

(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 I

C O 7 K 14/525 (2006.01)

C O 7 K 14/525 Z N A

C O 7 K 14/705 (2006.01)

C O 7 K 14/705

C O 7 K 19/00 (2006.01)

C O 7 K 19/00

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 N 15/28 (2006.01)

C 1 2 N 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)
 (86) (22) 出願日 平成27年2月26日 (2015.2.26)
 (65) 公表番号 特表2017-514787 (P2017-514787A)
 (43) 公表日 平成29年6月8日 (2017.6.8)
 (86) 国際出願番号 PCT/GB2015/050557
 (87) 国際公開番号 W02015/128653
 (87) 国際公開日 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
 英国 (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
 英国 (GB)

(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
 ービー ロンドン, トットナム コート
 ロード 97, ザ ネットワーク ビ
 ルディング
 (74) 代理人 100078282
 弁理士 山本 秀策
 (74) 代理人 100113413
 弁理士 森下 夏樹
 (74) 代理人 100181674
 弁理士 飯田 貴敏
 (74) 代理人 100181641
 弁理士 石川 大輔

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 A P R I Lバリエント

(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、バリエ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に記載のバリエント A P R I L。

【請求項3】

変異 M 2 0 0 G を含む、請求項1に記載のバリエ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エント 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エーション A P R I L 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エーション A P R I L、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。

【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。

【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エーション A P R I L 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】

インビボ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エーション A P R I L を含む、組成物。

【請求項 15】

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エーション A P R I L 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ン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。

【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、バリエーション増殖誘導リガンド (APRIL) に関する。そのようなバリエーション A P R I L を含む治療薬剤は、多発性骨髄腫

10

20

30

40

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

多発性骨髄腫

多発性骨髄腫（骨髄腫）は、形質細胞の骨髄悪性腫瘍である。異常な形質細胞の集団が骨髄に凝集し、そこでそれらは正常な血液細胞の産生を妨げる。骨髄腫は、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、腎臓そして骨髄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、骨髄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、大部分が骨髄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、骨髄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、および骨髄形質細胞では明瞭に発現される。BCMAは、初代骨髄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、これは多発性骨髄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。多発性骨髄腫細胞は、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、骨髄腫細胞上の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、特に多発性骨髄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。

10

【0011】

そのため、本発明の第一の態様において、バリエーション増殖誘導リガンド(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での変異を含む: A125、V174、T175、M200、P201、S202、H203、D205およびR206。

20

【0012】

バリエーション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】

バリエーション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。

30

【0014】

バリエーション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

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
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。

10

【 0 0 1 5 】

本発明はまた、M 2 0 0 G 変異を含むバリエーション増殖誘導リガンド (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づれかにしたがるバリエーション 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るバリエーション 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るバリエーション A P R I L、またはそのようなバリエーション 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る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るバリエーション 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る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るバリエーション A P R I L、そのようなバリエーション 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る核酸または本発明の第三の態様にしたがるベクターを含む、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る治療薬剤を、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る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る治療

50

薬剤の使用もまた提供される。

【 0 0 2 6 】

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ーション 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。

【 0 0 2 7 】

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。

【 0 0 2 8 】

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ビ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。

【 0 0 2 9 】

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ビ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。

【 0 0 3 0 】

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。

【 0 0 3 1 】

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ン性免疫グロブリン血症およびくすり型多発性骨髄腫から選択され得る。

【 0 0 3 2 】

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、バリエーション増殖誘導リガンド (A P R I L) 。

(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 に記載のバリエーション A P R I L 。

(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 に記載のバリエーション A P R I L 。

(項目 4)

以下の変異の組み合わせ :

10

20

30

40

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 に記載のバリエーション A P R I L。

10

20

(項目 5)

変異 M 2 0 0 G を含む、バリエーション増殖誘導リガンド (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エーション A P R I L を含む、キメラ抗原受容体。

30

(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エーション 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エーション 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。

40

(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)

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エーション 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)

インビボ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エーション 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エーション 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 鎖病、意義不明の単クローン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 Q u a n t i 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。エクドメインは抗原を認識する。これは、スパ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けらるように、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が全て同等に発現したが、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 ストックおよびヒンジの 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 ストック 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 ストック 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

F c のいずれかとインキュベートし、そして抗 C D 3 4 および抗ヒト F c P E の両方、ならびに F I T C を付与した m A b 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 C D 3 4 に関する B C M A および T A C I の結合の典型的なパターンを示す。

【図 1 4】古典的な C A R を説明する模式図 B : 生成された異なる A P R I L に基づく C A R のデザイン。 シグナルペプチドを短縮型 A P R I L アミノ末端に接続した。これを異なるスペーサー : F c 受容体結合を減少させるために、H o m b a c h ら (2 0 1 0 G e n e T h e r . 1 7 : 1 2 0 6 - 1 2 1 3) によって記載された p v a a 変異を用いて修飾されたヒト I g G 1 のヒンジ、C H 2 および C H 3 ドメイン ; ヒト C D 8 のストーク ; ならびに I g G 1 のヒンジのいずれかに融合した。これらスペーサーを、C D 2 8 膜貫通ドメイン、O X 4 0 エンドドメイン、および C D 3 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。

10

【図 1 5】異なる C A R の発現 受容体を、I R E S 配列を使用して高感度青色蛍光タンパク質 2 (e B F P 2) と共発現させた。初代ヒト T 細胞に形質導入し、抗 A P R I L - ビオチン / ストレプトアビジン A P C によって染色した。フローサイトメトリー解析を行った。e B F P 2 シグナルは、A P R I L 検出に対して示される。3 つの C A R 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 1 6】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 (N T) か、または異なるスペーサーの C A R 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 (N T) か、または B C M A もしくは T A C I を発現するように形質導入したかのいずれかの S u p T 1 細胞を使用。T 細胞は、N K 活性を減少させるために C D 5 6 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 7 A に示される。B C M A および T A C I 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。

20

【図 1 7】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、E L I S A によって計測した。C D 8 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 7 B に示される。

30

【図 1 8】初代骨髓腫上の B C M A 発現の例 ラット抗ヒト B C M A m A b V i c k y 1 によって染色した、骨髓腫サンプルの 4 例を示す。第一のパネルは、形質細胞性白血病 (骨髓腫の異常であり、進行した、かつ侵襲性の形態) の患者における、明瞭な B C M A 染色を示す。他 3 症例は、医学的かつ形態的に典型的な骨髓腫である。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 B C M A 発現データの例である。

【図 1 9】V 5 エピトープタグを有する A P R I L - C A R のアミノ酸配列。 A : d A P R I L - H C H 2 C H 3 p v a a - C D 2 8 O X Z B : d A P R I L - C D 8 S T K - C D 2 8 O X Z C : d A P R I L - H N G - C D 2 8 O X Z 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 V 5 タグを有さない点で、図 5 における配列とは異なる。

40

【図 2 0 A】B C M A 特異的 A P R I L 変異体のスクリーニングの要約 B C M A - F c および T A C I - F c 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 A P R I L と比較して A P R I L 変異体の平均 M F I 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 2 0 B】同上

【図 2 0 C】同上

50

【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

20

【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、それらが由来した元の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.FLuc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-BiTE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ストークを介して短縮型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スパーサーを介して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スパ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：APRILiTE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APRILiTE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ブロット。ブロットは、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。

10

【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 Vicky 1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

20

【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。

30

【発明を実施するための形態】

【0034】

詳細な説明

APRIL

本発明は、バリエーション増殖誘導リガンド（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。

40

【0035】

用語「バリエーション」は、「変異体」または「改変された」と同義であり、置換（単数または複数）、付加（単数または複数）または欠失（単数または複数）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

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(QKKKK¹¹³Q)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 】

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

【 0040 】

バリエーション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)またはそのバリエーションを含み得る。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 PVREPALSA LWLSWGAALG AVACAMALLT QQTELQSLRR

      70      80      90     100     110     120
EVSRLQGTGG PSQNGEGYPW QSLPEQSSDA LEAWENGERS RKRRAVLTQK QKKQHSLVHL

     130     140     150     160     170     180
VPINATSKDD SDVTEVMWQP ALRRGRGLQA QGYGVRIQDA GYLLYSQVL FQDVTFTMGQ

     190     200     210     220     230     240
VVSREGQGRQ ETLFRCIRSM PSHPDRAVNS CYSAGVFHLH QGDILSVIIP RARAKLNLSQ

    250
HGTFLGFVKL

```

10

配列番号 2

```

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFRICIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

```

20

【0041】

バリエーション A P R I L またはバリエーション短縮型 A P R I L は、野生型 A P R I L よりも (t h a t) 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、バリエーション 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を有する。いくつかの実施形態または適用において、バリエーション 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、バリエーション 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、バリエーション A P R I L は、以下の単一変異の 1 つを含み得る (配列番号 3 ~ 2 6) :

