

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6636803号
(P6636803)

(45) 発行日 令和2年1月29日 (2020.1.29)

(24) 登録日 令和1年12月27日 (2019.12.27)

(51) Int. Cl.

F I

C O 7 K 16/28 (2006.01)

C O 7 K 16/28 Z N A

C O 7 K 16/46 (2006.01)

C O 7 K 16/46

C 1 2 P 21/08 (2006.01)

C 1 2 P 21/08

A 6 1 K 39/395 (2006.01)

A 6 1 K 39/395 N

A 6 1 P 35/00 (2006.01)

A 6 1 P 35/00

請求項の数 14 (全 77 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2015-555751 (P2015-555751)
 (86) (22) 出願日 平成26年2月5日 (2014.2.5)
 (65) 公表番号 特表2016-508496 (P2016-508496A)
 (43) 公表日 平成28年3月22日 (2016.3.22)
 (86) 国際出願番号 PCT/EP2014/052189
 (87) 国際公開番号 W02014/122143
 (87) 国際公開日 平成26年8月14日 (2014.8.14)
 審査請求日 平成29年1月25日 (2017.1.25)
 (31) 優先権主張番号 13000571.3
 (32) 優先日 平成25年2月5日 (2013.2.5)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)
 (31) 優先権主張番号 13000570.5
 (32) 優先日 平成25年2月5日 (2013.2.5)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 欧州特許庁 (EP)

(73) 特許権者 515191372
 エンクマフ エスアーエールエル
 スイス国 2017 ブードリー, ルー
 ト デ ベル 1
 (74) 代理人 100107489
 弁理士 大塩 竹志
 (72) 発明者 ヴー, ミン ディエム
 スイス国 ツェーハー 8832 ヴォレ
 ラウ, フェルゼンラインシュトラッセ
 28
 (72) 発明者 シュトライン, クラウス
 ドイツ国 69469 ヴァインハイム,
 パノラマシュトラッセ 14

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 BCMAに対する抗体の選択のための方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

ヒト B 細胞成熟因子 (BCMA) と CD3 に特異的に結合する二重特異的抗体であって、該二重特異的抗体は、

(i) 配列番号 39 の CDR1 と配列番号 49 の CDR2 と配列番号 59 の CDR3 とを含む可変ドメイン VH および配列番号 69 の CDR1 と配列番号 79 の CDR2 と配列番号 89 の CDR3 とを含む可変ドメイン VL ;

(ii) 配列番号 37 の CDR1 と配列番号 47 の CDR2 と配列番号 57 の CDR3 とを含む可変ドメイン VH および配列番号 67 の CDR1 と配列番号 77 の CDR2 と配列番号 87 の CDR3 とを含む可変ドメイン VL ;

(iii) 配列番号 38 の CDR1 と配列番号 48 の CDR2 と配列番号 58 の CDR3 とを含む可変ドメイン VH および配列番号 68 の CDR1 と配列番号 78 の CDR2 と配列番号 88 の CDR3 とを含む可変ドメイン VL ;

(iv) 配列番号 40 の CDR1 と配列番号 50 の CDR2 と配列番号 60 の CDR3 とを含む可変ドメイン VH および配列番号 70 の CDR1 と配列番号 80 の CDR2 と配列番号 90 の CDR3 とを含む可変ドメイン VL ; または

(v) 配列番号 41 の CDR1 と配列番号 51 の CDR2 と配列番号 61 の CDR3 とを含む可変ドメイン VH および配列番号 71 の CDR1 と配列番号 81 の CDR2 と配列番号 91 の CDR3 とを含む可変ドメイン VL

を含む、BCMA に特異的に結合する抗体の重鎖と軽鎖とを含み、

50 nMの濃度の該BCMAに特異的に結合する抗体の結合は、ELISAアッセイにおいて450 nmでのODとして測定して、APRILなしでのヒトBCMAへの該BCMAに特異的に結合する抗体の結合と比較して、140 ng/ml マウスAPRILによって10%超は低下しない、二重特異的抗体。

【請求項2】

前記二重特異的抗体が、配列番号19の可変ドメインVHと、配列番号29の可変ドメインVLを含む、請求項1の(i)に記載の二重特異的抗体。

【請求項3】

前記二重特異的抗体が、配列番号17の可変ドメインVHと、配列番号27の可変ドメインVLを含む、請求項1の(ii)に記載の二重特異的抗体。

10

【請求項4】

前記二重特異的抗体が、配列番号18の可変ドメインVHと、配列番号28の可変ドメインVLを含む、請求項1の(iii)に記載の二重特異的抗体。

【請求項5】

前記二重特異的抗体が、配列番号20の可変ドメインVHと、配列番号30の可変ドメインVLを含む、請求項1の(iv)に記載の二重特異的抗体。

【請求項6】

前記二重特異的抗体が、配列番号21の可変ドメインVHと、配列番号31の可変ドメインVLを含む、請求項1の(v)に記載の二重特異的抗体。

【請求項7】

20

請求項1～6のいずれか1項に記載の二重特異的抗体であって、

100 nMの該二重特異的抗体の濃度で24時間後に、同一条件下でコントロールとして親Fc部分を有する同じ二重特異的抗体を使用するコントロールと比較して、BCMA発現細胞の調製物のうちの20%以上の細胞の細胞死をADCCによって誘導する改変Fc部分を含む、二重特異的抗体。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか1項に記載の二重特異的抗体であって、前記二重特異的抗体が、BCMAに特異的に結合する抗体の重鎖および軽鎖と、CD3に特異的に結合する抗体の重鎖および軽鎖とを含み、

30

(i) 前記BCMA重鎖および軽鎖の可変ドメインVLおよびVH、または、定常ドメインCLおよびCH1が互いに置き換えられるか；または

(ii) 前記CD3重鎖および軽鎖の可変ドメインVLおよびVH、または、定常ドメインCLおよびCH1が互いに置き換えられる、二重特異的抗体。

【請求項9】

請求項1～8のいずれか1項に記載の二重特異的抗体および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、薬学的組成物。

【請求項10】

医薬としての使用のための、請求項1～8のいずれか1項に記載の二重特異的抗体を含む組成物または請求項9に記載の薬学的組成物。

40

【請求項11】

形質細胞障害の処置における医薬として使用するための、請求項10に記載の組成物または請求項9に記載の薬学的組成物。

【請求項12】

多発性骨髄腫の処置における医薬として使用するための、請求項10に記載の組成物または請求項9に記載の薬学的組成物。

【請求項13】

全身性エリテマトーデスの処置において医薬として使用するための、請求項10に記載の組成物または請求項9に記載の薬学的組成物。

50

【請求項 14】

請求項 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の二重特異的抗体のインビトロでの調製方法であって、該方法は以下：

a) 宿主細胞を、

(i) 第 1 の標的に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖をコードする核酸分子を含むベクター；および

(ii) 第 2 の標的に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖をコードする核酸分子を含むベクター

で形質転換する工程であって、ここで、可変ドメイン V L および V H、または、定常ドメイン C L および C H 1 が互いに置き換えられる、工程；

b) 前記宿主細胞を、前記二重特異的抗体分子の合成を可能にする条件下で培養する工程；ならびに

c) 前記二重特異的抗体分子を前記培養物から回収する工程、を包含し、前記第 1 の標的が B C M A であり、前記第 2 の標的が C D 3 であるか、または、前記第 1 の標的が C D 3 であり、前記第 2 の標的が B C M A である、方法。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、B C M A に対する抗体の選択のための方法、B C M A に対する新たな抗体、それらの製造および使用に関する。

【背景技術】

【0002】

(発明の背景)

ヒト B 細胞成熟標的 (B C M A ; T R 1 7 _ H U M A N、T N F R S F 1 7 (U n i P r o t Q 0 2 2 2 3) としても公知) は、分化した形質細胞で優先的に発現される腫瘍壊死レセプタースーパーファミリーのメンバーである [L a a b i e t a l . 1 9 9 2 ; M a d r y e t a l . 1 9 9 8]。B C M A は、非グリコシル化 I I I 型膜貫通タンパク質であり、これは、B 細胞成熟、増殖および生存に關与する。B C M A は、T N F スーパーファミリーの 2 つのリガンド：A P R I L (増殖誘導リガンド) (B C M A に対する高親和性リガンド) および B 細胞活性化因子 B A F F (B C M A に対する低親和性リガンド) (T H A N K、B l y S、B リンパ球刺激因子、T A L L - 1 および z T N F 4) に対するレセプターである。A P R I L および B A F F は、構造類似性および重なり合うが別個のレセプター結合特異性を示す。負の調節因子 T A C I はまた、B A F F および A P R I L の両方に結合する。B C M A および / もしくは T A C I への、A P R I L および B A F F の同等の結合は、転写因子 N F - B を活性化し、生存促進性 B c l - 2 ファミリーメンバー (例えば、B c l - 2、B c l - x L、B c l - w、M c l - 1、A 1) の発現およびアポトーシス促進因子 (例えば、B i d、B a d、B i k、B i m など) のダウンレギュレーションを増大させ、従って、アポトーシスを阻害し、生存を促進する。この組み合わせられた作用は、B 細胞分化、増殖、生存および抗体生成を促進する (R i c k e r t R C e t a l . , I m m u n o l R e v (2 0 1 1) 2 4 4 (1) : 1 1 5 - 1 3 3 において概説されるとおり)。

【0003】

B C M A に対する抗体は、例えば、G r a s M - P . e t a l . I n t I m m u n o l . 7 (1 9 9 5) 1 0 9 3 - 1 1 0 6、W O 2 0 0 1 2 4 8 1 1、W O 2 0 0 1 2 4 8 1 2、W O 2 0 1 0 1 0 4 9 4 9 および W O 2 0 1 2 1 6 3 8 0 5 に記載されている。B C M A に対する抗体ならびにリンパ腫および多発性骨髄腫の処置のためのそれらの使用は、例えば、W O 2 0 0 2 0 6 6 5 1 6 および W O 2 0 1 0 1 0 4 9 4 9 で言及されている。W O 2 0 1 3 1 5 4 7 6 0 は、B C M A 認識部分および T 細胞活性化部分を含むキメラ抗原レセプターに関する。

【0004】

Ryan, MC et al., Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 3009-3018は、裸の抗体としてもしくは抗体-薬物結合体として、多発性骨髄腫(MM)細胞株の細胞傷害性を促進し得るリガンドブロック活性を有する抗BCMA抗体に関する。Ryanは、SG1、阻害性BCMA抗体が、核因子- κ BのAPRIIL依存性活性化を用量依存性的方式で、インビトロでブロックすることを示した。Ryanはまた、抗体SG2がBCMAへのAPRIIL結合を有意には阻害しないことを言及した。

【0005】

多種多様な組換え二重特異的抗体様式は、例えば、例えば、IgG抗体様式と単鎖ドメインとの融合によって、ここ最近開発された(Kontermann RE, mAbs 4:2, (2012) 1-16を参照のこと)。可変ドメインVLおよびVHもしくは定常ドメインCLおよびCH1が互いに置き換えられている二重特異的抗体は、WO2009080251およびWO2009080252に記載されている。

【0006】

誤って対合した副生成物という問題を回避するアプローチ(「ノブが凹みに入り込む」(「knobs-into-holes」)として公知である)は、CH3ドメインへ変異を導入して、接触界面を改変することによって、2つの異なる抗体重鎖の対合を強制することを目的とする。一方の鎖で、かさ高いアミノ酸を、短い側鎖を有するアミノ酸によって置き換えて、「凹み(hole)」を作った。逆に、大きな側鎖を有するアミノ酸を他方のCH3ドメインに導入して、「ノブ(knob)」を作った。これらの2つの重鎖(および2つの同一の軽鎖(これらは、両方の重鎖にとって適切でなければならない))を共発現することによって、ホモダイマー形成(「凹み-凹み」もしくは「ノブ-ノブ」)に対して高収率のヘテロダイマー形成(「ノブ-凹み」)を観察した(Ridgway JB, Presta LG, Carter P; およびWO1996027011)。ヘテロダイマーのパーセンテージは、ファージディスプレイアプローチおよび上記ヘテロダイマーを安定化させるジスルフィド架橋の導入を使用して、2つのCH3ドメインの相互作用表面を再構築することによってさらに増大させることができた(Merchant A.M, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681; A well S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35)。上記ノブが凹みに入り込む技術に関する新たなアプローチは、例えば、EP 1870459A1に記載されている。この様式は、非常に魅力的であるようだが、クリニックに向けた進歩を記載するデータは現在入手できていない。この戦略の1つの重大な制約は、2つの親抗体の軽鎖が誤って対合し、不活性分子を形成するのを防止するために同一でなければならないことである。従って、この技法は、第1の標的および第2の標的に対する2種の抗体から出発する、2つの標的に対する組換え二重特異的抗体を容易に開発するために適していない。なぜなら、これらの抗体の重鎖および/もしくは同一の軽鎖のいずれかが最適化されねばならないからである。Xie, Z., et al, J Immunol Methods 286 (2005) 95-101は、FC部分のためにノブが凹みに入り込む技術と組み合わせてscFvを使用する二重特異的抗体の様式に言及している。

【0007】

Tリンパ球のTCR/CD3複合体は、CD3標識ガンマ()、デルタ()、イプシロン()、ゼータ()、およびイータ()の不変のサブユニットとともに細胞表面で共発現される、TCRアルファ()/ベータ()またはTCRガンマ()/デルタ()ヘテロダイマーのいずれかからなる。ヒトCD3は、UniProt P07766(CD3E_HUMAN)の下に記載されている。

【0008】

現在の技術水準で記載される抗CD3抗体は、SP34(Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-

10

20

30

40

50

1100)である。SP34は、霊長類およびヒト両方のCD3と反応する。SP34は、Pharmingenから入手可能である。現在の技術水準で記載されるさらなる抗CD3抗体は、UCHT-1(WO2000041474を参照のこと)である。現在の技術水準で記載されるさらなる抗CD3抗体は、BC-3(Fred Hutchinson Cancer Research Institute; GvHDのフェーズI/II試験において使用される、Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992))である。SP34は、SP-34がCD3の鎖のみに存在するエピトープを認識する(Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047を参照のこと)のに対して、UCHT-1およびBC-3は、鎖および鎖の両方によって与えられるエピトープを認識するという点で、UCHT-1およびBC-3とは異なる。抗体SP34のものと同一配列を有する抗体の配列は、WO2008119565、WO2008119566、WO2008119567、WO2010037836、WO2010037837およびWO2010037838において言及されている。抗体SP34のVHに96%同一である配列は、US8236308(WO2007042261)に言及されている。SP34のものと同一配列を有するさらなる抗体のVHおよびVL配列は、配列番号7および8に示される。

10

【0009】

CD3およびBCMAに対する二重特異的抗体は、WO2007117600、WO2009132058、WO2012066058、およびWO2012143498で言

20

【0010】

モノクローナル抗体の細胞媒介性エフェクター機能(同様の抗体依存性細胞傷害性(ADCC))は、Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180; およびUS6602684に記載されるように、Asn297でのそれらのオリゴサッカリド組成を操作することによって増強され得る。WO1999054342、WO2004065540、WO2007031875、およびWO2007039818、Hristodorov D, Fischer R, Linden L., Mol Biotechnol. 2012 Oct 25. (Epub)はまた、Fc媒介性細胞傷害性を増強するための抗体のグリコシル化操作に関する。

30

【0011】

また、ヒンジ領域およびCH2ドメイン中のいくつかのアミノ酸残基は、モノクローナル抗体の細胞媒介性エフェクター機能に影響を及ぼす(Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993), Immunology, 86, 319 (1995), Chemical Immunology, 65, 88 (1997)] Chemical Immunology, 65, 88 (1997)]。従って、このようなアミノ酸の改変は、細胞媒介性エフェクター機能を増強し得る。細胞媒介性エフェクター機能を増大させるためのこのような抗体改変は、EP1931709、WO200042072において言及されており、アミノ酸234位、235位、236位、239位、267位、268位、293位、295位、324位、327位、328位、330位、および332位でのFc部分の置換を含む。さらに、細胞媒介性エフェクター機能を増大させるための抗体改変は、EP1697415に言及されており、荷電したアミノ酸、極性アミノ酸、もしくは非極性アミノ酸を有するEUアミノ酸277位、289位、306位、344位、もしくは378位のアミノ酸置換を含む。

40

【0012】

抗体様式ならびに二重特異的および多重特異的抗体の様式はまた、ペプボディー(pepbody)(WO200244215)、新規抗原レセプター(Novel Antigen Receptor)(「NAR」)(WO2003014161)、ダイアボディー-ダイアボディーダイマー「TandAbs」(WO2003048209)、ポリ

50

アルキレンオキシド改変 s c F v (U S 7 1 5 0 8 7 2)、ヒト化ウサギ抗体 (W O 2 0 0 5 0 1 6 9 5 0)、合成免疫グロブリンドメイン (W O 2 0 0 6 0 7 2 6 2 0)、共有結合ダイアボディー (W O 2 0 0 6 1 1 3 6 6 5)、フレキシボディー (f l e x i b o d y) (W O 2 0 0 3 0 2 5 0 1 8)、ドメイン抗体、d A b (W O 2 0 0 4 0 5 8 8 2)、ワクシボディー (v a c c i b o d y) (W O 2 0 0 4 0 7 6 4 8 9)、新世界ザルフレームワークを有する抗体 (W O 2 0 0 7 0 1 9 6 2 0)、切断可能なリンカーを有する抗体 - 薬物結合体 (W O 2 0 0 9 1 1 7 5 3 1)、ヒンジ領域を除去した I g G 4 抗体 (W O 2 0 1 0 0 6 3 7 8 5)、I g G 4 様 C H 3 ドメインを有する二重特異的抗体 (W O 2 0 0 8 1 1 9 3 5 3)、ラクダ抗体 (c a m e l i d A n t i b o d y) (U S 6 8 3 8 2 5 4)、ナノボディー (U S 7 6 5 5 7 5 9)、C A T ダイアボディー (U S 5 8 3 7 2 4 2)、標的抗原および C D 3 に対して指向される二重特異的 s c F v 2 (U S 7 2 3 5 6 4 1)、s I g A p l A n t i b o d y (U S 6 3 0 3 3 4 1)、ミニボディー (U S 5 8 3 7 8 2 1)、I g N A R (U S 2 0 0 9 1 4 8 4 3 8)、改変ヒンジ領域および F c 領域を有する抗体 (U S 2 0 0 8 2 2 7 9 5 8、U S 2 0 0 8 0 1 8 1 8 9 0)、三官能性抗体 (t r i f u n c t i o n a l a n t i b o d y) (U S 5 2 7 3 7 4 3)、トリオマブ (t r i o m a b) (U S 6 5 5 1 5 9 2)、トロイボディー (t r o y b o d y) (U S 6 2 9 4 6 5 4) である。

【先行技術文献】

【特許文献】

【 0 0 1 3 】

【特許文献 1】国際公開第 2 0 0 1 / 2 4 8 1 1 号

【特許文献 2】国際公開第 2 0 0 1 / 2 4 8 1 2 号

【特許文献 3】国際公開第 2 0 1 0 / 1 0 4 9 4 9 号

【特許文献 4】国際公開第 2 0 1 2 / 1 6 3 8 0 5 号

【特許文献 5】国際公開第 2 0 0 2 / 0 6 6 5 1 6 号

【特許文献 6】国際公開第 2 0 1 3 / 1 5 4 7 6 0 号

【特許文献 7】国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 0 2 5 1 号

【特許文献 8】国際公開第 2 0 0 9 / 0 8 0 2 5 2 号

【特許文献 9】国際公開第 2 0 0 0 / 0 4 1 4 7 4 号

【特許文献 1 0】国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 5 号

【特許文献 1 1】国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 6 号

【特許文献 1 2】国際公開第 2 0 0 8 / 1 1 9 5 6 7 号

【特許文献 1 3】国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 7 8 3 6 号

【特許文献 1 4】国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 7 8 3 7 号

【特許文献 1 5】国際公開第 2 0 1 0 / 0 3 7 8 3 8 号

【特許文献 1 6】米国特許第 8 2 3 6 3 0 8 号明細書

【特許文献 1 7】国際公開第 2 0 0 7 / 0 4 2 2 6 1 号

【特許文献 1 8】国際公開第 2 0 0 7 / 1 1 7 6 0 0 号

【特許文献 1 9】国際公開第 2 0 0 9 / 1 3 2 0 5 8 号

【特許文献 2 0】国際公開第 2 0 1 2 / 0 6 6 0 5 8 号

【特許文献 2 1】国際公開第 2 0 1 2 / 1 4 3 4 9 8 号

【特許文献 2 2】米国特許第 6 6 0 2 6 8 4 号明細書

【特許文献 2 3】国際公開第 1 9 9 9 / 0 5 4 3 4 2 号

【特許文献 2 4】国際公開第 2 0 0 4 / 0 6 5 5 4 0 号

【特許文献 2 5】国際公開第 2 0 0 7 / 0 3 1 8 7 5 号

【特許文献 2 6】国際公開第 2 0 0 7 / 0 3 9 8 1 8 号

【特許文献 2 7】欧州特許出願公開第 1 9 3 1 7 0 9 号明細書

【特許文献 2 8】国際公開第 2 0 0 0 / 4 2 0 7 2 号

【特許文献 2 9】国際公開第 2 0 0 2 / 4 4 2 1 5 号

【特許文献 3 0】国際公開第 2 0 0 3 / 0 1 4 1 6 1 号

10

20

30

40

50

- 【特許文献31】国際公開第2003/048209号
- 【特許文献32】米国特許第7150872号明細書
- 【特許文献33】国際公開第2005/016950号
- 【特許文献34】国際公開第2006/072620号
- 【特許文献35】国際公開第2006/113665号
- 【特許文献36】国際公開第2003/025018号
- 【特許文献37】国際公開第2004/058822号
- 【特許文献38】国際公開第2004/076489号
- 【特許文献39】国際公開第2007/019620号
- 【特許文献40】国際公開第2009/117531号 10
- 【特許文献41】国際公開第2010/063785号
- 【特許文献42】国際公開第2008/119353号
- 【特許文献43】米国特許第6838254号明細書
- 【特許文献44】米国特許第7655759号明細書
- 【特許文献45】米国特許第5837242号明細書
- 【特許文献46】米国特許第7235641号明細書
- 【特許文献47】米国特許第6303341号明細書
- 【特許文献48】米国特許第5837821号明細書
- 【特許文献49】米国特許第2009/148438号明細書
- 【特許文献50】米国特許第2008/227958号明細書 20
- 【特許文献51】米国特許第2008/0181890号明細書
- 【特許文献52】米国特許第5273743号明細書
- 【特許文献53】米国特許第6551592号明細書
- 【特許文献54】米国特許第6294654号明細書
- 【非特許文献】
- 【0014】
- 【非特許文献1】Rickert RC et al., Immunol Rev (2011) 244 (1): 115-133
- 【非特許文献2】Gras M-P. et al. Int Immunol. 7 (1995) 1093-1106 30
- 【非特許文献3】Ryan, MC et al., Mol. Cancer Ther. 6 (2007) 3009-3018
- 【非特許文献4】Kontermann RE, mAbs 4:2, (2012) 1-16
- 【非特許文献5】Merchant A.M, et al, Nature Biotech 16 (1998) 677-681
- 【非特許文献6】A well S, Ridgway JB, Wells JA, Carter P., J Mol Biol 270 (1997) 26-35
- 【非特許文献7】Xie, Z., et al, J Immunol Methods 286 (2005) 95-101 40
- 【非特許文献8】Yang SJ, The Journal of Immunology (1986) 137; 1097-1100
- 【非特許文献9】Anasetti et al., Transplantation 54: 844 (1992)
- 【非特許文献10】Salmeron et al., (1991) J. Immunol. 147: 3047
- 【非特許文献11】Umana, P., et al., Nature Biotechnol. 17 (1999) 176-180
- 【非特許文献12】Hristodorov D, Fischer R, Linden L., Mol Biotechnol. 2012 Oct 25. (Epub 50

)

【非特許文献13】Eur. J. Immunol., 23, 1098 (1993)

【非特許文献14】Immunology, 86, 319 (1995)

【非特許文献15】Chemical Immunology, 65, 88 (1997)

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

【0015】

(発明の要旨)

10

本発明は、BCMAに特異的に結合するモノクローナル抗体を含み、該抗体は、濃度6.25nMでの該抗体の結合が、140ng/ml マウスAPRILによって10%超は低下せず、好ましくは、APRILなしのヒトBCMAへの該抗体の結合と比較して、ELISAアッセイにおいて450nmのODとして測定して、1%超は低下しないことを特徴とする。好ましくは、上記抗体は、濃度50nMでの該抗体の結合が、ELISAアッセイにおいて450nmのODとして測定して、APRILなしのヒトBCMAへの該抗体の結合と比較して、140ng/ml マウスAPRILによって10%超は低下しないことを特徴とする。

【0016】

好ましくは、本発明に従う抗体は、H929細胞(ATCC(登録商標) CRL-9068TM)への抗BCMA抗体の結合に関して15nM以下というEC50値を示すことで特徴付けられる。

20

a) 上記抗体の結合は、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、APRILなしでのヒトBCMAへの上記抗体の結合と比較して、100ng/ml APRILによって20%超は低下しない、

b) 上記抗体は、APRILと比較して、APRIL依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、および

c) 上記抗体は、上記抗体なしと比較した場合、APRILなしでのNF- κ B活性化を20%超は変化させない。

【0017】

30

本発明は、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体に関し、該抗体は、

a) 該抗体の結合は、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、APRILもしくはBAFFそれぞれなしでのヒトBCMAへの該抗体の結合と比較して、20%超は100ng/ml APRILによって低下せず、100ng/ml BAFFによって低下しない、

b) 該抗体は、APRILのみと比較して、APRIL依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、

c) 該抗体は、BAFFのみと比較して、BAFF依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、および

d) 該抗体は、該抗体なしと比較して、BAFFおよびAPRILなしのNF- κ B活性化を20%超は変化させない、ことを特徴とする。

40

【0018】

好ましくは、上記抗体は、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAで測定して、100ng/ml APRILによって15%超は低下しないという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記抗体は、上記ELISAで測定して、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が1000ng/ml APRILによって低下しない、および20%超は低下しない、という点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記抗体は、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAで測定して、1000ng/ml APRILによって15%超は低下しないという点でさらに特徴付けられる。

50

【0019】

好ましくは、上記抗体は、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAで測定して、 100 ng/ml APRILによって低下しない、および 100 ng/ml BAFFによって15%超は低下しないという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記抗体は、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAで測定して、 1000 ng/ml APRILによって低下しない、および 1000 ng/ml BAFFによって20%超は低下しないという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記抗体は、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAで測定して、 1000 ng/ml APRILによって低下しない、および 1000 ng/ml BAFFによって15%超は低下しないという点でさらに特徴付けられる。

10

【0020】

好ましくは、本発明に従う抗体は、APRIL依存性NF- κ B活性化を15%超は変化させない。好ましくは、本発明に従う抗体は、APRILなしでのBAFF依存性NF- κ B活性化を15%超は変化させない。好ましくは、本発明に従う抗体は、APRILおよびBAFFなしでのNF- κ B活性化を15%超は変化させない。

【0021】

好ましくは、本発明に従う抗体は、BCMAへのその結合が、APRILもしくはBAFFそれぞれなしでのNCI-H929細胞への上記抗体の結合と比較して、 $2.5\text{ }\mu\text{g/ml}$ の濃度のAPRILまたはBAFFそれぞれの存在下もしくは非存在下で、NCI-H929細胞(ATCC(登録商標) CRL-9068^TM)への5nM、好ましくは、50nM、および好ましくは、140nMの濃度の上記抗体の結合として測定して、APRILによって低下しない、および好ましくは、BAFFによって25%超は低下しない、好ましくは、20%超は低下しない、好ましくは、10%超は低下しないことを特徴とする。

20

【0022】

好ましくは、本発明に従う抗体は、これがカニクイザルBCMAにも特異的に結合するという点でさらに特徴付けられる。

【0023】

本発明のさらに好ましい実施形態において、本発明に従う抗体は、単鎖可変フラグメント(scFv)を含むFcありもしくはFcなしの二重特異的抗体(例えば、二重特異的T細胞結合因子(engager)、ダイアボディー、もしくはタンデムscFv、DARPinなどの抗体模倣物、裸の単一特異的抗体、または抗体薬物結合体)である。好ましくは、二重特異的抗体は、BCMAおよびCD3に特異的に結合する。

30

【0024】

本発明は、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体の選択のための方法にさらに関し、上記方法は、以下：

a) ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、APRILなしでのヒトBCMAへの上記抗体の結合と比較して、 100 ng/ml APRILによって20%超は低下しない

b) 上記抗体は、APRILと比較して、APRIL依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、

40

c) 上記抗体は、上記抗体なしと比較して、APRILなしでのNF- κ B活性化を20%超は変化させない、

の場合に、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体を選択する工程において特徴付けられる。

【0025】

好ましくは、上記方法は、APRIL依存性NF- κ B活性化を15%超は変化させない抗体が選択される点で特徴付けられ、好ましくは、上記方法は、APRILなしでのNF- κ B活性化を15%超は変化させない抗体が選択されることを特徴とする。

【0026】

50

好ましくは、上記方法は、さらに、カニクイザルおよびヒトのBCMAへの上記抗体の結合が、APRILなしでのヒトBCMAへの上記抗体の結合と比較して、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、100ng/ml APRILによって20%超は低下しない場合に抗体が選択されることを特徴とする。好ましくは、上記方法は、カニクイザルおよびヒトのBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、100ng/ml APRILによって15%超は低下しない場合に、抗体が選択されるという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記方法は、カニクイザルおよびヒトのBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、1000ng/ml APRILによって低下せず、1000ng/mlによって20%超は低下しない場合に、抗体が選択されるという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記方法は、カニクイザルおよびヒトのBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、1000ng/ml APRILによって15%超は低下しない場合に抗体が選択されるという点でさらに特徴付けられる。

10

【0027】

本発明はさらに、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体の選択のための方法に関し、上記方法は、以下：

a) ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、APRILもしくはBAFFそれぞれなしでのヒトBCMAへの上記抗体の結合と比較して、100ng/ml APRILによって低下せず、100ng/ml BAFFによって20%超は低下しない、

20

b) 上記抗体は、APRILのみと比較して、APRIL依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、

c) 上記抗体は、BAFFのみと比較して、BAFF依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、および

d) 上記抗体は、上記抗体なしと比較して、BAFFおよびAPRILなしでのNF- κ B活性化を20%超は変化させない

の場合に、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体を選択する工程において特徴付けられる。

【0028】

好ましくは、上記方法は、APRIL依存性NF- κ B活性化を15%超は変化させない抗体が選択されることを特徴とする。好ましくは、上記方法は、BAFF依存性NF- κ B活性化を15%超は変化させない抗体が選択されることを特徴とする。好ましくは、上記方法は、APRILおよびBAFFなしでのNF- κ B活性化を15%超は変化させない抗体が選択されることを特徴とする。好ましくは、上記方法は、カニクイザルおよびヒトのBCMAに特異的に結合する抗体が選択されることを特徴とする。

30

【0029】

好ましくは、上記方法は、さらに、カニクイザルおよびヒトのBCMAへの上記抗体の結合が、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、APRILもしくはBAFFそれぞれなしでのヒトBCMAへの上記抗体の結合と比較して、100ng/ml APRILによって低下せず、100ng/ml BAFFによって20%超は低下しない場合に抗体が選択されることを特徴とする。好ましくは、上記方法は、カニクイザルおよびヒトのBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、100ng/ml APRILによって低下せず、100ng/ml BAFFによって15%超は低下しない場合に抗体が選択されるという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記方法は、カニクイザルおよびヒトのBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、1000ng/ml APRILによって低下せず、1000ng/mlによって20%超は低下しない場合に抗体が選択されるという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記方法は、カニクイザルおよびヒトのBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、1000ng/ml APRILによって低下せず、1000ng/ml BAFFによって15%超は低下しない場合に抗体が

40

50

選択されるという点でさらに特徴付けられる。

【0030】

本発明はさらに、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体の選択のための方法に関し、上記方法は、抗体を選択する工程において特徴付けられ、BCMAへのその結合が、APRILおよび好ましくは、BAFFなしでのNCI-H929細胞への上記抗体の結合と比較して、APRILおよび好ましくは、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度のBAFFの存在下もしくは非存在下でNCI-H929細胞(ATCC(登録商標) CRL-9068TM)への、 5 nM 、好ましくは、 50 nM 、および好ましくは、 140 nM の濃度での上記抗体の結合として測定して、APRILによって低下せず、好ましくは、BAFFによって25%超は低下しない、好ましくは、20%超は低下しない、好ましくは、10%超は低下しないことを特徴とする。

10

【0031】

本発明に基づいて、BCMAに対する本発明に従う抗体、BCMAに対する抗体-薬物結合体およびBCMAに対する二重特異的抗体、ならびに当該分野の技術水準で公知のFc部分ありもしくはなしの種々の様式におけるさらなる標的(例えば、上記の「発明の背景」を参照のこと)、単鎖可変フラグメント(scFv)(例えば、二重特異的T細胞結合因子、ダイアボディー、タンデムscFv、およびDARPinなどの抗体模倣物)を生成することは可能である。二重特異的抗体様式は、当該分野の技術水準で周知であり、例えば、Kontermann RE, mAbs 4:21-16 (2012); Holliger P., Hudson PJ, Nature Biotech. 23 (2005) 1126-1136およびChan AC, Carter PJ Nature Reviews Immunology 10, 301-316 (2010)およびCuesta AM et al., Trends Biotech. 28 (2011) 355-362にも記載される。

20

【0032】

本発明のさらなる実施形態は、2つの標的ヒトCD3(「CD3」ともさらに称される)およびヒトBCMAの細胞外ドメイン(「BCMA」ともさらに称される)に対する二重特異的抗体であり、BCMAに対する抗体として、本発明に従う抗BCMA抗体を含む点で特徴付けられる。

