genentech；鎖交換操作ドメイン（SEED）ボディ、EMD Serono；biologic、erus；及びFab交換抗体、Genmab）、対称IgG様抗体（例えば、デュアルターゲティング（DT）-Ig、GSK/Domantis；ツークインワン抗体、Genentech；架橋MAb、karmanos cancer center；mAb<2>、F-star；及びCovXボディ、CovX/Pfizer）、IgG融合物（例えば、デュアル可変ドメイン（DVD）-Ig、Abbott；IgG様二重特異性抗体、Eli Lilly；Ts2Ab、Medimmune/AZ；BsAb、Zymo Genetics；HERCULES、Biogen Idee；TvAb、Roche）Fc融合物（例えば、ScFv/Fc融合物、Academic Institution；SCORPION、Emergent BioSolutions/Trubion、Zymo Genetics/BMS；二重親和性リターゲティング技術（Fc-DART）、MacroGenics；デュアル（ScFv）²-Fab、National Research Center for Antibody Medicine）Fab融合物（例えば、F（ab）₂、Medarex/AMGEN；二重作用又はBis-Fab、Genentech；ドック・アンド・ロック（DNL）、ImmunoMedics；二価二重特異性、Biotechnol；及びFab-Fv、UCB-Celltech）、ScFvベース及びダイアボディベースの抗体（例えば、二重特異性T細胞エンゲイジャー（BiTE）、Micromet；タンデムダイアボディ（Tandab）、Affimed；DART、MacroGenics；単鎖ダイアボディ、Academic；TCR様抗体、AIT、Receptor Logics；ヒト血清アルブミンScFv融合物、Merrimack；及びCOMBODIES、Epigen Biotech）、IgG/非IgG融合物（例えば、イムノサイトカイン、EMDSerono、Philogen、ImmunGene、ImmunoMedics；スーパー抗原融合タンパク質、Active Biotech；及び免疫動員性抗腫瘍mTCR、ImmTAC）及びオリゴクローナル抗体（例えば、Symphogen及びMerus）であってもよい。

10

20

【0338】

一部の実施形態において、細胞傷害性部分は、ピロロベンゾジアゼピン二量体（PBD）である。PBDは、インピボで広域の抗腫瘍活性を有することが示されている強力な抗癌剤である。このような薬物は、DNAの副溝に結合して、細胞による認識及び修復が困難となる方法で2つのDNA鎖を一体に連結することにより、その活性を発揮する。従って、一部の実施形態において、本発明のイムノコンジュゲートは、PBDを含む本発明の抗体であってもよい。PBDに関する更なる情報は、Hartley et al, 2012 (Invest New Drugs 30: 950-958)を参照することができる。

30

【0339】

上記で考察したとおり、一部の実施形態において、本発明のイムノコンジュゲートは、本発明の抗体と細胞傷害性ポリペプチドとを含む融合タンパク質/ポリペプチドであってもよい。従って、更なる実施形態において本発明は、本発明のイムノコンジュゲート、例えば本発明の抗体と細胞傷害性ポリペプチドとを含む融合タンパク質/ポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。

40

【0340】

従って、別の見方をすれば、本発明は、細胞傷害性薬剤を対象の体内の新生血管構造にターゲティングする方法であって、本発明のイムノコンジュゲート（例えば、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートした本発明の抗体）を対象に投与することを含む方法を提供すると見られることもできる。好ましくは、新生血管構造は、腫瘍新生血管構造である。

【0341】

従って、本発明の更なる態様は、細胞傷害性薬剤を対象の体内の新生血管構造（例えば、腫瘍新生血管構造）にターゲティングするのに用いられる本発明のイムノコンジュゲート

50

ト（例えば、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートした本発明の抗体）を含む。

【0342】

従って、本発明の更なる態様は、細胞傷害性薬剤を対象の体内の新生血管構造（例えば、腫瘍新生血管構造）にターゲティングするための医薬の調製又は製造における本発明のイムノコンジュゲート（例えば、細胞傷害性薬剤にコンジュゲートした本発明の抗体）の使用を含む。

【0343】

当業者であれば、細胞傷害性薬剤を新生血管構造にターゲティングすれば、血管新生を阻害するように作用し得ることを理解するであろう。従って、上記に記載される治療的方法及び使用において本発明のイムノコンジュゲートを使用し得ることは明らかである。また、本発明のイムノコンジュゲートは、いかなる他の治療用薬剤（例えば、抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤）がない場合にも臨床的に有効であり得るが、それにも関わらず、上記に記載したとおり、イムノコンジュゲートを更なる抗癌及び/又は抗血管新生化合物/薬剤と併せて（別個に、逐次的に又は後に）投与することが有利となり得ることも理解されるであろう。

【0344】

本発明の抗体は、CLEC14Aに結合する。従って、本発明の抗体は、インビボ又はインビトロでのCLEC14Aの検出、詳細にはCLEC14A+細胞の検出に使用することができる。例えば、CLEC14Aが特定の腫瘍細胞で発現することに伴い、本発明の抗体は、特に検出可能部分にコンジュゲートした（カップリング、付加又は連結した）とき、インビボ又はインビトロでの腫瘍細胞の検出に使用することができる。

【0345】

従って、更なる実施形態において、本発明は、本発明の抗体と検出可能部分とを含むイムノコンジュゲートを提供する。かかる化合物を適切な検出方法と組み合わせるにより、対象のCLEC14A、特にCLEC14A+細胞の位置を検出することができ、従って対象の血管新生（例えば、腫瘍血管新生）の部位及び範囲、並びに対象の血管新生（例えば、腫瘍血管新生）の阻害を同定することができる。

【0346】

別の見方をすれば、本発明は、検出可能なシグナルを直接的又は間接的に生じる標識（検出可能部分）に付加された本発明の抗体を含む診断用又はイメージング用薬剤を提供する。

【0347】

一部の実施形態において、本発明のイムノコンジュゲートは、本発明の抗体と、ポリペプチド（例えば、直接シグナルを与えるものであるか、又は検出可能なシグナルを発生させるか若しくは生成するために使用し得るポリペプチド）を含む検出可能部分とを含む融合タンパク質/ポリペプチドであってもよい。従って、更なる実施形態において、本発明は、本発明のイムノコンジュゲート、例えば本発明の抗体と、ポリペプチドを含む検出可能部分とを含む融合タンパク質/ポリペプチドをコードする核酸分子を提供する。

【0348】

「検出可能部分」により、その部分が、本発明の化合物を患者に投与した後に標的部に位置するとき、典型的には体外から非侵襲的に検出し、及び標的の部位を位置付け得るものであるという意味が含まれる。従って、本発明のイムノコンジュゲートは、以下に更に記載するとおり、イメージング及び診断、特に固形腫瘍の新生血管構造のイメージング及び診断にも有用であり得る。

【0349】

一部の実施形態において、検出可能部分は、磁性ナノ粒子、放射性核種又はフルオロフォアであるか、又はそれを含む。

【0350】

従って、一部の実施形態において、検出可能部分は、イメージングに有用な放射性原子であってもよい。好適な放射性原子としては、シンチグラフィ検査用のテクネチウム⁹

10

20

30

40

50

^{99m}Tc又はヨウ素¹²³Iが挙げられる。他に、ヨウ素¹²⁴I；ヨウ素¹²⁵I；ヨウ素¹²⁶I；ヨウ素¹³¹I；ヨウ素¹³³I；インジウム¹¹¹In；インジウム^{113m}In、フッ素¹⁸F；フッ素¹⁹F；炭素¹¹C；炭素¹³C；銅⁶⁴Cu；銅⁶⁷Cu；窒素¹³N；窒素¹⁵N；酸素¹⁵O；酸素¹⁷O；ヒ素⁷²Bi；ガドリニウム；マンガン；鉄；重水素；トリチウム；イットリウム⁸⁶Y；ジルコニウム⁸⁹Zr；臭素⁷⁷Br、ガリウム⁶⁷Ga；ガリウム⁶⁸Ga、ルテニウム⁹⁵Tc、ルテニウム⁹⁷Tc、ルテニウム¹⁰³Tc、ルテニウム¹⁰⁵Tc、水銀¹⁰⁷Hg、レニウム^{99m}Tc、レニウム¹⁰¹Tc、レニウム¹⁰⁵Tc、スカンジウム⁴⁷Tiからなる群から選択されてもよい。当該技術分野において公知のとおり、かかる放射性同位体を抗体に直接又はEDTA若しくはDTPAなどのキレート剤を介してカップリングする好適な方法を用いることができる。

10

【0351】

一部の実施形態において、検出可能部分としては、ビスマス（III）、金（III）、ランタン（III）又は鉛（II）などのX線検出可能な化合物；ガリウム⁶⁷Ga、ガリウム⁶⁸Ga、水銀¹⁹⁷Hg、水銀²⁰³Hg、レニウム¹⁸⁶Tc、レニウム¹⁸⁸Tc、ルビジウム⁹⁷Rb、ルビジウム¹⁰³Rb、又はイットリウム⁹⁰Yなどの放射性イオン；コバルト（II）、銅（II）、クロム（III）、ジスプロシウム（III）、エルビウム（III）、ガドリニウム（III）、ホルミウム（III）、鉄（II）、鉄（III）、マンガン（II）、ネオジム（III）、ニッケル（II）、サマリウム（III）、テルビウム（III）、バナジウム（II）又はイッテルビウム（III）などの核磁気スピン共鳴同位体；又はローダミン又はフルオレセインが挙げられる。

20

【0352】

他の使用し得る容易に検出可能部分としては、例えば、ヨウ素¹²³I、ヨウ素¹³¹I、インジウム¹¹¹In、フッ素¹⁹F、炭素¹³C、窒素¹⁵N、酸素¹⁷O、ガドリニウム、マンガン又は鉄などの磁気共鳴画像法（MRI）用のスピン標識が挙げられる。

【0353】

放射性標識又は他の標識は、公知の方法で化合物に取り込み得る。例えば、化学的アミノ酸合成によって抗体が生合成又は合成される場合、例えば水素の代わりにフッ素¹⁹Fを含む好適なアミノ酸前駆体を使用する。^{99m}Tc、¹²³I、¹⁸⁶Rh、¹⁸⁸Rh及び¹¹¹Inなどの標識は、例えば抗体のシステイン残基を介して付加することができる。イットリウム⁹⁰Yは、リジン残基を介して付加することができる。IODOGEN法（Fraker et al (1978) Biochem. Biophys. Res. Comm. 80, 49-57）を用いてヨウ素¹²³Iを取り込むことができる。参考文献（“Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy”, J.F. Chatal, CRC Press, 1989）に他の方法が詳細に記載されている。

30

【0354】

多くの好適なフルオロフォア及び検出方法が当該技術分野において周知であり、例えば、Stefan Andersson-Engels et al (1997) “In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. Phys. Med. Biol. 42: 815-824; Altinoglu et al (2008) “Near-Infrared Emitting Fluorophore-Doped Calcium Phosphate Nanoparticles for In Vivo Imaging of Human Breast Cancer” ACS Nano 2(10): 2075-84; 及びChin et al (2009) “In-vivo optical detection of cancer using chlorin e6-polyvinylpyrrolidone induced fluorescence imaging and spectroscopy” BMC Medical Imaging 9:1 (doi:10.1186/1471-2342-9-1)によって記載されている。例としては、フルオレセイン及びその誘導体、蛍光色素、ローダミン及びその誘導体、緑色蛍光タンパク質（GFP）、ダンシル、ウンベリフェロン等が挙げられる。かかるコンジュゲートにおいて、本発明の抗体又はその機能的断片は、当業者に公知の方法によって調製することができる。

40

【0355】

検出可能部分は、ペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、D-ガラクトシダーゼ、グルコースオキシダーゼ、グルコースアミラーゼ、炭酸脱水酵素、アセチルコリンエステラーゼ、リゾチーム、リンゴ酸デヒドロゲナーゼ又はグルコース6-リン酸デヒドロゲナーゼなどの検出可能な酵素を含んでもよい。

50

【0356】

検出可能部分は、ビオチン、ジゴキシゲニン又は5 - プロモデオキシウリジンなどの分子を含んでもよい。

【0357】

検出可能部分は、ルミノール及びジオキセタンなどの化学発光標識、又はルシフェラーゼ及びルシフェリンなどの生物発光標識を含んでもよい。

【0358】

従って、更なる実施形態において、本発明は、対象の体内の新生血管構造をイメージングする方法を提供し、この方法は、

本発明のイメージング用薬剤（例えば、本発明の抗体と検出可能部分とを含むイムノコンジュゲート）を対象に投与することと、体内の検出可能部分をイメージングすることとを含む。好ましくは、新生血管構造は、腫瘍新生血管構造である。

10

【0359】

一部の実施形態において、対象は、好ましくは上記に記載されるものなど、固形腫瘍を有し得ると共に、腫瘍の新生血管構造がイメージングされる。従って、体内の特定の臓器におけるイメージング用薬剤（例えば、イムノコンジュゲート）の局在化は、その個体がその臓器に固形腫瘍を有し得るか、又はそれが発生中であり得ることを示す。この方法は、例えば、以前診断された固形腫瘍のサイズの決定、固形腫瘍に対する療法の有効性の決定、又は腫瘍の転移範囲の決定において有用であり得る。体内の検出可能部分をイメージングする方法は、当該技術分野において周知であり、PET（陽電子放射断層撮影法）が挙げられる。

20

【0360】

従って、本発明は、対象の固形腫瘍を検出、診断及び予後判定する方法を提供すると見ることでもでき、この方法は、本発明のイメージング用薬剤（例えば、イムノコンジュゲート）を対象に投与することと、体内における検出可能部分の存在及び/又は位置を検出することとを含む。

【0361】

上記の考察から、本発明が、本発明の抗体（上記に記載されるイムノコンジュゲートを含む）及び/又は本発明の免疫エフェクター細胞と、薬学的に許容可能な希釈剤、担体又は賦形剤とを含む様々な組成物、例えば医薬組成物、治療用組成物、診断用組成物、イメージング用組成物を提供することは明らかであろう。これに関して、本発明の薬剤（即ち、抗体、免疫エフェクター細胞、ベクター、ウイルス等）は、典型的には医薬組成物としての個体（即ち、対象）への投与用に、即ち薬学的に許容可能な担体、希釈剤又は賦形剤と共に製剤化され得ることが理解される。

30

【0362】

「薬学的に許容可能」には、製剤が無菌且つパイロジェンフリーであることが含まれる。好適な医薬担体、希釈剤及び賦形剤は、薬学の技術分野において周知である。1つ又は複数の担体は、阻害薬と適合性があり、且つその被投与者にとって有害でないという意味で「許容可能」でなければならない。典型的には、担体は、無菌且つパイロジェンフリーの水又は生理食塩水であり得る。しかしながら、他の許容可能な担体が用いられてもよい。

40

【0363】

一部の実施形態において、本発明の医薬組成物又は製剤は、非経口投与用、より詳細には静脈内投与用である。好ましい実施形態において、本医薬組成物は、患者への例えば注射による静脈内投与に好適である。

【0364】

非経口投与に好適な製剤には、抗酸化剤、緩衝剤、静菌剤及び意図する被投与者の血液と製剤を等張にする溶質を含有し得る水性及び非水性滅菌注射溶液；並びに懸濁剤及び増粘剤を含み得る水性及び非水性滅菌懸濁液が含まれる。

50

【0365】

液体医薬組成物は、それが溶液であるか、懸濁液であるか、又は他の同様の形態であるかに関わらず、以下：注射用水、食塩水液、好ましくは生理食塩水、リンゲル液、等張性塩化ナトリウム、溶媒又は懸濁媒としての役割を果たし得る合成モノ又はジグリセリドなどの固定油、ポリエチレングリコール類、グリセリン、プロピレングリコール又は他の溶媒などの滅菌希釈剤；ベンジルアルコール又はメチルパラベンなどの抗細菌剤；アスコルビン酸又は亜硫酸水素ナトリウムなどの抗酸化剤；エチレンジアミン四酢酸などのキレート剤；酢酸塩、クエン酸塩又はリン酸塩などの緩衝液及び塩化ナトリウム又はデキストロースなどの等張化用薬剤の1つ以上を含み得る。非経口製剤は、ガラス製又はプラスチック製のアンプル、使い捨てシリンジ又は複数回投与用バイアルに封入することができる。注射用医薬組成物は、好ましくは無菌である。

10

【0366】

本発明の医薬組成物は、治療（又は予防）しようとする疾患に適切な方法で投与され得る。投与の分量及び頻度は、患者の状態、並びに患者の疾患のタイプ及び重症度などの要因によって決まり得るが、適切な投薬量は臨床試験によって決定されてもよい。

【0367】

好ましくは、製剤は、1日用量又は単位、その1日サブ用量又適切な部分量の活性成分を含有する単位投薬量である。

【0368】

本発明の薬剤又は組成物は、活性成分を含む医薬製剤の形態で、任意選択で非毒性有機又は無機酸又は塩基付加塩の形態で、薬学的に許容可能な剤形で、経口的に又は任意の非経口経路によって投与されてもよい。治療する障害及び患者、並びに投与経路に応じて、組成物は、様々な用量で投与され得る。

20

【0369】

ヒト療法では、本発明の薬剤又は組成物は、概して、意図される投与経路及び標準的薬学実践の点で選択される好適な医薬賦形剤、希釈剤又は担体と混合して投与されることになる。

【0370】

例えば、本発明の薬剤又は組成物は、即時、遅延又は制御放出適用向けの、香味剤又は着色剤を含有し得る錠剤、カプセル剤、オビュール剤、エリキシル剤、溶液又は懸濁液の形態で経口的に、頬側の又は舌下に投与されてもよい。本発明の薬剤又は組成物は、陰茎海綿体内注射によって投与されてもよい。

30

【0371】

好適な錠剤は、微結晶性セルロース、ラクトース、クエン酸ナトリウム、炭酸カルシウム、リン酸水素カルシウム及びグリシンなどの賦形剤、デンプン（好ましくはトウモロコシ、ジャガイモ又はタピオカデンプン）、デンプングリコール酸ナトリウム、クロスカルメロースナトリウム及び特定の複合ケイ酸塩などの崩壊剤、及びポリビニルピロリドン、ヒドロキシプロピルメチルセルロース（HPMC）、ヒドロキシプロピルセルロース（HPC）、スクロース、ゼラチン及びアカシアなどの造粒結合剤を含有し得る。加えて、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸、ベヘン酸グリセリル及びタルクなどの潤滑剤が含まれることもある。

40

【0372】

同様のタイプの固体組成物は、ゼラチンカプセルの充填剤としても利用し得る。これに関して好ましい賦形剤としては、ラクトース、デンプン、セルロース、乳糖又は高分子量ポリエチレングリコールが挙げられる。水性懸濁液及び/又はエリキシル剤について、本発明の化合物は、様々な甘味剤又は香味剤、着色物質又は色素、乳化剤及び/又は懸濁剤、並びに水、エタノール、プロピレングリコール及びグリセリンなどの希釈剤、及びこれらの組み合わせと組み合わせてもよい。

【0373】

本発明の薬剤又は組成物は、非経口的に、例えば静脈内に、動脈内に、腹腔内に、髄腔

50

内に、脳室内に、胸骨内に、頭蓋内に、筋肉内に又は皮下に投与することもでき、又は注入技法によって投与されてもよい。これらは、他の物質、例えば溶液を血液と等張にするのに十分な塩又はグルコースを含有し得る滅菌水溶液の形態での使用が最も適している。水溶液は必要に応じて好適に（好ましくは3～9のpHに）緩衝されなければならない。無菌条件下における好適な非経口製剤の調製は、当業者に周知の標準的な製薬技法によって容易に達成される。

【0374】

製剤は、単位用量容器又は複数用量容器、例えば密封されたアンプル及びバイアルに提供されてもよく、使用直前に滅菌液体担体、例えば注射用水を加えるのみでよいフリーズドライ（凍結乾燥）状態で保存されてもよい。前述の種類の滅菌粉末、顆粒及び錠剤から即時調合注射溶液及び懸濁液が調製されてもよい。

10

【0375】

ヒト患者への経口及び非経口投与について、本発明の薬剤又は組成物の1日投薬量レベルは、通常、単回又は分割用量で投与される成人1人当たり1～1,000mg（即ち、約0.015～15mg/kg）であり得る。

【0376】

従って、例えば、本発明の薬剤又は組成物の錠剤又はカプセルは、適宜、一度に1つ又は2つ以上での投与につき1mg～1,000mgの活性薬剤を含有し得る。いずれの場合にも、医師が任意の個々の患者に最も好適となり得る実際の投薬量を決定することになり、それは、特定の患者の年齢、体重及び応答によって異なり得る。上記の投薬量は、平均的なケースの例示である。当然ながら、より高い又はより低い投薬量範囲が有利な個別の事例があることもあり、それらは本発明の範囲内にある。

20

【0377】

本発明の薬剤又は組成物は、鼻腔内に又は吸入によって投与することもでき、好都合には、好適な噴射剤、例えばジクロロジフルオロメタン、トリクロロフルオロメタン、ジクロロテトラフルオロエタン、ヒドロフルオロアルカン、例えば1,1,1,2-テトラフルオロエタン（HFA 134A3）又は1,1,1,2,3,3,3-ヘptaフルオロプロパン（HFA 227EA3）、二酸化炭素又は他の好適なガスを用いて加圧容器、ポンプ、スプレー又はネブライザーからドライパウダーインヘラー又はエアロゾルスプレー体裁の形態で送達される。加圧エアロゾルの場合、投薬量単位は、定量を送達するためのバルブを提供することにより決定し得る。加圧容器、ポンプ、スプレー又はネブライザーは、例えば、滑沢剤、例えばソルビタントリオレートを含み得るエタノールと噴射剤との混合物を溶媒として使用して、活性化化合物の溶液又は懸濁液を含有してもよい。インヘラー又は吸入器に用いられるカプセル及びカートリッジ（例えば、ゼラチン製）が、抗体とラクトース又はデンプンなどの好適な粉末基剤との混合粉末を含有するように製剤化されてもよい。かかる製剤は、例えば、小細胞肺癌、非小細胞肺癌、胸膜肺芽腫又はカルチノイド腫瘍など、肺の固形腫瘍の治療に特に有用であり得る。

30

【0378】

エアロゾル又はドライパウダー製剤は、好ましくは、患者に送達される阻害薬が各定用量又は「パフ」に少なくとも1mg含まれるように準備される。エアロゾルによる全1日用量は、患者毎に異なることになり、単一用量で又は通常、1日を通して分割用量で投与されることが理解されるであろう。

40

【0379】

一部の実施形態において、本発明の薬剤又は組成物は、特に結腸、直腸又は前立腺腫瘍の治療又はターゲティングについて、坐薬又はペッサリーの形態で投与することができる。

【0380】

一部の実施形態において、本発明の薬剤又は組成物は、眼経路によって投与されてもよい。眼科使用には、本発明の薬剤又は組成物は、例えば、等張性のpH調整済み滅菌生理食塩水中の微粒子化懸濁液として、又は好ましくは等張性のpH調整済み滅菌生理食塩水

50

中の溶液として、任意選択で塩化ベンジルアコニウム (benzylalkonium chloride) などの保存剤と組み合わせて製剤化することができる。代替的に、本発明の薬剤又は組成物は、ワセリンなどの軟膏として製剤化されてもよい。かかる製剤は、網膜芽細胞腫、髄上皮腫、ぶどう膜黒色腫、横紋筋肉腫、眼内リンパ腫、又は眼窩リンパ腫などの眼の固形腫瘍の治療に特に有用であり得る。

【0381】

一部の実施形態において、本発明の薬剤又は組成物は、患者への局所投与に好適であり得る。本発明の薬剤又は組成物は、ローション、溶液、クリーム、軟膏又は散布剤の形態で局所適用されてもよく、又は例えば皮膚パッチを使用することにより経皮投与されてもよい。皮膚への局所適用には、本発明の薬剤又は組成物は、例えば、以下：鉱油、流動ワセリン、白色ワセリン、プロピレングリコール、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン化合物、乳化ワックス及び水の1つ以上との混合物中に懸濁又は溶解した活性化合物を含有する好適な軟膏として製剤化することができる。代替的に、それは、例えば、以下：鉱油、モノステアリン酸ソルビタン、ポリエチレングリコール、流動パラフィン、ポリソルベート60、セチルエステルワックス、セテアリルアルコール、2-オクチルドデカノール、ベンジルアルコール及び水の1つ以上の混合物中に懸濁又は溶解した好適なローション又はクリームとして製剤化することができる。かかる製剤は、例えば、基底細胞癌、扁平上皮癌又は黒色腫などの皮膚の固形腫瘍の治療に特に有用であり得る。

10

【0382】

皮膚癌について、本発明の薬剤又は組成物は、エレクトロインコーポレーション (EI) によって送達することもできる。EIは、皮膚の表面上で直径30ミクロン以下の小さい粒子が、電気穿孔に用いられるものと同一又は同様の電気パルスを受けると起こる。EIでは、これらの粒子が角質層を通過して皮膚のより深い層に入り込む。粒子には阻害薬を負荷又はコーティングすることができ、又は粒子は、単に本発明の薬剤又は組成物がそこから入ることのできる孔を皮膚に生じさせる「弾丸」としての役割を果たすことができる。

20

【0383】

口腔内の局所投与に好適な製剤としては、香味付された基剤、通常、スクロース及びアカシア又はトラガカント中に活性成分を含むロゼンジ；ゼラチン及びグリセリン、又はスクロース及びアカシアなどの不活性基剤中に活性成分を含むトローチ；及び好適な液体担体中に活性成分を含む洗口剤が挙げられる。かかる製剤は、口腔及び咽頭の固形腫瘍の治療に特に有用であり得る。

30

【0384】

一部の実施形態において、本発明の薬剤又は組成物は、注射用徐放薬物送達システムを用いて送達し得る。これらは、注射頻度を低減するように特別に設計される。かかるシステムの例は、生分解性マイクロスフェアに組換えヒト成長ホルモン (rhGH) を封入したNutropin Depotであり、これは、注射されると長時間にわたってrhGHをゆっくりと放出する。

【0385】

本発明の薬剤又は組成物は、薬物を要求される部位、例えば眼腫瘍を治療するため眼内に直接放出する外科的に植え込まれた装置によって投与することができる。疾患部位へのかかる直接的な適用は、著しい全身性副作用のない有効な治療を実現する。

