

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6556156号
(P6556156)

(45) 発行日 令和1年8月7日(2019.8.7)

(24) 登録日 令和1年7月19日(2019.7.19)

(51) Int.Cl.	F 1	
C07K 14/525	(2006.01)	C07K 14/525 Z N A
C07K 14/705	(2006.01)	C07K 14/705
C07K 19/00	(2006.01)	C07K 19/00
C07K 16/46	(2006.01)	C07K 16/46
C12N 15/28	(2006.01)	C12N 15/28

請求項の数 18 (全 68 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願2016-553489 (P2016-553489)	(73) 特許権者 507299817 ユーシーエル ビジネス ピーエルシー イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティ ーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 97, ザ ネットワーク ビ ルディング
(86) (22) 出願日	平成27年2月26日(2015.2.26)	(74) 代理人 100078282 弁理士 山本 秀策
(65) 公表番号	特表2017-514787 (P2017-514787A)	(74) 代理人 100113413 弁理士 森下 夏樹
(43) 公表日	平成29年6月8日(2017.6.8)	(74) 代理人 100181674 弁理士 飯田 貴敏
(86) 國際出願番号	PCT/GB2015/050557	(74) 代理人 100181641 弁理士 石川 大輔
(87) 國際公開番号	W02015/128653	
(87) 國際公開日	平成27年9月3日(2015.9.3)	
審査請求日	平成29年12月26日(2017.12.26)	
(31) 優先権主張番号	1403479.7	
(32) 優先日	平成26年2月27日(2014.2.27)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)	
(31) 優先権主張番号	1403481.3	
(32) 優先日	平成26年2月27日(2014.2.27)	
(33) 優先権主張国・地域又は機関	英國(GB)	

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A P R I L バリアント

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

野生型 A P R I L よりも高い B C M A に対する結合アフィニティーを有し、かつ / または野生型 A P R I L と比較して変化した結合動態を有し、かつ / または野生型 A P R I L よりも高い B C M A : T A C I (膜貫通型活性化因子およびカルシウム調節因子およびシクロフィリンリガンド相互作用因子) 結合比率を有し、かつ以下の単一変異 : M 2 0 0 C 、 M 2 0 0 L 、 M 2 0 0 G 、 M 2 0 0 S 、 M 2 0 0 A 、 M 2 0 0 N の 1 つを含む、バリアント増殖誘導リガンド (A P R I L) 。

【請求項 2】

以下の変異の組み合わせ :

V 1 7 4 T および M 2 0 0 G 、または T 1 7 5 A および M 2 0 0 G 、または V 1 7 4 T 、 T 1 7 5 A および M 2 0 0 G 、または M 2 0 0 G 、 D 2 0 5 S および R 2 0 6 H の 1 つを含む、請求項 1 に記載のバリアント A P R I L 。

【請求項 3】

変異 M 2 0 0 G を含む、請求項 1 に記載のバリアント増殖誘導リガンド (A P R I L) 。

【請求項 4】

抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびエンドドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、該抗原結合ドメインが、請求項 1 ~ 3 のいずれかに記載のバリアント A P R I L を含む、キメラ抗原受容体。

【請求項 5】

抗原結合ドメインおよびT細胞活性化ドメインを含む二重特異性T細胞誘導体（BiTE）であって、該抗原結合ドメインが、請求項1～3のいずれかに記載のバリアントAPRILを含む、二重特異性T細胞誘導体。

【請求項 6】

請求項1～3のいずれかに記載のバリアントAPRIL、請求項4に記載のキメラ抗原受容体または請求項5に記載の二重特異性T細胞誘導体をコードする核酸。

【請求項 7】

請求項6に記載の核酸を含む、ベクター。

【請求項 8】

請求項4に記載のキメラ抗原受容体を含む、細胞。

10

【請求項 9】

請求項8に記載の細胞を作製するための組成物であって、キメラ抗原受容体をコードする核酸を含む、請求項7に記載のベクターを含み、該細胞は、該ベクターで形質転換またはトランスフェクションされる、組成物。

【請求項 10】

形質細胞障害を処置するための組成物であって、請求項8に記載の細胞または請求項5に記載の二重特異性T細胞誘導体を含む、組成物。

【請求項 11】

形質細胞障害を処置するための医薬品の製造における、請求項8に記載の細胞または請求項5に記載の二重特異性T細胞誘導体の使用。

20

【請求項 12】

形質細胞を検出するための組成物であって、請求項1～3のいずれかに記載のバリアントAPRILを含む診断薬剤を含む、組成物。

【請求項 13】

形質細胞障害を診断するための請求項12に記載の組成物。

【請求項 14】

インビトロで被験体における形質細胞障害を診断するための組成物であって、請求項1～3のいずれかに記載のバリアントAPRILを含む、組成物。

【請求項 15】

30

被験体における形質細胞障害を診断するための組成物であって、請求項1～3のいずれかに記載のバリアントAPRILを含み、インビトロで該被験体由来のサンプルに添加されることを特徴とする、組成物。

【請求項 16】

前記サンプルが、血液サンプルであるか、または血液サンプルに由来する、請求項15に記載の組成物。

【請求項 17】

前記形質細胞障害が、形質細胞腫、形質細胞性白血病、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症、アミロイドーシス、ワルデンストレーム型マクログロブリン血症、孤立性骨形質細胞腫、髄外性形質細胞腫、骨硬化性ミエローマ、H鎖病、意義不明の単クローナル性免疫グロブリン血症およびくすぶり型多発性骨髄腫より選択される、請求項10または14～16のいずれかに記載の組成物。

40

【請求項 18】

前記形質細胞障害が、多発性骨髄腫である、請求項17に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0001】**

発明の分野

本発明は、B細胞成熟抗原（BCMA）に結合する、バリアント増殖誘導リガンド（APRIL）に関する。そのようなバリアントAPRILを含む治療薬剤は、多発性骨髄腫

50

などの形質細胞疾患の処置に有用である。

【背景技術】

【0002】

発明の背景

多発性骨髓腫

多発性骨髓腫（骨髓腫）は、形質細胞の骨髓悪性腫瘍である。異常な形質細胞の集団が骨髓に凝集し、そこでそれらは正常な血液細胞の産生を妨げる。骨髓腫は、米国において2番目に一般的な血液悪性腫瘍であり（非ホジキンリンパ腫の次）、血液悪性腫瘍の13%を、および全てのがんの1%に相当する。この疾患は、死の前に病的骨折、感染への感受性、腎臓そして骨髓の機能不全を引き起こすことから、苦痛と医療出費の点で負担となる。

10

【0003】

多くのリンパ腫と異なり、骨髓腫は現在不治である。リンパ腫に用いられる標準的な化学療法薬は、大部分が骨髓腫には効果的でない。加えて、形質細胞ではCD20の発現が消失しているため、この疾患に対してリツキシマブを使用することはできない。ボルテゾミブやレナリドミドなどの新しい薬剤は部分的に効果的だが、長期にわたる寛解を導くことはできない。

【0004】

そのため、上昇した効果および改善した長期間の効果を有する、骨髓腫の治療のための代替の薬剤への必要性が存在する。

20

【0005】

BCMA

BCMA（TNFRSF17としても公知）は、専らB系列造血細胞または樹状細胞において発現する、形質細胞特異的表面抗原である。これはTNF受容体ファミリーの一員である。BCMAはナイーブB細胞では発現されないが、形質細胞芽へのB細胞分化の間にはアップレギュレートされ、記憶B細胞、形質細胞芽、および骨髓形質細胞では明瞭に発現される。BCMAは、初代骨髓腫細胞の大部分においても発現される。樹状細胞において検出される低レベルのmRNAを除き、BCMA発現は、他の組織において消失しているようであり、これは多発性骨髓腫に対する新規の治療のための標的としての可能性を示す。

30

【0006】

BCMAは、図1で模式的に示される相互接続したリガンドと受容体とのネットワーク内で機能する。2つの他のTNF受容体（活性化T細胞ならびに全てのB細胞で見出される膜貫通型活性化因子およびカルシウム調節因子およびシクロフィリンリガンド相互作用因子（TACI、TNFRSF13Bとしても公知）、ならびにBリンパ球で主に発現するBAFF-R（TNFRSF13C））は、BCMAとリガンドAPRILおよびBAFFを共有する。多発性骨髓腫細胞は、いくつかの症例においてはTACIを、そしてほとんどの症例においてはBCMAを発現するが、BAFF-Rは全く発現しない。

【0007】

天然のリガンドAPRILは、BCMA標的治療としてまたはBCMA標的治療の一部として有用である可能性がある。しかしながら、TACIは、活性化T細胞および全てのB細胞において見出されるため、TACIとの交差反応が、問題となる可能性があり、そのため、骨髓腫細胞上のBCMAを指向する薬剤を用いた処置は、非がん性のB細胞およびT細胞部分集団の病理学的枯渇（pathological depletion）もまた引き起こし得る。

40

【0008】

APRILはまた、形質細胞、特に多発性骨髓腫などの状態における悪性の形質細胞の存在を同定するための診断的適用に有用である可能性がある。しかしながら、この場合もまた、APRILのTACIにもまた結合する能力は、APRILに基づく診断が通常活性化T細胞およびB細胞も同定することを意味し、その結果は多義的であることを意味す

50

る。

【0009】

そのため、これらの欠点を伴わない抗BCMA治療および診断を開発する必要性が存在する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0010】

本発明の態様の概要

本発明者らは、野生型APRILよりも(*that*)高いBCMA : TACI結合比率を有する、BCMA結合リガンドAPRILの活性化させ、発展させた変異体を有する。これらの変異体は、より高い程度のBCMAに対する特異性を示すため、治療的適用および診断的適用のためのより焦点を当てたBCMA発現細胞の標的化を提供する。

【0011】

そのため、本発明の第一の態様において、バリアント増殖誘導リガンド(APRIL)を提供し、これは、野生型APRILよりも高いBCMAに対する結合アフィニティー、および/または野生型APRILと比較して変化した結合動態、および/または野生型APRILよりも高いBCMA : TACI(膜貫通型活性化因子およびカルシウム調節因子およびシクロフィリンリガンド相互作用因子)結合比率を有し、以下の位置の1つまたはそれより多くの変異を含む：A125、V174、T175、M200、P201、S202、H203、D205およびR206。

【0012】

バリアントAPRILは、以下の単一変異の1つを含み得る：

A125T、
V174T、V174G、
T175H、T175S、T175G、
M200C、M200L、M200G、M200S、M200A、M200N、
P201V、P201A、P201G、P201R、P201Y、P201W、
S202G、S202F、S202D、S202V、S202P、D205P。

【0013】

バリアントAPRILは、以下の位置での変異の組み合わせを含み得る：V174およびT175、またはV174およびM200、またはV174およびS202、またはV175およびM200、またはV175およびS202、またはD205およびR206、またはV174、T175およびM200、またはV174、T175およびS202、またはT175、D205およびR206、またはM200、D205およびR206、またはV174、T175、M200およびS202、またはT175、S202、D205およびR206。

【0014】

バリアントAPRILは、以下の変異の組み合わせの1つを含み得る：

V174TおよびT175A、またはV174TおよびM200G、またはT174SおよびS202G、または
V174TおよびS202V、またはV174GおよびS202G、またはV174GおよびS202E、または
V174GおよびS202A、またはV174GおよびS202G、またはV174EおよびS202Y、または
T175AおよびS202E、またはT175GおよびS202G、またはT175GおよびS202V、または
T175AおよびS202P、またはT175AおよびM200G、またはT175SおよびS202G、または
S202VおよびH203N、またはD205HおよびR206L、またはD205PおよびR206K、または

10

20

30

40

50

D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または D 2 0 5 S および R 2 0 6 P、または D 2 0 5 R および R 2 0 6 G、または

D 2 0 5 P および R 2 0 6 I、または D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または

V 1 7 4 T、T 1 7 5 A および S 2 0 2 E、または V 1 7 4 T、T 1 7 5 A および M 2 0 0 G、または

T 1 7 5 A、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または T 1 7 5 A、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または

M 2 0 0 G、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または M 2 0 0 G、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または

V 1 7 4 T、T 1 7 5 A、M 2 0 0 G および S 2 0 2 E、または

10

T 1 7 5 A、S 2 0 2 E、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または

T 1 7 5 A、S 2 0 2 E、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H。

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、M 2 0 0 G 変異を含むバリアント増殖誘導リガンド (A P R I L) を提供する。

【 0 0 1 6 】

本発明はまた、抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびエクトドメインを含み、当該抗原結合ドメインが、本発明の第一の態様のいずれかにしたがうバリアント A P R I L を含む、キメラ抗原受容体 (C A R) を提供する。

【 0 0 1 7 】

20

本発明はまた、抗原結合ドメインおよび T 細胞活性化ドメインを含み、当該抗原結合ドメインが、本発明の第一の態様にしたがうバリアント A P R I L を含む、二重特異性 T 細胞誘導体 (B i T E) を提供する。

【 0 0 1 8 】

第二の態様において、本発明は、本発明の第一の態様にしたがうバリアント A P R I L 、またはそのようなバリアント A P R I L を含む C A R もしくは B i T E をコードする核酸配列を提供する。

【 0 0 1 9 】

第三の態様において、本発明は、本発明の第二の態様にしたがう核酸配列を含むベクターを提供する。

30

【 0 0 2 0 】

本発明はまた、本発明の第一の態様にしたがうバリアント A P R I L を含むキメラ抗原受容体を含む細胞を提供する。

【 0 0 2 1 】

本発明はまた、キメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含む本発明の第三の態様にしたがうベクターを細胞に形質導入するか、またはトランスフェクションする工程を含む、そのような細胞を作製するための方法を提供する。

【 0 0 2 2 】

第四の態様において、本発明は、本発明の第一の態様にしたがうバリアント A P R I L 、そのようなバリアント A P R I L を含む C A R または B i T E 、そのような C A R を含む細胞、本発明の第二の態様にしたがう核酸または本発明の第三の態様にしたがうベクターを含む、治療薬剤を提供する。

40

【 0 0 2 3 】

本発明の第四の態様にしたがう治療薬剤を、被験体に投与する工程を含む、形質細胞障害を処置するための方法もまた提供される。

【 0 0 2 4 】

本発明の第四の態様にしたがう治療薬剤の形質細胞障害の処置における使用もまた提供される。

【 0 0 2 5 】

形質細胞障害の処置のための医薬品の製造における本発明の第四の態様にしたがう治療

50

薬剤の使用もまた提供される。

【0026】

第五の態様において、本発明は、本発明の第一の態様にしたがうバリエントA P R I Lを含む、形質細胞を検出するための診断薬剤を提供する。

【0027】

形質細胞障害を診断するための本発明の第五の態様にしたがう診断薬剤もまた提供される。

【0028】

本発明の第五の態様にしたがう診断薬剤を、被験体に投与する工程を含む、被験体においてインピボで形質細胞障害を診断するための方法もまた提供される。

10

【0029】

本発明の第五の態様にしたがう診断薬剤を、被験体由来のサンプルにインピトロで添加する工程を含む、被験体において形質細胞障害を診断するための方法もまた提供される。

【0030】

サンプルは、血液サンプルであるかまたはそれに由来し得る。

【0031】

形質細胞障害は、形質細胞腫、形質細胞性白血病、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症、アミロイドーシス、ワルデンストレーム型マクログロブリン血症、孤立性骨形質細胞腫、髄外性形質細胞腫、骨硬化性ミエローマ、H鎖病、意義不明の単クローニ性免疫グロブリン血症およびくすぶり型多発性骨髄腫から選択され得る。

20

【0032】

形質細胞障害は、多発性骨髄腫であり得る。

本発明の実施形態において、例えば以下の項目が提供される。

(項目1)

野生型A P R I Lよりも高いB C M Aに対する結合アフィニティーを有し、かつ/または野生型A P R I Lと比較して変化した結合動態を有し、かつ/または野生型A P R I Lよりも高いB C M A : T A C I (膜貫通型活性化因子およびカルシウム調節因子およびシクロフィリンリガンド相互作用因子)結合比率を有し、かつ以下の位置 : A 1 2 5、V 1 7 4、T 1 7 5、M 2 0 0、P 2 0 1、S 2 0 2、H 2 0 3、D 2 0 5およびR 2 0 6の1つまたはそれより多くにおける変異を含む、バリエント増殖誘導リガンド (A P R I L)。

30

(項目2)

以下の単一変異 :

A 1 2 5 T、

V 1 7 4 T、V 1 7 4 G、

T 1 7 5 H、T 1 7 5 S、T 1 7 5 G、

M 2 0 0 C、M 2 0 0 L、M 2 0 0 G、M 2 0 0 S、M 2 0 0 A、M 2 0 0 N、

P 2 0 1 V、P 2 0 1 A、P 2 0 1 G、P 2 0 1 R、P 2 0 1 Y、P 2 0 1 W、

S 2 0 2 G、S 2 0 2 F、S 2 0 2 D、S 2 0 2 V、S 2 0 2 P、D 2 0 5 P

の1つを含む、項目1に記載のバリエントA P R I L。

40

(項目3)

以下の位置における変異の組み合わせ : V 1 7 4 およびT 1 7 5、またはV 1 7 4 およびM 2 0 0、またはV 1 7 4 およびS 2 0 2、またはV 1 7 5 およびM 2 0 0、またはV 1 7 5 およびS 2 0 2、またはD 2 0 5 およびR 2 0 6、またはV 1 7 4、T 1 7 5 およびM 2 0 0、またはV 1 7 4、T 1 7 5 およびS 2 0 2、またはT 1 7 5、D 2 0 5 およびR 2 0 6、またはM 2 0 0、D 2 0 5 およびR 2 0 6、またはV 1 7 4、T 1 7 5、M 2 0 0 およびS 2 0 2、またはT 1 7 5、S 2 0 2、D 2 0 5 およびR 2 0 6を含む、項目1に記載のバリエントA P R I L。

(項目4)

以下の変異の組み合わせ :

50

V 1 7 4 T および T 1 7 5 A、または V 1 7 4 T および M 2 0 0 G、または T 1 7 4 S および S 2 0 2 G、または

V 1 7 4 T および S 2 0 2 V、または V 1 7 4 G および S 2 0 2 G、または V 1 7 4 G および S 2 0 2 E、または

V 1 7 4 G および S 2 0 2 A、または V 1 7 4 G および S 2 0 2 G、または V 1 7 4 E および S 2 0 2 Y、または

T 1 7 5 A および S 2 0 2 E、または T 1 7 5 G および S 2 0 2 G、または T 1 7 5 G および S 2 0 2 V、または

T 1 7 5 A および S 2 0 2 P、または T 1 7 5 A および M 2 0 0 G、または T 1 7 5 S および S 2 0 2 G、または

S 2 0 2 V および H 2 0 3 N、または D 2 0 5 H および R 2 0 6 L、または D 2 0 5 P および R 2 0 6 K、または

D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または D 2 0 5 S および R 2 0 6 P、または D 2 0 5 R および R 2 0 6 G、または

D 2 0 5 P および R 2 0 6 I、または D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または

V 1 7 4 T、T 1 7 5 A および S 2 0 2 E、または V 1 7 4 T、T 1 7 5 A および M 2 0 0 G、または

T 1 7 5 A、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または T 1 7 5 A、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または

M 2 0 0 G、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または M 2 0 0 G、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または

V 1 7 4 T、T 1 7 5 A、M 2 0 0 G および S 2 0 2 E、または

T 1 7 5 A、S 2 0 2 E、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または

T 1 7 5 A、S 2 0 2 E、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H

の 1 つを含む、項目 1 に記載のバリアント A P R I L。

(項目 5)

変異 M 2 0 0 G を含む、バリアント増殖誘導リガンド (A P R I L)。

(項目 6)

抗原結合ドメイン、膜貫通ドメインおよびエンドドメインを含むキメラ抗原受容体 (C A R) であって、該抗原結合ドメインが、前述の項目のいずれかに記載のバリアント A P R I L を含む、キメラ抗原受容体。

(項目 7)

抗原結合ドメインおよび T 細胞活性化ドメインを含む二重特異性 T 細胞誘導体 (B i T E) であって、該抗原結合ドメインが、項目 1 ~ 5 のいずれかに記載のバリアント A P R I L を含む、二重特異性 T 細胞誘導体。

(項目 8)

項目 1 ~ 5 のいずれかに記載のバリアント A P R I L、項目 6 に記載のキメラ抗原受容体または項目 7 に記載の二重特異性 T 細胞誘導体をコードする核酸配列。

(項目 9)

項目 8 に記載の核酸配列を含む、ベクター。

(項目 10)

項目 6 に記載のキメラ抗原受容体を含む、細胞。

(項目 11)

項目 10 に記載の細胞を作製するための方法であって、キメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含む、項目 9 に記載のベクターを用いて、細胞を形質転換またはトランスフェクションする工程を含む、方法。

(項目 10)

形質細胞障害を処置するための方法であって、項目 10 に記載の細胞または項目 7 に記載の二重特異性 T 細胞誘導体を被験体に投与する工程を含む、方法。

(項目 11)

10

20

30

40

50

形質細胞障害の処置における使用のための、項目 7 に記載の二重特異性 T 細胞誘導体の項目 10 に記載の細胞。

(項目 12)

形質細胞障害を処置するための医薬品の製造における、項目 7 に記載の二重特異性 T 細胞誘導体の項目 10 に記載の細胞の使用。

(項目 13)

項目 1 ~ 5 のいずれかに記載のバリアント A P R I L を含む、形質細胞を検出するための診断薬剤。

(項目 14)

形質細胞障害を診断するための項目 13 に記載の診断薬剤。

10

(項目 15)

インビポで被験体における形質細胞障害を診断するための方法であって、項目 1 ~ 5 のいずれかに記載のバリアント A P R I L を、該被験体に投与する工程を含む、方法。

(項目 16)

被験体における形質細胞障害を診断するための方法であって、項目 1 ~ 5 のいずれかに記載のバリアント A P R I L を、インビトロで該被験体由来のサンプルに添加する工程を含む、方法。

(項目 17)

前記サンプルが、血液サンプルであるか、または血液サンプルに由来する、項目 16 に記載の方法。

20

(項目 18)

前記形質細胞障害が、形質細胞腫、形質細胞性白血病、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症、アミロイドーシス、ワルデンストレーム型マクログロブリン血症、孤立性骨形質細胞腫、髄外性形質細胞腫、骨硬化性ミエローマ、H 鎮病、意義不明の単クローナル性免疫グロブリン血症およびくすぶり型多発性骨髄腫より選択される、項目 10 または 15 ~ 17 のいずれかに記載の方法。

(項目 19)

前記形質細胞障害が、多発性骨髄腫である、項目 18 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】

【0033】

30

【図 1】 A P R I L および B A F F のリガンド特異性と機能割り当て B 細胞活性化因子 (B A F F 、 T N F S F 1 3 B) は、 B A F F - R (B A F F - R 、 T N F R S F 1 3 C) 、 B 細胞膜抗原 (B C M A 、 T N F R S F 1 7) 、ならびに膜貫通型活性化因子およびカルシウム調節因子およびシクロフィリンリガンド相互作用因子 (T A C I 、 T N F R S F 1 3 B) と相互作用する一方、増殖誘導リガンド (A P R I L 、 T N F S F 1 3) は、 B C M A 、 T A C I 、およびプロテオグリカンと相互作用する。 B A F F - R 活性化は、末梢 B 細胞生存に影響を及ぼす一方、 B C M A は形質細胞生存に影響を及ぼし得る。 A P R I L のプロテオグリカンとの相互作用は、 A P R I L のアミノ末端を含む酸性硫酸化グルコサミノグリカン側鎖に関係する。

【図 2】骨髄腫での B C M A の発現データ 39 人の多発性骨髄腫患者由来の骨髄サンプルから骨髄腫細胞を、 C D 1 3 8 + 磁気ビーズ選択により単離した。これら細胞を、 P E と結合化された抗 B C M A モノクローナル抗体 J 6 M O (G S K) により染色した。抗原のコピー数は、 P E Quanti b r i t e b e a d s (B e c t o n D i c k e n s o n) を使用し、製造者の指示通りに定量した。抗原コピー数の箱ひげ図が、プロットされた範囲、四分位数、および中央値と共に提示する。我々は、その範囲が、細胞あたり 3 4 8 . 7 ~ 4 2 6 8 . 4 の B C M A コピーであり、平均値が 1 1 8 1 、中央値が 1 0 8 4 . 9 であることを見出した。

40

【図 3】キメラ抗原受容体の標準的なデザイン キメラ抗原受容体の典型的な構成を示す。これらは I 型膜貫通タンパク質である。エクトドメインは抗原を認識する。これは、スペーサードメインに接続された一本鎖可変フラグメント (s c F v) に由来する抗体から

50

なる。これは今度は、膜において分子を固定するように働く、膜貫通ドメインに連結される。最後に、これは細胞に細胞内シグナルを伝達するように働くエンドドメインに連結される。これは1つまたは複数のシグナリングドメインからなる。

【図4】生成された異なるAPRILに基づくCARのデザイン。図3に示されるCARデザインは、scFvが、抗原結合ドメインとしてはたらけるように、APRILの修飾形態に置換されるように修飾された：APRILは、プロテオグリカン結合アミノ末端が欠失されるように短縮化された。次いでシグナルペプチドが、タンパク質を細胞表面へ指向させるように、短縮型APRILアミノ末端に接続された。3つのCARが、このAPRILに基づく結合ドメインを用いて生成された：A. 第一のCARにおいて、ヒトCD8ストーク(stalk)ドメインがスペーサードメインとして使用された。B. 第二のCARにおいて、IgG1由来のヒンジがスペーサードメインとして使用された。C. 第三のCARにおいて、Fc受容体結合を減少するために、Hombachら(2010