【0033】

本発明は、好ましくは、BCMAおよびCD3に対する二重特異的抗体に関し、上記抗体は、

30

a) 上記抗体の結合は、ELISAアッセイにおいて 405 nm でのODとして測定して、APRILなしでのヒトBCMAへの上記抗体の結合と比較して、 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ APRILによって20%超は低下しない、

b) 上記抗体は、APRILと比較して、APRIL依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、および

c) 上記抗体は、上記抗体なしと比較して、APRILなしでのNF- κ B活性化を20%超は変化させない、

ことを特徴とする。

40

【0034】

本発明は、好ましくは、BCMAおよびCD3に対する二重特異的抗体に関し、上記抗体は、

a) 上記抗体の結合は、ELISAアッセイにおいて 405 nm でのODとして測定して、APRILもしくはBAFFそれぞれなしでのヒトBCMAへの上記抗体の結合と比較して、 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ APRILによって低下せず、 $100 \text{ ng}/\text{ml}$ BAFFによって20%超は低下しない、

b) 上記抗体は、APRILのみと比較して、APRIL依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、

c) 上記抗体は、BAFFのみと比較して、BAFF依存性NF- κ B活性化を20%

50

超は変化させない、および

d) 上記抗体は、上記抗体なしと比較して、B A F FおよびA P R I LなしでのN F - B活性化を20%超は変化させない、
ことを特徴とする。

【0035】

B C M AおよびC D 3に対する上記二重特異的抗体は、好ましくは、本発明に従う抗B C M A抗体および抗C D 3抗体を含むことを特徴とし、ここで

a) 上記標的のうち的一方に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖；ならびに

b) 上記標的のうちのもう一方に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖であって、ここでその可変ドメインV LおよびV Hもしくはその定常ドメインC LおよびC H 1は、互いに置き換えられている。

【0036】

好ましくは、上記可変ドメインV Hは、上記抗C D 3 抗体の重鎖C D R 1、C D R 2およびC D R 3としてそれぞれ配列番号1、2および3の重鎖C D Rを含み、ならびに上記可変ドメインV Lは、上記二重特異的抗体の上記抗C D 3 抗体部分の軽鎖C D R 1、C D R 2およびC D R 3としてそれぞれ配列番号4、5および6の軽鎖C D Rを含む。

【0037】

好ましくは、本発明に従うこのような二重特異的抗体は、上記抗C D 3 抗体部分の可変ドメインが配列番号7および配列番号8のものであることを特徴とする。

【0038】

好ましくは、本発明の従う抗体は、重鎖C D R 1、C D R 2およびC D R 3としてそれぞれ配列番号37~45、47~55、57~65の重鎖C D Rを含む可変ドメインV H、ならびに上記抗B C M A抗体の軽鎖C D R 1、C D R 2およびC D R 3としてそれぞれ配列番号67~75、77~85、87~95の軽鎖C D Rを含む可変ドメインV Lを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う上記抗体は、それぞれ、可変ドメインV Hが配列番号17~25の群より選択される、および上記可変ドメインV Lが配列番号27~35の群から選択されることを特徴とする。

【0039】

好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号37のC D R 1 H、配列番号47のC D R 2 H、配列番号57のC D R 3 H、ならびに配列番号67のC D R 1 L、配列番号77のC D R 2 L、配列番号87のC D R 3 Lを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号38のC D R 1 H、配列番号48のC D R 2 H、配列番号58のC D R 3 H、ならびに配列番号68のC D R 1 L、配列番号78のC D R 2 L、配列番号88のC D R 3 Lを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号39のC D R 1 H、配列番号49のC D R 2 H、配列番号59のC D R 3 H、ならびに配列番号69のC D R 1 L、配列番号79のC D R 2 L、配列番号89のC D R 3 Lを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号40のC D R 1 H、配列番号50のC D R 2 H、配列番号60のC D R 3 Hならびに配列番号70のC D R 1 L、配列番号80のC D R 2 L、配列番号90のC D R 3 Lを含むことを特徴とする。好ましくは、ヒトB C M Aに特異的に結合する、本発明に従う抗体は、配列番号41のC D R 1 H、配列番号51のC D R 2 H、配列番号61のC D R 3 H、ならびに配列番号71のC D R 1 L、配列番号81のC D R 2 L、配列番号91のC D R 3 Lを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号42のC D R 1 H、配列番号52のC D R 2 H、配列番号62のC D R 3 H、ならびに配列番号72のC D R 1 L、配列番号82のC D R 2 L、配列番号92のC D R 3 Lを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号43のC D R 1 H、配列番号53のC D R 2 H、配列番号63のC D R 3 H、ならびに配列番号73のC D R 1 L、配列番号83のC D R 2 L、配列番号93のC D R 3 Lを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号44のC D R 1 H、配列番号54のC D R 2 H、配列番号64のC D R 3 H、ならびに配列番号74のC D R 1 L、配列番号84のC D R 2 L、配列番号94のC D R 3 Lを含むこ

10

20

30

40

50

とを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号45のCDR1H、配列番号55のCDR2H、配列番号65のCDR3H、ならびに配列番号75のCDR1L、配列番号85のCDR2L、配列番号95のCDR3Lを含むことを特徴とする。

【0040】

好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号17～25からなる群より選択されるVHを含むという点で、および/または配列番号27～35からなる群より選択されるVLを含むことを特徴とする。

【0041】

好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号17のVHおよび配列番号27のVLを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号18のVHおよび配列番号28のVLを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号19のVHおよび配列番号29のVLを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号20のVHおよび配列番号30のVLを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号21のVHおよび配列番号31のVLを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号22のVHおよび配列番号32のVLを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号23のVHおよび配列番号33のVLを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号24のVHおよび配列番号34のVLを含むことを特徴とする。好ましくは、本発明に従う抗体は、配列番号25のVHおよび配列番号35のVLを含むことを特徴とする。

【0042】

本発明のさらなる実施形態において、抗体は、配列番号46のCDR1H、配列番号56のCDR2H、配列番号66のCDR3H、ならびに配列番号76のCDR1L、配列番号86のCDR2L、配列番号96のCDR3Lを含むことを特徴とする。本発明のさらなる実施形態において、抗体は、配列番号26のVHおよび配列番号36のVLを含むことを特徴とする。抗体MAB 13A7の結合は、ELISAアッセイで測定して、100ng/ml APRILによって20%超、低下する。

【0043】

好ましくは、本発明に従う二重特異的抗体は、一方の重鎖のCH3ドメインおよび他方の重鎖のCH3ドメインが、上記抗体CH3ドメインの間の元の界面を含む界面で各々接触することを特徴とし；ここで上記界面は、上記二重特異的抗体の形成を促進するように変化し、ここで上記変化は、

a) 上記二重特異的抗体内で他方の重鎖のCH3ドメインの元の界面に接触する一方の重鎖のCH3ドメインの元の界面内で、1つのアミノ酸残基が、より大きな側鎖体積を有する1つのアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、他方の重鎖のCH3ドメインの界面内の間隙に配置可能である一方の重鎖のCH3ドメインの界面内で突出部を生成するように、一方の重鎖のCH3ドメインが変化する、ならびに

b) 上記二重特異的抗体内で第1のCH3ドメインの元の界面に接触する第2のCH3ドメインの元の界面内で、1つのアミノ酸残基が、より小さい側鎖体積を有する1つのアミノ酸残基で置き換えられ、それによって、第1のCH3ドメインの界面内の突出部が配置可能である第2のCH3ドメインの界面内で間隙を生成するように、他方の重鎖のCH3ドメインが変化する、ことを特徴とする。

【0044】

好ましくは、このような二重特異的抗体は、より大きな側鎖体積を有する上記アミノ酸残基が、アルギニン(R)、フェニルアラニン(F)、チロシン(Y)、トリプトファン(W)からなる群より選択されることを特徴とする。

【0045】

好ましくは、このような二重特異的抗体は、より小さい側鎖体積を有するアミノ酸残基が、アラニン(A)、セリン(S)、スレオニン(T)、バリン(V)からなる群より選

択されることを特徴とする。

【 0 0 4 6 】

好ましくは、このような二重特異的抗体は、両方の C H 3 ドメインが、各 C H 3 ドメインの対応する位置におけるアミノ酸としてシステイン (C) の導入によってさらに変化させられることを特徴とする。

【 0 0 4 7 】

好ましくは、このような二重特異的抗体は、両方の重鎖の定常重鎖ドメイン C H 3 のうちの一方が、定常重鎖ドメイン C H 1 によって置き換えられ；そして他方の定常重鎖ドメイン C H 3 が、定常軽鎖ドメイン C L によって置き換えられることを特徴とする。

【 0 0 4 8 】

本発明はさらに、1 0 0 n M の上記抗体の濃度で 2 4 時間後に、同一条件下でコントロールとして親 F c 部分を有する同じ抗体を使用するコントロールと比較して、B C M A 発現細胞の調製物のうちの 2 0 % 以上の細胞の細胞死を A D C C によって誘導する改変 F c 部分を含む本発明に従う抗体に関する。このような抗体は、好ましくは、裸の抗体である。

10

【 0 0 4 9 】

好ましくは、本発明に従う抗体は、A s n 2 9 7 においてオリゴサッカリド (糖) の全量のうちの 6 0 % 以下のフコース量を有する抗体である (例えば、U S 2 0 1 2 0 3 1 5 2 6 8 を参照のこと) 。

【 0 0 5 0 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明に従う抗体の調製のための方法であり、上記方法は、

20

a) 宿主細胞を

b) 本発明に従う抗体の軽鎖および重鎖をコードする核酸分子を含むベクター

で形質転換する工程

c) 該宿主細胞を、該抗体分子の合成を可能にする条件下で培養する工程；および

d) 該抗体分子を該培養物から回収する工程、

を包含する。

【 0 0 5 1 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明に従う二重特異的抗体の調製のための方法であり、上記方法は、

30

e) 宿主細胞を、

f) 第 1 の標的に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖をコードする核酸分子を含むベクター

g) 第 2 の標的に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖をコードする核酸分子を含むベクター

で形質転換する工程であって、ここで可変ドメイン V L および V H もしくは定常ドメイン C L および C H 1 は、互いに置き換えられる、工程；

h) 上記宿主細胞を、上記抗体分子の合成を可能にする条件下で培養する工程；ならびに

40

i) 上記抗体分子を上記培養物から回収する工程、

を包含する。

【 0 0 5 2 】

本発明のさらなる実施形態は、本発明に従う抗体をコードする核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞である。本発明のさらなる実施形態は、第 1 の標的に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖をコードする核酸分子を含むベクターおよび第 2 の標的に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖をコードする核酸分子を含むベクターを含む宿主細胞であり、ここで可変ドメイン V L および V H もしくは定常ドメイン C L および C H 1 は、互いに置き換えられる。

【 0 0 5 3 】

50

本発明のさらに好ましい実施形態は、本発明に従う抗体および薬学的に受容可能な賦形剤を含む薬学的組成物である。

【0054】

本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬としての使用のための本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0055】

本発明のさらに好ましい実施形態は、形質細胞障害の処置における医薬としての使用のための、本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0056】

本発明のさらに好ましい実施形態は、多発性骨髄腫の処置における医薬としての使用のための、本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

10

【0057】

本発明のさらに好ましい実施形態は、全身性エリテマトーデスの処置における医薬としての使用のための本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0058】

本発明のさらに好ましい実施形態は、抗体媒介性拒絶の処置における医薬として使用するための、単一特異的抗体、ADCを增強した裸の抗体、抗体-薬物結合体もしくは二重特異的抗体を含む本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0059】

好ましくは、本発明に従う抗体は、多発性骨髄腫MMもしくはBCMAを発現する他のB細胞障害などの形質細胞障害の処置に使用され得る。MMは、骨髄区画中の異常な形質細胞のモノクローナルな増殖および蓄積によって特徴付けられるB細胞悪性疾患である。MMはまた、同じIgG遺伝子再構成および体細胞超変異を有する循環クローン性B細胞を伴う。MMは、低レベルの骨髄形質細胞およびモノクローン性のタンパク質によって特徴付けられる、意義不明の単クローン性高ガンマグロブリン血症(MGUS)といわれる無症候性の前悪性状態から生じる。MM細胞は、低速で増殖する。MMは、多発性の構造的染色体変化(例えば、不均衡な転座)の進行性の発生から生じる。MMは、悪性形質細胞および骨髄微小環境(例えば、正常な骨髄間質細胞)の相互作用を伴う。活動性MMの臨床徴候は、モノクローナル抗体スパイク、形質細胞が過密な骨髄、溶解性の骨病変および破骨細胞の過剰刺激から生じる骨破壊(Dimopoulos & Terpos, Ann Oncol 2010; 21 suppl 7: vii143-150)が挙げられる。形質細胞に関わる、すなわち、BCMAを発現する別のB細胞障害は、全身性エリテマトーデス(SLE)(狼瘡としても公知)である。SLEは、身体のいかなる部分にも影響を及ぼし得る全身性の自己免疫疾患であり、免疫系がその身体自体の細胞および組織を攻撃し、慢性的な炎症および組織損傷を生じることによって表される。これは、抗体-免疫複合体が沈着し、さらなる免疫応答を引き起こすIII型過敏性反応である(Inaki & Lee, Nat Rev Rheumatol 2010; 6: 326-337)。

20

30

【0060】

本発明のさらなる実施形態は、形質細胞および同種異系抗体が関わる抗体媒介性同種異系移植片拒絶(急性および慢性の抗体媒介性拒絶(AMR)を含む)の処置のための本発明に従う抗体である。急性AMRは、数日間にわたって起こる移植片機能不全によって特徴付けられ、予め形成されたか、または移植後に発生したデノボドナー特異的抗体のいずれかの結果である。それは、全ての腎移植のうちの約5~7%において起こり、以前に感作された(pre-sensitized)クロスマッチ陽性患者の中での急性拒絶エピソードのうちの20~48%の原因である(Colvin and Smith, Nature Rev Immunol 2005; 5(10): 807-817)。急性AMRを有する患者における組織病理検査からは、しばしば、内皮細胞膨潤、糸球体および尿細管周囲毛細血管の好中球浸潤、フィブリン血栓、間質性浮腫、ならびに出血が明らかになる(Trpkov et al. Transplantation 199

40

50

6 ; 61 (11) : 1586 - 1592)。AMRは、同種異系移植片生検におけるC4d染色もしくは抗体検出の他の改善された方法で同定され得る。AMRの別の形態はまた、ドナー特異的抗体も関わるが、移植後数ヶ月およびさらには数年以内に発現する慢性同種異系移植片傷害として公知である。それは、腎生検で移植系球体症（慢性同種異系移植片系球体症としても公知）として認められ、系球体メサングウム増殖および毛細管基底膜の二重構造（capillary basement membrane duplication）によって特徴付けられる（Regele et al. J Am Soc Nephrol 2002 ; 13 (9) : 2371 - 2380）。臨床発現は、早期段階での無症候性である患者から、進行した段階でのネフローゼ範囲のタンパク尿、高血圧症および同種異系移植片機能不全を有するまで変動する。疾患進行は、極めて急激であり得、特に、進行中の急性AMRを伴い、数ヶ月内に生着不全を生じる（Fotheringham et al. Nephron - Clin Pract 2009 ; 113 (1) : c1 - c7）。患者生検における移植系球体症の有病率は、1年で5%から5年で20%の間で変動する（Cosio et al. Am J Transplant 2008 ; 8 : 292 - 296）。

【0061】

本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬としての使用のための、本発明に従う裸の抗体を含む薬学的組成物である。

【0062】

本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬としての使用のための、増大したエフェクター機能を有する本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0063】

本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬としての使用のための、低下したエフェクター機能を有する本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0064】

本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬としての使用のための二重特異的抗体として本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0065】

本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬としての使用のための治療剤との、例えば、細胞傷害性薬剤もしくは放射性標識との結合体（薬物結合体）として、本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0066】

本発明のさらに好ましい実施形態は、医薬としての使用のための、ダイアボディーとして本発明に従う抗体を含む薬学的組成物である。

【0067】

1) APRIL依存性NF- κ B活性化をブロックも増大もしない、2) BAFF依存性NF- κ B活性化をブロックも増大もしない、および3) BAFFおよびAPRILなしでのNF- κ B活性化を誘導しない本発明に従う抗体（BCMA Mab）、好ましくは、Fc糖操作単一特異的抗体（好ましくは、裸の抗体）は、上記BCMA MabがMM患者におけるBCMA陽性腫瘍細胞を根絶する有効性が血清中もしくは腫瘍においてAPRILおよびBAFFの濃度によって負の影響を受けないことを回避することを、本発明者らは認識した。さらに、上記BCMA Mabは、BAFFおよびAPRILなしでNF- κ B活性化を誘導しないので、1) BCMA陽性応答性（BCMA-positive resp.）腫瘍細胞の生存の活性化および増大が起こらない；2) BCMA-Mabの有効性を低下させ得るレセプターインターナリゼーションもまた、起こらない可能性がある。抗体の有効性は、通常、腫瘍占有/抗体濃度とともに増大するので、本発明に従う抗BCMA抗体以外のBCMAに対する抗体での結果は、有効性においてかなりの患者間変動性があり得る（例えば、全体的に有効性が低い）。

【0068】

BCMAおよびCD3に対する二重特異的抗体に関して、本発明者らは、BCMAに対

する、および活性化T細胞抗原に特異的に結合し得る二重特異的抗体（BCMA-TCB）が、1）APRIL依存性NF- κ B活性化をブロックも増大もさせない、2）好ましくは、BAFF依存性NF- κ B活性化をブロックも増大もさせない、および3）APRILなしおよび好ましくは、BAFFなしでのNF- κ B活性化を誘導せず、MM患者においてBCMA陽性腫瘍細胞を根絶する上記BCMA-TCBの有効性が血清中もしくは腫瘍におけるAPRILおよびBAFFの濃度によって負の影響を受けることを避けることを認識する（図1および2ならびに図1および2の説明を参照のこと）。さらに、上記BCMA-TCBは、APRILなしでの、および好ましくは、BAFFなしでのNF- κ B活性化を誘導しないので、BCMA陽性応答性腫瘍細胞の活性化および生存の増大は、上記BCMA-TCBが、どんな理由にせよ、例えば、CD3への結合によってではなく、腫瘍細胞のみへの結合によって、腫瘍細胞を死滅させない場合では起こらない。さらに、BCMA-TCBの有効性を低下させ得るレセプターインターナリゼーションもまた、起こらない可能性がある。抗体の有効性は、通常、腫瘍占有/TCBの濃度とともに増大するので、本発明に従うBCMA抗体なしでのBCMA-TCBでの結果は、有効性においてかなりの患者間変動があり得る（例えば、全般的に有効性があまりない、図1および図2もまた参照のこと）。

【0069】

好ましくは、T細胞二重特異的抗体の場合の本発明に従う抗体は、好ましくは、皮下投与によって1週間に1回もしくは2回（例えば、好ましくは、0.25～2.5、好ましくは、25 mg/m²/週までの用量範囲において）投与される。本発明に従う抗体の優れた細胞傷害性活性に起因して、T細胞二重特異的でない（すなわち、一方のアーム上でCD3に結合しない）従来の単一特異的抗体もしくは従来の二重特異的抗体と比較して、本発明に従う抗体は、臨床的用量範囲の少なくとも同程度（もしくはさらに低い）を投与することができる。本発明に従う抗体に関しては、臨床状況では（例えば、1～100 mg/m²/週の用量範囲で）皮下投与が好ましいことが想定される。さらに、高レベルの血清APRILおよびBAFFを有する患者（例えば、多発性骨髄腫患者）において、本発明に従う抗体の用量を増大させることは、リガンド競合によって影響を受けない場合があるので、必ずしも必要とし得ない。対照的に、他のリガンドブロック/競合の抗BCMA抗体についての用量は、それらの患者において増大される必要があり得る。本発明に従う抗体の別の利点は、少なくとも1週間に1回もしくは2回の投与を可能にする約1～12日の排泄半減期である。

【0070】

好ましくは、裸の/結合体化していないADCC増強単一特異的抗体の場合の本発明に従う抗体は、静脈内経路によって、しかし好ましくは、皮下投与によって1週間あたり1回/2回の処置（例えば、4週間にわたって200～2000 mg/週の範囲の投与量）を可能にする特性を有する抗体である。糖操作した抗体 対 従来の抗体の優れたADCCおよび細胞除去（cell-depleting）活性に起因して（例えば、糖操作した抗CD20抗体GA101は、ADCCアッセイにとってのEC₅₀に関して、抗CD20リツキシマブより25倍強力であり、絶対的B細胞除去に関して2倍より強力である； Mossner et al., Blood 2010; 115 (22): 2293-4402）、糖操作した抗体は、従来の単一特異的抗体と比較して、臨床用量範囲が少なくとも同程度（もしくはさらに低い）で与えられる。例えば、リツキシマブ（抗CD20）は、再発性/難治性非ホジキンリンパ腫の処置のために4週間もしくは8週間にわたって375 mg/m²/週の緩徐な注入で与えられる（リツキサン（登録商標）（リツキシマブ）完全処方情報, Genentech, Inc., 2012）。糖操作した抗体は、所定の用量で患者において高い有効性を発揮し得るので（Salle et al., Blood 2012; 119 (22): 5126-5132）、本発明に従う抗体に関しては、皮下投与が可能であり、臨床状況において（例えば、疾患適応症に依存して、100～1000 mg/m²/週の用量範囲において）好ましいことが予見される。さらに、血清APRILおよびBAFFの高レベルを有する患者（例

10

20

30

40

50

えば、多発性骨髄腫患者）において、本発明に従う抗体（例えば、非リガンドブロック／競合抗体）の用量を増大させる必要はない可能性がある。なぜなら、それは、リガンド競合によって影響を受け得ないからである。対照的に、他のリガンドブロック／競合抗BCMA抗体の用量は、それらの患者において増加させる必要があり得、皮下投与を技術的により困難（例えば、薬学的）にし得る。本発明に従う抗体の別の利点は、約12日の排泄半減期と関連し、1週間に少なくとも1回もしくは2回の投与を可能にするFc部分の包含に基づく。

【0071】

本発明のさらに好ましい実施形態は、本発明に従う抗体を含む診断用組成物である。

【0072】

本発明はさらに、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体に関し、上記抗体は、上記抗体の結合が、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、APRILなしでのヒトBCMAへの上記抗体の結合と比較して、100ng/ml APRILによって20%超は低下しない、上記抗体は、APRILのみと比較して、APRIL依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、および上記抗体は、上記抗体なしと比較して、APRILなしでのNF- κ B活性化を20%超は変化させない、ことを特徴とする。好ましくは、上記抗体は、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、100ng/ml APRILによって15%超は低下しないという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記抗体は、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、1000ng/ml APRILによって20%超は低下しないという点でさらに特徴付けられる。好ましくは、上記抗体は、ヒトBCMAへの上記抗体の結合が、上記ELISAにおいて測定して、1000ng/ml APRILによって15%超は低下しないという点でさらに特徴付けられる。

【0073】

好ましくは、本発明に従う抗体は、APRIL依存性NF- κ B活性化を15%超は変化させない。好ましくは、本発明に従う抗体は、APRILなしでのNF- κ B活性化を15%超は変化させない。

【0074】

本発明によれば、ODは、405nmもしくは450nm（好ましくは、同じ相対的結果を伴う、APRILもしくはBAFFなしでの比較）で測定され得る。本発明によれば、ODは、ヒトもしくはマウスAPRILもしくはBAFFで、（好ましくは、同じ相対的結果を伴う、APRILもしくはBAFFなしでの比較）で測定され得る。本発明は、ことを特徴とする、ヒトBCMAに特異的に結合する抗体に関する。

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）

ヒトBCMAに特異的に結合する抗体であって、該抗体は、

a) 該抗体の結合は、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、APRILなしでのヒトBCMAへの該抗体の結合と比較して、100ng/ml APRILによって20%超は低下しない、

b) 該抗体は、APRILのみと比較して、APRIL依存性NF- κ B活性化を20%超は変化させない、および

c) 該抗体は、該抗体なしと比較して、APRILなしのNF- κ B活性化を20%超は変化させない、

ことを特徴とする、抗体。

（項目2）

項目1に記載の抗体であって、

ヒトBCMAに特異的に結合し、

a) 該抗体の結合は、ELISAアッセイにおいて405nmでのODとして測定して、APRILもしくはBAFFそれぞれなしでのヒトBCMAへの該抗体の結合と比較して、20%超は100ng/ml APRILによって低下せず、100ng/ml B

10

20

30

40

50

A F F によって低下しない、

b) 該抗体は、A P R I L のみと比較して、A P R I L 依存性 N F - B 活性化を 2 0 % 超は変化させない、

c) 該抗体は、B A F F のみと比較して、B A F F 依存性 N F - B 活性化を 2 0 % 超は変化させない、および

d) 該抗体は、該抗体なしと比較して、B A F F および A P R I L なしの N F - B 活性化を 2 0 % 超は変化させない、

ことを特徴とする、抗体。

(項目 3)

重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 として、それぞれ、配列番号 3 7 ~ 4 5、4 7 ~ 5 5、5 7 ~ 6 5 の重鎖 C D R を含む可変ドメイン V H を含むことを特徴とする、項目 1 または 2 に記載の抗体。

10

(項目 4)

軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 として、それぞれ、配列番号 6 7 ~ 7 5、7 7 ~ 8 5、8 7 ~ 9 5 の軽鎖 C D R を含む可変ドメイン V L を含むことを特徴とする、項目 1 ~ 3 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 5)

重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 として、それぞれ、配列番号 3 7 ~ 4 5、4 7 ~ 5 5、5 7 ~ 6 5 の重鎖 C D R を含む可変ドメイン V H を含むという点、および軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 として、それぞれ、配列番号 6 7 ~ 7 5、7 7 ~ 8 5、8 7 ~ 9 5 の軽鎖 C D R を含む可変ドメイン V L を含むことを特徴とする、項目 1 ~ 4 のいずれか 1 項に記載の抗体。

20

(項目 6)

前記可変ドメイン V H は、配列番号 1 7 ~ 2 5 の群から選択されることを特徴とする、項目 1 ~ 5 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 7)

前記可変ドメイン V L は、配列番号 2 7 ~ 3 5 の群から選択されることを特徴とする、項目 1 ~ 6 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 8)

前記可変ドメイン V H は、配列番号 1 7 ~ 2 5 の群から選択されるという点、および前記可変ドメイン V L は、配列番号 2 7 ~ 3 5 の群から選択されるという点でそれぞれ特徴付けられる、項目 1 ~ 7 のいずれか 1 項に記載の抗体。

30

(項目 9)

カニクイザル B C M A に特異的に結合することを特徴とする、項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 10)

項目 1 ~ 8 のいずれか 1 項に記載の抗体であって、

1 0 0 n M の該抗体の濃度で 2 4 時間後に、同一条件下でコントロールとして親 F c 部分を有する同じ抗体を使用するコントロールと比較して、B C M A 発現細胞の調製物のうちの 2 0 % 以上の細胞の細胞死を A D C C によって誘導する改変 F c 部分を含むことを特徴とする、抗体。

40

(項目 11)

A s n 2 9 7 においてオリゴサッカリドの全量のうちの 6 0 % 以下のフコース量を含むことを特徴とする、項目 10 に記載の抗体。

(項目 12)

標的 B C M A および C D 3 に特異的に結合する二重特異的抗体であることを特徴とする、項目 1 ~ 11 のいずれか 1 項に記載の抗体。

(項目 13)

項目 1 ~ 12 のいずれか 1 項に記載の抗体および薬学的に受容可能な賦形剤を含む、薬学的組成物。

50

(項目 1 4)

医薬としての使用のための、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体または項目 7 に記載の薬学的組成物。

(項目 1 5)

形質細胞障害の処置における医薬として使用するための、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体または項目 7 に記載の薬学的組成物。

(項目 1 6)

多発性骨髄腫の処置における医薬として使用するための、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体または項目 7 に記載の薬学的組成物。

(項目 1 7)

全身性エリテマトーデスの処置において医薬として使用するための、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体または項目 7 に記載の薬学的組成物。

(項目 1 8)

抗体媒介性拒絶の処置において医薬としての使用のための、項目 1 ~ 1 2 のいずれか 1 項に記載の抗体または項目 7 に記載の薬学的組成物。

(項目 1 9)

ヒト B C M A に特異的に結合する抗体の選択のための方法であって、該方法は、以下：

a) ヒト B C M A への該抗体の結合は、E L I S A アッセイにおいて 4 0 5 n m の O D として測定して、A P R I L なしでのヒト B C M A への該抗体の結合と比較して、1 0 0 n g / m l A P R I L によって 2 0 % 超は低下しない、

b) 該抗体は、A P R I L のみと比較して、A P R I L 依存性 N F - B 活性化を 2 0 % 以上は変化させない、および

c) 該抗体は、該抗体なしと比較して、A P R I L なしでの N F - B 活性化を 2 0 % 超は変化させない、

の場合に、ヒト B C M A に特異的に結合する抗体を選択することを特徴とする、方法。

(項目 2 0)

項目 1 9 に記載のヒト B C M A に特異的に結合する抗体の選択のための方法であって、該方法は、以下：

a) ヒト B C M A への該抗体の結合は、E L I S A アッセイにおいて 4 0 5 n m の O D として測定して、A P R I L もしくは B A F F それぞれなしでのヒト B C M A への該抗体の結合と比較して、1 0 0 n g / m l A P R I L によって低下せず、1 0 0 n g / m l B A F F によって 2 0 % 超は低下しない、

b) 該抗体は、A P R I L のみと比較して、A P R I L 依存性 N F - B 活性化を 2 0 % 超は変化させない、

c) 該抗体は、B A F F のみと比較して、B A F F 依存性 N F - B 活性化を 2 0 % 超は低下させない、および

d) 該抗体は、該抗体なしと比較して、B A F F および A P R I L なしでの N F - B 活性化を 2 0 % 超は変化させない、

の場合に、ヒト B C M A に特異的に結合する抗体を選択することを特徴とする、方法。

(項目 2 1)

カニクイザル B C M A に特異的に結合する抗体が選択されることを特徴とする、項目 1 9 または 2 0 に記載の方法。

【図面の簡単な説明】【 0 0 7 5 】

【図 1】プレートに結合した B C M A 細胞上での E L I S A による、リガンドブロック / 競合抗 B C M A 抗体に対する非リガンドブロック / 非競合抗 B C M A 抗体 ; またはリガンドブロック / 競合抗 B C M A (T C B 含有) に対する非リガンドブロック / 非競合抗 B C M A (T C B 含有) の優れた結合特性。このグラフで、多発性骨髄腫患者の血中および骨髄中に見出されるレベルを代表する可溶性 A P R I L もしくは B A F F の漸増濃度 (すなわち、1 0 n g / m l 、1 0 0 n g / m l 、1 0 0 0 n g / m l) は、プレートに結合し

10

20

30

40

50

たBCMAへの非リガンドブロック/非競合抗BCMA抗体もしくは非リガンドブロック/非競合抗BCMA(TCB含有)の結合を変化させない(実線)。対照的に、多発性骨髄腫患者の血中および骨髄中に見出されるレベルを代表する可溶性APRILもしくはBAFFの高濃度(すなわち、 $100\text{ ng/mL} \sim 1000\text{ ng/mL}$)は、プレートに結合したBCMAへの、リガンドブロック/競合抗BCMA抗体もしくはリガンドブロック/競合抗BCMA(TCB含有)の結合を低下させる(破線)。異なる特性を有する抗BCMA抗体もしくは抗BCMA(TCB含有)の濃度は、好ましくは、 $0.1\text{ pM} \sim 200\text{ nM}$ の範囲に及ぶ濃度(複数可)である。なぜなら付加の循環APRILもしくはBAFFのレベルは、 1 ng/mL (健康で正常) $\sim 100\text{ ng/mL}$ (MM, 血液)およびこれを超える(MM, 骨髄中の腫瘍)範囲に及ぶからである。

10

【図2】LDH放出アッセイにおける、リガンドブロック/競合抗BCMA抗体に対する非リガンドブロック/非競合抗BCMA抗体を含むT細胞二重特異的抗体によって媒介されるBCMA発現MM細胞の再指向T細胞傷害性の優れた効力。このグラフでは、多発性骨髄腫患者の血中および骨髄中に見出されるレベルを代表する可溶性APRILもしくはBAFFの漸増濃度(すなわち、 10 ng/mL 、 100 ng/mL 、 1000 ng/mL)は、BCMA発現MM細胞に特異的な非リガンドブロック/非競合抗BCMA抗体を含むT細胞二重特異的抗体の死滅化効力を変化させない(実線)。対照的に、多発性骨髄腫患者の血中および骨髄中に見出されるレベルを代表する可溶性APRILもしくはBAFFの高濃度(すなわち、 $100\text{ ng/mL} \sim 1000\text{ ng/mL}$)は、BCMA発現MM細胞に特異的なリガンドブロック/競合抗BCMA抗体を含むT細胞二重特異的抗体の死滅化効力を低下させる(破線)。異なる特性を有する抗BCMA抗体を伴うT細胞二重特異的物質の濃度は、好ましくは、 $0.1\text{ pM} \sim 200\text{ nM}$ の範囲に及ぶ濃度(複数可)である。なぜなら、付加の循環APRILもしくはBAFFのレベルは、 1 ng/mL (健康で正常) $\sim 100\text{ ng/mL}$ (MM, 血液)およびこれを超える(MM, 骨髄中の腫瘍)範囲に及ぶからである。

20

【図3】多発性骨髄腫細胞株でのBCMA発現。フローサイトメトリーによって検出される場合の、H929細胞への抗BCMA抗体の漸増濃度($0.3 \sim 10\text{ }\mu\text{g/mL}$)の結合の際のメジアン蛍光強度の増大。

【図4】BCMA陽性多発性骨髄腫細胞での抗BCMA抗体の結合。抗BCMA抗体濃度($0.2 \sim 40\text{ }\mu\text{g/mL}$)の関数でプロットした抗BCMA IgGクローンについての平均蛍光強度; (A) H929細胞に対してクローン13C2、17A5、83A10、(B) MKN45細胞に対してクローン13C2、17A5、83A10、(C) H929細胞に対してクローン13A4、13D2、14E1、13A7、14B11、(D) MKN45細胞に対してクローン13A4、13D2、14E1、13A7、14B11。

30

【図5】競合ELISA。マウスAPRIL($1.56 \sim 100\text{ nM}$)の濃度範囲の存在下での固定化ヒトBCMAに結合する、 500 nM もしくは 1000 nM の飽和濃度での7個の選択した抗BCMA Fabクローン(13C2、17A5、83A19、13A4、13D2、29B11、13A7)のELISA結果が示される。非競合の場合、シグナルは、上記濃度範囲にわたって上記アッセイの変動内で一定のままであり、マウスAPRILの存在下でのシグナルは、マウスAPRILが添加されなかったコントロールウェルに由来するシグナルに匹敵する。競合の場合、シグナルの濃度依存性低下が測定される。

