

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6557657号  
(P6557657)

(45) 発行日 令和1年8月7日(2019.8.7)

(24) 登録日 令和1年7月19日(2019.7.19)

(51) Int.Cl.

F 1

C07K 19/00	(2006.01)	C07K	19/00	Z N A
C07K 16/28	(2006.01)	C07K	16/28	
C07K 14/475	(2006.01)	C07K	14/475	
C12N 15/62	(2006.01)	C12N	15/62	Z
C12N 15/12	(2006.01)	C12N	15/12	

請求項の数 18 (全 27 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2016-521332 (P2016-521332)  
 (86) (22) 出願日 平成26年10月10日 (2014.10.10)  
 (65) 公表番号 特表2016-537966 (P2016-537966A)  
 (43) 公表日 平成28年12月8日 (2016.12.8)  
 (86) 國際出願番号 PCT/GB2014/053056  
 (87) 國際公開番号 WO2015/052536  
 (87) 國際公開日 平成27年4月16日 (2015.4.16)  
 審査請求日 平成29年9月11日 (2017.9.11)  
 (31) 優先権主張番号 1317928.8  
 (32) 優先日 平成25年10月10日 (2013.10.10)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
英國(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  
ーピー ロンドン, トッテナム コート  
ロード 97, ザ ネットワーク ビ  
ルディング  
(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】分子

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項1】

(i) B細胞成熟抗原 (BCMA) 結合部位を含むがプロテオグリカン結合に寄与するAPRILのアミノ末端部分を欠失した、短縮型増殖誘導リガンド(APRIL)を含む第一ドメイン；および

(ii) CD3特異的抗体またはその抗原結合部分を含み、かつ、T細胞表面においてCD3に結合すること、および、T細胞受容体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細胞を活性化することができる第二ドメイン

を含む二重特異性分子。

10

## 【請求項2】

前記第二ドメインは、

以下の重鎖相補性決定領域(CDR)：

CDR1：(配列番号3) K A S G Y T F T R Y T M H  
 CDR2：(配列番号4) I N P S R G Y T N Y N Q K F K D  
 CDR3：(配列番号5) Y Y D D H Y C L D Y、と

以下の軽鎖CDR：

CDR1：(配列番号6) S A S S S V S Y M N  
 CDR2：(配列番号7) R W I Y D T S K L A S  
 CDR3：(配列番号8) Q Q W S S N P F T、と

20

を含む、請求項 1 に記載の二重特異性分子。

【請求項 3】

前記第二ドメインは、配列番号 9 に示される s c F v 配列、または、配列番号 9 に示される s c F v に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有し、かつ C D 3 に結合するそのバリアントを含む、請求項 2 に記載の二重特異性分子。

【請求項 4】

配列番号 2 に示される配列、または B C M A と結合し、配列番号 2 に示される配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するそのバリアントを含む、請求項 1 に記載の二重特異性分子。

【請求項 5】

前記第一ドメインおよび第二ドメインは、スペーサーによって連結される、請求項 1 から 4 のいずれかに記載の二重特異性分子。

【請求項 6】

前記スペーサーは、I g G 1 ヒンジまたは C D 8 の柄を含む、請求項 5 に記載の二重特異性分子。

【請求項 7】

配列番号 10、11、もしくは 12 に示される配列、または、配列番号 10、11、もしくは 12 に示される配列に対して少なくとも 90 % の配列同一性を有するが、i ) B C M A に結合、および ii ) T 細胞を活性化する能力を保持するそれらのバリアントを含む、請求項 2 に記載の二重特異性分子。

【請求項 8】

三量体として B C M A に結合する、請求項 1 から 7 のいずれかに記載の二重特異性分子。

【請求項 9】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の二重特異性分子をコードする核酸。

【請求項 10】

配列番号 19、20、もしくは 21 に示される配列を含む、請求項 9 に記載の核酸。

【請求項 11】

請求項 9 または 10 に記載の核酸を含むベクター。

【請求項 12】

請求項 9 または 10 に記載の核酸を含み、かつ請求項 1 から 8 のいずれかに記載の二重特異性分子を産生する宿主細胞。

【請求項 13】

前記二重特異性分子が産生されるような条件下で、請求項 12 に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の二重特異性分子を産生する方法。

【請求項 14】

請求項 1 から 8 のいずれかに記載の二重特異性分子を、薬学的に許容できるキャリア、希釈剤、または添加物と一緒に含む薬学的組成物。

【請求項 15】

形質細胞障害を処置するための組成物であって、請求項 1 から 8 のいずれかに記載の二重特異性分子を含む、組成物。

【請求項 16】

前記形質細胞障害は、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 鎮病、意義不明の単クローニ性免疫グロブリン血症、および無症候性骨髄腫より選択される、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 17】

前記形質細胞障害は多発性骨髄腫である、請求項 15 に記載の組成物。

【請求項 18】

形質細胞障害を処置するための医薬の製造における、請求項 1 から 8 のいずれかに記載

10

20

30

40

50

の二重特異性分子の使用。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明はB細胞成熟抗原（BCMA）に結合し、かつT細胞を活性化させる、二重特異性分子に関する。この分子は、多発性骨髄腫などの形質細胞疾患の処置に有用である。

【背景技術】

【0002】

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球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、全てのがんの1%を占める。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。

【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、上昇した効果と、改善した長期間の効果を有する、骨髄腫の処置のための代替の薬剤への必要性が存在する。

【0005】

二重特異性抗体

2つの抗体様結合ドメインを有するという根本的な着想に基づく、広範に種々の分子が開発されてきた。

【0006】

二重特異性T細胞誘導分子は、初めは抗がん剤としての用途のために開発された、二重特異性抗体タイプの分子のクラスである。これらは、宿主の免疫システム、より具体的にはT細胞の細胞障害性活性を、がん細胞などの標的細胞に対して指向させる。これらの分子中で、一方の結合ドメインがCD3受容体を介してT細胞と結合し、他方は腫瘍細胞などの標的細胞に（腫瘍特異的分子を介して）結合する。二重特異的抗体は標的細胞とT細胞の両方に結合するため、標的細胞をT細胞の近くに引き寄せ、それによってT細胞が、例えばがん細胞に対する細胞障害性効果のような効果を発揮できる。T細胞：二重特異的抗体：がん細胞の複合体の形成は、T細胞中のシグナリングを誘導し、例えば細胞障害性メディエーターの放出を導く。理想的には、薬剤は標的細胞の存在下で望ましいシグナリングのみを誘導し、特異的な殺傷を導く。

【0007】

二重特異性T細胞誘導分子は多数の異なる形式で開発されているが、最も一般的なもののは1つは、異なる抗体の2つの単鎖可変フラグメント（scFv）からなる融合物である。これらは時にBiTE（二重特異性T細胞誘導抗体）として知られる。

【0008】

WO 2012 / 066058およびWO 2013 / 072415はいずれも、B細胞成熟抗原（BCMA）に結合するscFvを含むBiTEについて記載する。

【0009】

BCMAは、成熟リンパ球、すなわち記憶B細胞、形質芽細胞、および骨髄形質細胞において優先的に発現している膜貫通タンパク質である。BCMAは多発性骨髄腫細胞でもまた発現している。

【0010】

10

20

30

40

50

B C M A は多発性骨髄腫の処置のために見込みがある標的抗原であるが、古典的なターゲティングの手法は、骨髄腫細胞上での低密度な B C M A の発現により制限される。結果的に、古典的な治療抗体は、骨髄腫細胞表面で効果的な A D C C / C D C 活性を引き起こすのに十分な密度を達成しそうにない。同様に、m A b と毒または化学療法薬とのコンジュゲートは、標的とされた取り込みと非特異的な取り込みとの間の小さな相異のため、有用な治療の窓口をもたらしそうにない。

