

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2017年2月16日(16.02.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/026331 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) C07K 19/00 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01) C12N 1/15 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) C12N 1/19 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/072688
- (22) 国際出願日: 2016年8月2日(02.08.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-159240 2015年8月11日(11.08.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 保仙 直毅(HOSEN, Naoki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 杉山 治夫(SUGIYAMA, Haruo); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 熊ノ郷 淳(KUMANOGOH, Atsushi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). ▲高▼木 淳一(TAKAGI, Junichi); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人三枝国際特許事務所(SAE-GUSA & PARTNERS); 〒5410045 大阪府大阪市中央区道修町1-7-1 北浜TNKビル Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): 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, DO, 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, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))
— 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: ANTIBODY

(54) 発明の名称: 抗体

(57) Abstract: Provided is an active ingredient of a pharmaceutical composition for myeloma therapy. This antibody has an epitope in a region comprising the 20th to 109th amino acid residues of human integrin β_7 .

(57) 要約: 骨髄腫治療用の医薬組成物の有効成分の提供。 ヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する抗体。

WO 2017/026331 A1

明 細 書

発明の名称：抗体

技術分野

[0001] 新たな抗体およびその利用などが開示される。

背景技術

[0002] 形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患の代表例である多発性骨髄腫は、全ての癌の中のおよそ1%を占め、全ての血液学的悪性腫瘍の10%強を占める。多発性骨髄腫とは、骨髄に存在する形質細胞が癌化し（結果として異常な形質細胞となる）、単クローン性に増殖する疾患である。

[0003] 多発性骨髄腫では、異常な形質細胞（骨髄腫細胞）が体中の骨髄に広がり、全身の骨髄の至るところで増殖する。異常な形質細胞が増殖すると、骨の破壊を含む様々な症状が現れる。骨髄腫細胞からは、異常免疫グロブリンであるMタンパク質が産出され、血中のMタンパク質濃度が上昇することにより、血液が粘稠になる。

[0004] Mタンパク質は、体内に侵入した病原体などの異物を認識するという本来の抗体としては機能しないため、免疫力の低下も引き起こす。これらが多くの臓器に影響を与え、様々な徴候が生じる。代表的な徴候は、骨の痛みと損傷、高カルシウム症、腎障害や腎不全、貧血などである。

[0005] 現在、多発性骨髄腫の治療として、プロテアソーム阻害剤、サリドマイドとその誘導体であるレナリドマイドなどのiMIDs、およびメルファランとプレドニゾンとの併用などの化学療法、並びに造血幹細胞移植が主に行われている。

[0006] しかし、骨髄腫細胞は、ほとんどの場合、やがてこれらの治療薬に対して抵抗性を獲得する。このため、現在の治療手段では、発症後の平均生存期間は3～5年程度であり、骨髄腫患者の予後は厳しいのが現実である。また、これらの治療薬は、標的とする腫瘍細胞にだけ特異的に作用するものではないため、正常な細胞に対しても毒性を示し、結果として重篤な副作用を伴う

という問題がある。

[0007] モノクローナル抗体を利用した多発性骨髄腫の治療法の開発が試みられている。例えば、抗CS1抗体、および抗CD38抗体などが有望視されている（非特許文献1および2）。そして、特許文献1には抗ヒトCD48モノクローナル抗体を有効成分とする多発性骨髄腫などを対象とする治療薬が開示されている。

[0008] インテグリンは、生体内においては主として α 鎖と β 鎖とのヘテロダイマーを形成し、細胞表層上にてレセプターとしての機能を果たす。このようなインテグリンの α 鎖と β 鎖の組み合わせは多岐に渡る。

[0009] また、非特許文献4～6には、特定の抗原に対して親和性を有する抗原認識部位を含むキメラ抗原受容体T細胞（CAR-T細胞）が開示されている。

先行技術文献

特許文献

[0010] 特許文献1：国際公開公報2010/117059

非特許文献

[0011] 非特許文献1：Journal of Clinical Oncology, 2012 Jun 1; 30(16): 1953-9

非特許文献2：Journal of immunology, 2011 Feb 1; 186(3): 1840-8.

非特許文献3：J Biol Chem. 2012 May 4;287(19):15749-59.

非特許文献4：J Immunol. 2009 Nov 1;183(9):5563-74.

非特許文献5：N Engl J Med. 2014 Oct 16;371(16):1507-17.

非特許文献6：Nat Biotechnol. 2002 Jan;20(1):70-5.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0012] 抗CS1抗体は骨髄腫細胞への特異性は比較的高いが、抗体単独での抗骨髄腫効果は高いとはいえず、単剤での有効性は臨床試験では示されていない。レナリドマイドとの併用により抗CS1抗体の抗腫瘍効果が上昇するということが

見出され、この併用による承認を目指していると思われる。一方、CD38は、CD34陽性造血前駆細胞を含む多くの正常な血液細胞にも発現しているため、多発性骨髄腫の治療ターゲットとして特異性の低い抗原である。このような現状のもと、多発性骨髄腫等の形質細胞の腫瘍性増殖を伴う疾患等の治療により有効な手段を提供することが1つの課題である。

課題を解決するための手段

[0013] 本発明者らは、このような課題を解決すべく鋭意研究を行った結果、骨髄腫細胞およびその前駆体に特異的に結合することを指標にスクリーニングを行ってMMG49抗体を得た。そして、斯かる抗体がヒトインテグリン β_7 の特定の領域に結合することを確認し、斯かる抗体の抗原認識部位を用いて作製したCAR-T細胞が、骨髄腫の治療に非常に有用であることを見出した。また、MMG49抗体のエピトープが、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に存在することも明らかにした。

[0014] 本発明はこのような知見に基づいて完成されたものであり、以下に示す広い態様の発明を包含する。

[0015] (I) 抗体

抗体(I)は、以下の(I-1)～(I-25)に示す抗体を包含する。

[0016] (I-1)

抗ヒトインテグリン β_7 抗体であって、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する抗体。

(1-1A)

ヒトインテグリン β_7 の33～109番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する、(I-1)に記載の抗体。

(1-1B)

ヒトインテグリン β_7 の20～90番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する、(I-1)に記載の抗体。

(1-1C)

ヒトインテグリン β_7 の33～90番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープ

ブを有する、(I-1)に記載の抗体。

(I-2)

ヒトインテグリン β_7 の379～721番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部の存在下で、前記エピトープへの親和性が上昇する、(I-1)に記載の抗体。

(I-3)

ヒトインテグリン β_7 の417～721番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部の存在下で、前記エピトープへの親和性が上昇する、(I-2)に記載の抗体。

(I-4)

ヒトインテグリン β_7 の564～721番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部の存在下で、前記エピトープへの親和性が上昇する、(I-2)に記載の抗体。

(I-5)

ヒトインテグリン β_7 の379～563番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部の存在下で、前記エピトープへの親和性が上昇する、(I-2)に記載の抗体。

(I-6)

ヒトインテグリン β_7 の417～563番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部の存在下で、前記エピトープへの親和性が上昇する、(I-2)に記載の抗体。

(I-7)

ヒトインテグリン β_7 の379～416番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部の存在下で、前記エピトープへの親和性が上昇する、(I-2)に記載の抗体。

(I-8)

ヒトインテグリン β_7 を活性化することにより、前記エピトープへの親和性が上昇する、(I-1)～(I-7)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-9)

抗ヒトインテグリン β_7 抗体であって、正常細胞上にて発現するヒトインテグリン β_7 よりも、骨髄腫細胞上で発現するヒトインテグリン β_7 に対して親和性が高い抗体。

(I-10)

MMG49抗体と同一のエピトープを有する、(I-1)～(I-9)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-11)

配列番号1に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
配列番号2に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および／または
配列番号3に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR3
を含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは
配列番号6に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
配列番号7に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、および／または
配列番号8に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3
を含む軽鎖可変領域
を含む、(I-1)～(I-10)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-12)

配列番号4に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および／または
配列番号9に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域
を含む、(I-1)～(I-10)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-13)

Fv、scFv、ディアボディ (diabody)、トリアボディ (triabody)、テトラボディ (tetrabody)、またはこれらの組み合わせである、(I-1)～(I-12)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-14)

定常領域を含む、(I-1)～(I-11)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-15)

キメラ抗体である、(I-1)～(I-12)および(I-14)のいずれか1項に記載の抗体

。

(I-16)

ヒト化抗体である、(I-1)～(I-12)および(I-14)のいずれか1項に記載の抗体

。

(I-17)

ヒト抗体である、(I-1)～(I-12)および(I-14)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-18)

イムノグロブリン、Fab、F(ab')₂、ミニボディ (minibody)、scFv-Fc、またはこれらの組みあわせである、(I-1)～(I-12)および(I-14)～(I-17)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-19)

IgA、IgD、IgE、IgG、またはIgMである、(I-1)～(I-12)および(I-14)～(I-18)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-20)

配列番号5に示すアミノ酸配列を有する重鎖および／または配列番号10に示すアミノ酸配列を有する軽鎖を含む、(I-1)～(I-12)および(I-14)～(I-19)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-21)

細胞障害活性を有する、(I-1)～(I-20)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-22)

細胞障害活性が、ADCC活性および／またはCDC活性である、(I-21)に記載の抗体。

(I-23)

多重特異性抗体である、(I-1)～(I-22)のいずれか1項に記載の抗体。

(I-24)

サイトトキシンが結合してなる、(I-1)～(I-23)のいずれか1項に記載の抗体

。

(I-25)

モノクローナル抗体である、(I-1)～(I-24)のいずれか1項に記載の抗体。

[0017] (II) ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチド(II)は、以下の(II-1)に示すポリヌクレオチドを包含する。

(II-1)

上記抗体(I)のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。

[0018] (III) 宿主細胞

宿主細胞(III)は、以下の(III-1)または(III-2)に示す宿主細胞を包含する。

(III-1)

ポリヌクレオチド(II)を保持する宿主細胞。

(III-2)

真核細胞である、(III-1)に記載の宿主細胞。

[0019] (IV) キメラ抗原受容体

キメラ抗原受容体(IV)は、以下の(IV-1)～(IV-5)に示すキメラ抗原受容体を包含する。

(IV-1)

上記抗体(I)と同一のエピトープを有するキメラ抗原受容体。

(IV-2)

上記抗体(I)の抗原認識部位を含む、(IV-1)に記載のキメラ抗原受容体。

(IV-3)

抗原認識部位が、

配列番号1に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、

配列番号2に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および/または

配列番号3に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR3

を含む重鎖可変領域、ならびに/あるいは

配列番号6に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、

配列番号 7 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、および／または
配列番号 8 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3

を含む軽鎖可変領域

を含む、(IV-1)または(IV-2)に記載のキメラ抗原受容体。

(IV-4)

抗原認識部位が、

配列番号 4 に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および／または

配列番号 9 に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域

を含む、(IV-1)～(IV-3)のいずれかに記載のキメラ抗原受容体。

(IV-5)

配列番号 2 1 に示すアミノ酸配列を有する(IV-1)～(IV-4)のいずれか 1 項に
記載のキメラ抗原受容体。

[0020] (V) ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチド(V)は、上記ポリヌクレオチド(II)とは異なり、以下の(V-1)
)または(V-2)に示すポリヌクレオチドを包含する。

(V-1)

上記キメラ抗原受容体(IV)のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチド。

(V-2)

配列番号 2 2 に示す塩基配列を有する、(V-1)に記載のポリヌクレオチド。

[0021] (VI) 細胞

細胞(VI)は、上記宿主細胞(III)とは異なり、以下の(VI-1)～(VI-4)のいずれ
かに示す細胞を包含する。

(VI-1)

上記ポリヌクレオチド(V)を保持する細胞。

(VI-2)

真核細胞である、(VI-1)に記載の細胞。

(VI-3)

T細胞またはNK細胞である、(VI-1)または(VI-2)に記載の細胞。

(VI-4)

キメラ抗原受容体T細胞またはキメラ抗原受容体NK細胞である、(VI-1)～(VI-3)のいずれか1項に記載の細胞。

[0022] (VII) 医薬組成物

医薬組成物(VII)は、以下の(VII-1)～(VII-5)に示す医薬組成物を包含する。

(VII-1)

上記抗体(I)または上記細胞(VI)を含む医薬組成物。

(VII-2)

上記細胞がキメラ抗原受容体T細胞(VI-4)である、上記(VII-1)に記載の医薬組成物。

(VII-3)

癌の治療用である、(VII-1)または(VII-2)に記載の医薬組成物。

(VII-4)

癌が血液癌である、(VII-3)に記載の医薬組成物。

(VII-5)

血液癌が、形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患である、(VII-4)に記載の医薬組成物。

[0023] (VIII) 疾患の治療または予防方法

疾患の治療または予防方法(VIII)は、以下の(VIII-1)～(VIII-6)に示す疾患の治療または予防方法を包含する。

(VIII-1)

上記抗体(I)または上記細胞(VI)の治療有効量を被験体に投与する工程を含む、疾患の治療または予防方法。

(VIII-2)

上記細胞がキメラ抗原受容体T細胞(VI-4)である、上記(VIII-1)に記載の治療または予防方法。

(VIII-3)

疾患が癌であり、かつ被験体が癌に罹患する患者または癌に罹患する可能性

のある動物である、(VIII-1)または(VIII-2)に記載の治療または予防方法。

(VIII-4)

癌が血液癌である、(VII-3)に記載の治療または予防方法。

(VIII-5)

血液癌が、形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患である、(VIII-4)に記載の治療または予防方法。

(VIII-6)

活性型ヒトインテグリン β_7 を標的とした多発性骨髄腫の治療または予防方法。

[0024] (IX) 使用

使用(IX)は、以下の(IX-1)～(IX-5)に示す使用を包含する。

(IX-1)

医薬組成物を製造するための、上記抗体(I)または上記細胞(VI)の使用。

(IX-2)

上記細胞がキメラ抗原受容体T細胞(VI-4)である、上記(IX-1)に記載の治療または予防方法。

(IX-3)

癌の治療用である、(IX-1)または(IX-2)に記載の使用。

(IX-4)

癌が血液癌である、(IX-4)に記載の使用。

(IX-5)

血液癌が、形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患である、(IX-3)に記載の使用。

[0025] (X) スクリーニング方法

スクリーニング方法(X)は、以下の(X-1)～(X-4)に示すスクリーニング方法を包含する。

(X-1)

化合物ライブラリーからヒトインテグリン β_7 に特異的に結合し、且つ、ヒト

インテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に結合する候補物質を選別する工程を含む、癌の治療用または予防用の医薬組成物の有効成分のスクリーニング方法。

(X-2)

さらに、細胞障害活性を有する物質を選別する工程を含む、(X-1)に記載のスクリーニング方法。

(X-3)

選別される物質がモノクローナル抗体である、(X-1)または(X-2)に記載のスクリーニング方法。

(X-4)

癌が血液癌である、(X-1)～(X-3)のいずれか1項に記載のスクリーニング方法。(IX-5)

血液癌が、形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患である、(X-4)に記載のスクリーニング方法。

[0026] (XI) 診断方法

診断方法(XI)は、以下の(XI-1)～(XI-5)に示す診断方法を包含する。

(XI-1)

被験体から採取したサンプルと、上記抗体(I)とを接触させる工程を含む、癌の診断方法。

(XI-2)

被験体から採取したサンプルが、血液または骨髓液である、(XI-1)に記載の診断方法。

(XI-3)

上記抗体(I)と結合する細胞が検出された場合に癌に罹患した、または罹患する可能性がある判断する(XI-1)または(XI-2)に記載の診断方法。

(XI-4)

癌が血液癌である、(XI-3)に記載の診断方法。

(XI-5)

該細胞が形質細胞であり、かつ該癌が形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患である、(XI-4)に記載の診断方法。

[0027] (XII) キット

キット(XII)は、以下の(XII-1)～(XII-3)に示すキットを包含する。

(XII-1)

上記抗体(I)を含む、癌の診断用キット。

(XII-2)

癌が血液癌である、(XII-1)に記載の診断方法。

(XII-3)

癌が、形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患である、(XII-2)に記載のキット。

発明の効果

[0028] 本発明の抗体は、正常細胞を認識しないため、医薬組成物の有効成分として有用である。なかでも癌（例えば血液癌）の治療薬の有効成分として有用である。

[0029] 本発明の抗体は、その抗原認識部位をキメラ抗原受容体に適用することにより製造されるキメラ抗原受容体T細胞を、上述のような医薬組成物の有効成分として用いることができるので、有用である。

図面の簡単な説明

[0030] [図1]実施例2において、骨髓腫患者由来骨髓細胞に対するMMG49抗体の結合をFACSを用いて解析した結果。（左）骨髓腫前駆細胞分画（Myeloma progenitor cells）、骨髓腫形質細胞分画（Myeloma plasma cells）、およびCD45⁺白血球細胞（CD45⁺ leukocytes）の同定方法を示す図。（右）各分画に対するMMG49抗体の結合を示す図。

[図2]実施例2において、複数の骨髓腫患者由来骨髓細胞（UPN1～5）の骨髓腫前駆細胞分画、骨髓腫形質細胞分画、およびCD45⁺白血球細胞に対するMMG49抗体の結合をFACSにて解析した結果を示す図。

[図3]実施例3における、発現クローニング法によるMMG49抗体が認識する抗原タンパクの同定過程を示す。当初0.1%以下であったMMG49抗体に結合するBa

F3細胞をFACSソーティングにより濃縮した過程を示す。

[図4]実施例4において、Crispa-cas9システムを用いて作製したITGB7欠損U266細胞を、MMG49抗体またはFIB27抗体（市販の抗インテグリン β_7 抗体）で染色しFACS解析した結果を示す図。

[図5]実施例4において、MM1s骨髓腫細胞由来の細胞溶解液から、MMG49抗体またはisotype control抗体を用いて免疫沈降したものをSDS-PAGEし、次いで市販の抗インテグリン β_7 抗体（アブカム社）でウェスタンブロットを行った結果を示す図。

[図6]実施例5において、健常人末梢血細胞の各細胞分画（図中、左から順にB細胞、T細胞、単球、好中球、赤血球、および血小板を示す）に対する、それぞれMMG49抗体、FIB27抗体、およびFIB504抗体の結合をFACSを用いて解析した結果を示す図。

[図7]実施例5において、骨髓腫患者由来骨髓細胞の各細胞分画に対する、それぞれMMG49抗体の結合をFACS解析した結果を示す図。左に各細胞分画の同定方法を示し、右に各分画に対するMMG49の結合を示す図。Aでは造血幹細胞、前駆細胞分画と骨髓腫細胞との比較を、BではB/Tリンパ球分画と、骨髓腫前駆細胞および骨髓腫形質細胞分画との比較を示した。

[図8]実施例6において、各種骨髓腫細胞株、末梢血由来のT細胞、およびB細胞に対する、それぞれMMG49抗体およびFIB27抗体の結合をFACSを用いて解析した結果を示す図。併せて、上記細胞におけるITGA4の発現（抗インテグリン α_4 抗体の結合）およびITGAEの発現（抗インテグリン α_E 抗体の結合）の確認をFACS解析した結果も示す。

[図9]実施例6において、U266細胞およびITGA4(インテグリン α_4)欠損U266細胞に対する、MMG49抗体およびFIB27抗体の結合をFACS解析した結果を示す図。併せて、上記細胞におけるITGA4の発現(抗インテグリン α_4 抗体の結合)をFACS解析した結果も示す。

[図10]実施例7における、 $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ または Mn^{2+} の存在下、 37°C で20分間処理したインテグリン $\alpha_4\beta_7$ 強制発現K562細胞およびヒト正常末梢血由来T細胞

を、MMG49抗体あるいはisotype抗体と反応させた後、二次抗体としてanti-mouse IgG antibodyを用いて染色し、これらをFACS解析した結果を示す図。

[図11]実施例8における、ヒト/マウスキメラインテグリン β_7 タンパク質の構築とそれを一過性に発現させた293T細胞に対するMMG49抗体の結合の有無を示す図。

[図12]実施例8における、ヒト/マウスキメラインテグリン β_7 タンパク質を一過性に発現させた293T細胞に対するMMG49抗体の結合をFACS解析した結果を示す図。

[図13]図12に示す結果をまとめた図。図中のグラフにおいて、縦軸は抗体が結合した細胞のパーセンテージを示し、横軸は各種ヒト/マウスキメラインテグリン β_7 タンパク質を示す。

[図14]MMG49抗体の可変領域をヒトIgG4抗体定常部に接続することにより作製したキメラ化MMG49抗体を用いて、MM1s細胞およびKMS12BM細胞を染色した結果を示す図。

[図15]MMG49抗体の可変領域を用いたCARコンストラクトの作製法を示したシエーマ。

[図16]MMG49抗体の可変領域を用いたCARコンストラクトを発現させたT細胞をPE-抗ヒトF(ab')₂抗体を用いて染色した結果を示す図。

[図17]実施例9における、MMG49抗体由来CAR-T細胞またはGFPが導入されたT細胞 (control) と、インテグリン β_7 を発現していないK562細胞あるいはインテグリン $\alpha_4\beta_7$ を強制発現させたK562細胞との共培養により産生されるIFN- γ およびIL2の量をELISAにて定量した結果を示す図。*:p<0.05。

[図18]実施例10における、MMG49抗体由来CAR-T細胞またはGFPが導入されたT細胞 (control) と、MMG49抗原発現細胞または非発現細胞との共培養により産生されるIFN- γ の量をELISAにて定量した結果を示す図。

[図19]実施例10における、MMG49抗体由来CAR-T細胞またはGFPが導入されたT細胞 (control) と、MMG49抗原発現細胞または非発現細胞との共培養により産生されるIL2の量をELISAにて定量した結果を示す図。

[図20]実施例10における、MMG49抗体由来CAR-T細胞またはGFPを導入されたT細胞 (control) によるインテグリン β_7 を発現していないK562細胞あるいはインテグリン $\alpha_4\beta_7$ を強制発現させたK562細胞に対する細胞傷害の程度を ^{51}Cr killing assayにて測定した結果を示す図。なお、図中のグラフのy軸は細胞傷害率 (%) を意味する。

[図21]実施例10における、MMG49抗体由来CAR-T細胞またはGFPを導入されたT細胞 (control) によるMMG49抗原発現細胞または非発現細胞に対する細胞傷害の程度を ^{51}Cr killing assayにて測定した結果を示す図。

[図22]実施例11における、NOGマウスの骨髄内に生着させた骨髄腫細胞株MM1sに対する治療実験のデザインおよびその結果を示す図。MMG49抗体由来CAR-T細胞またはGFPを導入されたT細胞 (control) の移入後1週後の骨髄細胞を採取し、FACSにて解析した。MM1s細胞はヒトCD138⁺細胞として同定可能である。MMG49抗体由来CAR-T細胞投与群で骨髄内のMM1s細胞がほぼ完全に消失している。

[図23]実施例11における、NOGマウスの全身に生着させた骨髄腫細胞株MM1sに対する治療実験のデザインおよびその結果を示す図。MMG49抗体由来CAR-T細胞またはGFPを導入されたT細胞 (control) の移入前後の骨髄腫細胞の量はIVIS imagingでの蛍光強度の測定により評価した。MMG49抗体由来CAR-T細胞投与群で骨髄内のMM1s細胞がほぼ完全に消失している。

[図24]ヒト由来のインテグリン β_7 のアミノ酸配列と、マウス由来のインテグリン β_7 とのアミノ酸配列の比較を示す図。

[図25]実施例12における、ヒト/マウスキメラインテグリン β_7 タンパク質の構築とそれを一過性に発現させた293T細胞に対するMMG49抗体の結合の有無を示す図。

[図26]実施例13における、MMG49抗体のエピトープを検討する実験結果を示す図。横軸のMFIとはMMG49抗体に対する結合強度を表し、数値が高いほど結合合力が高いことを示す。

発明を実施するための形態

- [0031] 本明細書において、「含む」及び「有する」は、いわゆるオープンラングエッジであるが、これらは「のみから成る」というクローズドラングエッジを含む概念であり、一実施形態において、「のみから成る」に置き換えることができる。
- [0032] 「骨髓腫前駆細胞」は、骨髓腫形質細胞に分化する前の段階の前駆細胞であり、CD38が強発現しているが、成熟形質細胞に特異的なマーカーであるCD138の発現がないことによって特徴付けられる。よって、骨髓腫前駆細胞は、「CD38⁺CD138⁻細胞」又は「CD19-CD38⁺CD138⁻細胞」と表記される場合もある。
- [0033] 「骨髓腫形質細胞」は、一般には骨髓腫細胞とも呼ばれ、異常免疫グロブリンであるMタンパクを産生する細胞である。骨髓腫形質細胞では、CD38の強発現に加え、CD138が発現している。よって、骨髓腫形質細胞は、「CD38⁺CD138⁺細胞」又は「CD19-CD38⁺CD138⁺細胞」と表記される場合もある。
- [0034] 骨髓腫前駆細胞、及び骨髓腫形質細胞は、各々多発性骨髓腫以外の形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患における腫瘍前駆細胞、腫瘍性形質細胞をも意味する。
- [0035] 「造血前駆細胞」は、様々な血球系細胞へと分化可能な細胞である。造血前駆細胞は、CD34の発現によって特徴付けられる。よって、本明細書において造血前駆細胞は、「CD34⁺細胞」と表記される場合もある。
- [0036] (I) 抗体
- 抗体(I)とは、好ましくは抗ヒトインテグリン β_7 抗体であって、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する抗体である。
- [0037] より好ましくは、ヒトインテグリン β_7 の33～109番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する抗体またはヒトインテグリン β_7 の20～90番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する抗体を挙げることができる。最も好ましくは、ヒトインテグリン β_7 の33～90番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する抗体を挙げることができる。

- [0038] ヒトインテグリン β_7 とは特に限定はされず、配列番号31に示すアミノ酸配列を有する膜貫通タンパク質であり、インテグリン α とヘテロダイマーを形成するタンパク質とすることができる。具体的なインテグリン α として、インテグリン α_4 またはインテグリン α_E を挙げることができる。
- [0039] 具体的なヒトインテグリン β_7 のアミノ酸配列は、配列番号31に示すアミノ酸配列以外に、たとえばNCBIのデータベースに収載される、ACCESSION:EAW96675; VERSION:EAW96675.1, GI:119617081、ACCESSION:NM000889; VERSION:NM000889.2, GI:540344585、ACCESSION:XM005268851, VERSION:XM005268851.2, GI:767974096、ACCESSION:XM006719376, VERSION:XM006719376.2, GI:767974098、ACCESSION:XM005268852, VERSION:XM005268852.3, GI:767974097などに記載のアミノ酸配列を挙げることができる。
- [0040] 以下のヒトインテグリン β_7 に関する説明は配列番号31に示すアミノ酸配列を基に行うが、他のヒトインテグリン β_7 のアミノ酸配列であればインシリコで配列番号31に示すアミノ酸配列との相同性を確認し、これによって以下に説明するヒトインテグリン β_7 の領域および／または部位が、他のヒトインテグリン β_7 のアミノ酸配列のどの領域または部位に相当するのかを、当業者であれば容易に判断することができる。
- [0041] ヒトインテグリン β_7 の1～19番目のアミノ酸残基からなる領域はシグナルペプチドであり、生体内で膜タンパク質として機能する際には存在しないペプチド断片である。よって、ヒトインテグリン β_7 が膜タンパク質としての機能を発揮する際のN末端は、上記アミノ酸配列の20番目のアミノ酸残基である。
- [0042] ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域にはPSIドメインが含まれる。ヒトインテグリン β_7 のPSIドメインとマウスインテグリン β_7 のPSIドメインの相同性は、おおよそ80%以上と高いことが知られるものの、ヒトインテグリン β_7 およびマウスインテグリン β_7 のPSIドメインが含まれる20～109番目のアミノ酸残基からなる領域のアミノ酸残基を比較すると、図24にも示すように、ヒトインテグリン β_7 の23番目、26番目、28番目、30番目、32番目、35番目、36番目、38番目、41番目、42番目、48番目、93番目、94

番目、102番目、および109番目のアミノ酸残基の計15個のアミノ酸残基が異なっている。

[0043] したがって、抗体(I)のエピトープはこれらの15個のアミノ酸残基のいずれか一つ以上、好ましくは2つ以上、更に好ましくは3つ以上に関連することが好ましい。具体的には、抗体(I)のエピトープは、ヒトインテグリン β_7 の23～109番目のアミノ酸残基からなる領域に存在することが好ましく、23～48番目のアミノ酸残基からなる領域または93～109番目のアミノ酸残基からなる領域に存在することが更に好ましい。

[0044] 他の更に好ましい態様の抗体(I)のエピトープは、23～48番目のアミノ酸残基からなる領域、93～109番目のアミノ酸残基からなる領域、または23～48番目のアミノ酸残基からなる領域および93番目～109番目のアミノ酸残基からなる領域を組み合わせた立体的な領域であってもよい。

[0045] なお、抗体(I)のエピトープは線状エピトープであっても、立体エピトープ（非線状エピトープともいう。）であってもよい。線状エピトープとは、連続したアミノ酸残基がエピトープとなる場合であり、立体エピトープとは非連続的なアミノ酸残基によって構成されるエピトープであると当業者に知られる。

[0046] 例えば上述の23～48番目のアミノ酸残基からなる領域および93～109番目のアミノ酸残基からなる領域を組み合わせた立体的な領域をエピトープとする場合が立体エピトープに相当する例として挙げることができるが、20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に含まれる非連続的なアミノ酸残基からなる領域をエピトープとする場合も上記立体エピトープに包含される。

[0047] 上記のエピトープの中でも、48番目のアミノ酸残基が抗体(I)のエピトープとして強く関連するか、または抗体(I)のエピトープに含まれることが好ましい。

[0048] 具体的な線状エピトープおよび立体エピトープについては、例えば特表2011-527572号公報、特表2009-534401号公報、"Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes."

Forsstrom B, Axnas BB, Rockberg J, Danielsson H, Bohlin A, Uhlen M. *PLoS One*. 2015 Mar 27;10(3):e0121673. doi: 10.1371/journal.pone.0121673. eCollection 2015.などを参照することで当業者であれば理解することができる。

[0049] 以上を換言すると、抗体(I)はヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に特異的に結合する抗体であり、なかでも23～109番目の領域に特異的に結合することが好ましく、23～48番目および／または93～109番目の領域に特異的に結合することがより好ましい。

[0050] また、抗体(I)の上記エピトープであるインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に結合する性質を、エピトープへの親和性と呼ぶことがある。よって、用語「エピトープへの親和性が上昇する」とは、「エピトープへの特異的な結合能が上昇する」と同意である。

[0051] 用語「特異的」とは、用語「選択的」とは区別され得る。

[0052] 抗体(I)の他の態様として、抗体(I)の上記エピトープへの親和性が、ヒトインテグリン β_7 の379～722番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部の存在下で上昇することとすることが好ましい。

[0053] 「379～722番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部」とは、379～722番目のアミノ酸残基からなる領域であっても、その一部の領域であってもよいことを意味する。具体的に「その一部の領域」とは、例えばヒトインテグリン β_7 の417～722番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部、ヒトインテグリン β_7 の564～722番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部、ヒトインテグリン β_7 の379～563番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部、ヒトインテグリン β_7 の417～563番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部、またはヒトインテグリン β_7 の379～416番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部が挙げられる。すなわち、これらの領域の存在下で、抗体(I)の上記エピトープへの親和性を上昇させることができる。

[0054] 用語「存在下で」とは、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基

からなる領域と、ヒトインテグリン β_7 の379～722番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部とが、同一の分子内にて存在することができ、両者の領域が別々の分子で存在するものとすることもできる。好ましくは、両者の領域が同一の分子内にて存在することである。なお、用語「存在下で」とは「によって」と読み替えることもできる。

[0055] 上述の抗体(I)のエピトープへの親和性が上昇することは、下記の実施例などに記載される慣用の免疫学的測定法によって、当業者であれば容易に確認することができる。

[0056] 例えば、実施例8に示す各種ヒト/マウスのキメラインテグリン β_7 タンパク質であって、ヒト由来のインテグリン β_7 の1～109番目のアミノ酸残基からなる領域を含み、且つ、ヒト由来のインテグリン β_7 の722～798番目アミノ酸残基からなる領域を含むヒト/マウスのキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4960)を発現させた細胞を準備し、#4960のヒト由来のインテグリン β_7 の379～721番目アミノ酸残基からなる領域をマウス由来のインテグリン β_7 の379～721番目アミノ酸残基からなる領域に置換されたヒト/マウスのキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4961)を準備する。ここで、抗体(I)の結合の程度を、後者(#4961)を発現する細胞と前者(#4960)を発現する細胞とを比較することによって、抗体(I)の上記エピトープへの親和性の上昇を確認することができる。

[0057] 抗体(I)の他の態様として、抗体(I)の上記エピトープへの親和性は、ヒトインテグリン β_7 を活性化することによって上昇するものとするのが好ましい。活性化されたヒトインテグリン β_7 は上記エピトープを含む領域に構造的な特徴を有するため、抗体(I)の上記エピトープへの親和性が上昇すると考えられる。

[0058] ヒトインテグリン β_7 を活性化する方法は公知である。例えば、ヒトインテグリン β_7 を発現する細胞、例えば、形質細胞、NK細胞、T細胞、B細胞、リンパ芽球、パーキットリンパ腫由来の細胞、樹状細胞などの血球細胞または免疫細胞のいずれかの細胞に対して、PMAなどのホルボールエステル、マンガン

塩などを作用させることにより、その細胞にて発現するヒトインテグリン β_7 を活性化させることができる。また、上記の具体的な細胞に限らず、ヒトインテグリン β_7 を発現させた細胞を用いて、ホルボールエステル、マンガン塩などによって処理してもヒトインテグリン β_7 を活性化することができる。

[0059] 抗体(I)の上記エピトープへの親和性が、ヒトインテグリン β_7 を活性化することによって上昇することは、下記の実施例などに記載される慣用の免疫学的測定法によって、当業者であれば容易に確認することができる。

[0060] 例えば、実施例8に示す各種ヒト/マウスのキメラインテグリン β_7 タンパク質であって、1~109番目のアミノ酸残基からなる領域を含む#4960または#4961を発現させた細胞を準備し、これを実施例7に示すようなインテグリン β_7 の活性化手段に供した後に、免疫学的測定手段を用いて測定することによって、活性化処理の前後を比較して、活性化後の細胞への抗体(I)の上記エピトープへの親和性の上昇を確認することができる。

[0061] 抗体(I)の他の態様として、正常細胞上で発現するヒトインテグリン β_7 よりも、骨髓腫に由来する細胞上で発現するヒトインテグリン β_7 に対して、より親和性が高いことを特徴とする抗ヒトインテグリン β_7 抗体とすることができる。

[0062] 正常細胞とは、健常者に由来する細胞であれば特に限定はされず、例えば血液に由来する正常細胞とすることができ、このような正常細胞中でも正常形質細胞とすることが好ましい。

[0063] このような正常細胞上で発現するヒトインテグリン β_7 に比して、骨髓腫細胞上で発現するヒトインテグリン β_7 に対して、より親和性が高いことを確認する方法は、下記の実施例などに記載される慣用の免疫学的測定法によって、当業者であれば容易に実施することができる。

[0064] 「慣用の免疫学的測定法」とは、その抗原に関係なく種々の抗体を用いて測定する方法であれば特に限定されない。例えばフローサイトメトリー法(FACS)、これに付随するセルソーティング、ウェスタンブロッティング、ELISA、免疫沈降法、SPR法、QCM法などを挙げることができる。

- [0065] 抗体(I)の他の態様として、後述する実施例にて開示されるMMG49抗体と同一のエピトープを有するものとするのが好ましい。最も好ましくは、MMG49抗体と同一の抗体である。MMG49抗体の製造方法は、下記の実施例を参照することができる。
- [0066] 抗体(I)の他の態様として、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を含む態様の抗体とするのが好ましい。すなわち、抗体(I)は重鎖可変領域単独とすることもでき、軽鎖可変領域単独とすることもできる。好ましくは重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗体である。
- [0067] 可変領域とは抗原認識部位とも呼ばれ、抗体が抗原を認識するために重要な部位であると当業者に理解される。斯かる可変領域には3つの超可変領域（相補性決定領域〔CDR〕ともいう。）と呼ばれる領域を有しており、これらのCDRが抗体の抗原認識機能に最も関与する非常に重要な領域であることも当業者に知られている。
- [0068] 抗体(I)の他の態様に含まれる重鎖可変領域は、重鎖CDR1、重鎖CDR2、または重鎖CDR3のいずれか1つ以上を含む。すなわち、当該重鎖可変領域には重鎖CDR1、重鎖CDR2、または重鎖CDR3を単独で含有させることができ、少なくとも重鎖CDR3を含んでいることが好ましい。より好ましくはアミノ末端（N末端）から順に重鎖CDR1、重鎖CDR2、および重鎖CDR3を含む態様である。
- [0069] 軽鎖可変領域も重鎖可変領域と同様とすることができ、例えば、軽鎖CDR1、軽鎖CDR2、または軽鎖CDR3のいずれかを含み、少なくとも軽鎖CDR3を含んでいることが好ましく、軽鎖可変領域のN末端から順に軽鎖CDR1、軽鎖CDR2、および軽鎖CDR3を含むことが好ましい。
- [0070] 上記重鎖可変領域および軽鎖可変領域における、それぞれのCDR1～3以外の領域をFRを称することがある。より詳細には、N末端とCDR1との間の領域をFR1、CDR1とCDR2との間の領域をFR2、CDR2とCDR3との間の領域をFR3、CDR3とカルボキシ末端（C末端）との間の領域をFR4と呼び、重鎖可変領域および軽鎖可変領域それぞれに設定される呼称である。
- [0071] 上記重鎖CDR1～3および軽鎖CDR1～3のアミノ酸配列は、特に限定はされな

い。例えば、MMG49抗体の重鎖CDR1～3または軽鎖CDR1～3である、
配列番号1に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
配列番号2に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、
配列番号3に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR3、
配列番号6に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
配列番号7に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、
配列番号8に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3、
などが挙げられる。

[0072] 上記重鎖CDR1～3を含む重鎖可変領域の好ましい態様として、例えばMMG49抗体の重鎖可変領域である配列番号4に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域を挙げることができる。また上記軽鎖CDR1～3を含む軽鎖可変領域の好ましい態様として、例えばMMG49抗体の軽鎖可変領域である配列番号9に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域を挙げることができる。

[0073] 上記の配列番号1～4および6～9に示すMMG49抗体のアミノ酸配列は以下の表1に示すとおりである。表中の配列番号4および9に示すそれぞれ重鎖および可変領域のアミノ酸配列中に設けた下線部は、N末端から順にCDR1、CDR2、およびCDR3に位置する部分を示す。

[0074] [表1]

<MMG49 抗体のアミノ酸配列>		
重鎖	CDR1 (配列番号1)	GYTFSSYW
	CDR2 (配列番号2)	MLPGSGSS
	CDR3 (配列番号3)	ARGDGNYWYFDV
	可変領域 (配列番号4)	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKISCKA SGYTFSSYWIEWVKQRP GHGLEWIGEM LP GS SSNYNEKFKGK ATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDGNYWYFDVWG AG
軽鎖	CDR1 (配列番号6)	SSVGY
	CDR2 (配列番号7)	ATS
	CDR3 (配列番号8)	QQWSSDPPT
	可変領域 (配列番号9)	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPGEKVTM TCRASSSVGYMHW FQQKPGSSPKPWI YATSNLASGV PARFSGS ESGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSDPPTFGGGTKLEIK

[0075] 抗体(I)の構造は限定されない。具体的な構造として、Fv、scFv、ディアボディ (diabody)、トリアボディ (triabody)、テトラボディ (tetrabody)

などが挙げられ、これらを適宜組み合わせた構造とすることもできる。また、これらの組み合わせた構造も含めて、フラグメント抗体と呼ぶこともある。なお、このようなフラグメント抗体は、Fvを含む人工的にデザインされた組み換えタンパク質とすることもでき、タンパク質などの生体分子と融合されてなるものとすることもできる。

[0076] Fvとは、抗体の最小構造単位ともいわれ、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とが非共有結合性の分子間相互作用によって会合した構造である。さらに、重鎖可変領域および軽鎖可変領域内に存在するシステイン残基のチオール基同士がジスルフィド結合してなる構造とすることもできる。

[0077] scFvとは、重鎖可変領域のC末端と軽鎖可変領域のN末端とがリンカーで繋がれた構造であり、単鎖抗体とも呼ばれる。また、リンカーで繋がれるC末端とN末端は、それぞれ逆であってもよい。なお、scFvもFvと同様に非共有結合性の分子間相互作用などの会合によって、その構造を形成させることができる。

[0078] ディアボディ、トリアボディ、およびテトラボディとは、それぞれ上述のscFvが2量体、3量体および4量体を形成し、Fvなどと同様に可変領域同士の非共有結合性の分子間相互作用などにより、最も構造的に安定な状態で会合した構造である。

[0079] このような種々の構造を有する抗体(I)は、慣用の遺伝子工学的な手段を用いて発現ベクターを構築し、斯かる発現ベクターを抗体の産生に適した、原核細胞（大腸菌、放線菌など）、真核細胞（酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞など）などの宿主細胞を採用する発現系、慣用される無細胞発現系などを用いることにより、当業者であれば容易に製造することができる。製造した抗体は適宜、慣用の精製工程に供することで純度の高い状態として得ることも可能である。

[0080] 抗体(I)の他の態様として、定常領域を含有させることもできる。定常領域とは重鎖定常領域であればCH1、CH2、およびCH3を含み、軽鎖定常領域であればCLを含むと当業者に理解される。また、CH2およびCH3を含む領域はFcドメ

インと呼ばれることもある。

- [0081] 具体的な定常領域の由来は特に限定はされない。例えばヒト由来、マウス由来、ラット由来、ウサギ由来、サル由来、チンパンジー由来などといった大量生産に耐えうる動物種、ヒトに近縁する動物種、ヒトに投与しても免疫原性を生じさせにくい動物種などに由来する定常領域を挙げることができる。
- [0082] 抗体(I)の中でも、重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域がマウス由来のアミノ酸配列を有している場合、例えばヒト由来の定常領域を組み合わせることで、抗体(I)をキメラ抗体とすることができる。
- [0083] また、上述のキメラ抗体における、重鎖FR1～4および／または軽鎖FR1～4をヒト由来のアミノ酸配列に置換することで、抗体(I)をヒト化抗体とすることができる。
- [0084] さらに、上記ヒト化抗体における重鎖CDR1～3および／または軽鎖CDR1～3を、CDRが有する機能を減衰しない範囲に限ってヒト由来のアミノ酸配列に置換することで、抗体(I)をヒト抗体とすることができる。なお、用語「ヒト抗体」とは「完全ヒト化抗体」と呼ばれることもある。
- [0085] 定常領域を含む態様の抗体(I)の構造は、重鎖可変領域および重鎖定常領域を有する重鎖；ならびに軽鎖可変領域および軽鎖定常領域を有する軽鎖をそれぞれ1対ずつ含み、4本鎖の構造となるイムノグロブリンのみならず、Fab、F(ab')₂、ミニボディ(minibody)、scFv-Fcなどの構造を挙げることができる。さらに、これらを適宜組み合わせた構造とすることもできる。また、これらの組み合わせた構造も含めて、フラグメント抗体と呼ぶこともある。なお、このようなフラグメント抗体は、Fvを含む人工的にデザインされた組み換えタンパク質とすることもでき、タンパク質などの生体分子と融合されてなるものとすることもできる。
- [0086] Fabとは重鎖可変領域および重鎖定常領域中のCH1を含む重鎖の断片と、軽鎖可変領域および軽鎖定常領域を含む軽鎖とを含み、重鎖可変領域と軽鎖可変領域とが上述する非共有結合性の分子間相互作用によって会合するか、ま