40

【図6】FACSによる結合の競合。フローサイトメトリーによって検出される - APRILと抗BCMA抗体との競合。H929細胞に対する抗BCMA抗体クローン13A4、13D2、14E1、14B11の濃度($1\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、 $16\text{ }\mu\text{g/mL}$ 、および $40\text{ }\mu\text{g/mL}$)の関数で検出した、 1000 ng/mL の濃度で使用される - APRIL(FITCシグナル)の相対的メジアン蛍光強度。アイソタイプコントロールの存在下での - APRILの結合の際のメジアン蛍光強度を、1に設定した; 他のシグナルを、これに対して正規化した。抗BCMA抗体の存在下でのBCMA陽性H929細胞へのA

50

P R I L 結合の検出を、抗 H A 蛍光色素結合体化抗体によって測定した。

【図 7】F A C S による結合の競合。フローサイトメトリーによって検出される抗 B C M A 抗体と - A P R I L との競合。 - A P R I L 1 0 0 0 n g / m L の非存在下もしくは存在下で検出される、R P M I 細胞に対して抗 B C M A 抗体クローン 1 3 A 4、1 3 C 7、1 3 D 2、1 4 B 1 1、1 7 A 5、8 3 A 1 0 に関して 4 0 μ g / m L の濃度で使用される抗 B C M A 抗体の相対的メジアン蛍光強度 (A l e x a . F l u o r 6 4 7 シグナル)。 - A P R I L の非存在下での抗 B C M A 抗体の結合の際のメジアン蛍光強度を 1 に設定した； - A P R I L の存在下での上記抗 B C M A 抗体に対するそれぞれの他のシグナルを、それに対して正規化した。 - A P R I L の存在下での B C M A 陽性 R P M I 細胞への抗 B C M A 抗体結合の検出を、抗ヒト F c 蛍光色素結合体化抗体によって測定した。

10

【図 8】フローサイトメトリーによって検出される同時インキュベーション後の抗 B C M A 抗体と - A P R I L との競合。(A) 2 . 5 μ g / m L - A P R I L の存在下もしくは非存在下での濃度 2 0 μ g / m L での抗 B C M A 抗体クローン 1 4 B 1 1、1 3 D 2、1 3 A 4、1 7 A 5 および 8 3 A 1 0 の平均蛍光強度および相対的蛍光シグナル (A l e x a . F l u o r 6 4 7 シグナル)、(B) 2 . 5 μ g / m L - A P R I L および抗 B C M A 抗体クローン 8 3 A 1 0 (2 0 μ g / m L) の濃度での - A P R I L (F I T C シグナル) の平均蛍光強度および相対的蛍光シグナル (A l e x a . F l u o r 6 4 7 シグナル) を測定した。F I T C 結合体化抗ヒト F c 抗体での - A P R I L の存在下での抗 B C M A 抗体の検出を、 - A P R I L の非存在下による、抗 B C M A 抗体クローンのシグナルに対して正規化した。A l e x a . F l u o r 6 4 7 結合体化抗 H A 抗体による、抗 B C M A 抗体クローンの存在下での - A P R I L の検出は、アイソタイプコントロールの存在下での - A P R I L シグナルに対して正規化した。

20

【発明を実施するための形態】

【 0 0 7 6 】

(発明の詳細な説明)

用語「 B C M A、標的 B C M A、ヒト B C M A」とは、本明細書で使用される場合、B C M A ; T R 1 7 _ H U M A N , T N F R S F 1 7 (U n i P r o t Q 0 2 2 2 3) としても公知であり、分化した形質細胞で優先的に発現される腫瘍壊死レセプタースーパーファミリーのメンバーであるヒト B 細胞成熟標的に関する。B C M A の細胞外ドメインは、U n i P r o t によれば、アミノ酸 1 ~ 5 4 (もしくは 5 ~ 5 1) からなる。用語「 B C M A に対する抗体、抗 B C M A 抗体」とは、本明細書で使用される場合、B C M A の細胞外ドメインに特異的に結合する抗体に関する。

30

【 0 0 7 7 】

「 B C M A に特異的に結合する」とは、抗体が B C M A を標的とすることについて治療剤として有用であるように十分な親和性を有して、標的である B C M A に結合し得る抗体をいう。いくつかの実施形態において、関連しない非 B C M A タンパク質への抗 B C M A 抗体の結合の程度は、例えば、表面プラズモン共鳴 (S P R)、例えば、B i a c o r e (登録商標)、酵素結合イムノソルベント (E L I S A) もしくはフローサイトメトリー (F A C S) によって測定される場合、B C M A への上記抗体の結合より約 1 0 倍、好ましくは、> 1 0 0 倍弱い。好ましくは、B C M A に結合する抗体は、解離定数 (K d) 1 0 ⁻⁸ M 以下、好ましくは、1 0 ⁻⁸ M ~ 1 0 ⁻¹³ M、好ましくは、1 0 ⁻⁹ M ~ 1 0 ⁻¹³ M を有する。好ましくは、上記抗 B C M A 抗体は、種々の種 (好ましくは、ヒトおよびカニクイザルの中で) に由来する B C M A の中で保存されている B C M A のエピートに結合する。「 C D 3 および B C M A に特異的に結合する二重特異的抗体」とは、両方の標的への結合に関するそれぞれの定義に言及する。B C M A (もしくは B C M A および C D 3) に特異的に結合する抗体は、他のヒト抗原に結合しない。従って、E L I S A では、このような関連しない標的についての O D 値は、特定のアッセイの検出限界の値以下 (好ましくは、> 0 . 3 n g / m L)、またはプレートに結合した B C M A がいないもしくはトランスフェクトされていない H E K 2 9 3 細胞を伴うコントロールサンプルの O D

40

50

値以下である。

【0078】

用語「APRIL」とは、本明細書で使用される場合、組換え短縮型マウスAPRIL（アミノ酸106～241；NP__076006）に関する。APRILは、Ryan, 2007（Mol Cancer Ther; 6（11）：3009-18）に記載されるように生成され得る。

【0079】

用語「BAFF」とは、本明細書で使用される場合、組換え短縮型ヒトBAFF（UniProt Q9Y275（TN13B__HUMAN））に関し、これは、Gordon, 2003（Biochemistry; 42（20）：5977-5983）に記載されるように生成され得る。好ましくは、Hisタグ化BAFFが、本発明に従って使用される。好ましくは、上記Hisタグ化BAFFは、BAFF残基82～285をコードするDNAフラグメントを発現ベクターにクローニングし、N末端Hisタグ、そのあとにトロンピン切断部位を有する融合物を作り、上記ベクターを発現させ、その回収されたタンパク質をトロンピンで切断することによって生成される。

【0080】

抗BCMA抗体は、APRILおよび/もしくはBAFFの存在下および非存在下で、プレートに結合したBCMAを使用してヒトBCMAへの結合に関してELISAによって分析される。このアッセイに関して、プレートに結合したBCMAの量、好ましくは、1.5 μg/mL、および0.1 pM～200 nMの範囲に及ぶ抗BCMA抗体の濃度（複数可）が使用される。BCMAへの結合が本発明に従って阻害されないBCMA抗体は、「ELISAアッセイにおいてヒトBCMAへのAPRILおよび/もしくはBAFFの結合を阻害しない」抗BCMA抗体である。

【0081】

用語「NF- B」は、本明細書で使用される場合、組換えNF- B p50（受託番号P19838）に関する。NF- B活性は、NCI-H929 MM細胞（CRL-9068TM）の抽出物のDNA結合ELISAによって測定される。NCI-H929 MM細胞（未処理、または0.1 μg/mL TNF-、1000 ng/mL 熱処理HT-短縮型BAFF、1000 ng/mL 短縮型BAFF、0.1 pM～200 nM アイソタイプコントロール、ならびに0.1 pM～200 nM 抗BCMA抗体ありもしくはなし、で処理）を、20分間インキュベートする。NF- B活性を、NF- Bコンセンサス配列（US6150090）に結合したp65由来の化学発光シグナルを検出する機能的ELISAを使用してアッセイする。

【0082】

APRIL依存性NF- B活性化を20%超はブロックしない、およびAPRIL依存性NF- B活性化を20%超は低下させない、およびAPRIL依存性NF- B活性化を20%超は増大させない抗体は、本発明に従う抗体なしでのAPRIL誘導性NF- B活性化（コントロール群）と比較して、20%超は「APRIL依存性NF- B活性化を変化させない」とみなされる；20%は、実験間の平均標準変動性（mean standard variability）を表す。好ましくは、本発明に従う抗体は、APRIL依存性NF- B活性化を15%超は変化させない。

【0083】

BAFF依存性NF- B活性化を20%超はブロックしない、およびBAFF依存性NF- B活性化を20%超は低下させない、およびBAFF依存性NF- B活性化を20%超は増大させない抗体は、本発明に従う抗体なしでのBAFF誘導性NF- B活性化（コントロール群）と比較して、20%超は「BAFF依存性NF- B活性化を変化させない」とみなされる；20%は、実験間の平均標準変動性を表す。好ましくは、本発明に従う抗体は、BAFF依存性NF- B活性化を15%超は変化させない。

【0084】

APRILおよびBAFFなしでのNF- B活性化を20%超はブロックしない、お

10

20

30

40

50

および A P R I L および B A F F なしでの N F - B 活性化を 20 % 超は低下させない、および A P R I L および B A F F なしでの N F - B 活性化を 20 % 超は増大させない抗体は、本発明に従う抗体なしでの A P R I L 誘導性 N F - B 活性化（コントロール群）と比較して、20 % 超は「A P R I L および B A F F なしでの N F - B 活性化を変化させない」とみなされる；20 % は、実験間の平均標準変動性を表す。好ましくは、本発明に従う抗体は、A P R I L および B A F F なしでの N F - B 活性化を 15 % 超は変化させない。

【0085】

本発明に従う抗体が大過剰（好ましくは、最大 500 nM もしくは 1000 nM）で用いられる場合はまた、上記抗体の結合は、100 ng / ml A P R I L によって、および好ましくは、B A F F によって 20 % 超は低下しない、ならびに A P R I L ありおよびなしで A P R I L 依存性 N F - B 活性化を 20 % 超は変化せず、ならびに好ましくは、B A F F ありおよびなしで 20 % 超は変化しない。

【0086】

用語「さらなる標的」は、本明細書で用いられる場合、好ましくは、C D 3 のいずれかを意味する。用語「第 1 の標的および第 2 の標的」とは、第 1 の標的としての C D 3 および第 2 の標的としての B C M A を意味するか、または第 1 の標的としての B C M A および第 2 の標的としての C D 3 を意味するかのいずれかである。

【0087】

用語「C D 3 もしくは C D 3」とは、本明細書で用いられる場合、U n i P r o t P 0 7 7 6 6 (C D 3 E _ _ H U M A N) の下で記載されるヒト C D 3 に関する。用語「C D 3 に対する抗体、抗 C D 3 抗体」は、C D 3 に特異的に結合する抗体に関する。好ましくは、上記抗体は、重鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 として、それぞれ、配列番号 1、2 および 3 の重鎖 C D R を含む可変ドメイン V H、ならびに軽鎖 C D R 1、C D R 2 および C D R 3 として、それぞれ、配列番号 4、5 および 6 の軽鎖 C D R を含む可変ドメイン V L を含む。好ましくは、上記抗体は、配列番号 7 (V H) および配列番号 8 (V L) の可変ドメインを含む。

【0088】

用語「抗体」とは、本明細書で用いられる場合、モノクローナル抗体をいう。抗体は、2 対の「軽鎖」(L C) および「重鎖」(H C) (このような軽鎖 (L C) / 重鎖対は、本明細書で L C / H C と省略される) からなる。このような抗体の軽鎖および重鎖は、いくつかのドメインからなるポリペプチドである。各重鎖は、重鎖可変領域 (本明細書で H C V R もしくは V H と省略される) および重鎖定常領域を含む。上記重鎖定常領域は、重鎖定常ドメイン C H 1、C H 2 および C H 3 (抗体クラス I g A、I g D、および I g G)、ならびに必要に応じて重鎖定常ドメイン C H 4 (抗体クラス I g E および I g M) を含む。各軽鎖は、軽鎖可変ドメイン V L および軽鎖定常ドメイン C L を含む。上記可変ドメイン V H および V L は、より保存された、フレーム領域 (F R) といわれる領域が散在した超可変領域 (相補性決定領域 (C D R) とはいわれる) へとさらに細分類され得る。各 V H および V L は、3 つの C D R および 4 つの F R から構成され、アミノ末端からカルボキシ末端まで以下の順で配置される：F R 1、C D R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、F R 4。重鎖および軽鎖の「定常ドメイン」は、標的への抗体の結合には直接関与していないが、種々のエフェクター機能を示す。

【0089】

用語「抗体」は、それらの特徴的な特性が保持されている限りにおいて、例えば、マウス抗体、ヒト抗体、キメラ抗体、ヒト化抗体および遺伝子操作された抗体 (改変もしくは変異抗体) を含む。特に好ましいのは、ヒト抗体もしくはヒト化抗体であり、特に、組換えヒト抗体もしくはヒト化抗体が好ましい。

【0090】

用語「二重特異的抗体」とは、本明細書で用いられる場合、好ましくは、2 対の重鎖および軽鎖 (H C / L C) のうち的一方が C D 3 に特異的に結合し、他方が B C M A に特異

10

20

30

40

50

的に結合する抗体をいう。上記用語はまた、当該分野の技術水準に従う二重特異的抗体、好ましくは、二重特異的単鎖抗体の他の様式をいう。

【0091】

用語「裸の抗体」とは、本明細書で使用される場合、BCMAに特異的に結合し、Fc部分を含み、治療剤と、例えば、細胞傷害性薬剤とも放射性標識とも結合体化されていない抗体をいう。用語「結合体化した抗体、薬物結合体」とは、本明細書で使用される場合、BCMAに特異的に結合し、治療剤と、例えば、細胞傷害性薬剤もしくは放射性標識と結合体化されている抗体をいう。

【0092】

用語「二重特異的単鎖抗体」とは、本明細書で使用される場合、好ましくは、2つの結合ドメイン（一方は、BCMAに特異的に結合するものおよびもう一方は、好ましくは、CD3に特異的に結合するもの）を含む単一のポリペプチド鎖をいう。各結合ドメインは、抗体重鎖由来の1つの可変領域（「VH領域」）を含み、ここで第1の結合ドメインのVH領域は、CD3分子に特異的に結合し、第2の結合ドメインのVH領域は、BCMAに特異的に結合する。上記2つの結合ドメインは、必要に応じて、短いポリペプチドスペーサーによって互いに結合される。ポリペプチドスペーサーの非限定的例は、Gly-Gly-Gly-Ser（G-G-G-G-S）およびその反復である。各結合ドメインは、抗体軽鎖由来の1つの可変領域（「VL領域」）をさらに含み得、第1のおよび第2の結合ドメインの各々の中のVH領域およびVL領域は、第1の結合ドメインのVH領域およびVL領域、ならびに第2の結合ドメインのVH領域およびVL領域が互いに対合して、その結果、一緒になってそれらが第1のおよび第2の結合ドメインそれぞれに特異的に結合し得ることを可能にするために十分長いポリペプチドリinkerによって、互いに結合される（例えば、EP0623679を参照のこと）。二重特異的単鎖抗体は、例えば、Choi BD et al., Expert Opin Biol Ther. 2011 Jul; 11(7): 843-53およびWolf E. et al., Drug Discov Today. 2005 Sep 15; 10(18): 1237-44においても言及されている。

【0093】

用語「ダイアボディー」とは、本明細書で使用される場合、重鎖（VH）可変ドメインが軽鎖可変ドメイン（VL）に、短すぎて同じ鎖上で2つのドメイン間で対合できないポリペプチドリinkerによって同じポリペプチド鎖上で繋がれた（VH-VL）ものを含む小さな二価のおよび二重特異的抗体フラグメントをいう（Kipriyanov, Int. J. Cancer 77 (1998), 763-772）。これは、別の鎖の相補性ドメインと対合させ、2つの機能的抗原結合部位を有するダイマー分子のアセンブリを促進する。本発明の二重特異的ダイアボディーを構築するために、抗CD3抗体および抗BCMA抗体のVドメインを融合して、2つの鎖、VH（CD3）-VL（BCMA）、VH（BCMA）-VL（CD3）を作る。各鎖はそれ自体では、それぞれの抗原に結合できないが、他の鎖と対合すると、抗CD3抗体および抗BCMA抗体の機能的抗原結合部位を再形成する。2つのscFv分子は、分子内ダイマー形成には短すぎる重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間のリンカーと一緒に共発現され、自己アセンブリして、反対側の末端に2つの結合部位を有する二重特異的分子を形成する。例として、BCMAおよびCD3の結合ドメインをそれぞれコードする可変領域は、記載されるように得られたDNA構築物からPCRによって増幅され得、その結果、それらは、Kipriyanov et al., J. Immunol Methods, 200, 69-77 (1997a)に記載されるように、pHOGなどのベクターへとクローニングされ得る。上記2つのscFV構築物は、次いで、所望の配向において1つの発現ベクター中に組み合わされ、それによって、VH-VLリンカーは短くなって、それら自体への鎖の折り返し（back folding）を妨げる。上記DNAセグメントは、終止コドンおよびリボソーム結合部位（RBS）によって分離される。上記RBSは、バイシストロンメッセージとしてmRNAの転写を可能にし、上記ダイアボディー分子を形成する

10

20

30

40

50

ために非共有結合的に相互作用する2つのタンパク質へと、リボソームによって翻訳される。ダイアボディーは、他の抗体フラグメントと同様に、細菌 (*E. coli*) および酵母 (*Pichia pastoris*) において、機能的形態においてかつ高収量 (最大 Ig / l) で発現され得るという利点を有する。

【0094】

用語「タンデム s c F v」とは、本明細書で使用される場合、例えば、WO 03 / 025018 および WO 03 / 048209 に記載されるように、単鎖 F v 分子 (すなわち、免疫グロブリン重鎖および軽鎖の可変ドメイン、それぞれ V H および V L の会合によって形成される分子) をいう。このような F v 分子は、T a n d A b s (登録商標) として公知であり、4つの抗体可変ドメインを含み、ここで (i) 上記4つの可変ドメインのうちの初の2つもしくは最後の2つのいずれかが、配向 V H / V L もしくは V L / V H において抗原結合 s c F v を形成することによって、同じ鎖内で互いに分子内で結合する、(ii) 他の2つのドメインが、別の鎖のその対応する V H ドメインもしくは V L ドメインと分子間で結合して、抗原結合 V H / V L 対を形成する。好ましい実施形態において、WO 03 / 025018 で示唆されるように、このような F v 分子のモノマーは、少なくとも4つの可変ドメインを含み、そのうち、1つのモノマーのうちの2つの隣接するドメインは、抗原結合 V H - V L もしくは V L - V H s c F v ユニットを形成する。

【0095】

用語「D A R P i n」とは、本明細書で使用される場合、例えば、US 2009082274 に記載されるような二重特異的アンキリンリピート分子をいう。これらの分子は、天然のアンキリンタンパク質に由来し、このタンパク質は、ヒトゲノム中に見出され得、結合タンパク質の最も豊富なタイプのうちの1つである。D A R P i n ライブラリーモジュールは、天然のアンキリンリピートタンパク質配列によって、初期設計については229アンキリンリピートおよびその後の改善 (refinement) に関しては、別の2200アンキリンリピートを使用して、定義される。上記モジュールは、D A R P i n ライブラリーの構築ブロックとして働く。上記ライブラリーモジュールは、ヒトゲノム配列に似ている。1つの D A R P i n は、4~6モジュールからなる。各モジュールは約3.5 kDa であるので、平均的な D A R P i n のサイズは、16~21 kDa である。結合因子 (binder) の選択は、リボソームディスプレイによって行われ、これは、完全に無細胞であり、He M a n d T a u s s i g M J . , B i o c h e m S o c T r a n s . 2007, Nov; 35 (Pt 5) : 962 - 5 に記載される。

【0096】

用語「T細胞二重特異的結合因子 (T c e l l b i s p e c i f i c e n g a g e r)」とは、約55キロダルトンの単一のペプチド鎖上に、異なる抗体の2つの単鎖可変フラグメント (s c F v)、または4つの異なる遺伝子由来のアミノ酸配列からなる融合タンパク質である。上記 s c F v のうちの一方は、C D 3 レセプターを介して T 細胞に結合し、他方は、B C M A に結合する。

【0097】

ギリシャ文字によって示される哺乳動物抗体重鎖には、5つのタイプがある： 、 、 、 および μ (Janeway CA, Jr et al (2001). Immunobiology. 5th ed., Garland Publishing)。存在する重鎖のタイプは、抗体のクラスを定義する；これらの鎖は、それぞれ、Ig A、Ig D、Ig E、Ig G、および Ig M 抗体において見出される (Rhoades RA, Pflanzner RG (2002). Human Physiology, 4th ed., Thomson Learning)。別個の重鎖は、サイズおよび組成において異なっている； および は、約450アミノ酸を含む一方で、 μ および は、約550アミノ酸を有する。

【0098】

各重鎖は、2つの領域、定常領域および可変領域を有する。上記定常領域は、同じアイ

10

20

30

40

50

ソタイプの全ての抗体において同一であるが、異なるアイソタイプの抗体においては異なる。重鎖、およびは、3つの定常ドメインCH1、CH2、およびCH3（一列に）から構成される定常領域、ならびに付加された可撓性のためにヒンジ領域を有する（W o o f J , B u r t o n D N a t R e v I m m u n o l 4 (2 0 0 4) 8 9 - 9 9）；重鎖μおよびは、4つの定常ドメインCH1、CH2、CH3、およびCH4から構成される定常領域を有する（J a n e w a y C A , J r e t a l (2 0 0 1) . I m m u n o b i o l o g y . 5 t h e d . , G a r l a n d P u b l i s h i n g）。上記重鎖の可変領域は、種々のB細胞によって生成される抗体において異なるが、単一のB細胞もしくはB細胞クローンによって生成される全ての抗体に関して同じである。各重鎖の可変領域は、約110アミノ酸長であり、単一の抗体ドメインから構成される。

10

【0099】

哺乳動物では、ラムダ（ ）およびカッパ（ ）といわれる軽鎖の2タイプのみが存在する。軽鎖は、2つの連続ドメインを有する：1つの定常ドメインCLおよび1つの可変ドメインVL。軽鎖のおよその長さは、211～217アミノ酸である。好ましくは、上記軽鎖は、カッパ（ ）軽鎖であり、上記定常ドメインCLは、好ましくは、カッパ（K）軽鎖に由来する（定常ドメインCK）。

【0100】

用語「モノクローナル抗体」もしくは「モノクローナル抗体組成物」とは、本明細書で使用される場合、単一のアミノ酸組成の抗体分子の調製物をいう。

20

【0101】

本発明に従う「抗体」は、任意のクラス（例えば、IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgM、好ましくは、IgGもしくはIgE）の、もしくはサブクラス（例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2、好ましくは、IgG1）の抗体であり得、それによって、本発明に従う二価の二重特異的抗体が由来する両方の抗体は、同じサブクラス（例えば、IgG1、IgG4など、好ましくは、IgG1）の、好ましくは、同じアロタイプの（例えば、白色人種の）Fc部分を有する。

【0102】

「抗体のFc部分」は、当業者に周知かつ抗体のパパイン切断に基づいて定義される用語である。本発明に従う抗体は、Fc部分として、好ましくは、ヒト起源のFc部分、および好ましくは、ヒト定常領域の全ての他の部分を含む。抗体のFc部分は、補体活性化、C1q結合、C3活性化およびFcレセプター結合に直接関与する。補体系に対する抗体の影響は、ある特定の条件に依存する一方で、C1qへの結合は、Fc部分における規定された結合部位によって引き起こされる。このような結合部位は、当該分野の水準において公知であり、例えば、Lukas, T.J., et al., J. Immunol. 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., and Cebrá, J.J., MoI. Immunol. 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., Nature 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., MoI. Immunol. 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; およびEP 0 307 434に記載される。

30

40

【0103】

このような結合部位は、例えば、L234、L235、D270、N297、E318、K320、K322、P331およびP329（番号付けは、KabatsのEUIンデックスに従う（以下を参照のこと））である。サブクラスIgG1、IgG2およびIgG3の抗体は、通常は、補体活性化、C1q結合およびC3活性化を示すのに対して、I

50

g G 4 は、補体系を活性化せず、C 1 q を結合せず、そして C 3 を活性化しない。好ましくは、上記 F c 部分は、ヒト F c 部分である。

【 0 1 0 4 】

好ましくは、本発明に従う抗体は、野生型ヒト I g G F c 領域の F c 改変体を含む。上記 F c 改変体は、P r o 3 2 9 の位置においてアミノ酸置換を、および少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸置換を含み、ここで上記残基は、K a b a t の E U インデックスに従って番号付けされ、上記抗体は、野生型 I g G F c 領域を含む抗体と比較して、ヒト F c R I I I A および / もしくは F c R I I A および / もしくは F c R I に対して低下した親和性を示し、上記抗体によって誘導される A D C C は、野生型ヒト I g G F c 領域を含む抗体によって誘導される A D C C の少なくとも 2 0 % へと低下する。具体的実施形態において、本発明に従う抗体における野生型ヒト F c 領域の P r o 3 2 9 は、グリシンもしくはアルギニン、または上記 F c のプロリン 3 2 9 と F c R I I I のトリプトファン (t r y p t o p h a n e) 残基 T r p 8 7 および T i p 1 1 0 との間で形成される F c / F c レセプター界面内のプロリンサンドイッチを破壊するために十分な大きさのアミノ酸残基で置換される (S o n d e r m a n n e t a l . : N a t u r e 4 0 6 , 2 6 7 - 2 7 3 (2 0 J u l y 2 0 0 0)) 。本発明のさらなる局面において、上記 F c 改変体における上記少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸置換は、S 2 2 8 P、E 2 3 3 P、L 2 3 4 A、L 2 3 5 A、L 2 3 5 E、N 2 9 7 A、N 2 9 7 D、もしくは P 3 3 1 S であり、さらに別の実施形態において、上記少なくとも 1 個のさらなるアミノ酸置換は、ヒト I g G 1 F c 領域の L 2 3 4 A および L 2 3 5 A、またはヒト I g G 4 F c 領域の S 2 2 8 P および L 2 3 5 E である。このような F c 改変体は、W O 2 0 1 2 1 3 0 8 3 1 に詳細に記載される。

【 0 1 0 5 】

「エフェクター機能」とは、本明細書で使用される場合、抗体 F c 領域と F c レセプターもしくはリガンドとの相互作用から生じる生化学的事象を意味する。エフェクター機能としては、A D C C、A D C P、および C D C が挙げられるが、これらに限定されない。

「エフェクター細胞」とは、本明細書で使用される場合、1 つ以上の F c レセプターを発現し、1 つ以上のエフェクター機能を媒介する免疫系の細胞を意味する。エフェクター細胞としては、単球、マクロファージ、好中球、樹状細胞、好酸球、マスト細胞、血小板、B 細胞、大顆粒リンパ球、ランゲルハンス細胞、ナチュラルキラー (N K) 細胞、および

T 細胞が挙げられるが、これらに限定されず、任意の生物 (ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルが挙げられるが、これらに限定されない) に由来し得る。「ライブラリー」とは、本明細書において、何らかの形態にある F c 改変体のセット (核酸もしくはアミノ酸配列の列挙、可変性の位置での核酸もしくはアミノ酸置換の列挙、ライブラリー配列をコードする核酸を含む物理的ライブラリー、または精製形態もしくは非精製形態のいずれかの F c 改変体タンパク質を含む物理的ライブラリーが挙げられるが、これらに限定されない) を意味する。

【 0 1 0 6 】

「F c レセプター」もしくは「F c R」とは、本明細書で使用される場合、I g G 抗体 F c 領域を結合し、F c R 遺伝子によって実質的にコードされるタンパク質のファミリーのいずれかのメンバーを意味する。ヒトでは、このファミリーとしては、F c R I (C D 6 4) (アイソフォーム F c R I a、F c R I b、および F c R I c を含む) ; F c R I I (C D 3 2) (アイソフォーム F c R I I a (アロタイプ H 1 3 1 および R 1 3 1 を含む) を含む)、F c R I I b (F c R I I b - 1 および F c R I I b - 2 を含む)、および F c R I I c ; ならびに F c R I I I (C D 1 6) (アイソフォーム F c R I I I a (アロタイプ V 1 5 8 および F 1 5 8 を含む) を含む) および F c R I I I b (アロタイプ F c R I I I b - N A 1 および F c R I I I b - N A 2 を含む) (J e f f e r i s e t a l . , 2 0 0 2 , I m m u n o l L e t t 8 2 : 5 7 - 6 5)、ならびに任意の未だ見つかっていないヒト F c R もしくは F c R アイソフォームもしくはアロタイプが挙げられるが、これらに限定されない。

Fc Rは、任意の生物（ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルが挙げられるが、これらに限定されない）に由来し得る。マウスFc Rとしては、Fc RI (CD 64)、Fc RII (CD 32)、Fc RIII (CD 16)、およびFc RIII-2 (CD 16-2)、ならびに任意の未だ見つかっていないマウスFc RもしくはFc Rアイソフォームもしくはアロタイプが挙げられるが、これらに限定されない。

【0107】

「増大したエフェクター機能を有するFc 改変体」とは、本明細書で使用される場合、親Fc 配列のものとは少なくとも1個のアミノ酸改変によって異なるFc 配列、または、例えば、エフェクター機能を増大させるAsn 279でのグリコシル化の改善などの他の

改変に関連するFc 配列を意味する。このような改変は、例えば、Duncan et al., 1988, Nature 332:563-564; Lund et al., 1991, J Immunol 147:2657-2662; Lund et al., 1992, Mol Immunol 29:53-59; Alegre et al., 1994, Transplantation 57:1537-1543; Hutchins et al., 1995, Proc Natl Acad Sci U S A 92:11980-11984; Jefferis et al., 1995, //77muno/ Lett 44:111-117; Lund et al., 1995, Faseb J 9:115-119; Jefferis et al., 1996, Immunol Lett 54:101-104; Lund et al., 1996, J Immunol 157:4963-4969; Armour et al., 1999, Eur J Immunol 29:2613-2624; Idusogie et al., 2000, J Immunol 164:4178-4184; Reddy et al., 2000, J Immunol 164:1925-1933; Xu et al., 2000, Cell Immunol 200:16-26; Idusogie et al., 2001, J Immunol 166:2571-2575; Shields et al., 2001, J Biol Chem 276:6591-6604; Jefferis et al., 2002, Immunol Lett 82:57-65; Presta et al., 2002, Biochem Soc Trans 30:487-490; US5624821; US5885573; US6194551; WO200042072; WO199958572に言及されている。このようなFc 改変はまた、本発明に従って、Fc 部分の操作された糖形態を含む。「操作された糖形態」とは、本明細書で使用される場合、Fc ポリペプチドに共有結合されている炭水化物組成を意味し、ここで上記炭水化物組成は、親Fc ポリペプチドのものとは化学的に異なる。操作された糖形態は、いずれかの方法によって、例えば、操作されたもしくは改変体発現株を使用することによって、1以上の酵素（例えば、D1-4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIII (GnTIII)）との共発現によって、種々の生物もしくは種々の生物由来の細胞株においてFc ポリペプチドを発現することによって、または上記Fc ポリペプチドが発現された後に炭水化物（複数可）を改変することによって、生成され得る。操作された糖形態を生成するための方法は、当該分野で公知であり、Umana et al., 1999, Nat Biotechnol 17:176-180; Davies et al., 2001, Biotechnol Bioeng 74:288-294; Shields et al., 2002, J Biol Chem 277:26733-26740; Shinkawa et al., 2003, J Biol Chem 278:3466-3473) US6602684; WO200061739; WO200129246; WO200231140; WO200230954; PotelligentTM技術 (Biowa, Inc., Princeton, N.J.); GlycoMAbTM グリコシル化操作技術 (GLY CART biotechnology AG, Zurich, Switzerla

10

20

30

40

50

nd))で言及されている。操作された糖形態とは、代表的には、親Fcポリペプチドとは異なる炭水化物もしくはオリゴサッカリド組成をいう。

【0108】

増大したエフェクター機能を有するFc改変体を含む本発明に従う抗体は、FcレセプターIII(FcRIII, CD16a)に対して高結合親和性を示す。FcRIIIに対する高結合親和性は、結合が、CD16a/F158に関して、CHO宿主細胞(例えば、CHO DG44細胞もしくはCHO K1細胞)において発現される参照としての親抗体(95% フコシル化)に関連して少なくとも10倍増強されているか、または/そして結合が、CD16a/V158に関して、抗体濃度100nMでの固定化CD16aを使用して表面プラズモン共鳴(SPR)によって測定して、親抗体に関連して少なくとも20倍増強されていることを示す。FcRIII結合は、当該分野の技術水準に従う方法によって、例えば、Fc部分のアミノ酸配列または抗体のFc部分のグリコシル化を改変することによって、増大させられ得る(例えば、EP2235061を参照のこと)。Mori, K et al., Cytotechnology 55 (2007) 109およびSatoh M, et al., Expert Opin Biol Ther. 6 (2006) 1161-1173は、無フコシル化(afucosylated)抗体の生成のためのFUT8(-1, 6-フコシルトランスフェラーゼ)遺伝子ノックアウトCHO株に関する。

【0109】

用語「キメラ抗体」とは、1つの供給源もしくは種由来の変領域、すなわち、結合領域、および異なる供給源もしくは種に由来する定常領域の少なくとも一部を含み、通常は、組換えDNA技法によって調製される抗体をいう。マウス変領域およびヒト定常領域を含むキメラ抗体が好ましい。本発明によって包含される「キメラ抗体」の他の好ましい形態は、本発明に従う特性(特に、C1q結合および/もしくはFcレセプター(FcR)結合に関して)を生じるために、定常領域が元の抗体のものから改変されているかもしくは変化させられているものである。このようなキメラ抗体は、「クラススイッチされた抗体」ともいわれる。キメラ抗体は、免疫グロブリン変領域をコードするDNAセグメントおよび免疫グロブリン定常領域をコードするDNAセグメントを含む発現された免疫グロブリン遺伝子の生成物である。キメラ抗体を生成するための方法は、当該分野で周知の従来の組換えDNA技法および遺伝子トランスフェクション技法を要する。例えば、Morrisson, S.L., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855; 米国特許第5,202,238号および同第5,204,244号を参照のこと。

【0110】

用語「ヒト化抗体」とは、フレームワークもしくは「相補性決定領域」(CDR)が、親免疫グロブリンのものと比較して、異なる特異性の免疫グロブリンのCDRを含むように改変された抗体をいう。好ましい実施形態において、マウスCDRは、「ヒト化抗体」を調製するためにヒト抗体のフレームワーク領域へとグラフト化される。例えば、Reichmann, L., et al., Nature 332 (1988) 323-327; およびNeuberger, M.S., et al., Nature 314 (1985) 268-270を参照のこと。本発明によって包含される「ヒト化抗体」の他の形態は、定常領域が本発明に従う特性(特に、C1q結合および/もしくはFcレセプター(FcR)結合に関して)を生じるために、元の抗体のものからさらに改変されているかもしくは変化させられているものである。