#### 【0011】

そのため、低い B C M A 密度を、効果的な治療活動へと識別することができる、代替の薬剤の必要性がある。

特定の実施形態では、例えば以下が提供される：

10

##### (項目1)

(i) B 細胞成熟抗原 (B C M A) と結合し、かつ増殖誘導リガンド (A P R I L) の少なくとも一部を含む第一ドメイン；および

(ii) T 細胞活性化能を有する第二ドメインを含む二重特異性分子。

##### (項目2)

前記第二ドメインは、T 細胞表面において C D 3 に結合することによって T 細胞を活性化する、項目1に記載の二重特異性分子。

##### (項目3)

前記第二ドメインは、C D 3 特異的抗体またはその一部を含む、項目2に記載の二重特異性分子。

20

##### (項目4)

前記第二ドメインは、配列番号9に示される s c F v 配列由来の相補性決定領域 (C D R) を含む、項目3に記載の二重特異性分子。

##### (項目5)

前記第二ドメインは、配列番号9に示される s c F v 配列、または少なくとも 80 % の配列相同性を有し、かつ C D 3 に結合するそのバリアントを含む、項目3に記載の二重特異性分子。

##### (項目6)

前記第一ドメインは、B C M A 結合部位を含むが、プロテオグリカン結合に寄与する A P R I L のアミノ末端の一部を欠失した短縮型 A P R I L を含む、前述のいずれかの項目に記載の二重特異性分子。

30

##### (項目7)

配列番号2に示される配列、または B C M A と結合し、少なくとも 80 % の配列同一性を有するそのバリアントを含む、項目2に記載の二重特異性分子。

##### (項目8)

前記第一および第二結合ドメインは、スペーサーによって連結される、前述のいずれかの項目に記載の二重特異性分子。

##### (項目9)

前記スペーサーは、I g G 1 ヒンジまたは C D 8 の柄を含む、項目8に記載の二重特異性分子。

40

##### (項目10)

配列番号10、11、もしくは12に示される配列、または少なくとも 80 % の配列同一性を有するが、i) B C M A に結合、および ii) T 細胞を活性化する能力を保持するこれらのバリアントを含む、前述のいずれかの項目に記載の二重特異性分子。

##### (項目11)

三量体として B C M A に結合する、前述のいずれかの項目に記載の二重特異性分子。

##### (項目12)

前述のいずれかの項目に記載の二重特異性分子をコードする核酸配列。

##### (項目13)

50

配列番号 19、20、もしくは 21 に示される配列、または少なくとも 80 % の配列同一性を有するそれらのバリエントを含む、項目 12 に記載の核酸配列。

(項目 14)

項目 12 または 13 に記載の核酸配列を含むベクター。

(項目 15)

項目 12 または 13 に記載の核酸配列を含み、かつ項目 1 から 11 のいずれかに記載の二重特異性分子を產生する宿主細胞。

(項目 16)

前記二重特異性分子が產生されるような条件下で、項目 15 に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、項目 1 から 11 のいずれかに記載の二重特異性分子を產生する方法。

10

(項目 17)

項目 1 から 11 のいずれかに記載の二重特異性分子を、薬学的に許容できるキャリア、希釈剤、または添加物と一緒に含む薬学的組成物。

(項目 18)

項目 1 から 11 のいずれかに記載の二重特異性分子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。

(項目 19)

前記形質細胞障害は、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 鎮病、意義不明の単クローナル性免疫グロブリン血症、および無症候性骨髄腫より選択される、項目 18 に記載の方法。

20

(項目 20)

前記形質細胞障害は多発性骨髄腫である、項目 18 に記載の方法。

(項目 21)

形質細胞障害の処置における使用のための、項目 1 から 11 のいずれかに記載の二重特異性分子。

(項目 22)

形質細胞障害を処置するための医薬の製造における、項目 1 から 11 のいずれかに記載の二重特異性分子の使用。

30

(項目 23)

第一結合ドメインおよび第二結合ドメインを含む二重特異性分子であって、前記第一および第二結合ドメインは、スペーサーによって連結され、前記スペーサーは、CD8 の柄であるか、またはそれを含む、二重特異性分子。

(項目 24)

前記第一結合ドメインは標的分子に結合し、かつ前記第二結合ドメインは T 細胞活性化能を有する、項目 23 に記載の二重特異性分子。

(項目 25)

前記スペーサーは、配列番号 16 に示される配列もしくはそのバリエントを含む、またはそれからなる、項目 23 または 24 に記載の二重特異性分子。

40

(項目 26)

前記スペーサーが前記二重特異性分子のホモ二量体化を引き起こす、項目 23 から 25 のいずれかに記載の二重特異性分子。

(項目 27)

項目 23 から 26 のいずれかに記載の二重特異性分子のホモ二量体型。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【特許文献 1】国際公開第 2012 / 066058 号

【特許文献 2】国際公開第 2013 / 072415 号

【発明の概要】

50

**【課題を解決するための手段】****【0013】****本発明の態様の概要**

B細胞膜抗原（BCMA）は、ほとんど全ての多発性骨髄腫（MM）で発現する表面タンパク質である。BCMAは形質細胞でない限り発現していないため、この抗原を標的とすることは、骨髄腫の効果的な処置となり得る。しかしながらBCMAの低レベルな発現は、この抗原を標的とするときの検討事項である。

**【0014】**

本発明者らは、二重特異性T細胞活性化（BTA）分子に、増殖誘導リガンド（APRIL）に基づく結合ドメインを使用する場合、BCMA結合抗体よりもむしろその分子は骨髄腫細胞の存在下でT細胞の活性化を引き起こす能力を有することを、驚いたことに発見している。10

**【0015】**

理論に拘束されることを望むわけではないが、本発明者らは、これは本発明の二重特異性分子が、3回対称でBCMAに結合するためであると予想している：すなわち、BCMAと本発明のBTAとの相互作用は、それぞれの結合パートナーの三量体化を必要とする（図2Bを参照）。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する。

**【0016】**

古典的なBiotEの方法を用いると、T細胞活性化は、十分な数のCD3/TCR複合体がBiotEによって結合されたときのみに生じる。これは今度は標的細胞上の抗原密度に依存する。T細胞活性化カスケードを引き起こすための閾値を超えるために、十分な結合が生じなければならない。結合が不十分な場合は、例えば、標的細胞上の標的抗原の発現レベルが少なすぎるために、この閾値は満たされず、そしてT細胞活性化は生じない。20

**【0017】**

本発明の二重特異性分子では、標的細胞上のBCMA分子の発現が、本発明の3つの二重特異性分子が集合することを引き起こし、T細胞活性化のための3つのCD3結合ドメインを提供する。本発明の二重特異性分子が二量体として存在する実施形態では（例えばCD8の柄（stalk）を含む実施例、図2(a)(3)を参照）、BTAは、それぞれの結合したBCMAにつき2つのCD3/TCR複合体をリクルートすることができ、これによりよりこのシグナルの増幅を更に高めている。この化学量は、T細胞の活性化を導くためのCD3結合の閾値レベルを提供するのに十分である。30

**【0018】**

そのため、第一の態様において、本発明は、：

(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ドメイン；および

(ii) T細胞を活性化することのできる第二ドメインを含む二重特異性分子を提供する。

**【0019】**

第二ドメインは、T細胞表面のCD3に結合することによってT細胞を活性化させ得る。この点で、第二ドメインはCD3またはTCR特異的な抗体またはその一部を含み得る。

**【0020】**

第二ドメインは、配列番号9に示されるscFv由来の相補性決定領域（CDR）を含み得る。

**【0021】**

第二ドメインは、配列番号9に示されるものなどのscFv配列を含み得る。第二ドメインは、少なくとも80%の配列同一性を有し、かつCD3と結合する、そのような配列のバリエントを含み得る。

**【0022】**

10

20

30

40

50

第一ドメインは、B C M A 結合部位を含むが、プロテオグリカン結合に寄与するA P R I Lのアミノ末端部分を欠失した、短縮型A P R I Lを含み得る。そのような分子は配列番号2に示される配列を含み得る。代替的にその分子は、B C M Aと結合する、少なくとも80%の配列同一性を有する、その配列のバリエントを含み得る。