40

【0386】

本発明の薬剤又は組成物を送達する代替的方法は、温度感受性のReGel注射システムである。体温未満ではReGelは注射液であるが、体温では徐々に侵食及び溶解して既知の安全な生分解性ポリマーになるゲルリザーバを直ちに形成する。時間と共にバイオポリマーが溶解するに従い活性薬物が送達される。

【0387】

本発明の薬剤又は組成物は、経口的に送達することもできる。このプロセスは、体内でのビタミンB12の自然の経口取込み過程を用いてタンパク質及びペプチドを共送達する

50

。ビタミン B 1 2 の取込み系に乗ることにより、タンパク質又はペプチドは、腸壁を通り抜けることができる。ビタミン B 1 2 類似体と薬物との間で複合体が合成され、これは、複合体のビタミン B 1 2 部分における内因子 (I F) に対する有意な親和性と複合体の薬物部分の有意な生物活性との両方を保持している。

【 0 3 8 8 】

本発明の核酸分子薬剤 (例えば、核酸分子、ベクター等) は、以下に記載するとおりの好適な遺伝子コンストラクトとして投与して患者に送達し、そこで発現させてもよい。典型的には、遺伝子コンストラクト中の核酸は、細胞において化合物を発現させることのできるプロモーターに作動可能に連結されている。本発明の遺伝子コンストラクトは、当該技術分野において例えば Sambrook et al (2001) で周知の方法を用いて調製することができる。

10

【 0 3 8 9 】

ポリヌクレオチドを送達するための遺伝子コンストラクトは、DNA であっても又は RNA であってもよいが、DNA であれば好ましい。

【 0 3 9 0 】

好ましくは、遺伝子コンストラクトは、ヒト細胞への送達に適合され、例えばトランスポゾン系 (例えば、sleeping beauty、piggyBac) を用いて標的 DNA が宿主細胞ゲノムに組み込まれてもよい。遺伝子コンストラクトを細胞に導入する手段及び方法は、当該技術分野において公知であり、免疫リポソーム、リポソーム、ウイルスベクター (ワクシニア、改良ワクシニア、レンチウイルス、パルボウイルス、レトロウイルス、アデノウイルス及びアデノ随伴ウイルス (A A V) ベクターを含む) の使用、並びに DNA の例えば遺伝子銃及び電気穿孔を用いた直接送達によることが挙げられる。更に、治療のためにポリヌクレオチドを患者の標的組織に送達する方法も当該技術分野において周知である。代替的方法では、受容体介在性エンドサイトーシスを用いて DNA 巨大分子を細胞に運び込む高効率核酸送達システムが用いられる。これは、核酸に結合するポリカチオンに鉄輸送タンパク質トランスフェリンをコンジュゲートすることにより達成される。Cotten et al (1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 6094-6098 の方法によって作製された欠損の又は化学的に不活性なアデノウイルス粒子のエンドソーム破壊活性を用いた DNA コンストラクト又は本発明の他の遺伝子コンストラクトの高効率受容体介在性送達も用いることができる。「ネイキッド DNA 」並びにカチオン性及び中性脂質と複合体化した DNA も、治療する個体の細胞に本発明の DNA を導入するのに有用であり得ることが理解されるであろう。遺伝子療法の非ウイルス手法については、Ledley (1995, Human Gene Therapy 6, 1129-1144) に記載されている。

20

30

【 0 3 9 1 】

特定の組織の癌 / 腫瘍には、ポリヌクレオチド阻害薬をコードするベクター内に組織特異的プロモーターを使用することが有用であり得るが、核酸分子薬剤が体内において癌 / 腫瘍以外の部位で発現するリスクは、癌 / 腫瘍に罹患している患者にとっての治療利益に比して許容可能であると思われるため、これは必須ではない。細胞におけるポリヌクレオチド阻害薬の発現を時間的に調節可能であることが望ましい場合もあるが、これも必須ではない。

40

【 0 3 9 2 】

本発明の薬剤及び組成物は、保存のために凍結乾燥され、使用前に好適な担体中に再構成されてもよい。任意の好適な凍結乾燥方法 (例えば、噴霧乾燥、ケーキ乾燥) 及び / 又は再構成技法を用いることができる。当業者によれば、凍結乾燥及び再構成が様々な程度の抗体活性損失につながり得ること (例えば、従来の免疫グロブリンでは、I g M 抗体は、I g G 抗体と比べてより高い活性損失を有する傾向がある) 、及び補償するため使用レベルを上方に調整する必要があり得ることは理解されるであろう。一実施形態において、凍結乾燥 (フリーズドライ) 抗体は、再水和時にその (凍結乾燥前の) 活性の約 2 0 % 以下、又は約 2 5 % 以下、又は約 3 0 % 以下、又は約 3 5 % 以下、又は約 4 0 % 以下、又は約 4 5 % 以下、又は約 5 0 % 以下を失う。

50

【0393】

投与用の本発明の薬剤（例えば、抗体、免疫エフェクター細胞、核酸分子、ベクター等）は、医薬組成物における使用向けに適切に修飾されてもよい。例えば、薬剤は、例えば塩又は非電解質、酢酸塩、EDTA、クエン酸塩、トリス、リン酸塩又は酢酸塩緩衝液、マンニトール、グリシン、HSA（ヒト血清アルブミン）又はポリソルベートなどの適切な添加剤を使用することにより、本発明の組成物中で分解に対して安定化されてもよい。多数の安定化剤が当該技術分野において公知である。

【0394】

本明細書に定義するとおりの本発明の抗体は、インビトロ又はインビボ適用及びアッセイの分子ツールとして使用されてもよい。抗体が抗原結合部位を有することに伴い、これらは、特異的結合対のメンバーとして機能することができ、及びこれらの分子は、特定の結合対メンバーが必要な任意のアッセイで使用することができる。

10

【0395】

従って、本発明の更に別の態様は、本明細書に定義するとおりの本発明の抗体を含む試薬、及び例えばインビトロ又はインビボアッセイにおける分子ツールとしてのかかる抗体の使用を提供する。

【0396】

本発明は、本発明の抗体、CAR、イムノコンジュゲート又は組成物の1つ以上又は本発明の抗体又はCARをコードする核酸分子の1つ以上、又は本発明の核酸配列を含む1つ以上の組換え発現ベクター、又は本発明の組換え発現ベクター又は核酸配列を含む1つ以上の宿主細胞（免疫エフェクター細胞を含む）、又はウイルスを含むキットを更に含む。好ましくは、前記キットは、本明細書に記載されるとおりの方法及び使用、例えば本明細書に記載されるとおりの治療、診断又はイメージング方法に用いられるものであり、又は本明細書に記載されるとおりのインビトロアッセイ又は方法に用いられるものである。かかるキットの抗体は、好ましくは本明細書の他の部分に記載されるとおりの抗体コンジュゲート（イムノコンジュゲート）であってもよく、例えば、検出可能部分又は治療用薬剤若しくは細胞傷害性薬剤にコンジュゲートされてもよい。好ましくは、前記キットは、例えば診断時におけるキット構成要素の使用説明書を含む。好ましくは、前記キットは、本明細書の他の部分に記載されるとおりの疾患の診断又は治療用であり、任意選択でかかる疾患を診断又は治療するためのキット構成要素の使用説明書を含む。

20

30

【0397】

癌治療は、

(a) 腫瘍を有する動物又は患者（即ち、対象）に対し、少なくとも第1の検出可能に標識された本発明の抗CLEC14A抗体（例えば、本発明のイメージング用薬剤）の診断量を投与することにより腫瘍の画像を形成して、それによって腫瘍の検出可能画像を形成することと、

(b) 続いて同じ動物又は患者に対し、少なくとも第1の本発明の治療用薬剤（例えば、抗体、免疫エフェクター細胞又は組成物）の治療最適量を投与して、それによって抗腫瘍効果を生じさせることと

によって行ってもよい。

40

【0398】

本明細書における「腫瘍」といういかなる表現は、「癌」又は「癌腫」も指す。転移性癌も治療することができ、原発腫瘍からの転移を低減することもできる。術後患者に残るいわゆる微小残存病変（MRD）が、本発明の抗CLEC14A抗体及び他の薬剤、例えば免疫エフェクター細胞又は組成物による免疫療法に適していることもある。

【0399】

本発明の方法及び細胞を用いて治療する対象は、哺乳類の任意の種であってもよい。例えば、対象は、マウス、ラット、スナネズミ、ウサギ、モルモット、ハムスター、ネコ又はイヌなどの家庭内ペット、又はヤギ、ヒツジ、ブタ、雌ウシ又はウマなどの家畜の任意の種であってもよい。本発明の更なる好ましい実施形態において、対象は、サル、テナガ

50

ザル、ゴリラ、オランウータン、チンパンジー又はボノボなどの霊長類であってもよい。しかしながら、本発明の好ましい実施形態において、対象は、ヒトである。

【0400】

本願全体を通じて使用されるとき、用語「1つの(a)」及び「1つの(an)」は、それらが、上限が後に具体的に記載される場合を除き、言及される構成要素又はステップの「少なくとも1つ」、「少なくとも第1」、「1つ以上」又は「複数」を意味するという意味で用いられる。従って、「抗体」は、本明細書で使用されるとき、「少なくとも第1の抗体」を意味する。併用の機能し得る限度及びパラメータは、任意の単剤の量と同様に本開示を踏まえて当業者に公知であり得る。

【0401】

ここで、以下の非限定的な例において図を参照して本発明を更に詳細に説明する。

【図面の簡単な説明】

【0402】

【図1】H U V E C及び他の初代細胞におけるC L E C 1 4 Aの相対発現を示すグラフを示す。C L E C 1 4 Aは、内皮細胞(H U V E C)で特異的に発現し、ヒト大動脈平滑筋細胞(H A S M C)、ヒト肺線維芽細胞(M R C 5)、ヒト気管支上皮細胞(H B E)、ヘパトサイト又は末梢血単核細胞(P B M C)で発現しなかった。

【図2】[A] C L E C 1 4 Aを標的化するs i R N A二重鎖が、q P C Rによって決定するとき、H U V E CにおけるC L E C 1 4 A m R N A発現を効率的にノックダウンできることを示す。相対発現は、発現をフロチリン2に対して正規化することにより決定した。[B] タンパク質レベルでのC L E C 1 4 Aのノックダウンをウエスタンブロット分析によって決定した。ローディング対照としてチューブリンを使用した。[C] 対照又はc l e c 1 4 a標的化s i R N Aで処置したH U V E Cについての16時間後の新芽成長の代表的な画像を示す。[D] 対照及びC L E C 1 4 AノックダウンH U V E Cについての27個のスフェロイド(3つの臍帯からの9個のスフェロイド)の新芽の定量化を示す;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.001$ 。[E] 混合した対照(緑色)及びc l e c 1 4 a標的化s i R N Aで処置したH U V E C(赤色)についての24時間後の新芽成長の代表的な画像を示す。[F] 対照(C O N)及びC L E C 1 4 Aノックダウン(K D) H U V E Cに由来する先端細胞及び柄細胞のパーセンテージの定量化を示す;二元配置A N O V A統計検定及びボンフェローニ事後検定 $*** = p < 0.001$ 、n s = 有意差なし。

【図3-1】[A] C 5 7 B L / 6 (c l e c 1 4 a + / +)又はC 5 7 B L / 6 (C l e c 1 4 a t m 1 (K O M P) V l c g) (c l e c 1 4 a - / -)マウスにおけるc l e c 1 4 a遺伝子の概略図を示す。[B] c l e c 1 4 aの5'非翻訳領域(UTR)、コード配列(CDS)及び3'UTRについて3匹のc l e c 1 4 a + / +マウス(白色のバー)及び3匹のc l e c 1 4 a - / -マウス(黒色のバー)から生成されたc D N Aの定量的P C R分析を示す。相対発現は、発現をフロチリン2に対して正規化することにより決定した。[C] マウスC L E C 1 4 Aに対するポリクローナル抗血清を用いたc l e c 1 4 a + / +及びc l e c 1 4 a - / -マウスからの肺ライセートにおけるC L E C 1 4 Aタンパク質発現のウエスタンブロット分析を示す。ローディング対照としてチューブリンを使用した。[D] c l e c 1 4 a + / +及びc l e c 1 4 a - / -マウスからの大動脈リング発芽アッセイの代表的な画像を示す。1リング当たり形成された管の定量化[E]、及び大動脈リングから内皮管によって移動した最大距離の定量化[F]を示す、1遺伝子型当たり48個のリング、各遺伝子型につき6匹のマウスからのデータ;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.001$ 。[G] c l e c 1 4 a + / +及びc l e c 1 4 a - / -マウスからのスポンジ移植片のヘマトキシリン・エオシン染色切片の代表的な画像を示し、スポンジの中央部にある切片を分析した。[H] 図3Gに示すスポンジ移植片への細胞侵入の定量化を示す;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.05$ 。[I] 血管密度の定量化を示す;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.001$ 。[J] c l e c 1 4 a - / -マウスからのx - g a lで染色し、ヘマトキシリン・エオ

10

20

30

40

50

シンで対比染色した肝組織及びスポンジ組織の切片を示す。

【図3-2】[A] C57BL/6 (clec14a +/+)又はC57BL/6 (Clec14a tm1 (KOMP) Vlcg) (clec14a -/-)マウスにおけるclec14a遺伝子の概略図を示す。[B] clec14aの5'非翻訳領域(UTR)、コード配列(CDS)及び3'UTRについて3匹のclec14a +/+マウス(白色のバー)及び3匹のclec14a -/-マウス(黒色のバー)から生成されたcDNAの定量的PCR分析を示す。相対発現は、発現をフロチリン2に対して正規化することにより決定した。[C] マウスCLEC14Aに対するポリクローナル抗血清を用いたclec14a +/+及びclec14a -/-マウスからの肺ライセートにおけるCLEC14Aタンパク質発現のウエスタンブロット分析を示す。ローディング対照としてチューブリンを使用した。[D] clec14a +/+及びclec14a -/-マウスからの大動脈リング発芽アッセイの代表的な画像を示す。1リング当たり形成された管の定量化[E]、及び大動脈リングから内皮管によって移動した最大距離の定量化[F]を示す、1遺伝子型当たり48個のリング、各遺伝子型につき6匹のマウスからのデータ;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.001$ 。[G] clec14a +/+及びclec14a -/-マウスからのスポンジ移植片のヘマトキシリン・エオシン染色切片の代表的な画像を示し、スポンジの中央部にある切片を分析した。[H] 図3Gに示すスポンジ移植片への細胞侵入の定量化を示す;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.05$ 。[I] 血管密度の定量化を示す;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.001$ 。[J] clec14a -/-マウスからのx-galで染色し、ヘマトキシリン・エオシンで対比染色した肝組織及びスポンジ組織の切片を示す。

【図4】[A] clec14a +/+ (実線と丸)及びclec14a -/- (実線と四角)マウスにおけるルイス肺癌(LLC)腫瘍成長を示す;二元配置ANOVA統計分析、 $* = p < 0.05$ 、 $** = p < 0.01$ 、 $*** = p < 0.001$ 。[B] LLC腫瘍の代表的な画像を示す。[C] 7匹のclec14a +/+ (丸)及び7匹のclec14a -/- (四角)マウスについてのエンドポイント腫瘍重量を示す;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.001$ 。[D] マウスCD31に関して染色したLLC腫瘍切片の免疫蛍光染色の代表的な画像を示す。clec14a +/+及びclec14a -/-マウスからの血管密度の定量化[E]及びパーセンテージ内皮被覆率[F]を示す;マン・ホイットニー統計検定 $p < 0.0001$ 。[G] x-galで染色し、ヘマトキシリン・エオシンで対比染色したclec14a -/-マウスからの肝組織及びLLC腫瘍組織の切片を示す。

【図5】(A)創傷閉鎖の遅れを示す抗CLEC14Aモノクローナル抗体CRT-3によるHUVEC引っ掻き傷治癒アッセイの結果の光学顕微鏡像を示す。(B)(A)の結果のグラフ表現を示す。

【図6】CLEC14A抗体で処置したHUVECによる細管形成アッセイの分析を示す。HUVECを $20 \mu\text{g/ml}$ CRT2、3又は4又はマウスIgGアイソタイプ対照で処置した。16時間で細管の画像を撮り、細管の全長、ジャンクションの数、分岐の数、分岐の長さ、網目の数及び網目の総面積を分析した。図示するデータは、各々につき5つのデータ点を分析した3つの実験を表す。エラーバーは、SEMを示す。 $* p, 0.05$ 。 $** p < 0.01$ 。

【図7】(A)CLEC14AをトランスフェクトしたHEK293T及び(B)トロンプモジュリンをトランスフェクトしたHEK293Tに結合するCRT-2及びCRT-3のフローサイトメトリー分析のグラフを示す。

【図8】(A)トロンプモジュリンのCTLDとCLEC14Aの残りの部分とを含有するキメラをトランスフェクトしたHEK293T、(B)トロンプモジュリンのsush i様ドメインとCLEC14Aの残りの部分とを含有するキメラをトランスフェクトしたHEK293T、及び(C)トロンプモジュリンのループ残基97~108とCLEC14Aの残りの部分とを含有するキメラをトランスフェクトしたHEK293Tに結合するCRT-2及びCRT-3のフローサイトメトリー分析のグラフを示す。

10

20

30

40

50

【図9】CD141のCLEC14A領域1~42；CD141のCLEC14A領域97~108；及びCD141のCLEC14A領域122~142のアラインメントを示す。

【図10】CAR発現ベクター設計及び形質転換ヒトT細胞におけるCARの発現を示し、ここで、(A)は、トランケート型CD34マーカー遺伝子とscFv断片/CD3鎖キメラ受容体とを共発現するレトロウイルスCARベクター(pMP71ベース)を示す。発現は、LTRプロモーターからドライブされ、2AペプチドリンカーがCD34及びCARの両方の等モル発現を確実にする。第2世代CARコンストラクトは、CD28共刺激ドメインを含んだ。(B)は、フローサイトメトリーによって分析したCD34染色を示し、CLEC14A特異的CARを共発現するレトロウイルスコンストラクトを使用したT細胞の形質導入の成功を実証している。抗体CRT3ベースの第1世代CARは、CRT3.zと称される。抗体CRT3ベースの第2世代CARは、CRT3.28zと称される。(C)は、CLEC14A-Fcを用いてCARの発現に関して直接染色した、フローサイトメトリーによって分析した細胞を示す(%値は、Fc単独によるバックグラウンド染色を差し引いたCLEC14A-Fcの特異的結合を示す)。

【図11】インビトロでCLEC14Aに応答したCAR形質導入T細胞を示す。抗体CRT3ベースの第1世代又は第2世代CARを発現するように形質導入したT細胞又はモック形質導入(対照)T細胞について、(A)プレート結合組換えFc融合タンパク質として発現するか、(B)操作されたCHO細胞上に発現するか、又は(C)静置培養で成長したときにCLEC14Aを天然に発現するヒト臍帯静脈内皮細胞(HUVEC)上に発現するかのいずれかのCLEC14Aに対するその応答能力を試験した。T細胞応答は、インターフェロン産生に関してELISAを用いて計測した。図示するデータは、3~7つの反復実験から得られた代表的なものである。T細胞は、トランス遺伝子発現細胞の頻度が等しくなるように調整した。ヒストグラムは、全て平均応答+SDを示す。

【図12-1】CLEC14A特異的CARを形質導入したT細胞の更なるインビトロ機能試験を示す。抗体CRT-3ベースの第1世代又は第2世代CARを発現するように形質導入したT細胞、又はモック形質導入(対照)T細胞について、以下の機能アッセイにおいてCLEC14Aに対するその応答能力を試験した:(A)細胞傷害性、ヒトCLEC14Aを発現するように操作したCHO細胞を使用(CHO単独(対照細胞)のバックグラウンド溶解レベルを差し引いた)。図示するデータは、5つの反復実験の代表的なものである。(B)増殖、本発明者らは、CFSE標識CAR形質導入T細胞を使用して、HUVECと4日間共培養したときのCAR+(CD34+)及びCAR-(CD34-)細胞サブセットの増殖を計測した。図示するデータは、2つの反復実験の代表的なものである。(C)ヒトCLEC14A及びマウスCLEC14Aの両方に対する(CLEC14A特異的CAR形質導入T細胞の応答を、インターフェロン放出を用いて評価した。T細胞は、トランス遺伝子発現細胞の頻度が等しくなるように調整した。図示するデータは、6つの反復実験の代表的なものである。ヒストグラムは、全て平均応答+SDを示す。

【図12-2】CLEC14A特異的CARを形質導入したT細胞の更なるインビトロ機能試験を示す。抗体CRT-3ベースの第1世代又は第2世代CARを発現するように形質導入したT細胞、又はモック形質導入(対照)T細胞について、以下の機能アッセイにおいてCLEC14Aに対するその応答能力を試験した:(A)細胞傷害性、ヒトCLEC14Aを発現するように操作したCHO細胞を使用(CHO単独(対照細胞)のバックグラウンド溶解レベルを差し引いた)。図示するデータは、5つの反復実験の代表的なものである。(B)増殖、本発明者らは、CFSE標識CAR形質導入T細胞を使用して、HUVECと4日間共培養したときのCAR+(CD34+)及びCAR-(CD34-)細胞サブセットの増殖を計測した。図示するデータは、2つの反復実験の代表的なものである。(C)ヒトCLEC14A及びマウスCLEC14Aの両方に対する(CLEC14A特異的CAR形質導入T細胞の応答を、インターフェロン放出を用いて評価した。T細胞は、トランス遺伝子発現細胞の頻度が等しくなるように調整した。図示するデー

10

20

30

40

50

タは、6つの反復実験の代表的なものである。ヒストグラムは、全て平均応答 + S Dを示す。

【図13】CLEC14A特異的CAR形質導入マウスT細胞を注射した健常C57/BL6マウスを使用したインビボ毒性試験後の組織試料の組織像を示す。

【図14】抗体CRT-3ベースの第2世代CARを発現するように形質導入したT細胞又はモック形質導入(対照)T細胞で処置したマウスからのルイス肺癌腫瘍容積のグラフを示す。マウスは、合計2000万個のT細胞を投与され(CD8:CD4=5:2)、これらの細胞のうちの220万個にCRT3.28zが発現した。次に、(A)生物発光又は(B)ノギスを用いて腫瘍成長をモニタした。

【図15】抗体CRT-3ベースの第2世代CARを発現するように形質導入したT細胞又はモック形質導入(対照)T細胞を注射したマウスからのルイス肺癌腫瘍における腫瘍重量(A)、血管によって覆われた腫瘍組織面積のパーセンテージ(B)及びフィブリノゲンに関して染色された腫瘍組織のパーセンテージ(C)を示す棒グラフを示す。

【図16】(A)(i)0分及び(ii)90分の時点におけるCRT-3処置したHUVECの画像を示し、抗体がインターナライズされることを実証する；及び(B)CRT-3抗体薬物コンジュゲート(イムノコンジュゲート)で処置したHUVECの細胞生存度を示すグラフを示す。

【図17】(A)対照ADC(B12-ADC)による処置後24時間、及び(B)CRT-3-ADCによる処置後24時間のマウス肺組織像を示す。

【図18】滴定濃度のヒト及びマウス組換えCLEC14Aに対するCRT1、3及び5 CAR(CD28共刺激ドメインを含む)T細胞応答を示す。

【図19】種々の共刺激ドメインを含むCARの設計を示す。1) tCD34-F2A-scFv-CD28 TM-CD28シグナル-CD3、2) tCD34-F2A-scFv-CD8 TM-4-1BBシグナル-CD3、3) tCD34-F2A-scFv-CD8 TM-OX40シグナル-CD3、4) tCD34-F2A-scFv-CD28 TM-CD28シグナル-4-1BBシグナル-CD3、5) tCD34-F2A-scFv-CD28 TM-CD28シグナル-OX40シグナル-CD3、6) tCD34-F2A-scFv-CD8 TM-4-1BBシグナル-OX40シグナル-CD3。tCD34は、形質導入に成功した細胞を同定するために含まれ、従ってコンストラクトではこれ及びF2Aを除いてもよい。加えて、ヒンジ又はスペーサー領域、例えばCD8由来のものが含まれてもよい。

【図20-1】CRT1、3及び5 CAR対CLEC14Aを発現するマウス内皮細胞による細胞傷害性アッセイの結果を示す(図20A)。CRT1、3及び5 CARの増殖性アッセイの結果は、図20Bに示される。

【図20-2】CRT1、3及び5 CAR対CLEC14Aを発現するマウス内皮細胞による細胞傷害性アッセイの結果を示す(図20A)。CRT1、3及び5 CARの増殖性アッセイの結果は、図20Bに示される。

【図20-3】CRT1、3及び5 CAR対CLEC14Aを発現するマウス内皮細胞による細胞傷害性アッセイの結果を示す(図20A)。CRT1、3及び5 CARの増殖性アッセイの結果は、図20Bに示される。

【図20-4】CRT1、3及び5 CAR対CLEC14Aを発現するマウス内皮細胞による細胞傷害性アッセイの結果を示す(図20A)。CRT1、3及び5 CARの増殖性アッセイの結果は、図20Bに示される。

【図21】種々の共刺激ドメインを含むCRT3 CAR T細胞の機能試験を示し、及びヒトCLEC14Aを発現する滴定数のCHO細胞に应答したIFN産生を示す。

【図22-1】CLEC14Aキメラを発現するように操作した293細胞又はSEND細胞と共にインキュベートした後のCRT1、3及び5 CAR(CD28共刺激ドメイン)T細胞によるIFNガンマ放出を示す(A1-マウス細胞内ドメインを含むヒトCLEC14A、B1-マウス膜貫通及び細胞内ドメインを含むヒトCLEC14A、huCLEC-ヒトCLEC14A)。SEND細胞とインキュベートした後のCAR T細胞

10

20

30

40

50

についての細胞傷害性データを図22Bに示す。

【図22-2】CLEC14Aキメラを発現するように操作した293細胞又はSEND細胞と共にインキュベートした後のCRT1、3及び5 CAR (CD28共刺激ドメイン) T細胞によるIFNガンマ放出を示す (A1 - マウス細胞内ドメインを含むヒトCLEC14A、B1 - マウス膜貫通及び細胞内ドメインを含むヒトCLEC14A、huCLEC - ヒトCLEC14A)。SEND細胞とインキュベートした後のCAR T細胞についての細胞傷害性データを図22Bに示す。