【0111】

用語「ヒト抗体」とは、本明細書で使用される場合、ヒト生殖系列免疫グロブリン配列に由来する変領域および定常領域を有する抗体を含むことが意図される。ヒト抗体は、当該分野の水準で周知である(van Dijk, M.A., and van de Winkel, J.G., Curr. Opin. Chem. Biol. 5 (2001) 368-374)。ヒト抗体はまた、免疫の際に、内因性免疫グロブリ

ン生成の非存在下で、ヒト抗体の全レパートリーもしくは選択物を生成し得るトランスジェニック動物（例えば、マウス）で生成され得る。このような生殖系列変異マウスにおけるヒト生殖系列免疫グロブリン遺伝子アレイの移入は、ヒト抗体の生成をもたらす（例えば、Jakobovits, A., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 2551-2555; Jakobovits, A., et al., Nature 362 (1993) 255-258; Bruggemann, M., et al., Year Immunol. 7 (1993) 33-40を参照のこと）。ヒト抗体はまた、ファージディスプレイライブラリーで生成され得る（Hoogenboom, H.R., and Winter, G., J. Mol. Biol. 227 (1992) 381-388; Marks, J.D., et al., J. Mol. Biol. 222 (1991) 581-597）。Cole et al. および Boerner et al. の技法はまた、ヒトモノクローナル抗体の調製のために利用可能である（Cole et al., Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p. 77 (1985); および Boerner, P., et al., J. Immunol. 147 (1991) 86-95）。本発明に従うキメラ抗体およびヒト化抗体について既に言及されたように、用語「ヒト抗体」はまた、本明細書で使用される場合、本発明に従う特性（特に、C1q結合および/もしくはFcR結合に関して）を例えば「クラススイッチ」、すなわち、Fc部分の変化もしくは変異（例えば、IgG1からIgG4および/もしくはIgG1/IgG4変異へ）によって生成するために、定常領域において改変されているこのような抗体を包含する。

【0112】

用語「組換えヒト抗体」とは、本明細書で使用される場合、組換え手段によって調製されたか、発現されたか、作られたかもしくは単離された全てのヒト抗体（例えば、NSO細胞もしくはCHO細胞などの宿主細胞から、または宿主細胞へとトランスフェクトされた組換え発現ベクターを使用して発現されたヒト免疫グロブリン遺伝子もしくは抗体に関してトランスジェニックである動物（例えば、マウス）から単離された抗体）を含むことが意図される。このような組換えヒト抗体は、再構成形態で可変領域および定常領域を有する。本発明に従う組換えヒト抗体は、インビボでの体細胞超変異に供されてきた。従って、上記組換え抗体のVH領域およびVL領域のアミノ酸配列は、ヒト生殖系列VH配列およびVL配列に由来しかつ関連する一方で、インビボでヒト抗体生殖系列レパートリー内に天然に存在しない可能性のある配列である。

【0113】

「可変ドメイン」（軽鎖（VL）の可変ドメイン、重鎖（VH）の可変領域）は、本明細書で使用される場合、本発明に従う抗体の結合に直接関与する軽鎖および重鎖の対の各々を示す。可変ヒト軽鎖および重鎖のドメインは、同じ一般構造を有し、各ドメインは、4つのフレームワーク（FR）領域を含み、この配列は、広く保存されており、3つの「超可変領域」（もしくは相補性決定領域、CDR）によって繋がれている。上記フレームワーク領域は、シートコンホメーションをとり、CDRは、上記シート構造を繋ぐループを形成し得る。各鎖中のCDRは、フレームワーク領域によってそれらの三次元構造が保持され、他の鎖に由来するCDRと一緒に、結合部位を形成する。抗体重鎖および軽鎖CDR3領域は、本発明に従う抗体の結合特異性/親和性において特に重要な役割を果たすので、本発明のさらなる目的を提供する。

【0114】

用語「超可変領域」もしくは「抗体の標的結合部分」は、本明細書で使用される場合、標的結合を担う抗体のアミノ酸残基をいう。上記超可変領域は、「相補性決定領域」もしくは「CDR」に由来するアミノ酸残基を含む。「フレームワーク」もしくは「FR」領域は、本明細書で定義されるとおりの超可変領域残基以外のそれらの可変ドメイン領域である。従って、抗体の軽鎖および重鎖は、N末端からC末端へと、ドメインFR1、CD

R 1、F R 2、C D R 2、F R 3、C D R 3、および F R 4 を含む。各鎖の C D R は、このようなフレームワークのアミノ酸によって分離されている。特に、重鎖の C D R 3 は、標的結合に最も寄与する領域である。C D R 領域および F R 領域は、K a b a t e t a l . , S e q u e n c e s o f P r o t e i n s o f I m m u n o l o g i c a l I n t e r e s t , 5 t h e d . , P u b l i c H e a l t h S e r v i c e , N a t i o n a l I n s t i t u t e s o f H e a l t h , B e t h e s d a , M D (1 9 9 1) の標準的な定義に従って決定される。

【 0 1 1 5 】

重鎖ドメイン C H 3 が置き換えられる定常重鎖ドメイン C H 1 は、任意の I g クラス（例えば、I g A、I g D、I g E、I g G、および I g M）、もしくはサブクラス（例えば、I g G 1、I g G 2、I g G 3、I g G 4、I g A 1 および I g A 2）のものであり得る。

10

【 0 1 1 6 】

重鎖ドメイン C H 3 が置き換えられる定常軽鎖ドメイン C L は、ラムダ（ ）もしくは kappa（ ）タイプ、好ましくは、kappa（ ）タイプのものであり得る。

【 0 1 1 7 】

用語「標的」もしくは「標的分子」とは、本明細書で使用される場合、交換可能に使用され、ヒト B C M A をいう。二重特異的抗体に関して、上記用語は、B C M A および第 2 の標的をいう。好ましくは、二重特異的抗体に関して、上記用語は、B C M A および C D 3 をいう。

20

【 0 1 1 8 】

用語「エピトープ」は、抗体に特異的に結合し得る任意のポリペプチド決定基を含む。ある特定の実施形態において、エピトープ決定基は、アミノ酸、糖側鎖、ホスホリル、もしくはスルホニルなどの分子の化学的に活性な表面基（g r o u p i n g）を含み、ある特定の実施形態においては、特定の三次元構造特徴および／もしくは特定の電荷特性を有し得る。エピトープは、抗体によって結合される標的の領域である。

【 0 1 1 9 】

一般に、上記第 1 の標的に特異的に結合する本発明に従う抗体の軽鎖および重鎖をコードする 2 つのベクターが存在する。二重特異的抗体に関しては、上記第 1 の標的に特異的に結合する上記抗体の軽鎖および重鎖をコードする 2 つのベクターならびに上記第 2 の標的に特異的に結合する上記抗体の軽鎖および重鎖をコードするさらなる 2 つのベクターが存在する。上記 2 つのベクターのうちの一方は、それぞれの軽鎖をコードし、上記 2 つのベクターのうちの他方は、それぞれの重鎖をコードする。しかし、本発明に従う抗体の調製のための代替法において、上記第 1 の標的に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖をコードするただ 1 つの第 1 のベクター、ならびに上記第 2 の標的に特異的に結合する抗体の軽鎖および重鎖をコードするただ 1 つの第 2 のベクターが、宿主細胞を形質転換するために使用され得る。

30

【 0 1 2 0 】

用語「核酸もしくは核酸分子」は、本明細書で使用される場合、DNA 分子および RNA 分子を含むことが意図される。核酸分子は、1 本鎖であっても 2 本鎖であってもよいが、好ましくは、2 本鎖 DNA である。

40

【 0 1 2 1 】

本明細書で使用される場合、表現「細胞」、「細胞株」および「細胞培養物」は、交換可能に使用され、全てのこのような名称は、子孫を含む。従って、語句「形質転換体」および「形質転換した細胞」は、移入の回数を考慮せずに、初代被験体細胞およびこれから由来する培養物を含む。全ての子孫が、故意のもしくは不注意の変異に起因して、DNA 含有量において正確に同一でなくてもよいこともまた、理解される。本来形質転換された細胞においてスクリーニングされるのと同じ機能もしくは生物学的活性を有する改変子孫が含まれる。別個の名称が意図される場合、それは状況から明らかである。

【 0 1 2 2 】

50

用語「形質転換」とは、本明細書で使用される場合、宿主細胞へとベクター／核酸を移入するプロセスをいう。強力な (f o r m i d a b l e) 細胞壁バリアのない細胞が宿主細胞として使用される場合、例えば、G r a h a m a n d V a n d e r E h , V i r o l o g y 52 (1978) 546 f f によって記載されるとおりのリン酸カルシウム沈殿法によって、トランスフェクションが行われる。しかし、核注入によるもしくはプロトプラスト融合によるなどの、細胞へとDNAを導入するための他の方法もまた、使用され得る。原核生物細胞もしくは実質的細胞壁構築物を含む細胞が使用される場合、例えば、トランスフェクションの1方法は、C o h e n S N , e t a l , P N A S 1972 , 69 (8) : 2110 - 2114 によって記載されるとおりの塩化カルシウムを使用するカルシウム処理である。

10

【0123】

形質転換を使用する抗体の組換え生成は、当該分野の水準で周知であり、例えば、M a k r i d e s , S . C , P r o t e i n E x p r . P u r i f . 17 (1999) 183 - 202 ; G e i s s e , S . , e t a l . , P r o t e i n E x p r . P u r i f . 8 (1996) 271 - 282 ; K a u f m a n , R J . , M o I . B i o t e c h n o l . 16 (2000) 151 - 161 ; W e r n e r , R . G . , e t a l . , A r z n e i m i t t e l f o r s c h u n g 48 (1998) 870 - 880 の総説記事、ならびにUS 6331415 およびUS 4816567 に記載される。

【0124】

本明細書で使用される場合、「発現」とは、核酸がmRNAへと転写されるプロセスおよび／またはその転写されたmRNA (転写物ともいわれる) がその後ペプチド、ポリペプチドもしくはタンパク質へと翻訳されるプロセスをいう。上記転写物およびコードされるポリペプチドは、まとめて遺伝子産物といわれる。ポリヌクレオチドがゲノムDNAに由来する場合、真核生物細胞における発現は、mRNAのスプライシングを含み得る。

20

【0125】

「ベクター」は、核酸分子、特に、自己複製し、宿主細胞の中におよび／もしくは宿主細胞間に挿入される核酸分子を移入する核酸分子である。この用語は、DNAもしくはRNAを細胞へと主に挿入する (例えば、染色体組み込み) ように機能するベクター、DNAもしくはRNAを複製するように主に機能するベクターの複製、ならびにDNAもしくはRNAを転写および／もしくは翻訳するように機能する発現ベクターを含む。記載されるように上記機能のうちの1つより多くを提供するベクターもまた含まれる。

30

【0126】

「発現ベクター」は、適切な宿主細胞へと導入される場合に、転写され得、ポリペプチドへと翻訳され得るポリヌクレオチドである。「発現系」は、通常、所望の発現生成物を得るために機能し得る発現ベクターから構成される適切な宿主細胞をいう。

【0127】

本発明に従う抗体は、好ましくは、組換え手段によって生成される。このような方法は、当該分野の水準で周知であり、原核生物細胞および真核生物細胞におけるタンパク質発現、上記抗体ポリペプチドのその後の単離および通常は、薬学的に受容可能な純度への精製を含む。タンパク質発現のために、軽鎖および重鎖もしくはこれらのフラグメントをコードする核酸は、標準的な方法によって発現ベクターへと挿入される。発現は、適切な原核生物宿主細胞もしくは真核生物宿主細胞 (例えば、CHO細胞、NSO細胞、SP2 / 0細胞、HEK293細胞、COS細胞、酵母、もしくはE. coli細胞) において行われ、抗体は、上記細胞 (上清もしくは溶解後の細胞) から回収される。上記二重特異的抗体は、全細胞、細胞溶解物、または部分精製されたかもしくは実質的に純粋な形態で存在し得る。精製は、他の細胞成分もしくは他の夾雑物、例えば、他の細胞核酸もしくはタンパク質を、標準的な技法 (アルカリ / SDS処理、カラムクロマトグラフィーおよび他の当該分野で周知のものが挙げられる) によって排除するために行われる。A u s u b e l , F . , e t a l . , e d . , C u r r e n t P r o t o c o l s i n

40

50

Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley Interscience, New York (1987)を参照のこと。

【0128】

NS0細胞における発現は、例えば、Barnes, L.M., et al., Cytotechnology 32 (2000) 109-123; および Barnes, L.M., et al., Biotech. Bioeng. 73 (2001) 261-270によって記載される。一過性の発現は、例えば、Durocher, Y., et al., Nucl. Acids. Res. 30 (2002) E9によって記載される。可変ドメインのクローニングは、Orlandi, R., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989) 3833-3837; Carter, P., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89 (1992) 4285-4289; および Norderhaug, L., et al., J. Immunol. Methods 204 (1997) 77-87によって記載される。好ましい一過性の発現系(HEK293)は、Schlaeger, E.-J., and Christensen, K.,によってCytotechnology 30 (1999) 71-83の中で、およびSchlaeger, E.-J., による J. Immunol. Methods 194 (1996) 191-199中に記載される。

10

20

【0129】

原核生物に適した制御配列は、例えば、プロモーター、必要に応じて、オペレーター配列、およびリボソーム結合部位を含む。真核生物細胞は、プロモーター、エンハンサーおよびポリアデニル化シグナルを利用することが公知である。

【0130】

上記抗体は、従来の免疫グロブリン精製手順(例えば、プロテインA-セファロース、ヒドロキシアパタイトクロマトグラフィー、ゲル電気泳動、透析、もしくはアフィニティークロマトグラフィーなど)によって、培養培地から適切に分離される。モノクローナル抗体をコードするDNAもしくはRNAは、容易に単離され、従来の手順を使用して配列決定される。ハイブリドーマ細胞は、このようなDNAおよびRNAの供給源として働き得る。いったん単離されたら、上記DNAは、発現ベクターへと挿入され得、これは次いで、免疫グロブリンタンパク質を別段生成しないHEK293細胞、CHO細胞、もしくは骨髓腫細胞などの宿主細胞へとトランスフェクトされ、上記宿主細胞における組換えモノクローナル抗体の合成が得られる。

30

【0131】

本発明に従う抗体のアミノ酸配列改変体(もしくは変異体)は、上記抗体DNAに適ちなヌクレオチド変化を導入することによって、またはヌクレオチド合成によって、調製される。しかし、このような改変は、非常に限られた範囲でのみ、例えば、上記のように行われ得る。例えば、上記改変は、IgGアイソタイプおよび標的結合などの上述の抗体特徴を変化させないが、組換え生成物の収量、タンパク質安定性を改善し得るか、または精製を容易にし得る。

40

【0132】

T細胞二重特異的(TCB)結合因子は、細胞を死滅させるにあたって、非常に高濃度/腫瘍細胞レセプター占有依存性効力を有する(例えば、ピコモル濃度未満もしくは低ピコモル濃度範囲でのインビトロ細胞死滅化アッセイでのEC₅₀; Dreier et al. Int J Cancer 2002)。T細胞二重特異的結合因子(TCB)は、従来の単一特異的抗体より遙かに低い用量で与えられる。例えば、ブリナツモマブ(blinatumomab)(CD19×CD3)は、急性リンパ性白血病の処置のために5~15 μg/m²/日(すなわち、わずか0.35~0.105 mg/m²/週)、または非ホジキンリンパ腫の処置のために60 μg/m²/日の連続静脈内用量で与え

50

られ、これらの用量での血清濃度は、 $0.5 \sim 4 \text{ ng/ml}$ の範囲にある（Klinger et al., Blood 2012; Topp et al., J Clin Oncol 2011; Goebeler et al., Ann Oncol 2011）。TCBの低用量は、患者において高い有効性を発揮し得るので、本発明に従う抗体に関しては、皮下投与が可能であり、臨床状況において（好ましくは、 $0.25 \sim 2.5 \text{ mg/m}^2$ / 週の用量範囲において）好ましいと予見される。これらの低い濃度 / 用量 / レセプター占有においてすら、TCBは、かなりの有害事象を引き起こし得る（Klinger et al., Blood 2012）。従って、腫瘍細胞占有 / 適用範囲を制御することは重要である。高くかつ変動性のレベルの血清APRILおよびBAFFを有する患者（例えば、多発性骨髄腫患者、Moreaux et al., 2004; Blood 103(8): 3148-3157）において、腫瘍細胞に結合したTCBの数、応答する（resp.）腫瘍細胞占有は、APRIL / BAFFによってかなり影響を受け得る。しかし、本発明の上記抗体、腫瘍細胞占有、それぞれ、有効性 / 安全性を使用することによって、本発明に従う抗体の用量を増大させる必要はない可能性がある。なぜなら、上記抗体は、APRIL / BAFFリガンド競合によって影響を受け得ないからである。本発明に従う抗体の別の利点は、Fc部分の包含に基づき、このことは、排泄半減期を約12日間へと増大させ、患者によって運ばれるポンプを用いて静脈内におよび連続して与えられる必要があるFc部分なしのTCB（例えば、プリナツモマブ）と比較すると、1週間に少なくとも1回もしくは2回の投与を可能にする。

【0133】

【表1】

表1

	配列番号							
BCMA 抗体	VH	VL	CDR1H	CDR2H	CDR3H	CDR1L	CDR2L	CDR3L
13C2	17	27	37	47	57	67	77	87
17A5	18	28	38	48	58	68	78	88
83A10	19	29	39	49	59	69	79	89
13A4	20	30	40	50	60	70	80	90
13D2	21	31	41	51	61	71	81	91
14B11	22	32	42	52	62	72	82	92
14E1	23	33	43	53	63	73	83	93
29B11	24	34	44	54	64	74	84	94
29F3	25	35	45	55	65	75	85	95
13A7	26	36	46	56	66	76	86	96

【0134】

以下の実施例、配列表および図面は、本発明の理解を助けるために提供され、本発明の真の範囲は、添付の特許請求の範囲に示される。本発明の趣旨から逸脱することなく、示される手順において改変が行われ得ることは、理解される。

【0135】

（材料および一般的方法）

ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般情報は、以下に与えられる：Kabat, E. A., et al., Sequences of

Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。抗体鎖のアミノ酸は、EU番号付けに従って番号付けされかつ参照される (Edelman, G.M., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63 (1969) 78-85; Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, (1991))。

10

【0136】

(組換えDNA技法)

標準的方法は、Sambrook et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989に記載されるようにDNAを操作するために使用した。分子生物学的試薬を、製造業者の指示に従って使用した。ヒト免疫グロブリン軽鎖および重鎖のヌクレオチド配列に関する一般情報は、以下に示される: Kabat, E.A. et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., NIH Publication No. 91-3242。

20

【0137】

(遺伝子合成)

所望の遺伝子セグメントを、化学合成によって作製されたオリゴヌクレオチドから調製する。600~1800bp長の遺伝子セグメント(これは、単一の制限エンドヌクレアーゼ切断部位が隣接している)を、PCR増幅を含むオリゴヌクレオチドのアニーリングおよびライゲーションによってアセンブリし、その後、示される制限部位(例えば、KpnI/SadもしくはAscI/PacI)を介してpPCRScrip(Stratagene)ベースのpGA4クローニングベクターへとクローニングする。サブクローニングした遺伝子フラグメントのDNA配列を、DNA配列決定によって確認する。遺伝子合成フラグメントを、Geneart(Regensburg, Germany)の所定の仕様に従って注文する。

30

【0138】

(DNA配列決定)

DNA配列を、二重鎖配列決定法によって決定した。

【0139】

(DNAおよびタンパク質配列分析ならびに配列データ管理)

GCG(Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin)のソフトウェアパッケージバージョン10.2およびInfomaxのVector NTI Advanceスイートバージョン8.0を、配列作製、マッ

40

【0140】

(発現ベクター)

a)一過性発現(例えば、HEK293 EBNAもしくはHEK293-Fにおいて)のための発現プラスミドの記載される抗体改変体の発現のために、CMV-イントロンAプロモーターでのcDNA組織化もしくはCMVプロモーターでのゲノム組織化のいずれかに基づく細胞を適用する。

【0141】

抗体発現カセットの他に、ベクターは、E.coli中でこのプラスミドの複製を可能にする複製起点、およびE.coliにアンピシリン耐性を付与する - ラクタマーゼ遺

50

伝子を含んでいた。

【0142】

抗体遺伝子の転写ユニットは、以下のエレメントから構成される：

- 5'末端における特有の制限部位（複数可）- ヒトサイトメガロウイルス由来の最初期エンハンサーおよびプロモーター、
- 続いて、cDNA組織化の場合には、イントロンA配列、
- ヒト抗体遺伝子の5'非翻訳領域、
- 免疫グロブリン重鎖シグナル配列、
- cDNAもしくは免疫グロブリンエキソン-イントロン組織化を含むゲノム組織化のいずれかとしてのヒト抗体鎖（野生型もしくはドメイン交換を有する）
- ポリアデニル化シグナル配列を有する3'非翻訳領域、ならびに
- 3'末端における特有の制限部位（複数可）。

10

【0143】

以下に記載されるとおりの記載される抗体鎖を含む融合遺伝子を、PCRおよび/もしくは遺伝子合成によって生成し、公知の組換え法およびそれに応じた核酸セグメントを例えば、それぞれのベクター中の特有の制限部位を使用して繋ぐことによる技法でアセンブリする。サブクローニングされた核酸配列を、DNA配列決定によって検証する。一過性トランスフェクションのために、多量のプラスミドを、形質転換されたE. coli培養物（Nucleobond AX, Macherey-Nagel）からのプラスミド調製によって調製する。

20

【0144】

b) 抗体および抗原発現ベクターの生成。

重鎖および軽鎖のDNA配列の可変領域を、それぞれのレシピエント哺乳動物発現ベクターの中に予め挿入されたヒトIgG1定常重鎖もしくはヒト(hum)IgG1定常軽鎖のいずれかとインフレームでサブクローニングした。抗体発現を、CMVエンハンサーおよびMPSSVプロモーター、続いて、5'UTR、イントロンおよびMARエレメントを含むキメラMPSSVプロモーターによって駆動した。転写を、CDSの3'末端において合成ポリAシグナル配列によって終了させる。全てのベクターは、真核生物細胞における分泌のためのタンパク質を標的とするリーダーペプチドをコードする5'末端DNA配列を有する。さらに、各ベクターは、EBV EBNA発現細胞におけるエピソームプラスミド複製のためのEBV OriP配列を含む。

30

【0145】

ファージディスプレイ選択作戦のために、および選択された抗体の結合特性を特徴付けるために使用されてきた抗原を、C末端タグをコードする予め挿入されたDNA配列を有する哺乳動物抗原発現ベクターから発現した。Aviタグは、それぞれの抗原のインビボもしくはインビトロでのビオチン化のために使用されてきた。上記抗原の精製およびホモダイマー化もしくはヘテロダイマー化のために、ヒト(hum)IgG1 Fc野生型(Fcwt)もしくはFc knobを、抗原発現カセットのC末端に融合した。上記抗原発現を、CMVエンハンサーおよびMPSSVプロモーター、続いて、5'UTR、イントロンおよびMARエレメントを含むキメラMPSSVプロモーターによって駆動した。転写を、CDSの3'末端において合成ポリAシグナル配列によって終了させた。全てのベクターは、真核生物細胞における分泌のためのタンパク質を標的とするリーダーペプチドをコードする5'末端DNA配列を有する。さらに、各ベクターは、EBV EBNA発現細胞におけるエピソームプラスミド複製のためのEBV OriP配列を含む。

40

【0146】

(細胞培養技法)

標準的な細胞培養技法を、Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J. S., Dasso, M., Harford, J. B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K. M. (eds.), John Wiley

50

& Sons, Inc. に記載されるように使用する。

【0147】

(HEK293細胞における一過性発現)

二重特異的抗体を、以下に記載されるように、接着して増殖するHEK293-EBNA細胞においてもしくは懸濁物中で増殖するHEK293-F細胞において、それぞれの発現プラスミドの一過性の共トランスフェクションによって発現させる。

【0148】

a) HEK293-EBNA系における一過性トランスフェクション

二重特異的抗体を、接着して増殖するHEK293-EBNA細胞(10% Ultra Low IgG FCS (ウシ胎仔血清, Gibco)、2mM L-グルタミン (Gibco)、および250 µg/ml ジェネティシン (Gibco) を補充したDMEM (ダルベッコ改変イーグル培地, Gibco) 中で培養したエプスタイン・バーウイルス核標的を発現するヒト胚性腎細胞株293; アメリカンタイプカルチャーコレクション寄託番号ATCC # CRL-10852, Lot. 959218) 中で、それぞれの発現プラスミド (例えば、重鎖および改変重鎖、ならびにその対応する軽鎖および改変軽鎖ををコードする) の一過性共トランスフェクションによって発現させる。トランスフェクションのために、FuGENETM 6 Transfection Reagent (Roche Molecular Biochemicals) を、FuGENETM 試薬 (µl) 対 DNA (µg) が4:1 (3:1~6:1の範囲) の比で使用する。

【0149】

タンパク質を、1:2~2:1の範囲に及ぶ1:1 (等モル) の (改変型および野生型) それぞれ軽鎖および重鎖コードプラスミドのモル比を使用して、それぞれのプラスミドから発現させる。細胞に、3日目に、L-グルタミン 4mM, グルコース [Sigma] およびNAA [Gibco] を供給する。二重特異的抗体含有細胞培養上清を、トランスフェクション後5日目~11日目に、遠心分離によって回収し、-200Cで貯蔵した。例えば、HEK293細胞におけるヒト免疫グロブリンの組換え発現に関する一般的情報は、以下に与えられる: Meissner, P. et al., Biotechnol. Bioeng. 75 (2001) 197-203。

【0150】

b) HEK293-F系における一過性トランスフェクション

二重特異的抗体を、HEK293-Fシステム (Invitrogen) を使用して、製造業者の指示に従って、それぞれのプラスミド (例えば、重鎖および改変重鎖、ならびにその対応する軽鎖および改変軽鎖をコードする) の一過性トランスフェクションによって生成する。簡潔には、振盪フラスコ中もしくは攪拌発酵器中のいずれかで、無血清FreeStyle 293発現培地 (Invitrogen) 中、懸濁物中で増殖するHEK293-F細胞 (Invitrogen) を、上記4つの発現プラスミドおよび293フェクチン (fectin) もしくはフェクチン (Invitrogen) の混合物でトランスフェクトした。2L 振盪フラスコ (Corning) に関しては、HEK293-F細胞を、600mL中、密度 1.0×10^6 細胞/mLで播種し、120rpm, 8% CO₂ でインキュベートする。その翌日、上記細胞を、細胞密度 約 1.5×10^6 細胞/mLにおいて、A) 20mL Opti-MEM (Invitrogen) と、重鎖もしくは改変重鎖それぞれおよびその対応する軽鎖を等モル比でコードする600 µg 総プラスミドDNA (1 µg/mL)、ならびにB) 20mL Opti-MEM + 1.2mL 293フェクチンもしくはフェクチン (2 µl/mL) の約42mL ミックスでトランスフェクトする。グルコース消費に従って、グルコース溶液を、発酵の過程の間に添加する。分泌された抗体を含む上清を、5~10日後に回収し、抗体は、上記上清から直接精製するか、または上記上清を、凍結および保存するかのいずれかである。

【0151】

(タンパク質決定)

精製された抗体および派生物のタンパク質濃度を、Pace et al., Protein Science, 1995, 4, 2411-1423に従ってアミノ酸配列に基づいて計算したモル吸光係数を使用して、280nmでの光学密度(OD)を決定することによって決定する。

【0152】

(上清中の抗体濃度決定)

細胞培養上清中の抗体および派生物の濃度を、プロテインAアガロースビーズ(Roche)での免疫沈降によって概算する。60μL プロテインAアガロースビーズを、TBS-NP40(50mM Tris, pH7.5、150mM NaCl、1% Nonidet-P40)中で3回洗浄する。その後、1~15mL 細胞培養上清を、TBS-NP40で予め平衡化したプロテインAアガロースビーズにアプライする。室温で1時間インキュベートした後、上記ビーズを、0.5mL TBS-NP40で1回、0.5mL 2×リン酸緩衝食塩水(2×PBS, Roche)で2回、および0.5mL 100mM クエン酸Na pH5.0で短時間4回、Ultrafree-MC-フィルターカラム(Amicon)上で洗浄する。結合した抗体を、35μL NuPAGE(登録商標) LDSサンプル緩衝液(Invitrogen)を添加することによって溶離する。そのサンプルの半分を、それぞれ、NuPAGE(登録商標)サンプル還元剤と混合するか、もしくは還元しないままにし、10分間、70℃で加熱する。最終的に、5~30μLを、4-12% NuPAGE(登録商標) Bis-Tris SDS-PAGE(Invitrogen)にアプライし(非還元SDS-PAGEについてはMOPS緩衝液で、および還元SDS-PAGEについてはNuPAGE(登録商標)抗酸化剤泳動緩衝液添加剤(antioxidant running buffer additive)(Invitrogen)を含むMES緩衝液で)、クーマシーブルーで染色する。

【0153】

細胞培養上清中の抗体および派生物の濃度は、アフィニティーHPLCクロマトグラフィーによって定量的に測定される。簡潔には、プロテインAに結合する抗体および派生物を含む細胞培養上清を、200mM KH₂PO₄、100mM クエン酸ナトリウム、pH7.4中のApplied Biosystems Poros A/20カラムにアプライし、Agilent HPLC 1100システムで200mM NaCl、100mM クエン酸、pH2.5を用いてマトリクスから溶離する。その溶離したタンパク質を、UV吸光度およびピーク面積の積分によって定量する。精製された標準的IgG1抗体は、標準物質として働いた。

【0154】

あるいは、細胞培養上清中の抗体および派生物の濃度は、サンドイッチ-IgG-ELISAによって測定される。簡潔には、StreptaWell High Bind Streptavidin A-96ウェルマイクロタイタープレート(Roche)を、0.1μg/mLの100μL/ウェル ビオチン化抗ヒトIgG捕捉分子 F(ab')₂<h-Fc>BI(Dianova)で1時間室温において、または代わりに一晩4℃で被覆し、その後、200μL/ウェル PBS, 0.05% Tween(登録商標)(PBST, Sigma)で3回洗浄する。それぞれの抗体を含む細胞培養上清のPBS(Sigma)中の段階希釈物100μL/ウェルを、上記ウェルに添加し、室温においてマイクロタイタープレート振盪機上で1~2時間インキュベートする。上記ウェルを、200μL/ウェル PBSTで3回洗浄し、結合した抗体を、検出抗体として0.1μg/mLの100μL F(ab')₂<h-Fc>POD(Dianova)で1~2時間、室温においてマイクロタイタープレート振盪機上で検出する。結合していない検出抗体を、200μL/ウェル PBSTで3回洗い流し、結合した検出抗体を、100μL ABTS/ウェルの添加によって検出する。吸光度の決定は、405nmの測定波長(基準波長492nm)においてTecan Fluor Spectrometerで行う。

【0155】

(タンパク質精製)

タンパク質を、標準プロトコルを参照して、濾過した細胞培養上清から精製する。簡潔には、抗体を、プロテインAセファロースカラム(GE healthcare)にアプライし、PBSで洗浄する。抗体の溶離を、pH2.8で行い、続いて、そのサンプルを直ぐに中和する。凝集したタンパク質を、PBS中もしくは20mMヒスチジン、150mM NaCl pH6.0中でのサイズ排除クロマトグラフィー(スーパーデックス200, GE Healthcare)によってモノマー抗体から分離する。モノマー抗体画分をプールし、必要な場合には、例えば、MILLIPORE Amicon Ultra(30 MWCO)遠心分離濃縮器を使用して濃縮し、-20で凍結および貯蔵する。上記サンプルの一部をその後のタンパク質分析および分析による特徴付け(例えば、SDS-PAGE、サイズ排除クロマトグラフィーもしくは質量分析による)のために提供する。

10

【0156】

(SDS-PAGE)

NuPAGE(登録商標)プレキャストゲルシステム(Invitrogen)を、製造業者の指示に従って使用する。特に、10%もしくは4-12% NuPAGE(登録商標) Novex(登録商標) Bis-TRISプレキャストゲル(pH6.4)およびNuPAGE(登録商標) MES(還元ゲル、NuPAGE(登録商標)抗酸化剤泳動緩衝液添加剤を含む)もしくはMOPS(非還元ゲル)泳動緩衝液を使用する。

20

【0157】

(分析用サイズ排除クロマトグラフィー)

抗体の凝集およびオリゴマー状態を決定するためのサイズ排除クロマトグラフィーを、HPLCクロマトグラフィーによって行う。簡潔には、プロテインA精製抗体を、300mM NaCl、50mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH7.5中の、Agilent HPLC 1100システム上のTosoh TSKgel G3000SWカラムに、または2×PBS中の、Dionex HPLC-System上のスーパーデックス200カラム(GE Healthcare)にアプライする。溶離したタンパク質を、UV吸光度およびピーク面積の積分によって定量する。BioRad Gel Filtration Standard 151-1901を、標準物質として働いた。

30

【0158】

(質量分析)

クロスオーバー抗体の全脱グリコシル化質量を決定し、エレクトロスプレーイオン化質量分析(ESI-MS)によって確認する。簡潔には、100μgの精製抗体を、100mM KH₂PO₄/K₂HPO₄, pH7中、37で12~24時間、タンパク質濃度最大2mg/mlで、50mM N-グリコシダーゼF(PNGaseF, ProZyme)で脱グリコシル化する。その後、セファデックスG25カラム(GE Healthcare)のHPLCによって脱塩する。それぞれの重鎖および軽鎖の質量を、脱グリコシル化および還元後にESI-MSによって決定する。簡潔には、115μl中の50μg抗体を、60μl IM TCEPおよび50μl 8M グアニジン塩酸塩とともにインキュベートし、その後脱塩する。総質量ならびに還元重鎖および軽鎖の質量を、NanoMate(登録商標)源を装備したQ-Star Elite MSシステムでESI-MSによって検出する。

40

【実施例】

【0159】

(実施例1-抗BCMA抗体の生成)

(実施例1A.抗原およびツール試薬の生成)

(実施例1A1.組換え可溶性ヒトBCMA細胞外ドメイン)

a)組換え可溶性ヒトBCMA細胞外ドメイン(「BCMA ECD」)を、Ryan, 2007(Mol Cancer Ther; 6(11): 3009-18)