```

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。

```

40

【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 1 2 で示されるいくつかの例とともに図 1 0 で説明される。

【表 1】

表 1

変異	% <i>BCMA WT</i>	% <i>TACI WT</i>	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)

VLHLVPIN~~TT~~SKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR~~C~~IRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA~~K~~NLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 4 (V174T)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD~~TT~~FTMG
QVVSREGQGRQETLFR~~C~~IRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA~~K~~NLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 5 (V174G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD~~G~~TFTMG
QVVSREGQGRQETLFR~~C~~IRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA~~K~~NLSPHG
TFLGFVKL

10

配列番号 6 (T175H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVHFTMG
QVVSREGQGRQETLFR~~C~~IRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA~~K~~NLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 7 (T175S)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVSFTMG
QVVSREGQGRQETLFR~~C~~IRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA~~K~~NLSPHG
TFLGFVKL

20

配列番号 8 (T175G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVGFTMG
QVVSREGQGRQETLFR~~C~~IRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA~~K~~NLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 9 (M200C)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR~~C~~IRSCPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA~~K~~NLSPHG
TFLGFVKL

【化 2 - 2】

配列番号 10 (M200L)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSLPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 11 (M200G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSGPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 12 (M200S)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSSPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

10

配列番号 13 (M200A)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIR SAPSHPDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 14 (M200N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSNPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

20

配列番号 15 (P201V)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMVSHPDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 16 (P201A)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMASHPDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 17 (P201G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMGSHPDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

30

配列番号 18 (P201Y)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMYSHPDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 19 (P201R)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMRSHPDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

40

【化 2 - 3】

配列番号 20 (P201W)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMWHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 21 (S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMGHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 22 (S202F)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMFHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

10

配列番号 23 (S202D)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 24 (S202V)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMVHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

20

配列番号 25 (S202P)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPPHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 26 (D205P)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

【 0 0 4 4 】

バリエーション 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：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 S 2 0 2 および H 2
0 3、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。

30

【 0 0 4 5 】

特に、バリエーション 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：
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

40

50

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。

10

【 0 0 4 6 】

これらの特定の組み合わせた変異は、B C M A 標的化に有用な様式で 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示された（表 2 および図 1 1 を参照）。

【表 2】

表 2

変異	% <i>BCMA</i> WT	% <i>TACI</i> WT	配列
V174T, T175A	131	80	配列番号 27
V174T, M200G	172	49	配列番号 28
T174S, S202G	43	13	配列番号 29
V174T, S202V	303	613	配列番号 30
V174G, S202G	67	24	配列番号 31
V174G, S202E	35	18	配列番号 32
V174G, S202A	132	36	配列番号 33
V174G, S202G	29	49	配列番号 34
V174E, S202Y	33	15	配列番号 35
T175A, S202E	87	15	配列番号 36
T175G, S202G	34	17	配列番号 37
T175G, S202V	59	30	配列番号 38
T175A, S202P	100	0	配列番号 39
T175A, M200G	14	1	配列番号 40
T175S, S202G	43	13	配列番号 41
S202V, H203N	11	24	配列番号 42
D205H, R206L	357	86	配列番号 43
D205P, R206K	255	90	配列番号 44
D205P, R206N	111	138	配列番号 45
D205S, R206P	420	81	配列番号 46
D205R, R206G	404	84	配列番号 47
D205P, R206I	343	54	配列番号 48
D205S, R206H	234	112	配列番号 49
V174T, T175A, S202E	186	87	配列番号 50
V174T, T175A, M200G	28	4	配列番号 51
T175A, D205P, R206N	13	1	配列番号 52
T175A, D205S, R206H	15	2	配列番号 53
M200G, D205P, R206N	53	4	配列番号 54
M200G, D205S, R206H	68	15	配列番号 55
V174T, T175A, M200G, S202E	43	0	配列番号 56
T175A, S202E, D205P, R206N	19	0	配列番号 57
T175A, S202E, D205S, R206H	28	0	配列番号 58

10

20

30

40

【化 3 - 1】

配列番号 27 (V174T, T175A)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**TA**FTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 28 (V174T, M200G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**TT**FTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSGPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 29 (T174S, S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**ST**FTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMGHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

10

配列番号 30 (V174T, S202V)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**TT**FTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMVHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 31 (V174G, S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**GT**FTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMGHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

20

配列番号 32 (V174G, S202E)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**GT**FTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPEHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 33 (V174G, S202A)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**GT**FTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMAPHDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 34 (V174G, S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**GT**FTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMGHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHG
TFLGFVKL

30

【化 3 - 2】

配列番号 35 (V174E, S202Y)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**E**FTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**Y**HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 36 (T175A, S202E)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**AFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**E**HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 37 (T175G, S202G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**GFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**G**HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

10

配列番号 38 (T175G, S202V)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**GFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**V**HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 39 (T175A, S202P)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**AFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**P**HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

20

配列番号 40 (T175A, M200G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**AFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSG**P**SHPDRA**N**SCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 41 T175S, S202G

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**SFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**G**HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 42 (S202V, H203N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**TFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**V**NPDRA**N**SCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