【図22-3】CLEC14Aキメラを発現するように操作した293細胞又はSEND細胞と共にインキュベートした後のCRT1、3及び5 CAR (CD28共刺激ドメイン) T細胞によるIFNガンマ放出を示す (A1 - マウス細胞内ドメインを含むヒトCLEC14A、B1 - マウス膜貫通及び細胞内ドメインを含むヒトCLEC14A、huCLEC - ヒトCLEC14A)。SEND細胞とインキュベートした後のCAR T細胞についての細胞傷害性データを図22Bに示す。

【図23】インビトロ転写による電気穿孔用のRNAの生成に好適なベクターの概略図を示す。

【図24】マウスT細胞の形質導入に使用することのできるCARをコードするコンストラクトを示す。これらのコンストラクトは、マウスタンパク質の膜貫通、共刺激及び細胞内シグナリング配列を含む (配列番号116 ~ 121を参照されたい)。コンストラクトは、マウスCD8 のヒンジ又はスパーサドメインを更に含んでもよい。

【発明を実施するための形態】

【0403】

10

20

【表 1】

配列名 (配列タイプ)	配列 番号	配列
VH (aa)	1	M A E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G N S D T S Y N Q K F K G K A K L T A V T S T S T A Y M E L S S L T N E D S A V F Y C T H Y Y G S D Y A M D Y W G Q G T S V T V
VH CDR1 (aa)	2	GYTFTSYW
VH CDR2 (aa)	3	IYPGNSDT
VH CDR3 (aa)	4	THYYGSDYAMDY
VL (aa)	5	Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R V T M T C T A S S S V S S S Y L H W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H R S P R T F G G G T K L E I K R A A A
VL CDR1 (aa)	6	SSVSSSY
VL CDR2 (aa)	7	STS
VL CDR3 (aa)	8	HQYHRSPRT
ScFv (aa)	9	M A E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G N S D T S Y N Q K F K G K A K L T A V T S T S T A Y M E L S S L T N E D S A V F Y C T H Y Y G S D Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R V T M T C T A S S S V S S S Y L H W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P A

10

20

30

40

【 0 4 0 4 】

【表 3】

VH CDR1 (nt)	12	ggctacacctttaccagctactgg	
VH CDR2 (nt)	13	atttatcctggaaatagtgatact	
VH CDR3 (nt)	14	acacattactacggtagtgactatgctatggactac	
VL (nt)	15	caaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctctaggggaacgggtcaccatgacctgactgccagctcaagtgttaagttccagttactgactgggtaccagcagaagccaggatcctccccaaactctggattatagcacatccaacctggctctggagtcccagctcgcttcagtggtggctgggaccttactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgtgccacttactgccaccagtatcatcggtccccacggacgttcggtggaggaccaagctggaaatcaaactg	10
VL CDR1 (nt)	16	tcaagtgttaagttccagttac	20
VL CDR2 (nt)	17	agcacatcc	
VL CDR3 (nt)	18	caccagtatcatcggtccccacggacg	
ScFv (nt)	19	atggccgagggtccagctgcagcagctctgggactgtgctggcaaggcctggggcttcagtgaagatgtcctgcaaggctctggctacacctttaccagctactggatgactgggtaaaacagaggcctggacagggctggaatggattggcgctattatcctggaaatagtgatactagctacaaccagaagttcaagggcaaggccaaactgactgcagtcacatccaccagcactgcctacatggagctcagcagcctgacaaatgaggactctgcggcttttactgtacacattactacggtagtgactatgctatggactactggggctcaaggaaacctcagtcactgtctcctcaggtggaggcgggtcaggcggagggtggctctggcgggtggcgatcgcaaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctctaggggaacgggtcaccatgacctgactgccagctcaagtgttaagttccagttactgactgggtaccagcagaagccaggatcctccccaaactctggattatagcacatccaacctggctctggagtcccagctcgcttcagtggtggctgggacctcttactctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgtgccacttactgccaccagtatcatcggtccccacggacgttcggtggaggaccaagctggaaatcaaactgctggccgca	30 40

【表 4】

CAR3完全 - nt	20	<p>atgggcgtgctgctgacccagaggaccctgctgagcctgggctggccctgctgttt ccatctatggcatcgatggccgaggtccagctgcagcagctctgggactgtgctggc aaggcctggggcttcagtgaaagatgtcctgcaaggctctggctacaccttaccag ctactggatgactgggtaaacagaggcctggacagggctggaatggattggc gctattatcctggaaatagtgatactagctacaaccagaagtcaagggcaaggc caaactgactgcagtcacatccaccagcactgcctacatggagctcagcagcctg acaaatgaggactctgcggtctttactgtacacattactacggtagtgactatgctat ggactactggggcaaggaacctcagtcactgtctcctcaggtggaggcggttcag gcgagggtggctctggcggggcgatcgaaattgttctcaccagctccagca atcatgtctgcatctctaggggaacgggtcaccatgacctgcactgccagctcaagt gtaagttcagttacttgactggtagcagcagaagccaggatcctcccccactc tgatttatagcacatccaacctggctctggagtccagctcgttcagtgccagtg ggctctgggacctctactctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgtgcca cttattactgccaccagtatcatcgttccccacggacgttcggaggaccaccaagct ggaaatcaaactgacggccgcaattgaagttatgtatcctccttacctagacaat gagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacaccttgtccaagtc ccctatttccggaccttctaagccctttgggtgctgggtgggtgggtggagtctgg cttgctatagctgctagtaacagtgcccttattatttctgggtgaggagtaagagga gcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgccgccccgggccac ccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgacttcgcagcctatcgctcca gagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaa ccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggaca agagacgtggccgggacctgagatgggggaaagccgcagagaaggaaga accctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct acagtgagattgggatgaaaggcgagcggcggaggggcaaggggcacgatgg cctttaccaggtctcagtacagccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgc aggccctgccccctcgctaataaaagcttaacacgagcca</p>	10
VH (aa)	21	<p>M A E V Q G V E S G G G L V Q P K G S L K L S C A A S G F T F N T Y A M H W V C Q A P G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S Q S M L Y L Q M N N L K T E D T A M Y Y C V R E G V Y Y Y G S S G Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G</p>	20
VH CDR1 (aa)	22	GFTFNTYA	30
VH CDR2 (aa)	23	IRSKSNNYAT	40

【表 5】

VH CDR3 (aa)	24	VREGVYYYYGSSGYAMDY
VL (aa)	25	EIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGT SPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDA ATYYCQQRSSYPLTFGAPGKLELKRAA
VL CDR1 (aa)	26	SYMHWF
VL CDR2 (aa)	27	LWIYSTSNLA
VL CDR3 (aa)	28	QQRSSYPL
ScFv (aa)	29	M A E V Q G V E S G G G L V Q P K G S L K L S C A A S G F T F N T Y A M H W V C Q A P G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S Q S M L Y L Q M N N L K T E D T A M Y Y C V R E G V Y Y Y G S S G Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G G G G G S G G G G S G G G S E I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G T S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E D A A T Y Y C Q Q R S S Y P L T F G A P G K L E L K R A A
CAR2完全 - aa	30	M P R G W T A L C L L S L L P S G F M S L D N N G T A T P E L P T Q G T F S N V S T N V S Y Q E T T T P S T L G S T S L H P V S Q H G N E A T T N I T E T T V K F T S T S V I T S V Y G N T N S S V Q S Q T S V I S T V F T T P A N V S T P E T T L K P S L S P G N V S D L S T T S T S L A T S P T K P Y T S S S P I L S D I K A E I K C S G I R E V K L T Q G I C L E Q N K T S S C A E F K K D R G E G L A R V L C G E E Q A D A D A G A Q V C S L L L A Q S E V R P Q C L L L V L A N R T E I S S K L Q L M K K H Q S D L K K L G I L D F T E Q D V A S H Q S Y S Q K T L I A L V T S G A L L A V L G I T G Y F L M N R R S W S P T G E R L E L E P V D R V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P G N M G V L L T

10

20

30

40

【表 6】

		<p> Q R T L L S L V L A L L F P S M A S M A E V Q G V E S G G G L V Q P K G S L K L S C A A S G F T F N T Y A M H W V C Q A P G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S Q S M L Y L Q M N N L K T E D T A M Y Y C V R E G V Y Y Y G S S G Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S GGGGGSGGGGSGGGGSEIVLTQSPAIMSASPGEKVT ITCSASSSVSYMHWFQQKPGTSPKLWIYSTSNLASG VPARFSGSGSGTSSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSS YPLTFGAPGKLELKRAAI 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 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 Q 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 </p>	<p>10</p> <p>20</p> <p>30</p>
VH (nt)	31	<p> GACGCTTATCGATGGCCGAGGTGCAGGGGGTGGAGTCT GGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAAACTC TCATGTGCCGCCTCTGGTTTCACCTTCAATACCTATGCC A TGCACTGGGTCTGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAA TGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAA CATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCTC CAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAA CAACCTGAAAAGTGGAGACACAGCCATGTACTGTGT GAGAGAAGGGGTTTATTACTACGGTAGTAGTGGGTACTA TGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCTCAGGT </p>	<p>40</p>

【表 7】

VH CDR1 (nt)	32	GGTTTCACCTTCAATACCTATGCC	
VH CDR2 (nt)	33	ATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACA	
VH CDR3 (nt)	34	GTGAGAGAAGGGGTTTATTACTACCGGTAGTAGTGGGTAC TATGCTATGGACTAC	
VL (nt)	35	GAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT CTCCAGGGGAGAAGGTCACC ATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC TGGTTCCAGCAGAAG CCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCC AACCTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCT CTCACAATCAGCCGAATGGAG GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGT AGTTACCCCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGCGGCCGC	10
VL CDR1 (nt)	36	AGTTACATGCACTGGTTC	
VL CDR2 (nt)	37	CTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCT	20
VL CDR3 (nt)	38	CAGCAAAGGAGTAGTTACCCCTC	
ScFv (nt)	39	GACGCTTATCGATGGCCGAGGTGCAGGGGGTGGAGTCT GGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAAACTC TCATGTGCCGCCTCTGGTTTCACCTTCAATACCTATGCC ATGCACTGGGTCTGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGGA ATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCA ACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCT CCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGA ACAACCTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTG TGAGAGAAGGGGTTTATTACTACCGGTAGTAGTGGGTA ATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG TCTCCTCAGGTtctcaggtggaggcgggtcaggcggaggtggctggcg gtggcggatcgGAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCAT GTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC ATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC TGGTTCCAGCAGAAG CCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCC AACCTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCT CTCACAATCAGCCGAATGGAG GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGT AGTTACCCCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGCGGCCGC	30
CAR2完全 - nt	40	atgcctcgcggctggacagccctgtgcctgctgtctctgctgccatcc ggcttcatgagcctggataataacggcacagccaccccagagctgc	40

【表 8】

	<p>ctacacagggcaccttcagcaatgtgtccacaaacgtgagctatcag gagaccacaaccccttctaccctgggatccacaagcctgcaccccg gtctcagcacggcaacgaagccaccaccaacatcaccgagaccac agtgaagttfacctccacctctgtgattacctctgtgtacggaaataca actccagcgtgcagtctcagacatctgtgatctccacagtgtttacaac acctgccaatgtgtccaccccagagacaaccctgaagcccagcctg tctcctggaaatgtgtccgatctgtctaccacctccaccagcctggcca cctctcccaccaagccctatacctcctcttctcccacctgagcgatat caaagccgagatcaaatgcagcgggattcgggaagtgaactgaca cagggcatctgcctggaacagaataagacatccagctgcgccgagtt taagaaagatagaggagagggactggccaggggtgctgtgtggcga agagcaggccgacgccgatgccggcgcccaggtgtgttcctgctg ctggcccagctctgaggtgcgccccagctgctgctggtgctggc caatcggacagaaattagcagcaagctgcagctgatgaaaaaacac cagagcgatctgaaaaagctgggcatcctggactttaccgagcagg acgtggcctctcaccagagctacagccagaaaacactgatcgccct ggtgaccagcggagccctgctggccgtgctgggcatcaccggatatt tctgatgaatagggcgagctggagcccaccggcgagcggctgg agctggagcctgtcgaccgagtgaagcagaccctgaactttgatctg ctgaagctggccggcgacgtggagtccaaccccgggcccagggaat atgggcgtgctgctgaccagaggaccctgctgagcctggtgctgg ccctgctgtttccatctatggcatcgGACGCTTATCGATGGCC GAGGTGCAGGGGGTGGAGTCTGGTGGAGGATTGG TGCAGCCTAAAGGATCATTGAAACTCTCATGTGCC GCCTCTGGTTTCACCTTCAATACCTATGCCATGCAC TGGGTCTGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAAAT GGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTAT GCAACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATT CACCATCTCCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCT ATCTGCAAATGAACAACCTGAAAACCTGAGGACACA GCCATGTATTACTGTGTGAGAGAAGGGGTTTATTA</p>
--	---

10

20

30

40

【表 9】

	<p>CTACGGTAGTAGTGGGTACTATGCTATGGACTACT GGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGT tcctcaggtggagggcggttcagggcgaggtggctctggcggtggcg gatcgGAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCAT GTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC ATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACAT GCACTGGTTCCAGCAGAAG CCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGCAC ATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTA CTCTCTCACAATCAGCCGAATGGAG GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAG GAGTAGTTACCCCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGCGGCCG Caattgaagttatgtatcctcctccttacctagacaatgagaagagcaa tgaaccattatccatgtgaaagggaaacacctttgtccaagtccccta ttcccggaccttctaagccctttgggtgctgggtggtggtggtgagt cctggcttgctatagctgtagtaacagtggcctttattttctgggtg aggagtaagaggagcaggctcctgcacagtgactacatgaacatga ctccccgccgccccgggcccaccgcaagcattaccagccctatgc cccaccacgcgacttcgcagcctatcgctccagagtgaagttcagca ggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaaccagctc tataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtacgatgtttggac aagagacgtggccgggaccctgagatggggggaaagccgcagag aaggaagaaccctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagat aagatggcggaggcctacagtgagattgggatgaaaggcgagcgc cggaggggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtctcagtacag ccaccaaggacacctacgacgcccttcacatgcaggccctgcccc tcgctaataa</p>
--	--

10

20

30

40

【表 1 0】

VH* (aa)	41	MAEVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHW VKQRPQGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKAKLTAVTST STAYMELSSLTNEEDSAVFYCTHYGSDYAMDYWGQGTSVTI SSG	
VH CDR1* (aa)	42	TSYWMH	
VH CDR2* (aa)	43	WIGAIYPGNSDTS	10
VH CDR3* (aa)	44	THYYGSDYAMD	
VL* (aa)	45	QIVLTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKP GSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEAE DAATYYCHQYHRSPRTFGGGTKLEIKRAA	
VL CDR1* (aa)	46	SSSYLHWY	
VL CDR2* (aa)	47	LWIYSTSNLA	
VL CDR3* (aa)	48	HQYHRSPR	20
ScFv* (aa) (VH*)	49	MAEVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHW VKQRPQGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKAKLTAVTST STAYMELSSLTNEEDSAVFYCTHYGSDYAMDYWGQGTSVTI SSG S S G G G G S G G G G S G G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R V T M T C T A S S S V S S S Y L H W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H R S P R T F G G G T K L E I K R A A A	30
ScFv* (aa) (VL*)	50	M A E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G N S D T S Y N Q K F K G K A K L T A V T S T S T A Y M E L S S L T N E E D S A V F Y C T H Y Y G S D Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G G G G S G G G G S G G G G SQIVLTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQK PGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEA EDAATYYCHQYHRSPRTFGGGTKLEIKRAA	40

【表 1 2】

	<p>GGGACAGATC CAAGTTGGGA GCAGCTCTGC GTGCGGGGCC TCAGAGAATG AGGCCGGCGT TCGCCCTGTG CCTCCTCTGG CAGGCGCTCT GGCCCGGGCC GGGCGGCGGC GAACACCCCA CTGCCGACCG TGCTGGCTGC TCGGCCTCGG GGCCTGCTA CAGCCTGCAC CACGCTACCA TGAAGCGGCA GGCGGCCGAG GAGGCCTGCA TCCTGCGAGG TGGGGCGCTC AGCACCGTGC GTGCGGGCGC CGAGCTGCGC GCTGTGCTCG CGCTCCTGCG GGCAGGCCCA GGGCCCGGAG GGGGCTCAA AGACCTGCTG TTCTGGGTGC CACTGGAGCG CAGGCGTTCC CACTGCACCC TGGAGAACGA GCCTTTGCGG GGTTTCTCCT GGCTGTCTC CGACCCCGGC GGTCTCGAAA GCGACACGCT GCAGTGGGTG GAGGAGCCCC AACGCTCCTG CACCGCGCGG AGATGCGCGG TACTCCAGGC CACCGGTGGG GTCGAGCCCC CAGGCTGGAA GGAGATGCGA TGCCACCTGC GCGCCAACGG CTACCTGTGC AAGTACCAGT TTGAGGTCTT GTGTCCTGCG CCGCGCCCCG GGGCCGCCTC TAACTTGAGC TATCGCGCGC CCTTCCAGCT GCACAGCGCC GCTCTGGACT TCAGTCCACC TGGGACCGAG GTGAGTGCGC TCTGCCGGGG ACAGCTCCCG ATCTCAGTTA 1021 CTTGATCGC GGACGAAATC GGCGCTCGCT GGGACAAACT CTCGGGCGAT GTGTTGTGTC CCTGCCCCGG GAGGTACCTC CGTGCTGGCA AATGCGCAGA GCTCCCTAAC TGCCTAGACG ACTTGGGAGG CTTTGCCTGC GAATGTGCTA CGGGCTTCGA GCTGGGGAAG GACGGCCGCT 1201 CTTGTGTGAC CAGTGGGGAA GGACAGCCGA CCCTTGGGGG GACCGGGGTG CCCACCAGGC GCCCCCGGC CACTGCAACC AGCCCCGTGC CGCAGAGAAC ATGGCCAATC AGGGTGCACG</p>
--	--

10

20

30

40

【表 1 3】

		AGAAGCTGGG AGAGACACCA CTTGTCCCTG AACAAGACAA TTCAGTAACA TCTATTCCTG	
VH* (nt)	54	ATGGCCGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGACTGTGCT GGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGC AAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCAGCTACTGGATGCAC TGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGAT TGGCGCTATTTATCCTGGAAATAGTGATACTAGCTACAAC CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTG ACTGCAGTCACATCCACCAGCACTGCCTACATGGAGCTC AGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTTT TACTGTACACATTACTACGGTAGTGACTATGCTATGGACT ACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGTCTCC TCA	10
VH CDR1* (nt)	55	ACCAGCTACTGGATGCAC	
VH CDR2* (nt)	56	TGGATTGGCGCTATTTATCCTGGAAATAGTGATACTAGC	
VH CDR3* (nt)	57	ACACATTACTACGGTAGTGACTATGCTATGGAC	
VL* (nt)	58	CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT CTCTAGGGGAACGGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGC TCAAGTGTAAGTTCCAGTACTTGCCTGGTACCAGCAG AAGCCAGGATCCTCCCCAAACTCTGGATTTATAGCACA TCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGC AGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGC ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAG TATCATCGTTCCCCACGGACGTTCCGGTGGAGGCACCAA GCTGGAAATCAAACGTGCGGCCGC	20 30
VL CDR1* (nt)	59	AGTTCAGTACTTGCCTGGTAC	
VL CDR2* (nt)	60	CTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCT	
VL CDR3* (nt)	61	CCACCAGTATCATCGTTCCCCACGG	
ScFv* (nt)	62 (VH*)	ATGGCCGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGACTGTGCT GGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGC AAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCAGCTACTGGATGCAC TGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGAT TGGCGCTATTTATCCTGGAAATAGTGATACTAGCTACAAC CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTG ACTGCAGTCACATCCACCAGCACTGCCTACATGGAGCTC AGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTTT TACTGTACACATTACTACGGTAGTGACTATGCTATGGACT ACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGTCTCC TCATCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTC TGGCGGTGGCGGATCGcaaattgtctcaccagctctccagcaatcatgt ctgcatctctaggggaacgggtcaccatgacctgcactgccagctcaagtgaagtt	40

【表 1 4】

		ccagtacttgactggtaccagcagaagccaggatcctcccccactctggatt atagcacatccaacctggcttctggagctccagctcgcttcagtggcagtgggtctg ggaccttactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttatta ctgccaccagtatcatcgttccccacggacggttcggaggaggaccaagctggaa atcaaacgt	
ScFv* (nt)	63(VL*)	atggccgagggtccagctgcagcagtctgggactgtgctggcaaggcctggggcttc agtgaagatgtctgcaaggcttctggctacacctttaccagctactggatgactgg gtaaacagaggcctggacagggctggaatggattggcgctatttatcctggaat agtgatactagctacaaccagaagttcaagggcaaggccaaactgactgcagtc acatccaccagcactgcctacatggagctcagcagcctgacaaatgaggactctg cggcttttactgtacacattactacggtagtgactatgctatggactactggggctca ggaacctcagtcactgtcTCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGG AGGTGGCTCTGGCGGTGGCGGATCGCAAATTGTTCTCA CCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAAC GGGTCACCATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTT CCAGTTACTTGCCTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCT CCCCAAACTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTT CTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGG ACCTCTTACTCTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAA GATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCC CCACGGACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAA ACGTGCGGCCGC	10 20 30
ScFv* (nt)	64 (VH*VL *)	ATGGCCGAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGACTGTGCT GGCAAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCCTGC AAGGCTTCTGGCTACACCTTTACCAGCTACTGGATGCAC TGGGTAAAACAGAGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGAT TGGCGCTATTTATCCTGGAAATAGTGATACTAGCTACAAC CAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAACTG ACTGCAGTCACATCCACCAGCACTGCCTACATGGAGCTC AGCAGCCTGACAAATGAGGACTCTGCGGTCTTT TACTGTACACATTACTACGGTAGTGACTATGCTATGGACT ACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACTGTCTCC TCATCCTCAGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTC TGGCGGTGGCGGATCGCAAATTGTTCTCACCCAGTCTCC AGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGAACGGGTCCACCAT GACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCCAGTTACTT GCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAAC TCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCC CAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACT CTCTACAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCA CTTATTACTGCCACCAGTATCATCGTTCCCCACGGACGT	40

【表 1 5】

		TCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGTGCGGCC GC	
(G ₄ S) ₃ リンカー	65	GGGGSGGGGSGGGGS	
CD8αのヒンジ ドメイン	66	FVPVFLPAKP TTPAPRPPT PAPTIASQPL SLRPEACRPA AGGAVHTRGL DFACD	
短縮型IgG ヒンジ	67	AEPKSPDKTH TCP	10
リンカー配列	68	KDPK	
短縮型IgG ヒンジ + リンカー	69	AEPKSPDKTH TCPKDPK	
CD8α 膜貫通 ドメイン	70	IYIWAPLAGT CGVLLLSLVI TLYCNHRN	
CD28 膜貫通 ドメイン	71	FWVLVVGGV LACYSLLVTV AFIIFWV	20
CH2CH3ヒンジ	72	DPAEPKSPDK THTCPPCPAP ELLGGPSVFL FPPKPKDTLM ISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRV VSVLTVLHQD WLNGKEYKCK VSNKALPAPI EKTISKAKGQ PREPQVYTLF PSRDELTKNQ VSLTCLVKGF YPSDIAVEWE SNGQPENNYKTPPVLDSDG SFFLYSKLTV DKSRWQQGNV FSCSVMHEAL HNHYTQKSLS LSPGKDKPK	30
CD3ζドメイン	73	RVKFSRSADA PAYQQGQNQL YNELNLGRRE EYDVLDKRRG RDPENGGKPR RKNPQEGLYNELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGGHDGLY QGLSTATKDT YDALHMQALP PR	
4-1BBの 細胞内 ドメイン	74	RFSVVKRGRK KLLYIFKQPF MRPVQTTQEE DGCSCRFPEE EEGGCEL	40

【表 16】

ヒトCD28の 細胞内 ドメイン	75	RSKRSRLLHS DYMNMTPRRP GPTRKHYQPY APPRDFAAYR S		
OX40 (CD134) 共刺激 ドメイン	76	RDQRLPPDAH KPPGGGSFRT PIQEEQADAH STLAKI		
トランケート型 CD34分子 (nt)	77	atgcctcgcggctggacagccctgtgcctgctgtctctgctgccatccggctcatga gcctggataataacggcacagccaccccagagctgcctacacagggcacctca gcaatgtgtccacaaacgtgagctatcaggagaccacaacccctctaccctggg atccacaagcctgcaccccgtgtctcagcacggcaacgaagccaccaccaacat caccgagaccacagtgaagttacctccacctctgtgattacctctgtgtacggaaat acaaactccagcgtgcagtctcagacatctgtgatctccacagtggttacaacacct gccaatgtgtccaccccagagacaacccctgaagcccagcctgtctcctggaaatgt gtccgatctgtctaccacctccaccagcctggccacctctcccaccaagccctatac ctcctctctcccacctgagcgatataaagccgagatcaaatgcagcgggattcg ggaagtgaaactgacacagggcatctgcctggaacagaataagacatccagctg cgccgagtttaagaaagatagaggagagggactggccaggggtgtgtgtggcga agagcaggccgacgccgatgccggcgcccaggtgtgttccctgctgctggcccag tctgaggtgcgccccagtgctgtgctggtgtggccaatcggacagaaattag cagcaagctgcagctgatgaaaaaacaccagagcgatgaaaaagctgggca tcctggactttaccgagcaggacgtggcctctcaccagagctacagccagaaaac actgatcgccctgggtaccagcggagccctgctggccgtgctgggcatcaccggat attcctgatgaataggcgcagctggagccccaccggcgagcggctggagctgga gcctgtcgaccgagtgaagcagaccctgaactttgatctgctgaagctggccggcg acgtggagtccaaccccgggccagggaaatatggcgctgctgctgacctgagagga ccctgctgagcctgggtgctggccctgctgttccatctatggcatcg		10 20 30
トランケート型 CD34分子 (nt)	78	M P R G W T A L C L L S L L P S G F M S L D N N G T A T P E L P T Q G T F S N V S T N V S Y Q E T T T P S T L G S T S L H P V S Q H G N E A T T N I T E T T V K F T S T S V I T S V Y G N T N S S V Q S Q T S V I S T V F T T P A N V S T P E T T L K P S L S P G N V S D L S T T S T S L A T S P T K P Y T S S S P I L S D I K A E I K C S G I R E V K L T Q G I C L E Q	40	

