

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2024年9月19日(19.09.2024)



(10) 国際公開番号

WO 2024/190856 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/13 (2006.01) C12N 1/15 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
A61P 35/02 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
A61P 37/04 (2006.01) C12N 15/62 (2006.01)
C07K 14/725 (2006.01) C12N 15/63 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/009945

(22) 国際出願日: 2024年3月14日(14.03.2024)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願 2023-041191 2023年3月15日(15.03.2023) JP

(71) 出願人: 学校法人自治医科大学 (JICHI MEDICAL UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒1020093 東京都千代田区平河町二丁目6番3号 Tokyo (JP). タカラバイオ株式会社 (TAKARA BIO INC.) [JP/JP]; 〒5250058 滋賀県草津市野路東七丁目4番38号 Shiga (JP).

(72) 発明者: 内堀 亮介 (UCHIBORI, Ryosuke); 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP). 大嶺 謙 (OHMINE, Ken); 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP). 小澤 敬也 (OZAWA, Keiya); 〒3290498 栃木県下野市薬師寺3311-1 学校法人自治医科大学内 Tochigi (JP).

(74) 代理人: 山尾 憲人, 外(YAMAO, Norihito et al.); 〒5300017 大阪府大阪市北区角田町8番1号 大阪梅田ツインタワーズ・ノース 青山特許事務所 Osaka (JP).

(81) 指定国(表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国(表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第21条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則5.2(a))

(54) Title: ANTI-BCMA ANTIBODY AND CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR

(54) 発明の名称: 抗BCMA抗体およびキメラ抗原受容体

(57) Abstract: The present invention provides: a B-cell maturation antigen (BCMA) antibody containing light-chain variable (VL) regions and heavy-chain variable (VH) regions or an antigen-binding fragment of the antibody, wherein the amino acid sequences for complementarity determining region (CDR)1, CDR2 and CDR3 in each of the VL regions and CDR1, CDR2 and CDR3 in each of the VH regions are specified; and a chimeric antigen receptor containing the fragment.

(57) 要約: 本発明は、軽鎖可変(VL)領域及び重鎖可変(VH)領域を含むB細胞成熟抗原(BCMA)抗体又はその抗原結合フラグメントであって、VL領域の相補性決定領域(CDR)1、CDR2及びCDR3並びにVH領域のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列が特定される抗体又はその抗原結合フラグメント、前記フラグメントを含むキメラ抗原受容体を提供する。

WO 2024/190856 A1

明 細 書

発明の名称：抗BCMA抗体およびキメラ抗原受容体

技術分野

[0001] 本発明は、B細胞成熟抗原（BCMA）に特異的な抗体、その抗原結合フラグメント、前記フラグメントを含むキメラ抗原受容体に関する。

背景技術

[0002] BCMAは、CD269またはTNFRSF17とも呼ばれ、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーのメンバーで、そのリガンドはB細胞活性化因子（BAFF）および増殖誘導リガンド（APRIL）である。BCMAとBAFF又はAPRILの結合はNF-κBを活性化させ、抗アポトーシスBcl-2のメンバー、たとえばBcl-xLまたはBcl-2およびMcl-1の上方調節を誘導する。BCMAとそのリガンドの相互作用は様々な面から体液免疫、B細胞の生長、分化を調節することによって人体内環境の安定した平衡を維持する。

[0003] BCMAの発現はB細胞系に限られ、形質芽球、形質細胞および一部の成熟B細胞で発現され、末梢B細胞の分化時に増加する。一方、大半のB細胞、たとえばナイーブB細胞、メモリーB細胞や胚中心B細胞、およびほかの器官では発現されない。BCMAはがん細胞でも高度に発現し、たとえば多発性骨髄腫（MM）や形質細胞性白血病（PL）、ホジキンリンパ腫（HL）の患者の細胞でもBCMAが検出されている。

[0004] 最近、免疫療法、特に養子T細胞療法は、血液系の悪性腫瘍を治療する臨床試験において強い治療効果が示されている。T細胞はキメラ抗原受容体（CAR）を発現するように遺伝子修飾したT細胞（CAR-T細胞）の開発が進められている。CARは抗原認識ドメインおよびT細胞活性化ドメインを含む。CARはモノクローナル抗体の抗原結合の性質を利用してMHCに拘束されずにターゲティングすることができる。このような非MHC拘束性抗原認識によって、腫瘍が免疫機構から逃避する機序の一つが避けられる

。本分野では、多発性骨髄腫などの腫瘍を治療する、BCMAを標的とするCAR-T細胞の開発が切望されている（非特許文献1）。

先行技術文献

非特許文献

[0005] 非特許文献1：Scand J Immunol. 2020 Aug;92(2):e12910.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0006] 本発明の目的は、BCMAを標的とするCAR、BCMAを標的とする抗BCMA抗体及びその抗原結合フラグメントを提供することにある。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明者らは上記の課題を解決すべく鋭意研究した結果、BCMAを標的とする新規な抗BCMA抗体及びその抗原結合フラグメントを見出し、BCMAを標的とする効果的なCARを作製して本発明を完成させた。

[0008] すなわち、本発明は、以下に関する。

[1] 軽鎖可変（VL）領域及び重鎖可変（VH）領域を含む抗ヒトB細胞成熟抗原（BCMA）抗体又はその抗原結合フラグメントであって、VL領域の相補性決定領域（CDR）1、CDR2及びCDR3並びにVH領域のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列が、それぞれ以下の（1）～（6）からなる群より選択される配列番号に示されたアミノ酸配列である抗体又はその抗原結合フラグメント：

- （1）配列番号1～6、
- （2）配列番号7～12、
- （3）配列番号13～18、
- （4）配列番号19～24、
- （5）配列番号25～30、および
- （6）配列番号31～36。

[2] 前記VL領域及びVH領域のアミノ酸配列が、以下の（1）～（6）

）からなる群より選択される請求項 1 記載の抗体又はその抗原結合フラグメント：

- (1) 配列番号 37 及び 38、
- (2) 配列番号 39 及び 40、
- (3) 配列番号 41 及び 42、
- (4) 配列番号 43 及び 44、
- (5) 配列番号 45 及び 46、および
- (6) 配列番号 47 及び 48。

[3] 前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、IgG、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、scFv、及びシングルドメイン抗体(dAB)からなる群から選択される、[1]又は[2]に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。

[4] 前記抗原結合フラグメントはscFvである、[3]に記載の抗原結合フラグメント。

[5] [1]～[4]のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸。

[6] (i) 抗原結合ドメインと、(ii) 膜貫通ドメインと、(iii) 細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体(CAR)であって、

前記抗原結合ドメインが、[1]～[4]のいずれか1項に記載の抗原結合フラグメント含む、CAR。

[7] 前記細胞内ドメインが共刺激ドメイン及び活性化ドメインを含む、[6]に記載のCAR。

[8] 前記共刺激ドメインがCD28の細胞内フラグメントを含む、[7]に記載のCAR。

[9] 前記活性化ドメインがCD3ζの細胞内フラグメントを含む、[7]又は[8]に記載のCAR。

[10] [6]～[9]のいずれか一項に記載のCARをコードする核酸。

〔１１〕 〔５〕に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸もしくは〔１０〕に記載のＣＡＲをコードする核酸を含むベクター。

〔１２〕 〔５〕に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸もしくは〔１０〕に記載のＣＡＲをコードする核酸を含む細胞。

〔１３〕 前記細胞は、Ｔ細胞である、〔１２〕に記載の細胞。

〔１４〕 〔１３〕に記載の細胞を有効成分として含む医薬組成物。

〔１５〕 ＣＡＲを発現する細胞を製造する方法であって、細胞に、〔５〕に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸、〔１０〕に記載のＣＡＲをコードする核酸もしくは〔１１〕に記載のベクターを形質導入する工程含む、方法。

発明の効果

〔０００９〕 本発明により、ＢＣＭＡに特異的な抗体とその抗原結合フラグメント、ならびにＢＣＭＡを標的にした遺伝子改変免疫細胞療法の分野において有用なキメラ抗原受容体（ＣＡＲ）、前記ＣＡＲをコードする核酸、前記核酸を含むベクター、前記ＣＡＲを発現する細胞、前記細胞の製造方法、前記細胞を有効成分として含む医薬組成物、ならびに当該医薬組成物を対象に投与することを特徴とする疾病の予防（再発予防を含む、以下同じ）または治療方法が提供される。本発明のＣＡＲを発現する細胞は、ＢＣＭＡを発現する細胞に対し高い殺傷能力を有し、高い治療効果が期待される。

図面の簡単な説明

〔００１０〕 〔図１〕抗ＢＣＭＡ抗体１～６のアミノ酸配列を比較した図である。

〔図２〕ＢＣＭＡ－ＣＡＲの構造を示す図である。

〔図３〕ＢＣＭＡ－ＣＡＲ発現細胞の細胞シグナル伝達強度を示す図である。

〔図４〕抗ＢＣＭＡ抗体のリンカーの長さを比較した図である。

〔図５〕ＢＣＭＡ－ＣＡＲ発現細胞の細胞傷害活性の測定を示す図である。

〔図６〕ＢＣＭＡ－ＣＡＲ発現細胞におけるＩＦＮ－ γ 産生を示す図である。

〔図７〕ＢＣＭＡ－ＣＡＲ発現細胞の輸注後の経時的な腫瘍細胞のルシフェラーゼ活性のインビボ生物発光イメージングと、発光強度を数値化したグラフを

示す図である。

[図8-1] 担がんマウスに対するBCMA-CAR発現細胞の*in vivo*における抗腫瘍効果を示す図である。

[図8-2] 担がんマウスに対するBCMA-CAR発現細胞の*in vivo*における抗腫瘍効果を示す図である。

[図8-3] 担がんマウスに対するBCMA-CAR発現細胞の*in vivo*における抗腫瘍効果を示す図である。

[図9-1] BCMA-CAR発現細胞の貧血の進行抑制効果を示す図である。

[図9-2] BCMA-CAR発現細胞の貧血の進行抑制効果を示す図である。

[図10-1] 骨領域の進行に対するBCMA-CAR発現細胞療法の抑制効果を示す図である。

[図10-2] 骨領域の進行に対するBCMA-CAR発現細胞療法の抑制効果を示す図である。

発明を実施するための形態

[0011] 以下に本発明について詳細に説明する。

[0012] (1) 本発明の抗体又はその抗原結合フラグメント

本発明は、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体、または前記抗体の、ヒトBCMAに特異的に結合するフラグメントを提供する。前記抗体およびそのフラグメントは、下記実施例に示す抗B細胞成熟抗原（BCMA）抗体1～6からなる群より選択されるいずれかに由来するVL領域の相補性決定領域（CDR）1、CDR2及びCDR3、並びにVH領域のCDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列を含む。前記のVL領域の相補性決定領域CDR1～3、およびVH領域のCDR1～3のアミノ酸配列は、それぞれ以下の(1)～(6)に示される。

(1) 配列番号1～6、

(2) 配列番号7～12、

(3) 配列番号13～18、

(4) 配列番号19～24、

(5) 配列番号 25～30、

(6) 配列番号 31～36。

[0013] 本発明の一態様として、本発明の抗BCMA又はその抗原結合フラグメントのVL領域及びVH領域のアミノ酸配列は、以下の(1)～(6)からなる群より選択される。

(1) 配列番号 37 及び 38、

(2) 配列番号 39 及び 40、

(3) 配列番号 41 及び 42、

(4) 配列番号 43 及び 44、

(5) 配列番号 45 及び 46、および

(6) 配列番号 47 及び 48。

[0014] 本発明の抗BCMA抗体1～6の各VL CDRおよびVH CDRのアミノ酸配列、VLおよびVHそれぞれの全長アミノ酸配列、VLおよびVH全長をそれぞれコードする塩基配列の配列番号を以下の表1に示す。

[0015] [表1]

抗体	配列番号									
	VL			VH			全長アミノ酸		全長核酸	
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3	VL	VH	VL	VH
1	1	2	3	4	5	6	37	38	49	50
2	7	8	9	10	11	12	39	40	51	52
3	13	14	15	16	17	18	41	42	53	54
4	19	20	21	22	23	24	43	44	55	56
5	25	26	27	28	29	30	45	46	57	58
6	31	32	33	34	35	36	47	48	59	60

[0016] 本発明の抗体の一例である抗BCMA抗体1は、VL領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号1～3のアミノ酸配列からなり、VH領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号4～6のアミノ酸配列からなり、例えばVL領域及びVH領域はそれぞれ配列番号37及び38のアミノ酸を含み、例えばVL領域及びVH領域はそれぞれ配列番号49及び50の核酸配列を含む。

[0017] 本発明の抗体の一例である抗BCMA抗体2は、VL領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号7～9のアミノ酸配列からなり、VH領域のCDR1～

3はそれぞれ配列番号10～12のアミノ酸配列からなり、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号39及び40のアミノ酸を含み、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号51及び52の核酸配列を含む。

[0018] 本発明の抗体の一例である抗BCMA抗体3は、V_L領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号13～15のアミノ酸配列からなり、V_H領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号16～18のアミノ酸配列からなり、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号41及び42のアミノ酸を含み、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号53及び54の核酸配列を含む。

[0019] 本発明の抗体の一例である抗BCMA抗体4は、V_L領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号19～21のアミノ酸配列からなり、V_H領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号22～24のアミノ酸配列からなり、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号43及び44のアミノ酸を含み、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号55及び56の核酸配列を含む。

[0020] 本発明の抗体の一例である抗BCMA抗体5は、V_L領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号25～27のアミノ酸配列からなり、V_H領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号28～30のアミノ酸配列からなり、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号45及び46のアミノ酸を含み、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号57及び58の核酸配列を含む。

[0021] 本発明の抗体の一例である抗BCMA抗体6は、V_L領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号31～33のアミノ酸配列からなり、V_H領域のCDR1～3はそれぞれ配列番号34～36のアミノ酸配列からなり、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号47及び48のアミノ酸を含み、例えばV_L領域及びV_H領域はそれぞれ配列番号59及び60の核酸配列を含む。

[0022] 上記抗BCMA抗体1～6は、ヒトBCMAに特異的に結合するかぎり、

1 以上の変異を含んでいてもよい。したがって、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントの更なる例として、以下の (1') ~ (6') からなる群より選択されるアミノ酸配列を含む V_L 領域及び V_H 領域を含み、かつ、ヒト B C M A に特異的結合性を有する抗体又はその抗原結合フラグメントが挙げられる。

(1') (i) 配列番号 37 のアミノ酸配列、又は配列番号 37 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、及び (i i) 配列番号 38 のアミノ酸配列、又は配列番号 38 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、ここに、前記 (i) 及び (i i) の少なくとも一方は変異アミノ酸配列である、

(2') (i) 配列番号 39 のアミノ酸配列、又は配列番号 39 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、及び (i i) 配列番号 40 のアミノ酸配列、又は配列番号 40 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、ここに、前記 (i) 及び (i i) の少なくとも一方は変異アミノ酸配列である、

(3') (i) 配列番号 41 のアミノ酸配列、又は配列番号 41 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、及び (i i) 配列番号 42 のアミノ酸配列、又は配列番号 42 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、ここに、前記 (i) 及び (i i) の少なくとも一方は変異アミノ酸配列である、

(4') (i) 配列番号 43 のアミノ酸配列、又は配列番号 43 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、及び (i i) 配列番号 44 のアミノ酸配列、又は配列番号 44 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、ここに、前記 (i) 及び (i i) の少なくとも一方は変異アミノ酸配列である、

(5') (i) 配列番号 45 のアミノ酸配列、又は配列番号 45 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、及び (i i) 配列番号 46 のアミノ酸配列、又は配列番号 46 のアミノ酸配列において 1 以上の変

異を含む変異アミノ酸配列、ここに、前記 (i) 及び (i i) の少なくとも一方は変異アミノ酸配列である、

(6') (i) 配列番号 47 のアミノ酸配列、又は配列番号 47 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、及び (i i) 配列番号 48 のアミノ酸配列、又は配列番号 48 のアミノ酸配列において 1 以上の変異を含む変異アミノ酸配列、ここに、前記 (i) 及び (i i) の少なくとも一方は変異アミノ酸配列である。

[0023] 本明細書で使用される場合、「変異」という用語には、アミノ酸残基の欠失、付加、挿入、及び置換が包含される。前記 1 以上の変異は、アミノ酸残基の欠失、付加、挿入、及び置換のいずれかの組み合わせであってもよい。前記アミノ酸残基の置換は、保存的置換又は非保存的置換のいずれであってもよいが、好ましくは保存的置換である。保存的置換は、ペプチドの活性を実質的に改変しないような、類似の性質を有するアミノ酸残基間での置換であり、当業者によく知られている。例えば、非極性（疎水性）アミノ酸間での置換、極性（中性）アミノ酸間での置換、塩基性アミノ酸間での置換、及び酸性アミノ酸間での置換が挙げられる。非極性（疎水性）アミノ酸としては、例えば、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニン等が挙げられる。極性（中性）アミノ酸としては、例えば、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システイン等が挙げられる。塩基性アミノ酸としては、例えば、アルギニン、ヒスチジン、リジン等が挙げられる。酸性アミノ酸としては、例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸等が挙げられる。