## 【0023】

第一および第二結合ドメインは、Ig G 1 ヒンジ、セリン - グリシンリンカー、またはC D 8 の柄を含むスペーサーなどのスペーサーによって連結され得る。

## 【0024】

スペーサーは、例えばスペーサー中の、これが、同じスペーサーを含む別の分子とジスルフィド結合を形成できる1つまたは複数のシステイン残基の存在のため、B T A のホモ二量体形成を引き起こし得る。10

## 【0025】

二重特異性分子は、配列番号10、11、もしくは12に示される配列、または、少なくとも80%の配列同一性を有するが、i) B C M A に結合する、およびii) T細胞を活性化する能力を保持するそのバリエントを含み得る。

## 【0026】

二重特異性分子は、形質細胞表面のB C M AのようなB C M Aに三量体として結合し得る。

## 【0027】

第二の態様において、本発明は、本発明の第一の態様に記載の二重特異性分子をコードする核酸配列を提供する。20

## 【0028】

核酸配列は、配列番号19、20、もしくは21に示される配列、または少なくとも80%の配列同一性を有するそのバリエントを含み得る。

## 【0029】

第三の態様において、本発明は、本発明の第二の態様に記載の核酸配列を含むベクターを提供する。

## 【0030】

第四の態様において、本発明は、本発明の第二の態様に記載の核酸配列を含み、本発明の第一の態様に記載の二重特異性分子を産生する宿主細胞を提供する。30

## 【0031】

第五の態様において、本発明は、二重特異性分子が産生されるような条件下で、本発明の第四の態様に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、本発明の第一の態様に記載の二重特異性分子を産生する方法を提供する。

## 【0032】

第六の態様において、本発明は、本発明の第一の態様に記載の二重特異性分子を、薬学的に許容できるキャリア、希釈剤、または添加物と共に含む薬学的組成物を提供する。

## 【0033】

第七の態様において、本発明は、本発明の第一の態様に記載の二重特異性分子を被験体へ投与する工程を含む、形質細胞障害を治療する方法を提供する。40

## 【0034】

形質細胞障害は、例えば形質細胞腫、形質細胞性白血病、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症、アミロイドーシス、ワルデンストレーム型マクログロブリン血症、孤立性骨形質細胞腫、髄外性形質細胞腫、骨硬化性ミエローマ、H鎖病、意義不明の単クローナル性免疫グロブリン血症または無症候性骨髄腫であり得る。

## 【0035】

形質細胞障害は、多発性骨髄腫であり得る。

## 【0036】

第八の態様において、本発明は、形質細胞障害の治療における使用のための、本発明の第一の態様に記載の二重特異性分子を提供する。50

## 【0037】

第九の態様において、本発明は、本発明の第一の態様に記載の二重特異性分子の、形質細胞障害を治療するための医薬品の製造における使用を提供する。

## 【0038】

第十の態様において、本発明は、第一結合ドメインおよび第二結合ドメインを含む二重特異性分子を提供し、ここでこの第一および第二結合ドメインは、CD8の柄であるかまたはそれを含むスペーサーによって連結されている。

## 【図面の簡単な説明】

## 【0039】

【図1】BAFFとAPRILのリガンド特異性と機能割り当て BAFFはBAFF-R、BCMA、およびTACIと相互作用し、一方でAPRILはBCMA、TACI、およびプロテオグリカンと相互作用する。BAFF-R活性化は、末梢B細胞の生存に影響を及ぼし、一方でBCMAは形質細胞の生存に影響を及ぼし得る。APRILのプロテオグリカンとの相互作用は、APRILの酸性硫酸化グリコサミノグリカン側鎖アミノ末端に関係する。

【図2A】A：デザインされ構築された異なる形式 (1) IgG1ヒンジによって短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；(2)(SGGGGS)3リンカーを介して短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；(3)CD8の柄を介して短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；(4)IgG1ヒンジを介してOKT3と連結した短縮型APRIL；(5)(SGGGGS)3リンカーを介してOKT3 scFvと連結した短縮型APRIL；(6)CD8スペーサーを介してOKT3 scFvと連結した短縮型APRIL。コンストラクト(3)および(6)は、CD8スペーサー中のジスルフィド結合を通じてホモ二量体を形成する。B：APRILiTEに結合した状態での細胞間接触面の分子集合の概念図。

【図2B】A：デザインされ構築された異なる形式 (1) IgG1ヒンジによって短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；(2)(SGGGGS)3リンカーを介して短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；(3)CD8の柄を介して短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；(4)IgG1ヒンジを介してOKT3と連結した短縮型APRIL；(5)(SGGGGS)3リンカーを介してOKT3 scFvと連結した短縮型APRIL；(6)CD8スペーサーを介してOKT3 scFvと連結した短縮型APRIL。コンストラクト(3)および(6)は、CD8スペーサー中のジスルフィド結合を通じてホモ二量体を形成する。B：APRILiTEに結合した状態での細胞間接触面の分子集合の概念図。

【図3】異なるAPRILiTEコンストラクトをトランスフェクションされた293T細胞由来の上清のウェスタンプロット。プロッティングは、抗APRILを用いて行った。

【図4a】APRILiTE1、3、および6の、野生型SupT1細胞、およびBCMAおよびTACIを発現するように改変したSupT1細胞への結合。染色は抗APRILビオチン/ストレプトアビシン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4b】野生型JurkatへのAPRILiTEの結合、しかしT細胞受容体のないJurkatへは除いて。これは、APRILiTEがT細胞受容体に結合することを実証する。

【図5】プランクの培地または3つのAPRILiTE存在下で、T細胞と何も導入していないか、または改変したSupT1細胞との1:1共培養。

【図6】APRILiTE1、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7】初代骨髄腫でのBCMA発現の例。ラット抗ヒトBCMA mAb Vicki 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(骨

10

20

30

40

50

髓腫の異常であり、進行した、かつ侵襲性の形態)患者での明瞭なBCMAの染色を示す。他の3つの症例は医学的かつ形態的に典型的な骨髓腫である。これらは典型的に見られる中間的または曇った染色を示す。アイソタイプ対照(灰色)での染色を重ね合わせている。

【図8a】APRILiTEのアミノ酸配列A:APRILiTE#01;B:APRILiTE#03;C:APRILiTE#06

【図8b】APRILiTEのアミノ酸配列A:APRILiTE#01;B:APRILiTE#03;C:APRILiTE#06

【図8c】APRILiTEのアミノ酸配列A:APRILiTE#01;B:APRILiTE#03;C:APRILiTE#06

【図9】アイソタイプ対照の上に重ねたBCMAでの骨髓腫サンプルの染色。これらの骨髓腫細胞はBCMAを発現するが、ただし低いレベルである。

【図10】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、骨髓腫細胞と培養したときに、T細胞の透明な凝集/活性化を見ることができる。

【図11】骨髓腫細胞単独、末梢血T細胞との共培養の両方共に、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12】培養液中での骨髓腫細胞の共培養6日目での生存率。試験した両方のAPRILiTEは、PBMCの存在下で初代骨髓腫細胞の効果的な殺傷をもたらす。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0040】

###### 詳細な説明

###### B細胞膜抗原(BCMA)

本発明の第一の態様の二重特異性分子は、B細胞成熟抗原(BCMA)に結合する第一ドメインを含む。

##### 【0041】

BCMA(TNFRSF17としても公知)は、専らB系列造血細胞または樹状細胞において発現する、形質細胞特異的表面抗原である。これはTNF受容体ファミリーの一員である。BCMAはナイーブB細胞では発現されないが、形質細胞芽へのB細胞分化の間にはアップレギュレートされ、記憶B細胞、形質細胞芽、および骨髓形質細胞では明瞭に発現される。BCMAは、初代骨髓腫細胞の大部分においても発現される。

##### 【0042】

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受容体は、活性化T細胞および全てのB細胞で見出されるBCMA-TACI(TNFRSF13B)、ならびにBリンパ球で優先的に発現するBAFF-R(TNFRSF13C)と、リガンドAPRILおよびBCMAを共有する。多発性骨髓腫細胞は、いくつかの症例においてはTACIを、そしてほとんどの症例においてはBCMAを発現するが、BAFF-Rは全く発現しない。