【表 17】

		N K T S S C A E F K K D R G E G L A R V L C G E E Q A D A D A G A Q V C S L L L A Q S E V R P Q C L L L V L A N R T E I S S K L Q L M K K H Q S D L K K L G I L D F T E Q D V A S H Q S Y S Q K T L I A L V T S G A L L A V L G I T G Y F L M N R R S W S P T G E R L E L E P V D R V K Q T L N F D L L K L A G D V E S N P G P G N M G V L L T Q R T L L S L V L A L L F P S M A S	
CLEC14A プライマー	79	CTGGGACCGAGGTGAGTG	
CLEC14Aプローブ	80	CGCGATGCAAGTAACTGAGA	
フロチリン2プライマー	81	TGTTGTGGTTCGACTATAAACAG	
フロチリン2プローブ	82	GGGCTGCAACGTCATAATCT	
CLEC14A fwd プライマー	83	TAGTAGGAATTCGAGAGAATGAGGCCGGCGTTCCGCCCT G	
CLEC14A rev プライマー	84	AGAACCGCGGCCGCTGGAGGAGTCGAAAGCCTGAGGA GT	
マウス CLEC14A fwdプライマー	85	TAGTAGGAATTCGAGAGAATGAGGCCAGCGCTTGCCCT G	
マウス CLEC14A rev プライマー	86	CTACTAGCGGCCGCTCGTGGAAGAGGTGTGCGAAAGT	
ヒト CLEC14A fwd プライマー	87	TAGTAGTTAATTAAGAGAGAATGAGGCCGGCGTTCC	
マウス CLEC14A fwd プライマー	88	TAGTAGTTAATTAAGAGAGAATGAGGCCAGCGCTT	
ヒトfc rev プライマー	89	CTACTAGTTTAACTCATTACCCGGAGACAGGGA	
5' UTR Fwd	90	TTCCTTTTCCAGGGTTTGTG	
5' UTR rev	91	GCCTACAAGGTGGCTTGAAT	

10

20

30

40

【表 1 8】

CDS fwd	92	AAGCTGTGCTCCTGCTCTTG	
CDS rev	93	TCCTGAGTGCACCTGTGAGATG	
3' UTR fwd	94	CTGTAGAGGGCGGTGACTTT	
3' UTR rev	95	AGCTGCTCCCAAGTCCTCT	
mACTB fwd	96	CTAAGGCCAACCGTGAAAAG	
mACTB rev	97	ACCAGAGGCATACAGGGACA	
CD141 1-42 aa	98	MLGVLVLGALALAGLGFAPAEPQPGGSQCVEHDCFALYP GP	
CD141 97-108	99	QLPPGCGDPKRL	
CD141 122-142	100	TSYSRWARLDLNGAPLCGPL	
コドン最適化配列			
CRT3の ヒトコドン 最適化scFv ヌクレオチド 配列	101	ATGGCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCACCGTGCT GGCCAGGCCCGGAGCAAGCGTGAAGATGTCCTGCAAGG CCTCTGGCTACACCTTCAACAAGCTATTGGATGCACTGGG TGAAGCAGCGCCCAGGACAGGGCCTGGAGTGGATCGG AGCAATCTACCCCGGCAACTCCGACACCTCTTATAATCA GAAGTTCAAGGGCAAGGCCAAGCTGACAGCCGTGACCT CTACAAGCACCGCCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACC AACGAGGATAGCGCCGTGTTTTATTGCACACACTACTAT GGCTCCGACTACGCTATGGACTATTGGGGCCAGGGCAC CTCCGTGACAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGGCAGCGGA GGAGGAGGCTCCGGCGGGCGGCTCTCAGATCGTGC TGACCCAGAGCCCTGCCATCATGTCCGCCTCTCTGGGC GAGCGGGTGACAATGACCTGTACAGCCTCCTCTAGCGT GTCCTCTAGCTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCG GCTCCTCTCCTAAGCTGTGGATCTACAGCACCTCCAATC TGGCATCCGGCGTGCCTGCAAGGTTCTCTGGCAGCGGC TCCGGCACCTCTTACAGCCTGACAATCAGCAGCATGGAG GCAGAGGACGCAGCAACATACTATTGTACCAGTATCAC CGGAGCCCAAGAACCTTTGGCGGGCGGCACAAAGCTGGA GATCAAGCGGGCGGCCGCA	10
CRT3の マウスコドン 最適化scFv ヌクレオチド 配列	102	ATGGCCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGCACCGTGCT GGCTCGGCCCGGAGCTAGCGTGAAGATGTCCTGCAAGG CTTCTGGCTACACCTTCAACAAGCTACTGGATGCACTGGG TGAAGCAGCGCCCAGGACAGGGCCTGGAGTGGATCGG CGCCATCTACCCCGGAAACTCCGACACCTCTTACAACCA GAAGTTCAAGGGCAAGGCTAAGCTGACAGCCGTGACCT CTACAAGCACCGCTTACATGGAGCTGAGCAGCCTGACC AACGAGGATAGCGCCGTGTTTTACTGCACACACTACTAC GGCTCCGACTACGCTATGGATTACTGGGGACAGGGCAC CTCCGTGACAGTGTCTAGCGGAGGAGGAGGAAGCGGC GGAGGcGGCAGCGGAGGAGGAGGATCTCAGATCGTGTGCT GACCCAGTCTCCTGCTATCATGTCCGCCTCTCTGGGCGA GAGGGTGACAATGACCTGTACAGCCTCCTCTAGCGTGTGCT	20
			30
			40

【表 19】

		CTCTAGCTACCTGCACTGGTATCAGCAGAAGCCCGGCTC CTCTCCTAAGCTGTGGATCTACAGCACCTCCAACCTGGC TTCCGGAGTGCCTGCTCGGTTCTCTGGAAGCGGCTCCG GAACCTCTTACAGCCTGACAATCAGCAGCATGGAGGCTG AGGACGCCGCTACATACTACTGTCACCAGTACCACAGGA GCCCAAGAACCCTTTGGCGGAGGCACAAAGCTGGAGATC AAGAGGGCGGCCGCA	
CRT2の ヒトコドン 最適化scFv ヌクレオチド 配列	103	ATGGCAGAGGTGCAGGGAGTGGAGAGCGGAGGCCGGCC TGGTGCAGCCTAAGGGCTCCCTGAAGCTGTCTTGCGCC GCCAGCGGCTTACCTTTAACACATATGCAATGCACTGG GTGTGCCAGGCACCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGGTGG CACGGATCAGAAGCAAGTCCAACAATTATGCCACCTACT ATGCCGACAGCGTGAAGGATAGGTTTACAATCTCCCGC GACGATTCTCAGAGCATGCTGTACCTGCAGATGAACAAT CTGAAGACCGAGGACACAGCCATGTACTATTGCGTGCG GGAGGGCGTGTACTATTACGGCAGCTCCGGCTATTACG CTATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCAGCGTGACAGTG TCTAGCGGAGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTG GCGGGCGGCGGCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGTCCCC AGCAATCATGTCCGCCTCTCCAGGAGAGAAGGTGACCAT CACATGCTCCGCCTCCTCTAGCGTGTCTTATATGCACTG GTTCCAGCAGAAGCCCGGCACCTCTCCTAAGCTGTGGA TCTACAGCACATCCAATCTGGCATCCGGCGTGCCCGCAA GGTTTTCTGGCAGCGGCTCCGGCACCTCTTATAGCCTGA CAATCAGCCGGATGGAGGCAGAGGACGCAGCAACCTAT TACTGTCAGCAGAGATCCTCTTACCCTCTGACCTTTGGC GCCGGCACAAAGCTGGAGCTGAAGCGCGCGGCCGCA	10 20
CRT2の マウスコドン 最適化scFv ヌクレオチド 配列	104	ATGGCTGAGGTGCAGGGAGTGGAGAGCGGAGGAGGCC TGGTGCAGCCTAAGGGCTCCCTGAAGCTGTCTTGCGCC GCTAGCGGATTACCTTTAACACATACGCTATGCACTGG GTGTGCCAGGCTCCAGGAAAGGGCCTGGAGTGGGTGG CCAGGATCAGAAGCAAGTCCAACAACACTACGCTACCTACT ACGCCGACAGCGTGAAGGATCGGTTTACAATCTCCCGC GACGATTCTCAGAGCATGCTGTACCTGCAGATGAACAAC CTGAAGACCGAGGACACAGCTATGTACTACTGCGTGCG GGAGGGCGTGTACTACTACGGCAGCTCCGGATACTACG CTATGGACTACTGGGGACAGGGCACCTCCGTGACAGTG TCTAGCGGAGGAGGAGGCTCCGGAGGAGGAGGCTCTG GAGGCGGAGGCAGCGAGATCGTGCTGACCCAGTCTCCA GCTATCATGTCCGCCTCTCCCGGCGAGAAGGTGACCAT CACATGCTCCGCCTCCTCTAGCGTGTCTTACATGCACTG GTTCCAGCAGAAGCCCGGCACCTCTCCTAAGCTGTGGA TCTACAGCACATCCAACCTGGCTAGCGGAGTGCCCGCT CGGTTTTCTGGAAGCGGCTCCGGAACCTCTTACAGCCTG ACAATCTCCAGGATGGAGGCTGAGGACGCCGCTACATA CTACTGTCAGCAGAGATCCTCTTACCCTCTGACCTTTGG CGCCGGAACAAAGCTGGAGCTGAAGCGCGCGGCCGCA	30 40

【表 2 0】

CRT3変異体 (1及び2) 重鎖CDR1 (配列番号2 及び42)の コンセンサス	105	((GYTF)/X) TSYW ((MH)/X)	10
CRT3変異体 (1及び2) 重鎖CDR2 (配列番号3 及び43)の コンセンサス	106	((WIGA)/X)IYPGNSDT(S/X)	
CRT3変異体 (1及び2) 重鎖CDR3 (配列番号4 及び44)の コンセンサス	107	THYYGSDYAMD(Y/X)	20
CRT3変異体 (1及び2) 軽鎖CDR1 (配列番号6 及び46)の コンセンサス	108	((SSV)/X) SSSY ((LHWY)/X)	30
CRT3変異体 (1及び2) 軽鎖CDR2 (配列番号7 及び47)の コンセンサス	109	((LWIY)/X) STS ((NLA)/X)	40
CRT3変異体 (1及び2)軽鎖 CDR3(配列番号8 及び48)の コンセンサス	110	HQYHRSPR(T/X)	

【表 2 1】

マウスCD8αの ヒンジ及び 膜貫通領域を コードする ヌクレオチド 配列	111	actactaccaagccagtgctgCGaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatc tcagccccagagaccagaagattgtcggccccgtggctcagtgaaggggaccgg attggacttcgctgtgatattacatctgggcaccctggccggaatctgctggccc ttctgctgccttgatcatcactctcatctgctaccacaggagccga	10
マウスCD28 からの マウス細胞内 シグナリング 配列を コードする ヌクレオチド配列	112	aatagtagaaggaacagactcctcaaagtgactacatgaacatgactccccgga ggcctgggctcactcgaagccttaccagccctacgcccctgccagagactttgca gctaccgcccc	20
マウス4-1BB ドメインを コードする ヌクレオチド配列	113	aatggatcaggaaaaattccccacatattcaagcaaccatttaagaaga ccactggagcagctcaagaggaagatgctttagctgccgatgtccacag gaagaagaaggaggaggaggctatgag ctg	30
マウスCD3 ゼータ鎖を コードする ヌクレオチド配列	114	agagcaaaattcagcaggagtgcagagactgctccaacctgcaggacccaa ccagctctacaatgagctcaatctagggcgaagagaggaatagcgtcttgag aagaagcgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggaggagg aaccaccaggaaggcgtatacaatgcaactgcagaaagacaagatggcagaag cctacagtgagatcggcacaagaggcagagaggcggagaggcaaggggacg atggccttaccagggtctcagcactgccaccaaggacacctatgatgcctgcata tcagaccctggccc	40
マウスOX40 ドメインを コードする ヌクレオチド配列	115	cggaaggctggagattgcctaactcccaaacttgtggggaacagcttcag gaccccgatccaggaggaacacacagacgcacactttactctggccaagatc	40
マウスCD8α ヒンジ 及び 膜貫通領域、	116	ggaggaccaagctggaaatcaaacgtgCGGCGGcaactactaccaagccagt gctgCGaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagacca gaagattgtcggccccgtggctcagtgaaggggaccggattggacttcgctgtga tattacatctgggcaccctggccggaatctgctggcccttctgctgcttgatcatc actctcatctgctaccacaggagccgaaatagtagaaggaacagactcctcaa gtgactacatgaacatgactccccggaggcctgggctcactcgaagccttacc gccctacgcccctgccagagactttgcagcgtaccgcccagagcaaaattcagc	40

【表 2 2】

<p>CD28細胞内シグナリングドメイン及びCD3ζ細胞内シグナリングドメインをコードするヌクレオチド配列</p>		<p>aggagtgcagagactgctgccaacctgcaggacccaaccagctctacaatgagctcaatctagggcgaagagaggaatatgacgtcttgagaagaagcgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggagggaacccccaggaaggcgtatacaatgactgcagaaagacaagatggcagaagcctacagtgagatcggcacaagggcgagaggcggagaggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtcagcactgccaccaaggacacctatgatgcctgcatatgcagaccctggcccctcgctaataaaggcttaacacgagccatagatagaataaaag</p>	10
<p>マウスCD8αヒンジ及び膜貫通ドメイン、4-1BB細胞内シグナリングドメイン及びCD3ζ細胞内シグナリングドメインをコードするヌクレオチド配列</p>	117	<p>ggaggcaccaagctggaaatcaaactgggggcgcaactactaccaagccagtgctgcgaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagaccagaagattgtcgccccgtggctcagtgaggggaccggattggacttcgctgtgatattacatctgggcaccctggccggaatctgctggccctctgctgtccttgatcatctctcatctgctaccacaggagccgaaaatggatcaggaaaaattccccacatttcaagcaaccatttaagaagaccactggagcagctcaagaggaagatgctttagctgccgatgtccacaggaagaagaaggaggaggaggctatgagctgagagcaaaatcagcaggagtgcagagactgctgccaacctgcaggacccaacagctctacaatgagctcaatctagggcgaagagaggaatatgacgtcttgagaagaagcgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggaggagggaacccccaggaaggcgtatacaatgactgcagaaagacaagatggcagaagcctacagtgagatcggcacaaggcggagaggcggagaggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtcagcactgccaccaaggacacctatgatgcctgcatatgcagaccctggcccctcgctaataaaggcttaacacgagccatagatagaataaaag</p>	20
<p>マウスCD8αヒンジ及び膜貫通ドメイン、OX40細胞内シグナリングドメイン及びCD3ζ細胞内シグナリングドメインをコードするヌクレオチド配列</p>	118	<p>ggaggcaccaagctggaaatcaaactgggggcgcaactactaccaagccagtgctgcgaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagaccagaagattgtcgccccgtggctcagtgaggggaccggattggacttcgctgtgatattacatctgggcaccctggccggaatctgctggccctctgctgtccttgatcatctctcatctgctaccacaggagccgacggaaggcttgagattgcctaactcccaaacttggtgggaaacagcttcaggacccccgatccaggaggaacacacagacgcacactttactctggccaagatcagagcaaaatcagcaggagtgcagagactgctgccaacctgcaggacccaaccagctctacaatgagctcaatctagggcgaaagagaggaatatgacgtcttgagaagaagcgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggaggagggaacccccaggaaggcgtatacaatgactgcagaaagacaagatggcagaagcctacagtgagatcggcacaaggcggagaggcggagaggcaaggggcacgatggcctttaccaggggtcagcactgccaccaaggacacctatgatgcctgcatatgcagaccctggcccctcgctaataaaggcttaacacgagccatagatagaataaaag</p>	40

【表 2 3】

<p>マウスCD8α ヒンジ 及び 膜貫通ドメイン、 CD28 及び 4-1BB細胞内 シグナリング ドメイン 及び CD3ζ細胞内 シグナリング ドメインを コードする ヌクレオチド配列</p>	119	<p>ggaggcaccaagctggaaatcaaactgggggccgccaactactaccaagccagt gctgcgaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagacca gaagattgtcgccccgtggctcagtgaaggggaccggattggacttgcctgtga tattacatctgggacccttggccggaatctcgtggcccttctgctgtcctgatcatc actctcatctgctaccacaggagccgaaatagtagaaggaacagactcctcaaa gtgactacatgaacatgactccccggaggcctgggctcactcgaaagccttacca gccctacgcccctgccagagactttgcagcgtaccgccccaaatggatcaggaaa aaattccccacatattcaagcaaccattaagaagaccactggagcagctcaag aggaagatgctttagctgccgatgtccacaggaagaagaaggaggaggagga ggctatgagctgagagcaaaattcagcaggagtgcagagactgctccaacctg caggacccaaccagctctacaatgagctcaatctagggcgaagagaggaatat gacgtcttgagaagaagcgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagca gaggaggaggaacccccaggaaggcgtatacaatgactgcagaaagacaag atggcagaagcctacagtgagatcggcacaaaaggcgagaggcggagaggca aggggcacgatggccttaccagggtctcagcactgccaccaaggacacctatga tgcctgcatatgcagaccctggcccctcgctaataaaaggctaacacgagccata gatagaataaaag</p>	10 20
<p>マウスCD8α ヒンジ 及び 膜貫通ドメイン、 CD28 及び OX40細胞内 シグナリング ドメイン 及び CD3ζ細胞内 シグナリング ドメインを コードする ヌクレオチド配列</p>	120	<p>ggaggcaccaagctggaaatcaaactgggggccgccaactactaccaagccagt gctgcgaactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagacca gaagattgtcgccccgtggctcagtgaaggggaccggattggacttgcctgtga tattacatctgggacccttggccggaatctcgtggcccttctgctgtcctgatcatc actctcatctgctaccacaggagccgaaatagtagaaggaacagactcctcaaa gtgactacatgaacatgactccccggaggcctgggctcactcgaaagccttacca gccctacgcccctgccagagactttgcagcgtaccgccccggaaggcttgaga ttgcctaaaactccaaaccttgggggaaacagctcaggacccccgatccagga ggaacacacagacgcacacttactctggccaagatcagagcaaaattcagcag gagtgcagagactgctgccaacctgcaggacccccaccagctctacaatgagctc aatctagggcgaagagaggaatatgacgtcttgagaagaagcgggctcgggat ccagagatgggaggcaaacagcagaggaggaggaacccccaggaaggcgtat tacaatgactgcagaaagacaagatggcagaagcctacagtgagatcggcac aaaaggcagaggcggagaggcaaggggcacgatggccttaccagggtctca gactgccaccaaggacacctatgatgcctgcatatgcagaccctggcccctcg ctaataaaaggctaacacgagccatagatagaataaaag</p>	30 40

【表 2 4】

<p>マウスCD8α ヒンジ 及び 膜貫通ドメイン、 4-1BB 及び OX40細胞内 シグナリング ドメイン 及び CD3ζ細胞内 シグナリング ドメインを コードする ヌクレオチド配列</p>	<p>121</p>	<p>Ggaggcaccaagctggaatcaaacgtgggggccgcaactactaccaagccagt gctgCGAactccctcacctgtgcaccctaccgggacatctcagccccagagacca gaagattgtcgccccgtggctcagtgaggggaccggattggactcgctgtga tattacatctgggcacccttggccggaatctgcgtggcccttctgtgtcctgatcatc actctcatctgctaccacaggagccgaaaatggatcaggaaaaattccccaca tattcaagcaaccatttaagaagaccactggagcagctcaagaggaagatgcttgt agctgccgatgtccacaggaagaagaaggaggaggaggaggctatgagctgCG gaaggctggagattgCCTaacactccaaacctgttggggaaacagcttcagga ccccgatccaggaggaacacacagacgcacacttactctggccaagatcagag caaaattcagcaggagtgcagagactgtgccaacctgcaggacccccaccag cttacaatgagctcaatctagggcggaagagaggaatgatcgtcttgagaaga agcgggctcgggatccagagatgggaggcaaacagcagaggaggaggaacc cccaggaaggcgtatacaatgactgcagaaagacaagatggcagaagcctac agtgagatcgccacaaaaggcgagaggcgagaggcaaggggcacgatggc cttaccagggtctcagcactgccaccaaggacacctatgatgcctgcatatgcag acctggccccctgctaataaaggcttaacacgagccatagatagaataaaag</p>
--	------------	---

10

20

*は変異配列を示す

Xはアミノ酸が存在しないことを示す

【実施例】

【0427】

実施例

実施例 1 - C L E C 1 4 A 発現の分析

H U V E C の調製及び培養

ドナーのインフォームドコンセントを得た上で英国国民保健サービス (National Health Service) によって供与された臍帯からヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) を単離した。臍帯は、胎盤から解剖し、滅菌 P B S で静脈を洗浄して血液を除去した。M 1 9 9 培地 (Sigma) に希釈した 1 m g / m l のコラゲナーゼを静脈注射し、次に 3 7 °C で 2 0 分間インキュベートして内皮細胞を剥離させた。1 0 % F C S、1 0 % 大血管内皮細胞成長添加物 (TCS Cell Works)、及び 4 m M L - グルタミンを含有する M 1 9 9 完全培地で洗浄することによって H U V E C を収集し、ブタ皮膚 (Sigma) 由来の 0 . 1 % タイプ 1 ゼラチンをコートしたディッシュにプレティングした。

30

【0428】

初代細胞供給源

ヒト大動脈平滑筋細胞 (H A S M C) 及びヒト気管支上皮細胞 (H B E) は、TCS Cell Works から購入した。ヒト肺線維芽細胞 (M R C 5) は、英国癌研究所中央サービス (Cancer Research UK Central Services) から入手した。ヒト末梢血単核細胞 (P B M C) は、パーミンガム大学の癌研究所 (Institute of Cancer Studies) から入手した。ヘパトサイトは、パーミンガム大学免疫・感染学部 (School of Immunity and Infection, University of Birmingham) の David Adams 教授から供与いただいた。

40

【0429】

R N A 抽出及びリアルタイム P C R

培養下の初代細胞から TRI 試薬 (Sigma) を用いて全 R N A を単離し、続いて High-Capacity cDNA Archive キット (Applied Biosystems) を使用して供給されたランダムプライマーで c D N A を合成した。C L E C 1 4 A 発現の一次細胞スクリーニングには ProbeLibra

50

リアルタイムPCRアッセイシステム (Exiqon) を利用した。CLEC14Aの発現を正規化するハウスキーピング遺伝子としてフロチリン2を選択した。CLEC14A及びフロチリン2のプライマー及びプローブセットは、ProbeFinderソフトウェア (Roche) によって設計した。CLEC14Aについて、プライマー及びプローブセットは、以下であった：

5' - CTGGGACCGAGGTGAGTG - 3' (配列番号79)、及び

5' - CGCGATGCAAGTAAGTGAAG - 3' (配列番号80)、プローブ番号24を伴う。

【0430】

フロチリン2について、プライマー及びプローブは、以下であった：

5' - TGTGTGTGGTTCCGACTATAACAAG - 3' (配列番号81)、及び

5' - GGGCTGCACCGTTCATAATCT - 3' (配列番号82)、プローブ番号28を伴う。Rotor-Gene RG3000サーマルサイクラー (Corbett Research) で定量的PCR反応を実施した。反応混合物は各初代細胞型につきトリプリケートで調製し、各反応に5 ngのcDNAを加えた。変化倍数は、Ct法を用いて計算した。

【0431】

HUVEC免疫蛍光法

ガラスマイクロウェルチャンバ (Nunc) 内でHUVECを成長させて、氷冷メタノールで固定し、PBSTで洗浄し、PBST中10% FCS 3% BSAでブロックした。次に、パラフィン包埋切片に用いるのと同じプロトコルに従い細胞をCLEC14A抗体で染色し、又はミラノのFire分子腫瘍学研究所のMaria Grazia Lampugnani教授から供与いただいた、ヒトVE-カドヘリンに対する5 g/mマウスモノクローナルIgG抗体と共染色した。切片染色を510レーザー走査共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss) で分析した。

【0432】

結果

図1は、HUVEC及び他の初代細胞におけるCLEC14Aの相対発現を示すグラフである。CLEC14Aは内皮細胞で特異的に発現した。これは、CLEC14Aが内皮特異的であるという以前の知見を裏付けている。

【0433】

CLEC14A特異的プローブを用いて固形腫瘍及び正常組織の切片におけるCLEC14Aの発現を調べた。ヒト卵巣、膀胱、肝臓、乳房、結腸、直腸、食道、腎臓、肺、前立腺、胃、膵臓及び甲状腺腫瘍組織においてCLEC14A発現を免疫蛍光法により測定した。CLEC14A発現の内皮特異性が、内皮細胞上にある特定のフコース残基に結合するハリエニシダ (*Ulex europaeus*) 凝集素I (UEAI) との共局在によって確認された。CLEC14A発現は、分析した全ての腫瘍組織の血管に見られた。卵巣、膀胱、肝臓、乳房、腎臓及び前立腺腫瘍はCLEC14A発現が強陽性であった一方、胃、食道、肺、結腸、直腸、膵臓及び甲状腺腫瘍組織は、より低い特異的CLEC14A発現レベルを示した。対応する正常対照 (非腫瘍) 組織のいずれにもCLEC14A発現は検出されなかった。

【0434】

まとめると、これらの結果は、膜貫通タンパク質CLEC14Aが腫瘍血管構造に特異的に発現し、従って腫瘍内皮マーカーとして使用し得ることを実証している。

【0435】

実施例2：インビトロ及びインビボでのCLEC14A機能の分析

材料及び方法

試薬

ウエスタンブロッティング及び免疫沈降用；一次抗体：ヒツジポリクローナル抗ヒトCLEC14A (R&D systems)、マウスモノクローナル抗ヒトチューブリン (Sigma)；二次抗体：西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) コンジュゲートヤギポリクローナル抗マ

