

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2018-525005

(P2018-525005A)

(43) 公表日 平成30年9月6日(2018.9.6)

| (51) Int.Cl. | F 1 | テーマコード (参考) |
|------------------------|--------------|-----------------|
| C 12 N 15/13 (2006.01) | C 12 N 15/13 | 4 B 065 |
| C 12 N 15/62 (2006.01) | C 12 N 15/62 | Z N A Z 4 C 084 |
| C 07 K 16/28 (2006.01) | C 07 K 16/28 | 4 C 085 |
| C 07 K 16/46 (2006.01) | C 07 K 16/46 | 4 C 086 |
| C 12 N 15/06 (2006.01) | C 12 N 15/06 | 4 H 045 |

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 112 頁) 最終頁に続く

| | | | |
|---------------|------------------------------|----------|--|
| (21) 出願番号 | 特願2018-508695 (P2018-508695) | (71) 出願人 | 397060175 ヤンセン ファーマシューティカ エヌ. ペー. ベルギー国 ベー. - 2340 ベルセ トルンハウッサー・ヴェヒ 30 |
| (86) (22) 出願日 | 平成28年8月16日 (2016.8.16) | (74) 代理人 | 100092783 弁理士 小林 浩 |
| (85) 翻訳文提出日 | 平成30年4月5日 (2018.4.5) | (74) 代理人 | 100095360 弁理士 片山 英二 |
| (86) 國際出願番号 | PCT/US2016/047146 | (74) 代理人 | 100093676 弁理士 小林 純子 |
| (87) 國際公開番号 | W02017/031104 | (74) 代理人 | 100120134 弁理士 大森 規雄 |
| (87) 國際公開日 | 平成29年2月23日 (2017.2.23) | (74) 代理人 | 100149010 弁理士 星川 亮 |
| (31) 優先権主張番号 | 62/206,246 | | |
| (32) 優先日 | 平成27年8月17日 (2015.8.17) | | |
| (33) 優先権主張国 | 米国(US) | | |

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】抗BCMA抗体、BCMA及びCD3に結合する二重特異性抗原結合分子、並びにそれらの使用

(57) 【要約】

本明細書において、BCMAに免疫特異的に結合する抗体が提供される。提供されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントをコード可能な関連するポリヌクレオチド、提供された抗体又は抗原結合フラグメントを発現している細胞、並びに関連するベクター、及び検出可能に標識された抗体又は抗原結合フラグメントも記載されている。加えて、提供された抗体を使用する方法が記載されている。例えば、提供された抗体を使用して、BCMA発現がんの進行、退行、又は安定性を診断、処置、若しくはモニタすること、患者ががんを処置されるべきか否かを判定すること、又は対象がBCMA発現がんに苦しんでいるため、BCMA特異性抗がん治療剤、例えば、本明細書に記載されたBCMA及びCD3に対する多重特異性抗体による処置を受けることができるか否かを判定することができる。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

B C M A に免疫特異的に結合する組換え抗体、又はその抗原結合フラグメントであって、前記抗体は重鎖及び軽鎖を有し、前記重鎖は、

a . 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域 1 (C D R 1) 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

b . 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

c . 配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

d . 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 19 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

e . 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

f . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 19 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

g . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 19 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、を含む、組換え抗体、又はその抗原結合フラグメント。

10

20

30

【請求項 2】

前記抗体は、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 、及び配列番号 26 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 、を更に含む、請求項 1 に記載の抗体、又はその抗原結合フラグメント。

【請求項 3】

(a) の抗体の重鎖は、配列番号 27 のアミノ酸配列を含み、(b) の抗体の重鎖は、配列番号 57 のアミノ酸配列を含み、(f) の抗体の重鎖は、配列番号 34 のアミノ酸配列を含み、(k) の抗体の重鎖は、配列番号 39 のアミノ酸配列を含み、(l) の抗体の重鎖は、配列番号 40 のアミノ酸配列を含み、(m) の抗体の重鎖は、配列番号 58 のアミノ酸配列を含み、又は(n) の抗体の重鎖は、配列番号 43 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

30

【請求項 4】

前記抗体の軽鎖は、配列番号 28 のアミノ酸配列を含む、請求項 2 又は 3 に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 5】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト B C M A の細胞外ドメインに結合する、請求項 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

40

【請求項 6】

前記抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトの抗体又は抗原結合フラグメントである、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 7】

前記抗原結合フラグメントは、 F a b フラグメント、 F a b 2 フラグメント、又は一本鎖抗体である、請求項 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合フラグメント。

40

【請求項 8】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、 B C M A 及び A P R I L の相互作用を阻害する、請求項 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 9】

前記抗体又は抗原結合フラグメントは、 E L I S A により測定するとき、 B C M A 及び A P R I L の相互作用について約 5 . 9 n M の I C ₅₀ を示す、請求項 8 に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

50

【請求項 10】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは Ig G である、請求項 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 11】

Ig G 4 アイソタイプである、請求項 1 ~ 10 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 12】

前記 Ig G 4 は、その Fc 領域中に S 228 P 置換、L 234 A 置換、及び L 235 A 置換を有する、請求項 11 に記載の抗体。

【請求項 13】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト B C M A に免疫特異的に結合し、カニクイザル B C M A に交差反応する、請求項 1 ~ 12 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 14】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト骨髄腫細胞の表面上の B C M A に結合する、請求項 1 ~ 13 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 15】

前記抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト多発性骨髄腫細胞の表面上の B C M A に結合する、請求項 1 ~ 14 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

【請求項 16】

請求項 1 ~ 15 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントを発現している組換え細胞。

【請求項 17】

前記細胞はハイブリドーマである、請求項 16 に記載の細胞。

【請求項 18】

前記抗体は組換え的に生成される、請求項 16 に記載の細胞。

【請求項 19】

組換え B C M A × C D 3 二重特異性抗体又はその B C M A × C D 3 二重特異性結合フラグメントであって、

- a) 第 1 の重鎖 (H C 1) と、
- b) 第 2 の重鎖 (H C 2) と、
- c) 第 1 の軽鎖 (L C 1) と、
- d) 第 2 の軽鎖 (L C 2) と、を含み、

H C 1 は L C 1 と結合され、H C 2 は L C 2 と結合され、C D 3 に免疫特異的に結合する第 1 の抗原結合部位を形成するために、H C 1 は配列番号 5 9 、配列番号 6 0 、及び配列番号 6 1 を含み、L C 1 は配列番号 6 2 、配列番号 6 3 、及び配列番号 6 4 を含み、また B C M A に免疫特異的に結合する第 2 の抗原結合部位を形成するために、H C 2 は配列番号 4 、配列番号 5 、及び配列番号 6 を含み、L C 2 は配列番号 2 4 、配列番号 2 5 、及び配列番号 2 6 を含む、組換え B C M A × C D 3 二重特異性抗体又はその B C M A × C D 3 二重特異性結合フラグメント。

【請求項 20】

配列番号 5 5 を含む H C 1 と、配列番号 5 6 を含む L C 1 と、配列番号 6 5 を含む H C 2 と、配列番号 7 6 を含む L C 2 と、を含む、請求項 19 に記載の組換え B C M A × C D 3 二重特異性抗体又はそのフラグメント。

【請求項 21】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは Ig G である、請求項 20 に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項 22】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは Ig G 4 アイソタイプである、請求項 19 、 20 、又は 21 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異

10

20

30

40

50

性結合フラグメント。

【請求項 2 3】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、表面プラズモン共鳴により測定するとき、少なくとも 0.22 nM の親和性でヒト BCMA に免疫特異的に結合する、請求項 1 9 ~ 2 2 に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項 2 4】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒト骨髄腫細胞の表面上の BCMA に結合する、請求項 1 9 ~ 2 3 に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項 2 5】

前記抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒト多発性骨髄腫細胞の表面上の BCMA に結合する、請求項 1 9 ~ 2 4 に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項 2 6】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、約 0.37 nM 未満の EC₅₀ でインビトロでヒト T 細胞活性化を誘発する、請求項 1 9 ~ 2 5 に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項 2 7】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、約 0.45 nM 未満の EC₅₀ でインビトロで BCMA 発現細胞の T 細胞依存性細胞傷害を誘発する、請求項 1 9 ~ 2 6 に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項 2 8】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、BCMA アゴニストではない、請求項 1 9 ~ 2 7 に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項 2 9】

前記抗体又は二重特異性結合フラグメントは、10 nM 未満の濃度で NF-B 活性化を変化させない、請求項 1 9 ~ 2 8 に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

【請求項 3 0】

請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の抗体又は二重特異性結合フラグメントを発現している、組換え細胞。

【請求項 3 1】

前記細胞はハイブリドーマである、請求項 3 0 に記載の細胞。

【請求項 3 2】

がんを有する対象を処置するための方法であって、請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの治療的に有効な量を、それを必要とする対象に、がんを処置するのに十分な時間投与することを含む、方法。

【請求項 3 3】

がん細胞の成長又は増殖を阻害するための方法であって、請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの治療的に有効な量を投与し、がん細胞の成長又は増殖を阻害することを含む、方法。

【請求項 3 4】

T 細胞を BCMA 発現がん細胞にリダイレクトする方法であって、請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の BCMA × CD3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの治療的に有効な量を投与し、T 細胞をがんにリダイレクトすることを含む、方法。

【請求項 3 5】

前記がんは血液がんである、請求項 3 2 、 3 3 、又は 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 6】

前記血液がんは BCMA 発現 B 細胞がんである、請求項 3 5 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 7】

前記 B C M A 発現 B 細胞がんは多発性骨髄腫である、請求項 3 6 に記載の方法。

【請求項 3 8】

第 2 の治療剤を投与することを更に含む、請求項 3 2 に記載の方法。

【請求項 3 9】

前記第 2 の治療剤は、化学療法剤又は標的化抗がん治療剤である、請求項 3 8 に記載の方法。

【請求項 4 0】

前記化学療法剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミンニ塩酸塩、又はインターロイキン 2 である、請求項 3 9 に記載の方法。

10

【請求項 4 1】

請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体と、を含む、医薬組成物。

【請求項 4 2】

請求項 3 0 ~ 3 1 のいずれか一項に記載の細胞を培養することにより、請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを生成するための方法。

【請求項 4 3】

請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの H C 1 、 H C 2 、 L C 1 、又は L C 2 をコードする、単離された合成ポリヌクレオチド。

20

【請求項 4 4】

請求項 1 9 ~ 2 9 のいずれか一項に定義されるような B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント、及び / 又は請求項 4 4 に定義されるようなポリヌクレオチド、及びこれらのための包装、を含む、キット。

【発明の詳細な説明】**【技術分野】****【0 0 0 1】**

本出願は、2015年8月17日に出願された米国特許仮出願第 6 2 / 2 0 6 , 2 4 6 号の利益を主張するものであり、その全体は参照により本明細書に組み込まれる。

30

【0 0 0 2】**配列表**

本出願は、A S C I I フォーマットで電子的に提出済みの配列表を含み、当該配列表の全体を参照により本明細書に援用するものである。当該 A S C I I のコピーは、2016 年 8 月 15 日に作成され、ファイル名は P R D 3 3 8 3 U S N P _ S L . t x t であり、そのサイズは 8 7 , 3 4 1 バイトである。

【0 0 0 3】**技術分野**

本明細書で提供される開示は、B 細胞成熟抗原 (B C M A) に免疫特異的に結合するモノクローナル抗体、B C M A 及びクラスター決定因子 3 (C D 3) に免疫特異的に結合する多重特異性抗体、並びに当該抗体の產生及び使用方法に関する。

40

【背景技術】**【0 0 0 4】**

B 細胞成熟抗原は、B C M A 、 C D 2 6 9 、 T N F R S F 1 7 (UniProt Q 0 2 2 2 3) としても周知であるが、分化形質細胞に優先的に発現される腫瘍壊死受容体スーパーファミリーのメンバーである [Laabi et al . (1 9 9 2) E M B O J 1 1 (1 1) : 3 8 9 7 ~ 3 9 0 4 ; Madry et al . (1 9 9 8) Int Immunol 1 0 (1 1) : 1 6 9 3 ~ 1 7 0 2] 。 B C M A は、非グリコシル化 I 型膜貫通タンパク質であり、B 細胞の成熟、増殖、及び生存に関与する。 B C M A は、T N F スーパーファミリーの 2 つのリガンドの受容体であり、これらのリガンドは、B C

50

M Aに対する高親和性リガンドであるA P R I L（増殖誘発リガンド、C D 2 5 6、T N F S F 1 3）、及びB C M Aに対する低親和性リガンドであるB細胞活性化因子B A F F（T H A N K、B l y S、Bリンパ球刺激因子、T A L L - 1、及びz T N F 4）である。A P R I L及びB A F Fは、構造類似性と、重複するが異なる受容体結合特異性を示す。負の制御因子T A C IもB A F F及びA P R I Lの両方に結合する。A P R I L及びB A F FのB C M A及び/又はT A C Iへの配位結合は、転写因子N F - Bを活性化し、生存促進性B c 1 - 2 ファミリーメンバー（例えば、B c 1 - 2、B c 1 - x L、B c 1 - w、M c 1 - 1、A 1）の発現を増加させ、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）の発現を減少させることにより、アポトーシスを阻害して生存を促進する。この複合作用は、B細胞の分化、増殖、生存、及び抗体産生を促進する（R i c k e r t R C et al., Immunol Rev (2011) 244 (1) : 115 ~ 133に概説されるように）。この発見と一致して、B C M Aはまた、多発性骨髄腫（M M）細胞などの悪性ヒトB細胞の増殖及び生存も支持する。N o v a kらは、M M細胞株及び新鮮単離M M細胞が、それらの細胞表面上にB C M A及びT A C Iタンパク質を発現し、それらの細胞表面上でのB A F F - Rタンパク質の発現にはらつきがあることを発見している（N o v a k et al., (2004) Blood 103 (2) : 689 ~ 694）。

10

【0 0 0 5】

多発性骨髄腫（M M）は、2番目に多い血液悪性腫瘍であり、全がん死亡の2%を構成する。M Mは、異質性疾患であり、多くは染色体転座、とりわけt（11；14）、t（4；14）、t（8；14）、d e l（13）、d e l（17）により生じる（D r a c h et al., (1998) Blood 92 (3) : 802 ~ 809；G e r t z et al., (2005) Blood 106 (8) : 2837 ~ 2840；F a c o n et al., (2001) Blood 97 (6) : 1566 ~ 1571）。M M罹患者は、骨髄浸潤、骨破壊、腎不全、免疫不全、及びがん診断の心理社会的負担のために、様々な疾患関連症状が現れ得る。2006年の時点で、M Mの5年相対生存率は約34%であり、M Mが現在治療オプションのない治療の難しい疾患であることを浮き彫りにした。

20

【0 0 0 6】

リンパ腫及び多発性骨髄腫の治療に抗B C M A抗体を使用することは、国際公開第2002066516号及び同第2010104949号で言及されている。B C M Aに対する抗体は、例えば、G r a s M - P . et al . I nt Immunol . 7 (1995) 1093 ~ 1106、国際公開第200124811号、及び同第200124812号に記載されている。

30

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0 0 0 7】

それでもなお、B C M A、B A F F - R、及びT A C I、すなわちT N F受容体スーパー・ファミリーに属するB細胞受容体、並びにそれらのリガンドのB A F F及びA P R I Lは、がんとの闘いで治療の対象であるという事実にもかかわらず、依然としてこのような病状の治療に使用可能な更なるオプションを有する必要がある。

40

【課題を解決するための手段】

【0 0 0 8】

本明細書において、B C M Aに免疫特異的に結合する抗体及びその抗原結合フラグメントが提供される。また、提供されたB C M A特異性抗体及び抗原結合フラグメントをコード可能な関連するポリヌクレオチド、提供された抗体及び抗原結合フラグメントを発現している細胞、並びに関連するベクター、及び検出可能に標識された抗体及び抗原結合フラグメントも記載されている。加えて、提供された抗体及び抗原結合フラグメントを使用する方法が記載されている。例えば、B C M A特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、B C M A発現がんの進行、退行、又は安定性を診断若しくはモニタすること、患者ががんを

50

処置されるべきか否かを判定すること、又は対象が B C M A 発現がんに苦しんでいるか否かを判定することに使用でき、そのため、B C M A 特異性抗がん治療剤、例えば、本明細書に記載された B C M A 及び C D 3 に対する多重特異性抗体による処置に適し得る。

【 0 0 0 9 】

本明細書において、B C M A 及び C D 3 に免疫特異的に結合する多重特異性抗体及びその多重特異性抗原結合フラグメントが更に提供される。また、提供された B C M A × C D 3 多重特異性抗体をコード可能な関連するポリヌクレオチド、提供された抗体を発現している細胞、並びに関連するベクター、及び検出可能に標識された多重特異性抗体も記載されている。加えて、提供された多重特異性抗体を使用する方法が記載されている。例えば、B C M A × C D 3 多重特異性抗体は、B C M A 発現がんの進行、退行、又は安定性を診断若しくはモニタすること、患者ががんを処置されるべきか否かを判定すること、又は対象が B C M A 発現がんに苦しんでいるか否かを判定することに使用でき、そのため、B C M A 特異性抗がん治療剤、例えば、本明細書に記載された B C M A × C D 3 多重特異性抗体による処置に適し得る。

10

【 0 0 1 0 】

B C M A 特異性抗体

本明細書において、B C M A に特異的な組換え抗体及び抗原結合フラグメントが記載されている。一部の実施形態では、B C M A 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、ヒト B C M A に結合する。一部の実施形態では、B C M A 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、ヒト B C M A 及びカニクイザル B C M A に結合する。一部の実施形態では、B C M A 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、B C M A 細胞外ドメイン (E C D) からの 1 つ又は 2 つ以上の残基を含むエピトープに結合する。この B C M A 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、E L I S A により測定するとき、少なくとも 5 . 9 n M の I C ₅₀ で A P R I L 結合を阻害し得る。

20

【 0 0 1 1 】

表 1 に、本明細書に記載された一部の B C M A 特異性抗体の例の概要を提供する。

【 0 0 1 2 】

【表1】

表1. ヒトBCMAに対して生成されたmA bのCDR配列

(列記した各配列の配列番号を括弧内に示す)

| ID | HC-CDR1 | HC-CDR2 | HC-CDR3 | LC-CDR1 | LC-CDR2 | LC-CDR3 |
|----------|--------------|-----------------------|------------------|------------------|--------------|-----------------|
| BCMB 69 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITY YNPSLKS (5) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSS SDHV(26) |
| BCMB 117 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITY YNPSLKS (5) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSS SDHV(26) |
| BCMB 123 | SSYYFWG (7) | SIYYSGITY YNPSLKS (5) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSS SDHV(26) |
| BCMB 128 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITY YNPSLKS (5) | HDGATAG LFDY(19) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSS SDHV(26) |
| BCMB 129 | SGSYFWG (4) | SIYYSGST YYNPSLKS (8) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSS SDHV(26) |
| BCMB 176 | SSYYFWG (13) | SIYYSGITY YNPSLKS (5) | HDGATAG LFDY(19) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSS SDHV(26) |
| BCMB 177 | SSYYFWG (13) | SIYYSGST YYNPSLKS (8) | HDGATAG LFDY(19) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSS SDHV(26) |

10

20

30

40

【0013】

一部の実施形態では、表1に記載された抗体のうちいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖を含む、BCMA特異性抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。一部の実施形態では、表1に記載された抗体のうちいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖と、表1に記載された抗体のうちいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む軽鎖と、を含む、BCMA特異性抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。

【0014】

IgGクラスは、ヒトにおいて、4つのアイソタイプ：IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4に分割される。これらのアイソタイプは、Fc領域のアミノ酸配列において、95%超の相同性を共有するが、ヒンジ領域のアミノ酸組成及び構造において、主な差異を示す。Fc領域は、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介する。ADCCにおいて、抗体のFc領域は、免疫エフェクター細胞、例えば、ナチュラルキラー及びマクロファージの表面上のFc受容体（Fcgr）に結合する。同免疫エフェクター細胞は、標的細胞の貪食又は溶解をもたらす。CDCにおいて、抗体は、標的細胞を、細胞表面における補体カスケードをトリガーすることにより殺傷する。本明細書に記載された抗体は、IgGアイソタイプのいずれかとの組み合わせで、可変ドメインの記載された特徴を有する抗体を含む。同IgGアイソタイプは、Fc配列が異なるエフェクター機能をもたらすために改変されている改変版を含む。

【0015】

治療抗体の多くの用途について、Fc媒介性エフェクター機能は、作用のメカニズムの一部ではない。これらのFc媒介性エフェクター機能は、オフメカニズムの毒性を引き起こすことにより、有害であるおそれがあり、安全性リスクを引き起こすおそれがある。エフェクター機能を改変することは、Fc領域を遺伝子操作して、Fcgr又は補体因子へ

50

の結合性を低下させることにより達成され得る。活性化 (FcgRI、FcgRIIa、FcgRIIIa、及びFcgRIIIb) 及び阻害性 (FcgRIIb) FcgR又は補体の第1のコンポーネント (C1q)へのIgGの結合性は、ヒンジ領域及びCH2ドメイン中に位置する残基により決まる。IgG1、IgG2、及びIgG4に変異が導入されて、Fc機能を低下又はサイレンシングさせる。本明細書に記載された抗体は、これらの改変を含んでもよい。

【0016】

一部の実施形態において、抗体は、下記特性：(a) 親Fcと比較した場合、低下したエフェクター機能、(b) FcgRI、FcgRIIa、FcgRIIb、FcgRIIIb、及び/又はFcgRIIIaに対する低下した親和性、(c) FcgRIに対する低下した親和性、(d) FcgRIIaに対する低下した親和性、(e) FcgRIIbに対する低下した親和性、(f) FcgRIIIbに対する低下した親和性、又は(g) FcgRIIIaに対する低下した親和性のうち1つ又は2つ以上を有するFc領域を含む。
10

【0017】

一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、IgG又はその誘導体、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4のアイソタイプである。抗体がIgG4アイソタイプを有する一部の実施形態では、抗体は、K409R、S228P、L234A、及びL235A置換を、そのFc領域中に含有する。本明細書に記載された抗体は、これらの改変を含んでもよい。

【0018】

一部の実施形態では、記載された抗体は、ELISAにより測定するとき、5.9nMのIC₅₀でAPRIL結合を阻害することができる。
20

【0019】

一部の実施形態では、記載された抗体は、BCMA陽性多発性骨髄腫細胞株に結合する。
。

【0020】

記載されたBCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントに加えて、記載された抗体及び抗原結合フラグメントをコード可能なポリヌクレオチド配列もまた提供される。記載されたポリヌクレオチドを含むベクターもまた提供される。同様に、本明細書で提供されたBCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントを発現している細胞も提供される。また、開示されたベクターを発現可能な細胞も記載される。これらの細胞は、哺乳類細胞（例えば、293F細胞、CHO細胞）、昆虫細胞（例えば、Sf7細胞）、酵母細胞、植物細胞、又は細菌細胞（例えば、E.coli）でもよい。記載された抗体はまた、ハイブリドーマ細胞により生成することができる。
30

【0021】

BcMA特異性抗体を使用する方法

記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントを使用する方法もまた開示されている。本項に記載の方法に使用するための特定の抗体としては、表1の抗体に関して記載されたCDR一式を有するものが挙げられる。例えば、これらの抗体又は抗原結合フラグメントは、BCMA受容体の相互作用を使用して阻害することにより、がんを処置するのに有用であり得る。すなわち、抗体が毒物に結合され、この毒物をBCMA発現がんに標的化する。更に、これらの抗体又は抗原結合フラグメントは、生体サンプル、例えば、血液又は血清中におけるBCMAの存在を検出するのに、生体サンプル、例えば、血液又は血清中におけるBCMAの量を定量するのに、BCMA発現がんを診断するのに、がんで苦しむ対象を処置する方法を決定するのに、又は対象におけるBCMA発現がんの進行をモニタするのに、有用であり得る。一部の実施形態では、BCMA発現がんは、多発性骨髄腫(MM)などのリンパ腫であり得る。記載された方法は、対象がBCMA発現がんの処置、例えば、BCMA及びCD3に対する多重特異性抗体による処置を受ける前に行われてもよい。更に、記載された方法は、対象がBCMA発現がんの処置、例えば、本明細書に記載されたBCMA及びCD3に対する多重特異性抗体による処置を受けた後に
40

10

20

30

40

50

行われてもよい。

【0022】

生体サンプル中のBCMAを検出する記載された方法は、生体サンプルを、本明細書に記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントのうち1つ又は2つ以上に曝すことを含む。

【0023】

また、対象におけるBCMA発現がんを診断する記載された方法は、生体サンプルを、本明細書に記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントのうち1つ又は2つ以上に曝すことを伴うが、この方法は、サンプル中に存在するBCMAの量を定量する工程と、サンプル中に存在するBCMAの量を、既知の標準又は参照サンプルと比較する工程と、対象のBCMAレベルががんに関連付けられるBCMAのレベル内に入るかどうかを判定する工程と、を含む。

10

【0024】

本明細書において、対象中のBCMA発現がんをモニタする方法もまた記載されている。記載された方法は、生体サンプルを、本明細書に記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントのうち1つ又は2つ以上に曝す工程と、抗体又はその抗原結合フラグメントに結合したサンプル中に存在するBCMAの量を定量する工程と、サンプル中に存在するBCMAの量を、既知の標準若しくは参照サンプル、又は対象から以前に得られた類似するサンプル中のBCMAの量のいずれか一方と比較する工程と、比較されたサンプル中のBCMAの量における差異に基づいて、対象のBCMAレベルががんの進行、退行、又は不变を示すかどうかを判定する工程と、を含む。

20

【0025】

対象から得られ、又は同対象に由来するサンプルは、生体サンプル、例えば、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、組織会合していない循環腫瘍細胞、組織、外科手術的に切除された腫瘍組織、生検、微小針吸引サンプル、又は組織学的調製物である。

【0026】

記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、記載された方法又は当業者に既知の他の方法での使用のために標識されてもよい。例えば、本明細書に記載された抗体又はその抗原結合フラグメントは、放射線標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、ECL標識、酵素、ルテニウム、¹¹¹In-DOTA、¹¹¹In-ジエチレントリアミンペنتア酢酸(DTPA)、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びベータガラクトシダーゼ、若しくはポリヒスチジン、又は当技術分野において既知の類似するこのような標識で標識されてもよい。

30

【0027】

BCMA特異性抗体キット

開示されたBCMA特異性抗体又はその抗原結合フラグメントを含むキットが本明細書において記載されている。記載されたキットを使用して、本明細書で提供されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントを使用する方法、又は当業者に既知の他の方法を行うことができる。一部の実施形態では、記載されたキットは、本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントと、生体サンプル中のBCMAの存在を検出する際の使用のための試薬と、を含んでもよい。したがって、記載されたキットは、本明細書に記載された抗体又はその抗原結合フラグメントのうち1つ又は2つ以上と、使用していないときに抗体又はフラグメントを収容するための容器と、抗体又はフラグメントの使用のための取扱説明書と、本明細書に記載されたとおり、固体支持体に固定された抗体若しくはフラグメント及び/又は検出可能に標識された形態の抗体若しくはフラグメントを含んでもよい。

40

【0028】

BCMA × CD3多重特異性抗体

TCR/CD3複合体を介したBCMAを発現しているMM細胞へのTリンパ球のリダイレクトは、魅力的な別の方法を提示する。Tリンパ球のTCR/CD3複合体は、CD3標識化ガンマ()、デルタ()、イプシロン()、ゼータ()、及びイータ()

50

) の不变サブユニットを有する細胞表面で共発現された T C R アルファ() / ベータ() 又は T C R ガンマ() / デルタ() ヘテロ二量体のいずれかで構成される。ヒト C D 3 は、 UniProt P 0 7 7 6 6 (C D 3 E _ H U M A N) に記載されている。現況技術に記載されている抗 C D 3 抗体は、 S P 3 4 である (Yang S J , The Journal of Immunology (1986) 137 ; 1097 ~ 1100) 。 S P 3 4 は、 灵長類及びヒト C D 3 の両方に反応する。 S P 3 4 は、 Pharmingen から入手可能である。現況技術に記載されている更なる抗 C D 3 抗体は、 U C H T - 1 である (国際公開第 2 0 0 0 0 4 1 4 7 4 号参照) 。現況技術に記載されている更なる抗 C D 3 抗体は、 B C - 3 である (Fred Hutchinson Cancer Research Institute ; used in Phase I / II trials of GvHD , Anasetti et al . , Transplantation 54 : 844 (1992)) 。 S P 3 4 は C D 3 の 鎖だけに存在するエピトープを認識するが (Salmeron et al . , (1991) J . Immunol . 147 : 3047 参照) 、 U C H T - 1 及び B C - 3 は 及び 鎖の両方によつて与えられるエピトープを認識しており、この点で S P 3 4 は U C H T - 1 及び B C - 3 とは異なる。抗体 S P 3 4 と同じ配列を有する抗体の配列は、国際公開第 2 0 0 8 1 1 9 5 6 5 号、同第 2 0 0 8 1 1 9 5 6 6 号、同第 2 0 0 8 1 1 9 5 6 7 号、同第 2 0 1 0 0 3 7 8 3 6 号、同第 2 0 1 0 0 3 7 8 3 7 号、及び同第 2 0 1 0 0 3 7 8 3 8 号で言及されている。抗体 S P 3 4 の重鎖可変ドメイン (V H) と 96 % 同じ配列は、米国特許第 8 2 3 6 3 0 8 号 (国際公開第 2 0 0 7 0 4 2 2 6 1 号) で言及されている。

10

20

30

40

50

【 0 0 2 9 】

様々な C D 3 及び B C M A に対する二重特異性抗体は、国際公開第 2 0 0 7 1 1 7 6 0 0 号、同第 2 0 0 9 1 3 2 0 5 8 号、同第 2 0 1 2 0 6 6 0 5 8 号、同第 2 0 1 2 1 4 3 4 9 8 号、同第 2 0 1 3 0 7 2 4 0 6 号、同第 2 0 1 3 0 7 2 4 1 5 号、及び同第 2 0 1 4 1 2 2 1 4 4 号で言及されている。しかしながら、臨床への進展について述べているデータは、現在のところ利用可能ではない。

【 0 0 3 0 】

本明細書において、 B C M A 及び C D 3 に結合する、組換え多重特異性抗体 (「 B C M A × C D 3 多重特異性抗体」) 及びその多重特異性抗原結合フラグメントが記載されている。一実施形態では、 B C M A に免疫特異的に結合する組換え抗体又はその抗原結合フラグメントを提供する。

【 0 0 3 1 】

一部の実施形態では、多重特異性抗体の B C M A 特異性アームは、ヒト B C M A 及びカニクイザル B C M A に結合する。一部の実施形態では、 B C M A × C D 3 多重特異性抗体又は抗原結合フラグメントの B C M A 特異性アームは、ヒト B C M A の細胞外ドメインに結合する。好ましい実施形態では、 B C M A × C D 3 多重特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、二重特異性抗体又は抗原結合フラグメントである。一部の実施形態では、 a) 第 1 の重鎖 (H C 1) 、 b) 第 2 の重鎖 (H C 2) 、 c) 第 1 の軽鎖 (L C 1) 、及び d) 第 2 の軽鎖 (L C 2) を含み、 H C 1 と L C 1 とが対を成して、 B C M A に免疫特異的に結合する第 1 の抗原結合部位を形成し、 H C 2 と L C 2 とが対を成して、 C D 3 に免疫特異的に結合する第 2 の抗原結合部位を形成する、組換え B C M A × C D 3 二重特異性抗体、又はその B C M A × C D 3 二重特異性結合フラグメントが提供される。別の実施形態では、抗体又は二重特異性結合フラグメントを発現している組換え細胞が提供される。一部の実施形態では、 B C M A × C D 3 多重特異性抗体の B C M A 結合アーム (又は「 B C M A 特異性アーム」) は、本明細書に記載された B C M A 抗体から (例えば、表 1 で列記された C D R 配列を有する抗体から) 得られる。

【 0 0 3 2 】

一部の実施形態では、 B C M A × C D 3 多重特異性抗体又は抗原結合フラグメントの B C M A 特異性アームは、 I g G 又はその誘導体である。一部の実施形態では、記載された B C M A × C D 3 多重特異性抗体は、表面プラズモン共鳴により測定された場合、少なく

とも0.18nMの解離定数で、BCMAに結合可能である。一部の実施形態では、記載されたBCMA×CD3多重特異性抗体は、アゴニストではない。一部の実施形態では、記載されたBCMA×CD3多重特異性抗体は、10nM未満の濃度でNF-B活性化を変化させない。

【0033】

一部の実施形態では、BCMA×CD3多重特異性抗体のCD3結合アーム（又は「CD3特異性アーム」）は、マウスモノクローナル抗体SP34、マウスIgG3/ラムダアイソタイプから得られる。（K.R.Abhinandan and A.C.Martin, 2008.Mol.Immunol.45, 3832~3839）。一部の実施形態では、BCMA×CD3多重特異性抗体のCD3結合アームは、表2から選択される1つの重鎖及び1つの軽鎖を含む。

10

【0034】

【表2】

表2. CD3特異性抗体及び抗原結合フラグメントの重鎖及び軽鎖

| 重鎖 | 軽鎖 |
|--|--|
| CD3B219(配列番号55) EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWRQAPGKGLEWVARIRSKY NNYATYYAASVKGRFTISRDDSKNSLYL QMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVS WFAYWGQQGTLTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV TVPSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPCCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAAKTPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQE EMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTPVLDSDGSFLYSKLT DKSRWQEGNVFSCCSVHEALHNHYTQK SLSLGLK | CD3B219(配列番号56) QTVVTQEPSTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTS NYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPAR FSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWY SNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSS EELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSP VKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQW KSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |
| CDR1:TYAMN(配列番号59) | CDR1:RSSTGAVTTSNYAN(配列番号62) |
| CDR2:RIRSKYNNYATYYAASVKG (配列番号60) | CDR2:GTNKRAP(配列番号63) |
| CDR3:HGNFGNSYVSWFAY(配列番号61) | CDR3:ALWYSNLWV(配列番号64) |

20

30

40

【0035】

IgGクラスは、ヒトにおいて、4つのアイソタイプ：IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4に分割される。これらのアイソタイプは、Fc領域のアミノ酸配列において、95%超の相同性を共有するが、ヒンジ領域のアミノ酸組成及び構造において、主な差異を示す。Fc領域は、エフェクター機能、例えば、抗体依存性細胞傷害（ADCC）及び補体依存性細胞傷害（CDC）を媒介する。ADCCにおいて、抗体のFc領域は、免疫エフェクター細胞、例えば、ナチュラルキラー及びマクロファージの表面上のFc受容体（Fcgr）に結合する。同免疫エフェクター細胞は、標的細胞の貪食又は溶解をもたらす。CDCにおいて、抗体は、標的細胞を、細胞表面における補体カスケードをトリガーすることにより殺傷する。

【0036】

治療抗体の多くの用途について、Fc媒介性エフェクター機能は、作用のメカニズムの一部ではない。これらのFc媒介性エフェクター機能は、オフメカニズムの毒性を引き起こすことにより、有害であるおそれがあり、安全性リスクを引き起こすおそれがある。エフェクター機能を改変することは、Fc領域を遺伝子操作して、Fcgr又は補体因子への結合性を低下させることにより達成され得る。活性化（FcgrI、FcgrIIa、

50

$FcgR\text{I}\text{II}\text{I}\text{a}$ 、及び $FcgR\text{I}\text{II}\text{I}\text{b}$) 及び阻害性($FcgR\text{I}\text{I}\text{b}$) $FcgR$ 又は補体の第1のコンポーネント($C1q$)への IgG の結合性は、ヒンジ領域及び $CH2$ ドメイン中に位置する残基により決まる。 $IgG1$ 、 $IgG2$ 、及び $IgG4$ に変異が導入されて、 Fc 機能を低下又はサイレンシングさせる。

【0037】

一実施形態において、抗体は、下記特性：(a)親 Fc と比較した場合、低下したエフェクター機能、(b) $FcgR\text{I}$ 、 $FcgR\text{I}\text{II}\text{I}\text{a}$ 、 $FcgR\text{I}\text{II}\text{I}\text{b}$ 、 $FcgR\text{I}\text{I}\text{I}\text{b}$ 、及び/又は $FcgR\text{I}\text{II}\text{I}\text{a}$ に対する低下した親和性、(c) $FcgR\text{I}$ に対する低下した親和性、(d) $FcgR\text{I}\text{II}\text{I}\text{a}$ に対する低下した親和性、(e) $FcgR\text{I}\text{I}\text{I}\text{b}$ に対する低下した親和性、(f) $FcgR\text{I}\text{I}\text{I}\text{b}$ に対する低下した親和性、又は(g) $FcgR\text{I}\text{II}\text{I}\text{a}$ に対する低下した親和性のうち1つ又は2つ以上を有する Fc 領域を含む。

10

【0038】

一部の実施形態では、多重特異性抗体の $CD3$ 特異性アームが得られる $CD3$ 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、 IgG 又はその誘導体である。一部の実施形態では、多重特異性抗体の $CD3$ 特異性アームが得られる $CD3$ 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、 $IgG1$ 又はその誘導体である。一部の実施形態では、例えば、 $CD3$ 結合アームが得られる $CD3$ 特異性 $IgG1$ 抗体の Fc 領域は、その Fc 領域中に、 $L234A$ 、 $L235A$ 、及び $F405L$ 置換を含む。一部の実施形態では、多重特異性抗体の $CD3$ 特異性アームが得られる $CD3$ 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、 $IgG4$ 又はその誘導体である。一部の実施形態では、例えば、 $CD3$ 結合アームが得られる $CD3$ 特異性 $IgG4$ 抗体の Fc 領域は、その Fc 領域中に、 $S228P$ 、 $L234A$ 、 $L235A$ 、 $F405L$ 、及び $R409K$ 置換を含む。一部の実施形態では、多重特異性抗体の $CD3$ 特異性アームが得られる $CD3$ 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒトT細胞及び/又は初代カニクイザルT細胞上の $CD3$ に結合する。一部の実施形態では、多重特異性抗体の $CD3$ 特異性アームが得られる $CD3$ 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒト $CD4+T$ 細胞及び/又は初代カニクイザル $CD4+T$ 細胞を活性化する。

20

【0039】

記載された $BCMA \times CD3$ 多重特異性抗体に加えて、記載された $BCMA \times CD3$ 多重特異性抗体をコード可能なポリヌクレオチド配列も提供される。一部の実施形態では、 $BCMA \times CD3$ 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの $HC1$ 、 $HC2$ 、 $LC1$ 、又は $LC2$ をコードする単離された合成ポリヌクレオチドが提供される。記載されたポリヌクレオチドを含むベクターもまた提供され、同様に、本明細書で提供された $BCMA \times CD3$ 多重特異性抗体を発現している細胞も提供される。また、開示されたベクターを発現可能な細胞も記載される。これらの細胞は、哺乳類細胞(例えば、 $293F$ 細胞、 CHO 細胞)、昆虫細胞(例えば、 $Sf7$ 細胞)、酵母細胞、植物細胞、又は細菌細胞(例えば、 $E.coli$)でもよい。記載された抗体はまた、ハイブリドーマ細胞により生成することができる。一部の実施形態では、細胞を培養することにより、 $BCMA \times CD3$ 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを生成するための方法が提供される。

30

【0040】

本明細書において、 $BCMA \times CD3$ 多重特異性抗体又は抗原結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体とを含む医薬組成物が更に提供される。

40

【0041】

$BCMA \times CD3$ 多重特異性抗体を使用する方法

記載された $BCMA \times CD3$ 多重特異性抗体及びその多重特異性抗原結合フラグメントを使用する方法もまた開示される。例えば、 $BCMA \times CD3$ 多重特異性抗体及びその多重特異性抗原結合フラグメントは、それを必要とする対象における、 $BCMA$ 発現がんの処置に有用であり得る。一部の実施形態では、 $BCMA$ 発現がんは、多発性骨髄腫などのリンパ腫である。

50

【0042】

B C M A 発現がんの処置を、それを必要とする対象において行う記載された方法は、この対象に、治療的に有効な量の記載された B C M A × C D 3 多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントを投与する工程を含む。一部の実施形態では、対象は、哺乳類、好ましくは、ヒトである。好ましい実施形態では、治療的に有効な量の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性抗原結合フラグメントを、それを必要とする患者に、がんを処置するのに十分な時間投与することにより、がんを有する対象を処置するための方法が提供される。

【 0 0 4 3 】

がん細胞の成長又は増殖を阻害するために、治療的に有効な量の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性抗原結合フラグメントを投与することにより、がん細胞の成長又は増殖を阻害するための方法が更に提供される。10

【 0 0 4 4 】

また、本明細書において、T 細胞をがんにリダイレクトするために、治療的に有効な量の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性抗原結合フラグメントを投与することにより、T 細胞を B C M A 発現がん細胞にリダイレクトする方法も提供される。

【 0 0 4 5 】

B C M A × C D 3 特異性抗体キット

本明細書において、開示された B C M A × C D 3 多重特異性抗体を含むキットが記載されている。記載されたキットを使用して、本明細書で提供された B C M A × C D 3 多重特異性抗体を使用する方法又は当業者に既知の他の方法を行うことができる。一部の実施形態では、記載されたキットは、本明細書に記載された抗体と、B C M A 発現がんを処置する際の使用のための試薬と、を含んでもよい。したがって、記載されたキットは、本明細書に記載された多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントのうち 1 つ若しくは 2 つ以上、使用していないときに抗体又はフラグメントを収容するための容器、並びに / 又は抗体若しくはフラグメントの使用のための取扱説明書、本明細書に記載されたとおりの、固体支持体に固定された抗体若しくはフラグメント及び / 若しくは検出可能に標識された形態の抗体若しくはフラグメントを含んでもよい。20