たはジスルフィド結合によって結合してなる構造を有する。さらに、CH1とCLとがこれらのそれぞれに存在するシステイン残基のチオール基同士でジスルフィド結合してなるものとすることができる。

- [0087] $F(ab')_2$ とは、1対の上記Fabを有し、CH1同士がこれらに含まれるシステイン残基のチオール基同士でジスルフィド結合してなる構造を有する。
- [0088] ミニボディとは、上記scFvおよびCH3を含む1対の抗体断片を有し、斯かる抗体断片同士が、CH3同士で非共有結合性の分子間相互作用によって会合してなる構造を有する。
- [0089] scFv-Fcとは、上記scFv、CH2、およびCH3を含む1対の抗体断片を有し、上記ミニボディと同様にCH3同士で非共有結合性の分子間相互作用によって会合し、それぞれのCH3に含まれるシステイン残基のチオール基同士でジスルフィド結合してなる構造を有する。
- [0090] このような種々の構造を有する定常領域を含む抗体(I)も、定常領域を含まない抗体(I)と同様に、慣用の遺伝子工学的な手段を用いて発現ベクターを構築し、斯かる発現ベクターを抗体の産生に適した宿主細胞を採用する発現系を用いることにより、当業者であれば容易に製造することができる。製造した抗体は適宜、慣用の精製工程に供することで純度の高い状態として得ることも可能である。
- [0091] なお、Fabであれば、例えばイムノグロブリンであるIgGをパパインなどのプロテアーゼを用いてこれを分解することによっても得ることができる。また $F(ab')_2$ であれば、IgGをペプシンなどのプロテアーゼを用いてこれを分解することによって得ることもできる。
- [0092] 上記の定常領域を含む抗体(I)の中でも、好ましい構造はイムノグロブリンである。このようなイムノグロブリンのサブタイプは特に限定はされず、例えばIgA、IgD、IgE、IgG、IgMなどを挙げることができる。これらの中でも、IgGが好ましく、例えばマウス由来のIgGであれば、4つのサブクラスの中でもIgG2が好ましい。
- [0093] 上記の定常領域を含む抗体(I)の中でも、さらに好ましい態様の抗体は、配

列番号5に示すアミノ酸配列を有する重鎖および／または配列番号10に示すアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体である。最も好ましい抗体は配列番号5に示すアミノ酸配列を有する重鎖および配列番号10に示すアミノ酸配列を有する軽鎖を含む抗体である。

[0094] 上述のアミノ酸配列には、状況に応じて変異導入が施されてなるものとすることができる。このような変異は、重鎖CDRおよび軽鎖CDRには施されないことが好ましい。すなわち、重鎖FR、軽鎖FRに施されてなることが好ましく、抗体(I)が定常領域を含む場合は、下記に示すADCC活性またはCDC活性を調整するための変異の他に、更に変異が施されてなるものとすることができる。

[0095] 具体的な変異導入を施すアミノ酸残基の数は、特に限定はされない。例えば、変異導入前のアミノ酸配列と変異導入後のアミノ酸配列の同一性が70%程度、好ましくは75%程度、より好ましくは80%程度、より好ましくは85%程度、より好ましくは90%程度、より好ましくは95%程度、より好ましくは96%程度、より好ましくは97%程度、より好ましくは98%程度であり、最も好ましくは99%程度である。なお、このような数値は四捨五入によって得られるものとする。

[0096] 用語「同一性」とは、2以上の対比可能なアミノ酸配列の、互いに対する同一のアミノ酸配列の程度をいう。従って、ある2つのアミノ酸配列の同一性が高いほど、それらの配列の同一性のみならず類似性も高いと言える。

[0097] アミノ酸の同一性は、市販の又はインターネットを通じて利用可能な解析ツール（例えば、FASTA、BLAST、PSI-BLAST、SSEARCH等のソフトウェア）を用いて計算することができる。例えば、BLAST検索に一般的に用いられる主な初期条件は、以下の通りである。即ち、Advanced BLAST 2.1において、プログラムにblastpを用い、Expect値を10、Filterは全てOFFにして、MatrixにBLOSUM62を用い、Gap existence cost、Per residue gap cost、及びLambda ratioをそれぞれ11、1、0.85（デフォルト値）にして、他の各種パラメータもデフォルト値に設定して検索を行うことにより、アミノ酸配列の同一性の値

(%)を算出することができる。

[0098] 上述のアミノ酸配列への変異導入とは、置換、欠失、挿入などである。具体的変異導入は、慣用の方法を採用することにより達成できるものであれば、特に限定はされない。例えば、置換であれば保存的な置換技術を採用すればよい。

[0099] 用語「保存的な置換技術」とは、あるアミノ酸残基がそれと類似の側鎖を有するアミノ酸残基に置換される技術を意味する。

[0100] 例えば、リジン、アルギニン、ヒスチジンなどといった塩基性側鎖を有するアミノ酸残基同士で置換されることが保存的な置換技術にあたる。その他、アスパラギン酸、グルタミン酸などといった酸性側鎖を有するアミノ酸残基同士；グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システインなどといった非常電性極性側鎖を有するアミノ酸残基同士；アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン、トリプトファンなどといった非極性側鎖を有するアミノ酸残基同士；スレオニン、バリン、イソロイシンなどといった β -分枝側鎖を有するアミノ酸残基同士；チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジンなどといった芳香族側鎖を有するアミノ酸残基同士での置換も同様に保存的な置換技術にあたる。

[0101] 抗体(I)の他の態様として、抗体(I)を細胞障害活性を有するものとすることができる。細胞障害活性とは、抗体が細胞に結合することにより、結果として結合した細胞に何らかの障害を与える活性のことをいう。

[0102] このような細胞障害活性として、例えばADCC活性、CDC活性などが挙げられる。用語「ADCC活性」とは、抗体依存性細胞傷害活性(Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity)の略であり、抗体の定常領域に特異的なレセプターを発現しているNK細胞などの細胞障害活性を有する細胞を抗体の近傍にリクルートさせ、斯かる細胞などの作用によって、抗体が結合する細胞に対して傷害を与えることを誘起する活性である。

[0103] 用語「CDC活性」とは、補体依存性細胞傷害活性(Complement-Dependent C

ytotoxicity) の略であり、抗体が補体をその近傍にリクルートさせ、斯かる補体の作用によって抗体が結合している細胞に対して障害を与える作用を誘起する活性を言う。

- [0104] ここで、ADCC活性もCDC活性も、Lazar GA et al., Proc Natl Acad Sci US A, 103: 4005-10 (2006)、Shields RL et al., J Biol Chem, 276: 6591-604 (2001))、Moore GL et al., J Immunol, 159:3613-21 (1997)、An Z et al., MAbs, 1:572-9 (2009)などの文献を適宜参照しながら、定常領域に変異に施すことによってその活性を調整することができる。
- [0105] 例えば、定常領域がヒトIgG₁であれば、S239D、I332E、S239D/I332E、S239D/I332E/A330L、S298A、K334A、S298A/K334A、S298A/E333A/K334Aなどの変異を施すことによって、ADCC活性を上昇させることができる。
- [0106] また、同じく定常領域がヒトIgG₁である場合、V234A/G237A、H268Q/V309L/A330S/P331Sなどの変異を施すことによって、ADCC活性を下降させることができる。
- [0107] CDC活性に関しては、定常領域がヒトIgG₁である場合、S267E、H268F、S324T、S267E/H268F、S267E/S324T、H268F/S324T、S267E/H268F/S324Tなどの変異を施せば、その活性を上昇させることができる。
- [0108] ADCC活性は、Brunner K.T.らの方法 (Brunner, K.T., et al., Immunology, 1968, 14:181-96) に従って測定することができる。例えば、骨髓腫細胞を10%FCS添加のRPMI1640培地にて培養し、細胞数が $0.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^4$ 個となるように調製する。これに適量の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を加え、37°Cで1時間反応させ、細胞を ^{51}Cr でラベル化し、洗浄したものを標的細胞とする。エフェクター細胞としては、SCID マウスの骨髓細胞を10%のFBS、10ng/mlのマウスGM-CSF、及び40IU/mlのヒトIL2を添加したRPMI1640中で6日間培養したもの等を使用することができる。96ウェルプレートに被検抗体又はコントロールとなるそのアイソタイプ抗体を終濃度 $0.05 \sim 10 \mu\text{g}/\text{mL}$ となるように添加し、さらに標的細胞 (1.0×10^4 個) 及びエフェクター細胞 (5×10^5 個) を添加する。37°Cで4時間反応させ、遠心分離後、上清に放出された ^{51}Cr をγ-カウンターにて測定す

る。ADCC活性は、以下の式に基づいて求めることが出来る。

[0109] ADCC活性 = { ([標的細胞からの ^{51}Cr 放出] - [抗体の存在しない状態での自発的 ^{51}Cr 放出]) / ([1% Triton X-100添加による最大 ^{51}Cr 放出量] - [抗体の存在しない状態での自発的 ^{51}Cr 放出]) } × 100

[0110] CDC活性についても、Brunner K.T.らの方法 (Brunner, K.T., et al., Immunology, 1968, 14:181-96) に従って測定することができる。例えば、標的細胞となる骨髓腫細胞を10%FCS添加のRPMI1640培地にて培養し、細胞数が $0.5 \times 10^4 \sim 1.0 \times 10^4$ 個となるように調製する。これに適量の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を加え、37℃で1時間反応させ、細胞を ^{51}Cr でラベル化し、洗浄したものを標的細胞とする。ウシ胎児血清を添加したRPMI1640培地に懸濁した被検抗体又はコントロールとなるアイソタイプ抗体を終濃度0.5~50 $\mu\text{g/mL}$ となるように96ウェルプレートに加え、次いで前記標的細胞と補体とを加えて1.5時間反応させる。反応液を遠心分離し、上清に放出された ^{51}Cr を γ -カウンターにて測定する。CDC活性は、以下の式に基づいて求めることが出来る。

[0111] CDC活性 = { ([標的細胞からの ^{51}Cr 放出] - [抗体の存在しない状態での自発的 ^{51}Cr 放出]) / ([1% Triton X-100添加による最大 ^{51}Cr 放出量] - [抗体の存在しない状態での自発的 ^{51}Cr 放出]) } × 100

細胞傷害活性を有する抗体は、例えば上記方法を用いて細胞傷害活性の有無を評価し、当該活性を有する抗体を選抜することによって得ることが出来る。

[0112] 抗体(I)の他の態様として、多重特異性抗体とすることもできる。すなわち、ヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域以外の抗原(以後、これを他の抗原とよぶ。)に特異性をもって結合能を有するものとすることができる。

[0113] 他の抗原は、ヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域と構造的に非類似である抗原であることが好ましい。

[0114] 具体的な他の抗原は特に限定はされない。例えばCD3、CD16、C1q、Adenovirus knob domainなどが挙げられ、この中から適宜組み合わせで少なくとも1

つを他の抗原として適宜採用することができる。好ましくは上記に例示する抗原のうちの1つを、他の抗原として選択することである。すなわち、好ましい多重特異性抗体は、二重特異性抗体である。

[0115] このような多重特異性抗体は、当業者であれば慣用の技術を適宜採用することで容易に製造することができる。例えば、ヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域に相当するペプチド断片、またはヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域のみをヒト由来とし、それ以外をマウス由来などのヒト以外に由来するものとしたキメラ型インテグリン β_7 を発現する細胞を免疫付与した動物から得られるB細胞などの抗体産生細胞を用いて作製したハイブリドーマを準備し、上述の他の抗原で免疫付与した動物から得られるB細胞などの抗体産生細胞を用いて別途ハイブリドーマを作製して、これらのハイブリドーマ同士を細胞融合させて得られる新たなハイブリドーマ（二重特異性抗体の作成の場合には、これをクワドローマともいう。）から、慣用の方法によってスクリーニングすることにより、多重特異性抗体を得ることができる。

[0116] このほかに、例えば二重特異性抗体であれば、

（1）ヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域をエピトープとする、上記F(ab')₂の構造の抗体を作製する：

（2）一方で、他の抗原に特異的に結合するF(ab')₂の構造の抗体も同様に作製する：

（3）（1）および（2）で得られたそれぞれのF(ab')₂の構造の抗体をDTTなどの還元剤を用いて処理した後に、どちらか片方の処理物にはさらにエルマン試薬で処理する：

（4）（3）で得られたこれらの処理後のF(ab')₂構造の抗体を混合して反応させる：

といった（1）～（4）に示す手順によっても二重特異性抗体を作製することができる。

[0117] （A）ヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域をエピ

トープとする抗体を作製する。

(B) 一方で、他の抗原に特異的に結合する抗体も同様に作製する。

(C) (A) および (B) で得られたそれぞれの可変領域のアミノ酸配列およびこれをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を同定する。

(D) (C) にて同定したそれぞれの塩基配列を有するポリヌクレオチドを、要すれば定常部位の塩基配列配列、リンカー配列を有するポリヌクレオチドと共に組みこんだ発現ベクターを作製したのち、これをCHO細胞など抗体産生に適した宿主細胞に導入する。

といった (A) ~ (D) に示す手順によっても二重特異性抗体を産生させることができる。

[0118] 抗体(I)の他の態様として、サイトトキシン（細胞傷害活性を有する物質）が結合されてなるものとすることができる。サイトトキシンとは、細胞を死滅させる、細胞増殖を抑制するなどといった、細胞に何らかの障害を与える物質である限り特に限定はされない。

[0119] このようなサイトトキシンとして、例えば、シクロホスファミド水和物、イホスファミド、チオテパ、ブスルファラン、メルファラン、ニムスチン塩酸塩、ラニムスチン、ダカルパジン、テモゾロミドなどのアルキル化剤；メトトレキサート、ペメトレキセドナトリウム水和物、フルオロウラシル、ドキシフルリジン、カペシタビン、タガフル、シタラビン、ゲムシタビン塩酸塩、フルダラビンリン酸エステル、ネララビン、クラドリビン、レボホリナートカルシウムなどの代謝拮抗剤；ドキソルビシン塩酸塩、ダウノルビシン塩酸塩、プラルビシン、エピルビシン塩酸塩、イダルビシン塩酸塩、アクラルビシン塩酸塩、アムルビシン塩酸塩、ミトキサントロン塩酸塩、マイトマイシンC、アクチノマイシンD、ブレオマシニン塩酸塩、プペロマシニン塩酸塩、ジノスタチンスチマラマー、カリケアマイシンなどの抗生物質、ビンクリスチン硫酸塩、ビンブラスチン硫酸塩、ビンデシン硫酸塩、パクリタキセルなどの微小管阻害剤；アナストロゾール、エキセメスタン、レトロゾール、ファドロゾール塩酸塩水和物などのアロマターゼ阻害剤；シスプラチン、

カルボプラチン、ネダプラチン、オキサリプラチンなどの白金製剤；イリノテカン塩酸塩水和物、ノギテカン塩酸塩、エトポシド、ソブゾキサンなどのトポイソメラーゼ阻害剤、プレドニゾン、デキサメサゾンなどの副腎皮質ステロイド、サリドマイドおよびその誘導体であるレナリドマイド、プロテアーゼ阻害剤であるボルテゾミブ、 $^{90}\text{-Ittrium}$ などの放射性同位元素を挙げることができる。

[0120] これらの中でも、好ましくは、カリケアマイシン、メルファラン、ビンクリスチン硫酸塩、ドキソルビシン塩酸塩、プレドニゾン、デキサメサゾン、サリドマイド、レナリドマイド、ボルテゾミブであり、より好ましくは良好な抗体への結合の実績のあるカリケアマイシンである。

[0121] これらのサイトトキシンは、いずれも商業的に入手可能で上述の中から1種または2種以上を適宜組み合わせる選択することができる。

[0122] サイトトキシンと上述の抗体との結合様式は特に限定されず、例えば慣用の遺伝子工学的技術またはタンパク質工学的技術を適宜採用すれば、当業者は上述の抗体にサイトトキシンを容易に結合させることができる。より具体的にはリンカーを介して、上記抗体(I)のアミノ酸残基側鎖のアミノ基、チオール基、グアニジル基、水酸基、カルボキシル基など官能基に結合させる方法などが挙げることができる。

[0123] 抗体(I)は、ポリクローナル抗体であってもモノクローナル抗体であってもよい。好ましくはモノクローナル抗体である。

[0124] 用語「モノクローナル」とは、実質的に均一な集団から得られることを意味し、「モノクローナル抗体」とはこのような集団から得られる抗体であることを意味する。すなわち、このような集団に含まれる個々の抗体は、微量に存在し得る可能な天然に生じる突然変異を除けば同一であると解される。

[0125] さらに、抗体の特異的な結合対象（エピトープ）に関して、例えば抗体(I)ではこれがヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域に存在するものであるが、ポリクローナル抗体であれば、これがヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域における複数のサイトであ

るのに対し、モノクローナル抗体であれば、単一のサイトであるという点で、高い特異性を発揮するのでより有利である。

[0126] なお、修飾語として用いる「モノクローナル」とは上述のように実質的に均一の集団から得られる物と解され、その製造方法が特定される修飾語であると解されるべきではない。

[0127] 抗体(I)は、上記の方法の他に、ハイブリドーマ法、下記に示すポリヌクレオチド(II)を保持する宿主細胞(III)を用いた組換えDNA法、ファージライブラリーからの単離などを採用すれば当業者であれば容易に製造することができる。

[0128] 例えば、ヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域に相当するペプチドをマウス、ラット、ウサギなどの抗体産生に適した動物に免疫付与し、次いでB細胞を回収した後にハイブリドーマ法に供して、上述する抗体(I)が発揮する機能を指標にスクリーニングすることで、抗体(I)を製造する方法を挙げることができる。

[0129] このほかに、インテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域のみをヒト由来とし、それ以外をマウス由来などのヒト以外に由来するものとしたキメラ型インテグリン β_7 を発現する細胞を作成して、これをマウス、ラット、ウサギなどの抗体産生に適した動物（好ましくはマウス）に免疫付与し、次いでB細胞を回収した後にハイブリドーマ法に供して、上述する抗体(I)が発揮する機能を指標にスクリーニングすることで、抗体(I)を製造する方法を挙げることができる。

[0130] 抗体(I)が発揮する機能として、例えばヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域に対する親和性が、ヒトインテグリン β_7 の380~722番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも1部の下で上昇すること、ヒトインテグリン β_7 を活性化することによって上昇することなどを挙げることができる。よって、このような機能を利用する、下記のスクリーニング方法(X)に示す方法によって、抗体(I)を得ることもできる。

[0131] 抗体(I)は、ヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領

域にエピトープを有するので、当該インテグリン β_7 を発現する細胞に対し、上述するADCC活性およびCDC活性のみならず、アポトーシス誘導活性、生存シグナル遮断活性などのうちの一つまたは2つ以上を組み合わせることによって、斯かる細胞に対して細胞障害活性などを発揮することが期待される。よって、抗体(I)を含む組成物は下記に詳述するように医薬組成物(IV)として有用である。

- [0132] 特に、抗体(I)はヒトインテグリン β_7 の20~109番目のアミノ酸残基からなる領域をエピトープとするものであるが、抗体(I)のエピトープへの親和性はインテグリン β_7 を活性化することによって上昇する。活性型インテグリン β_7 は形質細胞などの血球細胞にて発現することから、抗体(I)は、これらの癌（例えば、血液癌）に対する医薬組成物の有効成分として用いられる。特に、上記の細胞に異変を生じさせる疾患（例えば骨髄腫、多発性骨髄腫など）に対する医薬組成物として有効に用いられる。

[0133] (II) ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチド(II)とは、上記抗体(I)のアミノ酸配列をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチドである。用語「ポリヌクレオチド」とは、たとえばリボヌクレオチド、デオキシリボヌクレオチド、またはこれらのいずれかのヌクレオチドなどが適宜公知の方法によって修飾されてなる一本鎖または二本鎖の形態を含む。

- [0134] ポリヌクレオチド(II)の塩基配列は、当業者であれば、例えばインシリコで上記抗体(I)のアミノ酸配列を基に適宜決定することができる。このような塩基配列を決定するのに使用されるコドンの種類は問わない。ポリヌクレオチドを使用する宿主のコドン頻度を勘案して、塩基配列を決定することが好ましい。

- [0135] 具体的なポリヌクレオチド(II)の塩基配列は特に限定はされない。上記抗体(I)の態様の一つとして特定するアミノ酸配列を示す各配列番号と斯かるアミノ酸配列をコードする塩基配列を示す配列番号の対応を下記表2に示す。すなわち、ポリヌクレオチド(II)が有する好ましい塩基配列は、配列番号1

1 ～ 20 に示す塩基配列である。

[0136] [表2]

アミノ酸配列	塩基配列
配列番号 1	配列番号 1 1
配列番号 2	配列番号 1 2
配列番号 3	配列番号 1 3
配列番号 4	配列番号 1 4
配列番号 5	配列番号 1 5
配列番号 6	配列番号 1 6
配列番号 7	配列番号 1 7
配列番号 8	配列番号 1 8
配列番号 9	配列番号 1 9
配列番号 10	配列番号 20

[0137] ポリヌクレオチド(II)は、ベクター内に組み込まれた態様とすることもできる。ベクターとは特に限定はされず、例えばクローニング用ベクターまたは発現用ベクターとすることもでき、その用途は問わない。

[0138] また、発現用ベクターであれば、大腸菌、放線菌などの原核細胞用のベクターとすることもでき、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞などの真核細胞用のベクターとすることもできる。

[0139] なお、ポリヌクレオチド(II)の5'末端側（上記抗体(I)でいうN末端側）には、適宜シグナルペプチドをコードする塩基配列を付加させることもできる。

[0140] ポリヌクレオチド(II)の具体的な使用方法は、特に限定されない。例えば下記の宿主細胞(III)に導入し、上記抗体(I)を発現させるために用いることを挙げることができる。

[0141] (III) 宿主細胞

宿主細胞(III)とは、上記ポリヌクレオチド(II)を保持する細胞である。用語「保持」とは、細胞内に上記ポリヌクレオチド(II)が存在する状態を維持することをいい、当該細胞が自発的に上記ポリヌクレオチドを積極的かどうかに関わらず細胞外に排出しない状態であることを意味する。

[0142] 宿主細胞(III)が上記ポリヌクレオチド(II)を保持する態様は特に限定されない。例えば細胞内でベクターの形態でポリヌクレオチドを保持させることもできるし、細胞内のゲノムに上記ポリヌクレオチド(II)がインテグレートされた形態で保持させることもできる。

[0143] 宿主細胞(III)の具体的な細胞の種類は、酵母細胞、昆虫細胞、哺乳類細胞などの真核細胞であっても大腸菌、放線菌などの原核細胞であってもよく、特に限定はされない。

[0144] (IV) キメラ抗原受容体

キメラ抗原受容体とは、人工のT細胞受容体(TCR)様のタンパク質であり、T細胞の細胞膜上にて発現する(細胞外ドメインに相当する)抗原認識部位を所望の抗原認識部位に置換し、且つT細胞そのものが有する細胞障害活性などの機能を、より効果的に発揮できるように構築されたタンパク質である。

[0145] キメラ抗原受容体(IV)とは、上記抗体(I)と同一のエピトープを有するものであり、より具体的には、上記抗体(I)の抗原認識部位を含むタンパク質である。すなわち、キメラ抗原受容体に含まれる抗原認識部位に存在するエピトープは、上記抗体(I)にて詳述したものと同様とすることができる。

[0146] さらに詳細には、キメラ抗原受容体(IV)のN末端から順に、上記抗体(I)の抗原認識部位、スペーサー配列、膜貫通ドメイン、共刺激因子、およびTCRの細胞内ドメインが配置されてなるタンパク質である。

[0147] キメラ抗原受容体(IV)に配置される上記抗体(I)の抗原認識部位とは、抗体(I)にて詳述した通りとすることができ、具体的には重鎖可変領域および／または軽鎖可変領域を挙げることができる。なかでも、重鎖可変領域および軽鎖可変領域を有しながらscFvの構造であることが好ましい。

[0148] このようなscFvにおいては、例えば重鎖可変領域と軽鎖可変領域の間には、適宜10個～25個程度のアミノ酸残基からなるスペーサー配列を設けることができる。より好ましくは、15～18個程度である。このようなスペーサー配列とは、キメラ抗原受容体(IV)に配置される上述のスペーサー配列

とは同一とすることもでき、異なるものとすることもできる。

- [0149] キメラ抗原受容体(IV)に配置されるスペーサー配列とは、特に限定はされない。例えば、10個～25個程度のアミノ酸残基からなるものとすることができる。より好ましくは、15～18個程度である。
- [0150] キメラ抗原受容体(IV)に配置される膜貫通ドメインとは特に限定されない。具体的には、T細胞などで発現するCD28、4-1BBなどのタンパク質に由来する細胞膜貫通ドメインを、適宜変異導入が施されることを許容しながら採用することができる。
- [0151] キメラ抗原受容体(IV)に配置される共刺激因子とは、T細胞などが有する共刺激因子であればよく特に限定はされない。例えば、4-1BB、OX40、CD28などを、適宜変異導入が施されることを許容しながら採用することができる。
- [0152] キメラ抗原受容体(IV)に配置されるTCRの細胞内ドメインとは特に限定はされない。たとえばTCRと鎖とも呼ばれるCD3などに由来する細胞内ドメインを適宜変異導入が施されることを許容しながら採用することができる。なお、CD3への変異導入に関して、ITAM(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif)が含まれるように施されてなることが好ましい。
- [0153] キメラ抗原受容体(IV)は配列番号21に示すアミノ酸配列を有するものとすることが好ましい。
- [0154] 上記のキメラ抗原受容体を特定するアミノ酸配列は、適宜変異導入が施されてなるものとすることができる。また、上記の膜貫通ドメイン、共刺激因子、およびTCRの細胞内ドメインに対する変異導入も同様とすることができる。具体的な変異導入数は、特に限定はされない。
- [0155] 例えば、変異導入前のアミノ酸配列と変異導入後のアミノ酸配列の同一性が70%程度、好ましくは75%程度、より好ましくは80%程度、より好ましくは85%程度、より好ましくは90%程度、より好ましくは95%程度、より好ましくは96%程度、より好ましくは97%程度、より好ましくは98%程度であり、最も好ましくは99%程度である。なお、このような数値は四捨五入によって得られるものとする。

[0156] 上述のアミノ酸配列への変異導入とは、置換、欠失、挿入などである。具体的な変異導入については、慣用の方法を採用して達成できるものであればよく、特に限定はされない。例えば、置換であれば保存的な置換技術を採用すればよい。

[0157] なお、このようなキメラ抗原受容体を製造するには、非特許文献4～6などに記載される方法を参照すれば、当業者であれば容易に製造することができる。

[0158] (V) ポリヌクレオチド

ポリヌクレオチド(V)とは、上記ポリヌクレオチド(II)とは異なり上記キメラ抗原受容体(IV)のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドである。

[0159] ポリヌクレオチド(V)の塩基配列は、上記ポリヌクレオチド(II)と同様に、例えばインシリコで上記キメラ抗原受容体(IV)のアミノ酸配列を基に適宜決定することができる。塩基配列を決定するのに使用されるコドンの種類は問わない。ポリヌクレオチドを使用する対象となる細胞のコドン頻度を勘案して、塩基配列を決定することが好ましい。

[0160] 具体的な塩基配列は、特に限定はされない。例えば配列番号21に示すアミノ酸配列を有するキメラ抗原受容体(IV)のアミノ酸配列を基に決定される配列番号22に示す塩基配列を有するポリヌクレオチドを挙げることができる。当然、このようなアミノ酸配列を基に決定される塩基配列は、使用するコドンの種類を問わないことを勘案すれば上記配列番号22に示す塩基配列に限定されないのは言うまでもない。

[0161] なお、ポリヌクレオチド(V)の5'末端側(上記キメラ抗原受容体(IV)でいうN末端側)には、適宜シグナルペプチドをコードする塩基配列を付加させることができる。

[0162] ポリヌクレオチド(V)の具体的な使用方法は、特に限定されない。例えば下記の細胞(VI)に導入し、上記キメラ抗原受容体(IV)を発現させるために用いることを挙げることができる。

[0163] (VI) 細胞

細胞(VI)とは、上記宿主細胞(III)とは異なり、上記ポリヌクレオチド(V)を保持する細胞である。用語「保持」とは、上記宿主細胞(III)と同様にすることができる。具体的な細胞の種類も、上記宿主細胞(III)と同様にすることができるが、細胞障害活性を有するが好ましい。例えば、T細胞、NK細胞、K細胞などを挙げることができ、なかでもT細胞の一種であるキラーT細胞（細胞障害性T細胞〔CTL〕ともいう）が最も好ましい。

[0164] 上記細胞(VI)に含まれるキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド(V)が発現することにより、キメラ抗原受容体(IV)を構成する上記抗体(I)の抗原認識部位が細胞の外側に露呈し、キメラ抗原受容体(IV)を構成する膜貫通ドメイン、上述の共刺激因子、もしくはTCRの細胞内ドメインは細胞膜または細胞内に局在することが好ましい。

[0165] これらの共刺激因子もしくは細胞膜または細胞内に局在するドメインは、上記抗体(I)の抗原認識部位が、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に結合すると、細胞内にて細胞障害活性を惹起させるシグナルを作動させる。また、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域への抗体(I)の親和性は、ヒトインテグリン β_7 を活性化することにより上昇する。したがって、抗体(I)は活性型インテグリン β_7 を発現する細胞または組織を対象に対して攻撃または細胞障害活性を発揮する。

[0166] このような機能を発揮する細胞がT細胞である場合、これをキメラ抗原受容体T細胞(VI-4)と呼ぶ。なお、NK細胞などの細胞障害活性を発揮する可能性を有する細胞も上述のキメラ抗原受容体T細胞と同様に、抗原認識部位の活性型ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域へ結合と、細胞膜または細胞内ドメインでの細胞障害活性を惹起させるシグナルの作動とを連動させることによって、キメラ抗原受容体T細胞と同様の効果を発揮し得る（これをキメラ抗原受容体NK細胞と呼ぶ。）。

[0167] このように、細胞(VI)は活性型インテグリン β_7 を発現する細胞または組織に対して細胞障害活性などを発揮するので、上記抗体(I)と同様に細胞(VI)を含む組成物は、下記に詳述する様な医薬組成物(IV)として有用であると言え

る。活性型インテグリン β_7 は形質細胞などの血球細胞にて発現することから、癌（例えば、血液癌）に対する医薬組成物の有効成分として用いられる。特に、上記の細胞に異変を生じさせる疾患（例えば骨髄腫、多発性骨髄腫など）に対する医薬組成物として有効に用いられる。

[0168] (VII) 医薬組成物

医薬組成物(VII)とは、上記抗体(I)または上記細胞(VI)を含む。上記細胞(VI)として、キメラ抗原受容体T細胞(VI-4)であることが好ましい。

[0169] 医薬組成物(VII)中の上記抗体(I)または上記細胞(VI)の含有量は、特に限定はされない。例えば、抗体(I)であれば、医薬組成物100重量部に対して0.001重量部～10重量部程度をすることができる。また、細胞(VI)であれば、1細胞/mL～ 10^4 細胞/mL程度とすることができる。

[0170] 医薬組成物(VII)の投与方法は、特に限定はされない。有効成分が抗体または細胞であることから、非経口的投与または非経腸的投与とすることが好ましい。例えば、経静脈投与、経筋肉投与、経皮下投与などが挙げられ、経静脈投与が好ましい。

[0171] 医薬組成物(VII)の剤形は、上述の投与方法に応じて薬学的に許容される慣用の担体と共に調製することができる。上述の好ましい投与方法を勘案すると、注射剤とすることが好ましい。

[0172] 医薬組成物(VII)の対象疾患は、特に限定はされない。具体的な対象疾患として、例えば癌が挙げられ、血液癌が好ましく、形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患であることが更に好ましい。用語「形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患」とは、異常な形質細胞の腫瘍性増殖とそれらより分泌される異常タンパク質の増加によって特徴づけられる疾患である。このような疾患として、例えば骨髄腫、多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、形質細胞腫、H鎖病、全身性AL型アミロイドーシスなどを挙げることができる。なお、他の実施形態において、医薬組成物(VII)の対象疾患は、悪性リンパ腫、白血病など他の血液悪性疾患であってもよい。

[0173] 医薬組成物(VII)の投与対象（被験体）は、上記疾患に罹患した患者である

か、または罹患する可能性がある動物とすることができる。「罹患する可能性がある」とは、後述する診断方法(XI)にて決定することができる。動物とは、例えば哺乳類動物とすることができ、好ましくはヒトである。

[0174] 医薬組成物(VII)の投与量は、投与対象の、疾患の程度、投与による所望効果の程度、体重、性別、年齢、動物種などの各条件によって区々であり一概に決定することができない。例えば有効成分が抗体(I)である場合、一日当たりで、通常は $1\mu\text{g/kg}$ (体重) $\sim 10\text{g/kg}$ (体重) 程度とすることができる。また、有効成分が細胞(VI)であれば、通常は 10^4 細胞/kg (体重) $\sim 10^9$ 細胞/kg (体重) 程度とすることができる。

[0175] 医薬組成物(VII)の投与スケジュールも、その投与量と同様に、投与対象の疾患の程度などの各条件によって区々であり一概に決定することができない。例えば、上記の1日当たりの投与量で、1日 \sim 1月に1回投与されることが好ましい。

[0176] (VIII) 疾患の治療または予防方法

疾患の治療または予防方法(VIII)とは、上記抗体(I)または上記細胞(VI)の治療有効量を被験体に投与する工程を含む、疾患の治療または予防方法である。細胞(VI)として、は好ましくはキメラ抗原受容体T細胞(VI-4)である。

[0177] 被験体とは、上記医薬組成物(VII)と同様とすることができる。被験体が疾患に罹患する患者である場合には、上記抗体(I)または上記細胞(VI)の治療有効量を投与することにより、その治療効果が期待され、被験体が疾患に罹患する可能性のある動物である場合には、その予防効果が期待される。予防とは、下記の診断方法(XI)に示すように、慣用の免疫学的方法によって測定された数値が、疾患に罹患すると判断される数値に到達させないようにすることを意味する。

[0178] 疾患とは、上記医薬組成物(VII)と同様とすることができ、例えば癌が例示され、好ましい癌として形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患（例えば、多発性骨髄腫など）を挙げることができる。

[0179] 治療有効量とは上記医薬組成物(VII)の投与量と同様とすることができ、上

記抗体(I)または上記細胞(VI)の製剤化は、上記医薬組成物(VII)の剤形と同様とすることができる。また、上記抗体(I)または上記細胞(VI)の投与方法、投与スケジュールなども上記医薬組成物(VII)にて詳述した通りとすることができる。

[0180] 疾患の治療または予防方法(VIII)には、活性型ヒトインテグリン β_7 を標的とした多発性骨髄腫の治療または予防方法を包含することができる。なお、標的とは上記の抗体(I)または上記の細胞(VI)の適用を挙げることができる。

[0181] (IX) 使用

使用(IX)とは、医薬組成物を製造するための、上記抗体(I)または上記細胞(IV)の使用である。

[0182] 医薬組成物とは、上記医薬組成物(VII)と同様とすることができる。なお、細胞(IV)はキメラ抗原受容体T細胞(VI-4)であることが好ましい。

[0183] また、医薬組成物の対象疾患も同様であり、例えば、癌の治療用、好ましくは血液癌、更に好ましくは形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患（例えば、骨髄腫、多発性骨髄腫など）が挙げられる。

[0184] そのほか、医薬組成物中の有効成分である上記抗体(I)または細胞(VI)の含有量、これらの剤形、投与方法、投与スケジュールなども、上記医薬組成物(VII)にて詳述したものと同様とすることができる。

[0185] (X) スクリーニング方法

スクリーニング方法(X)とは形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患の治療用または予防用の医薬組成物の有効成分のスクリーニング方法であって、化合物ライブラリーからヒトインテグリン β_7 に特異的に結合し、且つ、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に結合する候補物質を選別する工程を含む。

[0186] 医薬組成物とは上記医薬組成物(VII)と同様とすることができ、癌、好ましくは血液癌、更に好ましくは形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患（例えば骨髄腫、多発性骨髄腫など）の治療用または予防用の医薬組成物の有効成分とは、例えば上記抗体(I)が挙げられる。

- [0187] 化合物ライブラリーとは特に限定はされず、既存のライブラリーを用いることができる。好ましくは抗体ライブラリーであり、所望の抗原によって免疫付与された動物から得られるB細胞などの抗体産生細胞を用いて作製したハイブリドーマをライブラリーとすることが好ましい。
- [0188] ここで、所望の抗原とは特に限定されず、例えばヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域であることが好ましい。さらに好ましくは、活性型ヒトインテグリン β_7 である。
- [0189] 候補物質を選別する方法は特に限定はされない。例えば、ヒトインテグリン β_7 に特異的に結合する候補物質を選別し、且つ、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に相当するペプチド断片に結合することを慣用の免疫学的測定手段を用いて確認し、これを選別する手段を採用することができる。
- [0190] また、ヒトインテグリン β_7 に特異的に結合する候補物質を選別し、更に上記抗体(I)にて詳述したインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域のみをヒト由来とし、それ以外をマウス由来などのヒト以外に由来するものとしたキメラ型インテグリン β_7 を発現する細胞に結合する候補物質を慣用の免疫学的測定手段を用いて確認し、これを選別する手段を採用することができる。これを選別する手段を採用することもできる。
- [0191] また、ヒトインテグリン β_7 に特異的に結合する候補物質を選別し、更に、上記抗体(I)にて詳述したインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域のみをヒト由来とし、それ以外をマウス由来などのヒト以外に由来するものとしたキメラ型インテグリン β_7 を発現する細胞に対して、ホルボーリエステル、マンガン塩などによって処理し、処理前後で結合の程度が上昇する候補物質を確認し、これを選別する手段を採用することもできる。
- [0192] また、ヒトインテグリン β_7 に特異的に結合する候補物質を選別し、更に、上記抗体(I)にて詳述したヒトインテグリン β_7 の111～378番目のアミノ酸残基からなる領域をマウス由来に置換したキメラ体を発現する細胞と、ヒトインテグリン β_7 の110～721番目のアミノ酸残基からなる領域をマウス由来に置換

したキメラ体と作製し、前者に対する結合の程度が高い候補物質を確認し、これを選別する手段を採用することもできる。

[0193] さらに、スクリーニング方法(X)には細胞障害活性を有することを指標に候補物質を選別する工程が包含させることもできる。具体的な細胞障害活性を確認する対象となる細胞とは特に限定はされない。例えば上述したヒトインテグリン β_7 のPSIドメインに特徴がある活性型ヒト由来インテグリン β_7 を発現する血球細胞などを挙げることができる。

[0194] ここで、スクリーニングする候補物質が抗体である場合、細胞障害活性を有することを指標に候補物質を選別する工程を、ADCC活性またはCDC活性を有する抗体を選別する工程としてもよい。

[0195] このようにスクリーニング方法(X)によって選別される候補物質は、抗体であることが好ましく、更に好ましくはモノクローナル抗体である。最も好ましくは上記抗体(I)である。

[0196] (XI) 診断方法

診断方法(XI)とは癌の診断方法であり、被験体から採取したサンプルと、上記抗体(I)とを接触させる工程を含む。

[0197] 被験体とは、疾患の治療または予防方法(VIII)にて詳述した被験体と同様とすることができる。

[0198] 被験体から採取したサンプルとは、血液または骨髓液とすることができる。

[0199] 具体的な診断方法は、特に限定はされないが、例えば上記抗体(I)に結合する細胞が検出された場合に癌に罹患した、または罹患する可能性があると判断することが挙げられる。

[0200] 結合の程度は、慣用の免疫学的測定法を採用することによって、当業者であれば容易に決定することができる。ここで測定された程度に応じて、癌に罹患したか、あるいは罹患する可能性があるかのいずれかを決定することができる。

[0201] 具体的な癌の診断は特に限定されないが、例えば血液癌、より好ましくは

上記抗体(I)に結合する細胞が形質細胞である場合に、形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患（例えば、骨髄腫、多発性骨髄腫など）に罹患するまたは罹患する可能性があることを診断することができる。

[0202] (XII) キット

キット(XII)とは、上記抗体(I)を含む、癌の診断用キットである。

[0203] 癌とは、特に限定はされず、上述の医薬組成物(VII)にて詳述した通りとすることができ、好ましくは血液癌、更に好ましくは形質細胞の腫瘍性増殖をきたす疾患（例えば、骨髄腫、多発性骨髄腫など）である。

[0204] なお、キット(XII)には適宜マニュアルを添付させることができる。このようなマニュアルには上述の診断方法(XI)にて詳述する方法を癌の診断基準として記載させることができる。

実施例

[0205] 以下に、本発明をより詳細に説明するための実施例を示す。なお、本発明が以下に示す実施例に限定されないのは言うまでもない。

[0206] 試験方法：フローサイトメトリーおよびソーティング

以下の実施例において、細胞の選別のために用いたフローサイトメトリー(FACS)は下記のとおりで行った。

[0207] インフォームドコンセントを得た骨髄腫患者の腸骨から採取した骨髄単核球をACK液（150mMの NH_4Cl および10mMの KHCO_3 ）に浮遊させ、3分間、4℃で静置することにより赤血球を除去した。2%の胎児ウシ血清を添加したPBSで除去後の骨髄単核球を洗浄したのち、非特異的な抗体の結合を防ぐため、10%のヒトAB型血清を含むPBS中で、20分間、4℃でブロッキングを行った。

[0208] その後、蛍光色素でラベルされた各抗体（下記参照）をこれに加え、30分間、4℃で染色を行い、次いでPBSで洗浄したのち、1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のpropidium iodide (PI) を含んだPBS中に浮遊させ、その後FACS解析に供した。細胞の解析およびセルソーティングはFACS Aria セルソーター（Becton Dickinson Immunocytometry System社製）を用いて行った。

[0209] 細胞の染色には、次のモノクローナル抗体を適宜選択して使用した。

・ APC-conjugated anti-human CD34 antibody (BD Pharmingen社製) ・ PE-Cy7-conjugated anti-human CD34 antibody (BD Pharmingen社製) ・ APC/Cy7-conjugated anti-human CD19 antibody (Biolegend社製) ・ FITC-conjugated anti-human CD38 antibody (eBiosciences社製) ・ APC-conjugated anti-human CD138 antibody (Biolegend社製) ・ PE/Cy7-conjugated anti-human CD3 antibody (Biolegend社製) ・ FITC-conjugated anti-human CD14 antibody (BD Pharmingen社製) ・ PE/Cy7-conjugated anti-human CD45 antibody (Biolegend社製)。

[0210] [実施例 1]

骨髓腫細胞株に結合し健常人末梢血に結合しないモノクローナル抗体ライブラリーの作製 多発性骨髓腫に対する抗体治療においては、骨髓腫細胞には結合するが正常血液細胞には結合しない抗体を用いることが重要である。そこで、このような抗体を以下の方法により同定した。まず、以下の手法を用いて、様々な骨髓腫細胞株に結合するモノクローナル抗体を1万クローン以上作製した。

[0211] 6種類のヒト骨髓腫細胞株 (MM.1s細胞、RPMI8226細胞、INA6細胞、U266細胞、OPM2細胞、およびKMS12BM細胞) を抗原として、Balb/cマウスのfootpadに週2回、2-3週間免疫した。その後、膝下リンパ節を取り出して、細胞浮遊液を作製し、SP2/0マウスミエローマ細胞株と細胞融合させてハイブリドーマを作製した。細胞融合はポリエチレングリコールを用いる方法 (PEG法) を用いて行った。その後ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン培地 (HAT培地) で細胞を培養することにより、ハイブリドーマを選択した (>1万クローン)。