10

20

30

40

50

ウスIgG (Dako)、HRPコンジュゲートロバポリクローナル抗ヒツジIgG (R&D systems)。免疫蛍光法用；一次抗体：ウサギポリクローナル抗マウスPECAM (Santa Cruz)；二次抗体：Alexa Fluor488コンジュゲートロバポリクローナル抗ウサギ (Invitrogen)。フローサイトメトリー用；一次抗体：マウスモノクローナル抗HAタグ (CRUK)、マウスモノクローナル抗CLEC14A (C2、C4、以下に記載)；二次抗体：Alexa Fluor488コンジュゲートヤギポリクローナル抗マウスIgG (Invitrogen)。

【0436】

タンパク質産生用；レンチウイルスプラスミドpsPAX2 (レンチウイルスパッケージング；Addgene)、pMD2G (エンベローププラスミド；Addgene) 及びpWPI hCLEC14A-ECD-Fc (IRES - EGFP含有レンチウイルス哺乳類発現プラスミド；Addgene) を使用した。clec14a IMAGEクローン (Origene) からpcDNA3-Fcプラスミドへの初期PCRサブクローニングによってpWPI hCLEC14A-Fc及びmCLEC14A-Fcを作成した。使用したプライマーは以下のとおりであった：ヒトCLEC14Aフォワード5' TAGTAGGAATTCGAGAGAGATGAGGCCCGCGCTTCGCCCTG3' (配列番号83)；ヒトCLEC14Aリバーズ5' AGAACCGCGCGCGCTGGAGGAGTCGAAAGCCCTGAGGAGT3' (配列番号84)；マウスCLEC14Aフォワード5' TAGTAGGAATTCGAGAGAGAAATGAGGCCAGCGCTTGCCCTG3' (配列番号85)；マウスCLEC14Aリバーズ5' CTACTAGCGGCGCGCTCGTGGAGAGAGGTGTCGAAAGT3' (配列番号86)。

【0437】

EcoR1及びNot1制限部位を用いてCLEC14Aを挿入した。更なるPCRサブクローニングラウンドを実施してCLEC14A-Fc融合物をpWPIにトランスファーした。使用したプライマーは、以下のとおりであった：

ヒトCLEC14Aフォワード

5' TAGTAGTTAATTAAGAGAGAAATGAGGCCCGCGCTTC3' (配列番号87)；

マウスCLEC14Aフォワード

5' TAGTAGTTAATTAAGAGAGAAATGAGGCCAGCGCTT3' (配列番号88)；

ヒトFcリバーズ

5' CTACTAGTTTAAACTCATTTACCCGGAGACAGGGA3' (配列番号89)。

【0438】

このステップには、Pac1及びPme1制限部位を使用した。

【0439】

ヒト臍帯静脈内皮細胞を先述のとおり単離した。臍帯は、インフォームドコンセントを得てバーミンガム・ウィメンズ・ヘルスケア (Birmingham Women's Health Care) NHSトラストから入手した。継代1~6代目間のHUVECを使用し、10%ウシ胎仔血清 (PAA)、1%ウシ脳抽出物、90 µg/mlヘパリン、及び4 mM L-グルタミン、100 U/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシン (Invitrogen) を含有するM199完全培地 (cM199) で培養し、0.1%ブタ皮膚由来タイプ1ゼラチンでコートしたプレートに播種した。HEK293T細胞は、10%ウシ胎仔血清 (PAA)、4 mM L-グルタミン、100 U/mlペニシリン及び100 µg/mlストレプトマイシン (Invitrogen) を含有するDMEM (Sigma) 完全培地 (cDMEM) で培養した。

【0440】

HUVECにおけるsiRNAトランスフェクションを先述のとおり実施した。HEK293T細胞において、上記のレンチウイルスパッケージング、エンベロープ及び発現プラスミドによる一過性トランスフェクションによりレンチウイルスを作製した。プラスミドをOptiMEM (Invitrogen) 中においてポリエチレンイミン (36 µg/ml) と1:4

の比において室温で10分間インキュベートした後、cDME M中のHEK293T細胞に加えた。培地上清を使用して新鮮なHEK293T細胞を形質導入した。GFP陽性HEK293T細胞を選別し、タンパク質産生に使用した。pHL-Avitag3 hMMRN2を使用した上記のとおりポリエチレンイミン-過性トランスフェクションにより、HEK293T細胞におけるMMRN2の発現を実現した。

【0441】

定量的PCR

High-Capacity cDNA Archiveキット (Applied Biosystems) を使用して、1 μg の抽出全RNAからcDNAを調製した。RG-3000 (Corbett/Qiagen、Manchester、英国) サーマサイクラーでExpress qPCR supermix (Invitrogen) を用いてqPCR反応を実施した。ヒトclec14a及びフロチリン-2のプライマーは先述のとおりであった。マウスclec14a 5' UTR、CDS及び3' UTR並びにマウスアクチンのプライマーは以下のとおりである：5' UTRフォワード - TTCCTTTTCCAGGGTTTGTTG (配列番号90)；5' UTRリバーズ - GCCTACAAGGTGGCTTGAAT (配列番号91)；CDSフォワード - AAGCTGTGCTCCTGCTCTTG (配列番号92)；CDSリバーズ - TCCTGAGTGC ACTGTGAGATG (配列番号93)；3' UTRフォワード - CTGTAGAGGGCGGTGACTTT (配列番号94)；3' UTRリバーズ - AGCTGCTCCCAAGTCCCTCT (配列番号95)；mACTBフォワード - CTAAGGCCAACCGTGAAAAG (配列番号96)；mACTBリバーズ - ACCAGAGGCATACAGGGACA (配列番号97)。

10

20

【0442】

効率調整した数学的モデルに従い相対発現比を計算した。

【0443】

ウエスタンブロッティング及び免疫沈降

全細胞タンパク質ライセートを作製し、共免疫沈降実験を 2×10^7 個のHUV ECからタンパク質を抽出して実施した。CLEC14A相互作用タンパク質の初回の単離には、5 μg CLEC14A-Fc又は等モル量のhFcを使用した。内因性免疫沈降実験には、0.4 μg 抗CLEC14A抗体又はヒツジIgGを使用した。遮断実験には、5 μg CLEC14A-Fc又はhFcをPBS中でプロテインGビーズに一晩結合させた。ビーズは、20% FCS (PAA) 含有PBS中で5~6時間ブロックした。結合したCLEC14A-Fc又はhFcタンパク質を結合緩衝液中の漸増濃度のmIgG又は抗CLEC14A抗体 (CRT-2、以下に記載する) で一晩ブロックした。ウエスタンブロッティング及びSDS-PAGEには標準プロトコルを用いた。一次抗体は、対応するHRPコンジュゲート二次抗体と共に本文中に指示するとおり使用した。

30

40

【0444】

フローサイトメトリー

細胞を細胞解離緩衝液 (Invitrogen) で剥離し、PBSでリンスした後、ブロッキング緩衝液 (PBS、3% BSA、1% NaN₃) 中で15分間インキュベートした。続いて、ブロッキング緩衝液中の10 μg/ml抗HAタグ (CRUK)、一次抗体としての10 μg/ml抗CLEC14A (CRT-2、以下に記載する) を使用して30分間染色する。細胞をPBSでリンスし、ブロッキング緩衝液中のAlexa Fluor488コンジュゲートヤギポリクローナル抗マウスIgG (Invitrogen) で染色した。データ (15, 000イベント/試料) は、FACSCalibur装置 (Becton Dickinson、オックスフォード、英国) を使用して収集し、結果は、Becton Dickinson Cell Questソフトウェアで分析した。

【0445】

HUV ECスフェロイド発芽アッセイ及びインビトロマトリゲルチューブ形成アッセイ

HUV ECスフェロイドの作成及び内皮発芽の誘導をコラーゲンゲル中スフェロイド当たり1000個のHUV ECを使用して実施した。包埋後16時間で定量化を実施した。新芽成長を定量化するため新芽の数をカウントし、累積新芽長さ及び最大新芽長さを評価

50

した。2色発芽実験のため、H U V E Cをオレンジ色及び緑色のCellTracker色素 (Invitrogen) で予め標識した。24時間後、スフェロイドを4%ホルムアルデヒドで固定し、Vectorshield (Vector labs) でマウントした。Axioskop2顕微鏡及びAxioVision SE64 Rel 4.8ソフトウェア (Zeiss、ケンブリッジ、英国) でスライドを画像化した。

【0446】

マトリゲルチューブ形成アッセイについて、 1.4×10^5 個のH U V E Cを12ウェルプレート内の70 μ l 基底膜抽出物 (Matrigel、BD Bioscience、オックスフォード、英国) に播種した。16時間後、USB 2.0 2M Xliデジタルカメラ (XL Imaging LLC、キャロルトン、TX、米国) を備えたLeica DM 1L顕微鏡 (Leica、ミルトン・キーンズ、英国) を10倍の倍率で使用して1ウェル当たり5視野の画像を撮った。NIHウェブサイト (<http://imagej.nih.gov/ij/macros/toolsets/Angiogenesis%20Analyzer.txt>) で利用可能である、Image J用の血管新生アナライザープラグイン (Carpentier G. et al., Angiogenesis Analyzer for ImageJ. 4th ImageJ User and Developer Conference proceedings) で画像を分析した。

【0447】

タンパク質産生

C L E C 1 4 A - F cを発現するH E K 2 9 3 T細胞から培養培地 (C M) を回収した。C MをHiTrapプロテインA H Pカラム (GE healthcare、Amersham、英国) に流し、0~100%グラジエントの100 mMクエン酸ナトリウム (pH 3) を用いてタンパク質を溶出させた後、1 M トリス塩基で中和した。画分をS D S - P A G上で泳動させて、クーマシー染色及びウエスタンブロッティングによりタンパク質純度及び特異性に関して評価した。機能アッセイ前に、同様の濃度のタンパク質を含有する画分を合わせ、P B Sで透析した。

【0448】

モノクローナル抗体作成

マウスモノクローナル抗体は、Serotec Ltd (オックスフォード、英国) により、本発明者らが提供したトランスを破綻させるための以下のプロトコルを用いて商業的に調製された。精製マウスC L E C 1 4 A - F c融合タンパク質をフロイント完全アジュバント中50 μ gで皮下投与した。2週間後、マウスに更なる50 μ gを皮下投与したが、このときにはフロイントアジュバント中であった。マウスを殺処分し、2週間後の融合のために脾臓を摘出した。

【0449】

c l e c 1 4 a - / - マウスの作成

マウスはバーミンガム生物医学サービスユニット (Birmingham Biomedical Services Unit) (バーミンガム、英国) で飼育した。C L E C 1 4 A欠失カセットを含有するC 5 7 B L / 6 N VGB6フィーダー依存胚性幹細胞 (Clec14atm1(KOMP)Vlbg; プロジェクト番号V G 1 0 5 5 4) をノックアウトマウスプロジェクト (Knockout Mouse Project) (カリフォルニア大学、デイビス、米国) から調達した。バーミンガム大学のトランスジェニックマウス施設において胚性幹細胞をアルビノC 5 7 B L / 6マウスに注射することによってキメラマウスが作成され、C 5 7 B L / 6雌と交配することにより、カセットに関してヘテロ接合のマウスが作成された。

【0450】

大動脈リング及びマウス皮下スポンジ血管新生アッセイ

大動脈を分離し、コラーゲン中での大動脈リングアッセイ用に処理した。管/新芽成長、最大内皮遊走及び全内皮成長を定量化した。0日目、雄C 5 7黒色マウスの各側腹部の背側皮下に皮下滅菌ポリエーテルスポンジディスク (10 x 5 x 5 mm) を植え込んだ。隔日で14日間にわたり、皮膚から100 μ l b F G F (40 ng/ml; R&D systems) をスポンジに直接注入した。14日目にスポンジを摘出し、10%ホルマリンで固定してパラフィン包埋した。切片をヘマトキシリン・エオシンで染色し、細胞侵入分析のため、USB 2.0 2M Xliデジタルカメラ (XL Imaging LLC、キャロルトン、TX、米国) を備

10

20

30

40

50

えたLeica MZ 16顕微鏡 (Leica、ミルトン・キーンズ、英国) を1倍の倍率で使用してスポンジ断面を撮った。Leica DM E顕微鏡 (Leica、ミルトン・キーンズ、英国) によって40倍の倍率で取得された画像を血管密度に関して分析した。1スポンジ当たり各切片につき5視野で血管カウントを評価した。全ての動物実験は、RBが保有する内務省認可番号PPL 40/3339に基づき行われた。

【0451】

腫瘍移植アッセイ

10⁶個のルイス肺癌細胞を8~10週齢の雄マウスの側腹部に皮下注射した。腫瘍成長を毎日ノギスで計測することによりモニタし、2~4週間成長させた後、腫瘍質量を重量で決定し、4% PFAで固定し、パラフィン包埋して、6 μmの連続切片を切り出した。

10

【0452】

CLEC14Aは、インビトロで発芽血管新生を調節する

インビトロでの発芽血管新生におけるCLEC14Aの役割を調べるため、clec14aを標的とするsiRNA又は非相補的siRNA二重鎖で処置したHUVECからHUVECスフェロイドを作成した。clec14a発現のノックダウンが、qPCRによってmRNAレベルで(3つの実験で平均74%の低下)(図2A)、及び抗CLEC14Aポリクローナル抗血清でプローブしたタンパク質抽出物のウエスタンブロット分析によってタンパク質レベルで(図2B)確認された。CLEC14AノックダウンスフェロイドからのVEGF誘導性の発芽が妨げられ、ノックダウンスフェロイドは、スフェロイド当たり平均6.9個の新芽を生じ、それに対して対照細胞では13.2個であった(図2C及び図2D)。先端/柄細胞形成におけるCLEC14Aの役割を決定するため、対照HUVEC及びノックダウンHUVECを赤色又は緑色のいずれかで染色して混合した後、スフェロイドを形成し、発芽を誘導した(図2E)。CLEC14Aのノックダウンにより、先端位置にある細胞の割合(33%)は、対照細胞(67%)と比較して減少したが、しかしながら、CLEC14AノックダウンHUVECに由来した柄細胞の割合に何らの効果もなかった(図2F)。これらのデータは、CLEC14Aが新芽の惹起及び遊走において役割を有することを示唆している。

20

【0453】

CLEC14Aは、インビボで発芽血管新生を調節する

CLEC14Aのインビボ及びエキソビボでの役割を調べるため、マウスを作成してclec14aコード配列をlacZレポーターに置き換えた(図3A)。ヘテロ接合体(clec14a^{-/+})の交配により、等しい割合の雄マウス及び雌マウス(それぞれ49.5%/50.5%)及び野生型:ヘテロ接合体:ホモ接合体マウス(それぞれ26.4%:47.2%:26.4%)のメンデル比が生じた。clec14aは内皮限定遺伝子であるため、clec14a^{+/+}及びclec14a^{-/-}マウスから大動脈を分離した。抽出したcDNAをqPCRによって分析して、clec14aコード領域が欠損しているものの、5'及び3'非翻訳領域の発現は保持されていることが確認された(図2B)。タンパク質レベルでのCLEC14Aの欠損も肺組織ライセートのウエスタンブロット分析によって確認された(図3C)。

30

40

【0454】

多細胞三次元共培養下での発芽血管新生におけるCLEC14Aの役割を確認するため、大動脈を分離し、大動脈リングに切断し、コラーゲンに包埋した。VEGFによって細胞成長を刺激し、7日間にわたってモニタした後、内皮発芽のエンドポイント定量化を行った。この場合にも、CLEC14Aの欠損によって内皮の新芽成長及び遊走が妨げられた(図3D)。野生型マウスの大動脈リングでは、CLEC14Aノックアウトマウスにおける観察と比較して2倍を超える数の管が生じた(それぞれ30.6本の管に対して13.4本の管)(図3E)。加えて、各大動脈リングから最も離れて遊走した距離によって定義される最大遊走量もノックアウト培養物では低下した(図3F)。CLEC14Aがインビボで同様の機能を有するかどうかを評価するため、CLEC14Aノックアウト

50

マウスの皮下にスポンジパレルを植え込んだ。2週間にわたる2日毎のスポンジへのbFGF注射を用いて細胞浸潤及び新血管新生を刺激した。ヘマトキシリン・エオシン染色したスポンジ切片の肉眼的分析により、c1ec14a^{-/-}動物ではスポンジへの細胞の浸潤が妨げられたことが明らかになった(図3G及び図3H)。加えて、c1ec14a^{-/-}動物について血管増生が有意に低下した($p < 0.01$)(図3I)。このモデルにおいて血管新生によって生じた血管の内側を覆う内皮細胞がc1ec14aを発現することを確認するため、CLEC14A KOマウスのスポンジ及び肝臓をx-galで染色した。対応する肝切片と比較してスポンジ内の血管にx-gal強染色が観察された(図3J)。これらのデータから、本発明者らは、マウスCLEC14A発現がインビボで且つインビトロでも内皮遊走及び血管新生発芽を調節し、及び発芽内皮でCLEC14Aが上方制御されると結論付けることができる。

10

【0455】

CLEC14Aは、腫瘍成長を促進する

CLEC14A発現は、健常組織の血管と比較してヒト腫瘍血管で高度に上方制御されることが認められ、CLEC14Aに対して癌療法を標的化し得ることが示唆される。従って、CLEC14Aの欠損が腫瘍成長に効果を及ぼすかどうかを調べるため、本発明者らは、同系ルイス肺癌(LLC)モデルを使用した。そのため、 1×10^6 個のLLC細胞をc1ec14a^{+/+}又はc1ec14a^{-/-}マウスのいずれかの右側腹部に皮下注射した。c1ec14a^{-/-}マウスでは、c1ec14a^{+/+}同腹仔と比較して腫瘍成長が低下した(図4A)。これは、3つの独立した実験によって確認された。c1ec14a^{-/-}マウスから取った摘出腫瘍は、c1ec14a^{+/+}同腹仔と比べてサイズが小さく(図4B)、重量が軽かった(図4C)。これらの腫瘍内の血管密度も影響を受けたかどうかを決定するため、抗CD31抗体で組織切片を染色した。分析によれば、個々の血管の密度の低下(図4D及び図4E)及びパーセンテージ内皮被覆率の低下(図4F)が示される。更には、c1ec14a^{-/-}マウスから採取した腫瘍及び肝臓切片のx-gal染色により、赤血球が充満した管腔を有する成熟血管(図4G、黒色の矢印)と、腫瘍内の未熟微小血管(図4G)との両方におけるc1ec14aの高発現が明らかであり、腫瘍血管でc1ec14aが上方制御されることが確認される。

20

【0456】

実施例3：抗CLEC14Aモノクローナル抗体の調製及び血管新生に対するその効果
モノクローナル抗体の調製

モノクローナル抗体の調製に使用した抗原は、任意選択でアジュバントタンパク質(AP)とコンジュゲートした、マウスCLEC14AFc(CM)及びヒトCLEC14A-Fc(CH)であった。これらの4つの抗原(CM、CH、CM-AP、CH-AP)を、以下のプロトコルを用いたマウス免疫に使用した。

日 操作

- 0 免疫前試料を採取
完全フロイントアジュバント中100ugの抗原の免疫(足蹠)
- 14 不完全フロイントアジュバント中100ugの抗原の免疫(足蹠)
- 17 試験採血
- 18 融合用の膝窩リンパ節採取

40

【0457】

血清は、3つの抗原：CM、CH及びFcに対してELISAによって試験した。陰性対照として非免疫血清をとった。

【0458】

融合プロトコルは、以下のとおりであった：

- (1) 免疫マウスから膝窩リンパ節を採取し、ホモジナイズした。
- (2) 温かいDMEMで細胞を洗浄した。
- (3) 細胞をsp2/0骨髓腫細胞と混合した。

50

- (4) この混合物を遠心した(1000g)。
- (5) このペレットを50%PEG500に懸濁し、1分間インキュベートした。
- (6) この懸濁液を温かいDMEMでゆっくりと希釈した。
- (7) 懸濁液を遠心した(1000g)。
- (8) 細胞を腹膜マクロファージと共にプレートに播種した。
- (9) 細胞を37及び5%CO₂で培養した。

【0459】

各マウスから500個超のHAT耐性ハイブリドーマクローンを得た。クローン上清は、全て3つの吸収抗原(CM、CH及びFc)に対するELISAによって4日の間隔を置いて2回試験した。試験の結果、5つのクローンが得られ、そのうちの2つ、CRT-2及びCRT-3(両方ともサブクラスIgG1)を更に試験し、それらは、CM及びCHの両方と反応することが示され、且つFcと反応しなかった。限界希釈法によって陽性を2~4回クローニングし、培養フラスコ内で増殖させて、腹水のためにマウスに注射した。一方のクローン(CRT-3)がCLEC14aヒト-AP(CHAP)による免疫の結果であり、及び他方のクローン(CRT-2)がCLEC14aマウス-AP(CM-AP)による免疫の結果であった。

10

【0460】

CLEC14Aモノクローナル抗体による引っ掻き傷治癒アッセイ

10µlピペットの先端でコンフルエントなHUVECに引っ掻き傷を付けた。CLEC14Aの細胞外ドメインに対してマウス体内で産生された1µg/ml又は10µg/mlのモノクローナルCLEC14A抗体を含有する新しい培地を加えた。時点0、4、6、12時間における創傷閉鎖の画像をLeica DM 1000光学顕微鏡及びUSB 2.0 2M Xliカメラで取得することにより、HUVECの化学遊走性を評価した。Image Jソフトウェアを用いて創傷の開口面積を定量化した。

20

【0461】

CLEC14A阻害薬が血管新生を阻害する能力を調べた。上記に記載されるモノクローナル抗体を用いた引っ掻き傷治癒アッセイは、この抗CLEC14Aモノクローナル抗体がHUVEC引っ掻き傷治癒アッセイにおいて内皮細胞遊走を阻害することを示している。図5A及び図5Bに示すとおり、HUVECを10g/mlのモノクローナル抗体CRT-3で処置したとき、対照における13%と比較して、12時間の時点で創傷面積の25%が開いたままであった。

30

【0462】

これらの結果は、抗CLEC14Aモノクローナル抗体CRT-3が内皮細胞遊走に対して阻害効果を有することを示している。内皮細胞遊走は、血管新生の本質的特徴である。従って、これらのアッセイは、本発明のモノクローナル抗体が血管新生を直接阻害することのエビデンスを提供する。

【0463】

CLEC14A抗体処置が内皮細胞に及ぼす機能的効果を更に特徴付けるため、20µg/mlのCRT2、CRT3又はCRT4で処置したHUVECによりチューブ形成アッセイを実施した。CRT2及びCRT3による処置は、細管長さ及びジャンクションの数の有意な減少をもたらした。CRT2処置は、1視野当たりの網目面積も有意に減少させた。これらの結果は、CRT2、3及び4が全て、チューブ形成に異なる負の効果を及ぼすことを示している。

40

【0464】

実施例4：抗CLEC14Aモノクローナル抗体の特徴付け

本発明のモノクローナル抗体の結合部位をマッピングするため、様々なポリペプチドコンストラクトを作成して細胞で発現させた。全てのコンストラクトがC末端GFPTagを有するため、緑色の細胞をゲーティングし、赤色で染色した。CRT抗体の結合は、フローサイトメトリーを用いて分析した。

【0465】

50

図7Aは、CRT-2及びCRT-3の両方が、CLEC14Aを発現する細胞に結合することを示し、及び図7Bは、これらの抗体が、トロンボモジュリンを発現する細胞に結合しないことを実証している。

【0466】

トロンボモジュリン(CD141)のC型レクチンドメイン(CTLD)とCLEC14A分子の残りの部分とを含むキメラを作製した。この抗原を発現する細胞は、CRT抗体のいずれによっても認識されず(図8A)、但しCRT-2では蛍光の僅かなシフトが観察された。Sushi様ドメインがトロンボモジュリン(CD141)のSushi様ドメインに置き換えられているCLEC14A(CLEC14AのCTLDの正しい折り畳みを確認するため)を含むキメラも作成しており、これは、CRT-3の結合をもたらすが、CRT-2の結合をもたらさない(図8B)。両方のCRT抗体ともWT CLEC14Aに結合し、且つ予想どおりいずれもWT CD141に結合しない(図7)。

【0467】

これらのデータは、抗体CRT-3の結合部位がC型レクチンドメイン内にあり、CRT-2がCTLDとsushi様ドメインとの間の領域で結合することを示唆している。

【0468】

抗体の結合領域を更に決定するため、キメラループコンストラクトを作製した。これは、CLEC14A CTLDの構造予測に基づいた。

【0469】

CD141の領域1~42を含むCLEC14A
 CD141配列 - MLGVLVLGALLAGLGFPAEPPQPGGSQ
 CVEHDCFALYPGP(配列番号98)
 CD141の領域97~108を含むCLEC14A
 CD141配列 - QLPPGCGDPKRL(配列番号99)
 CD141の領域122~142を含むCLEC14A
 CD141配列 - TSYSRWARDLNGAPLCGPL(配列番号100)

【0470】

アラインメントを図9に示す。残念ながら、1~42及び122~142キメラは、正しく折り畳まれなかった。これは、それらが細胞表面上に存在することに起因するものと思われる(CLEC14Aポリクローナル抗体に関して染色陽性、しかし、これらは、抗体のいずれに関しても染色されない)。

【0471】

97~108キメラは、CRT-2及びCRT-3と結合し、この突然変異体が正しく折り畳まれることを示す。残基97~108をトロンボモジュリンの対応する領域とスワップした。この結果、CRT-2及びCRT-3がなおも結合できるように正しい折り畳みが生じた(図8C)。これらのデータは、CRT-2及びCRT-3がCLEC14Aの残基97~108に結合しないことを示唆している。

【0472】

この実験を3回繰り返し、同じ結果が得られた。

【0473】

CRT-2及びCRT-3コード配列をそのそれぞれのハイブリドーマから標準的な技法を用いてクローニングし、シーケンシングした。CDRは標準的なソフトウェアを用いて予測されている。ポリペプチド及びヌクレオチド配列は、以下の表に記載する。予測ソフトウェアの違いを踏まえて、CDR変異体を含めた配列変異体も示す(「*」の印を付す)。