【 図面の簡単な説明 】

【 0 0 4 6 】

【図 1 A】ヒト B C M A (図 1 A) 及びカニクイザル B C M A (図 1 B) をクローンするために使用されるベクター。30

【図 1 B】ヒト B C M A (図 1 A) 及びカニクイザル B C M A (図 1 B) をクローンするために使用されるベクター。

【図 2 A】B C M B 6 9 のエピトープ位置及びヒト B C M A と B C M B 6 9 との相互作用。(図 2 A) エピトープ位置の概観。B C M B 6 9 は、B C M A の凹状表面 (黒色領域) に結合する。(図 2 B) B C M A と B C M B 6 9 との直接接触を示す相互作用マップ。B C M A に接触する C D R - L 1 を除く全ての C D R からの残基。ファンデルワールス相互作用は破線で示し、水素結合は実線であり、矢印は骨格水素結合を示しており、骨格原子を指している。B C M B 6 9 及び A P R I L の両方に接触する B C M A 残基は黒色枠を有する。接触残基を特定するために 4 の距離のカットオフ値を用いた (水素結合に関しては 3 . 5 の距離の閾値)。(図 2 C 及び図 2 D) B C M B 6 9 の軽鎖 (図 2 C) 及び重鎖 (図 2 D) との B C M A の主な相互作用の拡大図。水素結合はオングストローム単位の距離を有する破線で示す。40

【図 2 B】B C M B 6 9 のエピトープ位置及びヒト B C M A と B C M B 6 9 との相互作用。(図 2 A) エピトープ位置の概観 B C M B 6 9 は、B C M A の凹状表面 (黒色領域) に結合する。(図 2 B) B C M A と B C M B 6 9 との直接接触を示す相互作用マップ。B C M A に接触する C D R - L 1 を除く全ての C D R からの残基。ファンデルワールス相互作用は破線で示し、水素結合は実線であり、矢印は骨格水素結合を示しており、骨格原子を指している。B C M B 6 9 及び A P R I L の両方に接触する B C M A 残基は黒色枠を有する。接触残基を特定するために 4 の距離のカットオフ値を用いた (水素結合に関しては 50

3.5 の距離の閾値)。(図2C及び図2D)BCMB69の軽鎖(図2C)及び重鎖(図2D)とのBCMAの主な相互作用の拡大図。水素結合はオングストローム単位の距離を有する破線で示す。

【図2C】BCMB69のエピトープ位置及びヒトBCMAとBCMB69との相互作用。(図2A)エピトープ位置の概観BCMB69は、BCMAの凹状表面(黒色領域)に結合する。(図2B)BCMAとBCMB69との直接接触を示す相互作用マップ。BCMAに接触するCDR-L1を除く全てのCDRからの残基。ファンデルワールス相互作用は破線で示し、水素結合は実線であり、矢印は骨格水素結合を示しており、骨格原子を指している。BCMB69及びAPRILの両方に接触するBCMA残基は黒色枠を有する。接触残基を特定するために4の距離のカットオフ値を用いた(水素結合に関しては3.5の距離の閾値)。(図2C及び図2D)BCMB69の軽鎖(図2C)及び重鎖(図2D)とのBCMAの主な相互作用の拡大図。水素結合はオングストローム単位の距離を有する破線で示す。

【図2D】BCMB69のエピトープ位置及びヒトBCMAとBCMB69との相互作用。(図2A)エピトープ位置の概観BCMB69は、BCMAの凹状表面(黒色領域)に結合する。(図2B)BCMAとBCMB69との直接接触を示す相互作用マップ。BCMAに接触するCDR-L1を除く全てのCDRからの残基。ファンデルワールス相互作用は破線で示し、水素結合は実線であり、矢印は骨格水素結合を示しており、骨格原子を指している。BCMB69及びAPRILの両方に接触するBCMA残基は黒色枠を有する。接触残基を特定するために4の距離のカットオフ値を用いた(水素結合に関しては3.5の距離の閾値)。(図2C及び図2D)BCMB69の軽鎖(図2C)及び重鎖(図2D)とのBCMAの主な相互作用の拡大図。水素結合はオングストローム単位の距離を有する破線で示す。

【図3】BCMB69のエピトープ及びパラトープ残基。エピトープ及びパラトープ残基は影付き、CDR領域は下線付き(Kabant定義)、ヒトと異なるBCMA残基は太字イタリック体である。BCMB69Fab及び細胞外BCMA配列のみを示す。

【図4A】BCMB69Fab及びAPRIL間(図4A)並びにBCMB69Fab及びBAFF間(図4B)のクラッシュ領域。Fab及びリガンド間のクラッシュ領域を示すBCMA/APRIL及びBCMA/BAFF複合体に対するBCMA/BCMB69複合体の構造的オーバーレイ。BCMAの溶媒接触可能表面を表示する。Fab及びリガンド分子をそれぞれ灰色及び黒色画で示す。両方の複合体中の等価BCMA C原子の重ね合わせにより、オーバーレイを得た(APRIL複合体では0.9、BAFFでは1.2のRMSD)。

【図4B】BCMB69Fab及びAPRIL間(図4A)並びにBCMB69Fab及びBAFF間(図4B)のクラッシュ領域。Fab及びリガンド間のクラッシュ領域を示すBCMA/APRIL及びBCMA/BAFF複合体に対するBCMA/BCMB69複合体の構造的オーバーレイ。BCMAの溶媒接触可能表面を表示する。Fab及びリガンド分子をそれぞれ灰色及び黒色画で示す。両方の複合体中の等価BCMA C原子の重ね合わせにより、オーバーレイを得た(APRIL複合体では0.9、BAFFでは1.2のRMSD)。

【図5】BCMB72のSPRデータは、分子が、ヒト、カニクイザル、及びマウスBCMAに対する結合性を有することを実証する。カニクイザル及びマウスBCMAの平均KDは、ヒトBCMAと比較するとき、それぞれ約36倍及び402倍である。

【図6】BCMA⁺細胞株におけるBCMB72の結合性に関するEC₅₀の測定。BCMB72を用いてBCMAに対して細胞株を染色した。細胞に対するBCMB72の結合性の幾何学的平均蛍光強度を示す。EC₅₀を凡例内に示す。約100nMの濃度で飽和に達した。平均蛍光強度を考慮して、U2932(EC₅₀ = 7.92nM)、MM1R(EC₅₀ = 8.74nM)、H929(EC₅₀ = 14.7nM)、EJM(EC₅₀ = 17.5nM)、及びL91(EC₅₀ = 22.3nM)細胞についてEC₅₀値を得た。データのグラフ化及びフィッティングは、可変勾配(4パラメータ)関数を有する非

10

20

30

40

50

線形回帰を使用して Graph Pad Prism 6 で行った。

【図 7】全血における B C M B 7 2 の結合プロファイル。3人の正常ヒトドナー由来の全血を、B C M A に対するモノクローナル若しくはポリクローナル抗体又は B C M B 7 2 で染色した。ゲーティング解析を行って、標準的な細胞特異的マーカーを用いて白血球集団中のリンパ球を同定した。1人の代表ドナーの染色強度をパネルに示しており、黒色実線は所望の抗体であり、灰色塗り潰しの破線は対応するアイソタイプである。B C M A 発現なしは、3人の正常ドナーにおけるリンパ球、単球、顆粒球、又は形質細胞様 D C で観察された。B C M B 7 2 は、3人の全てのドナーで C D 3 + T 細胞に対する結合性を示したが、ドナー間で強度が異なった。B C M B 7 2 は、このアッセイで試験した他のいずれの細胞種にも結合しなかった。

【図 8 A】種々の MM 細胞株の存在下における B C M B 7 2 依存性 T 細胞活性化。H 9 2 9 (図 9 A)、MM . 1 R (図 9 B)、R P M I 8 2 2 6 (図 9 C)、U 2 6 6 (図 9 D)、及び M v 4 - 1 1 (図 9 E) 細胞を、6人の正常ドナー由来の T 細胞 (ドナー平均 ± S E M を示す) 及び F c ブロッカー (2 m g / m L) の存在下で、提示した抗体に 48 時間供した。E C ₅₀ 値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log E C ₅₀ に関する 95 % 信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。(対称であるため、Log E C ₅₀ に関する信頼区間を使用し、E C ₅₀ 自体に関する信頼区間は使用しない。) + / - 2 未満の区間 (又は 4 未満の 95 % 信頼区間幅全体) を適切に考慮する。

【図 8 B】種々の MM 細胞株の存在下における B C M B 7 2 依存性 T 細胞活性化。H 9 2 9 (図 9 A)、MM . 1 R (図 9 B)、R P M I 8 2 2 6 (図 9 C)、U 2 6 6 (図 9 D)、及び M v 4 - 1 1 (図 9 E) 細胞を、6人の正常ドナー由来の T 細胞 (ドナー平均 ± S E M を示す) 及び F c ブロッcker (2 m g / m L) の存在下で、提示した抗体に 48 時間供した。E C ₅₀ 値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log E C ₅₀ に関する 95 % 信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。(対称であるため、Log E C ₅₀ に関する信頼区間を使用し、E C ₅₀ 自体に関する信頼区間は使用しない。) + / - 2 未満の区間 (又は 4 未満の 95 % 信頼区間幅全体) を適切に考慮する。

【図 8 C】種々の MM 細胞株の存在下における B C M B 7 2 依存性 T 細胞活性化。H 9 2 9 (図 9 A)、MM . 1 R (図 9 B)、R P M I 8 2 2 6 (図 9 C)、U 2 6 6 (図 9 D)、及び M v 4 - 1 1 (図 9 E) 細胞を、6人の正常ドナー由来の T 細胞 (ドナー平均 ± S E M を示す) 及び F c ブロッcker (2 m g / m L) の存在下で、提示した抗体に 48 時間供した。E C ₅₀ 値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log E C ₅₀ に関する 95 % 信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。(対称であるため、Log E C ₅₀ に関する信頼区間を使用し、E C ₅₀ 自体に関する信頼区間は使用しない。) + / - 2 未満の区間 (又は 4 未満の 95 % 信頼区間幅全体) を適切に考慮する。

【図 8 D】種々の MM 細胞株の存在下における B C M B 7 2 依存性 T 細胞活性化。H 9 2 9 (図 9 A)、MM . 1 R (図 9 B)、R P M I 8 2 2 6 (図 9 C)、U 2 6 6 (図 9 D)、及び M v 4 - 1 1 (図 9 E) 細胞を、6人の正常ドナー由来の T 細胞 (ドナー平均 ± S E M を示す) 及び F c ブロッcker (2 m g / m L) の存在下で、提示した抗体に 48 時間供した。E C ₅₀ 値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log E C ₅₀ に関する 95 % 信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。(対称であるため、Log E C ₅₀ に関する信頼区間を使用し、E C ₅₀ 自体に関する信頼区間は使用しない。) + / - 2 未満の区間 (又は 4 未満の 95 % 信頼区間幅全体) を適切に考慮する。

【図 8 E】種々の MM 細胞株の存在下における B C M B 7 2 依存性 T 細胞活性化。H 9 2 9 (図 9 A)、MM . 1 R (図 9 B)、R P M I 8 2 2 6 (図 9 C)、U 2 6 6 (図 9 D)、及び M v 4 - 1 1 (図 9 E) 細胞を、6人の正常ドナー由来の T 細胞 (ドナー平均 ± S E M を示す) 及び F c ブロッcker (2 m g / m L) の存在下で、提示した抗体に 48

10

20

30

40

50

時間供した。EC₅₀値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log EC₅₀に関する95%信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。（対称であるため、Log EC₅₀に関する信頼区間を使用し、EC₅₀自体に関する信頼区間は使用しない。）+/-2未満の区間（又は4未満の95%信頼区間幅全体）を適切に考慮する。

【図9A】複数の正常ドナー由来のT細胞を使用して2回の独立試験から得られたEC₅₀及び最大T細胞活性化値の概要。各細胞株及び各試験について個々のドナーの値及びドナーの平均値を示す。データなし=試験未実施、フィットなし=ソフトウェアの曲線作成不能、～値=モデル外挿に基づく近似値。

【図9B】複数の正常ドナー由来のT細胞を使用して2回の独立試験から得られたEC₅₀及び最大T細胞活性化値の概要。各細胞株及び各試験について個々のドナーの値及びドナーの平均値を示す。データなし=試験未実施、フィットなし=ソフトウェアの曲線作成不能、～値=モデル外挿に基づく近似値。

【図10A】種々の多発性骨髄腫細胞株のT細胞媒介性BCMB72依存性細胞傷害。H929（図11A）、MM.1R（図11B）、RPMI 8226（図11C）、U266（図11D）、及びMv4-11（図11E）細胞を、6人の正常ドナー由来のT細胞（ドナー平均±SEMを示す）及びFcブロッカー（2mg/mL）の存在下で、提示した抗体濃度に48時間供した。EC₅₀値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log EC₅₀に関する95%信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。（対称であるため、Log EC₅₀に関する信頼区間を使用し、EC₅₀自体に関する信頼区間は使用しない。）+/-2未満の区間（又は4未満の95%信頼区間幅全体）を適切に考慮する。

【図10B】種々の多発性骨髄腫細胞株のT細胞媒介性BCMB72依存性細胞傷害。H929（図11A）、MM.1R（図11B）、RPMI 8226（図11C）、U266（図11D）、及びMv4-11（図11E）細胞を、6人の正常ドナー由来のT細胞（ドナー平均±SEMを示す）及びFcブロッcker（2mg/mL）の存在下で、提示した抗体濃度に48時間供した。EC₅₀値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log EC₅₀に関する95%信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。（対称であるため、Log EC₅₀に関する信頼区間を使用し、EC₅₀自体に関する信頼区間は使用しない。）+/-2未満の区間（又は4未満の95%信頼区間幅全体）を適切に考慮する。

【図10C】種々の多発性骨髄腫細胞株のT細胞媒介性BCMB72依存性細胞傷害。H929（図11A）、MM.1R（図11B）、RPMI 8226（図11C）、U266（図11D）、及びMv4-11（図11E）細胞を、6人の正常ドナー由来のT細胞（ドナー平均±SEMを示す）及びFcブロッcker（2mg/mL）の存在下で、提示した抗体濃度に48時間供した。EC₅₀値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log EC₅₀に関する95%信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。（対称であるため、Log EC₅₀に関する信頼区間を使用し、EC₅₀自体に関する信頼区間は使用しない。）+/-2未満の区間（又は4未満の95%信頼区間幅全体）を適切に考慮する。

【図10D】種々の多発性骨髄腫細胞株のT細胞媒介性BCMB72依存性細胞傷害。H929（図11A）、MM.1R（図11B）、RPMI 8226（図11C）、U266（図11D）、及びMv4-11（図11E）細胞を、6人の正常ドナー由来のT細胞（ドナー平均±SEMを示す）及びFcブロッcker（2mg/mL）の存在下で、提示した抗体濃度に48時間供した。EC₅₀値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log EC₅₀に関する95%信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。（対称であるため、Log EC₅₀に関する信頼区間を使用し、EC₅₀自体に関する信頼区間は使用しない。）+/-2未満の区間（又は4未満の95%信頼区間幅全体）を適切に考慮する。

【図10E】種々の多発性骨髄腫細胞株のT細胞媒介性BCMB72依存性細胞傷害。H

10

20

30

40

50

929(図11A)、MM.1R(図11B)、 RPMI 8226(図11C)、U266(図11D)、及びMv4-11(図11E)細胞を、6人の正常ドナー由来のT細胞(ドナー平均±SEMを示す)及びFcブロッカー(2mg/mL)の存在下で、提示した抗体濃度に48時間供した。EC₅₀値をグラフに示した。統計分析：モデル収束の単純な事実に加えて、Log EC₅₀に関する95%信頼区間の幅を考慮して、フィットの妥当性を評価する。(対称であるため、Log EC₅₀に関する信頼区間を使用し、EC₅₀自体に関する信頼区間は使用しない。)+/-2未満の区間(又は4未満の95%信頼区間幅全体)を適切に考慮する。

【図11A】複数の正常ドナー由来のT細胞を使用して2回の独立試験から得られたEC₅₀及び最大溶解値の概要。各細胞株及び各試験について個々のドナーの値及びドナーの平均値を示す。データなし=試験未実施、フィットなし=ソフトウェアの曲線作成不能、~値=モデル外挿に基づく近似値。

【図11B】複数の正常ドナー由来のT細胞を使用して2回の独立試験から得られたEC₅₀及び最大溶解値の概要。各細胞株及び各試験について個々のドナーの値及びドナーの平均値を示す。データなし=試験未実施、フィットなし=ソフトウェアの曲線作成不能、~値=モデル外挿に基づく近似値。

【図12A】H929細胞における細胞傷害性及びT細胞活性化。BCMA×CD3二重特異性抗体(BCM72の変異体分子)をT細胞媒介性細胞傷害アッセイで試験した。BCMA陽性細胞株(H929)を、正常ドナー(ドナーID:M5763及びM6576)由来の外来性ヒトT細胞の存在下で種々の抗体濃度を用いて48時間インキュベートした。48時間インキュベーション後、フローサイトメトリーに基づく方法(FACS)により細胞殺傷を測定し、細胞傷害性%として図12Aに報告した。図12Bは、T細胞表面上のCD25のアップレギュレーションにより評価したときのT細胞活性化を示す。概して、データ点は作成したフィット曲線に沿ってぴったり並び、T細胞ドナー及び繰り返し試験間のばらつきはほとんどなかった。

【図12B】H929細胞における細胞傷害性及びT細胞活性化。BCMA×CD3二重特異性抗体(BCM72の変異体分子)をT細胞媒介性細胞傷害アッセイで試験した。BCMA陽性細胞株(H929)を、正常ドナー(ドナーID:M5763及びM6576)由来の外来性ヒトT細胞の存在下で種々の抗体濃度を用いて48時間インキュベートした。48時間インキュベーション後、フローサイトメトリーに基づく方法(FACS)により細胞殺傷を測定し、細胞傷害性%として図12Aに報告した。図12Bは、T細胞表面上のCD25のアップレギュレーションにより評価したときのT細胞活性化を示す。概して、データ点は作成したフィット曲線に沿ってぴったり並び、T細胞ドナー及び繰り返し試験間のばらつきはほとんどなかった。

【図13】BCM72媒介性サイトカイン放出のEC₅₀値の概要。細胞傷害性試験(実施例12、図8参照)から得られたRPMI8226細胞の上清を収集し、MSDに基づく多重アッセイを使用して6つの異なるサイトカイン濃度について分析した。BCM72(BCMA×CD3)及びコントロール抗体(BCMA×無及び無×CD3)を種々の濃度で使用した。

【図14A】BCMA陽性H929細胞株を使用して、T細胞媒介性BCM72依存性細胞傷害アッセイを行った。複数の正常ドナー(代表として3人のドナーM7197、M5137、及びM6457の概要を示す)由来のT細胞及びFcブロッカー(2mg/mL)の存在下で、細胞を種々の濃度のBCM72に48時間供した。エフェクター/標的(E/T)比は5:1であった。図14Aは細胞傷害能を示し、右側の図14BはT細胞活性化曲線を示しており、これらの曲線はBCM72の種々のロット間で同様であった。

【図14B】BCMA陽性H929細胞株を使用して、T細胞媒介性BCM72依存性細胞傷害アッセイを行った。複数の正常ドナー(代表として3人のドナーM7197、M5137、及びM6457の概要を示す)由来のT細胞及びFcブロッcker(2mg/mL)の存在下で、細胞を種々の濃度のBCM72に48時間供した。エフェクター/標

10

20

30

40

50

的（E/T）比は5：1であった。図14Aは細胞傷害能を示し、右側の図14BはT細胞活性化曲線を示しており、これらの曲線はBCMB72の種々のロット間で同様であった。

【図15】H929細胞を、BCMB72（BCMA×CD3）及びコントロール抗体（BCMA×無及び無×CD3）を用いて上記グラフのX軸に示した用量で30分間処理し、全タンパク質をProtein Simpleユーザー・マニュアルのような標準プロトコルに従ってSimple Western分析法を使用して分析した。ハウスキーピング遺伝子としてアクチンを用いてデータを正規化し、比率をY軸にプロットした。APRIL及びBAFFは予想どおりP38のリン酸化を誘発し、抗体は試験したいずれの濃度でも刺激作用を有さなかった。

【図16A】BCMAを発現しているHEK-NF-B細胞（図16A、図16C、及び図16E）又は親細胞（図16B、図16D、及び図16F）をTNF 及び種々の濃度のAPRIL又はBCMB72で刺激した。3つの時間点、16時間（図16A及び図16B）、24時間（図16C及び図16D）、及び48時間（図16E及び図16F）を分析した。TNF は、HEK-Nf-kB親細胞及びHEK-NF-kB-BCMA細胞の両方でNF-kB活性化を誘発したが、APRILの誘発はBCMA特異性細胞腫のみに見られた。BCMB72は、親細胞株では効果を有しておらず、BCMA発現細胞では高濃度においてのみ活性化を示した。

【図16B】BCMAを発現しているHEK-NF-B細胞（図16A、図16C、及び図16E）又は親細胞（図16B、図16D、及び図16F）をTNF 及び種々の濃度のAPRIL又はBCMB72で刺激した。3つの時間点、16時間（図16A及び図16B）、24時間（図16C及び図16D）、及び48時間（図16E及び図16F）を分析した。TNF は、HEK-Nf-kB親細胞及びHEK-NF-kB-BCMA細胞の両方でNF-kB活性化を誘発したが、APRILの誘発はBCMA特異性細胞腫のみに見られた。BCMB72は、親細胞株では効果を有しておらず、BCMA発現細胞では高濃度においてのみ活性化を示した。

【図16C】BCMAを発現しているHEK-NF-B細胞（図16A、図16C、及び図16E）又は親細胞（図16B、図16D、及び図16F）をTNF 及び種々の濃度のAPRIL又はBCMB72で刺激した。3つの時間点、16時間（図16A及び図16B）、24時間（図16C及び図16D）、及び48時間（図16E及び図16F）を分析した。TNF は、HEK-Nf-kB親細胞及びHEK-NF-kB-BCMA細胞の両方でNF-kB活性化を誘発したが、APRILの誘発はBCMA特異性細胞腫のみに見られた。BCMB72は、親細胞株では効果を有しておらず、BCMA発現細胞では高濃度においてのみ活性化を示した。

【図16D】BCMAを発現しているHEK-NF-B細胞（図16A、図16C、及び図16E）又は親細胞（図16B、図16D、及び図16F）をTNF 及び種々の濃度のAPRIL又はBCMB72で刺激した。3つの時間点、16時間（図16A及び図16B）、24時間（図16C及び図16D）、及び48時間（図16E及び図16F）を分析した。TNF は、HEK-Nf-kB親細胞及びHEK-NF-kB-BCMA細胞の両方でNF-kB活性化を誘発したが、APRILの誘発はBCMA特異性細胞腫のみに見られた。BCMB72は、親細胞株では効果を有しておらず、BCMA発現細胞では高濃度においてのみ活性化を示した。

【図16E】BCMAを発現しているHEK-NF-B細胞（図16A、図16C、及び図16E）又は親細胞（図16B、図16D、及び図16F）をTNF 及び種々の濃度のAPRIL又はBCMB72で刺激した。3つの時間点、16時間（図16A及び図16B）、24時間（図16C及び図16D）、及び48時間（図16E及び図16F）を分析した。TNF は、HEK-Nf-kB親細胞及びHEK-NF-kB-BCMA細胞の両方でNF-kB活性化を誘発したが、APRILの誘発はBCMA特異性細胞腫のみに見られた。BCMB72は、親細胞株では効果を有しておらず、BCMA発現細胞では高濃度においてのみ活性化を示した。

10

20

30

40

50

【図16F】BCMAを発現しているHEK-NF-B細胞(図16A、図16C、及び図16E)又は親細胞(図16B、図16D、及び図16F)をTNF及び種々の濃度のAPRIL又はBCMB72で刺激した。3つの時間点、16時間(図16A及び図16B)、24時間(図16C及び図16D)、及び48時間(図16E及び図16F)を分析した。TNFは、HEK-Nf-kB親細胞及びHEK-NF-kB-BCMA細胞の両方でNF-kB活性化を誘発したが、APRILの誘発はBCMA特異性細胞腫のみに見られた。BCMB72は、親細胞株では効果を有しておらず、BCMA発現細胞では高濃度においてのみ活性化を示した。

【図17A】T細胞は、sBCMA媒介性及びBCMB72依存性活性化を示さない。BCMB72(図17A)及び無×CD3コントロール抗体(図17B)を、種々の用量の可溶性BCMA-ECDの存在下で2人の正常ドナー(M7077及びM5137)由來のT細胞で用量設定した。データ：平均±SEM。

【図17B】T細胞は、sBCMA媒介性及びBCMB72依存性活性化を示さない。BCMB72(図17A)及び無×CD3コントロール抗体(図17B)を、種々の用量の可溶性BCMA-ECDの存在下で2人の正常ドナー(M7077及びM5137)由來のT細胞で用量設定した。データ：平均±SEM。

【図18A】H929細胞でのBCMB72のT細胞活性化及びT細胞媒介性細胞傷害能における可溶性因子、sBCMA、APRIL、及びBAFFの影響。ドナーT細胞(M7077&M6521)及びBCMB72を使用して、細胞を殺傷アッセイに48時間供した。標的細胞傷害性を左側のグラフに示し、T細胞活性化を右側のグラフに示す(n=2)。各処理のEC₅₀値を凡例内に示す。sBCMA(図18A)、APRIL(図18B)、及びBAFF(図18C)の存在下における細胞傷害性を示す。sBCMA(図18D)、APRIL(図18E)、及びBAFF(図18F)の存在下におけるT細胞活性化を示す。データ：平均±SEM。

【図18B】H929細胞でのBCMB72のT細胞活性化及びT細胞媒介性細胞傷害能における可溶性因子、sBCMA、APRIL、及びBAFFの影響。ドナーT細胞(M7077&M6521)及びBCMB72を使用して、細胞を殺傷アッセイに48時間供した。標的細胞傷害性を左側のグラフに示し、T細胞活性化を右側のグラフに示す(n=2)。各処理のEC₅₀値を凡例内に示す。sBCMA(図18A)、APRIL(図18B)、及びBAFF(図18C)の存在下における細胞傷害性を示す。sBCMA(図18D)、APRIL(図18E)、及びBAFF(図18F)の存在下におけるT細胞活性化を示す。データ：平均±SEM。

【図18C】H929細胞でのBCMB72のT細胞活性化及びT細胞媒介性細胞傷害能における可溶性因子、sBCMA、APRIL、及びBAFFの影響。ドナーT細胞(M7077&M6521)及びBCMB72を使用して、細胞を殺傷アッセイに48時間供した。標的細胞傷害性を左側のグラフに示し、T細胞活性化を右側のグラフに示す(n=2)。各処理のEC₅₀値を凡例内に示す。sBCMA(図18A)、APRIL(図18B)、及びBAFF(図18C)の存在下における細胞傷害性を示す。sBCMA(図18D)、APRIL(図18E)、及びBAFF(図18F)の存在下におけるT細胞活性化を示す。データ：平均±SEM。

【図18D】H929細胞でのBCMB72のT細胞活性化及びT細胞媒介性細胞傷害能における可溶性因子、sBCMA、APRIL、及びBAFFの影響。ドナーT細胞(M7077&M6521)及びBCMB72を使用して、細胞を殺傷アッセイに48時間供した。標的細胞傷害性を左側のグラフに示し、T細胞活性化を右側のグラフに示す(n=2)。各処理のEC₅₀値を凡例内に示す。sBCMA(図18A)、APRIL(図18B)、及びBAFF(図18C)の存在下における細胞傷害性を示す。sBCMA(図18D)、APRIL(図18E)、及びBAFF(図18F)の存在下におけるT細胞活性化を示す。データ：平均±SEM。

【図18E】H929細胞でのBCMB72のT細胞活性化及びT細胞媒介性細胞傷害能における可溶性因子、sBCMA、APRIL、及びBAFFの影響。ドナーT細胞(M

10

20

30

40

50

7077 & M6521) 及び BCMB72 を使用して、細胞を殺傷アッセイに 48 時間供した。標的細胞傷害性を左側のグラフに示し、T 細胞活性化を右側のグラフに示す (n = 2)。各処理の EC₅₀ 値を凡例内に示す。sBCMA (図 18A)、APRIL (図 18B)、及び BAFF (図 18C) の存在下における細胞傷害性を示す。sBCMA (図 18D)、APRIL (図 18E)、及び BAFF (図 18F) の存在下における T 細胞活性化を示す。データ：平均 ± SEM。

【図 18F】H929 細胞での BCMB72 の T 細胞活性化及び T 細胞媒介性細胞傷害能における可溶性因子、sBCMA、APRIL、及び BAFF の影響。ドナー T 細胞 (M7077 & M6521) 及び BCMB72 を使用して、細胞を殺傷アッセイに 48 時間供した。標的細胞傷害性を左側のグラフに示し、T 細胞活性化を右側のグラフに示す (n = 2)。各処理の EC₅₀ 値を凡例内に示す。sBCMA (図 18A)、APRIL (図 18B)、及び BAFF (図 18C) の存在下における細胞傷害性を示す。sBCMA (図 18D)、APRIL (図 18E)、及び BAFF (図 18F) の存在下における T 細胞活性化を示す。データ：平均 ± SEM。

【図 19A】2 回の独立試験から得られたシグナルを、競合抗体の不在下で APRIL 及び BAFF に結合する BCMA - Fc の最大シグナルに正規化した。APRIL (図 19A) 及び BAFF (図 19B) に結合する BCMA を、BCMB72 及びコントロール抗体 (無 × CD3) 濃度の関数としてプロットした。

【図 19B】2 回の独立試験から得られたシグナルを、競合抗体の不在下で APRIL 及び BAFF に結合する BCMA - Fc の最大シグナルに正規化した。APRIL (図 19A) 及び BAFF (図 19B) に結合する BCMA を、BCMB72 及びコントロール抗体 (無 × CD3) 濃度の関数としてプロットした。

【図 20A】ヒト初代 MM 形質細胞に対する BCMB72 の細胞傷害能。5人の異なる患者から得られた凍結骨髄由来単核細胞 (MM240BM (図 20A)、MM259BM (図 20B)、MM270BM (図 20C)、MM276BM (図 20D)、及び MM277BM (図 20E)) を使用して、IgG4 アイソタイプ (CNTO 9412、左パネル) コントロールと比較した BCMB72 の結合性、形質細胞の細胞傷害性 (中)、及び T 細胞活性化 (右) を評価した。細胞傷害アッセイについては、M7077 正常健康ドナー由来の T 細胞を患者 BMMC サンプルに外部添加し、BCMB72 (BCMA × CD3)、BC3B4 (BCMA × 無)、又は CNTO7008 (無 × CD3) を用いて 48 時間インキュベートした。BCMB72 は、全てのドナーサンプルに対して用量依存的に形質細胞に結合し、その平均蛍光強度を Y 軸に記録した。BCMB72 の処理に反応した生存形質細胞 (CD138⁺) の喪失及び T 細胞上の CD25 の随伴的なアップレギュレーションに注目されたい。T 細胞活性化の EC₅₀ 値をグラフに示す。

【図 20B】ヒト初代 MM 形質細胞に対する BCMB72 の細胞傷害能。5人の異なる患者から得られた凍結骨髄由来単核細胞 (MM240BM (図 20A)、MM259BM (図 20B)、MM270BM (図 20C)、MM276BM (図 20D)、及び MM277BM (図 20E)) を使用して、IgG4 アイソタイプ (CNTO 9412、左パネル) コントロールと比較した BCMB72 の結合性、形質細胞の細胞傷害性 (中)、及び T 細胞活性化 (右) を評価した。細胞傷害アッセイについては、M7077 正常健康ドナー由来の T 細胞を患者 BMMC サンプルに外部添加し、BCMB72 (BCMA × CD3)、BC3B4 (BCMA × 無)、又は CNTO7008 (無 × CD3) を用いて 48 時間インキュベートした。BCMB72 は、全てのドナーサンプルに対して用量依存的に形質細胞に結合し、その平均蛍光強度を Y 軸に記録した。BCMB72 の処理に反応した生存形質細胞 (CD138⁺) の喪失及び T 細胞上の CD25 の随伴的なアップレギュレーションに注目されたい。T 細胞活性化の EC₅₀ 値をグラフに示す。

【図 20C】ヒト初代 MM 形質細胞に対する BCMB72 の細胞傷害能。5人の異なる患者から得られた凍結骨髄由来単核細胞 (MM240BM (図 20A)、MM259BM (図 20B)、MM270BM (図 20C)、MM276BM (図 20D)、及び MM277BM (図 20E)) を使用して、IgG4 アイソタイプ (CNTO 9412、左パネル)

ル)コントロールと比較したBCMB72の結合性、形質細胞の細胞傷害性(中)、及びT細胞活性化(右)を評価した。細胞傷害アッセイについては、M7077正常健康ドナー由来のT細胞を患者BMMCサンプルに外部添加し、BCMB72(BCMA×CD3)、BC3B4(BCMA×無)、又はCNTO7008(無×CD3)を用いて48時間インキュベートした。BCMB72は、全てのドナーサンプルに対して用量依存的に形質細胞に結合し、その平均蛍光強度をY軸に記録した。BCMB72の処理に反応した生存形質細胞(CD138⁺)の喪失及びT細胞上のCD25の随伴的なアップレギュレーションに注目されたい。T細胞活性化のEC₅₀値をグラフに示す。

【図20D】ヒト初代MM形質細胞に対するBCMB72の細胞傷害能。5人の異なる患者から得られた凍結骨髄由来単核細胞(MM240BM(図20A)、MM259BM(図20B)、MM270BM(図20C)、MM276BM(図20D)、及びMM277BM(図20E))を使用して、IgG4アイソタイプ(CNTO9412、左パネル)コントロールと比較したBCMB72の結合性、形質細胞の細胞傷害性(中)、及びT細胞活性化(右)を評価した。細胞傷害アッセイについては、M7077正常健康ドナー由来のT細胞を患者BMMCサンプルに外部添加し、BCMB72(BCMA×CD3)、BC3B4(BCMA×無)、又はCNTO7008(無×CD3)を用いて48時間インキュベートした。BCMB72は、全てのドナーサンプルに対して用量依存的に形質細胞に結合し、その平均蛍光強度をY軸に記録した。BCMB72の処理に反応した生存形質細胞(CD138⁺)の喪失及びT細胞上のCD25の随伴的なアップレギュレーションに注目されたい。T細胞活性化のEC₅₀値をグラフに示す。

【図20E】ヒト初代MM形質細胞に対するBCMB72の細胞傷害能。5人の異なる患者から得られた凍結骨髄由来単核細胞(MM240BM(図20A)、MM259BM(図20B)、MM270BM(図20C)、MM276BM(図20D)、及びMM277BM(図20E))を使用して、IgG4アイソタイプ(CNTO9412、左パネル)コントロールと比較したBCMB72の結合性、形質細胞の細胞傷害性(中)、及びT細胞活性化(右)を評価した。細胞傷害アッセイについては、M7077正常健康ドナー由来のT細胞を患者BMMCサンプルに外部添加し、BCMB72(BCMA×CD3)、BC3B4(BCMA×無)、又はCNTO7008(無×CD3)を用いて48時間インキュベートした。BCMB72は、全てのドナーサンプルに対して用量依存的に形質細胞に結合し、その平均蛍光強度をY軸に記録した。BCMB72の処理に反応した生存形質細胞(CD138⁺)の喪失及びT細胞上のCD25の随伴的なアップレギュレーションに注目されたい。T細胞活性化のEC₅₀値をグラフに示す。

【図21】H929予防モデルにおけるBCMB72のインビボでの有効性。

【図22】H929異種移植マウスにおける血清可溶性BCMA濃度。ヒトBCMAELISAキット(R&D Systems)を使用して、血清可溶性BCMA濃度を検出した。可溶性BCMA濃度は、これらの動物における腫瘍の負担とよく相關するPBSコントロールと比較して、BCMB72の1μg及び0.5μg/マウスを用いたマウス治療で著しく低かった。より低用量のBCMB72(0.1μg/マウス)は、sBCMA濃度又は腫瘍サイズに効果がなかった。

【発明を実施するための形態】

【0047】

定義

本明細書及び特許請求の範囲を通して本明細書の諸態様に関する様々な用語が使用される。別途記載のない限り、そのような用語には、当該技術分野におけるそれらの通常の意味が与えられるものとする。その他の具体的に定義される用語は、本明細書に提供される定義と一致する様式で解釈されるものとする。

【0048】

本明細書及び添付の「特許請求の範囲」において使用されるとき、単数形「a」、「a n」及び「t h e」は、その内容について別段の明確な指示がない限り、複数の指示対象を包含する。したがって、例えば、「細胞(a cell)」という言及には、2つ以上の細胞

10

20

30

40

50

の組み合わせ、及びこれに類するものなどを含む。

【 0 0 4 9 】

本明細書で使用されるとき、測定値、例えば、量、持続時間等に言及する場合の「約」という用語は、指定された値から最大±10%の偏差を包含することを意味する。同様に、このような偏差は、開示された方法を行うのに適している。別途記載のない限り、本明細書及び特許請求の範囲において使用される成分、分子量、反応条件等の特性の量を表わす全ての数字は、「約」という用語により、全ての事例において修飾されていると理解されたい。したがって、そうではないと示されない限り、下記明細書及び添付の特許請求の範囲で説明された数値パラメータは、本発明により得られるのが求められる所望の特性に応じて変動する場合がある近似値である。最低でも、特許請求の範囲の範囲に対して均等論の適用を制限することを試みてはならず、各数値パラメータは、報告された有効桁の数字を考慮し、通常の四捨五入の手法を適用することにより、少なくとも解釈されるべきである。

10

【 0 0 5 0 】

本発明の広い範囲を説明する数値範囲及びパラメータは近似値であるが、特定の実施例中で説明された数値は、可能な限り正確に報告される。ただし、任意の数値は、各試験測定において見出される標準偏差を必然的に生じる、一定の誤差を本質的に含有する。

【 0 0 5 1 】

「単離された」は、生物学的成分（例えば、核酸、ペプチド、又はタンパク質）が、これらの成分が本来存在する生物の他の生物学的成分、すなわち、他の染色体及び染色体外DNA及びRNA、並びにタンパク質から、実質的に分離され、同他の成分とは別に生成され、又は同他の成分から離して精製されていることを意味する。このため、「単離」されている核酸、ペプチド、及びタンパク質は、標準的な精製法により精製された核酸及びタンパク質を含む。「単離された」核酸、ペプチド、及びタンパク質は、組成物の一部であることができ、このような組成物が核酸、ペプチド、又はタンパク質の本来の環境の一部ではない場合であっても単離されている。また、この用語は、宿主細胞中の組換え発現により調製された核酸、ペプチド、及びタンパク質、並びに化学合成された核酸も包含する。本明細書で使用されるとき、「単離された」抗体又は抗原結合フラグメントは、種々の抗原特異性を有する他の抗体又は抗原結合フラグメントを実質的に含まない抗体又は抗原結合フラグメントを意味することを意図している（例えば、BCMAに特異的に結合する単離された抗体は、BCMA以外の抗原に特異的に結合する抗体を実質的に含まない）。ただし、BCMAのエピトープ、アイソフォーム、又は変異体に特異的に結合する単離された抗体は、例えば、他の種に由来する他の関連する抗原（例えば、BCMA種間ホモログ）に対する交差反応性を有してもよい。

20

【 0 0 5 2 】

「ポリヌクレオチド」は、同義的に「核酸分子」、「ヌクレオチド」、又は「核酸」と呼ばれ、非修飾RNA若しくはDNA又は修飾RNA若しくはDNAでもよい、任意のポリリボヌクレオチド又はポリデオキシリボヌクレオチドを意味する。「ポリヌクレオチド」には、一本鎖及び二本鎖DNA、一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であるDNA、一本鎖及び二本鎖RNA、並びに一本鎖及び二本鎖の領域の混合物であるRNA、DNA及びRNAを含むハイブリッド分子（一本鎖、又はより典型的には、二本鎖、又は一本鎖及び二本鎖の領域の混合物でもよい）が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、「ポリヌクレオチド」は、RNA若しくはDNA又はRNA及びDNAの両方を含む三本鎖領域を意味する。用語、ポリヌクレオチドには、1つ以上の修飾塩基を含有するDNA又はRNA、及び安定性若しくは他の理由により修飾された主鎖を有するDNA又はRNAも含む。「修飾」塩基は、例えば、トリチル化塩基及び異常な塩基、例えば、イノシンを含む。各種の修飾が、DNA及びRNAになされてもよい。したがって、「ポリヌクレオチド」は、典型的に天然に認められるポリヌクレオチドの化学的、酵素的又は代謝的に修飾された形態、並びにウイルス及び細胞のDNA及びRNAの特徴を有する化学的形態を包含する。「ポリヌクレオチド」はまた、比較的短い核酸鎖（多くの場合、オリゴヌクレオ

30

40

50

チドと呼ばれる)も包含する。

【0053】

「実質的に同じ」の意味は、この用語が使用される文脈に応じて異なる場合がある。天然の配列バリエーションが重鎖及び軽鎖並びにこれらをコードする遺伝子中におそらく存在するために、幾らかのレベルのバリエーションが本明細書に記載されたアミノ酸配列又は抗体若しくは抗原結合フラグメントをコードする遺伝子内に見出されると予測されるであろう。ただし、固有の結合特性(例えば、特異性及び親和性)にはほとんど影響しないか、又は影響しない。このような予測は、部分的には、遺伝暗号の縮重及び保存的アミノ酸配列バリエーションの進化的成功による。同バリエーションは、コードされたタンパク質の性質を認識できるほどには変更させない。したがって、核酸配列の文脈において、「実質的に同じ」は、2つ以上の配列間での少なくとも65%の同一性を意味する。好ましくは、この用語は、2つ以上の配列間での少なくとも70%の同一性、より好ましくは、少なくとも75%の同一性、より好ましくは、少なくとも80%の同一性、より好ましくは、少なくとも85%の同一性、より好ましくは、少なくとも90%の同一性、より好ましくは、少なくとも91%の同一性、より好ましくは、少なくとも92%の同一性、より好ましくは、少なくとも93%の同一性、より好ましくは、少なくとも94%の同一性、より好ましくは、少なくとも95%の同一性、より好ましくは、少なくとも96%の同一性、より好ましくは、少なくとも97%の同一性、より好ましくは、少なくとも98%の同一性、及びより好ましくは、少なくとも99%以上の同一性を意味する。2つの配列間の同一性パーセントは、ギャップ数及び各ギャップの長さを考慮して、配列により共有される同一の位置の数の関数である(すなわち、相同性の割合(%) = 同一位置数 / 位置の総数 × 100)。同考慮は、2つの配列の最適なアライメントを導くのに必要である。2つのヌクレオチド又はアミノ酸配列間の同一性パーセントは、例えば、E. Meyers and W. Miller, Comput. Appl. Biosci. 4, 11~17 (1988) のアルゴリズムを使用して決定されてもよい。同アルゴリズムは、ALIGNプログラム(バージョン2.0)に組み込まれており、PAM120重み付け残基テーブル、ギャップ長ペナルティ12、及びギャップペナルティ4を使用する。加えて、2つのアミノ酸配列間の同一性パーセントは、Needleman and Wunsch, J. Mol. Biol. 48, 444~453 (1970) のアルゴリズムを使用して決定されてもよい。