[0212] 最後に、ハイブリドーマの培養上清を用いて、免疫に用いた骨髓腫細胞株に結合し、健常人末梢血由来単核球には結合しない抗体を含む上清をFACSを用いて選択した。その結果得られた骨髓腫細胞に特異的な抗体の候補は約200クローンであり、これらを発現するハイブリドーマを増殖させた後にこれを凍結保存した。

[0213] [実施例2]

ヒト多発性骨髄腫患者骨髄において骨髄腫細胞特異的に結合する抗体の同定

上記の実施例1にて得られた約200クローンの候補抗体を用いて、骨髄腫患者由来の骨髄細胞を染色し、FACSを用いて解析した。

[0214] 多発性骨髄腫患者由来の骨髄細胞に各候補抗体を加えて4℃で30分間インキュベートしたのち洗浄し、二次抗体としてPE-conjugated anti-mouse Ig G antibodyを加えてさらに4℃で30分間インキュベートした。洗浄の後、最後に、APC-conjugated anti-human CD138 antibody、FITC-conjugated anti-human CD38、またはPE/Cy7-conjugated anti-human CD45を用いて染色した。陰性コントロールとして、候補抗体の代わりに、Isotype control を加えたサンプルを同時に用意した。

[0215] これらをFACSを用いて解析することにより、CD45⁻CD38⁺CD138⁺骨髄腫形質細胞およびCD45⁻CD38⁺CD138⁻骨髄腫前駆細胞には結合するが、CD45⁺血液細胞には結合しない抗体を選択した。

[0216] その結果、MMG49抗体が上記の条件を満たす抗体として同定された（図1および図2）。図中の各ヒストグラムについて、Y軸は、細胞数を示し、X軸はMMG49抗体の結合強度を示す

[0217] [実施例3]

MMG49抗体が結合する抗原タンパクの同定

MMG49抗体が結合する抗原タンパクの同定を発現クローニング法によって行った。

[0218] まず、MMG49抗体が結合することがわかっているMM.1s細胞から、superscript choice system for cDNA synthesis (Invitrogen社)を用いてcDNAライブラリーを作製し、BstXIアダプター (Invitrogen社)を用いて、pMXsレトロウイルスベクター（東京大学医科学研究所 北村俊雄先生より分与）に挿入した。このようにして作製されたcDNA libraryをplat-E細胞（北村俊雄先生より分与）に導入することにより得たレトロウィルスをBaF3細胞に感染させて、MM.1s由来のcDNAライブラリーを発現するBaF3細胞を得た。

[0219] 次に、これらの細胞をMMG49抗体で染色し、陽性細胞をFACSでソーティングすることにより細胞濃縮を繰り返した（図3）。3回目のソーティング後にはほとんどの細胞がMMG49抗体に結合する細胞となった。そこで、これらの細胞が持つレトロウィルスのインサートをPCRにて増幅した後、シーケンシングすることにより塩基配列を同定した結果、細胞が保有するインサートがITGB7であることが明らかになった。

[0220] [実施例4]

ITGB7欠損骨髓腫細胞の作製によるMMG49抗体の結合抗原がITGB7発現タンパク質であることの確認

Crispa-Cas9システムを用いてITGB7欠損U266骨髓腫細胞株を作製した。

[0221] まず、PX330（adgene社）ベクターにITGB7特異的な標的配列の二本鎖DNA配列を挿入することによりベクターを作製した。それを薬剤選択のためのベクターであるlinear hygromycin-resistance gene expression vector（Clontech社）と共に、Nucleofector（登録商標）II（Lonza社）を用いてU266細胞に導入した。その後、ハイグロマイシンを添加した培地中で増えてきたクローンについてITGB7の発現をFIB27抗体（抗インテグリン β_7 抗体；Biolegend社）を用いて染色してFACSにて解析することにより、ITGB7欠損細胞を同定した。

[0222] 次に得られたITGB7欠損細胞をMMG49抗体を用いて染色し、FACSにて解析したところ、野生型のU266細胞にはMMG49抗体が結合するのに対して、ITGB7欠損株ではMMG49抗体の結合が完全に消失していた（図4）。このことはMMG49はITGB7発現タンパク質（インテグリン β_7 ）のみに結合していることを示している。

[0223] 次に、MM1s骨髓腫細胞の溶解液からMMG49抗体を用いて免疫沈降を行ったのちSDS-PAGEし、次いで抗インテグリン β_7 抗体（Miltenyi社）を用いてWBを行った。その結果、MMG49抗体による免疫沈降物中にはインテグリン β_7 が検出された（図5）。このことは、MMG49抗体がインテグリン β_7 に結合していることを示している。

[0224] [実施例5]

健常人末梢血および骨髄腫患者骨髄の各細胞分画におけるMMG49抗体の結合パターンの測定

市販されている抗インテグリン β_7 抗体（FIB27抗体；Biolegend社）およびMMG49抗体を用いて、健常人末梢血および骨髄細胞における様々な細胞分画への結合を測定した。

- [0225] 健常人由来の末梢血細胞からHES40を用いて赤血球を除いた後、Fc receptor blocking reagent（Miltenyi社）を加えて非特異的な抗体の結合をブロッキングし、その後、MMG49抗体またはFIB27抗体、あるいはIsotype controlとしてmouse IgG2aを加えて4℃で30分間インキュベートしたのち洗浄し、二次抗体としてPE-conjugated anti-mouse IgG antibodyを加えてさらに4℃で30分間インキュベートした。
- [0226] これらを洗浄した後、最後に、APC/Cy7-conjugated anti-human CD19 antibody、FITC-conjugated anti-human CD14 antibody、PE/Cy7-conjugated anti-human CD3 antibodyを用いて染色した。染色後の細胞をFACSを用いて解析することにより各分画におけるMMG49抗体およびFIB27抗体の結合を測定した（図6）。
- [0227] また、1 μ lの健常人の末梢血を100 μ lのPBS（含EDTA）に加えたものを、同様にMMG49抗体またはFIB27抗体を用いて染色し、最後にPacific blue-conjugated anti-human CD235 antibody（BD Pharmingen社）またはFITC-conjugated anti-human CD41 antibody（BD Pharmingen社）を用いて染色することにより、CD235⁺の赤血球および血小板への各抗体の有無も同様にFACS解析により検討した（図6）。これらの結果はFIB27抗体が多くのリンパ系細胞に強く結合するのに対して、MMG49抗体の上記の正常血球細胞への結合はきわめて弱いことを示している。
- [0228] さらに、骨髄中において骨髄腫細胞以外の各正常細胞分画へのMMG49抗体の結合がないかどうかを明らかにするため、骨髄腫患者の骨髄細胞も同様にMMG49抗体を用いて染色し、最後にAPC-conjugated anti-human CD34 antibody（BD Pharmingen社製）Alexa647-conjugated human CD3（BD Pharmingen社製）

)、Cy7APC-conjugated anti-CD19 human antibody (BD Pharmingen社製)、PE-Cy7-conjugated anti-CD38 human antibody (BD Pharmingen社製)、またはFITC-conjugated anti-CD14 human antibody (BD Pharmingen社製)を用いて染色した。これらの染色後の骨髄腫患者由来の骨髄細胞FACSを用いて解析することにより、各分画におけるMMG49抗体の結合を測定した(図7)。これらの結果はMMG49抗体は骨髄腫細胞に強く結合するのに対し、造血幹細胞、前駆細胞分画を含めた全ての正常血球にはほとんど結合しないことを示している。

[0229] [実施例6]

MMG49の各種細胞株への結合の解析

各種細胞株(MM1s細胞、U266細胞、RPMI8226細胞、およびJFN3細胞)におけるMMG49抗体およびFIB27抗体の結合をFACSを用いて解析した。染色の方法は上記実施例5に示す末梢血などの場合と同じである。

[0230] インテグリン β_7 はインテグリン α_4 またはインテグリン α_E とヘテロダイマーを形成して細胞表面にて発現されることが知られているので、Alexa647-conjugated anti-human CD49d antibody (Biolegend社)およびAPC-conjugated anti-human CD103 antibody (Biolegend社)を用いて、これらの発現も同時にFACSを用いて解析した。なお、CD103とはインテグリン α_E を示し、CD49dとはインテグリン α_4 を示す。なお、上記実験例5と同様に、健常者由来の末梢血におけるインテグリン α_E およびインテグリン α_4 の発現量も検討した(図8)。

[0231] その結果ITGA4はほとんどの骨髄腫細胞株に発現しており、ITGAEはどの細胞株にも発現していなかった。FIB27抗体は全ての骨髄腫細胞株に結合していたが、MMG49抗体の結合はFIB27抗体の発現レベルとは一致しなかった。さらに、Crispa-Cas9システムを用いて作製したITGA4欠損U266細胞に対するMMG49抗体、FIB27抗体の結合をFACSにて検討したところ、共に、ITGA4欠損によりU266細胞への結合が消失していた。つまり、MMG49抗体、FIB27抗体共に $\alpha_4\beta_7$ インテグリンとして発現している β_7 インテグリンを認識していることがわかった。

[0232] 〔実施例 7〕

インテグリンの活性化とMMG49抗体の結合の関連の解析

上記のMMG49抗体の特異な結合様式から考えて、MMG49抗体は活性化して構造の変化したインテグリン β_7 を認識しているのではないかと推測された。

[0233] そこで、 $\alpha_4\beta_7$ を強制発現させたK562細胞およびCD4 T cell enrichment kit (BD pharmingen社)を用いて濃縮したヒト正常末梢血CD4T細胞を5mM EDTA/HBSで洗浄した後、1mM Ca^{2+} /1mM Mg^{2+} /HBS（低活性用バッファー）あるいは2mM Mn^{2+} /HBS(活性化バッファー)中において、MMG49抗体あるいはFIB27抗体と共に室温で30分間インキュベートしたのち洗浄し、二次抗体としてPE-conjugated anti-mouse IgG antibodyを加え、さらに室温で30分間インキュベートした。これらをFACSを用いて解析することによりインテグリン $\alpha_4\beta_7$ が活性化された細胞におけるMMG49抗体およびFIB27抗体の結合を測定した。

[0234] その結果、 Mn^{2+} の存在下でMMG49抗体の結合が増強していることが観察された（図10）。一方、FIB27抗体については同様の変化は見られなかった。このことは、MMG49抗体が活性化したインテグリン β_7 に特異的な抗体である可能性を示唆する。

[0235] 〔実施例 8〕

MMG49抗体の認識に必須のエピトープの同定

MMG49抗体が認識しているエピトープを同定するために、オーバーラッピングPCR法を用いて、図11に示すような8種類のヒト/マウスキメラインテグリン β_7 タンパク質発現用ベクターを作製した。

[0236] それぞれの発現ベクターをリポフェクション法により293T細胞に導入し、48時間後にMMG49抗体の結合の有無を解析した。細胞を1%のウシ胎児血清添加PBSに浮遊させ、MMG49抗体を添加したのち、室温で30分間静置した。洗浄ののち、Alexa488-抗マウスIgG抗体を加え、室温で30分間静置したのち、FACSにて解析した。

[0237] その結果、MMG49抗体は、110～721番目のアミノ酸残基からなる領域がマウス由来で、且つ、これ以外（20～109番目のアミノ酸残基からなる領域および

722～798番目のアミノ酸残基からなる領域) がヒト由来の配列であるキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4960)に、全長がヒト由来のキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4927)の場合とほぼ同様に強く結合することが明らかとなった(図11～13)。

[0238] 722～798番目のアミノ酸残基からなる領域は膜貫通ドメイン(TM)および細胞内ドメイン(cytoplasmic)が含まれ、さらに1～19番目のアミノ酸残基からなる領域がシグナルペプチドであることに鑑みると、PSIドメインを含む20～109番目のアミノ酸残基からなる領域に、MMG49抗体の結合に必須のエピトープが存在することが示された。

[0239] また、110～378番目のアミノ酸残基からなる領域をマウス由来とし、且つ、20～109番目のアミノ酸残基からなる領域および379～798番目のアミノ酸残基からなる領域をヒト由来としたキメラキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4961)は、キメラインテグリン β_7 タンパク質(#4960)と比較して、MMG49抗体の結合力が、若干上昇し、全長がヒト由来のキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4927)の場合と完全に同じ結合レベルとなることが明らかとなった。

[0240] さらに、上述のMMG49抗体のエピトープが含まれると示された20～109番目のアミノ酸残基からなる領域、および1～19番目のアミノ酸残基からなるシグナルペプチドに相当する領域を含む1～378番目のアミノ酸残基からなる領域がマウス由来で、且つ、379～798番目のアミノ酸残基からなる領域がヒト由来であるキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4944)、および1～416番目のアミノ酸残基からなる領域がヒト由来であり、且つ417～798番目のアミノ酸残基からなる領域がヒト由来であるキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4945)は、1～563番目のアミノ酸残基からなる領域がマウス由来で、且つ、564～798番目のアミノ酸残基からなる領域がヒト由来であるキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4946)、および1～721番目のアミノ酸残基からなる領域がマウス由来で、且つ、722～798番目のアミノ酸残基からなる領域がヒト由来であるキメラインテグリン β_7 タンパク質(#4947)と比べて、MMG49抗体の結合能が若干上昇することも明らかとなった。

[0241] 以上の実験結果に鑑みると、MMG49抗体インテグリン β_7 の20～109番目のアミノ残酸基からなる領域への特異的な結合力、すなわち親和性は、ヒトインテグリン β_7 の379～721番目のアミノ酸残酸基からなる領域によって、すなわちヒトインテグリン β_7 の379～721番目のアミノ酸残酸基からなる領域の存在下で、上昇することも明らかとなった。

[0242] [実施例9]

MMG49抗体の抗体分子可変部領域の塩基配列の決定

MMG49抗体サブクラスの確認はIsotyping kit (Roche社) を用いて行ったところ、IgG2aサブクラスであることを確認した。さらに、MMG49抗体の可変部領域の塩基配列およびアミノ酸配列を決定した。

[0243] 配列決定の方法は、Smarter RACE cDNA amplification kit (Clontech) 社を用いて行った。すなわち、MMG49抗体を産生するハイブリドーマMMG49由来のmRNAから作製したcDNAを鋳型にして、PCR反応によりH鎖および κ 鎖可変部領域のcDNA断片を増幅し、その塩基配列を解読した。解読したH鎖可変領域のアミノ酸配列、塩基配列、および超過変領域 (CDR1～3) を下記表3および4に示す。

[0244] 解読したL鎖 (κ 鎖) 可変領域のアミノ酸配列、塩基配列、および超過変領域 (CDR1～3) も下記表3および4に示す。

[0245] 単離したMMG49抗体の可変領域配列の特異性を確認するため、可変部配列cDNAをヒトIgG4定常部およびヒトIgLの κ 鎖の定常部配列と結合させることによりキメラ化抗体の作製を行った。具体的にはIn-Fusion cloning kit (Takara社)を用いてpFuse-CH-Ig-hG4, pFuse-CL-Ig-hk (invivogen社) に各可変部配列を挿入したのち、それらをFreeStyle CHO-S細胞(Invitrogen社)に導入し、その培養上清に分泌されるキメラ化抗体を回収した。次に、MMG49抗体が結合するMM1s細胞およびMMG49抗体が結合しないKMS12BM細胞をMMG49-hIgG4を加えたバッファー中でインキュベートし、洗浄した後、ビオチン化抗ヒトIgG(Rockland社)を二次抗体として加え、再度洗浄した後、ストレプトアビジン-PE(Biolegend社)を加えることにより染色し、FACS解析を行った。その結果、MMG4

9-hIgG4は元のMMG49抗体と同様の染色パターンを示し、得られた可変部配列が正しいものであることが示唆された（図14）

[0246] [表3]

<表3：MMG49のアミノ酸配列>		
重鎖	CDR1（配列番号1）	GYTFSSYW
	CDR2（配列番号2）	MLPGSGSS
	CDR3（配列番号3）	ARGDGNVWYFDV
	可変領域 （配列番号4）	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVKIS CKASGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEMLPGSGSSNYN EKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGDG NYWYFDVWGAG
軽鎖	CDR1（配列番号6）	SSVG
	CDR2（配列番号7）	AT5
	CDR3（配列番号8）	QQWSSDPPT
	可変領域 （配列番号9）	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPGEK VTMTCRASSSVGYMHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVP ARFSGSESSTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSDPPTFG GGTKLEIK

[0247] [表4]

<表4：MMG49の塩基配列>		
重鎖	CDR1（配列番号11）	GGCTACACATTCAGTAGCTACTGG
	CDR2（配列番号12）	ATGTTACCTGGAAGTGGTAGTTCT
	CDR3（配列番号13）	GCAAGGGGGGATGGTAACACTACTGGTACTTCGATGTC
	可変領域 （配列番号14）	ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCAGTAA CTGCAGGTGTCCACTCCCAGGTTCACTGCAGCAGTCTGG AGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCC TGCAAGGCTTCTGGCTACACATTCACTAGCTACTGGATAG AGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGAT TGGAGAGATGTTACCTGGAAGTGGTAGTTCTAATACTACAAT GAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCACATGCAGATACAAT CCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATC TGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGGGGGGATGGT AACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGG
軽鎖	CDR1（配列番号16）	TCAAGTGTAGGTTAC
	CDR2（配列番号17）	GCCACATCC
	CDR3（配列番号18）	CAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCGACG
	可変領域 （配列番号19）	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCA GTGCTTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAATGTTCTCTC CCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAAG GTCACAATGACTTGCAGGGCCAGCTCAAGTGTAGGTTACA TGCAGTGGTTCCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAAACC CTGGATTTATGCCACATCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCT GCTCGCTTCACTGGCAGTGAGTCTGGGACCTCTTACTCTC TCACAATCAGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTA TTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCGACGTTCGGT GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[0248] 〔実施例 10〕

MMG49抗体の抗体分子可変部領域を用いたキメラ抗原受容体T細胞の作製

MMG49抗体分子可変部配列を用いたchimeric antigen receptor T cell（以下、MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞と呼ぶ。）の作製は、非特許文献2～4などを参照しながら以下の手順で行った。

[0249] （1）CD28およびCD3zのクローニング：

Jurkat細胞からTrizol（Invitrogen社）を用いてRNAを採取し、さらにSuperscript III cDNA synthesis kit（Invitrogen社）を用いてcDNAを作製した。そして、それを鋳型としてPCRによりCD28およびCD3zのcDNAを増幅し、それぞれ、TA cloning kit（Invitrogen社）を用いてクローニングし、シーケンシングによりこれらの塩基配列を確認した。

[0250] （2）MMG49抗体由来のVL/VHとCD28/CD3zの4つの断片の結合：

オーバーラッピングPCR法を用いて、MMG49抗体由来のVL領域およびVH領域、ならびに上記クローニングしたCD28およびCD3zの各遺伝子断片を結合し、キメラcDNAを作製した。その手順と用いたプライマーを図15に示す。用いたプライマーの塩基配列を以下の表4に示す。

[0251] [表5]

番号	プライマー名	塩基配列
23	49_car_vk-s5	gaattccaccatggattttcaagtgcagatt
24	49_car_vk-as6	gccggaaccgctagtgagccccggtttgatttccagcttggt
25	593_car_vk_as4	gctgccttctccgctgccaggtttgccggaaccgctagtgagacc
26	49_car_vh-s5	aaacctggcagcggagaaggcagccaggttcagctgcagcagtc
27	49_car_vh-as6	tgaggagacggtgaccgtgg
28	49_VKVH28as8	atacataaacttcaattgcggccgctgaggagacggtgaccgtgg
29	49carinfus1	ctaggcgccggaattccaccatggattttc
30	tcrczcarinfuas4	aatgtcgacctcgagtggctgttagcgag

[0252] 結合されたキメラcDNAはZeroBlunt PCR cloning kit（Invitrogen）を用いてクローニングした後、シーケンシングを行い塩基配列を確認した。また確認した塩基配列に基づいて確認されたアミノ酸配列（配列番号21）およびその塩基配列（配列番号22）を配列表に示す。なお、配列番号21に示すアミノ酸配列は、上記配列番号23に示すコザック配列（gaattccacc）を含

まない、その直ぐ後続く開示コドン (atg) からアミノ酸配列に変換したものである。

[0253] (3) 発現ベクターへの挿入：

次いで、(2) で結合されたキメラ cDNA を EcoRI/SalI の二つの制限酵素で切り出し、MSCV-ires-GFP ベクターに挿入した。

[0254] 上記により作製した MMG49 抗体由来キメラ抗原受容体 cDNA レトロウィルスベクターを gag/pol および VSV-G エンベロープ発現ベクターと共に lipofectamine 2000 (invitrogen 社) を用いて 293T 細胞に導入することによりレトロウィルスの作製を行った。遺伝子導入後 48 時間後に上清を回収しウィルス溶液として用いた。

[0255] (4) T 細胞への導入：

次いで、ヒト T 細胞へ MMG49 抗体由来キメラ抗原受容体の cDNA の導入は以下のように行った。

[0256] まず、anti-CD3 antibody (eBioscience 社) をコーティングした 48 ウェルプレートにヒト末梢血単核球を加え 72 時間培養した。培養液には X-VIVO15 (Lonza 社) に 10% のヒト AB 型血清と IL-2 (175 IU/L) を添加したものをを用い末梢血単核球を刺激した。その後、Retronectin (Takara 社) をコーティングした 48 ウェルプレートに上記作製のウィルス溶液を添加し、1700xg で 120 分間の遠心によりウィルスを Retronectin に吸着させた後、刺激後の末梢血単核球 (T 細胞を含む) を加え、これに遺伝子導入を行った。その後上述の培地で培養を続けることにより MMG49 抗体由来キメラ抗原受容体 T 細胞を増幅させ、以下の検討に用いた。MMG49 抗体の可変領域を用いた CAR コンストラクトを発現させた T 細胞を PE-抗ヒト F(ab')₂ 抗体 (Jackson Laboratory 社) を用いて染色した結果、コンストラクトの導入を示す GFP の発現に比例してヒト F(ab')₂ の発現が検出された (図 16)。つまり、導入された CAR は細胞表面に発現されていることが確認された。

[0257] [実施例 9]

MMG49 抗体由来キメラ抗原受容体 T 細胞による ITGB7 発現腫瘍細胞の認識と細胞

傷害活性の解析

上述の方法により作製したMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞あるいはGFPだけを導入されたコントロールT細胞とインテグリン β_7 を発現していないK562細胞あるいはインテグリン $\alpha_4\beta_7$ を強制発現させたK562細胞を共培養し、産生されるサイトカインの量を定量した。具体的にはT細胞およびターゲット細胞のそれぞれ 1×10^5 個を96ウェルプレートに加えた。24時間後に上清を回収し、ELISAにてIFN- γ の産生量を測定した。測定はQuantikine kit (R&D社)を用いて行った。その結果、インテグリン $\alpha_4\beta_7$ を強制発現させたK562細胞とMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞との共培養においてのみ、control (GFP発現ベクターを導入した刺激後の末梢血単核球を同様に培養して得られるT細胞) よりも高いIFN- γ およびIL2の産生が見られた (図17)。

次に、MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞あるいはGFPだけを導入されたコントロールT細胞とMMG49抗体が結合する骨髓腫細胞株 (MM.1s細胞、RPMI8226細胞、およびJJN3細胞) あるいはMMG49抗体が結合しない細胞 (KMS12BM, Mol t4, およびRaji細胞) とを共培養し、同様に産生されるサイトカインの量を定量した。その結果、MMG49抗体が結合する細胞であるMM.1s、RPMI8226細胞、およびJJN3細胞とMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞とを共培養したときにのみ、control (GFP発現ベクターを導入した刺激後の末梢血単核球を同様に培養して得られるT細胞) よりも高いIFN- γ およびIL2の産生が見られた (図18および19)。これらの結果は、MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞はMMG49抗体が認識する抗原 (これをMMG49抗原と呼ぶことがある。) を認識することにより活性化していることを示している。

[0258] さらに、 ^{51}Cr 細胞傷害アッセイにて、MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞が骨髓腫細胞株を傷害するかどうかを検討した。まず、標的細胞となるインテグリン β_7 を発現していないK562細胞あるいはインテグリン $\alpha_4\beta_7$ を強制発現させたK562細胞を10%のFCSを添加したRPMI1640培地にて培養し、細胞数が $0.5 \sim 1.0 \times 10^4$ 個となるように調製した。

[0259] これに適量の $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ を加え、 37°C で2時間反応させ、細胞を ^{51}Cr でラベ

ル化し、洗浄したものを標的細胞とした。これを、ウシ胎児血清を添加したRPMI1640培地に懸濁したMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞と混和し4時間共培養した。

[0260] その後、上清に放出された ^{51}Cr を γ -カウンターにて測定した。細胞傷害率(%)は以下の式(1)に基づいて求めた。

[0261] $(A-B)/(C-D) \times 100$ (1)

A: 実験に用いた細胞からの ^{51}Cr の放出量

B: 抗体の存在しない状態での自発的な ^{51}Cr の放出量

C: 1%のTriton X-100の添加による最大 ^{51}Cr 放出量

D: 抗体の存在しない状態での自発的 ^{51}Cr の放出量。

[0262] その結果、MMG49抗体が結合するインテグリン $\alpha_4\beta_7$ を強制発現させたK562細胞では、controlであるGFPだけを発現するT細胞に比べてMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞による高い細胞傷害が見られた(図20)。

[0263] 次に、MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞あるいはGFPだけを導入されたコントロールT細胞とMMG49抗体が結合する骨髓腫細胞株(MM1s細胞、RPMI8226細胞、およびJIN3細胞)あるいはMMG49抗体が結合しない細胞(KMS12BM, Mol4, および Raji細胞)とを共培養し、同様の検討を行った。その結果、MMG49抗体が結合するインテグリン $\alpha_4\beta_7$ を強制発現させたK562細胞でのみ、controlであるGFPだけを発現するT細胞に比べてMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞による高い細胞傷害が見られた(図21)。

[0264] 以上の結果は、MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞がMMG49抗体により認識される抗原を発現する細胞を特異的に傷害しうることを示している。

[0265] [実施例11]

MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞によるin vivoにおける骨髓腫瘍細胞排除能の解析 MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞を用いて、in vivoでの多発性骨髓腫に対する治療効果を調べた。

[0266] 2.4Gyの放射線照射を行ったNODマウスの骨髓内に骨髓腫細胞株MM1s細胞(4×10^5 個)を移植した。5日後に、マウスをMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞

胞投与群と、コントロールT細胞投与群に分け、それぞれ 5×10^6 個ずつ経静脈的に投与した。その7日後に骨髓の解析を行ったところ、コントロールT細胞投与群では明らかに全てのマウスに著明な骨髓腫細胞の増殖が見られたのに対して、MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞投与群では腫瘍はほぼ完全に消失していた。これらの結果はMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞投与がin vivoにおいてもMMG49抗原を発現する腫瘍を排除する能力を有することを示している（図22）。

[0267] さらに骨髓腫全身播種モデルを用いて、in vivoでの多発性骨髓腫に対する治療効果を調べた。

[0268] 2.4Gyの放射線照射を行ったNOGマウスの静脈内にルシフェラーゼ遺伝子を導入した骨髓腫細胞株MM1s細胞（ 5×10^6 個）を移植した。移植後5日後にIVIS imaging system（パーキンエルマー社）を用いて、腫瘍細胞の生着の程度を測定した。その後、マウスをMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞投与群と、コントロールT細胞投与群に分け、移植後5日後と7日後に、それぞれ 3×10^6 個ずつ経静脈的に投与した。2回目のT細胞投与後7日後にIVIS imaging systemを用いて、再度腫瘍量の測定を行ったところ、コントロールT細胞投与群では明らかに全てのマウスに著明な骨髓腫細胞の増殖が見られたのに対して、MMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞投与群では腫瘍はほぼ完全に消失していた（図23）。これらの結果はMMG49抗体由来キメラ抗原受容体T細胞投与がin vivoにおいてもMMG49抗原を発現する腫瘍を排除する能力を有することを示している。

[0269] [実施例12]

MMG49抗体のエピトープについて、実施例8にて検討した結果を更に詳細に検討する実験を行った。図25に示すような3種類のヒト/マウスキメラインテグリン β_7 タンパク質発現用ベクターを作製し、それぞれの発現ベクターをリポフェクション法により293T細胞に導入し、48時間後にMMG49抗体の結合の有無をFACSにて解析した。

[0270] その結果、MMG49抗体は、インテグリン β_7 タンパク質の1～32番目および91

～798番目のアミノ酸残基からなる領域がマウス由来で、且つ、これ以外（33～90番目のアミノ酸残基なる領域）がヒト由来の配列であるキメラインテグリン β_7 タンパク質（図25における、ch5.1）に、全長がヒト由来のインテグリン β_7 タンパク質（図11における、#4927）の場合とほぼ同様に強く結合することが明らかとなった（図25）。

[0271] よって、MMG49抗体のエピトープは、ヒトインテグリン β_7 タンパク質の33～90番目のアミノ酸残基に含まれることが強く示唆された。

[0272] [実施例13]

ヒトインテグリン β_7 、マウスインテグリン β_7 、およびヒトインテグリン β_7 の1あるいは2アミノ酸のみをマウス由来のアミノ酸配列に変異させた各種変異体（R35E/N36D、H38D、M41L/L42Q、およびA48V）を発現するベクターをリポフェクション法により293T細胞に導入し、その後は実施例8と同様に実験を行った。その結果、図25に示すように、A48V変異体のみがMMG49抗体に対する結合力がヒトインテグリン β_7 と比べて顕著に減少し、マウマウスインテグリン β_7 の数値に近くなることが明らかとなった。この結果より、ヒトインテグリン β_7 の48番目のアミノ酸残基が、MMG49抗体のエピトープに強く関連するか、またはMMG49抗体のエピトープに含まれることが明らかとなった。

[0273] 以下に、本明細書にて表示する塩基配列およびアミノ酸配列を示す。

請求の範囲

- [請求項1] 抗ヒトインテグリン β_7 抗体であって、ヒトインテグリン β_7 の20～109番目のアミノ酸残基からなる領域にエピトープを有する抗体。
- [請求項2] ヒトインテグリン β_7 の379～721番目のアミノ酸残基からなる領域の少なくとも一部の存在下で、前記エピトープへの親和性が上昇する、請求項1に記載の抗体。
- [請求項3] ヒトインテグリン β_7 を活性化することにより、前記エピトープへの親和性が上昇する、請求項1または2に記載の抗体。
- [請求項4] 配列番号1に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR1、
配列番号2に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR2、および／または
配列番号3に示すアミノ酸配列を有する重鎖CDR3
を含む重鎖可変領域、ならびに／あるいは
配列番号6に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR1、
配列番号7に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR2、および／または
配列番号8に示すアミノ酸配列を有する軽鎖CDR3
を含む軽鎖可変領域
を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の抗体。
- [請求項5] 配列番号4に示すアミノ酸配列を有する重鎖可変領域および／または
配列番号9に示すアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域
を含む、請求項1～4のいずれか1項に記載の抗体。
- [請求項6] 多重特異性抗体である、請求項1～5のいずれか1項に記載の抗体。
- [請求項7] 請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体をコードする塩基配列を有するポリヌクレオチド。
- [請求項8] 請求項7に記載のポリヌクレオチドを保持する宿主細胞。
- [請求項9] 請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体の抗原認識部位を含むキメラ抗原受容体。
- [請求項10] 請求項9に記載のキメラ抗原受容体をコードするポリヌクレオチド。
- [請求項11] 配列番号22に示す塩基配列を有する、請求項10に記載のポリヌ

レオチド。

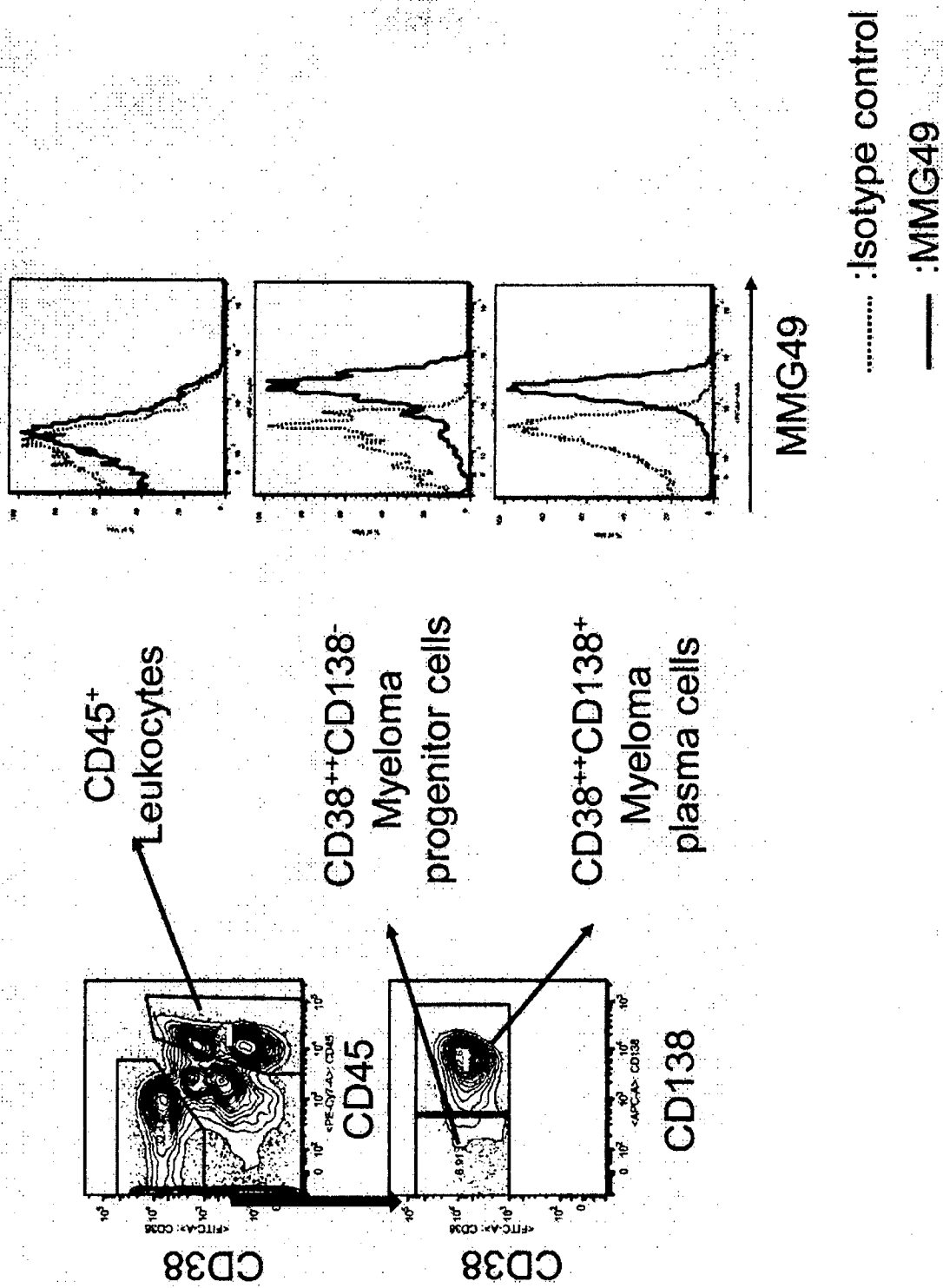
【請求項12】 請求項10または11に記載のポリヌクレオチドを保持する細胞。

【請求項13】 キメラ抗原受容体T細胞である、請求項12に記載の細胞。

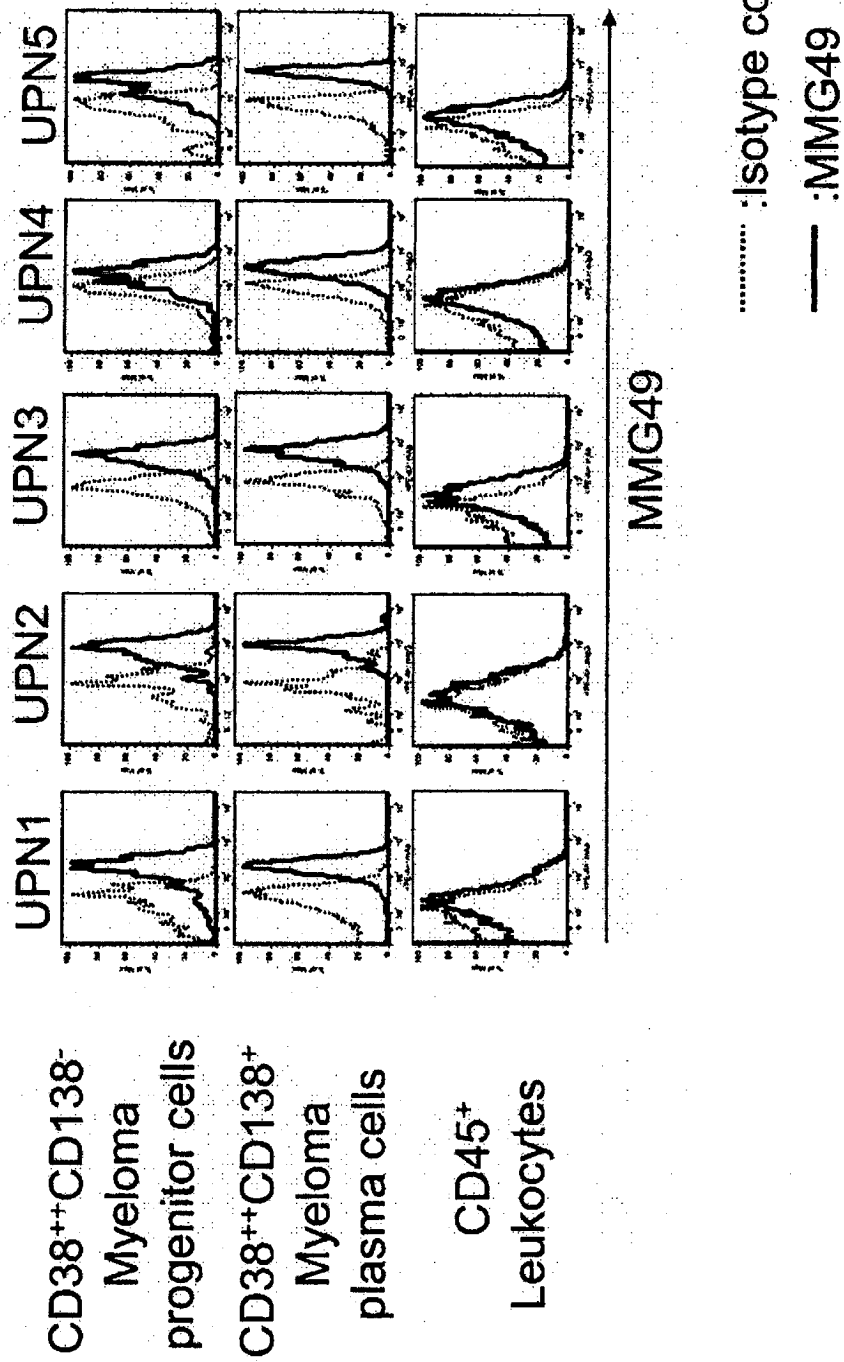
【請求項14】 請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体または請求項12に記載の細胞を含む医薬組成物。

【請求項15】 請求項1～6のいずれか1項に記載の抗体または請求項13に記載のキメラ抗原受容体T細胞を含む医薬組成物。

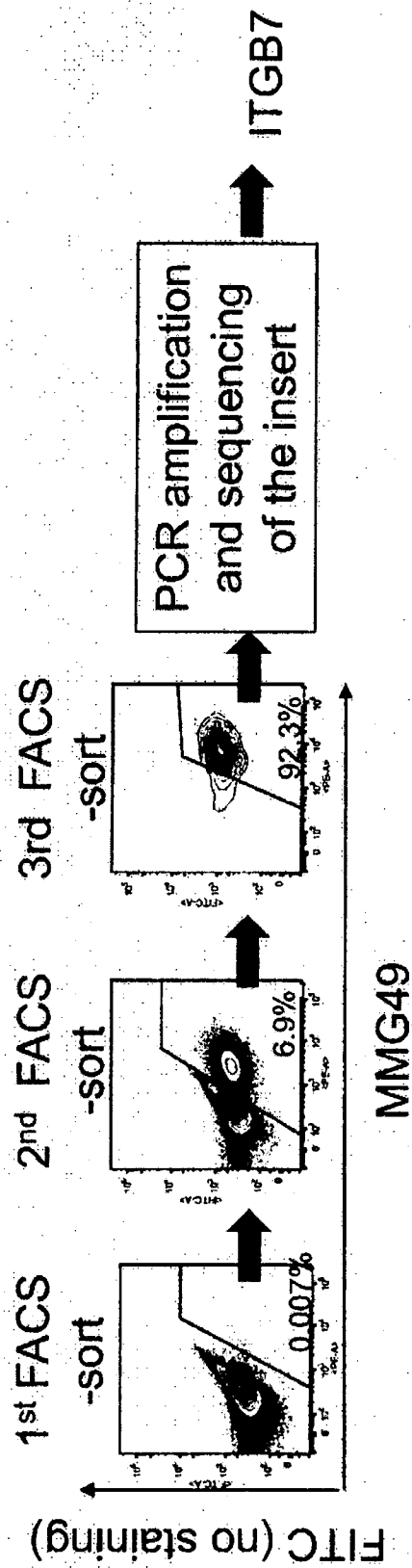
[図1]



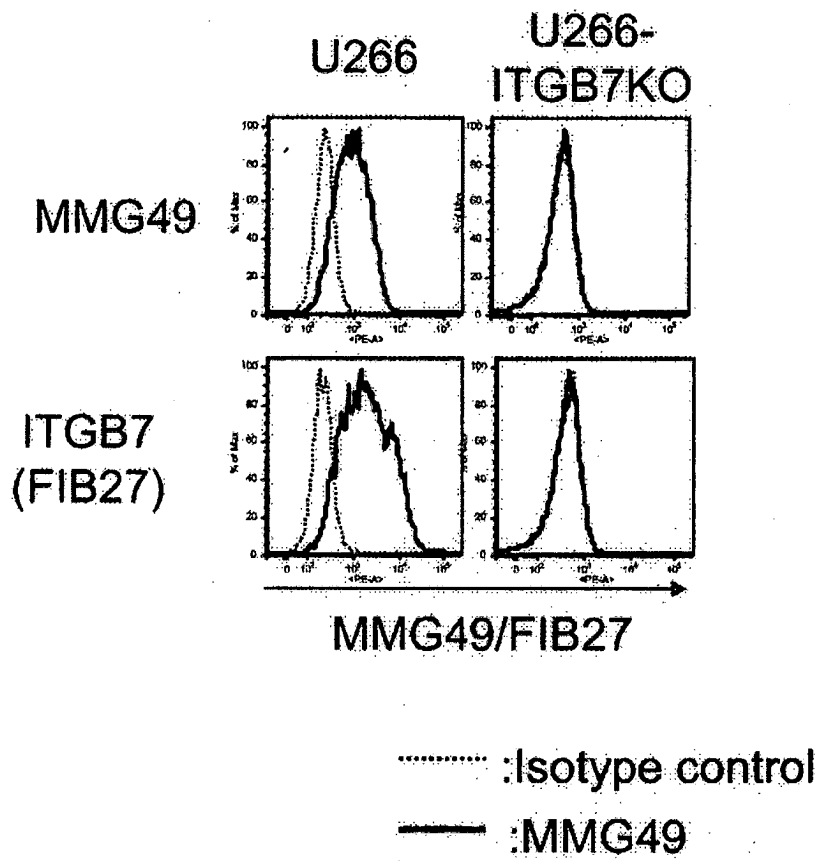
[図2]