Gene Ther. 17:1206-1213)によって記載されたpva/a変異を用いて修飾された、ヒトIgG1由来のヒンジ、CH2およびCH3ドメインがスペーサーとして使用された(以後Fc-pva aとして参照される)。全てのCARにおいて、これらのスペーサーはCD28の膜貫通ドメイン、そして次いでCD28、OX40およびCD3ゼータエンドドメインの融合物を含む三者のエンドドメインに連結される(Pule et al, Molecular therapy, 2005; Volume 12; Issue 5; Pages 933-41)。

【図5】上記3つのAPRIL-CARのアノテーションされたアミノ酸配列 A: は、CD8ストークAPRIL CARのアノテーションされたアミノ酸配列を示す； B: は、APRIL IgG1ヒンジに基づくCARのアノテーションされたアミノ酸配列を示す； C: は、APRIL Fc-pva aに基づくCARのアノテーションされたアミノ酸を示す。

【図6AB】異なるAPRILに基づくCARの発現およびリガンド結合 A. 受容体を、レトロウイルス遺伝子ベクターにおいて、マーカー遺伝子短縮型CD34と共に発現した。形質導入細胞でのマーカー遺伝子の発現は、形質導入の確認を可能にする。B. T細胞に、CD8ストークのスペーサー、IgG1ヒンジ、またはFcスペーサーのいずれかを有するAPRILに基づくCARを形質導入した。これらの受容体を細胞表面において安定に発現させることができたか否かを試験するために、次いでT細胞を抗APRIL-ビオチン/ストレプトアビジンAPCおよび抗CD34によって染色した。フローサイトメトリー解析を行った。APRILは、3つのCARにおいて細胞表面で同等に検出され、これはそれらが同等に安定して発現されることを示唆する。C. 次に、CARのTACIおよびBCMA認識能を決定した。形質導入されたT細胞を、マウスIgG2a Fcに融合させたりコンビナントBCMAまたはTACI融合物のいずれかと一緒に、抗マウス二次および抗CD34によって染色した。3つの受容体の構成は全て、BCMAおよびTACIの両方への結合を示した。驚くべき発見は、BCMAへの結合が、TACIへの結合よりも大きいように見えることであった。更に驚くべき発見は、3つのCARが全て同時に発現したが、BCMAおよびTACIを認識するという点で、Fcスペーサーを有するCARよりもCD8ストークおよびIgG1ヒンジCARが良好であることであった。

【図6C】同上

【図7】異なるCARコンストラクトの機能 3つの異なるAPRILに基づくCARの機能分析を行った。何も形質導入していない(NT)、または異なるCARを発現するように形質導入した、いずれかの正常ドナー末梢血T細胞。形質導入は、同等のタイター上清を使用して行った。次いで、非特異的なNK活性を除去するために、これらのT細胞よりCD56を枯渇させ、そしてエフェクターとして使用した。何も形質導入していない(NT)、またはBCMAもしくはTACIを発現するように形質導入した、いずれかのSupT1細胞を標的として使用した。示されるデータは、5回の独立した実験からの平均値および標準偏差である。A. BCMAおよびTACIを発現するT細胞の特異的な殺

10

20

30

40

50

傷を、クロム放出を使用して決定した。 B . インターフェロン 放出も決定した。標的およびエフェクターを 1 : 1 の比率で共培養した。 24 時間後、上清中のインターフェロン を E L I S A によって分析した。 C . C A R T 細胞の増殖 / 生存も、更に 6 日間インキュベートした同じ共培養中の C A R T 細胞の数を計数することによって決定した。 3 つの C A R は全て、 B C M A および T A C I を発現する標的に対する応答を指向した。 B C M A への応答は、 T A C I よりも大きかった。

【図 8】 A P R I L C A R T 細胞による初代骨髄腫細胞の殺傷 ほとんどの初代骨髄腫細胞は、それらの表面に少数の B C M A 分子を発現するため、低密度発現にも拘らず初代骨髄腫細胞の殺傷が生じるか否かを検証した。図 2 において記載された B C M A 発現の範囲に相当する 3 症例を選択した：第一は不明瞭な発現を有する（平均より低い）；第二の症例は中間的な発現を有する（ほぼ平均の発現）そして第三は明瞭な発現を有した（平均の発現より上）。 3 症例全てについてのアイソタイプ対照に対する B C M A 染色のヒストグラムは、左に示される。この分析においては、 C D 8 ストークおよびヒンジの A P R I L C A R のみを試験した。左に、開始数と比較した骨髄腫細胞の生存が、骨髄腫細胞と C A R T 細胞との 1 : 1 共培養後 3 日目および 6 日目で示される。 6 日目までに、不明瞭な B C M A 発現を有する骨髄腫細胞を含む、 95 % 超の骨髄腫細胞が排除された。

【図 9】 B C M A 標的化のために有用な新規 A P R I L 変異体を開発するために使用した方法。 A . 候補の A P R I L 分子を、 C D 8 ストーク C A R 構成（しかし、シグナリングエンドドメインを含まない）で表示させ、口蹄疫 2 A 配列を使用して C D 3 4 と共に発現させた。 B . 結晶データから B C M A の特異性またはアフィニティーに重要でありそうな残基を、プライマーとしてコードするコドンに対して縮重である（degenerate）オリゴヌクレオチドを使用するスプライシングオーバーラップ（splicing-by-overlap） P C R によって無作為化した。これらの P C R 産物を、 C D 8 ストーク C A R 構成内にライゲーションし、細菌を形質転換するために使用した。個々の細菌コロニー（それぞれ単一の変異体を含む）を培養した。プラスミド D N A をこれらの培養物から単離し、 293 T 細胞にトランスフェクションするために使用した。トランスフェクション後、 293 T 細胞を、マーカー遺伝子を伴う B C M A - F c 融合物または T A C I - F c 融合物のいずれかで別個に染色した。 C . どのように B C M A および T A C I に対する相対的な結合を、スクリーニングの間に推定したか： B C M A または T A C I のいずれかに対する C D 3 4 染色の蛍光強度の傾斜を計算した。次に、野生型 A P R I L の傾斜に対するこの傾斜の比率を計算した。この値を、読み出しとして使用した。

【図 10】 A P R I L 変異体の要約 - 単一残基変異。 B C M A - F c および T A C I - F c に対する結合で変化を示す変異体を、野生型 A P R I L のものと比較して要約している。

【図 11】 A P R I L 変異体の要約 - 複数残基変異。見込みのある変異体を、他の変異体と 1 回または複数回のいずれかで交差させ、特性評価した。 B C M A - F c および T A C I - F c に対する結合の変化が、ここで再び野生型 A P R I L と比較して示される。

【図 12 A】 いくつかの選択された変異体の B C M A - F c 、 T A C I - F c および A P R I L 結合 選択された変異体のフローサイトメトリー プロットが表に示される。第一の列は、 C D 3 4 の染色に対する B C M A - F c の染色を示す。第二の列は、 C D 3 4 の染色に対する T A C I - F c の染色を示す。第三の列は、 C D 3 4 の染色に対する A P R I L の染色を示す。第一の行は、対照としての野生型 A P R I L の染色を示す。第二の行は、 C D 3 4 単独の対照を示す。

【図 12 B】 同上

【図 12 C】 同上

【図 12 D】 同上

【図 12 E】 同上

【図 12 F】 同上

【図 13】 A P R I L に基づく C A R と短縮型 C D 3 4 を共発現するベクター スクリーニングのために使用したベクターを発現する細胞株を、 B C M A - F c または T A C I -

10

20

30

40

50

Fcのいずれかとインキュベートし、そして抗CD34および抗ヒトFcPEの両方、ならびにFITCを付与したmAbによって染色した。次いで細胞をフローサイトメトリーによって研究した。これは、マーカー遺伝子CD34に関するBCMAおよびTACIの結合の典型的なパターンを示す。

【図14】古典的なCARを説明する模式図 B：生成された異なるAPRILに基づくCARのデザイン。シグナルペプチドを短縮型APRILアミノ末端に接続した。これを異なるスペーサー：Fc受容体結合を減少させるために、Hombachら(2010 Gene Ther. 17: 1206-1213)によって記載されたpvaa変異を用いて修飾されたヒトIgG1のヒンジ、CH2およびCH3ドメイン；ヒトCD8のストーク；ならびにIgG1のヒンジのいずれかに融合した。これらスペーサーを、CD28膜貫通ドメイン、OX40エンドドメイン、およびCD3ゼータエンドドメインを含有する三者のエンドドメインに連結した。

【図15】異なるCARの発現 受容体を、IRES配列を使用して高感度青色蛍光タンパク質2(eBFP2)と共に発現させた。初代ヒトT細胞に形質導入し、抗APRIL-ビオチン/ストレプトアビシンAPCによって染色した。フローサイトメトリー解析を行った。eBFP2シグナルは、APRIL検出に対して示される。3つのCARは全て安定に発現した(3つの異なる正常ドナーT細胞を使用して行われた3回の独立実験の代表的な実験)。

【図16】クロム放出分析 エフェクターとして、何も形質導入していない(NT)か、または異なるスペーサーのCARを発現するように形質導入したかの、いずれかの正常ドナー末梢血T細胞、および標的として、何も形質導入していない(NT)か、またはBCMAもしくはTACIを発現するように形質導入したかのいずれかのSupT1細胞を使用。T細胞は、NK活性を減少させるためにCD56を枯渇させた。これは3回の独立した実験の代表であり、そして一例として示される。累積の殺傷データは、図7Aに示される。BCMAおよびTACIを発現するT細胞の特異的な殺傷が、陰性標的細胞に対する無活性と一緒に観察される。

【図17】インターフェロンガンマ放出 エフェクターと標的の1:1共培養由来を、ELISAによって計測した。CD8ストークのコンストラクトは、最高の特異性を有するようである一方で、ヒンジコンストラクトは、最多のインターフェロン放出をもたらし、これらはいくらかの非特異的活性を実証する。これは、3回の独立した実験の代表であり、一例として示される。累積のインターフェロンガンマ放出データは、図7Bに示される。

【図18】初代骨髄腫上のBCMA発現の例 ラット抗ヒトBCMA mAb Vick y1によって染色した、骨髄腫サンプルの4例を示す。第一のパネルは、形質細胞性白血病(骨髄腫の異常であり、進行した、かつ侵襲性の形態)の患者における、明瞭なBCMA染色を示す。他3症例は、医学的かつ形態的に典型的な骨髄腫である。それらは典型的に見られる、中間的または不明瞭な染色を示す。アイソタイプ対照(灰色)での染色を重ねた。これらは、図2に示される累積のBCMA発現データの例である。

【図19】V5エピトープタグを有するAPRIL-CARのアミノ酸配列。A: dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ B: dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ C: dAPRIL-HNG-CD28OXZ この図における配列は、異なるシグナルペプチドを有し、かつV5タグを有さない点で、図5における配列とは異なる。

【図20A】BCMA特異的APRIL変異体のスクリーニングの要約 BCMA-FcおよびTACI-Fcに対する結合の変化。これは、最初のスクリーニングデータのミニプレップDNAの例である。変異体を、それぞれのバッチで確認した野生型APRILと比較してAPRIL変異体の平均MF1グラディエントを表すことにより実験間の変動を補正したバッチでスクリーニングした。

【図20B】同上

【図20C】同上

【図20D】同上
 【図20E】同上
 【図20F】同上
 【図20G】同上
 【図20H】同上
 【図20I】同上
 【図20J】同上
 【図20K】同上
 【図20L】同上
 【図20M】同上
 【図20N】同上
 【図20O】同上
 【図20P】同上
 【図20Q】同上
 【図20R】同上
 【図20S】同上
 【図20T】同上
 【図20U】同上
 【図20V】同上
 【図20W】同上

10

【図21A】BCMA特異的APRIL変異体の配列アラインメント 無作為変異誘発プロセスの間に選択されたミニプレップ物を、BCMA-FcおよびTACI-Fcでの染色によって発現についてスクリーニングした。有用な可能性を有する変異体または有益な表現型を有する変異体を、キャピラリーシークエンスによって配列決定し、それらが由來した元のAPRIL配列とアライメントした。この図で示されるものは、そのようなスクリーニングプロセスの間に同定された変異体の例のアラインメントである。

【図21B】同上

【図22】標的残基におけるグリシン置換で変化したBCMAおよびTACI結合のグラフ

【図23A】APRIL CAR T細胞のインビボ機能の実証 尾静脈注射を介して 1×10^7 MM1.s.FLu c細胞を受容した、6匹の3ヶ月齢メスNSGマウス。マウスは、8日目および13日目に生物発光によってイメージングした。13日目でのイメージングの後に、4匹のマウスは尾静脈注射を介して 5×10^6 APRIL CAR T細胞を受容した。マウスは13日目および18日目にイメージングした。CAR T細胞を受容したマウスは、(*)により示される。骨髄腫の寛解は、処置したマウスの全てにおいて18日目までに観察されたが、一方で無処置マウスにおける疾患は進行した。

30

【図23B】同上

【図24A】A：設計および構築した異なるAPRIL-BiT E構成 (1) IgG1 ヒンジによって短縮型APRILに連結したOKT3 scFv、(2) (SGGGGS)3 リンカーを介して短縮型APRILに連結したOKT3 scFv、(3) CD8ス Tokを介して短縮型APRILに連結したOKT3 scFv、(4) IgG1ヒンジを介してOKT3 scFvに連結した短縮型APRIL、(5) (SGGGGS)3 リンカーを介してOKT3 scFvに連結した短縮型APRIL、(6) CD8スペーサーを介してOKT3 scFvに連結した短縮型APRIL。コンストラクト(3)および(6)は、CD8スペーサーにおけるジスルフィド結合によってホモダイマーを形成するはずである。B：APRIL iTEの結合における細胞間相互作用での分子集合の模式図。

40

【図24B】同上

【図25】異なるAPRIL iTEコンストラクトをトランスフェクションした293T細胞由来の上清のウェスタンプロット。プロットは、抗APRILを用いて行った。

50

【図26A】APRILiTE 1、3および6の野生型SupT1細胞ならびにBCMAおよびTACIを発現するように改変されたSupT1細胞との結合。染色は抗APRILビオチン/ストレプトアビジンAPCによるものである。Apriliteは、野生型SupT1細胞への結合は示さないが、BCMA発現細胞には結合し、かつより少ない程度でTACI発現細胞に結合する。

【図26B】野生型JurkatへのAPRILiTEの結合、しかしT細胞受容体のないJurkatへの非結合。これは、APRILiTEがT細胞受容体に結合することを実証する。

【図27】ブランクの培地または3種のAPRILiTE存在下でのT細胞と何も導入していないか、または改変したSupT1細胞との1:1共培養。

【図28】APRILiTE 1、3および6の存在下で、共培養3日間後に、BCMA発現SupT1細胞の完全な消失が観察された。

【図29】原発性骨髄腫でのBCMA発現の例。ラット抗ヒトBCMA mAb Vickiによって染色した骨髄腫サンプルの4例を示す。最初のパネルは、形質細胞白血病（異常であり、進行した、かつ侵襲性の形態の骨髄腫）を有する患者での明瞭なBCMAの染色を示す。他の3つの症例は臨床的かつ形態的に典型的な骨髄腫である。これらは典型的に見られる中間的または不明瞭な染色を示す。アイソタイプ対照（灰色）での染色を重ね合わせている。

【図30】APRILiTEのアミノ酸配列 A:APRILiTE #01、B:APRILiTE #03、C:APRILiTE #06

【図31】アイソタイプ対照の上に重ねたBCMAについての骨髄腫サンプルの染色。これらの骨髄腫細胞はBCMAを発現するが、低いレベルである。

【図32】1日目での共培養および対照の低倍率鏡検。APRILiTEの存在下で、骨髄腫細胞と培養したときに、T細胞の明確な凝集/活性化を見ることができる。

【図33】骨髄腫細胞単独、末梢血T細胞との共培養での、それら両方のAPRILiTE #3および#6の非存在下または存在下でのインターフェロンガンマの放出。

【図34】培養液中での骨髄腫細胞の共培養物の6日目での生存率。試験した両方のAPRILiTEは、PBMCの存在下で原発性骨髄腫細胞の効果的な殺傷をもたらす。

【図35】BiTE構成における多様なAPRIL変異体の機能の試験 4人の正常ドナーピービームを、WT APRILまたは多様な変異体のいずれかに基づく異なるBiTEの存在下で、SupT1細胞と共に、BCMAを発現するように改変したSupT1細胞と共に、TACIを発現するように改変したSupT1細胞と共に、または単独でインキュベートした。インターフェロンガンマレベルを、24時間後に計測した。

【発明を実施するための形態】

【0034】

詳細な説明

APRIL

本発明は、バリエント増殖誘導リガンド(APRIL)に関し、これは、野生型APRILよりも高いBCMAに対する結合アフィニティー、および/または野生型APRILと比較して変化した結合動態、および/または野生型APRILよりも高いBCMA: TACI(膜貫通型活性化因子およびカルシウム調節因子およびシクロフィリンリガンド相互作用因子)結合比率を有する。APRILはまた、TNFSF13としても公知である。

【0035】

用語「バリエント」は、「変異体」または「改変された」と同義であり、置換(单数または複数)、付加(单数または複数)または欠失(单数または複数)などの1つまたはそれより多くの変異を含むAPRILを意味する。典型的に、当該変異は置換である。

【0036】

APRILの野生型配列は、UNIPROT/O75888で入手可能であり、以下に示される(配列番号1)。これはシグナルペプチドを有さないという点で古典的な分泌タ

10

20

30

40

50

ンパク質ではない。これはフーリン切断部位 "K Q K K Q K" (配列番号1において下線を引かれている)を有する。アミノ末端はプロテオグリカン結合に関係する。

【0037】

Kimberleyら(2009、FASEB J 23:1584~1595)は、APRILシグナリングにおけるヘパリン硫酸プロテオグリカン(HSPG)相互作用の役割を検証する研究である。点変異は、以下のように生成された:

- 1) R146S、R189S、H220Eの3つの点変異を含む、APRIL-トリプル(WT-トリプルと示される)、
- 2) 疎水性モチーフ(QKQKK^{1 1 3}Q)に3つの点変異を含む、APRIL-HSPG(HSPGと示される)、
- 3) これらの部位の両方で6つ全てのアミノ酸が変異した、APRIL-HSPG-トリプル(HSPG-トリプルと示される)。
- 4) HSPGに結合することができるが、TACIにもBCMAにも結合する能力を欠失する(図2)APRILの形態であり、その受容体結合領域内に重要なアルギニンからアラニンへの変異を含む、APRIL-R231A。

【0038】

APRIL-R231Aを除く全ての変異体は、BCMAとTACIとの両方に結合する能力を保持した。R231A変異体は、両方の受容体に対する結合の完全な消失を示したが、HSPGに結合する能力を保持した。

【0039】

本発明のバリエントAPRILは、APRILのBCMA結合部位を含み得る。バリエントAPRILは、BCMA結合部位を含む、APRILのフラグメントを含み得る。

【0040】

バリエントAPRILは、当該分子のアミノ末端端部を欠失した短縮型APRILを含み得る。短縮型APRILは、BCMAおよびTACI結合を保持するが、プロテオグリカン結合は失い得る。短縮型APRILは、フーリン切断部位、またはその直後で切断され得る。短縮型APRILは、配列番号1として示される野生型APRIL分子からアミノ末端116アミノ酸を欠失し得る。短縮型APRILは、配列番号2として示される配列(配列番号1の太字で示される部分に対応する)またはそのバリエントを含み得る。これは、BCMAおよびTACI結合に必要とされる分子の一部に対応する。

10

20

30

【化1】

配列番号1

10 20 30 40 50 60

MPASSPFLLA PKGPPGNMGG PVREPALSVA LWLSWGAALG AVACAMALLT QQTELQSLRR

70 80 90 100 110 120

EVSRQLQGTGG PSQNGEGYPW QSLPEQSSDA LEAWENGERS RKRRAVLTQK QKKQHSQLHL

130 140 150 160 170 180

VPINATSKDD SDVTEVMWQP ALRRGRGLQA QGYGVRIQDA GVYLLYSQVL FQDVTFM**GQ**

10

190 200 210 220 230 240

VVSREGQGRQ ETLFRCIRSM PSHPDRAYNS CYSAGVFHLH QGDILSVIIP RARAKLNLS**PH**

250

HGTFLGFV**KL**

配列番号2

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFM**G**

20

QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLS**PH**TFLGFV**KL**

【0041】

バリアントA P R I Lまたはバリアント短縮型A P R I Lは、野生型A P R I Lよりも(*that*)特異的にさせる、結合特性を有する。例えば、いくつかの実施形態または適用において、バリアントA P R I Lは、野生型A P R I Lよりも高いB C M Aに対するアフィニティーを有する。いくつかの実施形態または適用において、バリアントA P R I Lは、野生型A P R I Lとは異なるB C M Aに対する結合動態を有する。いくつかの適用において、バリアントA P R I Lは、野生型A P R I Lまたはその組み合わせよりも高いB C M A : T A C I 結合比率を有する。変異体A P R I Lは、以下の位置の1つまたはそれより多くにおける変異を含む：A 1 2 5、V 1 7 4、T 1 7 5、M 2 0 0、P 2 0 1、S 2 0 2、H 2 0 3、D 2 0 5およびR 2 0 6(配列番号1において灰色で示される)。

30

【0042】

特に、バリアントA P R I Lは、以下の单一変異の1つを含み得る(配列番号3～26)：

A 1 2 5 T、

V 1 7 4 T、V 1 7 4 G、

T 1 7 5 H、T 1 7 5 S、T 1 7 5 G、

M 2 0 0 C、M 2 0 0 L、M 2 0 0 G、M 2 0 0 S、M 2 0 0 A、M 2 0 0 N、

40

P 2 0 1 V、P 2 0 1 A、P 2 0 1 G、P 2 0 1 R、P 2 0 1 Y、P 2 0 1 W、

S 2 0 2 G、S 2 0 2 F、S 2 0 2 D、S 2 0 2 V、S 2 0 2 P、D 2 0 5 P。

【0043】

これらの変異体は、B C M A 標的化に有用であり得る様式で、B C M A およびT A C Iに対する結合を変化させることが決定された。B C M A およびT A C Iに対する相対的な結合は表1に示され、図12で示されるいくつかの例とともに図10で説明される。

【表1】

表1

変異	% BCMA WT	% TACI WT	配列
A125T	46	42	配列番号 13
V174T	379	500	配列番号 14
V174G	109	34	配列番号 15
T175H	144	78	配列番号 16
T175S	129	35	配列番号 17
T175G	67	41	配列番号 18
M200C	50	0	配列番号 19
M200L	164	62	配列番号 20
M200G	35	0	配列番号 21
M200S	10	0	配列番号 22
M200A	20	3	配列番号 23
M200N	12	4	配列番号 24
P201V	20	1	配列番号 25
P201A	24	18	配列番号 26
P201G	13	4	配列番号 27
P201R	8	3	配列番号 28
P201Y	9	0	配列番号 29
P201W	6	5	配列番号 30
S202G	116	68	配列番号 31
S202F	28	30	配列番号 32
S202D	30	32	配列番号 33
S202V	204	232	配列番号 34
S202P	163	218	配列番号 35
D205P	26	18	配列番号 36

10

20

30

【化2-1】

配列番号3 (A125T)

VLHLVPINTSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号4 (V174T)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDTTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号5 (V174G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDGTFMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

10

配列番号6 (T175H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVHFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号7 (T175S)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVSFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

20

配列番号8 (T175G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVGFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号9 (M200C)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSCPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

【化2-2】

配列番号 10 (M200L)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSLPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 11 (M200G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSGPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 12 (M200S)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSSPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

10

配列番号 13 (M200A)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSAAPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 14 (M200N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSNPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

20

配列番号 15 (P201V)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMVSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 16 (P201A)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMASHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 17 (P201G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMGSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

30

配列番号 18 (P201Y)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMYSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 19 (P201R)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMRSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

40

【化2-3】

配列番号20(P201W)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMWSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号21(S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMGPHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号22(S202F)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMFPHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

10

配列番号23(S202D)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPDFHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号24(S202V)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPPHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

20

配列番号25(S202P)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPPHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号26(D205P)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPPRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

【0044】

バリアントA P R I Lは、以下の位置における変異の組み合わせを含み得る：V174
およびT175、またはV174およびM200、またはV174およびS202、またはV175およびM200、またはV175およびS202、またはS202およびH203、またはD205およびR206、またはV174、T175およびM200、またはV174、T175およびS202、またはT175、D205およびR206、またはM200、D205およびR206、またはV174、T175、M200およびS202、またはT175、S202、D205およびR206。

30

【0045】

特に、バリアントA P R I Lは、以下の特定の組み合わせた変異の1つを含み得る：
V174TおよびT175A、またはV174TおよびM200G、またはT174SおよびS202G、または

V174TおよびS202V、またはV174GおよびS202G、またはV174GおよびS202E、または

40

V174GおよびS202A、またはV174GおよびS202G、またはV174EおよびS202Y、または

T175AおよびS202E、またはT175GおよびS202G、またはT175GおよびS202V、または

T175AおよびS202P、またはT175AおよびM200G、またはT175SおよびS202G、または

S202VおよびH203N、またはD205HおよびR206L、またはD205PおよびR206K、または

D205PおよびR206N、またはD205SおよびR206P、またはD205RおよびR206N。

50

および R 206G、または

D 205P および R 206I、または D 205S および R 206H、または

V 174T、T 175A および S 202E、または V 174T、T 175A および M 200G、または

T 175A、D 205P および R 206N、または T 175A、D 205S および R 206H、または

M 200G、D 205P および R 206N、または M 200G、D 205S および R 206H、または

V 174T、T 175A、M 200G および S 202E、または

T 175A、S 202E、D 205P および R 206N、または

T 175A、S 202E、D 205S および R 206H。

【 0046 】

これらの特定の組み合わせた変異は、BCMA 標的化に有用な様式で BCMA および TACI に対する結合を変化させることが示された（表 2 および図 1-1 を参照）。