【0054】

タンパク質の機能に実質的な影響を有することなく、タンパク質のアミノ酸配列内に生じ得るバリエーションの度合いは、核酸配列のバリエーションの度合いより非常に小さい。これは、同じ縮重原理がアミノ酸配列には適用しないためである。したがって、抗体又は抗原結合フラグメントの文脈において、「実質的に同じ」は、記載された抗体又は抗原結合フラグメントに対して、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する抗体又は抗原結合フラグメントを意味する。他の実施形態は、本明細書に記載された抗体及び抗原結合フラグメントと顕著な同一性を共有しないが、1つ又は2つ以上のCDR又は結合性を付与するのに必要とされる他の配列を組み込む、フレームワーク、スキャフォールド、又は他の非結合領域を有し、本明細書に記載されたこのような配列に対して、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、又は99%の同一性を有する、BCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントを含む。

【0055】

「ベクター」とは、セグメントの複製又は発現をもたらすように、別の核酸セグメントを操作的に挿入可能な、レプリコン、例えば、プラスミド、ファージ、コスミド又はウイルスのことである。

【0056】

「クローン」は、有糸分裂により、単一の細胞又は共通する祖先から得られる細胞集団である。「細胞株」は、多くの世代の間、インビトロにおいて安定して増殖させることが

10

20

30

40

50

できる初代細胞のクローンである。本明細書で提供された一部の例では、細胞は、細胞をDNAでトランスフェクションすることにより、形質転換される。

【0057】

「発現する」及び「生成する」という用語は、本明細書において同義的に使用され、遺伝子産物の生合成を意味する。これらの用語は、遺伝子のRNAへの転写を包含する。また、これらの用語は、RNAの1つ又は2つ以上のポリペプチドへの翻訳を包含し、全ての天然の転写後及び翻訳後修飾を更に包含する。抗体又はその抗原結合フラグメントの発現又は生成は、細胞の細胞質内、又は細胞外環境、例えば、細胞培養の増殖培地内でもよい。

【0058】

「処置すること」又は「処置」という用語は、損傷、病理、又は病状の減弱又は改善における、何らかの成功又は成功の兆候を指し、これには、寛解、緩解、症状の減少、病状を患者にとってより許容できるものにすること、変性又は低落速度を遅くすること、変性による最終的な衰弱を和らげること、患者の肉体的又は精神的健康を改善すること、あるいは生存期間の長さを延長することなどの、何らかの客観的又は主観的パラメータを含む。治療は、客観的又は主観的なパラメータにより評価されてもよい。同パラメータには、身体的検査、神経学的検査、又は精神医学評価の結果が挙げられる。

10

【0059】

「有効量」又は「治療的に有効な量」は、必要とされる用量及び期間において、所望の治療結果を達成するのに有効な量を意味する。治療的に有効な量のBCMA×CD3抗体は、個体の病態、年齢、性別、及び体重、並びに個体における所望の応答を引き出す抗体の能力等の要因に従って変動し得る。治療的に有効な量はまた、抗体又は抗体部分の任意の毒性又は有害作用より、治療的に有益な作用が上回る量でもある。

20

【0060】

「抗体」は、特に断らない限り、免疫グロブリンの全てのアイソタイプ(IgG、IgA、IgE、IgM、IgD、及びIgY)を意味し、種々の単量体、多量体、及びキメラ型を含む。ポリクローナル抗体、モノクローナル抗体(mAb)、及び抗体様ポリペプチド、例えば、キメラ抗体及びヒト化抗体が、「抗体」という用語に具体的に包含される。

30

【0061】

「抗原結合フラグメント」は、特定の抗原に対して結合親和性を示し得る、任意のタンパク質性構造体である。抗原結合フラグメントは、任意の既知の手法、例えば、酵素開裂、ペプチド合成、及び組換え手法により提供されたものを含む。一部の抗原結合フラグメントは、親抗体分子の抗原結合特異性を保持しているインタクトな抗体の一部から構成される。例えば、抗原結合フラグメントは、特定の抗原に結合することが既知である抗体の、少なくとも1つの可変領域(重鎖若しくは軽鎖の可変領域のいずれか一方)、又は1つ若しくは2つ以上のCDRを含んでもよい。適切な抗原結合フラグメントの例には、ディアボディ及び一本鎖分子、並びにFab、F(ab')2、Fc、Fabc、及びFv分子、一本鎖(sc)抗体、個々の抗体軽鎖、個々の抗体重鎖、抗体鎖若しくはCDRと他のタンパク質との間でのキメラ融合体、タンパク質スキャフォールド、重鎖単量体若しくは二量体、軽鎖単量体若しくは二量体、1本の重鎖と1本の軽鎖とからなる二量体、VL、VH、CL、及びCH1ドメインからなる一価フラグメント、国際公開第2007059782号に記載された一価抗体、ヒンジ領域においてジスルフィド結合により連結された2つのFabフラグメントを含む二価フラグメント、V.sub.H及びC.sub.H1ドメインから本質的になるFdフラグメント、抗体の1つのアームのVL及びVHドメインから本質的になるFvフラグメント、VHドメインから本質的になり、ドメイン抗体とも呼ばれる(Holt et al, Trends Biotechnol. 2003 Nov., 21(11): 484~90) Fabフラグメント(Ward et al., Nature 341, 544~546 (1989))、ラクダ若しくはナノボディ(Revets et al, Expert Opin Biol Ther. 2005

40

50

5 Jan.、5(1):111~24)、単離された相補性決定領域(CDR)等が挙げられるが、これらに限定されない。全ての抗体アイソタイプが、抗原結合フラグメントを生成するのに使用されてもよい。加えて、抗原結合フラグメントは、対象となる所与の抗原に対する親和性を付与する方向にポリペプチドセグメントをうまく包含させ得る、非抗体タンパク質性フレームワーク、例えば、タンパク質スキヤフォールドを含んでもよい。抗原結合フラグメントは、組換的に生成されてもよく、又はインタクトな抗体の酵素的若しくは化学的開裂により生成されてもよい。「抗体又はその抗原結合フラグメント」という語句は、所与の抗原結合フラグメントが、語句内で言及された抗体の1つ又は2つ以上のアミノ酸セグメントを包含することを意味するように使用され得る。

【0062】

10

「エピトープ」という用語は、抗体に対する特異的結合が可能なタンパク質決定因子を意味する。エピトープは、通常、分子の表面グルーピング、例えば、アミノ酸又は糖側鎖からなり、通常、特定の三次元構造特性並びに特定の荷電特性を有する。構造的及び非構造的エピトープは、後者ではなく前者に対する結合が、変性溶媒の存在下で損失するという点で区別される。エピトープは、結合に直接関与するアミノ酸残基と、結合に直接関与しない他のアミノ酸残基、例えば、特異的に抗原に結合するペプチドにより効果的にプロックされるか、又は覆われるアミノ酸残基(すなわち、アミノ酸残基が、特異的に抗原に結合するペプチドのフットプリント内にある)とを含んでもよい。

【0063】

20

抗体又は抗体フラグメントの文脈において使用されるとき、「特異的な結合」若しくは「免疫特異的な結合」又はそれらの派生語は、免疫グロブリン遺伝子又は免疫グロブリン遺伝子のフラグメントによりコードされたドメインを介して、分子の混合集団を含有するサンプル中の他の分子に優先的に結合することなく、対象となるタンパク質の1つ又は2つ以上のエピトープに結合することを表わす。典型的には、抗体は、表面プラズモン共鳴アッセイ又は細胞結合アッセイにより測定された場合、約 1×10^{-8} M未満の K_d で、同じ性質の抗原に結合する。「[抗原]特異性」抗体(例えば、BCMA特異性抗体)等の表現は、列挙された抗体が列挙された抗原に特異的に結合することを伝達することを意味する。

【0064】

30

本明細書で使用されるとき、「 K_d 」という用語は、特定の抗体-抗原相互作用の解離平衡定数を意味する。

【0065】

「対象」という用語は、ヒト及び非ヒト動物を意味し、全ての脊椎動物、例えば、哺乳類及び非哺乳類、例えば、非ヒト靈長類、マウス、ウサギ、ヒツジ、イヌ、ネコ、ウマ、ウシ、ニワトリ、両生類、及び爬虫類を意味する。記載された方法の多くの実施形態において、対象はヒトである。

【0066】

40

本明細書で使用されるとき、「サンプル」という用語は、対象から単離された、類似する流体、細胞、又は組織(例えば、外科手術的に切除された腫瘍組織、微小針吸引を含む生検)の収集物、並びに対象内に存在する流体、細胞、又は組織を意味する。一部の実施形態では、サンプルは、体液である。体液は、典型的には、生理学的温度において液体であり、対象又は生物学的ソース中に存在し、これらから採取され、これらから外に出され、又は他の方法で抽出された自然発生する流体を含んでもよい。特定の組織、臓器、又は局所的な領域から得られた特定の体液及び特定の他の体液は、対象又は生物学的ソースにおいて、より全体的に又は全身的に適していてもよい。体液の例には、血液、血清及び漿膜液、血漿、リンパ、尿、唾液、囊胞液、涙、糞、痰、分泌組織及び臓器の粘膜分泌物、膣分泌物、腹水液、例えば、非固体腫瘍に関連するもの、肋膜、心膜、腹膜、腹部及び他の体腔の流体、気管支洗浄により収集された流体等が挙げられる。体液はまた、対象又は生物学的ソースと接触した溶液、例えば、細胞又は臓器順化培地を含む細胞及び臓器培養培地、洗浄液等を含んでもよい。本明細書で使用されるとき、「サンプル」という用語は

50

、対象から取り出された材料又は対象中に存在する材料を包含する。

【0067】

「既知の標準」は、既知の量又は濃度のBCMAを有する溶液でもよい。この場合、この溶液は、自然発生する溶液、例えば、初期、中期、後期、進行性、又は静的がんを有することが既知の患者からのサンプルでもよく、又はこの溶液は、希釈された既知の量のBCMAを有する緩衝水等の合成溶液でもよい。本明細書に記載された既知の標準は、対象から単離されたBCMA、組換え若しくは精製されたBCMAタンパク質、又は病態に関連するBCMA濃度の値を含んでもよい。

【0068】

本明細書で使用されるとき、「BCMA」という用語は、ヒトB細胞成熟抗原を意味し、BCMA、CD269、及びTNFRSF17(UniProt Q02223)としても周知であり、分化形質細胞に優先的に発現される腫瘍壞死受容体スーパーファミリーのメンバーである。ヒトBCMAの細胞外ドメインは、UniProtのアミノ酸1~54(又は5~51)により構成される。本明細書で使用されるとき、「BCMAに対する抗体、抗BCMA抗体」という用語は、BCMAに免疫特異的に結合する抗体を意味する。

10

【0069】

「CD3」という用語は、ヒトCD3タンパク質マルチサブユニット複合体を意味する。CD3タンパク質マルチサブユニット複合体は、6つの区別できるポリペプチド鎖から構成される。これらは、CD3鎖(SwissProt P09693)、CD3鎖(SwissProt P04234)、2つのCD3鎖(SwissProt P07766)、及び1つのCD3鎖ホモ二量体(SwissProt 20963)を含み、T細胞受容体及び鎖と会合する。「CD3」という用語は、特に断らない限り、細胞(T細胞を含む)により本来発現されているか、又はそれらのポリペプチドをコードする遺伝子若しくはcDNAによりトランスフェクションされた細胞上に発現され得る任意のCD3変異体、アイソフォーム、及び種間ホモログを含む。

20

【0070】

「BCMA×CD3抗体」は、多重特異性抗体、場合により、二重特異性抗体であり、同二重特異性抗体は、2種類の異なる抗原結合領域を含み、一方の抗原結合領域は、抗原BCMAに特異的に結合し、もう一方の抗原結合領域は、CD3に特異的に結合する。多重特異性抗体は、二重特異性抗体、ディアボディ、又は類似する分子であり得る(ディアボディの説明については、例えば、PNAS USA 90(14), 6444~8(1993)を参照のこと)。本明細書で提供された二重特異性抗体、ディアボディ等は、BCMAの一部に加えて、任意の適切な標的に結合してもよい。「二重特異性抗体」という用語は、異なる抗体配列により定義された、2種類の抗原結合領域を有する抗体と理解されたい。これは、異なる標的結合と理解され得るが、1つの標的中の異なるエピトープに十分結合することを含む。

30

【0071】

「参照サンプル」は、別のサンプル、例えば、試験サンプルに対して比較され、比較されたサンプルの特徴を決定することができるサンプルである。参照サンプルは、試験サンプルとの比較の基礎として機能する、いくつかの特徴付けられた特性を有するであろう。例えば、参照サンプルは、がんを有する対象を示すBCMAレベルについてのベンチマークとして使用することができる。参照サンプルは、試験サンプルと平行して解析されることを必ずしも必要としない。このため、一部の例では、参照サンプルは、所与の条件を特徴付けるために予め決定された数値又は範囲、例えば、対象中のがんを示すBCMAレベルでもよい。この用語はまた、生理学的状態又は病態、例えば、BCMA発現がんに関連することが周知であるが、未知量のBCMAを有する、比較目的で使用されるサンプルを含む。

40

【0072】

BCMA発現がんの進行の文脈において使用されるとき、「進行」という用語は、より

50

重篤でない状態からより重篤な状態へのがんの変化を含む。これは、腫瘍の数又は重症度、転移の程度、がんが成長又は増殖する速度等の増大を含むことができる。例えば、「結腸がんの進行」には、このようながんの、より重篤でない状態からより重篤な状態への進行、例えば、ステージⅠからステージⅠⅠへ、ステージⅠⅠからステージⅠⅡへ等の進行が挙げられる。

【0073】

B C M A 発現がんの退行の文脈において使用されるとき、「退行」という用語は、より重篤な状態からより重篤でない状態へのがんの変化を含む。これは、腫瘍の数又は重症度、転移の程度、がんが成長又は増殖する速度等の低下を含むことができると考えられる。例えば、「結腸がんの退行」には、このようながんの、より重篤な状態からより重篤でない状態への退行、例えば、ステージⅠⅡからステージⅠⅠへ、ステージⅠⅠからステージⅠへ等の進行が挙げられる。

10

【0074】

安定したB C M A 発現がんの文脈において使用されるとき、「安定した」という用語は、進行性がん又は退行性がんであるとみなすのに臨床的意義のある期間にわたり有意に十分に変化しない、又は変化していなかった病態を説明することを意図している。

【0075】

本明細書に記載された実施形態は、特定の方法、試薬、化合物、組成物、又は生物系に限定されるものではなく、当然、変動し得る。

20

【0076】

B C M A 特異性抗体及び抗原結合フラグメント

本明細書において、B C M A に特異的に結合する、組換えモノクローナル抗体又は抗原結合フラグメントが記載されている。抗体分子の全体的な構造は、抗原結合ドメインを含む。同ドメインは、重鎖及び軽鎖並びにFcドメインを含み、補体固定及び結合抗体受容体を含む各種の機能を果たす。

30

【0077】

記載されたB C M A 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、全てのアイソタイプである、IgA、IgD、IgE、IgG、及びIgM、並びに4本鎖免疫グロブリン構造の合成多量体を含む。記載された抗体又は抗原結合フラグメントはまた、雌鳥又はシチメンチョウの血清及び雌鳥又はシチメンチョウの卵黄中に一般的に見出されるIgYアイソタイプも含む。

【0078】

B C M A 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、任意の種から組換え手法により得ることができる。例えば、抗体又は抗原結合フラグメントは、マウス、ラット、ヤギ、ウマ、ブタ、ウシ、ニワトリ、ウサギ、ラクダ、ロバ、ヒト、又はそれらのキメラ版でもよい。ヒトへの投与において使用するために、非ヒト由来の抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトの患者への投与に基づいてほとんど抗原性がないように、遺伝的に又は構造的に改変することができる。

40

【0079】

一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントはキメラである。本明細書で使用されるとき、「キメラ」という用語は、非ヒト哺乳類、げっ歯類、又は爬虫類の抗体アミノ酸配列に由来する少なくとも1つの可変ドメインの少なくとも一部の部分を有するが、抗体又はその抗原結合フラグメントの残り部分がヒトに由来する、抗体又はその抗原結合フラグメントを意味する。

【0080】

一部の実施形態では、抗体は、ヒト化抗体である。ヒト化抗体は、非ヒト免疫グロブリンから得られた最少配列を含有する、キメラ免疫グロブリン、その免疫グロブリン鎖、又はフラグメント（例えば、Fv、Fab、Fab'、F(ab')2、又は抗体の他の抗原結合部分配列）でもよい。大部分は、ヒト化抗体は、レシピエントの相補性決定領域（CDR）からの残基が所望の特異性、親和性、及び能力を有する非ヒト種（ドナー抗体）

50

、例えば、マウス、ラット、又はウサギからの残基により置き換えられているヒト免疫グロブリン（レシピエント抗体）である。一般的には、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的に全てを含むこととなる。同可変ドメイン中、全て又は実質的に全てのCDR領域は、非ヒト免疫グロブリンのCDR領域に対応し、全て又は実質的に全てのフレームワーク領域は、ヒト免疫グロブリン配列のフレームワーク領域である。ヒト化抗体は、免疫グロブリン定常領域（Fc）、典型的には、ヒト免疫グロブリンのうち少なくとも一部を含んでもよい。

【0081】

本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントは、各種の形態で存在し得るが、表1に示された抗体CDRのうち1つ又は2つ以上を含むこととなる。

10

【0082】

本明細書において、BCMAに免疫特異的に結合する、組換え抗体及び抗原結合フラグメントが記載されている。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトIgG又はその誘導体である。本明細書で例示されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトであるが、例示された抗体又は抗原結合フラグメントは、キメラ化されてもよい。

【0083】

一部の実施形態では、表1に記載された抗体のうちいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖を含む、BCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントが提供される。一部の実施形態では、表1に記載された抗体のうちいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む重鎖と、表1に記載された抗体のうちいずれか1つのCDR1、CDR2、及びCDR3を含む軽鎖と、を含む、BCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントが提供される。

20

【0084】

一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号4を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、及び配列番号6を含む重鎖CDR3を含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号4を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、配列番号6を含む重鎖CDR3、配列番号7を含む軽鎖CDR1、配列番号8を含む軽鎖CDR2、及び配列番号9を含む軽鎖CDR3を含む。このBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。このBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、少なくとも5.9nMのIC₅₀でAPRIL結合を阻害し得る。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号10と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号10と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号11と実質的に同じか又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、1つのアームが抗BCMAアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

30

【0085】

一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号4を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、及び配列番号6を含む重鎖CDR3を含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号7を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、配列番号6を含む重鎖CDR3、配列番号24を含む軽鎖CDR1、配列番号25を含む軽鎖CDR2、及び配列番号26を含む軽鎖CDR3を含む。このBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号57と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号57と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号28と実質的に同じか又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイ

40

50

ン及び軽鎖可変ドメインは、1つのアームが抗BCMAアームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【0086】

一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号7を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、及び配列番号6を含む重鎖CDR3を含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号7を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、配列番号6を含む重鎖CDR3、配列番号24を含む軽鎖CDR1、配列番号25を含む軽鎖CDR2、及び配列番号26を含む軽鎖CDR3を含む。このBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号34と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号34と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号28と実質的に同じか又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、1つのアームが抗BCMAアームである、二重特異性構築物への包含に適している。10

【0087】

一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号4を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、及び配列番号19を含む重鎖CDR3を含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号4を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、配列番号19を含む重鎖CDR3、配列番号24を含む軽鎖CDR1、配列番号25を含む軽鎖CDR2、及び配列番号26を含む軽鎖CDR3を含む。このBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号39と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号39と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号28と実質的に同じか又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、1つのアームが抗BCMAアームである、二重特異性構築物への包含に適している。20

【0088】

一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号4を含む重鎖CDR1、配列番号8を含む重鎖CDR2、及び配列番号6を含む重鎖CDR3を含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号4を含む重鎖CDR1、配列番号8を含む重鎖CDR2、配列番号6を含む重鎖CDR3、配列番号24を含む軽鎖CDR1、配列番号25を含む軽鎖CDR2、及び配列番号26を含む軽鎖CDR3を含む。このBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号40と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号40と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号28と実質的に同じか又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、1つのアームが抗BCMAアームである、二重特異性構築物への包含に適している。30

【0089】

一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号13を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、及び配列番号19を含む重鎖CDR3を含む。一部の実施形態では、BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号13を含む重鎖CDR1、配列番号5を含む重鎖CDR2、配列番号19を含む重鎖CDR3、配列番号24を含む軽鎖CDR1、配列番号25を含む軽鎖CDR2、及び40

50

配列番号 26 を含む軽鎖 CDR3 を含む。この BCMA 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、BCMA 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号 58 と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、BCMA 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号 58 と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号 28 と実質的に同じか又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、1つのアームが抗 BCMA アームである、二重特異性構築物への包含に適している。

【0090】

一部の実施形態では、BCMA 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号 13 を含む重鎖 CDR1、配列番号 8 を含む重鎖 CDR2、及び配列番号 19 を含む重鎖 CDR3 を含む。一部の実施形態では、BCMA 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号 13 を含む重鎖 CDR1、配列番号 8 を含む重鎖 CDR2、配列番号 19 を含む重鎖 CDR3、配列番号 24 を含む軽鎖 CDR1、配列番号 25 を含む軽鎖 CDR2、及び配列番号 26 を含む軽鎖 CDR3 を含む。この BCMA 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトフレームワーク配列を含んでもよい。一部の実施形態では、BCMA 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号 43 と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインを含む。一部の実施形態では、BCMA 特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、配列番号 43 と実質的に同じか又は同一の重鎖可変ドメインと、配列番号 28 と実質的に同じか又は同一の軽鎖可変ドメインとを含む。この段落において検討された抗体の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインは、1つのアームが抗 BCMA アームである、二重特異性構築物への包含に適している。

10

20

【0091】

一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、IgG 又はその誘導体、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及び IgG4 のアイソタイプである。抗体が IgG1 アイソタイプからなる一部の実施形態では、抗体は IgG1 Fc 領域（配列番号 74）を含む。

【0092】

配列番号 74

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

30

【0093】

抗体が IgG4 アイソタイプからなる一部の実施形態では、抗体は、S228P、L234A、及び L235A 置換を、その Fc 領域（配列番号 73）中に含有する。

40

【0094】

配列番号 73

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

50

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

【0095】

上記段落において検討された、CDR及び/又は可変ドメイン配列により定義された特異性抗体は、これらのIgG Fc領域を含んでもよい。

【0096】

BCMAに免疫特異的に結合する抗体又は抗原結合フラグメントをコードする単離された合成ポリヌクレオチドもまた開示される。本明細書で提供された可変ドメインセグメントをコード可能な単離されたポリヌクレオチドは、抗体又は抗原結合フラグメントを生成する同一の又は異なるベクターに含まれてもよい。

10

【0097】

組換え抗原結合タンパク質をコードするポリヌクレオチドもまた、本開示の範囲内である。一部の実施形態では、記載されたポリヌクレオチド（及びこのポリヌクレオチドがコードするペプチド）は、リーダー配列を含む。当技術分野において既知の任意のリーダー配列を利用することができる。リーダー配列には、制限部位又は翻訳開始部位を挙げることができるが、これらに限定されない。

【0098】

本明細書に記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントの生物学的特性（例えば、結合親和性又は免疫エフェクター活性）を保持している、1つ又は複数のアミノ酸置換、欠失、又は付加を有する変異体を含む。本発明の文脈において、下記注釈は、別途記載のない限り、変異を説明するのに使用される。*i*) 所与の位置におけるアミノ酸の置換は、例えば、K409Rと記載される。K409Rは、409位におけるリジンのアルギニンによる置換を意味する。*ii*) 特定の変異体について、特定の三文字又は一文字コードは、コードXaa及びXを含めて、アミノ酸残基を示すのに使用される。このため、409位におけるリジンについてのアルギニンの置換は、K409Rと指定され、又は409位におけるリジンについての任意のアミノ酸残基の置換は、K409Xと指定される。409位におけるリジンの欠失の場合には、この欠失は、K409*により示される。当業者であれば、1つ又は複数のアミノ酸置換、欠失、又は付加を有する変異体を生成することができる。

20

【0099】

これらの変異体としては、(a) 1つ又は2つ以上のアミノ酸残基が保存的又は非保存的アミノ酸により置換されている変異体、(b) 1つ又は2つ以上のアミノ酸がポリペプチドに付加され、又は同ポリペプチドから欠失されている変異体、(c) 1つ又は2つ以上のアミノ酸が置換基を含む変異体、及び(d) ポリペプチドが別のペプチド又はポリペプチド、例えば、融合パートナー、タンパク質タグ、又は他の化学部分と融合した変異体を挙げることができる。これらは、ポリペプチドに有用な特性、例えば、抗体についてのエピトープ、ポリヒスチジン配列、ビオチン部分等を付与してもよい。本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントは、保存的又は非保存的位置のいずれかにおいてある種からのアミノ酸残基が別の種における対応する残基に置換されている変異体を含んでもよい。他の実施形態では、非保存的位置におけるアミノ酸残基は、保存的又は非保存的残基により置換される。これらの変異体を得るための手法は、遺伝的（欠失、変異等）、化学的、及び酵素的手法を含めて、当業者に既知である。

30

【0100】

本明細書に記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、複数の抗体アイソタイプ、例えば、IgM、IgD、IgG、IgA、及びIgEを具現化することができる。一部の実施形態では、抗体アイソタイプは、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4のアイソタイプ、好ましくは、IgG1又はIgG4のアイソタイプである。抗体又はその抗原結合フラグメントの特異性は、CDRのアミノ酸配列及び配置により主に決定される。したがって、あるアイソタイプのCDRは、抗原特異性を変化させることなく、別のアイソタイプに変更することができる。あるいは、抗原特異性を変化させること

40

50

となく、ハイブリドーマに、ある抗体アイソタイプを別のものにスイッチさせる技術（アイソタイプスイッチング）が確立されてきた。したがって、このような抗体アイソタイプは、記載された抗体又は抗原結合フラグメントの範囲内にある。

【0101】

本明細書に記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、APRIL結合について少なくとも 5.9 nM のIC₅₀値を有する。記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントのIC₅₀は、当該技術分野において周知の種々の方法、例えば、ELISAに基づく方法又はフローサイトメトリー（FACS）により決定され得る。ELISAによりIC₅₀を測定するアッセイは、BCMA特異性抗体の存在下及び不在下でBCMA結合プレートを有し、様々な濃度のAPRILを使用する。APRILのBCMAへの結合を阻害するBCMA抗体は、「ELISAにより測定するとき、APRILを阻害する」ことができる。
10

【0102】

本明細書に記載されたポリヌクレオチドを含むベクターもまた提供される。ベクターは、発現ベクターであり得る。このため、対象となるポリペプチドをコードする配列を含有する組換え発現ベクターは、本開示の範囲内であると想到される。発現ベクターは、1つ又は2つ以上の追加配列を含有してもよい。同追加配列には、例えば、制御配列（例えば、プロモータ、エンハンサー）、選択マーカー、及びポリアデニル化シグナルが挙げられるが、これらに限定されない。広い各種の宿主細胞を形質転換するためのベクターは周知であり、プラスミド、ファージミド、コスミド、バキュロウイルス、バクミド、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）、並びに、他の細菌、酵母、及びウイルスのベクターが挙げられるが、これらに限定されない。
20

【0103】

本説明の範囲内にある組換え発現ベクターは、適切な調節エレメントに操作可能に連結することができる少なくとも1つの組換えタンパク質をコードする、合成的、遺伝的、又はcDNA由来の核酸フラグメントを含む。このような調節エレメントには、転写プロモータ、適切なmRNAリボソーム結合部位をコードする配列、並びに転写及び翻訳の終了を制御する配列を挙げることができる。発現ベクター、特に、哺乳類の発現ベクターはまた、1つ又は2つ以上の非転写エレメント、例えば、複製の起点、発現される遺伝子に連結された適切なプロモータ及びエンハンサー、他の5'又は3'フランкиング非転写配列、5'又は3'非翻訳配列（例えば、必須リボソーム結合部位）、ポリアデニル化部位、スプライスドナー及びアクセプター部位、又は転写終了配列を含んでもよい。宿主において複製する能力を付与する複製の起点もまた包含されてもよい。
30

【0104】

脊椎動物細胞を形質転換するのに使用される発現ベクター中の転写及び翻訳コントロール配列は、ウイルスソースにより提供することができる。例示的なベクターは、Okayama and Berg, 3 Mol. Cell. Biol. 280 (1983)に記載されたように構築されてもよい。

【0105】

一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントのコード配列は、強力な構成的プロモータ、例えば、下記遺伝子：ヒポキサンチンホスホリボシルトランスフェラーゼ（Hprt）、アデノシンデアミナーゼ、ピルビン酸キナーゼ、ベータアクチン、ヒトミオシン、ヒトヘモグロビン、ヒト筋クレアチン等のためのプロモータの制御下に置かれる。加えて、多くのウイルスプロモータが、真核細胞中で構成的に機能し、記載された実施形態での使用に適している。このようなウイルスプロモータには、サイトメガロウイルス（CMV）中間初期プロモータ、SV40の初期及び後期プロモータ、マウス乳がんウイルス（MMTV）プロモータ、モロニー白血病ウイルス、ヒト免疫不全ウイルス（HIV）、エブスタインバーウィルス（EBV）、ラウス肉腫ウイルス（RSV）、及び他のレトロウイルスの長端末反復配列（LTR）、並びに単純ヘルペスウイルスのチミジンキナーゼプロモータが挙げられるが、これらに限定されない。一実施形態において、BCMA特異
40

性抗体又はその抗原結合フラグメントのコード配列は、誘引性プロモータ、例えば、メタロチオネインプロモータ、テトラサイクリン誘引性プロモータ、ドキシサイクリン誘引性プロモータ、1つ又は2つ以上のインターフェロン刺激応答エレメント(I S R E)、例えば、プロテインキナーゼR 2' , 5' -オリゴアデニレート合成酵素、M X 遺伝子、A D A R 1 等を含有するプロモータの制御下に置かれる。

【 0 1 0 6 】

本明細書に記載されたベクターは、1つ又は2つ以上の配列内リボソーム進入部位(I R E S)を含有してもよい。I R E S 配列の融合ベクター内への包含は、一部のタンパク質の発現を向上させるのに有益であり得る。一部の実施形態では、ベクター系は、1つ又は2つ以上のポリアデニル化部位(例えば、S V 4 0)を含むこととなる。同部位は、前述の核酸配列のうちいずれかの上流又は下流にあってもよい。ベクターのコンポーネントは、近接して連結されてもよく、又は遺伝子産物を発現させるのに最適な間隔を提供するように(すなわち、O R F 間に「スペーサ」ヌクレオチドを導入することにより)配置されてもよく、若しくは別のある方法で位置付けられてもよい。調節エレメント、例えば、I R E S モチーフはまた、発現に最適な間隔を提供するように配置されてもよい。

10

【 0 1 0 7 】

ベクターは、当技術分野において既知の選択マーカーを含んでもよい。選択マーカーには、陽性及び陰性選択マーカー、例えば、抗生物質抵抗性遺伝子(例えば、ネオマイシン抵抗性遺伝子、ヒグロマイシン抵抗性遺伝子、カナマイシン抵抗性遺伝子、テトラサイクリン抵抗性遺伝子、ペニシリン抵抗性遺伝子、ピューロマイシン抵抗性遺伝子、プラストサイジン抵抗性遺伝子)、グルタミン酸合成酵素遺伝子、ガンシクロビル選択用のH S V - T K 、H S V - T K 誘導体、又は6 - メチルプリン選択用の細菌のプリンヌクレオシドホスホリラーゼ遺伝子(G a d i e t a l . , 7 G e n e T h e r . 1 7 3 8 ~ 1 7 4 3 (2 0 0 0))が挙げられる。選択マーカーをコードする核酸配列又はクローニング部位は、対象となるポリペプチドをコードする核酸配列又はクローニング部位の上流又は下流にあってもよい。

20

【 0 1 0 8 】

本明細書に記載されたベクターを使用して、記載された抗体又は抗原結合フラグメントをコードする遺伝子で、種々の細胞を形質転換することができる。例えば、ベクターを使用して、B C M A 特異性抗体又は抗原結合フラグメントの生成細胞を生じさせることができる。このため、別の態様は、B C M A に特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、本明細書に記載され、例示された抗体又は抗原結合フラグメントをコードする核酸配列を含むベクターで形質転換された宿主細胞を特徴とする。

30

【 0 1 0 9 】

外来性遺伝子を細胞内に導入するための数多くの手法が、当技術分野において既知であり、本明細書に記載され、例示された種々の実施形態に従って、記載された方法を行う目的で組換え細胞を構築するのに使用することができる。使用される手法により、異種遺伝子配列を宿主細胞に適切に形質転換されるべきであり、その結果、異種遺伝子配列は、細胞の子孫により遺伝され、発現されることができ、レシピエント細胞の必須の成育及び生理学的機能が損なわれない。使用することができる手法としては、染色体導入法(例えば、細胞融合、染色体媒介性遺伝子導入、マイクロ細胞媒介性遺伝子導入)、物理的方法(例えば、トランスフェクション、スフェロプラスト融合、マイクロインジェクション、エレクトロポレーション、リポソーム担体)、ウイルスベクター導入(例えば、組換えD N A ウィルス、組換えR N A ウィルス)等が挙げられる(C l i n e , 2 9 P h a r m a c . T h e r . 6 9 ~ 9 2 (1 9 8 5) に記載)が、これらに限定されない。哺乳類細胞による細菌プロトプラストのリン酸カルシウム沈殿及びポリエチレンギリコール(P E G)誘因融合を使用しても、細胞を形質転換することができる。

40

【 0 1 1 0 】

本明細書に記載されたB C M A 特異性抗体又は抗原結合フラグメントの発現に使用するに適した細胞は、好ましくは、真核細胞、より好ましくは、植物、げっ歯類、又はヒト

50

起源の細胞である。これらの細胞には、例えば、N S O、C H O、C H O K 1、p e r C . 6、T k - t s 1 3、B H K、H E K 2 9 3 細胞、C O S - 7、T 9 8 G、C V - 1 / E B N A、L 細胞、C 1 2 7、3 T 3、He L a、N S 1、S p 2 / 0 骨髄腫細胞、及び B H K 細胞株等が挙げられるが、これらに限定されない。加えて、抗体の発現は、ハイブリドーマ細胞を使用して達成されてもよい。ハイブリドーマを生成するための方法は、当技術分野において十分確立されている。

【 0 1 1 1 】

本明細書に記載された発現ベクターにより形質転換された細胞は、本明細書に記載された抗体又は抗原結合フラグメントの組換え発現について選択され、又はスクリーニングされてもよい。組換え陽性細胞は、タンパク質改変又は変化させた翻訳後修飾により、所望の表現型、例えば、高レベルの発現、向上した増殖特性、又は所望の生化学的特性を有するタンパク質を生成する能力を示すサブクローンについて、増殖され、スクリーニングされる。これらの表現型は、所与のサブクローンの本来の特性又は変異により得る。変異は、化学薬品、U V 波長光、照射、ウイルス、挿入変異、D N A ミスマッチ修復の阻害、又はこのような方法の組み合わせにより得られる。

10

【 0 1 1 2 】

治療のためにB C M A 特異性抗体を使用する方法

本明細書において、治療に使用するための、B C M A 特異性抗体又はその抗原結合フラグメントが提供される。特に、これらの抗体又は抗原結合フラグメントは、がん、例えば、B C M A 発現がんを治療するのに有用であり得る。したがって、本発明は、本明細書に記載されたとおりの抗体、例えば、B C M A 特異性抗体又は抗原結合フラグメントを投与することを含むがんを治療する方法を提供する。例えば、この使用は、B C M A 受容体の相互作用を使用した阻害によるものであってよく、すなわち、抗体が毒物に結合され、この毒物をB C M A 発現がんに標的化する。一部の実施形態では、B C M A 発現がんは、多発性骨髄腫（M M）などのリンパ腫を含む。これらの方法に使用するための抗体としては、本明細書で上述されたもの、例えば、表1に列記された特徴（例えば、C D R 又は可変ドメイン配列）及びこれらの抗体の更なる検討において列記された特徴を有する、B C M A 特異性抗体又は抗原結合フラグメントが挙げられる。

20

【 0 1 1 3 】

本明細書に記載された一部の実施形態では、B C M A 特異性抗体の免疫エフェクター特性は、当業者に既知の技術によるF c 改変によって向上するか、又はサイレンシングされることができる。例えば、F c エフェクター機能、例えば、C 1 q 結合、補体依存性細胞毒性（C D C）、抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（A D C C）、抗体依存性細胞媒介性貪食（A D C P）、細胞表面受容体（例えば、B 細胞受容体、B C R）のダウンレギュレーション等が、これらの活性を担うF c 中の残基を改変することにより提供され、かつ／又は制御され得る。

30

【 0 1 1 4 】

「抗体依存性細胞媒介性細胞毒性」又は「A D C C」は、F c 受容体（F c R）を発現している非特異的細胞毒性細胞（例えば、ナチュラルキラー（N K）細胞、好中球、及びマクロファージ）が標的細胞上に結合した抗体を認識し、続けて、標的細胞の溶解を引き起こす、細胞媒介性反応を意味する。

40

【 0 1 1 5 】

A D C C を誘引するモノクローナル抗体の能力は、そのオリゴ糖成分を操作することにより向上され得る。ヒトI g G 1 又はI g G 3 は、A s n 2 9 7 において、N - グリコシル化される。ここで、グリカンの大部分は、周知の二分岐G 0、G 0 F、G 1、G 1 F、G 2、又はG 2 F の形態にある。遺伝子操作されていないC H O 細胞により生成される抗体は、典型的には、少なくとも約85%のグリカンフコース含量を有する。F c 領域に付着した二分岐の複雑なタイプのオリゴ糖からのコアフコースの除去により、改善されたF c . ガンマ . R I I I a 結合を介して、抗原結合性又はC D C 活性を変化させることなく、抗体のA D C C が向上される。このようなm A b は、二分岐の複雑なタイプのF c オリ

50

ゴ糖を有する、比較的高い脱フコシル化抗体の成功した発現をもたらすことが報告された種々の方法、例えば、培養浸透圧の制御 (Konno et al., Cytotecnology 64: 249~65, 2012)、宿主細胞株としての変異体CHO株Lec13の適用 (Shields et al., J Biol Chem 277: 26733~26740, 2002)、宿主細胞株としての変異体CHO株EB66の適用 (Olivier et al., Mabs; 2(4), 2010, Epub ahead of print, PMID: 20562582)、宿主細胞株としてのラットハイブリドーマ細胞株YB2/0の適用 (Shinkawa et al., J Biol Chem 278: 3466~3473, 2003)、アルファ.1, 6-フコシルトランスフェラーゼ (FUT8) 遺伝子に対して特異的な低分子干渉RNAの導入 (Mori et al., Biotechnol Bioeng 88: 901~908, 2004)、又はベータ-1, 4-N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼIIとゴルジアルファ-マンノシダーゼIIとの共発現又は強力なアルファ-マンノシダーゼI阻害剤であるキフネンシン (Ferrara et al., J Biol Chem 281: 5032~5036; 2006, Ferrara et al., Biotechnol Bioeng 93: 851~861, 2006; Xhou et al., Biotechnol Bioeng 99: 652~65, 2008) を使用して達成され得る。
10

【0116】

本明細書において記載された一部の実施形態では、BCMA抗体により引き出されたADCはまた、抗体Fc中の特定の置換によって向上され得る。例示的な置換は、例えば、米国特許第6,737,056号に記載されたように、アミノ酸位置256、290、298、312、356、330、333、334、360、378、又は430 (EUインデックスに従った残基番号付け) における置換である。
20

【0117】

BCMAを検出する方法

本明細書において、サンプルを、本明細書に記載された抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させることにより、生体サンプル中のBCMAを検出するための方法が提供される。本明細書に記載されたように、サンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織会合していない細胞（すなわち、遊離細胞）、組織（例えば、外科手術的に切除された腫瘍組織、微小針吸引を含む生検）、組織学的調製物等から得ることができる。一部の実施形態では、記載された方法は、サンプルを、本明細書に記載されたBCMA特異性抗体又はその抗原結合フラグメントのいずれかと接触させることにより、生体サンプル中のBCMAを検出することを含む。
30

【0118】

一部の実施形態では、サンプルを、本明細書に記載されたBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントの2つ以上と接触させてもよい。例えば、サンプルを、第1のBCMA特異性抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させ、ついで、第2のBCMA特異性抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよく、この場合、第1の抗体又は抗原結合フラグメントと第2の抗体又は抗原結合フラグメントとは、同じ抗体又は抗原結合フラグメントではない。一部の実施形態では、第1の抗体又はその抗原結合フラグメントは、サンプルと接触させる前に、表面、例えば、マルチウェルプレート、チップ又は類似する基材に固定されてもよい。他の実施形態では、第1の抗体又はその抗原結合フラグメントは、サンプルと接触させる前に、全く固定されず又は付着されなくてもよい。
40