50

に記載されるように生成する。簡潔には、上記ヒトBCMA細胞外ドメイン（ECD；アミノ酸5～51；NP__001183）を、BamH1部位（太字下線）を組みこんだ順方向プライマー

【化1】

5-AAGCTTGGATCCATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCC-3

（配列番号11）、および終止コドン（斜体）およびNotI部位（太字下線）を組みこんだ逆方向プライマー

【化2】

5-GAATTCGCGGCCGCTCATCCTTTCACTGAATTGGTCACACTTGCATTAC-3

10

（配列番号12）で、PCRテンプレートとしてIMAGEクローン687194（Invitrogen）を使用して増幅する。そのPCR生成物を、グルタチオンS-トランスフェラーゼ（GST）の上流にグルタチオンS-トランスフェラーゼ遺伝子を含む発現ベクターにクローニングし、lacUV5プロモーターの制御下にあるT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含むE.coli株へと形質転換し、その誘導されたタンパク質を、4

においてAECTAexplorer（GE Healthcare）で精製する。その細胞ペレットを、プロテアーゼインヒビターおよびリゾチームを含む1：15 w/vのB-PER緩衝液（Pierce）中で溶解する。その抽出物に、1～2 μg/mL DNase I（Sigma）を補充し、さらに20分間攪拌し、pH7.5に調節する

20

。その可溶性融合タンパク質を、31,000×gで20分間の遠心分離（Beckman）後に集め、B-PER緩衝液で予め平衡化したグルタチオンセファロース4 FFカラム（GE Healthcare）に載せる。上記カラムを、4カラム体積（CV）のB-PER緩衝液、各々3CVの洗浄緩衝液1および2（Pierce）で洗浄し、続いて、5CVの50mmol/L Tris（pH8.0）、0.15mol/L NaClで最後のカラム洗浄を行う。GSTタグ化BCMAを、50mmol/L Tris（pH8.0）中の20mmol/L還元型グルタチオンで溶離し、3500 MWCO slide-A-lyzer（Pierce）を使用して、PBS（pH7.4）に対して透析する。GSTタグ除去のために、BCMA：GSTを、グルタチオンセファロースに結合させながら50mmol/L Tris（pH8.0）、0.15mol/L

30

NaCl中のトロンピンで処理する。次いで、放出されたトロンピンは、ベンズアミジンセファロースカラム（GE Healthcare）によって捕捉される。GST切断BCMAは、上記カラムから3～5CVの50mmol/L Tris（pH8.0）、0.15mol/L NaClで溶離され、PBS（pH7.4）に対して透析される。トロンピン除去を、色素生成性基質S-2238（Chromogenix, Diapharma）を使用してトロンピン活性に関して画分を分析することによって確認する。タンパク質濃度を、A280によって決定する。全ての精製タンパク質を、SDS-PAGEによって、およびTSK-Gel G3000SW HPLCサイズ排除クロマトグラフィー（Tosoh Bioscience）によって分析する。BCMA ECDのビオチン化改変体（「BCMA-ECD-biot」）を、以下の改変を伴う同じ手順を使用して、上記のように生成する。Avi-HisタグをコードするDNA配列をPCR増幅によって上記の第1のPCR生成物の3'末端の下流に、インフレームで付加する。この新たな第2のPCR生成物は、次いで、pGEX4T1発現ベクターにサブクローニングされ、次いで、上記Aviタグのインビボビオチン化のために、BirA酵素を発現するためのベクターと一緒に細菌中に共形質転換される。残りの生成および精製工程は、BCMA-ECDに関して上記に示されるように行われる。

40

【0160】

b) ファージディスプレイ選択のための抗原として使用したヒト、カニクイザルおよびマウスのBCMAの細胞外ドメインを、N末端モノマーFc融合物として、HEK293T細胞において一過性に発現し、レセプター鎖を有するFc部分（Fc knob鎖）

50

のC末端に位置するaviタグ認識配列においてBirAビオチンリガーゼの共発現によってインビボで部位特異的ビオチン化した。ヒト、カンクイザルおよびマウスのBCMAの細胞外ドメインは、それぞれ、メチオニン4～アスパラギン53、メチオニン4～アスパラギン52、およびアラニン2～スレオニン49を含んだ。これらを、ヒトIgG1のヒンジにN末端融合し、ノブが凹みに入り込む技術によって融合していないヒトIgG1Fc部分(凹鎖(hole chain))とのヘテロダイマー化を可能にした。

【0161】

(実施例1A2。組換え短縮型マウスAPRIL)

a) 組換え短縮型マウスAPRILを、Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18)に記載されるように生成する。簡潔には、マウスAPRIL(残基106~241; NP_076006)を、IMAGEクローン5290965 (Invitrogen)から増幅し、COOH末端において、遺伝子特異的順方向プライマー

【化3】

5-ACGTTAGATCTCCACTCAGTCCTGCATCTTGTTCAGTTAAC-3 (配列番号13)

に融合した細菌発現ベクターへとクローニングし、逆方向プライマー

【化4】

5-AACGTTGCGGCCGCTAGTTTCACAAACCCAGG-3 (配列番号14)

を、増幅のために使用する。順方向プライマーおよび逆方向プライマーそれぞれの中のBglIIおよびNotI部位(太字下線)を、得られたPCRフラグメントを、COOH末端においてチオレドキシン(thioredoxin)に融合した細菌発現ベクターへとクローニングするために使用する。この構築物を、チオレドキシンレダクターゼ遺伝子に変異を含むEscherichia coli株K-12へと形質転換し、A600が約0.6になるまで25℃で培養し、1mmol/L イソプロピル-L-チオ-D-ガラクトピラノシドで誘導し、次いで、25℃で一晩培養する。上記E. coli細胞ペーストを再懸濁し、4℃において完全EDTA非含有プロテアーゼインヒビターを含む1:10 w/vのB-PER溶解緩衝液中で撹拌する。次いで、その混合物を、5×ストック緩衝液で終濃度50mmol/L Tris-HCl、0.4mol/L NaCl、1% Triton-X100、5% グリセロール、および10mmol/L イミダゾール(pH8~9)へと希釈する。上記サンプルに、リゾチーム、DNase I、および2mmol/L MgCl₂ (Sigma)を補充し、30分間撹拌し、4mmol/L EDTAへと調節し、20分間撹拌し、次いで、遠心分離して、細胞デブリを除去する。そのサンプルを、40mmol/L MgCl₂へと調節し、30分間撹拌し、その後、Ni-IMACカラム(GE Healthcare)に載せる。上記カラムを、20mmol/L Tris-HCl(pH8.0)中10mmol/L イミダゾールの3~5CV、20mmol/L Tris-HCl(pH8.0)中0.5% v/v Triton X-100の2~3CV、次いで、20mmol/L Tris-HCl(pH8.0)中70mmol/L イミダゾールの5~10CVで順次洗浄する。短縮型APRILを、20mmol/L Tris-HCl、5% グリセロール(pH8.0)中、70~500mmol/L イミダゾールの直線勾配で溶離する。プールしたタンパク質画分を、50mmol/L イミダゾール、0.1mol/L L-Arg、5% グリセロール、1mmol/L EDTA(pH8.0)を含むPBS緩衝液に対して透析する。タンパク質濃度を、分光光度法で決定する[280(1%)=0.94]。

【0162】

b) ファージディスプレイ選択およびELISAのツール(競合物)として使用した組換え短縮型マウスAPRILを、HEK EBNA細胞においてN末端モノマーFc-競合物として一過性に発現した。マウスAPRILは、ヒスチジン106~ロイシン241を含んだ。これを、N末端においてヒトIgG1のヒンジに融合し、ノブが凹みに入り込

10

20

30

40

50

む技術によって融合していないヒトIgG1Fc部分(凹鎖)とのヘテロダイマー化を可能にした。

【0163】

(実施例1A3。組換え短縮型ヒトBAFF)

組換え短縮型ヒトを、Gordon, 2003 (Biochemistry; 42 (20): 5977-5983)に記載されるように生成する。簡潔には、BAFF残基82~285をコードするDNAフラグメントを、N末端においてHisタグ、および後ろにトロンピン切断部位を含むpBr322ベクターへとクローニングし、N末端Hisタグ、そのあとにトロンピン切断部位を有する融合物を作る。lacUV5プロモーターの制御下にあるT7 RNAポリメラーゼ遺伝子を含むE.coli株を、37において、50mg/Lカルペニシリンを含むLB培地中で対数期中期まで培養し、次いで、16へと冷却し、その後、1.0mM IPTGで誘導する。細胞を、さらなる増殖の12時間後に遠心分離によって回収し、-80で保存する。上記細胞ペレットを、50mM Tris, pH8.0、および500mM NaCl中に再懸濁し、氷上で超音波処理する。遠心分離後、その上清を、Ni-NTAアガロースカラム(Qiagen)に載せる。上記カラムを、50mM Tris, pH8.0、500mM NaCl、および20mM イミダゾールで洗浄し、次いで、250mM イミダゾールを有する同じ緩衝液中での段階勾配で溶離する。BAFF含有画分をプールし、トロンピンを添加し、そのサンプルを、20mM Tris, pH8.0、および5mM CaCl₂に対して4において一晩透析する。タンパク質を、monoQ(Pharmacia)カラムで、最終的に、20mM Tris、150mM NaCl、および5mM MgCl₂中のS-200サイズ排除カラムでさらに精製する。

【0164】

(実施例1B。ヒトBCMAを表面に発現する組換え細胞)

ヒトBCMAを表面に発現する組換え細胞(「HEK293-BCMA細胞」)を、Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18)に記載されるように生成する。簡潔には、全長ヒトBCMAを、HindIII制限部位(太字下線)およびKozakコンセンサス配列を含む順方向プライマー

【化5】

5-GAATTC**AAGCTT**GCCACCATGTTGCAGATGGCTGGGCAGTGCTCC-3

(配列番号15)ならびに3'終止コドンおよびXbaI制限部位(太字下線)を含む逆方向プライマー

【化6】

5-GAATTC**TCTAGATT**ACCTAGCAGAAATTGATTTCTCTATCTCCGTAGC-3

(配列番号16)を使用して、IMAGEクローン687194(Invitrogen)をPCRテンプレートとして使用して増幅する。その増幅生成物を、ヒトサイトメガロウイルス(CMV)最初期エンハンサー/プロモーター、ポリヒスチジン(6xHis)、およびネオマイシン耐性遺伝子を含むE.coli発現ベクターにクローニングし、直線状にし、ヒト胚性腎293(HEK293)細胞へとトランスフェクトする。これらの細胞は、ヒトBCMAを表面に発現するものを選択し、高発現安定クローンを、蛍光活性化セルソーティング分析によって選択する。

【0165】

(実施例1C。BCMAを表面に発現するヒト骨髓腫細胞株)

a)細胞起源および培養条件。ヒトMM細胞株NCI-H929を、アメリカンタイプカルチャーコレクションから得る(ATCC CRL-9068)。NCI-H929細胞を、10%ウシ胎仔血清、2mM L-グルタミン、1mM ビルビン酸ナトリウムを補充したRPMI 1640中で増殖させる。U266B1(ATCC TIB-196)ヒトBリンパ球骨髓腫細胞株を、RPMI high Glucose、10%

FCS、1% グルタミン、1% ピルビン酸ナトリウム、10mM HEPES中で培養する。RPMI 8226 (ATCC CCL-155)、ヒトBリンパ球骨髄腫細胞株を、DMEM、10% FCS、1% グルタミン中で培養する。MKN45 (DSMZ ACC 409)、ヒト胃腺癌細胞株を、10% FCSおよび1% グルタミンを含むDMEM中で培養する。MM細胞株でのBCMA発現を、蛍光色素結合体化抗ヒトBCMA抗体 (BD Biosciences) を使用して、フローサイトメトリーによって確認する。

【0166】

b) BCMA発現を、フローサイトメトリーによって、3種のヒト骨髄腫細胞株 (H929、RPMI-8226およびU266B1) で評価した。簡潔には、細胞を採取し、洗淨し、生存率を計数し、96ウェル丸底プレートの1ウェルあたり50000細胞で再懸濁し、10 μ g/mlの抗ヒトBCMA抗体 (Abcam, #ab54834, マウスIgG1) とともに30分間、4においてインキュベートした (インターナリゼーションを妨げるため)。マウスIgG1をアイソタイプコントロール (BD Biosciences, #554121) として使用した。次いで、細胞を遠心分離 (5分間、350 \times gで) し、2回洗淨し、FITC結合体化抗マウス二次抗体とともに30分間4でインキュベートした。インキュベーション時間の最後に、細胞を遠心分離し (5分間、350 \times gで)、FACS緩衝液で2回洗淨し、100 μ l FACS緩衝液中に再懸濁し、FACS Divaソフトウェアを実行するCanto IIデバイスで分析した。図3は、H929細胞への漸増濃度の上記抗BCMA抗体の結合の際のメジアン蛍光強度の増大を示す。H929、RPMI-8226およびU266B1骨髄腫細胞株の膜表面のBCMAレセプター数の定量を、QFICKIT分析 (Dako, #K0078, 製造業者の指示に従う) によって評価した。

【0167】

【表2】

表2: H929、RPMI-8226およびU266B1骨髄腫細胞株の膜表面上のBCMAレセプター数の定量

骨髄腫細胞株	BCMA レセプター数
H929	6085
RPMI-8226	6253
U266(B1)	2865

【0168】

(実施例1D. 免疫による抗BCMA抗体の獲得)

抗BCMA抗体を、Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) に記載されるように、BCMA ECDでのラットの免疫によって生成する。簡潔には、Sprague-Dawleyラットを、Titer Max (登録商標) アジュバント (Sigma) を使用して、キーホールリンペットヘモシアニン結合体化BCMA ECD (アミノ酸5~54; NP_001183) で皮下免疫する。キーホールリンペットヘモシアニン結合体化を、Imject mcKLHV (Pierce) を使用して、リジン残基で行う。ヒトとマウスとの間のBCMAタンパク質の配列相同性が高いことに起因して、ラットは、抗体生成に好ましい。B細胞を、免疫した脾臓から回収し、標準的なポリエチレングリコール融合プロトコル (Goding 1996; Monoclonal antibodies: principles and practice, 3rd ed. Academic Press) を使用して、P3-X63.Ag8骨髄腫細胞に融合する。ハイブリドーマを、80% イスコフ改変ダルベッコ培地 (10% fetal clone I、4mmol/L L-グ

ルタミン、10% クローニングファクターを補充し、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび1×ヒポキサンチンナトリウム、アミノプテリン、およびチミジンもまた含む)中で培養する。ELISA試験を行って、BCMAへのハイブリドーマ培養上清の結合を検出する。陽性BCMA結合ハイブリドーマを、BCMAトランスフェクト体(HEK293-BCMA細胞)への細胞ベースの結合についてフローサイトメトリーによってさらにスクリーニングする。選択したハイブリドーマは、2ラウンドの限界希釈クローニングを受け、精製のためのさらに増殖させられる。さらに、これらの同じ選択されたハイブリドーマ由来の抗体を、標準的な方法によってヒト定常領域を有するキメラ抗体へと変換する。簡潔には、重鎖および軽鎖の可変領域をコードするcDNAを、ハイブリドーマ由来のmRNAからRT-PCRによって増幅し、次いで、ヒトIgG1の重鎖定常領域およびヒト軽鎖定常領域をそれぞれコードするcDNAとインフレームで結合させる。これらのcDNAを、哺乳動物一過性発現ベクターにクローニングし、プラスミドDNAを、E.coliで生成し、トランスフェクションのために精製する。HEK293細胞を、are標準的なトランスフェクション法(リン酸カルシウムベースのトランスフェクション)によってトランスフェクトし、7日間後、IgG1抗体を、プロテインAカラム上でのアフィニティークロマトグラフィーによって培養上清から精製し、続いて、モノマー抗体画分をサイズ排除クロマトグラフィーによって単離する。

【0169】

(実施例1E。インビトロでの組換えライブラリーからの抗BCMA抗体獲得)

(実施例1E1。包括的Fabライブラリーの構築)

Fab様式での包括的抗体ライブラリーを、以下のVドメイン対合を使用して、ヒト生殖系遺伝子に基づいて構築する：DP47-3ライブラリーについてはVk3__20

軽鎖とVH3__23 重鎖、およびDP88-3ライブラリーについてはVk1__17

軽鎖とVH1__69重鎖。両方のライブラリーを、軽鎖のCDR3(L3)および重鎖

のCDR3(H3)の中で無作為化し、重複伸長によるスプライシング(SOE)PCR(splicing by overlapping extension (SOE)

PCR)によって1ライブラリーあたり3つのフラグメントからアセンブリする。フラグメント1は、無作為化したL3を含む抗体遺伝子の5'末端を含み、フラグメント2は、

L3からH3にわたる中央の定常フラグメントであるのに対して、フラグメント3は、無作為化H3および抗体遺伝子の3'部分を含む。以下のプライマーの組み合わせを、

DP47-3ライブラリーについてのライブラリーフラグメントを生成するために使用する：フラグメント1(LMB3-LibL1b__new)、フラグメント2(MS63-MS64)、

フラグメント3(Lib2H-fdseq1ong)。WO2012020038の表1を参照のこと。以下のプライマーの組み合わせを、DP88-3ライブラリー

についてのライブラリーフラグメントを生成するために使用する：フラグメント1(LMB3-RJH__LIB3)、フラグメント2(RJH31-RJH32)およびフラグメント3(LIB88__2-fdseq1ong)。WO2012020038の表3および

表4を参照のこと。ライブラリーフラグメントの生成のためのPCRプロトコルは、以下を含む：94 での最初の変性を5分間；94 で1分間、58 で1分間、および72

で1分間を25サイクル；ならびに72 で10分間の末端伸長。アセンブリPCRのために、等モル比の上記3種のフラグメントを、テンプレートとして使用する。上記ア

センブリPCRプロトコルは、以下を含む：94 での最初の変性を3分間；ならびに94 で30秒、58 で1分、および72 で2分を5サイクル。この段階では、フラグ

メント1~3の外側の配列に相補的なプライマーが追加され、さらに20サイクルが行われ、その後、72 で10分間の末端伸長が行われる。全長無作為化Fab構築物の十分

量のアセンブリ後に、上記Fab構築物を、同様に処理したアクセプターファージミドベクターと一緒に、DP47-3ライブラリーについてはNcoI/NotI、およびDP

88-3ライブラリーについてはNcoI/NheIで消化する。DP47-3ライブラリーについては、22.8μgのFabライブラリーを、16.2μgのファージミドベ

クターとライゲーションする。DP88-3ライブラリーについては、30.6μgのF

10

20

30

40

50

a bライブラリーを、30.6 μ gのファージミドベクターとライゲーションする。精製したライゲーションを、最終的なDP47-3ライブラリーおよびDP88-3ライブラリーを得るために、それぞれ、DP47-3ライブラリーについては68の形質転換、およびDP88-3ライブラリーについては64の形質転換のために使用する。Fabライブラリーをディスプレイするファージミド粒子をレスキューし、PEG/NaCl精製によって精製して、抗BCMA Fabクローンの選択のために使用する。

【0170】

(実施例1E2。抗BCMA Fabクローンの選択)

a) 選択を、BCMA-ECD-ビオチンに対して行う。抗原を、発現の際にインビボでビオチン化する。以下のプロトコルに従って、溶液中で選択を行う：(i) 0.5時間 10にわたる総体積1ml中でのライブラリーDP88-3の約 10^{12} ファージミド粒子および100nM BCMA-ECD-ビオチンの結合；(ii) 10分間にわたる 5.4×10^7 ストレプトアビジン被覆磁性ビーズの添加による、BCMA-ECD-ビオチンおよび結合したファージの捕捉；(iii) 5×1 ml PBS/Tween (登録商標) 20および 5×1 ml PBSを使用してのビーズの洗浄；(iv) 10分間にわたる1ml 100mM TEA (トリエチルアミン) の添加によるファージ粒子の溶離および500 μ L 1M Tris/HCl pH7.4の添加による中和；ならびに(v) 対数期のE. coli TG1細胞 (Zymo Research) の再感染、ヘルパーファージVCSM13 (Stratagene) での感染およびその後の選択ラウンドで使用される予定のその後のファージミド粒子のPEG/NaCl沈殿。100nMの一定BCMA-ECD-ビオチン濃度を使用して、3ラウンドにわたる選択を行う。第2ラウンド目において、抗原：ファージ複合体の捕捉を、ストレプトアビジンビーズの代わりにニュートロアビジンプレートで行う。特異的結合因子を、以下のように用いてELISAによって同定する：100 μ lの100nM BCMA-ECD-ビオチンを、ニュートロアビジンプレートの各ウェルに被覆する。Fab含有細菌上清を添加し、結合しているFabを、抗Flag/HRP二次抗体を使用することによって、それらのFlagタグによって検出する。いったん同定されたら、抗BCMA ECDクローンを、0.5リットル培養体積において細菌で発現させ、アフィニティー精製し、BIACORE (登録商標) 機器を使用してSPR分析によってさらに特徴付ける。

【0171】

b) 抗BCMA Fabを、ファージディスプレイによって、種々のVドメインファミリーに由来するVLおよびVH対合からなる合成Fabライブラリーから樹立した。クローン13C2、17A5、83A10、13D2、14B11、14E1、29B11、および29F3を、Vk3__20/VH3__23サブライブラリーから、クローン13A4をVk2D__28/VH5__1サブライブラリーから、およびクローン13A7をVk2D__28/VH3__23サブライブラリーから、それぞれ生成した(表3)。これらのライブラリーは、もっぱら、ヒトフレームワークと、VLドメイン(3つの異なる長さ)およびVHドメイン(6つの異なる長さ)のCDR3における配列多様性とに基づく。

【0172】

【表 3】

表3:抗BCMAクローンおよびそれぞれのVL/VH対合

Fab クローン	VL ドメイン	VH ドメイン
13C2	Vk3_20	VH3_23
17A5	Vk3_20	VH3_23
83A10	Vk3_20	VH3_23
13A4	Vk2D_28	VH5_1
13D2	Vk3_20	VH3_23
14B11	Vk3_20	VH3_23
14E1	Vk3_20	VH3_23
29B11	Vk3_20	VH3_23
29F3	Vk3_20	VH3_23
13A7	Vk2D_28	VH3_23

10

20

【0173】

選択ラウンド（バイオパニング）を、以下のパターンに従って溶液中で行った：1．抗原のFc部分を認識する抗体のライブラリーを除去するために、 $10\mu\text{g/ml}$ の非関連ヒトIgGで被覆したイムノチューブ中の1ライブラリープールあたり約 10^{12} ファージミド粒子の予備清浄（pre-clearing）、2．総体積2ml中のFc結合因子のさらなる除去のための、 100nM 非関連非ビオチン化Fcノブが凹みに入り込む構築物の存在下での0.5時間にわたる非Fc結合ファージミド粒子と 100nM ビオチン化BCMAとのインキュベーション、3．振盪機上で20分間、パニング反応物を、ニュートロアビジンもしくはストレプトアビジンを予め被覆したマイクロタイタープレートの16ウェルの中に分割および移すことによる、ビオチン化BCMAおよび特異的に結合するファージの捕捉、4．プレート洗浄機を使用して、それぞれのウェルをPBS/Tween 20で10～30回およびPBSで10～30回洗浄、5．天然のリガンドの結合部位を認識し、従って、APRIL-非競合ファージ抗体を選択するFabクローンを置き換えるために、 230nM マウスAPRILを添加することによる任意選択の競合洗浄工程、6．5～10分間にわたって1ウェルあたり $125\mu\text{l}$ 100mM TEA（トリエチルアミン）を添加することによるファージ粒子の溶離、および等体積の 1M Tris/HCl pH7.4を添加することによる中和、7．溶離したファージ粒子での対数期のE.coli TG1細胞の再感染、ヘルパーファージVCSM13での感染、30で一晩振盪機上でのインキュベーションおよび次の選択ラウンドに使用される予定のファージミド粒子のその後のPEG/NaCl沈殿。

30

40

【0174】

一定抗原濃度 100nM を使用して、3～5ラウンドにわたって選択を行った。ヒトBCMAのみを抗原として使用する選択作戦とは別に、交差反応性抗体を選択するためにカニクイザルもしくはマウスBCMAもヒトBCMAと代わる代わるの様式で使用するさらなる選択作戦を行った。さらに、ストレプトアビジンプレートベースの捕捉の代わりとして、抗原：ファージ複合体の捕捉を、 5.4×10^7 ストレプトアビジン被覆磁性ビーズを、パニング反応物に添加することによって行い、続いて、上記の条件の下でそれぞれの磁石を使用して洗浄工程を行った。

【0175】

特異的結合因子を、BioRadのProteOn XPR36バイオセンサを使用し

50

て、F a b 含有細菌培養上清の表面プラズモン共鳴スクリーニングによって同定した。簡潔には、対数期の E . c o l i T G 1 細胞を溶離したファージ粒子に感染させた後、単一コロニー形成単位 (c f u) をまき、96 深型ウェルプレート中で 1 m l 発現培養物を接種するために拾い上げた。8 . 0 0 0 ~ 1 0 . 0 0 0 R U のヤギ抗ヒト I g G 、 F (a b ') 2 フラグメント特異的ポリクローナル抗体 (J a c k s o n I m m u n o R e s e a r c h , # 1 0 9 - 0 0 5 - 0 0 6) で誘導体化した P r o t e O n G L M チップ上で、垂直配向で上清から F a b を捕捉した。引き続いて、ヒト、カニクイザルおよびマウス B C M A 、ならびに非関連 F c ノブが凹みに入り込む構築物を、水平配向で分析物として注入した。B C M A への有意な結合応答を示し、抗原の F c 部分を結合しなかったクローンを、0 . 5 リットル培養体積において細菌で発現させ、アフィニティー精製し、B i o R a d の P r o t e O n X P R 3 6 バイオセンサでワンショットキネティクス (o n e - s h o t - k i n e t i c s) プロトコルを使用して、S P R 分析によって動力学的に特徴付けた。

【 0 1 7 6 】

(実施例 1 F . B C M A 結合アッセイ : 表面プラズモン共鳴)

a) 固定化 B C M A への B C M A 抗体の結合親和性を測定するために、B i a c o r e (登録商標) 3 0 0 0 機器 (P h a r m a c i a B i o s e n s o r) で表面プラズモン共鳴測定を行う。レセプター B C M A (B C M A - E C D) を、製造業者によって提供されるアミンカップリングプロトコルを使用して、400 共鳴単位のレベルでセンサチップにカップリングする。代替の B C M A - E C D - ビオチンを、これもまた 400 共鳴単位のレベルで、製造業者によって提供される上記プロトコルを使用して、ストレプトアビジン - センサチップにカップリングする。全ての実験において、フローセル 1 を、参照セルとして使用する。センサグラムを、濃度 0 . 1 p M ~ 2 0 0 n M の範囲に及ぶ F a b 溶液について記録する。非線形回帰分析を使用して、製造業者のソフトウェアを使用して動力学定数および結合定数を同時に計算する。100 n M の B C M A - E C D への一価の結合親和性を有する F a b クローンを、標準的な方法によって I g G に変換する。簡潔には、重鎖および軽鎖の可変領域をコードする c D N A を、ヒト I g G 1 の重鎖定常領域およびヒト 軽鎖定常領域をそれぞれコードする c D N A とインフレイムで結合する。これらの c D N A を、哺乳動物一過性発現ベクターへとクローニングし、プラスミド D N A を、E . c o l i において生成し、トランスフェクションのために精製する。H E K 2 9 3 細胞を、標準的なトランスフェクション法 (リン酸カルシウムベースのトランスフェクション) によってトランスフェクトし、7 日後に、I g G 1 抗体を、プロテイン A カラム上でのアフィニティークロマトグラフィーによって培養上清から精製し、続いて、モノマー抗体画分をサイズ排除クロマトグラフィーによって単離する。

【 0 1 7 7 】

b) 抗 B C M A F a b クローンのアフィニティー (K D) を、P r o t e O n X P R 3 6 機器 (B i o r a d) を使用して、25 において、ニュートロアビジン捕捉によって N L C チップに固定化したビオチン化ヒト、カニクイザルおよびマウスの B C M A で、表面プラズモン共鳴によって測定した (表 4) 。非関連ビオチン化 F c ノブが凹みに入り込む構築物を、陰性コントロールとして類似の様式で固定化した。抗原 (リガンド) の固定化 : 組換え抗原を、P B S T (1 0 m M ホスフェート、150 m M 塩化ナトリウム p H 7 . 4 、0 . 0 0 5 % T w e e n 2 0) で 1 0 μ g / m l へと希釈し、次いで、垂直配向で、40 μ l / 分において 300 秒にわたって注入した。分析物の注入 : ワンショットキネティクス測定のために、注入方向を水平配向に変更し、精製 F a b の連続 2 倍希釈物 (種々の濃度範囲) をチャンネル 1 ~ 5 を通し、会合時間 200 秒もしくは 300 秒、および解離時間 300 秒を用いて、40 μ l / 分で同時に注入した。緩衝液 (P B S T) を第 6 のチャンネルにそって注入して、基準のための「インライン (i n - l i n e) 」ブランクを提供した。会合速度定数 (k o n) および解離速度定数 (k o f f) を、P r o t e O n M a n a g e r v 3 . 1 ソフトウェアの単純な 1 対 1 L a n g m u i r 結合型モデルを使用して、会合センサグラムおよび解離センサグラムを同時に適

合させることによって計算した。平衡解離定数 (K_D) を、比 k_{off}/k_{on} として計算した。流速 $100 \mu\text{L}/\text{分}$ で接触時間 18 秒にわたって 10 mM グリシン - HCl $\text{pH} 1.5$ を使用して水平配向で再生を行った。

【0178】

【表4】

表4: 抗BCMA Fabクローンの一価の親和性

Fabクローン	K_D ヒト BCMA [nM]	K_D カニクイザル BCMA [nM]	K_D マウス BCMA [nM]
13C2	196	-	144
17A5	45	-	74
83A10	76	1510	1130
13A4	1.8	-	-
13D2	86	弱い	弱い
14B11	383	-	-
14E1	91	弱い	弱い
29B11	224	-	弱い
29F3	87	-	弱い
13A7	235	-	-

【0179】

c) 以下のとおりの、表面プラズモン共鳴 (SPR) による組換えBCMAへの抗BCMA抗体の結合の評価。全てのSPR実験を、25において、ランニング緩衝液としてのHBS-EP (0.01 M HEPES $\text{pH} 7.4$ 、 0.15 M NaCl、 3 mM EDTA、 0.005% Surfactant P20、Biacore, Freiburg/Germany) を用い、Biacore T200において行った。抗BCMA抗体と組換えBCMA Fc(kih) (ヒト、カニクイザルおよびマウス) との間の相互作用のアビディティを決定した。ビオチン化組換えヒト、カニクイザルおよびマウスBCMA Fc(kih) を、指示 (Biacore, Freiburg/Germany) に従ってSAチップに直接カップリングした。固定化レベルは、 $200 \sim 700 \text{ RU}$ の範囲に及んだ。上記抗BCMA抗体を、2倍濃度範囲 ($1.95 \sim 500 \text{ nM}$) において、流速 $30 \mu\text{L}/\text{分}$ で、 120 秒間にわたってフローセルに通過させた。 180 秒間、解離をモニターした。バルク屈折率差を、参照フローセルで得られる応答を差し引くことによって、校正した。ここで、上記抗BCMA抗体を、標準的なアミンカップリングキットに記載されるように予め活性化し、脱活性化した空の表面に流した。みかけの動力学的定数を、Biacore T200 Evaluation Software (vAA, Biacore AB, Uppsala/Sweden) を使用して導出して、比較目的の相互作用が二価であるが、数値積分によって $1:1$ Langmuir 型結合の速度式を適合させた。

【0180】

抗BCMA抗体と組換えヒトBCMA Fc(kih) との間の相互作用の親和性もまた、決定した。抗ヒトFab抗体 (GE Healthcare) を、 $\text{pH} 5.0$ において、標準的なアミンカップリングキット (Biacore, Freiburg/Germany) を使用してCM5チップに直接カップリングした。固定化レベルは、約 6500 RU であった。抗BCMA抗体を、 90 秒間、 25 nM で捕捉した。組換えヒトBCMA Fc(kih) を、4倍濃度範囲 ($1.95 \sim 500 \text{ nM}$) において、流速 $30 \mu\text{L}/\text{分}$ で、 120 秒かけてフローセルを通過させた。 120 秒間、解離をモニターした。バルク屈折率差を、参照フローセルで得られる応答を差し引くことによって、校正した。

ここで、組換えBCMAを、固定化した抗ヒトFab抗体を有する表面上に流したが、その上に抗BCMA抗体ではなくHBS-Epを注入した。動力学的定数を、Biacore T100 Evaluation Software (vAA, Biacore AB, Uppsala/Sweden) を使用して導出して、数値積分によって1:1 Langmuir型結合の速度式を適合させた(表5)。組換えカニクイザルBCMA Fc(kih)およびマウスBCMA Fc(kih)への83A10抗BCMA抗体の結合もまた、測定した(表6)。

【0181】

【表5】

表5. 1:1 Langmuir型結合の速度式を適合させることによって決定される親和性定数

10

リガンド	分析物	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
13C2 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	2.4E+05	1.1E-02	4.7E-08
17A5 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	2.2E+05	1.9E-03	8.7E-09
83A10 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	6.2E+05	2.5E-03	4.1E-09
29F3 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	3.2E+05	6.8E-03	2.1E-08
13A7 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	8.0E+04	7.9E-03	1.0E-07
13A4 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	7.2E+04	3.6E-04	5.1E-09
13D2 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	3.6E+05	9.3E-03	2.6E-08
14B11 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	1.5E+05	1.6E-02	1.1E-07
14E1 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	4.0E+05	8.1E-03	2.0E-08
29B11 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	1.7E+05	6.6E-03	4.0E-08

20

30

【0182】

【表6】

表6:83A10 抗BCMA抗体への組換えBCMA Fc(kih)の結合.

a)カニクイザルBCMA Fc(kih). b)マウスBCMA Fc(kih)

リガンド	分析物	Kon (1/Ms)	Koff (1/s)	KD (M)
83A10 抗BCMA IgG	huBCMA Fc(kih)	6.2E+05	2.5E-03	4.1E-09
83A10 抗BCMA IgG	cyBCMA Fc(kih)	2.8E+05	2.0E-02	7.2E-08
83A10 抗BCMA IgG	muBCMA Fc(kih)	2.0E+05	4.0E-02	2.0E-07