30

配列番号 43 (D205H, R206L)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**TFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**S**HP**H**LAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

配列番号 44 (D205P, R206K)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**TFTMG
 QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPT**S**HP**P**KAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA**K**NLNSPHG
 TFLGFVKL

【化 3 - 3】

配列番号 45 (D205P, R206N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHP **P**NAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

配列番号 46 (D205S, R206P)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHP **S**PAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

配列番号 47 (D205R, R206G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHP **R**GAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

10

配列番号 48 (D205P, R206I)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHP **P**IAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

配列番号 49 (D205S, R206H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHP **S**HAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

20

配列番号 50 (V174T, T175A, S202E)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**T**AFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPE**H**PDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

配列番号 51 (V174T, T175A, M200G)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**T**AFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSG**P**SHPDRA YNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

配列番号 52 (T175A, D205P, R206N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**AFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHP **P**NAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

30

配列番号 53 (T175A, D205S, R206H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**V**AFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHP **S**HAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

配列番号 54 (M200G, D205P, R206N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSG**P**SH **P**NAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

配列番号 55 (M200G, D205S, R206H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMG
QVVSREGQGRQETLFR CIRSG**P**SH **S**HAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLS PHG
TFLGFVKL

40

【化 3 - 4】

配列番号 56 (V174T, T175A, M200G, S202E)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**TA**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRICIRSG**PE**HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 57 (T175A, S202E, D205P, R206N)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**VA**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRICIRSM**PE**HP**PN**AYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

配列番号 58 (T175A, S202E, D205S, R206H)

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQD**VA**FTMG
QVVSREGQGRQETLFRICIRSM**PE**HP**PD**HAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAKLNLSPHG
TFLGFVKL

10

【 0 0 4 7 】

T細胞活性化

本発明は、

(i) B細胞成熟抗原 (B C M A) に結合し、本発明の第一の態様にしたがう変異体 A P R I L 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、二重特異性分子もまた提供する。

【 0 0 4 8 】

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 (T C R) を細胞表面に有する。そのような抗原認識は、S r c ファミリーキナーゼによる免疫受容体活性化チロシンモチーフ (I T A M) 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、 Ca^{2+} の放出を含むT細胞活性化をもたらす。

20

【 0 0 4 9 】

第二のドメインは、T C R 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。

【 0 0 5 0 】

CD分類 3 (C D 3)

本発明の二重特異性分子の第二のドメインは、C D 3 に結合し得る。

30

【 0 0 5 1 】

C D 3 は、C D 3 鎖、C D 3 鎖および2つのC D 3 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。C D 3 は、T細胞受容体 (T C R) 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。T C R、鎖およびC D 3 分子は、共にT C R 複合体を構成する。

【 0 0 5 2 】

T細胞上でのC D 3 の集合 (例えば固定した抗C D 3 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。

40

【 0 0 5 3 】

T細胞活性の調節におけるその中心的な役割のため、T C R / C D 3 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C D 3 抗原に特異的な抗体の生成にフォーカスしている。

【 0 0 5 4 】

第二のドメインは、O K T 3、W T 3 2、抗 l e u - 4、U C H T - 1、S P V - 3 T A、T R 6 6、S P V - T 3 B、またはアフィニティー調整されたそれらのバリエーションなどの、C D 3 に特異的に結合する抗体またはその一部を含み得る。

【 0 0 5 5 】

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(DRP)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(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)KASGYTFTRYTMH

CDR2:(配列番号60)INPSRGYTNYNQKFKD

CDR3:(配列番号61)YYDDHYCLDY

30

軽鎖

CDR1:(配列番号62)SASSSVSYMN

CDR2:(配列番号63)RWIYDTSKLAS

CDR3:(配列番号64)QQWSSNPFT

【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、そのバリエーションを含み得る。

【化4】

40

配列番号 65

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWWKQRPQGGLWIGYINPSR
GYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWG
QGTTTLTVSSSGGGSGGGSGGGSGQIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVS
YMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATY
YCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

【0060】

配列番号 65 由来のバリエーション配列は、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)

B i T E S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s c F v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s c F vであった。

【0062】

B i T Eは、一般的に、短い5残基ペプチドリナー(GGGGS)を介して、抗CD3 s c F vを抗標的抗原s c F v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s c F vが産生された。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PBMCを使用して、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 s c F vとマウス抗CD3 s c F v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ビトロ特性を実証した。

10

【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B i T Eであり、かつ臨床試験で最も進行したB i T E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。

20

【0064】

抗ヒトEpCAM×抗ヒトCD3 T a F vであるMT110は、臨床試験において試験された2番目のB i T Eであり、かつ広範な固形腫瘍に初めて指向された。MT110のインビトロ特性評価は、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B i T E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、B i T E様の構成に基づくが、標的抗原に結合するs c F v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。

30

【0065】

この「APRIL i T E」構成は、様々な理由で古典的なs c F v - s c F v構成と比較して好ましい:(a)単一ドメイン-s c F v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:

40

【化 5】

配列番号 66

METDTLLLWVLLLWPGSTGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH
 WVKQRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDS
 AVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSGQIVLTQSPAI
 MSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS
 GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRSDPAEPKSPDKTH
 TCPPCPKDPKSGGGGSLVHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGV
 RIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSC
 YSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGFVKL

10

配列番号 67

METDTLLLWVLLLWPGSTGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH
 WVKQRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDS
 AVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSGGGGSGGGGSGGGGSGQIVLTQSPAI
 MSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS
 GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRSDPTTTPAPRPPT
 PAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDSGGGGSLVHLVPINATSKDDSD
 VTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSRE
 GQGRQETLFR CIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHGT
 FLGFVKL

20

配列番号 68

MGTSLLCWMALCLLGADHADGVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQA
 QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFR CIRSMPSHPD
 RAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPTTTPAP
 RPPTPAPTASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDSGGGGSGVQLQQSGAE
 LARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWWVKQRPQGGLWIGYINPSRGYTNYNQKFK
 DKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSSG
 GGGSGGGGSGGGGSGQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSG
 TSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFT
 FSGGTKLEINRS

30

40

【0067】

本発明の分子は、そのバリエーション配列が、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