【表 2】

表 2

変異	% BCMA WT	% TACI WT	配列
V174T, T175A	131	80	配列番号 27
V174T, M200G	172	49	
T174S, S202G	43	13	
V174T, S202V	303	613	
V174G, S202G	67	24	
V174G, S202E	35	18	
V174G, S202A	132	36	
V174G, S202G	29	49	
V174E, S202Y	33	15	
T175A, S202E	87	15	
T175G, S202G	34	17	配列番号 37
T175G, S202V	59	30	
T175A, S202P	100	0	
T175A, M200G	14	1	
T175S, S202G	43	13	
S202V, H203N	11	24	
D205H, R206L	357	86	
D205P, R206K	255	90	
D205P, R206N	111	138	
D205S, R206P	420	81	
D205R, R206G	404	84	配列番号 47
D205P, R206I	343	54	
D205S, R206H	234	112	
V174T, T175A, S202E	186	87	
V174T, T175A, M200G	28	4	
T175A, D205P, R206N	13	1	
T175A, D205S, R206H	15	2	
M200G, D205P, R206N	53	4	
M200G, D205S, R206H	68	15	
V174T, T175A, M200G, S202E	43	0	配列番号 56
T175A, S202E, D205P, R206N	19	0	
T175A, S202E, D205S, R206H	28	0	

【化3-1】

配列番号 27 (V174T, T175A)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDTAFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 28 (V174T, M200G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDTTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSGPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 29 (T174S, S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDSTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

10

配列番号 30 (V174T, S202V)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDTTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 31 (V174G, S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDGTFMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

20

配列番号 32 (V174G, S202E)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDGTFMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPEHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 33 (V174G, S202A)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDGTFMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPAHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 34 (V174G, S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDGTFMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

30

【化3-2】

配列番号 35 (V174E, S202Y)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**E**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**YHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

配列番号 36 (T175A, S202E)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**EHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

配列番号 37 (T175G, S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**GFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**GHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

10

配列番号 38 (T175G, S202V)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**GFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**VHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

配列番号 39 (T175A, S202P)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**PHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

20

配列番号 40 (T175A, M200G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**GPHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

配列番号 41 T175S, S202G

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**SFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**GHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

配列番号 42 (S202V, H203N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**VNPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

30

配列番号 43 (D205H, R206L)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**SH**H**LAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

配列番号 44 (D205P, R206K)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSM**P**SH**P**KAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG TFLGFVKL

【化3-3】

配列番号 45 (D205P, R206N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPPNAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 46 (D205S, R206P)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPSPAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 47 (D205R, R206G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPRGAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

10

配列番号 48 (D205P, R206I)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPPAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 49 (D205S, R206H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPSHAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

20

配列番号 50 (V174T, T175A, S202E)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDTAFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPEHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 51 (V174T, T175A, M200G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDTAFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSGPSHPEHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

30

配列番号 52 (T175A, D205P, R206N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVAFMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPPNAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 53 (T175A, D205S, R206H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVAFMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSGPSHPSHAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 54 (M200G, D205P, R206N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSGPSHPPNAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

40

配列番号 55 (M200G, D205S, R206H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
 QVVSREGQGRQETLFRCIRSGPSHPSHAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
 TFLGFVKL

【化3-4】

配列番号 56 (V174T, T175A, M200G, S202E)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDTAFTMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSGPEHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 57 (T175A, S202E, D205P, R206N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVAFMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPEHPDNAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 58 (T175A, S202E, D205S, R206H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVAFMG
QVVSREGQGRQETLFRCIRSMPEHPDHAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

【0047】

T細胞活性化

本発明は、

(i) B細胞成熟抗原 (BCMA) に結合し、本発明の第一の態様にしたがう変異体APRILを含む、第一のドメインおよび

(ii) T細胞を活性化させることのできる第二のドメインを含む、二重特異性分子もまた提供する。

【0048】

本発明の分子の第二のドメインは、T細胞を活性化させることができる。T細胞は、MHC分子によって抗原提示細胞の表面に提示されたときに抗原性ペプチドを認識する、T細胞受容体 (TCR) を細胞表面に有する。そのような抗原認識は、Srcファミリーキナーゼによる免疫受容活性化チロシンモチーフ (ITAM) のリン酸化をもたらし、これは更なるキナーゼのリクルートを引き起こし、Ca²⁺の放出を含むT細胞活性化をもたらす。

【0049】

第二のドメインは、TCRによる抗原特異的認識によって引き起こされるものと同じパスウェイを引き起こすことによって、T細胞活性化を引き起こし得る。

【0050】

CD分類3 (CD3)

本発明の二重特異性分子の第二のドメインは、CD3に結合し得る。

【0051】

CD3は、CD3鎖、CD3鎖および2つのCD3鎖の4つの別個の鎖から構成されるタンパク質複合体である。CD3は、T細胞受容体 (TCR) およびT細胞の表面における鎖と相互作用し、活性化シグナルを生成する。TCR、鎖およびCD3分子は、共にTCR複合体を構成する。

【0052】

T細胞上でのCD3の集合 (例えば固定した抗CD3抗体による) は、T細胞受容体の結合に類似したT細胞の活性化を導くが、そのクローンの典型的な特異性には非依存的である。

【0053】

T細胞活性の調節におけるその中心的な役割のため、TCR/CD3に結合することのできる分子を開発する試みがある。この取り組みの多くは、ヒトCD3抗原に特異的な抗体の生成にフォーカスしている。

【0054】

第二のドメインは、OKT3、WT32、抗1e4、UCHT-1、SPV-3T A、TR66、SPV-T3B、またはアフィニティー調整されたそれらのバリアントなどの、CD3に特異的に結合する抗体またはその一部を含み得る。

【0055】

10

20

30

40

50

本明細書中で使用する場合、「抗体」は、少なくとも1つの相補性決定領域CDRを含む抗原結合部位を有するポリペプチドを意味する。抗体は、3つのCDRを含み、かつドメイン抗体(dAb)の抗原結合部位と同等の抗原結合部位を有し得る。抗体は、6つのCDRを含み得、古典的な抗体分子の抗原結合部位と同等の抗原結合部位を有し得る。ポリペプチドの残りは、抗原結合部位のための適当な足場を提供し、そしてそれを抗原と結合するために抗原結合部位を適切な手段で提示する、任意の配列であり得る。抗体は、免疫グロブリン分子全体またはその一部(Fab、F(ab)₂、Fv、一本鎖Fv(ScFv)フラグメント、ナノボディ、または一本鎖可変ドメイン(3つのCDRを有するVH鎖またはVL鎖であり得る)など)であり得る。抗体は二機能性抗体であり得る。抗体は非ヒト、キメラ、ヒト化、または完全ヒトのものであり得る。

10

【0056】

代替的に、第二のドメインは、免疫グロブリン由来ではないか、または免疫グロブリンに基づかないCD3結合分子を含み得る。多数の「抗体模倣」設計リピートタンパク質(DRPs)が開発され、非抗体ポリペプチドの結合能が利用されている。そのような分子としては、アンキリンまたはロイシンリッチリピートタンパク質(例えば、DARPin_s(設計アンキリンリピートタンパク質)、アンチカリン、アビマー、およびヴァーサボディ(Versabody))が挙げられる。

【0057】

本発明の二重特異性分子の第二のドメインは、FDAによって認可された最初のモノクローナル抗体である、モノクローナル抗体OKT3の全長または一部を含み得る。OKT3は、ATCC CRL 8001から入手可能である。この抗体の配列は、米国特許第7,381,803号において公開されている。

20

【0058】

第二のドメインは、OKT3由来の1つまたはそれより多くのCDRを含み得る。第二の結合ドメインは、OKT3重鎖由来のCDR3および/またはOKT3軽鎖由来のCDR3を含み得る。第二の結合ドメインは、以下に示されるOKT3由来の6つ全てのCDRを含み得る。

重鎖

CDR1：(配列番号59) K A S G Y T F T R Y T M H
 CDR2：(配列番号60) I N P S R G Y T N Y N Q K F K D
 CDR3：(配列番号61) Y Y D D H Y C L D Y

30

軽鎖

CDR1：(配列番号62) S A S S S V S Y M N
 CDR2：(配列番号63) R W I Y D T S K L A S
 CDR3：(配列番号64) Q Q W S S N P F T

【0059】

第二の結合ドメインは、OKT3由来のCDR配列を含むscFvを含み得る。第二の結合ドメインは、配列番号65として以下に示されるscFv配列、またはCD3結合能を保持し、少なくとも80%の配列同一性を有する、そのバリアントを含み得る。

【化4】

40

配列番号65

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSR
 GYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWG
 QGTTLTVSSGGGGSGGGGGGGSQIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCASSSVS
 YMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMMEAEDAATY
 YCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

【0060】

配列番号65由来のバリアント配列は、配列番号65として示される配列と少なくとも

50

80、85、90、95、98もしくは99%の配列同一性を有し得、かつ同等または改良されたCD3結合能および/またはTCR活性化能を有し得る。

【0061】

二重特異性T細胞誘導体(BITES)

BITESは、標的抗原をT細胞受容体(TCR)に接近させる、新しいクラスの治療薬である。その本来の設計は、一方のscFvは抗原を標的とし、そして他方はT細胞を活性化させる、リンカーによって一緒に連結された2つのscFvであった。

【0062】

BITEは、一般的に、短い5残基ペプチドリンカー(GGGGS)を介して、抗CD3 scFvを抗標的抗原scFvに融合させることによって作製される。1995年にCHO細胞においてEpCAM(上皮17-1A抗原)およびヒトCD3を標的とするタンデムscFvが產生された。この新種の二重特異性抗体の構成は、共シグナリングの非存在下で無刺激のヒトPBM使用して、多様な細胞株に対してナノモル濃度で高度に細胞毒性であることが証明された。後に、マウス抗CD19 scFvとマウス抗CD3 scFvとの間の融合物が創出された。この分子は、共シグナリング(例えばCD28を通じた)の必要なしに、効果的な細胞毒性を含む傑出したインピトロ特性を実証した。

【0063】

マウス抗ヒトCD3×抗ヒトCD19であるブリナツモマブは、開発された最初のBITEであり、かつ臨床試験で最も進行したBITEである。この候補はリンパ腫および白血病への処置として研究されている。

【0064】

抗ヒトEpCAM×抗ヒトCD3 TaFvであるMT110は、臨床試験において試験された2番目のBITEであり、かつ広範な固体腫瘍に初めて指向された。MT110のインピトロ特性評価は、腫瘍細胞株においてMT103で得られた結果を再現し、それによってBITE構成の普遍性を実証した。MT110は現在、肺がん、大腸がんおよび胃腸がん患者についての臨床試験中である。

本発明の二重特異性分子は、BITE様の構成に基づくが、標的抗原に結合するscFvまたは他の抗体に基づく結合ドメインを有する代わりに、BCMAについてのリガンド(すなわちAPRIL)に基づく結合ドメインを有する。

【0065】

この「APRILiTE」構成は、様々な理由で古典的なscFv-scFv構成と比較して好ましい：(a) 単一ドメイン-scFv融合物は、他の構成よりも安定であり、かつ作製が容易でありそうである；(b) 細胞表面でのBCMAおよびAPRILの集合は、それぞれの結合パートナーの三量体化を必要とする。これは、タンパク質レベルでのT細胞活性化ドメインの集合を誘導し、このタンパク質を高度に特異的に、かつ高度に強力にする。

【0066】

本発明の分子は、以下のアミノ酸配列の1つを含み得るが、APRILに相当する配列の一部における以下の位置の1つに変異を含み得る(配列番号1に示される位置番号を参照して)：S202、P201、M200、T175、V174、A125、H203、D205およびR206：

10

20

30

40

【化 5 】

配列番号 66

METDTLLLWLLLWPGSTGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH
WVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDS
AVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSSGGGGGGGGGGGGGGGQIVLTQSPAI
MSASPGEKVTMTCSSSVSYMWNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS
GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRSDPAEPKSPDKTH
TCPPCPKDPKSGGGGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGV
RIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSC
YSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAQLNLSPHGTFLGFVKL

10

配列番号 67

METDTLLWVLLWPGSTGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH
WVVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDKSSSTAYMQLSSLTSEDS
AVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSSGGGSGGGSGGGSQIVLTQSPAI
MSASPGEKVMTCSASSSVSYMWNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS
GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRSDPTTPAPRPPT
PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDSGGGSVLHLVPINATSKDDS
DVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVWSRE
GQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA
KLNLSPHG
TFLGFVKL

20

配列番号 68

MGTSLLCWMALCLLGADHADGVLHLVPINATSKDDSDVTVMWQPALRRGRGLQA
QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPD
RAYNSCYSAGVFHLHQGDLISVIIPRARAQLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPTTPAP
RPPTPAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDSGGGGSQVQLQQSGAE
LARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK
DKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSSG
GGGSGGGSGGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSSSVSYMNWYQQKSG
TSPKRWYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFT
FGSGTKLEINRS

30

〔 0 0 6 7 〕

本発明の分子は、そのバリエント配列が、本発明の第一の態様において定義されるような分子、すなわち

(i) B細胞成熟抗原 (BCMA) に結合し、かつ増殖誘導リガンド (APRIL) の少なくとも一部を含む第一のドメイン、および

(i i) T 細胞を活性化させることのできる第二のドメイン

を含む二重特異性分子である限り、配列番号 6 6、6 7 または 6 8 として示される配列の少なくとも 8 0、8 5、9 0、9 5、9 8 または 9 9 % の配列同一性を有するバリエントを含み得る。

【 0 0 6 8 】

50

シグナルペプチド

本発明の二重特異性分子は、その產生を補助するシグナルペプチドを含み得る。シグナルペプチドは、二重特異性分子が宿主細胞上清から採取され得るように、宿主細胞による二重特異性分子の分泌を引き起こし得る。

【0069】

シグナルペプチドのコアは、単一のアルファヘリックスを形成する傾向を有する、疎水性アミノ酸の長いストレッチを含み得る。シグナルペプチドは、移行の間にポリペプチドの適切なトポロジーに強制することを補助する、アミノ酸の短い正に荷電されたストレッチより開始し得る。シグナルペプチドの端部には、典型的にシグナルペプチダーゼによって認識され、かつ切断されるアミノ酸のストレッチがある。シグナルペプチダーゼは、移行間または完了の後のいずれかに切断し、遊離シグナルペプチドおよび成熟タンパク質を生成し得る。次いで遊離シグナルペプチドは、特異的なプロテアーゼによって消化される。

【0070】

シグナルペプチドは、分子のアミノ末端にあり得る。

【0071】

二重特異性分子は、以下の一般式を有し得る：

シグナルペプチド - 第一のドメイン - 第二のドメイン。

【0072】

シグナルペプチドは、配列番号 69 もしくは 70 を含み得るか、またはシグナルペプチドが、依然として二重特異性分子の分泌を引き起こすように機能する限り、5つ、4つ、3つ、2つもしくは1つのアミノ酸変異（挿入、置換もしくは付加）を有するそれらのバリエントを含み得る。

配列番号 69 : METDTLLLWVLLLWVPGSTG

配列番号 70 : MGTSLLCWMAALCLLGADHADG

【0073】

配列番号 69 および 70 のシグナルペプチドは、コンパクトでありかつ高度に効率的である。それらは、末端グリシンの後ろで約 95 % の切断をもたらすことが予測され、これは、シグナルペプチダーゼによる効率的な除去をもたらす。

【0074】

スペーサー

本発明の分子は、第一のドメインと第二のドメインとを連結させ、この2つのドメインを空間的に離すためのスペーサー配列を含み得る。

【0075】

スペーサー配列は、例えば、IgG1 ヒンジまたは CD8 ストークを含み得る。リンカーは、代替的に IgG1 ヒンジまたは CD8 ストークと同様の長さおよび / またはドメイン配置特性を有する、代替的リンカー配列を含み得る。

【0076】

スペーサーは、短いスペーサー（例えば 100 未満、80 未満、60 未満または 45 未満のアミノ酸を含むスペーサー）であり得る。スペーサーは、IgG1 ヒンジもしくは CD8 ストーク、またはそれらの修飾された形態であるか、またはそれらを含み得る。

【0077】

これらのリンカーのためのアミノ酸配列の例は、以下に挙げられる。

配列番号 71 (IgG1 ヒンジ) : A E P K S P D K T H T C P P C P K D P K S G G G
G S

配列番号 72 (CD8 ストーク) :

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

【0078】

CD8 ストークは、ホモダイマーの形成を誘導し得るような配列を有する（図 2 を参照）

10

20

30

40

50

)。これが望ましくない場合、1つもしくはそれより多くのシステイン残基を、C D 8 ストームの配列から置換してもよいし、または除去してもよい。本発明の二重特異性分子は、スペーサーであって、配列番号72として示される配列、または少なくとも80、85、90、95、98もしくは99%の配列同一性を有するそのバリエントを含むか、またはそれらからなるスペーサーを含み得、ただし、そのバリエント配列は、第一のドメインおよび第二のドメインのおよそ同等の配置をもたらす分子であり、かつ/またはそのバリエント配列は、二重特異性分子のホモダイマー化を引き起す。

【0079】

本発明の分子は、以下の一般式を有し得る。

シグナルペプチド - 第一のドメイン - スペーサー - 第二のドメイン。

10

【0080】

スペーサーは、チェーンブレークを導入するための1つまたはそれより多くのリンカーモチーフもまた含み得る。チェーンブレークは、2つの別個のドメインを離れさせるが、異なる角度における配向を可能にする。そのような配列として、配列S D Pおよび配列S G G G S D P(配列番号73)が挙げられる。

【0081】

リンカーは、S G G G G S(配列番号74)などのセリン-グリシンリンカーを含み得る。

【0082】

キメラ抗原受容体(CAR)

20

キメラ抗原受容体(CAR)(キメラT細胞受容体、人工T細胞受容体およびキメラ免疫受容体としても公知)は、免疫エフェクター細胞上に任意の特異性を移植する、改変された受容体である。古典的なCAR(図3)において、モノクローナル抗体の特異性は、T細胞またはNK細胞上に移植される。CARをコードする核酸は、例えばレトロウイルスベクターを使用して、T細胞またはNK細胞中に導入され得る。このようにして、多数のがん特異的T細胞またはNK細胞は、養子細胞移入のために生成させることができる。このアプローチの早期臨床的研究は、最初にB細胞悪性腫瘍を処置するために全B細胞抗原CD19を標的としたときに、いくつかのがんにおける有効性を示した。

【0083】

CARの標的抗原結合ドメインは、一般的にスペーサーおよび膜貫通ドメインを介してシグナリングエンドドメインに融合される。CARが標的抗原に結合するとき、これは標的抗原が発現されるT細胞へ活性化シグナルの伝達をもたらす。

30

【0084】

CARは、

- (i) B細胞成熟抗原(BCMA)結合ドメインとして作用するバリエントA P R I L、
- (i i) 任意選択のスペーサー、
- (i i i) 膜貫通ドメインおよび
- (i v) エンドドメイン

を含み得る。

【0085】

エンドドメインは、細胞内T細胞シグナリングドメインを含み得るかまたはこれと会合し得る。

40

【0086】

本発明のCARは、以下のアミノ酸配列の1つを含み得るが、A P R I Lに相当する配列の一部における以下の位置の1つにおいて変異を含み得る(配列番号1に示される位置番号を参照して):S 202、P 201、M 200、T 175、V 174、A 125、H 203、D 205およびR 206。

【化6-1】

配列番号 75 (dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ)

METDTLLLWVLLWVPGSTGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQ
 DAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQ
 GDILSVIIPRARAKLNLSPHGTFLGFVLSGGGSDPAEPKSPDKTHTCPCPAPPVAGPSVFL
 FPPKPKDLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGVFCSCVMHEA
 LHNHYTQKSLSPGKDKFWVLVVGGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT 10
 PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRV
 KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQKD
 KMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 76 (dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ)

METDTLLLWVLLWVPGSTGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQ
 DAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQ
 GDILSVIIPRARAKLNLSPHGTFLGFVLSGGGSDPTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVGGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTP
 RRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRV 20
 KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

配列番号 77 (dAPRIL-HNG-CD28OXZ)

METDTLLLWVLLWVPGSTGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQ
 DAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQ
 GDILSVIIPRARAKLNLSPHGTFLGFVLSGGGSDPAEPKSPDKTHTCPCPKDPFWVLVVV
 GGVLACYSLLTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRD
 QRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVFKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGR
 REEYDVLDKRRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELOQDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQG
 LSTATKDTYDALHMQALPPR 30

配列番号 78 (dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ)

MGTSLLCWMALCLLGADHGKPIPNPLLGLDSTSAGGGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQ
 PALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPS
 HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHGTFLGFVLSGGGSDPAEPKSPDK
 THTCPCPAPPVAGPSVLFPPKPKDLMIAARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSPGKDKFWVLVVGGVLACYSLLTVAFII 40

【化6-2】

FWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFR
 TPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMG
 GKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
 PPR

配列番号 79 (dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ)

MGTSLLCWMALCLLGADHADGKIPNPLLGLDSTSAGGGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQ
 PALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPS
 HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSHGTFLGFKLSSGGSDPTTPAPRP
 PTAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDFWVLVVVGGVLACYSLVAFIIF
 WVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFR
 TPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGG
 GKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSEIGMKGERRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR

10

配列番号 80 (dAPRIL-HNG-CD28OXZ)

MGTSLLCWMALCLLGADHADGKIPNPLLGLDSTSAGGGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQ
 PALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPS
 HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSHGTFLGFKLSSGGSDPAEPKSPDK
 THTCPCPKDPKFVWLVVVVGGVLACYSLVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTR
 KHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTP
 TPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADA
 PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDRGRDPEMGGKPRRKNPQEGLYNELQDKMAEAYSE
 IGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

【0087】

本発明の分子は、配列番号75、76、77、78、79または80として示される配列の、少なくとも80、85、90、95、98または99%の配列同一性を有するバリアントを含み得、ただし、バリアント配列は、本発明の第一の態様において定義される分子、すなわち、

30

(i) B C M A 結合ドメイン、

(ii) 任意選択のスペーサードメイン、

(iii) 膜貫通ドメインおよび

(iv) エンドドメイン

を含む C A R であり、かつ A P R I L に相当する配列の一部において以下の位置の1つにおいて変異を含む（配列番号1に示される位置番号を参照して）：S 2 0 2 、 P 2 0 1 、 M 2 0 0 、 T 1 7 5 、 V 1 7 4 、 A 1 2 5 、 H 2 0 3 、 D 2 0 5 および R 2 0 6 。

40

【0088】

2つのポリペプチド配列間の同一性パーセンテージは、 h t t p : / / b l a s t . n c b i . n l m . n i h . g o v . において自由に入手できる B L A S T などのプログラムによって容易に決定され得る。

【0089】

核酸配列

本発明は、上記で定義されるようなバリアント A P R I L 、バリアント A P R I L を含む C A R またはバリアント A P R I L を含む B i T E をコードする核酸配列もまた提供する。

【0090】

核酸配列は、 R N A または D N A であり得、二本鎖または一本鎖であり得る。

50

【0091】

A P R I L - B i T E をコードする核酸配列は、配列番号 81 ~ 83 として示される。本発明の核酸配列は、配列番号 81、82 または 83 によってコードされる通りのアミノ酸配列をコードし得るが、A P R I L に相当する配列の一部において以下の位置の 1 つにおいて変異を含み得る（配列番号 1 に示される位置番号を参照して）：S 202、P 201、M 200、T 175、V 174、A 125、H 203、D 205 および R 206。

【化7-1】

配列番号 81 (APRILITE#01)

ATGGAGACCGACACCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAG
CACCAGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGGCCAGCTGCCAGACCAGGC
GCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGTACAC
CATGCACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTAC
ATCAACCCCAGCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCC
ACCCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCT
GACCAGCGAGGACAGCGCCGTACTACTGCGCCAGATACTACGACGACCAC
ACTGCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACCCCTGACCGTGAGCAGCTCTGGC
GGAGGCAGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCCAGCCAGATCGTG
CTGACCCAGAGCCCAGCCATCATGAGCGCCAGGCCAGGCGAGAAGGTGACCAT
GACCTGCAGCGCCAGCAGCGTGAACATGAACCTGGTACCGAGCAGAAGAAGA
GCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGCCAGCGG
CGTGCCAGCCCCACTTCAGAGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTACAGCCTGACCA
TCAGCGGCATGGAGGCCAGGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGC
AGCAACCCCTTCACCTCGGCAGCGGCCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTGG
TCCCGCCGAGCCCCAAATCTCCTGACAAAACACACATGCCAACCGTGCC
AGATCCCAAATCTGGCGGAGGCCAGCGTGCTGCACCTGGTGCCCATCAACG

10

20

【化7-2】

CCACCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTG
 AGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACG
 CTGGCGTGTACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAA
 TGGGCCAGGTGGTGGCCAGGGCAGACAGGGACAGAGGAGACCCCTGTTCCG
 GTGCATCCGGAGCATGCCAGCCACCCGACAGGCCTACAACAGCTGCTACA
 GCGCTGGCGTGTTCACCTGCACCAGGGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCC
 AGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCCCACGGCACCTTCTGGCTTCGT
 GAAGCTGTGA

10

配列番号 82 (APRILITE#03)

ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAG
 CACCGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGGCCAGCTGGCCAGACCAGGC
 GCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTCACCCGGTACAC
 CATGCACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCTAC
 ATCAACCCAGCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCC
 ACCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCT
 GACCAGCGAGGACAGCGCCGTACTACTGCGCCAGATACTACGACGACCAC
 ACTGCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACCTGACCGTGAGCAGCTCTGGC
 GGAGGCGGCTCTGGCGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCCAGATCGT
 CTGACCCAGAGCCCAGCCATCATGAGCGCCAGGCCAGGGAGAAGGTGACCAT
 GACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAACATGAACCTGGTACCAAGCAGAAGA
 GCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCGG
 CGTGCCAGCCCACCTCAGAGGCAGCGGCAGCGGCCAGCAGCTACAGCCTGACCA
 TCAGCGGCATGGAGGCCAGGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGC
 AGCAACCCCTCACCTCGGCAGCGGCCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTGGA
 TCCCACCAAGGCCAGCGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGCGCCACCATCGCGT
 CGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCAGCGGTGCCGCCAGCGGGGGGGCG
 CAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTCTGGCGGAGGCGGCAG
 CGTGCTGCACCTGGTGCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGA
 CCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGCAGAGGCCTGCAGGCCA
 GGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCTGGCGTGTACCTGCTGTACTCCCAGG
 TGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTGGTGAGCCGGGAGGGC
 CAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGCATCCGGAGCATGCCAGCCACCC
 CGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTCACCTGCACCAAG
 GCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCC
 CCCCACGGCACCTTCTGGCTCGTGAAGCTGTGA

20

30

40

【化7-3】

配列番号 83 (APRILITE#06)

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGGATGCCCTGTGCCTGCTGGAGCCGACCA
 CGCCGACGGCGTGCTGCACCTGGTCCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACT
 CTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCT
 GCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCTGGCGTGTACCTGCTGT
 ACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTGGTGAGC
 CGGGAGGGCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGCATCCGGAGCATGC
 CCAGCCACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTCAC 10
 CTGCAACAGGGCGACATCCTGAGCGTGTACATCCCCAGAGGCCAGAGCCAAGCT
 GAACCTGTCCCCCCCACGGCACCTTCTGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCG
 GCTCGGATCCCACCAACGACGCCAGCGCCGACCAACACCCGGCGCCAC
 CATCGCGTCGAGCCCCCTGTCCTGCGCCCAGAGGCAGCCGGCAGCGCG
 GGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATAGCGGTGGCG
 GTGGCAGCCAGGTGCAAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTCACCCGGTACA
 CCATGCACTGGGTGAAGCAGCGCCAGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCTA 20
 CATCAACCCAGCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAAGTTCAAGGACAAGGC
 CACCCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCC
 TGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATACTACCGACGACCAC
 TACTGCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACCCCTGACCGTGAGCAGCTCTGG
 CGGAGGGCGCTCTGGCGAGGCAGGCGCTCTGGCGGAGGCCAGGCGAGATCGT
 GCTGACCCAGAGGCCAGCCATCATGAGCGCCAGCCCAGGCGAGAAAGGTGACCA
 TGACCTGCAGCGCCAGCAGCGTGAGCTACATGAACCTGGTACCGAGCAGAAG 30
 AGCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCG
 GCGTGCAGCCCACCTCAGAGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTACAGCCTGAC
 CATCAGCGGCATGGAGGCCAGGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGG
 GCAGCAACCCCTCACCTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTG
 TGA

【0092】

APRIL-CARをコードする核酸配列は、配列番号84～89として示される。本発明の核酸配列は、配列番号84、85、86、87、88または89によってコードされる通りのアミノ酸配列をコードし得るが、APRILに相当する配列の一部において以下の位置の1つにおいて変異を含み得る（配列番号1に示される位置番号を参照して）：S202、P201、M200、T175、V174、A125、H203、D205およびR206。

10

20

30

40

【化8-1】

配列番号 84 (dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ)

ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGTGGTGCTGCTGTGGTGCCAGGCAGCACCGGCAGC
 GTGCTCCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATG
 TGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAG
 GACGCTGGCGTGTACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGC
 CAGGTGGTGAGCCGGAGGGCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGATCCGGAGCATG
 CCCAGCCACCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTCACCTGCACCAG
 GGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCAGGC
 ACCTTTCTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGGGGCTCGGATCCCCCGAGCCAAATCTCCT
 GACAAAACCTCACACATGCCAACCGTGCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCGTAGTCAGTC
 TTCCCCCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGT
 GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTG
 CATAATGCCAAGACAAAGCCGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
 CTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGCTGAATGCAAGGAGTACAAGTGCAGGTCTCCAAACAAA
 GCCCTCCAGCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAGGGCAGCCCGAGAACACAG
 GTGTACACCCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACCGAGTCAGCCTGACCTGCCTG
 GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAACCGGAGAAC
 AACTACAAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCCTACAGCAAGCTC
 ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
 CTGCACAACCAACTACACGCAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGTAAAAAAGATCCAAATT
 TGGGTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTAGTAACAGTGGCCTT
 ATTATTTCTGGTGGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGACTACATGAACATGACT
 CCCCGCCGCCCGGGCCACCGCAAGCATTACCGCCCTATGCCCAACACCGCAGTC
 GCCTATCGCTCCAGGGACCAGAGGCTGCCCGATGCCACAAGCCCCCTGGGGAGGCAGT
 TTCCGGACCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCAGGCCACTCCACCCCTGCCAAGATCAGAGT
 AAGTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGGCCAGAACCCAGCTATAACGAG
 CTCATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATTTGGACAAGAGACGTGGCGGGACCCGTAG
 ATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACGTGAGAACAGAT
 AAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAAGATTGGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGC
 GATGGCCTTACCAAGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAG
 GCCCTGCCCTCGCTAA

10

20

30

配列番号 85 (dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ)

ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGTGGTGCTGCTGTGGTGCCAGGCAGCACCGGCAGC
 GTGCTCCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATG
 TGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAG
 GACGCTGGCGTGTACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGC
 CAGGTGGTGAGCCGGAGGGCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGATCCGGAGCATG
 CCCAGCCACCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTCACCTGCACCAG

40

【化8-2】

GGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCACCGGC
 ACCTTCTGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGCTCGATCCCACGACGCCAGCGCC
 CGACCACCAACACCGGCCACCATCGCTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGC
 CGGCCAGCGCGGGGGCGCAGTCACACGAGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTTTGG
 GTGCTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTATAGCTGCTAGTAACAGTGGCTTTATT
 ATTTCTGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTGAACATGAAACATGACTCCC
 CGCCGCCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCACCACGCCACTTCGAGCC
 TATCGCTCCAGGGACCAGAGGCTGCCCTGGATGCCACAAGCCCCCTGGGGAGGCAGTTTC
 CGGACCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCAGCCTGGCAAGATCAGACTGAAG
 TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCGTACAGCAGGCCAGAACAGCTATAACGAGCTC
 AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCTGAGATG
 GGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACGTGAGAAAGATAAG
 ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGAT
 GCCCTTACCAAGGGCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCC
 CTGCCTCCTCGCTAA

10

配列番号 86 (dAPRIL-HNG-CD28OXZ)

20

ATGGAGACCGACACCCCTGCTGCTGTGGTCTGCTGCTGTGGTGCCAGGCACCACGGCAGC
 GTGCTCCACCTGGTGCCTACAGCCACCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATG
 TGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGCCAGAGGCCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAG
 GACGCTGGCGTGTACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTCACAATGGC
 CAGGTGGTGAGCCGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGATCCGGAGCATG
 CCCAGCCACCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTCACCTGCACCAG
 GGGCACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCACCGGC
 ACCTTCTGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGCTCGATCCCAGGCCAAATCTCCT
 GACAAAACACACATGCCACCGTGCCAAAAGATCCAAATTGGTGCTGGTGGTT
 GGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTGCTAGTAACAGTGGCTTATTATTTCTGGTGAGG
 AGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCC
 ACCCGCAAGCATTACCAAGGCCCTATGCCACCAACGCCACTTCGCGACGCCCTATCGCTCCAGGGAC
 CAGAGGCTGCCCGATGCCACAAGCCCCCTGGGGAGGCAGTTCCGGACCCCATCCAA
 GAGGAGCAGGCCAGGCCACTCCACCCCTGCCAAGATCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGA
 GACGCCCGCGTACAGCAGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGA
 GAGGAGTACGATTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCTGAGATGGGGAAAGCCGAGA
 AGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACGTGAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
 AGTGAGATTGGATGAAAGCGAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGCCTTACCAAGGG
 CTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCCCTGCTCCTCGCTAA

30

40

配列番号 87 (dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ)

【化8-3】

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGATGGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGAGCCGACCACGCCGACGGC
 AAGCCCATTCCAACCCCTGCTGGCCTGGACTCCACCTCTGGCGGAGGCAGCGTGTG
 CACCTGGTCCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAG
 CCAGCCCTGAGACGGGCAGAGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCT
 GGCCTGTACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGCCAGGTG
 GTGAGCCGGGAGGGCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTCATCCGGAGCATGCCAGC
 CACCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGTGGCGTGTTCACCTGCACCAGGGCAGC
 ATCCTGAGCGTGTATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGCACCTTT
 CTGGGCTTGTGAAGCTGTCTGGAGGCCTCGGATCCCGCCGAGCCAAATCTCCTGACAAA 10
 ACTCACACATGCCAACCGTGCCTCACCTCCCCTGGCCGGCCCGTCAGTCTCCTTCCCC
 CCAAAACCAAGGACACCCCTCATGATGCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC
 GTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
 GCCAAGACAAAGCCGGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
 GTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTCAAGGTCTCAACAAAGCCCTC
 CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCCACAGGTGTAC
 ACCCTGCCCATCCGGATGAGCTGACCAAGAACAGGTGAGCTGACCTGCCTGGTCAAA
 GGCTTCTATCCCAGCGACATGCCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAACCGGAGAACAACTAC
 AAGACCACGCCCTCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTCTTCTACAGCAAGCTCACCGTG
 GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGAAACGTCTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
 AACCACTACACGAGAACAGCCCTCCCTGCTCCGGTAAAAAAAGATCCAAATTGGGTG
 CTGGTGGTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTAGTAACAGTGGCTTATTATT
 TTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGCACAGTACTACATGAACATGACTCCCCGC
 CGCCCCGGCCCACCCGAAGCATTACCGCCCTATGCCCAACACCGCAGCTCGCAGCCTAT
 CGCTCCAGGGACCAGAGGCTGCCCTGATGCCCAAGCCCCCTGGGGAGGCAGTTCCGG
 ACCCCCACCAAGAGGAGCAGGCCAGCCCACCTCCACCCCTGGCCAAGATCAGAGTGAAGTTC
 AGCAGGAGCGCAGACGCCCGCGTACAGCAGGGCCAGAACCCAGCTCTATAACGAGCTCAAT
 CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCCGGACCCCTGAGATGGG
 GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACGTGAGAAAGATAAGATG
 GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGATGAAAGGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGCACGATGGC
 CTTTACCAAGGGTCTCAGTACGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAAGGCCCTG
 CCTCCTCGCTAA

配列番号 88 (dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ)

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGATGGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGAGCCGACCACGCCGACGGC
 AAGCCCATTCCAACCCCTGCTGGCCTGGACTCCACCTCTGGCGGAGGCAGCGTGTG
 CACCTGGTCCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAG
 CCAGCCCTGAGACGGGCAGAGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCT
 GGCCTGTACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGCCAGGTG 40

【化8-4】

GTGAGCCGGGAGGGCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGCATCCGGAGCATGCCAGC
 CACCCCGACAGAGCCTACAAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTCTTCACCTGCACCAGGGCGAC
 ATCCTGAGCGTGTATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGCACCTTT
 CTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGGCTCGGATCCACCACGACGCCAGCGCCGACCCA
 CCAACACCGCGCCCACCATCGCTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCAGGCCA
 GCGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTGGGTGCTG
 GTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTATAGCTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTTC
 TGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAACATGACTCCCCGCC
 CCCGGGCCCACCCGCAAGCATTACCAAGCCCTATGCCCAACCACGCCACTTCGCAGCCTATCGC
 TCCAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCACAAGCCCCCTGGGGAGGCAGTTCCGGACC
 CCCATCCAAGAGGAGCAGGCCACCTCCACCCCTGGCCAAGATCAGAGTGAAGTTCAGC
 AGGAGCGCAGACGCCCGCGTACCAAGCAGGCCAGAACACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
 GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTGGACAAGAGACGTGGCGGGACCCCTGAGATGGGGGA
 AACCGAGAAGGAAGAACCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACACTGCAGAAAAGATAAGATGGCG
 GAGGCCCTACAGTGAAGATTGGATGAAAGGCCAGCGCCGGAGGGCAAGGGGACGATGCC
 TACCAAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCC
 CCTCGCTAA

10

20

配列番号 89 (dAPRIL-HNG-CD28OXZ)

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGAGGCCGACCACGCCGACGGC
 AAGCCCATTCCAACCCCTGCTGGCCTGGACTCCACCTCTGGGGAGGCCGAGCGTGCTG
 CACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAG
 CCAGCCCTGAGACGGGCAGAGGCCGTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCT
 GCGTGTACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGCCAGGTG
 GTGAGCCGGAGGGCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGCATCCGGAGCATGCCAGC
 CACCCCGACAGAGCCTACAAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTCTTCACCTGCACCAGGGCGAC
 ATCCTGAGCGTGTATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGCACCTTT
 CTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGGCTCGGATCCGCCGAGCCAAATCTCCTGACAAA
 ACTCACACATGCCACCGTGCCAAAGATCCAAATTGGTGTGGTGGTTGGTGG
 GTCCTGGCTTGCTATAGCTGCTAGTAACAGTGGCCTTATTATTTCTGGTGGAGGAGTAAG
 AGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGCCACCCGC
 AACGATTACCGCCCTATGCCCAACACGCCACTTCACCCCTGGCAAGATCAGAGTGAAGTT
 CAGCAGGAGCGCAGACGCC
 CCCCGTACAGCAGGCCAGAACAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGGAG
 TACCGATTTGGACAAGAGACGTGGCGGGACCCCTGAGATGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAG
 AACCCCTCAGGAAGGCCGTACAATGAACCTGAGAAAGATAAGATGGCGGAGGC
 ATTGGGATGAAAGGCAGCGCCGGAGGGCAAGGGGACGATGGCCTTACCAAGGGTCTCAGT
 ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTCACATGCAGGCC
 CCTCGCTAA

30

40

【0093】

核酸配列は、上記で言及されるバリエーションを含む配列番号81、82、83、84、85、86、87、88または89によってコードされるアミノ酸配列と同じアミノ酸配列をコードし得るが、遺伝暗号の縮重に起因して、異なる核酸配列を有し得る。核酸配列は、本発明の第一の態様で定義される分子をコードする限り、配列番号81～89として示される配列と、少なくとも80、85、90、95、98、または99%の同一性を

50

有し得る。

【0094】

核酸配列は、配列番号81～89によってコードされるアミノ酸配列をコードし得るが、以下の単一変異の1つを含み得る（配列番号22～45）。

A 1 2 5 T、

V 1 7 4 T、V 1 7 4 G、

T 1 7 5 H、T 1 7 5 S、T 1 7 5 G、

M 2 0 0 C、M 2 0 0 L、M 2 0 0 G、M 2 0 0 S、M 2 0 0 A、M 2 0 0 N、

P 2 0 1 V、P 2 0 1 A、P 2 0 1 G、P 2 0 1 R、P 2 0 1 Y、P 2 0 1 W、

S 2 0 2 G、S 2 0 2 F、S 2 0 2 D、S 2 0 2 V、S 2 0 2 P、D 2 0 5 P。 10

【0095】

核酸配列は、配列番号81～89によってコードされるアミノ酸配列をコードし得るが、以下の位置における変異の組み合わせを含み得る：V 1 7 4 および T 1 7 5、または V 1 7 4 および M 2 0 0、または V 1 7 4 および S 2 0 2、または V 1 7 5 および M 2 0 0、または V 1 7 5 および S 2 0 2、または D 2 0 5 および R 2 0 6、または V 1 7 4、T 1 7 5 および M 2 0 0、または V 1 7 4、T 1 7 5 および S 2 0 2、または T 1 7 5、D 2 0 5 および R 2 0 6、または M 2 0 0、D 2 0 5 および R 2 0 6、または V 1 7 4、T 1 7 5、M 2 0 0 および S 2 0 2、または T 1 7 5、S 2 0 2、D 2 0 5 および R 2 0 6。

【0096】

核酸配列は、配列番号81～89によってコードされるアミノ酸配列をコードし得るが、以下の特定の変異の組み合わせの1つを含み得る：

V 1 7 4 T および T 1 7 5 A、または V 1 7 4 T および M 2 0 0 G、または T 1 7 4 S および S 2 0 2 G、または

V 1 7 4 T および S 2 0 2 V、または V 1 7 4 G および S 2 0 2 G、または V 1 7 4 G および S 2 0 2 E、または

V 1 7 4 G および S 2 0 2 A、または V 1 7 4 G および S 2 0 2 G、または V 1 7 4 E および S 2 0 2 Y、または

T 1 7 5 A および S 2 0 2 E、または T 1 7 5 G および S 2 0 2 G、または T 1 7 5 G および S 2 0 2 V、または 30

T 1 7 5 A および S 2 0 2 P、または T 1 7 5 A および M 2 0 0 G、または T 1 7 5 S および S 2 0 2 G、または

S 2 0 2 V および H 2 0 3 N、または D 2 0 5 H および R 2 0 6 L、または D 2 0 5 P および R 2 0 6 K、または

D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または D 2 0 5 S および R 2 0 6 P、または D 2 0 5 R および R 2 0 6 G、または

D 2 0 5 P および R 2 0 6 I、または D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または

V 1 7 4 T、T 1 7 5 A および S 2 0 2 E、または V 1 7 4 T、T 1 7 5 A および M 2 0 0 G、または

T 1 7 5 A、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または T 1 7 5 A、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または 40

M 2 0 0 G、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または M 2 0 0 G、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H、または

V 1 7 4 T、T 1 7 5 A、M 2 0 0 G および S 2 0 2 E、または

T 1 7 5 A、S 2 0 2 E、D 2 0 5 P および R 2 0 6 N、または

T 1 7 5 A、S 2 0 2 E、D 2 0 5 S および R 2 0 6 H。

【0097】

ベクター

本発明は、本発明にしたがう核酸配列を含むベクターも提供する。そのようなベクターは、本発明の第一の態様にしたがうバリエント A P R I L を発現し、かつ産生するよう、 50

宿主細胞に核酸配列を導入するために使用され得る。

【0098】

ベクターは、例えばプラスミドもしくは合成mRNA、またはレトロウイルスベクターもしくはレンチウイルスベクターなどのウイルスベクターであり得る。

【0099】

ベクターは、エフェクター細胞にトランスフェクションまたは形質導入する能力を有し得る。

【0100】

細胞

本発明は、本発明にしたがう核酸を含む宿主細胞も提供する。

10

【0101】

本発明は、本発明にしたがうCARを含む細胞もまた提供する。

【0102】

細胞は、T細胞またはナチュラルキラー(NK)細胞などの免疫細胞であり得る。細胞は、初代細胞または細胞株由来の細胞であり得る。

【0103】

本発明は、本発明の複数のCARを発現する細胞を含む細胞組成物もまた提供する。

【0104】

本発明は、キメラ抗原受容体をコードする核酸配列を含む本発明のベクターを、細胞に形質導入する工程またはトランスフェクションする工程を含む、本発明にしたがう細胞を作製するための方法もまた提供する。

20

【0105】

細胞は、エキソビオでトランスフェクションまたは形質導入され得、その後同じ被験体または異なる被験体へ再移植され得る。

【0106】

治療薬剤

本発明は、上記で定義される通りのバリアントAPRIL、核酸、ベクター、CAR発現細胞またはBiTEを含む治療薬剤を提供する。

【0107】

治療薬剤は、薬剤を形質細胞などのBCMA発現細胞へと標的化するための標的化部分としてバリアントAPRILを含み得る。治療薬剤は、例えば形質細胞に直接作用するか、または形質細胞に作用するために免疫系の他の細胞をリクルートすることによって治療効果(effect)を発揮する、機能ドメインもまた含み得る。

30

【0108】

バリアントAPRILは、細胞傷害性薬物などの薬物と結合され得る。

【0109】

バリアントAPRILは、キメラ抗原受容体または二重特異性T細胞誘導体(BiTE)の一部であり得る。

【0110】

薬学的組成物

40

本発明は、本発明の治療薬剤を、薬学的に許容されるキャリア、希釈液、もしくは賦形剤、および任意に1つまたは複数の更に薬学的に有効なポリペプチド、および/もしくは化合物と一緒に含む薬学的組成物にも関する。そのような製剤は、例えば、静脈注入に適した形式であり得る。

【0111】

処置の方法

本発明の治療薬剤および薬学的組成物は、がん性の疾患、特に亢進したBCMA発現に関連する形質細胞障害またはB細胞障害の治療のために使用され得る。

【0112】

形質細胞障害は、形質細胞腫、形質細胞性白血病、多発性骨髄腫、マクログロブリン血

50

症、アミロイドーシス、ワルデンストレーム型マクログロブリン血症、孤立性骨形質細胞腫、髄外性形質細胞腫、骨硬化性ミエローマ（POEMS症候群）、およびH鎖病と意義不明の単クローナル性免疫グロブリン血症／くすぶり型多発性骨髄腫を含む。

【0113】

その疾患は、多発性骨髄腫であり得る。

【0114】

上昇したBCMA発現レベルに相關するB細胞障害の例は、CLL（慢性リンパ性白血病）および非ホジキンリンパ腫（NHL）である。本発明の二重特異性結合薬剤は、全身性エリテマトーデス（SLE）、多発性硬化症（MS）、および関節リウマチ（RA）のような自己免疫疾患の治療においても使用され得る。

10

【0115】

本発明の方法は、がん性の疾患、特に亢進したBCMA発現に相關する形質細胞障害またはB細胞障害の治療のためであり得る。

【0116】

疾患の処置のための方法は、本発明の薬剤または組成物の治療上の使用に關係する。この点で、薬剤または組成物は疾患に付隨する少なくとも1つの症状を小さくする、減少する、もしくは改善する、および／または疾患の進行を遅延する、減少する、もしくは阻止するために、既存の疾患または状態を有する被験体に投与され得る。本発明の方法は、形質細胞などのBCMA発現細胞のT細胞媒介性の殺傷を引き起こすか、または促進し得る。

20

【0117】

診断

本発明は、本発明のバリエントAPRILを含む、形質細胞を検出するための診断薬剤もまた提供する。

【0118】

診断薬剤は、放射性ラベルもしくは蛍光ラベルまたは色素などの検出可能なラベルもまた含み得る。

【0119】

診断薬剤は、形質細胞障害を診断するためのものであり得る。

【0120】

診断方法は、インピボまたはインピトロで行われ得る。インピボ法において、診断薬剤は被験体へ投与される。

30

【0121】

インピトロ法において、バリエントAPRILは、インピトロで被験体由来のサンプルへ添加される。当該サンプルは、形質細胞を含み得る。当該サンプルは、PBM Cサンプルなどの血液サンプルであるか、またはそれに由来し得る。

【0122】

ここで本発明がさらに実施例によって記載されるが、これは本発明の実施において当業者を支援することに役立つことを意図しており、本発明の範囲を制限することを何ら意図しない。

40

【実施例】

【0123】

実施例1 骨髄腫への標的としてのBCMAの特性評価

初代骨髄腫細胞を、明らかに疾患を有することが知られている多発性骨髄腫患者由来の、新鮮な骨髄サンプルでのCD138免疫磁気的選択を行うことによって単離した。これら細胞は、PEと結合体化されたBCMA特異的J6MO mAb (GSK)により染色した。同時に、既知の数の結合部位を有するビーズの標準が、PE Quantibrite bead kit (Becton Dickinson)を使用して、製造者の指示通りに生成した。骨髄腫細胞でのBCMAコピー数は、骨髄腫細胞からの平均蛍光強度と、ビーズより得られた標準曲線とを相關させることによって得ることができた。骨髄腫

50

細胞表面での B C M A コピー数の範囲は低く：細胞あたり 3 4 8 . 7 ~ 4 2 6 8 . 4 B C M A コピーであり、平均値が 1 1 8 1、中間値が 1 0 8 4 . 9 (図 2) であることが見出された。これは、C A Rへの古典的な標的である、例えば C D 1 9 および G D 2 などより相当低い。初代骨髄腫細胞での B C M A 発現の存在は、V i c k y - 1 抗体 (A b c a m A b 1 7 3 2 3) によっても確認され、この例は図 1 8 に示される。

【 0 1 2 4 】

実施例 2 A P R I L に基づく C A R のデザインおよび構築

天然形態における A P R I L は、分泌型 I I 型タンパク質である。C A R のための B C M A 結合ドメインとしての A P R I L の使用、およびこのタンパク質を安定に、かつこの形態での B C M A への結合を保持するためには、この I I 型分泌タンパク質の I 型膜結合タンパク質への転換を必要とする。候補分子を生成するために、A P R I L の先端のアミノ末端を欠失させて、プロテオグリカンへの結合を除去した。次に、新生タンパク質を小胞体へ、そしてそこから細胞表面へと指向させるために、シグナルペプチドを付加した。また、使用したスペーサーの性質が、C A R の機能を変化させ得るため、3 つの異なるスペーサードメインを試験した：(i) F c 結合モチーフを除去するために変化させたヒト I g G 1 スペーサー；(i i) C D 8 ストーク；および(i i i) I g G 1 ヒンジ単独、を含む A P R I L に基づく C A R が生成された (図 4 に漫画および図 5 にアミノ酸配列、ならびに図 1 9 にも異なるシグナルペプチドおよび V 5 エピトープタグを有する点で、図 5 に示される配列とは異なるアミノ酸配列)。これら C A R は、マーカータンパク質 (短縮型 C D 3 4) が、便利なマーカー遺伝子として共発現できるように、バイリストロニックなレトロウイルスベクター (図 6 A) に発現させた。