##### 【0043】

###### APRIL

本発明の二重特異性分子の第一ドメインは、増殖誘導リガンド(APRIL)の少なくとも一部を含む。APRILはTNFSF13としても公知される。

##### 【0044】

APRILの野生型配列は、UNIPROT/O75888で入手でき、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ンパク質ではない。これはフーリン切断部位"KQKKQQ" (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。

##### 【0045】

第一結合ドメインは、APRILのBCMA結合部位を含み得る。第一結合ドメインは、BCMA結合部位を含むAPRILの断片を含み得る。

##### 【0046】

10

20

30

40

50

第一結合ドメインは、分子のアミノ末端を欠失した、短縮型 A P R I L を含み得る。短縮型 A P R I L は、B C M A および T A C I 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 A P R I L は、フーリン切断部位、またはその直後で切斷され得る。短縮型 A P R I L は、配列番号 2 で示される野生型 A P R I L 分子からアミノ末端 116 アミノ酸を欠失し得る。短縮型 A P R I L は、配列番号 2 で示される配列（太字で示される配列番号 1 の一部に対応する）、またはそのバリエントを含み得る。これは、B C M A および T A C I 結合に必要とされる分子の一部に対応する。

## 【化 1】

## 配列番号 1

10	20	30	40	50	60	10
MPASSPFLLA PKGPPGNMGG PVREPALSVA LWLSWGAALG AVACAMALLT QQTELQSLRR						
70	80	90	100	110	120	
EVSRLOQGTGG PSQNGEGYPW QSLPEQSSDA LEAWENGERS RKRRAVLT <u>QK</u> <u>KQH</u> SVL <u>HL</u>						
130	140	150	160	170	180	
VPINATSKDD SDVTEVMNQP ALRRGRGLQA QGYGVRIQDA GYVLLYSQVL FQDVTFETMGQ						
190	200	210	220	230	240	20
VVSREGQGRQ ETLFRCIRSM PSHPDRAYNS CYSAGVFHLH QGDILSVIIP RARAKLNLS						
						250
HGTFLGFVKL						

## 【化 2】

## 配列番号 2

VLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQ						
DVTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVII						30
PRARAKLNLSPHGTFLGFVKL						

## 【0047】

本発明の二重特異性分子は、少なくとも 80 % のアミノ酸配列同一性を有し、かつ同等または改良された B C M A 結合能を有する、配列番号 2 に示される短縮型 A P R I L のバリエントを含み得る。そのバリエント配列は、配列番号 2 に対して、少なくとも 80 %、85 %、90 %、95 %、98 %、または 99 % の配列同一性を有し得る。

## 【0048】

2つのポリペプチド配列間の同一性パーセンテージは、h t t p : / / b l a s t . n c b i . n l m . n i h . g o v . において自由に入手できる B L A S T などのプログラムによって容易に決定され得る。						40
--	--	--	--	--	--	----

## 【0049】

## T 細胞活性化

本発明の分子の第二ドメインは、T 細胞活性化能を有する。T 細胞は、抗原提示細胞の表面上で M H C 分子によって提示されたときに、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、これが更なるキナーゼのリクルートを引き起こし、C a<sup>2+</sup> の放出を含む T 細胞活性化をもたらす。

## 【0050】

第二ドメインは、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						50
--	--	--	--	--	--	----

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。

【0051】

表面抗原分類3(CD3)

本発明の二重特異性分子の第二ドメインは、CD3に結合し得る。

【0052】

CD3は4つの別個の鎖：CD3<sub>α</sub>、CD3<sub>β</sub>、および2つのCD3<sub>γ</sub>鎖によって構成されるタンパク質複合体である。CD3は、T細胞表面のT細胞受容体(TCR)および鎖と会合して、活性化シグナルを生成する。TCR、鎖、およびCD3分子は共にTCR複合体を含む。

【0053】

例えば固定された抗CD3抗体による、T細胞上のCD3の集合は、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。

【0054】

T細胞活性の調節における中心的な役割のため、TCR/CD3結合能を有する分子を開発する試みがある。この仕事の多くは、ヒトCD3抗原に特異的な抗体の生成にフォーカスしている。

【0055】

第二ドメインは、OKT3、WT32、抗Leu-4、UCHT-1、SPV-3TA、TR66、SPV-T3B、またはアフィニティー調整されたそれらのバリエントなどの、CD3に特異的に結合する抗体またはその一部を含み得る。

【0056】

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、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、抗原結合部位に適した足場を提供し、そして抗原と結合するためにそれを適切な手段でそれを提示する、任意の配列であり得る。抗体は、免疫グロブリン全体、またはFab、F(ab)<sub>2</sub>、Fv、一本鎖Fv(ScFv)断片、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またはVL鎖であり得る)などのその一部であり得る。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、または完全にヒト型であり得る。

【0057】

代替的に、第二ドメインは、免疫グロブリン由来でない、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」デザインされた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、DARPins(デザインされた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。

【0058】

本発明の二重特異性抗体の第二ドメインは、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。抗体配列は、米国特許第7,381,803において公開されている。

【0059】

第二ドメインは、OKT3由来の1つまたは複数のCDRを含み得る。第二結合ドメインは、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。第二結合ドメインは、以下に示すように、OKT3由来の6つ全てのCDRを含み得る。

【0060】

10

20

30

40

50

**重鎖**

C D R 1 : (配列番号3) K A S G Y T F T R Y T M H  
 C D R 2 : (配列番号4) I N P S R G Y T N Y N Q K F K D  
 C D R 3 : (配列番号5) Y Y D D H Y C L D Y

**【0061】****軽鎖**

C D R 1 : (配列番号6) S A S S S V S Y M N  
 C D R 2 : (配列番号7) R W I Y D T S K L A S  
 C D R 3 : (配列番号8) Q Q W S S N P F T

**【0062】**

第二結合ドメインは、O K T 3 由来のC D R 配列を含むs c F v を含み得る。第二結合ドメインは、配列番号9として以下に示されるs c F v 配列、またはC D 3 結合能を残し、少なくとも80%の配列同一性を有する、そのバリエントを含み得る。

**【化3】****配列番号9**

QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSR  
 GYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYDDHYCLDYWG  
 QGTTLTVSSGGGGSGGGGGGGSQIVLTQSPAAMSASPGEKVTMTCSASSSVS  
 YMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATY  
 YCQQWSSNPFTFGSGTKLEINR

**【0063】**

配列番号9由来のバリエント配列は、配列番号9で示す配列と少なくとも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C D 3 結合能、および/またはT C R 活性化能を有し得る。

**【0064】****二重特異性T細胞誘導抗体(BiTES)**

B i T E S は、標的抗原をT細胞受容体(T C R)に接近させる、治療薬の新しいクラスである。本来のデザインは、一方のs c F v 標的抗原とT細胞を活性化させる他方とが、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。

**【0065】**

B i T E は、短い5残基ペプチドリンカー(G G G G S)を介して、抗C D 3 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、一般的に作製される。1995年に、C H O 細胞で、E p C A M(上皮17-1A抗原)およびヒトC D 3 を標的としたタンデムs c F v が産生された。この新種の二重特異性抗体の形式は、共シグナリングの非存在下で無刺激のヒトP B M C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C D 1 9 s c F v とマウス抗C D 3 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C D 2 8を通じた)の必要ななしに、効果的な細胞毒性を含む傑出したインピトロ特性を実証した。

**【0066】**

マウス抗ヒトC D 3 ×抗ヒトC D 1 9 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。そ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。

**【0067】**

抗ヒトE p C A M × 抗ヒトC D 3 T a F v であるM T 1 1 0 は、臨床試験で試験された2番目のB i T E であり、かつ最初は広範な固形腫瘍に指向された。M T 1 1 0 のインピトロ特性評価は、腫瘍細胞株においてM T 1 0 3 で得られた結果を再現し、それによってB i T E 形式の普遍性を実証した。M T 1 1 0 は現在、肺がん、大腸がん、および胃腸がん患者のための臨床試験中である。