(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である限り、配列番号 66、67 または 68 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エーション
 を含む得る。

【0068】

50

シグナルペプチド

本発明の二重特異性分子は、その産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。

10

【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ーションを含み得る。

20

配列番号69：M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G

配列番号70：M G T S L L C W M A L C L L G A D H A D G

【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。

30

【0075】

スペーサー配列は、例えば、I g G 1 ヒンジまたはC D 8 ストックを含み得る。リンカーは、代替的にI g G 1 ヒンジまたはC D 8 ストッ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、I g G 1 ヒンジもしくはC D 8 ストック、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。

40

【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（I g G 1 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 S

配列番号72（C D 8 ストック）：

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】

C D 8 ストックは、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

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、ＣＤ８ストーク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ーションを含むか、またはそれらからなるスペーサーを含み得、ただし、そのバリエーション配列は、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／またはそのバリエーション配列は、二重特異性分子のホモダイマー化を引き起こす。

【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、チェーンブレイ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。チェーンブレイクは、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ＳＤＰおよび配列ＳＧＧＳＤＰ（配列番号７３）が挙げられる。

【００８１】

リンカーは、ＳＧＧＧＳ（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ーションＡＰＲＩＬ、
- (ii) 任意選択のスペーサー、
- (iii) 膜貫通ドメインおよび
- (iv) エンドドメイン

を含み得る。

【００８５】

40

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。

【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、ＡＰＲＩＬ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）：Ｓ２０２、Ｐ２０１、Ｍ２００、Ｔ１７５、Ｖ１７４、Ａ１２５、Ｈ２０３、Ｄ２０５およびＲ２０６。

【化 6 - 1】

配列番号 75 (dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQ
 DAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQ
 GDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPAEPKSPDKTHTCPPCPAPPVAGPSVFL
 FPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
 LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL
 VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMEHA
 LHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT
 PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAH KPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRV
 KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKD
 KMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

10

配列番号 76 (dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQ
 DAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQ
 GDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEAC
 RPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT
 PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAH KPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRV
 KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

配列番号 77 (dAPRIL-HNG-CD28OXZ)

METDTLLLWVLLLWVPGSTGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQ
 DAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQ
 GDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPAEPKSPDKTHTCPPCPKDPKFWVLVVV
 GGVACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT
 PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAH KPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRV
 KFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPGEMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDK
 MAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

30

配列番号 78 (dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ)

MGTSLLCWMALCLLGADHADGKPIPNPLLGLDSTSGGGGVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQ
 PALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPS
 HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARA KLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPAEPKSPDK
 THTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMIARTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN
 AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY
 TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV
 DKSRWQQGNVFSQSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT

40

【化 6 - 2】

FWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFR
 TPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMG
 GKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQAL
 PPR

配列番号 79 (dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ)

MGTSLLCWMALCLLGADHADGKPIPNPLLGLDSTSGGGGSLVHLVPINATSKDDSDVTEVMWQ
 PALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPS
 HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII PRARAKLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPTTTPAPRP
 PTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIF
 WVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRT
 PIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMG
 KPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALP
 PR

10

配列番号 80 (dAPRIL-HNG-CD28OXZ)

MGTSLLCWMALCLLGADHADGKPIPNPLLGLDSTSGGGGSLVHLVPINATSKDDSDVTEVMWQ
 PALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRICIRSMPS
 HPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII PRARAKLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPAEPKSPDK
 THTCPCKPKDPKFWVLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTR
 KHYPYAPPRDFAAYRSRDQRLPPDAHKKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKIRVKFSRSADA
 PAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPPEMGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSE
 IGMKGERRRRGKGGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR

20

【 0 0 8 7】

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エーションを含み得、ただし、バリエーション配列は、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、
- (i i) 任意選択のスペーサドメイン、
- (i i i) 膜貫通ドメインおよび
- (i v) 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。

【 0 0 8 8】

40

2 つのポリペプチド配列間の同一性パーセンテージは、<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> 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。

【 0 0 8 9】

核酸配列

本発明は、上記で定義されるようなバリエーション A P R I L、バリエーション A P R I L を含む C A R またはバリエーション 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。

【 0 0 9 0】

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

【 0 0 9 1 】

A P R I L - B i T E をコードする核酸配列は、配列番号 8 1 ~ 8 3 として示される。本発明の核酸配列は、配列番号 8 1、8 2 または 8 3 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 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。

【 化 7 - 1 】

配列番号 81 (APRILiTE#01)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAG
CACCGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGGCCAGACCAGGC
GCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGTACAC
CATGCACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTAC
ATCAACCCCAGCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCC
ACCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACC GCCTACATGCAGCTGAGCAGCCT
GACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATACTACGACGACCACT
ACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACCGTGAGCAGCTCTGGC
GGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCCAGATCGTG
CTGACCCAGAGCCCAGCCATCATGAGCGCCAGCCCAGGCGAGAAGGTGACCAT
GACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGA
GCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCGG
CGTGCCAGCCCACTTCAGAGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTACAGCCTGACCA
TCAGCGGCATGGAGGCCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGC
AGCAACCCCTTCACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTTCGGA
TCCCGCCGAGCCCAATCTCCTGACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAAA
AGATCCCAAATCTGGCGGAGGCGGCAGCGTGCTGCACCTGGTGCCCATCAACG

10

20

【化 7 - 2】

CCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTG
AGACGGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACG
CTGGCGTGACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAA
TGGGCCAGGTGGTGAGCCGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCG
GTGCATCCGGAGCATGCCCAGCCACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACA
GCGCTGGCGTGTTTCACCTGCACCAGGGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCC
AGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGCACCTTTCTGGGCTTCGT
GAAGCTGTGA

10

配列番号 82 (APRILITE#03)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAG
CACCGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGGCCAGACCAGGC
GCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGTACAC
CATGCACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTAC
ATCAACCCCAGCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCC
ACCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCT
GACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTAATACTGCGCCAGATACTACGACGACCACT
ACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACCGTGAGCAGCTCTGGC
GGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCCAGATCGTG
CTGACCCAGAGCCCAGCCATCATGAGCGCCAGCCCAGGCGAGAAGGTGACCAT
GACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGAACTGGTACCAGCAGAAGA
GCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCGG
CGTGCCAGCCCACTTCAGAGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTACAGCCTGACCA
TCAGCGGCATGGAGGCCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGC
AGCAACCCCTTCACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTGCGA
TCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAACACCGGCGCCCACCATCGCGT
CGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGGCG
CAGTGACACAGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATTCTGGCGGAGGCGGCAG
CGTGCTGCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGA
CCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCCA
GGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCTGGCGTGTAACCTGCTGTACTCCCAGG
TGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTGGTGAGCCGGGAGGGC
CAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCGGTGATCCGGAGCATGCCAGCCACCC
CGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTTCACCTGCACCAGG
GCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCC
CCCCACGGCACCTTTCTGGGCTTCGTGAAGCTGTGA

20

30

40

【化 7 - 3】

配列番号 83 (APRILiTE#06)

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGGAGCCGACCA
 CGCCGACGGCGTGCTGCACCTGGTGGCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACT
 CTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCT
 GCAGGCCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCTGGCGTGTACCTGCTGT
 ACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTGGTGAGC
 CGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCGGTGATCCGGAGCATGC
 CCAGCCACCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTCAC
 CTGCACCAGGGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCT
 GAACCTGTCCCCCAGCGCACCTTTCTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCG
 GCTCGGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCACCAACACCGGCGCCAC
 CATCGCGTCGACGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCG
 GGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATAGCGGTGGCG
 GTGGCAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGGCCAGACCAGG
 CGCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTTCACCCGGTACA
 CCATGCACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTA
 CATCAACCCAGCAGAGGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGC
 CACCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCC
 TGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATACTACGACGACCAC
 TACTGCCTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCACCCTGACCGTGAGCAGCTCTGG
 CGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCCAGATCGT
 GCTGACCCAGAGCCCAGCCATCATGAGCGCCAGCCCAGGCGAGAAGGTGACCA
 TGACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGAACTGGTACCAGCAGAAG
 AGCGGCACCAGCCCCAAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGGCCAGCG
 GCGTGCCAGCCCCTTCAGAGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTACAGCCTGAC
 CATCAGCGGCATGGAGGCCGAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGA
 GCAGCAACCCCTTCACCTTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTCTG
 TGA

10

20

30

【 0 0 9 2】

A P R I L - C A R 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、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 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

【化 8 - 1】

配列番号 84 (dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCACCGGCAGC
GTGCTCCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATG
TGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAG
GACGCTGGCGTGACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGC
CAGGTGGTGAGCCGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCGGTGTCATCCGGAGCATG
CCCAGCCACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTTCACCTGCACCAG
GGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGC
ACCTTTCTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGGCTCGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCT
GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCCTC
TTCCCCCAAACCCAAGGACACCCTCATGATCGCCCGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTG
GTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTG
CATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTC
CTCACCGTCTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
GCCCCCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAG
GTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTG
GTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAAC
AACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACAGCAAGCTC
ACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCT
CTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAAGATCCCAAATTT
TGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTT
ATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCTGACAGTGACTACATGAACATGACT
CCCCGCCGCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCA
GCCTATCGCTCCAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCCCACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGT
TTCCGGACCCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCCACTCCACCCTGGCCAAGATCAGAGTG
AAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAG
CTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAG
ATGGGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGAT
AAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCAC
GATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAG
GCCCTGCCTCCTCGCTAA

10

20

30

配列番号 85 (dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCACCGGCAGC
GTGCTCCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATG
TGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAG
GACGCTGGCGTGACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGC
CAGGTGGTGAGCCGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCGGTGTCATCCGGAGCATG
CCCAGCCACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTTCACCTGCACCAG

40

【化 8 - 2】

GGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGC
ACCTTTCTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGGCTCGGATCCCACCACGACGCCAGCGCCG
CGACCACCAACACCGGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGC
CGGCCAGCGGGCGGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGG
GTGCTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATT
ATTTTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGAACATGACTCCC
CGCCGCCCCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCC
TATCGCTCCAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCCCACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTC
CGGACCCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCCACTCCACCCTGGCCAAGATCAGAGTGAAG
TTCAGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTC
AATCTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATG
GGGGGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCGTGACAATGAACTGCAGAAAGATAAG
ATGGCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGAT
GGCCTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCC
CTGCCTCCTCGCTAA

10

配列番号 86 (dAPRIL-HNG-CD28OXZ)

20

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAGCACCGGCAGC
GTGCTCCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATG
TGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAG
GACGCTGGCGTGTAACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGC
CAGGTGGTGAGCCGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCGGTGATCCGGAGCATG
CCCAGCCACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTTCACCTGCACCAG
GGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGC
ACCTTTCTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGGCTCGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCT
GACAAAACCTCACACATGCCCACCGTGCCCAAAGATCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTT
GGTGGAGTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGG
AGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGAATGAACATGACTCCCCGCGCCCCGGGGCC
ACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGGGAC
CAGAGGCTGCCCCCGATGCCCCACAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCCGGACCCCCATCCAA
GAGGAGCAGGCCGACGCCCCACTCCACCCTGGCCAAGATCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCA
GACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGA
GAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAAGCCGAGA
AGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTAC
AGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGT
CTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCTAA

30

40

配列番号 87 (dAPRIL-HCH2CH3pvaa-CD28OXZ)

【化 8 - 3】

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGGAGCCGACCACGCCGACGGC
AAGCCCATTCCCAACCCCCTGCTGGGCCTGGACTCCACCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGTGCTG
CACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAG
CCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCT
GGCGTGTAACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTG
GTGAGCCGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCGGTGTCATCCGGAGCATGCCCAGC
CACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTTCACCTGCACCAGGGCGAC
ATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGCACCTTT
CTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGGCTCGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAA
ACTCACACATGCCCACCGTGCCAGCACCTCCCGTGGCCGGCCCGTCAGTCTTCCTCTTCCCC
CCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCGCCCGGACCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGAC
GTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT
GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACC
GTCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTC
CCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTAC
ACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAA
GGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAACCGGAGAACAATACT
AAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCCTCTACAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCAC
AACCCTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAAAAGATCCCAAATTTTGGGTG
CTGGTGGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATT
TTCTGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGC
CGCCCCGGGCCCCACCGCAAGCATACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTAT
CGCTCCAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCCAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCCGG
ACCCCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCCCACTCCACCCTGGCCAAGATCAGAGTGAAGTTC
AGCAGGAGCGCAGACGCCCCCGGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAAT
CTAGGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGG
GGAAAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATG
GCGGAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGC
CTTTACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTG
CCTCCTCGCTAA

10

20

30

配列番号 88 (dAPRIL-CD8STK-CD28OXZ)

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGGAGCCGACCACGCCGACGGC
AAGCCCATTCCCAACCCCCTGCTGGGCCTGGACTCCACCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGTGCTG
CACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAG
CCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCTGCAGGCCCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCT
GGCGTGTAACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTG

40

【化 8 - 4】

GTGAGCCGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCGGTGCATCCGGAGCATGCCCCAGC
 CACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTTCACCTGCACCAGGGCGAC
 ATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGCACCTTT
 CTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGGCTCGGATCCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCA
 CCAACACCCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCCCTGTCCCTGCGCCCAGAGGCGTGCCGGCCA
 GCGGCGGGGGGCGCAGTGACACGAGGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATATCTTTTGGGTGCTG
 GTGGTGGTTGGTGGAGTCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTC
 TGGGTGAGGAGTAAGAGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGC
 CCGGGGCCACCCGCAAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGC
 TCCAGGGACCAGAGGCTGCCCCCGATGCCCAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCCGGACC
 CCCATCCAAGAGGAGCAGGCCGACGCCCACTCCACCCTGGCCAAGATCAGAGTGAAGTTCAGC
 AGGAGCGCAGACGCCCCCGCTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTA
 GGACGAAGAGAGGAGTACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGA
 AAGCCGAGAAGGAAGAACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCG
 GAGGCCTACAGTGAGATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTT
 TACCAGGGTCTCAGTACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCT
 CCTCGCTAA

10

20

配列番号 89 (dAPRIL-HNG-CD28OXZ)

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGGAGCCGACCACGCCGACGGC
 AAGCCCATTCCCAACCCCTGCTGGGCTGGACTCCACCTCTGGCGGAGGCGGCAGCGTGCTG
 CACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAG
 CCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCT
 GCGTGCTACCTGCTGTACTCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTG
 GTGAGCCGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCTGTTCCGGTGCATCCGGAGCATGCCCAGC
 CACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTTCACCTGCACCAGGGCGAC
 ATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCCCCCACGGCACCTTT
 CTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGCGGCTCGGATCCCGCCGAGCCCAAATCTCCTGACAAA
 ACTCACACATGCCACCGTGCCCAAAGATCCCAAATTTTGGGTGCTGGTGGTGGTTGGTGA
 GTCCTGGCTTGCTATAGCTTGCTAGTAACAGTGGCCTTTATTATTTTCTGGGTGAGGAGTAAG
 AGGAGCAGGCTCCTGCACAGTGACTACATGAACATGACTCCCCGCCGCCCCGGGCCACCCGC
 AAGCATTACCAGCCCTATGCCCCACCACGCGACTTCGCAGCCTATCGCTCCAGGGACCAGAGG
 CTGCCCCCGATGCCCAAGCCCCCTGGGGGAGGCAGTTTCCGGACCCCATCCAAGAGGAG
 CAGGCCGACGCCCACTCCACCCTGGCCAAGATCAGAGTGAAGTTCAGCAGGAGCGCAGACGCC
 CCGCGTACCAGCAGGGCCAGAACCAGCTCTATAACGAGCTCAATCTAGGACGAAGAGAGGAG
 TACGATGTTTTGGACAAGAGACGTGGCCGGGACCCTGAGATGGGGGGAAGCCGAGAAGGAAG
 AACCCTCAGGAAGGCCTGTACAATGAACTGCAGAAAGATAAGATGGCGGAGGCCTACAGTGAG
 ATTGGGATGAAAGGCGAGCGCCGGAGGGGCAAGGGGCACGATGGCCTTTACCAGGGTCTCAGT
 ACAGCCACCAAGGACACCTACGACGCCCTTCACATGCAGGCCCTGCCTCCTCGCTAA

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。

【 0 0 9 4 】

核酸配列は、配列番号 8 1 ~ 8 9 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 2 2 ~ 4 5 ）。

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

【 0 0 9 5 】

核酸配列は、配列番号 8 1 ~ 8 9 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。

【 0 0 9 6 】

20

核酸配列は、配列番号 8 1 ~ 8 9 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。

【 0 0 9 7 】

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ーション 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、エキソピボ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エーション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エーション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(affect)を発揮する、機能ドメインもまた含み得る。

30

【0108】

バリエーションAPRILは、細胞傷害性薬物などの薬物と結合され得る。

【0109】

バリエーション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

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。

40

【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（P O E M S 症候群）、およびH鎖病と意義不明の単クローン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発現レベルに相関する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発現に相関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関係する。この点で、薬剤または組成物は疾患に付随する少なくとも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、本発明のバリエーション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、インビボまたはインビトロで行われ得る。インビボ法において、診断薬剤は被験体へ投与される。

30

【0121】

インビトロ法において、バリエーションAPRILは、インビ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、PBMC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関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BCMAコピー数の範囲は低く：細胞あたり348.7～4268.4 BCMAコピーであり、平均値が1181、中間値が1084.9（図2）であることが見出された。これは、CARへの古典的な標的である、例えばCD19およびGD2などより相当低い。初代骨髄腫細胞でのBCMA発現の存在は、Vicky-1抗体（Abcam Ab17323）によっても確認され、この例は図18に示される。