[0024] 前記 1 以上の変異は、好ましくは CDR 以外の領域にある。前記 1 以上の変異は、例えば 1 ～ 10 個の変異、好ましくは 1 ～ 9、8、7、6、5、4、3 又は 2 個の変異、より好ましくは 1 ～ 3 個の変異、さらにより好ましくは 1 又は 2 個の変異であってもよい。

[0025] 前記変異アミノ酸配列は、例えば、配列番号 37 ～ 48 のいずれかのアミノ酸配列に対して少なくとも 80%、85%、90%、91%、92%、9

3%、94%、95%、96%、97%、98%又は99%の配列同一性を有するアミノ酸配列である。ここで、パーセント(%)同一性は、参照アミノ酸配列と比較アミノ酸配列とを、最大の%同一性となるように整列させて求められる。パーセント(%)同一性は、当該分野で既知の方法、例えば、BLAST、FASTA等を用いて決定することができる。

[0026] 「抗体」(Ab)は、抗原に特異的に結合する免疫グロブリンであり、ジスルフィド結合によって相互に連結された少なくとも2本の重鎖(H鎖)及び2本の軽鎖(L鎖)、又はそれらの抗原結合分子を含み得る。各H鎖は、VH領域及び重鎖定常領域を含む。重鎖定常領域は、3つの定常ドメイン、すなわちCH1、CH2及びCH3を含む。各軽鎖は、VL領域及び軽鎖定常領域を含む。軽鎖定常領域は、1つの定常ドメイン、すなわちCL領域を含む。VH領域及びVL領域は、フレームワーク領域(FR)と呼ばれる保存された領域と、相補性決定領域(CDR)と呼ばれる超可変性の領域に更に細分され得る。VH及びVLはそれぞれ、アミノ末端からカルボキシ末端にFR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、及びFR4の順で並ぶ、3つのCDR及び4つのFRを含む。重鎖及び軽鎖の可変領域は、抗原と相互作用する抗原結合部位を含む。

[0027] 「抗体」という用語には、例えば、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、組換え抗体、多重特異的抗体(二重特異的抗体を含む)、ヒト抗体、ヒト化抗体、抗体変異体、キメラ抗体、合成抗体、抗体軽鎖単量体、抗体重鎖単量体、抗体軽鎖二量体、抗体重鎖二量体、抗体軽鎖-抗体重鎖対、イントラボディ(intrabodies)、抗体融合体(抗体コンジュゲート)、一本鎖抗体(scFv)、アフィボディ(affibodies)、Fabフラグメント、F(ab')₂フラグメント、ジスルフィド連結Fv(sdFv)、抗イディオタイプ(抗Id)抗体(例えば抗-抗-Id抗体を含む)、ミニボディ(minibodies)、ドメイン抗体、抗体模倣物、及び上記のいずれかの抗原結合フラグメントが含まれる。抗体には、主要なクラスとして、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMが存在し

、重鎖定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、例えば、I g A、I g D、I g E、例えばI g G 1、I g G 2、I g G 3、及びI g G 4のサブクラスを含むI g G、並びにI g Mのクラスの抗体をそれぞれ生じさせる、アルファ（ α ）、デルタ（ δ ）、イプシロン（ ϵ ）、ガンマ（ γ ）、及びミュー（ μ ）が知られている。軽鎖定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、例えばカッパー（ κ ）又はラムダ（ λ ）のサブクラスが知られている。本発明の抗体は、いずれのクラス又はサブクラスであってもよい。

[0028] 「抗原結合フラグメント」は、抗体の抗原結合部（例えばC D R）を含む任意の抗原結合分子を指す。本発明の抗原結合フラグメントは、本発明の抗体に由来するC D Rを含み、例えば、限定するものではないが、F a b、F a b'、F（a b'）₂、F vフラグメント、直鎖抗体、s c F v、シングルドメイン抗体、及び抗原結合分子から形成される多重特異性抗体が挙げられる。本発明の抗原結合フラグメントは前記のいずれの形態のものであってもよいが、一態様としてはs c F vが例示される。s c F vは、リンカーペプチドにより共有結合で連結されたV H及びV Lヘテロダイマーである。リンカーペプチドは、例えば、約10アミノ酸～約25アミノ酸のペプチドで、柔軟性のためにグリシンに富むだけでなく、可溶性のためにセリン又はトレオニンに富んでいる。リンカーは、V H領域のN末端とV L領域のC末端とを連結し得るか、又はV H領域のC末端とV L領域のN末端とを連結し得るかのいずれかである。すなわち、N末端側からV LーリンカーーV Hの順でもよく、V HーリンカーーV Lの順でもよい。本発明に有用なリンカー配列には、限定されないが、グリシン／セリンリンカー、例えば、G G G S G G G S G G G S（配列番号61）、G l y 4 S e r（G 4 S）リンカー、例えば（G 4 S）₃リンカー（配列番号62：G G G G S G G G G S G G G G S）及び（G 4 S）₄リンカー（配列番号63：G G G G S G G G G S G G G G S G G G G S）、G G S S R S S S S G G G G S G G G G（配列番号：64）のリンカー配列が含まれる。s c F vは、定常領域の除去及びリンカーの導入にもかかわらず当初の免疫グロブリンの特異性を維持する。

[0029] 本発明の抗体およびその抗原結合フラグメントは、ヒトBCMAに結合する能力を保持する限り、抗体1～6に由来するFRを有していてもよく、異なる抗体に由来するFR、例えば異なる動物種の抗体に由来するFRを有していてもよい。本発明により提供されるCDRを当業者に周知の方法で他のFRに移植して作製された抗体およびその抗原結合フラグメントも本発明に包含される。また、本発明の抗体は抗体1～6に由来する定常領域を有していてもよく、他の抗体、例えば異なる動物種に由来する抗体の定常領域を有していてもよい。

[0030] 本発明の抗体の抗原（BCMA）に対する結合親和性は、一般的には、解離定数（KD）によって表され得る。親和性は、限定されないが、平衡解離定数（KD）及び平衡会合定数（KA）を含む、当該技術分野で知られている多くの方法で測定され得る及び／又は表され得る。KDは k_{off}/k_{on} の商から計算されるが、KAは k_{on}/k_{off} の商から計算される。 k_{on} は、例えば抗原に対する抗体の会合速度定数を指し、 k_{off} は、例えば抗原に対する抗体の解離定数を指す。 k_{on} 及び k_{off} は、BIACORE（商標）又はKinExA等の当業者に知られている技術によって決定され得る。

[0031] （2）キメラ抗原受容体（CAR）

本発明は、（i）抗原結合ドメインと、（ii）膜貫通ドメインと、（iii）細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体（CAR）であって、前記抗原結合ドメインが、本発明の抗BCMA抗体又はその抗原結合フラグメントを含む、CARを含む。本発明のCARは、組換え受容体である。これらの受容体をコードする核酸は、当該技術分野で知られている技術によりT細胞を含む免疫細胞に容易に導入され、その細胞によって発現される。CARによりBCMAを認識し、同時にBCMAに結合したCARを介して活性化された免疫細胞は、BCMAを発現する細胞を攻撃して破壊させる。腫瘍細胞上にBCMAが存在する場合、CARを発現する免疫細胞は、腫瘍細胞を傷害、死滅させることができる。

[0032] (i) 抗原結合ドメイン

本発明のCARに含まれる抗原結合ドメインは、本発明の抗BCMA抗体1～6のいずれかに由来する6つのCDRを有するポリペプチドであり、好ましくは抗体1～6の抗原結合フラグメント、例えば1種以上のscFvである。抗原結合ドメインは、場合により後述のスペーサドメイン、リーダーペプチドも含めて、細胞外ドメインと呼ぶこともある。

[0033] 本発明の一態様として、本発明のCARは、抗原結合ドメインと膜貫通ドメインの間にヒンジドメイン又はスペーサドメインを含んでもよい。本明細書において「ヒンジドメイン」及び「スペーサドメイン」という用語は区別なく使用される。このドメインは、300個までのアミノ酸、好ましくは10～100個のアミノ酸、最も好ましくは25～50個のアミノ酸を含む。スペーサドメインは、CARと抗原の結合を促進し、細胞内へのシグナル伝達を亢進する配列であることが好ましい。結合を促進すると予想されるアミノ酸としては、システイン、荷電アミノ酸又は潜在的なグリコシル化部位内のセリン又はスレオニンなどのアミノ酸が例示され、スペーサドメインを構成するアミノ酸として使用することができる。スペーサドメインは、CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3) のヒンジ領域であるアミノ酸番号118～178、CD8 β (GenBank: AA35664.1) のアミノ酸番号135～195、CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1) のアミノ酸番号315～396、又はCD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1) のアミノ酸番号137～152の全部又は一部を使用することができる。また、スペーサドメインとして、抗体H鎖又はL鎖の定常領域の一部(CH1領域又はCL領域)も使用することができる。さらに、スペーサドメインは、人為的に設計された配列であってもよい。本発明のCARは、多量体、特に二量体となるよう設計することができる。例えば、スペーサドメイン及び／又は膜貫通ドメインにシステインを挿入することにより、CARが多量体化(二量体化)される。

[0034] 本発明の一態様として、本発明のCARは、そのN末端にリーダーペプチド（本明細書では「シグナルペプチド」又は「リーダー配列」とも呼ばれる）を更に含み得る。リーダーペプチドのポリヌクレオチド配列及びポリペプチド配列は、当該技術分野において知られている。例えば、GM-CSF受容体のリーダーペプチドを使用できる。

[0035] (ii) 膜貫通ドメイン

本発明のCARは、抗原結合ドメインと細胞内ドメインを直接的又は間接的に連結する膜貫通ドメインを含む。また、本発明のCARは、これらのドメインの間に、任意にリンカー配列やスペーサー配列を含みうる。膜貫通ドメインは天然のポリペプチドに由来するものでもよく、人為的に設計したものでもよい。天然のポリペプチド由来の膜貫通ドメインは、任意の膜結合タンパク質又は膜貫通タンパク質から取得することができる。例えば、T細胞受容体の α 、 β 鎖、CD3 ζ 鎖、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITRの膜貫通ドメインを使用することができる。また、人為的に設計された膜貫通ドメインは、ロイシン及びバリンなどの疎水性残基を主に含むポリペプチドであってもよい。また、フェニルアラニン、トリプトファン及び／又はバリンのトリプレットが、人工膜貫通ドメインの各末端に見出されることが好ましい。場合により、短いオリゴペプチドリinker又はポリペプチドリinker、例えば長さが2～10個のアミノ酸配列からなるリンカーを、膜貫通ドメインと細胞内ドメインとの間に配置することができる。特にグリシン-セリン連続配列を有するリンカー配列を使用することができる。本発明の一態様として、膜貫通ドメインはCD28（NCBI RefSeq：NP_006130.1）のアミノ酸番号153～180の配列を有する膜貫通ドメインが使用できる。更に別の態様として、GITR（NCBI RefSeq：NP_004186.1）のアミノ酸番号162～183の配列を有する膜貫通ドメインが使用できる。

[0036] (i i i) 細胞内ドメイン

本発明のCARは、細胞内ドメインを含む。細胞内ドメインは、同一分子内に存在する抗原結合ドメインが抗原と結合（相互作用）した際に、細胞内にシグナルを伝達することが可能な分子である。T細胞受容体（TCR）の複合体のみを介して発生されたシグナルは、T細胞の活性化に不十分であること、そして二次又は共刺激シグナルも必要であることが知られている。天然のT細胞活性化シグナルは、2つの異なる種類の細胞質シグナル伝達配列、すなわちTCR複合体を介して抗原依存的一次活性化を開始させる配列（活性化ドメイン）及び抗原非依存的に作用して二次又は共刺激シグナルを提供する配列（共刺激ドメイン）によって伝達されている。好適な態様において、本発明のCARは、細胞内ドメインとして、前記活性化ドメイン及び／又は共刺激ドメインを含む。

[0037] 活性化ドメインは、免疫受容体チロシンベース活性化モチーフ（ITAM）として知られるシグナル伝達モチーフを含むことがある〔ネイチャー（Nature）、第338巻、第383-384頁（1989）〕。本発明で利用できる活性化ドメインは、例えば、CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、及びCD66dに由来するITAMを包含する。具体的には、CD3 ζ （NCBI RefSeq: NP_932170.1）のアミノ酸番号51～164、Fc ϵ R γ （NCBI RefSeq: NP_004097.1）のアミノ酸番号45～86、Fc ϵ R β （NCBI RefSeq: NP_000130.1）のアミノ酸番号201～244、CD3 γ （NCBI RefSeq: NP_000064.1）のアミノ酸番号139～182、CD3 δ （NCBI RefSeq: NP_000723.1）のアミノ酸番号128～171、CD3 ϵ （NCBI RefSeq: NP_000724.1）のアミノ酸番号153～207、CD5（NCBI RefSeq: NP_055022.2）のアミノ酸番号402～495、CD22（NCBI RefSeq: NP_001762.2）のアミノ酸番号7

07～847、CD79a (NCBI RefSeq: NP_001774.1) のアミノ酸番号166～226、CD79b (NCBI RefSeq: NP_000617.1) のアミノ酸番号182～229、CD66d (NCBI RefSeq: NP_001806.2) のアミノ酸番号177～252の配列を有するペプチド及びこれらと同一の機能を有するその変異体が挙げられる。なお、本明細書に記載するNCBI RefSeq IDやGenBankのアミノ酸配列情報に基づくアミノ酸番号は、各タンパク質の前駆体（シグナルペプチド配列などを含む）を全長として付された番号である。

[0038] 共刺激ドメインには、例えば、CD2、CD4、CD5、CD8 α 、CD8 β 、CD28、CD134、CD137、ICOS、及びCD154に由来する配列が含まれる。具体的な例としては、CD2 (NCBI RefSeq: NP_001758.2) のアミノ酸番号236～351、CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1) のアミノ酸番号421～458、CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2) のアミノ酸番号402～495、CD8 α (NCBI RefSeq: NP_001759.3) のアミノ酸番号207～235、CD8 β (GenBank: AAA35664.1) のアミノ酸番号196～210、CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1) のアミノ酸番号181～220、CD137 (4-1BB、NCBI RefSeq: NP_001552.2) のアミノ酸番号214～255、CD134 (OX40、NCBI RefSeq: NP_003318.1) のアミノ酸番号241～277、ICOS (NCBI RefSeq: NP_036224.1) のアミノ酸番号166～199の配列を有するペプチド及びこれらと同一の機能を有するその変異体が挙げられる。

[0039] 本発明は、細胞内ドメインとして活性化ドメイン又は共刺激ドメインを1つ又は複数、例えば2つ又は3つ含むCARを含む。特に好適には、細胞内ドメインとして、CD3 ζ の活性化ドメインを含むCAR、CD3 ζ の活性

化ドメイン及びCD28の共刺激ドメインを含むCARが例示される。同じ種類の細胞内ドメインを複数個タンデムに連結したCARも本発明に含まれる。本発明のCARでは、細胞内ドメインに含まれる各ドメインの間にオリゴペプチドリンカー又はポリペプチドリンカーを挿入して連結することができる。好ましくは長さが2～10個のアミノ酸からなるリンカーが使用できる。特にグリシン-セリン連続配列を有するリンカーを使用することができる。

[0040] (3) 本発明の核酸

本発明は、前記(1)の抗体又はその抗原結合フラグメント及び前記(2)のCARをコードする核酸を提供する。本発明の核酸は、細胞内で本発明の抗体、その抗原結合フラグメント又はCARを発現することができる。本発明の抗BCMA抗体1のVL領域及びVH領域をコードする核酸は、例えば配列番号49及び50の核酸配列を有し、本発明の抗BCMA抗体2のVL領域及びVH領域をコードする核酸は、例えば配列番号51及び52の核酸配列を有し、本発明の抗BCMA抗体3のVL領域及びVH領域をコードする核酸は、例えば配列番号53及び54の核酸配列を有し、本発明の抗BCMA抗体4のVL領域及びVH領域をコードする核酸は、例えば配列番号55及び56の核酸配列を有し、本発明の抗BCMA抗体5のVL領域及びVH領域をコードする核酸は、例えば配列番号57及び58の核酸配列を有し、本発明の抗BCMA抗体6のVL領域及びVH領域をコードする核酸は、例えば配列番号59及び60の核酸配列を有する。

[0041] 本発明の核酸の種類は限定されず、一本鎖核酸、二本鎖核酸、DNA、又はRNAが使用できる。うち、DNAとしては二本鎖DNA、一本鎖DNA、cDNAが例示され、RNAとしてはmRNAが例示される。

[0042] 本発明の核酸は、細胞内で発現されるようにプロモーター配列を有する核酸に連結することができる。プロモーターの例には、遺伝子または作動可能に連結された構築物の発現を構成的に促進するプロモーター、薬物など(例えば、テトラサイクリンまたはドキソルビシン)の作用により遺伝子または

作動可能に連結された構築物の発現を誘導するプロモーターが含まれる。本発明の核酸はまた、核酸の効率的な転写を得るために、プロモーターまたは転写開始部位と協働する他の調節エレメント、例えば、エンハンサー配列またはターミネーター配列を含んでなる核酸と連結することもできる。