【0119】

記載されたBCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、検出可能に標識されてもよい。一部の実施形態では、標識された抗体及び抗原結合フラグメントは、本明細書に記載された方法により、BCMAの検出を容易にし得る。多くのこのような標識が、当業者に容易に既知である。例えば、適切な標識には、放射線標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、ECL標識、又は酵素が挙げられるが、これらに限定されると
50

考えられるべきではない。より具体的には、記載された標識には、ルテニウム、¹¹¹In - DOTA、¹¹¹In - ジエチレントリアミン五酢酸(DTPA)、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びベータガラクトシダーゼ、ポリヒスチジン(HISタグ)、アクリジン染料、シアニン染料、フルオロン染料、オキサジン染料、フェナントリジン染料、ローダミン染料、A1exaf1uor(登録商標)染料等が挙げられる。

【0120】

記載されたBCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントは、生体サンプル中のBCMAを検出するための各種のアッセイに使用されてもよい。一部の適切なアッセイには、ウェスタンプロット分析、ラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、免疫蛍光測定法、免疫沈澱法、平衡透析法、免疫拡散法、電気化学発光(ELC)免疫アッセイ、免疫組織化学法、蛍光発色細胞選別(FACS)又はELISAアッセイが挙げられるが、これらに限定されると考えられるべきではない。10

【0121】

本明細書に記載された一部の実施形態では、対象におけるBCMA発現がん細胞の検出を使用して、対象がBCMAに向けられる治療剤により処置されてもよいことを判定することができる。

【0122】

BCMAは、血液及び血清サンプル中に、検出可能なレベルで存在する。このため、本明細書において、サンプルを、BCMAに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させることにより、血液から得られたサンプル、例えば、血清サンプル中のBCMAを検出するための方法が提供される。血液サンプル又はその派生物は、希釈され、画分され、又は他の方法で処理されて、記載された方法が行われ得るサンプルを生成することができる。一部の実施形態では、BCMAは、当技術分野において既知の任意の回数のアッセイにより、血液サンプル又はその派生物中で検出することができる。例えば、同アッセイには、ウェスタンプロット分析、ラジオイムノアッセイ、表面プラズモン共鳴、免疫蛍光測定法、免疫沈澱法、平衡透析法、免疫拡散法、電気化学発光(ELC)免疫アッセイ、免疫組織化学法、蛍光発色細胞選別(FACS)又はELISAアッセイが挙げられるが、これらに限定されない。20

【0123】

がんを診断するための方法

本明細書において、対象におけるBCMA発現がんを診断するための方法が提供される。一部の実施形態では、BCMA発現がんは、多発性骨髄腫(MM)などのリンパ腫を含む。一部の実施形態では、上記されたように、生体サンプル、例えば、血液サンプル又は血清サンプル中のBCMAを検出することは、サンプルが得られた対象中のがんを診断する能力を提供する。あるいは、一部の実施形態では、他のサンプル、例えば、組織学的サンプル、微小針吸引サンプル、切除された腫瘍組織、循環細胞、循環腫瘍細胞等もまた、サンプルが得られた対象ががんを有するかどうかを評価するのに使用されてもよい。一部の実施形態では、サンプルが得られた対象ががんを有することが既に分かっていてもよいが、対象を苦しめているがんの種類は、未だに診断されていなくてもよく、又は予備的診断では未知であるため、対象から得られた生体サンプル中のBCMAを検出することにより、がんの診断を可能にし、又は明確にすることができる。例えば、対象ががんを有することが分かっていてもよいが、分かっていないなくてもよく、又は、対象のがんがBCMAを発現しているかどうかが、不明であってもよい。40

【0124】

一部の実施形態では、記載された方法は、対象から得られた生体サンプル中に存在するBCMAの量を決定し、観察されたBCMAの量をコントロール又は参照サンプル中のBCMAの量と比較することにより、対象がBCMA発現がんに苦しんでいるどうかを評価することを含む。この場合、対象から得られたサンプル中のBCMAの量とコントロール又は参照サンプル中のBCMAの量との間の差は、対象がBCMA発現がんに苦しんでい50

ることの指標である。別の実施形態では、対象から得られた生体サンプル中に観察された B C M A の量は、特定の形態又はステージのがんに関連することが既知の B C M A のレベルと比較されて、対象のがんの形態又はステージを決定することができる。一部の実施形態では、対象から得られたサンプル中の B C M A の量は、サンプルを、B C M A に免疫特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、本明細書に記載された B C M A 特異性抗体と接触させることにより評価される。B C M A の存在について評価されるサンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織会合していない細胞（すなわち、遊離細胞）、組織（例えば、外科手術的に切除された腫瘍組織、微小針吸引を含む生検）、組織学的調製物等から得られてもよい。一部の実施形態では、B C M A 発現がんは、多発性骨髄腫（MM）などの血液がんを含む。一部の実施形態では、対象は、ヒトである。

10

【 0 1 2 5 】

一部の実施形態では、B C M A 発現がんを診断する方法は、対象の生体サンプルを、B C M A 特異性抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、表1で提供された抗体及びフラグメントから得られたもの）と接触させること、抗体又はその抗原結合フラグメントによって結合したサンプル中に存在するB C M A の量を定量すること、サンプル中に存在するB C M A の量を既知の標準又は参照サンプルと比較すること、及び対象のB C M A レベルががんに関連するB C M A のレベル内に入るかどうかを判定することを含むであろう。更なる実施形態では、診断方法は、がん特異的処置を投与又は処方する更なる工程が続き得る。別の実施形態では、診断方法は、がんの処置を容易にするために、判定の結果を伝送する更なる工程が続き得る。一部の実施形態では、がん特異的処置は、例えば、本明細書に記載されたB C M A × C D 3 多重特異性抗体などのB C M A 発現がんに対して向けられてもよい。

20

【 0 1 2 6 】

一部の実施形態では、記載された方法は、対象から得られた血液又は血清サンプル中に存在するB C M A の量を決定することと、観察されたB C M A の量をコントロール又は参照サンプル中のB C M A の量と比較することと、により、対象がB C M A 発現がんに苦しんでいるかどうかを評価することを含む。この場合、対象から得られたサンプル中のB C M A の量とコントロール又は参照サンプル中のB C M A の量との間の差は、対象がB C M A 発現がんに苦しんでいることの指標である。

30

【 0 1 2 7 】

一部の実施形態では、コントロール又は参照サンプルは、B C M A 発現がんに苦しんでいない対象から得られてもよい。一部の実施形態では、コントロール又は参照サンプルは、B C M A 発現がんに苦しんでいる対象から得られてもよい。コントロール又は参照サンプルがB C M A 発現がんに苦しんでいない対象から得られる一部の実施形態では、コントロール又は参照サンプルについて観察されたB C M A の量に対して、試験サンプル中に存在するB C M A の量における観察された増大は、評価された対象がB C M A 発現がんに苦しんでいることの指標である。コントロールサンプルがB C M A 発現がんに苦しんでいない対象から得られる一部の実施形態では、コントロール又は参照サンプルについて観察されたB C M A の量に対して、試験サンプル中に存在するB C M A の量における観察された減少又は類似性は、評価された対象がB C M A 発現がんに苦しんでいないことの指標である。コントロール又は参照サンプルがB C M A 発現がんに苦しんでいる対象から得られる一部の実施形態では、コントロール又は参照サンプルについて観察されたB C M A の量に対して、試験サンプル中に存在するB C M A の量における観察された類似性は、評価された対象がB C M A 発現がんに苦しんでいることの指標である。コントロール又は参照サンプルがB C M A 発現がんに苦しんでいる対象から得られる一部の実施形態では、コントロール又は参照サンプルについて観察されたB C M A の量に対して、試験サンプル中に存在するB C M A の量における観察された減少は、評価された対象がB C M A 発現がんに苦しんでいないことの指標である。

40

【 0 1 2 8 】

50

一部の実施形態では、対象から得られたサンプル中のBCMAの量は、サンプルを、BCMAに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、本明細書に記載された抗体と接触させることにより評価される。BCMAの存在について評価されるサンプルは、血液サンプル、血清サンプル、循環細胞、循環腫瘍細胞、組織会合していない細胞（すなわち、遊離細胞）、組織（例えば、外科手術的に切除された腫瘍組織、微小針吸引を含む生検）、組織学的調製物等から得られてもよい。

【0129】

種々の態様において、BCMAの量は、サンプルを、BCMAに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させることにより決定される。一部の実施形態では、サンプルを、BCMAに特異的に結合する2つ以上の種類の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよい。一部の実施形態では、サンプルを、BCMAに特異的に結合する第1の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させ、ついで、BCMAに特異的に結合する第2の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよい。本明細書に記載されたものなどのBCMA特異性抗体又は抗原結合フラグメントを、この能力において使用してもよい。

10

【0130】

BCMA特異性抗体及び抗原結合フラグメントの種々の組み合わせを使用して、記載された診断方法を行うための「第1」とび「第2」の抗体又は抗原結合フラグメントを提供することができる。一部の実施形態では、BCMA発現がんは、多発性骨髄腫（MM）などのリンパ腫を含む。

20

【0131】

特定の実施形態では、BCMAの量は、ウェスタンプロット分析、ラジオイムノアッセイ、免疫蛍光測定法、免疫沈澱法、平衡透析法、免疫拡散法、電気化学発光（ECL）免疫アッセイ、免疫組織化学法、蛍光発色細胞選別（FACS）又はELISAアッセイにより決定される。

20

【0132】

記載された診断方法の種々の実施形態では、コントロール又は参照サンプルが使用される。このサンプルは、使用されるアッセイが適切に機能していることを保証する陽性又は陰性のアッセイコントロールでもよい。例えば、この性質のアッセイコントロールは、免疫組織化学アッセイに一般的に使用されてもよいと考えられる。あるいは、サンプルは、健康な対象からの生体サンプル中のBCMAの量について標準化された参照であってもよい。一部の実施形態では、試験された対象の観察されたBCMAレベルは、BCMA発現がんを有することが分かっている対象からのサンプル中に観察されたBCMAレベルと比較されてもよい。一部の実施形態では、コントロール対象は、対象となる特定のがんに苦しんでいてもよい。一部の実施形態では、コントロール対象は、初期段階のがんを有することが既知であり、同初期段階のがんは、BCMA発現がんであってもよく、又はBCMA発現がんでなくてもよい。一部の実施形態では、コントロール対象は、中間段階のがんを有することが既知であり、同中間段階のがんは、BCMA発現がんであってもよく、又はBCMA発現がんでなくてもよい。一部の実施形態では、コントロール対象は、後期段階を有することが既知であり、同後期段階は、BCMA発現がんであってもよく、又はBCMA発現がんでなくてもよい。

30

【0133】

がんをモニタするための方法

本明細書において、対象におけるBCMA発現がんをモニタするための方法が提供される。一部の実施形態では、BCMA発現がんは、多発性骨髄腫（MM）などのリンパ腫を含む。一部の実施形態では、記載された方法は、対象から得られた試験サンプル中に存在するBCMAの量を決定することと、観察されたBCMAの量をより早い時点で対象から同様にして得られた生体サンプル中のBCMAの量と比較することと、により、BCMA発現がんが進行性、退行性、又は不变なままであるかどうかを評価することを含む。この場合、試験サンプル中のBCMAの量とより早期のサンプル中のBCMAの量との差

40

50

は、がんが、進行性、退行性、又は不变なままであるかどうかの指標を提供する。これに
関して、より早期のサンプルについて観察された量に対して増大した量のBCMAを含む
試験サンプルは、BCMA発現がんの進行を示すことができる。逆に、より早期のサンプル
について観察された量に対して減少した量のBCMAを含む試験サンプルは、BCMA
発現がんの退行を示すことができる。

【0134】

したがって、より早期のサンプルについて観察された量に対してBCMAの量における
わずかな差しか有さない試験サンプルは、BCMA発現がんについて不变の病態を示すこ
とができる。一部の実施形態では、対象から得られた生体サンプル中のBCMAの量は、
サンプルを、BCMAに特異的に結合する抗体又はその抗原結合フラグメント、例えば、
本明細書に記載された抗体と接触させることにより評価される。BCMAの存在について
評価されるサンプルは、尿、血液、血清、血漿、唾液、腹水、循環細胞、循環腫瘍細胞、
組織会合していない細胞（すなわち、遊離細胞）、組織（例えば、外科手術的に切除され
た腫瘍組織、微小針吸引を含む生検）、組織学的調製物等から得られてもよい。一部の実
施形態では、対象は、ヒトである。

10

【0135】

一部の実施形態では、BCMA発現がんをモニタする方法は、対象の生体サンプルを、
BCMA特異性抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、表1で提供された抗体及び
フラグメントから得られたもの）と接触させることと、サンプル中に存在するBCMAの
量を定量することと、サンプル中に存在するBCMAの量をより早い時点において同じ対
象から同様にして得られた生体サンプル中に存在することが決定されたBCMAの量と比
較することと、対象のBCMAレベルが経時的に変化していたかどうかを判定することと
、を含むであろう。より早期のサンプルについて観察された量に対して増大した量のBC
MAを含む試験サンプルは、がんの進行を示すことができる。逆に、より早期のサンプル
について観察された量に対して減少した量のBCMAを含む試験サンプルは、BCMA発
現がんの退行を示すことができる。したがって、より早期のサンプルについて観察された
量に対してBCMAの量におけるわずかな差しか有さない試験サンプルは、BCMA発現
がんについて不变の病態を示すことができる。一部の実施形態では、サンプルのBCMA
レベルは、単独で、又はより早い時点において評価されたサンプルについて観察されたB
CMAレベルに加えて、既知の標準又は参照サンプルと比較されてもよい。更なる実施形
態では、診断方法は、がん特異的処置を投与する更なる工程が続き得る。一部の実施形
態では、がん特異的処置は、例えば、本明細書に記載されたBCMA×CD3多重特異性抗
体などのBCMA発現がんに対して向けられてもよい。

20

【0136】

種々の態様において、BCMAの量は、サンプルを、BCMAに特異的に結合する抗体
又はその抗原結合フラグメントと接触させることにより決定される。一部の実施形態では
、サンプルを、BCMAに特異的に結合する2つ以上の種類の抗体又はその抗原結合フラ
グメントと接触させてもよい。一部の実施形態では、サンプルを、BCMAに特異的に結合
する第1の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させ、ついで、BCMAに特異的に結合
する第2の抗体又はその抗原結合フラグメントと接触させてもよい。本明細書に記載
されたもの等の抗体を、この能力において使用されてもよい。

30

【0137】

表1で記載された抗体及び抗原結合フラグメントの種々の組み合わせを使用して、記載
されたモニタ方法を行うための「第1」と及び「第2」の抗体又は抗原結合フラグメントを
提供することができる。一部の実施形態では、BCMA発現がんは、急性骨髓性白血病(AM
L)などの血液がんを含む。

40

【0138】

特定の実施形態では、BCMAの量は、ウェスタンプロット分析、ラジオイムノアッセイ、
免疫蛍光測定法、免疫沈澱法、平衡透析法、免疫拡散法、電気化学発光(ELCL)免疫
アッセイ、免疫組織化学法、蛍光発色細胞選別(FACS)又はELISAアッセイに

50

より決定される。

【0139】

B C M A を検出するためのキット

本明細書において、生体サンプル中の B C M A を検出するためのキットが提供される。これらのキットは、本明細書に記載された B C M A 特異性抗体又はその抗原結合フラグメントのうち 1 つ又は 2 つ以上と、このキットを使用するための取扱説明書とを含む。

【0140】

提供された B C M A 特異性抗体又は抗原結合フラグメントは、溶液の中に存在してもよく、凍結乾燥されてもよく、基材、キャリア、又はプレートに固着されてもよく、又は検出可能に標識化されていてもよい。

10

【0141】

記載されたキットはまた、本明細書に記載された方法を行うのに有用な更なる構成要素を含んでもよい。例として、キットは、対象からサンプルを得るための手段、コントロール若しくは参照サンプル、例えば、ゆっくり進行するがんを有する対象及び／若しくはがんを有さない対象からのサンプル、1 つ若しくはそれ以上のサンプル区画、及び／又は本発明の方法の実施を説明する取扱説明書、並びに組織特異的コントロール若しくは標準をも含んでもよい。

【0142】

B C M A のレベルを決定するための手段は、例えば、B C M A のレベルを決定するためのアッセイに使用するためのバッファ又は他の試薬を更に含み得る。取扱説明書は、例えば、アッセイを行うための印刷された取扱説明書及び／又は B C M A の発現レベルを評価するための取扱説明書であり得る。

20

【0143】

記載されたキットはまた、対象からサンプルを単離するための手段を含んでもよい。これらの手段は、対象から流体又は組織を得るのに使用され得る機器又は試薬のうち 1 つ又は 2 つ以上の品目を含み得る。対象からサンプルを得るための手段はまた、血液サンプルから血液成分、例えば、血清を単離するための手段を含んでもよい。好ましくは、キットは、ヒト対象で使用するために設計されている。

【0144】

多重特異性抗体

30

本明細書に記載された抗 B C M A 抗体の結合ドメインは、その表面上に B C M A を発現している細胞を認識する。上記されたように、B C M A の発現は、がん細胞を示し得る。特定の部分集合の細胞に対するより特異的な標的化は、二重特異性分子、例えば、B C M A 及び別の標的 (C D 3 など) に結合する抗体又は抗体フラグメントを作製することにより達成され得る。これは、B C M A に結合する第 1 の領域及び他の標的抗原に結合する第 2 の結合領域を含む分子を作製することにより達成される。抗原結合領域は、標的の特異的認識を可能にするいずれの形態もとることができ、例えば、結合領域は、重鎖可変ドメイン、F v (重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインの組み合わせ)、フィブロネクチン I I I 型ドメインに基づく結合ドメイン (例えば、フィブロネクチン由来、若しくはフィブロネクチン由来の I I I 型ドメインのコンセンサスに基づく、又はテネイシン由来、若しくはテネイシン由来の I I I 型ドメインのコンセンサスに基づく、例えば、J a n s s e n B i o t e c h , I n c . から得られる C e n t y r i n 分子、例えば、国際公開第 2 0 1 0 / 0 5 1 2 7 4 号及び同第 2 0 1 0 / 0 9 3 6 2 7 号を参照のこと) であってよく、又はこれらを含んでよい。したがって、B C M A 及び別の抗原にそれぞれに結合する 2 種類の異なる抗原結合領域を含む二重特異性分子が提供される。

40

【0145】

本明細書に記載された一部の多重特異性抗体は、B C M A 及び C D 3 にそれぞれ結合する 2 種類の異なる抗原結合領域を含む。好ましい実施形態では、B C M A 及び C D 3 に結合する多重特異性抗体 (B C M A × C D 3 多重特異性抗体) 及びその多重特異性抗原結合フラグメントが提供される。一部の実施形態では、B C M A × C D 3 多重特異性抗体は、

50

B C M A に免疫特異的に結合する第 1 の抗原結合部位を形成するために対を成す第 1 の重鎖 (H C 1) 及び第 1 の軽鎖 (L C 1) と、 C D 3 に免疫特異的に結合する第 2 の抗原結合部位を形成するために対を成す第 2 の重鎖 (H C 2) 及び第 2 の軽鎖 (L C 2) と、を含む。好ましい実施形態では、 B C M A × C D 3 多重特異性抗体は、 C D 3 に免疫特異的に結合する第 1 の抗原結合部位を形成するために対を成す第 1 の重鎖 (H C 1) 及び第 1 の軽鎖 (L C 1) を含む B C M A 特異性アームと、 B C M A に免疫特異的に結合する第 2 の抗原結合部位を形成するために対を成す第 2 の重鎖 (H C 2) 及び第 2 の軽鎖 (L C 2) を含む C D 3 特異性アームと、を含む二重特異性抗体である。一部の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、全長抗体構造を有する抗体を含む。本明細書で使用されるとき、「全長抗体」は、 2 本の全長抗体重鎖と 2 本の全長抗体軽鎖とを有する抗体を意味する。全長抗体重鎖 (H C) は、重鎖可変ドメイン及び定常ドメイン、 V H 、 C H 1 、 C H 2 、及び C H 3 を含む。全長抗体重鎖 (L C) は、軽鎖可変ドメイン及び定常ドメイン、 V L 及び C L を含む。全長抗体は、一方又は両方の重鎖のいずれかにおいて、 C 末端リジン (K) を欠いていてもよい。「 F a b アーム」又は「半分子」という用語は、抗原に特異的に結合する一対の重鎖 - 軽鎖を意味する。一部の実施形態では、抗原結合ドメインのうちの 1 つは、非抗体ベースの結合ドメイン、例えば、フィブロネクチン 3 型ドメインに基づく結合ドメイン、例えば、 C e n t y r i n である。

10

【 0 1 4 6 】

本明細書で提供された多重特異性抗体の B C M A 結合アームは、上記された B C M A 特異性抗体のいずれかから得られてもよい。このような B C M A 結合アームの一部の例示的な実施形態では、 B C M A に結合する第 1 の抗原結合領域は、表 1 で記載された抗体クローニングから得られた重鎖 C D R 1 、 C D R 2 、及び C D R 3 を含む。このような B C M A 結合アームの一部の例示的な実施形態では、 B C M A に結合する第 1 の抗原結合領域は、表 1 で記載された抗体クローニングから得られた重鎖 C D R 1 、 C D R 2 、及び C D R 3 と、軽鎖 C D R 1 、 C D R 2 、及び C D R 3 を含む。このような B C M A 結合アームの一部の例示的な実施形態では、 B C M A に結合する第 1 の抗原結合領域は、クローン B C M B 6 9 、 B C M B 1 1 7 、 B C M B 1 2 3 、 B C M B 1 2 8 、 B C M B 1 2 9 、 B C M B 1 7 6 、又は B C M B 1 7 7 の重鎖 C D R 1 、 C D R 2 、及び C D R 3 を含む。このような B C M A 結合アームの一部の例示的な実施形態では、 B C M A に結合する第 1 の抗原結合領域は、クローン B C M B 6 9 、 B C M B 1 1 7 、 B C M B 1 2 3 、 B C M B 1 2 8 、 B C M B 1 2 9 、 B C M B 1 7 6 、又は B C M B 1 7 7 の重鎖 C D R 1 、 C D R 2 、及び C D R 3 と、軽鎖 C D R 1 、 C D R 2 、及び C D R 3 を含む。このような B C M A 結合アームの一部の例示的な実施形態では、 B C M A に結合する第 1 の抗原結合領域は、表 1 に記載された抗体クローニングから得られた重鎖可変ドメインを含む。このような B C M A 結合アームの一部の例示的な実施形態では、 B C M A に結合する第 1 の抗原結合領域は、表 1 に記載された抗体クローニングから得られた重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。このような B C M A 結合アームの一部の例示的な実施形態では、 B C M A に結合する第 1 の抗原結合領域は、クローン B C M B 6 9 、 B C M B 1 1 7 、 B C M B 1 2 3 、 B C M B 1 2 8 、 B C M B 1 2 9 、 B C M B 1 7 6 、又は B C M B 1 7 7 の重鎖可変ドメインを含む。このような B C M A 結合アームの一部の例示的な実施形態では、 B C M A に結合する第 1 の抗原結合領域は、クローン B C M B 6 9 、 B C M B 1 1 7 、 B C M B 1 2 3 、 B C M B 1 2 8 、 B C M B 1 2 9 、 B C M B 1 7 6 、又は B C M B 1 7 7 の重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインを含む。

20

【 0 1 4 7 】

表 3 は、 B C M A に特異的な 1 つの重鎖及び軽鎖対と C D 3 に特異的な別の重鎖及び軽鎖対とを有する B C M A × C D 3 二重特異性抗体のリストを提供し、特定の抗体 I D を列記して、記載された実施形態を產生するために使用される抗原特異性抗体アームを説明する。

30

【 0 1 4 8 】

40

【表3】

表3.

| BCMA特異性アーム＝ Ab ID | CD3特異性アーム＝ Ab ID |
|----------------------|---------------------|
| BCMB69 | CD3B219 |
| BCMB117 | CD3B219 |
| BCMB123 | CD3B219 |
| BCMB128 | CD3B219 |
| BCMB129 | CD3B219 |
| BCMB176 | CD3B219 |
| BCMB177 | CD3B219 |

10

【0149】

二重特異性抗体の一部の実施形態では、BCMA結合アームは、カニクイザルBCMA、好ましくは、その細胞外ドメインにも結合する。

【0150】

一部の実施形態では、多重特異性抗体のBCMA結合アームは、IgG又はその誘導体、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、及びIgG4のアイソタイプである。BCMA結合アームがIgG4アイソタイプを有する一部の実施形態では、BCMA結合アームは、S228P、L234A、及びL235A置換を、そのFc領域中に含有する。

20

【0151】

二重特異性抗体の一部の実施形態では、第2の抗原結合アームは、ヒトCD3に結合する。一部の好ましい実施形態では、BCMA×CD3二重特異性抗体のCD3特異性アームは、ヒト初代T細胞及び/又はカニクイザル初代T細胞に結合し、これらを活性化するCD3特異性抗体から得られる。一部の実施形態では、CD3結合アームは、CD3のN末端において、エピトープに結合する。一部の実施形態では、CD3結合アームは、CD3の6つのN末端アミノ酸を含むエピトープと接触する。一部の実施形態では、二重特異性抗体のCD3特異性結合アームは、マウスモノクローナル抗体SP34、マウスIgG3/ラムダアイソタイプから得られる。一部の実施形態では、CD3結合アームは、抗体SP34のCDRを含む。このようなCD3結合アームは、 5×10^{-7} M以下、例えば、 1×10^{-7} M以下、 5×10^{-8} M以下、 1×10^{-8} M以下、 5×10^{-9} M以下、又は 1×10^{-9} M以下の親和性で、CD3に結合し得る。CD3特異性結合アームは、マウスモノクローナル抗体SP34のヒト化版のアームでもよい。ヒトフレームワーク適合(HFA)は、CD3特異性アームが得られる抗CD3抗体をヒト化するのに使用されてもよい。二重特異性抗体の一部の実施形態では、CD3結合アームは、表2から選択される重鎖と軽鎖とのペアを含む。二重特異性抗体の他の実施形態では、CD3結合アームは、表2に記載した重鎖CDR1、CDR2、及びCDR3、並びに軽鎖CDR1、CDR2、及びCDR3配列を含む。例えば、本明細書に記載された二重特異性抗体のCD3結合アームの一部の実施形態の重鎖及び軽鎖CDR配列は、以下のアミノ酸配列を含み得る：Hc CDR1、配列番号59；Hc CDR2、配列番号60；Hc CDR3、配列番号61；Lc CDR1、配列番号62；Lc CDR2、配列番号63；及びLc CDR3、配列番号64。

30

40

【0152】

一部の実施形態では、CD3結合アームは、IgG又はその誘導体である。一部の実施形態では、CD3結合アームは、IgG1、IgG2、IgG3、又はIgG4である。CD3結合アームがIgG4アイソタイプを有する一部の実施形態では、CD3結合アームは、S228P、L234A、L235A、F405L、及びR409K置換を、そのFc領域中に含有する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒトT細胞上のCD3に結合する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代カニクイザルT細胞上のCD3に結合する。一部の実施形態では、抗体又は抗

50

原結合フラグメントは、初代ヒト及びカニクイザルT細胞上のCD3に結合する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代ヒトCD4+T細胞を活性化する。一部の実施形態では、抗体又は抗原結合フラグメントは、初代カニクイザルCD4+T細胞を活性化する。

【0153】

一部の実施形態では、抗体クローンBCMB69、BCMB117、BCMB123、BCMB128、BCMB129、BCMB176、又はBCMB177の重鎖を含むBCMA結合アームを有するBCMA×CD3二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローンBCMB69、BCMB117、BCMB123、BCMB128、BCMB129、BCMB176、又はBCMB177の重鎖及び軽鎖を含むBCMA結合アームを有するBCMA×CD3二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローンCD3B219の重鎖を含むCD3結合アームを有するBCMA×CD3二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローンCD3B219の重鎖及び軽鎖を含むCD3結合アームを有するBCMA×CD3二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローンBCMB69、BCMB117、BCMB123、BCMB128、BCMB129、BCMB176、又はBCMB177の重鎖を含むBCMA結合アームと、抗体クローンCD3B219の重鎖を含むCD3結合アームとを有する、BCMA×CD3二重特異性抗体が提供される。一部の実施形態では、抗体クローンBCMB69、BCMB117、BCMB123、BCMB128、BCMB129、BCMB176、又はBCMB177の重鎖及び軽鎖を含むBCMA結合アームと、抗体クローンCD3B219の重鎖及び軽鎖を含むCD3結合アームとを有する、BCMA×CD3二重特異性抗体が提供される。

10

20

30

40

50

【0154】
例示的なBCMA×CD3二重特異性抗体を表9に提示する。

【0155】

種々のフォーマットの二重特異性抗体が記載されてきており、Chamess and Baty(2009)Curr Opin Drug Disc Dev 12:276に近年レビューされた。

【0156】

一部の実施形態では、本発明の二重特異性抗体は、本発明において記載されたもの等の制御されたFabアーム交換により得られたディアボディ、クロスボディ、又は二重特異性抗体である。

【0157】

一部の実施形態では、二重特異性抗体には、ヘテロ二量体化する相補性CH3ドメインを有するIgG様分子、組換えIgG様デュアル標的化分子（この分子の2つの側面はそれぞれ少なくとも2種類の抗体のFabフラグメント又はFabフラグメントの一部を含有する）、IgG融合分子（全長IgG抗体がエクストラFabフラグメント又はFabフラグメントの一部に融合されている）、Fc融合分子（一本鎖Fv分子又は安定化ディアボディが重鎖定常ドメイン、Fc領域又はその一部に融合されている）、Fab融合分子（異なるFabフラグメントが互いに融合されている）、ScFv-及びディアボディ-ベース及び重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）（異なる一本鎖Fv分子又は異なるディアボディ若しくは異なる重鎖抗体（例えば、ドメイン抗体、ナノボディ）が互いに又は別のタンパク質若しくは担体分子に融合されている）が挙げられる。

【0158】

一部の実施形態では、相補性CH3ドメイン分子を有するIgG様分子には、Triomab/Quadroma(Triom Pharma/Fresenius Biotech)、Knobbs-into-Holes(Genentech)、CrossMabs(Roche)及び静電的マッチされた抗体(Amgen)、LUZ-Y(Genentech)、ストランド交換操作ドメインボディ(SEEDbody)(EMD Serono)、Biclonic(Merus)、並びにDuoBody(登録商標)(G

enmab A/S) が挙げられる。

【0159】

一部の実施形態では、組換え IgG 様デュアル標的化分子には、Dual Targeting (DT)-Ig (GSK/Domantis)、Two-in-one Antibody (Genentech)、Cross-linked Mabs (Karmanos Cancer Center)、mAb2 (F-Star)、及びCovX-body (CovX/Pfizer) が挙げられる。

【0160】

一部の実施形態では、IgG 融合分子には、Dual Variable Domain (DVD)-Ig (Abbott)、IgG-like Bispecific (InnClone/Eli Lilly)、Ts2Ab (MedImmune/AZ)、及びBsAb (ZymoGenetics)、HERCULES (Biogen Idec)、並びにTvAb (Roche) が挙げられる。

10

【0161】

一部の実施形態では、Fc 融合分子には、ScFv/Fc Fusions (Academic Institution)、SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, ZymoGenetics/BMS)、Dual Affinity Retargeting Technology (Fc-DART) (MacroGenics)、及びDual (ScFv).sub.2-Fab (National Research Center for Antibody Medicine - China) が挙げられる。

20

【0162】

一部の実施形態では、Fab 融合二重特異性抗体には、F(ab)2 (Medarex/AMGEN)、Dual-Action or Bis-Fab (Genentech)、Dock-and-Lock (DNL) (Immunomedics)、Bivalent Bispecific (Biotechnol)、及びFab-Fv (UCB-Celletech) が挙げられる。ScFv-、ディアボディ-ベース及びドメイン抗体には、Bispecific T Cell Engager (BITE) (Micromet)、Tandem Diobody (Tandab) (Affimed)、Dual Affinity Retargeting Technology (DART) (MacroGenics)、Single-chain Diobody (Academic)、TCR-like Antibodies (AIT, Receptor Logics)、Human Serum Albumin ScFv Fusion (Merrimack)、及びCOMBODY (Epigen Biotech)、二重標的指向性ナノボディ (dual targeting nanobody) (Ablynx)、二重標的指向性の重鎖のみのドメイン抗体 (dual targeting heavy chain only domain antibody) が挙げられるが、これらに限定されない。

30

【0163】

本発明の全長二重特異性抗体は、例えば、2つの単特異性二価抗体間でのFab アーム交換（又は半分子交換）を使用して、インピトロでのセルフリー環境において又は共発現を使用するかのいずれか一方において、異なる特異性を有する2つの抗体半分子の好ましいヘテロ二量体形成のために、各半分子における重鎖CH3界面に置換を導入することにより生成されてもよい。Fab アーム交換反応は、ジスルフィド結合異性化反応及びCH3ドメインの解離-会合の結果である。親単特異性抗体のヒンジ領域における重鎖ジスルフィド結合は減少する。親単特異性抗体のうち1つの得られた遊離システインは、第2の親単特異性抗体分子のシステイン残基と重鎖内ジスルフィド結合を形成し、同時に、親抗体のCH3ドメインは、解離-会合により開放及び再形成する。Fab アームのCH3ドメインは、ホモ二量体化より好ましいヘテロ二量体化に操作されてもよい。得られた生成物は、それぞれ異なるエピトープ、すなわち、BCMA上のエピトープ及びCD3上のエピトープに結合する、2つのFab アーム又は半分子を有する二重特異性抗体である。

40

50

【0164】

本明細書で使用されるとき、「ホモ二量体化」は、同一のCH3アミノ酸配列を有する2本の重鎖の相互作用を意味する。本明細書で使用されるとき、「ホモ二量体」は、同一のCH3アミノ酸配列を有する2本の重鎖を有する抗体を意味する。

【0165】

本明細書で使用されるとき、「ヘテロ二量体化」は、同一でないCH3アミノ酸配列を有する2本の重鎖の相互作用を意味する。本明細書で使用されるとき、「ヘテロ二量体」は、同一でないCH3アミノ酸配列を有する2本の重鎖を有する抗体を意味する。

【0166】

「ノブ - in - ホール」戦略（例えば、国際公開第2006/028936号を参照のこと）が、全長二重特異性抗体を生成するのに使用されてもよい。簡潔に、ヒトIgGにおけるCH3ドメインの界面を形成する選択されたアミノ酸は、ヘテロ二量体形成を促進するために、CH3ドメイン相互作用に影響を及ぼす位置において変異され得る。小さな側鎖を有するアミノ酸（ホール）が、第1の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入され、大きな側鎖を有するアミノ酸（ノブ）が、第2の抗原に特異的に結合する抗体の重鎖内に導入される。2つの抗体の共発現後に、ヘテロ二量体が、「ホール」を有する重鎖と「ノブ」を有する重鎖との優先的な相互作用の結果として形成される。ノブ及びホールを形成する例示的なCH3置換ペアは、T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S、及びT366W/T366S_L368A_Y407Vである（第1の重鎖の第1のCH3ドメインにおける改変位置 / 第2の重鎖の第2のCH3ドメインにおける改変位置として表現）。

10

20

30

【0167】

他の戦略、例えば、あるCH3表面における正に荷電した残基及び第2のCH3表面における負に荷電した残基を置換することによる静電的相互作用を使用する重鎖ヘテロ二量体化の促進が、米国特許出願公開第2010/0015133号、米国特許出願公開第2009/0182127号、米国特許出願公開第2010/028637号、又は米国特許出願公開第2011/0123532号に記載されたように使用されてもよい。他の戦略では、ヘテロ二量体化は、米国特許出願公開第2012/0149876号又は米国特許出願公開第2013/0195849号に記載されたように、下記置換：L351Y_F405A_Y407V/T394W、T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V、L351Y_Y407A/T366A_K409F、L351Y_Y407A/T366V_K409F_Y407A/T366A_K409F、又はT350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W（第1の重鎖の第1のCH3ドメインにおける改変位置 / 第2の重鎖の第2のCH3ドメインにおける改変位置として表現）により促進されてもよい。

40

【0168】

上記された方法に加えて、本発明の二重特異性抗体は、国際公開第2011/1311746号に記載された方法に従って、セルフリー環境でのインビトロにおいて、2つの単特異性ホモ二量体抗体のCH3領域中に非対称な変異を導入し、ジスルフィド結合を異性化させる還元条件下において、2つの親単特異性ホモ二量体抗体から二重特異性ヘテロ二量体抗体を形成することにより生成されてもよい。この方法において、第1の単特異性二価抗体（例えば、抗BCMA抗体）及び第2の単特異性二価抗体（例えば、抗CD3抗体）は、ヘテロ二量体の安定性を促進するCH3ドメインにおける特定の置換を有するよう操作される。これらの抗体は、ヒンジ領域におけるシステインがジスルフィド結合異性化を受けるのに十分な還元条件下において共にインキュベートされ、これにより、Fabアーム交換による二重特異性抗体が生成される。インキュベーション条件は、最適には、非還元条件に戻されてもよい。使用されてもよい例示的な還元剤は、2-メルカプトエチルアミン（2-MEA）、ジチオスレイトール（DTT）、ジチオエリスリトール（DTE）

50

)、グルタチオン、トリス(2-カルボキシエチル)ホスフィン(TCEP)、L-システイン、及びベータ-メルカプトエタノール、好ましくは、2-メルカプトエチルアミン、ジチオスレイトール、及びトリス(2-カルボキシエチル)ホスフィンからなる群から選択される還元剤である。例えば、少なくとも20の温度において、少なくとも25mM 2-MEAの存在下又は少なくとも0.5mMジチオスレイトールの存在下で、pH 5~8、例えば、pH 7.0又はpH 7.4において、少なくとも90分のインキュベーションが使用されてもよい。

【0169】

記載されたBCMA×CD3多重特異性抗体に加えて、記載されたBCMA×CD3多重特異性抗体をコード可能なポリヌクレオチド配列も提供される。記載されたポリヌクレオチドを含むベクターもまた提供され、同様に、本明細書で提供されたBCMA×CD3多重特異性抗体を発現している細胞も提供される。また、開示されたベクターを発現可能な細胞も記載される。これらの細胞は、哺乳類細胞(例えば、293F細胞、CHO細胞)、昆虫細胞(例えば、Sf9細胞)、酵母細胞、植物細胞、又は細菌細胞(例えば、E.coli)でもよい。記載された抗体はまた、ハイブリドーマ細胞により生成することができる。

10

【0170】

多重特異性抗体及びその多重特異性抗原結合フラグメントを使用する治療組成物及び処置方法

上記で検討されたBCMA二重特異性抗体、例えば、上記で検討されたBCMA×CD3二重特異性抗体は、治療に有用である。特に、BCMA二重特異性抗体は、がんを処置するのに有用である。また、本明細書において、治療的に有効な量の、本明細書に記載された多重特異性抗体又は多重特異性抗原結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体とを含む、哺乳類における過剰増殖性障害を処置するための治療組成物が提供される。好ましい実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書に記載されたようなBCMA×CD3多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されたようなBCMA×CD3二重特異性抗体又はそのBCMA×CD3二重特異性抗原結合フラグメントである。一実施形態では、当該医薬組成物は、BCMA発現がんの治療用であり、BCMA発現がんとしては、多発性骨髄腫(MM)などのBCMA発現B細胞がん、及びBCMAが発現していると今のところ判定される他のがんが挙げられる(ただし、これらに限定されない)。がん、例えば、上記で検討された特定のがんを含む血液がんを処置するのに使用されてもよい特定の二重特異性抗体には、抗体BCMB69、BCMB117、BCMB123、BCMB128、BCMB129、BCMB176、若しくはBCMB177、又はCD3B219が挙げられる。がん、例えば、これらの特定のがんを含む血液がんを処置するのに有用な二重特異性抗体の一例は、BCMB72である。

20

30

【0171】

本明細書で提供された医薬組成物は、a)有効量の本発明の多重特異性抗体又は抗体フラグメントと、b)不活性でも又は生理学的に活性でもよい医薬的に許容され得る担体とを含む。好ましい実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書に記載されたようなBCMA×CD3多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されたようなBCMA×CD3二重特異性抗体又はそのBCMA×CD3二重特異性抗原結合フラグメントである。本明細書で使用されるとき、「医薬的に許容され得る担体」という用語は、生理学的に適合性である、任意かつ全ての溶媒、分散媒体、コーティング、抗菌剤、及び抗真菌剤等を含む。適切な担体、希釈剤、及び/又は賦形剤の例には、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等のうち1種又は2種以上、並びにそれらの任意の組み合わせが挙げられる。多くの場合には、等張性剤、例えば、糖、ポリアルコール、又は塩化ナトリウムを組成物中に含むのが好ましいであろう。特に、適切な担体の関連する例には、(1)ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水、pH約7.4、約1mg/mL~25mg/mLヒト血清ア

40

50

ルブミンを含有又は非含有、(2)0.9%生理食塩水(0.9%w/v)塩化ナトリウム(NaCl)、及び(3)5%(w/v)デキストロースが挙げられ、抗酸化剤、例えば、トリプタミン及び安定化剤、例えば、Tween 20(登録商標)をも含有してもよい。

【0172】

本明細書における組成物はまた、処置される特定の障害に応じて、更なる治療剤を含有してもよい。好ましくは、多重特異性抗体又は抗体フラグメントと補助的な活性化合物とは、互いに有害に影響を及ぼさない補完的な活性を有するであろう。好ましい実施形態では、更なる治療剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン2である。好ましい実施形態では、更なる治療剤は、化学療法剤である。