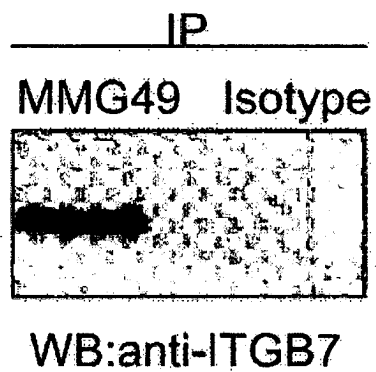
[图3]



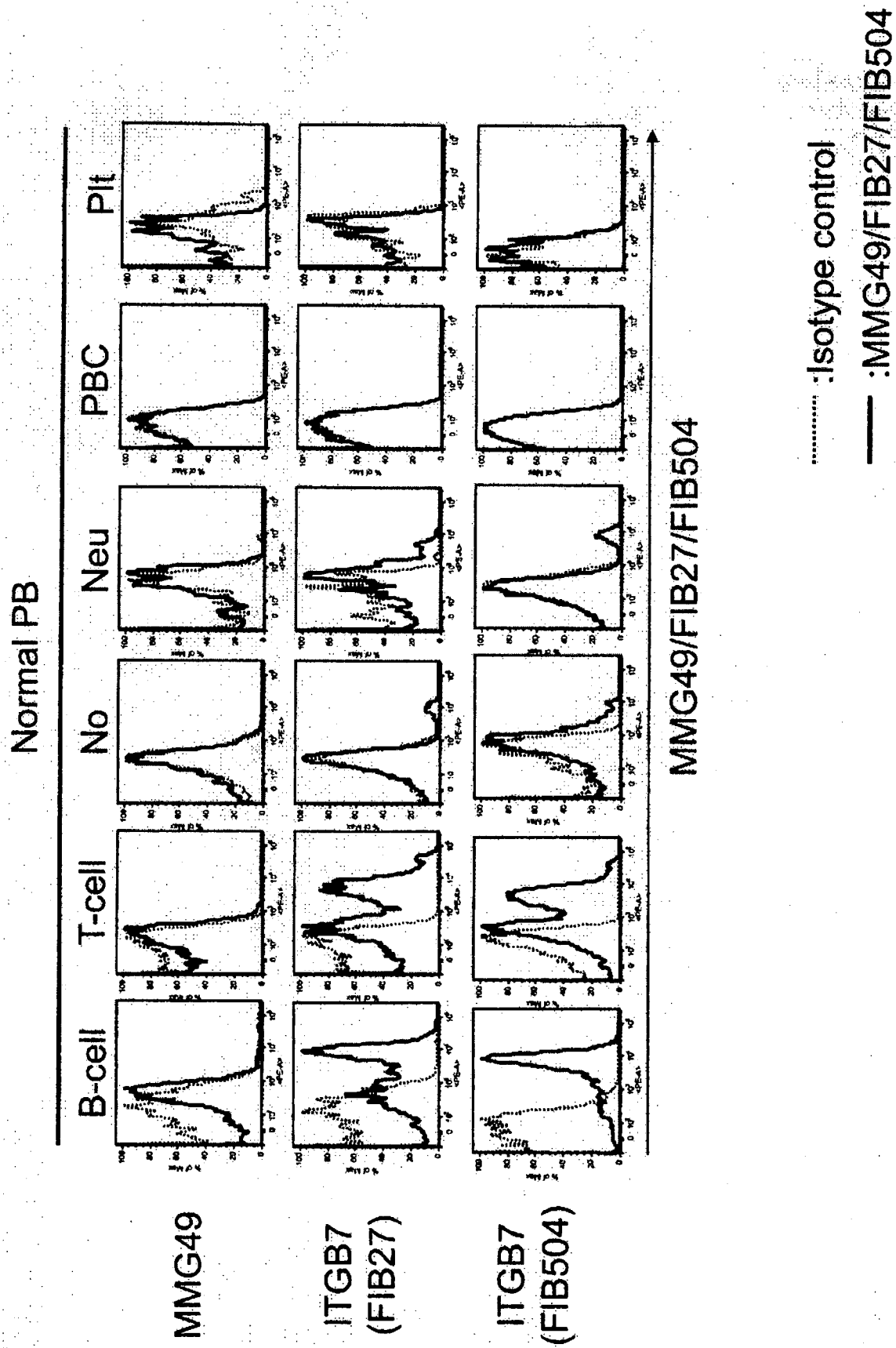
[図4]



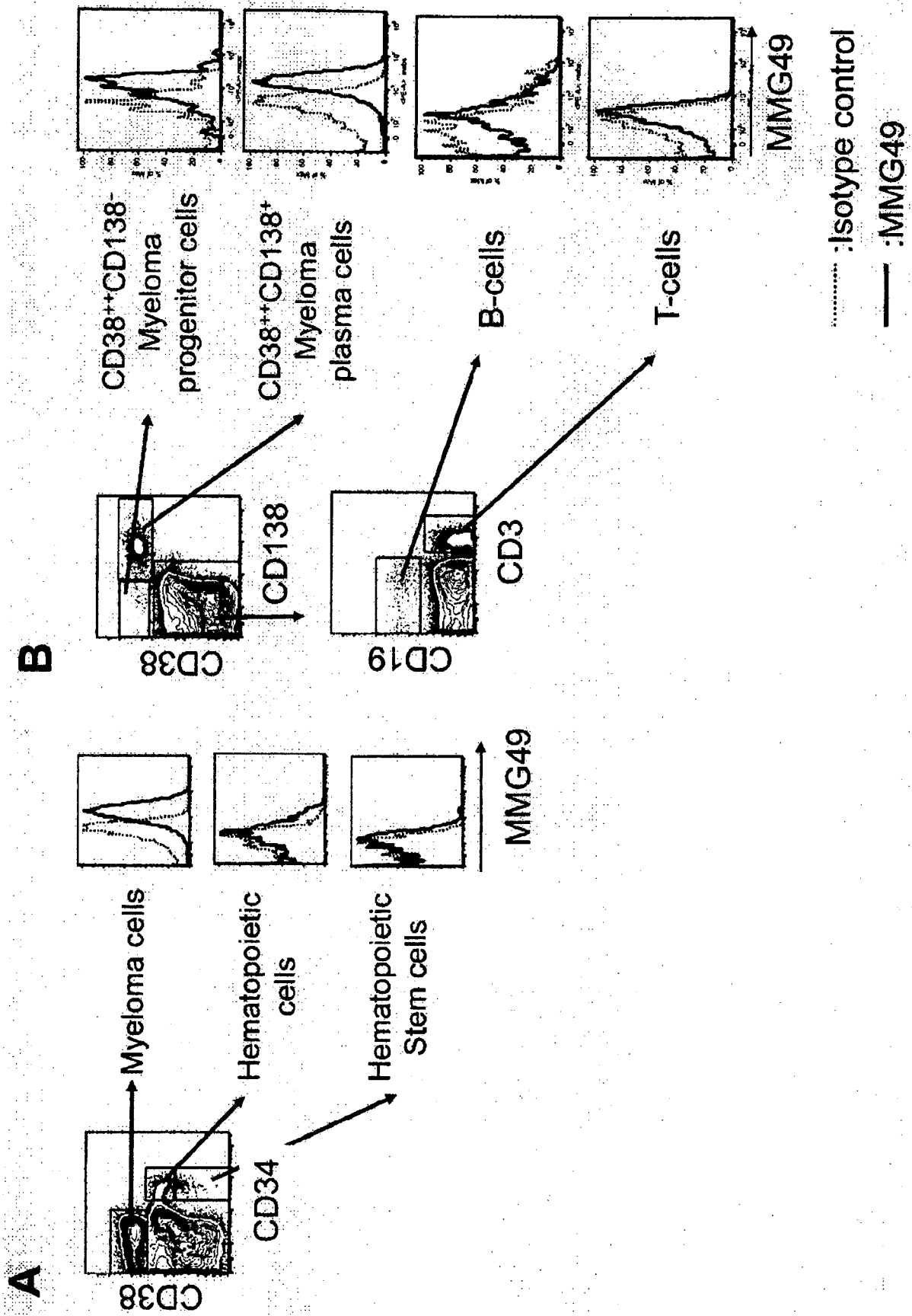
[図5]



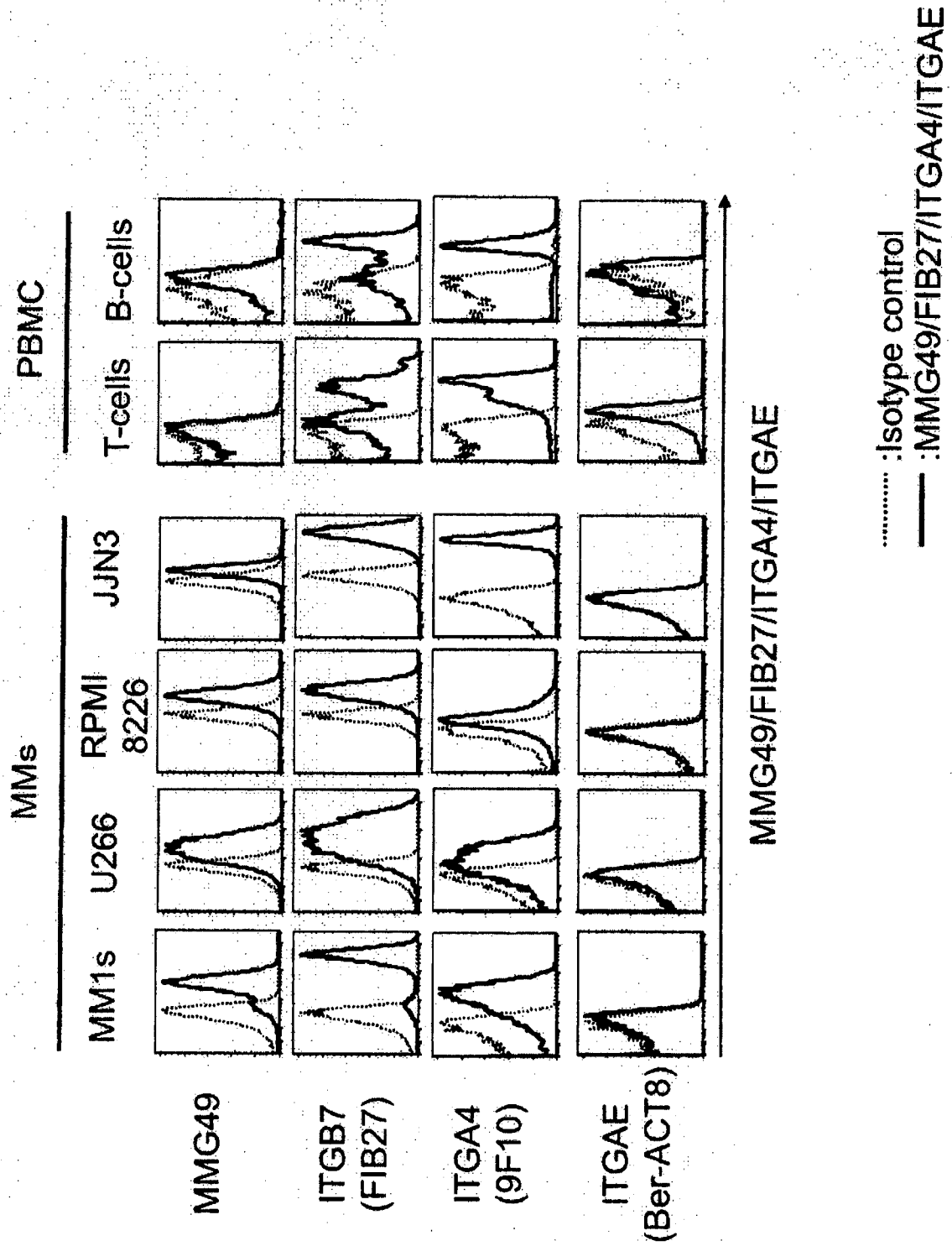
[図6]



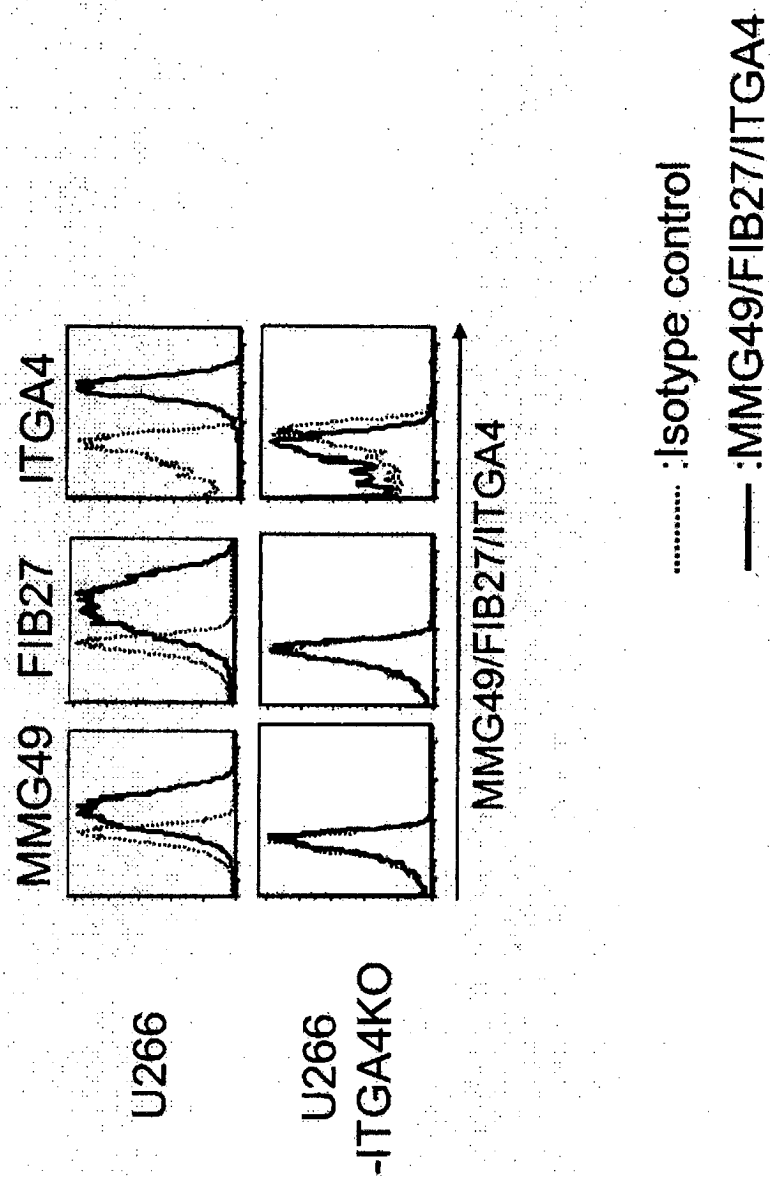
[図7]



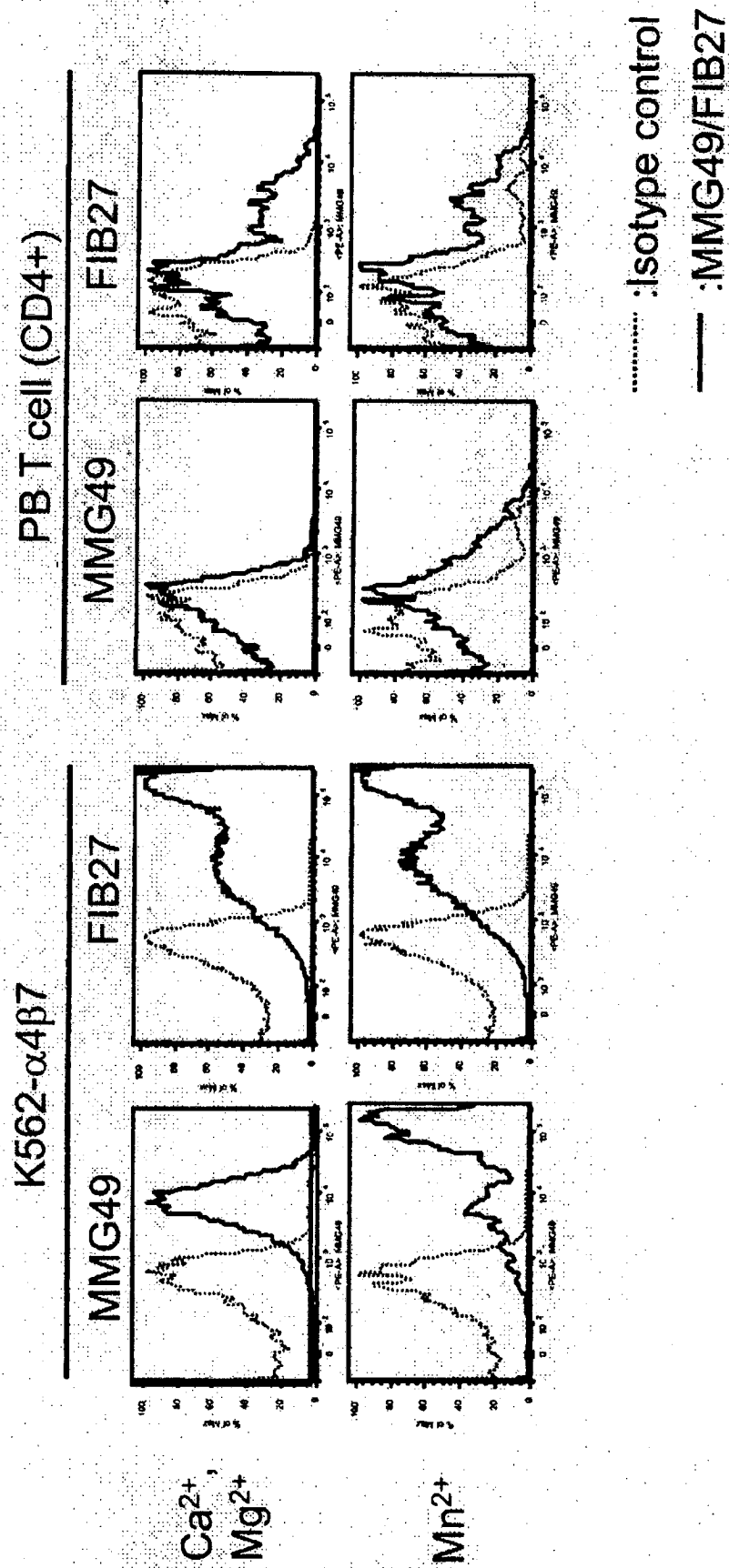
[図8]



[図9]



[図10]



[図11]

Integrin $\beta 7$

1	20	97	149	391	476	513	561	598	643	727	747	798
signal	PSI	Hybrid	β I domain		Hybrid	I-EGF	I-EGF	I-EGF	I-EGF	β -tail domain	TM	cyto-plasmic
						1	2	3	4			

MMG49 Antibody

Reactivity

human

#4927	+++											
#4944	+											
#4945	+											
#4946	-											
#4947	-											
#4959	+											
#4960	++											
#4961	+++											

mouse

human

417

564

722

110

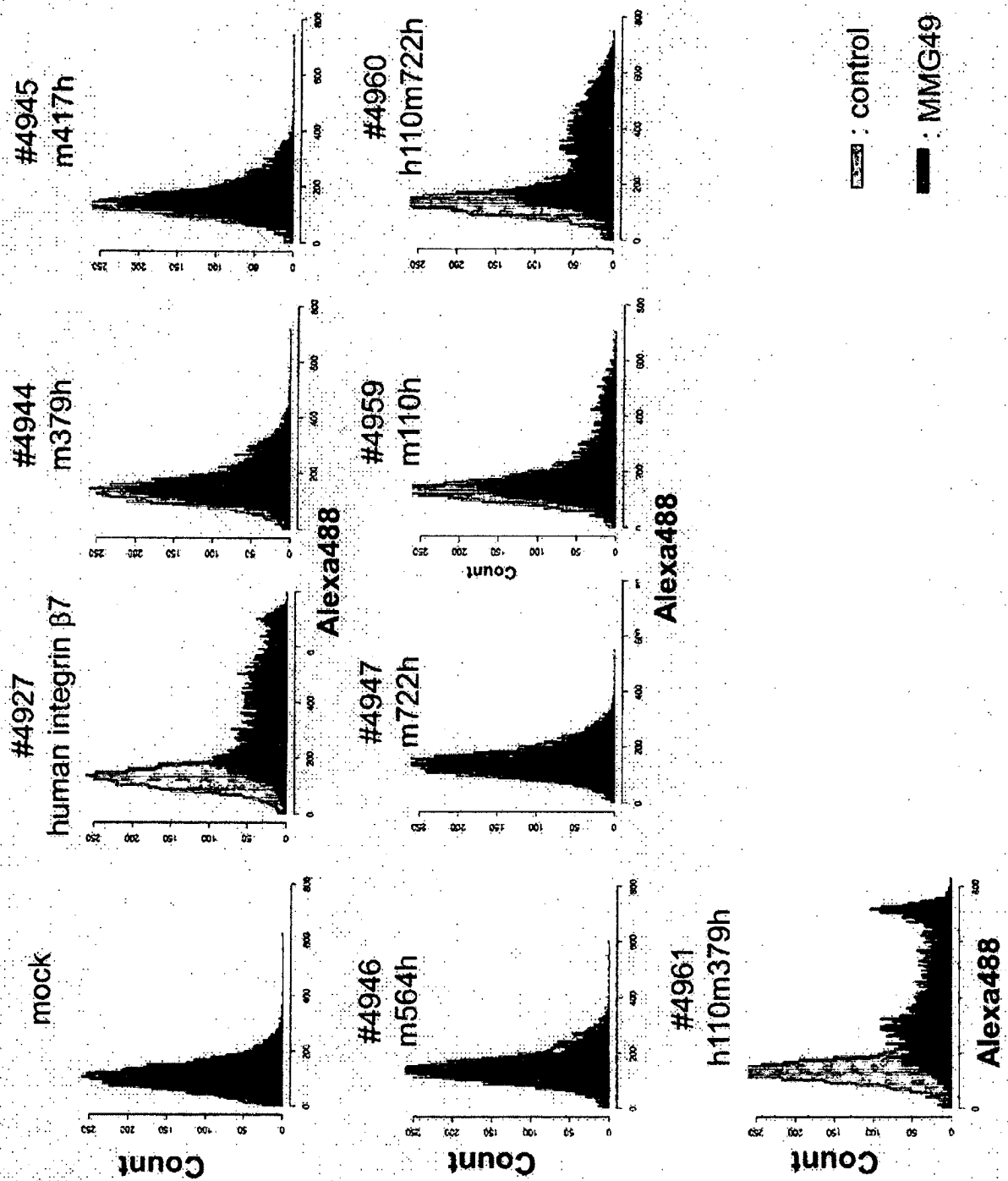
110

722

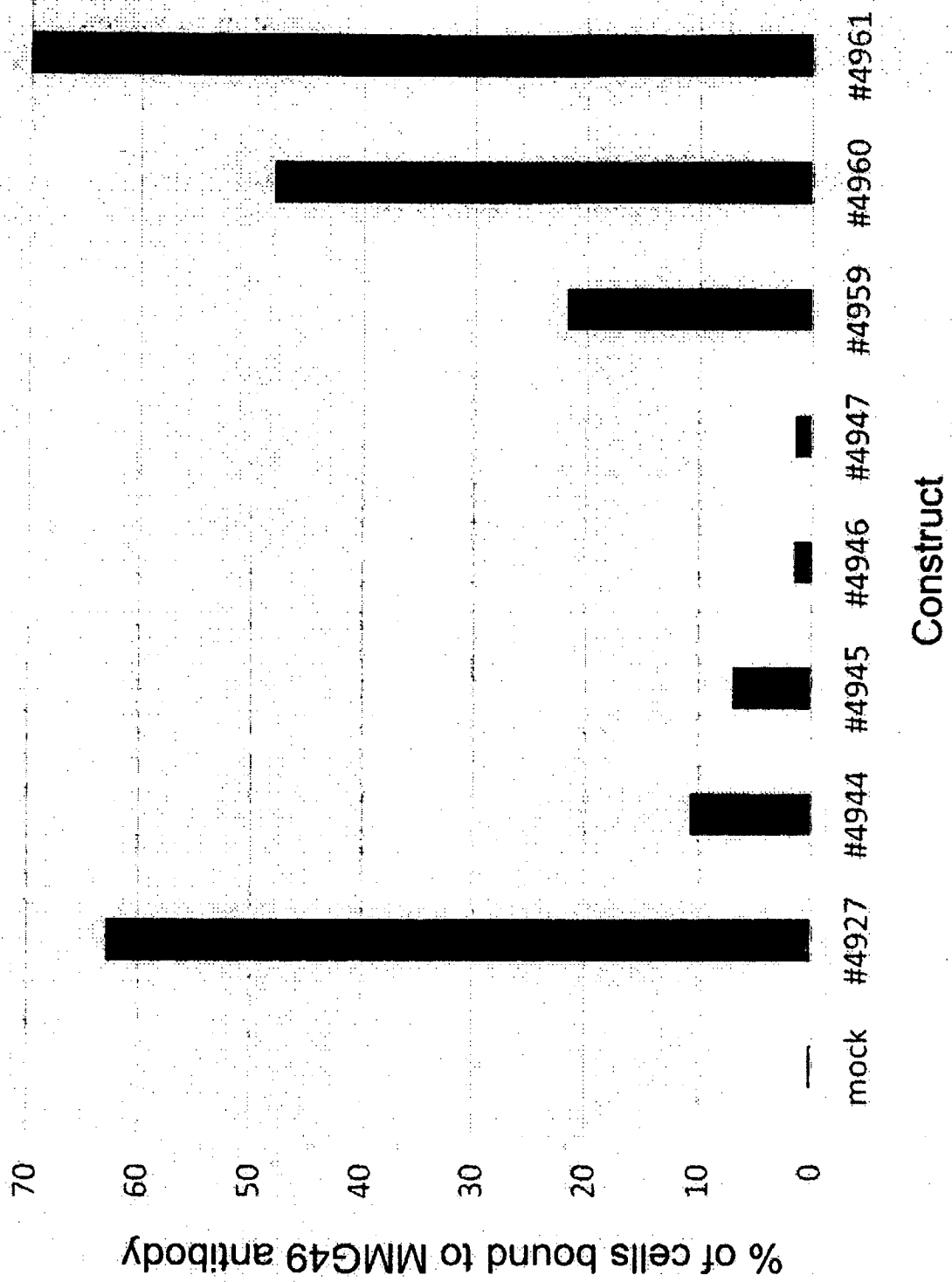
379

110

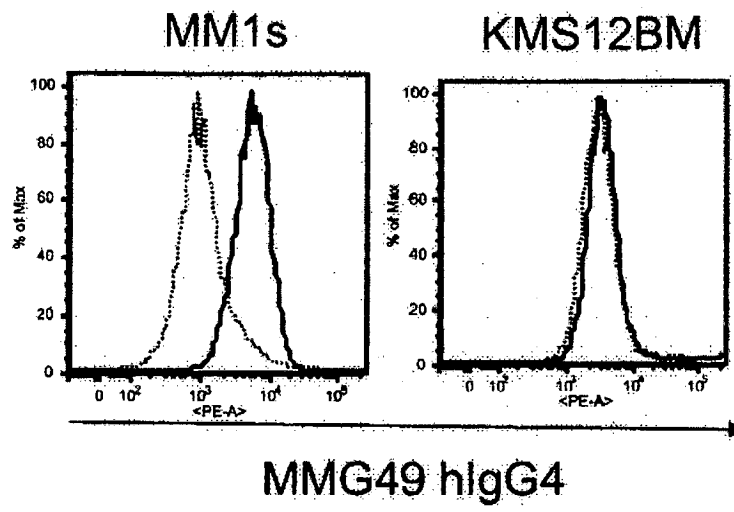
[図12]



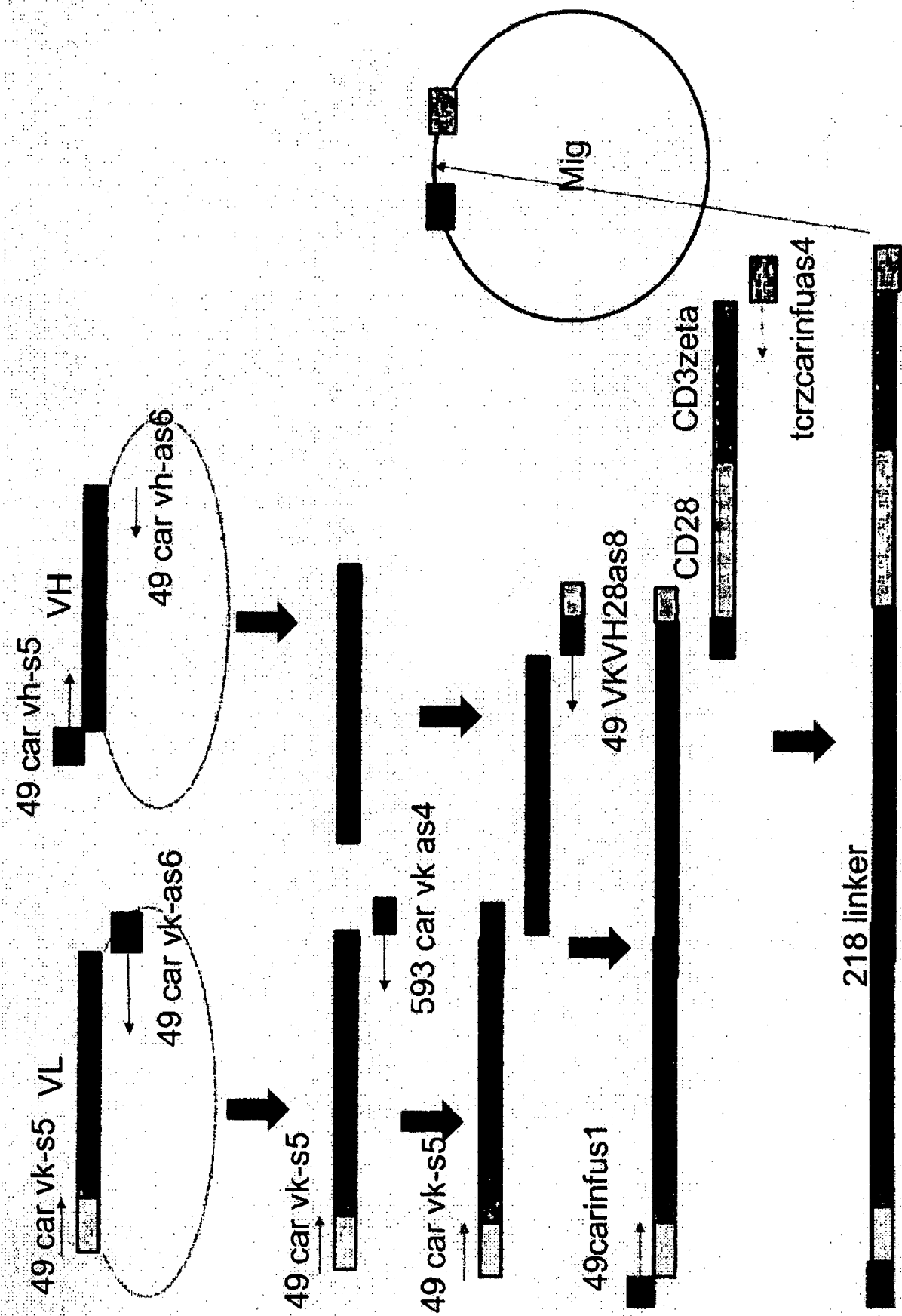
[図13]



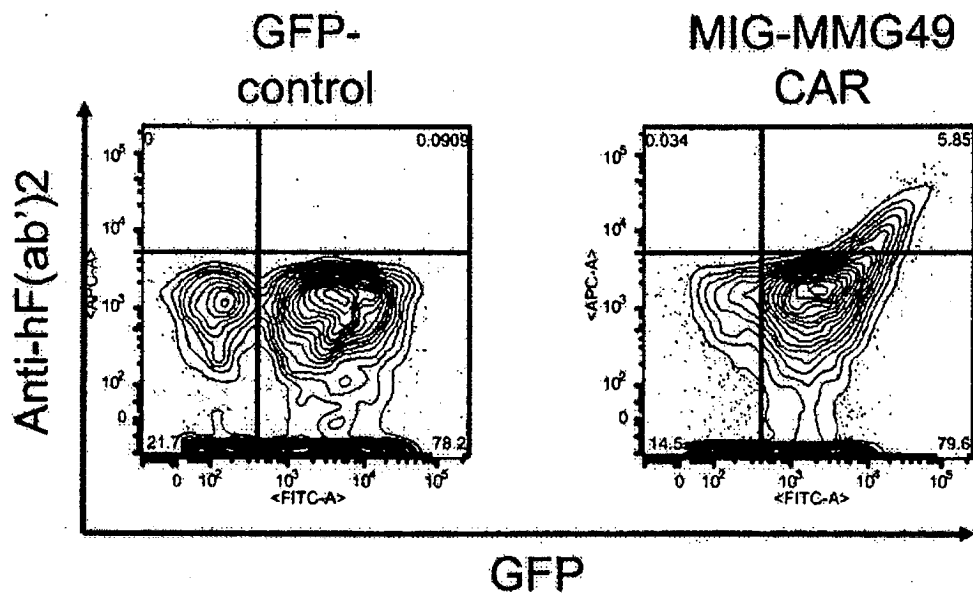
[図14]



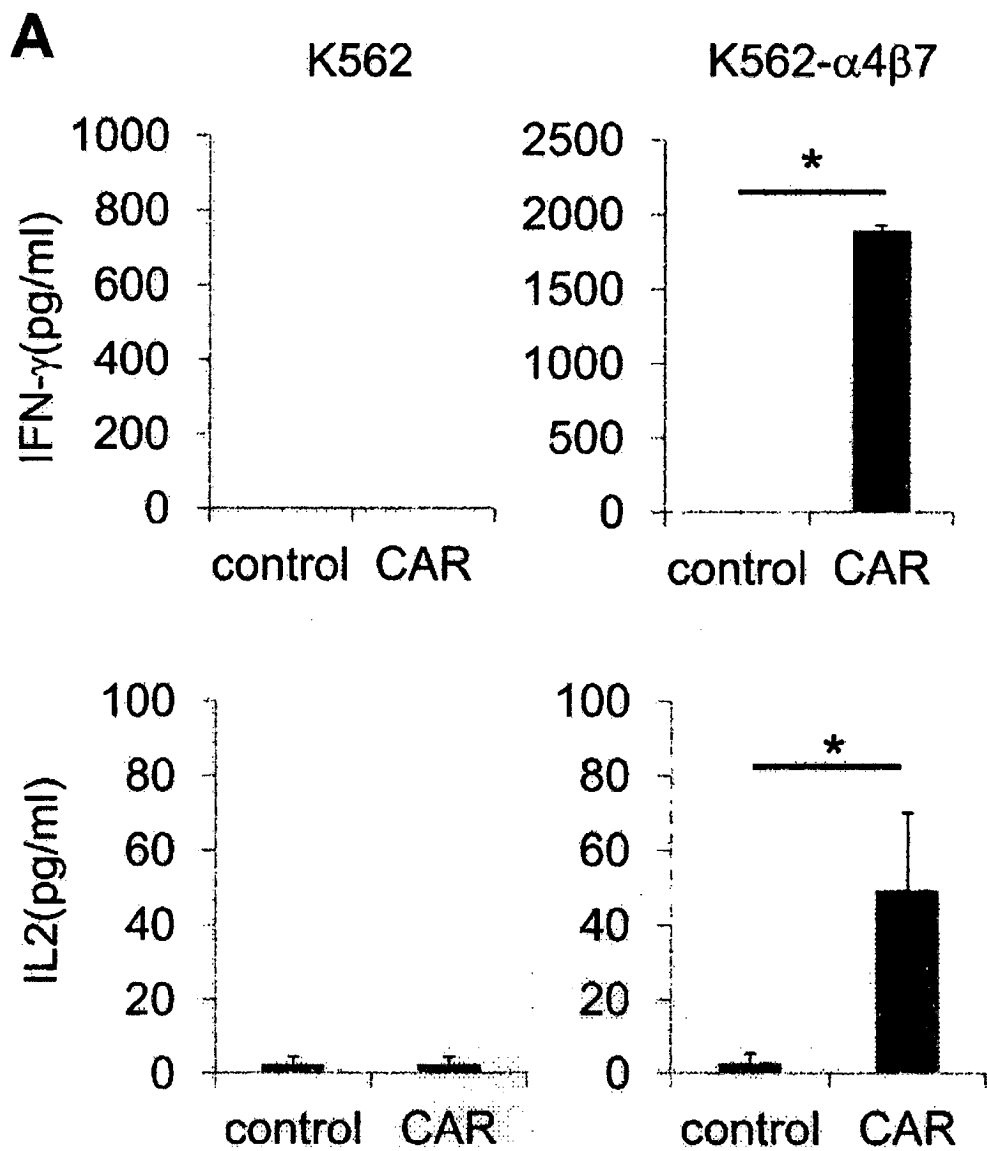
[図15]



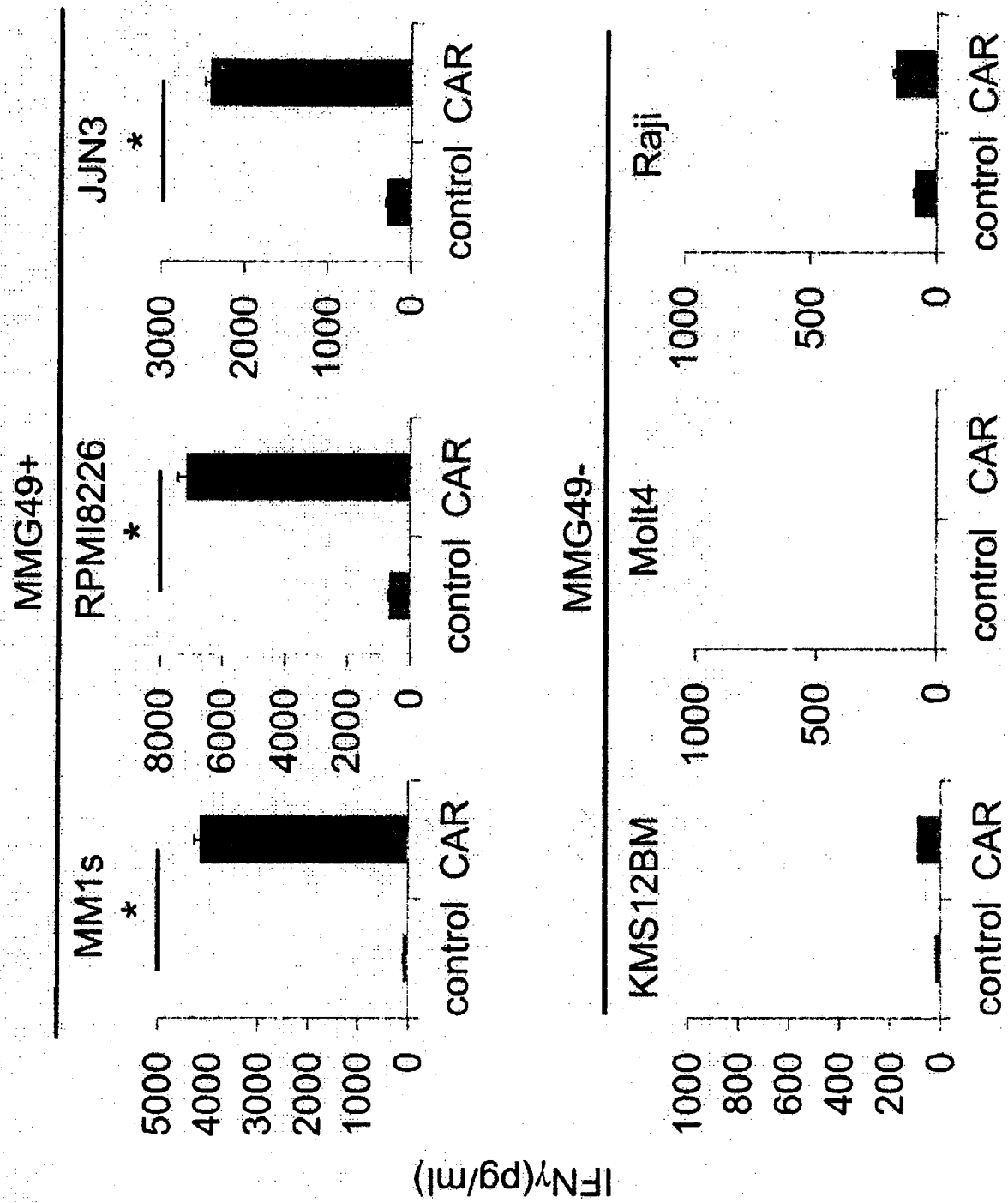
[図16]



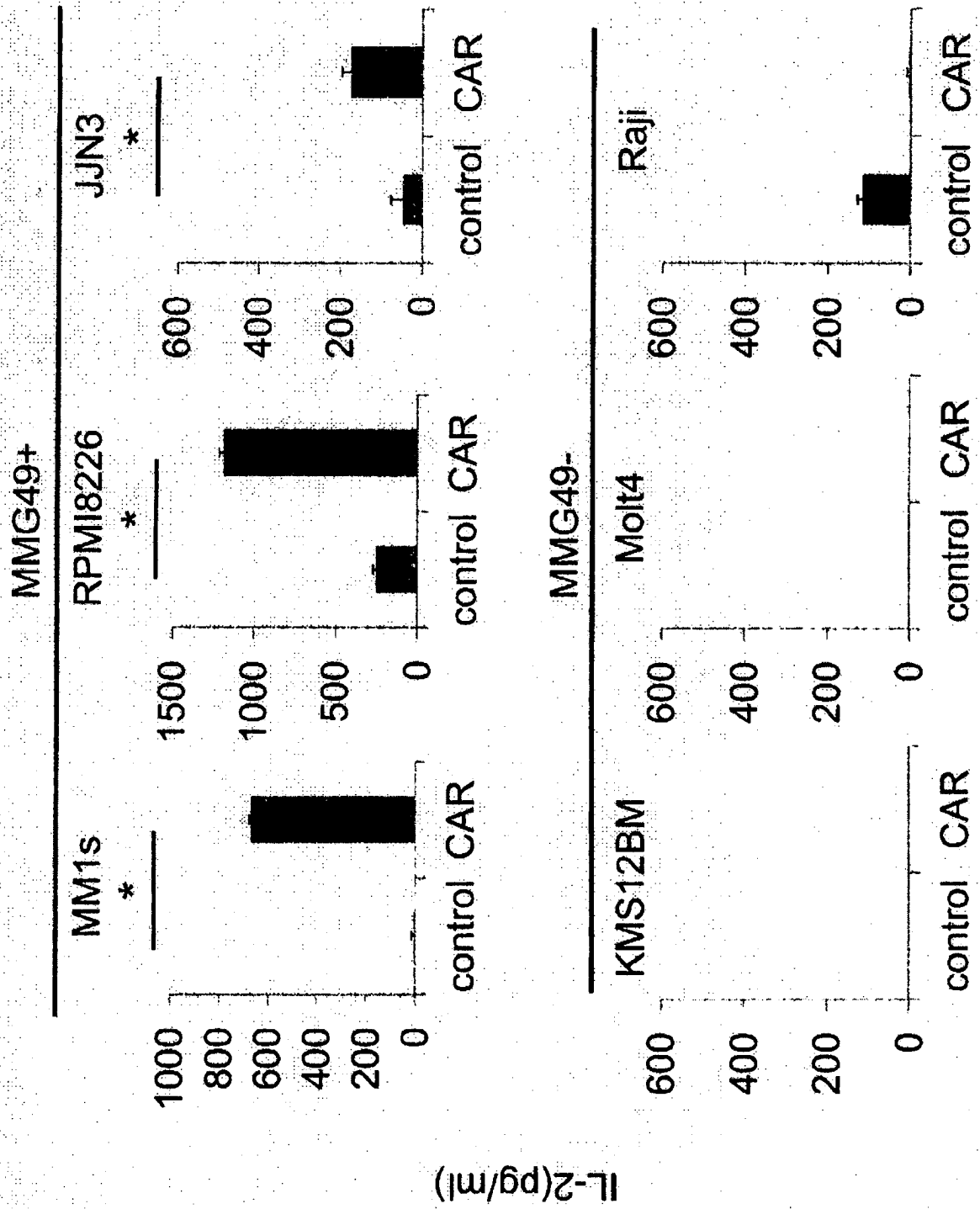
[図17]