[0043] ある実施形態では、本発明の核酸は、特定の宿主細胞での発現のためにコドンが最適化された核酸である。

[0044] (4) 本発明のベクター

本発明は、前記(3)の本発明の核酸を含むベクターを提供する。本発明のベクターは、所望の細胞に本発明の抗体、その抗原結合フラグメント又はCARを運び、発現させることができる。

[0045] 本発明のベクターの態様としては、複数のポリペプチドを発現させる場合に、当該複数のペプチドはそれぞれ別々のプロモーターにより転写、翻訳されてもよく、内部リボソームエントリー部位(IRES)を使用して一つのプロモーターで転写、翻訳されてもよい。さらに、複数のポリペプチドが自己切断ペプチドを介して相互に接続されたポリペプチドをコードする核酸が一つのプロモーターで転写、翻訳される構成であってもよい。

[0046] 本発明に使用可能なベクターは、適切な宿主細胞中で本発明の核酸を発現するように、本発明の核酸と機能的に連結している適切な制御配列を含む。制御配列としては、本発明の核酸を転写させるためのプロモーター、転写を制御するための任意のオペレーター配列、リボソーム結合部位配列、エンハンサー、ポリアデニル化配列、及び転写や翻訳の終了を制御する配列等が例示される。哺乳動物細胞内で転写を制御するプロモーターとしては、哺乳動物由来のプロモーター(PGKプロモーター、EF1- α プロモーター、 β -グロビンプロモーター等)、ウイルス由来のプロモーター(CMVプロモーター、SV40プロモーター、MMLV-LTRプロモーター、HIV-LTRプロモーター等)、人工的に構築されたプロモーター(CAGプロモーター等)が例示される。さらにベクターは、当業者に公知の各種の配列、例えば、制限酵素切断部位、薬剤耐性遺伝子等のマーカー遺伝子(選択遺伝

子)、シグナル配列、リーダー配列等を必要に応じて含んでいても良い。これらの各種配列又は部位は、発現させるポリペプチドの種類、使用する宿主細胞、培養培地等の条件に応じて、当業者が適宜選択して使用することができる。

[0047] 本発明のベクターは、本発明の核酸に加え、細胞にベクターが導入されたことを確認するためのマーカーとなり得る遺伝子(例えば、薬剤耐性遺伝子、リポーター酵素をコードする遺伝子、または蛍光タンパク質をコードする遺伝子)や治療用遺伝子を含んでもよい。

[0048] 本発明に使用可能なベクターは、宿主細胞のゲノムに組み込まれるベクター、組み込まれないベクター、細胞質に存在して自律的に複製するエピソードベクターのいずれもが使用できる。例えば、プラスミドベクター、ウイルスベクター、トランスポゾンベクター、人工染色体等が好適に使用できる。ウイルスベクターとしては、レトロウイルスベクター(オンコレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、シュードタイプベクターを包含する)、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(AAV)ベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、センダイウイルスベクター、エプスタインバーウイルス(EBV)ベクター、HSVベクターなどのウイルスベクターが使用できる。上記ウイルスベクターとしては、感染した細胞中でウイルスが自己複製できないように複製能を欠損させたものが好適である。種々のウイルスベクターとその製造方法は当業者に周知である。また、市販されているウイルスベクターを本発明に使用してもよい。

[0049] また、リポソーム及び陽イオン脂質などの縮合剤との併用により、非ウイルスベクターも使用することができる。更に、リン酸カルシウム形質移入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、パーティクルボンバードメントにより細胞に本発明の核酸を導入することができる。

[0050] (5) 本発明の細胞

本発明は、前記(1)の抗体又はその抗原結合フラグメント及び前記(2

）のCARを発現する細胞を提供する。本発明の細胞の由来は特に限定されず、哺乳動物由来の細胞、例えば、ヒト細胞、またはサル、マウス、ラット、ブタ、ウマ、およびイヌなどの非ヒト哺乳動物由来の細胞を使用することができる。本発明の細胞は、好適には、ヒト細胞である。本発明の細胞を培養することにより、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメントを製造することができる。

[0051] 本発明の細胞の種類は特に限定されず、いずれの細胞も使用可能である。例えば、体液、組織もしくは器官、例えば、血液（末梢血、臍帯血など）もしくは骨髓から採取、単離、もしくは精製された細胞、または上述の細胞を分化させる、もしくは多能性幹細胞（iPSC）を作製するために初期化することにより得られた細胞が使用可能である（例えば、Themeli et al 2013 参照）。末梢血単核細胞（PBMC）、免疫細胞、臍帯血単核細胞、線維芽細胞、脂肪細胞前駆体、肝細胞、皮膚ケラチノサイト、間葉幹細胞、脂肪幹細胞、種々の癌細胞株、または神経幹細胞が使用可能である。例えば、NK細胞またはT細胞、T細胞の前駆細胞（造血幹細胞、リンパ球前駆細胞など）またはそれらを含む細胞集団が使用可能である。T細胞の例には、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、制御性T細胞、細胞傷害性T細胞、および腫瘍浸潤リンパ球が含まれる。T細胞およびT細胞の前駆細胞を含む細胞集団には、PBMCが含まれる。上述の細胞は、生体から採取してもよく、生体から採取した細胞の拡大培養により得てもよく、または細胞株として樹立してもよい。さらに多能性幹細胞（ES細胞、iPS細胞等）から分化させて得られる細胞、例えば免疫細胞を本発明の細胞として使用してもよい。特定の細胞を認識して傷害する能力を有するT細胞のクローンよりiPS細胞を作製し、次いでこれを分化させてT細胞を得ることができる。こうして得られたT細胞は、出発材料としたT細胞クローンと同じ特異性の細胞傷害活性を有し、かつより未分化な状態にある。このようなT細胞に本発明のキメラ型受容体をコードする核酸を導入することにより、優れた治療効果を発揮する細胞を簡便に調製することが可能となる。

- [0052] 抗体の産生を目的とする場合は、組換えタンパク質の製造に適した細胞に本発明の抗体をコードする核酸または前記核酸を有するベクターが導入される。前記細胞としては、例えばチャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞系やリンパ組織を起源とする不死化細胞が例示される。例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（DHFR）を欠損したCHO細胞は抗体産生用の宿主細胞として好適である。
- [0053] 本明細書において「免疫細胞」とは、生体内において免疫機能に関与している細胞全般を言い、造血幹細胞、好中球、好塩基球、マクロファージ、リンパ球（B細胞およびT細胞）、単球、樹状細胞、ナチュラルキラー（NK）細胞、形質細胞等が例示される。これらのうち、本発明にはT細胞およびNK細胞が好適である。なお、本明細書における「免疫細胞」には前記の免疫細胞に分化する能力を有する「免疫細胞の前駆細胞」も包含される。
- [0054] 本発明の細胞または本発明の細胞から分化させた細胞の生体への移植が望まれる場合は、その移植を受ける生体自体またはその同種の生体から採取した細胞に核酸を導入することが好ましい。
- [0055] 本発明の細胞は、本発明の抗体又はその抗原結合フラグメント、もしくは本発明のCARを発現する他、疾病の治療に有用なポリペプチド（酵素、抗体、サイトカイン、受容体等）や核酸（siRNA等）をさらに発現するものであってもよい。
- [0056] 本明細書において「標的細胞」とは、患者において低減または排除することが望まれる細胞を意味し、腫瘍細胞や病原体が感染した細胞が例示される。特に限定されないが、好ましくは腫瘍細胞であり、さらに好ましくは造血器腫瘍細胞であり、固形腫瘍細胞である。
- [0057] 本発明のCARを発現する免疫細胞は、BCMAを発現する細胞を認識する能力を有し、当該細胞を、その細胞傷害活性により破壊する。この細胞傷害活性は公知の方法により評価できる。例えば、放射性物質、蛍光物質等で標識した標的細胞に対する、本発明の細胞の細胞傷害活性を、本発明の細胞により破壊された標的細胞より遊離される放射活性や蛍光物質の強度を測定

することによって評価できる。また、本発明の細胞や標的細胞より特異的に遊離されるGM-CSF、IFN- γ 等のサイトカイン量を測定することにより検出することもできる。

[0058] (6) 本発明の細胞の製造方法

本発明は、前記(3)の本発明の核酸を細胞に導入する工程を含む、細胞の製造方法を提供する。すなわち、本発明の細胞の製造方法により、前記(5)の本発明の細胞を製造することができる。

[0059] 当該工程は通常、生体外(ex vivo)で実施される。例えば、前記(3)の核酸や(4)のベクターを利用して、細胞を生体外で形質転換することにより製造することができる。

[0060] 本発明の細胞の製造方法には、哺乳動物、例えばヒト由来の細胞又はサル、マウス、ラット、ブタ、ウシ、イヌ等の非ヒト哺乳動物由来の細胞が使用できる。本発明の方法に使用される細胞に特に限定はなく、前記されている、任意の細胞を使用することができる。前記の細胞は生体より採取されたもの、それを拡大培養したもの又は細胞株として樹立されたもののいずれでもよい。製造された細胞又は当該細胞より分化させた細胞を生体に移植することが望まれる場合には、その生体自身又は同種の生体から採取された細胞に核酸やベクターを導入することが好ましい。また、核酸やベクターの導入前に細胞を刺激することにより、細胞への核酸導入の効率を向上させることができる。また、特定の種類の細胞を富化しておくことができる。例えば、PBMCを抗CD3抗体存在下で培養した場合にはT細胞の比率が向上する。さらに抗CD3抗体と組換えフィブロネクチンフラグメントであるレトロネクチンの共存下にPBMCを培養した場合にはCD8陽性T細胞を高含有する細胞集団が得られる。

[0061] リポソーム、陽イオン脂質、ポリエチレンジアミンなどの補助剤との併用により、非ウイルスベクターも本発明に使用することができる。更に、リン酸カルシウム形質移入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、パーティクルボンバードメントにより細胞に本発明の核酸を導入することが

できる。

[0062] 各種ウイルスベクターの製造方法、細胞への導入方法も当業者に周知である。例えばレトロウイルスベクターまたはレンチウイルスベクターを使用する場合、ベクターが有しているLTR配列及びパッケージングシグナル配列に基づいて適切なパッケージング細胞を選択し、これを使用してウイルス粒子を調製して遺伝子導入を実施することができる。また、トランスフェクション効率の高い293細胞や293T細胞を用いてレトロウイルス粒子またはレンチウイルス粒子を作製することもできる。レトロウイルス、レンチウイルスを基に製造された多くの種類のウイルスベクター及び当該ベクターのパッケージングに使用可能なパッケージング細胞やパッケージングキットは、各社より広く市販されている。

[0063] 本発明の核酸が導入された細胞を生体外で培養することにより、細胞数を拡大することができる。細胞の培養には、当該細胞に適した培地を使用すればよく、公知のまたは市販の培地から選択して使用することができる。例えば、リンパ球やその他の免疫細胞の培養に使用可能な培地も当業者には公知であり、また、種々の組成のものが市販されている。これらの培地はヒトまたは動物由来の血清（例えばウシ胎児血清；FBS又はFCS）を含むものの他、異種由来成分不含（xeno-free）培地、未知成分を含有しない培地（defined medium）等があり、目的に応じて選択することができる。また、細胞の培養には公知の培養用容器（プレート、シャーレ、フラスコ、バッグ、培養槽等）を使用することができる。また、培養の条件も通常の細胞培養と同じ条件（例えば32～37℃、5%CO₂等）とすればよい。さらに、適当な時間間隔をおいて培養物に新鮮な培地を加えて希釈する、培地を交換する、細胞培養用容器を交換するなどの操作を行うことができる。

[0064] （7）本発明の医薬組成物

本発明は、前記（5）の本発明の細胞、例えば本発明のCARを発現する免疫細胞を有効成分として含む医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物

は、薬学上許容可能な賦形剤を含むことができる。薬学上許容可能な賦形剤は、当業者にはよく知られており、例えば、リン酸緩衝生理食塩水（例えば、0.01Mリン酸塩、0.138M NaCl、0.0027M KCl、pH7.4）、塩酸塩、臭化水素酸塩、リン酸塩、硫酸塩などの鉱酸塩を含有する水溶液、生理食塩液、グリコール又はエタノールなどの溶液及び酢酸塩、プロピオン酸塩、マロン酸塩、安息香酸塩などの有機酸の塩を含む。湿潤剤又は乳化剤などの補助剤、及びpH緩衝剤も使用することができる。薬学上許容可能な賦形剤は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N. J. 1991) にも記載される。本発明の医薬組成物は、非経口投与、例えば、注射又は注入に適した公知の形態とすることができる。本発明の医薬組成物は更に、懸濁化剤、保存剤、安定化剤及び／又は分散剤などの製剤補助剤、保存中の有効期限を延ばすために保存剤を含んでいてもよい。

[0065] 本発明はまた、細胞医薬とは異なる医薬組成物も提供する。本発明の抗体およびその抗原結合フラグメントは、抗がん剤やその他の薬物と組み合わせた抗体薬物複合体（ADC）の作製に利用することができる。前記複合体はBCMAを発現する細胞、組織等に薬物を特異的に送達することができる。抗体又は抗原結合性フラグメントと薬物との結合は、当該薬物の構造等を考慮して適切な手段を選択すればよい。さらに、本発明は二重特異性抗体の作製に利用することができる。例えば、本発明の抗原結合性フラグメントを抗CD3抗体の抗原結合性フラグメントに結合させた二重特異性T細胞誘導抗体（BiTE）は、BCMA発現細胞にT細胞を誘導することで抗腫瘍効果を発揮する。二重特性抗体は本発明の核酸と他の抗体又はそのフラグメントをコードする核酸とを利用した組換えDNA技術により作製することが可能である。

[0066] （8）本発明の疾病の予防または治療方法

本発明は、前記（7）の本発明の医薬組成物を対象に投与することを特徴とする疾病の予防または治療方法を提供する。本発明の医薬組成物、例えば

本発明のCARを発現する細胞が投与される疾病としては、前記組成物に有効成分として含まれる細胞に感受性を示す疾患であればよく、BMCAを発現する細胞が関連する疾患が例示されるが、これらに限定はされない。本発明の医薬組成物により予防または治療される疾患としては、例えば、B細胞関連疾患が例示され、多発性骨髄腫（MM）、非ホジキンリンパ腫（NHL）、不確定な悪性度のB細胞増殖、リンパ腫様肉芽腫症、移植後リンパ増殖性障害、免疫調節性障害、関節リウマチ、重症筋無力症、特発性血小板減少性紫斑病、抗リン脂質抗体症候群、シャーガス病、グレーブス病、ウェゲナー肉芽腫症、結節性多発動脈炎、シェーグレン症候群、尋常性天疱瘡、強皮症、多発性硬化症、抗リン脂質抗体症候群、ANCA関連血管炎、グッドパスチャー病、川崎病、自己免疫性溶血性貧血及び急速進行性糸球体腎炎、重鎖病、原発性もしくは免疫細胞関連アミロイドーシス、または意義不明の単クローン性免疫グロブリン血症が含まれる。MMには、顕性多発性骨髄腫、くすぶり型多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、非分泌型骨髄腫、IgD骨髄腫、骨硬化性骨髄腫、骨の孤立性形質細胞腫、及び髄外性形質細胞腫が含まれる。NHLは、バーキットリンパ腫、慢性リンパ球性白血病／小リンパ球性リンパ腫（CLL／SLL）、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、免疫芽球性大細胞型リンパ腫、前駆Bリンパ芽球性リンパ腫、及びマントル細胞リンパ腫が含まれる。

[0067] 医薬組成物の投与方法としては、皮内投与、皮下投与、静脈内投与などが利用でき、全身投与、患部局所またはその近傍の組織、例えば皮下に局所投与しても良い。投与量は、投与される対象の年齢、体重、投与方法等により適宜調整することができる。その際には投与回数や複数回投与される場合の投与間隔も考慮される。投与される対象は、動物であり、好ましくは哺乳動物、例えばヒト、又はサル、マウス、ラット、ブタ、ウマ、イヌなどの非ヒト哺乳動物であってもよい。より好ましくは、ヒトである。

[0068] 本発明の疾病の予防または治療方法では、本発明の細胞が投与された対象に、本発明の細胞が発現するCARに結合するリガンドを投与することによ

り、生体内での本発明の細胞の増殖を誘導しおよび／または当該細胞の生体内での存続期間を延長することができる。リガンドの投与方法には特に限定はないが、生体内における本発明の細胞の分布等を考慮して、適切な方法が選択される。リガンドの投与量や投与スケジュールも、組み合わせる細胞の種類や投与量、疾病の種類等を考慮して適宜設定すればよい。

実施例

[0069] 以下の実施例により本発明を更に具体的に説明するが、本発明の範囲はこれらの実施例によって限定されない。

[0070] 実施例1 抗BCMA抗体のクローニング

BALB/cマウス3匹へRecombinant Human BCM A/TNFRSF17 Fc Chimera (R&D Systems社製、Cat. No. 193-BC)を腸骨リンパ節法で免疫した。免疫したマウスの腸骨リンパ節を採取してリンパ球とSP2/Oミエローマ細胞を融合し、抗体産生ハイブリドーマをクローニングした。抗ヒトBCMA抗体を産生するハイブリドーマ6クローンからNucleoSpin RNA (タカラバイオ社製)を用いて全RNAを抽出した。350ngのハイブリドーマ由来全RNAを鋳型とし、SMARTer RACE 5' / 3' Kit (タカラバイオ社製)を用いて逆転写反応(RT反応)を行い、cDNAを合成した。