10

【 0 1 2 5 】

実施例 3 A P R I L に基づく C A R の発現および機能

本研究の目的は、構築された A P R I L に基づく C A R が、細胞表面に発現するか否か、および A P R I L が本来のタンパク質を形成するようにフォールディングされるか否かを試験することであった。T 細胞にこれらの異なる C A R コンストラクトを形質導入し、そして市販の抗 A P R I L m A b を使用した染色と同時にマーカー遺伝子についての染色を行い、そしてフローサイトメトリーによって解析した。この実験の結果は、図 6 B に示され、ここで A P R I L 結合は、マーカー遺伝子の蛍光に対してプロットしている。これらデータは、この形式において A P R I L に基づく C A R は細胞表面に発現しており、かつ A P R I L は、抗 A P R I L m A b により認識されるのに十分にフォールディングされることを示す。

20

【 0 1 2 6 】

次に、この構成の A P R I L は、B C M A および T A C I を認識できるか否かを決定した。リコンビナント B C M A および T A C I を、マウス I g G 2 a - F c との融合物として生成した。これらリコンビナントタンパク質を、形質導入された T 細胞とインキュベートした。この後に、細胞を洗浄し、そして抗マウスの蛍光物質と結合体化された抗体、および異なる蛍光物質と結合体化された、マーカー遺伝子を検出するための抗体によって染色した。細胞をフローサイトメトリーにより解析し、その結果は図 6 C に提示される。異なる C A R は、B C M A および T A C I の両方に結合することができた。驚くべきことに、C A R は T A C I よりも良好に B C M A に結合することができた。また驚くべきことに、C D 8 ストークまたは I g G 1 ヒンジスペーサーを有する C A R は、F c スペーサーを有する C A R よりも良好に、B C M A および T A C I に結合することができた。

30

【 0 1 2 7 】

実施例 4 A P R I L に基づくキメラ抗原受容体は、B C M A 発現細胞に対して活性的である

正常ドナー由来 T 細胞に、異なる A P R I L C A R を形質導入し、そして野生型、または B C M A および T A C I を発現するように改変した、いずれかの S u p T 1 細胞に対して試験した。機能を決定するために、数種の異なる分析を使用した。古典的なクロム放出分析を行った。ここで、標的細胞 (S u p T 1 細胞) を、⁵ C r を用いて標識し、そ

40

50

してエフェクター（形質導入されたT細胞）と、異なる比率で混合した。標的細胞の溶解は、共培養上清中の⁵¹Crを計数することにより、決定した（図6Aは累積のデータを示し、異なるエフェクター：標的比での単独の分析からのデータ例は、図16に示される）。

【0128】

加えて、SupT1細胞と1:1で培養したT細胞由来上清を、インターフェロンガンマについてELISAによって分析した（図6Bは累積のデータを示し、単独の分析からのデータ例は図17に示される）。SupT1細胞との共培養の1週間後でのT細胞増加量の計測も行った（図6C）。T細胞は、計数ビーズを用いて調整したフローサイトメトリーによって計数した。これら実験データは、APRILに基づくCARが、BCMAを発現する標的を殺傷することができる事を示す。更にこれらデータは、CD8ストークまたはIgG1ヒンジに基づくCARが、Fc-pvaaに基づくCARよりも良好に挙動したことを示す。

【0129】

実施例5 APRILに基づくCARは、原発性骨髄腫細胞を殺傷することができる上記データは、原理的にはAPRILに基づくCARを作製することができる事を実証しているため、励まされる。しかしながら、ほとんどの原発性骨髄腫細胞は、その表面において少数のBCMA分子を発現するため、そのようなAPRILに基づくCARが、特に低密度発現の症例において、原発性骨髄腫細胞の殺傷を引き起こすか否かについて調べた（investigated）。図2において記載されたBCMA発現の範囲に相当する3症例を選択した：第一は不明瞭な発現を有する（平均より低い）；第二の症例は中間的な発現を有する（ほぼ平均の発現）、そして第三は明瞭な発現を有した（平均の発現よりも上）。図8は、BCMA発現を説明するために、左に3症例全てについてのアイソタイプ対照に対するBCMA染色のヒストグラムを示す。異なるスペーサーを有するAPRILに基づくCARを比較したときに、CD8ストークのスペーサーおよびIgG1ヒンジスペーサーを有するCARが、Fc-pvaaで間隔を開けられたCARよりも良好に挙動する事が決定されたため、この分析においてはCD8ストークおよびヒンジのAPRIL CARのみを試験した。左に、骨髄腫細胞とCAR-T細胞の1:1共培養後3日および6日の、開始数と比較した骨髄腫細胞の生存を示す。6日までに、不明瞭なBCMA発現を有する骨髄腫細胞を含む、95%超の骨髄腫細胞が排除された。不明瞭にBCMAを発現する骨髄腫細胞は、高度に発現するものよりも殺傷の速度は遅いが、APRIL CARによって標的とされ得る。

【0130】

実施例6 一連の「APRIL ITES」の構築

本発明者らは、図24Aに示されるように、OKT3由来のscFvをAPRILの細胞外ドメインへと連結させる一連の二重特異性誘導体を構築した。数種の設計の検討を、これらの分子の構築の間に行つた：（a）プロテオグリカンに結合するAPRILのアミノ末端を、非特異的結合を防ぐために短縮化した、（b）コンストラクト4、5および6において、シグナルペプチドをAPRILの成熟エクトドメインに結合させた、（c）OKT3を、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とを連結させるリンカーを含むscFvとして再構成した、（d）多様な異なるスペーサーを、scFvとAPRILとの間で試行した。

【0131】

多様な異なる構成は、以下の通りである。

- (1) IgG1ヒンジによって短縮型APRILに連結させたOKT3 scFv、
- (2) (SGGGGS)3リンカーを介して短縮型APRILに連結させたOKT3 scFv、
- (3) CD8ストークを介して短縮型APRILに連結させたOKT3 scFv、
- (4) IgG1ヒンジを介してOKT3 scFvに連結させた短縮型APRIL、
- (5) (SGGGGS)3リンカーを介してOKT3 scFvに連結させた短縮型APRILおよび

10

20

30

40

50

(6) CD8スペーサーを介してOKT3scFvに連結させた短縮型APRIL。コンストラクト(3)および(6)は、CD8スペーサーにおけるジスルフィド結合を通じてホモダイマーを形成する。コンストラクト(1)、(3)および(6)についてのアミノ酸配列は、図30に示される。

【0132】

実施例7 293T細胞におけるAPRILiTの発現

293T細胞に、上記に列挙されるAPRILiTコンストラクトをコードする発現プラスミドをトランスフェクションした。293T細胞由来の上清をアクリルアミドゲル上で流し、タンパク質を膜に転写した。その後、膜を、APRILを認識する抗体を用いて染色した。この結果は、図25に示される。タンパク質1、3および6が、予想される分子量において検出された。タンパク質2、4および5は検出されず、これは、これらの構造が不安定であることを示す。

【0133】

実施例8 TCRおよびBCMAへの結合

その後、これらのタンパク質が、一方の末端でT細胞受容体(TCR)と、および他方の末端でBCMAとのいずれにも結合できるか否かを検証した。トランスフェクションした293T細胞由来の上清を、Jurkat T細胞およびTCRノックアウトを有するJurkat T細胞クローニングを染色するために使用した。これは、APRILiTが、TCRに結合することを実証する(図26b)。その後、BCMAを発現するように改変したSupT1細胞およびTACIを発現するように改変したSupT1細胞を、二次抗APRILビオチン次いでストレプトアビジンPEを使用して、上記の上清で染色した。この結果は、図26aに示される。APRILiT 1、3および6はBCMAに結合し、そしてTACIにはより少ない程度で結合したことが見出された。

【0134】

実施例9 安定なAPRILiTは、IFN放出を引き起こす

正常ドナーT細胞を、異なるSupT1と1:1で培養した。使用したSupT1は、形質導入なし、BCMAを発現するように改変したものまたはTACIを発現するように改変したもののいずれかであった。この結果は、図27に示される。T細胞は、いずれかのAPRILiTの存在下で、BCMAまたはTACIで改変したSupT1細胞を用いて曝露した場合にのみIFNを放出することが見出された。BCMAに対する応答は、TACIに対する応答よりも大きかった。

【0135】

実施例10 安定なAPRILiTは、BCMA+標的のT細胞媒介性の殺傷を引き起こす

T細胞を、APRILiT 1、3および6の非存在下または存在下で、野生型SupT1細胞と、BCMAを発現するSupT1細胞とおよびTACIを発現するSupT1細胞と1:1で培養した。この結果は、図28に示される。残存T細胞は、APRILiTの添加なしの条件で存在するSupT1細胞の比率として示される。

【0136】

実施例11 原発性骨髄腫細胞におけるBCMA発現の検証

4種の異なる骨髄腫サンプルを、ラット抗ヒトBCMA mAb Vicky1を用いて染色した。この結果は、図29に示される。臨床的および形態的に典型的な骨髄腫(パネル2~4)において、中間的または不明瞭な染色が見られる。

【0137】

実施例12 原発性骨髄腫細胞におけるAPRILiTの効果の検証

既知の多発性BCMA+骨髄腫を有する2人の患者由来の診断用骨髄吸引物由来の残りの材料を使用した。CD138磁気ビーズ選択を、吸引物から骨髄腫細胞を精製するために行った。これらの細胞を、完全培養培地において48時間静置し、BCMAについての染色を、実際にBCMA陽性であることを確認するために行った。骨髄腫細胞はBCMAを発現するが、低レベルであることが見出された(図31)。

10

20

30

40

50

【0138】

次に、OKT3およびCD28.2を使用して刺激した正常ドナー末梢単核細胞を、CD56枯渇させ、NK細胞を除去した。CD56を枯渇させたPBMCとCD138選択した原発性骨髄腫細胞との1:1共培養を、APRILiTE #03および#06のいずれかの非存在下または存在下で行った。APRILiTE #01を試験するためには、材料が不十分であった。共培養物を、顕微鏡によって観察した。上清へのインターフェロンガンマの放出を、ELISAによって測定した。骨髄腫細胞の生存を、Annexin V / PI染色およびビーズカウント調整フローサイトメトリーによって測定した。

【0139】

明らかな集合（T細胞活性化の指標）が、共培養において見られた（図32を参照）。インターフェロンガンマ放出は、PBMCをAPRILiTEの存在下で骨髄腫細胞と培養した条件で観察されたが、SupT1.BCMA細胞と共に培養したときよりも低い絶対量であった（図33）。骨髄腫細胞の殺傷は、PBMCが、APRILiTEと共に存在する場合での共培養の6日後でも観察された（図34）。

【0140】

これらの発見は、APRILiTEが、原発性骨髄腫細胞の存在下で、骨髄腫細胞のT細胞媒介性の殺傷を引き起こすのに十分なレベルでT細胞活性化を引き起こすことを実証する。

【0141】

実施例13 インビボでのAPRILiTEの試験
h u S C I D モデルを使用した：NSG (n o d - s c i d ガンマ、N O D - s c i d I L 2 R ガンマ^{n u l l}) マウスに典型的なレベルのBCMAを発現する骨髄腫細胞株を異種移植する。これらの系統を、生物発光イメージングによって疾患を測定するために、ホタルルシフェラーゼを発現するように変更する。正常ドナーPBMCを、付随するAPRILiTEの腹腔内投与の間に尾静脈を介して投与する。以下を順に測定する（1）APRILiTEの血清レベル、（2）ヒトインターフェロンガンマの血清レベル、（3）フローサイトメトリーによる末梢血T細胞の増加量、生着および活性化、（4）腫瘍の生物発光測定。次に、以下を測定する：（1）骨髄の組織学による腫瘍の負荷、（2）骨髄、脾臓、血液およびリンパ節のフローサイトメトリーによるT細胞の増殖および生着および（3）残りの組織を、いずれかの毒性について肉眼および免疫組織学的に調べる。

【0142】

実施例14 BCMA標的化に特に適切なAPRIL変異体の生産
目的は、CARのためにより適切であり得る結合を有するAPRIL変異体を生成することであった。Hymowitz et al, 2004, The Journal of biological chemistry: Volume 280; Issue 8; Pages 7218-27によって記載された結晶データならびにRCSBデポジット1XU1および1XU2からの結晶データを使用して、BCMAへの結合を変化させ得るか、またはTACIよりもBCMAに対する特異性を上昇させ得る数種の残基を選択した。

【0143】

有用な性質を有するこれらの残基における変異を同定するための戦略は、図31Bにおいて概説される。変異のためにコドンに対して縮重であるオリゴヌクレオチドを用いたスプライシングオーバーラップPCRを使用して、変異体APRILのライブラリーを、重要な変異について生成し、無作為化した。これらのライブラリーを、CD8ストーク上にAPRILを提示し、かつCD34を口蹄疫2Aペプチドと共に共発現する、図31Aに示される足場にライゲーションした。このコンストラクト由来の典型的な発現は、図9に示される。これらのライゲーション産物をコンピテント細胞に形質転換し、單一コロニーを取り、個別に増加させ、そしてそのDNAを抽出し、そして293T細胞にトランスフェクションした。

【0144】

10

20

30

40

50

次いで 293T 細胞を別個にリコンビナントヒト B C M A - F c または T A C I - F c のいずれかとインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、Jackson ポリクローナル抗 F c Alexa fluor 488 を用いて二次的に染色し、マーカー遺伝子を抗 C D 34 APC を用いて染色した。A P R I L 変異体を野生型 A P R I L およびそれとのバッチにおける対照としての C D 34 単独を用いて、この方法でバッチでスクリーニングした。C D 34 陽性の事象を、図 31 に示される番号の 4 つのゲートに分割した。A l e x a f l u o r 488 平均蛍光強度 (M F I) を、それぞれのゲートについて計算し、多様なゲートの M F I 間の平均グラディエントを、以下の式を使用して計算した：[(M F I . 1 - M F I . 2) + (M F I . 2 - M F I . 3) + (M F I . 3 - M F I . 4)] / 3 (図 31C において説明される)。

10

【 0 1 4 5 】

この方法で、平均 M F I グラディエントを、それぞれの A P R I L 変異体についての B C M A および T A C I への結合について計算した。それぞれの変異体について、B C M A 結合および T A C I 結合の平均 M F I グラディエントを、それぞれのバッチにおける A P R I L WT 対照への結合の比率に変換した。有用な可能性のある変異体を生じるプラスミドを、キャピラリーシークエンスによって配列決定した。

【 0 1 4 6 】

この最初のスクリーニングの結果は、表 1 に要約され、図 10 で説明される。

【 0 1 4 7 】

その後、変異体のクラスを单一変異について概説されるものと同様の戦略によって一緒に組み合わせたが、更なる変異を導入するために変異体 A P R I L をコードするプラスミドを鋳型として使用した。この取り組みの結果は、表 2 に要約され、図 11 で説明される。野生型よりもはるかに高い B C M A に対するアフィニティーを有する変異体を生成することが可能であった（例えば、変異体 D 205R、R 206G）。本発明者らは、野生型 A P R I L と同程度の B C M A 結合を有するが、T A C I に結合しない変異体を生成することができた（例えば、変異体 T 175A、S 202P）。本発明者らは、野生型よりも低い B C M A への結合を有するが（これは、逆説的に低密度抗原の認識を改善し得る）、T A C I に結合しない変異体もまた生成することができた（例えば、V 174T、T 175A、M 200G、S 202E）。

20

【 0 1 4 8 】

最も見込みのある変異体由来のラージスケールの高品質のプラスミド D N A を生成し、トランسفエクションおよび発現データの反復を行った。これらのデータは、図 12 に示される。

30

【 0 1 4 9 】

実施例 15 F c スペーサーに融合された分泌型および短縮型の A P R I L は、B C M A および T A C I を認識する

C A R 形式（すなわち、膜貫通ドメインに融合し、そして細胞膜に固定した）における短縮型 A P R I L が、B C M A および T A C I に結合できるか否か調べるために、基本的な C A R を、自己切断する口蹄疫 2 A ペプチドを用いて、便利なマーカー遺伝子としての短縮型 C D 34 と共に、インフレームで改変した。このコンストラクトを発現する安定な S U P T 1 細胞株を樹立した。ヒト（および他種、示されない）I g F c ドメインに融合した分泌型の短縮型 B C M A および T A C I もまた生成し、そしてリコンビナントタンパク質を產生した。B C M A - F c と T A C I - F c との両方が、改変された S U P T 1 細胞株に結合することが示された。C D 34 マーカー遺伝子を発現する細胞のみが、B C M A - F c および T A C I - F c に結合することが見出された（図 9）。

40

【 0 1 5 0 】

実施例 16 A P R I L に基づくキメラ抗原受容体は、T 細胞の表面で安定に発現される

C A R スペーサードメインは、感度および特異性を変化させ得る。3 つのスペーサードメインを有する、3 つの型の A P R I L に基づく C A R が生成された：（i）F c 結合モ

50

チーフを除去するために改変したヒト IgG1スペーサー；(i i) CD8ストーク；および(i i i) IgG1ヒンジ単独(図14B)。初代ヒトT細胞にこれらの異なるCARを形質導入し、そして市販の抗APRIL mAbを使用して染色した(図15)。

【0151】

実施例17 APRILに基づくキメラ抗原受容体は、同種の標的を発現する細胞に対して活性的である

通常ドナー由来T細胞に、異なるAPRIL CARを形質導入し、そして野生型、またはBCMAおよびTACIを発現するように改変したSupT1細胞に対して試験した。機能を決定するために、数種の異なる分析を使用した。古典的なクロム放出分析を行った。ここで、標的細胞(SupT1細胞)は⁵¹Crを用いて標識し、そして異なる比率でエフェクター(形質導入されたT細胞)と混合した。標的細胞の溶解は、共培養上清中の⁵¹Crを計数することによって決定した(図16)。

10

【0152】

加えて、SupT1細胞と1:1で培養したT細胞由来上清を、インターフェロンガンマについてELISAによって分析した(図17)。

【0153】

SupT1細胞との共培養の1週間後のT細胞増加量の計測もまた行った。T細胞は、計数ピーズにより調整されたフローサイトメトリーによって計数した。最初のデータ(示されない)は、CD8ストークに基づくコンストラクトが、他のコンストラクトよりも多いT細胞増殖を引き起こすことを示すようである。

20

【0154】

実施例18 BCMA特異的APRIL変異体の生産

APRIL変異体を、特定のコドンを標的とする縮重プライマーを使用して生成した。これらのコドンを、APRIL-BCMA結合およびAPRIL-TACI結合のインシリコ解析を通じて同定した。この解析から、TACI結合に関係するようであるが、BCMA結合には関係しないようである残基を標的とした。

【0155】

(i)細胞表面発現CD34および(ii)APRIL変異体をコードするプラスミドを產生した。その後、このプラスミドを細菌に形質転換し、プレーティングし、單一コロニーを取り、別個に増やし、そしてそのDNAを抽出し、293T細胞にトランスフェクションした。

30

【0156】

單一のAPRIL変異体およびCD34を発現するT細胞をそれぞれ2等分し、0.1μg RNDヒトBCMA-hFcまたはTACI-hFcキメラと個別にインキュベートした。その後、細胞を洗浄し、JacksonポリクローナルahFc Alexa flour 488およびBD aCD34 APCを用いて二次的に染色した。

【0157】

APRIL変異体を、この方法で、それぞれのバッチにおける対照として野生型APRILを用いてバッチでスクリーニングした。CD34陽性の事象を、図9に示される番号の4つのゲートに分割した。Alexa flour 488平均蛍光強度(MFI)を、それぞれのゲートについて計算し、多様なゲートのMFI間の平均グラディエントを、以下の式を使用して計算した：[(MFI.1 - MFI.2) + (MFI.2 - MFI.3) + (MFI.3 - MFI.4)] / 3。

40

【0158】

この方法において、平均MFIグラディエントを、それぞれのAPRIL変異体についてのBCMAおよびTACIへの結合について計算した。それぞれの変異体について、BCMAおよびTACI結合の平均MFIグラディエントを、関連するスクリーニングのバッチにおけるAPRIL野生型の対照に対する結合の比率に変換した。その後、野生型よりも高いBCMA:TACI結合比率を示す変異体を配列決定した。

【0159】

50

この結果は、図20に示され、重要な変異体の配列は、図21に示される。

【0160】

その後、グリシン置換の効果を標的残基について調べた。この結果は図22に示される。この結果は、APRIL_{WT}における残基S202、P201、M200、T175、V174、A125、H203、D205およびR206が、BCMAよりもTACIへの結合に比較的重要であることを示す。

【0161】

実施例19 APRIL CAR T細胞のインピボ機能の実証

インピボでのAPRIL CAR T細胞機能を実証するために、ヒト/マウスキメラモデルにおいてAPRIL CAR T細胞を試験した。MM1.s(ATCC CRL-2974)は、中間的なレベルのBCMAを発現するヒト骨髄腫細胞株である。本発明者らは、細胞株MM1.s.FL ucを得るために、この細胞株をホタルルシフェラーゼを発現するように改変した。

【0162】

NOD scid gamma(NSG: NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rgtm1Wjl / SzJ)マウスは、いくつかのヒト細胞株およびヒト末梢血リンパ球を移植することのできる、重度免疫不全マウスである。3ヶ月齢メスNSGマウスに、いずれの予備治療もなしに、尾静脈注射を介して 1×10^7 のMM1.s.FL uc細胞を与えた。移植は、一連の生物発光イメージングによって決定した(図23)。全てのマウスにおいて、強固であり、かつ増加する髄内移植が観察された。13日目に、 5×10^6 のAPRIL-HNG-CD28OXZ CAR T細胞を、尾静脈注射により投与した。一連の生物発光を行い、これは全ての処置されたマウスにおいて、MM1.s負荷量における急速な減少から完全な寛解を示した(図23)。このCAR治療への応答は、フローサイトメトリーおよび免疫組織化学によって確認した。

【0163】

実施例20 BiTE構成における多様なAPRIL変異体の機能の試験

4種の正常ドナーのPBMCを、WT APRILまたは多様な変異体のいずれかに基づく異なるBiTESの存在下で、SupT1細胞と、BCMAを発現するように改変したSupT1細胞と、TACIを発現するように改変したSupT1細胞と、または単独でインキュベートした。インターフェロンガンマレベルを24時間後に測定した。この結果は、図35に示される。変異体M200Gは、野生型よりも顕著に改善したBCMA対TACI特異性を示す。

【0164】

上記の明細書の中で言及されている全ての刊行物は、本明細書中に参照により援用される。記載された方法の種々の改変および変化、ならびに本発明のシステムは、本発明の範囲および主旨から逸脱することなく、当事者に明白であろう。本発明は具体的な好ましい実施形態に関連して記載したが、特許請求の範囲に記載の発明は、そのような具体的な実施形態に過度に限定されるべきでないことが理解されるべきである。実際に、記載された手法についての発明を遂行するための、分子生物学、細胞免疫学、または関連する分野の当事者にとって明らかな、本発明を実施するための記載された態様の種々の改変は、添付の特許請求の範囲内に含まれることが意図される。

【図1】

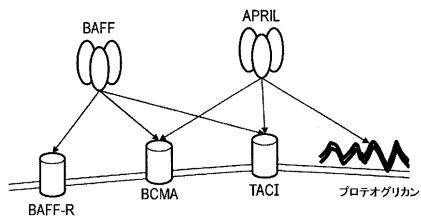


FIG. 1

【図2】

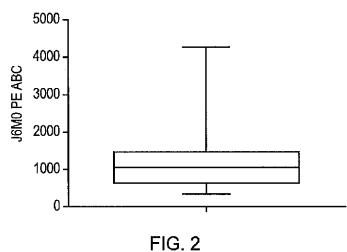


FIG. 2

【図3】

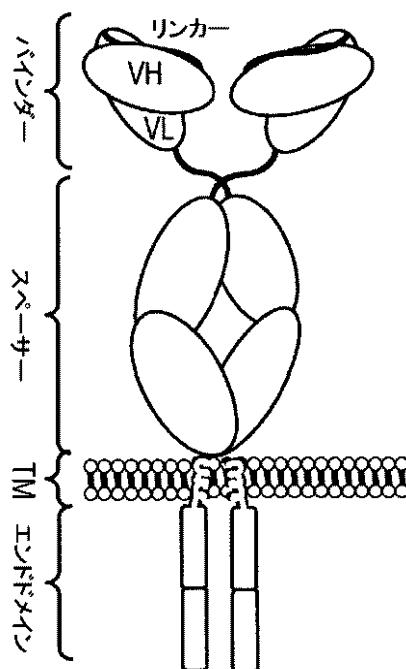


FIG. 3

【図4】

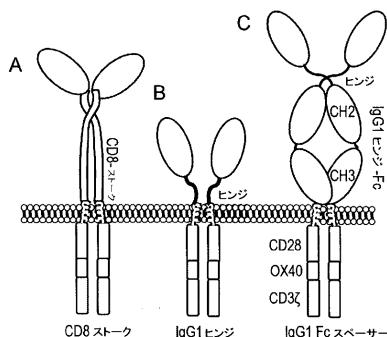


FIG. 4

【図5】

A

METDTLLLWVLLIWPGSTSVLHLVPINATSKDDSDNTBVWMPALRRGRGLQAGCVRQDAGVYLLYQ
VLFQDVTIFTMGQVWSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPRAYNSCYSAGVFLHMQGDILSVIIIPARAKLNLSPH
GTFLGFKLISGGSDPITTPARRPPPTAPIASQPLSLRPEACRPAAGGAVITRGLDFACDFWVLVUVGGV
ACYSLLVTVAFIITFWRSKRSRLLHSDDYMMTPRPRPGPTRKHYQPYAPPDFAAYRSRSDQRQLPPOAHKPPGG
SFRTPIQEQQADAHSTLAKIRVKFSSRASDAAAYQQGQNOLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGKPRRK
PQEGLYNEPLQOKOMA2AYSEIIGMKGERRRGKGDGLIYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