【0124】

実施例2 APRILに基づくCARのデザインおよび構築

天然形態におけるAPRILは、分泌型II型タンパク質である。CARのためのBCMA結合ドメインとしてのAPRIL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BCMAへの結合を保持するためには、このII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、APRIL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、使用したスパーサーの性質が、CARの機能を変化させ得るため、3つの異なるスパーサードメインを試験した：(i)Fc結合モチーフを除去するために変化させたヒトIgG1スパーサー；(ii)CD8ストーク；および(iii)IgG1ヒンジ単独、を含むAPRILに基づくCAR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19にも異なるシグナルペプチドおよびV5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CARは、マーカータンパク質（短縮型CD34）が、便利なマーカー遺伝子として共発現できるように、バイシストロニックなレトロウイルスベクター（図6A）に発現させた。

【0125】

実施例3 APRILに基づくCARの発現および機能

本研究の目的は、構築されたAPRILに基づくCARが、細胞表面に発現するか否か、およびAPRIL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CARコンストラクトを形質導入し、そして市販の抗APRIL mAb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6Bに示され、ここでAPRIL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APRILに基づくCARは細胞表面に発現しており、かつAPRILは、抗APRIL mAb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。

【0126】

次に、この構成のAPRILは、BCMAおよびTACIを認識できるか否かを決定した。リコンビナントBCMAおよびTACIを、マウスIgG2a-Fc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6Cに提示される。異なるCARは、BCMAおよびTACIの両方に結合することができた。驚くべきことに、CARはTACIよりも良好にBCMAに結合することができた。また驚くべきことに、CD8ストークまたはIgG1ヒンジスパーサーを有するCARは、Fcスパーサーを有するCARよりも良好に、BCMAおよびTACIに結合することができた。

【0127】

実施例4 APRILに基づくキメラ抗原受容体は、BCMA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、いずれかの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）を、⁵¹Crを用いて標識し、そ

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、Sup T1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）。Sup T1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

10

【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こと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ことが決定されたため、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日での、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。

20

30

【0130】

実施例6 一連の「APRILITES」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った：（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の成熟エクス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。

40

【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

50

(6) CD8 スペーサーを介して O K T 3 s c F v に連結させた短縮型 A P R I L 。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 7 293 T 細胞における A P R I L i T E の発現

293 T 細胞に、上記に列挙される A P R I L i T E 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。293 T 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、A P R I L 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。

10

【0133】

実施例 8 T C R および B C M A 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 (T C R) と、および他方の末端で B C M A 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 293 T 細胞由来の上清を、J u r k a t T 細胞および T C R ノックアウトを有する J u r k a t T 細胞クローンを染色するために使用した。これは、A P R I L i T E が、T C R に結合することを実証する (図 26 b)。その後、B C M A を発現するように改変した S u p T 1 細胞および T A C I を発現するように改変した S u p T 1 細胞を、二次抗 A P R I L ピオチン次いでストレプトアビジン P E を使用して、上記の上清で染色した。この結果は、図 26 a に示される。A P R I L i T E 1、3 および 6 は B C M A に結合し、そして T A C I にはより少ない程度で結合したことが見出された。

20

【0134】

実施例 9 安定な A P R I L I T E は、I F N 放出を引き起こす

正常ドナー T 細胞を、異なる S u p T 1 と 1 : 1 で培養した。使用した S u p T 1 は、形質導入なし、B C M A を発現するように改変したものまたは T A C I 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 A P R I L i T E の存在下で、B C M A または T A C I で改変した S u p T 1 細胞を用いて曝露した場合にのみ I F N を放出することが見出された。B C M A に対する応答は、T A C I に対する応答よりも大きかった。

30

【0135】

実施例 10 安定な A P R I L I T E は、B C M A + 標的の T 細胞媒介性の殺傷を引き起こす

T 細胞を、A P R I L i T E 1、3 および 6 の非存在下または存在下で、野生型 S u p T 1 細胞と、B C M A を発現する S u p T 1 細胞とおよび T A C I を発現する S u p T 1 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、A P R I L i T E の添加なしの条件で存在する S u p T 1 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 B C M A 発現の検証

40

4 種の異なる骨髄腫サンプルを、ラット抗ヒト B C M A m A b V i c k y 1 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 A P R I L i T E の効果の検証

既知の多発性 B C M A + 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。C D 138 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、B C M A についての染色を、実際に B C M A 陽性であることを確認するために行った。骨髄腫細胞は B C M A を発現するが、低レベルであることが見出された (図 31)。

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

huSCIDモデルを使用した:NSG(nod-scidガンマ、NOD-scid IL2Rガンマ^{u11})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改変する。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菌に形質転換し、単一コロニーを取り、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】

次いで293T細胞を別個にリコンビナントヒトBCMA-FcまたはTACI-Fc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ポリクロナル抗Fc Alexa fluor 488を用いて二次的に染色し、マーカー遺伝子を抗CD34 APCを用いて染色した。APRIL変異体を野生型APRILおよびそれぞれのバッチにおける対照としてのCD34単独を用いて、この方法でバッチでスクリーニングした。CD34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。Alexa fluor 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：
$$[(MFI.1 - MFI.2) + (MFI.2 - MFI.3) + (MFI.3 - MFI.4)] / 3$$
(図31Cにおいて説明される)。

10

【0145】

この方法で、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結合およびTACI結合の平均MFIグラディエントを、それぞれのバッチにおけるAPRIL 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、キャピラリーシーケンスによって配列決定した。

【0146】

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。

【0147】

その後、変異体のクラスを単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APRIL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BCMAに対するアフィニティ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D205R、R206G)。本発明者らは、野生型APRILと同程度のBCMA結合を有するが、TACI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T175A、S202P)。本発明者らは、野生型よりも低いBCMA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)、TACI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、V174T、T175A、M200G、S202E)。

20

【0148】

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DNAを生成し、トランスフェ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

【0149】

実施例15 Fcスペーサーに融合された分泌型および短縮型のAPRILは、BCMAおよびTACIを認識する

CAR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APRILが、BCMAおよびTACIに結合できるか否か調べるために、基本的なCARを、自己切断する口蹄疫2A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CD34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SUT1細胞株を樹立した。ヒト(および他種、示されない)Ig Fcドメインに融合した分泌型の短縮型BCMAおよびTACIもまた生成し、そしてリコンビナントタンパク質を産生した。BCMA-FcとTACI-Fcとの両方が、改変されたSUT1細胞株に結合することが示された。CD34マーカー遺伝子を発現する細胞のみが、BCMA-FcおよびTACI-Fcに結合することが見出された(図9)。

40

【0150】

実施例16 APRIL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

CAR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APRILに基づくCARが生成された：(i)Fc結合モ

50

チーフを除去するために改変したヒト I g G 1 スペーサー ; (i i) C D 8 ストック ; および (i i i) I g G 1 ヒンジ単独 (図 1 4 B) 。初代ヒト T 細胞にこれらの異なる C A R を形質導入し、そして市販の抗 A P R I L m A b を使用して染色した (図 1 5) 。

【 0 1 5 1 】

実施例 1 7 A P R I L 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 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 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) は ^{51}Cr 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 ^{51}Cr を計数することによって決定した (図 1 6) 。

10

【 0 1 5 2 】

加えて、S u p T 1 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 E L I S A によって分析した (図 1 7) 。

【 0 1 5 3 】

S u p T 1 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、計数ビ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、C D 8 ストッ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

【 0 1 5 4 】

実施例 1 8 B C M A 特異的 A P R I L 変異体の生産

A P R I L 変異体を、特定のコドンを選択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、A P R I L - B C M A 結合および A P R I L - T A C I 結合のインシリコ解析を通じて同定した。この解析から、T A C I 結合に関係するようであるが、B C M A 結合には関係しないようである残基を選択した。

【 0 1 5 5 】

(i) 細胞表面発現 C D 3 4 および (i i) A P R I L 変異体をコードするプラスミドを産生した。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、単一コロニーを取り、別個に増やし、そしてその D N A を抽出し、2 9 3 T 細胞にトランスフェクションした。

30

【 0 1 5 6 】

単一の A P R I L 変異体および C D 3 4 を発現する T 細胞をそれぞれ 2 等分し、0 . 1 μg R N D ヒト B C M A - h F c または T A C I - h F c 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、J a c k s o n ポリクローナル a h F c A l e x a f l u o r 4 8 8 および B D a C D 3 4 A P C を用いて二次的に染色した。

【 0 1 5 7 】