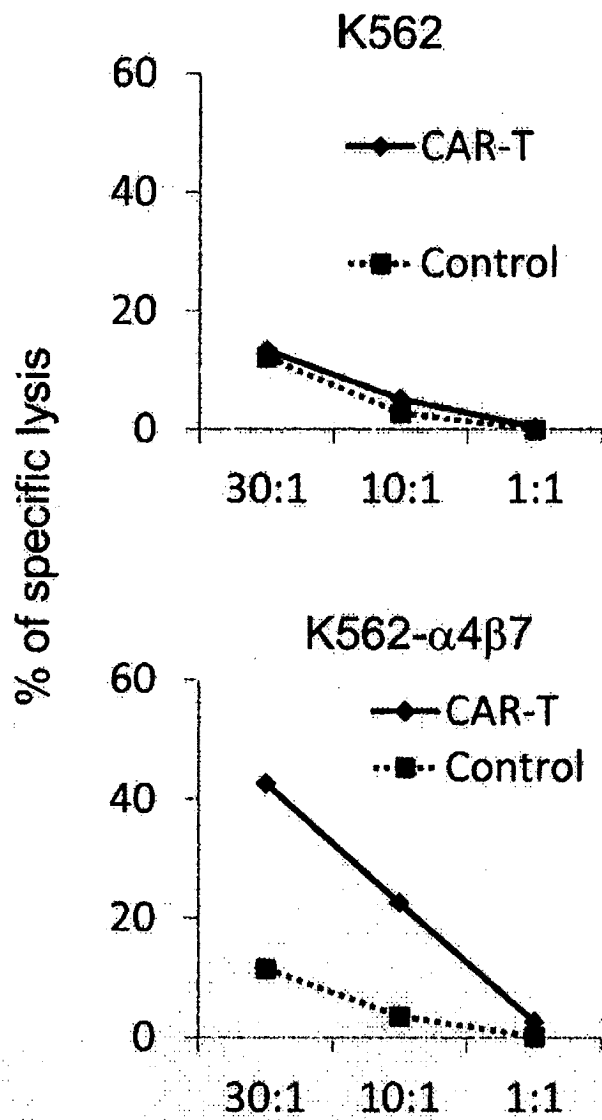
[図18]



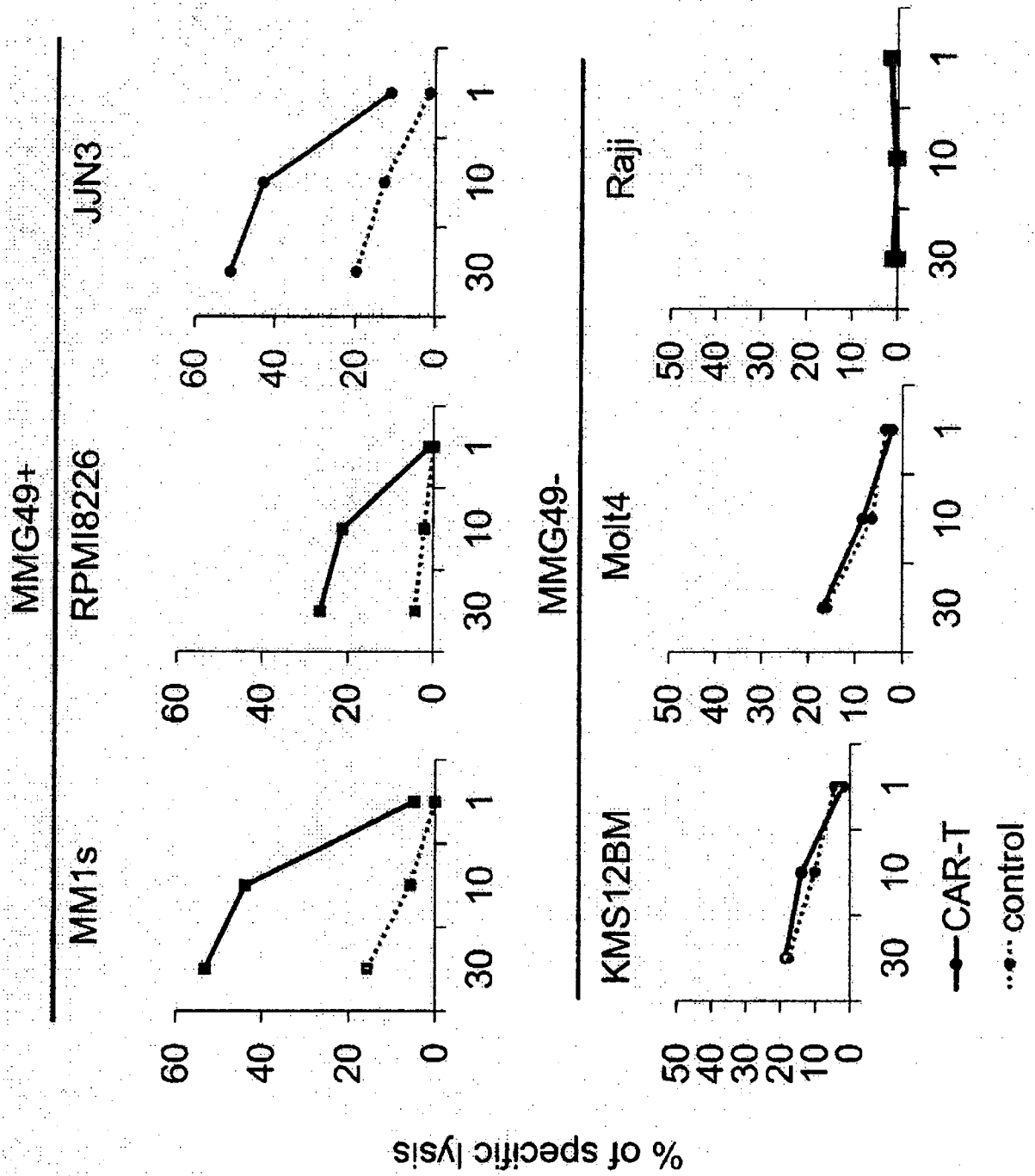
[図19]



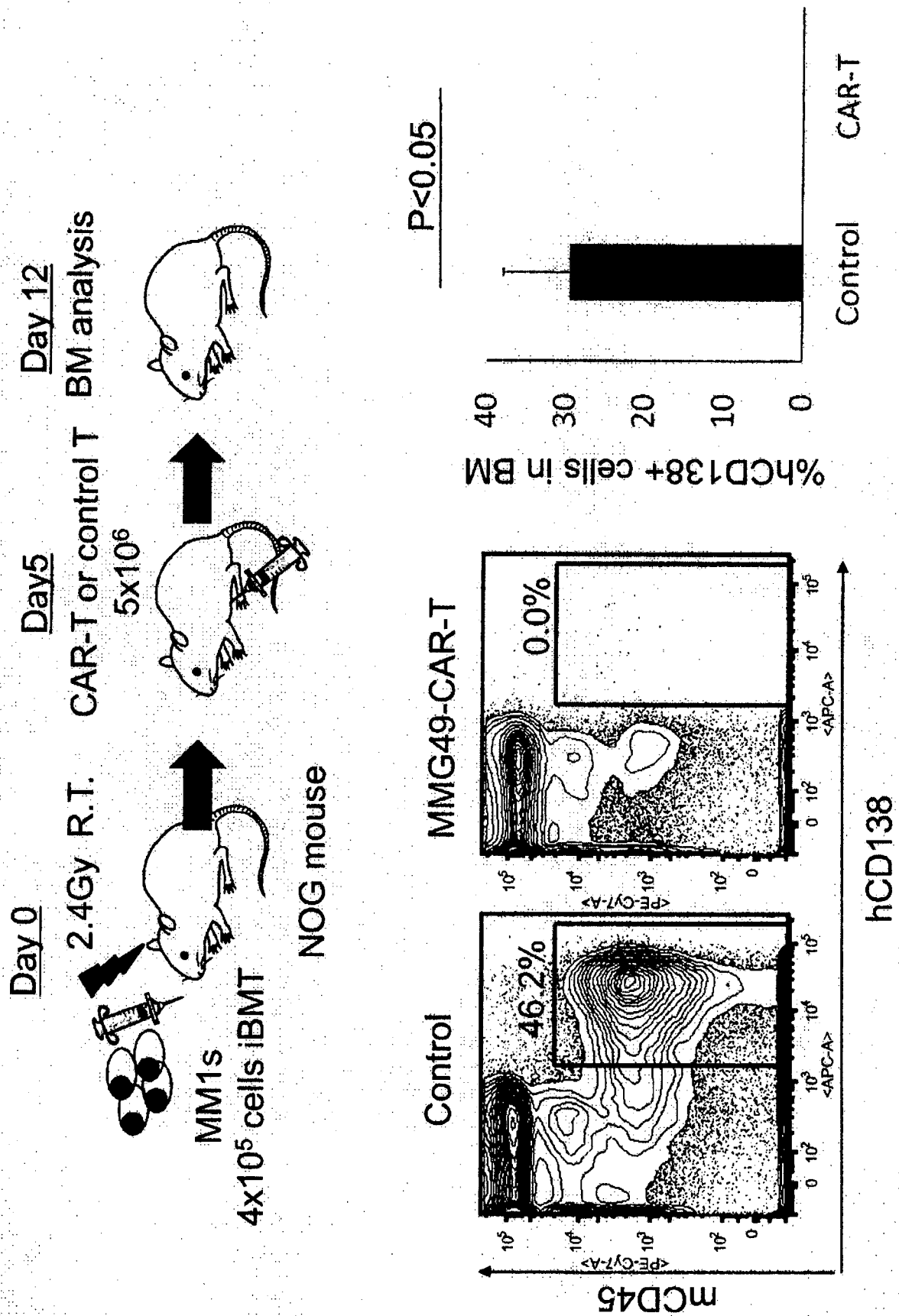
[図20]



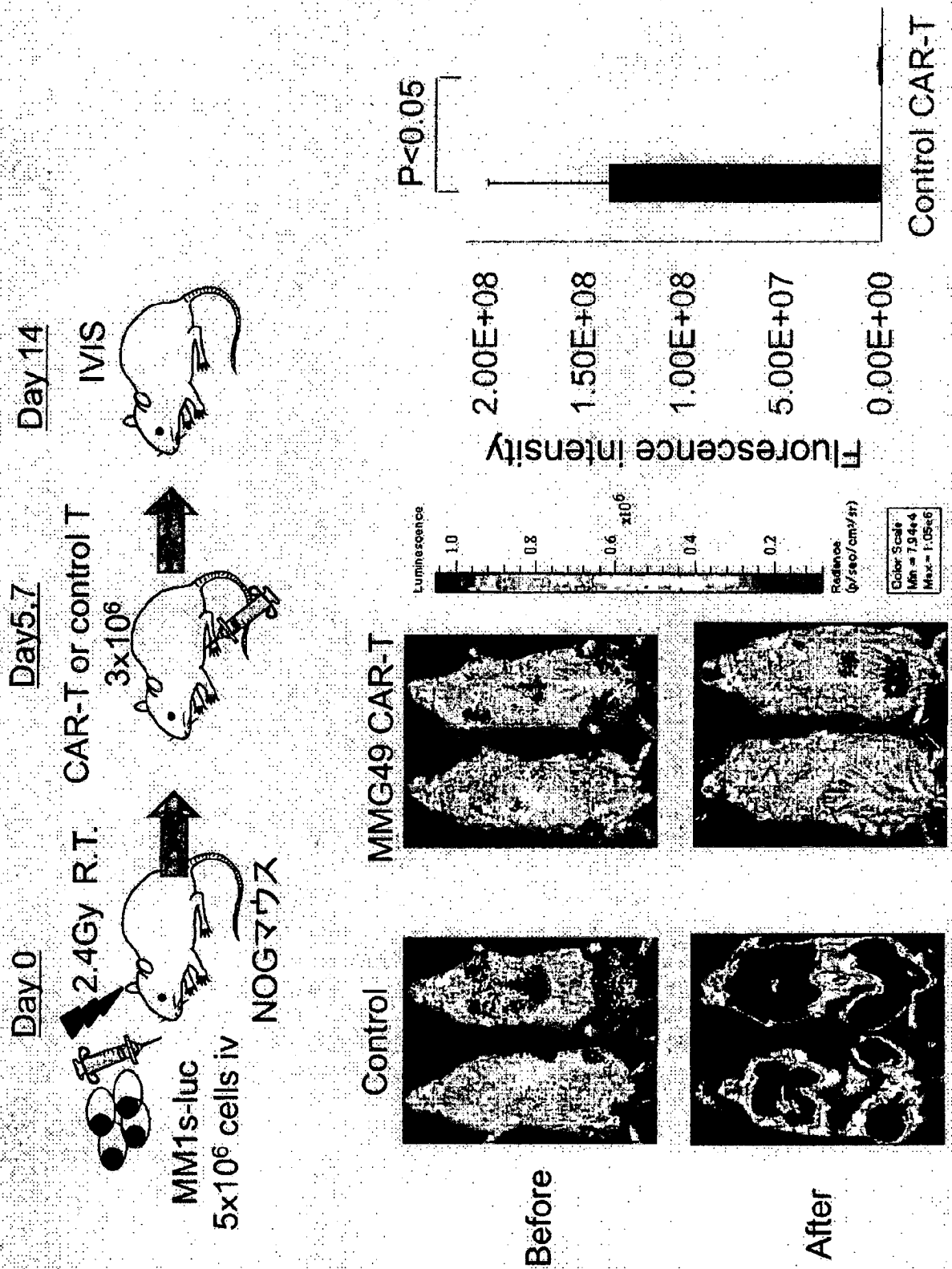
[図21]



[図22]



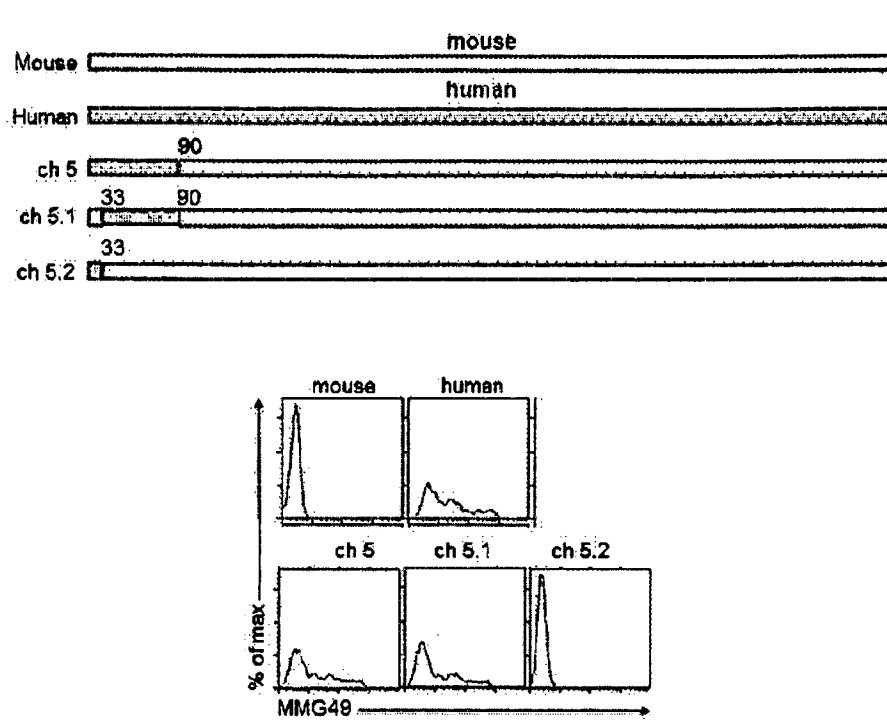
[図23]



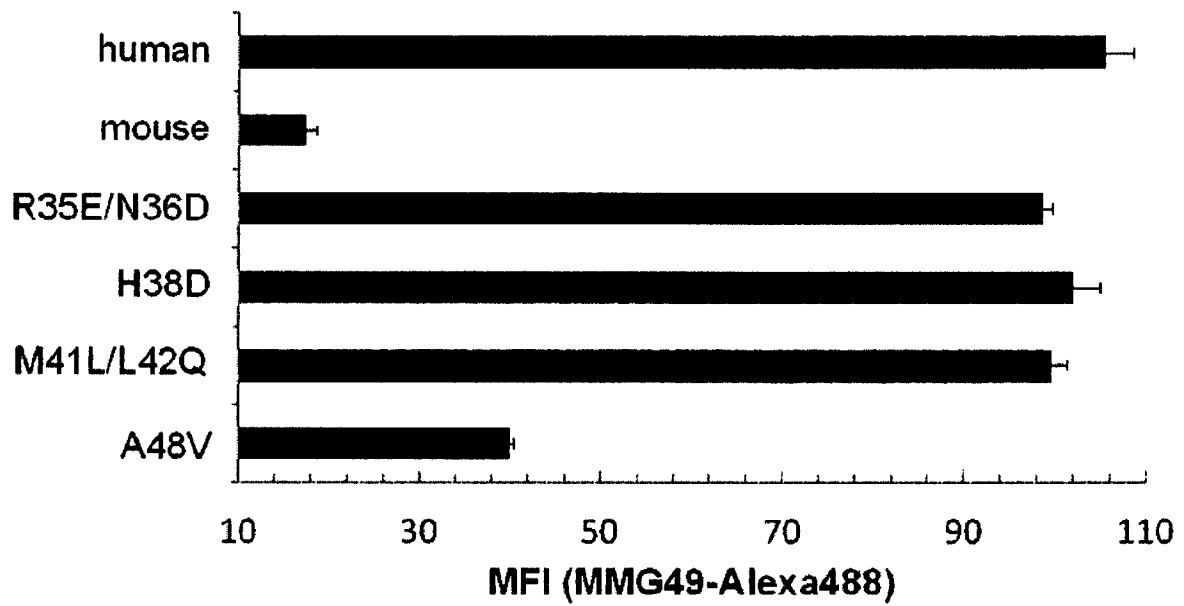
Alignment: human vs. mouse $\beta 7$ integrin

[illegible]

[図25]



[図26]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/30(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

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)

C12N15/09, A61K35/17, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/30, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII), CAPLUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	TIDSWELL, M., et al., Structure-function analysis of the integrin beta 7 subunit: identification of domains involved in adhesion to MADCAM-1, J. Immunol., 1997, vol.159, no.3, p.1497-1505, ISSN 0022-1767, particularly, Abstract, p.1500-1501, FIGURE 3., FIGURE 7., Table I., Table II.	1,3,7,8 1-10,12-15 11
X Y A	Anti-Integrin beta 7 antibody [EP5948] (ab137058), abcam [online], [retrieved 2016.10.18], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.abcam.com/integrin-beta-7-antibody-ep5948-ab137058.html>, entire text	1 1-10,12-15 11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
19 October 2016 (19.10.16)

Date of mailing of the international search report
01 November 2016 (01.11.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072688

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	KRISSANSEN, GW., et al., Immunologic and structural relatedness of the integrin beta 7 complex and the human intraepithelial lymphocyte antigen HML-1, FEBS Lett., 1992, vol.296, no.1, p.25-28, ISSN 0014-5793, particularly, Abstract, MATERIALS AND METHODS	1 1-10,12-15 11
Y A	JP 6-303990 A (Kanebo, Ltd.), 01 November 1994 (01.11.1994), claims; paragraph [0020]; examples (Family: none)	1-10,12-15 11
Y A	JP 2015-513394 A (Seattle Children's Hospital d/b/a Seattle Children's Research Institute), 14 May 2015 (14.05.2015), claims; examples; fig. 1 & WO 2013/123061 A1 claims; examples; fig. 1 & US 2015/0038684 A1 & EP 2814846 A1	1-10,12-15 11
A	JP 2001-507210 A (Millenium Pharmaceuticals, Inc.), 05 June 2001 (05.06.2001), claims; examples & WO 1998/006248 A2 claims; examples & US 7147851 B1 & EP 918797 A2	1-15
A	CN 103374073 A (Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS), 30 October 2013 (30.10.2013), claims; paragraphs [0042], [0043] (Family: none)	1-15
A	GOTO, T., et al., A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells, Blood, 1994, vol.84, no.6, p.1922-1930, ISSN 0006-4971, particularly, Abstract, MATERIALS AND METHODS, RESULTS	1-15
A	JP 6-086688 A (Michio KONO), 29 March 1994 (29.03.1994), claims; examples (Family: none)	1-15
A	JP 2003-508355 A (Molecular Discoveries, L.L.C.), 04 March 2003 (04.03.2003), claims; examples & WO 2001/012674 A1 claims; examples & US 6376654 B1 & EP 1204683 A1	1-15

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i,
C07K16/30(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A61K35/17, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/30, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21,
C12N5/10

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII)、CAplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN)、WPIDS/WPIX (STN)、
GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq、UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X	TIDSWELL, M., et al., Structure-function analysis of the integrin beta 7 subunit: identification of domains involved in adhesion to MAdCAM-1, J. Immunol., 1997, vol.159, no.3, p.1497-1505, ISSN 0022-1767, 特に Abstract, p.1500-1501, FIGURE 3., FIGURE 7., Table I., Table II.	1, 3, 7, 8
Y		1-10, 12-15
A		11

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☑ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

19. 10. 2016

国際調査報告の発送日

01. 11. 2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)
郵便番号100-8915
東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

森井 文緒

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

3765

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X Y A	Anti-Integrin beta 7 antibody [EP5948] (ab137058), abcam [online], [retrieved 2016. 10. 18], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.abcam.com/integrin-beta-7-antibody-ep5948-ab137058.html >, 全文	1 1-10, 12-15 11
X Y A	KRISSANSEN, GW., et al., Immunologic and structural relatedness of the integrin beta 7 complex and the human intraepithelial lymphocyte antigen HML-1, FEBS Lett., 1992, vol.296, no.1, p. 25-28, ISSN 0014-5793, 特に Abstract, MATERIALS AND METHODS	1 1-10, 12-15 11
Y A	JP 6-303990 A (鐘紡株式会社) 1994. 11. 01, 特許請求の範囲, 段落[0020], 実施例 (ファミリーなし)	1-10, 12-15 11
Y A	JP 2015-513394 A (シアトル チルドレンズ ホスピタル ドウー イング ビジネス アズ シアトル チルドレンズ リサーチ イ ンスティテュート) 2015. 05. 14, 特許請求の範囲, 実施例, 図 1 & WO 2013/123061 A1, 特許請求の範囲, 実施例, 図 1 & US 2015/0038684 A1 & EP 2814846 A1	1-10, 12-15 11
A	JP 2001-507210 A (ミレニアム ファーマシューティカルズ, イン コーポレイテッド) 2001. 06. 05, 特許請求の範囲, 実施例 & WO 1998/006248 A2, 特許請求の範囲, 実施例 & US 7147851 B1 & EP 918797 A2	1-15
A	CN 103374073 A (中国科学院上海生命科学研究院) 2013. 10. 30, 特許請求の範囲, 段落[0042], [0043] (ファミリーなし)	1-15
A	GOTO, T., et al., A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells, Blood, 1994, vol. 84, no. 6, p. 1922-1930, ISSN 0006-4971, 特に Abstract, MATERIALS AND METHODS, RESULTS	1-15

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
A	JP 6-086688 A (河野 道生) 1994. 03. 29, 特許請求の範囲, 実施例 (ファミリーなし)	1-15
A	JP 2003-508355 A (モレキュラー・ディスカヴァリーズ・エルエル シー) 2003. 03. 04, 特許請求の範囲, 実施例 & WO 2001/012674 A1, 特許請求の範囲, 実施例 & US 6376654 B1 & EP 1204683 A1	1-15



(11)

EP 3 336 184 A1

(12)

EUROPEAN PATENT APPLICATION

published in accordance with Art. 153(4) EPC

(43) Date of publication:

20.06.2018 Bulletin 2018/25

(51) Int Cl.:

C12N 15/09 ^(2006.01) **A61K 35/17** ^(2015.01)
A61K 39/395 ^(2006.01) **A61P 35/00** ^(2006.01)
C07K 16/30 ^(2006.01) **C07K 19/00** ^(2006.01)
C12N 1/15 ^(2006.01) **C12N 1/19** ^(2006.01)
C12N 1/21 ^(2006.01) **C12N 5/10** ^(2006.01)

(21) Application number: **16835028.8**

(22) Date of filing: **02.08.2016**

(86) International application number:

PCT/JP2016/072688

(87) International publication number:

WO 2017/026331 (16.02.2017 Gazette 2017/07)

(84) Designated Contracting States:

**AL AT BE BG CH CY CZ DE DK EE ES FI FR GB
GR HR HU IE IS IT LI LT LU LV MC MK MT NL NO
PL PT RO RS SE SI SK SM TR**

Designated Extension States:

BA ME

Designated Validation States:

MA MD

• **SUGIYAMA, Haruo**

Suita-shi

Osaka 565-0871 (JP)

• **KUMANOGOH, Atsushi**

Suita-shi

Osaka 565-0871 (JP)

• **TAKAGI, Junichi**

Suita-shi

Osaka 565-0871 (JP)

(30) Priority: **11.08.2015 JP 2015159240**

(71) Applicant: **Osaka University**

Suita-shi, Osaka 565-0871 (JP)

(74) Representative: **Hoffmann Eitle**

Patent- und Rechtsanwälte PartmbB

Arabellastraße 30

81925 München (DE)

(72) Inventors:

• **HOSEN, Naoki**

Suita-shi

Osaka 565-0871 (JP)

(54) **ANTIBODY**

(57) Provided is an active ingredient of a pharmaceutical composition for treating myeloma. Specifically, provided is an antibody whose epitope is present in the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of human integrin β_7 .

EP 3 336 184 A1

Description

Technical Field

5 [0001] A novel antibody, a use thereof, and the like are disclosed.

Background Art

10 [0002] Multiple myeloma, which is a typical example of a disease causing neoplastic growth of plasma cells, accounts for about 1% of all cancers, and accounts for a little more than 10% of all hematological malignant tumors. Multiple myeloma is a disease in which a plasma cell present in bone marrow becomes cancerous (becomes an abnormal plasma cell as a result) and undergoes monoclonal growth.

15 [0003] In multiple myeloma, abnormal plasma cells (myeloma cells) spread to the bone marrow throughout the body and grow in every part of the bone marrow throughout the entire body. When the abnormal plasma cells grow, various symptoms including bone breakage appear. The myeloma cells produce M protein, which is an abnormal immunoglobulin, to increase an M protein concentration in blood, and hence the blood becomes viscous.

20 [0004] The M protein does not function as an original antibody, which recognizes a foreign substance, such as a pathogen, which has entered the body. Accordingly, immunocompetence is reduced. Those phenomena affect many organs, and thus various symptoms occur. Typical symptoms are bone pain and damage, hypercalcaemia, nephropathy and renal failure, anemia, and the like.

[0005] At present, as treatment of multiple myeloma, proteasome inhibitors, iMIDs, such as thalidomide and a derivative thereof, specifically lenalidomide, and chemotherapy using, for example, melphalan in combination with prednisone, and hematopoietic stem cell transplantation are mainly employed.

25 [0006] However, the myeloma cells eventually acquire resistance to those therapeutic agents in most cases. Accordingly, the reality of the current treatment means is that a myeloma patient has an unpromising prognosis with a mean survival period after onset of from about 3 years to about 5 years. In addition, those therapeutic agents do not specifically act on only tumor cells serving as targets, and hence have a problem of showing toxicity also to normal cells, consequently causing serious side effects.

30 [0007] There have been attempts to develop a treatment method for multiple myeloma utilizing a monoclonal antibody. For example, an anti-CS1 antibody, and an anti-CD38 antibody, and the like are considered promising (Non Patent Literatures 1 and 2). In addition, in Patent Literature 1, there is disclosed a therapeutic agent for multiple myeloma or the like, which uses an anti-human CD48 monoclonal antibody as an active ingredient.

[0008] Integrins mainly form a heterodimer of an α -chain and a β -chain to serve a function as a receptor on a cell surface in a living body. There are many combinations of α -chains and β -chains of such integrins.

35 [0009] In addition, in Non Patent Literatures 4 to 6, there are disclosed chimeric antigen receptor T-cells (CAR-T cells) including an antigen recognition site having an affinity for a certain antigen.

Citation List

40 Patent Literature

[0010] PTL 1: WO 2010/117059 A1

Non-patent Literature

45

[0011]

NPL 1: Journal of Clinical Oncology, 2012 Jun 1; 30(16): 1953-9.

NPL 2: Journal of immunology, 2011 Feb 1; 186(3): 1840-8.

50 NPL 3: J Biol Chem. 2012 May 4; 287(19): 15749-59.

NPL 4: J Immunol. 2009 Nov 1; 183(9): 5563-74.

NPL 5: N Engl J Med. 2014 Oct 16; 371(16): 1507-17.

NPL 6: Nat Biotechnol. 2002 Jan; 20(1): 70-5.

55

Summary of Invention

Technical Problem

[0012] The anti-CSI antibody has relatively high specificity to myeloma cells. However, the antibody alone cannot be said to have a high anti-myeloma effect, and its effectiveness as a single agent has not been demonstrated in a clinical test. It has been found that the anti-tumor effect of the anti-CSI antibody is increased through combined use with lenalidomide, and it is considered that an approval is being sought for the combined use. Meanwhile, CD38 is also expressed in many normal blood cells including CD34-positive hematopoietic progenitor cells, and hence is an antigen having low specificity as a therapeutic target of multiple myeloma. Under such circumstances, an object of the present invention is to provide means that is more effective for the treatment of, for example, a disease involving neoplastic growth of plasma cells, such as multiple myeloma.

Solution to Problem

[0013] The inventors of the present invention have made extensive investigations in order to achieve such object, and as a result, have obtained an MMG49 antibody by performing screening through use of specific binding to myeloma cells and progenitors thereof as an indicator. In addition, the inventors have confirmed that such antibody binds to a certain region of human integrin β_7 , and have found that CAR-T cells generated using an antigen recognition site of such antibody are extremely useful for the treatment of myeloma. In addition, the inventors have also elucidated that an epitope of the MMG49 antibody is present in the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 .

[0014] The present invention has been completed on the basis of such findings, and encompasses inventions of a wide range of aspects described below.

(I) Antibody

[0015] An antibody (I) encompasses antibodies described in the following items (I-1) to (I-25).

(I-1) An anti-human integrin β_7 antibody, whose epitope is present in a region of the amino acid residue positions 20 to 109 of human integrin β_7 .

(1-1A) An antibody according to the item (I-1), whose epitope is present in a region of the amino acid residue positions 33 to 109 of the human integrin β_7 .

(1-1B) An antibody according to the item (I-1), whose epitope is present in a region of the amino acid residue positions 20 to 90 of the human integrin β_7 .

(1-1C) An antibody according to the item (I-1), whose epitope is present in a region of the amino acid residue positions 33 to 90 of the human integrin β_7 .

(1-2) An antibody according to the item (I-1), whose affinity for the epitope is increased in the presence of at least part of a region of the amino acid residue positions 379 to 721 of the human integrin β_7 .

(I-3) An antibody according to the item (I-2), whose affinity for the epitope is increased in the presence of at least part of a region of the amino acid residue positions 417 to 721 of the human integrin β_7 .

(I-4) An antibody according to the item (I-2), whose affinity for the epitope is increased in the presence of at least part of a region of the amino acid residue positions 564 to 721 of the human integrin β_7 .

(I-5) An antibody according to the item (I-2), whose affinity for the epitope is increased in the presence of at least part of a region of the amino acid residue positions 379 to 563 of the human integrin β_7 .

(I-6) An antibody according to the item (I-2), whose affinity for the epitope is increased in the presence of at least part of a region of the amino acid residue positions 417 to 563 of the human integrin β_7 .

(1-7) An antibody according to the item (I-2), whose affinity for the epitope is increased in the presence of at least part of a region of the amino acid residue positions 379 to 416 of the human integrin β_7 .

(I-8) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-7), whose affinity for the epitope is increased through activation of the human integrin β_7 .

(I-9) An anti-human integrin β_7 antibody, whose affinity for human integrin β_7 expressed on myeloma cells is higher than for human integrin β_7 expressed on normal cells.

(I-10) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-9), whose epitope is identical to that of an MMG49 antibody.

(I-11) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-10), the antibody including:
a heavy chain variable region including:

heavy-chain CDR1 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1;
heavy-chain CDR2 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2; and/or
heavy-chain CDR3 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 3; and/or

a light chain variable region including:

light-chain CDR1 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 6;
light-chain CDR2 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7; and/or
light-chain CDR3 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8.

(I-12) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-10), the antibody including:

a heavy chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4; and/or
a light chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9.

(I-13) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-12), which is Fv, scFv, a diabody, a triabody, a tetrabody, or a combination thereof.

(I-14) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-11), the antibody including a constant region.

(I-15) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-12) and (I-14), which is a chimeric antibody.

(I-16) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-12) and (I-14), which is a humanized antibody.

(I-17) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-12) and (I-14), which is a human antibody.

(I-18) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-12) and (I-14) to (I-17), which is an immunoglobulin, Fab, F(ab')₂, a minibody, scFv-Fc, or a combination thereof.

(I-19) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-12) and (I-14) to (I-18), which is IgA, IgD, IgE, IgG, or IgM.

(I-20) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-12) and (I-14) to (I-19), the antibody including a heavy chain having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5 and/or a light chain having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 10.

(I-21) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-20), which has cytotoxic activity.

(I-22) An antibody according to the item (I-21), in which the cytotoxic activity is ADCC activity and/or CDC activity.

(I-23) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-22), which is a multispecific antibody.

(I-24) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-23), which has a cytotoxin bound thereto.

(I-25) An antibody according to any one of the items (I-1) to (I-24), which is a monoclonal antibody.

(II) Polynucleotide

[0016] A polynucleotide (II) encompasses a polynucleotide described in the following item (II-1).

[0017] (II-1) A polynucleotide, which has a base sequence encoding the amino acid sequence of the antibody (I).

(III) Host Cell

[0018] A host cell (III) encompasses a host cell described in the following item (III-1) or (III-2).

(III-1) A host cell, which harbors the polynucleotide (II).

(III-2) A host cell according to the item (III-1), which is a eukaryotic cell.

(IV) Chimeric Antigen Receptor

[0019] A chimeric antigen receptor (IV) encompasses chimeric antigen receptors described in the following items (IV-1) to (IV-5).

(IV-1) A chimeric antigen receptor, whose epitope is identical to that of the antibody (I).

(IV-2) A chimeric antigen receptor according to the item (IV-1), the chimeric antigen receptor including an antigen recognition site of the antibody (I).

(IV-3) A chimeric antigen receptor according to the item (IV-1) or (IV-2), the antigen recognition site including:

a heavy chain variable region including:

heavy-chain CDR1 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1;

heavy-chain CDR2 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2; and/or
heavy-chain CDR3 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 3; and/or

a light chain variable region including:

light-chain CDR1 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 6;
light-chain CDR2 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7; and/or
light-chain CDR3 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8.

(IV-4) A chimeric antigen receptor according to any one of the items (IV-1) to (IV-3), in which the antigen recognition site includes:

a heavy chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4; and/or
a light chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9.

(IV-5) A chimeric antigen receptor according to any one of the items (IV-1) to (IV-4), the chimeric antigen receptor having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 21.

(V) Polynucleotide

[0020] A polynucleotide (V) encompasses a polynucleotide described in the following item (V-1) or (V-2) unlike the polynucleotide (II).

(V-1) A polynucleotide, which encodes the amino acid sequence of the chimeric antigen receptor (IV).

(V-2) A polynucleotide according to the item (V-1), which has the base sequence set forth in SEQ ID NO: 22.

(VI) Cell

[0021] A cell (VI) encompasses a cell described in any one of the following items (VI-1) to (VI-4) unlike the host cell (III).

(VI-1) A cell, which harbors the polynucleotide (V).

(VI-2) A cell according to the item (VI-1), which is a eukaryotic cell.

(VI-3) A cell according to the item (VI-1) or (VI-2), which is a T-cell or an NK cell.

(VI-4) A cell according to any one of the items (VI-1) to (VI-3), which is a chimeric antigen receptor T-cell or a chimeric antigen receptor NK cell.

(VII) Pharmaceutical Composition

[0022] A pharmaceutical composition (VII) encompasses pharmaceutical compositions described in the following items (VII-1) to (VII-5).

(VII-1) A pharmaceutical composition, including the antibody (I) or the cell (VI).

(VII-2) A pharmaceutical composition according to the item (VII-1), in which the cell is the chimeric antigen receptor T-cell (VI-4).

(VII-3) A pharmaceutical composition according to the item (VII-1) or (VII-2), which is for use in treatment of cancer.

(VII-4) A pharmaceutical composition according to the item (VII-3), in which the cancer is blood cancer.

(VII-5) A pharmaceutical composition according to the item (VII-4), in which the blood cancer is a disease causing neoplastic growth of plasma cells.

(VIII) Treatment or Prevention Method for Disease

[0023] A treatment or prevention method (VIII) for a disease encompasses treatment or prevention methods for a disease described in the following items (VIII-1) to (VIII-6).

(VIII-1) A treatment or prevention method for a disease, including administering a therapeutically effective amount of the antibody (I) or the cell (VI) to a subject.

(VIII-2) A treatment or prevention method according to the item (VIII-1), in which the cell is the chimeric antigen receptor T-cell (VI-4).

(VIII-3) A treatment or prevention method according to the item (VIII-1) or (VIII-2), in which the disease is cancer, and in which the subject is a patient who has developed cancer or an animal having a risk of developing cancer.

(VIII-4) A treatment or prevention method according to the item (VII-3), in which the cancer is blood cancer.

(VIII-5) A treatment or prevention method according to the item (VIII-4), in which the blood cancer is a disease causing neoplastic growth of plasma cells.

(VIII-6) A treatment or prevention method for multiple myeloma, targeting active-form human integrin β_7 .

(IX) Use

[0024] A use (IX) encompasses uses described in the following items (IX-1) to (IX-5).

(IX-1) A use of the antibody (I) or the cell (VI), for producing a pharmaceutical composition.

(IX-2) A treatment or prevention method according to the item (IX-1), in which the cell is the chimeric antigen receptor T-cell (VI-4).

(IX-3) A use according to the item (IX-1) or (IX-2), which is for treatment of cancer.

(IX-4) A use according to the item (IX-4), in which the cancer is blood cancer.

(IX-5) A use according to the item (IX-3), in which the blood cancer is a disease causing neoplastic growth of plasma cells.

(X) Screening Method

[0025] A screening method (X) encompasses screening methods described in the following (X-1) to (X-4).

(X-1) A screening method for an active ingredient of a pharmaceutical composition for treating or preventing cancer, the method including selecting, from a compound library, a candidate substance that specifically binds to human integrin β_7 and binds to a region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 .

(X-2) A screening method according to the item (X-1), further including selecting a substance having cytotoxic activity.

(X-3) A screening method according to the item (X-1) or (X-2), in which the substance to be selected is a monoclonal antibody.

(X-4) A screening method according to any one of the items (X-1) to (X-3), in which the cancer is blood cancer.

(IX-5) A screening method according to the item (X-4), in which the blood cancer is a disease causing neoplastic growth of plasma cells.

(XI) Diagnosis Method

[0026] A diagnosis method (XI) encompasses diagnosis methods described in the following items (XI-1) to (XI-5).

(XI-1) A diagnosis method for cancer, including bringing a sample collected from a subject into contact with the antibody (I).

(XI-2) A diagnosis method according to the item (XI-1), in which the sample collected from a subject is blood or bone marrow fluid.

(XI-3) A diagnosis method according to the item (XI-1) or (XI-2), further including judging that the subject has developed, or has a risk of developing, cancer when cells that bind to the antibody (I) are detected.

(XI-4) A diagnosis method according to the item (XI-3), in which the cancer is blood cancer.

(XI-5) A diagnosis method according to the item (XI-4), in which the cells are plasma cells, and in which the cancer is a disease causing neoplastic growth of plasma cells.

(XII) Kit

[0027] A kit (XII) encompasses kits described in the following items (XII-1) to (XII-3).

(XII-1) A kit for diagnosis of cancer, including the antibody (I).

(XII-2) A diagnosis method according to the item (XII-1), in which the cancer is blood cancer.

(XII-3) A kit according to the item (XII-2), in which the cancer is a disease causing neoplastic growth of plasma cells.

Advantageous Effects of Invention

[0028] The antibody of the present invention does not recognize normal cells, and hence is useful as an active ingredient

of a pharmaceutical composition. In particular, the antibody of the present invention is useful as an active ingredient of a therapeutic agent for cancer (e.g., blood cancer).

[0029] The antibody of the present invention is useful because chimeric antigen receptor T-cells produced by applying its antigen recognition site to a chimeric antigen receptor can be used as an active ingredient of such pharmaceutical composition as described above.

Brief Description of Drawings

[0030]

FIGS. 1 are results obtained in Example 2 by analyzing the binding of an MMG49 antibody to myeloma patient-derived bone marrow cells through use of FACS. (Left) A diagram for illustrating a method of identifying a myeloma progenitor cell fraction (Myeloma progenitor cells), a myeloma plasma cell fraction (Myeloma plasma cells), and CD45⁺ leukocytes (CD45⁺ leukocytes). (Right) Graphs for showing the binding of the MMG49 antibody to each of the fractions.

FIGS. 2 are graphs for showing results obtained in Example 2 by analyzing, by FACS, the binding of the MMG49 antibody to the myeloma progenitor cell fraction, myeloma plasma cell fraction, and CD45⁺ leukocytes of a plurality of myeloma patient-derived bone marrow cells (UPN1 to UPN5).

FIG. 3 is an illustration of a process of identifying an antigen protein recognized by the MMG49 antibody by an expression cloning method in Example 3. There is illustrated a process of concentrating BaF3 cells that bind to the MMG49 antibody, from an initial concentration of 0.1% or less, by FACS sorting.

FIGS. 4 are graphs for showing results obtained in Example 4 by staining ITGB7-deficient U266 cells generated using a Crispa-cas9 system with the MMG49 antibody or an FIB27 antibody (commercially available anti-integrin β_7 antibody), followed by FACS analysis.

FIG. 5 is an image for showing results obtained in Example 4 by subjecting a product immunoprecipitated from a cell lysate derived from MM1s myeloma cells with the MMG49 antibody or an isotype control antibody, to SDS-PAGE, and then performing western blot with a commercially available anti-integrin β_7 antibody (Abcam plc).