B

METDTLLLWVLLIWPGSTSVLHLVPINATSKDDSDNTBVWMPALRRGRGLQAGCVRQDAGVYLLYQ
VLFQDVTIFTMGQVWSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPRAYNSCYSAGVFLHMQGDILSVIIIPARAKLNLSPH
GTFLGFKLISGGSDPITPKSPDKTHCPCPKDPIWVLVUVGGVLLACYSLLVTVAFIITFWRSKRSRLLHS
DDYMMTPRPRPGPTRKHYQPYAPPDFAAYRSRSDQRQLPPOAHKPPGGSFRTPQIEEQADAHSTLAKIRVKFSSR
SADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGKPRRKPNQEGLYNEPLQDKMMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

C

METDTLLLWVLLIWPGSTSVLHLVPINATSKDDSDNTBVWMPALRRGRGLQAGCVRQDAGVYLLYQ
VLFQDVTIFTMGQVWSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPRAYNSCYSAGVFLHMQGDILSVIIIPARAKLNLSPH
GTFLGFKLISGGSDPITPKSPDKTHCPCPKDPIWVLVUVGGVLLACYSLLVTVAFIITFWRSKRSRLLHS
DDYMMTPRPRPGPTRKHYQPYAPPDFAAYRSRSDQRQLPPOAHKPPGGSFRTPQIEEQADAHSTLAKIRVKFSSR
SADAPAYQQGQNQLYNELNLRREEYDVLKRRGRDPEMGKPRRKPNQEGLYNEPLQDKMMAEAYSEIGMKGE
RRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

シグナルペプチド	効果的なシグナルペプチド
APRIL	短縮型APRIL
spacer	ヒトIgG1ヒンジCH2CH3、ヒトCD8αストーク およびヒトIgG1ヒンジのいずれか
混成遺伝子ドメイン	CD28膜貫通ドメイン、CD28エンドドメインおよびOX40 およびCD3セータードメインから構成される混成ドメイン

FIG. 5

【図 6 A B】

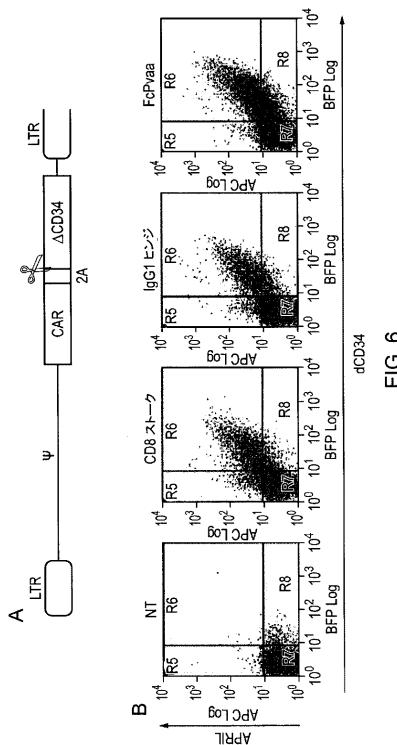


FIG. 6

【図 6 C】

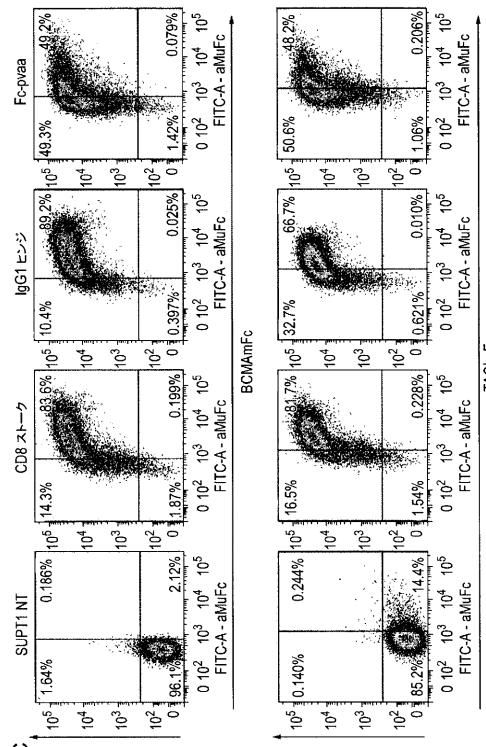


FIG. 6 (続き)

【図 7】

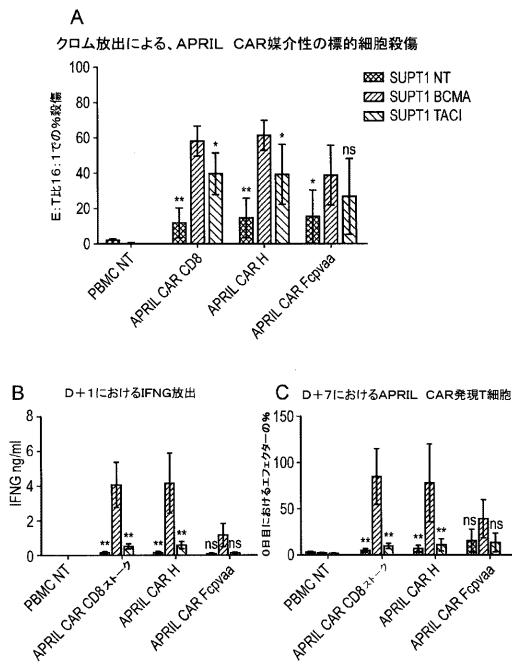


FIG. 7

【図 8】

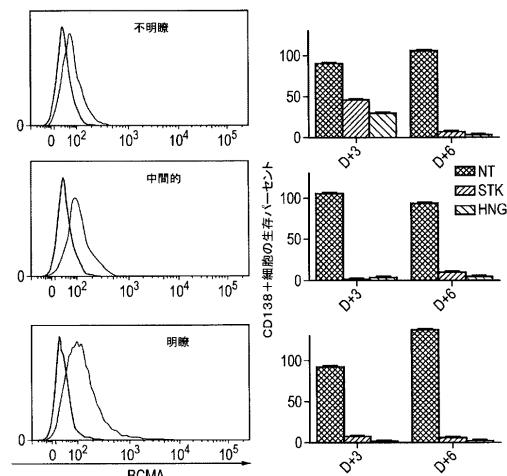


FIG. 8

【 义 9 】

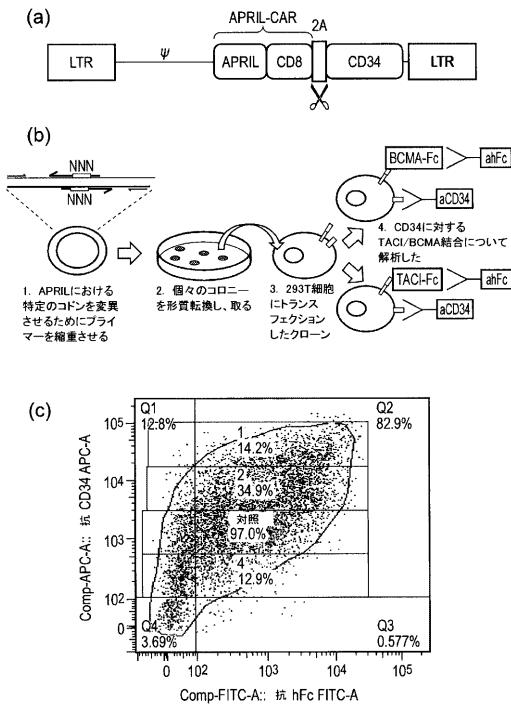


FIG. 9

【図10】

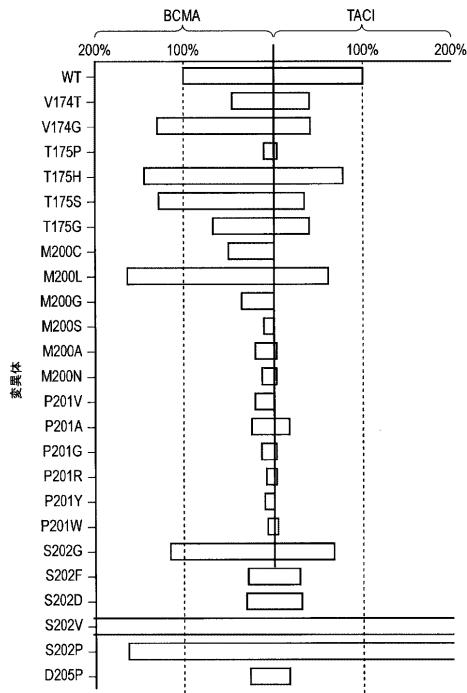


FIG. 10

【 1 1 】

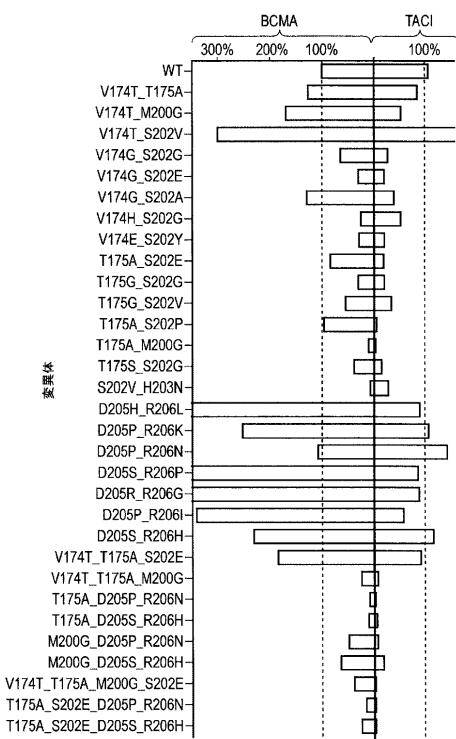


FIG. 11

【 义 1 2 A 】

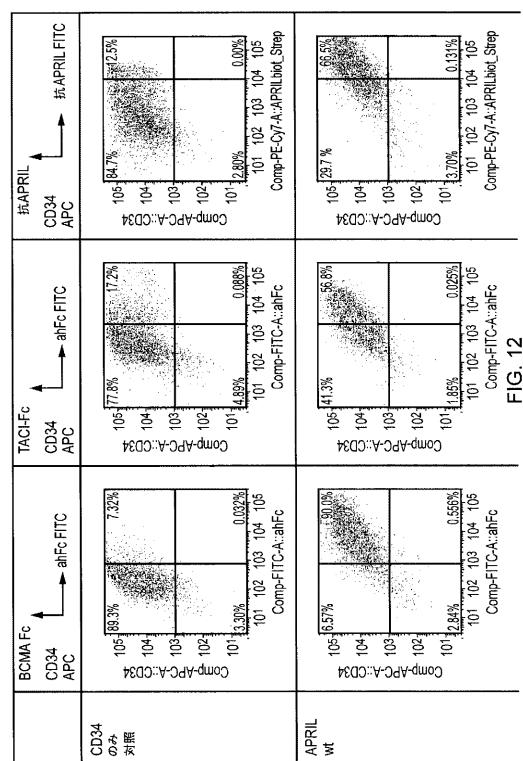


FIG.

【図 12 B】

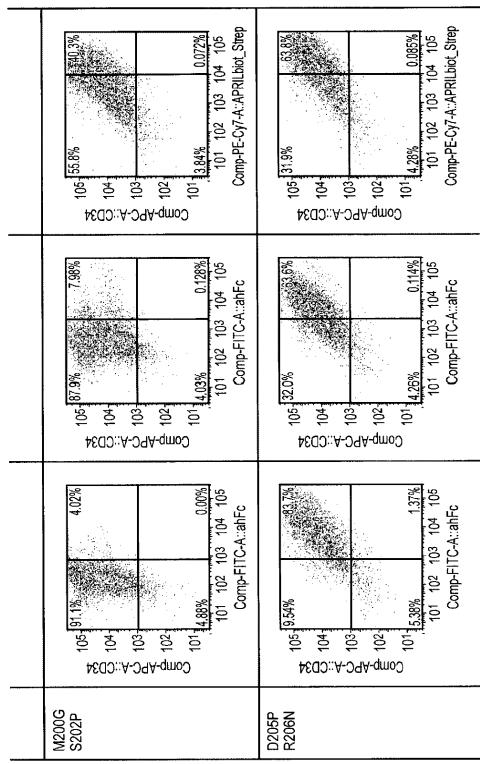


FIG. 12 (練毛)

【図 12 C】

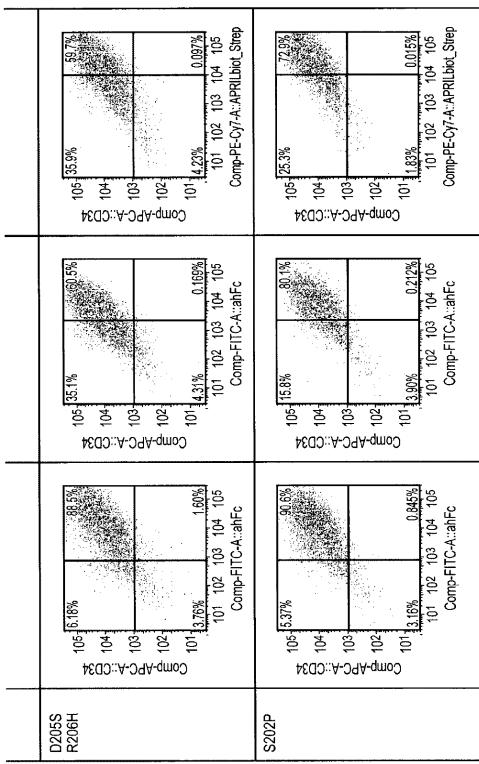


FIG. 12 (練毛)

【図 12 D】

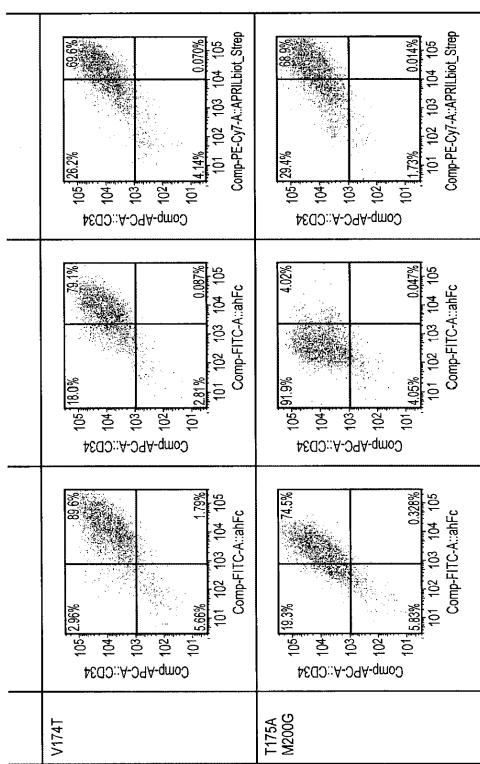


FIG. 12 (緩毛)

【図 12 E】

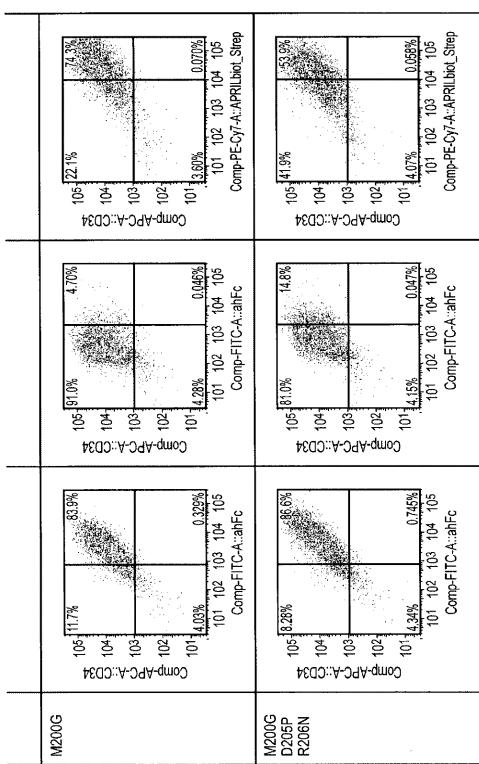


FIG. 12 (緩毛)

【図 12 F】

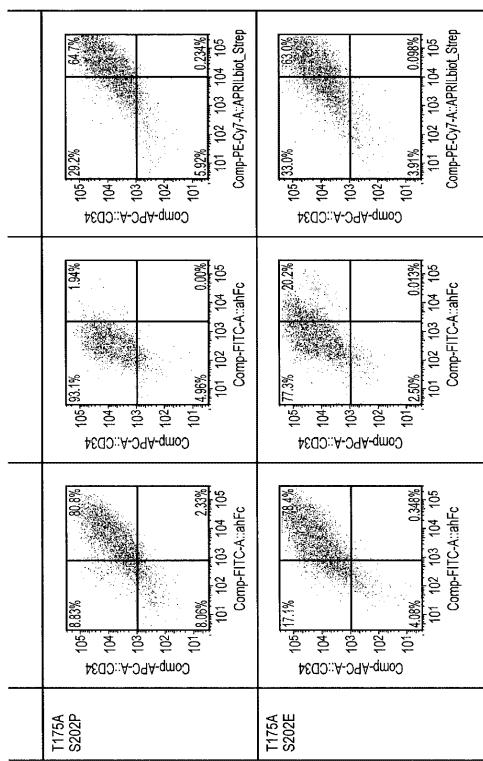


FIG. 12 (繰き)

【図 13】

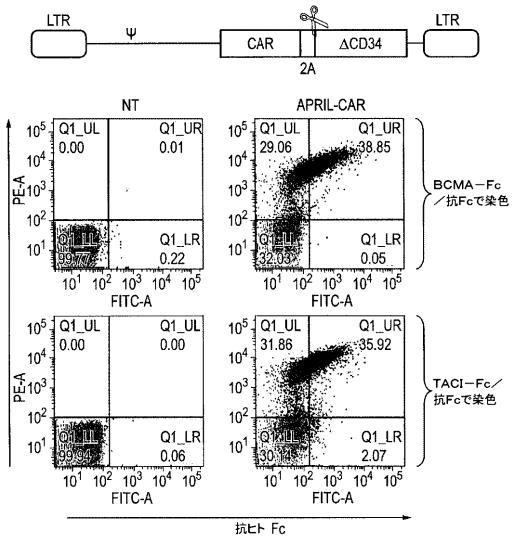


FIG. 13

【図 14】

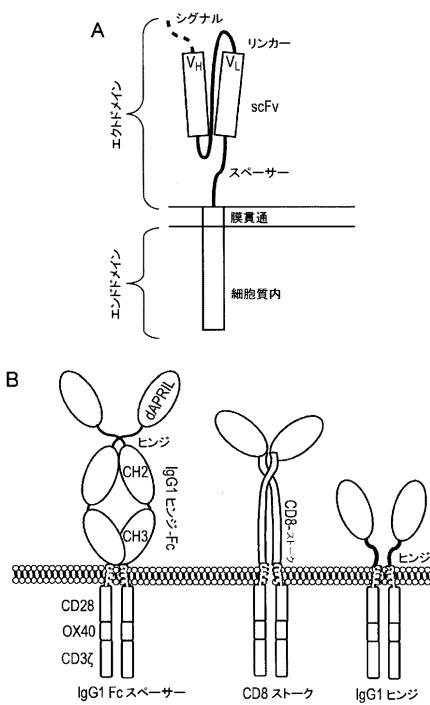


FIG. 14

【図 15】

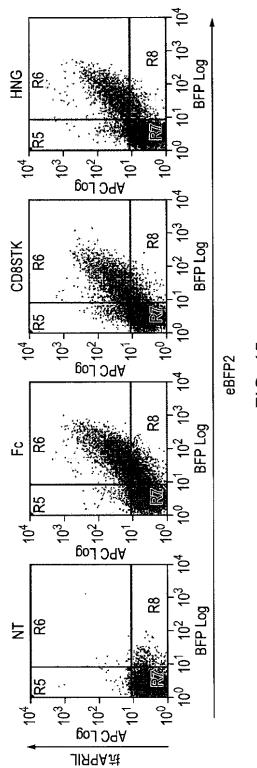


FIG. 15

【図16】

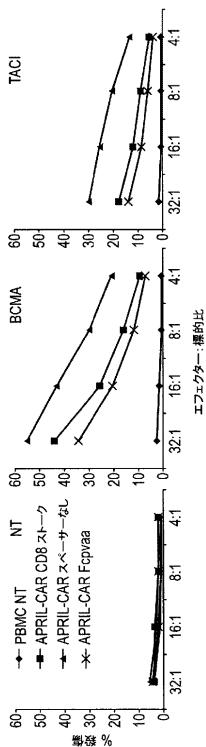


FIG. 16

【図17】

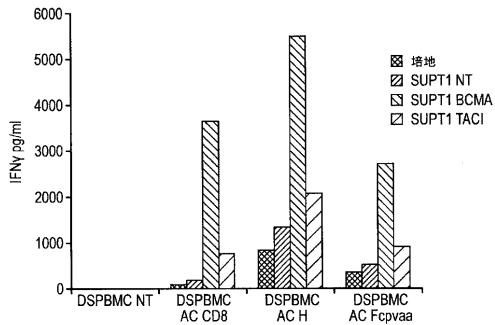


FIG. 17

【図18】

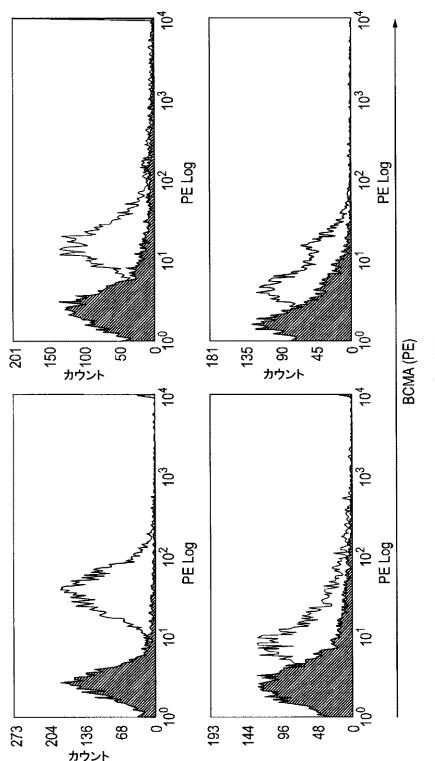
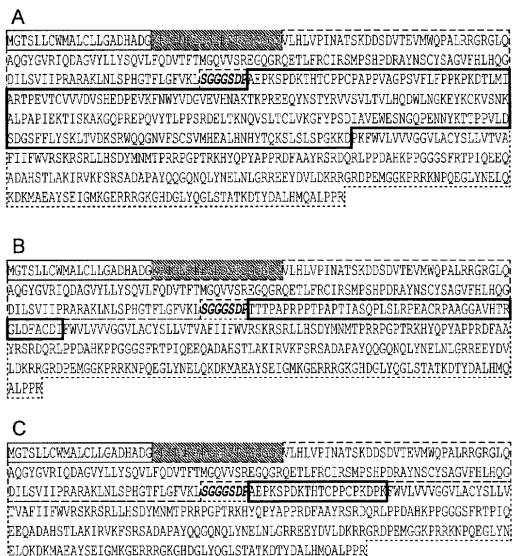


FIG. 18

【図19】



■シグナルペプチド
■シグネーリングカ
■CD40
■CD28
■CD28真通ドメイン、CD28エンドドメインおよびFOX40
およびCD3ゼータエンドドメインから構成される混成エンドドメイン

FIG. 19

【図 20 A】

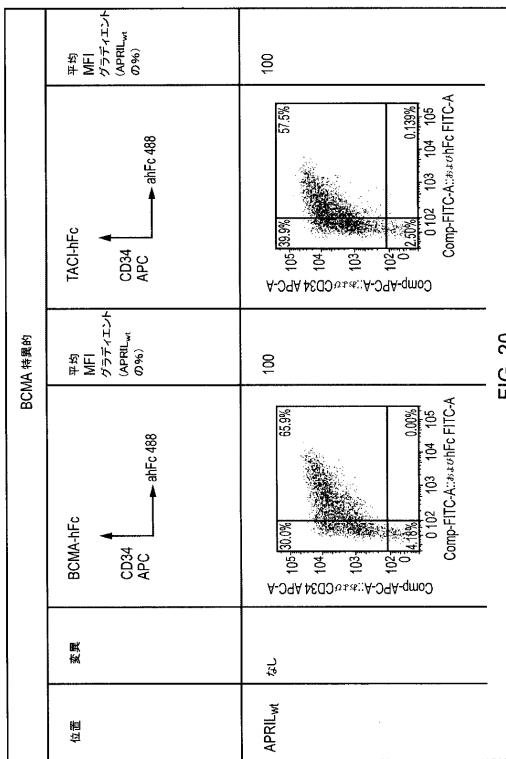


FIG. 20

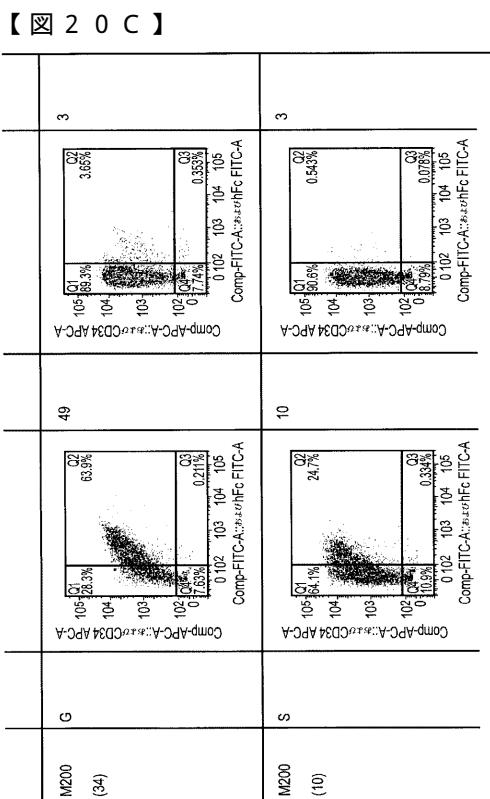


FIG. 20 (続き)