40

【0183】

(実施例1G。BCMAシグナル伝達アッセイ: NF- κ B活性化)

50

a) Ryan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18)に記載されるように、NCI-H929細胞を洗浄し、処理前に、0.25% ウシ胎仔血清を補充したRPMI中で24時間インキュベートする。次いで、上記細胞を、処理しないか、または0.1 µg/mL TNF-、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mL 熱処理HT短縮型APRIL、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mL 短縮型APRIL、0.1 pM~200 nM アイストープコントロール、もしくは0.1 pM~200 nM 抗BCMA抗体で、20分間処理する。リガンドブロックを評価するために、20分間、0.1 pM~200 nMの抗BCMA抗体もしくはアイソタイプコントロール抗体で予備処理した細胞を、1000 ng/mLの短縮型APRILで処理する。次いで、細胞を回収し、洗浄し、プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビターを補充した50 mmol/L Tris-HCl (pH 7.5)、1% NP₄₀、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTAで溶解する。次いで、タンパク質抽出物を、TransAM (登録商標) 化学発光アッセイキット (Active Motif) を使用してNF- κ B活性について分析し、発光シグナル読み取りを、Fusion HTプレートリーダー (Packard Instruments) で行う。

【0184】

b) 簡潔には、H929細胞を、細胞インキュベーター中で、24時間、37 °Cにおいて0.25% FCSを含むRPMI 1640中で飢餓にさせる。飢餓時間 (starvation time) の最後に、細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、ViCellを使用して評価した。生細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液 (BD Biosciences) 中、 4×10^6 細胞/mLに調節した。この細胞懸濁物のうちの30 µlを、丸底96ウェルプレートへと1ウェルあたりでさらにアリコートに分け、抗BCMA抗体 (15 µg/mLもしくは50 µg/mL) もしくはアイソタイプコントロール抗体 (10 µg/mL、20 µg/mLおよび40 µg/mL) とともに20分間、細胞インキュベーター中で予備インキュベートした。次いで、細胞に、40分間、37 °Cでヘマグルチニン (HA) (R&D Systems Europe, #7907-AP-010) でタグ化した1 µg/mL 組換えマウス - APRILを補充した。熱不活化 - APRIL (HI APRIL) を上記アッセイで使用して、- APRIL誘導性NF- κ Bシグナルの特異性を確認した (熱不活化を、60 °Cで1時間の - APRILの処理により行った)。インキュベーション時間の最後に、細胞を回収し、洗浄し、溶解し、Nuclear Extractキット (Active Motif, #40410) の製造業者のプロトコルに従って処理した。タンパク質抽出物を、NF- κ B活性について、TransAm^(C) NF- κ B p65 Chemi Assayキット (Active Motif, #40097) を使用して製造業者の指示に従って分析した。発光シグナルを、Spectra Max M5ルミノメーター (Molecular Devices) を使用して読み取った。

【0185】

(実施例1H。BCMAへの結合において、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mLのAPRILもしくはBAFFによって影響を受けず、BCMA細胞内ドメインによるシグナル伝達を促進もブロックもしない抗体を選択するための抗BCMA抗体のスクリーニング)

本発明は、1) ヒトBCMAに結合する、2) BCMAへの結合は、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mLのAPRILおよびBAFFによって影響を受けない、3) APRIL依存性NF- κ B活性化を>20%、好ましくは、>15%ブロックも低下もさせない、または>20%、好ましくは、>15% 増大させない、4) BAFF依存性NF- κ B活性化を、>20%、好ましくは、>15%ブロックも低下もさせない、または>20%、好ましくは、>15%増大させない、5) APRILもBAFFもなしでNF- κ B活性化をそれ自体で誘導させない、抗ヒトBCMA抗体の生成に関する。表10は、所望の新たな特性：非リガンド結合/ブロック、非リガンド競合を有するBC

MA抗体の選択のためのスクリーニングパラダイムを示す。重要なことに、BCMAへの結合がAPRILによってもBAFFによってもブロックされない抗体を選択する。

【0186】

(実施例1H1。HEK293-BCMA細胞、プレートに結合したBCMAもしくはBCMA陽性多発性骨髄腫細胞株上のBCMAへの結合(フローサイトメトリーおよびELISA))

a) 固定化アプローチおよび/もしくは上記の組換えインビトロライブラリーのスクリーニングのいずれかに由来する抗BCMA抗体を、フローサイトメトリーによって、HEK293-BCMA細胞上のヒトBCMAへの結合について分析する。簡潔には、培養した細胞を回収し、計数し、細胞生存率をトリパンブルー排除法を使用して評価する。次いで、生細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)中で 2×10^6 細胞/mlへと調節する。この細胞懸濁物のうちの90 μ lを、丸底96ウェルプレートへと1ウェルあたりでさらにアリコートに分ける。10 μ lの上記抗BCMA抗体もしくは対応するIgGコントロールを、終濃度0.1pM~200nMを得るように、その細胞を含むウェルに添加する。全ての構築物およびコントロールIgGを同じ容量モル濃度で使用する。30分間、4でインキュベートした後、上記細胞を遠心分離し(5分間、350 \times g)、150 μ l/ウェルFACS染色緩衝液(BD Biosciences)で洗浄し、再懸濁し、さらに30分間、4で12 μ l/ウェル 蛍光色素結合体化AffiniPure F(ab')₂ Fragmentヤギ抗ヒトIgG Fc Fragment Specific(Jackson Immuno Research Lab; 作業溶液: 1:20)とともにインキュベートする。次いで、細胞を、染色緩衝液(BD Biosciences) 120 μ l/ウェルで洗浄し、350 \times gで5分間の遠心分離によってペレット化する。第2の洗浄工程を、FACS染色緩衝液150 μ l/ウェルを使用して行う。上記サンプルを、200 μ l/ウェルFACS染色緩衝液中に再懸濁し、FACSDiva(登録商標)ソフトウェアを備えたLSRIIFローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して、取得および分析する。平均蛍光強度を、抗BCMA抗体濃度の関数としてプロットして、結合曲線を得て最大結合の50%に達する有効抗体濃度(EC₅₀)を計算する。細胞上のBCMAに結合する抗BCMA抗体は、このアッセイから判定されるように、次のスクリーニング工程、すなわち、APRILおよびBAFFに対する競合BCMA結合アッセイのために選択される(以下の工程(実施例1H2))。

【0187】

HEK293-BCMA細胞上のヒトBCMAへの結合を示す抗体の特性は、Ryan et al. (2007)によって記載されるとおりのELISA法を使用して確認する。簡潔には、イムノソープ(immunosorb)96ウェルプレートを、1.5 μ g/mLのGST-BCMA-ECDで被覆し、PBS+1% Tween(登録商標)(PBS-T)で洗浄し、PBS-T+1% 血清アルブミンでブロックする。BCMA被覆プレートを、ハイブリドーマ培養上清とともに2時間室温でインキュベートし、PBS-Tで5回洗浄し、ペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗ラットIgGとともにインキュベートする。二次抗体とのインキュベーションの後、プレートを洗浄し、3, 3, 5, 5-テトラメチルベンジジン基質とともにインキュベートし、等体積の1mol/L H₂SO₄で停止させる。

【0188】

b) 抗BCMA IgG抗体(クローン13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14E1、13A7、14B11)を、フローサイトメトリーによって、BCMA発現H929細胞上のヒトBCMAへの結合について分析した。MKN45(BCMAを発現しないヒト胃腺癌細胞株)を、陰性コントロールとして使用した。簡潔には、培養した細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、ViCellを使用して評価した。次いで、生細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)中で 2×10^6 細胞/mlに調節する。この細胞懸濁物のうちの100 μ lを、丸底96ウェル

プレートに1ウェルあたりでさらにアリコートに分け、30 μ lの上記抗BCMA抗体もしくは対応するIgGコントロールとともに、30分間4でインキュベートした。全ての抗BCMA抗体（およびアイソタイプコントロール）を力価測定し、0.1~40 μ g/mlの間の終濃度範囲で分析した。次いで、細胞を遠心分離し（5分、350 \times g）、120 μ l/ウェル FACS染色緩衝液（BD Biosciences）で洗浄し、再懸濁し、さらに30分間4で、蛍光色素結合体化PE結合体化AffiniPure F(ab')₂ Fragmentヤギ抗ヒトIgG Fc Fragment Specific（Jackson Immuno Research Lab；109-116-170）とともにインキュベートした。次いで、細胞を、染色緩衝液（BD Biosciences）で2回洗浄し、1ウェルあたり100 μ l BD固定緩衝液（#BD Biosciences, 554655）を使用して、4で20分間固定し、120 μ l FACS緩衝液中に再懸濁し、BD FACS Canto IIを使用して分析した。図4は、抗BCMA抗体濃度の関数でプロットした抗BCMA IgGクロンの平均蛍光強度を示す；（A）H929細胞に対してクローン13C2、17A5、83A10、（B）MKN45細胞に対してクローン13C2、17A5、83A10、（C）H929細胞に対してクローン13A4、13D2、14E1、13A7、14B11、（D）MKN45細胞に対してクローン13A4、13D2、14E1、13A7、14B11。H929細胞へのクローン13C2、17A5、83A10の結合に関するEC50値（最大結合の50%に達するために必要とされる抗体濃度を示す）を、表7にまとめる。

【0189】

【表7】

表7:H929多発性骨髄腫細胞への抗BCMA抗体の結合に関するEC50値

	抗BCMA抗体 クローン 13C2	抗BCMA抗体 クローン 83A10	抗BCMA抗体 クローン 17A5
EC50 (nM)	13.9	12.5	9.0
EC50 (ug/ml)	2.0	1.8	1.3

【0190】

（実施例1H2。APRILもしくはBAFFの100 ng/ml、好ましくは、1000 ng/mlは、ヒトBCMAへのBCMA抗体結合を変化させない（フローサイトメトリーおよびELISA））

a) 上記の工程（実施例1H1）から選択された抗BCMA抗体を、次いで、フローサイトメトリーによって、100 ng/ml、好ましくは、1000 ng/ml APRILもしくはBAFFの存在下もしくは非存在下で、HEK293-BCMA細胞上のヒトBCMAへの結合について分析する。生きている293-BCMA細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液（BD Biosciences）中で 2×10^6 細胞/mlに調節する。この細胞懸濁物のうちの90 μ lを、丸底96ウェルプレートに1ウェルあたりでさらにアリコートに分ける。10 μ lの上記抗BCMA抗体もしくは対応するIgGコントロールを、その細胞含有ウェルに添加して、終濃度0.1 pM~200 nMを得る。全ての構築物およびコントロールIgGを、同じ容量モル濃度で使用する。30分間37でインキュベートした後、100 ng/ml、好ましくは、1000 ng/mlのAPRILおよびBAFFそれぞれの存在下および非存在下で、上記細胞を遠心分離し（5分、350 \times g）、150 μ l/ウェル FACS染色緩衝液（BD Biosciences）で洗浄し、再懸濁し、さらに30分間4で12 μ l/ウェル 蛍光色素結合体化AffiniPure F(ab')₂ Fragmentヤギ抗ヒトIgG Fc Fragment Specific（Jackson Immuno Research Lab；作業溶液：1:20）とともにインキュベートする。次いで、細胞を、染色

緩衝液 (BD Biosciences) 120 μ l / ウェルで洗浄し、350 \times g で5分間の遠心分離によってペレット化する。第2の洗浄工程を、FACS染色緩衝液 150 μ l / ウェルを使用して行う。上記サンプルを、200 μ l / ウェル FACS染色緩衝液中に再懸濁し、FACS Diva (登録商標) ソフトウェアを備えたLSRIIFローサイトメーター (BD Biosciences) を使用して、取得および分析する。その平均蛍光強度を抗BCMA抗体濃度の関数としてプロットして、その結合曲線を得て最大結合の50%に達するための有効抗体濃度 (EC_{50}) を計算する。1つの結合曲線は、APRILの存在下で、もうひとつはその非存在下で行われ、同じことをBAFFの存在下および非存在下で行う。BCMAへの結合が、100 ng / ml、好ましくは、1000 ng / mlのAPRILによって影響を受けず、同様に100 ng / ml、好ましくは、1000 ng / mlのBAFFによっても影響を受けないそれらの抗体を、以下の次の工程のために選択する。BCMAへの結合に関してリガンドAPRILおよびBAFFと競合しない抗体の代表的結合曲線、ならびにBCMAへの結合に関してこれらのリガンドと競合する抗体の代表的結合曲線を、図1に示す。

【0191】

100 ng / ml APRILもしくはBAFFの存在下で、HEK293-BCMA細胞上のヒトBCMAへの結合を示す抗体の特性を、Ryan et al. (2007) によって記載されるとおりのELISA法を使用して確認する。簡潔には、イムノソープ96ウェルプレートを、1.5 μ g / mlのGST-BCMA-ECDで被覆し、PBS + 1% Tween (登録商標) (PBS-T) で洗浄し、PBS-T + 1% 血清アルブミンでブロックする。BCMA被覆プレートを、ハイブリドーマ培養上清とともに2時間室温でインキュベートし、PBS-Tで5回洗浄し、ペルオキシダーゼ結合体化ヤギ抗ラットIgGとともにインキュベートする。二次抗体とのインキュベーションの後、プレートを洗浄し、3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジン基質とともにインキュベートし、等体積の1 mol / L H_2SO_4 で停止させる。プレートベースのリガンドブロックについては、プレートを、上記のように1 μ g / mlのGST-BCMA-ECDで被覆する。被覆したプレートを、精製抗体とともに特定の濃度で予めインキュベートし、PBS-Tで洗浄し、次いで、3 μ g / mlの組換えヒトMegA APRIL (Alexis Biochemicals) もしくは組換えヒトBAFF (R&D Systems) とともにインキュベートする。APRILもしくはBAFFの結合を、ペルオキシダーゼ結合体化抗FLAG、続いて、上記のように3, 3', 5, 5'-テトラメチルベンジジンでの発色を使用して検出する。

【0192】

b) ELISAによる非APRIL競合抗BCMA Fabもしくは抗体の同定。固定化ヒトBCMAへのFabの結合を、マウスAPRILの漸増濃度の存在下で評価した。25 nM ビオチン化ヒトBCMA (100 μ l / ウェル) を、ニュートロアビジンプレート上に被覆し、振盪機上で、1時間室温でインキュベートした。500 nMもしくは1000 nMの精製Fabを添加して、上記被覆ヒトBCMAを1時間室温で飽和させた。上記プレートを、3回PBSで洗浄し、マウスAPRILを、PBS緩衝液中での2倍段階希釈 (0 ~ 100 nMの範囲に及ぶ) を使用して、8種の種々の濃度で添加し、振盪機上で30分間インキュベートした。上記プレートを3回PBSで洗浄し、抗FLAG-HRP二次抗体 (1 : 4000) を1時間添加した。再び、上記プレートを3回PBSで洗浄し、100 μ l / ウェル BM Blue POD (Roche) を添加することによって発色させた。50 μ l / ウェル 1M H_2SO_4 を添加することによって反応を停止させ、そのODを、OD₄₅₀₋₆₅₀ の最終的な読み取りのために450 nmで読み取った (650 nmの参照)。選択したFabの結果を、図5に示す。50 nM (100 ng / ml) もしくは6.25 nM (140 ng / ml) のmuAPRILの非存在下対存在下での抗BCMAクローンで測定したOD値の低下 (%) を、表8にまとめる。

【0193】

【表 8】

表8:muAPRILの非存在下 対 存在下で測定したOD値(450nm)における低下

muAPRIL (nMおよびng/mL)	muAPRIL の存在下での OD 値における低下(↓)						
						
	抗 BCMA 抗体クローン						
	13C2	17A5	83A10	13A4	13D2	29B11	13A7
50 nM / 1000 ng/mL	18.9%	34.5%	6.3%	13.1%	7.3%	67.3%	93.2%
6.25 nM / 140 ng/mL	↓ なし	5.6%	↓ なし	7.7%	6.4%	12.1%	31.3%

10

【 0 1 9 4 】

c) フローサイトメトリーによって検出される - APRIL と抗 BCMA 抗体との競合。 - APRIL と抗 BCMA 抗体との間の結果としての競合の評価を、抗 BCMA 抗体(クローン 13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14E1、13A7、14B11)の漸増濃度の存在下での - APRIL の結合を定量することによって、H929細胞に対して行った。簡潔には、培養した細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、ViCell を使用して評価した。生細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)中で 1×10^6 細胞/mlに調節した。この細胞懸濁物のうちの100 μ lを、丸底96ウェルプレートに1ウェルあたりでさらにアリコートに分け、30 μ lの上記抗BCMA抗体もしくは対応するIgGコントロールとともに30分間4 でインキュベートする。全て抗BCMA抗体(およびアイソタイプコントロール)を力価測定し、終濃度1 μ g/ml、16 μ g/mlおよび40 μ g/mlで分析する。次いで、細胞を遠心分離し(5分、350 \times g)、120 μ l/ウェル FACS染色緩衝液(BD Biosciences)で洗浄し、再懸濁し、ヘマグルチニン(HA)(R&D Systems Europe, #7907-AP-010)でタグ化した1 μ g/ml 組換えマウス - APRILとともにさらに30分間4 でインキュベートする。次いで、120 μ l/ウェル FACS緩衝液で1回細胞を洗浄し、FITC結合体化抗HA抗体(Sigma Aldrich, #H7411)とともに30分間4 でインキュベートする。インキュベーション時間の最後に、細胞を、120 μ l/ウェル FACS緩衝液で洗浄し、100 μ l BD固定緩衝液/ウェル(#BD Biosciences, 554655)を使用して、4 で20分間固定し、80 μ l FACS緩衝液で再懸濁し、BD FACS Fortessaを使用して分析する。図6は、H929細胞での抗BCMA抗体クローン13A4、13D2、14E1、13A7、14B11の漸増濃度の関数で検出される - APRIL の相対的メジアン蛍光強度(FITCシグナル)を示す。アイソタイプコントロールの存在下での - APRIL の結合の際のメジアン蛍光強度を、1に設定した；他のシグナルを、それに対して正規化した。

20

30

【 0 1 9 5 】

d) フローサイトメトリーによって検出される抗BCMA抗体と - APRIL との競合。 - APRIL と抗BCMA抗体との間の結果としての競合の評価を、 - APRIL の存在下もしくは非存在下で抗BCMA抗体(クローン13A4、13C2、13D2、14B11、17A5、83A10)の結合を定量することによって、RPMI細胞に対して行った。簡潔には、培養した細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、ViCell を使用して評価した。生細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)中で 1×10^6 細胞/mlに調節した。この細胞懸濁物のうちの100 μ lを、丸底96ウェルプレートに1ウェルあたりでさらにアリコートに分け、30 μ lの上記抗BCMA抗体もしくは対応するIgGコントロールとともに20分間4 でインキュベートした。全ての抗BCMA抗体およびアイソタイプコントロールを、終濃度40 μ g/mlで分析した。次いで、細胞を遠心分離し(5分、350 \times g)、120 μ l/ウェル FACS染色緩衝液(BD Biosciences)で洗浄し、再懸濁し、ヘマグ

40

50

ルチニン(HA)(R&D Systems Europe, #7907-AP-010)でタグ化した $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 組換えマウス-APRILとともにさらに40分間4でインキュベートした。次いで、細胞を、1回 $120\mu\text{l}$ /ウェルFACS緩衝液で洗浄し、Alexa.Fluor 647結合体化抗ヒトFc抗体(Jackson Immuno Research Lab, #109-606-008)とともに30分間4でインキュベートした。インキュベーション時間の最後に、細胞を $120\mu\text{l}$ /ウェルFACS緩衝液で洗浄し、 $100\mu\text{l}$ BD固定緩衝液/ウェル(#BD Biosciences, 554655)を使用して4で20分間固定し、 $80\mu\text{l}$ FACS緩衝液中に再懸濁し、BD FACS Fortessaを使用して分析した。図7は、 $1000\text{ng}/\text{mL}$ の-APRILの非存在下もしくは存在下で検出されるRPM I細胞上での抗BCMA抗体クローン13A4、13C7、13D2、14B11、17A5、83A10の相対的メジアン蛍光強度(Alexa.Fluor 647シグナル)を示す。-APRILの非存在下での抗BCMA抗体の結合の際のメジアン蛍光強度を1に設定した；-APRILの存在下での抗BCMA抗体に関する他のシグナルを、それに対して正規化した。

10

【0196】

e)フローサイトメトリーによって検出される、同時インキュベーション後の抗BCMA抗体と-APRILとの競合。-APRILと抗BCMA抗体との間の結果としての競合の評価を、-APRILの存在下もしくは非存在下で、抗BCMA抗体(クローン14B11、13D2、13A4、17A5、83A10)の結合を定量することによって、H9292細胞に対して行った。簡潔には、培養した細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、ViCellを使用して評価した。生細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)中で 1×10^6 細胞/ mL に調節した。この細胞懸濁物のうちの $100\mu\text{l}$ を、丸底96ウェルプレートにウェルあたりさらにアリコートに分け、上記抗BCMA抗体もしくは対応するIgGコントロールの $30\mu\text{l}$ およびヘマグルチニン(HA)(R&D Systems Europe, #7907-AP-010)でタグ化した-APRILの $30\mu\text{l}$ とともに40分間4でインキュベートした。全ての抗BCMA抗体およびアイソタイプコントロールを終濃度 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ で；-APRILを終濃度 $2.5\mu\text{g}/\text{mL}$ で分析した。次いで、細胞を遠心分離し(5分、 $350\times g$)、 $120\mu\text{l}$ /ウェルFACS染色緩衝液(BD Biosciences)で洗浄した。その後、細胞を、Alexa.Fluor 647結合体化抗ヒトFc抗体(Jackson Immuno Research Lab, #109-606-008)およびFITC結合体化抗HA抗体(Sigma Aldrich, #H7411)とともに30分間4でインキュベートした。インキュベーション時間の最後に、細胞を、 $120\mu\text{l}$ /ウェルFACS緩衝液で洗浄し、 $100\mu\text{l}$ BD固定緩衝液/ウェル(#BD Biosciences, 554655)を使用して、4で20分間固定し、 $80\mu\text{l}$ FACS緩衝液で再懸濁し、BD FACS CantoIIを使用して分析した。図8Aは、上記抗BCMA抗体クローンの平均蛍光強度および相対的蛍光シグナル(Alexa.Fluor 647シグナル)を示し、図8Bは、-APRIL(FITCシグナル)および上記抗BCMA抗体クローンの平均蛍光強度および相対的蛍光シグナル(Alexa.Fluor 647シグナル)を示す。-APRILとFITC結合体化抗ヒトFc抗体との存在下での抗BCMA抗体の検出を、-APRILの非存在下での抗BCMA抗体クローンのシグナルに対して正規化した。抗BCMA抗体クローンとAlexa.Fluor 647結合体化抗HA抗体との存在下での-APRILの検出を、アイソタイプコントロールの存在下での-APRILシグナルに対して正規化した。蛍光色素結合体化抗ヒトFc抗体で検出されたとおりの、-APRIL($2.5\mu\text{g}/\text{mL}$)の存在下での抗BCMA抗体($20\mu\text{g}/\text{mL}$)クローン14B11、13D2、13A4、17A5および83A10の結合の低下を表9にまとめる。

20

30

40

【0197】

50

【表 9】

表9: APRILの存在下でのH929細胞への抗BCMA抗体の結合における低下

抗BCMA抗体 クローン	APRILの存在下での抗BCMA抗体の結合 における低下(↓)
14B11	50%
13D2	25%
13A4	25%
17A5	20%
83A10	10%

10

【0198】

(実施例1H3。BCMA抗体は、APRIL依存性NF- κ B活性化をブロックも増大もしない)

a) 上記の工程(実施例1H2)において非競合として選択された抗体(すなわち、それらのBCMA結合曲線が、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mLのAPRILの存在によって影響を受けない、および100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mLのBAFFの存在によっても影響を受けない)を、次いで、APRIL、BAFF、およびBCMA媒介性NF- κ B活性化に対する効果に関して工程(実施例1H3)で試験する。APRILはBCMAに対する高親和性リガンドであるので、APRILシグナル伝達に対する抗BCMA抗体のブロック特性もしくはアゴニスト特性を、最初に試験する。Ryan 2007(Mol Cancer Ther; 6(11): 3009-18)に記載されるように、抗BCMA抗体がAPRIL下流シグナル伝達をブロックするかもしれないかを確認するために、NCI-H929ヒト多発性骨髄腫(MM)細胞を洗浄し、無血清RPMI中で24時間、処理前にインキュベートする。次いで、上記細胞は未処理であるか、または0.1 μ g/mL TNF- α (陽性コントロールとして使用)、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mL 熱処理HT短縮型APRIL、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mL 短縮型APRIL、0.1 pM~200 nM アイソタイプコントロール、あるいは0.1 pM~200 nM 抗BCMA抗体で、20分間処理する。APRILブロックを評価するために、0.1 pM~200 nMの抗BCMA抗体もしくはそれぞれのアイソタイプコントロール抗体で20分間予備処理した細胞を、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mLの短縮型APRILで処理する。次いで、細胞を回収し、洗浄し、プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビターを補充した50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.5)、1% NP₄₀、150 mmol/L NaCl、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L EGTAで溶解する。次いで、タンパク質抽出物を、TransAM(登録商標)化学発光アッセイキット(Active Motif)を使用してNF- κ B活性について分析し、発光シグナル読み取りを、Fusion HTプレートリーダー(Packard Instruments)で行う。

20

30

40

【0199】

NF- κ B活性は、NF- κ Bコンセンサス配列に結合したp65に由来する化学発光シグナルを検出する機能的ELISAを使用してアッセイされるので、APRIL媒介性下流シグナル伝達およびNF- κ B活性化を変化させない(すなわち、APRILのみで処理したNCI-H929 MM細胞由来の核抽出物中でELISAによって検出されるその平均発光シグナルは、APRILおよび抗BCMA抗体で処理したNCI-H929 MM細胞からの核抽出物のものに対して類似であり、有意に低下も増大もさせない)抗

50

BCMA抗体は、以下の次の工程のために選択される。

【0200】

b) 抗BCMA抗体(クローン13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11)の結合がAPRIL誘導性NFκB活性化(BCMAの下流にある公知のシグナル伝達経路)を妨害するかどうかを評価した。簡潔には、H929細胞を、0.25% FCSを含むRPMI 1640中で24時間37℃において細胞インキュベーター中で飢餓状態にした。飢餓時間の最後に、細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、Viecellを使用して評価した。生細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)中で 4×10^6 細胞/mlに調節した。この細胞懸濁物のうちの30μlを、丸底96ウェルプレートにウェルあたりさらにアリコートに分け、抗BCMA抗体(15μg/mlもしくは50μg/ml)またはアイソタイプコントロール抗体(10μg/ml、20μg/mlおよび40μg/ml)とともに20分間、細胞インキュベーター中で予めインキュベートした。次いで、細胞に、マウスヘマグルチニン(HA)(R&D Systems Europe, #7907-AP-010)でタグ化した1μg/ml 組換え - APRILを40分間37℃で補充した。熱不活化 - APRIL(HI APRIL)をアッセイにおいて使用して、 - APRIL誘導性NFκBシグナルの特異性を確認した(熱不活化を、60℃で1時間での - APRILの処理によって行った)。インキュベーション時間の最後に、細胞を回収し、洗浄し、溶解し、Nuclear Extract Kit(Active Motif, #40410)の製造業者のプロトコルに従って処理した。タンパク質抽出物を、TransAm(Cytoskeleton) NfκB p65 Chemi Assayキット(Active Motif, #40097)を使用して、製造業者の指示に従ってNF-κB活性について分析した。発光シグナルを、Spectra Max M5ルミノメーター(Molecular Devices)を使用して読み取った。上記のように処理したH929細胞を使用して得られる相対的発光シグナル強度を測定した。アイソタイプコントロールの存在下での - APRILの結合の際に得られた発光シグナルを、1に設定した;他のシグナルを、これに対して正規化した。

【0201】

(実施例1H4。BCMA抗体は、BAFF依存性NF-κB活性化をブロックも増大もさせない)

次いで、上記の工程(実施例1H3)においてAPRIL依存性NF-κB活性化をブロックしないおよび増大させないとして選択された抗体を、次に、BAFF媒介性NF-κB活性化に対する効果に関して工程(実施例1H3)で試験する。Ryan 2007(Mol Cancer Ther; 6(11): 3009-18)に記載されるように、BCMA抗体が、NF-κB活性化をもたらすBAFF下流シグナル伝達をブロックもしくは増大させるかどうかを確認するために、NCI-H929 MM細胞(CRL-9068^TM)を洗浄し、Ryan 2007(Mol Cancer Ther; 6(11): 3009-18)に記載されるように、無血清RPMI培地中で24時間、処理前にインキュベートする。次いで、細胞は、処理しないか、または0.1μg/mL TNF-α、100ng/mL、好ましくは、1000ng/mL 熱処理HT短縮型BAFF、100ng/mL、好ましくは、1000ng/mL 短縮型BAFF、1~0.1pM~200nM アイソタイプコントロール、もしくは0.1pM~200nM 抗BCMA抗体とともに20分間処理する。BAFFブロックを評価するために、0.1pM~200nMの抗BCMA抗体もしくはそれぞれのアイソタイプコントロール抗体で20分間予備処理した細胞を、1μg/mLの短縮型BAFFで処理する。次いで、細胞を回収し、洗浄し、プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビターを補充した50mmol/L Tris-HCl(pH7.5)、1% NP40、150mmol/L NaCl、1mmol/L EDTA、1mmol/L EGTAで溶解する。次いで、タンパク質抽出物を、TransAM(登録商標)化学発光アッセイキット(Active Motif)を使用してNF-κB活性について分析し、発光シ

グナル読み取りを、Fusion HTプレートリーダー(Packard Instruments)で行う。BAFF媒介性下流シグナル伝達およびNF- κ B活性化を変化させない(すなわち、BAFFのみで処理したNCI-H929 MM細胞由来の核抽出物における、ELISAによって検出されるNF- κ Bコンセンサス配列に結合したp65由来の平均発光シグナルは、BAFFおよび抗BCMA抗体で処理したNCI-H929 MM細胞由来の核抽出物のものに類似であり、有意に低下も増大もしない)抗BCMA抗体を、以下の次の工程のために選択する。

【0202】

(実施例1H5。BCMA抗体は、NF- κ B活性化をそれ自体で誘導しない)

a) 次いで、上記の工程(実施例1H4)においてBAFF依存性NF- κ B活性化をブロックしないおよび増大させないとして選択された抗体を、次に、NF- κ B活性化を媒介するそれらの内因性のアゴニスト効果について工程(実施例1H5)で試験する。BCMA抗体がアゴニスト的であり、それら自体で下流シグナル伝達を誘導するかどうかを確認するために、NCI-H929細胞を洗浄し、無血清RPMI培地中で24時間、処理前にインキュベートする。次いで、上記細胞は、未処理であるか、 $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ TNF- α 、 $0.1 \text{ pM} \sim 200 \text{ nM}$ アイソタイプコントロールもしくは $0.1 \text{ pM} \sim 200 \text{ nM}$ 抗BCMA抗体で20分間処理する。次いで、細胞を回収し、洗浄し、プロテアーゼインヒビターおよびホスファターゼインヒビターを補充した $50 \text{ mmol}/\text{L}$ Tris-HCl (pH 7.5)、 1% NP₄₀、 $150 \text{ mmol}/\text{L}$ NaCl、 $1 \text{ mmol}/\text{L}$ EDTA、 $1 \text{ mmol}/\text{L}$ EGTAで溶解する。次いで、タンパク質抽出物を、NF- κ B活性についてTransAM(登録商標)化学発光アッセイキット(Active Motif)を使用して分析し、発光シグナル読み取りを、Fusion HTプレートリーダー(Packard Instruments)で行う。下流のシグナル伝達およびNF- κ B活性化を誘導しない(すなわち、抗BCMA抗体のみで処理されたNCI-H929 MM細胞に由来する核抽出物中でELISAによって検出されるNF- κ Bコンセンサス配列に結合したp65由来の平均発光シグナルは、アイソタイプコントロール抗体で処理したNCI-H929 MM細胞に由来する核抽出物のものに類似であり、有意に増大させない)抗BCMA抗体を、さらなる生成ならびにインビトロおよびインビボでの特徴付けのために最終的に選択する。それらは、非リガンドブロック、非競合および非シグナル伝達の抗BCMA抗体を表す(表10を参照)。

【0203】

b) BCMA発現H929細胞への抗BCMA抗体(クローン13C2、17A5、83A10、13A4、13D2、14B11)の結合がNF κ B活性化(BCMAの下流にある公知のシグナル伝達経路)を誘導するかどうかを評価した。簡潔には、H929細胞を、 0.25% FCSを含むRPMI 1640中で24時間37℃において細胞インキュベーター中で飢餓状態にした。飢餓時間の最後に、細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、ViCellを使用して評価した。生細胞を、BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)中で 4×10^6 細胞/mLに調節した。この細胞懸濁液のうちの $30 \mu\text{L}$ を、丸底96ウェルプレートにウェルあたりさらにアリコートに分け、 100 nM もしくは 350 nM ($14 \mu\text{g}/\text{mL}$ もしくは $50 \mu\text{g}/\text{mL}$)の抗BCMA抗体 $30 \mu\text{L}$ とともに20分間、37℃でインキュベートした。陰性コントロールとして、細胞は未処理のままにしたか、またはその対応するIgGアイソタイプコントロール抗体 100 nM ($14 \mu\text{g}/\text{mL}$)とともに20分間、37℃でインキュベートした。陽性コントロールとして、細胞を、ヘマグルチニン(HA)(R&D Systems Europe, #7907-AP-010)でタグ化した $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 組換えマウス-APRIIとともに、20分間37℃でインキュベートした。インキュベーション時間の最後に、細胞を回収し、洗浄し、溶解し、Nuclear Extract Kit(Active Motif, #40410)の製造業者のプロトコルに従って処理した。タンパク質抽出物を、TransAm^(c) Nf κ B p65 Chemi Assayキット(Active Motif, #40097)を使用して、製造業者の指示

に従ってNF- κ B活性について分析した。発光シグナルを、Spectra Max M5ルミノメーター(Molecular Devices)を使用して読み取った。上記のように処理したH929細胞から得られた相対的発光シグナル強度を測定した。上記アイソタイプコントロールの存在下でのAPRILの結合の際に得られた発光シグナルを、1に設定した；他のシグナルをこれに対して正規化した。