10

【0173】

本発明の組成物は、各種の形態でもよい。これらには、例えば、液体、半固体、及び固体の剤形が挙げられるが、好ましい形態は、意図された投与方式及び治療用途により決まる。典型的に好ましい組成物は、注射用液又は注入用液の形態である。好ましい投与方式は、非経口(例えば、静脈内、筋肉内、腹腔内、皮下)である。好ましい実施形態では、本発明の組成物は、静脈内に、ボーラスとして又は一定期間にわたる連続的な注入により投与される。別の好ましい実施形態では、本組成物は、局所及び全身性の治療効果を発揮するために、筋肉内、皮下、関節内、関節滑液嚢内、腫瘍内、腫瘍周囲、病巣内、又は病巣周囲の経路により投与される。

20

【0174】

非経口投与用の無菌組成物が、本発明の抗体、抗体フラグメント、又は抗体コンジュゲートを、必要とされる量で適切な溶媒に包含させ、続けて、マイクロフィルター法により滅菌することにより調製され得る。溶媒又は媒体として、水、生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水、デキストロース、グリセロール、エタノール等、並びにこれらの組み合わせを使用することができる。多くの場合には、等張性剤、例えば、糖、ポリアルコール、又は塩化ナトリウムを組成物中に含むのが好ましいであろう。これらの組成物はまた、補助剤、特に、湿潤剤、等張化剤、乳化剤、分散剤、及び安定化剤を含有してもよい。非経口投与用の無菌組成物はまた、使用時に滅菌水又は任意の他の注射用無菌媒体中に溶解されてもよい、無菌の固体組成物の形態に調製されてもよい。

30

【0175】

多重特異性抗体又は抗体フラグメントはまた、経口投与されてもよい。経口投与用の固体組成物として、錠剤、丸剤、粉末剤(ゼラチンカプセル剤、サッシェ剤)、又は顆粒剤が使用されてもよい。これらの組成物において、本発明による活性成分は、1つ又は2つ以上の不活性な希釈剤、例えば、デンプン、セルロース、スクロース、ラクトース、又はシリカと、アルゴン流下において混合される。これらの組成物はまた、希釈剤以外の物質、例えば、1つ又は2つ以上の滑材、例えば、ステアリン酸マグネシウム又はタルク、着色剤、コーティング(糖衣錠)、又はグレーズを含んでもよい。

【0176】

経口投与用の液体組成物として、不活性な希釈剤、例えば、水、エタノール、グリセロール、植物油、又はパラフィンオイルを含有する、医薬的に許容され得る液剤、懸濁剤、乳剤、シロップ剤、及びエリキシル剤が使用されてもよい。これらの組成物は、希釈剤以外の物質、例えば、湿潤剤、甘味料、増粘剤、着香剤、又は安定化製品を含んでもよい。

40

【0177】

用量は、所望の効果、処置の持続期間、及び使用される投与経路により決まる。用量は、一般的には、成人1日あたりに経口で5mg~1000mgであり、単位用量は、活性物質1mg~250mgの範囲である。一般的には、医師は、適切な用量を、処置される対象の年齢、体重、及び同対象に固有の任意の他の要因に応じて決定するであろう。

【0178】

また、本明細書において、当該BCMAに結合し、T細胞を補充して、当該BCMA+細胞を殺傷すること(すなわち、T細胞のリダイレクト)が可能な多重特異性抗体を、そ

50

れを必要とする患者に投与することにより、BCMA + 細胞を殺傷するための方法が提供される。本発明の多重特異性抗体又は抗体フラグメントのいずれかは、治療的に使用されてもよい。例えば、一実施形態では、BCMA × CD3 多重特異性抗体の BCMB72 を治療的に使用して、対象においてがんを治療してもよい。

【0179】

好みしい実施形態では、本発明の多重特異性抗体又は抗体フラグメントは、哺乳類における過剰増殖性障害を処置するために使用される。より好みしい実施形態では、本発明の多重特異性抗体又は抗体フラグメントを含有する、上記で開示された医薬組成物のうち1つは、哺乳類における過剰増殖性障害を処置するために使用される。一実施形態において、この障害は、がんである。特に、がんはBCMA 発現がんであり、BCMA 発現がんとしては、多発性骨髄腫（MM）などのBCMA 発現 B 細胞がん、及びBCMA が発現していると今のところ判定される他のがんが挙げられる（ただし、これらに限定されない）。好みしい実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書に記載されたようなBCMA × CD3 多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントであり、より好みしくは、本明細書に記載されたようなBCMA × CD3 二重特異性抗体又はそのBCMA × CD3 二重特異性抗原結合フラグメントである。

【0180】

したがって、本発明の医薬組成物は、様々ながんの治療又は予防に有用であり、がんとしては、BCMA 発現がんが挙げられ（ただし、これらに限定されない）、BCMA 発現がんとしては、急性多発性骨髄腫（MM）などのBCMA 発現 B 細胞がん、及びBCMA が発現していると今のところ判定される他のがんが挙げられる（ただし、これらに限定されない）。

【0181】

同様に、本明細書において、選択された細胞集団の成長を阻害するための方法であって、BCMA 発現標的細胞又はこのような標的細胞を含有する組織を、有効量の本発明の多重特異性抗体又は抗体フラグメントと、単独で、又は他の細胞毒性剤若しくは治療剤との組み合わせにおいてかのいずれか一方で、末梢血単核球（PBMC）の存在下で接触させることを含む、方法が更に提供される。好みしい実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書に記載されたようなBCMA × CD3 多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントであり、より好みしくは、本明細書に記載されたようなBCMA × CD3 二重特異性抗体又はそのBCMA × CD3 二重特異性抗原結合フラグメントである。好みしい実施形態では、更なる治療剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン2である。好みしい実施形態では、更なる治療剤は、化学療法剤である。選択された細胞集団の成長を阻害するための方法は、インピトロ、インピボ、又はエクスピボにおいて実施され得る。

【0182】

インピトロでの使用例には、疾患細胞又は悪性細胞を殺傷するための同じ患者への移植前の自家骨髄の処理、適格性T細胞を殺傷し、移植片対宿主病（GVHD）を防止するための移植前の骨髄の処理、標的抗原を発現していない所望の変異体を除く全ての細胞を殺傷し、又は不要な抗原を発現している変異体を殺傷するための細胞培養物の処理が挙げられる。非臨床的なインピトロでの使用条件は、当業者により容易に決定される。

【0183】

臨床的なエクスピボでの使用例は、がん処置における自家移植前での、骨髄から腫瘍細胞を除去することである。処置は、下記のように行われ得る。骨髄を、患者又は他の個体から収集し、ついで、本発明の細胞毒性剤を添加された血清含有培地中でインキュベートする。濃度は、約30分～約48時間、約37°Cにおいて、約10 μM～1 μMの範囲である。インキュベーションの濃度及び時間の正確な条件、すなわち用量は、当業者により容易に決定される。インキュベーション後、骨髄細胞を、血清含有培地で洗浄し、既知の方法に従って、i.v. 注入により患者に戻す。患者が他の処置、例えば、一連の骨髄破壊的化学療法又は全身照射を受けている状況において、骨髄の収集と処理された細胞の再

10

20

30

40

50

注入との時間の間、処理された骨髄細胞は、標準的な医療機器を使用して、液体窒素中で凍結保存される。

【0184】

臨床的なインビオでの使用について、治療的に有効な量の多重特異性抗体又は抗原結合フラグメントがそれを必要とする対象に投与される。例えば、B C M A × C D 3 多重特異性抗体及びその多重特異性抗原結合フラグメントは、それを必要とする対象における、B C M A 発現がんの処置に有用であり得る。一部の実施形態では、B C M A 発現がんは、多発性骨髄腫（M M）などのB細胞がんである。好ましい実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書に記載されたようなB C M A × C D 3 多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されたようなB C M A × C D 3 二重特異性抗体又はそのB C M A × C D 3 二重特異性抗原結合フラグメントである。一部の実施形態では、対象は、哺乳類、好ましくは、ヒトである。一部の実施形態では、多重特異性抗体又は多重特異性抗原結合フラグメントは、無菌試験済みの溶液として投与されるであろう。

10

【0185】

処置及び使用の上記方法における投与計画は、最適な所望の応答（例えば、治療応答）を提供するように調節される。例えば、単一ボーラスを投与してもよく、いくつかの分離用量を、時間をかけて投与してもよく、又は用量を治療状況の緊急性によって示されるように、比例して減少又は増加させてよい。非経口組成物は、投与の容易性及び用量の均一性のための投与形態に製剤化されてもよい。

20

【0186】

多重特異性抗体及びフラグメントの効率的な投与及び投与計画は、処置される疾患又は状態により決まり、当業者により決定されてもよい。本発明の化合物の治療的に有効な量の例示的で非限定的な範囲は、約0.001～10mg/kg、例えば、約0.001～5mg/kg、例えば、約0.001～2mg/kg、例えば、約0.001～1mg/kg、例えば、約0.001、約0.01、約0.1、又は約10mg/kgである。

20

【0187】

当技術分野において通常の技能を有する医師又は獣医師は、必要とされる医薬組成物の有効量を、容易に決定し、処方することができる。例えば、医師又は獣医師は、所望の治療効果を達成するのに必要されるより少ないレベルで医薬組成物中に利用される多重特異性抗体又はフラグメントの用量で開始し、所望の効果が達成されるまで、用量を徐々に増大させることができる。一般的には、本発明の二重特異性抗体の適切な日量は、治療効果を生じさせるのに有効な最も少ない用量である化合物量であろう。投与は、例えば、非経口、例えば、静脈内、筋肉内、又は皮下でもよい。一実施形態において、多重特異性抗体又はフラグメントは、mg/m²で算出された毎週投与での注入により投与されてもよい。このような用量は、例えば、下記：用量(mg/kg) × 70 : 1.8 に従って、上記で提供されたmg/kg用量に基づくことができる。このような投与は、例えば、1～8回、例えば、3～5回繰り返されてもよい。投与は、2～24時間、例えば、2～12時間の期間にわたる連続的な注入により行われてもよい。一実施形態において、多重特異性抗体又はフラグメントは、毒性の副作用を減少させるために、長期間、例えば、24時間超にわたるゆっくりとした連続的な注入により投与されてもよい。

30

【0188】

一実施形態において、多重特異性抗体又はフラグメントは、1週間に1回で与えられる場合、最大8回、例えば、4～6回の固定用量として算出された毎週投与において投与されてもよい。このような計画は、例えば、6ヶ月又は12ヶ月後に、必要に応じて1回又は2回以上の回数繰り返されてもよい。このような固定用量は、例えば、上記で提供されたmg/kg用量に基づくことができるが、このとき体重は、70kgと仮定する。用量は、例えば、生体サンプルを採取し、本発明の多重特異性抗体のB C M A 抗原結合領域を標的にする抗イディオタイプ抗体を使用することによって、本発明の二重特異性抗体の投

40

50

与時の血中量を測定することにより、決定又は調節されてもよい。

【0189】

一実施形態において、多重特異性抗体又はフラグメントは、維持治療、例えば、6ヶ月以上の期間に週一回等により投与されてもよい。

【0190】

多重特異性抗体又はフラグメントはまた、がんの進行リスクを低下させ、がんの進行におけるイベントの発生の開始を遅延させ、かつ／又はがんが緩解した際の再発リスクを低下させるために、予防的に投与されてもよい。

【0191】

本明細書に記載された多重特異性抗体及びそのフラグメントはまた、組み合わせ治療において投与されてもよい、すなわち、処置される疾患又は状態に関連する他の治療剤と組み合わせられてもよい。したがって、一実施形態において、抗体含有医薬は、1種又は2種以上の他の治療剤、例えば、化学療法剤と組み合わせるためのものである。一部の実施形態では、他の治療剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン2である。このような組み合わせ投与は、同時、任意の順序において、別々又は連続的でもよい。同時投与について、薬剤は、必要に応じて、1つの組成物又は別々の組成物として投与されてもよい。

10

【0192】

一実施形態において、対象においてBCMAを発現している細胞が関与する障害を処置するための方法であって、それを必要とする対象に、治療的に有効な量の、本明細書に記載された多重特異性抗体又はフラグメント、例えば、BCMA×CD3二重特異性抗体を投与し、かつ放射線治療を行うことを含む方法が提供される。一実施形態において、がんを治療又は予防するための方法であって、それを必要とする対象に、治療的に有効な量の、本明細書に記載された多重特異性抗体又はフラグメント、例えば、BCMA×CD3抗体を投与し、かつ放射線治療を行うことを含む方法が提供される。放射線治療としては、提供される患者に対する、放射線又は放射性医薬の関連する投与を含んでもよい。放射線源は、処置される患者の外側又は内側のいずれか一方であってもよい（放射線処置は、例えば、放射線外部照射（EBRT）又は組織内照射療法（BT）の形態でもよい）。このような方法を実施するのに使用されてもよい放射性元素には、例えば、ラジウム、セシウム-137、イリジウム-192、アメリシウム-241、金-198、コバルト-57、銅-67、テクネチウム-99、ヨウ素-123、ヨウ素-131、及びインジウム-111が挙げられる。

20

30

【0193】

キット

また、本明細書において、例えば、記載された多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントと、特定の細胞種を殺傷するための抗体又はフラグメントを使用するための取扱説明書と、を含むキットも提供される。好ましい実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書に記載されたようなBCMA×CD3多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されたようなBCMA×CD3二重特異性抗体又はそのBCMA×CD3二重特異性抗原結合フラグメントである。取扱説明書は、多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントを、インピトロ、インピボ、又はエクスピボにおいて使用するための指示を含んでもよい。

40

【0194】

典型的には、キットは、多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントを含有する区画を有するであろう。多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントは、凍結乾燥状態、液状、又はキットに含ませるのに修正可能な他の形態でもよい。キットはまた、キットの取扱説明書に記載された方法を実施するのに必要とされる、更なる要素を含有してもよい。同要素は、例えば、凍結乾燥粉末を再構成するための滅菌溶液、患者への投与の前に多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントと組み合わせるための更なる薬剤、及び多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントを患者に投与するのを支援するツールである。

50

【0195】

診断的使用

本明細書に記載された多重特異性抗体及びフラグメントはまた、診断目的に使用されてもよい。このため、本明細書で定義されたような多重特異性抗体又はフラグメントを含む診断組成物及びその使用もまた提供される。好ましい実施形態では、多重特異性抗体は、本明細書に記載されたような B C M A × C D 3 多重特異性抗体又はその多重特異性抗原結合フラグメントであり、より好ましくは、本明細書に記載されたような B C M A × C D 3 二重特異性抗体又はその B C M A × C D 3 二重特異性抗原結合フラグメントである。一実施形態において、本発明は、二重特異性 B C M A × C D 3 抗体と、 B C M A に対する抗体の結合を検出するための 1 種又は 2 種以上の試薬と、を含む容器を含む、がんを診断するためのキットを提供する。試薬には、例えば、蛍光タグ、酵素タグ、又は他の検出可能なタグを挙げることができる。試薬はまた、酵素反応のための二次若しくは三次抗体又は試薬を含んでもよい。この場合、酵素反応は、可視化することができる生成物を生じる。例えば、本明細書に記載された多重特異性抗体又はその抗原結合フラグメントは、放射線標識、蛍光標識、エピトープタグ、ビオチン、発色団標識、 E C L 標識、酵素、ルテニウム、¹¹¹In - D O T A 、¹¹¹In - ジエチレントリアミンペニンタ酢酸 (D T P A) 、西洋わさびペルオキシダーゼ、アルカリホスファターゼ、及びベータガラクトシダーゼ、若しくはポリヒスチジン、又は、当技術分野において公知の類似するこのような標識で標識されてもよい。

10

20

【0196】

記載された主題の例示的な実施形態

本明細書における主題をより良くより完全に説明するために、本項は提示された主題の例示的な実施形態の列挙を提供する。

【0197】

実施形態の列挙：

1 . B C M A に免疫特異的に結合する組換え抗体、又はその抗原結合フラグメントであって、抗体は重鎖及び軽鎖を有し、当該重鎖は、

a . 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖相補性決定領域 1 (C D R 1) 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

b . 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

c . 配列番号 7 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

d . 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 19 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

e . 配列番号 4 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 6 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

f . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 5 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 19 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、

g . 配列番号 13 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 1 、配列番号 8 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 2 、及び配列番号 19 のアミノ酸配列を有する重鎖 C D R 3 、を含む、組換え抗体、又はその抗原結合フラグメント。

30

2 . 当該抗体は、配列番号 24 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 1 、配列番号 25 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 2 、及び配列番号 26 のアミノ酸配列を有する軽鎖 C D R 3 、を更に含む、実施形態 1 に記載の抗体、又はその抗原結合フラグメント。

3 . (a) の抗体の重鎖は、配列番号 27 のアミノ酸配列を含み、(b) の抗体の重鎖は、配列番号 57 のアミノ酸配列を含み、(f) の抗体の重鎖は、配列番号 34 のアミノ酸配列を含み、(k) の抗体の重鎖は、配列番号 39 のアミノ酸配列を含み、(l) の抗体の重鎖は、配列番号 40 のアミノ酸配列を含み、(m) の抗体の重鎖は、配列番号 58

40

50

のアミノ酸配列を含み、又は(n)の抗体の重鎖は、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む、実施形態 1 に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

4 . 抗体の軽鎖は、配列番号 2 8 のアミノ酸配列を含む、実施形態 2 又は 3 に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

5 . 抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト B C M A の細胞外ドメインに結合する、実施形態 1 ~ 4 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

6 . 抗体又は抗原結合フラグメントは、ヒトの抗体又は抗原結合フラグメントである、実施形態 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

7 . 抗原結合フラグメントは、F a b フラグメント、F a b 2 フラグメント、又は一本鎖抗体である、実施形態 1 ~ 6 のいずれか一項に記載の抗原結合フラグメント。 10

8 . 抗体又はその抗原結合フラグメントは、B C M A 及び A P R I L の相互作用を阻害する、実施形態 1 ~ 7 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

9 . 抗体又は抗原結合フラグメントは、E L I S A により測定するとき、B C M A 及び A P R I L の相互作用について約 5 . 9 n M の I C ₅₀ を示す、実施形態 8 に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

10 . 抗体又はその抗原結合フラグメントは I g G である、実施形態 1 ~ 9 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

11 . I g G 4 アイソタイプである、実施形態 1 ~ 1 0 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

12 . I g G 4 は、その F c 領域中に、S 2 2 8 P 置換、L 2 3 4 A 置換、及び L 2 3 5 A 置換を有する、実施形態 1 1 に記載の抗体。 20

13 . 抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト B C M A に免疫特異的に結合し、カニクイザル B C M A に交差反応する、実施形態 1 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

14 . 抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト骨髄腫細胞の表面上の B C M A に結合する、実施形態 1 ~ 1 3 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。

15 . 抗体又はその抗原結合フラグメントは、ヒト多発性骨髄腫細胞の表面上の B C M A に結合する、実施形態 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメント。 30

16 . 実施形態 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の抗体又は抗原結合フラグメントを発現している、組換え細胞。

17 . 細胞はハイブリドーマである、実施形態 1 6 に記載の細胞。

18 . 抗体は組換え的に生成される、実施形態 1 6 に記載の細胞。

19 . 組換え B C M A × C D 3 二重特異性抗体又はその B C M A × C D 3 二重特異性結合フラグメントであって、

- a) 第 1 の重鎖 (H C 1) 、
- b) 第 2 の重鎖 (H C 2) 、
- c) 第 1 の軽鎖 (L C 1) 、と、
- d) 第 2 の軽鎖 (L C 2) を含み、

H C 1 は L C 1 と結合され、H C 2 は L C 2 と結合され、C D 3 に免疫特異的に結合する第 1 の抗原結合部位を形成するために、H C 1 は配列番号 5 9 、配列番号 6 0 、及び配列番号 6 1 を含み、L C 1 は配列番号 6 2 、配列番号 6 3 、及び配列番号 6 4 を含み、また B C M A に免疫特異的に結合する第 2 の抗原結合部位を形成するために、H C 2 は配列番号 4 、配列番号 5 、及び配列番号 6 を含み、L C 2 は配列番号 2 4 、配列番号 2 5 、及び配列番号 2 6 を含む、組換え B C M A × C D 3 二重特異性抗体又はその B C M A × C D 3 二重特異性結合フラグメント。 40

20 . 配列番号 5 5 を含む H C 1 と、配列番号 5 6 を含む L C 1 と、配列番号 6 5 を含む H C 2 と、a) 配列番号 6 6 又は b) 配列番号 7 6 を含む L C 2 と、を含む、実施形態 1 9 に記載の組換え B C M A × C D 3 二重特異性抗体又はそのフラグメント。

21 . 抗体又は二重特異性結合フラグメントは I g G である、実施形態 2 0 に記載の B 50

C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

22 . 抗体又は二重特異性結合フラグメントは I g G 4 アイソタイプである、実施形態 19 、 20 、又は 21 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

23 . 抗体又は二重特異性結合フラグメントは、表面プラズモン共鳴により測定するとき、少なくとも 0.22 nM の親和性でヒト B C M A に免疫特異的に結合する、実施形態 19 ~ 22 に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

24 . 抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒト骨髄腫細胞の表面上の B C M A に結合する、実施形態 19 ~ 23 に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

25 . 抗体又はその二重特異性結合フラグメントは、ヒト多発性骨髄腫細胞の表面上の B C M A に結合する、実施形態 19 ~ 24 に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

26 . 抗体又は二重特異性結合フラグメントは、約 0.37 nM 未満の E C 50 でインピトロでヒト T 細胞活性化を誘発する、実施形態 19 ~ 25 に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

27 . 抗体又は二重特異性結合フラグメントは、約 0.45 nM 未満の E C 50 でインピトロで B C M A 発現細胞の T 細胞依存性細胞傷害を誘発する、実施形態 19 ~ 26 に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

28 . 抗体又は二重特異性結合フラグメントは、 B C M A アゴニストではない、実施形態 19 ~ 27 に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

29 . 抗体又は二重特異性結合フラグメントは、 10 nM 未満の濃度で N F - B 活性化を変化させない、実施形態 19 ~ 28 に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント。

30 . 実施形態 19 ~ 29 のいずれか一項に記載の抗体又は二重特異性結合フラグメントを発現している、組換え細胞。

31 . 細胞はハイブリドーマである、実施形態 30 に記載の細胞。

32 . がんを有する対象を処置するための方法であって、実施形態 19 ~ 29 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの治療的に有効な量を、それを必要とする対象に、がんを処置するのに十分な時間投与することを含む、方法。

33 . がん細胞の成長又は増殖を阻害するための方法であって、実施形態 19 ~ 29 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの治療的に有効な量を投与し、がん細胞の成長又は増殖を阻害することを含む、方法。

34 . T 細胞を B C M A 発現がん細胞にリダイレクトする方法であって、実施形態 19 ~ 29 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの治療的に有効な量を投与し、 T 細胞をがんにリダイレクトすることを含む、方法。

35 . がんは血液がんである、実施形態 32 、 33 、又は 34 に記載の方法。

36 . 血液がんは B C M A 発現 B 細胞がんである、実施形態 35 に記載の方法。

37 . B C M A 発現 B 細胞がんは多発性骨髄腫である、実施形態 36 に記載の方法。

38 . 第 2 の治療剤を投与することを更に含む、実施形態 32 に記載の方法。

39 . 第 2 の治療剤は、化学療法剤又は標的化抗がん治療剤である、実施形態 38 に記載の方法。

40 . 化学療法剤は、シタラビン、アントラサイクリン、ヒスタミン二塩酸塩、又はインターロイキン 2 である、実施形態 39 に記載の方法。

41 . 実施形態 19 ~ 29 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントと、医薬的に許容され得る担体と、を含む、医薬組成物。

42 . 実施形態 30 ~ 31 のいずれか一項に記載の細胞を培養することにより、実施形

態 19 ~ 29 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントを生成するための方法。

43. 実施形態 19 ~ 29 のいずれか一項に記載の B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメントの H C 1、H C 2、L C 1、又は L C 2 をコードする、単離された合成ポリヌクレオチド。

44. 実施形態 19 ~ 29 のいずれか一項に定義されるような B C M A × C D 3 二重特異性抗体又は二重特異性結合フラグメント、及び / 又は請求項 44 に定義されるようなポリヌクレオチド、及びこれらのための包装、を含む、キット。

【実施例】

【0198】

下記実施例は、先の開示を補い、本明細書に記載された主題のより良好な理解を提供するために提供される。これらの実施例は、記載された主題を限定すると解釈されるべきでない。本明細書に記載された実施例及び実施形態は、例示のみを目的とするものであり、それらを考慮して種々の改変又は変更が、当業者に明らかであろう。また、本明細書に記載された実施例及び実施形態は、本発明の真の範囲内に含まれ、本発明の真の範囲を逸脱することなくなされ得ることが理解される。

【0199】

実施例 1 : 材料

B C M A E C D 分子

組換えヒト (h) B C M A - F c 融合タンパク質 (カタログ # 193 - B C - 050 、 h B C M A (配列番号 1) のアミノ酸 1 ~ 54 に相当する) 及び組換えマウス (m) B C M A - F c 融合タンパク質 (カタログ # 593 - B C - 050 、 m B C M A (配列番号 2) のアミノ酸 1 ~ 49 に相当する) を R & D Systems から入手した。組換えカニクイザル B C M A タンパク質は、遺伝子合成技術 (米国特許第 6,670,127 号、同第 6,521,427 号) から得た c D N A から調製した。全てのタンパク質を、使用前にエンドトキシンについて検査し、ファージパニング試験のためにビオチン化した。これらの材料を結合性及び親和性の測定にも使用した。

【0200】

可溶性ヒト B C M A を A B B i o s c i e n c e s (カタログ番号 P 011 X p 、ロット番号 033 - 013) から入手し、特性試験に使用した。

【0201】

A P R I L 、 B A F F 、 B A F F - R 、及び T A C I 分子

可溶性 h A P R I L (カタログ # D Y 884) 、 h B A F F (カタログ # 2149 - B F) 、 h B A F F - R (カタログ # 1162 - B R 、 h B A F F - R のアミノ酸 7 ~ 71 に相当する) 、及び h T A C I (T A C I のアミノ酸 2 ~ 166 に相当する) を R & D Systems から入手した。 B A F F - R 及び T A C I を S P R 試験のためにビオチン化した。

【0202】

B C M A 細胞株の生成

ヒト B C M A (図 1A) 及びカニクイザル B C M A (図 1B) を提供するベクターを、標準的な方法を使用して H E K 293 e x p i 細胞に一次的にトランスフェクションした。トランスフェクションされた 293 F 付着細胞を、安定したプラスミド組込み用に選択した。ついで、単一細胞を選別し、 B C M A 表面受容体発現を、抗ヒト B C M A - P E 標識抗体 (R & D Systems F A B 193 P) を使用する F A C S により定量した。

【0203】

実施例 2 : ヒト B C M A モノクローナル抗体発現ハイブリドーマの単離

ヒト免疫グロブリントラスジェニックラット株 (O m n i R a t (登録商標) 、 O M T , I n c .) を使用して、ヒト B C M A モノクローナル抗体発現ハイブリドーマ細胞を発生させた。 O m n i R a t (登録商標) は、完全なヒト I g L 座 (J - C) に結合し

た 12 の V_H 及び J_H - C_H に結合した 16 の V_H)と共に、キメラヒト / ラット IgH 座 (ラット C_H 座に結合した自然構成での 22 のヒト V_H セグメント、全てのヒト D 及び J_H セグメントからなる) を含む。(例えば、 Osborn , et al . (2013) J Immunol 190 (4) : 1481 ~ 1490 を参照のこと) 。したがって、ラットは、ラット IgM 又は IgG の発現の減少を示し、免疫付与に応じて、導入されたヒト重鎖及び軽鎖導入遺伝子がクラススイッチ及び体細胞突然変異を受け、高親和性ヒト IgG モノクローナル抗体を生成する。 Omni Rat (登録商標) の調製及び使用、並びにこのようなラットにより生じるゲノム修飾は、国際公開第 14 / 093908 号 (Brugemannら) に記載されている。

【 0204 】

組換えヒト BCMA (rhBCMA) で免疫化されるとき、このトランスジェニックラットは、ヒト BCMA に特異的なヒト IgG 抗体を産生する。

【 0205 】

免疫化計画を以下のように実施した： 6 匹のラットを hBCMA - Fc 融合で免疫化した。 21 日間の免疫規制飼育の後、免疫化ラットから脾臓及びリンパ節を採取し、これらを使用して合計 4 つのハイブリドーマライブラリを生成した。ライブラリを滴定し、 ELISA でアッセイし、ビオチン化 hBCMA に結合性を示す mAb を同定した。 mAb を MSD Streptavidin プレート上に捕捉した。更なる確認スクリーニングの後、ヒト BCMA 及びカニクイザル BCMA に特異的な結合性を示したハイブリドーマ上清を、配列決定し、クローンし、発現させ、ヒト IgG1 及び IgG4 の両方に変換した。

【 0206 】

実施例 3 : BCMA 抗体の精製

清澄化した培養上清中の BCMA 抗体を、 Mab Select SURE Protein A 樹脂により捕捉し、 100 mM 酢酸ナトリウム (pH 3.5) で溶出した。抗体を含む画分をプールし、 2.5 M Tris HC1 (pH 7.2) で直ちに中和し、ついで 1 × PBS 又は指定がある場合は他の所望のバッファにバッファ交換した。タンパク質濃度を、 NanoDrop 分光光度計で OD 280 を測定して決定し、その吸光係数を用いて計算した。抗体の純度及び均質性を SDS-PAGE 及び SE-HPLC により評価した。単量体が SE-HPLC により 95 % 未満であった場合、 Superdex 200 を用いた SEC ポリッシュ工程を行った。

【 0207 】

実施例 4 : BCMA に細胞結合する BCMA 抗体の特性

操作された BCMA 発現細胞並びにがん細胞株 U2392 、 EJM 、 MMIR 、 U266 、 OPM2 、及び RPMI - 18226 に対する BCMA 抗体の結合性を、 MSD (mesoscale) 細胞結合アッセイ及びフローサイトメトリーを使用して評価した。スクリーニングアッセイの目的は、 BCMA を発現している細胞に結合した抗体を特定すること、並びにカニクイザル BCMA を発現している細胞との交差反応性を特定することであった。

【 0208 】

MSD 細胞結合アッセイについては、細胞を固定し、 BCMA 抗体サンプルを 3 回アッセイした。簡潔に言えば、精製 BCMA 抗体の発現上清を 10 µg / mL に正規化した。ウェルあたりに 5000 個の細胞を、 384 ウェルプレート (MA6000 , cat . L21XB , MSD) に播種し、 2 時間付着させた。ついで、細胞を、 PBS 中の 20 % FBS (Gibco) で、 15 分間プロッキングした。ついで、抗体上清を加え、 RT で 1 時間放置した。細胞を、 PBS で 3 回洗浄し、ついで、ルテニウム標識化二次抗体 (Jackson Immuno Research) を、 1 µg / mL で加え、室温において 1 時間インキュベートした。ついで、更なる洗浄工程を適用し、ついで、ウェルあたり 35 µL の (界面活性剤を含まない) MSD リードバッファ T を加え、検出のために、 30 分間インキュベートした。ついで、 MSD Sector 6000 を使用して、プレ-

10

20

30

40

50

トを読み取った。データを、コントロールに対して正規化し、GraphPad Prism Version 5を使用してグラフ化した。陽性のバインダーを、バックグラウンドより3倍高いシグナルを有するヒットであると決定した。アッセイを、データ整合性のために繰り返し、トップバインダーを、更なる開発のために選択した。

【0209】

フローサイトメトリーについては、細胞を生存性染料と共にインキュベートし、100,000個の細胞をU底プレートに添加し、遠心分離して細胞をペレット状にした。滴定したBCMA抗体を細胞に添加した。インキュベーション期間の後、細胞をペレット状にし、洗浄した。二次抗体に特異的なAllexaFluor 647標識種を細胞に添加し、インキュベートした。細胞をペレット状にし、7回洗浄した。細胞を適量のランニングバッファで再懸濁し、FACSCanto IIを使用して分析した。細胞を、サイズについてはFSC-A対SSC-A、一重線及び生存性染料についてはSSC-A対SSC-Hによりゲート開閉した。生細胞集団のgeomFI値をグラフ化し、可能であれば、すなわち曲線が十分にS字状であれば、EC₅₀値の計算に使用した。

10

【0210】

A PRILリガンド結合の阻害

BCMA抗体パネルを、APRIL結合競合ELISAにおいてスクリーニングした。可溶性ヒトAprilをR&D systemsから購入し(カタログ#DY884)、固定されたBCMAへのAPRILの結合を阻害する抗BCMA抗体の能力を評価した。

20

【0211】

簡潔に言えば、96ウェル透明マキシソルブプレートを、PBSで作製した0.5μg/ml BCMA-ECDFの100μLで処理し、室温で一晩インキュベートした。ついでプレートを、PBS中に0.05% Tween-20を含むELISA洗浄バッファ(R&D Systems、カタログ#WA126)で3回洗浄した後、PBS中に1%BSA5を含むReagent Diluent(R&D Systems、カタログ#DY995)の300μL/ウェルで阻害した。競合結合については、BCMA抗体を100μmの容量でプレートに添加し、APRIL添加前に30分間インキュベートした。30分後、ウェルあたり1ngのAPRILを添加し、プレートを4℃で一晩インキュベートした。未結合のAPRILをELISA洗浄バッファで洗浄し、結合したビオチン化APRILを、SA-HRP複合体を用いて450nMの光学濃度で検出した。

30

【0212】

実施例5：ヒット評価及び選択

特性試験の完了後、以下の特徴を有するように、M2ハイブリドーマから得られた抗体(BCMB69と命名)を決定した。

- ・組換えヒトBCMAに結合する
- ・組換えカニクイザルBCMAに結合する
- ・マウスBCMAへの弱い結合性を示す
- ・フローサイトメトリーにより測定するとき、HEK発現ヒトBCMA及びHEK発現カニクイザルBCMAの両方に結合する
- ・BCMA(U2392、EJM、MMIR、U266、OPM2、及び RPMI-18226)を発現するヒトがん株に結合する
- ・IC₅₀=5.9nMでAPRIL結合を阻害する

40

結果として、BCMA×CD3二重特異性抗体を作製するために、BCMB69(表4及び表5)を発現させ、精製した。

【0213】

【表4】

表4. B C M B 6 9 の C D R 配列（関連配列番号を括弧内に示した）

| ID | HC-CDR1 | HC-CDR2 | HC-CDR3 | LC-CDR1 | LC-CDR2 | LC-CDR3 |
|------------|----------------|-------------------------|--------------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| BCMB 69 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYY NPSLKS(5) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGSK SVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |

【0214】

【表5】

表5：B C M B 6 9 の V_H 及び V_L 配列

| mAb AA ID | VHアミノ酸配列 | 配列番号 | VLアミノ酸配列 | 配列番号 |
|--------------|--|------|---|------|
| BCMB 69 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGGQGTLTVSSA | 27 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |

【0215】

実施例6：抗 B C M A F a b の結晶構造

抗体 / 抗原相互作用を原子的詳細において特徴付け、抗体の作用機序の理解を深め、いざれか必要な抗体操作の試行を支持するために、1つの抗 B C M A 抗体（B C M B 6 9）の結晶構造を遊離 F a b 形態並びにヒト B C M A に結合した場合において決定した。

10

20

【0216】

材料

H i s タグを付けた B C M A F a b （配列番号 7 5 及び 7 6、以降は単に B C M B 6 9 F a b とする）を H E K 2 9 3 細胞で発現させ、親和性及びサイズ排除クロマトグラフィーを使用して精製した。F a b を 1 3 0 m M N a C l 、 2 0 m M M E S (p H 7 . 4) 中に得た。

30

【0217】

C 末端に H i s タグを有するヒト B C M A 細胞外領域（配列番号 1 の残基 5 ~ 5 1、以降は単に B C M A とする）をバキュロウイルス系を用いて発現させ、親和性及びサイズ排除クロマトグラフィーにより精製した。タンパク質を 5 0 m M N a C l 、 2 0 m M T r i s (p H 8) 中に得た。

30

【0218】

結晶化

B C M A / B C M B 6 9 F a b 複合体

B C M A と B C M B 6 9 F a b とを 3 . 8 : 1 のモル比（B C M A 過剰）で 4 で約 1 6 時間混合し、一方で 2 0 m M H e p e s (p H 7 . 5) にバッファ交換することにより、F a b / 抗原複合体を調製した。その後、2 0 m M H e p e s (p H 7 . 5) 中で 5 1 ~ 6 3 m M N a C l のグラジエントを用いて複合体をモノ S 5 / 5 0 カラムから溶出させ、1 7 m g / m L に濃縮した。X線回折に適した結晶を、マイクロ播種を用いたシッティングドロップ蒸気拡散法を 2 0 で使用して、2 5 % P E G 3 k D a 、 0 . 2 M M g C l ₂ 、 0 . 1 M M e s (p H 6 . 5) から得られた。

40

【0219】

B C M B 6 9 F a b

B C M B 6 9 F a b を更に精製することなく 9 m g / m L に濃縮した。X線回折に適した結晶を、シッティングドロップ蒸気拡散法を 2 0 で用いて、2 M (N H ₄) ₂ S O ₄ 、 5 % M P D 、 0 . 1 M M e s (p H 6 . 5) から得た。

【0220】

X線データ収集及び構造決定

X線データ収集のため、結晶を、2 0 % グリセロールを添加した対応する母液を含むク

50

ライオプロテクタント溶液中に数秒間浸漬した後、液体窒素中で瞬間凍結した。BCMA / BCMB69複合体のX線回析データは、Canadian Light Source (CLS) のビームラインCMCF-08IDでRayonix 300HS CCD検出器を使用して収集したが、遊離BCMB69FabのX線データは、Argonne National LaboratoryのAdvanced Photon Source (APS) のビームライン17-IDでDectris Pilatus 6M Pixel Array 検出器を使用して収集した。回折データをプログラムHKLで処理した (Otwinkowski, Z. & Minor, W. (1997). Processing of X-ray diffraction data collected in oscillation mode. Methods in Enzymology 276: 307~326.). 10

【0221】

構造を、Phaserを用いた分子置換法 (MR) により解析した (Read, R. J. (2001). Pushing the boundaries of molecular replacement with maximum likelihood. Acta Crystallographica D Biological Crystallography 57: 1373~82)。遊離Fab構造の場合、MRの探索モデルは、抗インフルエンザヘマグルチニン5j8Fab (PDBコード: 4M5Y) であった。BCMA / Fab複合体の場合、MRの探索モデルは、BCMAの結晶構造 (PDBコード: 1XU2) 及びBCMB69遊離Fab構造であった。構造を、PHENIXを用いて微細化し (Adams, P. D., Gopal, K., Grossé-Kunstleve, R. W., Hung, L. W., Ioerger, T. R., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Pai, R. K., Read, R. J., Romo, T. D., Sacchettini, J. C., Sauter, N. K., Storoni, L. C. & Terwilliger, T. C. (2004). Recent developments in the PHENIX software for automated crystallographic structure determination. Journal of Synchrotron Radiation 11: 53~5.)、COOTを使用してモデル調整を行った (Emsley P. & Cowtan, K. (2004). COOT: Model building tools for molecular graphics. Acta Crystallographica D60: 2126~2132)。他の全ての結晶学的計算は、CCP4のプログラムスイートを用いて行った (Collaborative Computational Project Number 4, 1994)。全ての分子グラフィックはPyMolを用いて生成した (DeLano, W. (2002). The PyMOL molecular graphics system. Palo Alto, CA, USA; Delano Scientific)。 20 30

【0222】

BCMB69遊離Fab構造及び複合体の両方のデータ統計値を表6に示す。

【0223】

【表6】

表6. BCMA/BCMB69 Fab複合体及び遊離BCMB69 Fabの結晶学的データ。

| | 複合体 | 遊離Fab | |
|--|------------------------|---|----|
| CBISにおける構造ID | PS41 | PS40 | |
| 結晶データ | | | |
| 結晶化溶液 | | | |
| 0.1Mバッファ | Mes pH6.5 | Mes pH6.5 | |
| 沈殿剤 | 25%PEG 3kDa | 2M(NH ₄) ₂ SO ₄ | 10 |
| 添加剤 | 0.2M MgCl ₂ | 5% MPD | |
| 空間群 | P2 ₁ | P2 ₁ 2 ₁ 2 ₁ | |
| 分子／非対称ユニット | 2 | 1 | |
| 単位胞 | | | |
| a、b、c(Å) | 62.9、87.1、88.7 | 64.3、71.1、123.0 | |
| α、β、γ(°) | 90.0、94.8、90.0 | 90.0、90.0、90.0 | |
| 溶媒含量(%) | 47 | 56 | |
| X線データ* | | | |
| 分解能(Å) | 50.00–2.00 | 50.00–2.70 | 20 |
| 最外郭(Å) | (2.07–2.00) | (2.75–2.70) | |
| 観測された反射数(Measured reflections) | 235,905 | 91,256 | |
| 完全性(%) | 99.9(99.8) | 99.9(99.9) | |
| 多重度(Redundancy) | 3.7(3.6) | 5.7(4.8) | |
| R _{sym} (%) | 10.0(52.7) | 14.8(51.9) | |
| <I/σ> | 13.3(2.9) | 13.5(3.1) | |
| 精密化 | | | |
| 分解能(Å) | 45.4–2.0 | 34.2–2.7 | |
| 観測された反射数(Number of reflections) | 64,157 | 15,890 | 30 |
| 全原子数 | 7,001 | 3,149 | |
| 水分子数 | 89 | 10 | |
| R _{work} /R _{free} (%) | 19.0/23.7 | 18.5/24.0 | |
| 結合長RMSD(Å) | 0.009 | 0.004 | |
| 結合角RMSD(°) | 1.190 | 0.869 | |
| B因子平均値(Å ²) | 31.0 | 51.1 | |
| MolProbity | | | |
| ラマチャンドランプロットの「好ましい(favored)」領域の割合(%) | 97.32 | 96.86 | |
| ラマチャンドランプロットの「許容(allowed)」領域の割合(%) | 2.68 | 2.90 | 40 |
| ラマチャンドランプロットの外れ値(outliers)の割合(%) | 0.00 | 0.24 | |
| ロータマーの外れ値(outliers)の割合(%) | 0.39 | 0.59 | |
| クラッシュスコア | 3.20 | 1.96 | |