【0474】

10

20

30

40

【表 2 5】

CRT-3		
配列名 (配列タイプ)	配列 番号	配列
VH CDR1 (aa)	2	GYTFTSYW
VH CDR2 (aa)	3	IYPGNSDT
VH CDR3 (aa)	4	THYYGSDYAMDY
VH CDR1* (aa)	42	TSYWMH
VH CDR2* (aa)	43	WIGAIYPGNSDTS
VH CDR3* (aa)	44	THYYGSDYAMD
VL CDR1 (aa)	6	SSVSSSY
VL CDR2 (aa)	7	STS
VL CDR3 (aa)	8	HQYHRSPRT
VL CDR1* (aa)	46	SSSYLHWY
VL CDR2* (aa)	47	LWIYSTSNLA
VL CDR3* (aa)	48	HQYHRSPR
VH (aa)	1	M A E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G N S D T S Y N Q K F K G K A K L T A V T S T S T A Y M E L S S L T N E D S A V F Y C T H Y Y G S D Y A M D Y W G Q G T S V T V
VH* (aa)	41	MAEVQLQQSGTVLARP GASVKMSCKASGYTFTSYWMHW VKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKAKLTAVTST STAYMELSSLTNEDSAVFYCTHYGSDYAMDYWGQGTSVTI SSG
VL (aa)	5	Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R V T M T C T A S S S V S S S Y L H W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G

10

20

30

40

【 0 4 7 5 】

【表 2 6】

		S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H R S P R T F G G G T K L E I K R A A A	
VL* (aa)	45	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQKP GSSPKLWYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSSYSLTSSMEAE DAATYYCHQYHRSPRTFGGGTKLEIKRAA	
ScFv (aa)	9	M A E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G N S D T S Y N Q K F K G K A K L T A V T S T S T A Y M E L S S L T N E D S A V F Y C T H Y Y G S D Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R V T M T C T A S S S V S S S Y L H W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H R S P R T F G G G T K L E I K R A A A	10 20
ScFv* (aa)	49 (VH*)	MAEVQLQQSGTVLARPASVKMSCKASGYTFTSYWMHW VKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKAKLTAVTST STAYMELSSLTNEDSAVFYCTHYGSDYAMDYWGQGTSVTI SSGSSSGGGGSGGGGSGGGGSSQI VLTQSPAIMSASLGERVTMTCT ASSSVSSSYLHWYQQKPGSSPK LWIYSTSNLASGVPARFSGSGS GTSYSLTSSMEAEADAATYYCH QYHRSPRTFGGGTKLEIKRAA	30
ScFv* (aa)	50 (VL*)	M A E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G N S D T S Y N Q K F K G K A K L T A V T S T S T A Y M E L S S L T N E D S A V F Y C T H Y Y G S D Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G G G G S G G G G S	40

【表 2 7】

		G G G G SQIVLTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQK PGSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEA EDAATYYCHQYHRSPRTFGGGTKLEIKRAA	
ScFv* (aa)	51 (VH*VL)	MAEVQLQQSGTVLARPGASVKMSCKASGYTFTSYWMHW VKQRPGQGLEWIGAIYPGNSDTSYNQKFKGKAKLTAVTST STAYMELSSLTNEDESAVFYCTHYGSDYAMDYWGQGTSTVTI SSG S S G G G G S G G G G S G G G S QIVLTQSPAIMASASLGERVTMTCTASSSVSSSYLHWYQQK GSSPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEA DAATYYCHQYHRSPRTFGGGTKLEIKRAA	10
VH CDR1 (nt)	12	ggctacaccttaccagctactgg	20
VH CDR2 (nt)	13	atctatcctggaaatagtgatact	
VH CDR3 (nt)	14	acacattactacggtagtgactatgctatggactac	
VL CDR1 (nt)	16	tcaagtgaagttccagttac	
VL CDR2 (nt)	17	agcacatcc	30
VL CDR3 (nt)	18	caccagtatcatcgttccccacggacg	
VHC(nt)	11	atggccgaggctcagctgcagcagctctgggactgtgctggcaaggcctggggcttc agtgaagatgtcctgcaaggcttctggctacaccttaccagctactggatgactgg gtaaacagaggcctggacagggctggaatggattggcgctattatcctggaaat agtgatactagctacaaccagaagttcaagggaaggccaaactgactgcagtc acatccaccagcactgcctacatggagctcagcagcctgacaaatgaggactctg cggctctttactgtacacattactacggtagtgactatgctatggactactggggctca ggaacctcagtcactgtc	40

【 0 4 7 7 】

【表 2 8】

VL (nt)	15	caaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctctaggggaacgggtca ccatgacctgcactgccagctcaagtgaagtccagttactgactggtaccagc agaagccaggatcctccccaaactctggattatagcacatccaacctggcttctg gagtcccagctcgctcagtgaggcagtggtctgggaccttactctcacaatcag cagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccaccagtatcatcggtcccc acggacggtcggaggcaccagctggaaatcaaact	10
ScFv (nt)	19	atggccgaggccagctgcagcagctctgggactgtgctggcaaggcctggggctc agtgaagatgtcctgcaaggctctggctacacctttaccagctactggatgactgg gtaaacagaggcctggacagggctggaatggattggcgctattatcctggaaat agtgatactagctacaaccagaagttcaagggcaaggccaaactgactgcagtc acatccaccagcactgcctacatggagctcagcagcctgacaaatgaggactctg cggcttttactgtacacattactacggtagtgactatgctatggactactggggctca ggaacctcagtcactgtctcctcaggtggaggcgggtcaggcggagggtgctctgg cggtgccggtcgcgaaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctta ggggaacgggtcaccatgacctgactgccagctcaagtgaagttccagttactg cactggtaccagcagaagccaggatcctccccaaactctggattatagcacatc caacctggcttctggagtcccagctcgctcagtgaggcagtggtctgggacctttac tctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgccaccag tatcatggtccccacggacggtcggaggcaccagctggaaatcaaactgctgc ggccgca	20
CRT-2			30
配列名 (配列タイプ)	配列 番号	配列	
VH CDR1 (aa)	22	GFTFNTYA	
VH CDR2 (aa)	23	IRSKSNNYAT	
VH CDR3 (aa)	24	VREGVYYYYGSSGYAMDY	40
VL CDR1 (aa)	26	SYMHWF	
VL CDR2 (aa)	27	LWIYSTSNLA	
VL CDR3 (aa)	28	QQRSSYPL	
VH (aa)	21	M A E V Q G V E S G G G L V Q P K G S L K L S C A A S G F T F N T Y A M H W V C Q A P G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y Y A D	

【表 29】

		S V K D R F T I S R D D S Q S M L Y L Q M N N L K T E D T A M Y Y C V R E G V Y Y Y G S S G Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G	
VL (aa)	25	EIVLTQSPAIMSASPGEKVTITCSASSSVSYMHWFQQKPGT SPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRMEAEDA ATYYCQQRSSYPLTFGAPGKLELKRAA	10
ScFv (aa)	29	M A E V Q G V E S G G G L V Q P K G S L K L S C A A S G F T F N T Y A M H W V C Q A P G K G L E W V A R I R S K S N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S Q S M L Y L Q M N N L K T E D T A M Y Y C V R E G V Y Y Y G S S G Y Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G G G G G S G G G G S G G G G S E I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T I T C S A S S S V S Y M H W F Q Q K P G T S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S R M E A E D A A T Y Y C Q Q R S S Y P L T F G A P G K L E L K R A A	20
VH CDR1 (nt)	32	GGTTTCACCTTCAATACCTATGCC	
VH CDR2 (nt)	33	ATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAACA	
VH CDR3 (nt)	34	GTGAGAGAAGGGGTTTATTACTACGGTAGTAGTGGGTAC TATGCTATGGACTAC	
VL CDR1 (nt)	36	AGTTACATGCACTGGTTC	
VL CDR2 (nt)	37	CTCTGGATTTATAGCACATCCAACCTGGCT	30
VL CDR3 (nt)	38	CAGCAAAGGAGTAGTTACCCCTC	
VH (nt)	31	GACGCTTATCGATGGCCGAGGTGCAGGGGGTGGAGTCT GGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAACTC TCATGTGCCGCTCTGGTTTCACCTTCAATACCTATGCC A TGCACTGGGTCTGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGAA TGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCAA CATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCTC CAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGAA CAACCTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGT GAGAGAAGGGGTTTATTACTACGGTAGTAGTGGGTA TGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGT CTCCTCAGGT	40
VL (nt)	35	GAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCAT CTCCAGGGGAGAAGGTCACC ATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC TGGTTCCAGCAGAAG CCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCC	

【表 3 0】

		AACCTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCT CTCACAATCAGCCGAATGGAG GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGT AGTTACCCCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGCGGCCGC	
ScFv (nt)	39	GACGCTTATCGATGGCCGAGGTGCAGGGGGTGGAGTCT GGTGGAGGATTGGTGCAGCCTAAAGGATCATTGAAACTC TCATGTGCCGCTCTGGTTTACCTTCAATACCTATGCC ATGCACTGGGTCTGCCAGGCTCCAGGAAAGGGTTTGGGA ATGGGTTGCTCGCATAAGAAGTAAAAGTAATAATTATGCA ACATATTATGCCGATTCAGTGAAAGACAGATTCACCATCT CCAGAGATGATTCACAAAGCATGCTCTATCTGCAAATGA ACAACCTGAAAACCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTG TGAGAGAAGGGGTTTATTACTAAGGTAGTAGTGGGTA ATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCG TCTCCTCAGGTtccctcaggtggaggcggttcaggcggagggtggctctggcg gtggcggatcgGAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCAT GTCTGCATCTCCAGGGGAGAAGGTCACC ATAACCTGCAGTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTACATGCAC TGGTTCCAGCAGAAG CCAGGCACTTCTCCCAAACCTCTGGATTTATAGCACATCC AACCTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACCTCTTACTCT CTCACAATCAGCCGAATGGAG GCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAAAGGAGT AGTTACCCCTCACGTTCCGGT GCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAACGTGCGGCCGC	10 20 30

【 0 4 8 0 】

実施例 5：抗 C L E C 1 4 A モノクローナル抗体の抗原結合ドメインベースのキメラ抗原受容体の設計及び分析

C A R コンストラクトの作成

ヒト型及びマウス型のタンパク質と交差反応する C L E C 1 4 A 特異的モノクローナル抗体を発現するハイブリドーマを上記に記載されるとおり入手した。次にマウスハイブリドーマの各々から、あらゆるマウス V 遺伝子ファミリーを増幅するように設計された縮重プライマーセットを用いた R T - P C R により、s c F v をコードする遺伝子コンストラクトを単離した。次に、以前記載されている 2 つの C A R ベクター pMP71.tCD34.2A.CD19 及び pMP71.tCD34.2A.CD19.IEV (Cheadle et al, J.Immunol., 2014, 192(8), 3654-65) に C l a I、N o t I 断片として s c F v 遺伝子をサブクローニングして、C D 1 9 特異的 s c F v 領域を置き換えた。これらのベクターは、当初、M P 7 1 レトロウイルス発現プラスミド (C. Baum、Hannover からの供与) を用いて構築されたものであり、トランケート型 C D 3 4 マーカー遺伝子を共発現した。

【 0 4 8 1 】

ヒト及びマウス T 細胞の形質導入

ヒト T 細胞の形質導入用の組換えレトロウイルスを作成するため、FuGENE HD (Roche) を製造者の指示に従い使用して Phoenix アンホトロピックパッケージング細胞に M P 7 1 レトロウイルスベクター及び pCL amphi (Imgenex) をトランスフェクトした。マウス T 細

10

20

30

40

50

胞の形質導入用の組換えレトロウイルスを同じように、但しPhoenixエコトロピックパッケージ細胞及びpCL ecoを使用して作成した。lymphoprep (Axis Shield、オスロ、ノルウェイ)でヘパリン添加血液から密度勾配遠心法によってヒト末梢血単核細胞 (P B M C) を単離した。標準培地 (10%ウシ胎仔血清 (F B S ; PAA、Pasching Austria)、2 mM L - グルタミン、100 IU / ml ペニシリン、及び100 pg / ml ストレプトマイシンを含有するR P M I 1640 (Sigma)) + 1%ヒトA B血清 (TCS Biosciences、バッキンガム、英国)を使用して、抗C D 3抗体 (O K T 3、eBioscience ; 30 ng / ml)、抗C D 28抗体 (R&D Systems ; 30 ng / ml) 及びインターロイキン - 2 (I L 2 ; 300 U / ml ; Chiron、エメリービル、C A) を使用してP B M Cを予め48時間活性化させた。マウスT細胞の形質導入は、標準培地中のコンカナバリンA (2 ug / ml ; Sigma) 及びマウスインターロイキン7 (1 ng / ml ; eBioscience) で予め48時間活性化させたマウス脾細胞を使用して行った。予め活性化させたヒト及びマウスT細胞を、続いて製造者の指示に従いretronectin (Takara) をコートしたプレートにおいてスピネクションにより形質導入した (又は非トランスフェクトphoenix細胞からの馴化上清でモック形質導入した)。次に、ヒトT細胞をI L 2 (100 U / ml) 含有標準培地 + 1%ヒトA B血清中で培養した。スピネクション後、マウスT細胞は、I L 2 (100 U / ml) 含有標準培地で24時間培養し、次にlymphoprep (Axis Shield) を使用して精製した。指示がある場合、形質導入細胞は、抗C D 3 4 マイクロビーズ (Miltenyi Biotec、独国) を製造者の指示に従い使用して免疫磁気分離法によりエンリッチした。ヒトドナーによる研究は国立研究倫理局委員会ウェストミッドランド州 (National Research Ethics Service Committee West Midlands) (Solihull) によって承認されたものであり、全てのドナーから書面によるインフォームドコンセントを得た。

10

20

【0482】

細胞株及び組換えタンパク質

10%ウシ胎仔血清 (F B S ; PAA、Pasching Austria)、2 mM L - グルタミン、100 IU / ml ペニシリン、及び100 pg / ml ストレプトマイシンを含有するダルベッコ変法イーグル培地 (D M E M) 中にPhoenix A又はE、C H O及びルイス肺癌細胞を維持した。C H O細胞は、完全長ヒトC L E C 14 Aを発現するpWPIベクター (Addgene) (又はベクター単独) を形質導入したものであった。上述のとおり、インフォームドコンセント及びサウスパーミンガム研究倫理委員会の倫理承認を得た上でパーミンガム・ウイメンズ・ヘルスケアN H Sトラストから入手した臍帯を使用してヒト臍帯静脈内皮細胞 (H U V E C) を単離した。H U V E Cは、10% F B S、4 mM L - グルタミン、10%大血管内皮細胞成長添加物 (TCS Cellworks) を含有するM 199完全培地に維持し、0.1%ブタ皮膚由来タイプ1ゼラチン (Sigma) をコートしたプレートにおいて培養した。ヒトF c タグを有するヒト及びマウスC L E C 14 Aタンパク質をH E K 293T細胞で発現させてプロテインAカラムで精製した。

30

【0483】

フローサイトメトリー

H U V E Cをトリプシン処理し、5%正常ヤギ血清 / P B S 中の上記に記載したC L E C 14 A特異的マウスモノクローナル抗体 (10 ug / ml) 又はI g G 1アイソタイプ対照 (Dako) によって氷上で1時間染色した。細胞を洗浄し、R - P E コンジュゲートヤギ抗マウス抗体 (Serotec) とインキュベートすることにより結合抗体を検出した。ヨウ化プロピジウムで染色することにより死細胞を同定した。ヒトT細胞をP B Sで洗浄し、Live/Dead Fixable Violet死細胞染色キット (Life Technologies) によって暗所下20分間染色した。次に、細胞をフロー緩衝液 (P B S 中0.5% w / v B S A + 2 mM E D T A ; p H 7.2) で洗浄し、抗ヒトC D 4 (P E コンジュゲート)、抗ヒトC D 8 (F I T C コンジュゲート) (全てBD Pharmingenから) 及び抗ヒトC D 3 4 (P e - C y 5) (BioLegend) によって暗所下氷上で30分間染色した。代替的に、C D 3 4に関して染色するのではなく、むしろ、初めに細胞をヒトF c 断片 (10 ug / ml) でブロックし、次にそれらの細胞を10 ug / ml 組換えヒトC L E C 14 A - F c 融合タンパク

40

50

質（又はFc対照）と共に、続いてヒツジ抗CLEC14Aポリクローナル抗体（R&D systems、10 μ g/ml）と共にインキュベートすることにより、CAR発現を直接検出した。最後に細胞をFITCコンジュゲートウサギ抗ヒツジ抗体（Invitrogen、1:10希釈）によって染色した。インキュベーションは、全て氷上で1時間行った。

【0484】

ヘパリン添加尾採血からのマウスT細胞を染色する場合、それらは、初めにBD Pharm Lyse（Becton Dickinson）を使用して赤血球溶解に供してから上記に記載したとおり染色し、但し抗マウスCD4-FITC、CD8-PE及びCD45.1（PE-Cy7コンジュゲート）（全てBD Biosciences）を使用した。細胞は、BD LSR IIフローサイトメーター及びFlowJoソフトウェア（TreeStar Inc、アシュランド、OR）を使用して分析した。

10

【0485】

CFSE 標識

T細胞をPBSで2回洗浄し、2.5 μ Mカルボキシフルオレセインスクシンイミジルエステル（CFSE）と37 $^{\circ}$ Cで10分間インキュベートした。10%FBSを含有するRPMI-1640を加えることにより標識反応をクエンチした。細胞を洗浄し、標準培地+1%ヒトAB血清及びIL2（10IU/ml）に1.5 \times 10⁶細胞/mlで再懸濁し、10:1のT細胞:HVEC比が得られるようにHVECが入ったウェルに加えた。37 $^{\circ}$ C/5%CO₂で5日間インキュベートした後、細胞を上記に記載したとおり抗ヒトCD34（PE-Cy5）を用いたフローサイトメトリーによって分析した。

20

【0486】

IFN 放出アッセイ

刺激細胞（2.5 \times 10⁴/ウェル）をCD34+ CAR-T細胞と指示する応答細胞：刺激細胞比においてトリプリケートで共培養した。代替的に、組換えタンパク質（1 μ g/ml）をプレコートしたウェルにおいて2 \times 10⁴個のCD34+ CAR-T細胞をインキュベートした。IL2（25U/ml）を補足した100 μ l/ウェルの標準培地中、37 $^{\circ}$ C/5%CO₂で細胞をインキュベートした。18時間後、ELISA（Pierce Endogen、ロックフォード、IL）を製造者の指示に従い用いて培養上清を分泌IFN γ に関して試験した。

30

【0487】

細胞傷害性アッセイ

クロム遊離アッセイを既知のエフェクター：標的比（1250標的/ウェル）でセットアップし、7.5時間後に回収した。

【0488】

毒性試験

6~8週齢C57BL/6マウス（Charles River Laboratories）に4Gyの全身照射（TBI）を行った。18時間後、各マウスに、CD45.1+コンジュニックBoyJマウスからの2 \times 10⁷個のCAR形質導入又はモック形質導入T細胞調製物を尾静脈注射した。毒性の徴候に関してマウスをモニタし、及び週1回の尾採血によって免疫モニタリングを行った。マウスは、最終的に45日後に殺処分し、組織学的分析のために主要臓器を摘出した。

40

【0489】

RIP Tag 2 トランスジェニックマウス腫瘍モデル

RIP-Tag 2マウスは、膵島細胞発癌モデルである。C57BL/6Jバックグラウンド（The Jackson Laboratory）でRIP-Tag 2マウスを維持した。凍結保存したCAR形質導入及びモック形質導入T細胞を解凍し、洗浄し、前日に4Gy TBIでコンディショニングしておいた12週齢のマウスに1500万T細胞/マウスを一度に尾静脈に静脈内注射した。12週齢から、全てのRIP-Tag 2マウスに50%糖分食（Harlan Teklad）を摂らせて、インスリン分泌腫瘍によって誘導される低血糖を軽減した。殺処分したCAR-T細胞処置マウスの全腫瘍量を16週齢でノギスを使用して定量化し

50

て、個別に摘出した肉眼的腫瘍 (> 1 mm³) を、式：容積 = $a \times b^2 \times 0.52$ (式中、 a 及び b は、腫瘍のそれぞれ長い方の直径及び短い方の直径を表す) を用いて計測した。各マウスの全ての腫瘍の容積を加えて動物 1 匹当たりの総腫瘍量を求めた。未処置 R i p T a g 2 マウスが 16 週まで生存しないため、16 週 C A R 処置マウスの年齢対照比較はなく、従って、比較は、14 週齢モック処置マウスと行った。

【0490】

ルイス肺癌 (L L C) マウスモデル

6 ~ 8 週齢雌 C 5 7 B L 6 マウスの側腹部に 10^6 個の L L C 細胞を皮下接種した。3 日後、マウスは、4 G y T B I を受け、その 18 時間後、各マウスに C D 4 5 . 1 + コンジェニック B o y J マウスからの 2×10^7 個の C A R 又はモック T 細胞調製物を尾静脈注射した。ノギス (式：容積 = 長さ \times 幅 \times 0.5 を使用) 及び生物発光イメージング (IVIS Spectrum、Caliper Life Sciences) によって腫瘍成長を計測した。週 1 回の尾採血により免疫モニタリングを行った。

【0491】

組織調製及び免疫蛍光分析

マウス実験からの組織を O C T (Bio Optica) に包埋し、ドライアイスで凍結して - 80 で保存した。組織調製及び組織学的分析は、以下の一次抗体を用いて行った：精製ラットモノクローナル抗汎内皮細胞抗原 (550563、クローン Meca32、BD Pharmingen、米国)、1 : 100 希釈；ウサギモノクローナル抗切断型カスパーゼ 3 (asp175、クローン 5A1、Cell Signaling、米国)、1 : 100 希釈；ウサギポリクローナル抗フィブリノゲン (A0080、Dako)、1 : 100 希釈；及びウサギモノクローナル抗 C D 3 4 (ab174720、Abcam) 1 : 50 希釈；ヒツジポリクローナル抗 C L E C 1 4 A (AF4968、R&D) 1 : 50 希釈。インキュベートして洗浄した後、試料を二次抗体抗ウサギ Alexa Fluor-488 及び Alexa Fluor-555；抗ラット Alexa Fluor-488 及び Alexa Fluor-555；及び抗ヒツジ Alexa Fluor-488 (Molecular Probes) とインキュベートし、D A P I 核酸染色 (Invitrogen) で対比染色した。C A R 形質導入 T 細胞を検出するため、P B S 中に 1 : 50 希釈したウサギモノクローナル抗 C D 3 4 (ab174720、Abcam) で組織を染色した。インキュベートして洗浄した後、試料を抗ウサギ Alexa Fluor-555 (Molecular Probes) で染色し、D A P I で対比染色した。

【0492】

ヒト腫瘍組織アレイ (SuperBiochips Inc.、ソウル、韓国) を 1 : 20 希釈のヒツジポリクローナル抗 C L E C 1 4 A (AF4968、R&D systems) 及びローダミンにコンジュゲートしたハリエニシダ (Ulex europaeus) 凝集素 I (Vectorlabs、英国) を用いて 1 時間、続いて抗ヒツジ F I T C 抗体 (10 μ g / ml、Invitrogen、英国) を用いて染色した。

【0493】

R i p T a g 2 腫瘍組織の分析のため、血管が占有する表面積を、Meca32 陽性構造が占有する面積として ImageJ ソフトウェアによって定量化し、D A P I によって可視化された総組織面積と比較した。各動物につき少なくとも 4 視野 / 画像の総血管面積を定量化した。各画像におけるフィブリノゲン溢出量 (赤色のチャンネル) を決定するため、本発明者らは、各血管 (Meca32、緑色チャンネル) の近くに関心領域 (R O I) を描き、次に Leica 共焦点ソフトウェアヒストグラム定量化ツール (Confocal Software Histogram Quantification Tool) を使用して赤色及び緑色チャンネルの平均蛍光強度 (M F I) を定量化した。得られた血管本数の値を正規化するため、本発明者らは、赤色チャンネル M F I と緑色チャンネル M F I との比を計算した。値は、赤色 - 緑色共染色に対するパーセンテージとして表す。各分析画像におけるカスパーゼ 3 (緑色チャンネル) の発現レベルを決定するため、本発明者らは、同じサイズの 5 つのランダムな R O I を検討した。次に、本発明者らは、緑色チャンネルの M F I を計測し、及び本発明者らは、カスパーゼ 3 染色面積を組織範囲に存在する全細胞と比較することにより値を正規化した。各試料につき、1 処置群当たり 5 匹のマウスの少なくとも 10 画像を分析した。Leica TCS SP2 AOBs 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (Leica Microsystems) を使用して R i p T a g 2 マウスからの組織を

10

20

30

40

50

分析した。他の全ての組織は、Axiovert 100Mレーザー走査型共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss、ウェリン・ガーデン・シティ、英国) を使用して分析した。

【0494】

統計分析

データの統計分析は、指示する検定及びGraphPad Prismソフトウェアを用いて行った。p値 < 0.05を有意と見なした。

【0495】

結果

トランケート型CD34マーカー遺伝子とscFv断片/CD3鎖キメラ受容体とを共発現するレトロウイルスCARベクター (pMP71ベース) を作成した。発現は、LTRプロモーターからドライブされ、2AペプチドリンカーがCD34及びCARの両方の等モル発現を確実にする。第2世代CARコンストラクトは、CD28共刺激ドメインを含んだ (図10を参照されたい)。

10

【0496】

図10Bは、フローサイトメトリーによって分析したCD34染色が、CLEC14A特異的CARを共発現するレトロウイルスコンストラクトを使用したT細胞の形質導入の成功を実証したことを示している。抗体CRT3ベースの第1世代CARは、CRT3.zと称される。抗体CRT3ベースの第2世代CARは、CRT3.28zと称される。CD4及びCD8 T細胞サブセットにおいて同等な発現が見られたことに留意されたい (データは示さず)。

20

【0497】

図10Cは、CLEC14A-Fcを用いてCARの発現に関して直接染色した細胞を示す (%値は、Fc単独によるバックグラウンド染色を差し引いたCLEC14A-Fcの特異的結合を示す)。

【0498】

図11は、インビトロでCLEC14Aに応答したCAR形質導入T細胞を示す。抗体CRT3ベースの第1世代又は第2世代CARを発現するように形質導入したT細胞又はモック形質導入 (対照) T細胞について、(A) プレート結合組換えFc融合タンパク質として発現するか、(B) 操作されたCHO細胞上に発現するか、又は(C) 静置培養で成長したときにCLEC14Aを天然に発現するヒト臍帯静脈内皮細胞 (HVEC) 上に発現するかのいずれかのCLEC14Aに対するその応答能力を試験した。T細胞応答は、インターフェロン産生に関してELISAを用いて計測した。図11に示すデータは、3~7つの反復実験から得られた代表的なものである。T細胞は、トランス遺伝子発現細胞の頻度が等しくなるように調整した。ヒストグラムは、全て平均応答+SDを示す。