【0204】

【表10】

表10: BCMA抗体選択のためのスクリーニングパラダイム

評価工程(時系列順に)	選択基準	技法の説明
1) BCMA への結合	結合	プレートに結合したBCMA 細胞への結合(ELISA)
2) 100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mL APRIL によっても BAFF によっても低下しない BCMA への結合	低下なし	プレートに結合したBCMA への結合は、100 ng/mL、好ましくは、1000 ng/mL の APRIL にも BAFF にも影響を受けない(ELISA)
3) NF- κ B 下流シグナル伝達の非活性化 3.1) 抗 BCMA 抗体は、APRIL 依存性 NF- κ B 活性化をブロックもしくは増大させるか? 3.2) 抗 BCMA 抗体は、BAFF 依存性 NF- κ B 活性化をブロックもしくは増大させるか? 3.3) 抗BCMA抗体は、NF- κ B 活性化をそれ自体で誘導するか?	3つの場合全てで変化なし	MM細胞株 NCI-H929 における APRIL/BAFF 依存性活性化(化学発光 ELISA)

【0205】

(実施例1H6。BCMA抗体は、カニクイザルに交叉反応性である)

実施例1で生成したヒトBCMA抗体をまた、カニクイザルに対するそれらの交叉反応性およびカニクイザル形質細胞に結合する能力について試験する。簡潔には、PBMCおよび/もしくは骨髓吸引物を、カニクイザルから集め、細胞を培養し、計数し、細胞生存率を、トリパンブルー排除法を使用して評価する。次いで、生細胞を、0.1% BSA含有PBS中で 2×10^6 細胞/mLに調節する。この細胞懸濁物のうちの90 μ lを、丸底96ウェルプレートにウェルあたりでさらにアリコートに分ける。BCMA抗体もしくは対応するIgGコントロールのうちの10 μ lを、上記細胞含有ウェルに添加して、終濃度0.1 pM ~ 200 nMを得る。BCMA抗体およびコントロールIgGを、同じ容量モル濃度で使用する。30分間4 でインキュベートした後、細胞を遠心分離し(5分間, 350 \times g)、150 μ l /ウェル BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)で洗浄し、再懸濁し、さらに30分間4 で、12 μ l /ウェル蛍光色素結合体化抗His抗体(Lucerna)とともにBCMA抗体の検出のためにインキュベートする。カニクイザル細胞をまた、蛍光色素結合体化CD38、CD19およびCD20抗体で染色する。次いで、細胞を、120 μ l /ウェル FACS染色緩衝液を添加し、350 \times gで5分間遠心分離することによって洗浄する。第2の洗浄工程を、150 μ l /ウェル FACS染色緩衝液で行う。上記サンプルを、200 μ l /ウェル FACS染色緩衝液中で再懸濁し、FACSDiva(登録商標)ソフトウェアを備えたLSRIIFローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して取得および分析する。次いで、CD38⁺ CD19^{1.0} CD20⁻形質細胞へのBCMA抗体の結合を評価し、平均蛍光強度を、CD38⁺ CD19^{1.0} CD20⁻形質

細胞もしくは全CD19⁺ B細胞のいずれかでゲーティングをかけて決定し、ヒストグラムもしくはドットプロットでプロットする。

【0206】

(実施例2 - リガンド (APRIL、BAFF) 結合をブロックせず、BCMA細胞内ドメインを介するシグナル伝達を促進もブロックもせず、BCMAへのその結合が100 ng/ml、好ましくは、1000 ng/mlのAPRILによっても、100 ng/ml、好ましくは、1000 ng/mlのBAFFによっても影響を受けない、治療用抗BCMA抗体の生成)

上記の工程 (実施例1H6) 後に選択した抗体が、組換え抗体ライブラリーからのインビトロ選択に由来する場合、それらは、既に非結合体化ヒトIgG1抗体である。免疫に由来する、上記の工程 (実施例1H6) 後に選択したそれらの抗体は、ラット-ヒトキメラ様式にあり、次いで、好ましくは、それらが治療に適用され得るように、ヒト化される。その場合、標準的な抗体ヒト化方法は、それらのラット可変領域の相補性決定領域をヒト抗体可変領域フレームワークに移すことによって適用される。さらなる変異は、必要であれば、キメラ親抗体と比較して、BCMAへの結合を回復させるために、上記可変領域に導入される。

【0207】

(実施例2A. 治療用抗BCMA抗体の生成)

ADCCを媒介する非結合体化IgG1抗体 (例えば、糖操作された抗体) (以下の実施例3Aを参照のこと) もしくは細胞傷害性低分子部分を送達する結合体化抗体 (例えば、抗体-薬物結合体) (以下の実施例4Aを参照のこと) を生成するために、細胞を、4つのプラスミド (2つは、抗体発現用 (一方は、抗体の重鎖の発現用およびもう一方は、抗体の軽鎖の発現用)、1つは、GnTII発現用、および1つは、マンノシダーゼII発現用であり、それぞれ、4:4:1:1の比) で共トランスフェクトする。細胞を、接着性単層培養物としてTフラスコ中で、10% FCSを補充したDMEM培養培地を使用して増殖させ、それらが50~80%の間でコンフルエントになったときにトランスフェクトする。T75フラスコのトランスフェクションのために、800万個の細胞を、FCS (10% V/V最終で)、250 µg/ml ネオマイシンを補充した14 ml DMEM培養培地中に、トランスフェクションの24時間前に播種し、細胞を、5% CO₂ 雰囲気中で37 °Cのインキュベーター中に一晩おく。トランスフェクトする予定の各T75フラスコに関しては、DNA、CaCl₂ および水の溶液を、軽鎖発現ベクターおよび重鎖発現ベクターの間で等分割した47 µg 総プラスミドベクターDNA、235 µlの1M CaCl₂ 溶液を混合し、最終体積469 µlになるように水を添加することによって調製する。この溶液に、469 µlの50 mM HEPES、280 mM NaCl、1.5 mM Na₂HPO₄ 溶液 (pH 7.05) を添加し、直ぐに10秒間混合し、室温で20秒間静置する。上記懸濁物を、12 mlの、2% FCSを補充したDMEMで希釈し、既存の培地の代わりにT75に添加する。上記細胞を、37 °C、5% CO₂ で約17~20時間インキュベートし、次いで、培地を、12 ml DMEM、10% FCSで置き換える。馴化培養培地を、トランスフェクションの5~7日後に、5分間、1200 rpmで遠心分離し、続いて、第2の遠心分離を10分間4000 rpmで行って回収し、4 °Cで維持する。

【0208】

T細胞二重特異的因子の抗体の生成のために (以下の実施例5を参照のこと)、細胞を、2つのプラスミド (一方は、抗体の重鎖の発現用、およびもう一方は、抗体の軽鎖の発現用) を、それぞれ1:1の比で共トランスフェクトする。細胞を、10% FCSを補充したDMEM培養培地を使用して、Tフラスコ中の接着性単層培養物として増殖させ、それらが50~80%の間でコンフルエントになったときにトランスフェクトする。T75フラスコのトランスフェクションのために、FCS (最終10% V/Vで)、250 µg/ml ネオマイシンを補充した14 ml DMEM培養培地中でのトランスフェクションの24時間前に、800万個の細胞を播種し、37 °Cにおいて5% CO₂ 雰囲気

のインキュベーター中に一晩おく。トランスフェクトされる予定の各T75フラスコに関しては、DNA、CaCl₂および水の溶液を、軽鎖発現ベクターと重鎖発現ベクターとの間で等しく分割した47μg 総プラスミドベクターDNAと、235μlの1M CaCl₂溶液を混合し、最終体積469μlになるように水を添加することによって調製する。この溶液に、pH7.05の50mM HEPES、280mM NaCl、1.5mM Na₂HPO₄溶液を469μl添加し、直ぐに10秒間混合し、室温で20秒間静置する。その懸濁物を、2% FCSを補充した12mlのDMEMで希釈し、既存の培地の代わりにT75に添加する。上記細胞を37℃、5% CO₂で約17~20時間インキュベートし、次いで、上記培地を、12ml DMEM、10% FCSに交換する。馴化培養培地を、トランスフェクションの5~7日間後に5分間、1200rpmでの遠心分離し、続いて、10分間、4000rpmでの2回目の遠心分離を行って回収し、4℃で維持する。

10

【0209】

その分泌された抗体を、プロテインAアフィニティークロマトグラフィー、続いて、カチオン交換クロマトグラフィーおよびスーパーデックス200カラム(Amersham Pharmacia)での最後のサイズ排除クロマトグラフィー工程(上記緩衝液をリン酸緩衝食塩水(phosphate buffer saline)に交換し、純粋なモノマーIgG1画分を集める)によって精製する。抗体濃度を、分光光度計を使用して280nmの吸光度から概算する。上記抗体を、25mM リン酸カリウム、125mM 塩化ナトリウム、100mM グリシン溶液(pH6.7)中に処方した。

20

【0210】

(実施例3。ADCCを媒介する非結合体化IgG1抗体)

(実施例3A。Fcを操作したIgG1の生成)

実施例2Aで生成したFcを操作したIgG1抗体は、さらなる工程を要せず、実施例3Bの工程、におけるインビトロ試験をいつでも行う状態になっている。

【0211】

(実施例3B。非結合体化IgG1抗体のインビトロ試験：ADCC)

MM腫瘍細胞(標的細胞)に対する実施例2Aで生成した抗BCMA非結合体化IgG1(上記を参照のこと)のADCC能力を、細胞アッセイで決定する。ヒトPBMCを、エフェクター細胞として使用し、クエン酸ナトリウムを含む細胞調製チューブ(Vacutainer CPT tubes, BD)で製造業者の指示に従って密度勾配遠心分離法を使用して調製する。簡潔には、静脈血をVacutainer CPT tube中に直接集める。その勾配を、400×gで30分間、室温(RT)で、壊さないように遠心分離する。PBMCを含む界面相を集め、PBSで洗浄し(2つの勾配から50ml/細胞)、300×gで10分間、RTでの遠心分離によって回収する。そのペレットをPBSで再懸濁した後、上記PBMCを計数し、200×gで10分間、RTで遠心分離することによって2回洗浄する。次いで、上記細胞を、その後の手順のために適切な培地中に再懸濁する。

30

【0212】

ADCCアッセイに使用されるエフェクター 対 標的比は、PBMCに関して25:1である。上記エフェクター細胞を、丸底96ウェルプレートの1ウェルあたり50μlを添加するために、適切な濃度でAIM-V培地中に調製する。標的細胞は、10% ウシ胎仔血清を補充したRPMI-1640中で増殖させたヒトBCMA発現細胞(例えば、NCI-H929)である。標的細胞をPBS中で洗浄し、計数し、1マイクロウェルあたり30,000個の細胞/100μlを添加するために、1mlあたり30万個で完全RPMI-1640中に再懸濁する。完全RPMI-1640中に抗体を希釈し、50μlで予めプレートにまいた標的細胞に添加し、上記標的細胞に10分間室温で結合させる。次いで、上記エフェクター細胞を添加し、プレートを、4時間、37℃において5% CO₂を含む加湿雰囲気中でインキュベートする。標的細胞の死滅化を、Cytotoxicity Detectionキット(Roche Diagnostics)を使

40

50

用して、損傷した細胞からの乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) 放出を測定することによって評価する。4時間のインキュベーション後、上記プレートを、800 x gで遠心分離にかける。各ウェルからの100 µl 上清を、新たな透明平底96ウェルプレートに移す。上記キットの100 µl 発色基質緩衝液 (color substrate buffer) を、1ウェルあたりに添加する。発色反応のVmax値を、SOF Tmax PROソフトウェア (Molecular Devices) を使用して、490 nmで少なくとも10分間、ELISAリーダーで決定する。自発的LDH放出を、標的細胞およびエフェクター細胞のみを含む (しかし抗体は含まない) ウェルから測定する。最大放出を、標的細胞および1% Triton X-100のみを含むウェルから決定する。特異的抗体媒介性死滅化のパーセンテージを、以下のように計算する： $((x - SR) / (MR - SR)) * 100$ (ここでxは、特定の抗体濃度でのVmaxの平均であり、SRは、自発的放出のVmaxの平均であり、MRは、最大放出のVmaxの平均である)。

10

【0213】

(実施例4。細胞傷害性低分子部分を送達する結合体化抗体)

(実施例4A。抗体-薬物結合体の生成)

実施例2Aの工程で生成したADCCを媒介する非結合体化IgG1抗体を、さらに合成する。マレイミドカプロイル-バリン-シトルリン-p-アミノベンゾイル-モノメチルアウリスタチンF (vcMMAF) を合成し、以前にRyan, 2007 (Mol Cancer Ther; 6 (11): 3009-18) およびDoronina 2006 (Bioconjug Chem 17: 144-24) に記載されたように、DTT還元後に上記工程(e)の後に選択されるIgG1抗体のシステイン残基に結合体化する。

20

【0214】

(実施例4B。抗体薬物結合体のインビトロ試験：細胞傷害性アッセイ)

BCMA発現NCI-H929多発性骨髄腫標的細胞を、抗体もしくは抗体-薬物結合体の存在下もしくは非存在下で、丸底96ウェルプレート中、5,000個/ウェルでまき、37、5% CO₂でインキュベートする。細胞生存率を、抗体もしくは抗体-薬物結合体に曝露して96時間後に、発光細胞生存率アッセイ (Cell Titer - Glo, Promega) を使用して評価する。発光シグナルの読み取りを、Fusion HTプレートリーダー (Packard Instruments) を使用して行う。次いで、抗体-薬物結合体の濃度を、用量応答曲線として平均発光シグナルに対してプロットする。そのIC₅₀値を、未処理のコントロールウェルの細胞生存率の50%を生じる抗体-薬物結合体濃度として決定する (Prism, GraphPad)。

30

【0215】

(実施例5-抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の生成)

(実施例5A。抗CD3抗体の生成)

VH領域およびVL領域の以下のタンパク質配列を、WO 2007/042261に記載されるようにヒトおよびカニクイザル交叉反応性CD3 抗体を生成するために使用する。

【0216】

H2C__VH (配列番号7) :

E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S G F T F N K Y A M N W V R Q A
P G K G L E W V A R I R S K Y N N Y A T Y Y A D S V K D R F T I S R D D S K N T
A Y L Q M N N L K T E D T A V Y Y C V R H G N F G N S Y I S Y W A Y W G Q G T L
V T V S S

【0217】

H2C__VL (配列番号8)

Q T V V T Q E P S L T V S P G G T V T L T C G S S T G A V T S G Y Y P N W V Q Q
K P G Q A P R G L I G G T K F L A P G T P A R F S G S L L G G K A A L T L S G V
Q P E D E A E Y Y C A L W Y S N R W V F G G G T K L T V L

40

50

【0218】

簡潔には、FcなしのT細胞二重特異的因子（以下の実施例5Bを参照のこと）に関しては、上記の配列をコードするオリゴヌクレオチドを、PCRによって一緒に結合して、単鎖Fv（ScFv）をコードする遺伝子を合成する。ここでVHおよびVL配列は、WO2007/042261に記載されるように、セリンおよびグリシン残基を含む可撓性リンカーによって繋がれる。フラグメントを、抗CD3-VL抗CD3×VH配向で繋ぐ。これは、抗CD3-ScFvといわれる。

【0219】

簡潔には、Fcを有するT細胞二重特異的（下記の実施例5Cを参照のこと）のために、上記の配列をコードするオリゴヌクレオチドを、PCRによって一緒に結合して、抗CD3抗体のVH配列およびVL配列をそれぞれコードするcDNAを合成する。

【0220】

（実施例5B。Fcなしの抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の生成）

（実施例5B1。抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的因子：2つのscFv融合タンパク質の生成）

（実施例5B1a。抗BCMA-ScFvの生成）

単鎖Fv（ScFv）をコードするcDNAフラグメントを、リガンド（APRIL、BAFF）結合をブロックせず、BCMA細胞内ドメインを介するシグナル伝達を促進もブロックもせず、BCMAへのその結合が、100ng/ml 好ましくは、1000ng/mlのAPRILによって影響を受けず、もしくは100ng/ml 好ましくは、1000ng/mlのBAFFによって影響を受けない抗BCMA-IgG1抗体の各々について、すなわち、上記実施例1の工程（実施例1H6）の後に選択されたヒトIgG1抗体について、および上記の工程（実施例2）の後に生成したヒト化IgG1抗体について、生成する。これを、各抗体のそれぞれのVH領域およびVL領域をコードするcDNAセグメントのPCR増幅によって行う。各場合に、上記VH領域およびVL領域を、WO2004106383に開示されるように、そこに記載されるものに類似のプライマーを使用して、18アミノ酸リンカーによって繋ぐ。上記フラグメントを、VH抗BCMA-VL抗BCMA配向においてクローニングする。

【0221】

（実施例5B1b。VH抗BCMA-VL抗BCMA配向構築物のクローニング）

抗CD3×抗BCMA二重特異的抗体をコードするcDNAを、上記の工程（実施例5B1a）で記載されるそれぞれのScFvの配列と、上記の工程（実施例3A）で記載される抗CD3-ScFvの配列とをインフレームで繋ぐことによって、上記の工程（実施例5B1a）における抗BCMA抗体の各々について生成する。VH抗CD3-VL抗CD3×VH抗BCMA-VL抗BCMA配向でクローニングを行う。哺乳動物リーダーペプチドをコードする配列を、上記抗CD3×抗BCMA二重特異的抗体をコードするcDNAに各々にインフレームで付加し、その後、各最終構築物を、哺乳動物発現ベクターへとサブクローニングする。上記の実施例1において記載されるようにIgG1抗体に使用した同じベクターおよびトランスフェクション法を、使用する。あるいは、リーダー配列を含む上記抗CD3×抗BCMA二重特異的抗体をコードする各最終構築物を、哺乳動物発現ベクターpEFDFRに（WO20041106383に記載されるように）サブクローニングし、上記二重特異的抗体を、工程（実施例5B1c）で以下に記載されるように生成する。

【0222】

（実施例5B1c。二重特異的単鎖結合因子の発現および特徴付け）

DNA配列決定によって所望の配列を確認した後に、5B1bで得た各構築物を、例えば、デヒドロ葉酸レダクターゼ陰性CHO細胞にトランスフェクトし、WO20041106383に記載されるように特徴付けするために発現する。例えば、CD3に関してはJurkat細胞（ATCC）およびBCMAに関してはNCI-H929（ATCC）への結合のために、フローサイトメトリー実験を行う。上記細胞を、BCMA/CD3二

10

20

30

40

50

重特異的構築物発現細胞の上清とともに約 1 時間、4 でインキュベートし、FACS 緩衝液（ウシ胎仔血清および 0.05 アジ化ナトリウムを含むリン酸緩衝食塩水）中で 2 回洗浄し、結合した構築物を、発現ベクター pEFDFR に組みこまれた 6 × HIS タグによって、HIS 抗体例えば（Dianova）を使用して検出する。結合した抗 HIS 抗体を検出するために、上記細胞を、上記のように洗浄し、例えば、ヤギ抗マウス FITC 結合体化抗体（BD 550003）もしくは抗マウス PE 結合体化抗体（IgG）（Sigma, P8547）とともにインキュベートし、例えば、FACS Canto（BD Biosciences）で分析する。次いで、その表面に全長 BCMA を発現する DNA 構築物でトランスフェクトした CHO 細胞株を使用した以外は、WO20041106383 に記載されるように固定化金属アフィニティクロマトグラフィー（IMAC）およびゲル濾過を含む 2 工程精製プロセスによって上記構築物を精製した後に、フローサイトメトリーベースのアッセイを使用して該構築物の機能的活性を分析する。

【0223】

（実施例 5C. Fc を有する抗 BCMA / 抗 CD3 T 細胞二重特異的 1 + 1 様式の生成）

抗 BCMA / 抗 CD3 T 細胞二重特異的因子を、工程（実施例 1H6）の後に選択されるヒトもしくはヒト化抗 BCMA 抗体のために生成する。実施例 2 に記載されるように、その対応する抗 BCMA IgG1 抗体の完全重鎖および軽鎖をコードする cDNA、ならびに実施例 3A に記載される抗 CD3 VH および VL の cDNA を、出発材料として使用する。各二重特異的抗体のために、4 種のタンパク質鎖が必要とされ、その対応する抗 BCMA 抗体の重鎖および軽鎖、ならびに上記の抗 CD3 抗体重鎖および軽鎖をそれぞれ含む。誤って対合した重鎖を有する、例えば、抗 CD3 抗体の 2 つの重鎖を有する副生成物の形成を最小限にするために、変異したヘテロダイマー Fc 領域が使用され、これは、WO2009080251 および WO2009080252 に記載されるように、「ノブが凹みに入り込む変異」および操作されたジスルフィド結合を有する。誤って対合した軽鎖を有する、例えば、抗 BCMA 抗体の 2 つの軽鎖を有する副生成物の形成を最小限にするために、CH1 × 定常 クロスオーバーが、WO2009080251 および WO2009080252 に記載される方法論を使用して、抗 CD3 抗体の重鎖および軽鎖に適用される。

【0224】

簡潔には、各二重特異的抗体は、以下をそれぞれコードする 4 種の哺乳動物発現ベクターの同時共トランスフェクションによって生成される：a) その対応する BCMA 抗体の完全軽鎖 cDNA、b) ヘテロダイマー抗体を生成するために Fc 領域中に「凹変異」（以下の詳細を参照のこと）を有するその対応する BCMA 抗体の完全重鎖 cDNA、c) 標準の分子生物学的方法（例えば、スプライス - オーバーラップ - 伸長 PCR）によって生成され、（N 末端から C 末端の順に）分泌リーダーペプチド、上記の抗 CD3 抗体の VL および IgG1 抗体のヒト CH1 ドメインから作られる融合タンパク質をコードする融合 cDNA、ならびに d) ヘテロダイマー抗体を生成するために、標準の分子生物学的方法（例えば、スプライス - オーバーラップ - 伸長 PCR）によって生成され、（N 末端から C 末端の順に）分泌リーダーペプチド、上記の抗 CD3 抗体の VH、ヒト軽鎖 cDNA の定常 ドメイン、ヒト IgG1 抗体のヒンジ領域、および Fc 領域中に「knob 変異」（以下の詳細を参照のこと）を含むヒト IgG1 抗体の Fc 領域（CH2 ドメインおよび CH3 ドメイン）から作られる融合タンパク質をコードする融合 cDNA。ヒトもしくはヒト化 IgG1 抗体の生成のために上記の方法を使用する哺乳動物細胞の共トランスフェクション、ならびに抗体生成および精製（実施例 2 を参照のこと）。ヒト IgG1 Fc 領域中の「ノブが凹みに入り込む変異」は、以下からなる：T366W（「ノブ（knob）変異」として公知）；ならびに T366S、L368A、および Y407V（まとめて、「凹変異」として公知）。さらに、ジスルフィドを含ませて、安定性および収量、ならびにイオン架橋を形成しヘテロダイマー化収量を増加させる追加の残基を増加させることができる（EP 1870459A1）。

【0225】

(実施例6 - BCM AおよびCD3への抗BCM A / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体の同時結合(表面プラズモン共鳴))

実施例5で生成された二重特異的抗BCM A / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体のBCM AおよびCD3への結合特性を、表面プラズモン共鳴(SPR)技術によって、Biacore(登録商標) T100機器(Biacore AB)と、ランニング緩衝液(0.01M HEPES pH7.4, 0.15M NaCl, 3mM EDTA, 0.005% Surfactant P20, Biacore)としてHBS-E Pを使用して分析する。このシステムは、分子相互作用の研究のために十分に確立されている。それは、リガンド/分析物結合の連続リアルタイムモニタリングを可能とし、従って、種々のアッセイ状況において会合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)、および平衡定数(K_D)の決定を可能にする。SPR技術は、金被覆バイオセンサチップの表面の近傍の屈折率の測定に基づく。屈折率の変化は、固定化されたりリガンドと、溶液中の注入された分析物との相互作用によって引き起こされる表面上での質量変化を示す。分子が上記表面の固定化リガンドに結合すれば、質量は増加し、解離すれば、質量は減少する。

【0226】

捕捉抗Hisタグ抗体を、CM5バイオセンサチップの表面に、アミンカップリング化学を使用して固定化する。フローセルを、0.1M N-ヒドロキシスクシンイミドおよび0.1M 3-(N,N-ジメチルアミノ)プロピル-N-エチルカルボジイミドの1:1混合物で流速5 μ l/分において活性化し、抗ヒトIgG抗体を、酢酸ナトリウム、pH5.0中、10 μ g/mlで注入する。このことから、約12000共鳴単位(RU)の表面密度を生じた。参照コントロールフローセルを、同じように、ただし捕捉抗体の代わりに、ピヒクル緩衝液のみで処理する。表面を、1M エタノールアミン/HCl pH8.5の注入でブロックする。上記抗BCM A / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体を、HBS-P中に希釈し、流速5 μ l/分で注入する。接触時間(会合相)は、上記抗体に関して、BCM A - ECD結合については1~100nMの間、およびCD3相互作用については1~200nMの間の濃度で、1分間である。BCM A - ECDを3.125nM、6.25nM、12.5nM、25nM、50nM、および100nMの漸増濃度で、CD3を0.21nM、0.62nM、1.85nM、5.6nM、16.7nM、50nM、100nMおよび200nMの濃度で、注入する。接触時間(会合相)は3分であり、解離時間(ランニング緩衝液での洗浄)は、両方の分子に関して流速30 μ l/分で5分である。全ての相互作用を、25(標準温度)で行う。3M 塩化マグネシウムの再生溶液を、60秒間、5 μ l/分の流速で注入して、各結合サイクル後にいかなる非共有結合タンパク質をも除去する。シグナルを、1シグナル/秒の速度で検出する。サンプルを、漸増濃度で注入する。接触時間に対してプロットしたシグナルの速度(すなわち、共鳴単位)を示すSPRグラフを決定する。

【0227】

(実施例7 - MM細胞上のBCM AもしくはT細胞上のCD3への抗BCM A / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合(フローサイトメトリー))

実施例5で生成した抗BCM A / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体をまた、フローサイトメトリーによって、NCI-H929多発性骨髄腫細胞上で発現されるヒトBCM Aもしくはヒト白血病T細胞Jurkat(ATCC)上で発現されるヒトCD3へのそれらの結合特性に関して分析する。簡潔には、培養した細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、トリパンブルー排除法を使用して評価する。次いで、生細胞を、0.1% BSAを含むPBS中で 2×10^6 細胞/mlに調節する。この細胞懸濁物のうちの90 μ lを、丸底96ウェルプレートに1ウェルあたりでさらにアリコートに分ける。上記T細胞二重特異的抗体もしくは対応するIgGコントロールのうちの10 μ lを、上記細胞含有ウェルに添加して、0.1pM~200nMの終濃度を得る。抗BCM A / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体およびコントロールIgGを、同じ容量モル濃度で使用する。30分間、4でのインキュベーションの後に、細胞を遠心分離し(5分間、350 \times g)、150

μl /ウェル BSA含有FACS染色緩衝液(BD Biosciences)で洗浄し、再懸濁し、さらに30分間4 で、 $12\mu\text{l}$ /ウェル 蛍光色素結合体化抗His抗体(Lucerna)とともに、T細胞二重特異的抗体の検出のためにインキュベートする。次いで、細胞を、 $120\mu\text{l}$ /ウェル FACS染色緩衝液の添加および $350\times g$ で5分間の遠心分離によって洗浄する。第2の洗浄工程を、 $150\mu\text{l}$ /ウェル FACS染色緩衝液で行う。上記サンプルを、 $200\mu\text{l}$ /ウェル FACS染色緩衝液中で再懸濁し、FACSDiva(登録商標)ソフトウェアを備えたLSRIIFローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して取得および分析する。MM細胞およびT細胞への上記抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合を評価し、その平均蛍光強度を、BCMA発現NCI-H929 MM細胞もしくはCD3発現Jurkat T細胞のいずれかに対してゲーティングをかけて決定し、ヒストグラムもしくはドットプロットでプロットする。

10

【0228】

(実施例8 - 抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合の際のT細胞の活性化(フローサイトメトリー))

実施例5で生成した抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体をまた、フローサイトメトリーによって、ヒトBCMA発現MM細胞の存在下もしくは非存在下、 $\text{CD}4^+$ および $\text{CD}8^+$ T細胞上の初期活性化マーカーCD69または後期活性化マーカーCD25の表面発現を評価することによって、T細胞活性化を誘導するそれらの能力を分析する。簡潔には、BCMA発現NCI-H929 MM細胞を、細胞解離緩衝液で回収し、計数し、トリパンブルーを使用して細胞生存率を確認する。生存MM細胞を、完全RPMI-1640培地中で 0.2×10^6 細胞/mLに調節し、1ウェルあたりこの細胞懸濁物のうちの $100\mu\text{l}$ を、丸底96ウェルプレートの中にピペットで移す。T細胞二重特異的構築物のうちの $50\mu\text{l}$ を、MM細胞含有ウェルに添加して、終濃度1nMを得る。上記96ウェルプレートを確保しておき、さらなる操作のときまで、37、5% CO_2 で維持する。

20

【0229】

PBMCを、クエン酸ナトリウムを含む細胞調製チューブ(Cell Preparation Tubes with Sodium citrate)(Vacutainer CPT tubes, BD Biosciences)を使用して、密度勾配遠心分離法を使用して新鮮な血液から単離する。次いで、全ヒトT細胞を、Pan T Cell Isolation Kit II(Miltenyi Biotec)を使用して、製造業者の指示に従って単離する。次いで、ヒト全T細胞(エフェクター)を、完全RPMI-1640培地中で 2×10^6 細胞/mLに調節する。この細胞懸濁物のうちの $50\mu\text{l}$ を、既にBCMA発現MM細胞を含むアッセイプレート中の1ウェルあたりに添加して、最終E:T比 5:1を得る。T細胞二重特異的構築物がBCMA発現MM腫瘍標的細胞の存在下でのみT細胞を活性化し得るかどうかを試験するために、エフェクター細胞あり、しかしMM腫瘍標的細胞はなしで、それぞれの二重特異的分子の $0.1\text{pM}\sim 200\text{nM}$ の範囲の終濃度(複数可)を含むウェルもまた、含める。37、5% CO_2 で5日間のインキュベーション後、細胞を、遠心分離(5分間、 $350\times g$)によってペレット化し、 $150\mu\text{l}$ /ウェルのFACS染色緩衝液(BD Biosciences)で2回洗浄する。ヒトCD4、CD8、CD69もしくはCD25に対する選択した蛍光色素結合体化抗体(BD Biosciences)での上記エフェクター細胞の表面染色を、FACS染色緩衝液(BD Biosciences)中で製造業者のプロトコルに従って遮光して4 で30分間行う。細胞を、 $150\mu\text{l}$ /ウェル FACS染色緩衝液で2回洗浄し、 $200\mu\text{l}$ /ウェル FACS染色緩衝液中に再懸濁し、FACSDiva(登録商標)ソフトウェアを補完したLSRIIFローサイトメーター(BD Biosciences)を使用して取得および分析する。CD69およびCD25活性化マーカーの発現を、ヒストグラムもしくはドットプロットで表されるように、 $\text{CD}4^+$ および $\text{CD}8^+$ T細胞集団に対してゲーティングをかけた平均蛍光強度を測定する

30

40

50

ことによって決定する。

【0230】

(実施例9 - 抗BCMA / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合の際のT細胞の増殖 (CFSE希釈))

実施例5で生成した抗BCMA / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体をまた、フローサイトメトリーによって、ヒトBCMA発現MM細胞の存在下もしくは非存在下で、CD8⁺もしくはCD4⁺ T細胞の増殖を誘導するそれらの能力について分析する。簡潔には、BCMA発現NCI-H929 MM細胞を、細胞解離緩衝液で回収し、計数し、トリパンプルーを使用して生存率について調べる。生存MM細胞を、完全RPMI培地中で0.2 × 10⁶ 細胞/mlに調節し、この細胞懸濁物のうちの100 µlを、丸底96ウェルプレートに1ウェルあたりピペットで移す。T細胞二重特異的構築物のうちの50 µlを、MM細胞含有ウェルに添加して、0.1 pM ~ 200 nMの範囲の終濃度 (複数可) を得る。上記ウェルプレートを確保しておき、37 °C、5 % CO₂ で維持する。

【0231】

PBMCを、クエン酸ナトリウムを含む細胞調製チューブ (Cell Preparation Tubes with Sodium citrate) (Vacutainer CPT tubes, BD Biosciences) を使用し、密度勾配遠心分離法を使用して新鮮な血液から単離する。次いで、全ヒトT細胞を、Pan T Cell Isolation Kit II (Miltenyi Biotec) を使用して、製造業者の指示に従って単離する。次いで、上記全T細胞を、血清なしの予め加温したRPMI (37 °C) 中で1 mlあたり100万個の細胞に調節し、遮光して、1 µM CFSEで室温において6分間染色する。次いで、染色体積を、10 % FCSおよび1 % GlutaMaxを補充したRPMI-1640培地を添加することによって倍量にして、CFSE染色を停止する。室温でさらに20分間のインキュベーションの後、上記細胞を、予め加温した血清含有培地で3回洗浄して、残留CFSEを除去する。次いで、CFSE染色した全T細胞 (エフェクター) を、完全RPMI-1640培地中で2 × 10⁶ 細胞/mlへと調節する。この細胞懸濁物のうちの50 µlを、BCMA発現NCI-H929 MM細胞を既に含むアッセイプレート中の1ウェルあたりに添加して、最終E:T比 5:1を得る。T細胞二重特異的構築物がBCMA発現MM腫瘍標的細胞の存在下でのみT細胞を活性化し得るかどうかを試験するために、エフェクター細胞ありだが、MM腫瘍標的細胞なしの0.1 pM ~ 200 nMの範囲の濃度の上記T細胞二重特異的抗体を含むウェルもまた、含める。37 °C、5 % CO₂ で5日間のインキュベーションの後、遠心分離 (5分間、350 × g) によって細胞をペレット化し、150 µl / ウェルのFACS染色緩衝液 (BD Biosciences) で2回洗浄する。ヒトCD4、CD8もしくはCD25に対する選択した蛍光色素結合体化抗体 (BD) での上記エフェクター細胞の表面染色を、FACS染色緩衝液中で製造業者のプロトコルに従って、遮光して4 °Cで30分間行う。細胞を、150 µl / ウェル FACS染色緩衝液で2回洗浄し、200 µl / ウェル FACS染色緩衝液中で再懸濁し、FACS Diva (登録商標) ソフトウェア (BD) を補完したLSR IIフローサイトメーターを使用して取得および分析する。非増殖細胞のパーセンテージを、ウェルがBCMA発現MM細胞およびCFSE染色T細胞を含むが、T細胞二重特異的抗体なしの群において一番右の非希釈CFSEピークでゲーティングをかけることによって決定し、他の実験群 (ウェル) のものと比較する。増殖細胞のパーセンテージを、最も右のピーク (観察可能であれば) を除く全てのその希釈CFSEピークをゲーティング、することによって測定する。CD4⁺ およびCD8⁺ T細胞の増殖レベルを、その集団で最初にゲーティングをかけ、次にCFSE希釈ピークをさらに調べることによって決定する。