FIGS. 6 are graphs for showing results obtained in Example 5 by analyzing the binding of each of the MMG49 antibody, the FIB27 antibody, and an FIB504 antibody to each cell fraction of healthy person peripheral blood cells (in the figures, B-cells, T-cells, monocytes, neutrophils, red blood cells, and platelets are shown in the stated order from the left-hand side) through use of FACS.

FIGS. 7 are graphs for showing results obtained in Example 5 by analyzing, by FACS, the binding of the MMG49 antibody to each of cell fractions of myeloma patient-derived bone marrow cells. On the left-hand side, a method of identifying each cell fraction is illustrated, and on the right-hand side, graphs for showing the binding of MMG49 to each fraction are shown. In FIGS. 7A, a comparison between hematopoietic stem cell and progenitor cell fractions, and myeloma cells is shown, and in FIGS. 7B, a comparison between B/T lymphocyte fractions, and myeloma progenitor cell and myeloma plasma cell fractions is shown.

FIGS. 8 are graphs for showing results obtained in Example 6 by analyzing the binding of each of the MMG49 antibody and the FIB27 antibody to each of various myeloma cell lines, and T-cells and B-cells derived from peripheral blood through use of FACS. There are also shown results of confirming the expression of ITGA4 (binding of an anti-integrin α_4 antibody) and the expression of ITGAE (binding of an anti-integrin α_E antibody) in the above-mentioned cells by FACS analysis.

FIGS. 9 are graphs for showing results obtained in Example 6 by analyzing, by FACS, the binding of the MMG49 antibody and the FIB27 antibody to U266 cells and ITGA4 (integrin α_4) - deficient U266 cells. There are also shown results obtained by analyzing, by FACS, the expression of ITGA4 (binding of the anti-integrin α_4 antibody) in the above-mentioned cells.

FIGS. 10 are graphs for showing results obtained in Example 7 by allowing integrin $\alpha_4\beta_7$ -forcibly expressing K562 cells and human normal peripheral blood-derived T-cells treated in the presence of Ca²⁺/Mg²⁺ or Mn²⁺ at 37°C for 20 minutes to react with the MMG49 antibody or an isotype antibody, then staining the cells using an anti-mouse IgG antibody as a secondary antibody, and subjecting the stained cells to FACS analysis.

FIG. 11 is a diagram for illustrating the construction of human/mouse chimeric integrin β_7 proteins and the presence or absence of the binding of the MMG49 antibody to 293T cells caused to transiently express the proteins in Example 8.

FIGS. 12 are graphs for showing results obtained in Example 8 by analyzing, by FACS, the binding of the MMG49 antibody to 293T cells caused to transiently express the human/mouse chimeric integrin β_7 proteins.

FIG. 13 is a graph for summarizing the results shown in FIGS. 12. In the graph in FIG. 13, the axis of ordinate represents the percentage of cells bound to the antibody, and the axis of abscissa represents various human/mouse chimeric integrin β_7 proteins.

FIGS. 14 are graphs for showing results obtained by staining MM1s cells and KMS12BM cells with a chimerized

MMG49 antibody generated by linking variable regions of the MMG49 antibody to a human IgG4 antibody constant domain.

FIG. 15 is a scheme for illustrating a method of generating a CAR construct using variable regions of the MMG49 antibody.

FIG. 16 are graphs for showing results obtained by staining T-cells caused to express the CAR construct using variable regions of the MMG49 antibody with a PE-anti-human F(ab')₂ antibody.

FIG. 17 are graphs for showing results obtained in Example 9 by quantitatively determining, by ELISA, the amounts of IFN- γ and IL2 produced through coculture of MMG49 antibody-derived CAR-T cells or T-cells having introduced therein GFP (control) with K562 cells expressing no integrin β_7 or K562 cells caused to forcibly express integrin $\alpha_4\beta_7$. *: $p < 0.05$.

FIGS. 18 are graphs for showing results obtained in Example 10 by quantitatively determining, by ELISA, the amount of IFN- γ produced through coculture of MMG49 antibody-derived CAR-T cells or T-cells having introduced therein GFP (control) with MMG49 antigen-expressing cells or non-expressing cells.

FIGS. 19 are graphs for showing results obtained in Example 10 by quantitatively determining, by ELISA, the amount of IL2 produced through coculture of MMG49 antibody-derived CAR-T cells or T-cells having introduced therein GFP (control) with MMG49 antigen-expressing cells or non-expressing cells.

FIGS. 20 are graphs for showing results obtained in Example 10 by measuring, by ⁵¹Cr killing assay, the degree of cell damage caused by MMG49 antibody-derived CAR-T cells or T-cells having introduced therein GFP (control) with respect to K562 cells expressing no integrin β_7 or K562 cells caused to forcibly express integrin $\alpha_4\beta_7$. The y-axis of each of the graphs in FIGS. 20 represents a cell damage percentage (%).

FIGS. 21 are graphs for showing results obtained in Example 10 by measuring, by ⁵¹Cr killing assay, the degree of cell damage caused by MMG49 antibody-derived CAR-T cells or T-cells having introduced therein GFP (control) with respect to MMG49 antigen-expressing cells or non-expressing cells.

FIGS. 22 are a diagram and graphs for illustrating and showing the design of a therapeutic experiment for a myeloma cell line MM1s engrafted in the bone marrow of an NOG mouse and results thereof in Example 11. Bone marrow cells after 1 week from the transfer of MMG49 antibody-derived CAR-T cells or T-cells having introduced therein GFP (control) were collected and analyzed by FACS. MM1s cells can be identified as human CD138⁺ cells. In an MMG49 antibody-derived CAR-T cell-administered group, MM1s cells in the bone marrow have almost completely disappeared.

FIGS. 23 are a diagram, images, and a graph for illustrating and showing the design of a therapeutic experiment for the myeloma cell line MM1s systemically engrafted to an NOG mouse and results thereof in Example 11. The amounts of myeloma cells before and after the transfer of MMG49 antibody-derived CAR-T cells or T-cells having introduced therein GFP (control) were evaluated by fluorescence intensity measurement based on IVIS imaging. In an MMG49 antibody-derived CAR-T cell-administered group, MM1s cells in the bone marrow have almost completely disappeared.

FIG. 24 is a view for illustrating a comparison between the amino acid sequence of integrin β_7 of human origin and the amino acid sequence of integrin β_7 of mouse origin.

FIGS. 25 are a diagram and graphs for illustrating and showing the construction of human/mouse chimeric integrin β_7 proteins and the presence or absence of the binding of the MMG49 antibody to 293T cells caused to transiently express the proteins in Example 12.

FIG. 26 is a graph for showing results of an experiment for investigating an epitope of the MMG49 antibody in Example 13. MFI on the axis of abscissa represents binding strength to the MMG49 antibody, and a higher numerical value indicates a higher avidity.

Description of Embodiments

[0031] Herein, "include" and "have" are so-called open language, but are each a concept including the closed language "consisting of", and in one embodiment, may be replaced by "consisting of".

[0032] A "myeloma progenitor cell" is a progenitor cell in a stage before differentiating into a myeloma plasma cell, and is characterized by highly expressing CD38, but not expressing CD138, which serves as a marker specific to a mature plasma cell. Therefore, the myeloma progenitor cell is sometimes referred to as "CD38⁺⁺CD138⁻ cell" or "CD19⁻CD38⁺⁺CD138⁻ cell".

[0033] A "myeloma plasma cell" is generally also called a myeloma cell, and is a cell that produces M protein, which is an abnormal immunoglobulin. The myeloma plasma cell expresses CD138 in addition to highly expressing CD38. Therefore, the myeloma plasma cell is sometimes referred to as "CD38⁺⁺CD138⁺ cell" or "CD19⁻CD38⁺⁺CD138⁺ cell".

[0034] The myeloma progenitor cell and the myeloma plasma cell also mean a tumor progenitor cell and a neoplastic plasma cell, respectively, in a disease causing neoplastic growth of plasma cells other than multiple myeloma.

[0035] A "hematopoietic progenitor cell" is a cell capable of differentiating into various hematopoietic cells. The he-

matopoietic progenitor cell is characterized by expressing CD34. Therefore, herein, the hematopoietic progenitor cell is sometimes referred to as "CD34⁺ cell".

(I) Antibody

[0036] An antibody (I) is preferably an anti-human integrin β_7 antibody whose epitope is present in the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of human integrin β_7 .

[0037] More preferred examples of the antibody (I) may include: an antibody whose epitope is present in the region of the amino acid residue positions 33 to 109 of human integrin β_7 ; and an antibody whose epitope is present in the region of the amino acid residue positions 20 to 90 of human integrin β_7 . The most preferred example thereof may be an antibody whose epitope is present in the region of the amino acid residue positions 33 to 90 of human integrin β_7 .

[0038] The human integrin β_7 is not particularly limited, and may be a transmembrane protein having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 31, the protein being capable of forming a heterodimer with integrin α . Specific examples of the integrin α may include integrin α_4 and integrin α_E .

[0039] Specific examples of the amino acid sequence of the human integrin β_7 may include, in addition to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 31, amino acid sequences described in, for example: ACCESSION: EAW96675, VERSION: EAW96675.1, GI: 119617081; ACCESSION: NM000889, VERSION: NM000889.2, GI: 540344585; ACCESSION: XM005268851, VERSION: XM005268851.2, GI: 767974096; ACCESSION: XM006719376, VERSION: XM006719376.2, GI: 767974098; and ACCESSION: XM005268852, VERSION: XM005268852.3, GI: 767974097, listed in the NCBI database.

[0040] The following description regarding the human integrin β_7 is made on the basis of the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 31. However, for any other amino acid sequence of the human integrin β_7 , a person skilled in the art can easily judge which region or site of the other amino acid sequence of the human integrin β_7 corresponds to a region and/or site of the human integrin β_7 to be described below by determining the homology of the other amino acid sequence to the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 31 in silico.

[0041] The region of the amino acid residue positions 1 to 19 of the human integrin β_7 is a peptide fragment serving as a signal peptide and being absent when the human integrin β_7 functions as a membrane protein in a living body. Accordingly, when the human integrin β_7 exhibits a function as a membrane protein, its N-terminus is the amino acid residue at position 20 of the above-mentioned amino acid sequence.

[0042] The region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 includes a PSI domain. The PSI domain of the human integrin β_7 and the PSI domain of mouse integrin β_7 are known to have a high homology of about 80% or more. However, as illustrated in FIG. 24, when compared to each other, the amino acid residues of the regions of the amino acid residue positions 20 to 109 including the PSI domains of the human integrin β_7 and the mouse integrin β_7 differ from each other at a total of 15 amino acid residues, specifically amino acid residues at position 23, position 26, position 28, position 30, position 32, position 35, position 36, position 38, position 41, position 42, position 48, position 93, position 94, position 102, and position 109 of the human integrin β_7 .

[0043] Therefore, it is preferred that the epitope of the antibody (I) be associated with any one or more, preferably two or more, more preferably three or more of those 15 amino acid residues. Specifically, the epitope of the antibody (I) is preferably present in the region of the amino acid residue positions 23 to 109 of the human integrin β_7 , more preferably present in the region of the amino acid residue positions 23 to 48 or the region of the amino acid residue positions 93 to 109.

[0044] The epitope of the antibody (I) in another more preferred embodiment may be: the region of the amino acid residue positions 23 to 48; the region of the amino acid residue positions 93 to 109; or a three-dimensional region that is a combination of the region of the amino acid residue positions 23 to 48 and the region of the amino acid residue positions 93 to position 109.

[0045] The epitope of the antibody (I) may be a linear epitope, or may be a conformational epitope (also called a non-linear epitope). It is known to a person skilled in the art that the linear epitope is a case in which consecutive amino acid residues serve as an epitope and the conformational epitope is an epitope formed of non-consecutive amino acid residues.

[0046] For example, the case in which the above-mentioned three-dimensional region that is a combination of the region of the amino acid residue positions 23 to 48 and the region of the amino acid residue positions 93 to 109 serves as the epitope may be given as an example corresponding to the conformational epitope, and a case in which a region of non-consecutive amino acid residues included in the region of the amino acid residue positions 20 to 109 serves as the epitope is also encompassed in the conformational epitope.

[0047] Of the above-mentioned epitopes, it is preferred that the amino acid residue at position 48 be strongly related to the epitope of the antibody (I) or be included in the epitope of the antibody (I).

[0048] A person skilled in the art can understand about specific linear epitopes and conformational epitopes with reference to, for example, JP 2011-527572 A, JP 2009-534401 A, or "Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes." Forsstrom B, Axnas BB, Rockberg J, Danielsson H, Bohlin A, Uhlen M. PLoS One. 2015 Mar 27; 10(3): e0121673. doi: 10.1371/journal.pone.0121673. eCollection 2015.

[0049] In other words, the foregoing means that the antibody (I) is an antibody that specifically binds to the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 , and in particular, preferably specifically binds to the region at positions from 23 to 109, more preferably specifically binds to the region at positions from 23 to 48 and/or positions from 93 to 109.

[0050] In addition, the property of the antibody (I) of binding to the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the integrin β_7 , which serves as the epitope, is sometimes referred to as affinity for the epitope. Accordingly, the term "affinity for the epitope is increased" has the same meaning as "specific binding capacity for the epitope is increased."

[0051] The term "specific" may be distinguished from the term "selective".

[0052] As another embodiment of the antibody (I), it is preferred that the affinity of the antibody (I) for the epitope be increased in the presence of at least part of the region of the amino acid residue positions 379 to 722 of the human integrin β_7 .

[0053] The "at least part of the region of the amino acid residue positions 379 to 722" means that any one of the region of the amino acid residue positions 379 to 722 and a partial region thereof may be adopted. Specific examples of the "partial region thereof" include: at least part of the region of the amino acid residue positions 417 to 722 of the human integrin β_7 ; at least part of the region of the amino acid residue positions 564 to 722 of the human integrin β_7 ; at least part of the region of the amino acid residue positions 379 to 563 of the human integrin β_7 ; at least part of the region of the amino acid residue positions 417 to 563 of the human integrin β_7 ; and at least part of the region of the amino acid residue positions 379 to 416 of the human integrin β_7 . That is, the affinity of the antibody (I) for the epitope can be increased in the presence of any of those regions.

[0054] The term "in the presence of" means that the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 and at least part of the region of the amino acid residue positions 379 to 722 of the human integrin β_7 may be present in the same molecule, or the two regions may be present as separate molecules. It is preferred that the two regions be present in the same molecule. The term "in the presence of" may be read as "by".

[0055] A person skilled in the art can easily confirm that the affinity of the above-mentioned antibody (I) for the epitope is increased, by a commonly used immunoassay method described in, for example, Examples to be described below.

[0056] For example, cells caused to express a human/mouse chimeric integrin β_7 protein (#4960), which is various human/mouse chimeric integrin β_7 proteins described in Example 8, and which includes the region of the amino acid residue positions 1 to 109 of integrin β_7 of human origin and includes the region of the amino acid residue positions 722 to 798 of the integrin β_7 of human origin, are prepared, and a human/mouse chimeric integrin β_7 protein (#4961) in which the region of #4960 of the amino acid residue positions 379 to 721 of the integrin β_7 of human origin is replaced with the region of the amino acid residue positions 379 to 721 of integrin β_7 of mouse origin is prepared. In this case, the increase in the affinity of the antibody (I) for the epitope may be confirmed by comparing the degrees of binding of the antibody (I) between cells expressing the latter (#4961) and cells expressing the former (#4960).

[0057] As another embodiment of the antibody (I), it is preferred that the affinity of the antibody (I) for the epitope be increased by activating the human integrin β_7 . Probably because activated human integrin β_7 has a structural feature in a region including the epitope, the affinity of the antibody (I) for the epitope is increased.

[0058] A method of activating the human integrin β_7 is known. For example, by allowing a phorbol ester, such as PMA, a manganese salt, or the like to act on cells expressing the human integrin β_7 , e.g., cells selected from blood cells and immune cells, such as plasma cells, NK cells, T-cells, B-cells, lymphoblasts, Burkitt lymphoma-derived cells, and dendritic cells, the human integrin β_7 expressed in the cells may be activated. In addition, without being limited to the above-mentioned specific cells, cells caused to express the human integrin β_7 may be used and treated with a phorbol ester, a manganese salt, or the like to activate the human integrin β_7 .

[0059] A person skilled in the art can easily confirm that the affinity of the antibody (I) for the epitope is increased through activation of the human integrin β_7 , by a commonly used immunoassay method described in, for example, Examples to be described below.

[0060] For example, cells caused to express #4960 or #4961, which is the various human/mouse chimeric integrin β_7 proteins described in Example 8 and includes the region of the amino acid residue positions 1 to 109, are prepared, and the cells are subjected to integrin β_7 -activating means as described in Example 7. After that, affinities before and after the activation treatment are compared to each other through measurement using immunoassay means. Thus, the increase in the affinity of the antibody (I) for the epitope in the cells after the activation may be confirmed.

[0061] As another embodiment of the antibody (I), the antibody (I) may be an anti-human integrin β_7 antibody having a feature of having a higher affinity for human integrin β_7 expressed on myeloma-derived cells than for human integrin β_7 expressed on normal cells.

[0062] The normal cells are not particularly limited as long as the cells are derived from a healthy person, and may be, for example, blood-derived normal cells. Of such normal cells, normal plasma cells are preferred.

[0063] A method of confirming that the antibody has a higher affinity for human integrin β_7 expressed on myeloma cells than for human integrin β_7 expressed on such normal cells can easily be performed by a person skilled in the art by a commonly used immunoassay method described in, for example, Examples to be described below.

[0064] The "commonly used immunoassay method" is not particularly limited as long as the method involves measurement using various antibodies irrespective of the antigen. Examples thereof may include a flow cytometry method (FACS), cell sorting involved therein, western blotting, ELISA, an immunoprecipitation method, a SPR method, and a QCM method.

[0065] As another embodiment of the antibody (I), an epitope of the antibody (I) is preferably identical to that of an MMG49 antibody disclosed in Examples to be described later. An antibody identical to the MMG49 antibody is most preferred. For a method of producing the MMG49 antibody, reference may be made to Examples to be described below.

[0066] As another embodiment of the antibody (I), the antibody (I) is preferably an antibody of an embodiment including a heavy chain variable region and/or a light chain variable region. That is, the antibody (I) may be the heavy chain variable region alone, or may be the light chain variable region alone. The antibody (I) is preferably an antibody including the heavy chain variable region and the light chain variable region.

[0067] A variable region is also called an antigen recognition site, and is understood by a person skilled in the art to be a site important for an antibody to recognize an antigen. Such variable region has three regions called hypervariable regions (also referred to as complementarity determining regions [CDRs]), and it is also known to a person skilled in the art that the CDRs are extremely important regions most involved in the antigen recognition function of an antibody.

[0068] The heavy chain variable region included in the other embodiment of the antibody (I) includes any one or more of heavy-chain CDR1, heavy-chain CDR2, and heavy-chain CDR3. That is, the heavy chain variable region may contain heavy-chain CDR1, heavy-chain CDR2, or heavy-chain CDR3 alone, and preferably includes at least heavy-chain CDR3. A more preferred embodiment includes heavy-chain CDR1, heavy-chain CDR2, and heavy-chain CDR3 in the stated order from the amino-terminus (N-terminus).

[0069] The light chain variable region may be similar to the heavy chain variable region, i.e., includes, for example, any one of light-chain CDR1, light-chain CDR2, and light-chain CDR3, preferably includes at least light-chain CDR3, and preferably includes light-chain CDR1, light-chain CDR2, and light-chain CDR3 in the stated order from the N-terminus of the light chain variable region.

[0070] Regions other than CDR1 to CDR3 in each of the heavy chain variable region and the light chain variable region are sometimes referred to as FRs. More specifically, a region between the N-terminus and the CDR1 is called FR1, a region between the CDR1 and the CDR2 is called FR2, a region between the CDR2 and the CDR3 is called FR3, and a region between the CDR3 and the carboxy-terminus (C-terminus) is called FR4, and the names are designated for each of the heavy chain variable region and the light chain variable region.

[0071] The amino acid sequences of the heavy-chain CDR1 to CDR3 and the light-chain CDR1 to CDR3 are not particularly limited. Examples thereof include heavy-chain CDR1 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1, heavy-chain CDR2 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2, heavy-chain CDR3 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 3, light-chain CDR1 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 6, light-chain CDR2 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7, and light-chain CDR3 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8 serving as heavy-chain CDRs 1 to 3 or light-chain CDRs 1 to 3 of the MMG49 antibody.

[0072] As a preferred embodiment of the heavy chain variable region including the heavy-chain CDR1 to CDR3, there may be given, for example, a heavy chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4, which is a heavy chain variable region of the MMG49 antibody. In addition, as a preferred embodiment of the light chain variable region including the light-chain CDR1 to CDR3, there may be given, for example, a light chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9, which is a light chain variable region of the MMG49 antibody.

[0073] The above-mentioned amino acid sequences of the MMG49 antibody set forth in SEQ ID NOS: 1 to 4 and 6 to 9 are as shown in Table 1 below. Underlined parts in each of the amino acid sequences of the heavy chain and variable regions set forth in SEQ ID NOS: 4 and 9 in Table 1 indicate portions located at the CDR1, the CDR2, and the CDR3 in the stated order from the N-terminus.

Table 1

<Amino acid sequences of MMG49 antibody>		
Heavy chain	CDR1 (SEQ ID NO: 1)	GYTFSSYW
	CDR2 (SEQ ID NO: 2)	MLPGSGSS
	CDR3 (SEQ ID NO: 3)	ARGDGNWYFDV
	Variable region (SEQ ID NO: 4)	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGASVK ISCKASGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEMLPGSGS SNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYY CARGDGNWYFDVWGAG

(continued)

<Amino acid sequences of MMG49 antibody>		
5	Light chain	CDR1 (SEQ ID NO: 6) SSVGY
		CDR2 (SEQ ID NO: 7) ATS
		CDR3 (SEQ ID NO: 8) QQWSSDPPT
10	Variable region (SEQ ID NO: 9)	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILSASPG EKVIMTCRASSSVGYMHWFOQKPGSSPKPWIYATSNLA SGVPARFSGSESGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSS DPPTFGGGTKLEIK

[0074] The structure of the antibody (I) is not limited. Specific examples of the structure include Fv, scFv, a diabody, a triabody, and a tetrabody, and the structure may also be a structure obtained by appropriately combining these structures. In addition, those structures including the combined structures as well are each sometimes also called a fragment antibody. Such fragment antibody may be an artificially designed recombinant protein including Fv, or may be one fused with a biomolecule, such as a protein.

[0075] The Fv is also called the smallest structural unit of an antibody, and is a structure in which a heavy chain variable region and a light chain variable region are associated with each other through a non-covalent intermolecular interaction. Further, the Fv may be a structure in which the thiol groups of cysteine residues present in the heavy chain variable region and the light chain variable region form a disulfide bond with each other.

[0076] The scFv is a structure in which the C-terminus of a heavy chain variable region and the N-terminus of a light chain variable region are linked through a linker, and is also called a single-chain antibody. In addition, the C-terminus and N-terminus to be linked through a linker may be the C-terminus of the light chain variable region and the N-terminus of the heavy chain variable region. The structure of the scFv may be formed by association based on a non-covalent intermolecular interaction or the like as in the Fv.

[0077] The diabody, the triabody, and the tetrabody are structures in which the above-mentioned scFv forms a dimer, a trimer, and a tetramer, respectively, and is associated in the structurally most stable state through a non-covalent intermolecular interaction or the like between variable regions as in the Fv or the like.

[0078] A person skilled in the art can easily produce the antibody (I) having any of such various structures by: constructing an expression vector through use of commonly used genetic engineering means; and using, with such expression vector, an expression system adopting host cells suited for antibody production, such as prokaryotic cells (such as *Escherichia coli* or actinomycetes) or eukaryotic cells (such as yeast cells, insect cells, or mammalian cells), a commonly used cell-free expression system, or the like. The produced antibody may be appropriately subjected to a commonly used purification process so as to be obtained in a high-purity state.

[0079] As another embodiment of the antibody (I), the antibody (I) may contain a constant region. The constant region is understood by a person skilled in the art to be as follows: a heavy chain constant region includes CH1, CH2, and CH3, and a light chain constant region includes CL. In addition, a region including CH2 and CH3 is sometimes called an Fc domain.

[0080] A specific origin of the constant region is not particularly limited. Examples thereof may include constant regions originating from animal species capable of mass production, animal species closely related to humans, animal species that are less liable to cause immunogenicity in administration to a human, and the like, e.g., constant regions of human origin, mouse origin, rat origin, rabbit origin, monkey origin, and chimpanzee origin.

[0081] In the antibody (I), when the heavy chain variable region and/or the light chain variable region have an amino acid sequence of mouse origin, for example, a constant region of human origin may be combined therewith, to thereby provide the antibody (I) as a chimeric antibody.

[0082] In addition, heavy-chain FR1 to FR4 and/or light-chain FR1 to FR4 in the above-mentioned chimeric antibody may be replaced with amino acid sequences of human origin, to thereby provide the antibody (I) as a humanized antibody.

[0083] Further, heavy-chain CDR1 to CDR3 and/or light-chain CDR1 to CDR3 in the above-mentioned humanized antibody may be replaced with amino acid sequences of human origin to the extent that the functions of the CDRs are not reduced, to thereby provide the antibody (I) as a human antibody. The term "human antibody" is sometimes called a "completely humanized antibody".

[0084] Examples of the structure of the antibody (I) of the embodiment including a constant region may include structures such as Fab, F(ab')₂, a minibody, and scFv-Fc, as well as an immunoglobulin having a four-chain structure including a pair of heavy chains each having a heavy chain variable region and a heavy chain constant region, and a pair of light chains each having a light chain variable region and a light chain constant region. Further, a structure obtained by

appropriately combining those structures may also be adopted. In addition, those structures including combined structures are each sometimes called a fragment antibody. Such fragment antibody may be an artificially designed recombinant protein including Fv, or may be one fused with a biomolecule, such as a protein.

[0085] The Fab includes a heavy chain fragment including a heavy chain variable region and CH1 in a heavy chain constant region, and a light chain including a light chain variable region and a light chain constant region, and has a structure in which the heavy chain variable region and the light chain variable region are associated with each other through the above-mentioned non-covalent intermolecular interaction, or are bonded to each other through a disulfide bond. Further, the Fab may be such that the CH1 and the CL form a disulfide bond between the thiol groups of cysteine residues respectively present therein.

[0086] The $F(ab')_2$ has a pair of the Fabs, and has a structure in which the CH1s form a disulfide bond between the thiol groups of cysteine residues respectively included therein.

[0087] The minibody has a pair of antibody fragments each including the scFv and CH3, and has a structure in which such antibody fragments are associated with each other through a non-covalent intermolecular interaction between the CH3s.

[0088] The scFv-Fc has a pair of antibody fragments each including the scFv, CH2, and CH3, and has a structure in which, as in the minibody, the antibody fragments are associated with each other through a non-covalent intermolecular interaction between the CH3s, and form a disulfide bond between the thiol groups of cysteine residues included in the respective CH3s.

[0089] A person skilled in the art can easily produce the antibody (I) including a constant region having any of such various structures as with the antibody (I) including no constant region, by constructing an expression vector through use of commonly used genetic engineering means, and using, with such expression vector, an expression system adopting host cells suited for antibody production. The produced antibody may be appropriately subjected to a commonly used purification process so as to be obtained in a high-purity state.

[0090] The Fab may be obtained by, for example, digesting an immunoglobulin IgG with a protease such as papain. In addition, $F(ab')_2$, the $F(ab')_2$ may be obtained by digesting IgG with a protease such as pepsin.

[0091] Of the above-mentioned antibodies (I) each including a constant region, a preferred structure is an immunoglobulin. The subtype of such immunoglobulin is not particularly limited, and examples thereof may include IgA, IgD, IgE, IgG, and IgM. Of those, IgG is preferred, and for example, in the case of IgG of mouse origin, IgG2 is preferred out of the four subclasses.

[0092] Of the above-mentioned antibodies (I) each including a constant region, an antibody of a more preferred embodiment is an antibody including a heavy chain having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5 and/or a light chain having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 10. The most preferred antibody is an antibody including a heavy chain having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 5 and a light chain having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 10.

[0093] A mutation may be introduced into each of the above-mentioned amino acid sequences depending on the situation. It is preferred that such mutation be not introduced into heavy-chain CDRs and light-chain CDRs. That is, the mutation is preferably introduced into a heavy-chain FR or a light-chain FR. When the antibody (I) includes a constant region, a mutation may be further introduced in addition to a mutation for adjusting ADCC activity or CDC activity to be described below.

[0094] A specific number of amino acid residues at which mutations are introduced is not particularly limited. For example, identity between an amino acid sequence before mutation introduction and an amino acid sequence after mutation introduction is about 70%, preferably about 75%, more preferably about 80%, more preferably about 85%, more preferably about 90%, more preferably about 95%, more preferably about 96%, more preferably about 97%, more preferably about 98%, most preferably about 99%. Such numerical value is one obtained by rounding.

[0095] The term "identity" refers to the degree of amino acid sequences identical to each other in two or more comparable amino acid sequences. Therefore, as the identity between given two amino acid sequences increases, it can be said that those sequences have not only higher identity but also higher similarity.

[0096] The identity of amino acids may be calculated using an analytical tool that is commercially available or available through the Internet (e.g., software such as FASTA, BLAST, PSI-BLAST, or SSEARCH). For example, main initial conditions to be generally used for a BLAST search are as described below. That is, a value (%) for the identity between amino acid sequences may be calculated by performing a search on Advanced BLAST 2.1 with blastp being used as a program, the Expect value being set to 10, all Filters being turned OFF, BLOSUM62 being used for Matrix, the Gap existence cost, Per residue gap cost, and Lambda ratio being set to 11, 1, and 0.85 (default values), respectively, and the other various parameters being also set to default values.

[0097] The above-mentioned introduction of a mutation into an amino acid sequence refers to substitution, deletion, insertion, or the like. Specific mutation introduction is not particularly limited as long as the mutation introduction can be achieved by adopting a commonly used method. For example, in the case of the substitution, a conservative substitution technology may be adopted.

[0098] The term "conservative substitution technology" means a technology involving substituting a certain amino acid residue with an amino acid residue having a side chain similar thereto.

[0099] For example, substitution between amino acid residues each having a basic side chain, such as lysine, arginine, and histidine, is a conservative substitution technology. In addition, each of substitutions between: amino acid residues each having an acidic side chain, such as aspartic acid and glutamic acid; amino acid residues each having an uncharged polar side chain, such as glycine, asparagine, glutamine, serine, threonine, tyrosine, and cysteine; amino acid residues each having a non-polar side chain, such as alanine, valine, leucine, isoleucine, proline, phenylalanine, methionine, and tryptophan; amino acid residues each having a β -branched side chain, such as threonine, valine, and isoleucine; and amino acid residues each having an aromatic side chain, such as tyrosine, phenylalanine, tryptophan, and histidine, is similarly a conservative substitution technology.

[0100] As another embodiment of the antibody (I), the antibody (I) may have cytotoxic activity. The cytotoxic activity refers to such activity that the antibody binds to cells, and as a result, causes some damage to the cells bound to the antibody.

[0101] Examples of such cytotoxic activity include ADCC activity and CDC activity. The term "ADCC activity" is an abbreviation of antibody-dependent cytotoxic activity (Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity), and is activity of recruiting cells having cytotoxic activity, such as NK cells expressing a receptor specific to a constant region of an antibody, to the vicinity of the antibody, to thereby induce damage to cells to which the antibody binds through the action of such cells and the like.

[0102] The term "CDC activity" is an abbreviation of complement-dependent cytotoxic activity (Complement-Dependent Cytotoxicity), and refers to activity that the antibody recruits a complement to its vicinity, to thereby induce an action of causing damage to cells bound to the antibody through the action of such complement.

[0103] Here, each of the ADCC activity and the CDC activity may be adjusted by introducing a mutation into a constant region while appropriately referring to the literature, such as Lazar GA et al., Proc Natl Acad Sci USA, 103: 4005-10 (2006), Shields RL et al., J Biol Chem, 276: 6591-604 (2001), Moore GL et al., J Immunol, 159:3613-21 (1997), An Z et al., MABs, 1:572-9 (2009).

[0104] For example, when the constant region is human IgG₁, the ADCC activity may be increased by introducing a mutation such as S239D, I332E, S239D/I332E, S239D/I332E/A330L, S298A, K334A, S298A/K334A, or S298A/E333A/K334A.

[0105] In addition, when the constant region is human IgG₁ as in the foregoing, the ADCC activity may be decreased by introducing a mutation such as V234A/G237A, or H268Q/V309L/A330S/P331S.

[0106] With regard to the CDC activity, when the constant region is human IgG₁, the activity may be increased by introducing a mutation such as S267E, H268F, S324T, S267E/H268F, S267E/S324T, H268F/S324T, or S267E/H268F/S324T.

[0107] The ADCC activity may be measured in accordance with Brunner K.T., et al.'s method (Brunner, K.T., et al., Immunology, 1968, 14:181-96). For example, myeloma cells are cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10% FCS, and are prepared so that the number of cells may be from 0.5×10^4 to 1.0×10^4 . An appropriate amount of Na₂⁵¹CrO₄ is added thereto and allowed to react therewith at 37°C for 1 hour to label the cells with ⁵¹Cr, and the resultant cells are washed and then used as target cells. As effector cells, ones obtained by culturing SCID mouse bone marrow cells for 6 days in RPMI1640 supplemented with 10% FBS, 10 ng/ml mouse GM-CSF, and 40 IU/ml human IL2, or the like may be used. To a 96-well plate, an antibody to be tested or an isotype antibody thereof serving as a control is added at a final concentration from 0.05 μ g/mL to 10 μ g/mL, and the target cells (1.0×10^4 cells) and the effector cells (5×10^5 cells) are further added. The mixture is subjected to a reaction at 37°C for 4 hours and centrifuged, and then ⁵¹Cr released into the supernatant is measured with a γ -counter. The ADCC activity may be determined on the basis of the following equation.

[0108] ADCC activity = $\frac{([^{51}\text{Cr} \text{ release from target cells}] - [\text{spontaneous } ^{51}\text{Cr} \text{ release under antibody-free state}])}{([\text{maximum } ^{51}\text{Cr} \text{ release amount caused by 1\% Triton X-100 addition}] - [\text{spontaneous } ^{51}\text{Cr} \text{ release under antibody-free state}])} \times 100$

[0109] The CDC activity may also be measured in accordance with Brunner K.T., et al.'s method (Brunner, K.T., et al., Immunology, 1968, 14:181-96). For example, myeloma cells to be used as target cells are cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10% FCS, and are prepared so that the number of cells may be from 0.5×10^4 to 1.0×10^4 . An appropriate amount of Na₂⁵¹CrO₄ is added thereto and allowed to react therewith at 37°C for 1 hour to label the cells with ⁵¹Cr, and the resultant cells are washed and then used as target cells. An antibody to be tested or an isotype antibody serving as a control suspended in RPMI1640 medium supplemented with fetal bovine serum is added to a 96-well plate at a final concentration of from 0.5 μ g/mL to 50 pg/mL, and then the target cells and a complement are added, followed by a reaction for 1.5 hours. The reaction liquid is centrifuged, and ⁵¹Cr released into the supernatant is measured with a γ -counter. The CDC activity may be determined on the basis of the following equation.

[0110] CDC activity = $\frac{([^{51}\text{Cr} \text{ release from target cells}] - [\text{spontaneous } ^{51}\text{Cr} \text{ release under antibody-free state}])}{([\text{maximum } ^{51}\text{Cr} \text{ release amount caused by 1\% Triton X-100 addition}] - [\text{spontaneous } ^{51}\text{Cr} \text{ release under antibody-free state}])}$

×100

[0111] The antibody having cytotoxic activity may be obtained by, for example, evaluating the presence or absence of cytotoxic activity through use of the above-mentioned method, and selecting an antibody having the activity.

[0112] As another embodiment of the antibody (I), the antibody (I) may be a multispecific antibody. That is, the antibody (I) may have binding capacity with specificity to an antigen other than the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 (the antigen is hereinafter referred to as other antigen).

[0113] The other antigen is preferably an antigen structurally dissimilar to the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 .

[0114] A specific other antigen is not particularly limited. Examples thereof include CD3, CD16, C1q, and Adenovirus knob domain, and at least one of those antigens in appropriate combination may be appropriately adopted as the other antigen. It is preferred that one of the antigens given as examples above be selected as the other antigen. That is, a preferred multispecific antibody is a bispecific antibody.

[0115] A person skilled in the art can easily produce such multispecific antibody by appropriately adopting a commonly used technology. For example, the multispecific antibody may be obtained in the following manner: hybridomas generated using antibody-producing cells, such as B-cells, obtained from an animal immunized with cells expressing a peptide fragment corresponding to the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 , or chimeric integrin β_7 in which only the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 is of human origin and the rest is of non-human origin, such as mouse origin, are prepared; separately, hybridomas are generated using antibody-producing cells, such as B-cells, obtained from an animal immunized with the above-mentioned other antigen; and screening is performed, by a commonly used method, for new hybridomas obtained by cell fusion between the above-mentioned hybridomas (the new hybridomas are also referred to as quadromas in the case of producing a bispecific antibody).

[0116] In addition to the foregoing, for example, in the case of a bispecific antibody, the bispecific antibody may be generated by a procedure described in the following (1) to (4):

(1) An antibody having the structure of the above-mentioned $F(ab')_2$, which uses the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 as an epitope, is generated;

(2) Meanwhile, an antibody having the structure of $F(ab')_2$ that specifically binds to the other antigen is also similarly generated;

(3) The antibodies of the respective $F(ab')_2$ structures obtained in (1) and (2) are treated with a reducing agent, such as DTT, and then any one of the treated products is further treated with Ellman's reagent; and

(4) The treated antibodies of the $F(ab')_2$ structures obtained in (3) are mixed and allowed to react with each other.

[0117] The bispecific antibody may also be produced by a procedure described in the following (A) to (D).

(A) An antibody using the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 as an epitope is generated.

(B) Meanwhile, an antibody that specifically binds to the other antigen is similarly generated.

(C) The amino acid sequences of respective variable regions obtained in (A) and (B) and the base sequences of polynucleotides encoding the variable regions are identified.

(D) An expression vector having incorporated therein polynucleotides having the respective base sequences identified in (C) together with, as necessary, polynucleotides having a base sequence for a constant domain and a linker sequence is generated, and then the expression vector is introduced into host cells suited for antibody production, such as CHO cells.

[0118] As another embodiment of the antibody (I), the antibody (I) may have bound thereto a cytotoxin (substance having cytotoxic activity). The cytotoxin is not particularly limited as long as the cytotoxin is a substance that causes some damage to cells, such as the killing of cells or the inhibition of cell growth.

[0119] Examples of such cytotoxin may include: alkylating agents, such as cyclophosphamide hydrate, iphosphamide, thiotepa, busulfan, melphalan, nimustine hydrochloride, ranimustine, dacarbazine, and temozolomide; metabolic antagonists, such as methotrexate, pemetrexed sodium hydrate, fluorouracil, doxifluridine, capecitabine, tegafur, cytarabine, gemcitabine hydrochloride, fludarabine phosphate, nelarabine, cladribine, and calcium levofolinate; antibiotic substances, such as doxorubicin hydrochloride, daunorubicin hydrochloride, pirarubicin, epirubicin hydrochloride, idarubicin hydrochloride, aclarubicin hydrochloride, amrubicin hydrochloride, mitoxantrone hydrochloride, mitomycin C, actinomycin D, bleomycin hydrochloride, peplomycin hydrochloride, zinostatin stimalamer, and calicheamicin; microtubule inhibitors, such as vincristine sulfate, vinblastine sulfate, vindesine sulfate, and paclitaxel; aromatase inhibitors, such as anastrozole, exemestane, letrozole, and fadrozole hydrochloride hydrate; platinating agents, such as cisplatin, carboplatin, nedaplatin, and oxaliplatin; topoisomerase inhibitors, such as irinotecan hydrochloride hydrate, nogitecan hydrochloride, etoposide,

and sobuzoxane; adrenal cortex steroids, such as prednisolone and dexamethasone; thalidomide and a derivative thereof, specifically lenalidomide; bortezomib serving as a protease inhibitor; and radioactive isotopes, such as $^{90}\text{-Ittrium}$.

[0120] Of those, calicheamicin, melphalan, vincristine sulfate, doxorubicin hydrochloride, prednisolone, dexamethasone, thalidomide, lenalidomide, and bortezomib are preferred, and calicheamicin having proven excellence in binding to an antibody is more preferred.

[0121] Each of those cytotoxins is commercially available, and one kind or two or more kinds in appropriate combination may be selected from the above-mentioned cytotoxins.

[0122] The manner of binding between the cytotoxin and the above-mentioned antibody is not particularly limited, and a person skilled in the art can easily bind the cytotoxin to the above-mentioned antibody by, for example, appropriately adopting a commonly used genetic engineering technology or protein engineering technology. More specifically, there may be given, for example, a method involving binding the cytotoxin to a functional group, such as an amino group, a thiol group, a guanidyl group, a hydroxy group, or a carboxyl group, of an amino acid residue side chain of the antibody (I) via a linker.

[0123] The antibody (I) may be a polyclonal antibody or may be a monoclonal antibody. The antibody (I) is preferably a monoclonal antibody.

[0124] The term "monoclonal" means being obtained from a substantially uniform population, and the "monoclonal antibody" means an antibody obtained from such population. That is, it is understood that individual antibodies included in such population are identical to each other except for a naturally occurring mutation that may be present in a minute amount.

[0125] Further, with regard to a specific binding target (epitope) of an antibody, for example, in the case of the antibody (I), the epitope is present in the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 . In this regard, in the case of a polyclonal antibody, the epitope is a plurality of sites in the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 , whereas in the case of a monoclonal antibody, the epitope is a single site. For this reason, the monoclonal antibody exhibits high specificity, and hence is more advantageous.

[0126] The term "monoclonal" to be used as a modifier is understood to mean being obtained from a substantially uniform population as described above, and should not be understood as a modifier for specifying a production method for the antibody.

[0127] Other than the above-mentioned method, a person skilled in the art can easily produce the antibody (I) by adopting a hybridoma method, a recombinant DNA method using a host cell (III) harboring a polynucleotide (II) to be described below, isolation from a phage library, or the like.

[0128] For example, there may be given a method involving: immunizing an animal suited for antibody production, such as a mouse, a rat, or a rabbit, with a peptide corresponding to the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 ; then recovering B-cells and subjecting the recovered B-cells to a hybridoma method; and performing screening through use of the function exhibited by the antibody (I) described above as an indicator, to thereby produce the antibody (I).

[0129] In addition to the foregoing, there may be given a method involving: generating cells expressing chimeric integrin β_7 in which only the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of integrin β_7 is of human origin and the rest is of non-human origin, such as mouse origin; immunizing an animal suited for antibody production, such as a mouse, a rat, or a rabbit (preferably a mouse), with the cells; then recovering B-cells and subjecting the recovered B-cells to a hybridoma method; and performing screening through use of the function exhibited by the antibody (I) described above as an indicator, to thereby produce the antibody (I).

[0130] Examples of the function exhibited by the antibody (I) may include: an increase in affinity for the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 in the presence of at least part of the region of the amino acid residue positions 380 to 722 of the human integrin β_7 ; and an increase in the affinity through activation of the human integrin β_7 . Accordingly, the antibody (I) may be obtained by a method shown in a screening method (X) to be described below, which utilizes such function.

[0131] An epitope for the antibody (I) is present in the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 , and hence the antibody (I) is expected to exhibit cytotoxic activity or the like on cells expressing the integrin β_7 by combining one or two or more of not only the above-mentioned ADCC activity and CDC activity, but also apoptosis-inducing activity, survival signal-blocking activity, and the like on such cells. Accordingly, a composition including the antibody (I) is useful as a pharmaceutical composition (IV) as described in detail below.