【図 20 B】

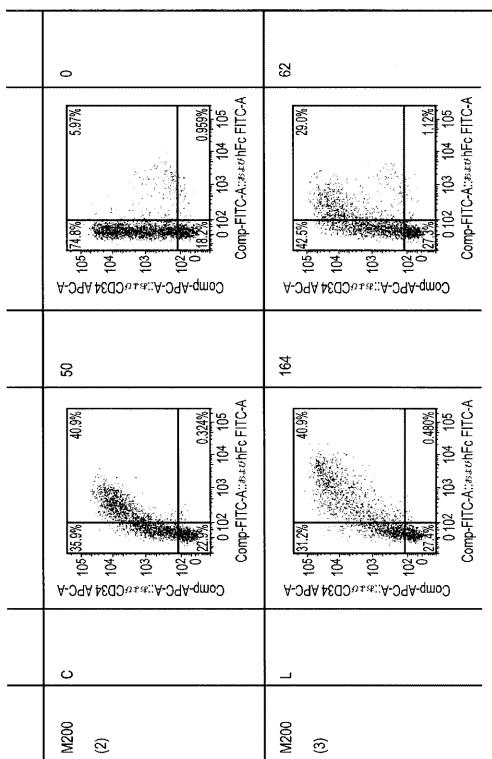


FIG. 20 (続き)

【図 20 D】

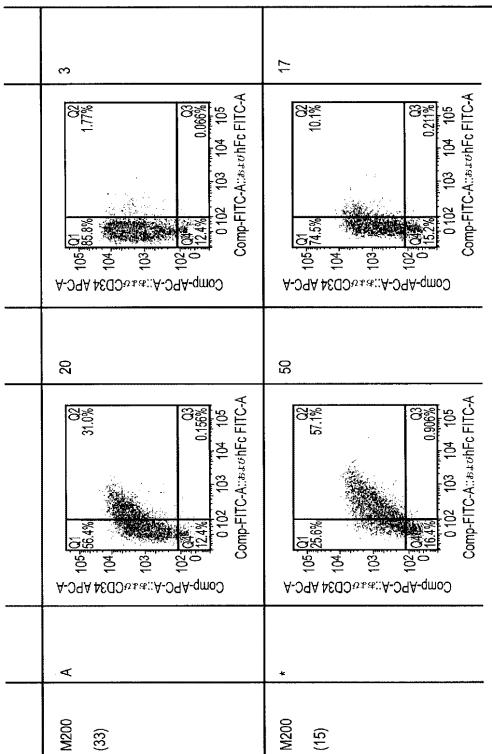


FIG. 20 (続き)

【図 20 E】

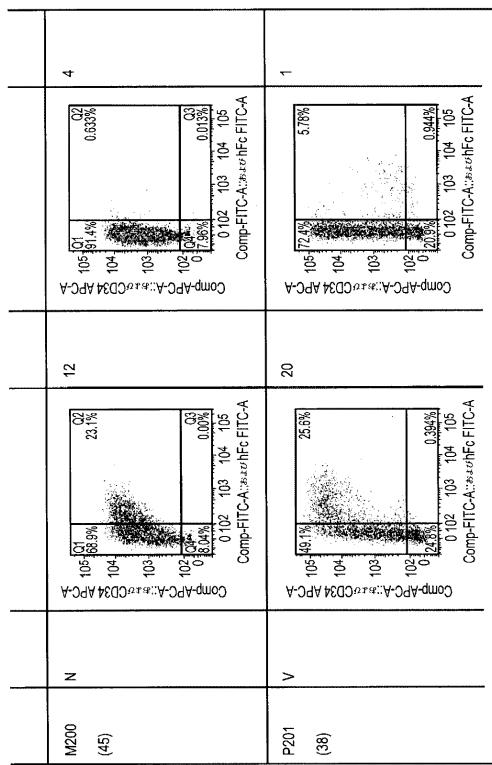


FIG. 20 (続き)

【図 20 F】

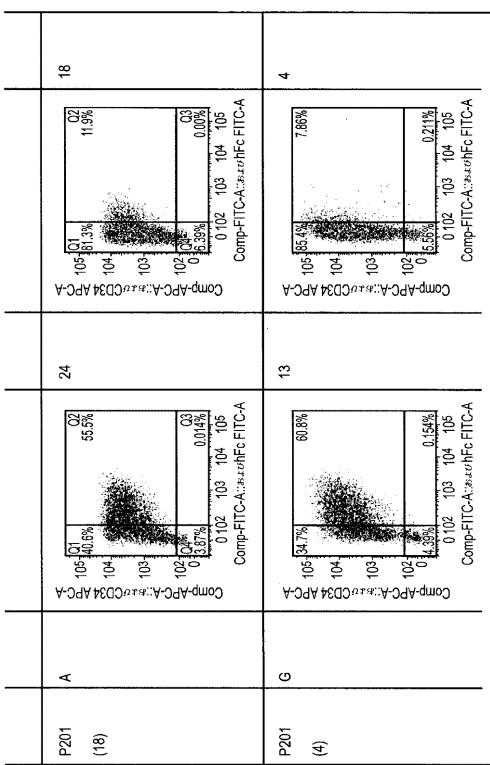


FIG. 20 (続き)

【図 20 G】

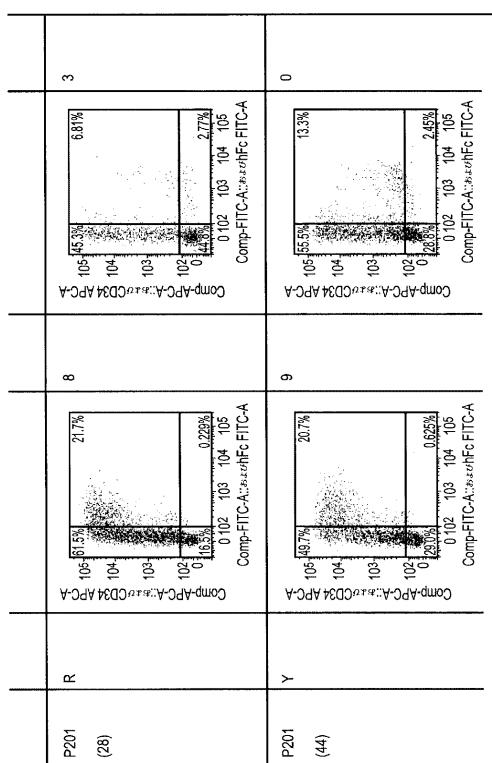


FIG. 20 (続き)

【図 20 H】

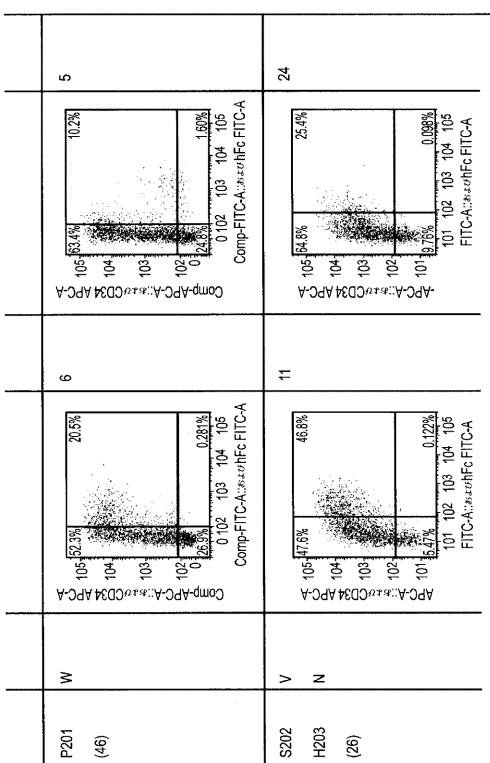


FIG. 20 (続き)

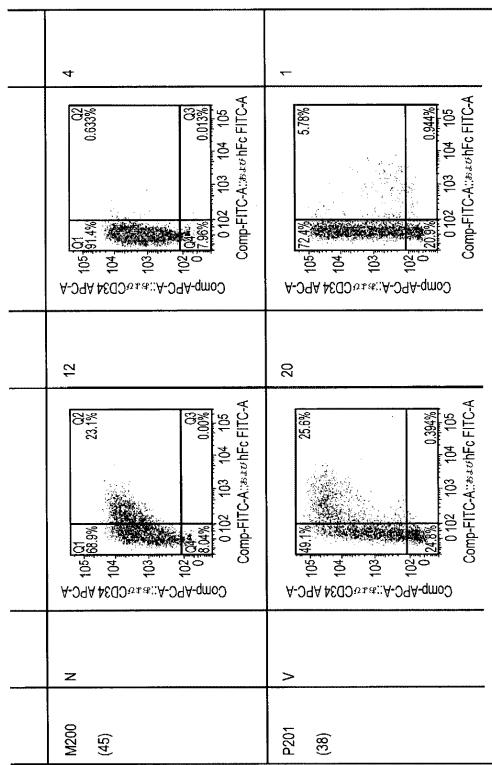


FIG. 20 (続き)

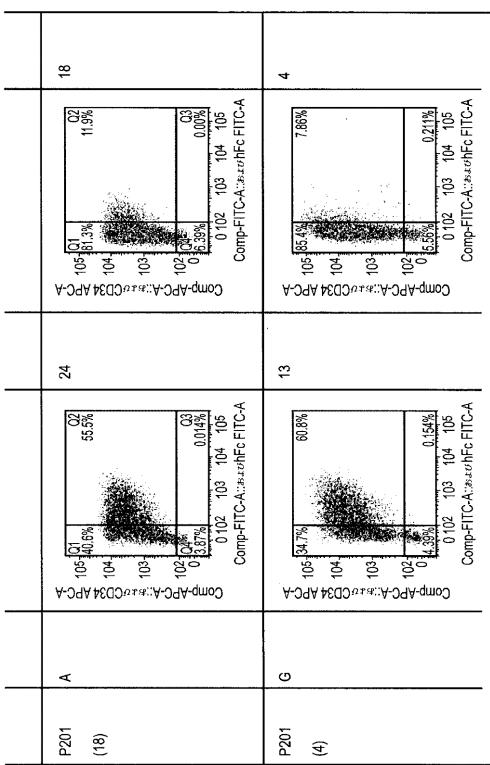


FIG. 20 (続き)

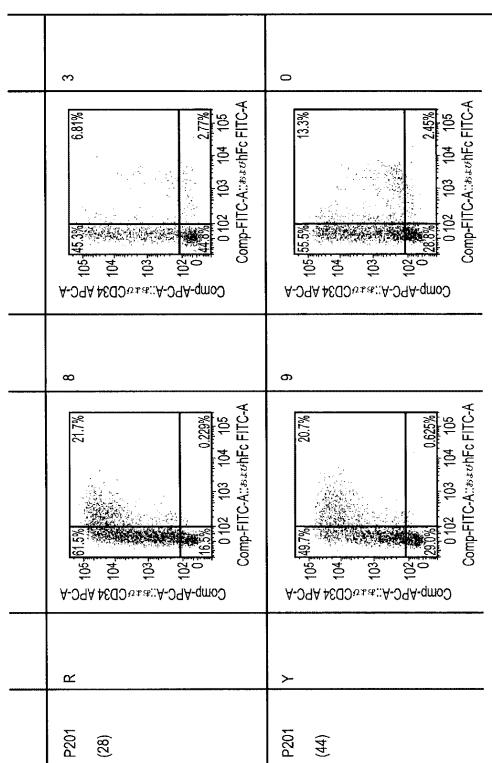


FIG. 20 (続き)

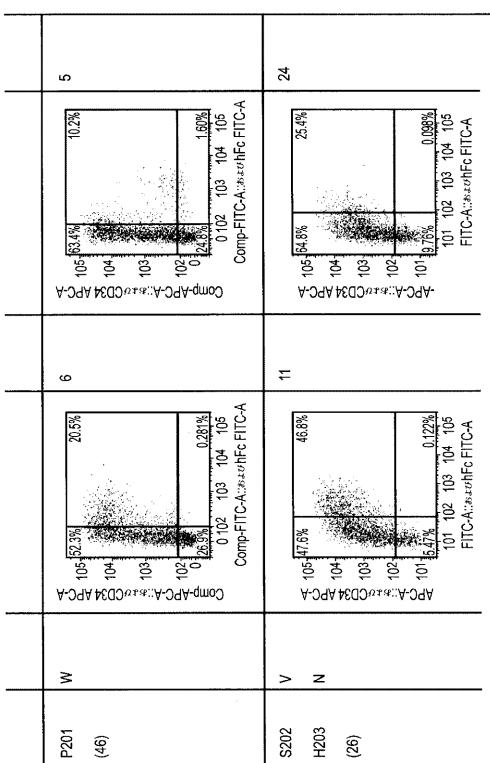


FIG. 20 (続き)

【図201】

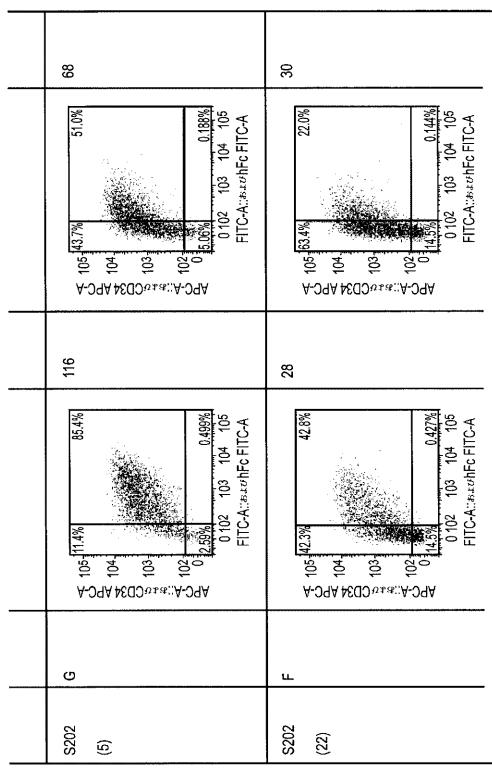


FIG. 20 (続言)

【図20K】

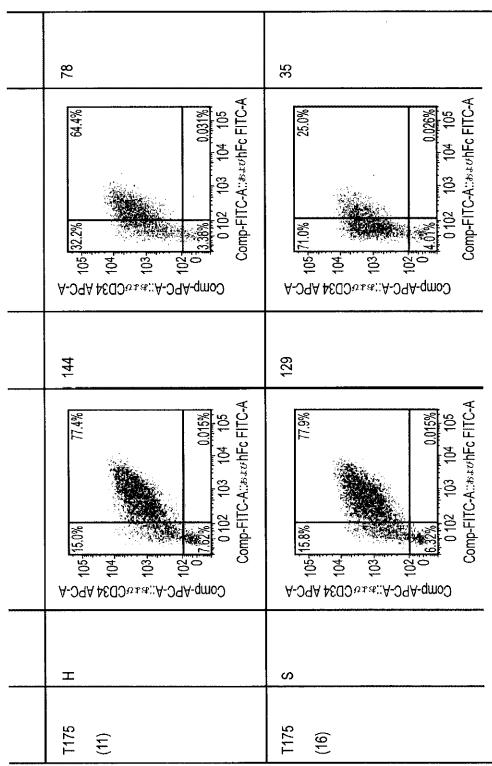


FIG. 20 (続き)

【 図 2 0 】

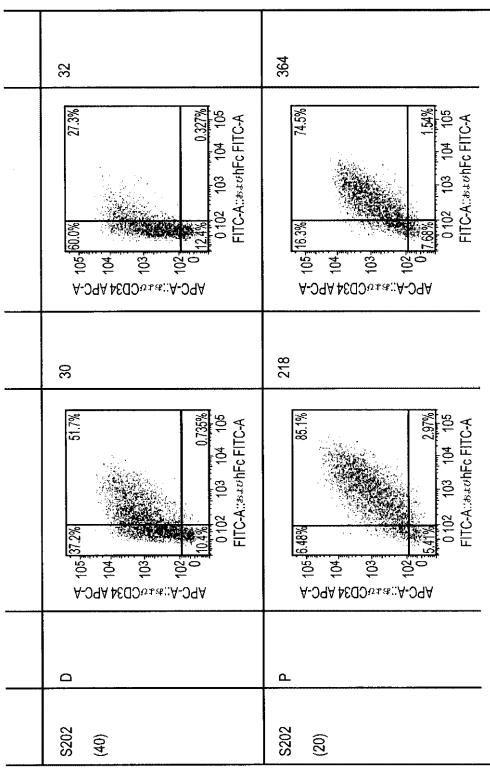


FIG. 20 (続き)

【図20L】

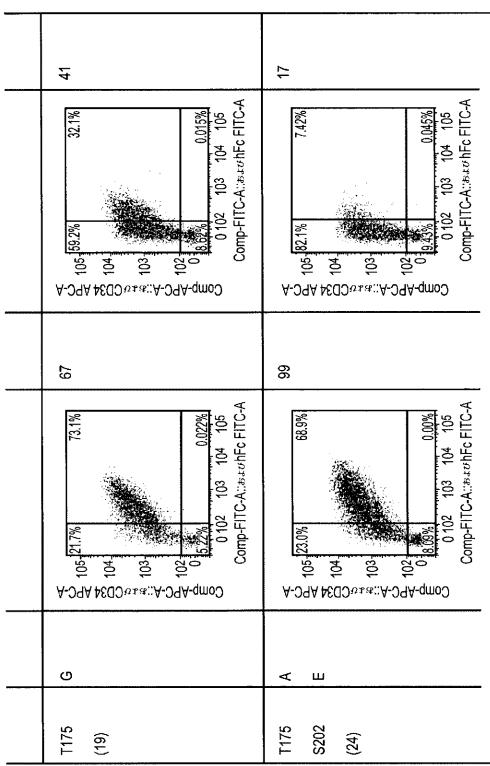


FIG. 20 (続き)

【図 20 M】

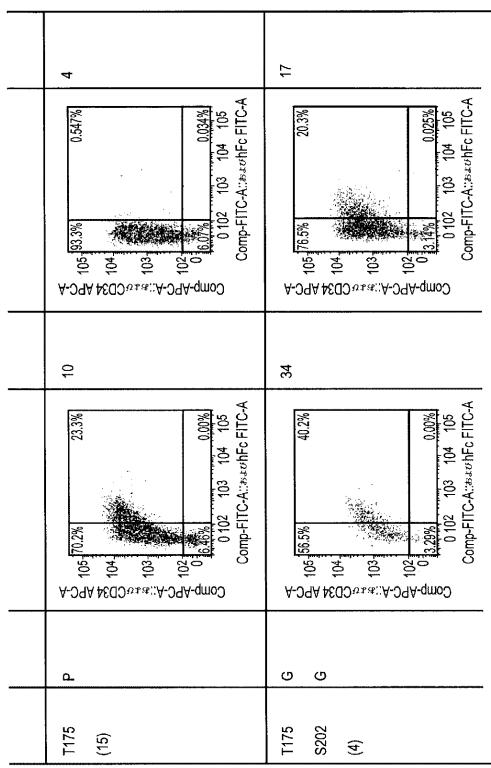


FIG. 20 (続き)

【図 20 N】

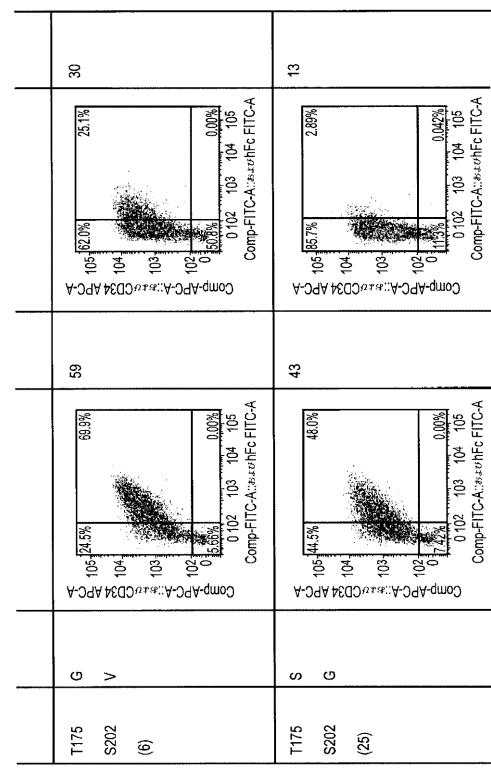


FIG. 20 (続き)

【図 20 O】

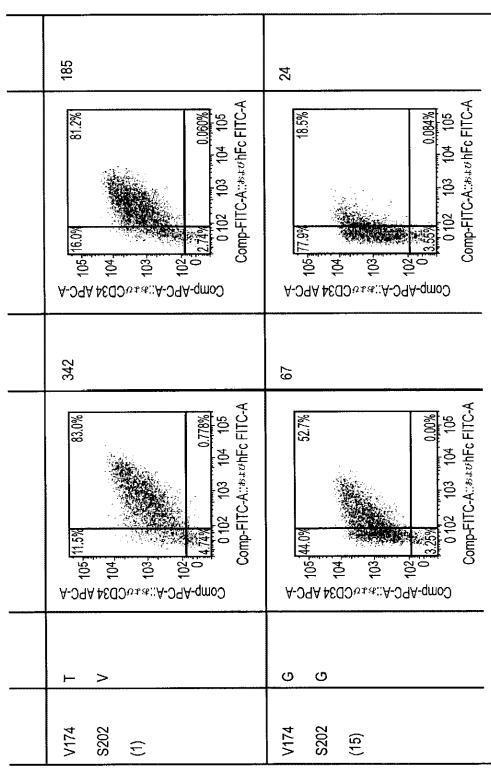


FIG. 20 (続き)

【図 20 P】

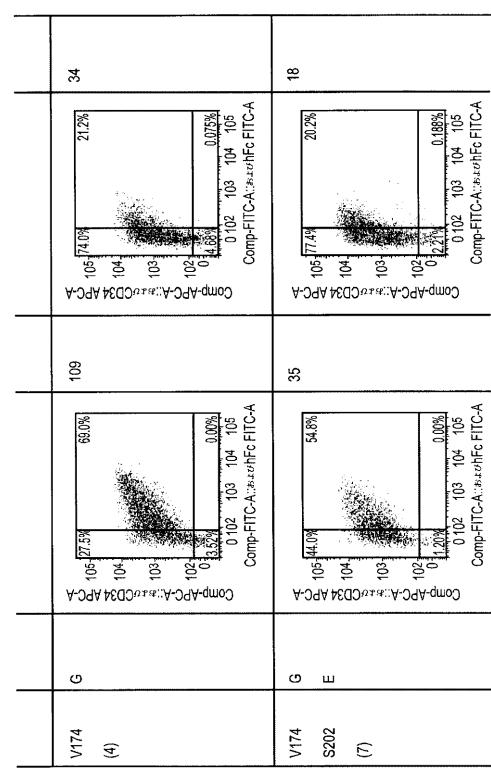
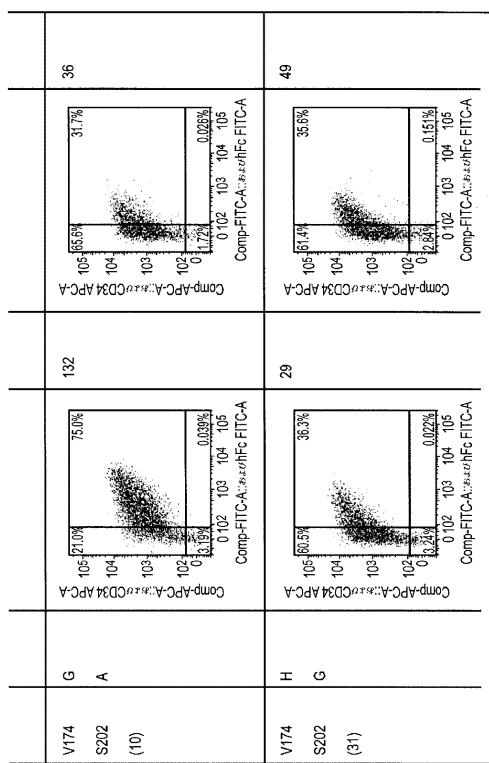
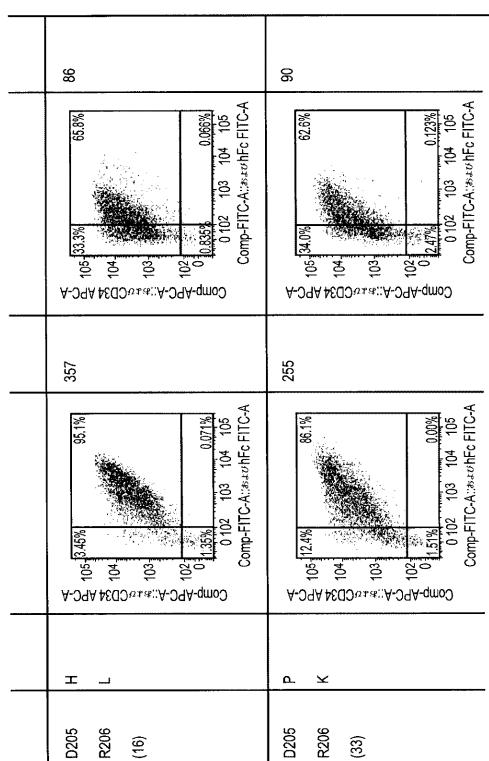