【0232】

(実施例10 - 抗BCMA / 抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合の際の活性化したT細胞からのサイトカイン生成)

(実施例10A. インターフェロン - 生成)

実施例 5 で生成した抗 B C M A / 抗 C D 3 T 細胞二重特異的抗体もまた、ヒト B C M A 発現 M M 細胞の存在下もしくは非存在下で T 細胞によってインターフェロン - (I F N -) 生成を誘導するそれらの能力について分析する。簡潔には、B C M A 発現 N C I - H 9 2 9 M M 細胞を、細胞解離緩衝液で回収し、計数し、トリパンブルーを使用して生存率について調べる。1 ウェルあたり約 20,000 個の生細胞を丸底 96 ウェルプレートにまき、それぞれの抗体希釈物を添加して、0.1 p M ~ 200 n M の範囲の終濃度 (複数可) を得る。同じ容量モル濃度に調節した抗ヒト B C M A I g G および抗 C D 3 I g G を、コントロールとして使用する。ヒト全 T エフェクター細胞を添加して、最終 E : T 比 5 : 1 を得る。37、5 % C O₂ で 20 時間のインキュベーションの後、上清中のヒト I F N - レベルを、E L I S A によって、製造業者の指示 (ヒト I F N - E L I S A K i t I I , B D B i o s c i e n c e s) に従って測定する。抗 B C M A / 抗 C D 3 T 細胞二重特異的抗体および B C M A 発現 M M 細胞の存在下での T 細胞によって生成された I F N - のレベルを測定し、ヒストグラムにプロットし、抗 B C M A / 抗 C D 3 T 細胞二重特異的抗体の存在下であるが、B C M A 発現 M M 細胞なしでの T 細胞によって生成されたものと比較する。

【 0 2 3 3 】

(実施例 10 B . サイトカイン放出アッセイ (C B A 分析))

実施例 5 で生成した抗 B C M A / 抗 C D 3 T 細胞二重特異的抗体をまた、ヒト B C M A 発現 M M 細胞の存在下もしくは非存在下で T 細胞媒介性サイトカイン生成を誘導するそれらの能力について分析する。P B M C を、密度勾配遠心分離法を使用し、クエン酸ナトリウムを含む細胞調製チューブ (V a c u t a i n e r C P T t u b e s , B D B i o s c i e n c e s) を使用して新鮮な血液から単離し、最終細胞濃度 30 万個の細胞 / ウェルを、丸底 96 ウェルプレートにまく。次いで、B C M A 発現 N C I - H 9 2 9 M M 細胞を添加して、最終 E : T 比 10 : 1 を得、同様に、T 細胞二重特異的構築物および I g G コントロールを添加して、37、5 % C O₂ での 24 時間にわたって、0.1 p M ~ 200 n M の範囲の終濃度 (複数可) を得る。翌日、上記細胞を、5 分間、350 x g で遠心分離し、その上清を、新たな深型ウェルの 96 ウェルプレートへとさらなる分析のために移す。C B A 分析を、L S R I I フローサイトメーターのための製造業者の指示に従って、ヒト I L - 2、ヒト I L - 4、ヒト I L - 6、ヒト I L - 10、ヒト T N F - 、およびヒト I F N - を含む H u m a n T h 1 / T h 2 C y t o k i n e K i t I I (B D B i o s c i e n c e s) を使用して行う。抗 B C M A / 抗 C D 3 T 細胞二重特異的抗体および B C M A 発現 M M 細胞の存在下で T 細胞によって生成されるサイトカインのレベルを測定し、ヒストグラムにプロットし、抗 B C M A / 抗 C D 3 T 細胞二重特異的抗体の存在下であるが、B C M A 発現 M M 細胞なしで T 細胞によって生成されるものと比較する。

【 0 2 3 4 】

(実施例 11 - T 細胞上の C D 3 および M M 細胞上の B C M A への抗 B C M A / 抗 C D 3 T 細胞二重特異的抗体の架橋の際の M M 細胞の T 細胞による再指向された細胞傷害性 (L D H 放出アッセイ))

実施例 5 で生成した抗 B C M A / 抗 C D 3 T 細胞二重特異的抗体をまた、細胞上の B C M A への抗原結合部分の結合による上記構築物の架橋の際に、B C M A 発現 M M 細胞における T 細胞媒介性アポトーシスを誘導するそれらの能力について分析する。簡潔には、ヒト B C M A 発現 N C I - H 9 2 9 多発性骨髄腫標的細胞を細胞解離緩衝液で回収し、10 % ウシ胎仔血清 (I n v i t r o g e n) を補充した R P M I 中で洗浄および再懸濁する。約 30,000 個の細胞 / ウェルを、丸底 96 ウェルプレートにまき、上記構築物の各々の希釈物を、所望の終濃度 ; 0.1 p M ~ 200 n M の範囲の終濃度のために添加する (三連で) 。適切な比較のために、全 T 細胞二重特異的構築物およびコントロールを、同じ容量モル濃度に調節する。ヒト全 T 細胞 (エフェクター) をウェルに添加して、最終 E : T 比 5 : 1 を得る。ヒト P B M C がエフェクター細胞として使用される場合、最終 E : T 比 10 : 1 が使用される。P H A - L (S i g m a) は、1 μ g / m l の濃

度でヒトT細胞活性化の陽性コントロールとして使用される。陰性コントロール群は、エフェクターもしくは標的細胞のみによって表される。正規化のために、NCI-H929 MM標的細胞の最大溶解(=100%)を、標的細胞と終濃度1% Triton X-100とをインキュベートし細胞死を誘導することによって決定する。最小溶解(=0%)は、標的細胞と、エフェクター細胞のみとを、すなわち、いかなるT細胞二重特異的抗体もなしで共インキュベートすることによって表す。37、5% CO₂での20時間のインキュベーションの後、次いで、アポトーシス/壊死MM標的細胞から上清へのLDH放出を、LDH検出キット(Roche Applied Science)で、製造業者の指示に従って測定する。LDH放出のパーセンテージを、濃度応答曲線において、抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の濃度に対してプロットする。そのIC₅₀値を、Prismソフトウェア(GraphPad)を使用して測定し、LDH放出の50%を生じるT細胞二重特異的抗体濃度として決定する。

10

【0235】

(実施例12 - BCMA発現MM細胞の死滅化能力に対する非リガンドブロック/非競合抗BCMA抗体 対 リガンドブロック/競合抗BCMA抗体を含むT細胞二重特異的因子の比較

ある特定の組織学的悪性疾患(例えば、多発性骨髄腫)において、循環するBCMA-リガンドAPRILおよびBAFFのレベルは、上昇し得る(Moreaux et al. 2004; Blood 103(8): 3148-3157)。従って、本発明者らは、血清中の高レベルのリガンドが腫瘍細胞上のBCMAへの抗BCMA抗体の結合を妨害し得ることを認識している。健康なドナーとの比較において、MM患者における循環するAPRIL(BCMAに対する高親和性リガンド)のレベルは、約10 ng/mLに対して約100 ng/mLである。BAFF(BCMAに対する低親和性リガンド)に関しては、そのレベルは、健康なドナーの約3 ng/mLと比較して、1~1000 ng/mLで変動し得る。上記腫瘍細胞の近くでは、APRIL/BAFF濃度は、血清中で測定されるよりさらにかなり高い可能性がある。ある特定の自己免疫疾患(例えば、全身性エリテマトーデス)では、循環するAPRILのレベルも同様に高く、約85 ng/mLである(Koyama et al. 2005; Ann Rheum Dis 64: 1065-1067)。

20

【0236】

非リガンドブロック/非競合抗BCMA抗体を含む、実施例5で生成した抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体をまた、高濃度(すなわち、100 ng/mL~1000 ng/mL)のAPRILもしくはBAFFの存在下での細胞上のBCMAへの抗原結合部分の結合による上記構築物の架橋の際に、BCMA発現MM細胞におけるT細胞媒介性アポトーシスを誘導するそれらの能力について、同じ様式のリガンドブロック/競合抗BCMA抗体を含む抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体と比較して分析する。

30

【0237】

図1に示されるように、多発性骨髄腫患者の血中および骨髄中に見出されるレベルを代表する漸増濃度(すなわち、10 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL)の可溶性APRILもしくはBAFFは、プレートに結合したBCMAへの非リガンドブロック/非競合抗BCMA抗体の結合を変化させない(実線)。対照的に、多発性骨髄腫患者の血中および骨髄中に見出されるレベルを代表する高濃度(すなわち、100 ng/mL~1000 ng/mL)の可溶性APRILもしくはBAFFは、結合したBCMAへのリガンドブロック/競合抗BCMA抗体の結合を低下させる(破線)。

40

【0238】

図2に示されるように、多発性骨髄腫患者の血中および骨髄中に見出されるレベルを代表する漸増濃度(すなわち、10 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL)の可溶性APRILもしくはBAFFは、BCMA発現MM細胞に対して特異的な非リガンドブロック/非競合抗BCMA抗体を含むT細胞二重特異的抗体の死滅化効力を変化させない(実線)。対照的に、多発性骨髄腫患者の血中および骨髄中に見出されるレベルを

50

代表する高濃度（すなわち、 $100\text{ ng/mL} \sim 1000\text{ ng/mL}$ ）の可溶性APRILもしくはBAFFは、BCMA発現MM細胞に対して特異的なリガンドブロック/競合抗BCMA抗体を含むT細胞二重特異的抗体の死滅化効力を低下させる（破線）。

【0239】

（実施例12A。 10 ng/mL 、 100 ng/mL 、 1000 ng/mL のAPRILもしくはBAFFの存在下での非リガンド結合/ブロック、非競合抗BCMA抗体での、BCMA発現MM細胞への抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合特性（フローサイトメトリー））

実施例5で生成した非リガンド結合/ブロック、非競合抗BCMA抗体を有する抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体を、フローサイトメトリーによって、 10 ng/mL 、 100 ng/mL および 1000 ng/mL のAPRILもしくはBAFFの存在下で、NCI-H929多発性骨髄腫細胞上で発現されるヒトBCMAへのそれらの結合特性について分析する。簡潔には、培養した細胞を回収し、計数し、細胞生存率を、トリパンブルー排除法を使用して評価する。次いで、生細胞を、 0.1% BSAを含むPBS中で 2×10^6 細胞/mLに調節する。この細胞懸濁物のうちの $90\text{ }\mu\text{L}$ を、丸底96ウェルプレートにウェルあたりさらにアリコートに分ける。上記T細胞二重特異的抗体もしくは対応するIgGコントロールのうちの $10\text{ }\mu\text{L}$ を上記細胞含有ウェルに添加して、好ましくは、 $0.1\text{ pM} \sim 200\text{ nM}$ の範囲に及ぶ終濃度を得る。抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体およびコントロールIgGを、同じ容量モル濃度で使用する。30分間4 でのインキュベーションの後、細胞を遠心分離し（5分間、 $350 \times g$ ）、 $150\text{ }\mu\text{L}$ /ウェルのBSA含有FACS染色緩衝液（BD Biosciences）で洗浄し、再懸濁し、さらに30分間4 で、 $12\text{ }\mu\text{L}$ /ウェル 蛍光色素結合体化抗His抗体（Lucerna）とともにT細胞二重特異的抗体の検出のためにインキュベートする。次いで、細胞を、 $120\text{ }\mu\text{L}$ /ウェル FACS染色緩衝液の添加および $350 \times g$ で5分間の遠心分離によって洗浄する。第2の洗浄工程を、 $150\text{ }\mu\text{L}$ /ウェル FACS染色緩衝液で行う。上記サンプルを $200\text{ }\mu\text{L}$ /ウェル FACS染色緩衝液中に再懸濁し、FACSDiva（登録商標）ソフトウェアを備えたLSRIIFローサイトメーター（BD Biosciences）を使用して取得および分析する。MM細胞およびT細胞への抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合を評価し、その平均蛍光強度を、BCMA発現NCI-H929 MM細胞でゲーティングをかけて決定し、ヒストグラムもしくはドットプロットでプロットする。次いで、MM細胞への、非リガンド結合/ブロック、非競合抗BCMA抗体を有する抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合（例えば、MFI）を、 0 ng/mL 、 10 ng/mL 、 100 ng/mL 、 1000 ng/mL のAPRILもしくはBAFFの存在下でリガンド結合/ブロック、競合抗BCMA抗体を有する抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の結合と比較する。

【0240】

（実施例12B。 10 ng/mL 、 100 ng/mL 、 1000 ng/mL のAPRILもしくはBAFFの存在下での非リガンド結合/ブロック、非競合抗BCMA抗体を有する抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の死滅化特性：BCMA発現MM細胞のT細胞による再指向された細胞傷害性（LDH放出アッセイ））

実施例5で生成した非リガンド結合/ブロック、非競合抗BCMA抗体を有する抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体を、漸増濃度（すなわち、 10 ng/mL 、 100 ng/mL 、 1000 ng/mL ）のAPRILもしくはBAFFの存在下もしくは非存在下で、細胞上のBCMAへの抗原結合部分の結合による上記構築物の架橋の際に、BCMA発現MM細胞におけるT細胞媒介性アポトーシスを誘導するそれらの能力について分析する。簡潔には、ヒトBCMA発現NCI-H929多発性骨髄腫標的細胞を、細胞解離緩衝液で回収し、 10% ウシ胎仔血清（Invitrogen）を補充したRPMI中で洗浄および再懸濁する。約 $30,000$ 細胞/ウェルを、丸底96ウェルプレートにまき、上記T細胞二重特異的抗体のそれぞれの希釈物を、好ましくは、 $0.1\text{ nM} \sim$

10 nMの範囲の1 nMの固定した濃度になるように添加する(三連で)。適切な比較のために、全てのT細胞二重特異的抗体およびコントロールを、同じ容量モル濃度に調節する。漸増濃度(すなわち、10 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mL)の可溶性ヒト組換えAPRILもしくはBAFFを、上記細胞培養物に添加する。APRILの添加もBAFFの添加もないウェルをまた、コントロールとしてプレートに含める。次いで、ヒト全T細胞(エフェクター)を、ウェルに添加して、最終E:T比 5:1を得る。ヒトPBMCをエフェクター細胞として使用する場合、最終E:T比 10:1を使用する。PHA-L(Sigma)を、濃度1 µg/mLでヒトT細胞活性化の陽性コントロールとして使用する。陰性コントロール群は、エフェクターもしくは標的細胞のみによって表される。正規化のために、NCI-H929 MM標的細胞の最大溶解(=100%)を、細胞死を含め、終濃度1% Triton X-100との標的細胞のインキュベーションによって決定する。最小溶解(=0%)を、エフェクター細胞とのみ、すなわち、いかなる構築物も抗体もなしで共インキュベートした標的細胞によって表される。37、5% CO₂での20時間のインキュベーションの後、次いで、アポトーシス/壊死MM標的細胞から上清へのLDH放出を、LDH検出キット(Roche Applied Science)で、製造業者の指示に従って測定する。LDH放出のパーセンテージを、濃度応答曲線において、固定した濃度(複数可の抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の存在下で、好ましくは、0.1 pM~200 nMの濃度範囲で、APRILもしくはBAFFの濃度に対してプロットする。次いで、そのIC₅₀値を、Prismソフトウェア(GraphPad)を使用して測定する。次いで、非リガンド結合/ブロック、非競合抗BCMA抗体を有する抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体のIC₅₀値を、0 ng/mL、10 ng/mL、100 ng/mL、1000 ng/mLのAPRILもしくはBAFFの存在下で、リガンド結合/ブロック、競合抗BCMA抗体を有する抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体のものと比較する。

【0241】

(実施例13 - V k * M Y C 多発性骨髄腫マウスモデルにおける抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の治療有効性の評価)

マウス交叉反応性抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体を、Chesi, 2012(Chesi et al., 2012; Blood 120: 376-385)に記載されるように、V k * M Y C 多発性骨髄腫になりやすいマウスにおいて多発性骨髄腫を防止するそれらの能力について試験する。多発性骨髄腫は、骨髄中の形質細胞の制御されない増大を伴う血液悪性疾患である。BCMAは、悪性形質細胞上で強く発現されるので、本発明者らは、抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的因子が多発性骨髄腫の処置に効果的であると仮定する。上記V k * M Y C 多発性骨髄腫マウスモデルは、ヒト骨髄腫をよく表し、クリニックにおいて使用される薬物応答の予測となり;抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的抗体の前臨床的概念実証を試験するための優れたツールの代表である。簡潔には、Mayo Clinic Arizonaでの学術的協同研究から得られたV k * M Y Cマウスを、ヒトCD3 トランスジェニック(huCD3 Tg)マウスと交配する。huCD3 Tg x V k * M Y Cマウス由来のT細胞は、ヒトCD3 およびマウスCD3 の両方をその細胞表面に発現するので、上記マウスは、抗BCMA/抗CD3 T細胞二重特異的因子に応答性である。V k * M Y Cマウスは、約30週齢で開始する単クローン性高ガンマグロブリン血症を一律に発症し、これは、ヒト骨髄腫の代表的な臨床徴候(例えば、貧血、骨粗鬆症および腎疾患)を伴って、時間を経てゆっくりと進行する。マウスの尾の掠り傷を付けて定期的に採血し、血液をMicrotainer tubes(BD Biosciences)に集め、室温で凝固させ、次いで、10分間、2,300 gで遠心分離する。血清を生理食塩緩衝液中で1:2希釈し、プレキャストQuickGels(Helena Laboratories)を使用して製造業者の指示に従ってQuickGel Chamber装置で分析する。ガンマグロブリン(gamma)/アルブミン比および血清画分を、デンストメトリー分析によって測定する。

10

20

30

40

50

【0242】

治療研究のために、V k * M Y Cマウスを登録し、種々の処置群に無作為化する (n = 5 ~ 8 / 群) : 例えば、1) コントロール I g G ; 2) 抗 B C M A / 抗 C D 3 T細胞二重特異的抗体 ; 500 μ g / k g / 週もしくは10 μ g / マウス / 週を尾静脈から静脈内投与する ; 3) 標準ケアとして使用される1日目、4日目、8日目、11日目にボルテゾミブ 1 m g / k g / i . p . 。好ましくは、抗 B C M A / 抗 C D 3 T細胞二重特異的抗体の用量 (複数可) は、複数であり得、200 ~ 1000 μ g / k g / 週の範囲に及び得る。各群において、少なくとも3歳の (> 1歳) V k * M Y Cマウスは、0 . 3 ~ 2 . 0の間のガンマグロブリン / アルブミン比 (デンストメトリーによって測定される場合、約10 ~ 70 g / lの間の顕著なMスパイクに対応する) を有する。血清タンパク質電気泳動 (S P E P) を、0日目と処置後14日目に行って、クリニックで行われるように、腫瘍応答のマーカーとしてのMスパイクにおける処置媒介性低下を測定する。いくつかの治療研究では、Mスパイク 約10 ~ 70 g / lおよび5%を超える骨髓形質細胞増加症を有する移植 V k * M Y Cマウスを登録し、種々の処置群に割り当てる。Mスパイクを低下させる抗 B C M A / 抗 C D 3 T細胞二重特異的抗体の有効性を、評価する。

10

【0243】

(実施例14 - 全身性エリテマトーデスの、N Z B / W狼瘡になりやすいマウスモデルにおける治療有効性の評価)

マウス交叉反応性抗 B C M A / 抗 C D 3 T細胞二重特異的抗体を、N Z B / W p r o n eマウス (十分に特徴付けられたモデル (H a s s e t a l . , 2010 ; J I m m u n o l 184 (9) : 4789 - 4800)) において全身性エリテマトーデス (S L E) を防止するそれらの能力について試験する。自己反応性形質細胞が S L Eにおいて重要な役割を果たし、自己反応性形質細胞の抗 B C M A / 抗 C D 3 T細胞二重特異的因子での枯渇が、S L E患者に有益であり得ることを示唆する証拠が蓄積しつつある。簡潔には、N Z BおよびN Z Wマウスを、J a c k s o n L a b o r a t o r y から購入し、h u C D 3 T gマウスと交配する。次いで、N Z B x h u C D 3 T gマウスおよびN Z W x h u C D 3 T gマウスを、互いと交配し、雌性 h u C D 3 T g x N Z B / W F 1マウスを、将来的な研究のために選択する。マウスを、A l b u s t i x 試薬ストリップ (S i e m e n s H e a l t h c a r e D i a g n o s t i c s I n c .) で隔週にタンパク尿について半定量的に試験し、タンパク質濃度 (0 ~ 20 g / lまで) に従って0 ~ 4までのスケールでスコア付けする。7 ~ 8ヶ月齢の h u C D 3 T g x N Z B / W F 1雌性マウスを、治療研究に登録し、種々の処置群に無作為化する (n = 16 / 群) : 例えば、1) コントロール I g G ; 2) 抗 B C M A / 抗 C D 3 T細胞二重特異的抗体 ; 500 μ g / k g / 週もしくは10 μ g / マウス / 週が尾静脈を介して静脈内投与される ; 3) 標準ケアとして使用される抗 B A F F 20 m g / k g / 週。好ましくは、抗 B C M A / 抗 C D 3 T細胞二重特異的抗体の用量 (複数可) は、複数であり得、200 ~ 1000 μ g / k g / 週の範囲に及び得る。上記治療研究の開始時のベースラインタンパク質レベルは、30 ~ 300 m g / d Lである。

20

30

【0244】

S L Eの代表的な臨床エンドポイントは、タンパク尿、腎疾患および糸球体腎炎、糸球体の細胞充実性およびサイズの増大などの徴候、過ヨウ素酸 - シッフ (P A S S) 陽性沈着物、E L I S Aによって測定される場合、d s D N A、総 I g A、I g GおよびI g Mなどの血清中の自己抗体の出現からなる。

40

【0245】

(実施例15 - 腎同種異系移植片の急性抗体媒介性体液性拒絶の実験マウスモデルにおける治療有効性の評価)

実施例2から生じたマウス交叉反応性抗 B C M A抗体、好ましくは、非結合体化 I g G 1抗体 (実施例3) および細胞傷害性低分子部分を送達する結合体化抗体 (実施例4) を、形質細胞が関わる同種異系移植片の急性抗体媒介性体液性拒絶およびB i c k e r s t a f f , 2008 (B i c k e r s t a f f e t a l . , A m J P a t h o l

50

2008; 173 (2): 347-357)に記載されるように、腎同種異系移植片の急性体液性拒絶の実験マウスモデルにおけるアロ抗体を処置するそれらの潜在性について試験する。

【0246】

(実施例15A。マウスにおける皮膚移植での予備感作)

C57BL/6 (H-2b) および DBA/2 (H-2d) 成体マウスを、Jackson Laboratory から得る。C57BL/6 レシピエントマウスを、最初に、DBA/2 ドナーマウス由来の皮膚同種異系移植片で予備感作する。簡潔には、全層皮膚同種異系移植片 (約 8×10 mm) を、レシピエントの側腹部の準備した移植床に入れ、四隅を 5-0 シルク縫合糸 (Ethicon) で縫合する。次いで、上記皮膚同種異系移植片を、保護包帯で 7 日間覆う。移植片拒絶は、移植後 7 日目までに起こると予測され、皮膚移植片が暗色になる、痂皮形成する、および壊死性に変性することによって特徴付けられる。予備感作したレシピエントマウスには、その後、腎同種異系移植片を受けさせる。

【0247】

(実施例15B。マウス腎移植)

実施例15Aの予備感作したマウスを、腎同種異系移植片レシピエントとして使用し、治療研究に登録し、種々の処置群に無作為化する ($n = 10$ / 群): 1) コントロール IgG; 2) 抗 B C M A 抗体; $20 \text{ mg} / \text{kg} / \text{週}$ もしくは $400 \mu \text{g} / \text{マウス} / \text{週}$ (尾静脈を介して静脈内投与される)。Bickerstaff et al. (2008) に記載されるように、DBA/2 マウス由来のドナー左腎を、10-0 シルクマイクロ縫合糸 (Ethicon) で結紮し、副腎血管および精巣血管を分離することによって単離する。大動脈および下大静脈を、それらの接合部において、左腎動脈および静脈とともに分離する。大動脈を、腎血管下で結紮する。左尿管膀胱接合部を含む膀胱の一区画 (patch) を切除する。移植片を、 $0.2 \sim 0.4 \text{ ml}$ の冷ヘパリン化乳酸リンゲル液でインサイチュ灌流する。最終的に、血管供給を有する腎臓および上記膀胱の一区画に付着した尿管を、ひとまとめにして回収する。予備感作 C57BL/6 マウスを、腎同種異系移植片のレシピエントとして供する。上記レシピエントの生来の右腎を、移植直前に取り出す。腎臓下大動脈および下大静脈を注意深く分離し、クロスクランプをかける。ドナー腎静脈とレシピエント下大静脈との間の端側吻合を、連続 10-0 縫合糸を使用して行う。ドナー大動脈カフとレシピエント大動脈との間の動脈吻合もまた行う。腎同種異系移植片を即座に灌流して、吻合が成功したことを証明する。次いで、泌尿器再構築を、膀胱間吻合 (bladder-to-bladder anastomosis) によって行う。生来の左腎を、腎移植の 5 日後に取り出す。腎同種異系移植片生存を、全体的な動物の健康状態を毎日検査し、かつクレアチニンレベルを測定し、正常の未処置マウスのレベル (例えば、 $20 \mu \text{mol} / \text{L}$) と比較することによって追跡する。マウスが病気の徴候 (例えば、体重減少、瀕死状態、うずくまった体位など) を示し、2 日連続して $100 \mu \text{mol} / \text{L}$ より高いクレアチニンレベルを伴う場合に腎同種異系移植片拒絶とみなす; 次いで、レシピエントに麻酔をかけ、組織病理分析のための腎同種異系移植片を回収する。

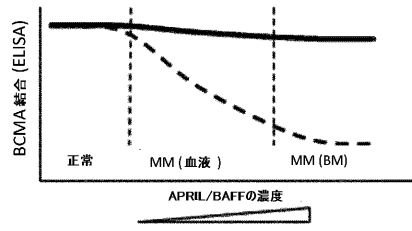
【0248】

(実施例15C。循環アロ抗体分析)

ドナー反応性抗体もしくはアロ抗体の存在は、血清が DBA/2 脾細胞に結合する能力によって決定される。結合を、フローサイトメトリーによって、FITC 結合体化ヤギ抗マウス IgG (鎖特異的)、ラット抗マウス IgG1、ラット抗マウス IgG2a、もしくはラット抗マウス IgG2b (BD Biosciences) 検出抗体を使用して検出する。抗体結合を、DBA/2 脾細胞を Ig 結合の標的として使用して、平均蛍光強度 MFI として測定する。バックグラウンド蛍光を、5 つのナイーブ C57BL/6 血清の結合から得た MFI 値を利用することによって、各サブタイプについてのコントロール実験で決定する。陰性染色コントロールは、脾細胞 + 各検出抗体を含む。

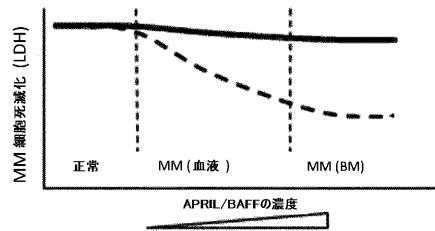
【図 1】

Fig.1



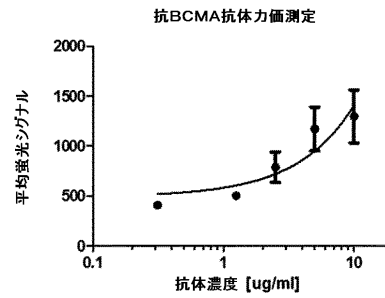
【図 2】

Fig. 2



【図 3】

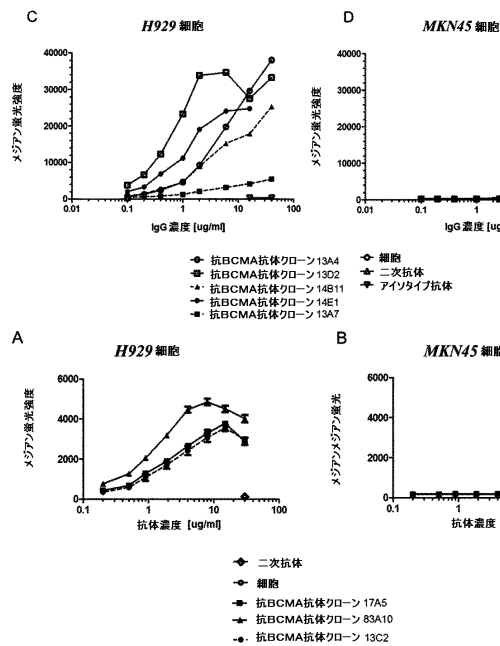
Fig. 3



● 抗BCMA抗体
#ab54834 (Abcam), BCMAに対するマウスモノクローナル

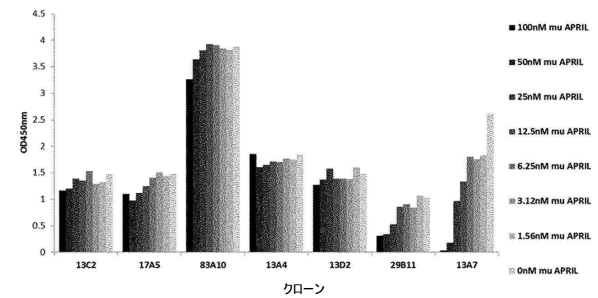
【図 4】

Fig. 4



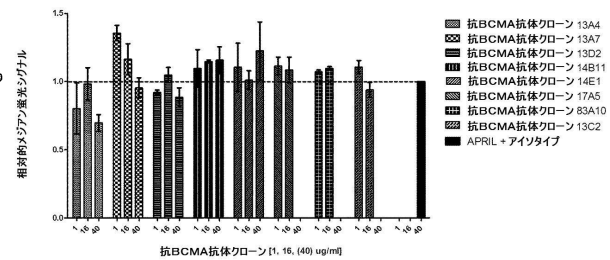
【図 5】

Fig. 5



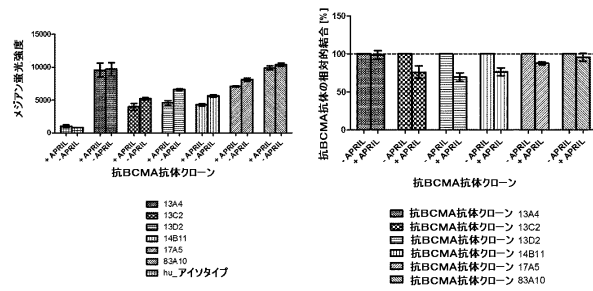
【図 6】

Fig. 6



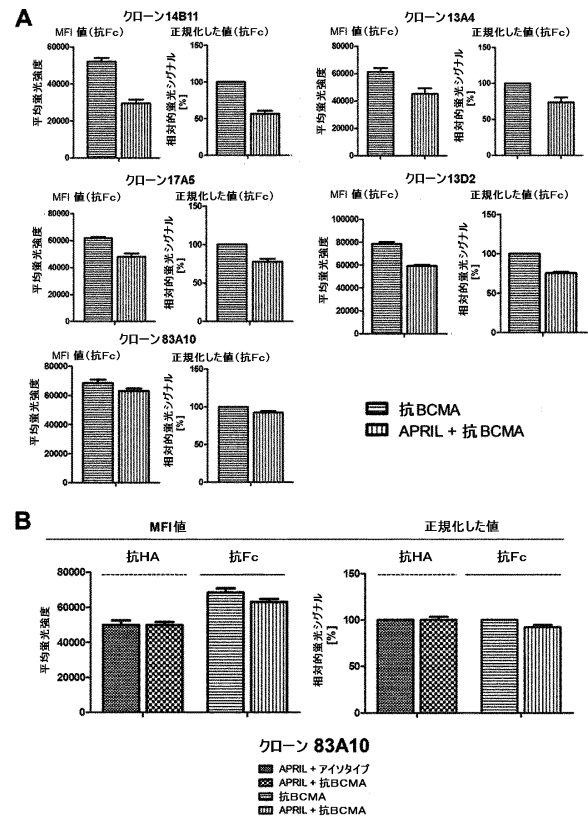
【図 7】

Fig. 7



【図 8】

Fig. 8



【配列表】

0006636803000001.app

フロントページの続き

(51)Int.Cl.		F I
A 6 1 P 37/02	(2006.01)	A 6 1 P 37/02
C 1 2 N 15/13	(2006.01)	C 1 2 N 15/13

前置審査

- (72)発明者 メスナー, エッケハルト
スイス国 ツェーハー - 8 2 8 0 クロイツリンゲン, フェルゼンブルクヴェーク 5
- (72)発明者 ホッセ, ラルフ
スイス国 ツェーハー - 6 3 3 0 ハーム, シュミートシュトラーク 8
- (72)発明者 アスト, オリヴァー
スイス国 ツェーハー - 8 3 0 3 パッサースドルフ, ヤコブ スパルテンシュタインシュトラーク 1 2
- (72)発明者 フライモーザー - グルトショーパー, アンネ
スイス国 ツェーハー - 8 0 5 0 チューリッヒ, ノインブルネンシュトラーク 7 6
- (72)発明者 バツァツ, マリーナ
スイス国 ツェーハー - 8 0 4 6 チューリッヒ, ホルダーバッハヴェーク 2 1
- (72)発明者 ファウティ, ターニャ
スイス国 ツェーハー - 8 0 4 9 チューリッヒ, ライトホーファーシュトラーク 4 6
- (72)発明者 クライン, クリスティアン
スイス国 ツェーハー - 8 9 0 6 ボンシュテッテン, クリュツアッハーヴェーク 4 1
- (72)発明者 ウマーナ, パブロ
スイス国 ツェーハー - 8 8 3 2 ヴォレラウ, フェルゼンラインシュトラーク 2 8
- (72)発明者 モーザー, サミュエル
スイス国 ツェーハー - 6 3 4 3 ロートクロイツ, アイヒマット 3 1

審査官 田中 晴絵

- (56)参考文献 特表2012-520308(JP,A)
国際公開第2012/163805(WO,A1)
国際公開第2012/066058(WO,A1)
特表2011-506509(JP,A)
MoI Cancer Ther, 2007年, vol.6,no.11, p.3009-3018

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

C 0 7 K

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

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)