10

20

30

40

50

## 【0068】

本発明の二重特異性分子は、B i T E 様の形式に基づくが、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、B C M A に対するリガンド、つまり A P R I L に基づく結合ドメインを有する。

## 【0069】

この「A P R I L i T E」形式は、様々な理由で古典的な s c F v - s c F v 形式と比較して好ましい：(a) 単一ドメイン - s c F v 融合物は、他の形式よりも安定であり、かつ作製が容易でありそうである；(b) 細胞表面でのB C M A およびA P R I L のアセンブリは、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、タンパク質を高度に特異的に、かつ高度に強力にする。

10

## 【0070】

本発明の分子は、以下のアミノ酸配列の1つを含み得る：

## 【化4】

## 配列番号10

METDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH  
 WVQQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDS  
 AVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSSSGGGGSGGGGGSGGGGSQIVLTQSPAI  
 MSASPGEKVTMTCSSSVSYMWNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS  
 GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRSDPAEPKSPDKTH  
 TCPPCPKDPKGSGGGGSVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGV  
 RIQDAGVYLLYSQVLFQDVFTFTMGQVVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSC  
 YSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAALKLNLSPHGTFLGFVKL

20

## 【化5】

## 配列番号11

30

METDTLLLWVLLWVPGSTGQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMH  
 WVQQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDS  
 AVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSSSGGGGSGGGGGSGGGGSQIVLTQSPAI  
 MSASPGEKVTMTCSSSVSYMWNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGS  
 GSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEINRSDPTTPAPRPPT  
 PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDSGGGGSVLHLVPINATSKDDS  
 DVTEVMWQPALRRGRGLQAQGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVFTFTMGQVVSRE  
 GQGRQETLFRCIRSMPSHPDRAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAALKLNLSPHG  
 TFLGFVKL

40

## 【化6】

## 配列番号12

MGTSLLCWMALCLLGADHADGVLHLVPINATSKDDSDVTEVMWQPALRRGRGLQA  
 QGYGVRIQDAGVYLLYSQVLFQDVFTMGQVSREGQGRQETLFRCIRSMPSHPD  
 RAYNSCYSAGVFHLHQGDILSVIIPRARAQLNLSPHGTFLGFVKLSGGGSDPTTPAP  
 RPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAHVTRGLDFACDSGGGGSQVQLQQSGAE  
 LARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFK 10  
 DKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSA VYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLVSSSG  
 GGGSGGGGSGGGSQIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSG  
 TSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFT  
 FGSGTKLEINRS

## 【0071】

本発明の分子は、バリアント配列が本発明の最初の態様で定義された分子、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ドメイン；および  
 (ii) T細胞活性化能を有する第二ドメイン 20

を含む二重特異性分子である限り、配列番号10、11、または12に示される配列と少  
 なくとも80、85、90、95、98、または99%の配列同一性を有するバリアント  
 を含み得る。

## 【0072】

## シグナルペプチド

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より回収できるように、二重特異性分子の宿  
 主細胞からの分泌を引き起こし得る。

## 【0073】

シグナルペプチドのコアは、単一の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。 30

## 【0074】

シグナルペプチドは、分子のアミノ末端にあり得る。

## 【0075】

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 - 第一ドメイン - 第二ドメイン 40

## 【0076】

シグナルペプチドは、配列番号13もしくは14、またはシグナルペプチドが二重特異  
 性分子の分泌をまだ引き起こすよう機能する限り、5、4、3、2、または1つのアミノ  
 酸変異（挿入、置換、または付加）を有するそれらのバリアントを含み得る。

## 【0077】

配列番号13：METDTLLWVLLWVPGSTG

配列番号14：MGTSLLCWMALCLLGADHADG

## 【0078】

配列番号13および14のシグナルペプチドは、コンパクトであり、かつ高度に効果的 50

である。それらは、末端グリシン後に約 95 % の切断を生じさせると予測され、これがシグナルペプチダーゼによる効果的な除去を生じさせる。

**【 0 0 7 9 】**

**スペーサー**

本発明の分子は、第一ドメインと第二ドメインとを連結させ、かつこの 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。

**【 0 0 8 0 】**

スペーサー配列は、例えば、IgG1 ヒンジ、または CD8 の柄を含み得る。リンカーは、代替的に IgG1 ヒンジまたは CD8 の柄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なリンカー配列を含み得る。

10

**【 0 0 8 1 】**

スペーサーは、短いスペーサー（例えば 100 未満、80 未満、60 未満、または 45 未満のアミノ酸を含むスペーサー）であり得る。スペーサーは、IgG1 ヒンジもしくは CD8 の柄、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。

**【 0 0 8 2 】**

これらリンカーのアミノ酸配列の例は下記に挙げられる：

**【 0 0 8 3 】**

配列番号 15 ( IgG1 ヒンジ) : A E P K S P D K T H T C P P C P K D P K S G G  
G G S

配列番号 16 ( CD8 の柄) :

20

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

**【 0 0 8 4 】**

CD8 の柄は、ホモ二量体の形成を誘導し得るような配列を有する（図 2 を参照）。これが望まれない場合には、1つまたは複数のシステイン残基が、CD8 の柄の配列より置換または除去され得る。本発明の二重特異性分子は、スペーサーを含み得、スペーサーは配列番号 16 に示される配列、もしくはそのバリエントを含むかまたはそれからなり、そのバリエントは、第一および第二ドメインのおおよそ同等な配置を引き起こし、ならびに / もしくはバリエント配列は、二重特異性分子のホモ二量体化を引き起こす分子である限り、少なくとも 80 、 85 、 90 、 95 、 98 、または 99 % の配列同一性を有する。

30

**【 0 0 8 5 】**

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 - 第一ドメイン - スペーサー - 第二ドメイン

**【 0 0 8 6 】**

スペーサーは、チェーンブレークを導入するための 1 つまたは複数のリンカーモチーフを含み得る。チェーンブレークは、2 つの別個のドメインを分離させるが、異なる角度に配向させる。そのような配列は、配列 S D P 、および配列 S G G G S D P （配列番号 17 ）を含み得る。

**【 0 0 8 7 】**

リンカーは、S G G G G S （配列番号 18 ）などのセリン - グリシンリンカーを含み得る。

40

**【 0 0 8 8 】**

**核酸配列**

本発明の第二の態様は、本発明の第一の態様の二重特異性分子をコードする核酸配列に関する。

**【 0 0 8 9 】**

核酸配列は、下記の配列の 1 つであるか、またはそれを含み得る。

【化7-1】

配列番号19(APRILITE#01)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGTGCTGCTGCTGTGGTGCCAGGCAG  
 CACCGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGCCGAGCTGGCCAGACCAGGC  
 GCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTCACCCGGTACAC  
 CATGCACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCTAC  
 ATCAACCCCAGCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCC  
 ACCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCT  
 GACCAGCGAGGACAGCGCCGTACTACTGCGCCAGATACTACGACGACCAC  
 ACTGCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACCCCTGACCGTGAGCAGCTCTGGC  
 GGAGGGGGCTCTGGCGGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGGCAGCCAGATCGT

10

【化7-2】

CTGACCCAGAGCCCAGCCATCATGAGCGCCAGCCCAGGCAGAGAAGGTGACCAT  
 GACCTGCAGCGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATGAACCTGGTACCAAGCAGAAAGA  
 GCGGCACCAGCCCCAACGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGCCAGCGG  
 CGTGCAGCCCACTCAGAGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTACAGCCTGACCA  
 TCAGCGGCATGGAGGCCAGGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGC  
 AGCAACCCCTCACCTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTCGGA  
 TCCCGCCAGCCCCAAATCTCCTGACAAAACACACATGCCACCAGTGGCCAAA  
 AGATCCCCAAATCTGGCGGAGGCAGCGGTGCTGCACCTGGTGGCCATCAACG  
 CCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTG  
 AGACGGGGCAGAGGCCCTGCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACG  
 CTGGCGTGTACCTGCTGTACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTCACAA  
 TGGGCCAGGTGGTGAGCCGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCG  
 GTGCATCCGGAGCATGCCAGCCACCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACA  
 GCGCTGGCGTGTTCACCTGCACCAGGGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCC  
 AGAGCCAGAGCCAAGCTAACCTGTCCCCCCCACGGCACCTTCTGGGCTTCGT  
 GAAGCTGTGA