[0071] 各ハイブリドーマから産生される抗体のアイソタイプ判定は全てIgG1及びκであったため、VL領域をコードするDNAのPCRは、5' - RACE cDNAの5'末端に対応するUPMセンスプライマー(配列番号67: GATTACGCCAAGCTTCTCATTCCTGTTGAAGCTCTTGACAAT)とmIgG1のL鎖定常領域の末端に対応するアンチセンスプライマー(配列番号68: GATTACGCCAAGCTTCTCAATTTTCTTGCCACCTTGGTGC)を混合したプライマー対で、一方、VH領域をコードするDNAのPCRは5' - RACE cDNAの5'末端に対応するUPMセンスプライマーとmIgG1のH鎖定常領域CH1の末端に対応するアンチセンスプライマーを混合したプライマー対で行った。つ

まり、PCRは、Tricine-EDTA Bufferで5.5倍に希釈したRT反応後の溶液（cDNA溶液）2.5 μ Lを用いて、10 $\times$ センスプライマー、50 nMアンチセンスプライマー、2 $\times$ SeqAmp Buffer、SeqAmp DNA polymerase（タカラバイオ社製）を加えて総量50 μ Lとし、TaKaRa PCR Thermal Cycler Dice（タカラバイオ社製）にて94 $^{\circ}$ Cで30秒、68 $^{\circ}$ Cで30秒、72 $^{\circ}$ Cで3分を25サイクル繰り返した。

[0072] 次に、アガロースゲル電気泳動でPCR産物を分離し、増幅された可変領域DNA断片、すなわちLV領域及びHV領域をそれぞれコードするDNAについてクローニングを行った。つまり、電気泳動の後に増幅断片に相当するバンドをゲルブロックとして切り出して、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up（タカラバイオ社製）を用いてDNAを精製し、クローニングベクターとのIn-Fusion反応を行った。つまり、クローニングベクター 50 ng、アガロースゲルからの精製産物 7.0 μ L、In-Fusion HD Master Mix（タカラバイオ社製） 2.0 μ Lを加えて総量10 μ Lとし、TaKaRa PCR Thermal Cycler Diceにて50 $^{\circ}$ Cで10分間反応させた。この反応物2.5 μ Lと大腸菌（Stellar Competent Cells：タカラバイオ社製）を用いてトランスフォーメーションを行った。LV領域及びHV領域をコードする各DNAについて得られたコロニーを10個選択して培養した。NucleoSpin Plasmid EasyPureを用いて培養物よりプラスミドを抽出し、制限酵素EcoRI及びHindIIIで二重消化することで、増幅された可変領域DNA断片の挿入を確認した。

[0073] 可変領域DNA断片の塩基配列は、それらの挿入が確認できたプラスミドについて、3.2 pmolのM13 reverse primer（配列番号69：CAGGAAACAGCTATGAC）とM13 Forward primer（配列番号70：GTAAAACGACGGCCAGT）を用いてシーケンスすることで決定し

た。

[0074] 得られた塩基配列をBLASTで検索したところ、全てのクローンがIgG L鎖またはH鎖の塩基配列と相同性を示したことから、クローニングしたPCR産物はL鎖、H鎖の可変領域をコードする核酸を含むDNA断片であることが確認された。この塩基配列中で定常領域の5'端より上流に存在し、かつ定常領域がイン・フレームとなるような開始コドンATGを検索して、アミノ酸配列を推定した。各クローンの軽鎖および重鎖各々の推定アミノ酸配列をClustalW2 Multiple Sequence Alignmentにて比較し、相同性を最大に調整する操作を行った後、Kabatの定義による相補性決定領域 (complementarity determining region: CDR) について比較した。L鎖のCDR1はアミノ酸が24～38番目、CDR2は54～60番目、CDR3は113～121番目であった。一方、H鎖のCDR1はアミノ酸が31～35番目、CDR2は50～66番目、CDR3は99～110番目であった。また、一連の解析結果から、各ハイブリドーマのクローンが産生する抗体は全て異なるものであると推定された。かくして得られた抗体を抗BCMA抗体1～6と称す。抗BCMA抗体1～6のCDR、VL、VHそれぞれの配列を表2-1～表2-5に示す。抗BCMA抗体1～6のアミノ酸配列の比較を図1に示す。

[0075]

[表2-1]

配列番号	名称	配列
1	抗体1 VL CDR1	RASKSVSTSGYSYMH
2	抗体1 VL CDR2	LASNLES
3	抗体1 VL CDR3	QHSRELPFT
4	抗体1 VH CDR1	SYVMH
5	抗体1 VH CDR2	YIIPYNDGTYNEKFKG
6	抗体1 VH CDR3	LTFSYDSYAMDF
7	抗体2 VL CDR1	RASKSVSTSGYSYMH
8	抗体2 VL CDR2	LASNLES
9	抗体2 VL CDR3	QHIRELPIT
10	抗体2 VH CDR1	NYVMH
11	抗体2 VH CDR2	YIIPYNDGTYNEKFKG
12	抗体2 VH CDR3	LTFSYDSYAMDY
13	抗体3 VL CDR1	RASKNVSTSGYRYMH
14	抗体3 VL CDR2	LASNLES
15	抗体3 VL CDR3	QHSRELPFT
16	抗体3 VH CDR1	SYIMHW
17	抗体3 VH CDR2	YIIPYNDGTYNEKFKG
18	抗体3 VH CDR3	LTFSYDSYAMDY

[0076]

[表2-2]

配列番号	名称	配列
19	抗体4 VL CDR1	RASKSVSTSGYSYMH
20	抗体4 VL CDR2	LASNLES
21	抗体4 VL CDR3	QHSRELPFT
22	抗体4 VH CDR1	NYIIHW
23	抗体4 VH CDR2	YIIPYNDGSKYNEKFKG
24	抗体4 VH CDR3	LTFSYDSYAMDY
25	抗体5 VL CDR1	RASKSVSTSGYSYIH
26	抗体5 VL CDR2	LASNLES
27	抗体5 VL CDR3	QHSRELPFT
28	抗体5 VH CDR1	NYIMHW
29	抗体5 VH CDR2	YIIPYNDGTKYNEQFTG
30	抗体5 VH CDR3	LTFSYDSYAMDY
31	抗体6 VL CDR1	RASKSVSTSGYSYMH
32	抗体6 VL CDR2	LASNLES
33	抗体6 VL CDR3	QHSRELPFT
34	抗体6 VH CDR1	GYIMHW
35	抗体6 VH CDR2	YIIPYNDGTKYNEKFKG
36	抗体6 VH CDR3	LTFSYDSYAMDY

[0077]

[表2-3]

配列番号	名称	配列
37	抗体1 VL鎖アミノ酸	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGT KLEIK
38	抗体1 VH鎖アミノ酸	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTYTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYIIP YNDGTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSY AMDFWQGTSVTVSS
39	抗体2 VL鎖アミノ酸	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHIRELPITFGSGT KLEIK
40	抗体2 VH鎖アミノ酸	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYVMHWVKQKPGQGLEWIGYIIP YNDGTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELTSLTSEDSAVFYCARLTFSDSY AMDYWGQTSVTVSS
41	抗体3 VL鎖アミノ酸	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKNVSTSGYRYMHWYQQKSGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGT KLEIK
42	抗体3 VH鎖アミノ酸	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIP YNDGTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSY AMDYWGQTSVTVSS
43	抗体4 VL鎖アミノ酸	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPRLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGT KLEIK
44	抗体4 VH鎖アミノ酸	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQKPGQGLEWIGYIIP YNDGSKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSY AMDYWGQTSVTVSS
45	抗体5 VL鎖アミノ酸	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYIHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGT KLEIK
46	抗体5 VH鎖アミノ酸	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIP YNDGTKYNEQFTGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSY AMDYWGQTSVTVSS
47	抗体6 VL鎖アミノ酸	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIY LASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQHSRELPFTFGSGT KLEIK
48	抗体6 VH鎖アミノ酸	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTGYIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIP YNDGTKYNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSY AMDYWGQTSVTVSS

[0078]

[表2-4]

配列番号	名称	配列
49	抗体1 VL鎖核酸	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG GGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTT ATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT CTTGCAATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGTGTCGAA CCTATTACTGTGACACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACA AAGTTGGAAATAAAA
50	抗体1 VH鎖核酸	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGT GAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATACACTAGCTATGTTATGCACT GGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTATTCCT TACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTG AGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTGACCTTTTCTTACGACTCCTAT GCTATGGACTTCTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
51	抗体2 VL鎖核酸	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG GGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGTTATAGTT ATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT CTTGCAATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGTGTCGAA CGTATTACTGTGACACATTAGGGAGCTTCCAATACGTTTCGGCTCGGGGACA AAGTTGGAAATAAAA
52	抗体2 VH鎖核酸	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGT GAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAACTATGTTATGCACT GGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTATTCCT TATAATGATGGTACTAAATACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCACCAGCCTGACCTCTG AGGACTCTGCGGTCTTTTACTGTGCAAGATTGACCTTTTCTTACGACTCCTAT GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
53	抗体3 VL鎖核酸	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG GGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAATGTCACTACATCTGGCTATAGGT ACATGCACTGGTACCAACAGAAATCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT CTTGCAATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGTGTCGAA CCTATTACTGTGACACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACA AAGTTGGAAATAAAA
54	抗体3 VH鎖核酸	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGT GAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATATTATGCACT GGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTATTCCT TACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGAC TTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTG AGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTGACCTTTTCTTACGACTCCTAT GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[表2-5]

配列番号	名称	配列
55	抗体4 VL鎖核酸	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG GGCCACCATCTCATGCAAGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTT ATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAGACTCCTCATCTAT CTTGCAATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGTGCTGCAA CCTATTACTGTGACACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACA AAGTTGGAAATAAAA
56	抗体4 VH鎖核酸	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGT GAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACCTAATAATTATACACT GGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTATTCCT TACAATGATGGTTCTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGAC TTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTG AGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTGACCTTTTCTTACGACTCCTAT GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
57	抗体5 VL鎖核酸	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG GGCCACCATCTCATGCAAGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTT ATATACACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT CTTGCAATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGTGCTGCAA CCTATTACTGTGACACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACA AAGTTGGAAATAAAA
58	抗体5 VH鎖核酸	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGT GAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACCTAATAATTATGCACT GGGTGAAGCAGAGGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTATTCCT TACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGCAGTTCACAGGCAAGGCCACACTGAC TTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTG AGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTGACCTTTTCTTACGACTCCTAT GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
59	抗体6 VL鎖核酸	GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTATCTCTGGGGCAGAG GGCCACCATCTCATGCAAGGCCAGCAAAAGTGTCACTACATCTGGCTATAGTT ATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTAT CTTGCAATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCACTGGCAGTGGGTC TGGGACAGACTTCACCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGTGCTGCAA CCTATTACTGTGACACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTTTCGGCTCGGGGACA AAGTTGGAAATAAAA
60	抗体6 VH鎖核酸	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAACCTGGGGCTTCTGT GAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCAGTGGCTATATTATGCACT GGGTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTATTCCT TACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGAC TTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTG AGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGATTGACCTTTTCTTACGACTCCTAT GCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0080] 実施例2 抗BCMA CAR

(1) CAR発現ベクタープラスミドの構築

実施例1で取得した各抗BCMA抗体の抗原結合フラグメントを含むCARを作製した。N末端より、GM-CSF受容体のシグナルペプチド配列、抗BCMA抗体のVL領域、リンカー配列（18アミノ酸、配列番号64、「18aaリンカー」ともいう）、抗BCMA抗体のVH領域、CD28の細胞外領域、膜貫通領域および細胞内領域、ならびにCD3と細胞内領域を

含むCARをコードする核酸を作製した。このCARをBCMA-CARと命名した。VH領域とVL領域の順を入れ替えたCARをコードする核酸も作製した。なお、VH領域とVL領域の順序を区別して表現する場合は、BCMA-CARのLHコンストラクトまたはHLコンストラクトと称する。さらに、リンカー長を区別して表現する場合は、例えば18アミノ酸長リンカーの場合、BCMA-CARのL18HコンストラクトまたはH18Lコンストラクトと称する。これらのCARの構造を図2に示す。この核酸をpMEI-5 DNAベクター（タカラバイオ社製）に挿入してレトロウイルスプラスミドpMEI-5/BCMA-CARを調製した。

[0081] (2) レトロウイルスベクター溶液の調製

293T細胞株とPG13細胞株（ATCC CRL-10686）は、特に断らない限り、10%ウシ胎児血清（FBS）および100 U/mL Penicillin-Streptomycinを添加したDMEM/F-12培地で培養した。

[0082] 以下に示す操作で、実施例2-(1)で作製した各種レトロウイルスプラスミドを使用してそれぞれのレトロウイルスベクター溶液を調製した。まず、293T細胞で一過性のレトロウイルスベクター上清を調製した。293T細胞に、レトロウイルスパッケージングプラスミド（Gag-pol発現プラスミドpGP、VSV-G発現プラスミドpVSV-G（Uchibori R, et al. Mol Ther Oncolytics. 2018; 12: 16-25.））ならびにレトロウイルスプラスミドpMEI-5/BCMA-CARをリン酸カルシウム法で導入し、37℃、5% CO₂の条件で7時間培養した。終濃度5 mM酪酸ナトリウム（STEMCELL Technologies Inc. 社製）を添加したDMEM/F-12培地に培地を全量交換し、37℃、5% CO₂の条件で16時間培養した。DMEM/F-12培地に培地を全量交換し、32℃、5% CO₂の条件で24時間培養した。培養後、2,000×gで10分間の遠心分離を行ってウイルスベクター上清を回収し、さらに0.45 μmフィルターを

用いたろ過により細胞破片を除去した。このウイルス上清に R e t r o - X
C o n c e n t r a t o r（タカラバイオ社製）を添加して混和した後に
4℃で一晩静置し、混合物を 2, 000×g で 10 分間の遠心分離に供した
後にペレットを 1 mL の D M E M / F - 1 2 培地に再懸濁して濃縮ウイルス
溶液とした。

[0083] 次に、パッケージング細胞株として P G 1 3 細胞株を使用してレトロウ
イルスベクターの製造を行った。すなわち、6 ウェルプレートへ播種した P G
1 3 細胞を、8 μ g / mL のポリブレン存在下で、前記の精製したウイルス
溶液に暴露し、37℃、5% C O₂ に設定したインキュベータ内に 7 時間静
置した後に D M E M / F - 1 2 培地を 1 mL 添加し、インキュベータ内にさ
らに一晩静置した。翌日に培地を全量交換して 37℃、5% C O₂ に設定し
たインキュベータ内に 6 時間静置した後、形質導入した細胞を剥がして全量
を T - 7 5 フラスコへ継代した。サブコンフルエントに達した段階で限界希
釈法により単一細胞クローンを単離するために、37℃、5% C O₂ に設定
したインキュベータ内で 7 ~ 10 日間培養した。トリプシン処理でウェルか
ら剥離させた細胞を 12 ウェルプレートに播種して 37℃、5% C O₂ に設
定したインキュベータ内で 3 ~ 4 日間培養した。トリプシン処理でウェルか
ら細胞を剥離し、3 / 4 量の細胞を凍結保存液（セルバンカー：日本全薬工
業株式会社製）に再懸濁して - 80℃フリーザー内で冷凍保存した。残りの
1 / 4 量を 12 ウェルプレートに播種して 37℃、5% C O₂ に設定したイ
ンキュベータ内で 3 ~ 4 日間培養した。細胞がコンフルエントに達した時点
で、終濃度 5 mM 酪酸ナトリウムを添加した D M E M / F - 1 2 培地に培地
を全量交換した。培養物は 32℃、5% C O₂ に設定したインキュベータ内
に 48 時間静置した。培養物を 2, 000×g で 10 分間の遠心分離に供し
た後、上清を回収して 0.45 μ m フィルターを用いたろ過により細胞破片
を除去し、レトロウイルスベクター溶液とした。レトロウイルスベクター溶
液の一部を分取して力価（R e t r o v i r u s T i t e r S e t （
f o r R e a l T i m e P C R）：タカラバイオ社製）を測定し、残

りは凍結セラムチューブに分注して使用時まで -80°C フリーザー内で冷凍保存した。各クローンのウイルス上清力価 (Retrovirus Titer Set (for Real Time PCR)) を測定して選別することにより、レトロウイルスベクター安定産生クローン株を樹立した。上清中のウイルス力価が 4.0×10^9 copies/mL以上であったレトロウイルスベクター安定産生クローン株については解凍した凍結保存細胞をT-75フラスコに播種し、その後T-225フラスコへと拡大培養を行い、コンフルエントに達した時点で培地を終濃度5 mM酪酸ナトリウムを添加したDMEM/F-12培地に交換した。前述の方法と同様の手順でレトロウイルスベクター溶液を回収し、凍結セラムチューブに分注して使用時まで -80°C フリーザー内で冷凍保存した。