30

【0499】

図12は、CLEC14A特異的CARを形質導入したT細胞の更なるインビトロ機能試験を示す。抗体CRT-3ベースの第1世代又は第2世代CARを発現するように形質導入したT細胞、又はモック形質導入 (対照) T細胞について、以下の機能アッセイにおいてCLEC14Aに対するその応答能力を試験した: (A) 細胞傷害性、ヒトCLEC14Aを発現するように操作したCHO細胞を使用 (CHO単独 (対照細胞) のバックグラウンド溶解レベルを差し引いた)。図示するデータは、5つの反復実験の代表的なものである。(B) 増殖、本発明者らは、CFSE標識CAR形質導入T細胞を使用して、HVECと4日間共培養したときのCAR+ (CD34+) 及びCAR- (CD34-) 細胞サブセットの増殖を計測した。図示するデータは、2つの反復実験の代表的なものである。(C) ヒトCLEC14A及びマウスCLEC14Aの両方に対する (CLEC14A特異的CAR形質導入T細胞の応答を、インターフェロン放出を用いて評価した。T細胞は、トランス遺伝子発現細胞の頻度が等しくなるように調整した。図示するデータは、6つの反復実験の代表的なものである。ヒストグラムは、全て平均応答+SDを示す。

40

50

【0500】

図13は、CLEC14A特異的CAR形質導入マウスT細胞を注射した健常C57/BL6マウスを使用したインビボ毒性試験を示す。実験終了時にマウスを殺処分し、主要臓器を摘出した。組織学的検査により、病変のエビデンスがないことが明らかになった。

【0501】

図14は、ルイス肺癌腫瘍を担持するマウスに注射したときのCLEC14A特異的CAR形質導入マウスT細胞の抗腫瘍応答を示す。C57BL6マウスにルイス肺癌細胞(100万細胞/マウス)を皮下注射し、4日後、マウスは、T細胞生着を促進するための4Gy全身照射を受けた。次に、抗体CRT-3ベースの第2世代CARを発現するように形質導入したT細胞、又はモック形質導入(対照)T細胞を尾静脈に注射した。マウスは、合計2000万個のT細胞を投与され(CD8:CD4=5:2)、これらの細胞のうち2.2個にCRT3.28zが発現した。次に、(A)生物発光又は(B)ノギスを用いて腫瘍成長をモニタした。

10

【0502】

図15は、ルイス肺癌腫瘍を担持するマウスに注射したときのCLEC14A特異的CAR形質導入マウスT細胞の抗腫瘍応答を示す。実験終了時に腫瘍を切除して秤量した(A)。組織学的分析から、CARで処置したマウスの腫瘍が有意な血管密度の低下(B、MECA-32に関して染色)及びより高レベルの血管漏出(C、フィブリノゲンに関して染色)を示したことが実証された。

20

【0503】

CRT-3に由来するCARのポリペプチド及びヌクレオチド配列を以下の表に示す。

【0504】

【表 3 1】

CAR3完全 - aa	10	M G V L L T Q R T L L S L V L A L L F P S M A S M A E V Q L Q Q S G T V L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y W M H W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G N S D T S Y N Q K F K G K A K L T A V T S T S T A Y M E L S S L T N E D S A V F Y C T H Y Y G S D Y A M D Y W G Q G T S V T V S S G G G G S G G G G S G G G G S Q I V L T Q S P A I M S A S L G E R V T M T C T A S S S V S S S Y L H W Y Q Q K P G S S P K L W I Y S T S N L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I S S M E A E D A A T Y Y C H Q Y H R S P R T F G G G T K L E I K R A A A 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 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 Q 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	10
CAR3完全 - nt	20	atgggcgtgctgctgaccagaggaccctgctgagcctggctggcctgctgtt ccatctatggcatcgatggccgaggtccagctgcagcagctctgggactgtgctggc aaggcctggggcttcagtgaagatgtcctgcaaggcttctggctacacctttaccag	30

【 0 5 0 5 】

【表 3 2】

	<p>ctactggatgcactgggtaaacagaggcctggacagggctggaatggattggc gctattatcctggaaatagtatactagctacaaccagaagttcaagggcaaggc caaactgactgcagtcacatccaccagcactgcctacatggagctcagcagcctg acaaatgaggactctgcggtctttactgtacacattactacggtagtgactatgctat ggactactggggcaaggaacctcagtcactgtctcctcaggtggaggcgggtcag gCGgaggtggctctggcggggcgatcgaaattgttctcaccagctccagca atcatgtctgcatctctaggggaacgggtccatgacctgactgccagctcaagt gtaagttccagttactgcactggtagcagcagaagccaggatcctcccccactc tgattatagcacatccaacctggcttctggagctccagctcgtcagtgccagtg ggctgggaccttactctctcacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgcc cttactgcccaccagtatcatcgttccccacggacggtcggaggcaccagct ggaaatcaaacgtgcggccgcaattgaagttatgtatcctcctctacccagacaat gagaagagcaatggaaccattatccatgtgaaagggaaacaccttgcagtc ccctatttccggaccttcaagcccttgggtgctgggtgggtgggtgagctctgg cttgctatagcttgctagtaacagtggccttatttttctgggtgaggagtaagagga gcaggctcctgcacagtgactacatgaacatgactccccgcccggggccac ccgcaagcattaccagccctatgccccaccacgcgactcgcagcctatcgtcca gagtgaagttcagcaggagcgcagacgccccgcgtaccagcagggccagaa ccagctctataacgagctcaatctaggacgaagagaggagtagatgtttggaca agagacgtggccgggacctgagatgggggaaagccgcagagaaggaaga accctcaggaaggcctgtacaatgaactgcagaaagataagatggcggaggcct acagtgagattggatgaaaggcgagcgcggggggcaaggggcacgatgg ccttaccagggtctcagtagcagccaccaaggacacctacgacgccttcacatgc aggccctgccccctcgctaataaaagctaacacgagcca</p>
--	--

10

20

30

【0506】

実施例 6：抗 C L E C 1 4 A モノクローナル抗体 - 薬物コンジュゲート（イムノコンジュゲート）の設計及び分析

C R T - 3 抗体 - 薬物コンジュゲート（イムノコンジュゲート）のインターナリゼーション

40

モノクローナル抗 C L E C 1 4 A 抗体（C R T - 3）薬物コンジュゲート（C R T - 3 - A D C）を作成し、ここで、抗体は、チラパザミンに付加した。

【0507】

図 1 6 A は、C R T - 3 で処置した H U V E C 細胞を示し、0 分後（図 1 6 A（i））及び 9 0 分後（図 1 6 A（ii））の抗体の局在化を示し、抗体が H U V E C 細胞にインターナライズされることを実証している。図 1 6 B は、C R T - 3 - A D C で処置した H U V E C における Cell Titre Glo 発光細胞生存アッセイによる細胞傷害性測定値のグラフを示し、C R T - 3 抗体がイムノコンジュゲートとして細胞傷害性を示すことを実証している。

【0508】

50

LLC ADC 24時間パイロット実験

100万個のルイス肺癌細胞を2匹のマウスの右側腹部に皮下注射し、目に見えるサイズまで成長させた。次に、1mg/kgのCRT-3-ADC又はB12-ADC(対照)を尾静脈注射によって投与した。マウスは、1時間観察し、24時間後に殺処分した。

【0509】

結果

CRT-3-ADCによる24時間の処置は、マウスの全般的な健康に何ら効果を及ぼさなかった。腫瘍部位における広範な出血がCRT-3-ADC処置マウスにおいてのみ観察され、対照では観察されなかったことから、血管新生の腫瘍特異的破壊が実証される(図17)。

【0510】

実施例7:CLEC14Aに対するCRT1、3及び5の滴定

CRT1、3及び5 CAR(CD28共刺激ドメイン)T細胞とインキュベートするためのFc融合タンパク質としてCLEC14Aを発現させた。形質導入効率を等しくするため、全てのCAR-T細胞株をモックT細胞と希釈した。結果は、図18に見ることができ、ここで、試験した全てのCAR-T細胞がCLEC14Aに良好に応答することが示される(示されるデータはトリPLICATE培養の平均値+SDである)。

【0511】

実施例8: CRT1、3及び5 CAR T細胞の細胞傷害性及び増殖アッセイ

CRT1、3及び5 CAR(CD28共刺激ドメインを含む)T細胞を使用して細胞傷害性試験を行った。T細胞をモックT細胞と希釈して形質導入効率を等しくし、ヒトCLEC14Aを発現するマウス内皮細胞とインキュベートした。結果を図20に示し、これは、3つの試験したCARが全て、細胞傷害性を媒介し得ることを実証している。示されるデータはトリPLICATE培養の平均値+SDである。

【0512】

更に、プレート結合組換えCLEC14A-Fc融合タンパク質で刺激したCRT1、3及び5 CAR(CD28共刺激ドメイン)T細胞を用いて増殖アッセイ(CFSE標識)を行った。CAR-T細胞株は、全てモックT細胞と希釈して形質導入効率を等しくし、ここで、3つの試験したCARが全て刺激後に増殖能を有した。

【0513】

実施例9:異なる共刺激及び膜貫通領域を有するCAR

以下のCARをクローニングし、レトロウイルスベクターを使用して単一ドナーからのT細胞に入れる操作を行っている:

- 1) CRT3-CD28 TM-CD28 共刺激シグナル-CD3(CRT3.28z)
- 2) CRT3-CD8 TM-4-1BB 共刺激シグナル-CD3(CRT3.BBz)
- 3) CRT3-CD28 TM-CD28及び4-1BB 共刺激シグナル-CD3(CRT3.28BBz)
- 4) CRT3-CD28 TM-CD28及びOX40 共刺激シグナル-CD3(CRT3.28Oxz)
- 5) CRT3-CD8 TM-4-1BB及びOX40 共刺激シグナル-CD3(CRT3.BBOxz)。

【0514】

作成した全てのコンストラクトがT細胞に良好に形質導入された。これらの異なるコンストラクトの機能をインビトロで評価し、サイトカイン産生、細胞傷害性及び増殖応答について評価した(図21を参照されたい)。サイトカイン放出から、特にCRT3.28z及びCRT3.28Oxzを発現するT細胞による強力な抗原特異的応答が示された。ヒトCLEC14Aを発現する滴定数のCHO細胞(又はベクターのみの対照)に応答したIFN産生を計測することにより、サイトカイン産生を分析した。CAR-T細胞株

10

20

30

40

50

は、全てモックT細胞と希釈して形質導入効率を等しくした。示されるデータは、トリPLICATE培養の平均値 + S Dである。CLEC14Aを発現するように操作したマウス内皮細胞 (SEND) に対する細胞傷害活性を計測し、プレート結合組換えCLEC14A - Fc融合タンパク質による刺激後の増殖応答を計測した (データは示さず)。

【0515】

実施例10：キメラCLEC14Aによる刺激後のCAR T細胞からのサイトカイン放出の決定

ヒト配列を含有するが、膜貫通及び/又は細胞内ドメインはマウス由来であるキメラ型のCLEC14Aを293及びSEND細胞で発現させた。CLEC発現を等しくするためレンチウイルスベクターから共発現するGFPを用いてこれらの細胞を選別し、次にCAR T細胞 (CD28共刺激ドメインを含むCRT1、3及び5) を用いて試験した。CAR T細胞を293細胞及びSEND細胞の両方とインキュベートした後、IFNの放出を計測した。結果は、図22に見ることができる。加えて、CLEC14Aキメラを発現するSEND細胞とインキュベートしたときのT細胞の細胞傷害性を決定した。CAR T細胞株は、全てモックT細胞と希釈して形質導入効率を等しくした。示されるデータは、トリPLICATE培養の平均値である。

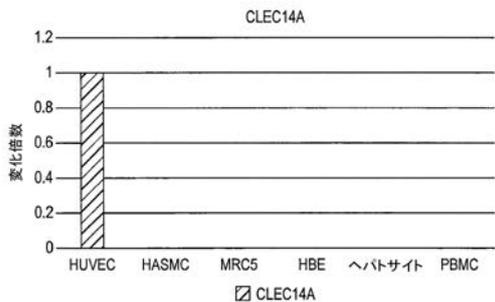
【0516】

図22を見て分かるとおり、試験した全てのCRT1、3及び5 CAR T細胞が、ヒトCLEC14A (huCLEC)、マウス細胞内ドメインを有するヒトCLEC14A (A1) 及びマウス膜貫通及び細胞内ドメインを有するヒトCLEC14A (B1) のいずれかを発現する293及びSEND細胞からのIFNの放出をもたらす。

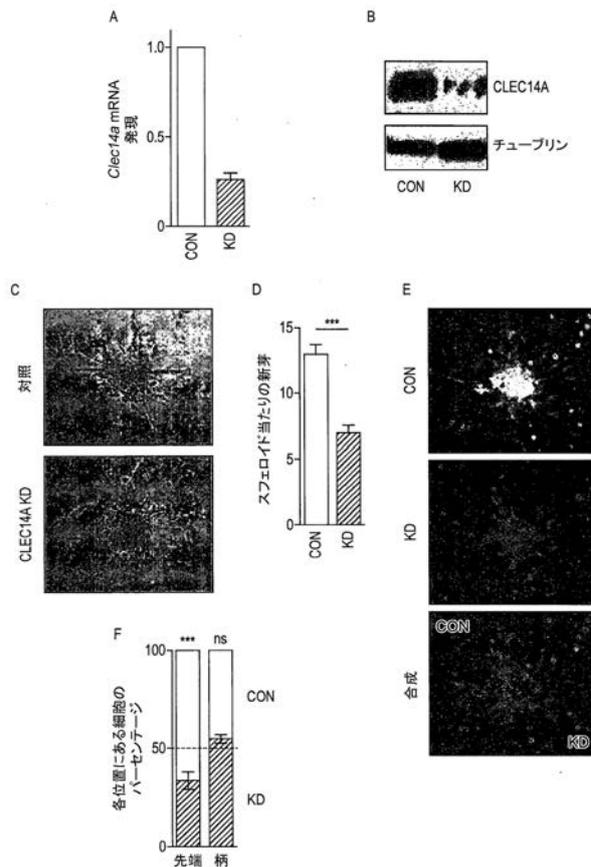
10

20

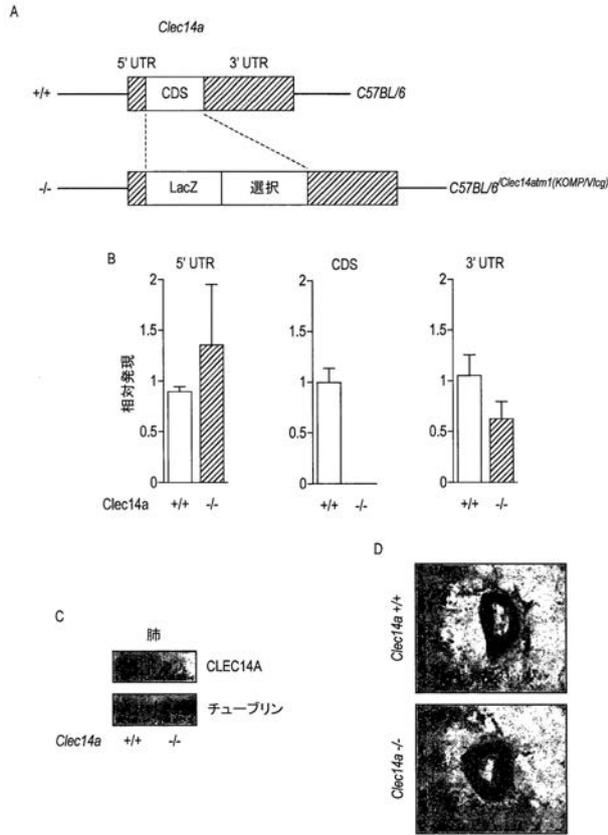
【図1】



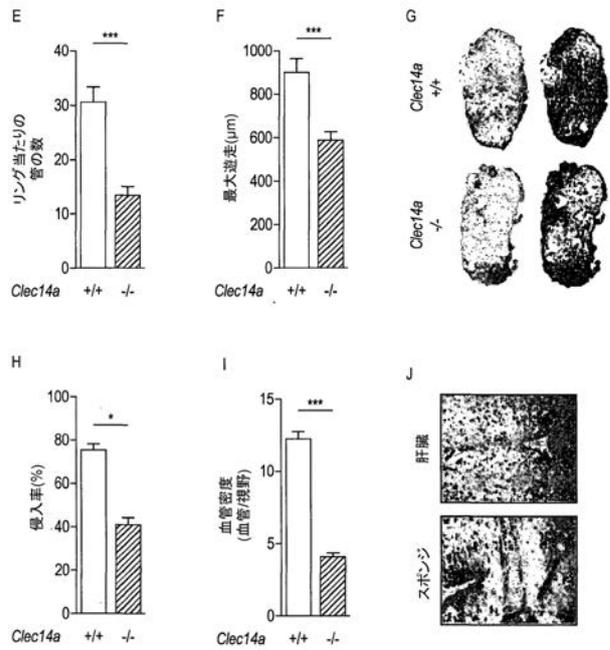
【図2】



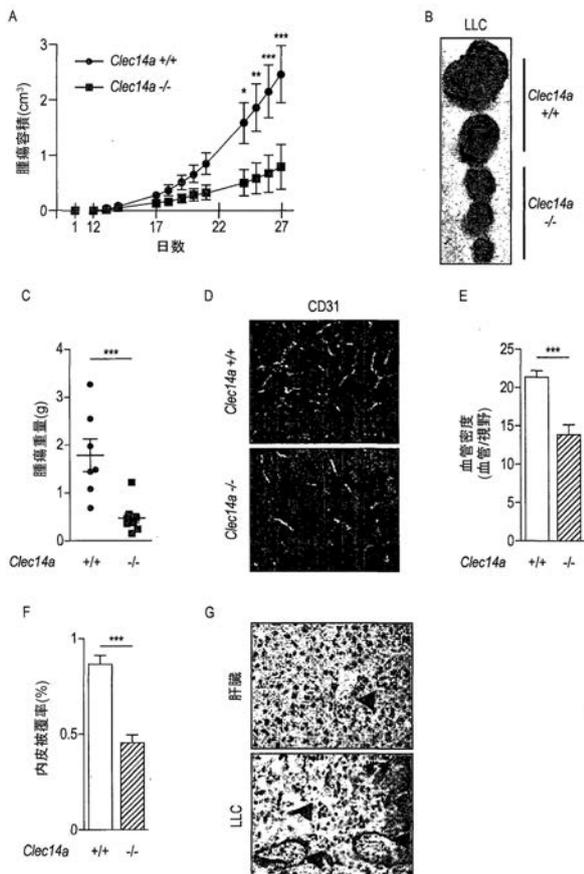
【 図 3 - 1 】



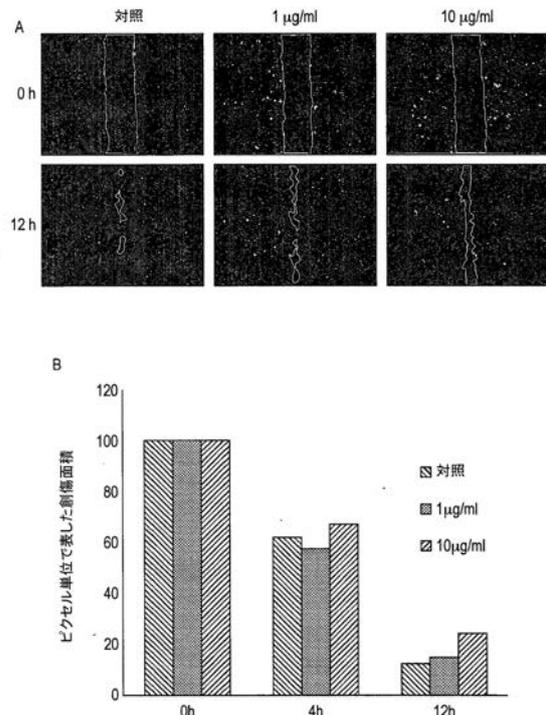
【 図 3 - 2 】



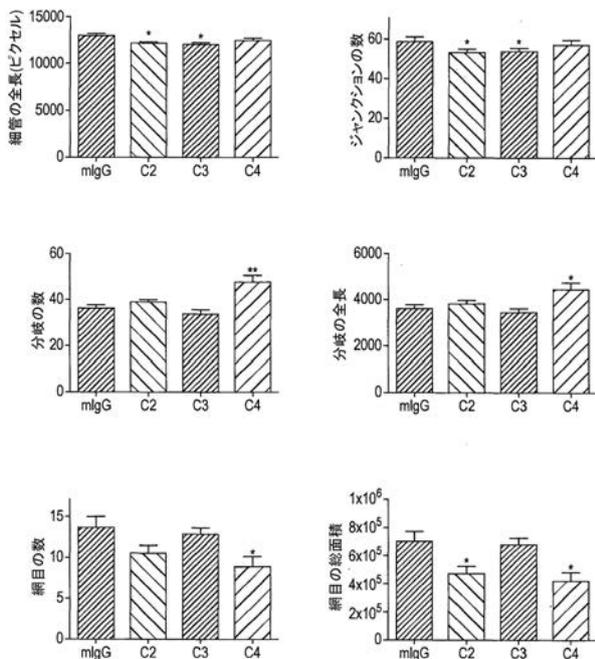
【 図 4 】



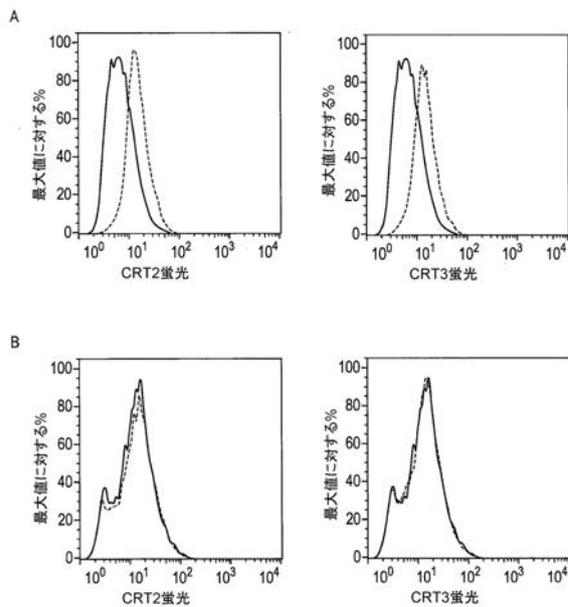
【 図 5 】



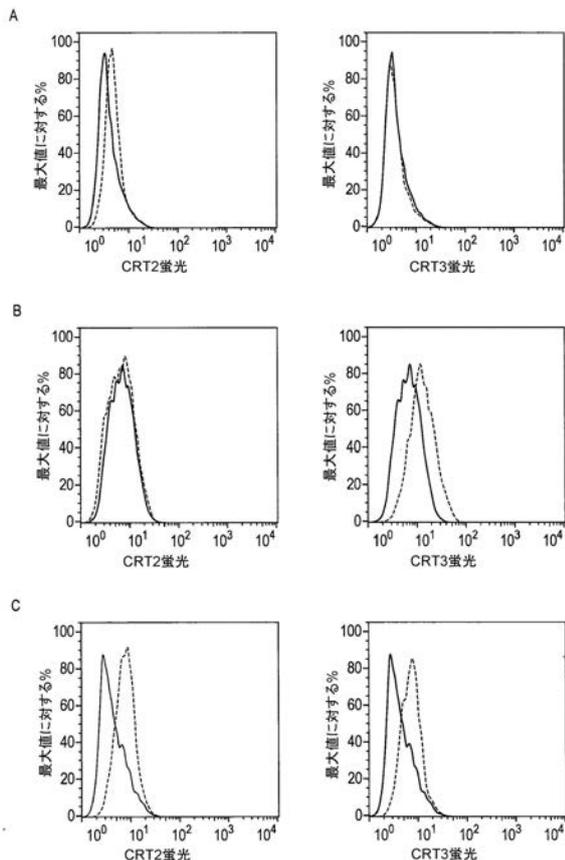
【 図 6 】



【 図 7 】



【 図 8 】



【 図 9 】

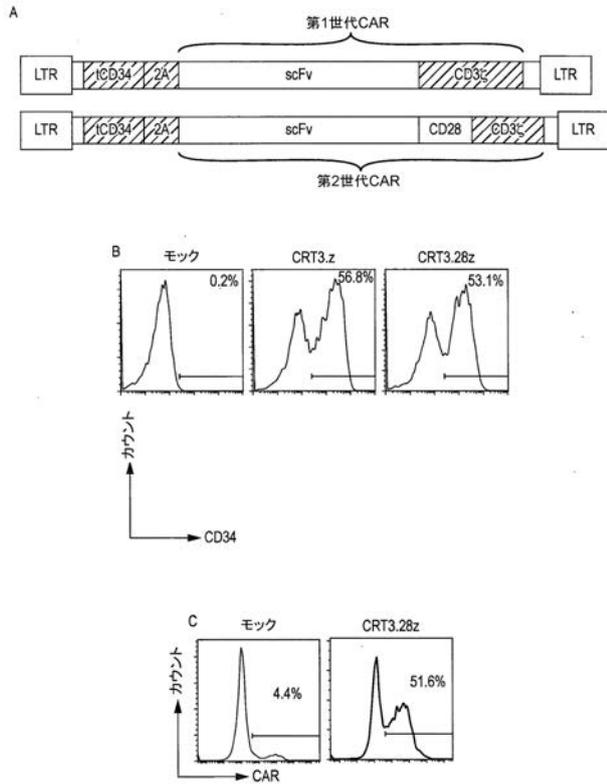
```

CLEC14A MRPFALCLLWQALWFGFGGGEHPTADRAGCSASGACYSLSLHATMKRQAEEACILRGA 60
CD141  NLGVLVLGALALAGLGFAPAEPQPGSQ--CVEHDCFALYFGPATFLNASQICDLGRH 58
      * . . . * * * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . * . . . *
CLEC14A LSTVRAGAE LRAVLALLRAGPGGGGSKDLLFWVALERRRSHCTLENR-PLRGFSWLSSD 119
CD141  LMTVRSVAADVISLLNGDGGVGRRR----LWIGLQLPPGCGDPKRLGSLRGPQWVTGD 114
      * * * * . . . : : * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *
CLEC14A PGGLESDTLQWVEEPQRSCTARRCAVLQATGQVPEPAG--WKEMRCHLRANGYLCKY 173
CD141  -NNTSYSRWARLDLNGAPLCGLPLCVAVSAAEATVPSEPIWEEQQCEVKADGFLCEP 169
      . . . . . : : . . . * . . . * . . . * * * * * * * * * * * * * *

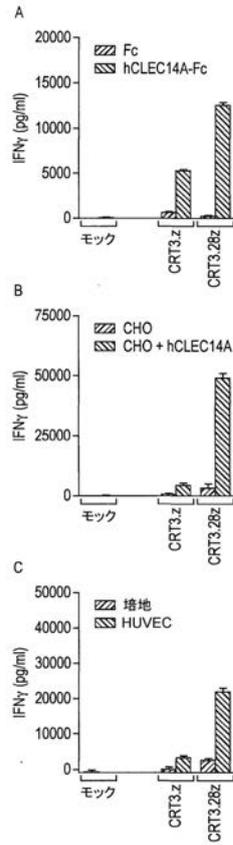
```