20

30

## 【化8-1】

配列番号20(APRILITE#03)

ATGGAGACCGACACCCTGCTGCTGTGGGTGCTGCTGCTGTGGGTGCCAGGCAG  
 CACCGGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGAGCGGAGGCCAGCTGCCAGACCAGGC  
 GCCAGCGTGAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTCACCCGGTACAC  
 CATGCACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGGCCAGGGCTGGAGTGGATCGGCTAC  
 ATCAACCCCCAGCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGCC  
 ACCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCCT 10  
 GACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGATACTACGACGACCCT  
 ACTGCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCACCCGTGACCGTGAGCAGCTCTGGC  
 GGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCAGGCTCTGGCGGAGGCCAGCCAGATCGTG  
 CTGACCCAGAGCCCAGCCATCATGAGCGCCAGCCCAGGCCAGAGAAGGTGACCAT  
 GACCTGCAGCGCCAGCAGCGTGAGCTACATGAACCTGGTACCAAGCAGAAGA  
 GCGGCACCAGCCCCAACCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGCCAGCGG  
 CGTGCAGCCCACCTCAGAGGCAGCGGCAGCGGACCCAGCTACAGCCTGACCA  
 TCAGCGGCATGGAGGCCAGGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGAGC  
 AGCAACCCCTTCACCTTCCGCAGCGGCCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTCGGA 20  
 TCCCACCAACGACGCCAGCGCCGCCGACCAACACCGGCCACCATCGCGT  
 CGCAGCCCCTGTCCCTGCGCCAGAGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGGCG  
 CAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATTCTGGCGGAGGCCAG  
 CGTGCTGCACCTGGTGCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACTCTGATGTGA

## 【化8-2】

CCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCCTGCAGGCCA  
 GGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCTGGCGTGTACCTGCTGTACTCCCAGG 30  
 TGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTGGTGAGCCGGAGGGC  
 CAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGCATCCGGAGCATGCCAGCCACCC  
 CGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTCACCTGCACCAGG  
 GCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCTGAACCTGTCC  
 CCCCACGGCACCTTCTGGCTCGTGAAGCTGTGA

## 【化9】

## 配列番号21(APRILITE#06)

ATGGGCACCTCCCTGCTGTGCTGGATGGCCCTGTGCCTGCTGGAGGCCGACCA  
 CGCCGACGGCGTGCTGCACCTGGTCCCCATCAACGCCACCAGCAAGGACGACT  
 CTGATGTGACCGAGGTGATGTGGCAGCCAGCCCTGAGACGGGGCAGAGGCCT  
 GCAGGCCAGGGCTACGGCGTGAGAATCCAGGACGCTGGCGTGTACCTGCTGT  
 ACTCCCAGGTGCTGTTCCAGGACGTGACCTTCACAATGGGCCAGGTGGTGAGC  
 CGGGAGGGCCAGGGCAGACAGGAGACCCCTGTTCCGGTGCATCCGGAGCATGC 10  
 CCAGCCACCCCGACAGAGCCTACAACAGCTGCTACAGCGCTGGCGTGTTCAC  
 CTGCACCAGGGCGACATCCTGAGCGTGATCATCCCCAGAGCCAGAGCCAAGCT  
 GAACCTGTCCCCCCCACGGCACCTTCTGGGCTTCGTGAAGCTGTCTGGAGGC  
 GCTCGGATCCCACCAACGACGCCAGCGCCGACCAACACCGGGGCCAC  
 CATCGCGTCGAGCCCTGTCCTGCGCCAGAGCGTGCAGCCAGACCAG  
 GGGGGCGCAGTGCACACGAGGGGCTGGACTTCGCCTGTGATAGCGGTGGCG  
 GTGGCAGCCAGGTGCAGCTGCAGCAGCGGAGGCCAGCTGGCCAGACCAGG  
 CGCCAGCGTAAGATGAGCTGCAAGGCCAGCGGCTACACCTCACCCGGTACA 20  
 CCATGCACTGGGTGAAGCAGCGGCCAGGCCAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTA  
 CATCAACCCCAGCAGAGGCTACACCAACTACAACCAGAAGTTCAAGGACAAGGC  
 CACCCCTGACCACCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTACATGCAGCTGAGCAGCC  
 TGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGACTACTGCGCCAGATACTACGACGACCAC  
 TACTGCCTGGACTACTGGGCCAGGGCACCCCTGACCGTGAGCAGCTCTGG  
 CGGAGGCGGCTCTGGCGAGGCGGCTCTGGCGGAGGCGCAGCCAGATCGT  
 GCTGACCCAGAGCCCAGCCATCATGAGGCCAGGCCAGGGCGAGAAGGTGACCA  
 TGACCTGCAGCGCCAGCAGCGTGAGCTACATGAACTGGTACCGACAGAAG 30  
 AGCGGCACCAAGCCCCAGCGGTGGATCTACGACACCAGCAAGCTGCCAGCG  
 GCGTGCCAGCCCACCTCAGAGGCAGCGGCAGCGGCACCAAGCTACAGCCTGAC  
 CATCAGCGGCATGGAGGCCAGGATGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGG  
 GCAGCAACCCCTCACCTCGGCAGCGGCACCAAGCTGGAGATCAACCGGTG  
 TGA

## 【0090】

核酸配列は、配列番号19、20、または21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19、20、または21に示される配列と、少なくとも80、85、90、95、98、または99%の同一性を有し得る。

## 【0091】

## ベクター

本発明は、本発明に記載の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記載の分子を発現し、かつ産生するよう、宿主細胞に核酸配列を導入するために使用され得る。

## 【0092】

ベクターは、例えば、プラスミドまたはウイルスベクターであり得る。

10

20

30

40

50

## 【0093】

## 宿主細胞

本発明は、本発明に記載の核酸を含む宿主細胞も提供する。宿主細胞は、本発明の第一の態様に記載の分子の產生能を有し得る。

## 【0094】

宿主細胞は、ヒト胎児由来腎臓細胞株293などの哺乳動物細胞であり得る。

## 【0095】

本発明はまた、本発明の第一の態様に記載の分子を產生する方法も提供し、この方法は分子の產生に適した条件下で、本発明の宿主細胞を培養し、そして次いで宿主細胞または上清より分子を回収する工程を含む。

10

## 【0096】

上記のような、細胞において產生される本発明の二重特異性分子は、細胞内（例えば、細胞質中、ペリプラズム中、または封入体中）で產生され、そして次いで宿主細胞より単離され、そして必要に応じてさらに精製されるか；またはそれらは、細胞外（例えば、宿主細胞が培養されている培地中）で產生され、そして次いで培養培地より単離され、そして必要に応じてさらに精製されるかのいずれかであり得る。

## 【0097】

## 薬学的組成物

本発明は、有効成分として、少なくとも1つの本発明の二重特異性分子を、薬学的に許容されるキャリア、希釈液、または添加物、および／または補助剤、ならびに必要に応じて1つまたは複数のさらなる薬学的に有効なポリペプチド、および／または化合物と一緒に含む薬学的組成物にも関係する。そのような製剤は、例えば、経口投与または非経口投与（静脈内、筋肉内、または皮下注射、または静脈注入）に適した形式であり得る。

20

## 【0098】

## 処置の方法

本発明の分子は、がん性の疾患、特に亢進したB C M A 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。

## 【0099】

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（P O E M S 症候群）、およびH鎖病と意義不明の単クローニ性免疫グロブリン血症／無症候性骨髄腫を含む。

30

## 【0100】

上記疾患は、多発性骨髄腫であり得る。

## 【0101】

上昇したB C M A 発現レベルに相關するB細胞障害の例は、C L L（慢性リンパ性白血病）および非ホジキンリンパ腫（N H L）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（S L E）、多発性硬化症（M S）、および関節リウマチ（R A）のような自己免疫疾患の治療においても使用され得る。