【0224】

エピトープ、パラトープ、及び相互作用

BCMB69は、BCMAの-ヘアピン領域内の残基(残基Y13-H19)及びヘリックス-ループ-ヘリックス領域内の残基(残基L26、R27、及びN31-L35)から構成される立体構造エピトープを認識する(図3及び4)。BCMB69エピトープは、BCMA上の約830 Å²の面積からなり、リガンド結合DXLモチーフ(-へ

アピンのI型ターン内の残基D15-L18)を含み、これは抗体の相補性決定領域(CDR)に覆われた浅い空洞内に突き出している。DXLターンの先端にあるロイシン17は、抗体の空洞内に完全に埋没し、BCMB69との広範な相互作用を有する。別の主要なエピトープ残基はArg27であり、これは β_1 -ヘリックスh1上にあり、重鎖CDRといくつかの水素結合接触を形成する。

【0225】

BCMB69パラトープは、CDR-L1を除く全てのCDRからの残基で構成される(図2及び3)。重鎖は、軽鎖と比較して2倍のBCMAとの接触数を有する。CDR-H3のループ先端にある小さな側鎖(102-GAVAG-106)(配列番号77)は、CDR-H3のBCMAへの挿入と、広範な抗体/抗原接触の達成とに役立つ(CDR-H3により全接触の40%が形成される)。BCMB69CDRは、BCMAの椅子状構造の凹状表面上に集まっており、CDR-L2(残基Y48、D52、P54、S55)、CDR-H1(残基G32-Y34)、及びCDR-H3(D101、A103、V104、Y110)は、h1ヘリックス及びh1h2ループにより形成される「シート」に接触しているが、CDR-L3(残基W90、S92、D95)、CDR-H1(F35)、CDR-H2(Y54、Y60)、及びCDR-H3(H100、G102、A103、A105)は、BCMAの-ヘアピンにより形成される「バック」と相互作用する。「椅子の脚」(h2ヘリックス)にある唯一のエピトープ残基であるLeu35は、CDR-L2の残基D52とのファンデルワールス接触を有する。

10

【0226】

BCMAは、小さく(約50残基)かつコンパクトな細胞外ドメインを有する。非競合抗体又はリガンドがBCMAに結合するのに利用できる表面は限られている。BCMB69エピトープ残基のほとんどは、APRIL(14のエピトープ残基のうちの12)及びBAFF(14の残基のうちの9)にも結合する残基である。BCMAの最も高親和性のリガンドであるAPRILの場合、共用されないエピトープ残基はF14及びS16だけであるが(図2B)、BAFFでは、非共用残基はF14、L26、T32、P33、及びL35である。DXLループは、リガンド及びBCMB69の両方により埋没される。

20

【0227】

提案されるBCMB69の作用機序

BCMB69は、MMがん細胞に対するT細胞のリダイレクトに関する候補である。BCMB69×抗CD3二重特異性抗体により媒介されるがん細胞の殺傷は、BCMB69エピトープの構造及び位置により弱められるとは推測されない。エピトープの接触可能位置は、BCMB69Fabアームを膜結合型BCMAに結合させるが、他方のFabアームは、依然としてT細胞膜内のCD3に結合している。

30

【0228】

BCMB69はまた、BCMA結合部位の立体的閉塞及び直接競合により、形質細胞内のAPRIL及びBAFFシグナル伝達経路を途絶させることもできる。BCMA/BCMB69構造のBCMA/APRIL及びBCMA/BAFF構造へのオーバーレイ(Liu, Y., Hong, X., Kappeler, J., Jiang, L., Zhang, R., Xu, L., Pan, C.H., Martin, W.E., Murphy, R.C., Shu, H.B., Dai, S. & Zhang, G. (2003). Nature 423: 49~56; Hymowitz, S.G., Patel, D.R., Wallweber, H.J.A., Runyon, S., Yan, M., Yin, J., Shriver, S.K., Gordon, N.C., Pan, B., Skeleton, N.J., Kelley, R.F. & Starovasnik, M.A. (2005). J. Biol. Chem. 280: 7218~7227.)は、BCMB69及びAPRIL、BAFF間のクラッシュ領域を示し(図2B並びに図4A及び4B)、BCMAが抗体及び天然リガンドに同時に結合できなくなる。APRIL及びBAFFは、TACI及びBAFF-Rなどの他の受容体を使用してシグナルを送ることができ、BCMAノックアウトマウスは依然として生存することができる。したがって、BCMAの閉塞によるAP

40

50

R I L 及び B A F F 活性の阻害は、M M 患者にとって決定的な毒性ではないことがある。

【 0 2 2 9 】

実施例 7 : B C M B 6 9 変異体の構造に基づく設計

非結合 B C M B 6 9 可変ドメインの翻訳後修飾モチーフ及び凝集リスクの計算評価は、D 1 0 1 - G 1 0 2 残基 (C D R - H 3) の異性化の媒体リスクと、凝集リスクを有し得る C D R 領域内の 4 8 6² の疎水性パッチとを示す。パッチ内で最も露出した疎水性残基は、I 5 8 (C D R - H 2) 、F 3 5 (C D R - H 1) 、及び V 1 0 4 (C D R - H 3) である (V 1 0 4 は、F v 相同性モデルには関連したが、F a b 結晶構造には関連しなかった) 。 B C M B 6 9 可変ドメインにおける異性化及び凝集リスクを排除するために、様々な突然変異を合理的に設計した (表 7) 。

10

【 0 2 3 0 】

【表7】

表7：BCMB69変異体のパネル

| 設定 | クローンID | 変異 | 目的 |
|----|---------|--|-------------------------------------|
| 1 | BCMB117 | G152A ^L | 異性化を排除し、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB118 | G102A ^H 、F35Y ^H 、V104T ^H | 異性化を排除し、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB119 | D101E ^H 、F35Y ^H 、V104T ^H | 異性化を排除し、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB120 | D101S ^H 、F35Y ^H 、V104T ^H | 異性化を排除し、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB121 | G32S ^H 、F35Y ^H 、I58S ^H 、P37K ^L 、V44L ^L 、V83D ^L | 疎水性を低下させるためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 1 | BCMB122 | G32S ^H 、F35Y ^H 、I58S ^H | 疎水性を低下させるためのVH生殖細胞系突然変異 |
| 1 | BCMB123 | G32S ^H | 单一突然変異の結果にアクセスする、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB124 | F35Y ^H | 单一突然変異の結果にアクセスする、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB125 | D101E ^H | 单一突然変異の結果にアクセスする、異性化を排除する |
| 1 | BCMB126 | D101S ^H | 单一突然変異の結果にアクセスする、異性化を排除する |
| 1 | BCMB127 | G102A ^H | 单一突然変異の結果にアクセスする、異性化を排除する |
| 1 | BCMB128 | V104T ^H | 单一突然変異の結果にアクセスする、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB129 | I58S ^H | 单一突然変異の結果にアクセスする、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB130 | G102A ^H 、F35Y ^H 、I58S ^H | 異性化を排除し、疎水性を低下させる |
| 1 | BCMB131 | D101E ^H 、F35Y ^H 、I58S ^H | 異性化を排除し、疎水性を低下させる |
| 2 | BCMB176 | G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させるためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB177 | I58R ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させるためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB178 | I58W ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させるためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB179 | D101Q ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 異性化及び疎水性を阻害する |
| 2 | BCMB180 | D101H ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 異性化及び疎水性を阻害する |
| 2 | BCMB181 | D101W ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させ、異性化を排除するためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB182 | D101Y ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させ、異性化を排除するためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB183 | I58R ^H 、D101Q ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させ、異性化を排除するためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB184 | I58R ^H 、D101H ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させ、異性化を排除するためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB185 | I58R ^H 、D101Y ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させ、異性化を排除するためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB186 | I58W ^H 、D101Q ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させ、異性化を排除するためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB187 | I58W ^H 、D101H ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させ、異性化を排除するためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |
| 2 | BCMB188 | I58W ^H 、D101Y ^H 、G32S ^H 、V104T ^H 、G152A ^L | 疎水性を低下させ、異性化を排除するためのVH及びVL生殖細胞系突然変異 |

10

20

30

40

構造に基づく B C M B 6 9 変異体の C D R 配列と V H 及び V L 配列とをそれぞれ表 8 及び表 9 に示す。

【 0 2 3 2 】

【表8】

表8：BCMB 6.9 変異体のCDR配列（関連配列番号を括弧内に示した）

| ID | HC-CDR1 | HC-CDR2 | HC-CDR3 | LC-CDR1 | LC-CDR2 | LC-CDR3 |
|----------|--------------|-----------------------|------------------|------------------|--------------|------------------|
| BCMB 117 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 118 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HDAATAG LFDY(9) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 119 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HEGATAG LFDY(12) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 120 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HSGATAG LFDY(15) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 121 | SSSYWG (7) | SIYYSGSTYY NPSLKS(8) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 122 | SSSYWG (7) | SIYYSGSTYY NPSLKS(8) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 123 | SSSYWG (7) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 124 | SGSYWG (10) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 125 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HEGAVAG LFDY(16) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 126 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HSGAVAG LFDY(17) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 127 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HDAAVAG LFDY(18) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 128 | SGSYFWG (4) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HDGATAG LFDY(19) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 129 | SGSYFWG (4) | SIYYSGSTYY NPSLKS(8) | HDGAVAG LFDY(6) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 130 | SSSYWG (10) | SIYYSGSTYY NPSLKS(8) | HDAAVAG LFDY(18) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 131 | SSSYWG (10) | SIYYSGSTYY NPSLKS(8) | HEGAVAG LFDY(16) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 176 | SSSYFWG (13) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HDGATAG LFDY(19) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 177 | SSSYFWG (13) | SIYYSGSTYY NPSLKS(8) | HDGATAG LFDY(19) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 178 | SSSYFWG (13) | SIYYSGWTYY NPSLKS(11) | HDGATAG LFDY(19) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 179 | SSSYFWG (13) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HQGATAG LFDY(20) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 180 | SSSYFWG (13) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HHGATAG LFDY(21) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 181 | SSSYFWG (13) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HWGATAG LFDY(22) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 182 | SSSYFWG (13) | SIYYSGITYYN PSLKS(5) | HYGATAG LFDY(23) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 183 | SSSYFWG (13) | SIYYSGRTYY NPSLKS(14) | HQGATAG LFDY(20) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 184 | SSSYFWG (13) | SIYYSGRTYY NPSLKS(14) | HHGATAG LFDY(21) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 185 | SSSYFWG (13) | SIYYSGRTYY NPSLKS(14) | HYGATAG LFDY(23) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 186 | SSSYFWG (13) | SIYYSGWTYY NPSLKS(11) | HQGATAG LFDY(20) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 187 | SSSYFWG (13) | SIYYSGWTYY NPSLKS(11) | HHGATAG LFDY(21) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |
| BCMB 188 | SSSYFWG (13) | SIYYSGWTYY NPSLKS(11) | HYGATAG LFDY(23) | GGNNIGS KSVH(24) | DDSDRPS (25) | QVWDSSS DHVV(26) |

【表9-1】

表9：BCMB 69変異体のV_h及びV_l配列

| mAb AA ID | VHアミノ酸配列 | 配列番号 | VLアミノ酸配列 | 配列番号 |
|--------------|--|------|---|------|
| BCMB 117 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 57 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 118 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDAATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 29 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 119 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHEGATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 31 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 120 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHSGATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 32 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 121 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 33 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQKP GQAPVVLVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEADYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 30 |
| BCMB 122 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 33 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 123 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 34 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 124 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 35 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 125 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHEGAVAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 36 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |

【0234】

【表9-2】

(表9の続き)

| mAb AA ID | VHアミノ酸配列 | 配列番号 | VLアミノ酸配列 | 配列番号 |
|--------------|---|------|---|------|
| BCMB 126 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHSGAVAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 37 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 127 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDAAVAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 38 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 128 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGATAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 39 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 129 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGAVAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 40 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 130 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDAAVAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 41 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 131 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSGSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHEGAVAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 42 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 176 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGATAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 58 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 177 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHDGATAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 43 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 178 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGWTYYNP SLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS SVTAADTAVYYCARHDGATAG LFDYWGQQGTLTVTSSA | 44 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 179 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWRQPP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHQGATAGL FDYWGQQGTLTVTSSA | 45 | SYVLTQPPSVAPGQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIP ERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |

【表9-3】

(表9の続き)

| mAb AA ID | VHアミノ酸配列 | 配列番号 | VLアミノ酸配列 | 配列番号 |
|--------------|---|------|--|------|
| BCMB 180 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHHGATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 46 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 181 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHWGATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 47 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 182 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGITYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHYGATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 48 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 183 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHQGATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 49 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 184 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHHGATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 50 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 185 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPS LKSRTVTISVDTSKNQFSLKLSS VTAADTAVYYCARHYGATAGL FDYWGQQGTLTVSSA | 51 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 186 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGWTYYNP SLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARHQGATAG LFDYWGQQGTLTVSSA | 52 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 187 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGWTYYNP SLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARHHGATAG LFDYWGQQGTLTVSSA | 53 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |
| BCMB 188 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLT CTVSGGSISSSSYFWGWIRQP PGKGLEWIGSIYYSGWTYYNP SLKSRTVTISVDTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARHYGATAG LFDYWGQQGTLTVSSA | 54 | SYVLTQPPSVSVPQTARI TCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVYDDSDRPSGIP ERFSGNSNGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDH VVFGGGTKLTVL | 28 |

【0236】

したがって、BCMB69に加えて、28の変異体を発現させ、実施例3に記載したよ

うに精製し、実施例4に記載したようにフローサイトメトリーによりBCMA発現細胞への結合性について特徴付けた。28の変異体のうちの7つは、BCMAを発現している細胞に結合したことから、BCMA×CD3二重特異性パネルを作製するために先に進めた。

【0237】

実施例8：IgG4 S228P、L234A、L235Aの二重特異性フォーマットにおけるBCMA及びCD3抗体の調製

BCMA抗体は、Fc置換S228P、L234A、及びL235A(EUインデックスによる番号付け)を有するIgG4として発現された。配列番号55及び配列番号56の配列をそれぞれ有する重鎖及び軽鎖を含む、単特異性抗CD3抗体のCD3B19も生成した。

10

【0238】

プロテインAカラム(HiTrap MabSelect Sureカラム)を使用する標準的な方法を使用して、単特異性抗体を精製した。溶出後、プールを、D-PBS、pH7.2内へ透析した。

【0239】

二重特異性BCMA×CD3抗体を、(国際公開第2011/131746号に記載されたような)インピトロでのFabアーム交換において、単特異性CD3 mAbと単特異性BCMA mAbとを組み合わせることにより生成した。簡潔に言えば、PBS(pH7~7.4)中の約1~20mg/mLの抗BCMA/抗CD3抗体(モル比1:1)(又は場合によっては、一方の親抗体を6%過剰にして、もう一方の抗体を激減させる)と、75mM 2-メルカプトエタノールアミン(2-MEA)とを混合し、31で5時間インキュベートし、ついで標準的な方法を使用して、透析、透析ろ過、タンジェント流ろ過、及び/又は回転細胞ろ過により、2-MEAを除去した。カチオン交換(CEX)HPLC又は疎水性相互作用クロマトグラフィー(HIC)HPLCのいずれかにより、二重特異性BCMA×CD3抗体の形成を分析する。望ましい場合には、二重特異性BCMA×CD3抗体を分取CEX又はHICによりポリッシュし、残留親抗体を除去した。

20

【0240】

代表的なBCMA×CD3二重特異性抗体の重鎖及び軽鎖を以下の表10に示す。BCMB178は、CD3アームと組み合せたときに発現が悪く、結果として、更なる特徴付けを行わなかった。

30

【0241】

【表10-1】

表10. 二重特異性抗体の重鎖及び軽鎖の配列

| Ab | | アミノ酸配列 |
|--------|----------------------------|--|
| BCMB72 | 重鎖1 CD3B219 (配列番号55) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLLSV VTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPVQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLYSLKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| | 軽鎖1 CD3B219 (配列番号56) | QTVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |
| | 重鎖2 BCMB69 (配列番号65) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGISSSGSYFWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTPSSS LGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| | 軽鎖2 BCMB69 (配列番号76) | SYVLTQPPSVSVAvgQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPMSGIPERFSGNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAP VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKGDS PVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |

10

20

30

【0242】

【表10-2】

(表10の続き)

| Ab | | アミノ酸配列 |
|-------|----------------------------|--|
| BC3B7 | 重鎖1 CD3B219 (配列番号55) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPVQYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFLYSKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK |
| | 軽鎖1 CD3B219 (配列番号56) | QTVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |
| | 重鎖2 BCMB117 (配列番号67) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGISSSGSYFWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSGK |
| | 軽鎖2 BCMB117 (配列番号66) | SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAP VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |

10

20

30

【0243】

【表10-3】

(表10の続き)

| Ab | | アミノ酸配列 |
|-------|----------------------------|--|
| BC3B8 | 重鎖1 CD3B219 (配列番号55) | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPVQYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNQPENNYKTPVLDSDGSFLYSLKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p> |
| | 軽鎖1 CD3B219 (配列番号56) | <p>QTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p> |
| | 重鎖2 BCMB123 (配列番号68) | <p>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYZFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPE AAGGPSVFLFPPPKDKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p> |
| | 軽鎖2 BCMB123 (配列番号66) | <p>SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAP VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p> |

【0244】

10

20

30

【表10-4】

(表10の続き)

| Ab | | アミノ酸配列 |
|-------|----------------------------|--|
| BC3B9 | 重鎖1 CD3B219 (配列番号55) | <p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPALVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNQPENNYKTPVLDSDGSFLYSLKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p> |
| | 軽鎖1 CD3B219 (配列番号56) | <p>QTVVTQEPLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p> |
| | 重鎖2 BCMB128 (配列番号69) | <p>QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNNPSLKSrvTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWQGQTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPALVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCCPAPE AAGGPSVFLFPPPKDKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</p> |
| | 軽鎖2 BCMB128 (配列番号66) | <p>SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAP VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS</p> |

【0245】

10

20

30

【表10-5】

(表10の続き)

| Ab | | アミノ酸配列 |
|--------|----------------------------|--|
| BC3B10 | 重鎖1 CD3B219 (配列番号55) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPVQYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSGK |
| | 軽鎖1 CD3B219 (配列番号56) | QTVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |
| | 重鎖2 BCMB129 (配列番号70) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRRVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVAGLFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSS LGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSGK |
| | 軽鎖2 BCMB129 (配列番号66) | SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAP VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |

10

20

30

【0246】

【表10-6】

(表10の続き)

| Ab | | アミノ酸配列 |
|--------|----------------------------|---|
| BC3B11 | 重鎖1 CD3B219 (配列番号55) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTVSWNNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKDKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPVQYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTPVLDSDGSFLYSLKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| | 軽鎖1 CD3B219 (配列番号56) | QTVVTQEPEPLTVSPGGTVTLCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAGPTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |
| | 重鎖2 BCMB176 (配列番号71) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTVISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTWSWNNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPE AAGGPSVFLFPPPKDKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| | 軽鎖2 BCMB176 (配列番号66) | SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQQPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAP VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSS PVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |

【0247】

10

20

30

【表10-7】

(表10の続き)

| Ab | | アミノ酸配列 |
|--------|----------------------------|--|
| BC3B12 | 重鎖1 CD3B219 (配列番号55) | EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVR QAPGKGLEWVARIRSKNNYATYYAASVKGRFTISRDDS KNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGNSYVSWFAYW GQQTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLV KDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSV VTPVSSSLGTKYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC PPCPAPEAAGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD VSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPVQYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEW ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFLYSLKLTVDKSRWQE GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| | 軽鎖1 CD3B219 (配列番号56) | QTVVTQEPLSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQ QKPGQAPRGLIGGTNKRAPGTPARFSGSLLGGKAALTLS GVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVLGQPKAAP SVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPPGAUTVAWKADS SPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRS YSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |
| | 重鎖2 BCMB177 (配列番号72) | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSSSYFWGWI RQPPGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPSLKSRSVTISVDTSKNQ FSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATAGLFDYWGGTLLV VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSGVHTFPALQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPE AAGGPSVFLFPPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPE VQFNWYVDGVEVHNAAKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPVY TLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK |
| | 軽鎖2 BCMB177 (配列番号66) | SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGGNNIGSKSVHWYQPPP GQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGNSGNTATLTISRVE AGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGTKLTVLGQPKAAP VTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPPGAUTVAWKADSS PVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECS |

10

20

30

40

【0248】

実施例9：B C M A 抗体及びB C M A × C D 3 二重特異性抗体のB C M A 親和性の測定
表面プラズモン共鳴(S P R)を使用して、C D 3 二重特異性抗体の生成に使用される
B C M A 抗体のヒトB C M A 親和性の値を測定した。S P Rのために従ったプロトコルは
、実施例4に記載したプロトコルと同様であった。表11に示した結果は、全てのサンプ
ルが様々な親和性で单量体B C M A 抗原に結合したことを見た。親m A b (B C M B 6 9)は、~1.4 n Mの結合親和性を有した。B C M B 1 1 7 及びB C M B 1 2 8は、B C
M B 6 9 の範囲内の親和性を有したが、B C M B 1 2 3 、B C M B 1 2 9 、B C M B 1 7
6 、及びB C M B 1 7 7は、オフ速度が速いために比較的弱い親和性を有した(3~15
倍)。データの再現性を評価するために、全てのサンプルを少なくとも3回実施し、標準
偏差を記録した。

【0249】

【表11】

表11. SPRによる抗BCMA mAbの単量体ヒトBCMAとの結合親和性

| mAb | $k_{on} (\times 10^6 \text{1/Ms})$ | $k_{off} (\times 10^{-3} \text{1/s})$ | $K_D (\text{nM})$ |
|---------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------|
| BCMB69 | 2.74±0.02 | 3.95±0.19 | 1.44±0.05 |
| BCMB117 | 2.57±0.21 | 3.42±0.25 | 1.34±0.20 |
| BCMB123 | 2.14±0.04 | 11.0±1.33 | 5.12±0.69 |
| BCMB128 | 4.20±0.13 | 8.70±0.61 | 2.07±0.21 |
| BCMB129 | 1.54±0.06 | 8.43±0.44 | 5.47±0.13 |
| BCMB176 | 4.00±0.05 | 28.8±1.25 | 7.18±0.22 |
| BCMB177 | 2.80±0.22 | 56.6±5.54 | 20.2±1.57 |

【0250】

また、SPRを使用して、ヒト及びカニクイザルBCMAに対するBCMA×CD3二重特異性抗体の親和性の値も測定した。表12の結果は、全てのサンプルが様々な親和性でFc-Bcma抗原に結合したことを示す。BC3B7及びBC3B9は、ヒトBCMAに対してBCMB72の範囲内の親和性を有したが、残りの二重特異性抗体は、BCMB72と比較すると2~3倍弱い親和性を有した。カニクイザルFc-Bcmaに対しては、BC3B7及びBC3B9は、BCMB72より2~3倍強い親和性を有したが(K_D はそれぞれ0.65~0.37nM)、残りのmAbは、BCMB72と同様の結合を維持した(K_D は~0.8~1.2nM)。データの再現性を評価するために、全てのサンプルを少なくとも3回実施し、標準偏差を記録した。

【0251】

【表12】

表12. SPRによるBCMA×CD3抗体のFc-Bcmaに対する結合親和性

| BCMA×CD3 | Fc-Bcma | k_{on1} ($\times 10^6 \text{1/Ms}$) | k_{off1} ($\times 10^{-3} \text{1/s}$) | K_D (nM) | k_{on2} ($\times 10^{-3} \text{1/s}$) | k_{off2} ($\times 10^{-4} \text{1/s}$) | 最終 K_D (nM) |
|-----------------------|---------|--|---|---------------|--|---|---------------|
| BCMB72 (B69×B219) | Hu | 1.35±0.11 | 2.08±0.80 | 1.51±0.45 | 6.56±1.27 | 2.79±0.55 | 0.06±0.01 |
| | Cy | 1.26±0.12 | 4.83±0.28 | 3.87±0.57 | 1.06±0.10 | 7.85±1.04 | 1.65±0.26 |
| BC3B7 (B117×B219) | Hu | 1.48±0.09 | 1.58±0.30 | 1.07±0.20 | 4.97±0.67 | 2.94±0.54 | 0.06±0.01 |
| | Cy | 1.38±0.07 | 4.17±0.19 | 3.04±0.25 | 1.50±0.06 | 4.15±0.53 | 0.65±0.04 |
| BC3B8 (B123×B219) | Hu | 1.35±0.08 | 1.23±0.24 | 0.91±0.16 | 3.13±0.48 | 5.94±0.82 | 0.14±0.01 |
| | Cy | 1.09±0.05 | 7.34±0.21 | 6.77±0.48 | 1.94±0.08 | 3.26±0.43 | 0.97±0.09 |
| BC3B9 (B128×B219) | Hu | 2.58±0.14 | 2.05±0.75 | 0.79±0.25 | 5.06±1.12 | 3.64±0.36 | 0.05±0.01 |
| | Cy | 2.18±0.06 | 4.23±0.23 | 1.94±0.14 | 1.60±0.09 | 3.76±0.52 | 0.37±0.04 |
| BC3B10 (B129×B219) | Hu | 1.02±0.07 | 1.55±0.31 | 1.50±0.22 | 4.53±0.64 | 5.31±1.20 | 0.16±0.03 |
| | Cy | 0.93±0.04 | 6.36±0.28 | 6.84±0.48 | 1.65±0.07 | 3.59±0.50 | 1.22±0.17 |
| BC3B11 (B176×B219) | Hu | 2.26±0.16 | 1.32±0.15 | 0.58±0.07 | 2.52±0.32 | 6.89±1.17 | 0.12±0.02 |
| | Cy | 1.93±0.10 | 6.83±0.11 | 3.56±0.23 | 1.47±0.04 | 3.95±0.76 | 0.75±0.11 |
| BC3B12 (B177×B219) | Hu | 1.78±0.09 | 1.29±0.05 | 0.72±0.05 | 1.29±0.15 | 5.57±0.38 | 0.22±0.03 |
| | Cy | 1.48±0.10 | 8.31±0.30 | 5.65±0.46 | 1.46±0.07 | 3.37±0.43 | 1.06±0.15 |

【0252】

抗BCMA×CD3二重特異性抗体(BCMB72)のFc-融合BCMAタンパク質(ヒト、カニクイザル、及びマウス)との結合親和性を、Biacore T200 system(GE Healthcare, NJ)を用いた表面プラズモン共鳴(SPR)により測定した。

【0253】

ストレプトアビジン誘導体化センサーチップ(GE Healthcare, Prod # BR-1005-31)のフローセル2、3、及び4を、それぞれビオチン化Fc-融合ヒト、カニクイザル、又はマウスBCMAを用いて固定した(BCMA固定濃度は12~16応答ユニット(RU); Fc-Bcmaタンパク質:ヒト(R&D Systems; Prod # 193-Fc)、カニクイザル(自社製; Cat # BCMW6.0)。

10

20

30

40

50

01)、及びマウス(R & D Systems; Prod # 593 - BC)を自社でビオチン化した)。フローセル1にはタンパク質を固定せず、参照表面として使用した。ランニングバッファ(PBS pH 7.4、0.005% P20、3mM EDTA)で25において結合速度論試験を行った。BCMB72は、100nMから開始して5倍希釈で0.16nMまでランニングバッファで調製した。これらの溶液を50μL/分で5分間注入し(会合相)、ランニングバッファを流すことにより解離を15分間モニタした。グリシン(pH 1.5)の短時間注入及び100μL/分のランニングバッファにより、チップ表面を再生した。BCMB72とFc-BcMAとの相互作用の結合速度論分析は、検体注入の参照控除曲線からバッファ注入により作成された曲線を差し引くことにより、データの重複参照によって行った。センサーグラムの全体的速度論フィッティングは、Two-State binding Model using Biacore T200 Evaluation Software(GE Healthcare, NJ)を使用して行った。異なるBCMA種のTwo-State結合モデルから得られた結合親和性の結果を、最初の複合体(K_{D1})及び最終複合体(K_D)として記録する(図5)。

10

【0254】

実施例10:多発性骨髓腫バックグラウンドの不死化細胞株の存在下におけるBCMA × CD3抗体の標的特異性T細胞活性化及び細胞傷害能

BCMA × CD3抗体により媒介されるT細胞の活性化を評価した。簡潔に言えば、BCMB72(BCMA × CD3)及びコントロール抗体(BCMA × 無及び無 × CD3)をPBSで800μg/mLに希釈した。96ウェルU底プレートにおいてPBSで4倍系列希釈して用量設定を調製した。最後のカラムをPBSのみとして残した(溶媒コントロール)。

20

【0255】

Glutamax、10% FBS、及び25mM HEPESを添加した、抗生物質を含まないRPMI 1640培地(培養培地)で、標的細胞を培養した。設定日(1日目)には、標的細胞を計数し、1000万個の細胞を1350rpmで3分間遠心分離した後、上清を捨てた。CellTrace FCCS増殖染料を18μLの無菌DMSOで再構成し、この溶液の1μLを無菌PBSの10mLで希釈した。細胞ペレットを1mLのCFSE希釈物で再懸濁し、直接光から覆って室温で8分間インキュベートした。インキュベーション後、1mLのHI FBSを細胞懸濁液に添加し、過剰なCFSEをクエンチした。10% FBSを有するRPMI-1640で細胞を2回洗浄した。10mLのRPMIで再構成した後、細胞を計数し、細胞生存性を集計表に記録した。細胞を $2 \cdot 2 \times 10^5 / mL$ に希釈し、使用するまで37でインキュベートした。

30

【0256】

正常ドナー由来の汎T細胞を37の水浴で解凍した後、凍結バイアルの中身を50mL円錐バイアルに移し、15mLの低温培地で再構成した。ついで細胞を4において1350rpmで3分間遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットを5~10mLの培地で再構成した。T細胞を計数し、生存性を記録した。ついで細胞を培地で $1 \cdot 1 \times 10^6 / mL$ に再構成した。

40

【0257】

2×10^5 個の標的細胞を96ウェルU底プレートのウェルに添加し、ついでFcブロッカーを添加した(2mg/mLの最終濃度まで)。全ての細胞株を室温で10分間インキュベートし、Fc受容体活性を阻害した。 1×10^5 個のT細胞をウェルに添加した(5:1のエフェクター:標的比)。標的及びT細胞を混合した後、20μLのBCMA × CD3抗体希釈物を各ウェルに添加した。プレートを37において5%CO₂で48時間インキュベートした。

【0258】

2日後、プレートを4において1350rpmで3分間遠心分離し、100μLの上清を別のプレートに移し、サイトカイン放出アッセイ用に-80で保存した。細胞を2

50

0.0 μL の PBS で洗浄し、50 μL の近赤外 Live / Dead 染料 (1 : 200 希釀物) 及び抗 CD25 PE 抗体 (1 : 50 希釀物) で室温で 20 分間インキュベートした。その後、細胞を 200 μL の FACS バッファで 1 回洗浄し、最後に 150 μL の FACS バッファで再構成した。標的細胞傷害性 (標的 %) 及び T 細胞活性化 CD25+ (生存 T 細胞 %) について、FACSCanto II 及び FlowJo 7.6 を使用して細胞を分析した。データのグラフ化及びフィッティングは、最小 2 乗法を用いた可変勾配 (4 パラメータ) 関数を有する非線形回帰を使用して GraphPad Prism 6 で行った。

【0259】

図 8 は、T 細胞表面上の CD25 のアップレギュレーションにより評価するとき、BCMB72 が一貫して標的特異性 T 細胞活性化を促進することを示す。Fc ブロッカーを使用して、標的細胞への抗体の Fc 受容体依存性結合を防止した。概して、データ点は作成したフィット曲線に沿ってぴったり並び、T 細胞ドナー間のばらつきはほとんどなかった。BCMA+ 細胞では 45 ~ 85 % の最大活性化を達成し、BCMA- 細胞では 4 ~ 10 % であった (バックグラウンド濃度に等しい)。複数の正常ドナー由来の T 細胞を使用して 2 回の独立試験から得られた EC₅₀ 及び最大 T 細胞活性化値の概要を図 9 に示す。

【0260】

図 10 は、BCMB72 が BCMA+ 細胞株に対して一貫して強い細胞傷害性を有したこと示す。Fc ブロッカーを使用して、標的細胞への BCMB72 の Fc 受容体依存性結合を防止した。概して、データ点は作成したフィット曲線に沿ってぴったり並び、T 細胞ドナー間のばらつきはほとんどなかった。BCMA+ 細胞では 62 ~ 97 % の最大溶解を達成し、BCMA- 細胞では 4 ~ 18 % であった。複数の正常ドナー由来の T 細胞を使用して 2 回の独立試験から得られた EC₅₀ 及び最大溶解値の概要を図 11 に示す。

【0261】

他の 6 つの BCMA × CD3 抗体は、83 ~ 93 % の最大細胞傷害性 (図 12A) と、2 人の異なるドナーの T 細胞を用いた BCMA+ H929 細胞での 74 ~ 83 % の T 細胞活性化 (図 12B) とを示した。これらの 6 つの BCMA × CD3 抗体分子は、0.04 ~ 0.09 nM の範囲の EC₅₀ 値で BCMA+ 標的細胞の殺傷に効力がある。

【0262】

実施例 11：BCMA+ 細胞株における BCMB72 の結合効率

悪性バックグラウンドの種々の BCMA+ 細胞株に結合する BCMB72 の EC₅₀ 値を評価した。簡潔に言えば、二重特異性抗体 BCMB72 (BCMA × CD3) を PBS で 750 μg / mL に希釈した。96 ウエル U 底プレートにおいて PBS で 3 倍系列希釈して用量設定を調製した。最後のカラムを PBS のみとして残した (溶媒コントロール)。

【0263】

Glutamax、10 % FBS、及び 25 mM HEPES を添加した、抗生物質を含まない RPMI 1640 培地 (培養培地) で、H929 標的細胞を培養した。アッセイについては、標的細胞の密度及び生存性を測定し、その後、細胞を 4 において 100 rpm で 5 分間遠心分離した。ついで細胞ペレットを 10 mL の PBS で洗浄し、再度 1000 rpm で 5 分間遠心分離した。5.5 × 10⁵ 細胞 / mL で細胞を PBS で再懸濁し、96 ウエル U 底プレートのウェルあたり 90 μL の細胞懸濁液を分取し、ついで BCMB72 希釈物の 10 μL / ウェルを分取した。プレートを 4 において暗所で 1 時間インキュベートし、ついで 1000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を捨てた。細胞ペレットを 200 μL の FACS バッファで 2 回洗浄した。ヒト IgG4 Fc に対する PE 標識二次抗体を FACS バッファで 1 : 25 に溶解し、この混合液の 50 μL を対応するウェルに添加した。サンプルを 4 で 20 分間インキュベートし、上記のように FACS バッファで洗浄し、FACSCanto II での分析用に 150 μL の FACS バッファで再構成した。BCMB72 の結合性について FlowJo 7.6 を使用してデータを分析し、データのグラフ化及びフィッティングは、最小 2 乗法を用いた可変勾配関数を

10

20

30

40

50

有する非線形回帰を使用して Graph Pad Prism 6 で行った。

【0264】

図 6 に見られるように、BCMB72 は、試験した全ての BCMA + 細胞株に結合することができる。H929 細胞に対する結合性の EC₅₀ は 14.7 nM であり、MM.1R 細胞に対しては 9.74 nM、EJM 細胞に対しては 17.5 nM、LP1 細胞に対しては 22.3 nM、及び U-2932 細胞に対しては 7.92 nM であった。

【0265】

実施例 12：エクスピボでの正常ヒトドナー由来の全血における BCMA の発現及び BCMB72 の結合性の分析

白血球での BCMA の発現及び BCMB72 の結合性を、エクスピボで 3 人の正常ヒトドナー由来の全血において評価した。簡潔に言えば、正常ヒトドナー由来の新鮮末梢血を試験前にヘパリン被覆管に保存した。血液を 100 μL の一定分量で 96 ウェル U 底プレートにピペットで移した。染色抗体を、試験の集計表に示したように、マスターミックスで調製した。マスターミックスを、BCMA に対する抗体（すなわち、BCMB72）と共に血液に直接添加した。室温で 30 分間のインキュベーション後、血液を有するプレートを 4 回において 1350 rpm で 3 分間遠心分離した。上清血漿を捨て、ペレットを 4 回連続繰り返して赤血球溶解に供し、各洗浄の間に 5 分間インキュベートした。溶解の完了後、ペレットを PBS で 1 回洗浄し、ついで 1:200 の Live / Dead 近赤外染料及び 1:50 の抗 IgG4 PE (BCMB72 を有するウェルについてのみ) を有する PBS で染色した。プレートを更に室温で 15 分間インキュベートした。その後、サンプルを 200 μL の FACS バッファで洗浄し、最後に LSRFortessa での分析用に 150 μL の FACS バッファで再構成した。各ウェルから約 100,000 のイベントを収集した。分析を FlowJo 7.6 で行った。

10

20

30

【0266】

図 7 に示すように、BCMA 発現なしは、3 人の正常ドナーにおけるリンパ球、単球、顆粒球、又は形質細胞様 DC で観察された。BCMB72 は、3 人の全てのドナーで CD3+T 細胞に対する結合性を示したが、ドナー間で強度が異なった。BCMB72 は、このアッセイで試験した他のいずれの細胞種にも結合しなかった。

【0267】

実施例 13：サイトカインプロファイルにおける BCMB72 の効果

T 細胞媒介性殺傷アッセイから得られた上清におけるサイトカインプロファイルを、BCMB72 及びコントロール抗体を使用して評価した。T 細胞及び抗体を、T 細胞媒介性細胞傷害アッセイで行ったように播種した（実施例 10 参照）。48 時間のインキュベーション後、細胞上清を採取し、MSD に基づく ELISA を使用して異なる（10/30 P1ex）サイトカインを測定した。サイトカイン濃度を pg/mL として表し、データのグラフ化及びフィッティングは、可変勾配（4 パラメータ）関数を有する非線形回帰を使用して Graph Pad Prism 6 で行った。6 人の T 細胞ドナーを用いた RPMI 8226 細胞株から得た 6 種類のサイトカインの EC₅₀ 値を図 13 に示す。データは、T 細胞の活性化から得られた有意なサイトカイン放出を示す。コントロール抗体では、サイトカイン放出が少ない／ないことが観察された（データは示していない）。

30

40

【0268】

実施例 14：T 細胞活性化及び T 細胞媒介性標的細胞殺傷における HEK 及び CHO 產生（一過性 & 安定細胞株）BCMB72 の機能性比較

異なる細胞において及び異なる発現方式の下で產生された二重特異性抗体は、活性が異なり得る。したがって、HEK 細胞（一過性発現）又は CHO 細胞（一過性若しくは安定発現）で產生された BCMB72 のインビトロでの有効性を評価した。

【0269】

BCMB72 を PBS で 800 μg/mL に希釈した。各試験で指示するように、96 ウェル U 底プレートにおいて PBS で 3 倍又は 4 倍系列希釈のいずれかで用量設定を調製した。最後のカラムを PBS のみとして残した（溶媒コントロール）。

50

【0270】

G l u t a M A X、10% F B S、及び25 mM H E P E Sを添加した、抗生物質を含まないR P M I 1640培地（培養培地）で、H 9 2 9 標的細胞を培養した。設定日（1日目）には、細胞を計数し、1000万個の細胞を1350 rpmで3分間遠心分離し、上清を捨てた。C e l l T r a c e F C S E 増殖染料を18 μLの無菌D M S Oで再構成し、この溶液の1 μLを無菌P B Sの10 mLで希釈した。H 9 2 9 細胞ペレットを1 mLのC F S E 希釈物で再懸濁し、直接光から覆って室温で8分間インキュベートした。インキュベーション後、1 mLのH I F B Sを細胞懸濁液に添加し、過剰なC F S Eをクエンチした。10% F B Sを有する1640 R P M Iで細胞を2回洗浄した。10 mLのR P M Iで再構成した後、細胞を計数し、細胞生存性を集計表に記録した。細胞を指示濃度に希釈し、使用するまで37でインキュベートした。

10

【0271】

正常ドナー由来のT細胞を37の水浴で解凍した後、バイアルの中身を50 mL円錐バイアルに移し、15 mLの低温培地で再構成した。ついで細胞を4において1350 rpmで3分間遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットを5~10 mLの培地で再構成した。T細胞を計数し、適切な濃度に培地で再構成した（各試験の集計表参照）。

【0272】

H 9 2 9 細胞をウェルに添加し、ついでT細胞を添加した（5:1のエフェクター：標的比）。この試験一式では、F c プロッカーは使用しなかった。標的及びT細胞を混合した後、20 μLのB C M B 7 2 希釈物を各ウェルに添加した。プレートを37において5% C O₂で48時間インキュベートした。

20

【0273】

2日後、細胞を含むプレートを遠心分離し、上清を捨てるか又はサイトカイン放出アッセイ用に保存した。細胞を200 μLのP B Sで洗浄し、50 μLの近赤外L i v e / D e a d 染料（1:200 希釈物）及び抗C D 2 5 P E 抗体（1:50 希釈物）で室温で20分間インキュベートした。その後、細胞を200 μLのF A C S バッファで1回洗浄し、最後に150 μLのF A C S バッファで再構成した。細胞は、同日にF A C S C a n t o I I を使用してフローサイトメトリーを実施し、標的細胞傷害性（標的%）及びT細胞活性化C D 2 5+（生存T細胞%）についてF l o w J o 7 . 6で分析した。データのグラフ化及びフィッティングは、可変勾配（4パラメータ）関数及び最小2乗法を用いた非線形回帰を使用してG r a p h P a d P r i s m 6で行った。