[0084] (3) 抗BCMA-CARの機能検定に用いるJurkat細胞の作製

Jurkat細胞株 (ECACC EC88042803) およびその形質導入細胞は、特に断らない限り、10%ウシ胎児血清 (FBS) および100 U/mL Penicillin-Streptomycinを添加したRPMI 1640培地で培養した。

[0085] 以下に示す操作で、CARからの活性化シグナルに応答してルシフェラーゼ遺伝子の発現が誘導されるスイッチ機能を有した発現カセットを搭載した自己不活化型レトロウイルスベクター溶液を調製した。この発現カセットはBCMA-CARの機能を検定することができる。まず、293T細胞で一過性のレトロウイルスベクター上清を調製した。293T細胞に、レトロウイルスパッケージングプラスミド (Gag-pol発現プラスミドpGP、VSV-G発現プラスミドpVSV-G) ならびにレトロウイルスプラスミドpRetro-X Q/BR6N-ELucをリン酸カルシウム法で導入し、 37°C 、5% CO_2 の条件で7時間培養した (Uchibori R, et al. Mol Ther Oncolytics. 2018; 12:16-25.)。終濃度5 mM酪酸ナトリウム (STEMCELL Technologies Inc. 社製) を添加したDMEM/F-12

培地に培地を全量交換し、37℃、5% CO₂の条件で16時間培養した。その後、DMEM/F-12培地に培地を全量交換し、32℃、5% CO₂の条件で24時間培養した。培養後、2,000×gで10分間の遠心分離を行ってウイルスベクター上清を回収し、さらに0.45 μmフィルターを用いたろ過により細胞破片を除去した。

[0086] (4) 抗BCMA-CARの機能検定

Jurkat細胞への形質導入には、RetroNectin結合ウイルス感染法(J Biochem, 2001 Sep; 130(3): 331-4)を用いた。PBSで希釈した20 μg/mL RetroNectin溶液(タカラバイオ社製)を表面未処理の24ウェルプレートに0.5 mL/ウェル加えて4℃で放置した。RetroNectin溶液を除き、ブロッキング溶液(2% ウシ血清アルブミン(BSA))を添加したリン酸緩衝生理食塩水(PBS))を0.5 mL/ウェル加え、室温で30分間静置してブロッキング処理を行った。ブロッキング溶液を除き、PBSを0.5 mL/ウェル加えて一度洗浄し、PBSを除去した。実施例実施例2-(3)で調製したBR6N-ELucレトロウイルスベクター溶液(PBSで4.0×10⁹ copies/mLに希釈)をRetroNectinコートプレート上にそれぞれ0.5 mL/ウェル加えた。32℃に保温した遠心機にレトロウイルスを加えたプレートをセットし、32℃、1,960×gの条件で2時間遠心し、RetroNectin上へのウイルス粒子の吸着を促した。プレートからウイルス希釈液を除去し、1% BSAを添加したPBS 1 mLで洗浄した。Jurkat細胞(RPMI 1640培地で4.0×10⁵ cells/mLに希釈)をウイルス吸着済みのプレートに1 mL/ウェル加え、32℃、1,960×gの条件で10分間遠心した。プレートは37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内に一晩静置して形質導入を行った。形質導入したJurkat細胞を翌日に回収し、RPMI 1640培地7.5 mLに懸濁し、37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内に静置した(Day 1)。サブコンフルエントに達した段階で限界

希釈法により単一細胞クローンを単離するために、37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内で7～10日間培養した。ウェルから細胞を採取し、12ウェルプレートに播種して37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内で3～4日間培養した。ウェルから細胞を採取し、T-25フラスコに播種して37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内で3～4日間培養した。1.0×10⁵ cells/wellを発光シグナル検出用の96ウェルホワイトマイクロプレートに播種し、残りの細胞はT-75フラスコに播種して培養を継続した。96ウェルホワイトマイクロプレートに播種した細胞にTPA (12-O-Tetradecanoylphorbol 13-acetate) およびIonomycinを添加して、24時間後にルシフェラーゼアッセイを行って発光強度を測定した。無刺激群の発光強度が低値であり、かつ無刺激群と刺激群の発光強度比が優れている細胞を、BCMA-CARの機能検定として用いる形質導入Jurkat細胞 (Jurkat/iELuc細胞) とした。Jurkat/iELuc細胞はT-225フラスコへと拡大培養を行い、コンフルエントに達した時点で凍結保存液 (セルバンカー: 日本全薬工業株式会社製) に懸濁して凍結セラムチューブに分注し、使用時まで-80℃フリーザー内で冷凍保存した。

[0087] (5) 抗BCMA-CAR構築物のJurkat/iELuc細胞への形質導入

(抗BCMA-CARの機能検定)

Jurkat/iELuc細胞への形質導入には、RetroNectin結合ウイルス感染法を用いた。実施例2-(4)と同じ操作でBCMA-CARレトロウイルスを吸着させたRetroNectinコート24ウェルプレートにJurkat/iELuc細胞 (RPMI 1640培地で4.0×10⁵ cells/mLに希釈) を1mL/ウェル加え、32℃、1,960×gの条件で10分間遠心した。プレートは37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内に一晩静置して形質導入を行った。形質導入したJurkat/iELuc細胞を翌日に回収し、RPMI 1640培地7.5

mLに懸濁し、37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内に静置した（Day 1）。

[0088] 作製された形質導入細胞（GMC）をDay 7に回収し、慢性骨髓性白血病細胞株K562細胞、BCMAを発現するK562細胞（K562-BCMA）、又はBCMAを発現するヒト骨髓腫細胞株U266細胞と、発光シグナル検出用の96ウェルホワイトマイクロプレートにエフェクター：ターゲット比1：1で混和し、37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内に18時間静置して共培養した。Bright-Glo Luciferase Assay試薬（Promega社製）を添加して、形質導入細胞の発光強度を測定した。その結果を図3に示す。図3に示す通り、BCMA-CARを形質導入したJurkat/iELuc細胞では、BCMA特異的に発光強度の増加が観察された。特に抗BCMA抗体1由来のLHコンストラクトは、コントロール（形質導入細胞のみ）の発光強度が低く、かつコントロール群とU266共培養群の発光強度比が46.9倍と、最も反応性に優れていた。

[0089] （6）リンカーの長さの比較

抗BCMA抗体1由来のLHコンストラクトについて、実施例2-（1）と同様の手順でリンカーアミノ酸長を15残基（L15H、配列番号62）または20残基（L20H、配列番号63）に置換したレトロウイルスプラスミドを構築し、レトロウイルスベクター溶液をそれぞれ調製した。実施例2-（2）～（5）と同様の手順でJurkat/iELuc細胞に形質導入し、K562細胞、K562-BCMA細胞、又はU266細胞と、発光シグナル検出用の96ウェルホワイトマイクロプレートにエフェクター：ターゲット比1：1で混和し、37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内に18時間静置して共培養した。コントロールとして、形質導入していない細胞（Jurkat細胞およびJurkat/iELuc細胞）も同様に共培養した。Bright-Glo Luciferase Assay試薬（Promega社製）を添加して、形質導入細胞の発光強度を測定した。

。その結果を図4に示す。図4に示す通り、BCMA-CARを形質導入したJurkat/iELuc細胞では、BCMA特異的に発光強度の増加が観察された。特にL20Hコンストラクトは、コントロール（形質導入細胞のみ）の発光強度が低く、かつコントロール群とU266共培養群の発光強度比が62.8倍と、最も反応性に優れていた。抗体1由来のLHコンストラクトを有しリンカーの長さが20であるCARをBCMA-CAR（L20H）とし、そのアミノ酸配列を配列番号65に示す。また、BCMA-CAR（L20H）をコードする核酸の塩基配列を配列番号66に示す（表3）。

[0090]

[表3]

配列番号	名称	配列
65	BCMA-CAR (L20H) アミノ酸	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVST SGYSYMHWYQQKPGQPPRLLIYASNLESGVPARFSGSGSGTDFTLNHPVEE EDAATYYCQHSRELPTFGSGTKLEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLQQ SGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDGSK YNEKFKGKATLTSKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSYAMDYWG QGTSVTVSSATGAAAEVMPYPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSK PFWVLVVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRK HYQPYAPPRDFAAYRSRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVLDK RRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALPPR
66	BCMA-CAR (L20H) 核酸	ATGCTGCTCCTGGTGACCAGCTTGCTGCTGTGCGAGCTTCTCACCAGCCTT CCTCCTGATCCCCGACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAGCTGTAT CTCTGGGCGAGAGGCCACCATCTCATGCAGGGCCAGCAAAAGTGTCAGTACA TCTGGCTATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAG ACTCCTCATCTATCTTGCATCCAACCTAGAATCTGGGGTCCCTGCCAGGTTCA GTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAG GAGGATGCTGCAACCTATTACTGTCAGCACAGTAGGGAGCTTCCATTACGTT CGGCTCGGGGACAAAGTTGGAATAAAAGGGGAGGAGGATCTGGTGGAGGAG GGAGTGGCGGTGGCGGATCTGGAGGTGGAGGAAGCGAGGTCCAGCTGCAGCAG TCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGTCTGCAAGGC TTCTGGATACACATTCACCTAACTATATTATACACTGGGTGAAGCAGAAGCCTG GGCAGGGCCTTGAGTGGATTGGATATATTATTCCTTACAATGATGGTTCTAAG TACAATGAGAAGTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAG CACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATT ACTGTGCAAGATTGACCTTTTCTTACGACTCCTATGCTATGGACTACTGGGT CAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCTaccggtgeggccgcaATTGAAGT TATGTATCCTCCTCCTTACCTAGACAATGAGAAGAGCAATGGAACCATTATCC ATGTGAAAGGGAACACCTTTGTCCAAGTCCCCTATTTCCCGGACCTTCTAAG CCCTTTTGGGTGCTGGTGGTGGTGGGGGAGTCTGGCTTCTATAGCTTGCT AGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCC TGCACAGTGAATGACATGAACATGACTCCCCCGCGCCCGGGCCACCCGCAAG CATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGTCCAGAGT GAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGC TCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAG AGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCA GGAAGGCCTGTACAATGAAGTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTG AGATTGGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTAC CAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTACATGCAGGC CCTGCCCCCTCGCTAA

[0091] 実施例3 抗BCMA-CARの評価

(1) 抗BCMA-CAR構築物のT細胞への形質導入

インフォームド・コンセントが得られたボランティアから末梢血をBD
バキュティナCPT単核球分離用採血管に採取し、25℃、1,500×g

の条件で15分間遠心して分離された末梢血単核球（PBMC：peripheral blood mononuclear cells）と血漿をそれぞれ回収した。PBMCはCELL OTION（日本全薬工業株式会社製）で2回洗浄し、細胞凍結保存液CP-1（Kyokuto pharmaceutical industrial co., ltd. 社製）とヒト血清アルブミン（HSA）（Albuminar; CSL Behring社製）とRPMIの混合液に混和して-80℃で使用時まで凍結保存した。血漿は56℃に設定したウォーターバスで30分の非働化処理を行い、-80℃で使用時まで凍結保存した。

[0092] PBMCの活性化に際し、ACD-A液（テルモ社製）で希釈した5 μ g/mL CD3 Monoclonal Antibody（OKT3）（Thermo Fisher Scientific社製）と20 μ g/mL RetroNectin（タカラバイオ社製）を表面未処理の6ウェルプレートに1mL/ウェル加え、37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内で3時間静置した後、4℃で一晩放置してOKT3/RetroNectinコートプレートを作製した。解凍したPBMCを培地（175 IU/mL IL-2と0.1% 非働化済み自己血漿を添加したG-T551培地（タカラバイオ社製））に懸濁して2.0 $\times$ 10⁵ cells/mLに調整した細胞懸濁液を調製した。DMEM/F-12培地（FBS不含、Penicillin-Streptomycin不含）で3回洗浄したOKT3/RetroNectinコートプレートに、前記の細胞懸濁液を6.5mL/ウェル加えた。プレートは37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内に4日間静置し、PBMC中のT細胞の活性化と増殖を促進させた。

[0093] T細胞への形質導入には、RetroNectin結合ウイルス感染法を用いた。実施例2-（4）と同じ操作で、実施例2-（6）で調製した抗体1由来のBCMA-CAR（L20H）をコードする核酸を含むレトロウイルスベクター溶液を吸着させたRetroNectinコート24ウェルプ

レートを作製した、このプレートにOKT3／Retronectinで活性化したT細胞（ 175 IU/mL のIL-2と0.1% 非働化済み自己血漿を添加したGT-T551培地で $4.0 \times 10^5 \text{ cells/mL}$ に希釈）を 4 mL ／ウェル加え、 32°C 、 $1,960 \times g$ の条件で10分間遠心した。プレートは 37°C 、5% CO_2 に設定したインキュベータ内に一晩静置して形質導入を行った。形質導入したT細胞を翌日に回収し、終濃度 175 IU/mL のIL-2を添加した基本培地（0.1%の非働化済み自己血漿を添加したGT-T551培地（タカラバイオ社製）） 30 mL に懸濁し、 37°C 、5% CO_2 に設定したインキュベータ内に静置した（Day 1）。Day 4、7、9、11に、終濃度 175 IU/mL のIL-2を添加した基本培地を等量加えた。Day 14に細胞を回収して、CELL OTIONで洗浄した。

[0094] （2）細胞傷害活性測定

実施例3－（1）で作製された形質導入細胞（GMC）を、慢性骨髓性白血病細胞株K562細胞、BCMAを発現するK562細胞（K562-BCMA）、又はBCMAを発現するヒト骨髓腫細胞株U266細胞と、V底96ウェルマイクロプレートでエフェクター：ターゲット比25：1、12.5：1、6.25：1、3.13：1で混和し、 37°C 、5% CO_2 に設定したインキュベータ内に18時間静置して共培養した。コントロールとして、形質導入していない細胞（NGMC）も同様に共培養した。 $250 \times g$ 、室温、10分間の条件でマイクロプレートを遠心した後、上清を $100 \mu\text{L}$ ／ウェルずつ平底96ウェルマイクロプレートに分取し、LDH Cytotoxicity Detection Kit（タカラバイオ社製）を用いて細胞傷害活性を測定した。図5に示す通り、BCMA-CARを発現するT細胞はBCMA特異的に細胞傷害活性を示した。

[0095] （3）CAR形質導入T細胞によるIFN- γ の産生

実施例3－（1）で作製した形質導入細胞を、K562細胞、K562-BCMA細胞、ヒト骨髓腫細胞株U266細胞をエフェクター：ターゲット

比1 : 1でBSAを終濃度1%添加したRPMI-1640 Medium (Invitrogen社製)に混和してV底96ウェルマイクロプレートに移し、37℃、5% CO₂に設定したインキュベータ内に18時間静置して共培養した。250×g、室温、10分間の条件でマイクロプレートを遠心した後に上清を分取し、Human IFN gamma ELISA Ready-SET-Go (eBioscience社製)を用いてIFN-γの産生を測定した。図6に示す通り、BCMA-CARを発現するT細胞はBCMA特異的にIFN-γを産生することを示した。

[0096] (4) 担がんマウスに対するCAR-T細胞の*in vivo*抗腫瘍効果1
免疫不全NOGマウスに、Emeraldルシフェラーゼ遺伝子を形質導入したヒト骨髓腫細胞株U266細胞を尾静脈から 1×10^6 個接種し、その42日後に実施例3-(1)で作製したCAR形質導入細胞を 2×10^6 個輸注した(各n=10)。各形質導入T細胞の輸注後の経時的な腫瘍細胞のルシフェラーゼ活性のインビボ生物発光イメージングと、発光強度を数値化したグラフを図7に示す。BCMA-CARを発現するT細胞は*in vivo*における高い抗腫瘍活性が確認された。

[0097] (5) 担がんマウスに対するCAR-T細胞の*in vivo*抗腫瘍効果2
誘導性遺伝子発現システム(Uchibori Rら、Mol Ther Oncolytics 2019、12:16-25)を使用して、注入されたCAR-T細胞が腫瘍特異的応答を示したかどうかを分析した。iELuc-TはCARのシグナルに応答してルシフェラーゼを発現するT細胞である。CARを発現しないiELuc-T細胞(iELuc-T細胞処理グループ)とCARを発現するiELuc-T細胞(CAR/iELuc-T細胞処理グループ)を、実施例3-(4)と同様に担がんマウスに輸注した(図8-1中、A)。グループの輸注後の経時的な腫瘍細胞のルシフェラーゼ活性とCARのシグナルに応答したルシフェラーゼ活性のインビボ生物発光イメージングと、発光強度を数値化したグラフを図8に示す。iELuc-T細胞処理グループでは、注入された細胞の部分的な活性化が観察され

たが、その後も腫瘍細胞は増殖を続けた（図8-2および図8-3中、B、C、F、およびG）。対照的に、CAR/iELuc-T細胞処理グループでは、注入された細胞の全身的な活性化が観察され、腫瘍細胞が消失した（図8-2および図8-3中、D、E、H、およびI）。注入されたCAR-T細胞は腫瘍細胞特異的な細胞傷害性反応を示すことが確認された。興味深いことに、注入されたT細胞の活性化も、腫瘍細胞の消失とともに急速に減少した。