FIG. 20 (続き)

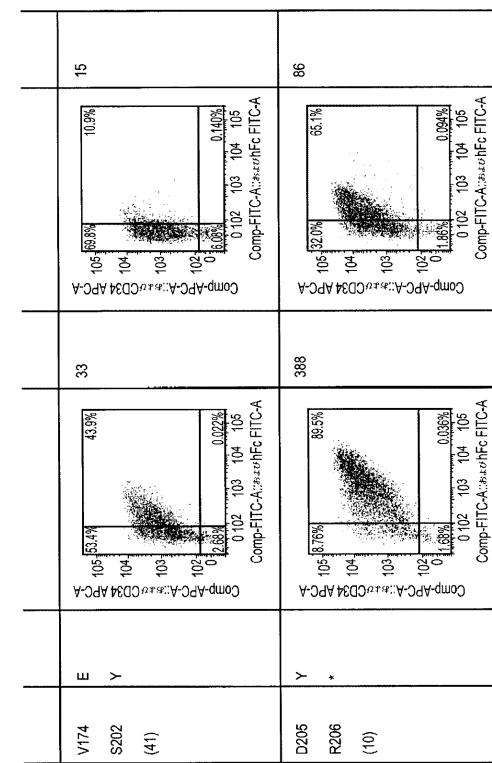
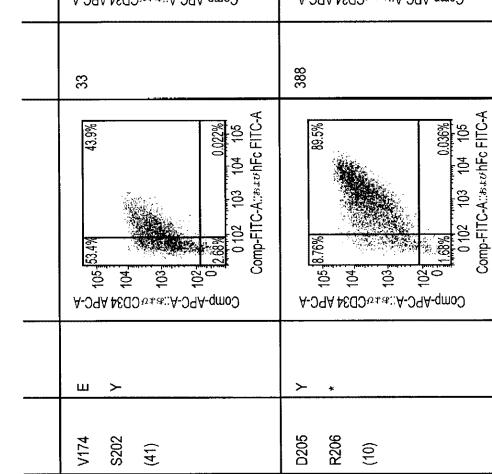
【図 20 Q】

V174 (G)
S202 (A)

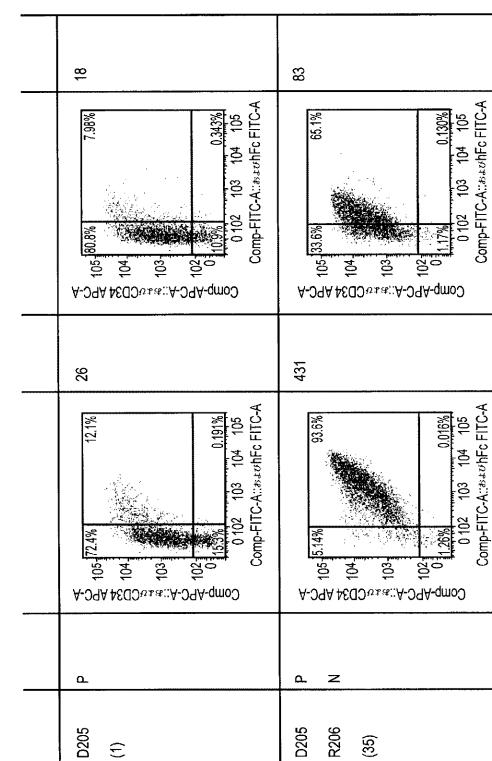
【図 20 S】

D205 (H)
R206 (L)D205 (P)
R206 (33)

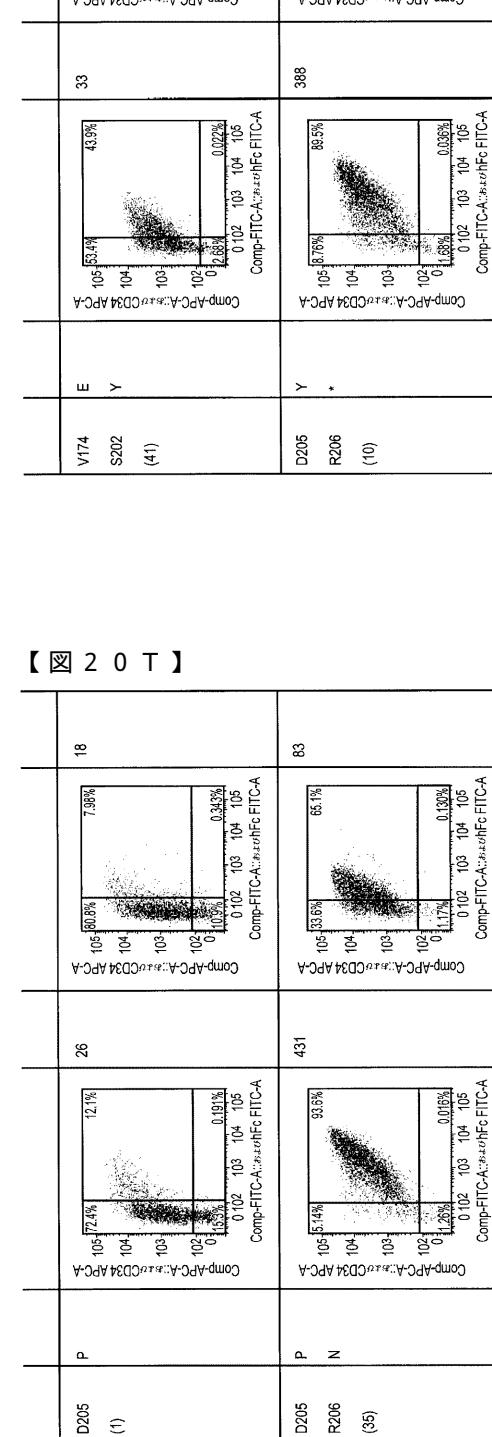
【図 20 R】

V174 (H)
S202 (G)D205 (Y)
R206 (41)

【図 20 T】



D205 (18)



D205 (83)

R206 (10)

【図20U】

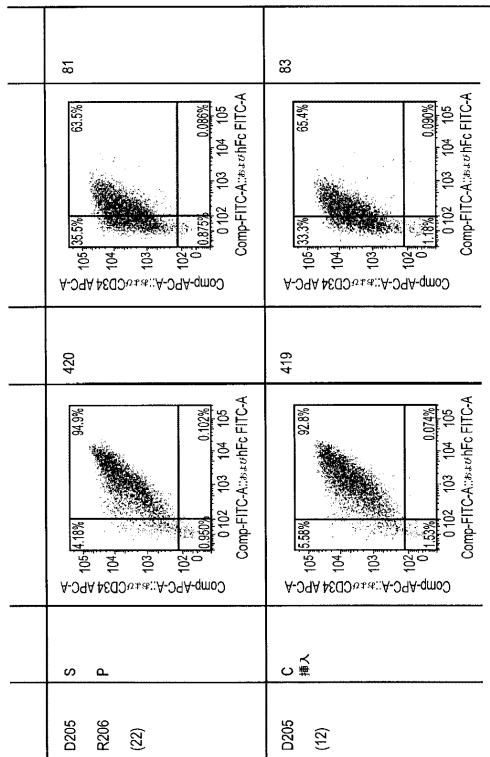


FIG. 20 (練き)

【図20V】

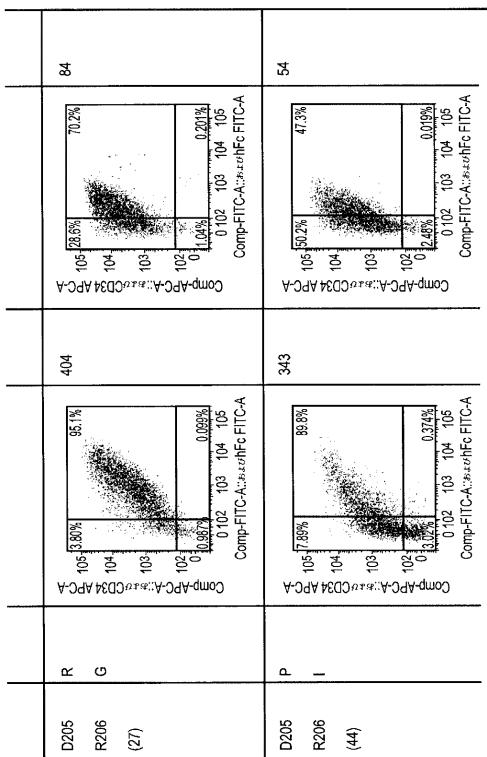


FIG. 20 (続き)

【图20W】

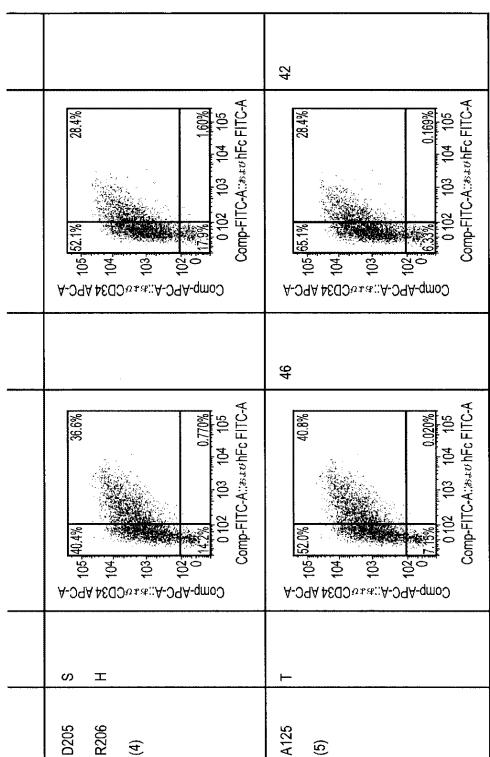


FIG. 20 (練き)

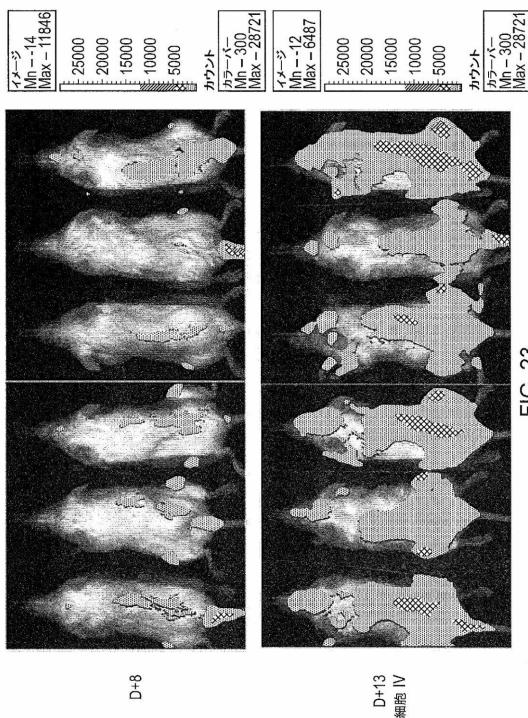
【 図 2 1 】

FIG. 21

【図21B】

FIG. 21 (続き)

【図23A】



【 図 2 2 】

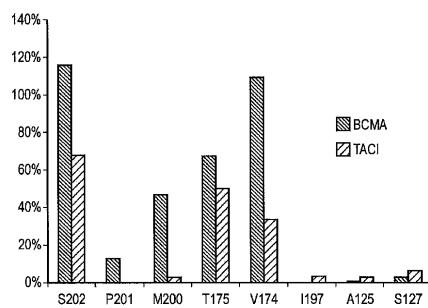


FIG. 22

【図23B】

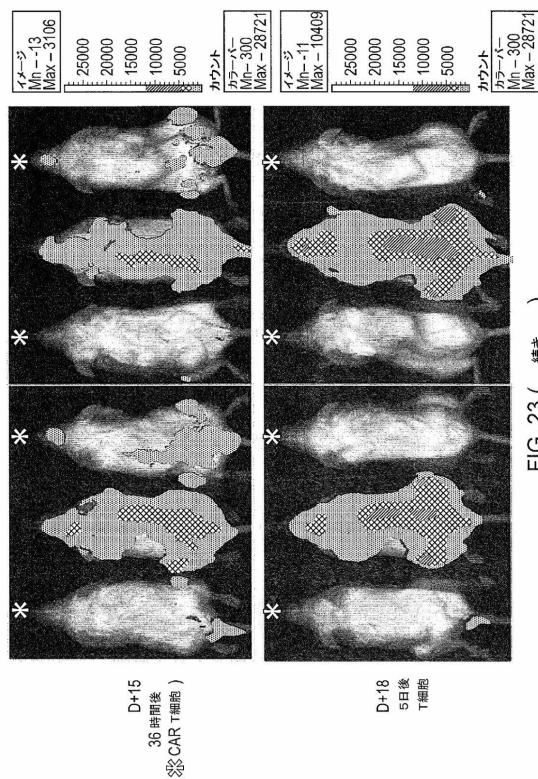


FIG. 23 (続き)

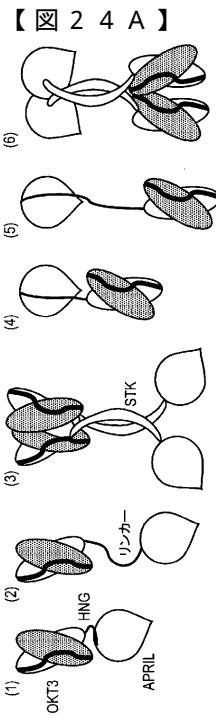


FIG. 24A

【図 24B】

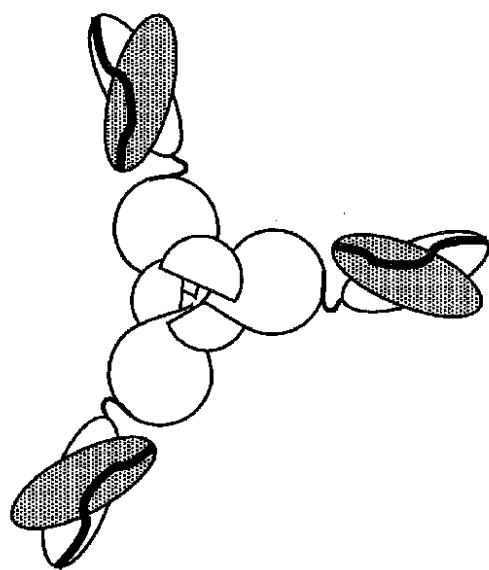


FIG. 24B

【図 25】

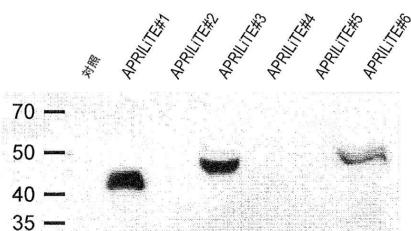
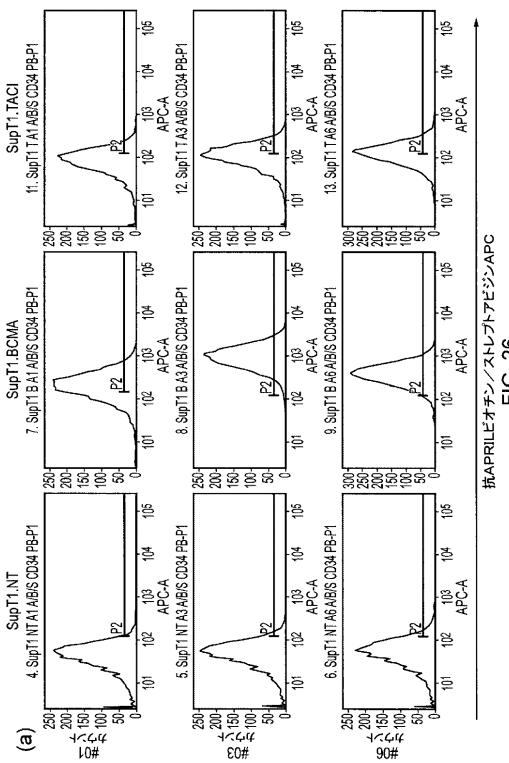


FIG. 25

【図 26A】



抗APRILビオチン/ストレプトアビシン-APC

FIG. 26

【図26B】

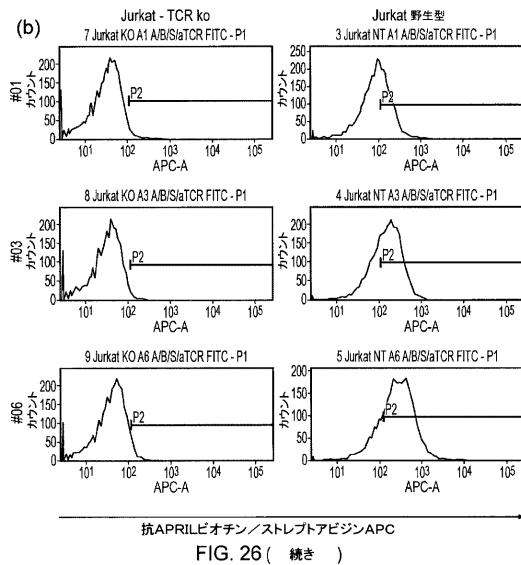


FIG. 26(続き)

【図27】

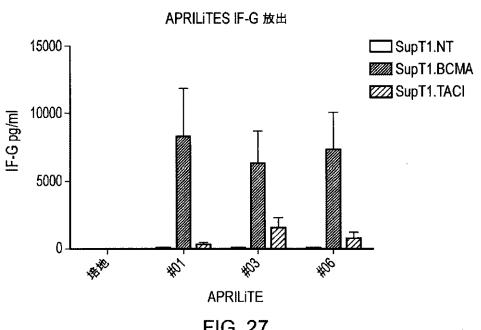


FIG. 27

【図28】

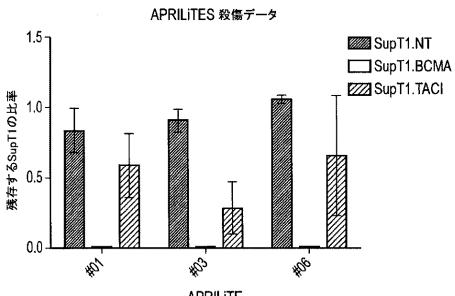


FIG. 28

【図29】

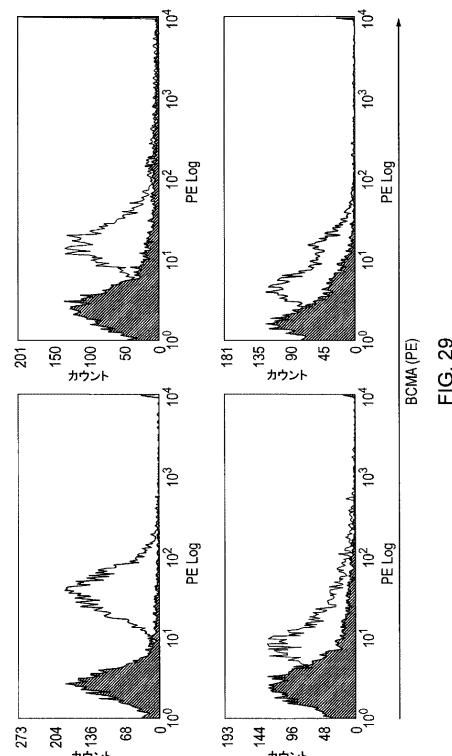


FIG. 29

【図30】

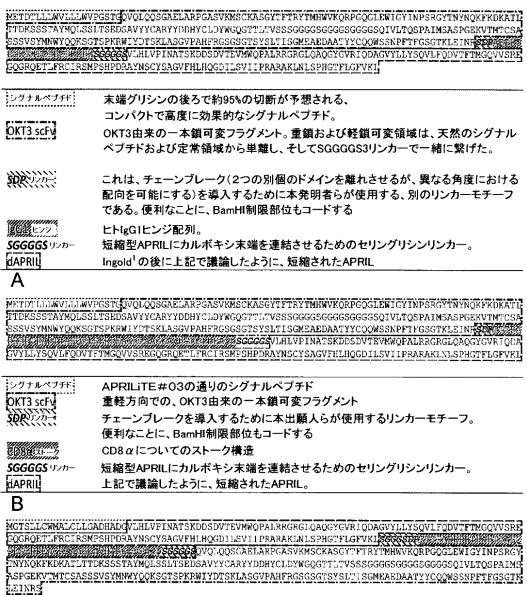
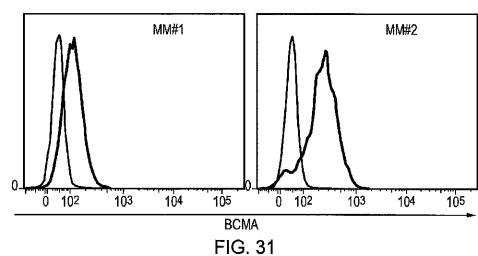


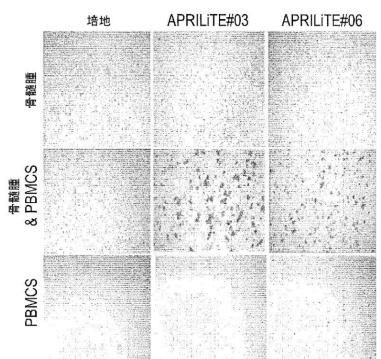
FIG. 30

C

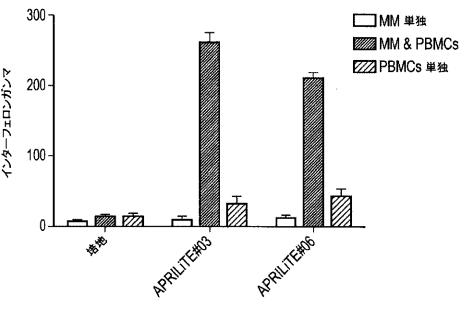
【図 3 1】



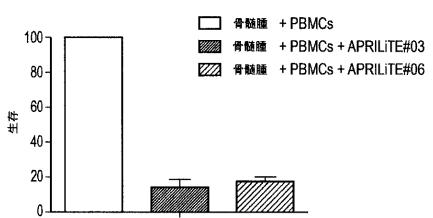
【図 3 2】



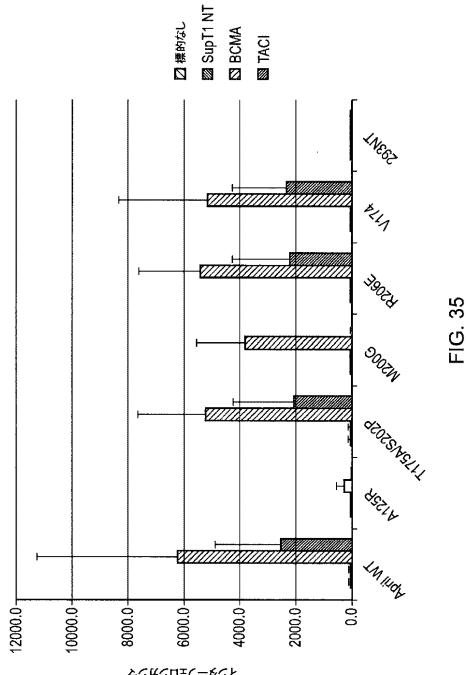
【図 3 3】



【図 3 4】



【図 3 5】



【配列表】

0006556156000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I		
C 1 2 N	15/62	(2006.01)	C 1 2 N	15/62
C 1 2 N	15/63	(2006.01)	C 1 2 N	15/63
C 1 2 N	1/15	(2006.01)	C 1 2 N	1/15
C 1 2 N	1/19	(2006.01)	C 1 2 N	1/19
C 1 2 N	1/21	(2006.01)	C 1 2 N	1/21
C 1 2 N	5/10	(2006.01)	C 1 2 N	5/10
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02
A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00
A 6 1 P	7/00	(2006.01)	A 6 1 P	7/00
A 6 1 K	35/12	(2015.01)	A 6 1 K	35/12
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17
A 6 1 K	49/00	(2006.01)	A 6 1 K	49/00

(31)優先権主張番号 1409759.6

(32)優先日 平成26年6月2日(2014.6.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(31)優先権主張番号 1409761.2

(32)優先日 平成26年6月2日(2014.6.2)

(33)優先権主張国・地域又は機関

英国(GB)

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ブーレ, マーティン

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 ヨン, クエ

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 リー, リディア

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 チャブリン, ニール

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

(72)発明者 ドレイパー, ベン

イギリス国 ダブリュー1ティー 4ティーピー ロンドン, トッテナム コート ロード 9
7, ザ ネットワーク ビルディング, ユーシーエル ビジネス ピーエルシー 気付

審査官 鈴木 優志

(56)参考文献 米国特許出願公開第2005/0003480(US, A1)

米国特許出願公開第2006/0014248(US, A1)

米国特許出願公開第2013/0156770(US, A1)

松下貴史ら, 日本臨床免疫学会会誌, 2005年, Vol.28, No.5, p.333-342

Kimberley FC et al., The Journal of Biological Chemistry, 2012年, Vol.287, No.44,

p.37434-37446

Carpenter RO et al. , Clinical Cancer Research , 2013年 , Vol.19, No.8 , p.2048-2060

(58)調査した分野(Int.Cl. , DB名)

C 12 N 15 / 00 ~ 15 / 90

C 07 K 1 / 00 ~ 19 / 00

JST Plus / JMED Plus / JST7580 (JDream III)

Caplus / DWPI / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS (STN)

UniProt / GeneSeq