30

【0274】

図14に見られるように、H E K 細胞で產生されたB C M B 7 2 及びC H O 細胞で產生されたB C M B 7 2 は、T細胞リダイレクトアッセイにおいて標的細胞に対する細胞障害性及びT細胞に対する刺激の点で、実質的に同様に機能した。85%の最大殺傷及び80%のT細胞活性化を概ね達成した。細胞傷害性の平均E C₅₀ 値は、H E K 細胞で產生されたB C M B 7 2 では0.29 nM、C H O 細胞で產生されたB C M B 7 2 では0.42~0.47 nMであった。T細胞活性化の平均E C₅₀ 値は、H E K 細胞で產生されたB C M B 7 2 では0.28 nM、C H O 細胞で產生されたB C M B 7 2 では0.37~0.41 nMであった。S t u d e n t ' s T - t e s t を使用した比較分析は、E C₅₀ 値間に統計的有意性を示さなかった。

40

【0275】

実施例15：B C M B 7 2 によるP 3 8 シグナル伝達活性化

B A F F 及びA P R I L は共に、2つの受容体B C M A（B細胞成熟抗原、T N F R S F 1 7）及びT A C I（膜貫通活性化因子及びC A M L 相互作用体、T N F R S F 1 3 b）に結合する。B C M Aの結合は、J N K 及びP 3 8 M A P K シグナル伝達経路を活性化する。B C M A × C D 3 二重特異性抗体のB C M B 7 2 は、B C M A に向けてアゴニスト作用を及ぼし得る可能性がある。この試験は2つの部分を含んだ。1. A P R I L 又はB A F F 处理後のH 9 2 9 又はM M 1 . R 細胞におけるP 3 8 a M A P K の変化をモニタするために、簡単なウエスタン分析アッセイを開発すること。2. 新たに開発され

50

たアッセイを使用して、BCMB72がBCMAに向けていずれかのアゴニスト作用を有するかどうかを調べること。

【0276】

細胞処理

H929又はMM1.R細胞を、処理前に37において5%CO₂の存在下で24時間、血清を含まないRPMI培地に1.5e6/mLで播種した。処理日に、細胞を遠沈させ、血清を含まないRPMI中に1.5e6/mLで再懸濁した。経時変化アッセイでは、細胞を10本の管に管あたり5mLを分取した。各管の細胞を、1000ng/mLのAPRIL(R&D Systems、カタログ#5860-AP-010)又は1000ng/mLのBAFF(R&D Systems、カタログ#2149-BF-010)を用いてそれぞれ0、5、15、30、及び60分間、37において5%CO₂の存在下で処理した。インキュベーション後、細胞を直ちにペレット状にし、細胞溶解物を形成するために-80で凍結した。BCMB72のアゴニスト作用アッセイについて、H929細胞処理群を表13に列記した。BCMB72のアゴニスト作用アッセイは2回行った。

【0277】

【表13】

表13. BCMB72のアゴニスト作用アッセイの処理群

| 試料 | 処理(15分) |
|----|-------------------|
| 1 | APRIL 0ng/mL |
| 2 | APRIL 1000ng/mL |
| 3 | BAFF 0ng/mL |
| 4 | BAFF 1000ng/mL |
| 5 | BCMB72 0ng/mL |
| 6 | BCMB72 10ng/mL |
| 7 | BCMB72 100ng/mL |
| 8 | BCMB72 1000ng/mL |
| 9 | BCMB72 10000ng/mL |

【0278】

Simple Western分析用の細胞溶解物の調製

ホスファターゼ及びプロテアーゼ阻害剤を含むRIPAバッファで細胞を溶解した。タンパク質濃度を、BioRad DC Protein Assay(BioRad #500-0112)及びウシ血清アルブミン標準を用いてSpectraMax Plus 384マイクロプレートリーダー(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)で測定した。

【0279】

Simple Western分析

Simple Western分析を、Protein Simpleユーザーマニュアルに従ってWes-Rabbit(12-230KDa)Master kit(Protein Simple #PS-MK01)を用いて行った。簡潔に言うと、細胞溶解物サンプルをマスター・ミックスと混合して、1×サンプルバッファ、1×蛍光分子量マーク、及び40mMジチオスレイトール(DTT)の最終濃度にし、ついで95で5分間加熱した。サンプル、阻害試薬、一次抗体蛍光体-p38 MAPK(ThermoFisher:VWR#MA5-15182)又はActin-beta(Cell Signaling, #8457S)、HRP結合二次抗体、化学発光基質、並びに分離及び積層マトリックスを、Simple Wesマイクロプレート内の指定のウェルに分配し、プレートの読み込み後、分離電気泳動及び免疫検出工程をキャピラリーシステムで実施したが、これらは完全自動化であった。電気泳動中、タンパク質は、積層及び分離マトリックスにより分子量に基づいて分離され、独自の光活性化捕獲化学を用いてキャピラリー壁

10

20

30

40

50

に固定された。一次抗体を抗体希釈剤 II (Protein Simple #042-203) で 1 : 50 に希釈した。標的タンパク質を、一次抗体で 60 分間、ついで HRP 結合二次抗体を用いて免疫学的検出を行った。Simon-simple Western 分析を室温で行い、機器のデフォルト設定を使用した。デジタル画像を Compass ソフトウェア (Protein Simple) を用いて分析し、検出タンパク質の定量データを分子量、シグナル / ピーク強度、及びピーク面積として記録した。

【0280】

結果

経時変化試験から得られた情報に基づいて、15 分間のインキュベーション終点を使用して H929 細胞で BCMB72 アゴニストアッセイを行った。p38 MAPK シグナルをヒトベータアクチンシグナルにより正規化した。2つのアッセイから得られた正規化 p38 MAPK シグナルの平均を図 15 に示す。BCMB72 アゴニストアッセイは、BCMB72 が H929 細胞において BCMA に向けたアゴニスト作用を有していないことを実証した。

10

【0281】

実施例 16：BCMB72 による NF-B シグナル伝達

BCMA は、内因性リガンドに応答して NF-B シグナル伝達を生じさせ得る表面受容体である。NF-B 経路活性化における BCMA に結合した BCMB72 の影響を、NF-B プロモータの下でアルカリホスファターゼ (SEAP) を発現する BCMA 発現レポーター細胞株を使用して評価した。

20

【0282】

Glutamax 及び 10% FBS を添加した DMEM 培地（培養培地）で細胞を培養した。試験前夜に、細胞をトリプシン処理（37℃ に予め加温した 0.25% トリプシン中に 5 分）により採取し、30 mL の培養培地で洗浄した。ついで細胞を 4℃ において 1000 rpm で 5 分間遠心分離し、血清を含まない DMEM (Glutamax 含有) で 2.5×10^5 細胞 / mL に再構成した。 5×10^4 個の細胞を 96 ウェル平底プレートのウェルに添加し、37℃ で 16 時間インキュベートした。

【0283】

翌朝、種々の刺激性試薬 (TNF、APRIL、BCMB72) を対応するウェルに添加し（試験プレートマップ参照）、プレートを 37℃ で更に 16、24、又は 48 時間インキュベートし、これらはそれぞれ早期、中期、及び後期のシグナル伝達時点を表した。各時点の後、10 μL の馴化培養培地をウェルから収集し、SEAP キット (Cayman, 600272) 内で提供される 96 ウェル固体プレートに移し、蓋で覆った。SEAP 標準は、バルク標準 (5 U / mL) を、血清を含まない DMEM (Glutamax 含有) で 1 : 10 に希釈することにより調製し、ついで 1 : 2 の系列希釈を調製した。希釈範囲は 50 ~ 0.78 mU / mL である。サンプルを有するプレートを 65℃ で 30 分間インキュベートし、内因性アルカリホスファターゼを不活性化した。このアッセイで発現された SEAP は、これらのインキュベーション条件下で安定である。プレートを室温でインキュベートした後、10 μL の標準希釈物を適切なウェルに添加した。50 μL の基質溶液を全てのウェルに添加し、サンプルを軽く攪拌し、溶液をウェルに分配した。サンプルを 20 ~ 30 分間インキュベートし、PerkinElmer EnVision

30

2104 Multilabel Reader を使用して化学発光を評価した。化学発光の読み取り値を標準曲線に基づいて活性単位濃度に変換し、値を Microsoft Excel 2010 で分析し、グラフ分析用に Graph Prism 6 にインポートした。

40

【0284】

図 16 は、APRIL が 0.46 nM 程度の低濃度でも BCMA を刺激できたのに対し、概して BCMB72 は 10 nM 未満の濃度では BCMA 形質導入細胞で NF-B 経路を活性化しなかったことを実証する。高 BCMB72 濃度 (44 ~ 133 nM) では、中程度の BCMB72 依存性活性化が観察された。

50

【0285】

実施例17：標的細胞の不在下でのT細胞活性化におけるBCMAの細胞外ドメインの外部添加の影響

BCMAの細胞外ドメイン（ECD）は、溶液中で三量体を形成し得る。したがって、多数の二重特異性抗体が、標的細胞の不在下でBCMA-ECD三量体及び架橋TCR複合体に結合できる可能性がある。これは同様にして、標的非依存性でT細胞を活性化し得る。この試験は、外部添加したBCMAのECDが、標的細胞との相互作用なしにCD25発現濃度でT細胞活性化を誘発し得るかどうかを調べた。

【0286】

BCMB72（BCMA×CD3）及びコントロール（無×CD3）をPBSで800μg/mLに希釈した。96ウェルU底プレートにおいてPBSで3倍系列希釈して用量設定を調製した。最後のカラムをPBSのみとして残した（溶媒コントロール）。 10

【0287】

可溶性BCMA-ECD（sBCMA）をPBSで36μg/mL（6.67μM）に希釈した。96ウェルU底プレートにおいてPBSで3倍系列希釈して用量設定を調製した。上部のウェルをPBSのみとして残した（溶媒コントロール）。

【0288】

正常ドナー由来の汎T細胞を37の水浴で解凍した後、凍結バイアルの中身を50mL円錐バイアルに移し、30mLの低温培地で再構成した。ついで細胞を4において1350rpmで3分間遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットを10mLの培地で再構成した。T細胞を計数し、生存性を記録した。ついで細胞を培地で0.525×10^6/mLに再構成した。 20

【0289】

1×10^5個のT細胞（190μL）をウェルに添加し、ついで5μLのsBCMA希釈物及び5μLのBCMB72希釈物を添加した。プレートを37において5%CO₂で48時間インキュベートした。

【0290】

2日後、プレートを4において1500rpmで3分間遠心分離し、上清を捨てた。細胞ペレットを200μLのPBSで洗浄し、50μLの近赤外Live/Dead染料（1:200希釈物）及び抗CD25PE抗体（1:50希釈物）で室温で20分間インキュベートした。その後、細胞を200μLのFACSバッファで1回洗浄し、最後に150μLのFACSバッファで再構成した。T細胞活性化CD25+（生存T細胞%）について、FACSCanto II及びFlowJo 7.6を使用して細胞を分析した。データのグラフ化及びフィッティングは、最小2乗フィッティング法を用いた非線形回帰を使用してGraphPad Prism 6で行った。 30

【0291】

正常ドナー由来のT細胞は、BCMB72の存在下でsBCMA-ECD媒介性活性化を示さなかった。高濃度(>40nM)のBCMB72では、sBCMA非依存性において、T細胞の低パーセンテージの弱い活性化（10~15%）が観察された（図17）。

【0292】

実施例18：T細胞活性化及びBCMB72依存性細胞傷害における可溶性BCMAのECD、APRIL、及びBAFFの影響 40

可溶性BCMA-ECDは、BCMA×CD3抗体のシンクとして働き得るが、APRIL及びBAFFは、表面受容体とBCMA×CD3抗体との相互作用の競合的阻害剤であり得る。BCMB72依存性細胞殺傷のインビトロでの細胞傷害能における可溶性BCMA-ECD並びに内因性リガンドAPRIL及びBAFFの影響を、固定細胞株H929及び正常ドナーM7077由来の汎T細胞を用いたT細胞リダイレクトアッセイで評価した。

【0293】

BCMB72をPBSで800μg/mLに希釈した。96ウェルU底プレートにおい

50

て PBS で 3 倍系列希釈して用量設定を調製した。最後のカラムを PBS のみとして残した（溶媒コントロール）。可溶性 BCMA ECD を 9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈し、APRIL 及び BAFF を 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ に希釈した。96 ウェル U 底プレートにおいて PBS で 3 倍系列希釈して、両方の試薬の用量設定を調製した。

【0294】

Glutamax、10% FBS、及び 25 mM HEPES を添加した、抗生物質を含まない RPMI 1640 培地（培養培地）で、H929 標的細胞を培養した。設定日（1 日目）には、標的細胞を計数し、1000 万個の細胞を 1350 rpm で 3 分間遠心分離した後、上清を捨てた。CellTrace FCSE 増殖染料を 18 μL の無菌 DMEM で再構成し、この溶液の 1 μL を無菌 PBS の 10 mL で希釈した。細胞ペレットを 1 mL の CFSE 希釈物で再懸濁し、直接光から覆って室温で 8 分間インキュベートした。インキュベーション後、1 mL の HI FBS を細胞懸濁液に添加し、過剰な CFSE をクエンチした。10% FBS を有する RPMI - 1640 で細胞を 2 回洗浄した。10 mL の RPMI で再構成した後、細胞を計数し、細胞生存性を集計表に記録した。細胞を $2.2 \times 10^5/\text{mL}$ に希釈し、使用するまで 37 でインキュベートした。

10

【0295】

正常ドナー由来の汎 T 細胞を 37 の水浴で解凍した後、凍結バイアルの中身を 50 mL 円錐バイアルに移し、30 mL の低温培地で再構成した。ついで細胞を 4 において 1350 rpm で 3 分間遠心分離した。上清を捨て、細胞ペレットを 10 mL の培地で再構成した。T 細胞を計数し、生存性を記録した。ついで細胞を培地で $1.1 \times 10^6/\text{mL}$ に再構成した。

20

【0296】

2×10^5 個の H929 細胞を 96 ウェル U 底プレートのウェルに添加した。この試験では、Fc ブロックサーを用いたインキュベーションは必要なかった。 1×10^5 個の T 細胞をウェルに添加した（5 : 1 のエフェクター : 標的比）。標的及び T 細胞を混合した後、20 μL の sBCMA、APRIL、又は BAFF のいずれかをウェルに添加し、ついで 5 μL の抗体希釈物を添加した。プレートを 37 において 5% CO₂ で 48 時間インキュベートした。

30

【0297】

2 日後、プレートを 4 において 1500 rpm で 3 分間遠心分離し、上清を捨てた。細胞を 200 μL の PBS で洗浄し、50 μL の近赤外 Live / Dead 染料（1 : 200 希釈物）及び抗 CD25 PE 抗体（1 : 50 希釈物）で室温で 20 分間インキュベートした。その後、細胞を 200 μL の FACS バッファで 1 回洗浄し、最後に 150 μL の FACS バッファで再構成した。標的細胞傷害性（標的%）及び T 細胞活性化 CD25+（生存 T 細胞%）について、FACSCanto II 及び FlowJo 7.6 を使用して細胞を分析した。データのグラフ化及びフィッティングは、最小 2 乗法を用いた可変勾配（4 パラメータ）関数を有する非線形回帰を使用して GraphPad Prism 6 で行った。

40

【0298】

BCMB72 は、可溶性 BCMA ECD の存在下で H929 細胞に細胞傷害性を及ぼすことができ、高用量（> 160 nM）の BCMA ECD で EC₅₀ にごくわずかな影響（2 倍上昇）があった。T 細胞活性化も同様に影響を受けた（図 18 A 及び 18 D 参照）。APRIL は、細胞傷害性及び T 細胞活性化の EC₅₀ 値を高用量（46 nM）で 6 倍に上昇させたが、より低い用量ではアッセイに与えた影響は最小限であった（図 18 B 及び 18 E 参照）。最大殺傷は、sBCMA 又は APRIL により影響を受けなかった。対照的に、外因性 BAFF は、51 nM 以下の濃度で BCMB72 媒介性細胞傷害に影響を与えるなかった（図 18 C 参照）。全ての事例における T 細胞活性化能は、予想どおり殺傷データとよく相關した（図 18 F 参照）。

【0299】

実施例 19：インビトロでの BCMA への結合における BCMB72、APRIL、及

50

び B A F F の競合

2つのTNFリガンド、APRIL及びBAFFは、BCMAに結合し、シグナル伝達カスケードを誘発し、細胞の生存及び増殖をもたらし得る。BCMAの細胞外ドメインは、これら2つのリガンド、並びにこのモチーフに対して挙げられた抗体に結合する、短い54個のアミノ酸フラグメントである。ここでは、これらのリガンドのBCMB72に対する競合性を評価した。

【0300】

アッセイをELISAに基づくフォーマットで設定した。競合アッセイの調製において、BCMA-FcをMSD SulfoTagで標識した。BCMA-Fcの50 μgバイアルを500 μLのPBSで再構成し、0.1 mg/mL(3.125 μMの単量体)を得た。150 nモルのNHS-sulfoTagを50 μLの水に溶解し、3 mMの溶液を得た。10×過剰の標識反応のために、5.2 μLの3 mM NHS-SulfoTag(15.6 nモル)を500 μLのBCMA-Fc(1.56 nモルの単量体)に添加した。暗所において室温で2時間反応させた。50 μLの1Mトリスを添加し、未反応NHSをクエンチした。過剰なSulfoTag及びトリスを、PBSで平衡化した2 mL 7K MWCO Zebaスピンカラム上でのバッファ交換により除去した。最終容量は~630 μLであり、したがって最終SulfoTag-BCMA-Fcを2.5 μMとして使用した。

【0301】

競合アッセイについては、抗BAFF(100 μg)及び抗APRIL(100 μg)を200 μLのPBSで再構成し、0.5 mg/mLの原液を得た。30 μL(6 μg)の抗APRIL及び抗BAFFを、2.97 mLのPBSでそれぞれ希釈し、2 μg/mLの溶液を得た。96ウェルMSD高結合プレートの各ウェルに、25 μLの2 μg/mL抗APRILを添加した。第2の96ウェルMSD高結合プレートの各ウェルに、25 μLの2 μg/mL抗BAFFを添加した。プレートを一晩、4℃に維持し、抗体を固定した。抗APRIL及び抗BAFFで被覆されたプレートの中身を捨て、ウェルあたり300 μLのSuperBlockを添加した。室温で1時間阻害後、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。10 μgの各組換えAPRIL及びBAFFを100 μLのPBSで再懸濁し、0.1 mg/mLの溶液を得た。各APRIL及びBAFFの3 mLの2 μg/mL溶液を、新たに再構成したタンパク質の60 μLを2.94 mLのSuperBlockで希釈することにより作製した。25 μLの2 μg/mL APRILを抗APRIL被覆プレートの各ウェルに添加し、25 μLの2 μg/mL BAFFを抗BAFF被覆プレートの各ウェルに添加した。室温で1時間捕捉後、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。500 μgの抗BCMA(R&D Sys Mab193)を1 mLのPBSで再構成し、0.5 mg/mL(3.3 μM)の原液を得た。抗BCMA Mab193、BCMB72.004、及びコントロール抗体(無×CD3)をSuperBlockで1 μMに希釈した。100 μLの抗体を200 μLのSuperBlockに混合することにより、11 ptの3倍系列希釈系を調製した。6 mLの30 nM SulfoTag-BCMA-Fcを、72 μLの上記タンパク質を5.928 mLのSuperBlockで希釈することにより調製した。25 μLのステップ11の各抗体を、以下の図1のプレートマップに従ってAPRIL/BAFF捕捉プレートの各ウェルに添加した。25 μLの30 nM SulfoTag-BCMA-Fcを両方のプレートの各ウェルに添加した。室温で1時間後、プレートをPBS-Tで3回洗浄した。150 μLの1×MSDリードバッファTを各ウェルに添加し、プレートをセクタ6000イメージでスキャンした。上記のように正確に試験を繰り返し、第2の独立した一連の結果を得た。

【0302】

図19に見られるように、BCMB72の量を増加させてインキュベートしたとき、コントロール抗体(無×CD3)では見られないが、BCMA-Fcタンパク質は、プレート結合APRIL及びBAFFへの結合が妨げられた。観測結果は、それぞれ3回の繰り返しを有する2回の独立試験で一致した。

10

20

30

40

50

【0303】

実施例20：多発性骨髄腫患者の骨髄CD138陽性細胞のBCMB72への結合性及び細胞傷害性

多発性骨髄腫患者由来の一次サンプルにおけるBCMB72の能力を評価するために、5人の患者由来の凍結骨髄の多発性骨髄腫サンプル及び健康ドナー由来のT細胞を使用した細胞傷害性殺傷アッセイでこの抗体を試験した。抗体結合性及びT細胞活性化能も測定した。

【0304】

BCMB72結合アッセイ

96ウェルU底プレートにおいてウェルあたり $100\mu L$ の細胞懸濁液を分取し、ついで $95\mu L$ の培地を分取した。次に、 $5\mu L$ のBCMB72の系列希釈又はコントロールをウェルに添加し、プレートを4℃で1時間インキュベートした。染色後、細胞を $1,200 rpm$ で3分間遠心分離し、 $200\mu L$ のPBSで1回洗浄した。細胞を再度遠心分離し、上清を捨てた後、ペレットを $50\mu L$ の近赤外Live/Dead染料(1:200希釈物)、抗ヒトIgG4FcPE抗体(1:50希釈物)、抗CD138(MI15 1:50希釈物及びDL-101 1:50希釈物)で再構成し、暗所において室温で20分間インキュベートした。その後、細胞を遠心分離し、 $200\mu L$ のFACSバッファで洗浄し、最後に $150\mu L$ のFACSバッファで再構成した。CD138+MNCでのBCMB72の結合強度について、FACSCanto II及びFlowJo

7.6を使用してサンプルを分析した。データのフィッティングは、最小2乗法を用いた可変勾配(4パラメータ)関数を有する非線形回帰を使用してGraphPad Prism 6を行った。

【0305】

T細胞リダイレクトアッセイ

1×10^5 個の標的細胞を96ウェルU底プレートのウェルに添加し、ついで 1×10^5 個のT細胞を添加した(5:1のおよそのエフェクター:標的比、ただし、骨髄由来の肥満細胞中の形質細胞計数を平均20%とする)。標的及びT細胞を混合した後、 $5\mu L$ のBCMB72希釈物を各ウェルに添加した。プレートを37℃において5%CO₂で48時間インキュベートした。

【0306】

2日後、プレートを遠心分離し、上清を捨てた。細胞を $200\mu L$ のPBSで洗浄し、 $50\mu L$ の近赤外Live/Dead染料(1:200希釈物)を有するPBS、抗CD138(MI15 1:50希釈物及びDL-101 1:50希釈物)、抗TCR/(1:50希釈物)、及び抗CD25PE(1:50希釈物)で室温で20分間インキュベートした。その後、細胞を $200\mu L$ のFACSバッファで1回洗浄し、最後に $150\mu L$ のFACSバッファで再構成した。形質細胞傷害性(死滅CD138+細胞%)及びT細胞活性化CD25+(生存T細胞%)について、FACSCanto II及びFlowJo 7.6を使用して細胞を分析した。データのグラフ化及びフィッティングは、最小2乗法を用いた可変勾配(4パラメータ)関数を有する非線形回帰を使用してGraphPad Prism 6を行った。

【0307】

結果

図20は、CD138⁺形質細胞の喪失により立証されるように、BCMB72が48時間後に用量依存的に全ての患者サンプルに結合し、その殺傷を誘発したことを示す。T細胞活性化データは、予想どおり殺傷データとよく相關している。T細胞活性化の平均EC₅₀は、1nMの範囲内であった。これらのデータは、BCMB72がインピトロで原発性多発性骨髄腫の骨髄細胞を殺傷できることを立証している。

【0308】

実施例21：PBMCHit化NSGマウスでのH929ヒト多発性骨髄腫異種移植片の腫瘍形成予防におけるBCMB72の抗腫瘍効果

10

20

30

40

50

この試験は、PBM C（末梢血単核球）ヒト化NSG（NOD SCID Gamma）マウスでのH929ヒト多発性骨髄腫（MM）異種移植片の腫瘍形成予防におけるBC M B 7 2 の効果を評価した。NSGマウスは、成熟機能性T細胞、B細胞、及びナチュラルキラー（NK）細胞を欠失する免疫不全状態株である。試験7日前に、同齢雌NSGマウスに 1×10^7 個のヒトPBM Cを静脈内注射した。PBM C接種後1日目に、各マウスにH929ヒトMM細胞（200 μLのPBS中に 5×10^6 個の細胞）を右後背臍腹に皮下移植し、ついでPBS並びにBC M B 7 2 0.1 μg（0.005 mg / kg）、0.5 μg（0.025 mg / kg）、及び1 μg（0.05 mg / kg）/動物を静脈内（IV）投与した。合計5つの治療について、PBSコントロール及びBC M B 7 2 を1日おき又は2日おきに投与した。H929 sc腫瘍は、腫瘍細胞移植後、早ければ8日目にPBS及び0.1 μg BC M B 7 2 治療群で検出可能であった。これら2つの群の腫瘍は、22日目に平均腫瘍体積が $> 500 \text{ mm}^3$ になるまで成長し続けた。24日目までに、PBSコントロール群の平均腫瘍体積は 1000 mm^3 を超えていた。興味深いことに、sc H929腫瘍は、0.5 μg及び1 μgのBC M B 7 2 で治療したマウスでは成長しなかった（図21）。したがって、BC M B 7 2 は、0.5及び1 μg /動物で治療した全ての動物でH929ヒトMM異種移植片の腫瘍形成を阻害した。

10

【0309】

実施例22：BC M B 7 2 で治療されたPBM Cヒト化NSGマウスでのH929（ヒト多発性骨髄腫細胞）異種移植片由来のマウス血清中の可溶性BC M Aの定量

20

この試験は、H929異種移植片マウス由来の血清中の可溶性BC M A濃度を定量するために、及び可溶性BC M A濃度をこれらの動物における腫瘍の負担に相関させるために設計された。

【0310】

簡潔に言えば、異種移植片試験サンプルから得た血清を、R & D Systemsから得られるBC M A酵素結合免疫吸着検査法（ELISA）により分析した。血清を解凍し、希釈用試薬で1:50に希釈し、4で一晩インキュベートした。BC M A ELISAを製造業者のプロトコルに従って実施した。ELISAプレートを、450 nmに設定したMD SpectraMaxプレートリーダーM5（Molecular Devices, Sunnyvale CA）を使用して分析した。ELISA内の各ウェルは、元の異種移植片試験の一匹のマウス由来の血清に対応する。

30

【0311】

BC M B 7 2 の1 μg及び0.5 μgで治療されたマウスのマウス血清中の可溶性BC M A濃度は、PBSのみ又はBC M B 7 2 の0.1 μg / マウスと比較するとき、有意な低下があった（図22）。これらのデータは、BC M B 7 2 の1 μg及び0.5 μgで治療されたマウスで腫瘍の成長がないか又は最小限であった、異種移植片試験を支持する。これらのデータは、血清サンプル中の可溶性BC M Aが、多発性骨髄腫の指標を評価するための潜在的バイオマーカーとして洞察力に優れ、生存可溶性BC M Aが病気の負担をモニタするのに役立ち得ることを示唆する。

【0312】

【表14-1】

配列表の簡単な説明

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|--------|--|---|
| 1 | PRT | ヒト | BCMA | MLQMAGQCSQNEYFDSLHACIPCQLRCSSNTPP LTCQRYCNAVTNSVKGTNAILWTCLGLSLIISLAV FVLMFLLRKINSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLE KSRTGDEILPRGLEYTVEECTCEDCIKSKPKVDS DHCFLPAMEEGATILVTTKTNDYCKSLPAALSAT EIEKSISAR |
| 2 | PRT | マウス | BCMA | MAQQCFHSEYFDSLHACKPCHLRCNPPATCQP YCDPSVTSSVKGTYTVLWIFLGLTLVLSLAFTISFL LRKMNPEALKDEPQSPGQLDGSAQLDKADTELTR IRAGDDRIFPRSLEYTVEECTCEDCVKSCKPKGDSD HFFPLPAMEEGATILVTTKTGDYGKSSVPTALQSV MGMEKPTHTR |
| 3 | PRT | カニクイザル | BCMA | MLQMARQCSQNEYFDSLHDCKPCQLRCSSTPPL TCQRYCNASTMNSVKGMNAILWTCLGLSLIISLAV FVLTFLLRKMSSEPLKDEFKNTGSGLLGMANIDLE KGRTGDEIVLPRGLEYTVEECTCEDCIKNKPVDS DHCFLPAMEEGATILVTTKTNDYCNLSAALSVT EIEKSISAR |
| 4 | PRT | ヒト | BCMB69、 BCMB117、 BCMB118、 BCMB119、 BCMB120、 BCMB125、 BCMB126、 BCMB127、 BCMB128、 及び BCMB129— HCDR1 | SGSYFWG |
| 5 | PRT | ヒト | BCMB69、 BCMB117、 BCMB118、 BCMB119、 BCMB120、 BCMB123、 BCMB124、 BCMB125、 BCMB126、 BCMB127、 BCMB128、 BCMB176、 BCMB179、 BCMB180、 BCMB181、 及び BCMB182— HCDR2 | SIYYSGITYYNPSLKS |

【0313】

【表14-2】

(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|----|---|-----------------|
| 6 | PRT | ヒト | BCMB69、 BCMB117、 BCMB121、 BCMB122、 BCMB123、 BCMB124、 及び BCMB129— HCDR3 | HDGAVAGLFDY |
| 7 | PRT | ヒト | BCMB121、 BCMB122、 及び BCMB123 HCDR1 | SSYYWG |
| 8 | PRT | ヒト | BCMB121、 BCMB122、 BCMB129、 BCMB130、 BCMB131、 及び BCMB177— HCDR2 | SIYSGSTYYNPSLKS |
| 9 | PRT | ヒト | BCMB118— HCDR3 | HDAATAGLFDY |
| 10 | PRT | ヒト | BCMB124、 BCMB130、 及び BCMB131— HCDR1 | SGSYYWG |
| 11 | PRT | ヒト | BCMB178、 BCMB186、 BCMB187、 及び BCMB188— HCDR2 | SIYSGWTYYNPSLKS |
| 12 | PRT | ヒト | BCMB119— HCDR3 | HEGATAGLFDY |
| 13 | PRT | ヒト | BCMB176、 BCMB177、 BCMB178、 BCMB179、 BCMB180、 BCMB181、 BCMB182、 BCMB183、 BCMB184、 BCMB185、 BCMB186、 BCMB187、 及び BCMB188— HCDR1 | SSSYFWG |
| 14 | PRT | ヒト | BCMB183、 BCMB184、 及び BCMB185— HCDR2 | SIYSGRTYYNPSLKS |

【表14-3】
(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|----|---|-------------|
| 15 | PRT | ヒト | BCMB120－ HCDR3 | HSGATAGLFDY |
| 16 | PRT | ヒト | BCMB125 及び BCMB131－ HCDR3 | HEGAVAGLFDY |
| 17 | PRT | ヒト | BCMB126－ HCDR3 | HSGAVAGLFDY |
| 18 | PRT | ヒト | BCMB127 及び BCMB130－ HCDR3 | HDAAVAGLFDY |
| 19 | PRT | ヒト | BCMB128、 BCMB176、 BCMB177、 及び BCMB178－ HCDR3 | HDGATAGLFDY |
| 20 | PRT | ヒト | BCMB179、 BCMB183、 及び BCMB186－ HCDR3 | HQGATAGLFDY |
| 21 | PRT | ヒト | BCMB180、 BCMB184、 及び BCMB187－ HCDR3 | HHGATAGLFDY |
| 22 | PRT | ヒト | BCMB181－ HCDR3 | HWGATAGLFDY |
| 23 | PRT | ヒト | BCMB182、 BCMB185、 及び BCMB188－ HCDR3 | HYGATAGLFDY |

【0315】

10

20

30

【表14-4】

(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 | |
|------|-----|----|--|-------------|----|
| 24 | PRT | ヒト | BCMB69、 BCMB117、 BCMB118、 BCMB119、 BCMB120、 BCMB121、 BCMB122、 BCMB123、 BCMB124、 BCMB125、 BCMB126、 BCMB127、 BCMB128、 BCMB129、 BCMB130、 BCMB131、 BCMB176、 BCMB177、 BCMB178、 BCMB179、 BCMB180、 BCMB181、 BCMB182、 BCMB183、 BCMB184、 BCMB185、 BCMB186、 BCMB187、 及び BCMB188— LCDR1 | GGNNIGSKSVH | 10 |
| 25 | PRT | ヒト | BCMB69、 BCMB117、 BCMB118、 BCMB119、 BCMB120、 BCMB121、 BCMB122、 BCMB123、 BCMB124、 BCMB125、 BCMB126、 BCMB127、 BCMB128、 BCMB129、 BCMB130、 BCMB131、 BCMB176、 BCMB177、 BCMB178、 BCMB179、 BCMB180、 BCMB181、 BCMB182、 BCMB183、 BCMB184、 BCMB185、 BCMB186、 BCMB187、 及び BCMB188— LCDR2 | DDSDRPS | 30 |
| | | | | | 40 |

【表14-5】

(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 | |
|------|-----|----|--|---|----------|
| 26 | PRT | ヒト | BCMB69、 BCMB117、 BCMB118、 BCMB119、 BCMB120、 BCMB121、 BCMB122、 BCMB123、 BCMB124、 BCMB125、 BCMB126、 BCMB127、 BCMB128、 BCMB129、 BCMB130、 BCMB131、 BCMB176、 BCMB177、 BCMB178、 BCMB179、 BCMB180、 BCMB181、 BCMB182、 BCMB183、 BCMB184、 BCMB185、 BCMB186、 BCMB187、 及び BCMB188— LCDR3 | QVWDSSSDHVV | 10 |
| 27 | PRT | ヒト | BCMB69— VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGGQGTLVTVSSA | 20 30 |

【0317】

【表14-6】
(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|----|---|---|
| 28 | PRT | ヒト | BCMB69、 BCMB118、 BCMB119、 BCMB120、 BCMB122、 BCMB123、 BCMB124、 BCMB125、 BCMB126、 BCMB127、 BCMB128、 BCMB129、 BCMB130、 BCMB131、 BCMB177、 BCMB178、 BCMB179、 BCMB180、 BCMB181、 BCMB182、 BCMB183、 BCMB184、 BCMB185、 BCMB186、 BCMB187、 及び BCMB188— VL | SYVLTQPPSVSVA PGQTARITCGGNNIGSKSVH WYQQPPGQAPVVVVYDDSDRPSGIPERFSGSN GNTATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGT KLTVL |
| 29 | PRT | ヒト | BCMB118— VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYY WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFS LKLS VTAADTA VYY CAR HDA ATA GLFDYWGQQGTLVTVSSA |
| 30 | PRT | ヒト | BCMB121— VL | SYVLTQPPSVSVA PGQTARITCGGNNIGSKSVH WYQQKPGQAPV LVVYDDSDRPSGIPERFSGSN GNTATLTISRVEAGDEADYYCQVWDSSSDHVVFGGGT KLTVL |
| 31 | PRT | ヒト | BCMB119— VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYY WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFS LKLS VTAADTA VYY CAR HEG ATA GLFDYWGQQGTLVTVSSA |
| 32 | PRT | ヒト | BCMB120— VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYY WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFS LKLS VTAADTA VYY CAR HSG ATA GLFDYWGQQGTLVTVSSA |
| 33 | PRT | ヒト | BCMB121 及び BCMB122— VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYY WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFS LKLS VTAADTA VYY CAR HDG AVA GLFDYWGQQGTLVTVSSA |
| 34 | PRT | ヒト | BCMB123— VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFS LKLS VTAADTA VYY CAR HDG AVA GLFDYWGQQGTLVTVSSA |
| 35 | PRT | ヒト | BCMB124— VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYY WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKS RVTISVDT SKNQFS LKLS VTAADTA VYY CAR HDG AVA GLFDYWGQQGTLVTVSSA |

【0318】

【表14-7】

(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|----|------------|---|
| 36 | PRT | ヒト | BCMB125-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHEGAVA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 37 | PRT | ヒト | BCMB126-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHSGAVA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 38 | PRT | ヒト | BCMB127-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDAAVA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 39 | PRT | ヒト | BCMB128-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 40 | PRT | ヒト | BCMB129-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTI ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 41 | PRT | ヒト | BCMB130-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTI ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDAAVA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 42 | PRT | ヒト | BCMB131-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRTI ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHEGAVA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 43 | PRT | ヒト | BCMB177-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPSLKSRTI ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 44 | PRT | ヒト | BCMB178-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGWTYYNPSLKSRTI ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 45 | PRT | ヒト | BCMB179-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHQGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 46 | PRT | ヒト | BCMB180-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHHGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 47 | PRT | ヒト | BCMB181-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHWGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 48 | PRT | ヒト | BCMB182-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHYGATAG LFDYWGQQGTLTVSSA |

【0319】

10

20

30

40

【表14-8】

(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|----|------------|--|
| 49 | PRT | ヒト | BCMB183-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHQGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 50 | PRT | ヒト | BCMB184-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHHGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 51 | PRT | ヒト | BCMB185-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHYGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 52 | PRT | ヒト | BCMB186-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGWTYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHQGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 53 | PRT | ヒト | BCMB187-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGWTYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHHGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 54 | PRT | ヒト | BCMB188-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGWTYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHYGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 55 | PRT | ヒト | CD3B219-重鎖 | EVQLVESGGGLVQPQGSLRLSCAASGFTFNTYAM NWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAASVKG RFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGN FGNSYVSWFAYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYLFPPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKY TCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQED PEVQFNWYWDGVENVNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFY PSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFLLLYS KLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSL SLSL GK |
| 56 | PRT | ヒト | CD3B219-軽鎖 | QTVVTQEPLTVSPGGTVTLCRSSTGAVENTTNSYA NWVQQKPGQAPRGLIGGTTNKRAPGTPARFSGSLL GGKAALTLSGVQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGG TKLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCL ISDFYPGAVENTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSN NKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVE KTVAPTECS |
| 57 | PRT | ヒト | BCMB117-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 58 | PRT | ヒト | BCMB176-VH | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQQGTLTVSSA |
| 59 | PRT | ヒト | CD3B219-VH | TYAMN |

【表14-9】
(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|----|--|---|
| 60 | PRT | ヒト | CD3B219-VH | RIRSKNNYATYYAASVKG |
| 61 | PRT | ヒト | CD3B219-VH | HGNFGNSYVSWFAY |
| 62 | PRT | ヒト | CD3B219-VL | RSSTGAVTTSNYAN |
| 63 | PRT | ヒト | CD3B219-VL | GTNKRAP |
| 64 | PRT | ヒト | CD3B219-VL | ALWYSNLWV |
| 65 | PRT | ヒト | BCMB69-重鎖 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLGK |
| 66 | PRT | ヒト | BCMB123、 BCMB128、 BCMB129、 BCMB177、 BCMB178、 BCMB179、 BCMB180、 BCMB181、 BCMB182、 BCMB183、 BCMB184、 BCMB185、 BCMB186、 BCMB187、 及び BCMB188- 軽鎖 | SYVLTQPPSVVAPGQTARITCGNNIGSKSVHWY QQPPGQAPVVVYDDSDRPSGIPERFSGNSNGNT ATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSDHVVFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNN KYAASSYSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS |
| 67 | PRT | ヒト | BCMB117- 重鎖 | QLQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSISSGSYFWGWIRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTKTTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVD KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLGK |

【表14-10】

(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|----|------------|---|
| 68 | PRT | ヒト | BCMB123－重鎖 | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPDSIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLGK 10 |
| 69 | PRT | ヒト | BCMB128－重鎖 | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPDSIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLGK 20 |
| 70 | PRT | ヒト | BCMB129－重鎖 | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGSTYYNPSLKSRT ISVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPDSIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLGK 30 |
| 71 | PRT | ヒト | BCMB176－重鎖 | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTI SVDTSKNQFSKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTKYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPDSIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSSLGK 40 |

【0322】

【表14-11】

(上記表の続き)

| 配列番号 | タイプ | 種 | 説明 | 配列 |
|------|-----|----|---|---|
| 72 | PRT | ヒト | BCMB177-重鎖 | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSSSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGRTYYNPSLKSRTV ISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGATA GLFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPCPAPEAAGGPSVF LFPPPKDLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSG K |
| 73 | PRT | 人工 | IgG4PAA | astkgpsvflapcsrstsestaalgcldyfpepvtswnsgal tsgvhtfpavlqssglylsissvvtpvssslgtktvtnvdhkpnsnt kvdkrveskygppcpcpaapeaaggpsvflfppkpkdltmisrt pevtcvvvdvsqedpevqfnwyvvdgvevhnaktkpreeqfnsty rvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkglpssiektiskakgqpre pqvytlppsqeemtnqvsiltclvkgfypsdiaewesngqpen nykttppvldsdgsfflysrtdksrwqegnvfscsVmhealhn hytqkslsislgk |
| 74 | PRT | ヒト | IgG1 | Astkgpsvflapsskstsggtaaigcldyfpepvtswnsga Itsgvhtfpavlqssglylsissvvtpvssslgtqtyicnvnhkpnsnt kvdkkvepkscdkthtcpcpcapellggpsvflfppkpkdltmis rtpevtcvvvdvshedpevkfnwyvvdgvevhnaktkpreeqyns tyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektskakgqpr epqvytlppsqeemtnqvsiltclvkgfypsdiaewesngqpe nnytppvldsdgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsVmhealhn hytqkslsislgk |
| 75 | PRT | ヒト | Fab | QLQLQESGPGLVKPSETSLTCTVSGGSISSGSYF WGWRQPPGKGLEWIGSIYYSGITYYNPSLKSRTVI SVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARHDGAVA GLFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFLAPSSKST SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKVEPKSCHHHHH |
| 76 | PRT | ヒト | BCMB69、 BCMB118、 BCMB119、 BCMB120、 BCMB122、 BCMB124、 BCMB125、 BCMB126、 BCMB127、 BCMB130、 BCMB131- 軽鎖 | SYVLTQPPSVSVAPGQTARITCGNNIGSKSVHWY QQPPGQAPVVVYDDSDRPMSGIPERFSGNSNGNT ATLTISRVEAGDEAVYYCQVWDSSSDHVVFGGGT KLTVLGQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLI SDFYPGAVTVAWKGDSSPVKAGVETTPSKQSNN KYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS |

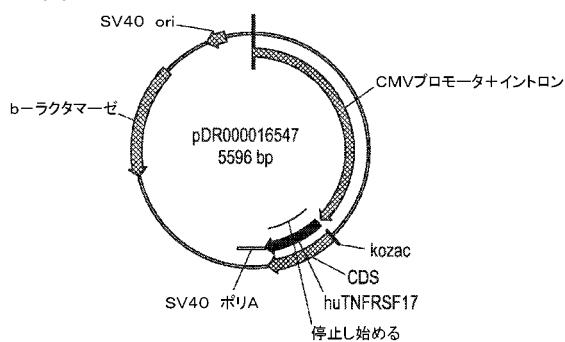
10

20

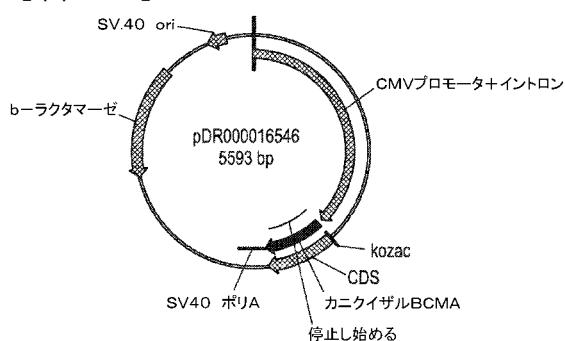
30

40

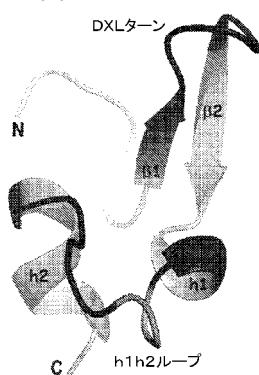
【図 1 A】



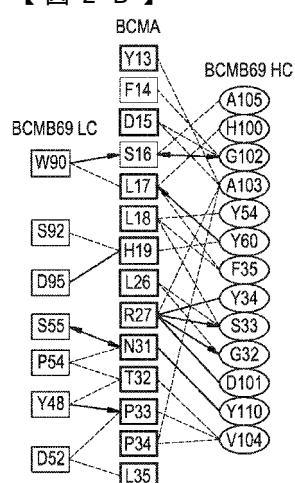
【図 1 B】



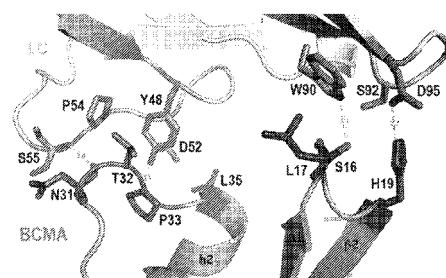
【図 2 A】



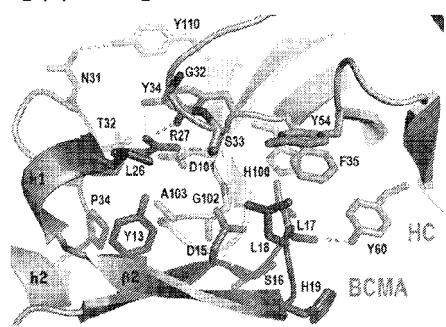
【図 2 B】



【図 2 C】



【図 2 D】

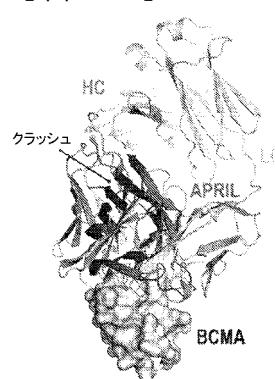


【図 3】

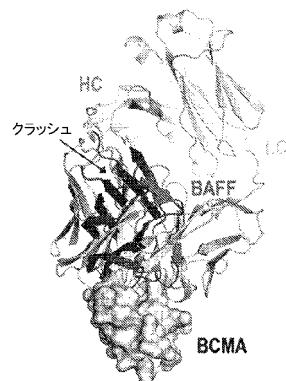
エピトープ
ヒト BCMA YLQWAGQGSQNSRPFPSLSSRACIIPQCFPSSSTPPIPCQYVNSYVNSVKGFLA (配列番号1の1~54)
カニクイザル BCMA YLQWAGQGSQNSRPFPSLSSRACIIPQCFPSSSTPPIPCQYVNSYVNSVKGFLA (配列番号3の1~53)
マウス BCMA ---KQKQHEHSPMSLILGCKHIDRISAN---PVAQPHUDPVVLSVSKKCTYT (配列番号2の1~49)

パトーブ
配列番号75
BCMB69_HC 1 QDQIQRGHDV VNPQVPTI LUTCIVSGG316 [RE] EGGTQI2PQKSLPWRIGL DPGGLI[RE]PSSLSLGRVFE SVWNSK 77
CDR-H1
BCMB69_HC 73 CDR-H2
BCMB69_HC 153 CDR-H3
BCMB69_HC 153 FPTSIKLSVNTADRAVYVCFPFGAVH1, FPDVQGQSTLNTVSSAAATGDSVPLNPASKSTPQGNAALGCLVNDY 231
CDR-L1
BCMB69_LC 1 SYVILQQPSVSVVALQQTAR FGCGHGEHSSWPAJQPHQJAHVWW [RE] [RE] [RE] [RE] [RE] [RE] [RE] [RE] 72
BCMB69_LC 73 CDR-L2
BCMB69_LC 143 CDR-L3
BCMB69_LC 143 T13KVKVQGKJAVLTVQ [RE] 144
BCMB69_LC 143 AVTVKAKGKQVPPVKAQVLFICPQKSONQVTAANSLLTQDQHAKKQKSYQAVIHEGQTVIKIVAPCDS 214

【図 4 A】



【図 4 B】

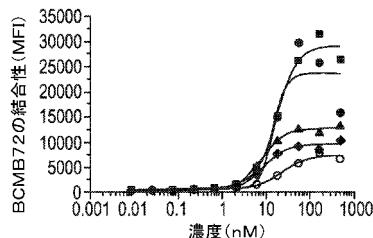


【図 5】

| mAb | Fc-BCMA | 最初の複合体 (K_D , nM) | 最終複合体 (K_D , nM) | 範囲 |
|--------|---------|-------------------------|------------------------|-------------|
| ヒト | | 1.59 | 0.18 | 0.15 – 0.20 |
| BCMB72 | カニクイザル | 17.8 | 6.50 | 5.36 – 7.27 |
| | マウス | 283 | 72.4 | 62.0 – 82.9 |

BCMB72の親和性:ヒト>カニクイザル>マウス

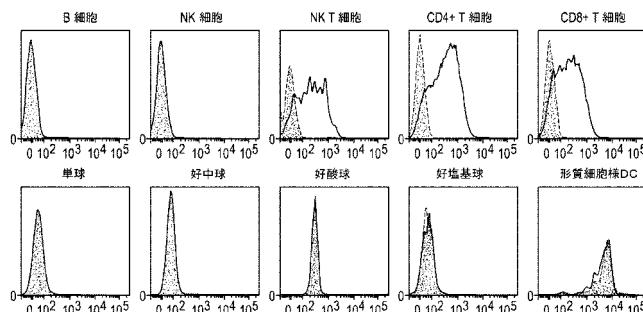
【図 6】



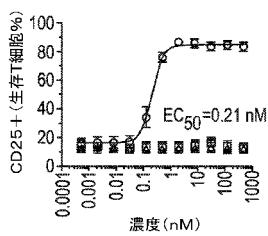
細胞: EC50 (nM):

- ◆ H929 14.7
- ◆ MM.1R 8.74
- ◆ EJM 17.5
- ◆ LP1 22.3
- ◆ U2932 7.92

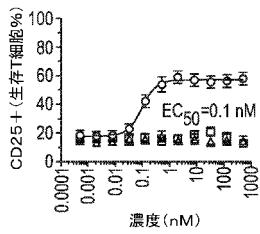
【図 7】



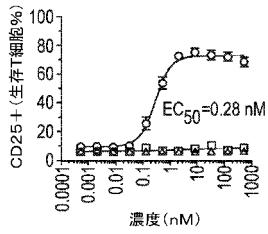
【図 8 A】



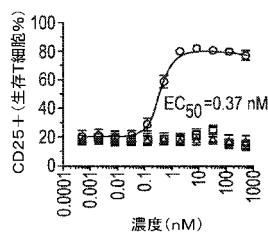
【図 8 B】



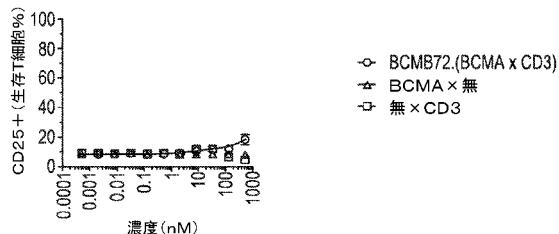
【図 8 C】



【図 8 D】



【図 8 E】



【図 9 A】

| 細胞株 ドナー | H929 (BCMA-00271) | | H929 (BCMA-00273) | |
|------------|-------------------|--------|-------------------|--------|
| | EC50 (nM) | 最大活性化% | EC50 (nM) | 最大活性化% |
| M5137 | 0.1683 | 89.74 | ~ 0.5477 | 68.70 |
| M7197 | 0.3000 | 80.73 | 1.0860 | 81.11 |
| M6576 | 0.3178 | 85.08 | 0.5134 | 82.66 |
| M6457 | 0.2436 | 74.57 | 0.7859 | 81.07 |
| M2550 | 0.1572 | 92.34 | 0.4325 | 85.24 |
| M6521 | 0.1313 | 85.01 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 1.3240 | 72.96 |
| 平均 | 0.2116 | 84.64 | 0.7070 | 78.53 |

| 細胞株 ドナー | MM.1R (BCMA-00271) | | MM.1R (BCMA-00273) | |
|------------|--------------------|--------|--------------------|--------|
| | EC50 (nM) | 最大活性化% | EC50 (nM) | 最大活性化% |
| M5137 | 0.0988 | 64.71 | 0.1295 | 79.62 |
| M7197 | 0.1159 | 45.60 | 0.1323 | 70.25 |
| M6576 | 0.1179 | 50.93 | 0.1645 | 78.08 |
| M6457 | 0.0776 | 49.27 | 0.1042 | 80.51 |
| M2550 | 0.1206 | 60.05 | 0.3514 | 83.80 |
| M6521 | 0.0964 | 73.62 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 0.2470 | 66.68 |
| 平均 | 0.0992 | 57.12 | 0.1675 | 76.25 |

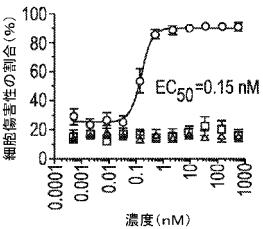
| 細胞株 ドナー | RPMI 8226 (BCMA-00271) | | RPMI 8226 (BCMA-00273) | |
|------------|------------------------|--------|------------------------|--------|
| | EC50 (nM) | 最大活性化% | EC50 (nM) | 最大活性化% |
| M5137 | 0.2448 | 71.81 | 0.4787 | 50.33 |
| M7197 | 0.2260 | 67.98 | 0.3357 | 64.15 |
| M6576 | 0.2482 | 77.69 | 0.3094 | 70.58 |
| M6457 | 0.3041 | 66.83 | 0.4631 | 57.15 |
| M2550 | 0.6072 | 84.07 | 0.5163 | 70.42 |
| M6521 | 0.1409 | 67.74 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 0.4055 | 54.73 |
| 平均 | 0.2777 | 72.76 | 0.4024 | 61.19 |

【図 9 B】

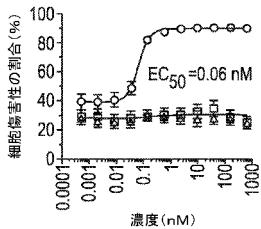
| 細胞株 ドナー | U266 (BCMA-00271) | | U266 (BCMA-00273) | |
|------------|-------------------|--------|-------------------|--------|
| | EC50 (nM) | 最大活性化% | EC50 (nM) | 最大活性化% |
| M5137 | 0.2068 | 85.39 | 0.4073 | 73.02 |
| M7197 | 0.3833 | 71.98 | 0.5545 | 65.98 |
| M6576 | 0.4521 | 80.52 | 0.6042 | 76.95 |
| M6457 | 0.3646 | 74.82 | 0.4772 | 61.85 |
| M2550 | 0.5256 | 85.30 | 0.6823 | 76.24 |
| M6521 | 0.4066 | 84.71 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 0.6620 | 68.31 |
| 平均 | 0.3743 | 80.41 | 0.5711 | 70.34 |

| 細胞株 ドナー | MV4-11 (BCMA-00271) | | MV4-11 (BCMA-00273) | |
|------------|---------------------|----------|---------------------|--------|
| | EC50 (nM) | 最大活性化% | EC50 (nM) | 最大活性化% |
| M5137 | ~ 2.940e+006 | ~ 1522 | ~ 1.357 | 4.702 |
| M7197 | 6.214 | 7.572 | 144 | 6.156 |
| M6576 | ~ 1.855e+010 | ~ 104868 | 31.41 | 10.7 |
| M6457 | ~ 2.294e+007 | ~ 4196 | フィットなし | フィットなし |
| M2550 | ~ 4.075e+008 | ~ 68789 | 16.85 | 5.626 |
| M6521 | ~ 59722 | ~ 110.5 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 279 | 8.427 |
| 平均 | 1.531E+12 | 229246 | 30.58 | 6.958 |

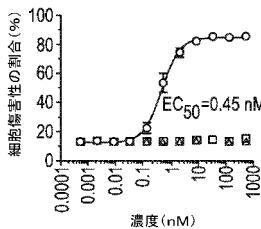
【図 10 A】



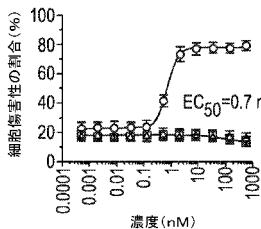
【図 10 B】



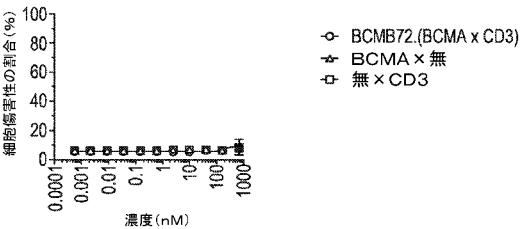
【図 10 C】



【図 10 D】



【図 10 E】



【図 1 1 A】

| 細胞株 | H929 (BCMA-00271) | | H929 (BCMA-00273) | |
|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
| | EC50 (nM) | 最大溶解% | EC50 (nM) | 最大溶解% |
| M5137 | 0.2376 | 90.48 | 1.1630 | 75.61 |
| M7197 | 0.1631 | 92.02 | 1.3480 | 82.56 |
| M6576 | ~ 0.1405 | 91.75 | 0.4301 | 87.14 |
| M6457 | 0.2294 | 79.98 | 0.8720 | 82.29 |
| M2550 | ~ 0.1130 | 92.48 | 0.3575 | 89.63 |
| M6521 | 0.0973 | 92.27 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 1.7690 | 80.05 |
| 平均 | 0.1495 | 89.72 | 0.8133 | 83.13 |

| 細胞株 | MM.1R (BCMA-00271) | | MM.1R (BCMA-00273) | |
|-------|--------------------|-------|--------------------|-------|
| | EC50 (nM) | 最大溶解% | EC50 (nM) | 最大溶解% |
| M5137 | 0.0654 | 92.97 | 0.0569 | 97.23 |
| M7197 | 0.0824 | 92.60 | 0.0945 | 96.75 |
| M6576 | 0.0480 | 90.47 | 0.0617 | 95.29 |
| M6457 | 0.0548 | 81.00 | 0.0432 | 87.92 |
| M2550 | 0.0595 | 92.95 | 0.1212 | 96.97 |
| M6521 | 0.0511 | 87.76 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 0.1008 | 94.98 |
| 平均 | 0.0617 | 89.62 | 0.0766 | 94.87 |

| 細胞株 | RPMI 8226 (BCMA-00271) | | RPMI 8226 (BCMA-00273) | |
|-------|------------------------|-------|------------------------|-------|
| | EC50 (nM) | 最大溶解% | EC50 (nM) | 最大溶解% |
| M5137 | 0.5044 | 82.02 | 1.0670 | 81.12 |
| M7197 | 0.7262 | 82.47 | 0.8636 | 78.55 |
| M6576 | 0.3366 | 86.65 | 0.4842 | 79.81 |
| M6457 | 0.6967 | 76.10 | 1.0700 | 69.25 |
| M2550 | 0.5379 | 89.73 | 0.6956 | 84.73 |
| M6521 | 0.1625 | 81.03 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 1.2050 | 73.50 |
| 平均 | 0.4531 | 83.55 | 0.8543 | 77.99 |

【図 1 1 B】

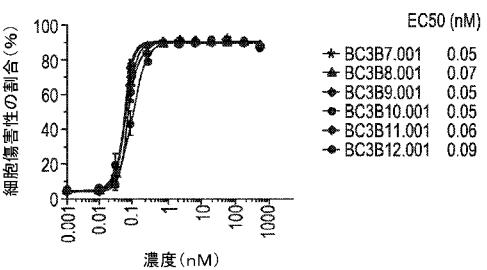
| 細胞株 | U266 (BCMA-00271) | | U266 (BCMA-00273) | |
|-------|-------------------|-------|-------------------|-------|
| | EC50 (nM) | 最大溶解% | EC50 (nM) | 最大溶解% |
| M5137 | 0.7810 | 72.59 | 1.0180 | 76.19 |
| M7197 | 0.7355 | 76.36 | 1.1610 | 77.29 |
| M6576 | 0.7298 | 83.86 | 0.9710 | 82.34 |
| M6457 | 0.7734 | 62.05 | 1.4320 | 56.77 |
| M2550 | 0.6516 | 83.21 | 0.9347 | 85.93 |
| M6521 | 0.5621 | 83.09 | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | 1.1580 | 74.21 |
| 平均 | 0.7046 | 76.82 | 1.0800 | 75.31 |

| 細胞株 | MV4-11 (BCMA-00271) | | MV4-11 (BCMA-00273) | |
|-------|---------------------|---------|---------------------|--------|
| | EC50 (nM) | 最大溶解% | EC50 (nM) | 最大溶解% |
| M5137 | 2.038 | 8.425 | ~ 0.06555 | 18.31 |
| M7197 | ~ 157.1 | 4.79 | フィットなし | フィットなし |
| M6576 | ~ 391461 | ~ 23049 | 13.61 | 9.835 |
| M6457 | フィットなし | フィットなし | 0 | ~ 9780 |
| M2550 | ~ 147.7 | 8.21 | ~ 14.70 | 8.366 |
| M6521 | フィットなし | フィットなし | データなし | データなし |
| M7077 | データなし | データなし | ~ 1.247e+022 | 18.68 |
| 平均 | ~ 157.2 | 7.658 | フィットなし | フィットなし |

【図 1 2 A】

【図 1 2 A】

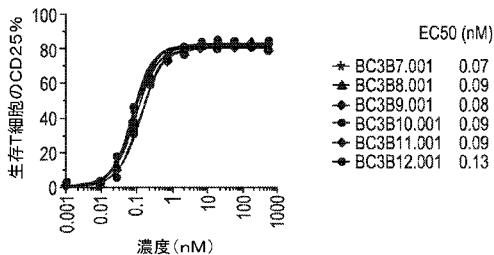
T細胞媒介性細胞傷害アッセイ
H929細胞(48時間); ドナーID: M5763 & 6576



【図 1 2 B】

T細胞活性化アッセイ

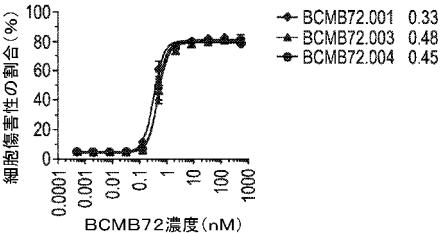
H929細胞(48時間); ドナーID: M5763 & 6576



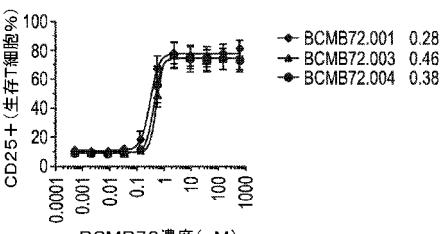
【図 1 3】

| BCMA × CD3 EC ₅₀ 分析 (nM) | | | | | | |
|-------------------------------------|-------|----------|---------|----------|----------|----------|
| | M2550 | M5137 | M6457 | M6541 | M6576 | M7197 |
| IFNg | 2.049 | ~ 2.079 | ~ 2.112 | ~ 0.9252 | 1.366 | 1.126 |
| TNF α | 2.909 | 2.377 | 3.717 | 2.863 | 1.991 | 95.15 |
| IL-2 | 3.262 | 1.645 | 2.508 | 1.297 | 1.501 | 1.767 |
| IL-6 | 2.385 | ~ 2.054 | 1.65 | ~ 0.5650 | 0.7961 | ~ 0.5003 |
| IL-8 | 1.031 | 0.3267 | 0.7208 | ~ 0.1117 | 0.328 | ~ 0.4640 |
| IL-10 | 1.158 | ~ 0.7865 | 0.7296 | ~ 0.5154 | ~ 0.5217 | 0.9593 |

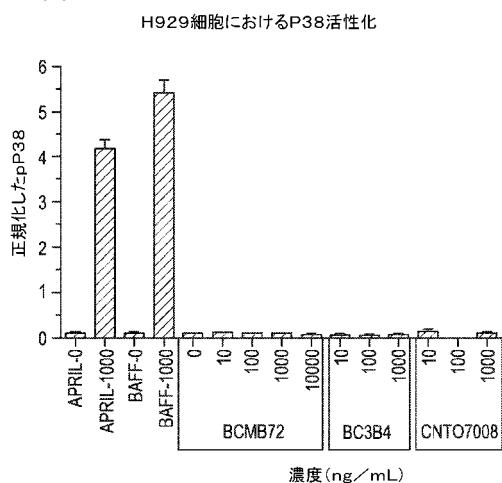
【図 1 4 A】



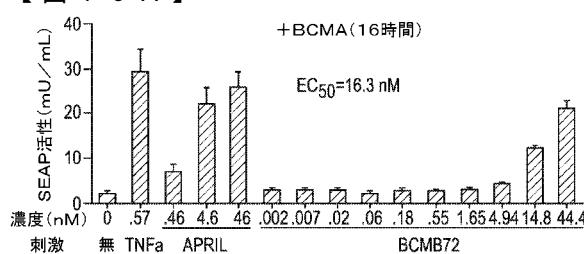
【図 1 4 B】



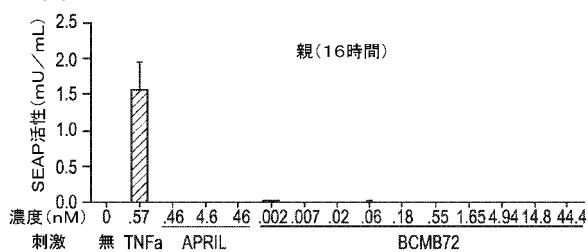
【図 1 5】



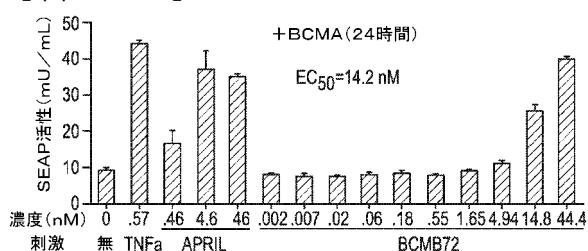
【図 1 6 A】



【図 1 6 B】



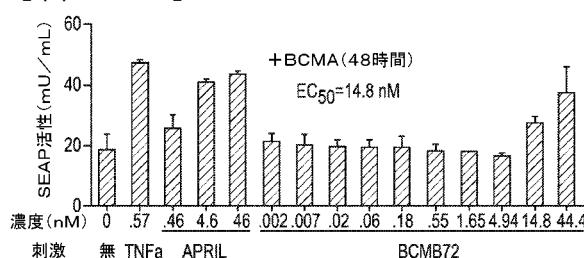
【図 1 6 C】



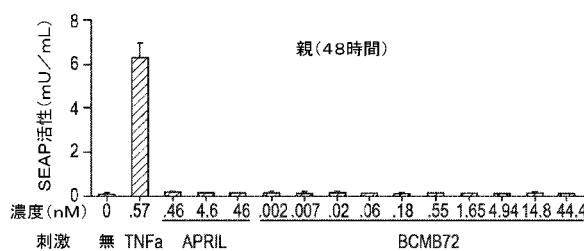
【図 1 6 D】



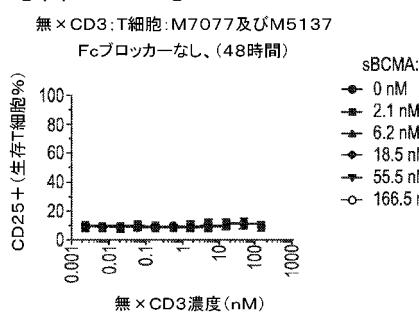
【図 1 6 E】



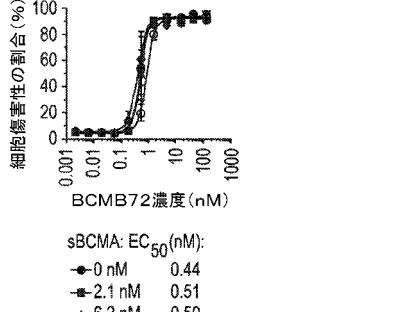
【図 1 6 F】



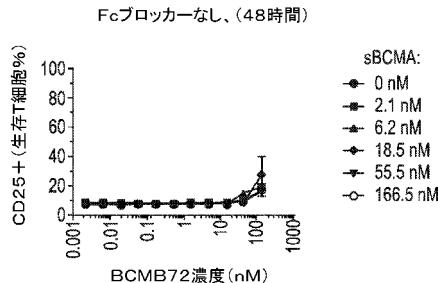
【図 1 7 B】



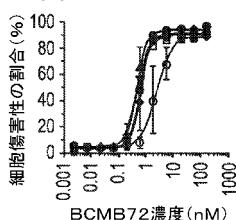
【図 1 8 A】

sBCMA: EC₅₀(nM):

| | |
|----------|------|
| 0 nM | 0.44 |
| 2.1 nM | 0.51 |
| 6.2 nM | 0.50 |
| 18.5 nM | 0.50 |
| 55.5 nM | 0.55 |
| 166.5 nM | 0.89 |

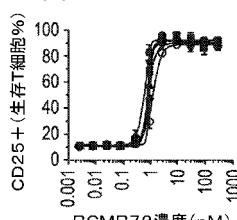


【図 18 B】



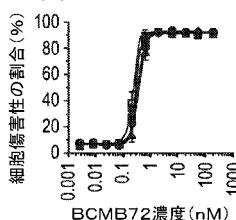
APRIL: EC₅₀ (nM):
 ● 0 nM 0.42
 ■ 0.2 nM 0.56
 ▲ 0.6 nM 0.54
 ◆ 1.7 nM 0.52
 ▽ 5.1 nM 0.54
 □ 15.4 nM 0.63
 ○ 46.1 nM 2.30

【図 18 D】



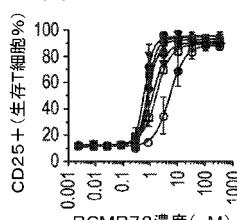
sBCMA: EC₅₀ (nM):
 ● 0 nM 0.42
 ■ 2.1 nM 0.52
 ▲ 6.2 nM 0.54
 ◆ 18.5 nM 0.51
 ▽ 55.5 nM 0.58
 ○ 166.5 nM 0.80

【図 18 C】



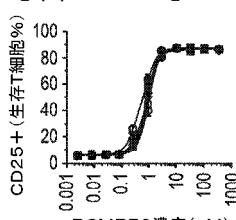
BAFF: EC₅₀ (nM):
 ● 0 nM 0.23
 ■ 0.2 nM 0.29
 ▲ 0.6 nM 0.25
 ◆ 1.9 nM 0.30
 ▽ 5.7 nM 0.30
 □ 17 nM 0.35
 ○ 51 nM 0.23

【図 18 E】



APRIL: EC₅₀ (nM):
 ● 0 nM 0.40
 ■ 0.2 nM 0.51
 ▲ 0.6 nM 0.49
 ◆ 1.7 nM 0.59
 ▽ 5.1 nM 0.70
 □ 15.4 nM 0.96
 ○ 46.1 nM 2.73

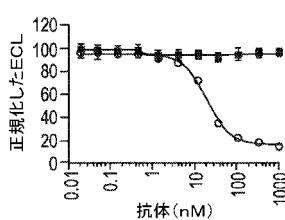
【図 18 F】



BAFF: EC₅₀ (nM):
 ● 0 nM 0.37
 ■ 0.2 nM 0.50
 ▲ 0.6 nM 0.44
 ◆ 1.9 nM 0.48
 ▽ 5.7 nM 0.53
 □ 17 nM 0.62
 ○ 51 nM 0.33

【図 19 A】

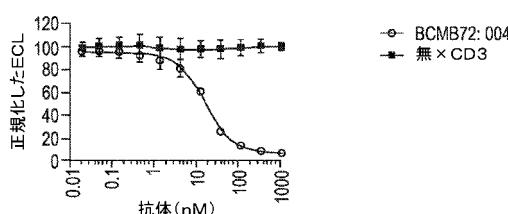
APRIL捕捉プレートへのBCMAの結合性 (n=2)



○ BCMB72
 ■ 無 × CD3

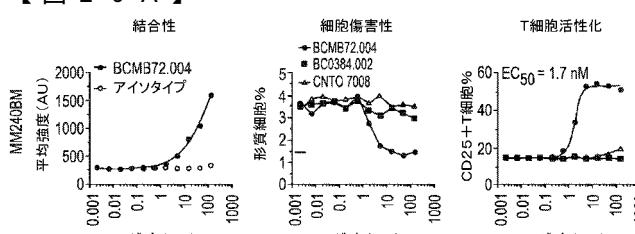
【図 19 B】

BAFF捕捉プレートへのBCMAの結合性 (n=2)

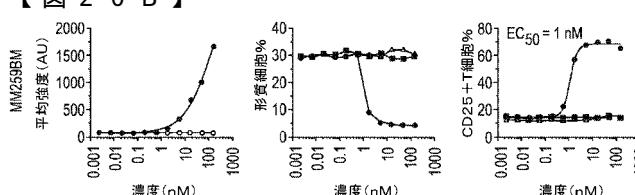


○ BCMB72: 004
 ■ 無 × CD3

【図 20 A】



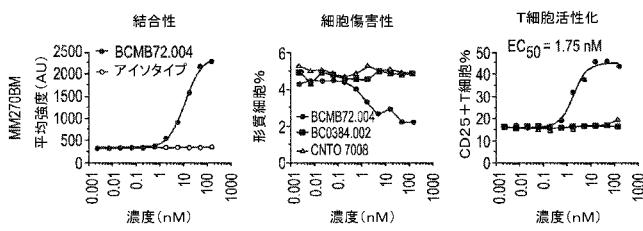
【図 20 B】



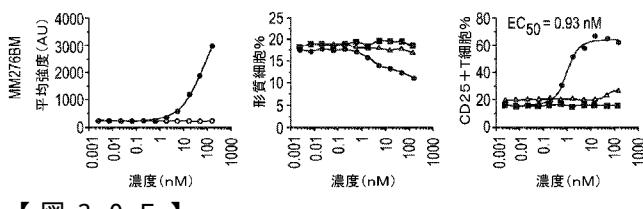
○ BCMB72: 004
 ■ BC0384: 002
 ▲ CNTC 7008

○ BCMB72: 004
 ■ BC0384: 002
 ▲ CNTC 7008

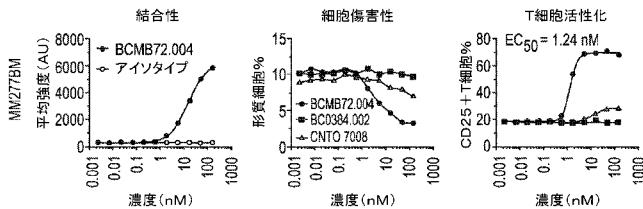
【図 2 0 C】



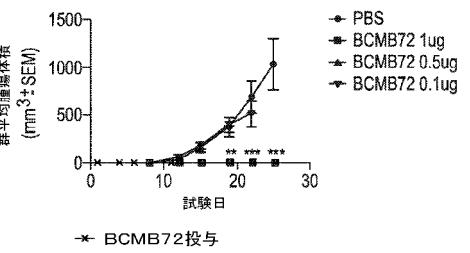
【図 2 0 D】



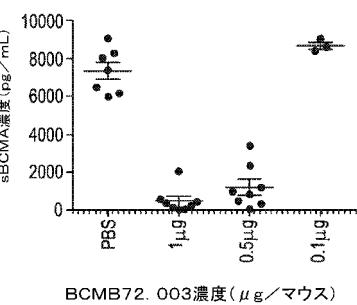
【図 2 0 E】



【図 2 1】



【図 2 2】



【配列表】

2018525005000001.app

【国際調査報告】

| INTERNATIONAL SEARCH REPORT | | International application No PCT/US2016/047146 | | | | | | |
|--|---|---|-----------|--|-----------------------|---|---|-------|
| A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER INV. C07K16/28 ADD. | | | | | | | | |
| According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC | | | | | | | | |
| B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K A61K | | | | | | | | |
| Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched | | | | | | | | |
| Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) EPO-Internal, Sequence Search, BIOSIS, EMBASE | | | | | | | | |
| C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Category*</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th style="text-align: left; padding: 2px;">Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td style="padding: 2px;">X</td> <td style="padding: 2px;"> DATABASE Geneseq [Online] 17 January 2013 (2013-01-17), "Anti-CD3 epsilon humanized antibody VL region coding gene, SEQ ID 55.", XP002762973, retrieved from EBI accession no. GSN:BAG88459 Database accession no. BAG88459 the whole document ----- -/-/ </td> <td style="padding: 2px;">43,44</td> </tr> </tbody> </table> | | | Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | X | DATABASE Geneseq [Online] 17 January 2013 (2013-01-17), "Anti-CD3 epsilon humanized antibody VL region coding gene, SEQ ID 55.", XP002762973, retrieved from EBI accession no. GSN:BAG88459 Database accession no. BAG88459 the whole document ----- -/-/ | 43,44 |
| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. | | | | | | |
| X | DATABASE Geneseq [Online] 17 January 2013 (2013-01-17), "Anti-CD3 epsilon humanized antibody VL region coding gene, SEQ ID 55.", XP002762973, retrieved from EBI accession no. GSN:BAG88459 Database accession no. BAG88459 the whole document ----- -/-/ | 43,44 | | | | | | |
| <input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex. | | | | | | | | |
| * Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed | | | | | | | | |
| "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family | | | | | | | | |
| Date of the actual completion of the international search 14 October 2016 | Date of mailing of the international search report 26/10/2016 | | | | | | | |
| Name and mailing address of the ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel: (+31-70) 340-2040, Fax: (+31-70) 340-3016 | Authorized officer Lonnoy, Olivier | | | | | | | |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/US2016/047146

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|-----------|---|-----------------------|
| X | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>11 April 2013 (2013-04-11), "Anti-HA mAb (CL860UCA) light chain variable region coding gene, SEQ 5.", XP002762974, retrieved from EBI accession no. GSN:BAK30778 Database accession no. BAK30778 the whole document</p> <p>-----</p> | 43,44 |
| X | <p>DATABASE Geneseq [Online]</p> <p>4 December 2014 (2014-12-04), "Anti-CD3 variant humanized antibody VH (XENP11810 H1.15_L1.4), SEQ 57.", XP002762975, retrieved from EBI accession no. GSP:BBP23340 Database accession no. BBP23340 the whole document</p> <p>-----</p> | 43,44 |
| X | <p>WO 2013/072415 A1 (AMGEN RES MUNICH GMBH [DE]; BOEHRINGER INGELHEIM INT [DE]) 23 May 2013 (2013-05-23) claim 1</p> <p>-----</p> | 1,3,5-18 |
| A | | 2,4, 19-42 |
| 1 | | |

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) [April 2005]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

| |
|------------------------------|
| International application No |
| PCT/US2016/047146 |

| Patent document cited in search report | Publication date | Patent family member(s) | Publication date |
|--|------------------|-------------------------|------------------|
| WO 2013072415 | A1 23-05-2013 | AR 088883 A1 | 16-07-2014 |
| | | AU 2012327203 A1 | 30-05-2013 |
| | | CA 2849196 A1 | 23-05-2013 |
| | | CA 2850591 A1 | 23-05-2013 |
| | | CL 2014001254 A1 | 10-10-2014 |
| | | CN 104114578 A | 22-10-2014 |
| | | CN 104169300 A | 26-11-2014 |
| | | EA 201490931 A1 | 29-08-2014 |
| | | EA 201490932 A1 | 30-09-2014 |
| | | EP 2780374 A1 | 24-09-2014 |
| | | EP 2780375 A1 | 24-09-2014 |
| | | JP 2014534242 A | 18-12-2014 |
| | | JP 2015504306 A | 12-02-2015 |
| | | KR 20140105757 A | 02-09-2014 |
| | | KR 20140105758 A | 02-09-2014 |
| | | MA 35449 B1 | 01-09-2014 |
| | | MA 35450 B1 | 01-09-2014 |
| | | NZ 622087 A | 24-06-2016 |
| | | PE 15642014 A1 | 29-11-2014 |
| | | PH 12014501091 A1 | 28-07-2014 |
| | | SG 11201400671Y A | 28-04-2014 |
| | | SG 11201401729P A | 26-09-2014 |
| | | TW 201326214 A | 01-07-2013 |
| | | US 2013156769 A1 | 20-06-2013 |
| | | US 2013156770 A1 | 20-06-2013 |
| | | US 2014348837 A1 | 27-11-2014 |
| | | US 2015023967 A1 | 22-01-2015 |
| | | UY 34453 A | 28-06-2013 |
| | | UY 34454 A | 28-06-2013 |
| | | WO 2013072406 A1 | 23-05-2013 |
| | | WO 2013072415 A1 | 23-05-2013 |

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US2016/047146

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - on paper or in the form of an image file.
 - b. furnished together with the international application under PCT Rule 13ter.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
 - c. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
 - in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13ter.1(a)).
 - on paper or in the form of an image file (Rule 13ter.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).
2. In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
3. Additional comments:

フロントページの続き

| (51)Int.Cl. | F I | テーマコード(参考) |
|---------------------------|-----------------|------------|
| C 1 2 N 15/07 (2006.01) | C 1 2 N 15/07 | 100 |
| C 1 2 N 5/10 (2006.01) | C 1 2 N 5/10 | |
| C 1 2 N 5/20 (2006.01) | C 1 2 N 5/20 | |
| C 1 2 N 5/24 (2006.01) | C 1 2 N 5/24 | |
| C 1 2 N 1/19 (2006.01) | C 1 2 N 1/19 | |
| C 1 2 N 1/15 (2006.01) | C 1 2 N 1/15 | |
| C 1 2 N 1/21 (2006.01) | C 1 2 N 1/21 | |
| A 6 1 P 35/00 (2006.01) | A 6 1 P 35/00 | |
| A 6 1 P 35/02 (2006.01) | A 6 1 P 35/02 | |
| A 6 1 K 39/395 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | D |
| A 6 1 K 45/00 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | E |
| A 6 1 K 38/20 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | N |
| A 6 1 K 31/7068 (2006.01) | A 6 1 K 39/395 | T |
| A 6 1 K 31/704 (2006.01) | A 6 1 K 45/00 | |
| A 6 1 K 31/417 (2006.01) | A 6 1 K 38/20 | |
| | A 6 1 K 31/7068 | |
| | A 6 1 K 31/704 | |
| | A 6 1 K 31/417 | |

(81)指定国 AP(BW,GH,GM,KE,LR,LS,MW,MZ,NA,RW,SD,SL,ST,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,RU,TJ,TM),EP(AL,AT,BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HR,HU,I,E,IS,IT,LT,LU,LV,MC,MK,MT,NL,NO,PL,PT,R0,RS,SE,SI,SK,SM,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA,GN,GQ,GW,KM,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AO,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BH,BN,BR,BW,BY,BZ,CA,CH,CL,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,D0,DZ,EC,EE,EG,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,GT,HN,HR,HU,ID,IL,IN,IR,IS,JP,KE,KG,KN,KP,KR,KZ,LA,LC,LK,LR,LS,LU,LY,MA,MD,ME,MG,MK,MN,MW,MX,MY,MZ,NA,NG,NI,NO,NZ,OM,PA,PE,PG,PH,PL,PT,QA,RO,RS,RU,RW,SA,SC,SD,SE,SG,SK,SL,SM,ST,SV,SY,TH,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,US

(74)代理人 100104282

弁理士 鈴木 康仁

(72)発明者 ピラリセッティ, コダンダラム

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
400

(72)発明者 ボールドウィン, エリック トーマス

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
400

(72)発明者 パワーズ, ゴードン ディー.

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
400

(72)発明者 カルドソ, ローザ マリア フエルナンデス

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
400

(72)発明者 アッター, リカルド

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
400

(72)発明者 ゴーデット, フランソワ

アメリカ合衆国 ペンシルベニア州 19477, スプリング ハウス, マッキーン ロード 1
400

F ターム(参考) 4B065 AA01X AA57X AA87X AB01 AB04 AC14 BA02 CA25 CA44
4C084 AA02 AA19 BA44 DA14 NA05 NA14 ZB261 ZB271
4C085 AA13 AA14 AA16 BB11 BB36 BB41 BB43 CC22 CC23 DD62
EE01
4C086 AA02 BC38 EA10 EA17 MA02 MA04 NA05 NA14 ZB26 ZB27
ZC75
4H045 AA11 AA30 BA41 DA76 EA20 FA74