[0098] （6）貧血の進行抑制効果

赤血球生成は骨髓の構造単位および機能単位で起こり、赤芽球島（EBI）と呼ばれる。骨髓内で部分的に成熟した後、網赤血球は血液に入り、そこで成熟赤血球になる。骨髓に浸潤した骨髓腫細胞は、サイトカインを分泌することによってEBIの機能と構造を損傷する。MM患者の骨髓内のマクロファージの総数は、骨髓腫細胞による骨髓浸潤の面積と逆相関する。EBIのセントラルマクロファージは骨髓マクロファージ全体のわずかな割合であるが、骨髓のセントラルマクロファージ集団が比例して減少すると、EBI数と赤血球生成活性が低下する。担がんマウス（U266+）では正常マウス（Normal）に比べて脾臓重量が顕著に増加していることが判明した。これは、骨髓へのU266細胞の浸潤が正常な髄内造血を阻害し、その結果脾臓での髄外造血が亢進したためと考えられる。脾臓の重量もGMC治療グループで正常よりも高いものの減少し、正常な重量に戻ったことが示された（図9-1、A）。

[0099] さらに、マウスの胎児肝臓造血は生後約2週間で消失する。しかし、急性の実験的な貧血では、成体マウスの肝臓で髄外造血が起こる。したがって、MM患者の貧血病態をマウスで再現することは技術的に困難であると推測される。治療前および治療後21日の血液学的パラメーターを図9Bに示す。図9B中、WBCは白血球、RBCは赤血球、Hbはヘモグロビン、Hfはヘマトクリット、MCVは平均血球容積、MCHは平均赤血球ヘモグロビン量、MCHCは平均赤血球ヘモグロビン濃度、PLTは血小板数、Reti

は網状赤血球数を示す。この研究では、治療開始時に担がんマウスのMCHが大幅に減少したが、RBCと網状赤血球の数は増加する傾向が確認された。しかし、生理食塩水（Saline）とNGMCで治療したマウスは時間の経過とともに貧血傾向を示し、赤血球と網状赤血球が減少した。対照的に、GMCで治療したマウスでは、貧血の進行が防止され、正常なマウスで観察されたものと同様であった（図9-2、B）。

[0100] （7）骨領域の進行に対するCAR-T療法の抑制効果

マイクロCTを使用して骨梁の形態を評価した（図10-1および図10-2）。図10-2中、BS/BVは骨表面積/体積比、BS/TVは組織体積あたりの骨体積、Tb.Thは骨梁幅、Tb.Nは骨梁数、Tb.Spは骨梁中心距離を示す。

[0101] 治療開始時、担がんマウスは正常なマウスに比べてわずかに進行した骨病変を示した。しかし、骨表面は正常なマウスと同様だった（図10-1および図10-2、A、C）。生理食塩水またはNGMCで治療したマウスは進行性の骨病変を示した。顆と骨表面の重度の破壊が観察された（図10-1および図10-2、B、C）。対照的に、GMCで治療したマウスでは、骨病変の進行が強力に防止され、骨表面は正常なマウスと同様だった。観察期間が短いため、本研究で観察された現象は、GMC投与によって引き起こされた骨病変の改善ではなく、進行の減少であったと考えられる。

産業上の利用可能性

[0102] 本発明により、BCMAを標的にした遺伝子改変免疫細胞療法の分野において有用なCAR、前記CARをコードする核酸、前記核酸を含むベクター、前記キメラ型受容体を発現する細胞、前記細胞の製造方法、前記細胞を有効成分として含む医薬組成物、ならびに当該医薬組成物を対象に投与することを特徴とする疾病の予防（再発予防を含む、以下同じ）または治療方法が提供される。本発明のCARを発現する細胞は、BCMAを発現する細胞に対し高い殺傷能力を有し、高い治療効果が期待される。

請求の範囲

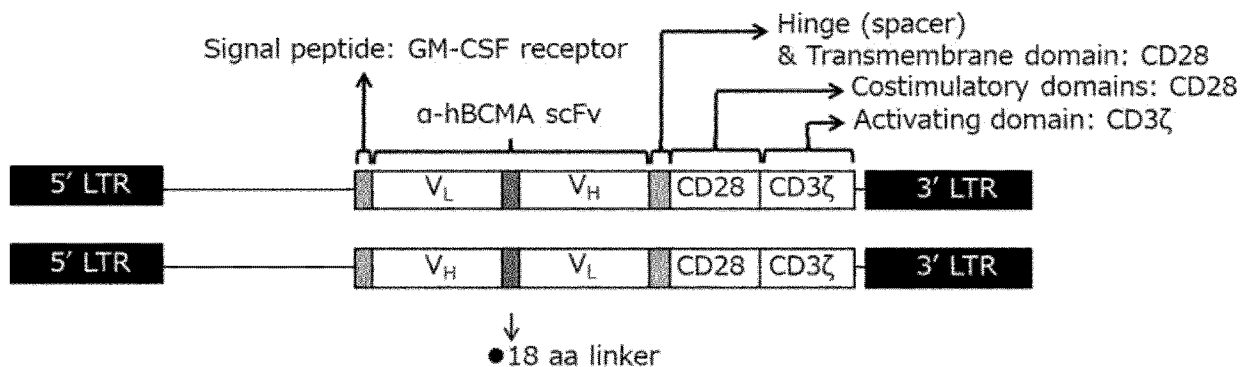
- [請求項1] 軽鎖可変（V L）領域及び重鎖可変（V H）領域を含む抗ヒトB細胞成熟抗原（B C M A）抗体又はその抗原結合フラグメントであって、V L領域の相補性決定領域（C D R）1、C D R 2及びC D R 3並びにV H領域のC D R 1、C D R 2及びC D R 3のアミノ酸配列が、それぞれ以下の（1）～（6）からなる群より選択される配列番号に示されたアミノ酸配列である抗体又はその抗原結合フラグメント：
- （1）配列番号1～6、
 - （2）配列番号7～12、
 - （3）配列番号13～18、
 - （4）配列番号19～24、
 - （5）配列番号25～30、および
 - （6）配列番号31～36。
- [請求項2] 前記V L領域及びV H領域のアミノ酸配列が、以下の（1）～（6）からなる群より選択される請求項1記載の抗体又はその抗原結合フラグメント：
- （1）配列番号37及び38、
 - （2）配列番号39及び40、
 - （3）配列番号41及び42、
 - （4）配列番号43及び44、
 - （5）配列番号45及び46、および
 - （6）配列番号47及び48。
- [請求項3] 前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、I g G、F a b、F a b'、F（a b'）₂、F v、s c F v、及びシングルドメイン抗体（d A B）からなる群から選択される、請求項1又は2に記載の抗体又はその抗原結合フラグメント。
- [請求項4] 前記抗原結合フラグメントはs c F vである、請求項3に記載の抗原結合フラグメント。

- [請求項5] 請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸。
- [請求項6] (i) 抗原結合ドメインと、(ii) 膜貫通ドメインと、(iii) 細胞内ドメインとを含むキメラ抗原受容体(CAR)であって、前記抗原結合ドメインが、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗原結合フラグメント含む、CAR。
- [請求項7] 前記細胞内ドメインが共刺激ドメイン及び活性化ドメインを含む、請求項6に記載のCAR。
- [請求項8] 前記共刺激ドメインがCD28の細胞内フラグメントを含む、請求項7に記載のCAR。
- [請求項9] 前記活性化ドメインがCD3ζの細胞内フラグメントを含む、請求項7又は8に記載のCAR。
- [請求項10] 請求項6～9のいずれか1項に記載のCARをコードする核酸。
- [請求項11] 請求項5に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸もしくは請求項10に記載のCARをコードする核酸を含むベクター。
- [請求項12] 請求項5に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸もしくは請求項10に記載のCARをコードする核酸を含む細胞。
- [請求項13] 前記細胞は、T細胞である、請求項12に記載の細胞。
- [請求項14] 請求項13に記載の細胞を有効成分として含む医薬組成物。
- [請求項15] CARを発現する細胞を製造する方法であって、細胞に、請求項5に記載の抗体又はその抗原結合フラグメントをコードする核酸、請求項10に記載のCARをコードする核酸、もしくは請求項11に記載のベクターを形質導入する工程含む、方法。

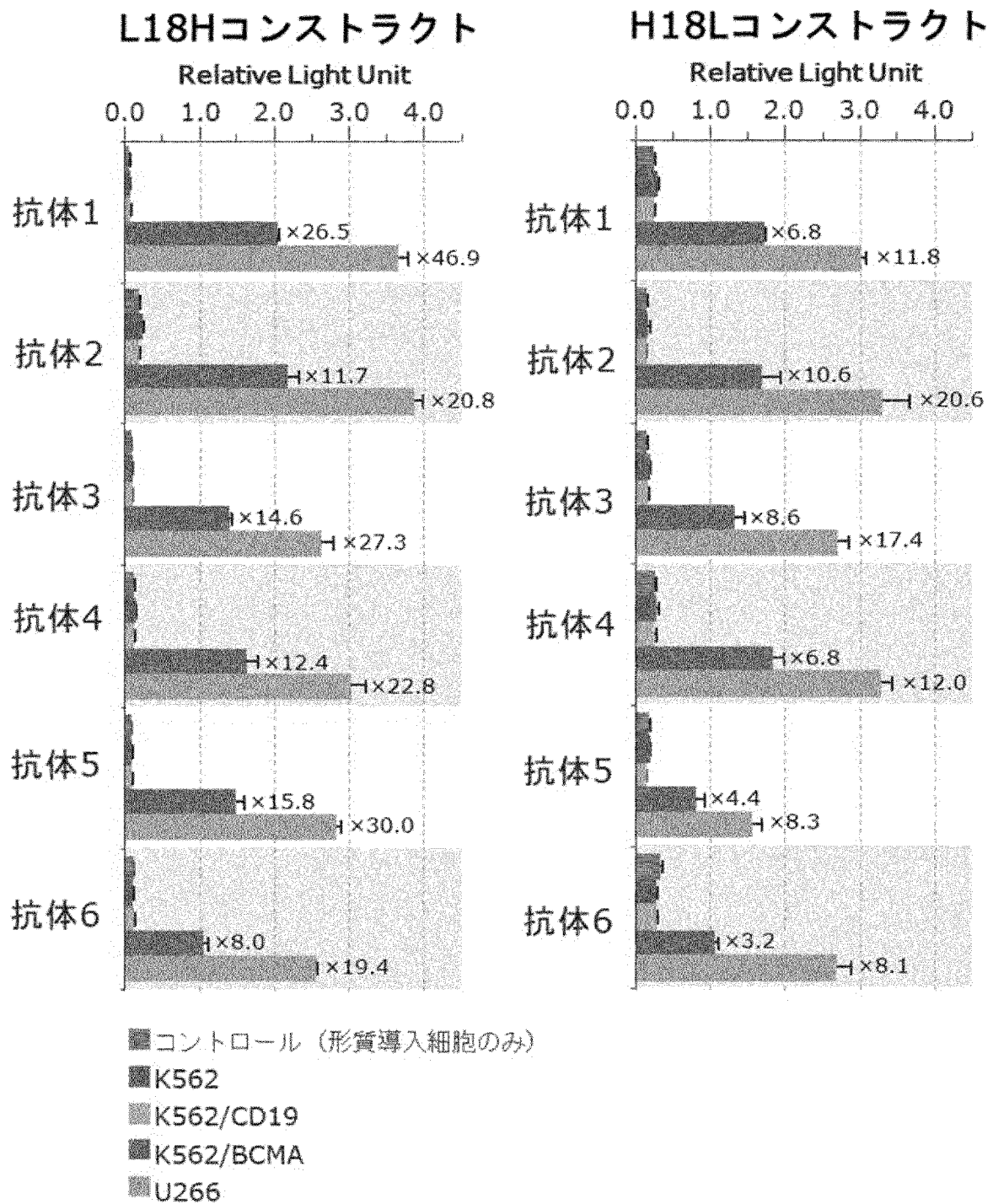
[図1]

L鎖	1	24	38		
抗 BCMA 抗体 1	METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQOKPGQPPKL				
抗 BCMA 抗体 2	METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQOKPGQPPKL				
抗 BCMA 抗体 3	METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKNVSTSGYRYMHYQOKSGQPPKL				
抗 BCMA 抗体 4	METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQOKPGQPPRL				
抗 BCMA 抗体 5	METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYIHVYQOKPGQPPKL				
抗 BCMA 抗体 6	METDTLLLWVLLLVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVSTSGYSYMHYQOKPGQPPKL				
	54	60	113	121	
抗 BCMA 抗体 1	LIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYQHSRELPTTFGSGTKLEIK				
抗 BCMA 抗体 2	LIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYQHIRELPTTFGSGTKLEIK				
抗 BCMA 抗体 3	LIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYQHSRELPTTFGSGTKLEIK				
抗 BCMA 抗体 4	LIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYQHSRELPTTFGSGTKLEIK				
抗 BCMA 抗体 5	LIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYQHSRELPTTFGSGTKLEIK				
抗 BCMA 抗体 6	LIYLASNLESGVPARFSGSGSGTDFLTNIHPVEEEDAATYYQHSRELPTTFGSGTKLEIK				
H鎖	1	31	35	50	66
抗 BCMA 抗体 1	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTYSYIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDGTYNEKFKGKATL				
抗 BCMA 抗体 2	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDGTYNEKFKGKATL				
抗 BCMA 抗体 3	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDGTYNEKFKGKATL				
抗 BCMA 抗体 4	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDGSKYNEKFKGKATL				
抗 BCMA 抗体 5	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDGTYNEQFTGKATL				
抗 BCMA 抗体 6	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTGYIMHWVKQKPGQGLEWIGYIIPYNDGTYNEKFKGKATL				
		99	110		
抗 BCMA 抗体 1	TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSYAMDYWGQGTSTVTVSS				
抗 BCMA 抗体 2	TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVFYCARLTFSDSYAMDYWGQGTSTVTVSS				
抗 BCMA 抗体 3	TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSYAMDYWGQGTSTVTVSS				
抗 BCMA 抗体 4	TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSYAMDYWGQGTSTVTVSS				
抗 BCMA 抗体 5	TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSYAMDYWGQGTSTVTVSS				
抗 BCMA 抗体 6	TSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARLTFSDSYAMDYWGQGTSTVTVSS				

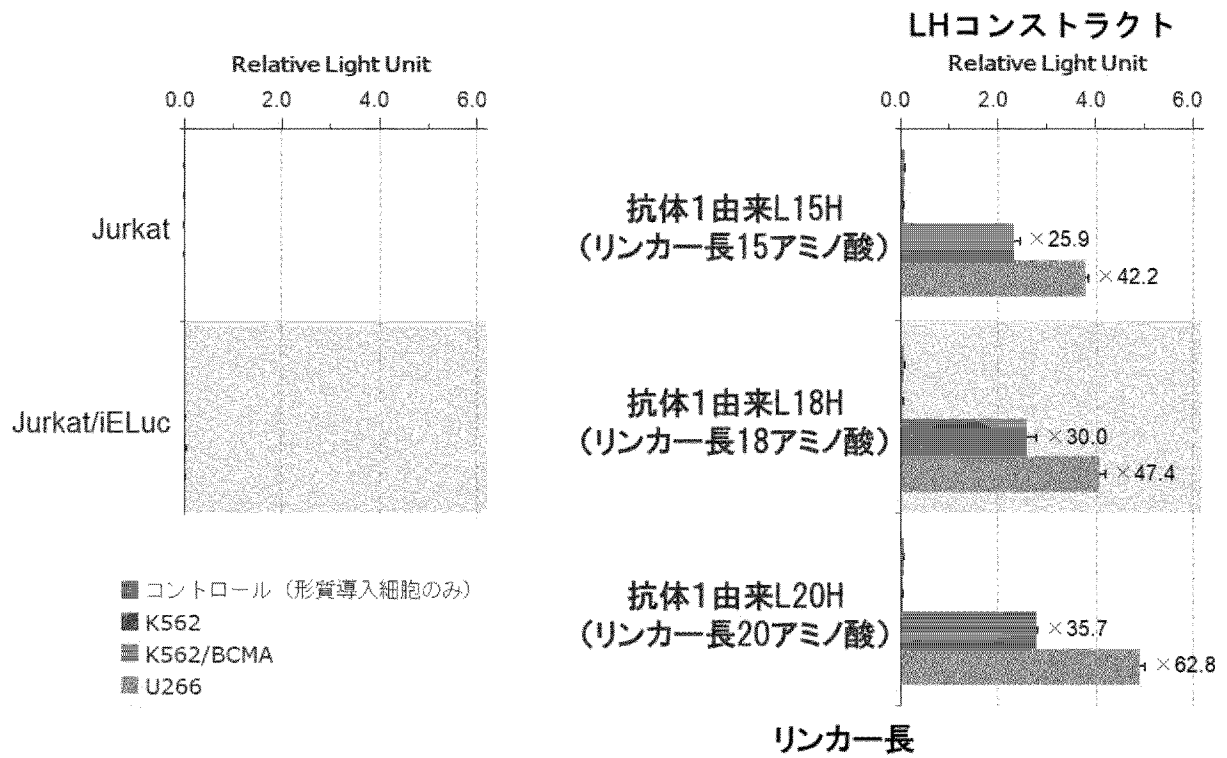
[図2]