40

## 【0102】

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

## 【0103】

疾患の処置のための方法は、本発明の分子の治療的使用に關係する。本明細書中では、疾患に付隨する少なくとも1つの症状を小さくする、減少する、もしくは改善する、および／または疾患の進行を遅延する、減少する、もしくは阻止するために、その分子が、既存の疾患または状態を有する被験体に投与され得る。本発明の分子または薬学的組成物は、形質細胞などのB C M A 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。

## 【0104】

50

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。

#### 【実施例】

##### 【0105】

###### 実施例1 一連の”APRILITES”的構築

図2Aに示されるように、本発明者らは、OKT3由来のscFvをAPRILの細胞外領域に結合させる、二重特異性T細胞誘導抗体を構築した。これらの分子の構築の間に、いくつかのデザインの検討が行われた：(a) APRILのプロテオグリカンに結合するN末端領域を短縮させ、非特異的な結合を防いだ；(b) コンストラクト4、5、および6ではシグナルペプチドを成熟したAPRILの外部ドメインに結合した；(c) OKT3を、重鎖可変領域と軽鎖可変領域を連結するリンカーでscFvとして再形式化した；(d) scFvとAPRILとの間に種々の異なるスペーサーを試した。

##### 【0106】

種々の異なる形式は以下である：

- (1) IgG1のヒンジによって短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；
- (2) (SGGGGS)3リンカーを介して短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；
- (3) CD8の柄を介して短縮型APRILと連結したOKT3 scFv；
- (4) IgG1のヒンジを介してOKT3 scFvと連結した短縮型APRIL；
- (5) (SGGGGS)3リンカーを介してOKT3 scFvと連結した短縮型APRIL；および
- (6) CD8スペーサーを介してOKT3 scFvと連結した短縮型APRIL。

コンストラクト(3)および(6)は、CD8スペーサー中のジスルフィド結合を通じてホモ二量体を形成する。コンストラクト(1)、(3)、および(6)のアミノ酸配列は図8に示される。

##### 【0107】

###### 実施例2 293T細胞におけるAPRILiTEの発現

293T細胞に、上に挙げたAPRILiTEコンストラクトをコードする発現プラスミドをトランスフェクションした。293T細胞由来の上清をアクリルアミドゲル上で泳動し、タンパク質をメンブレンに転写した。次にメンブレンを、APRILを認識する抗体によって染色した。その結果は図3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で検出された。タンパク質2、4および5は検出されず、これらの構成は不安定であることが示された。

##### 【0108】

###### 実施例3 TCRとBCMAへの結合

次に、これらのタンパク質が一端でT細胞受容体(TCR)と、他端でBCMAの両方と結合できるか否かについて調べた。トランスフェクションした293T細胞由来の上清を使用して、Jurkat T細胞およびTCRがノックアウトされたJurkat T細胞クローニングを染色した。これはAPRILiTEがTCRに結合することを示す(図4b)。BCMAを発現するように改変したSupT1細胞、およびTACIを発現するよう改変したSupT1細胞を、二次的に抗APRILビオチンとそれに続くストレプトアビジンPEを用いて、上記の上清と共に染色した。その結果は図4aに示される。APRILiTE1、3、および6はBCMAに結合し、そしてTACIとはより少ない程度でTACIと結合することが見出された。

##### 【0109】

###### 実施例4 安定なAPRILITEはIFNの放出を誘起する。

正常ドナーT細胞を異なるSupT1と1:1で培養した。使用したSupT1は何も導入していないもの、BCMAを発現するように改変したもの、またはTACIを発現するよう改変したもののはずれかであった。その結果を図5に示す。T細胞は、BCMA

10

20

30

40

50

またはTACIで改変したSupT1細胞に曝された時に、いずれかのAPRILiTEの存在下でのみIFN $\gamma$ を放出することが見出された。BCMAへの応答は、TACIへの応答よりも大きかった。

#### 【0110】

実施例5 安定なAPRILiTEはBCMA+標的のT細胞媒介性殺傷を誘導する。

T細胞を、APRILiTE1、3および6の非存在下または存在下で、野生型SupT1細胞、BCMAを発現するSupT1細胞、およびTACIの発現するSupT1細胞と、1:1で培養した。その結果を図6に示す。残っているT細胞は、APRILiTEを添加していない条件下で存在するSupT1細胞の比率として示される。

#### 【0111】

実施例6 初代骨髄腫細胞におけるBCMA発現の解析

4つの異なる骨髄腫サンプルを、ラット抗ヒトBCMAモノクローナル抗体Vicky1によって染色した。その結果を図7に示す。医学的かつ形態的に典型的な骨髄腫（パネル2から4）において、中間的または曇った染色が観察された。

#### 【0112】

実施例7 初代骨髄腫細胞におけるAPRILiTEの効果の解析

既知のBCMA+多発性骨髄腫を有する2人の患者由来の診断用の骨髄吸引物由来の余った材料を使用した。CD138磁気ビーズによる選択を行って、吸引物から骨髄腫細胞を精製した。これらの細胞を完全培養培地で48時間休止させ、BCMAについて染色を行って、それらが実際にBCMA陽性であるか確認した。骨髄細胞はBCMAを発現するが、ただし低いレベルではあることが見出された（図9）。

#### 【0113】

次に、OKT3とCD28.2を用いて刺激した正常ドナー由来の末梢血単核球から、CD56を枯渇させ、NK細胞を取り除いた。APRILiTE#03とAPRILiTE#06のいずれかの非存在下または存在下で、CD56を枯渇させたPBMCとCD138で選択した初代骨髄腫細胞を1:1で共培養した。APRILiTE#01を試験するためには、不十分な材料があった。共培養物を顕微鏡によって観察した。上清中のインターフェロンガンマの放出を、ELISAによって計測した。骨髄腫細胞の生存を、アネクシンV/PI染色およびビーズ計数で制御されたフローサイトメトリーによって計測した。

#### 【0114】

透明な凝集（T細胞活性化の指標）が共培養下において観察された（図10を参照）。APRILiTEの存在下で、PBMCを骨髄腫細胞と培養した条件においてインターフェロンガンマの放出が観察されたにも関わらず、SupT1 BCMA細胞との共培養の時よりも少ない絶対量であった。（図11）。骨髄腫細胞の殺傷もまた、共培養6日後にPBMCがAPRILiTEと共に存在するときに観察された（図12）。

#### 【0115】

これらの発見は、T細胞媒介性の骨髄腫細胞の殺傷を引き起こすのに十分なレベルの初代骨髄腫細胞の存在下で、APRILiTEはT細胞の活性化を引き起こすということを実証した。

#### 【0116】

実施例8 *in vivo*でのAPRILiTEの試験

*huSCID*モデルを使用した：NSG (nod-scid) ガンマ、NOD-scid IL2R<sup>nu<sup>nu</sup></sup>マウスは、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されている。これらの株は、生物発光イメージングによって疾患を計測するために、ホタルルシフェラーゼを発現するように改変されている。正常ドナーのPBMCは、付随するAPRILiTEの腹腔内投与の間に、尾静脈を介して投与される。以下を順番に計測した（1）APRILiTEの血清レベル；（2）ヒトイント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）腫瘍の生物発光計測。次に、以下を計測した：（1）骨髄組織学によ

10

20

30

40

50

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細胞の増殖と生着；ならびに(3)残りの組織は任意の毒性について肉眼で、および免疫組織学的に調べた。