[0132] In particular, the antibody (I) uses the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 as an epitope, and the affinity of the antibody (I) for the epitope is increased through activation of the integrin β_7 . Active-form integrin β_7 is expressed in blood cells, such as plasma cells, and hence the antibody (I) is used as an active ingredient of a pharmaceutical composition for cancer thereof (e.g., blood cancer). In particular, the antibody (I) is effectively used as a pharmaceutical composition for a disease causing an abnormality in the above-mentioned cells (e.g., myeloma or multiple myeloma).

(II) Polynucleotide

[0133] A polynucleotide (II) is a polynucleotide having a base sequence encoding the amino acid sequence of the antibody (I). The term "polynucleotide" includes, for example, a single-stranded or double-stranded form in which a ribonucleotide, a deoxyribonucleotide, any one nucleotide thereof, or the like is appropriately modified by a known method.

[0134] A person skilled in the art can appropriately determine the base sequence of the polynucleotide (II), for example, in silico on the basis of the amino acid sequence of the antibody (I). The kinds of codons to be used for determining such base sequence are not limited. The base sequence is preferably determined in consideration of the codon frequency of a host in which the polynucleotide is to be used.

[0135] A specific base sequence of the polynucleotide (II) is not particularly limited. Correspondence between each SEQ ID NO in which an amino acid sequence identified as one embodiment of the antibody (I) is set forth and the SEQ ID NO in which a base sequence encoding such amino acid sequence is set forth is shown in Table 2 below. That is, preferred base sequences of the polynucleotide (II) are base sequences set forth in SEQ ID NOS: 11 to 20.

Table 2

Amino acid sequence	Base sequence
SEQ ID NO: 1	SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 2	SEQ ID NO: 12
SEQ ID NO: 3	SEQ ID NO: 13
SEQ ID NO: 4	SEQ ID NO: 14
SEQ ID NO: 5	SEQ ID NO: 15
SEQ ID NO: 6	SEQ ID NO: 16
SEQ ID NO: 7	SEQ ID NO: 17
SEQ ID NO: 8	SEQ ID NO: 18
SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 19
SEQ ID NO: 10	SEQ ID NO: 20

[0136] The polynucleotide (II) may adopt an embodiment of being incorporated into a vector. The vector is not particularly limited, and may be, for example, a vector for cloning or a vector for expression, and its intended use is not limited.

[0137] In addition, the vector for expression may be a vector for prokaryotic cells, such as *Escherichia coli* or actinomycetes, or may be a vector for eukaryotic cells, such as yeast cells, insect cells, or mammalian cells.

[0138] A base sequence encoding a signal peptide may be appropriately added to the 5'-end side of the polynucleotide (II) (corresponding to the N-terminus side of the antibody (I)).

[0139] A specific method of using the polynucleotide (II) is not particularly limited. For example, the polynucleotide (II) may be used for expressing the antibody (I) by being introduced into the following host cell (III).

(III) Host Cell

[0140] A host cell (III) is a cell harboring the polynucleotide (II). The term "harbor" refers to the keeping of a state in which the polynucleotide (II) is present in the cell, and means that the cell is in a state of not spontaneously discharging the polynucleotide to the outside of the cell irrespective of whether the discharge is active.

[0141] The embodiment in which the host cell (III) harbors the polynucleotide (II) is not particularly limited. For example, the polynucleotide may be harbored in the form of a vector in the cell, or the polynucleotide (II) may be harbored in the form of being integrated into the genome in the cell.

[0142] A specific cell kind of the host cell (III) may be a eukaryotic cell, such as a yeast cell, an insect cell, or a mammalian cell, or may be a prokaryotic cell, such as *Escherichia coli* or an actinomycete, and is not particularly limited.

(IV) Chimeric Antigen Receptor

[0143] A chimeric antigen receptor is an artificial T-cell receptor (TCR)-like protein, and is a protein in which an antigen recognition site expressed on the cell membrane of T-cells (corresponding to an extracellular domain) is replaced with a desired antigen recognition site and which is constructed so as to be able to more effectively exhibit a function, such

as cytotoxic activity, of T-cells themselves.

[0144] The chimeric antigen receptor (IV) is a chimeric antigen receptor whose epitope is identical to that of the antibody (I), and more specifically, is a protein including an antigen recognition site of the antibody (I). That is, the epitope present in the antigen recognition site included in the chimeric antigen receptor may be the same as the one described in detail in the antibody (I).

[0145] More specifically, the chimeric antigen receptor (IV) is a protein in which the antigen recognition site of the antibody (I), a spacer sequence, a transmembrane domain, a costimulator, and an TCR intracellular domain are arranged in the stated order from the N-terminus of the chimeric antigen receptor (IV).

[0146] The antigen recognition site of the antibody (I) to be arranged in the chimeric antigen receptor (IV) may be as described in detail in the antibody (I), and specific examples thereof may include a heavy chain variable region and/or a light chain variable region. Of those, the antigen recognition site preferably has the structure of scFv while having a heavy chain variable region and a light chain variable region.

[0147] In such scFv, for example, between the heavy chain variable region and the light chain variable region, a spacer sequence consisting of about 10 to about 25 amino acid residues may be appropriately arranged. The number of amino acid residues is more preferably from about 15 to about 18. Such spacer sequence may be identical to the above-mentioned spacer sequence to be arranged in the chimeric antigen receptor (IV), or may be different therefrom.

[0148] The spacer sequence to be arranged in the chimeric antigen receptor (IV) is not particularly limited. For example, the spacer sequence may be consisting of about 10 to about 25 amino acid residues. The number of amino acid residues is more preferably from about 15 to about 18.

[0149] The transmembrane domain to be arranged in the chimeric antigen receptor (IV) is not particularly limited. Specifically, a cell transmembrane domain derived from a protein, such as CD28 or 4-1BB, expressed in T-cells or the like may be adopted while being allowed to appropriately have a mutation introduced thereinto.

[0150] The costimulator to be arranged in the chimeric antigen receptor (IV) may be a costimulator of T-cells or the like, and is not particularly limited. For example, 4-1BB, OX40, CD28, or the like may be adopted while being allowed to appropriately have a mutation introduced thereinto.

[0151] The TCR intracellular domain to be arranged in the chimeric antigen receptor (IV) is not particularly limited. For example, an intracellular domain derived from CD3, which is also called a TCR ζ chain, or the like may be adopted while being allowed to appropriately have a mutation introduced thereinto. It is preferred that a mutation be introduced into CD3 so as to include an Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif (ITAM).

[0152] The chimeric antigen receptor (IV) preferably has the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 21.

[0153] A mutation may be appropriately introduced into an amino acid sequence identifying the above-mentioned chimeric antigen receptor. In addition, a mutation may also be similarly introduced into each of the above-mentioned transmembrane domain, costimulator, and TCR intracellular domain. A specific number of mutations to be introduced is not particularly limited.

[0154] For example, identity between an amino acid sequence before mutation introduction and an amino acid sequence after mutation introduction is about 70%, preferably about 75%, more preferably about 80%, more preferably about 85%, more preferably about 90%, more preferably about 95%, more preferably about 96%, more preferably about 97%, more preferably about 98%, most preferably about 99%. Such numerical value is one obtained by rounding.

[0155] The above-mentioned introduction of a mutation into an amino acid sequence refers to substitution, deletion, insertion, or the like. Specific mutation introduction is not particularly limited as long as the mutation introduction can be achieved by adopting a commonly used method. For example, in the case of the substitution, a conservative substitution technology may be adopted.

[0156] For the production of such chimeric antigen receptor, a person skilled in the art can easily produce the chimeric antigen receptor with reference to a method described in, for example, each of Non Patent Literatures 4 to 6.

(V) Polynucleotide

[0157] A polynucleotide (V) is a polynucleotide encoding the amino acid sequence of the chimeric antigen receptor (IV) unlike the polynucleotide (II).

[0158] As in the polynucleotide (II), the base sequence of the polynucleotide (V) may be appropriately determined, for example, in silico on the basis of the amino acid sequence of the chimeric antigen receptor (IV). The kinds of codons to be used for determining the base sequence are not limited. The base sequence is preferably determined in consideration of the codon frequency of cells serving as a target for which the polynucleotide is to be used.

[0159] A specific base sequence is not particularly limited. For example, there may be given a polynucleotide having the base sequence set forth in SEQ ID NO: 22, which is determined on the basis of the amino acid sequence of the chimeric antigen receptor (IV) having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 21. Of course, in consideration of the kinds of the codons to be used being not limited, needless to say, the base sequence to be determined on the basis of such amino acid sequence is not limited to the base sequence set forth in SEQ ID NO: 22.

[0160] A base sequence encoding a signal peptide may be appropriately added to the 5'-end side of the polynucleotide (V) (corresponding to the N-terminus side of the chimeric antigen receptor (IV)).

[0161] A specific method of using the polynucleotide (V) is not particularly limited. For example, the polynucleotide (V) may be used for expressing the chimeric antigen receptor (IV) by being introduced into the following cell (VI).

(VI) Cell

[0162] A cell (VI) is a cell harboring the polynucleotide (V) unlike the host cell (III). The term "harbor" may be the same as in the host cell (III). A specific kind of the cell may also be the same as in the host cell (III), but the cell (VI) preferably has cytotoxic activity. Examples thereof may include a T-cell, an NK cell, and a K cell. Of those, a killer T-cell (sometimes referred to as cytotoxic T-cell [CTL]), which is a kind of T-cell, is most preferred.

[0163] It is preferred that, when the polynucleotide (V), which encodes the chimeric antigen receptor, included in the cell (VI) is expressed, the antigen recognition site of the antibody (I) serving as a component of the chimeric antigen receptor (IV) be exposed to the outside of the cell, and the transmembrane domain, the costimulator, or the TCR intracellular domain serving as a component of the chimeric antigen receptor (IV) be localized on a cell membrane or inside the cell.

[0164] The costimulator, or the domain to be localized on the cell membrane or inside the cell activates a signal that induces cytotoxic activity in cells when the antigen recognition site of the antibody (I) binds to the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 . In addition, the affinity of the antibody (I) for the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 is increased through activation of the human integrin β_7 . Therefore, the antibody (I) attacks, or exhibits cytotoxic activity on, a cell or tissue expressing active-form integrin β_7 serving as a target.

[0165] When the cell exhibiting such function is a T-cell, the cell is referred to as chimeric antigen receptor T-cell (VI-4). Like the chimeric antigen receptor T-cell, a cell having the possibility of exhibiting cytotoxic activity, such as an NK cell, can also exhibit an effect similar to that of the chimeric antigen receptor T-cell (such cell is referred to as chimeric antigen receptor NK cell) through cooperation between the binding of the antigen recognition site to the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of active-form human integrin β_7 , and the activation of a signal that induces cytotoxic activity at the cell membrane or the intracellular domain.

[0166] As described above, the cell (VI) exhibits cytotoxic activity and the like on a cell or tissue expressing active-form integrin β_7 . Accordingly, as with the antibody (I), a composition including the cell (VI) may be said to be useful as such a pharmaceutical composition (IV) as described in detail below. The active-form integrin β_7 is expressed in blood cells, such as plasma cells, and hence the cell (VI) is used as an active ingredient of a pharmaceutical composition for cancer (e.g., blood cancer). In particular, the cell (VI) is effectively used as a pharmaceutical composition for a disease causing an abnormality in the above-mentioned cells (e.g., myeloma or multiple myeloma).

(VII) Pharmaceutical Composition

[0167] A pharmaceutical composition (VII) includes the antibody (I) or the cell (VI). The cell (VI) is preferably the chimeric antigen receptor T-cell (VI-4).

[0168] The content of the antibody (I) or the cell (VI) in the pharmaceutical composition (VII) is not particularly limited. For example, in the case of the antibody (I), the content may be from about 0.001 part by weight to about 10 parts by weight with respect to 100 parts by weight of the pharmaceutical composition. In addition, in the case of the cell (VI), the content may be from about 1 cell/mL to about 10^4 cells/mL.

[0169] An administration method for the pharmaceutical composition (VII) is not particularly limited. Because its active ingredient is an antibody or a cell, parenteral administration or non-enteral administration is preferred. Examples thereof include intravenous administration, intramuscular administration, and subcutaneous administration. Of those, intravenous administration is preferred.

[0170] A dosage form of the pharmaceutical composition (VII) may be prepared together with a pharmacologically acceptable and commonly used carrier depending on the above-mentioned administration method. In consideration of the above-mentioned preferred administration method, the dosage form is preferably an injection.

[0171] A target disease of the pharmaceutical composition (VII) is not particularly limited. A specific example of the target disease is cancer, preferably blood cancer, more preferably a disease causing neoplastic growth of plasma cells. The term "disease causing neoplastic growth of plasma cells" refers to a disease characterized by neoplastic growth of abnormal plasma cells and an increase in abnormal protein secreted therefrom. Examples of such disease may include myeloma, multiple myeloma, plasma cell leukemia, plasmacytoma, H chain disease, and systemic AL amyloidosis. In another embodiment, the target disease of the pharmaceutical composition (VII) may be a different hematologic malignancy, such as malignant lymphoma or leukemia.

[0172] An administration target (subject) of the pharmaceutical composition (VII) may be a patient who has developed

the above-mentioned disease, or may be an animal having a risk of developing the above-mentioned disease. Whether "having a risk of developing" may be determined by a diagnosis method (XI) to be described later. The animal may be, for example, a mammal, and is preferably a human.

[0173] The dose of the pharmaceutical composition (VII) varies depending on various conditions of the administration target, such as the severity of the disease, the degree of a desired effect achieved by the administration, body weight, sex, age, and animal species, and cannot be unconditionally determined. For example, when the active ingredient is the antibody (I), the dose may be generally from about 1 μ g/kg (body weight) to about 10 g/kg (body weight) per day. In addition, when the active ingredient is the cell (VI), the dose may be generally from about 10^4 cells/kg (body weight) to about 10^9 cells/kg (body weight).

[0174] As with its dose, the administration schedule of the pharmaceutical composition (VII) also varies depending on various conditions of the administration target, such as the severity of the disease, and cannot be unconditionally determined. For example, the pharmaceutical composition (VII) is preferably administered in the above-mentioned daily dose at a frequency of from once a day to once a month.

(VIII) Treatment or Prevention Method for Disease

[0175] A treatment or prevention method (VIII) for a disease is a treatment or prevention method for a disease including a step of administering a therapeutically effective amount of the antibody (I) or the cell (VI) to a subject. The cell (VI) is preferably the chimeric antigen receptor T-cell (VI-4).

[0176] The subject may be the same as in the pharmaceutical composition (VII). When the subject is a patient who has developed a disease, the administration of the therapeutically effective amount of the antibody (I) or the cell (VI) is expected to achieve a therapeutic effect thereon, and when the subject is an animal having a risk of developing a disease, the administration is expected to achieve a preventing effect thereon. As described in a diagnosis method (XI) to be described below, the preventing means keeping of a numerical value measured by a commonly used immunological method from reaching a numerical value at which it is judged that a disease has developed.

[0177] The disease may be the same as in the pharmaceutical composition (VII), and is exemplified by, for example, cancer. A preferred example of the cancer may be a disease causing neoplastic growth of plasma cells (e.g., multiple myeloma).

[0178] The therapeutically effective amount may be the same as the dose of the pharmaceutical composition (VII), and a formulation of the antibody (I) or the cell (VI) may be the same as the dosage form of the pharmaceutical composition (VII). In addition, an administration method for the antibody (I) or the cell (VI), an administration schedule therefor, and the like may also be as described in detail in the pharmaceutical composition (VII).

[0179] The treatment or prevention method (VIII) for a disease may encompass a treatment or prevention method for multiple myeloma including targeting active-form human integrin β_7 . An example of the targeting may be application of the antibody (I) or the cell (VI).

(IX) Use

[0180] A use (IX) is a use of the antibody (I) or the cell (IV), for producing a pharmaceutical composition.

[0181] The pharmaceutical composition may be the same as the pharmaceutical composition (VII). The cell (IV) is preferably the chimeric antigen receptor T-cell (VI-4).

[0182] In addition, a target disease of the pharmaceutical composition is also the same, and the pharmaceutical composition is used for treating, for example, cancer, preferably blood cancer, more preferably a disease causing neoplastic growth of plasma cells (e.g., myeloma or multiple myeloma).

[0183] Besides, the content of the antibody (I) or the cell (VI) serving as an active ingredient in the pharmaceutical composition, the dosage form thereof, an administration method therefor, an administration schedule therefor, and the like may also be the same as those described in detail in the pharmaceutical composition (VII).

(X) Screening Method

[0184] A screening method (X) is a screening method for an active ingredient of a pharmaceutical composition for treating or preventing a disease causing neoplastic growth of plasma cells, including a step of selecting, from a compound library, a candidate substance that specifically binds to human integrin β_7 and binds to a region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 .

[0185] The pharmaceutical composition may be the same as the pharmaceutical composition (VII), and an example of an active ingredient of the pharmaceutical composition for treating or preventing cancer, preferably blood cancer, more preferably a disease causing neoplastic growth of plasma cells (e.g., myeloma or multiple myeloma) is the antibody (I).

[0186] The compound library is not particularly limited, and an existing library may be used. The compound library is preferably an antibody library, and the library preferably includes hybridomas generated using antibody-producing cells, such as B-cells, obtained from an animal immunized with a desired antigen.

[0187] Here, the desired antigen is not particularly limited, and is preferably, for example, the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 . The desired antigen is more preferably active-form human integrin β_7 .

[0188] A method of selecting the candidate substance is not particularly limited. For example, there may be adopted means involving: selecting a candidate substance that specifically binds to human integrin β_7 ; confirming that the candidate substance binds to a peptide fragment corresponding to the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the human integrin β_7 , through use of commonly used immunoassay means; and selecting such candidate substance.

[0189] In addition, there may be adopted means involving: selecting a candidate substance that specifically binds to the human integrin β_7 ; further confirming a candidate substance that binds to cells expressing the chimeric integrin β_7 in which only the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of integrin β_7 is of human origin and the rest is of non-human origin, such as mouse origin, described in detail in the antibody (I), through use of commonly used immunoassay means; and selecting such candidate substance. Means involving selecting such candidate substance may also be adopted.

[0190] In addition, there may also be adopted means involving: selecting a candidate substance that specifically binds to the human integrin β_7 ; further treating cells expressing the chimeric integrin β_7 in which only the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of integrin β_7 is of human origin and the rest is of non-human origin, such as mouse origin, described in detail in the antibody (I) with a phorbol ester, a manganese salt, or the like, and confirming a candidate substance showing an increased degree of binding after the treatment as compared to that before the treatment; and selecting such candidate substance.

[0191] In addition, there may also be adopted means involving: selecting a candidate substance that specifically binds to the human integrin β_7 ; further generating cells expressing the chimera in which a region of the amino acid residue positions 111 to 378 of the human integrin β_7 is replaced with one of mouse origin described in detail in the antibody (I), and a chimera in which a region of the amino acid residue positions 110 to 721 of the human integrin β_7 is replaced with one of mouse origin; confirming a candidate substance showing a higher degree of bind for the former; and selecting such candidate substance.

[0192] Further, the screening method (X) may also include a step of selecting a candidate substance through use of the presence of cytotoxic activity as an indicator. Specific cells serving as a target on which the cytotoxic activity is to be confirmed are not particularly limited. Examples thereof may include blood cells expressing active-form integrin β_7 of human origin having a feature in the PSI domain of the human integrin β_7 described above.

[0193] Here, when the candidate substance to be screened is an antibody, the step of selecting a candidate substance through use of the presence of cytotoxic activity as an indicator may be a step of selecting an antibody having ADCC activity or CDC activity.

[0194] The candidate substance to be selected by the screening method (X) as described above is preferably an antibody, more preferably a monoclonal antibody. The candidate substance to be selected is most preferably the antibody (I).

(XI) Diagnosis Method

[0195] A diagnosis method (XI) is a diagnosis method for cancer, and includes a step of bringing a sample collected from a subject into contact with the antibody (I).

[0196] The subject may be the same as the subject described in detail in the treatment or prevention method (VIII) for a disease.

[0197] The sample collected from a subject may be blood or bone marrow fluid.

[0198] A specific diagnosis method is not particularly limited, but may involve, for example, judging that the subject has developed, or has a risk of developing, cancer when cells that bind to the antibody (I) are detected.

[0199] A person skilled in the art can easily determine the degree of binding by adopting a commonly used immunoassay method. Any one of whether the subject has developed cancer and whether the subject has a risk of developing cancer may be determined depending on the degree measured here.

[0200] Specific diagnosis of cancer is not particularly limited, but, for example, the subject may be diagnosed as having developed, or having a risk of developing, blood cancer, more preferably a disease causing neoplastic growth of plasma cells (e.g., myeloma or multiple myeloma) when cells that bind to the antibody (I) are plasma cells.

(XII) Kit

[0201] A kit (XII) is a kit for diagnosis of cancer, including the antibody (I).

[0202] The cancer is not particularly limited, and may be as described in detail in the above-mentioned pharmaceutical

composition (VII), and is preferably blood cancer, more preferably a disease causing neoplastic growth of plasma cells (e.g., myeloma or multiple myeloma).

[0203] The kit (XII) may be appropriately accompanied by a manual. In such manual, the method described in detail in the above-mentioned diagnosis method (XI) may be described to serve as a criterion for the diagnosis of cancer.

Examples

[0204] Now, Examples for describing the present invention in more detail are described. Needless to say, the present invention is not limited to Examples described below.

Test Method: Flow Cytometry and Sorting

[0205] In the following Examples, flow cytometry (FACS) used for selecting cells was performed in the following manner.

[0206] Bone marrow mononuclear cells collected from an ilium of a myeloma patient who had given informed consent were suspended in an ACK solution (150 mM NH_4Cl and 10 mM KHCO_3), and the whole was left at rest at 4°C for 3 minutes to remove red blood cells. The bone marrow mononuclear cells after the removal were washed with PBS supplemented with 2% fetal bovine serum, and then, in order to prevent the binding of a non-specific antibody, blocking was performed at 4°C for 20 minutes in PBS containing 10% human AB serum.

[0207] After that, each antibody (see below) labeled with a fluorescent dye was added thereto to perform staining at 4°C for 30 minutes. After that, the cells were washed with PBS, and then suspended in PBS containing 1 $\mu\text{g/ml}$ propidium iodide (PI), followed by FACS analysis. The analysis of the cells and cell sorting were performed using FACS Aria Cell Sorter (manufactured by Becton Dickinson Immunocytometry System).

[0208] For the staining of the cells, the following monoclonal antibodies were appropriately selected and used.

- APC-conjugated anti-human CD34 antibody (manufactured by BD Pharmingen)
- PE-Cy7-conjugated anti-human CD34 antibody (manufactured by BD Pharmingen)
- APC/Cy7-conjugated anti-human CD19 antibody (manufactured by Biolegend)
- FITC-conjugated anti-human CD38 antibody (manufactured by eBiosciences)
- APC-conjugated anti-human CD138 antibody (manufactured by Biolegend)
- PE/Cy7-conjugated anti-human CD3 antibody (manufactured by Biolegend)
- FITC-conjugated anti-human CD14 antibody (manufactured by BD Pharmingen)
- PE/Cy7-conjugated anti-human CD45 antibody (manufactured by Biolegend)

[Example 1]

Generation of Monoclonal Antibody Library that binds to Myeloma Cell Line and does not bind to Healthy Person Peripheral Blood

[0209] In antibody therapy against multiple myeloma, it is important to use an antibody that binds to myeloma cells but does not bind to normal blood cells. In view of this, such antibody was identified by the following method. First, 10,000 clones or more of monoclonal antibodies that bound to various myeloma cell lines were generated using the following technique.

[0210] Balb/c mice were immunized at the footpad twice a week for from 2 weeks to 3 weeks through use of six kinds of human myeloma cell lines (MM.1s cells, RPMI8226 cells, INA6 cells, U266 cells, OPM2 cells, and KMS12BM cells) as antigens. After that, a lymph node below the knee was removed, and a cell suspension was generated and subjected to cell fusion with a SP2/0 mouse myeloma cell line to generate hybridomas. The cell fusion was performed using a method using polyethylene glycol (PEG method). After that, the cells were cultured in hypoxanthine-aminopterin-thymidine medium (HAT medium) to select hybridomas (>10,000 clones).

[0211] Finally, through use of culture supernatants of the hybridomas, a supernatant including antibodies that bound to the myeloma cell line used for the immunization and did not bind to healthy person peripheral blood-derived mononuclear cells was selected using FACS. Antibody candidates specific to myeloma cells obtained as a result of the foregoing were about 200 clones, and the hybridomas expressing those antibody candidates were grown and then cryopreserved.

[Example 2]

Identification of Antibody that specifically binds to Myeloma Cells in Human Multiple Myeloma Patient Bone Marrow

[0212] About 200 clones of candidate antibodies obtained in Example 1 described above were used to stain myeloma patient-derived bone marrow cells, followed by analysis using FACS.

[0213] Each candidate antibody was added to multiple myeloma patient-derived bone marrow cells, and the cells were incubated at 4°C for 30 minutes and then washed. A PE-conjugated anti-mouse IgG antibody was added as a secondary antibody, and the cells were further incubated at 4°C for 30 minutes. After washing, finally, the cells were stained using an APC-conjugated anti-human CD138 antibody, FITC-conjugated anti-human CD38, or PE/Cy7-conjugated anti-human CD45. As a negative control, a sample having added thereto an isotype control in place of the candidate antibody was prepared as the same time.

[0214] Those cells were analyzed using FACS to select an antibody that bound to CD45⁻CD38⁺⁺CD138⁺ myeloma plasma cells and CD45⁻CD38⁺⁺CD138⁻ myeloma progenitor cells, but did not bind to CD45⁺ blood cells.

[0215] As a result, an MMG49 antibody was identified as an antibody satisfying the above-mentioned condition (FIGS. 1 and FIGS. 2). In each histogram in the figures, the Y-axis represents the number of cells, and the X-axis represents the binding strength of the MMG49 antibody.

[Example 3]

Identification of Antigen Protein to which MMG49 Antibody binds

[0216] An antigen protein to which the MMG49 antibody bound was identified by an expression cloning method.

[0217] First, a cDNA library was generated from MM.1s cells, to which the MMG49 antibody was known to bind, using a superscript choice system for cDNA synthesis (Invitrogen), and was inserted into a pMXs retrovirus vector (donated by Professor Toshio Kitamura at the Institute of Medical Science of the University of Tokyo) using a BstXI adaptor (Invitrogen). The thus generated cDNA library was introduced into plat-E cells (donated by Professor Toshio Kitamura), and BaF3 cells were infected with the resultant retrovirus. Thus, BaF3 cells expressing an MM.1s-derived cDNA library were obtained.

[0218] Next, the cells were repeatedly concentrated by staining the cells with the MMG49 antibody and sorting positive cells by FACS (FIG. 3). After the third sorting, most cells were cells that bound to the MMG49 antibody. Then, the retrovirus insert carried by those cells was amplified by PCR, and then sequenced to identify its base sequence. As a result, it was revealed that the insert carried by the cells was ITGB7.

[Example 4]

Confirmation that Antigen to which MMG49 Antibody binds is ITGB7-expressed Protein by Generation of ITGB7-deficient Myeloma Cells

[0219] An ITGB7-deficient U266 myeloma cell line was generated using a Crispa-Cas9 system.

[0220] First, a vector was generated by inserting a doublestranded DNA sequence serving as an ITGB7-specific target sequence into a PX330 (adgene) vector. The vector was introduced together with a linear hygromycin-resistance gene expression vector (Clontech) serving as a vector for drug selection into U266 cells through use of Nucleofector (trademark) II (Lonza). After that, for clones that had grown in a medium supplemented with hygromycin, the expression of ITGB7 was stained using an FIB27 antibody (anti-integrin β_7 antibody; Biolegend), followed by analysis by FACS, to thereby identify ITGB7-deficient cells.

[0221] Next, the resultant ITGB7-deficient cells were stained using the MMG49 antibody and analyzed by FACS. As a result, it was found that the MMG49 antibody bound to wild-type U266 cells, whereas the binding of the MMG49 antibody had completely disappeared in the ITGB7-deficient strain (FIGS. 4). This shows that MMG49 is bound to only the ITGB7-expressed protein (integrin β_7).

[0222] Next, immunoprecipitation from a lysate of MM1s myeloma cells was performed using the MMG49 antibody, followed by SDS-PAGE. Subsequently, WB was performed using an anti-integrin β_7 antibody (Miltenyi). As a result, integrin β_7 was detected in the product immunoprecipitated with the MMG49 antibody (FIG. 5). This shows that the MMG49 antibody is bound to the integrin β_7 .

[Example 5]

Measurement of Binding Pattern of MMG49 Antibody in Cell Fractions of Healthy Person Peripheral Blood and Myeloma Patient Bone Marrow

[0223] Through use of a commercially available anti-integrin β_7 antibody (FIB27 antibody; Biolegend) and the MMG49 antibody, binding to various cell fractions in healthy person peripheral blood and bone marrow cells was measured.

[0224] Red blood cells were removed from healthy person-derived peripheral blood cells using HES40, and then an Fc receptor blocking reagent (Miltenyi) was added to block non-specific antibody binding. After that, the MMG49 antibody or the FIB27 antibody, or mouse IgG2a serving as an isotype control was added, and the cells were incubated at 4°C for 30 minutes and then washed. A PE-conjugated anti-mouse IgG antibody was added as a secondary antibody, and the cells were further incubated at 4°C for 30 minutes.

[0225] The resultant cells were washed, and then, finally, stained using an APC/Cy7-conjugated anti-human CD19 antibody, an FITC-conjugated anti-human CD14 antibody, or a PE/Cy7-conjugated anti-human CD3 antibody. The cells after the staining were analyzed using FACS, to thereby measure the binding of the MMG49 antibody and the FIB27 antibody in each fraction (FIGS. 6).

[0226] In addition, 100 μ l of PBS (containing EDTA) supplemented with 1 μ l of peripheral blood of a healthy person was similarly stained using the MMG49 antibody or the FIB27 antibody, and finally stained using a Pacific blue-conjugated anti-human CD235 antibody (BD Pharmingen) or an FITC-conjugated anti-human CD41 antibody (BD Pharmingen), and thus the presence or absence of the binding of each antibody to CD235⁺ red blood cells and platelets was also similarly investigated by FACS analysis (FIGS. 6). The results of the foregoing show that the FIB27 antibody strongly binds to many lymphoid cells, whereas the binding of the MMG49 antibody to the above-mentioned normal blood cells is extremely weak.

[0227] Further, in order to elucidate whether the binding of the MMG49 antibody to each normal cell fraction except for myeloma cells was absent in bone marrow, bone marrow cells of a myeloma patient were also similarly stained using the MMG49 antibody, and finally stained using an APC-conjugated anti-human CD34 antibody (manufactured by BD Pharmingen), Alexa647-conjugated human CD3 (manufactured by BD Pharmingen), a Cy7APC-conjugated anti-CD19 human antibody (manufactured by BD Pharmingen), a PE-Cy7-conjugated anti-CD38 human antibody (manufactured by BD Pharmingen), or an FITC-conjugated anti-CD14 human antibody (manufactured by BD Pharmingen). Those myeloma patient-derived bone marrow cells after the staining were analyzed using FACS, and thus the binding of the MMG49 antibody in each fraction was measured (FIGS. 7). The results of the foregoing show that the MMG49 antibody strongly binds to myeloma cells, but hardly binds to all normal blood cells including hematopoietic stem cell and progenitor cell fractions.

[Example 6]

Analysis of Binding of MMG49 to Various Cell Lines

[0228] The binding of the MMG49 antibody and the FIB27 antibody in various cell lines (MM1s cells, U266 cells, RPMI8226 cells, and JJN3 cells) was analyzed using FACS. A staining method is the same as in the case of peripheral blood or the like described above in Example 5.

[0229] Integrin β_7 is known to form a heterodimer with integrin α_4 or integrin α_E and be expressed on a cell surface. Therefore, the expression thereof was also analyzed at the same time using FACS, with an Alexa647-conjugated anti-human CD49d antibody (Biolegend) and an APC-conjugated anti-human CD103 antibody (Biolegend). CD103 represents the integrin α_E , and CD49d represents the integrin α_4 . In the same manner as in Experimental Example 5 described above, the expression levels of the integrin α_E and the integrin α_4 in healthy person-derived peripheral blood were also investigated (FIGS. 8).

[0230] As a result, ITGA4 was expressed in most of the myeloma cell lines, and ITGAE was expressed in none of the cell lines. The FIB27 antibody was bound to all myeloma cell lines, but the binding of the MMG49 antibody did not coincide with the expression level of the FIB27 antibody. Further, the binding of the MMG49 antibody or the FIB27 antibody to ITGA4-deficient U266 cells generated using a Crispa-Cas9 system was investigated by FACS, and as a result, it was found that the binding of both the antibodies to U266 cells had disappeared due to ITGA4 deficiency. That is, it was found that both the MMG49 antibody and the FIB27 antibody recognized β_7 integrin expressed as $\alpha_4\beta_7$ integrin.

[Example 7]

Analysis of Correlation between Activation of Integrin and Binding of MMG49 Antibody

[0231] In consideration of the unique binding manner of the MMG49 antibody described above, it was supposed that the MMG49 antibody recognized integrin β_7 that had been changed in structure through activation.

[0232] In view of the foregoing, K562 cells caused to forcibly express $\alpha_4\beta_7$ and human normal peripheral blood CD4T-cells concentrated using a CD4 T-cell enrichment kit (BD pharmingen) were washed with 5 mM EDTA/HBS, and then incubated in 1 mM Ca^{2+} /1 mM Mg^{2+} /HBS (buffer for low activity) or 2 mM Mn^{2+} /HBS (activating buffer) together with the MMG49 antibody or the FIB27 antibody at room temperature for 30 minutes, followed by washing. A PE-conjugated anti-mouse IgG antibody was added as a secondary antibody, and the cells were further incubated at room temperature for 30 minutes. The resultant cells were analyzed using FACS, to thereby measure the binding of the MMG49 antibody and the FIB27 antibody in cells in which the integrin $\alpha_4\beta_7$ had been activated.

[0233] As a result, an enhancement in binding of the MMG49 antibody in the presence of Mn^{2+} was observed (FIGS. 10). Meanwhile, no similar change was observed for the FIB27 antibody. This suggests the possibility that the MMG49 antibody is an antibody specific to activated conformation of integrin β_7 .

[Example 8]

Identification of Epitope essential for Recognition by MMG49 Antibody

[0234] In order to identify an epitope recognized by the MMG49 antibody, vectors for expressing eight kinds of human/mouse chimeric integrin β_7 proteins as illustrated in FIG. 11 were generated using an overlapping PCR method.

[0235] Each expression vector was introduced into 293T-cells by a lipofection method, and 48 hours after that, the presence or absence of the binding of the MMG49 antibody was analyzed. The cells were suspended in PBS supplemented with 1% fetal bovine serum, the MMG49 antibody was added, and then the whole was left at rest at room temperature for 30 minutes. After washing, an Alexa488-anti-mouse IgG antibody was added, and the whole was left at rest at room temperature for 30 minutes, followed by analysis by FACS.

[0236] As a result, it was revealed that the MMG49 antibody strongly bound to a chimeric integrin β_7 protein (#4960) in which a region of the amino acid residue positions 110 to 721 was of mouse origin and the rest (region of the amino acid residue positions 20 to 109 and region of the amino acid residue positions 722 to 798) had sequences of human origin in almost the same manner as in the case of a chimeric integrin β_7 protein entirely of human origin (#4927) (FIG. 11 to FIG. 13).

[0237] In view of the fact that the region of the amino acid residue positions 722 to 798 includes a transmembrane domain (TM) and an intracellular domain (cytoplasmic), and that a region of the amino acid residue positions 1 to 19 is a signal peptide, it was shown that an epitope essential for the binding of the MMG49 antibody was present in the region of the amino acid residue positions 20 to 109 including a PSI domain.

[0238] In addition, it was revealed that the MMG49 antibody had a slightly increased avidity for a chimeric integrin β_7 protein (#4961) in which a region of the amino acid residue positions 110 to 378 was of mouse origin, and in which a region of the amino acid residue positions 20 to 109 and a region of amino acid residue positions 379 to 798 were of human origin as compared to the chimeric integrin β_7 protein (#4960), and the increased avidity was at exactly the same binding level as in the case of the chimeric integrin β_7 protein entirely of human origin (#4927).

[0239] Further, it was also revealed that the MMG49 antibody had slightly increased binding capacity for a chimeric integrin β_7 protein (#4944) in which the above-mentioned region of the amino acid residue positions 20 to 109, which had been shown to include the epitope of the MMG49 antibody, and a region of the amino acid residue positions 1 to 378 including a region corresponding to a signal peptide of the amino acid residue positions 1 to 19 were of mouse origin, and in which a region of the amino acid residue positions 379 to 798 was of human origin, and a chimeric integrin β_7 protein (#4945) in which a region of the amino acid residue positions 1 to 416 was of human origin and a region of the amino acid residue positions 417 to 798 was of human origin as compared to a chimeric integrin β_7 protein (#4946) in which a region of the amino acid residue positions 1 to 563 was of mouse origin and a region of the amino acid residue positions 564 to 798 was of human origin, and a chimeric integrin β_7 protein (#4947) in which a region of the amino acid residue positions 1 to 721 was of mouse origin and a region of the amino acid residue positions 722 to 798 was of human origin.

[0240] In view of the above-mentioned experimental results, it was also revealed that the specific avidity, that is, affinity of the MMG49 antibody for the region of the amino acid residue positions 20 to 109 of the integrin β_7 was increased by the region of the amino acid residue positions 379 to 721 of human integrin β_7 , that is, in the presence of the region of the amino acid residue positions 379 to 721 of human integrin β_7 .

[Example 9]

Determination of Base Sequence of Antibody Molecule Variable Regions of MMG49 Antibody

[0241] The subclass of the MMG49 antibody was confirmed using an Isotyping kit (Roche), and was confirmed to be IgG2a subclass. Further, the base sequences and amino acid sequences of variable regions of the MMG49 antibody were determined.

[0242] A sequence determination method was performed using a Smarter RACE cDNA amplification kit (Clontech). That is, cDNAs generated from mRNAs derived from hybridomas MMG49 producing the MMG49 antibody were used as templates to amplify cDNA fragments of H-chain and κ -chain variable regions by a PCR reaction, and their base sequences were read. The read amino acid sequence and base sequence, and hypervariable regions (CDR1 to CDR3) of the H-chain variable region are shown in Tables 3 and 4 below.

[0243] The read amino acid sequence and base sequence, and hypervariable regions (CDR1 to CDR3) of the L-chain (κ -chain) variable region are also shown in Tables 3 and 4 below.

[0244] In order to confirm the specificity of the isolated variable region sequences of the MMG49 antibody, variable region sequence cDNAs were bound to a human IgG4 constant domain and human IgL κ -chain constant domain sequence to generate a chimerized antibody. Specifically, each variable region sequence was inserted into pFuse-CH-Ig-hG4 or pFuse-CL-Ig-hk (Invitrogen) using In-Fusion cloning kit (Takara). After that, the resultant was introduced into FreeStyle CHO-S cells (Invitrogen), and a chimerized antibody secreted into the culture supernatant thereof was recovered. Next, MM1s cells to which the MMG49 antibody bound and KMS12BM cells to which the MMG49 antibody did not bind were incubated in a buffer supplemented with MMG49-hlgG4, and were washed. After that, biotinylated anti-human IgG (Rockland) was added as a secondary antibody, and the cells were washed again, and then stained by adding streptavidin-PE (Biolegend), followed by FACS analysis. As a result, MMG49-hlgG4 showed a staining pattern similar to that of the original MMG49 antibody, suggesting that the obtained variable region sequences were correct (FIGS. 14).

<Table 3: Amino acid sequences of MMG49>

Heavy chain	CDR1 (SEQ ID NO: 1)	GYTFSSYW
	CDR2 (SEQ ID NO: 2)	MLPGSGSS
	CDR3 (SEQ ID NO: 3)	ARGDGNVWYFDV
	Variable region (SEQ ID NO: 4)	MEWTWVFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSGAELMKPGAS VKISCKASGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEMLP GSGSSNYNEKFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARGDGNVWYFDVWGAG
Light chain	CDR1 (SEQ ID NO: 6)	SSVGY
	CDR2 (SEQ ID NO: 7)	ATS
	CDR3 (SEQ ID NO: 8)	QQWSSDPPT
	Variable region (SEQ ID NO: 9)	MDFQVQIFSFLLISASVIMSRGQIVLSQSPAILAS PGEKVIMTCRASSSVGYMHWFOQKPGSSPKPWYAT SNLASGVPARFSGSESGTSYSLTISRVEAEDAATYY CQQWSSDPPTFCGGGTKLEIK

<Table 4: Base sequences of MMG49>		
5	CDR1 (SEQ ID NO: 11)	GGCTACACATTCAGTAGCTACTGG
	CDR2 (SEQ ID NO: 12)	ATGTTACCTGGAAGTGGTAGTTCT
	CDR3 (SEQ ID NO: 13)	GCAAGGGGGGATGGTAACTACTGGTACTTCGATGTC
	Variable region (SEQ ID NO: 14)	ATGGAATGGACCTGGGTCTTTCTCTTCCTCCTGTCA GTAAC TGCAGGTGTCCACTCCCAGGTT CAGCTGCAG CAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCA GTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACATT C AGTAGCTACTGGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCT GGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATGTTACCT GGAAGTGGTAGTTCTAACTACAATGAGAAGTTCAAG GGCAAGGCCACATTCAGTGCAGATACATCCTCCAAC ACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAG GACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGGGGGGATGGT AACTACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGG
10	Heavy chain	
15		
20		
25		
30	Light chain	
35		
	CDR1 (SEQ ID NO: 16)	TCAAGTGTAGGTTAC
	CDR2 (SEQ ID NO: 17)	GCCACATCC
	CDR3 (SEQ ID NO: 18)	CAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCGACG
	Variable region (SEQ ID NO: 19)	ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCCTGCTA ATCAGTGCTTCAGTCATAATGTCCAGAGGACAAAT T GTTCTCTCCCAGTCTCCAGCAATCCTGTCTGCATCT CCAGGGGAGAAGGTCACAATGACTTGCAGGGCCAGC TCAAGTGTAGGTTACATGCACTGGTTCAGCAGAAG CCAGGATCCTCCCCCAAACCTGGATTTATGCCACA TCCAACCTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGT GGCAGTGAGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATC AGCAGAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTAC TGCCAGCAGTGGAGTAGTGACCCACCGACGTTCCGT GGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA

[Example 10]

Generation of Chimeric Antigen Receptor T-cells using Antibody Molecule Variable Regions of MMG49 Antibody

[0245] Chimeric antigen receptor T-cells (hereinafter referred to as MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells) were generated using the MMG49 antibody molecule variable region sequences by the following procedure with reference to Non Patent Literatures 2 to 4 and the like.

(1) Cloning of CD28 and CD3z:

[0246] RNAs were collected from Jurkat cells through use of Trizol (Invitrogen), and cDNAs were generated using a Superscript III cDNA synthesis kit (Invitrogen). Then, the cDNAs were used as templates to amplify cDNAs of CD28 and CD3z by PCR, each of which was cloned using a TA cloning kit (Invitrogen), and their base sequences were confirmed by sequencing.