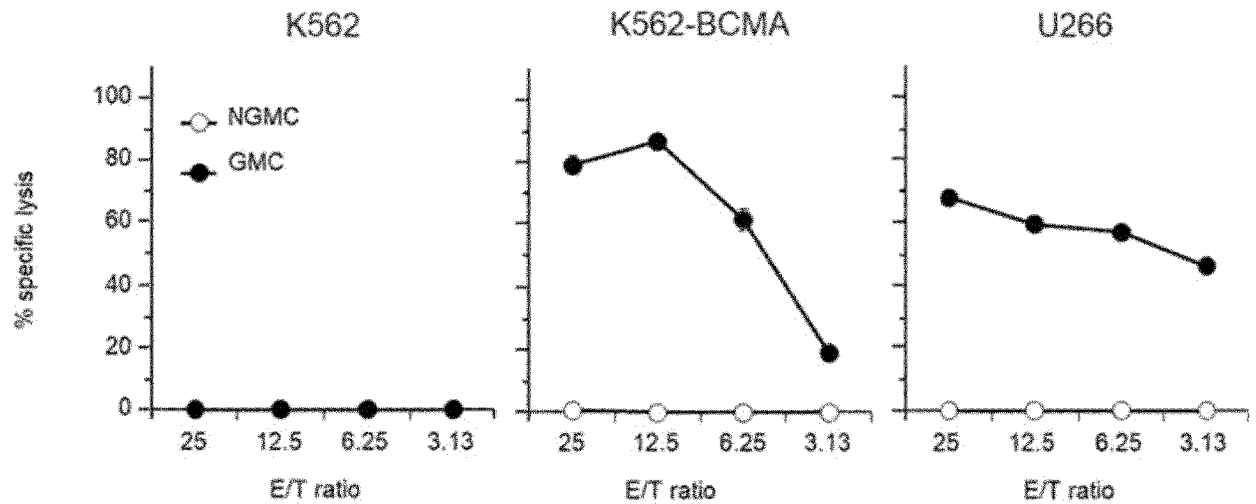
[図3]



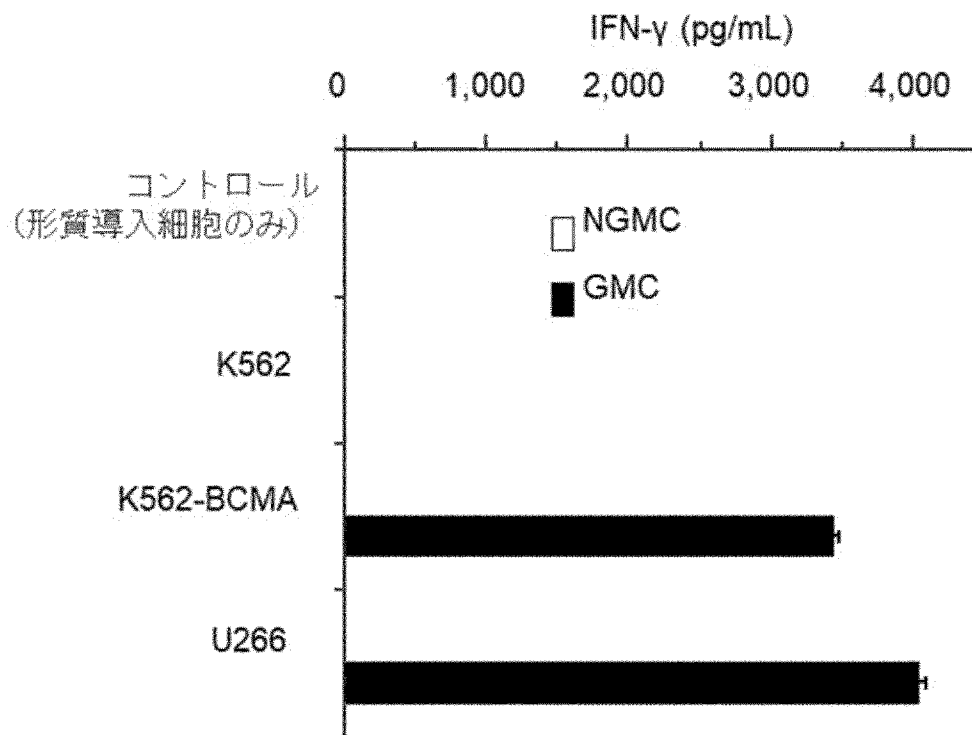
[図4]



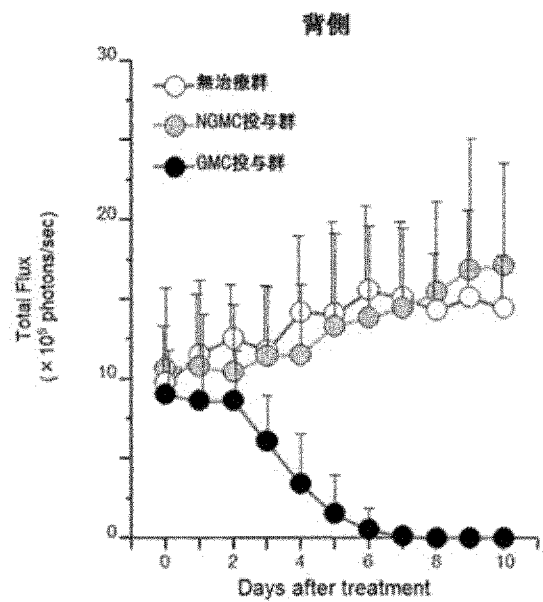
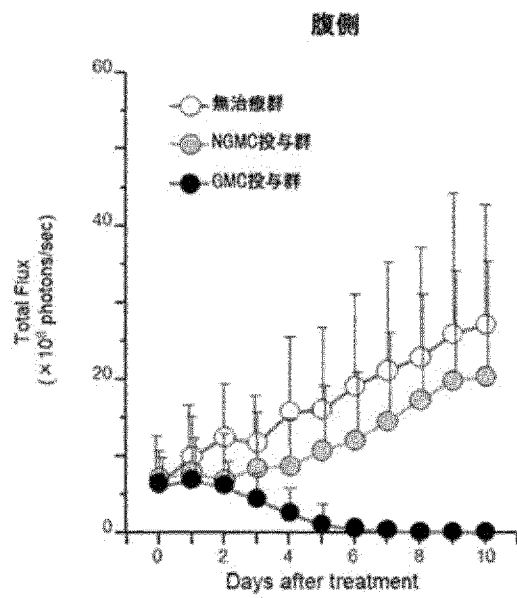
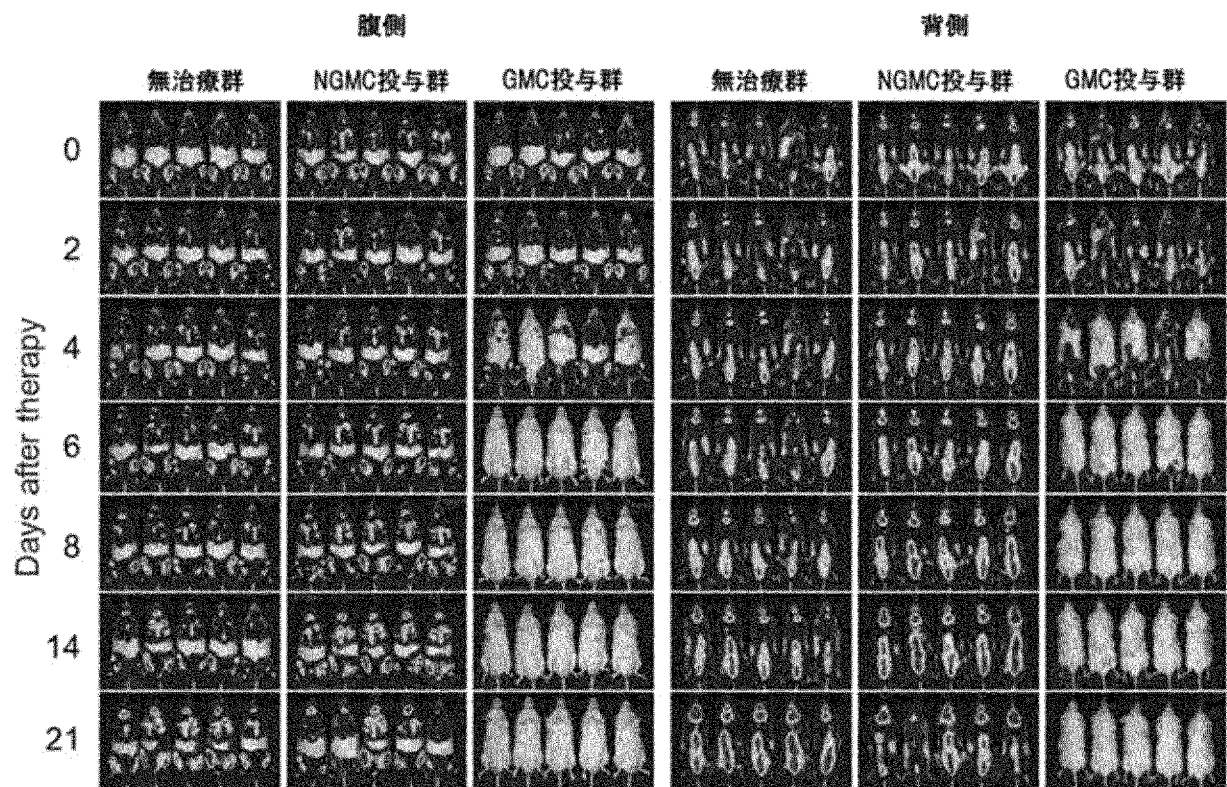
[図5]



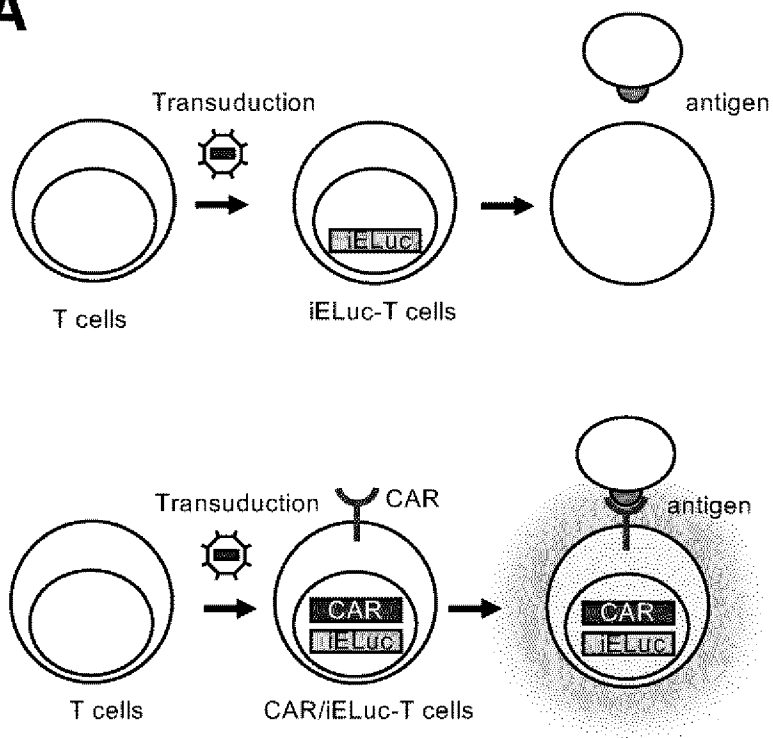
[図6]



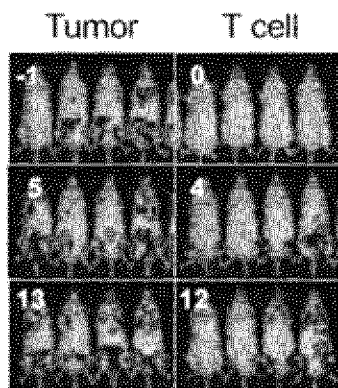
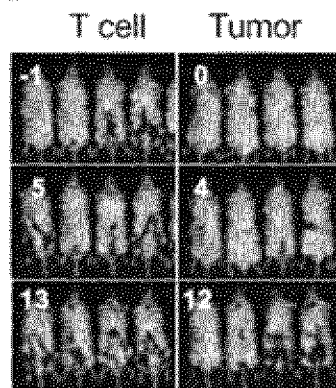
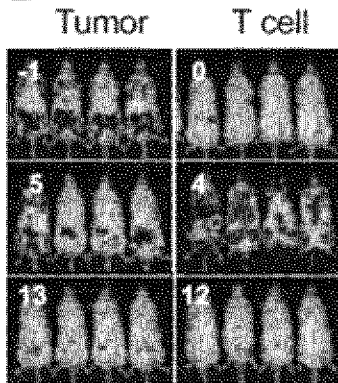
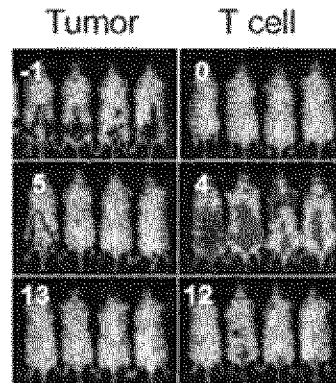
[図7]



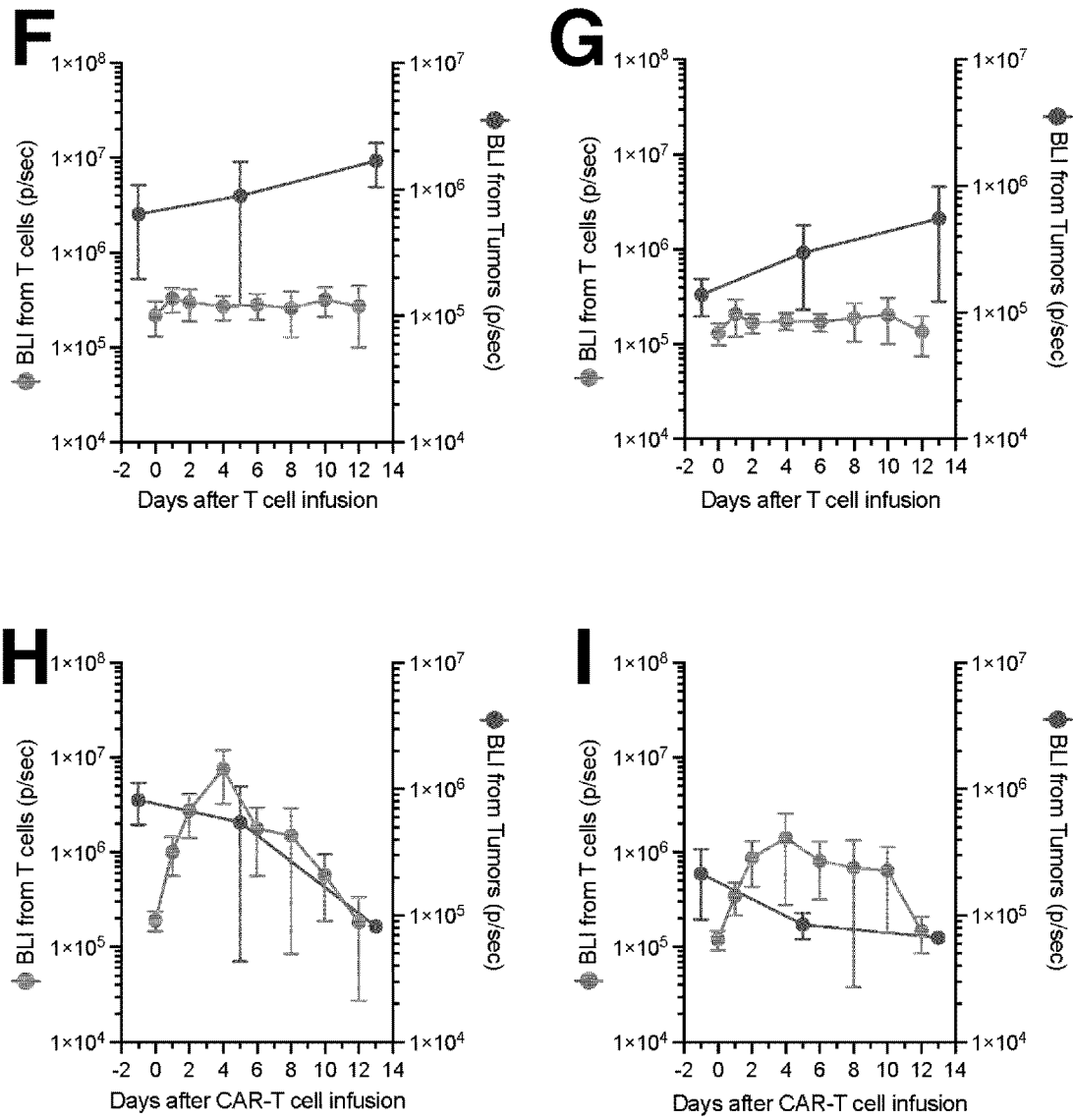
[図8-1]