**【0117】**

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。

10

**【図1】**

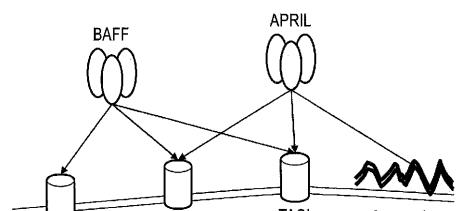


FIG. 1

**【図2B】**

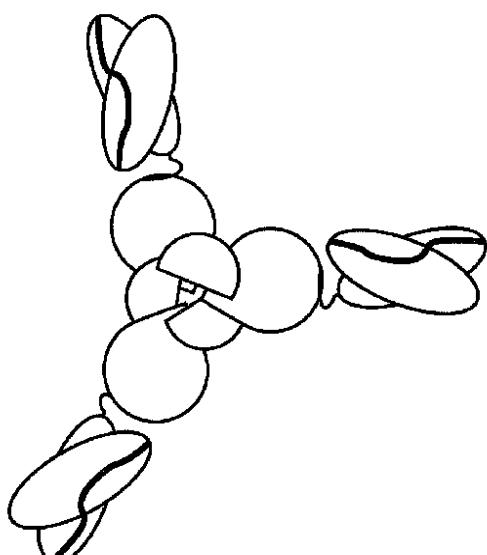


FIG. 2B

**【図2A】**

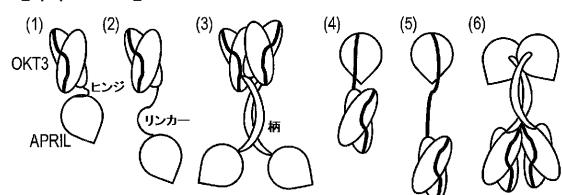


FIG. 2A

【図3】

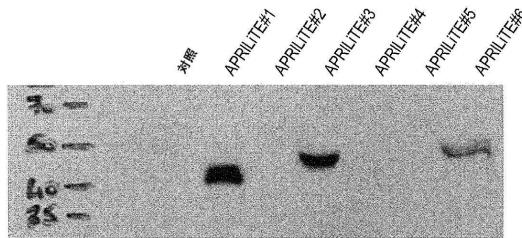
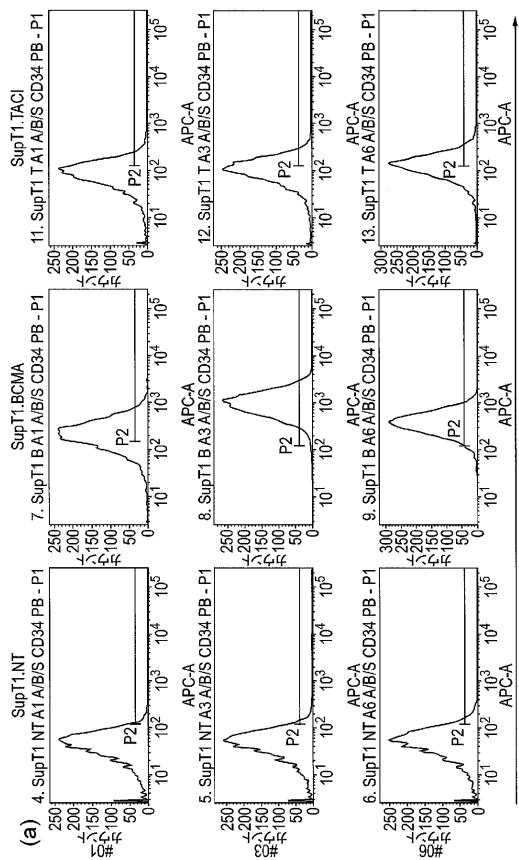


FIG. 3

【図4 a】

APRILITEオチン／ストレプトビンAPC  
FIG. 4

【図4 b】

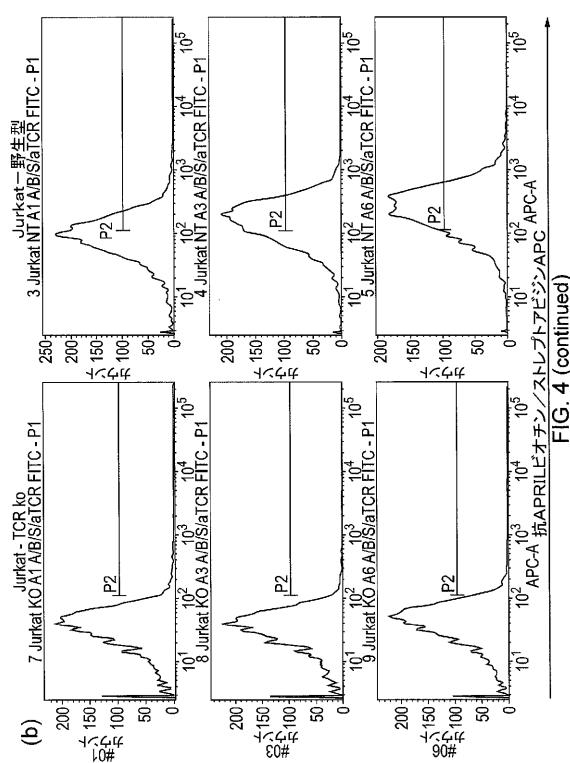


FIG. 4 (continued)

【図5】

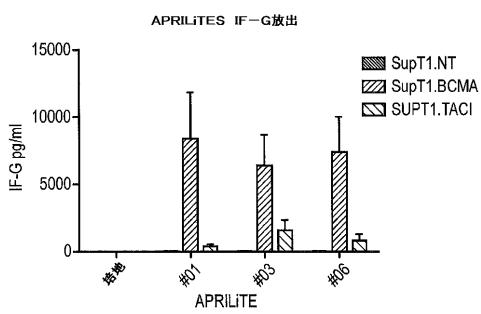


FIG. 5

【図6】

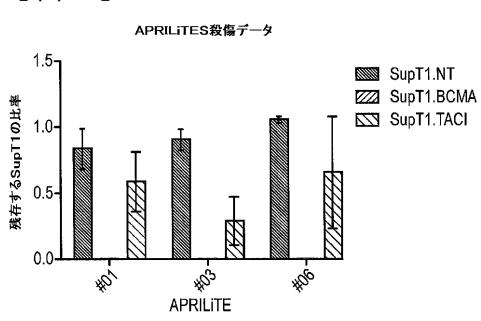


FIG. 6



【図 1 2】

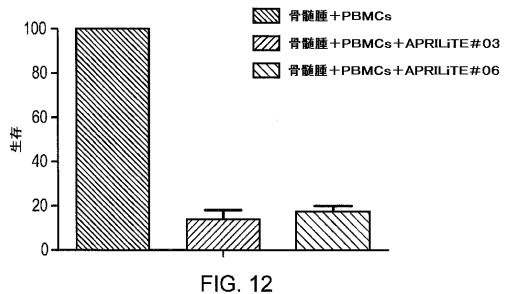


FIG. 12

【配列表】

0006557657000001.app

## フロントページの続き

			F I	
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
C 1 2 P	21/08	(2006.01)	C 1 2 P	21/08
C 1 2 P	21/02	(2006.01)	C 1 2 P	21/02
A 6 1 K	39/395	(2006.01)	A 6 1 K	39/395
A 6 1 K	38/18	(2006.01)	A 6 1 K	38/18
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00
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 P	25/28	(2006.01)	A 6 1 P	25/28
			A 6 1 P	43/00
				1 0 7

(74)代理人 230113332

弁護士 山本 健策

(72)発明者 ブーレ， マーティン

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

(72)発明者 ヨン， クエ

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

(72)発明者 リー， リディア

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

(72)発明者 チャップリン， 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

審査官 柴原 直司

(56)参考文献 国際公開第2012/066058 (WO, A1)

特表2000-502562 (JP, A)

Biochem. Pharmacol., (2003), 66, [8], p.1427-1432

Clin. Cancer Res., (2011), 17, [17], p.5626-5637

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 15 / 0 0 - 1 5 / 9 0

C 0 7 K 1 / 0 0 - 1 9 / 0 0

A 6 1 K 3 8 / 0 0 - 5 1 / 1 2

Capplus / MEDLINE / EMBASE / BIOSIS / WPIDS (STN)

JSTplus / JMEDplus / JST7580 (JDreamIII)

UniProt / GeneSeq

GenBank / EMBL / DDBJ / GeneSeq

PubMed

Google

Google Scholar