A P R I L 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 A P R I L を用いてバッチでスクリーニングした。C D 3 4 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。A l e x a f l u o r 4 8 8 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 : $[(MFI_1 - MFI_2) + (MFI_2 - MFI_3) + (MFI_3 - MFI_4)] / 3$ 。

40

【 0 1 5 8 】

この方法において、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 および T A C I 結合の平均 M F I 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 A P R I L 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 B C M A : T A C I 結合比率を示す変異体を配列決定した。

【 0 1 5 9 】

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細胞のインビボ機能の実証

インビボでの 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.FLuc 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} Il2rg^{tm1Wjl/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.FLuc 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】

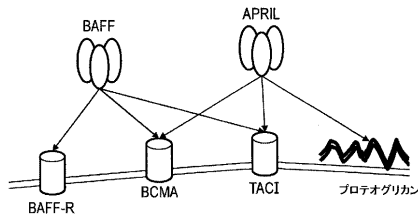


FIG. 1

【図 2】

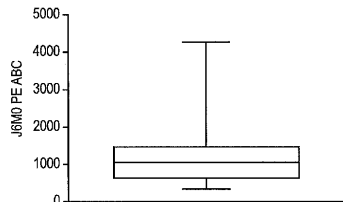


FIG. 2

【図 3】

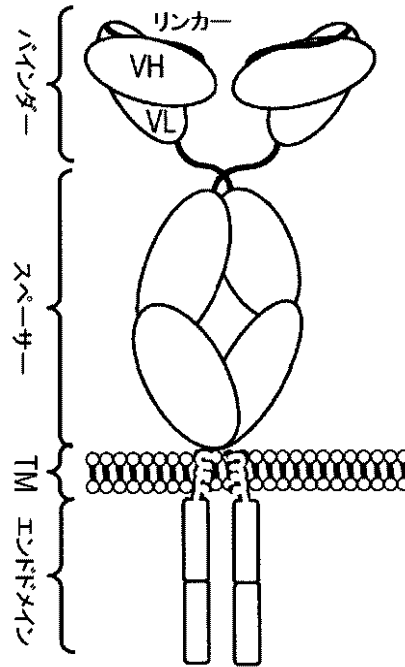


FIG. 3

【図 4】

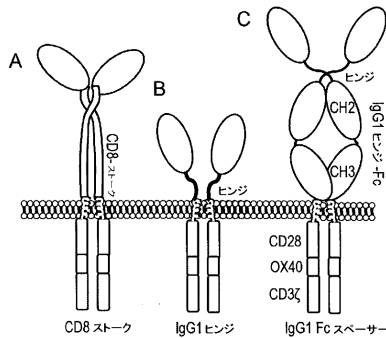


FIG. 4

【図 5】

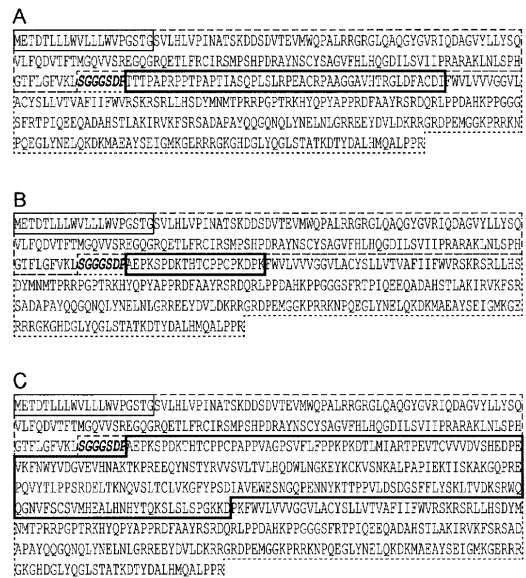


FIG. 5

【図 6 A B】

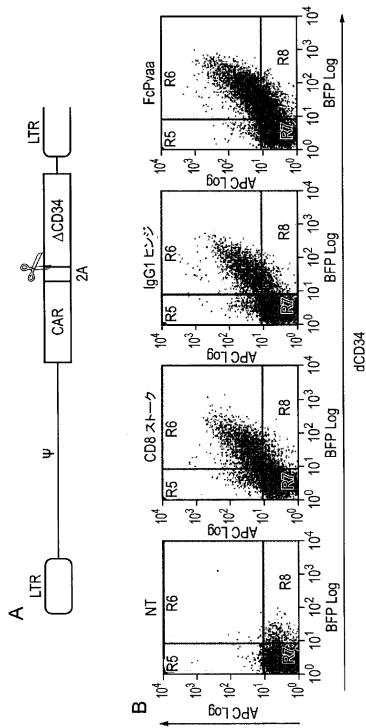


FIG. 6

【図 6 C】

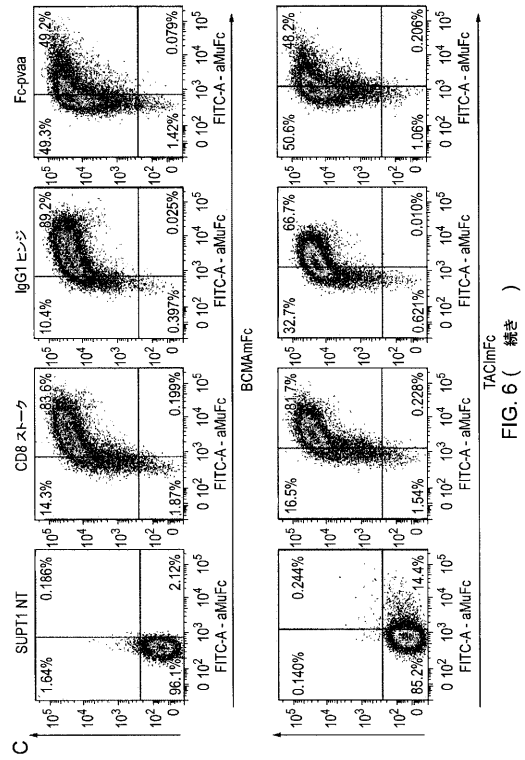


FIG. 6 (続き)

【図 7】

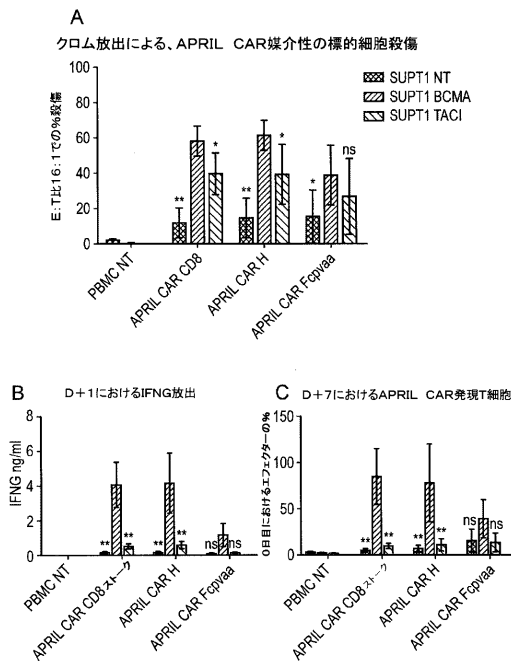


FIG. 7

【図 8】

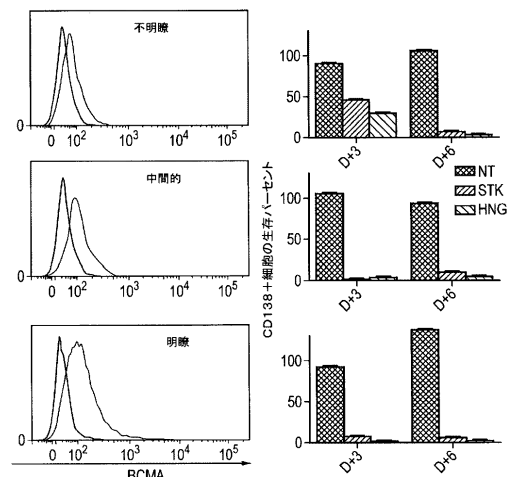


FIG. 8

【図 9】

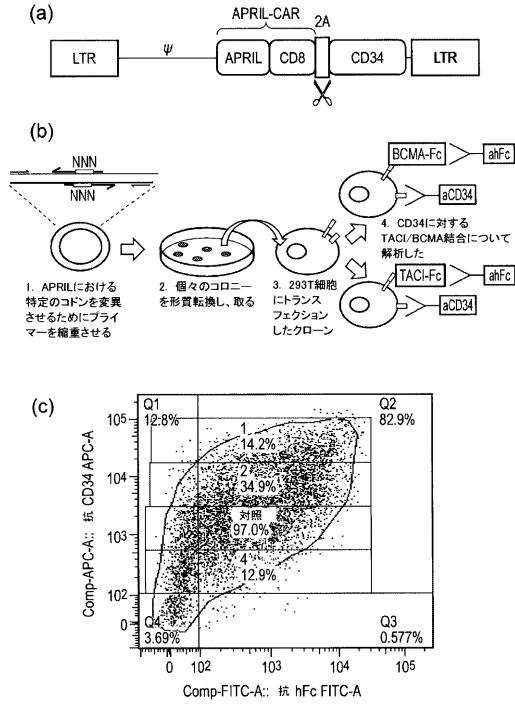


FIG. 9

【図 10】

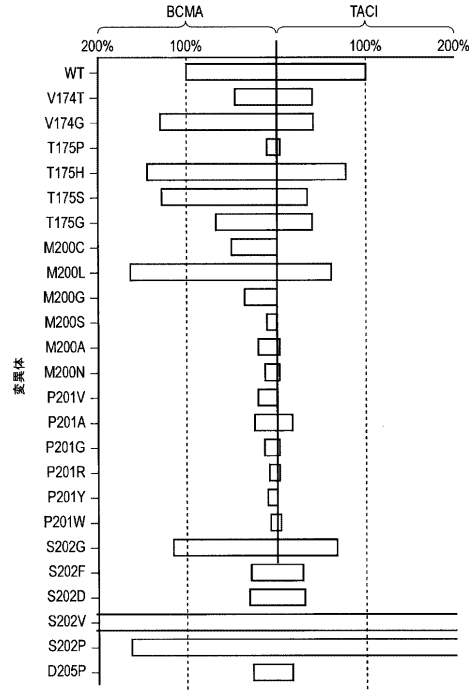


FIG. 10

【図 11】

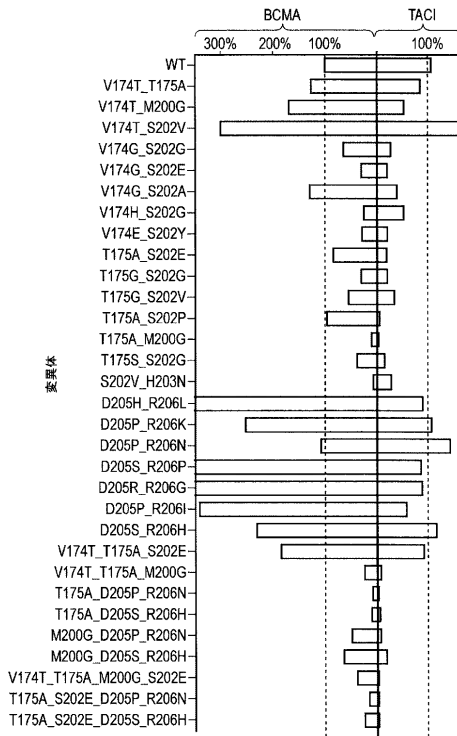


FIG. 11

【図 12 A】

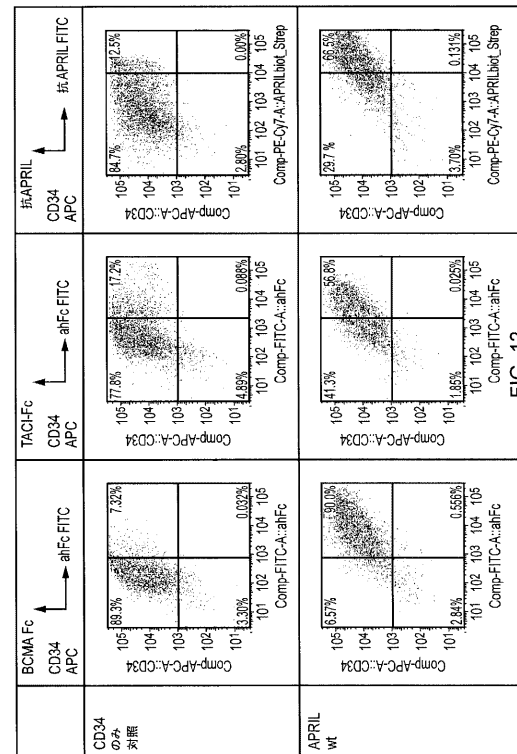


FIG. 12

【図 12 B】

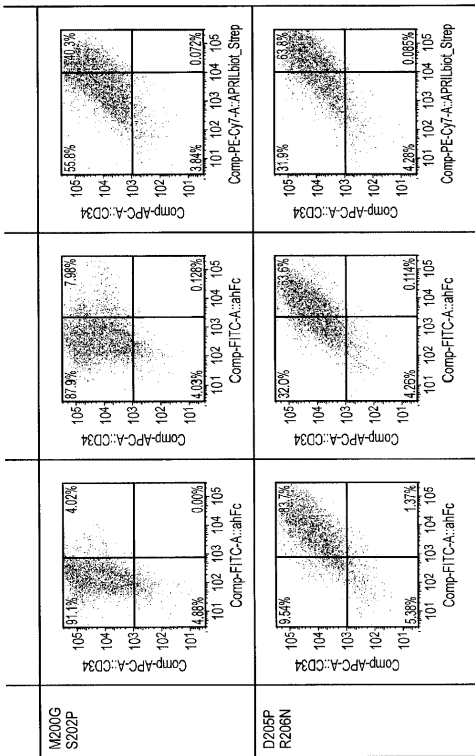


FIG. 12 (続き)

【図 12 C】

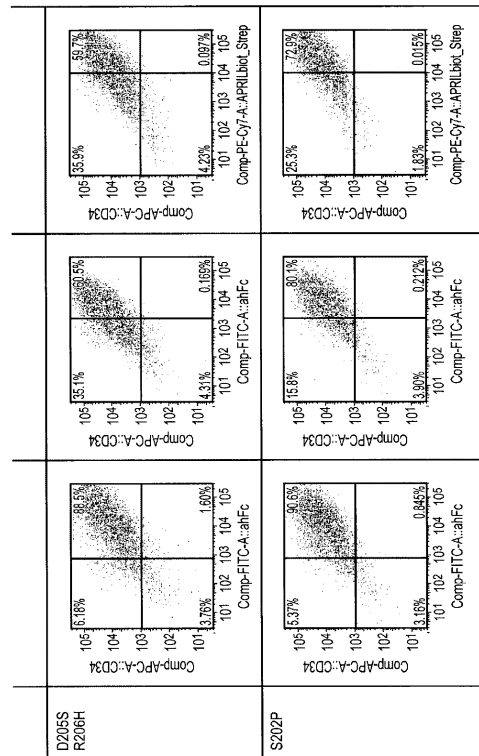


FIG. 12 (続き)

【図 12 D】

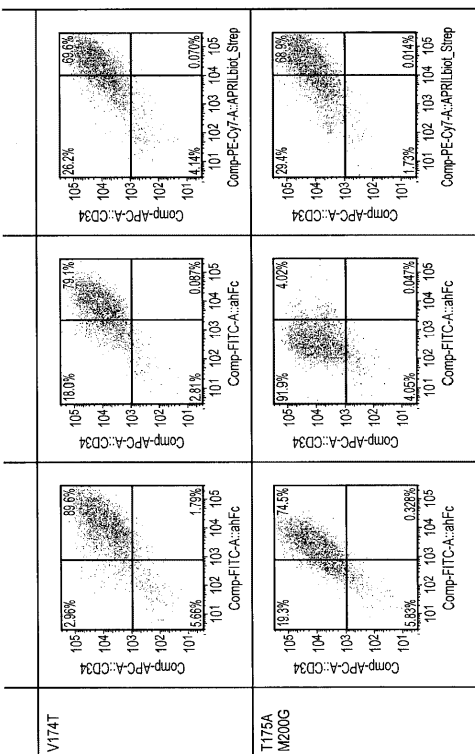


FIG. 12 (続き)

【図 12 E】

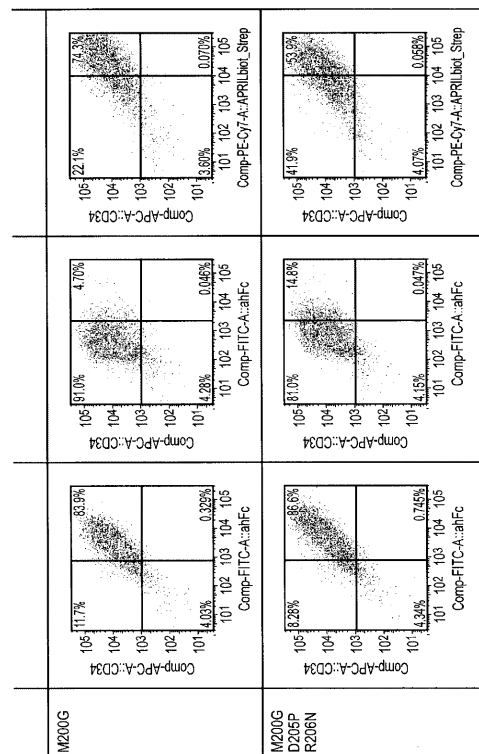


FIG. 12 (続き)

【図 12 F】

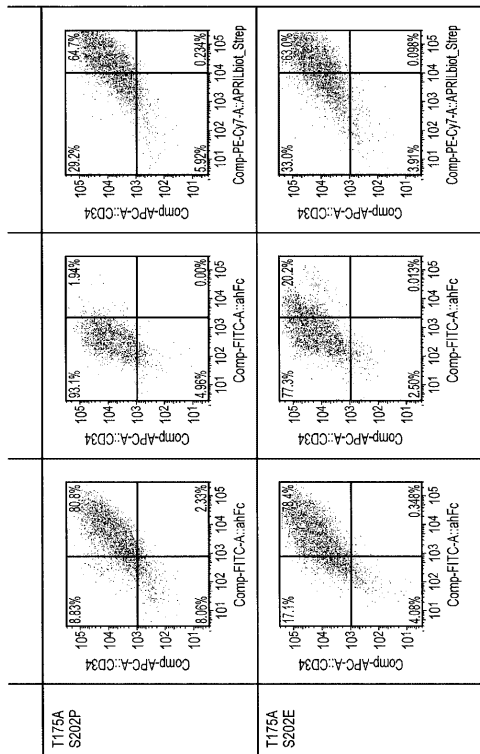


FIG. 12 (続き)

【図 13】

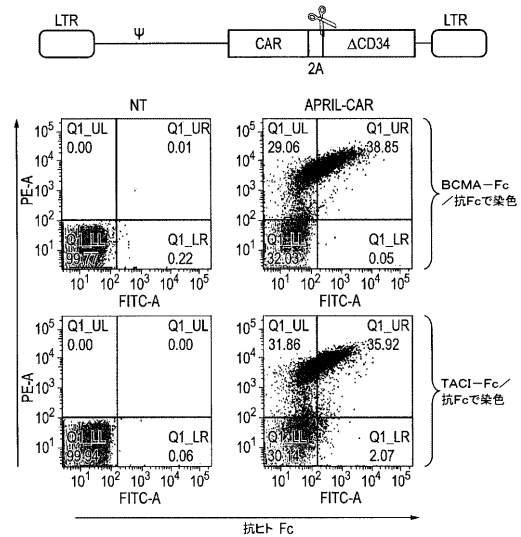


FIG. 13

【図 14】

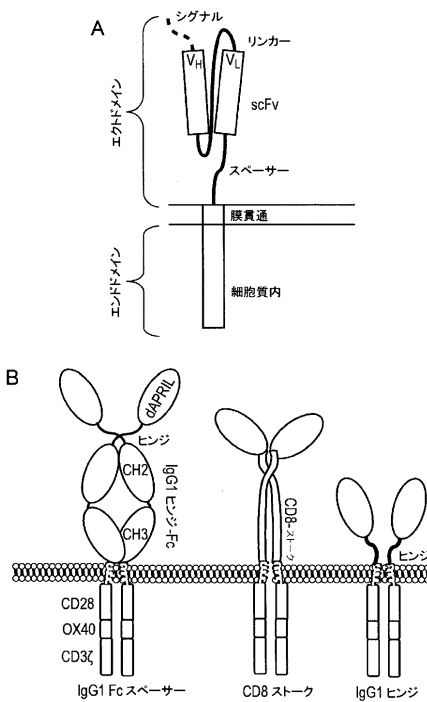


FIG. 14

【図 15】

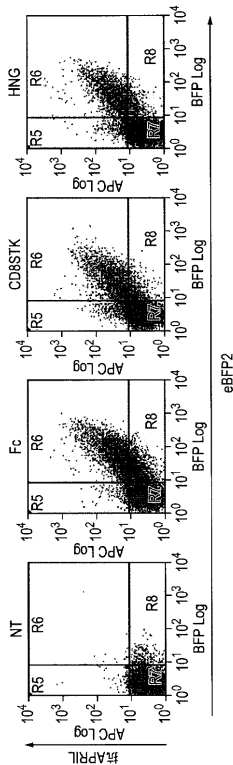


FIG. 15

【図 16】

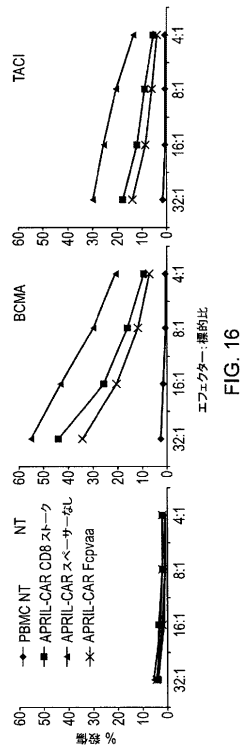


FIG. 16

【図 17】

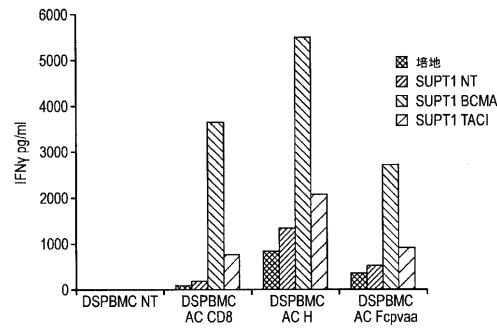


FIG. 17

【図 18】

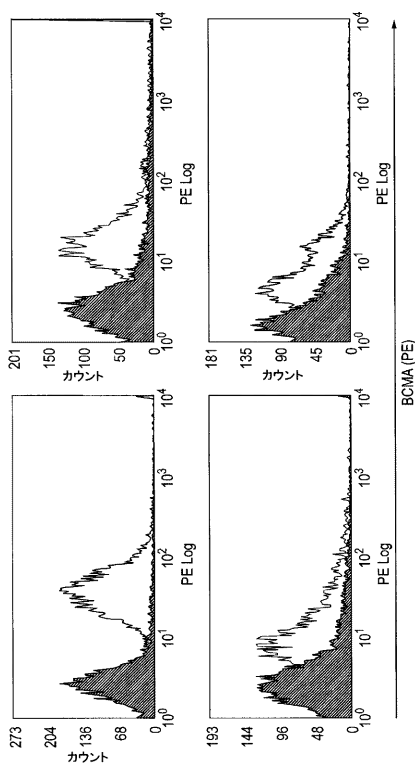


FIG. 18

【図 19】

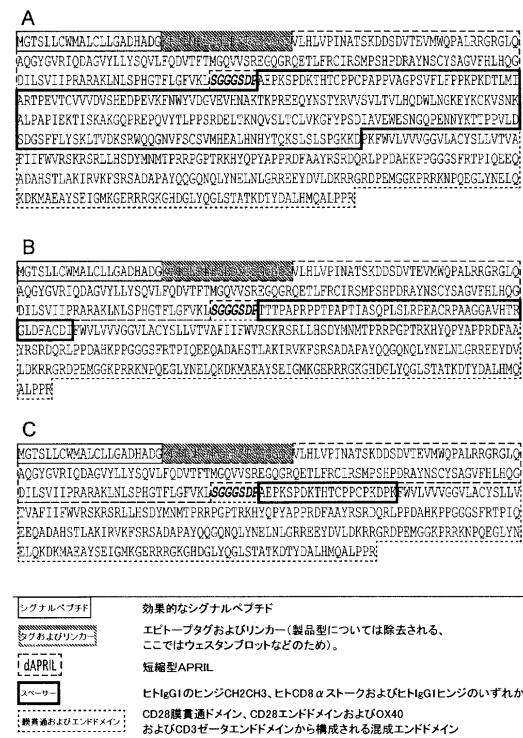


FIG. 19

【図 20 A】

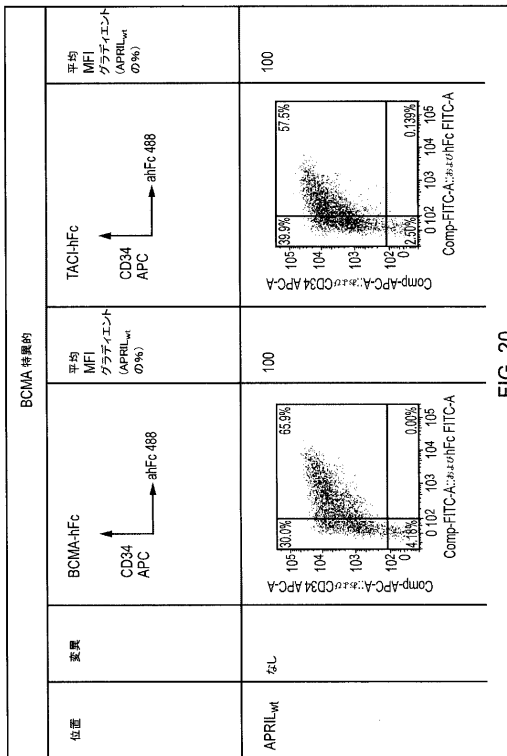


FIG. 20

【図 20 B】

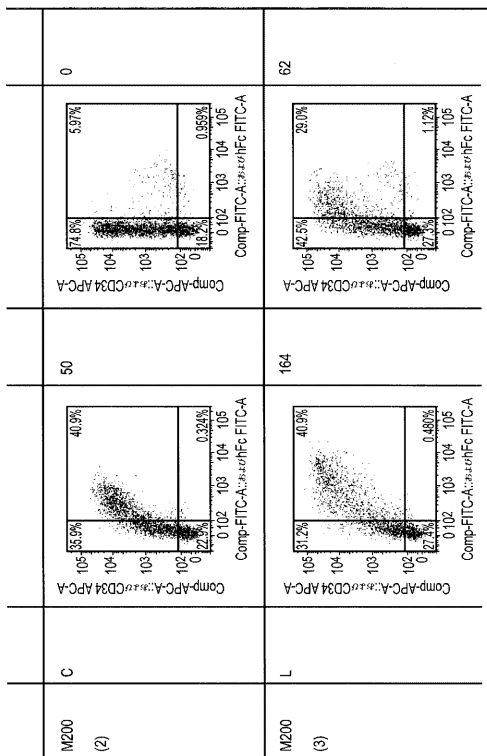


FIG. 20 (続き)

【図 20 C】

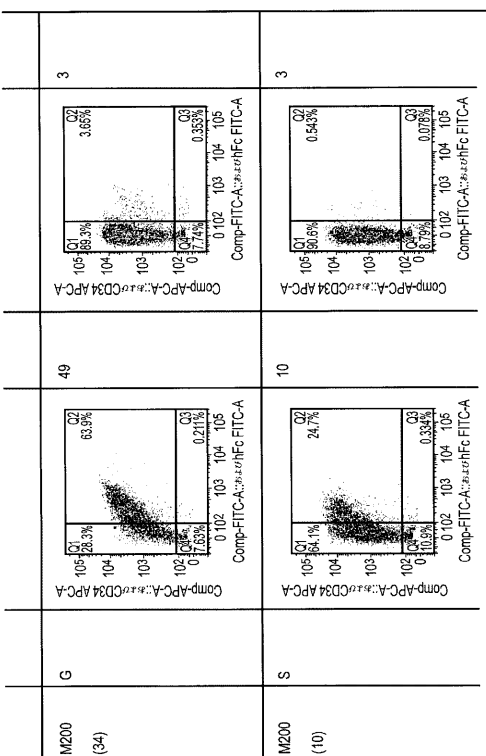


FIG. 20 (続き)

【図 20 D】

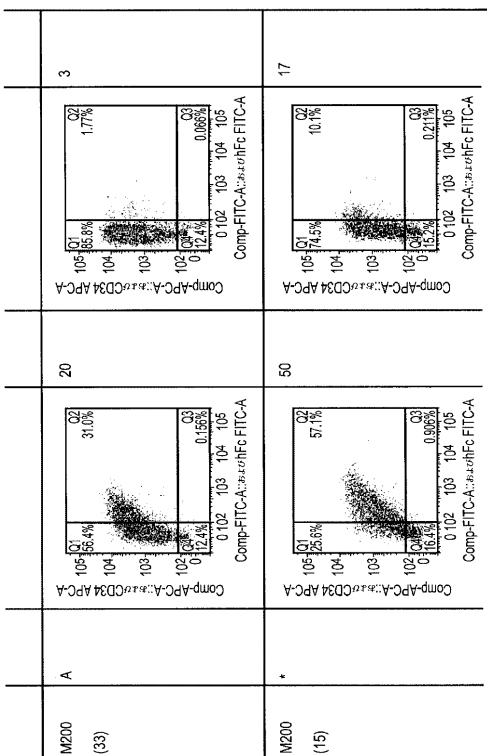


FIG. 20 (続き)

【図 20 E】

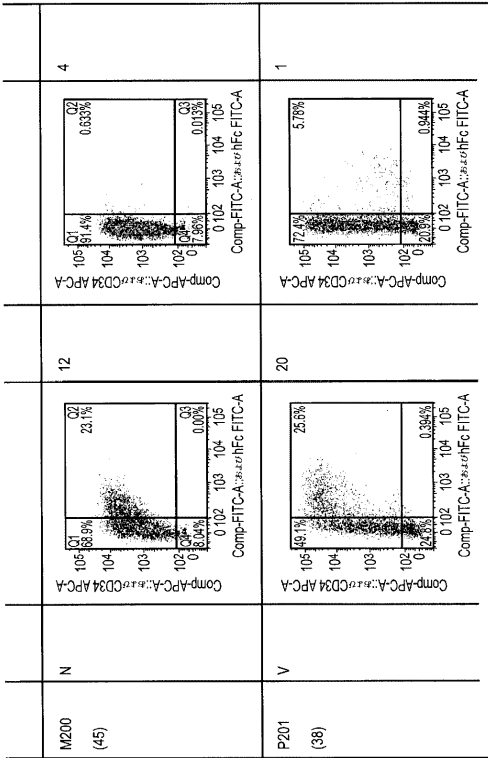


FIG. 20 (続き)

【図 20 F】

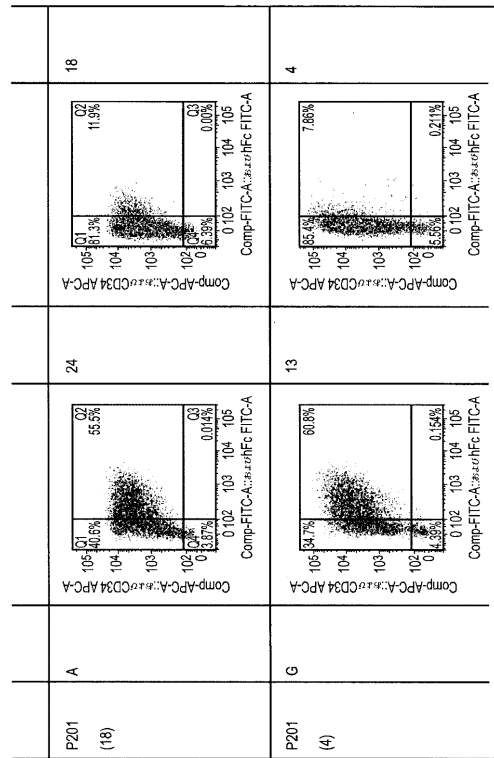


FIG. 20 (続き)

【図 20 G】

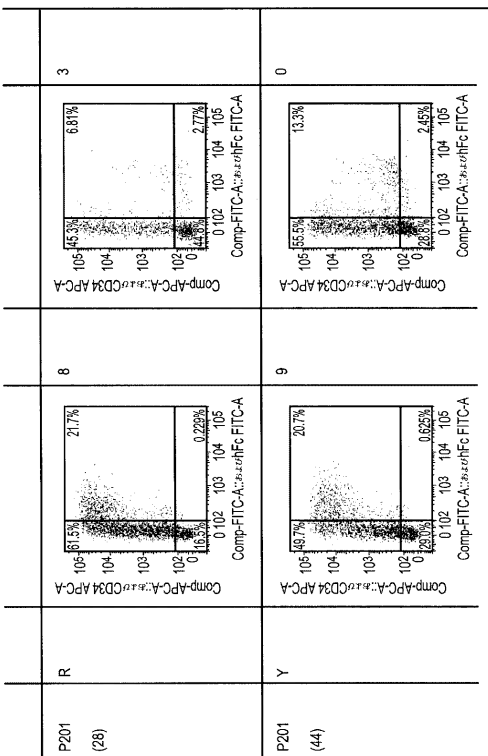


FIG. 20 (続き)

【図 20 H】

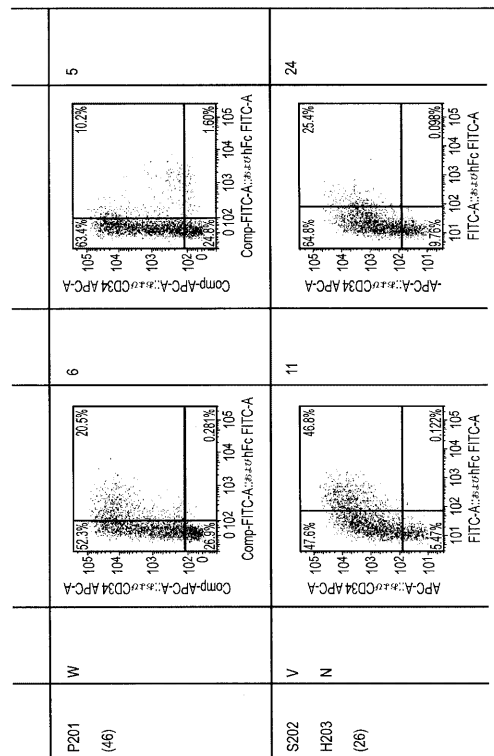


FIG. 20 (続き)

【図 20 I】

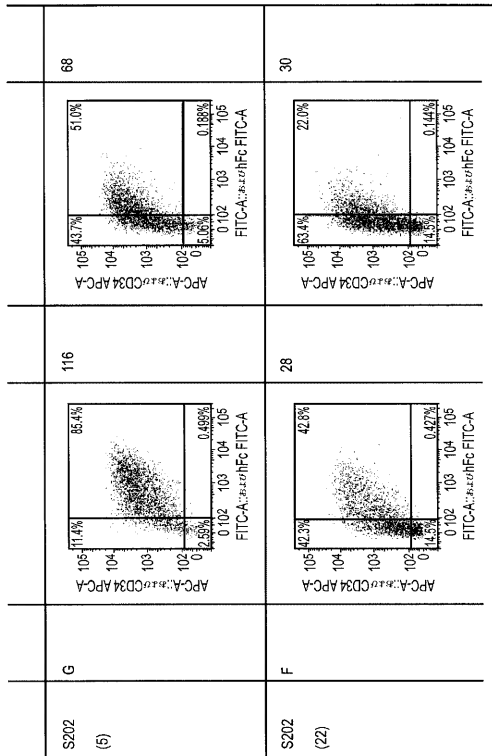


FIG. 20 (続き)

【図 20 J】

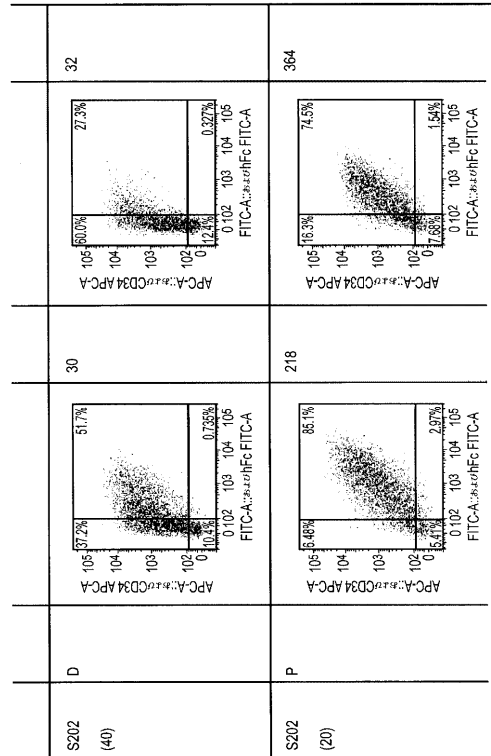


FIG. 20 (続き)

【図 20 K】

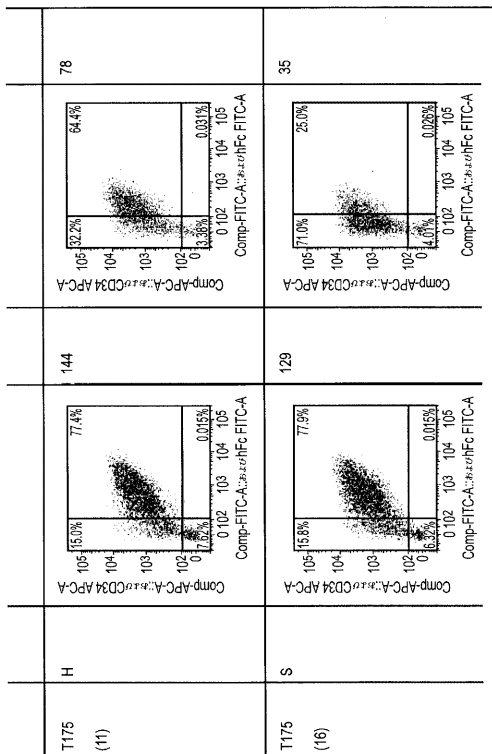


FIG. 20 (続き)

【図 20 L】

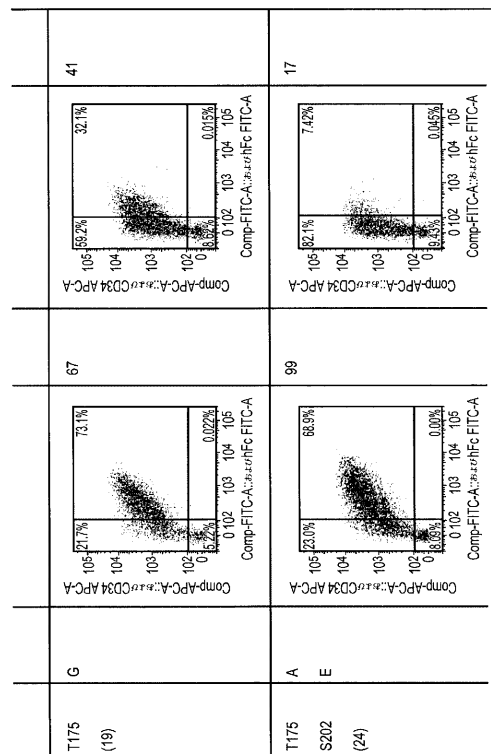


FIG. 20 (続き)

【図 20 M】

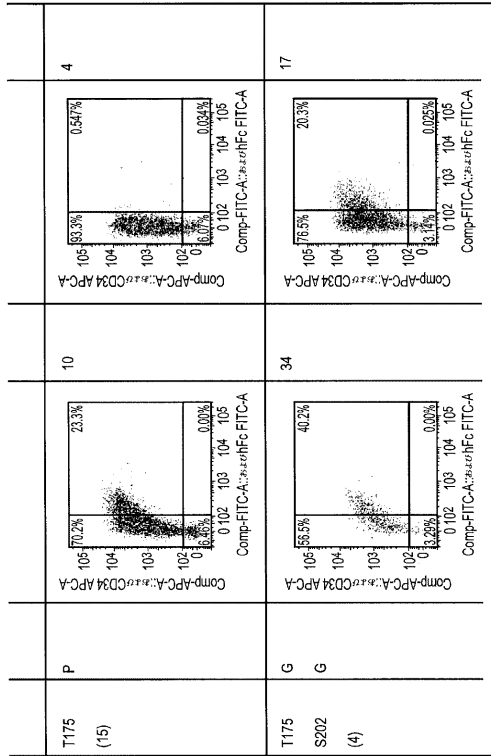


FIG. 20 (続き)

【図 20 N】

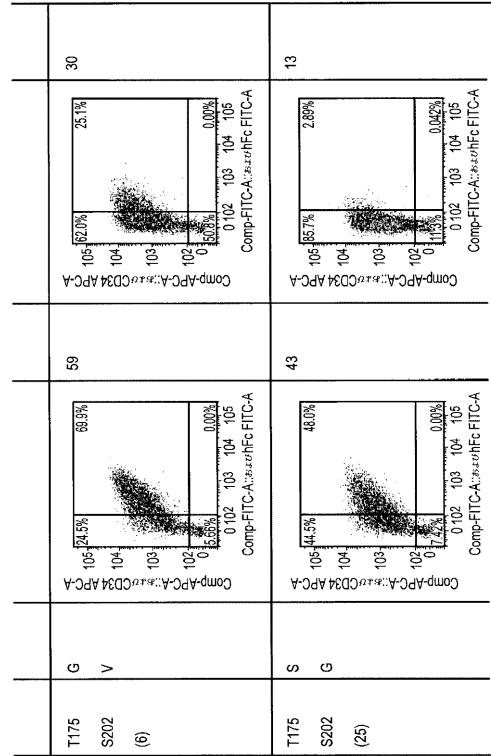


FIG. 20 (続き)

【図 20 O】

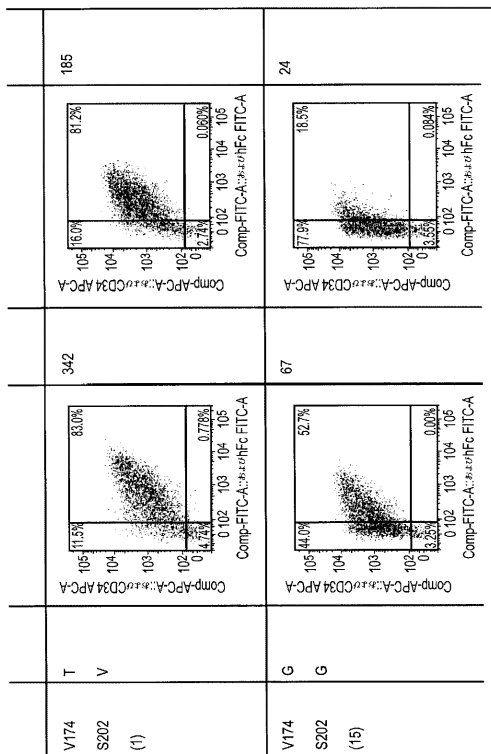


FIG. 20 (続き)

【図 20 P】

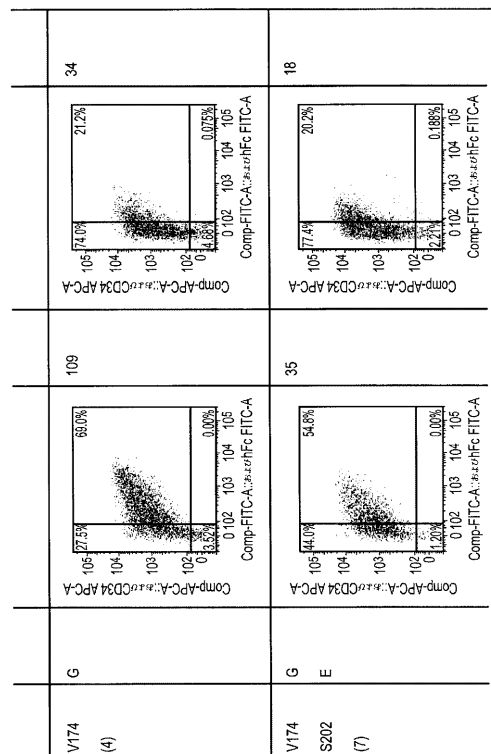


FIG. 20 (続き)

【図 20 Q】

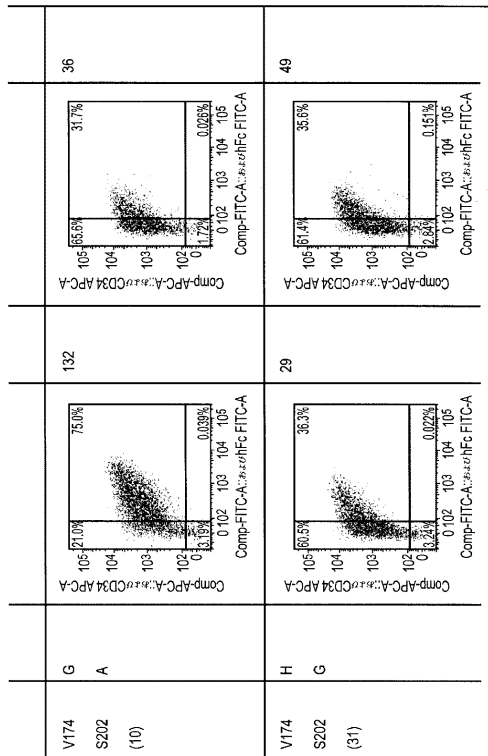


FIG. 20 (続き)

【図 20 R】

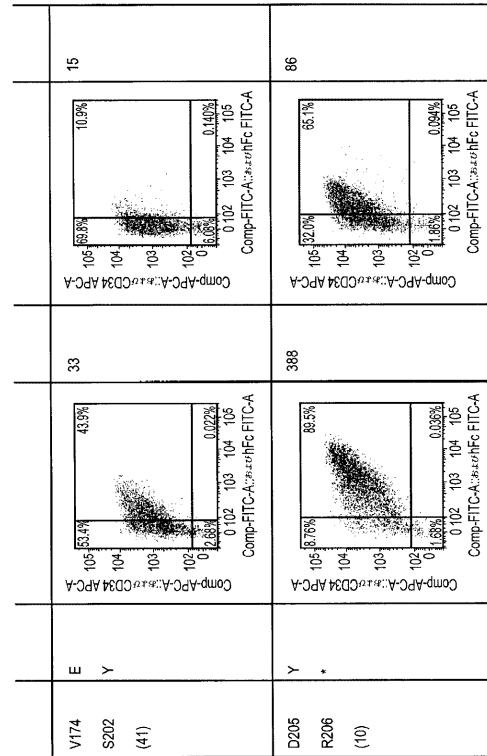


FIG. 20 (続き)

【図 20 S】

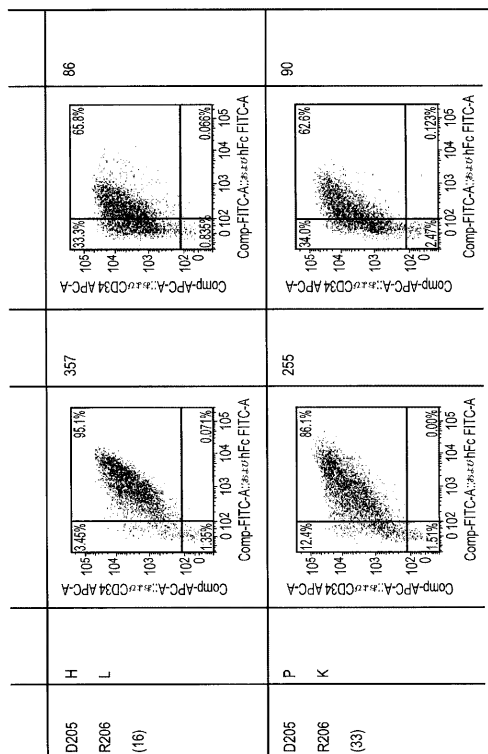


FIG. 20 (続き)

【図 20 T】

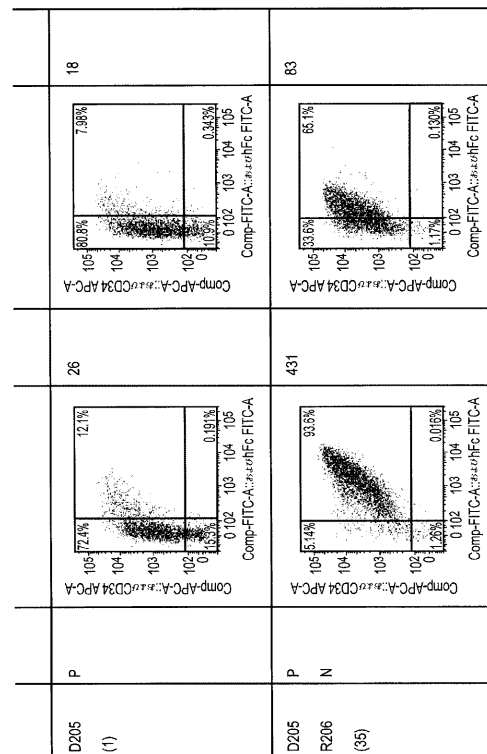


FIG. 20 (続き)

【図 20 U】

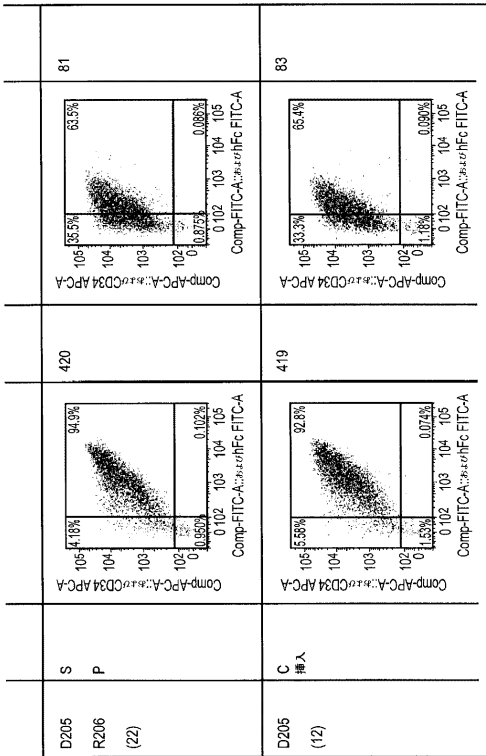


FIG. 20 (続き)

【図 20 V】

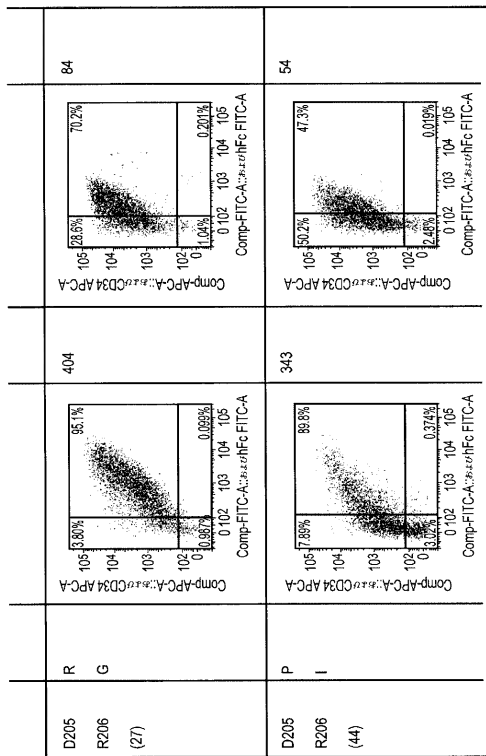


FIG. 20 (続き)

【図 20 W】

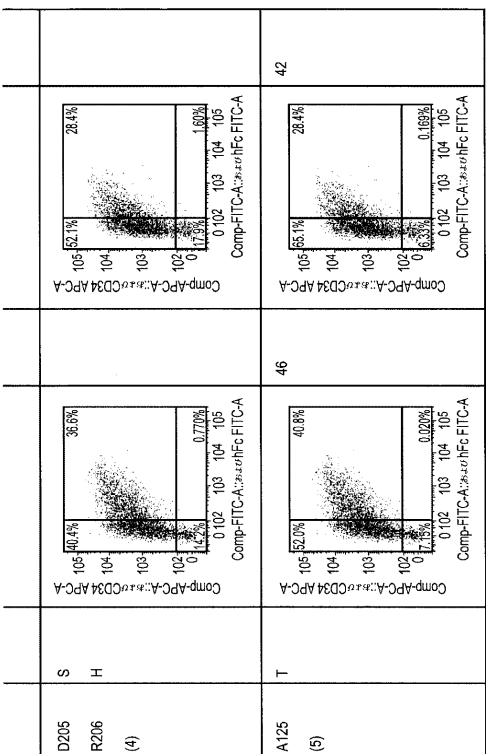


FIG. 20 (続き)

【図 21】

M200X (2)	491	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
M200C (3)	493	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
M200L (10)	401	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
M200S (15)	405	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
M200* (33)	406	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
M200A (33)	403	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
M200G (34)	402	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
M200N (45)	405	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
P201X (406.seq)	491	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
P201A-18 (406.seq)	408	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
P201Y-36 (406.seq)	405	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
P201W-46 (406.seq)	406	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
P201B-28 (406.seq)	406	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
P201Y-44 (406.seq)	406	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
S202X (406.seq)	491	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
S202G-5 (406.seq)	409	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
S202Z-20 (406.seq)	405	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
S202Z-24 (406.seq)	401	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
S202V_S203N-24 (406.seq)	398	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
S202D-40 (406.seq)	403	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175X (406.seq)	421	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175G_S202G-4 (406.seq)	337	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175G_S202V-6 (406.seq)	337	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175H-11 (406.seq)	335	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175H-15 (406.seq)	336	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175H-16 (406.seq)	335	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175G-19 (406.seq)	334	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175A_S202G-24 (406.seq)	333	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175G_S202G-25 (406.seq)	336	gctgggtgtacctgtgtactccagggtgctgtccaggagctgacacagcccccagacag
T175X (406.seq)	491	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175G_S202G-4 (406.seq)	407	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175G_S202V-6 (406.seq)	407	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175H-11 (406.seq)	405	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175H-15 (406.seq)	406	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175H-16 (406.seq)	405	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175G-19 (406.seq)	404	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175A_S202G-24 (406.seq)	403	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag
T175G_S202G-25 (406.seq)	406	gccccggggccaggccagacaggagaccctgtccgggtgcatccggagctgacacagcccccagacag

FIG. 21

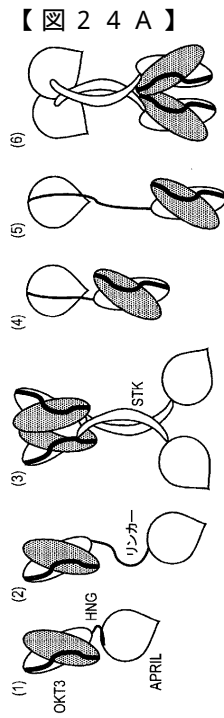


FIG. 24A

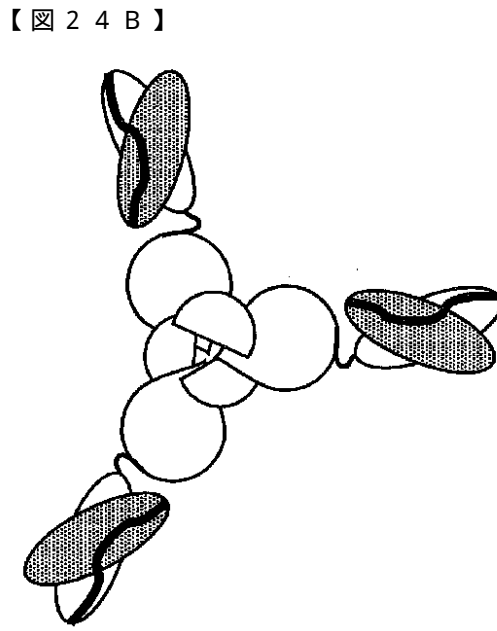


FIG. 24B

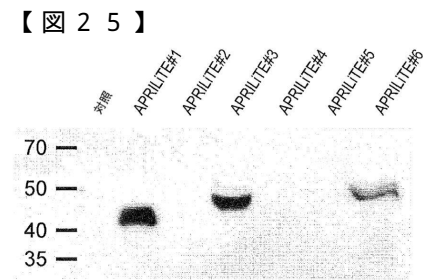
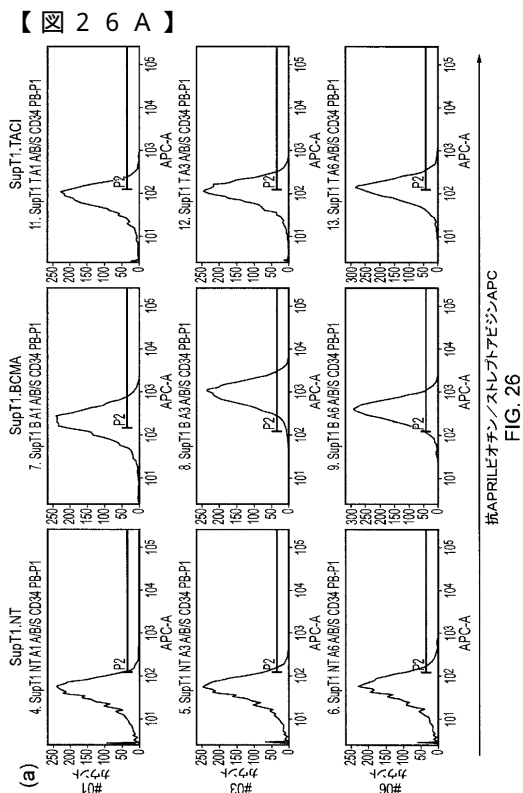


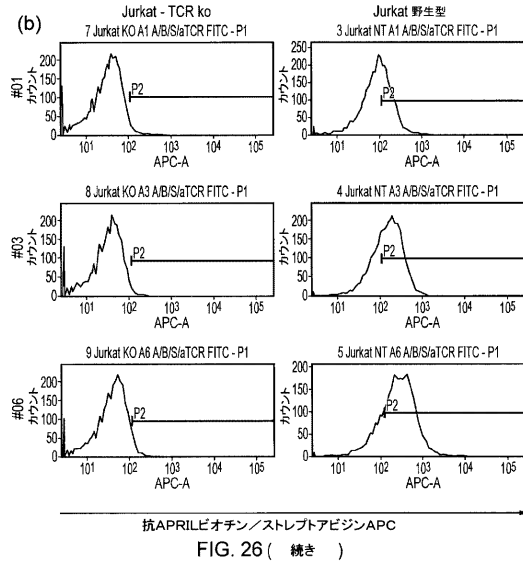
FIG. 25



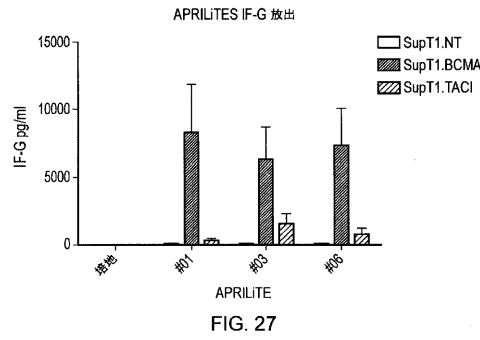
抗APRILITEオチン/ストレプトアビジンAPC

FIG. 26

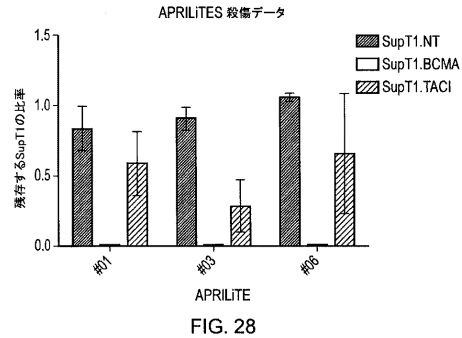
【図 26 B】



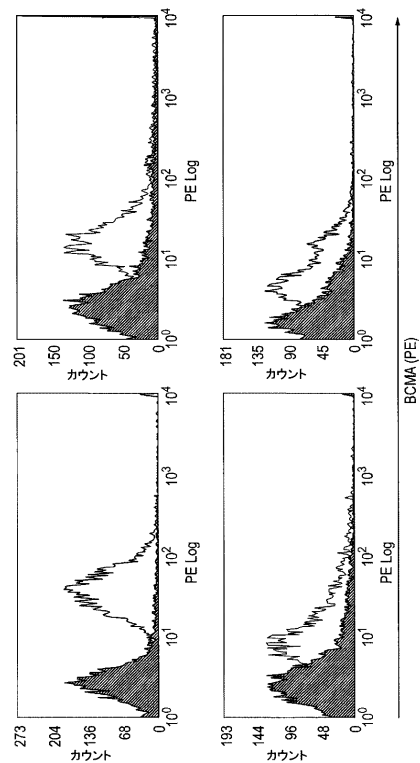
【図 27】



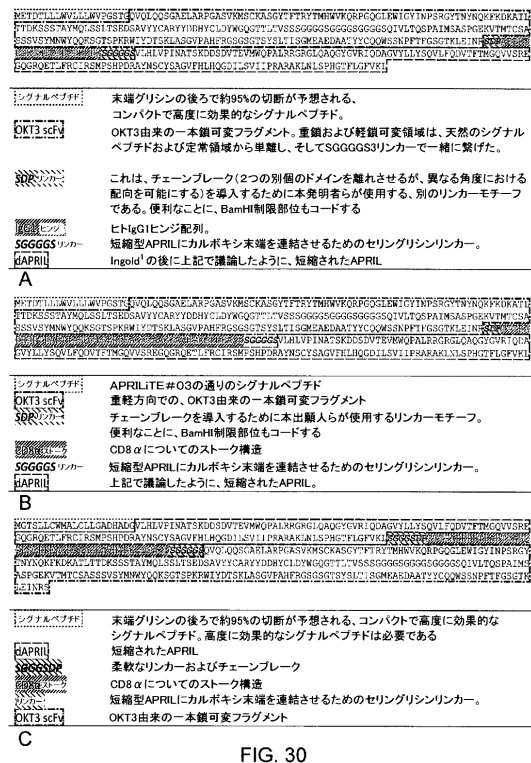
【図 28】



【図 29】



【図 30】



【図 3 1】

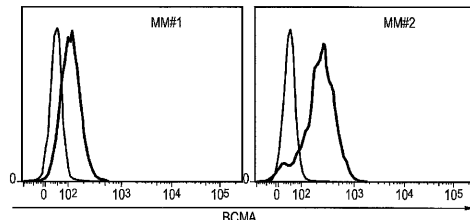


FIG. 31

【図 3 2】

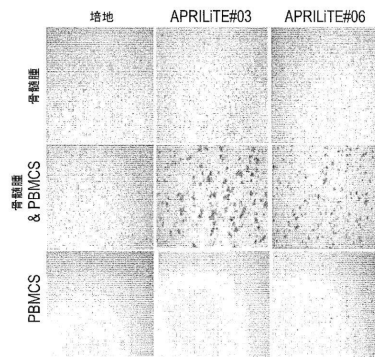


FIG. 32

【図 3 3】

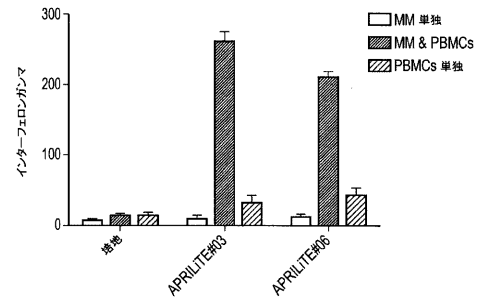


FIG. 33

【図 3 4】

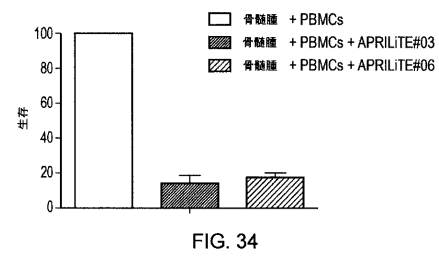


FIG. 34

【図 3 5】

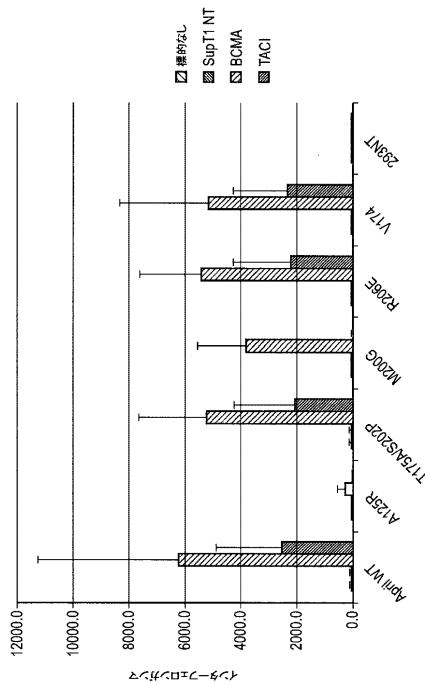


FIG. 35

【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	Z	
C 1 2 N 15/63 (2006.01)	C 1 2 N 15/63	Z	
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	
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 プーレ, 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 チャプリン, 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)

C12N 15/00 ~ 15/90

C07K 1/00 ~ 19/00

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII)

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

UniProt/GeneSeq