A

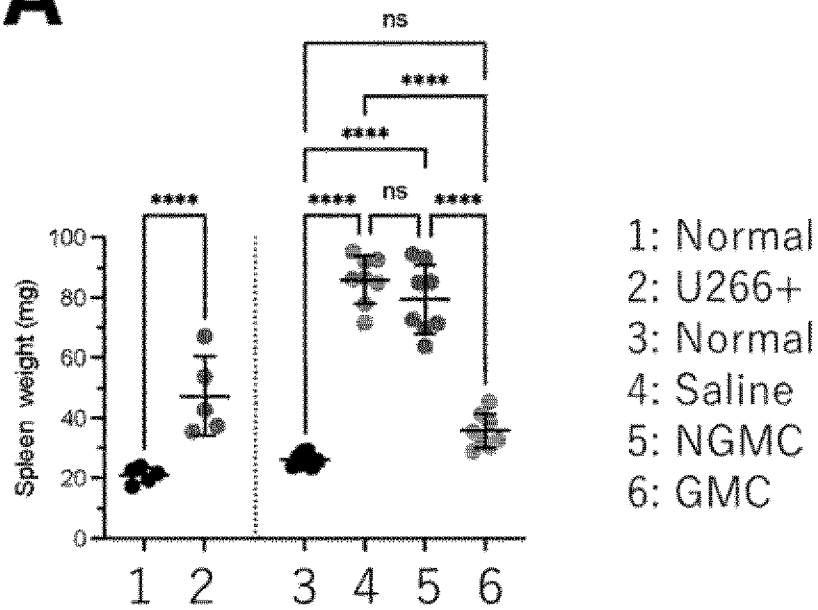
[図8-2]

B**C****D****E**

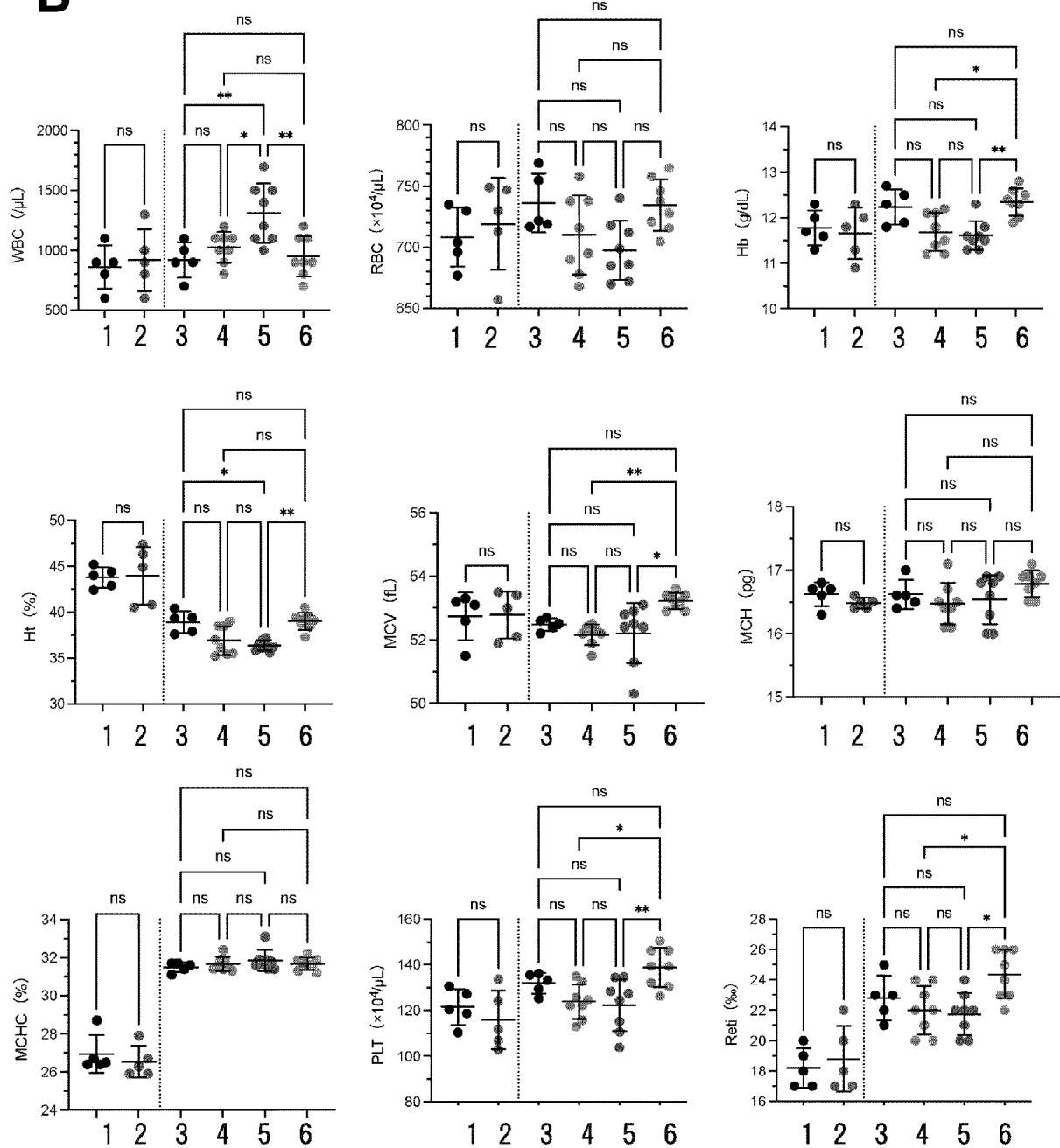
[図8-3]



[図9-1]

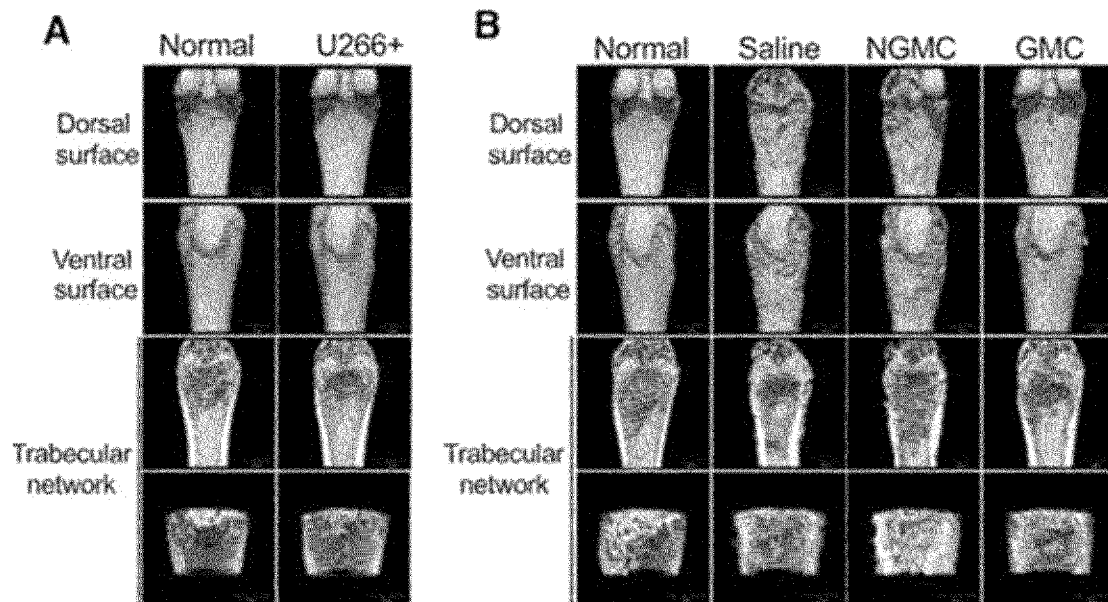
A

[図9-2]

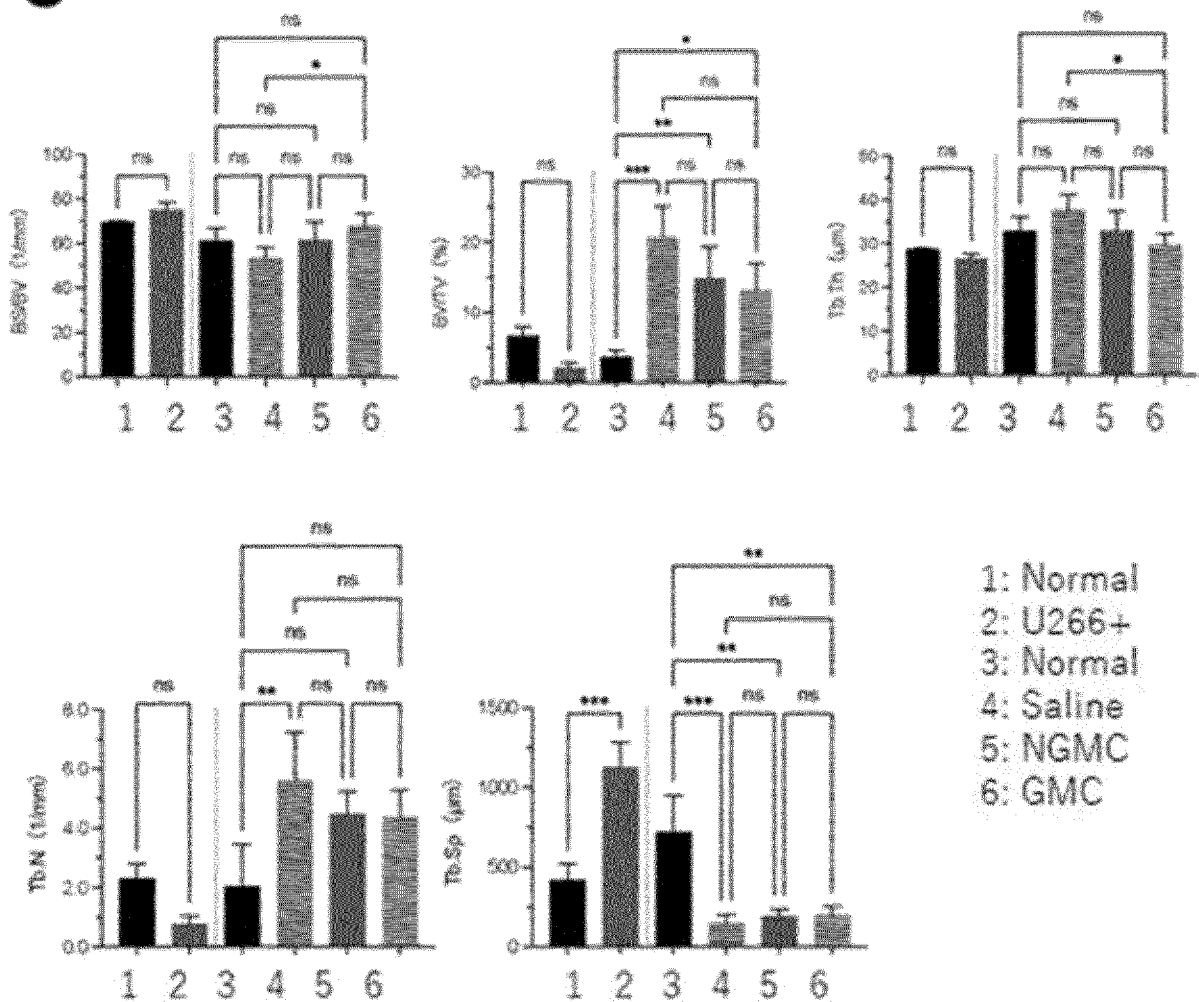
B

- 1: Normal
- 2: U266+
- 3: Normal
- 4: Saline
- 5: NGMC
- 6: GMC

[図10-1]



[図10-2]

C

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/009945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N 15/13(2006.01)i; **A61K 35/17**(2015.01)i; **A61K 39/00**(2006.01)i; **A61K 39/395**(2006.01)i; **A61P 35/02**(2006.01)i; **A61P 37/04**(2006.01)i; **C07K 14/725**(2006.01)i; **C07K 16/28**(2006.01)i; **C07K 19/00**(2006.01)i; **C12N 1/15**(2006.01)i; **C12N 1/19**(2006.01)i; **C12N 1/21**(2006.01)i; **C12N 5/10**(2006.01)i; **C12N 15/12**(2006.01)i; **C12N 15/62**(2006.01)i; **C12N 15/63**(2006.01)i; **C12P 21/02**(2006.01)i

FI: C12N15/13 ZNA; A61K35/17; A61K39/00 H; A61K39/395 N; A61P35/02; A61P37/04; C07K14/725; C07K16/28; C07K19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/62 Z; C12N15/63 Z; C12P21/02 C

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)

C12N15/13; A61K35/17; A61K39/00; A61K39/395; A61P35/02; A61P37/04; C07K14/725; C07K16/28; C07K19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/62; C12N15/63; C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Published examined utility model applications of Japan 1922-1996
Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024
Registered utility model specifications of Japan 1996-2024
Published registered utility model applications of Japan 1994-2024

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2021/0015870 A1 (PROMAB BIOTECHNOLOGIES, INC.) 21 January 2021 (2021-01-21) claims, examples	1-15
X	BERAHOVICH, Robert et al. CAR-T Cells Based on Novel BCMA Monoclonal Antibody Block Multiple Myeloma Cell Growth. Cancers. 11 September 2018, vol. 10, no. 9, 323, DOI: 10.3390/cancers abstact, p. 2, 3rd paragraph, p. 4, 1st paragraph, 2.3, p. 6, 1st paragraph to p. 10, 1st paragraph	1-15



Further documents are listed in the continuation of Box C.



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
“D” document cited by the applicant in the international application
“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

27 May 2024

Date of mailing of the international search report

04 June 2024

Name and mailing address of the ISA/JP

**Japan Patent Office (ISA/JP)
3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915
Japan**

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/009945

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Recombinant Human BCMA/TNFRSF17 Fc Chimera Protein, CF. R&D SYSTEMS website [online]. 02 December 2020, [retrieved on 22 May 2024], internet:<URL: https://web.archive.org/web/20201202121545/https://www.rndsystems.com/products/recombinant-human-bcma-tnfrsf17-fc-chimera-protein-cf_193-bc> Recombinant Human BCMA/TNFRSF17 Fc Chimera Protein, CF Summary	1-15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/009945

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.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/JP2024/009945

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
US	2021/0015870	A1	21 January 2021	WO	2019/195017	A1	
				EP	3773630	A1	
				CN	112074278	A	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C12N 15/13(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i;
A61P 35/02(2006.01)i; A61P 37/04(2006.01)i; C07K 14/725(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i;
C07K 19/00(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i;
C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; C12N 15/63(2006.01)i;
C12P 21/02(2006.01)i
FI: C12N15/13 ZNA; A61K35/17; A61K39/00 H; A61K39/395 N; A61P35/02; A61P37/04; C07K14/725; C07K16/28;
C07K19/00; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/62 Z; C12N15/63 Z; C12P21/02
C

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料（国際特許分類（IPC））

C12N15/13; A61K35/17; A61K39/00; A61K39/395; A61P35/02; A61P37/04; C07K14/725; C07K16/28; C07K19/00;
C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/62; C12N15/63; C12P21/02

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報1922-1996年
日本国公開実用新案公報1971-2024年
日本国実用新案登録公報1996-2024年
日本国登録実用新案公報1994-2024年

国際調査で使用した電子データベース（データベースの名称、調査に使用した用語）

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/REGISTRY/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリ*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	US 2021/0015870 A1 (PROMAB BIOTECHNOLOGIES, INC.) 21.01.2021 (2021-01-21) 特許請求の範囲、実施例	1-15
X	BERAHOVICH, Robert et al., CAR-T Cells Based on Novel BCMA Monoclonal Antibody Block Multiple Myeloma Cell Growth, Cancers, 2018.09.11, Vol. 10, No. 9, 323, DOI: 10.3390/cancers 要約、第2頁第3段落、第4頁第1段落、2. 3、第6頁第1段落～第10頁第 1段落	1-15

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☒ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリ
“A” 特に関連のある文献ではなく、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“E” 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に
公表されたもの
“L” 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若し
くは他の特別な理由を確立するために引用する文献（理由を
付す）
“O” 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
“P” 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願の日の
後に公表された文献

“T” 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と抵
触するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引
用するもの
“X” 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性
又は進歩性がないと考えられるもの
“Y” 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献
との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がな
いと考えられるもの
“&” 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日
27.05.2024

国際調査報告の発送日
04.06.2024

名称及びあて先
日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

権限のある職員（特許庁審査官）

田中 晴絵 4B 2666

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式 PCT/ISA/210（第2ページ）（2022年7月）

C. 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	Recombinant Human BCMA/TNFRSF17 Fc Chimera Protein, CF, R&D SYSTEMS website [オンライン], 2020.12.02, [検索日 2024.05.22], インターネット : <URL: https://web.archive.org/web/20201202121545/https://www.rndsystems.com/ products/recombinant-human-bcma-tnfrsf17-fc-chimera-protein-cf_193-bc> Recombinant Human BCMA/TNFRSF17 Fc Chimera Protein, CF Summary	1-15

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。

- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。

2. ☐ この国際出願で開示されたスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。

3. 補足意見：

国際出願番号
PCT/JP2024/009945

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	2021/0015870	A1	21.01.2021	WO	2019/195017	A1	
				EP	3773630	A1	
				CN	112074278	A	