● ○ CLEC14A CTLD及びCD141 CTLDのアミノ酸アラインメント

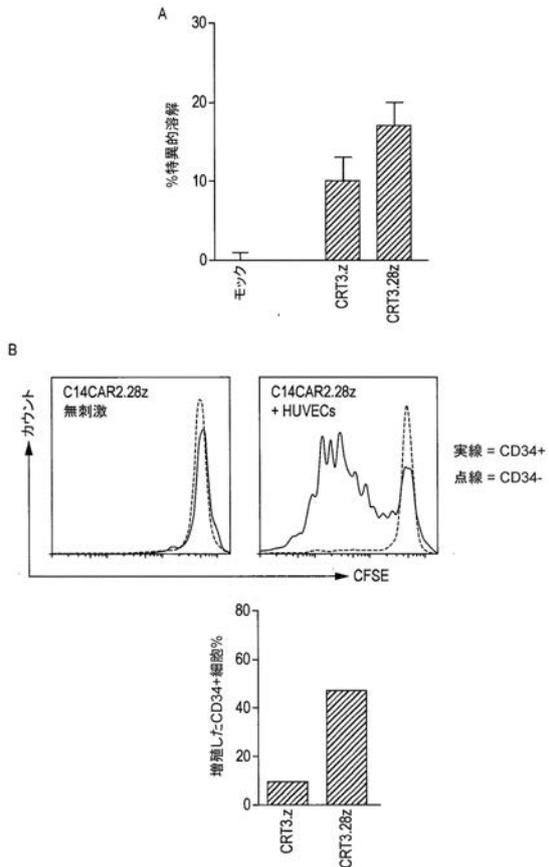
【 図 1 0 】



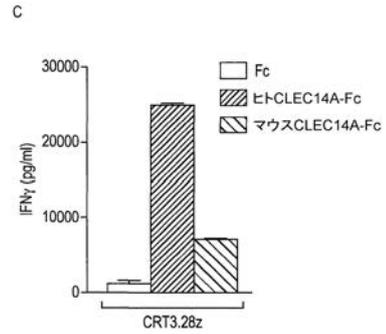
【 図 1 1 】



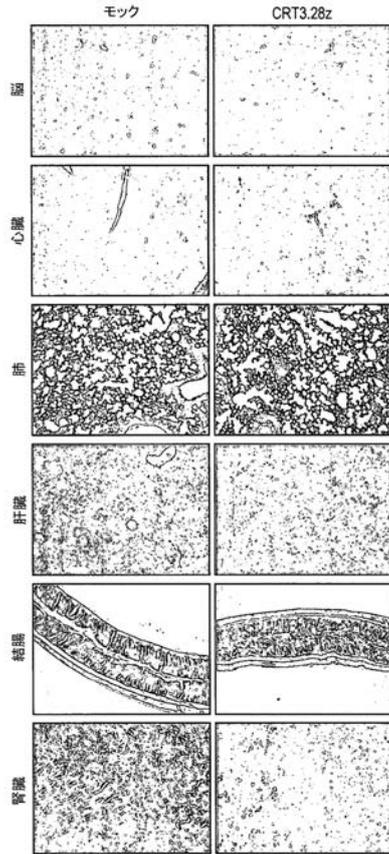
【 図 1 2 - 1 】



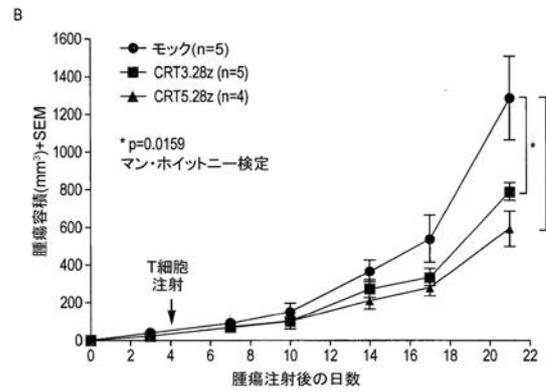
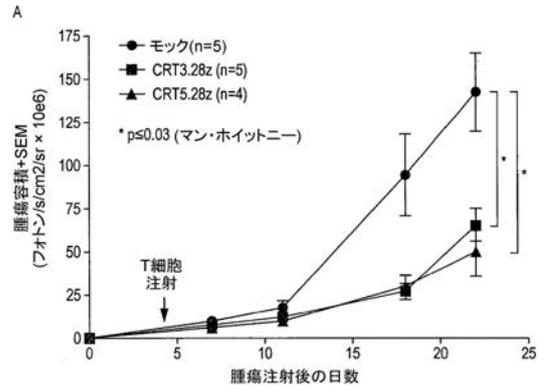
【 図 1 2 - 2 】



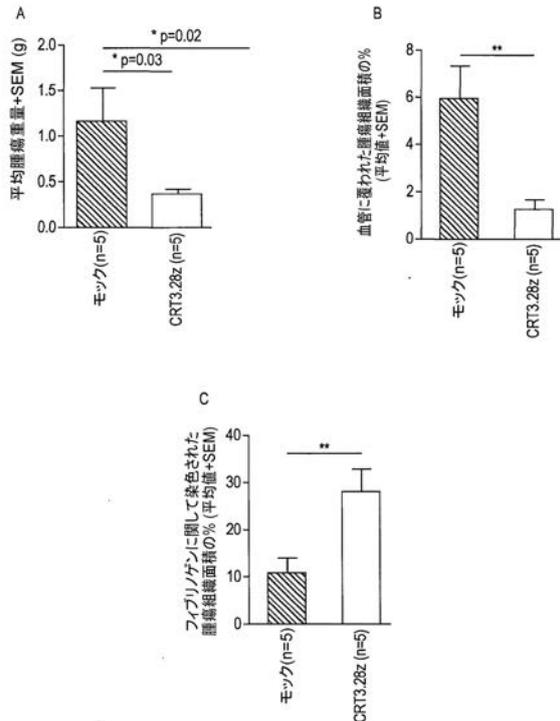
【 図 1 3 】



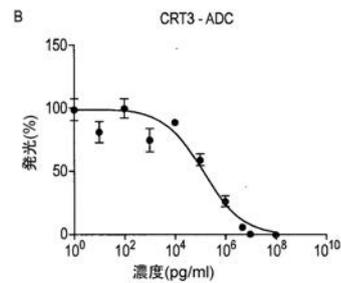
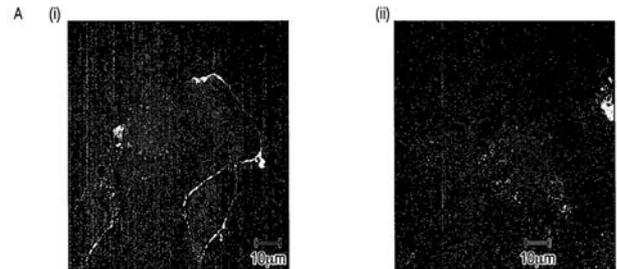
【 図 1 4 】



【 図 1 5 】



【 図 1 6 】



【 図 17 】

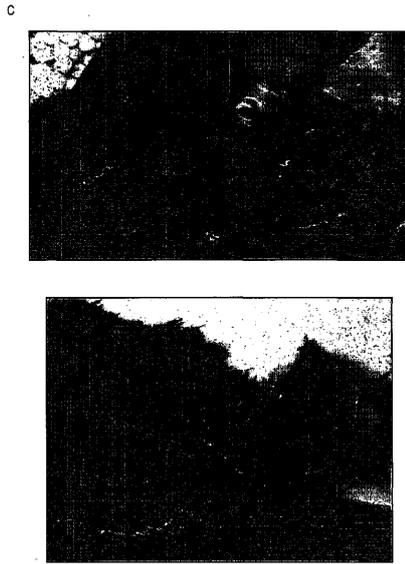


FIG. 17

【 図 18 】

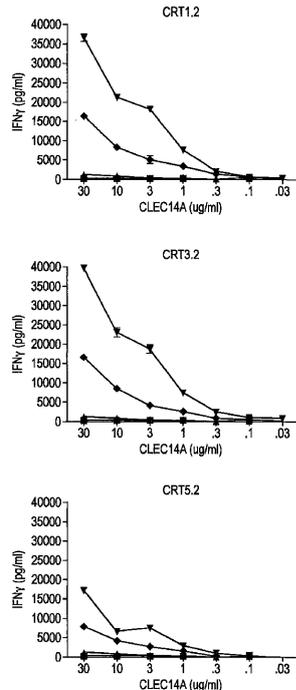
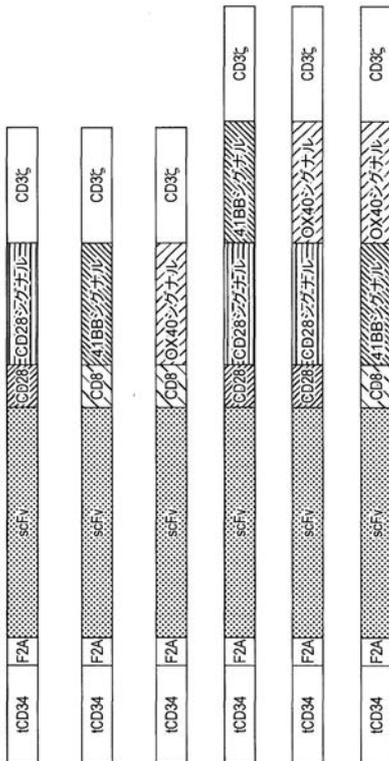
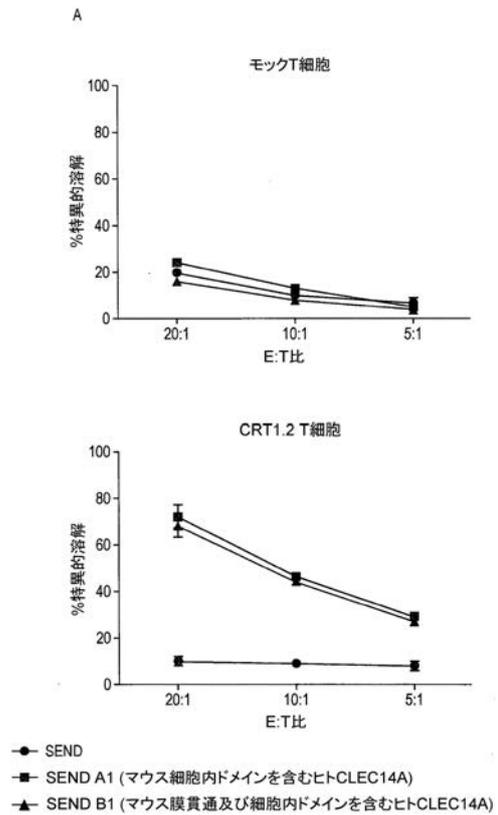


FIG. 18

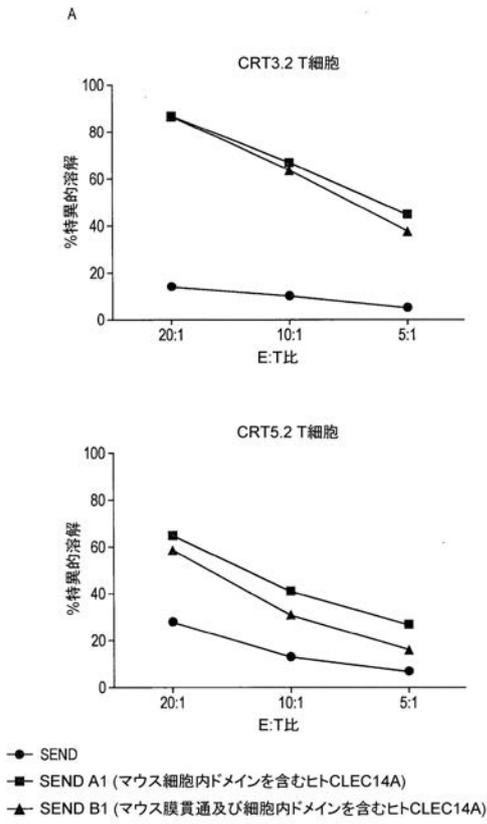
【 図 19 】



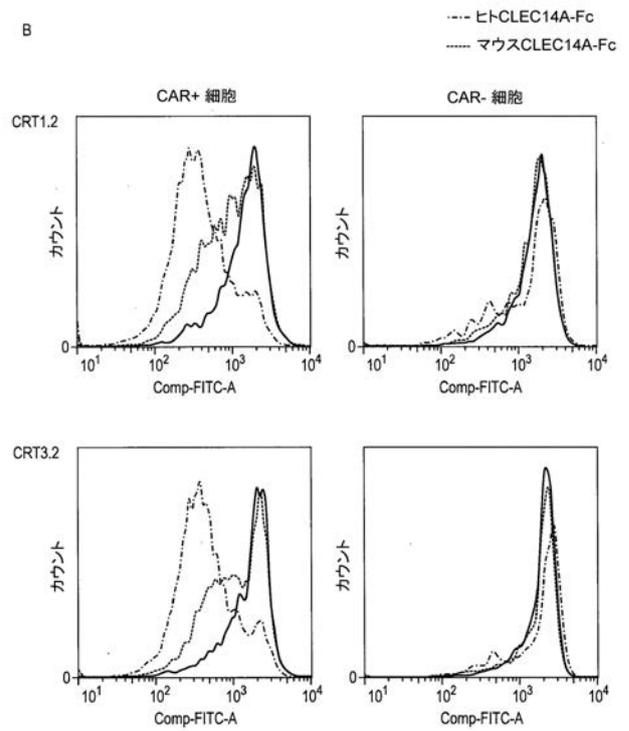
【 図 20 - 1 】



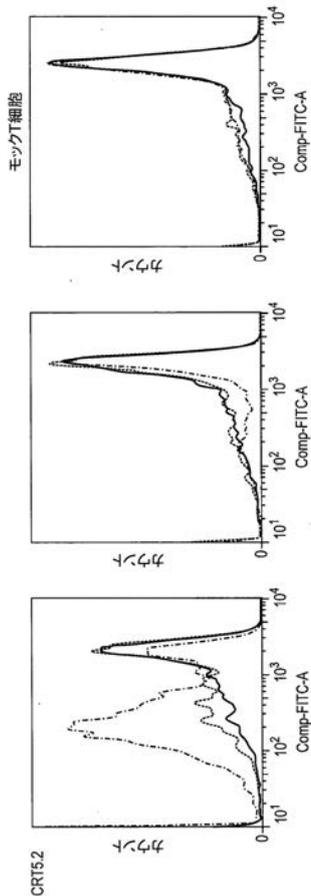
【 図 2 0 - 2 】



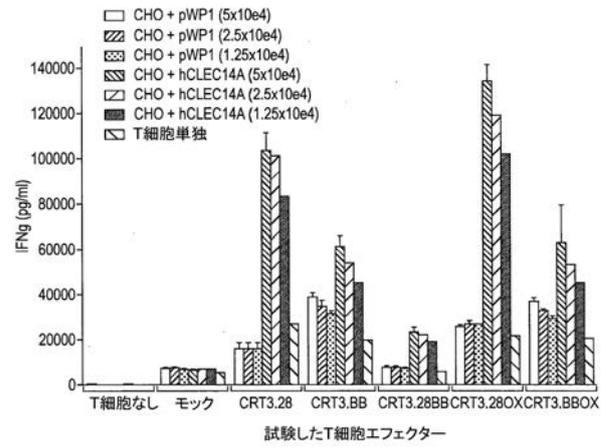
【 図 2 0 - 3 】



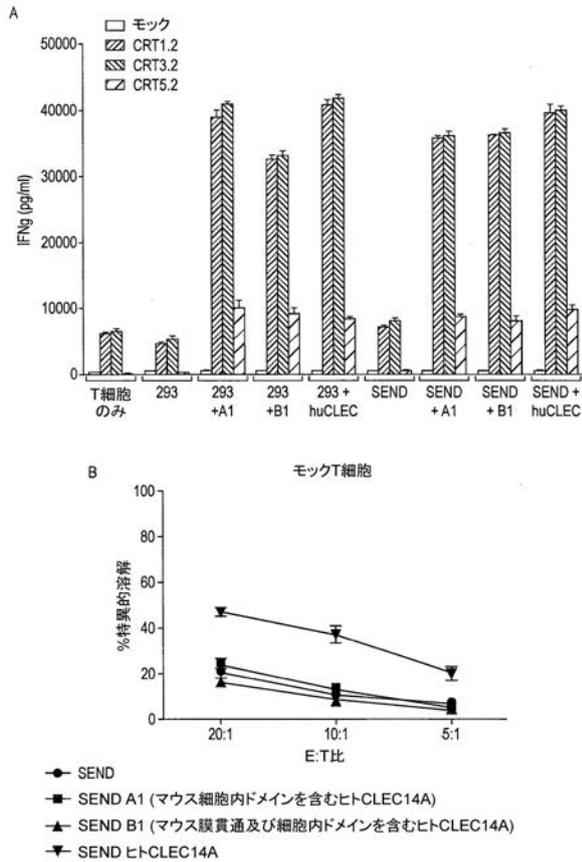
【 図 2 0 - 4 】



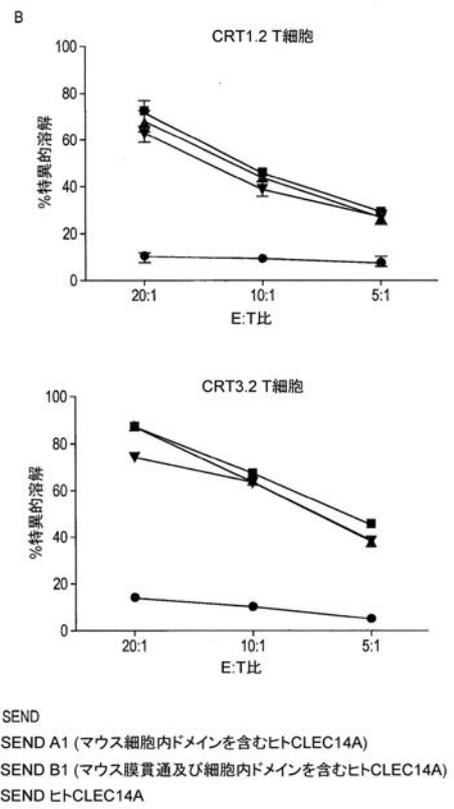
【 図 2 1 】



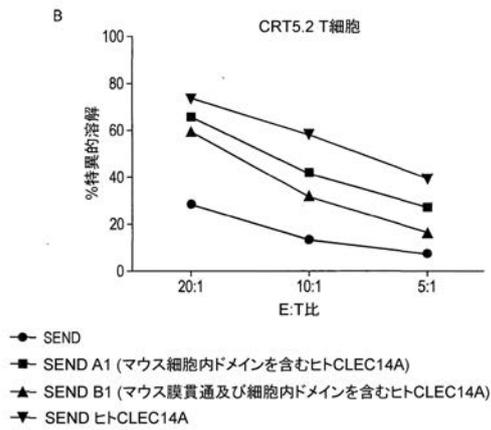
【 図 2 2 - 1 】



【 図 2 2 - 2 】

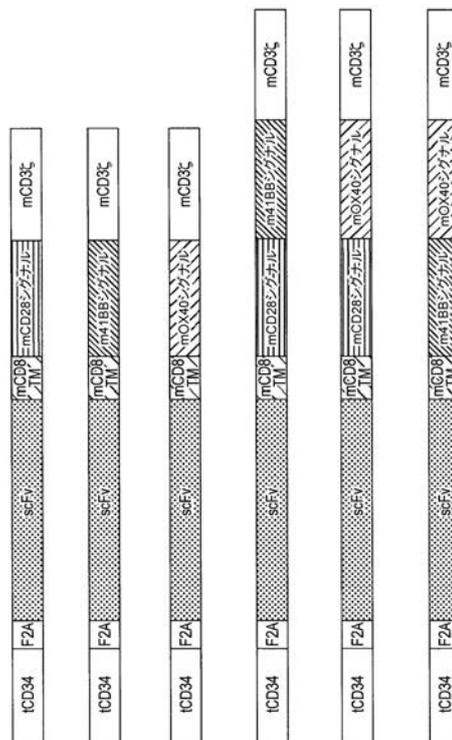
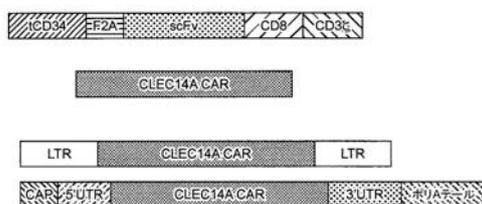


【 図 2 2 - 3 】



【 図 2 4 】

【 図 2 3 】



【配列表】

2019511224000001.app

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/050689

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 A61K39/395 C07K14/00 ADD.		
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) C07K A61K		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2011/027132 A1 (CANCER REC TECH LTD [GB]; BICKNELL ROY [GB]; ZHUANG XIAODONG [GB]; MUR) 10 March 2011 (2011-03-10) page 4, line 19 - line 30 page 8, line 28 - page 14, line 16 page 54, line 18 - page 55, line 16 page 56, line 14 - line 22 figures 16A,16B,17A,17B page 57; example 2 -----	1-42
A	WO 2013/187556 A1 (SCRIPPS KOREA ANTIBODY INST [KR]) 19 December 2013 (2013-12-19) page 1, paragraph 1 page 36 - page 37; tables 2-5 page 38 - page 39; tables 6-9 ----- -/--	1
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C.		<input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.
* 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 June 2017		Date of mailing of the international search report 07/07/2017
Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Sitch, David

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/GB2017/050689

Box No. I 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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/GB2017/050689

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>Xiaodong Zhuang ET AL: "Abstract LB-256: Immunotherapy using genetically modified T lymphocytes to target CLEC14A on the tumor vasculature", Proceedings of the AACR Annual Meeting 2014, 1 October 2014 (2014-10-01), XP55237609, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2014-LB-256 Retrieved from the Internet: URL:http://cancerres.aacrjournals.org/content/74/19_Supplement/LB-256 [retrieved on 2015-12-18] abstract</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	17-35
A	<p>P J NOY ET AL: "Blocking CLEC14A-MMRN2 binding inhibits sprouting angiogenesis and tumour growth", ONCOGENE, vol. 34, no. 47, 9 March 2015 (2015-03-09) , pages 5821-5831, XP55268966, ISSN: 0950-9232, DOI: 10.1038/onc.2015.34 page 5825, first full paragraph - page 5826, first full paragraph</p> <p style="text-align: center;">-----</p>	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/GB2017/050689

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2011027132 A1	10-03-2011	AU 2010290989 A1	15-03-2012
		CA 2810119 A1	10-03-2011
		EP 2473529 A1	11-07-2012
		ES 2567030 T3	19-04-2016
		HU E028878 T2	30-01-2017
		JP 5962996 B2	03-08-2016
		JP 2013503842 A	04-02-2013
		US 2012276000 A1	01-11-2012
		WO 2011027132 A1	10-03-2011
		WO 2013187556 A1	19-12-2013
EP 2861623 A1	22-04-2015		
JP 6129305 B2	17-05-2017		
JP 2016503286 A	04-02-2016		
KR 20150023665 A	05-03-2015		
US 2015140001 A1	21-05-2015		
WO 2013187556 A1	19-12-2013		
WO 2013187724 A1	19-12-2013		

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 5/0783 (2010.01)	C 1 2 N 5/0783	
C 1 2 N 7/01 (2006.01)	C 1 2 N 7/01	
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/28	
C 0 7 K 14/705 (2006.01)	C 0 7 K 14/705	
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395	N
A 6 1 P 43/00 (2006.01)	A 6 1 P 43/00	1 1 1
A 6 1 P 35/00 (2006.01)	A 6 1 P 35/00	
A 6 1 K 45/00 (2006.01)	A 6 1 K 45/00	
A 6 1 K 47/68 (2017.01)	A 6 1 K 47/68	

(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, TJ, 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, RO, 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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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

(74) 代理人 100109346

弁理士 大貫 敏史

(74) 代理人 100117189

弁理士 江口 昭彦

(74) 代理人 100134120

弁理士 内藤 和彦

(72) 発明者 ビックネル, ロイ

イギリス国, ビー 1 7 8 イービー ウェスト ミッドランズ, バーミンガム, エッジバーストン, パーンズリー ロード 7

(72) 発明者 リー, スティーブン

イギリス国, ビー 1 4 6 エスワイ ウェスト ミッドランズ, バーミンガム, キングス ヒース, グローブ ロード 1 2 0

F ターム(参考) 4B065 AA94X AB01 BA02 CA23 CA25 CA44

4C076 AA95 BB11 CC27 EE41

4C084 AA19 MA02 NA05 NA13 ZB262 ZC412

4C085 AA14 AA15

4H045 BA41 BA72 EA20 FA74

【要約の続き】

である。本発明は、キメラ抗原受容体、本発明の抗体又はキメラ抗原受容体をコードする核酸分子、ベクター、細胞、並びに抗体及びキメラ抗原受容体の方法 / 使用を更に提供する。