(2) Binding of Four Fragments, i.e., MMG49 antibody-derived VL/VH, and CD28/CD3z:

[0247] Through use of an overlapping PCR method, respective gene fragments of the MMG49 antibody-derived VL region and VH region, and the CD28 and CD3z cloned above were bound to each other to generate chimeric cDNA. A procedure therefor and primers used are illustrated in FIG. 15. The base sequences of the primers used are shown in

Table 4 below.

Table 5

No.	Primer name	Base sequence
23	49_car_vk-s5	gaattccaccatggattttcaagtcagatt
24	49_car_vk-as6	gccggaaccgctagtggagcccggttgattccagctgggt
25	593_car_vk_as4	gctgccttctccgctgccaggttgccggaaccgctagtggagcc
26	49_car_vh-s5	aaacctggcagcggagaaggcagccaggttcagctgcagcagtc
27	49_car_vh-as6	tgaggagacggtgaccgtgg
28	49_VKVH28as8	atacataactcaattgcggccgctgaggagacggtgaccgtgg
29	49carinfus1	ctaggcgcggaattccaccatggatttc
30	tcrcarinfuas4	aatgtcgacctcgagtggctgttagcgag

[0248] The bound chimeric cDNA was cloned using a ZeroBlunt PCR cloning kit (Invitrogen), and then sequenced to confirm its base sequence. In addition, an amino acid sequence (SEQ ID NO: 21) confirmed on the basis of the confirmed base sequence and the base sequence (SEQ ID NO: 22) are shown in the sequence listing. The amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 21 is one obtained by conversion into an amino acid sequence from the disclosure codon (atg) immediately following the Kozak sequence (gaattccacc) shown above in SEQ ID NO: 23, which was excluded.

(3) Insertion into Expression Vector:

[0249] Subsequently, the chimeric cDNA bound in (2) was cleaved with two restriction enzymes EcoRI/Sall, and inserted into an MSCV-ires-GFP vector.

[0250] The MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor cDNA retrovirus vector generated by the foregoing was introduced into 293T cells together with a gag/pol and VSV-G envelope expression vector through use of lipofectamine 2000 (Invitrogen), to thereby generate a retrovirus. After 48 hours from the gene introduction, a supernatant was recovered and used as a virus solution.

(4) Introduction into T-cells:

[0251] Subsequently, cDNA of an MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor was introduced into human T-cells as described below.

[0252] First, human peripheral blood mononuclear cells were added to a 48-well plate coated with an anti-CD3 antibody (eBioscience) and cultured for 72 hours. X-VIVO15 (Lonza) supplemented with 10% human AB serum and IL-2 (175 IU/L) was used as a culture medium, and the peripheral blood mononuclear cells were stimulated. After that, the virus solution generated above was added to a 48-well plate coated with Retronectin (Takara), and the virus was adsorbed to Retronectin by centrifugation at $1,700 \times g$ for 120 minutes. After that, the peripheral blood mononuclear cells (including T-cells) after the stimulation were added, and the gene was introduced thereto. After that, culture was continued in the above-mentioned medium to amplify MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells, which were used in the following investigation. The T-cells caused to express a CAR construct using variable regions of the MMG49 antibody were stained using a PE-anti-human F(ab')₂ antibody (Jackson Laboratory), and as a result, the expression of human F(ab')₂ was detected in proportion to the expression of GFP indicating the introduction of the construct (FIGS. 16). That is, it was confirmed that the introduced CAR was expressed on a cell surface.

[Example 9]

Analysis of Recognition of ITGB7-expressing Tumor Cells by MMG49 Antibody-derived Chimeric Antigen Receptor T-cells and Cytotoxic Activity thereof

[0253] The MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells generated by the above-mentioned method or control T-cells having introduced therein only GFP were cocultured with K562 cells expressing no integrin β_7 or K562 cells caused to forcibly express integrin $\alpha_4\beta_7$, and the amount of a produced cytokine was quantitatively determined. Specifically, 1×10^5 each of the T-cells and the target cells were added to a 96-well plate. After 24 hours, a supernatant

was recovered, and the amount of production of IFN- γ was measured by ELISA. The measurement was performed using a Quantikine kit (R&D). As a result, only in the coculture of the K562 cells caused to forcibly express integrin $\alpha_4\beta_7$ with the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells, higher production of IFN- γ and IL2 than in the control (T-cells obtained by similarly culturing stimulated peripheral blood mononuclear cells having introduced therein a GFP expression vector) was observed (FIGS. 17).

[0254] Next, the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells or control T-cells having introduced therein only GFP were cocultured with myeloma cell lines to which the MMG49 antibody bound (MM.1s cells, RPMI8226 cells, and JJN3 cells) or cells to which the MMG49 antibody did not bind (KMS12BM, Molt4, and Raji cells), and the amount of a produced cytokine was similarly quantitatively determined. As a result, only when the MM.1s, RPMI8226 cells, and JJN3 cells, which were cells to which the MMG49 antibody bound, were cocultured with the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells, higher production of IFN- γ and IL2 than in the control (T-cells obtained by similarly culturing stimulated peripheral blood mononuclear cells having introduced therein a GFP expression vector) was observed (FIGS. 18 and FIGS. 19). The results show that the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells are activated by recognizing an antigen recognized by the MMG49 antibody (sometimes referred to as MMG49 antigen).

[0255] Further, whether the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells damaged a myeloma cell line was investigated by ^{51}Cr cytotoxicity assay. First, K562 cells expressing no integrin β_7 or K562 cells caused to forcibly express integrin $\alpha_4\beta_7$ to be used as target cells were cultured in RPMI1640 medium supplemented with 10% FCS, and were prepared so that the number of cells was from 0.5×10^4 to 1.0×10^4 .

[0256] An appropriate amount of $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ was added thereto and allowed to react therewith at 37°C for 2 hours to label the cells with ^{51}Cr , and the resultant cells were washed and then used as target cells. The target cells were mixed with MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells suspended in RPMI1640 medium supplemented with fetal bovine serum, and the cells were cocultured for 4 hours.

[0257] After that, ^{51}Cr released into the supernatant was measured with a γ -counter. A cell damage percentage (%) was determined on the basis of the following expression (1).

$$(A-B) / (C-D) \times 100 \quad (1)$$

A: Amount of ^{51}Cr released from cells used in experiment

B: Spontaneous ^{51}Cr release amount under antibody-free state

C: Maximum ^{51}Cr release amount with addition of 1% Triton X-100

D: Spontaneous ^{51}Cr release amount under antibody-free state.

[0258] As a result, in the K562 cells caused to forcibly express integrin $\alpha_4\beta_7$ to which the MMG49 antibody bound, higher cell damage caused by the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells than in the T-cells expressing only GFP serving as a control was observed (FIGS. 20).

[0259] Next, the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells or control T-cells having introduced therein only GFP were cocultured with myeloma cell lines to which the MMG49 antibody bound (MM1s cells, RPMI8226 cells, and JJN3 cells) or cells to which the MMG49 antibody did not bind (KMS12BM, Molt4, and Raji cells), and a similar investigation was performed. As a result, only in the K562 cells caused to forcibly express integrin $\alpha_4\beta_7$ to which the MMG49 antibody bound, higher cell damage caused by the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells than in the T-cells expressing only GFP serving as a control was observed (FIGS. 21).

[0260] The above-mentioned results show that the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells can specifically damage cells expressing an antigen to be recognized by the MMG49 antibody.

[Example 11]

Analysis of Myeloma Cell-eliminating Ability exhibited by MMG49 Antibody-derived Chimeric Antigen Receptor T-cells in vivo

[0261] A therapeutic effect on multiple myeloma was investigated in vivo using the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells.

[0262] Myeloma cell line MM1s cells (4×10^5 cells) were transplanted into the bone marrow of NOG mice subjected to radiation exposure at 2.4 Gy. After 5 days, the mice were grouped into an MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cell-administered group and a control T-cell-administered group, and each group was intravenously administered with 5×10^6 cells per mouse. After 7 days from the administration, the bone marrow was analyzed. As a result, marked growth of myeloma cells was clearly observed in all mice of the control T-cell-administered group, whereas the tumor had almost completely disappeared in the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cell-administered

group. The results show that the administration of the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells has an ability to eliminate a tumor expressing the MMG49 antigen even in vivo (FIGS. 22).

[0263] Further, a therapeutic effect on multiple myeloma was investigated in vivo using a myeloma-systemically seeded model.

[0264] Myeloma cell line MM1s cells (5×10^6 cells) having introduced therein luciferase gene were intravenously transplanted into NOG mice subjected to radiation exposure at 2.4 Gy. After 5 days from the transplantation, the degree of engraftment of the tumor cells was measured using an IVIS imaging system (PerkinElmer). After that, the mice were grouped into an MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cell-administered group and a control T-cell-administered group, and each group was intravenously administered with 3×10^6 cells per mouse 5 days and 7 days after the transplantation. After 7 days from the second T-cell administration, a tumor volume was measured again using the IVIS imaging system. As a result, marked growth of myeloma cells was clearly observed in all mice of the control T-cell-administered group, whereas the tumor had almost completely disappeared in the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cell-administered group (FIGS. 23). The results show that the administration of the MMG49 antibody-derived chimeric antigen receptor T-cells has an ability to eliminate a tumor expressing the MMG49 antigen even in vivo.

[Example 12]

[0265] For the epitope of the MMG49 antibody, an experiment for investigating, in more detail, the results of the investigation in Example 8 was performed. Vectors for expressing three kinds of human/mouse chimeric integrin β_7 protein as illustrated in FIGS. 25 were generated, and each of the expression vectors was introduced into 293T cells by a lipofection method. After 48 hours, the presence or absence of the binding of the MMG49 antibody was analyzed by FACS.

[0266] As a result, it was revealed that the MMG49 antibody strongly bound to a chimeric integrin β_7 protein (ch5.1 in FIGS. 25) in which regions of the amino acid residue positions 1 to 32 and positions 91 to 798 of integrin β_7 protein were of mouse origin, and the rest (region of the amino acid residue positions 33 to 90) had a sequence of human origin in almost the same manner as in the case of the integrin β_7 protein entirely of human origin (#4927 in FIG. 11) (FIGS. 25).

[0267] Thus, it was strongly suggested that the epitope of the MMG49 antibody was included in the amino acid residues at positions 33 to 90 of the human integrin β_7 protein.

[Example 13]

[0268] Vectors expressing the human integrin β_7 , the mouse integrin β_7 , and various variants obtained by mutating only one or two amino acids of the human integrin β_7 into an amino acid sequence of mouse origin (R35E/N36D, H38D, M41L/L42Q, and A48V) were introduced into 293T cells by a lipofection method, and an experiment was performed in the same manner as in Example 8 thereafter. As a result, as shown in FIGS. 25, it was revealed that only the A48V variant had a remarkably reduced avidity for the MMG49 antibody as compared to the human integrin β_7 , and had a numerical value close to that of the mouse integrin β_7 . The results revealed that the amino acid residue at position 48 of the human integrin β_7 was strongly related to the epitope of the MMG49 antibody, or included in the epitope of the MMG49 antibody.

[0269] Base sequences and amino acid sequences described herein are shown below.

SEQUENCE LISTING

5 <110> OSAKA UNIVERSITY
 <120> Antibody
 <130> P16-107WO
 10 <150>\201@JP 2015-159240
 <151>\201@2015-08-11
 <160> 31
 <170> PatentIn version 3.5
 15 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 20 <220>
 <223> VH CDR1 of MMG49 antibody
 <400> 1
 25 Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp
 1 5
 <210> 2
 <211> 8
 <212> PRT
 30 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VH CDR2 of MMG49 Antibody
 <400> 2
 35 Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser
 1 5
 40 <210> 3
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 45 <220>
 <223> VH CDR3 of MMG49 Antibody
 <400> 3
 50 Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val
 1 5 10
 55 <210> 4
 <211> 131
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

EP 3 336 184 A1

<223> VH of MMG49 Antibody

<400> 4

5 Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
10 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

15 Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn
20 65 70 75 80

Glu Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

25 Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

30 Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp
115 120 125

Gly Ala Gly
130

<210> 5

<211> 461

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Heavy Chain of MMG49 Antibody

<400> 5

45 Met Glu Trp Thr Trp Val Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys
50 20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

55 Ser Ser Tyr Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu

EP 3 336 184 A1

	50		55		60												
5	Glu 65	Trp	Ile	Gly	Glu	Met 70	Leu	Pro	Gly	Ser	Gly 75	Ser	Ser	Asn	Tyr	Asn 80	
	Glu	Lys	Phe	Lys	Gly 85	Lys	Ala	Thr	Phe	Thr 90	Ala	Asp	Thr	Ser	Ser	Asn 95	
10	Thr	Ala	Tyr	Met 100	Gln	Leu	Ser	Ser	Leu 105	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser 110	Ala	Val	
15	Tyr	Tyr	Cys 115	Ala	Arg	Gly	Asp	Gly 120	Asn	Tyr	Trp	Tyr	Phe 125	Asp	Val	Trp	
	Gly	Ala	Gly	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala 135	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	
20	Val 145	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr 155	Leu	Gly	Cys	Leu	Val 160	
25	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro 165	Glu	Pro	Val	Thr	Leu 170	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly 175	Ser	
30	Leu	Ser	Ser	Gly 180	Val	His	Thr	Phe	Pro 185	Ala	Val	Leu	Gln	Ser 190	Asp	Leu	
	Tyr	Thr	Leu 195	Ser	Ser	Ser	Val	Thr	Val 200	Thr	Ser	Ser	Thr 205	Trp	Pro	Ser	
35	Gln 210	Ser	Ile	Thr	Cys	Asn	Val 215	Ala	His	Pro	Ala	Ser 220	Ser	Thr	Lys	Val	
40	Asp 225	Lys	Lys	Ile	Glu	Pro 230	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile 235	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro 240	
45	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala 245	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly 250	Gly	Pro	Ser	Val	Phe 255	Ile	
	Phe	Pro	Pro	Lys 260	Ile	Lys	Asp	Val	Leu 265	Met	Ile	Ser	Leu	Ser 270	Pro	Ile	
50	Val	Thr	Cys 275	Val	Val	Val	Asp	Val 280	Ser	Glu	Asp	Asp	Pro	Asp 285	Val	Gln	
55	Ile	Ser 290	Trp	Phe	Val	Asn	Asn 295	Val	Glu	Val	His	Thr 300	Ala	Gln	Thr	Gln	

EP 3 336 184 A1

Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu
305 310 315 320

5 Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys
325 330 335

Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys
340 345 350

10 Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro
355 360 365

15 Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr
370 375 380

20 Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys
385 390 395 400

Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

25 Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val
420 425 430

30 Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn
435 440 445

35 His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 6
<211> 5
<212> PRT
40 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL CDR1 of MMG49 Antibody

<400> 6

45 Ser Ser Val Gly Tyr
1 5

<210> 7
<211> 3
<212> PRT
50 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL CDR2 of MMG49 Antibody

55 <400> 7

Ala Thr Ser
1

5 <210> 8
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
10 <223> VL CDR3 of MMG49

<400> 8

Gln Gln Trp Ser Ser Asp Pro Pro Thr
15 1 5

<210> 9
<211> 128
20 <212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> VL of MMG49 Antibody

25 <400> 9

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

30 Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 35 40 45

Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

40 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

45 Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

50 Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

55 <210> 10
<211> 234

EP 3 336 184 A1

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> Light Chain of MMG49 Antibody

<400> 10

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp
100 105 110

Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln
130 135 140

Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr
145 150 155 160

Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln
165 170 175

Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
180 185 190

Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg
195 200 205

His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro
210 215 220

EP 3 336 184 A1

Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
225 230

5 <210> 11
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

10 <220>
<223> VH CDR1 of MMG49 Antibody

<400> 11
ggctacacat tcagtagcta ctgg 24

15 <210> 12
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

20 <220>
<223> VH CDR2 of MMG49 Antibody

<400> 12
atgttacctg gaagtggtag ttct 24

25 <210> 13
<211> 36
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

30 <220>
<223> VH CDR3 of MMG49 Antibody

<400> 13
gcaagggggg atggtaacta ctggtacttc gatgtc 36

35 <210> 14
<211> 393
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> VH of MMG49 Antibody

45 <400> 14
atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag 60

gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120

tgcaaggctt ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct 180

50 ggacatggcc ttgagtggat tggagagatg ttacctggaa gtggtagttc taactacaat 240

gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300

caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag gggggatggg 360

55 aactactggg acttcgatgt ctggggcgca ggg 393

EP 3 336 184 A1

<210> 15
 <211> 1383
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> Heavy Chain of MMG49 Antibody

<400> 15
 atggaatgga cctgggtctt tctcttcctc ctgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag 60
 gttcagctgc agcagtctgg agctgagctg atgaagcctg gggcctcagt gaagatatcc 120
 tgcaaggctt ctggctacac attcagtagc tactggatag agtgggtaaa gcagaggcct 180
 ggacatggcc ttgagtggat tggagagatg ttacctggaa gtggtagttc taactacaat 240
 gagaagttca agggcaaggc cacattcact gcagatacat cctccaacac agcctacatg 300
 caactcagca gcctgacatc tgaggactct gccgtctatt actgtgcaag gggggatggt 360
 aactactggt acttcgatgt ctggggcgca ggggctaaaa caacagcccc atcgggtctat 420
 ccactggccc ctgtgtgtgg agatacaact ggctcctcgg tgactctagg atgcctggtc 480
 aagggttatt tccctgagcc agtgaccttg acctggaact ctggatccct gtccagtgggt 540
 gtgcacacct tcccagctgt cctgcagtct gacctctaca ccctcagcag ctcagtgact 600
 gtaacctcga gcacctggcc cagccagtcc atcacctgca atgtggccca cccggcaagc 660
 agcaccaagg tggacaagaa aattgagccc agagggccca caatcaagcc ctgtcctcca 720
 tgcaaatgcc cagcacctaa cctcttggggt ggaccatccg tcttcatctt ccctccaaag 780
 atcaaggatg tactcatgat ctccctgagc cccatagtca catgtgtggt ggtggatgtg 840
 agcgaggatg acccagatgt ccagatcagc tggtttgtga acaacgtgga agtacacaca 900
 gctcagacac aaacccatag agaggattac aacagtactc tccgggtggt cagtgccttc 960
 cccatccagc accaggactg gatgagtggc aaggagttca aatgcaaggt caacaacaaa 1020
 gacctcccag cgcccatcga gagaacctc tcaaaaccca aagggtcagt aagagctcca 1080
 caggtatatg tcttgccctc accagaagaa gagatgacta agaaacaggt cactctgacc 1140
 tgcattggtca cagacttcat gcctgaagac atttacgtgg agtggaccaa caacgggaaa 1200
 acagagctaa actacaagaa cactgaacca gtccctggact ctgatggttc ttacttcatg 1260
 tacagcaagc tgagagtgga aaagaagaac tgggtggaaa gaaatagcta ctctgttca 1320
 gtggtccacg agggctctgca caatcaccac acgactaaga gcttctcccg gactccgggt 1380
 aaa 1383

<210> 16
 <211> 15
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> VL CDR1 of MMG49 Antibody
 5
 <400> 16
 tcaagtgtag gttac 15
 <210> 17
 10 <211> 9
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 15 <223> VL CDR2 of MMG49 Antibody
 <400> 17
 gccacatcc 9
 20 <210> 18
 <211> 27
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 25 <223> VL CDR3 of MMG49 Antibody
 <400> 18
 cagcagtgga gtagtgaccc accgacg 27
 30 <210> 19
 <211> 384
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 35 <220>
 <223> VL of MMG49 Antibody
 <400> 19
 atggattttc aagtgcagat ttccagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc 60
 40 agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag 120
 gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcactgggt ccagcagaag 180
 ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtccct 240
 45 gctcgcttca gtggcagtga gtctgggacc tottactctc tcacaatcag cagagtggag 300
 gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgaccacc gacgttcggt 360
 50 ggaggcacca agctggaaat caaa 384
 <210> 20
 <211> 702
 <212> DNA
 55 <213> Artificial Sequence
 <220>

EP 3 336 184 A1

<223> Light Chain of MMG49 Antibody

<400> 20

```

atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc      60
5
agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc aggggagaag      120
gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcactgggt ccagcagaag      180
ccaggatcct cccccaaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc tggagtcctt      240
10
gctcgcttca gtggcagtga gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag cagagtggag      300
gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgaccacc gacgttcggt      360
ggaggcacca agctggaaat caaagcagat gctgcaccaa ctgtatccat cttcccacca      420
15
tccagtgagc agttaacatc tggaggtgcc tcagtcgtgt gcttcttgaa caacttctac      480
cccaaagaca tcaatgtcaa gtggaagatt gatggcagtg aacgacaaaa tggcgtcctg      540
20
aacagttgga ctgatcagga cagcaaagac agcacctaca gcatgagcag caccctcacg      600
ttgaccaagg acgagtatga acgacataac agctatacct gtgaggccac tcacaagaca      660
tcaacttcac ccattgtcaa gagcttcaac aggaatgagt gt      702

```

<210> 21

<211> 485

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CAR described in example

<400> 21

```

35 Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile
20 25 30
40

Leu Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser
35 40 45

45 Ser Ser Val Gly Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser
50 55 60

50 Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
65 70 75 80

Ala Arg Phe Ser Gly Ser Glu Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile
85 90 95
55

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp

```

EP 3 336 184 A1

	100		105		110
5	Ser Ser Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	115	120	125	
10	Arg Gly Ser Thr Ser Gly Ser Gly Lys Pro Gly Ser Gly Glu Gly Ser	130	135	140	
15	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala	145	150	155	160
20	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr	165	170	175	
25	Trp Ile Glu Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile	180	185	190	
30	Gly Glu Met Leu Pro Gly Ser Gly Ser Ser Asn Tyr Asn Glu Lys Phe	195	200	205	
35	Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	210	215	220	
40	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	225	230	235	240
45	Ala Arg Gly Asp Gly Asn Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly	245	250	255	
50	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro	260	265	270	
55	Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val	275	280	285	
	Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys	290	295	300	
	Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser	305	310	315	320
	Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg	325	330	335	
	Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro	340	345	350	

EP 3 336 184 A1

Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe
355 360 365

5 Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro
370 375 380

10 Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly
385 390 395 400

Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro
405 410 415

15 Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr
420 425 430

20 Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly
435 440 445

Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln
450 455 460

25 Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln
465 470 475 480

30 Ala Leu Pro Pro Arg
485

35 <210> 22
<211> 1468
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

40 <220>
<223> CAR described in example

<400> 22
gaattccacc atggattttc aagtgcagat ttccagcttc ctgctaataca gtgcttcagt 60
cataatgtcc agaggacaaa ttgttctctc ccagtctcca gcaatcctgt ctgcatctcc 120
45 aggggagaag gtcacaatga cttgcagggc cagctcaagt gtaggttaca tgcaactggt 180
ccagcagaag ccaggatcct cccccaacc ctggatttat gccacatcca acctggcttc 240
tggaagtcct gctcgcttca gtggcagtga gtctgggacc tcttactctc tcacaatcag 300
50 cagagtggag gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtgaccacc 360
gacgttcggt ggaggcacca agctggaaat caaacggggc tccactagcg gttccggcaa 420
acctggcagc ggagaaggca gccaggttca gctgcagcag tctggagctg agctgatgaa 480
55 gcctggggcc tcagtgaaga tatcctgcaa ggcttctggc tacacattca gtagctactg 540

EP 3 336 184 A1

	gatagagtgg gtaaagcaga ggcctggaca tggccttgag tggattggag agatgttacc	600
	tggaagtggg agttctaact acaatgagaa gttcaagggc aaggccacat tcaactgcaga	660
5	tacatcctcc aacacagcct acatgcaact cagcagcctg acatctgagg actctgccgt	720
	ctattactgt gcaagggggg atggtaacta ctgggtacttc gatgtctggg gcgcagggac	780
	cacggtcacc gtctcctcag cggccgcaat tgaagttatg tatcctcctc cttacctaga	840
10	caatgagaag agcaatggaa ccattatcca tgtgaaaggg aaacaccttt gtccaagtcc	900
	cctattttccc ggaccttcta agcccttttg ggtgctgggtg gtggttgggtg gagtccctggc	960
	ttgctatagc ttgctagtaa cagtggcctt tattattttc tgggtgagga gtaagaggag	1020
15	caggctcctg cacagtgact acatgaacat gactccccgc cgccccgggc ccacccgcaa	1080
	gcattaccag ccctatgccc caccacgoga cttcgcagcc tatcgctcca gagtgaagtt	1140
	cagcaggagc gcagacgccc ccgcgtacca gcagggccag aaccagctct ataacgagct	1200
20	caatctagga cgaagagagg agtacgatgt tttggacaag agacgtggcc gggaccctga	1260
	gatgggggga aagccgagaa ggaagaaccc tcaggaaggc ctgtacaatg aactgcagaa	1320
25	agataagatg gcggaggcct acagtgagat tgggatgaaa ggcgagcgcc ggaggggcaa	1380
	ggggcacgat ggcctttacc agggctctcag tacagccacc aaggacacct acgacgcctt	1440
	tcacatgcag gccctgcccc ctcgctaa	1468
30	<210> 23 <211> 31 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
35	<220> <223> Primer	
	<400> 23	
	gaattccacc atggattttc aagtgcagat t	31
40	<210> 24 <211> 42 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
45	<220> <223> Primer	
	<400> 24	
50	gccggaaccg ctagtggagc cccgtttgat ttccagcttg gt	42
55	<210> 25 <211> 45 <212> DNA <213> Artificial Sequence	
	<220>	

EP 3 336 184 A1

<223> Primer
 <400> 25
 gctgccttct ccgctgccag gtttgccgga accgctagtg gagcc 45
 5
 <210> 26
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 10
 <220>
 <223> Primer
 <400> 26
 aaacctggca gcggagaagg cagccagggt cagctgcagc agtc 44
 15
 <210> 27
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 20
 <220>
 <223> Primer
 <400> 27
 tgaggagacg gtgaccgtgg 20
 25
 <210> 28
 <211> 44
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 30
 <220>
 <223> Primer
 <400> 28
 atacataact tcaattgcgg ccgctgagga gacggtgacc gtgg 44
 35
 <210> 29
 <211> 30
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 40
 <220>
 <223> Primer
 <400> 29
 ctaggcgccg gaattccacc atggattttc 30
 45
 <210> 30
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 50
 <220>
 <223> Primer
 <400> 30
 55

aatgtcgacc tcgagtggct gtttagcgag

29

<210> 31
 <211> 798
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 31

Met Val Ala Leu Pro Met Val Leu Val Leu Leu Leu Val Leu Ser Arg
 1 5 10 15

Gly Glu Ser Glu Leu Asp Ala Lys Ile Pro Ser Thr Gly Asp Ala Thr
 20 25 30

Glu Trp Arg Asn Pro His Leu Ser Met Leu Gly Ser Cys Gln Pro Ala
 35 40 45

Pro Ser Cys Gln Lys Cys Ile Leu Ser His Pro Ser Cys Ala Trp Cys
 50 55 60

Lys Gln Leu Asn Phe Thr Ala Ser Gly Glu Ala Glu Ala Arg Arg Cys
 65 70 75 80

Ala Arg Arg Glu Glu Leu Leu Ala Arg Gly Cys Pro Leu Glu Glu Leu
 85 90 95

Glu Glu Pro Arg Gly Gln Gln Glu Val Leu Gln Asp Gln Pro Leu Ser
 100 105 110

Gln Gly Ala Arg Gly Glu Gly Ala Thr Gln Leu Ala Pro Gln Arg Val
 115 120 125

Arg Val Thr Leu Arg Pro Gly Glu Pro Gln Gln Leu Gln Val Arg Phe
 130 135 140

Leu Arg Ala Glu Gly Tyr Pro Val Asp Leu Tyr Tyr Leu Met Asp Leu
 145 150 155 160

Ser Tyr Ser Met Lys Asp Asp Leu Glu Arg Val Arg Gln Leu Gly His
 165 170 175

Ala Leu Leu Val Arg Leu Gln Glu Val Thr His Ser Val Arg Ile Gly
 180 185 190

Phe Gly Ser Phe Val Asp Lys Thr Val Leu Pro Phe Val Ser Thr Val
 195 200 205

Pro Ser Lys Leu Arg His Pro Cys Pro Thr Arg Leu Glu Arg Cys Gln

EP 3 336 184 A1

	210		215		220															
5	Ser	Pro	Phe	Ser	Phe	His	His	Val	Leu	Ser	Leu	Thr	Gly	Asp	Ala	Gln				
	225					230					235					240				
	Ala	Phe	Glu	Arg	Glu	Val	Gly	Arg	Gln	Ser	Val	Ser	Gly	Asn	Leu	Asp				
10					245					250					255					
	Ser	Pro	Glu	Gly	Gly	Phe	Asp	Ala	Ile	Leu	Gln	Ala	Ala	Leu	Cys	Gln				
				260					265						270					
15	Glu	Gln	Ile	Gly	Trp	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Leu	Leu	Val	Phe	Thr	Ser				
			275					280						285						
	Asp	Asp	Thr	Phe	His	Thr	Ala	Gly	Asp	Gly	Lys	Leu	Gly	Gly	Ile	Phe				
20		290					295					300								
	Met	Pro	Ser	Asp	Gly	His	Cys	His	Leu	Asp	Ser	Asn	Gly	Leu	Tyr	Ser				
	305					310					315					320				
25																				
	Arg	Ser	Thr	Glu	Phe	Asp	Tyr	Pro	Ser	Val	Gly	Gln	Val	Ala	Gln	Ala				
					325					330					335					
30	Leu	Ser	Ala	Ala	Asn	Ile	Gln	Pro	Ile	Phe	Ala	Val	Thr	Ser	Ala	Ala				
				340					345					350						
	Leu	Pro	Val	Tyr	Gln	Glu	Leu	Ser	Lys	Leu	Ile	Pro	Lys	Ser	Ala	Val				
35			355					360					365							
	Gly	Glu	Leu	Ser	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Val	Val	Gln	Leu	Ile	Met	Asp				
		370					375					380								
40	Ala	Tyr	Asn	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Val	Thr	Leu	Glu	His	Ser	Ser	Leu				
	385					390					395					400				
	Pro	Pro	Gly	Val	His	Ile	Ser	Tyr	Glu	Ser	Gln	Cys	Glu	Gly	Pro	Glu				
45					405					410					415					
	Lys	Arg	Glu	Gly	Lys	Ala	Glu	Asp	Arg	Gly	Gln	Cys	Asn	His	Val	Arg				
50				420					425					430						
	Ile	Asn	Gln	Thr	Val	Thr	Phe	Trp	Val	Ser	Leu	Gln	Ala	Thr	His	Cys				
			435					440					445							
55	Leu	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Leu	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly	Phe	Ser	Glu				
		450					455					460								

EP 3 336 184 A1

	Glu	Leu	Ile	Val	Glu	Leu	His	Thr	Leu	Cys	Asp	Cys	Asn	Cys	Ser	Asp	465	470	475	480
5	Thr	Gln	Pro	Gln	Ala	Pro	His	Cys	Ser	Asp	Gly	Gln	Gly	His	Leu	Gln		485	490	495
10	Cys	Gly	Val	Cys	Ser	Cys	Ala	Pro	Gly	Arg	Leu	Gly	Arg	Leu	Cys	Glu		500	505	510
	Cys	Ser	Val	Ala	Glu	Leu	Ser	Ser	Pro	Asp	Leu	Glu	Ser	Gly	Cys	Arg		515	520	525
15	Ala	Pro	Asn	Gly	Thr	Gly	Pro	Leu	Cys	Ser	Gly	Lys	Gly	His	Cys	Gln		530	535	540
20	Cys	Gly	Arg	Cys	Ser	Cys	Ser	Gly	Gln	Ser	Ser	Gly	His	Leu	Cys	Glu		545	550	555
	Cys	Asp	Asp	Ala	Ser	Cys	Glu	Arg	His	Glu	Gly	Ile	Leu	Cys	Gly	Gly		565	570	575
25	Phe	Gly	Arg	Cys	Gln	Cys	Gly	Val	Cys	His	Cys	His	Ala	Asn	Arg	Thr		580	585	590
30	Gly	Arg	Ala	Cys	Glu	Cys	Ser	Gly	Asp	Met	Asp	Ser	Cys	Ile	Ser	Pro		595	600	605
35	Glu	Gly	Gly	Leu	Cys	Ser	Gly	His	Gly	Arg	Cys	Lys	Cys	Asn	Arg	Cys		610	615	620
	Gln	Cys	Leu	Asp	Gly	Tyr	Tyr	Gly	Ala	Leu	Cys	Asp	Gln	Cys	Pro	Gly		625	630	635
40	Cys	Lys	Thr	Pro	Cys	Glu	Arg	His	Arg	Asp	Cys	Ala	Glu	Cys	Gly	Ala		645	650	655
45	Phe	Arg	Thr	Gly	Pro	Leu	Ala	Thr	Asn	Cys	Ser	Thr	Ala	Cys	Ala	His		660	665	670
50	Thr	Asn	Val	Thr	Leu	Ala	Leu	Ala	Pro	Ile	Leu	Asp	Asp	Gly	Trp	Cys		675	680	685
	Lys	Glu	Arg	Thr	Leu	Asp	Asn	Gln	Leu	Phe	Phe	Phe	Leu	Val	Glu	Asp		690	695	700
55	Asp	Ala	Arg	Gly	Thr	Val	Val	Leu	Arg	Val	Arg	Pro	Gln	Glu	Lys	Gly		705	710	715
																				720

Ala Asp His Thr Gln Ala Ile Val Leu Gly Cys Val Gly Gly Ile Val
725 730 735

5 Ala Val Gly Leu Gly Leu Val Leu Ala Tyr Arg Leu Ser Val Glu Ile
740 745 750

10 Tyr Asp Arg Arg Glu Tyr Ser Arg Phe Glu Lys Glu Gln Gln Leu
755 760 765

15 Asn Trp Lys Gln Asp Ser Asn Pro Leu Tyr Lys Ser Ala Ile Thr Thr
770 775 780

Thr Ile Asn Pro Arg Phe Gln Glu Ala Asp Ser Pro Thr Leu
785 790 795

20 Claims

1. An anti-human integrin β_7 antibody, whose epitope is present in a region of the amino acid residue positions 20 to 109 of human integrin β_7 .
- 25 2. An antibody according to claim 1, whose affinity for the epitope is increased in the presence of at least part of a region of the amino acid residue positions 379 to 721 of the human integrin β_7 .
3. An antibody according to claim 1 or 2, whose affinity for the epitope is increased through activation of the human integrin β_7 .
- 30 4. An antibody according to any one of claims 1 to 3, the antibody comprising:
 - a heavy chain variable region including
 - 35 heavy-chain CDR1 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1,
 - heavy-chain CDR2 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 2, and/or
 - heavy-chain CDR3 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 3; and/or
 - a light chain variable region including
 - 40 light-chain CDR1 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 6,
 - light-chain CDR2 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 7, and/or
 - light-chain CDR3 having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 8.
- 45 5. An antibody according to any one of claims 1 to 4, the antibody comprising:
 - a heavy chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 4; and/or
 - a light chain variable region having the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 9.
- 50 6. An antibody according to any one of claims 1 to 5, which is a multispecific antibody.
7. A polynucleotide, which has a base sequence encoding the antibody of any one of claims 1 to 6.
8. A host cell, which harbors the polynucleotide of claim 7.
- 55 9. A chimeric antigen receptor, comprising an antigen recognition site of the antibody of any one of claims 1 to 6.
10. A polynucleotide, which encodes the chimeric antigen receptor of claim 9.

11. A polynucleotide according to claim 10, which has the base sequence set forth in SEQ ID NO: 22.

12. A cell, which harbors the polynucleotide of claim 10 or 11.

5 **13.** A cell according to claim 12, which is a chimeric antigen receptor T-cell.

14. A pharmaceutical composition, comprising the antibody of any one of claims 1 to 6 or the cell of claim 12.

10 **15.** A pharmaceutical composition, comprising the antibody of any one of claims 1 to 6 or the chimeric antigen receptor
T-cell of claim 13.

15

20

25

30

35

40

45

50

55

Fig. 1

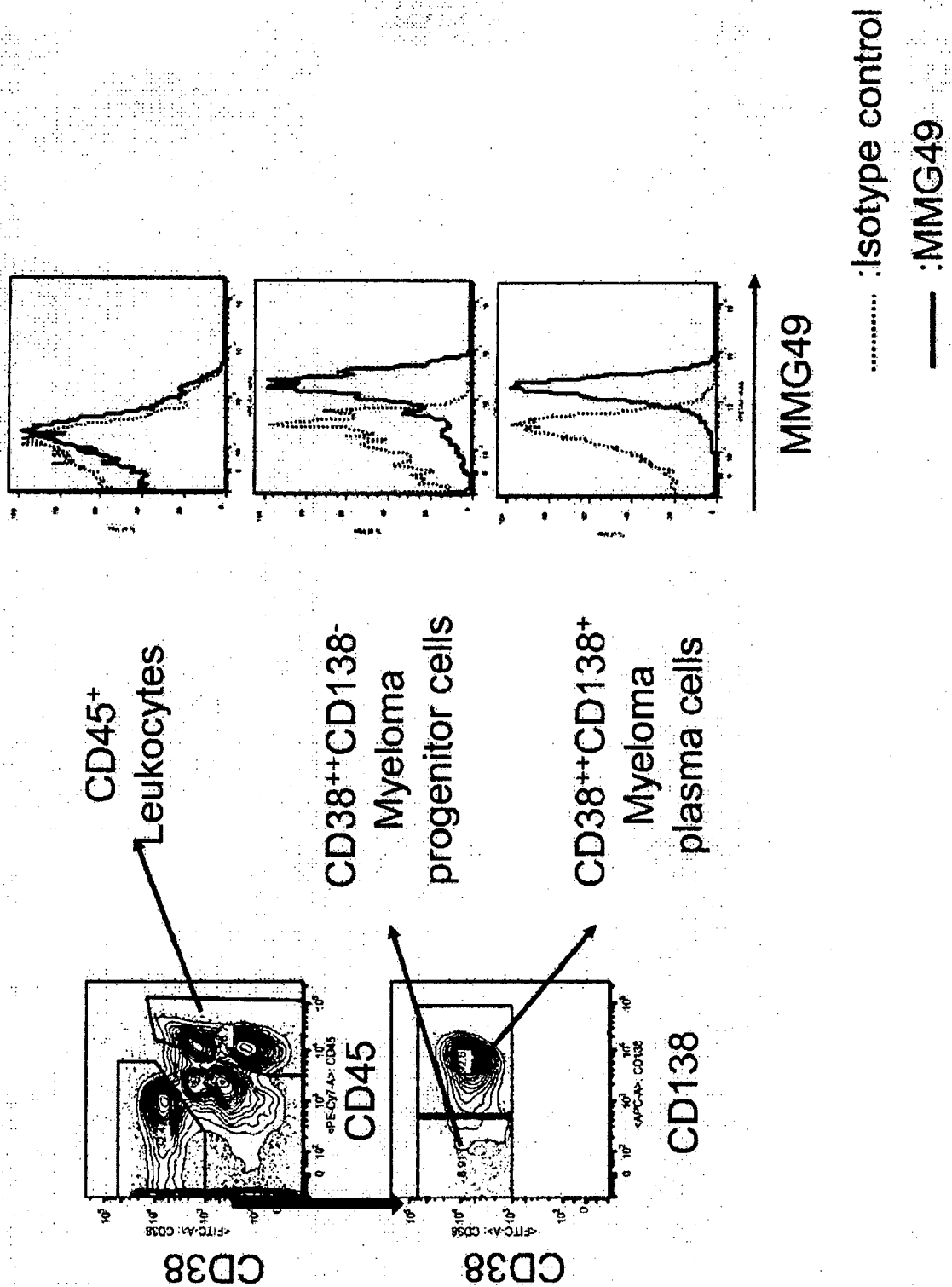


Fig. 2

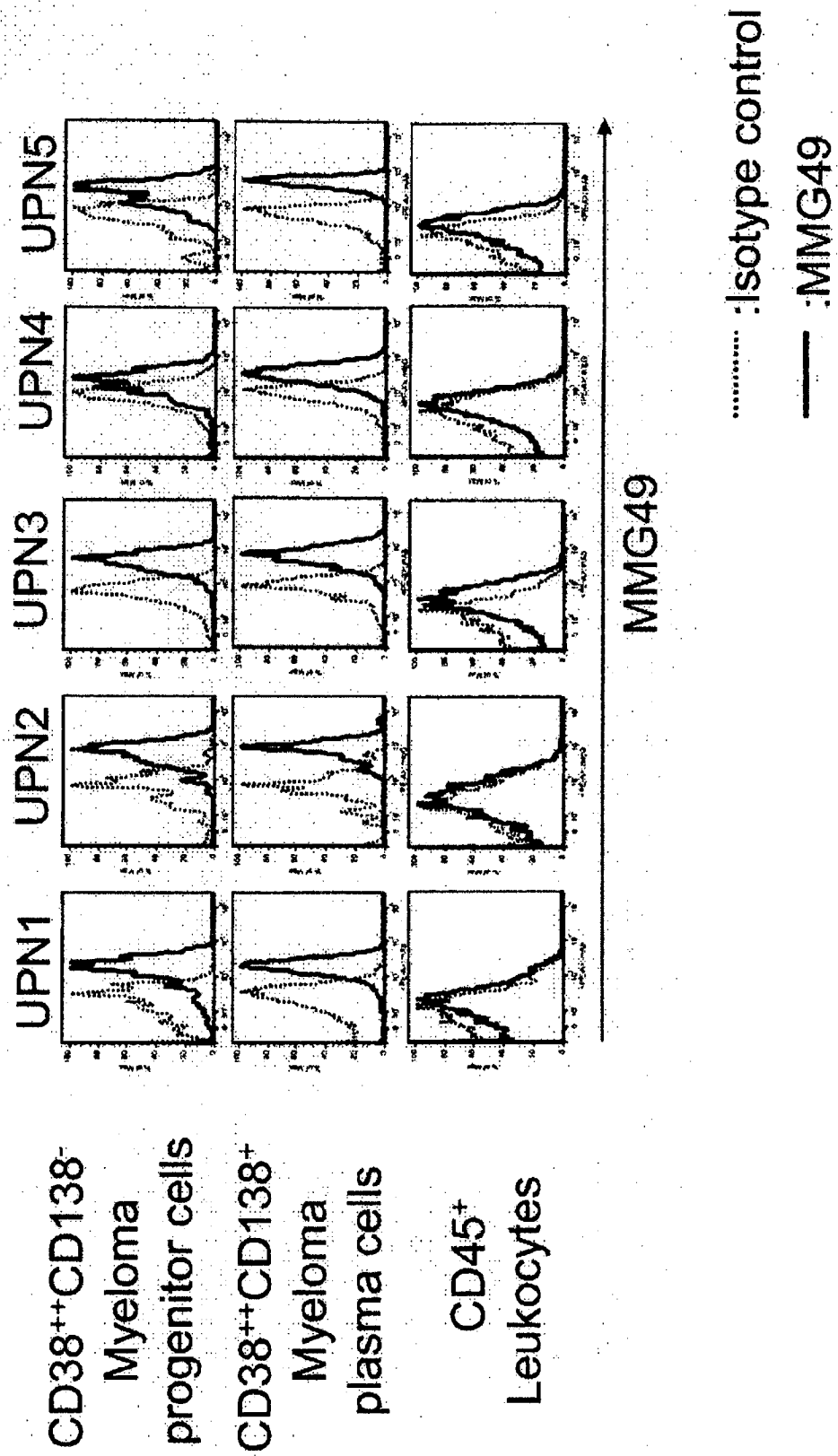


Fig. 3

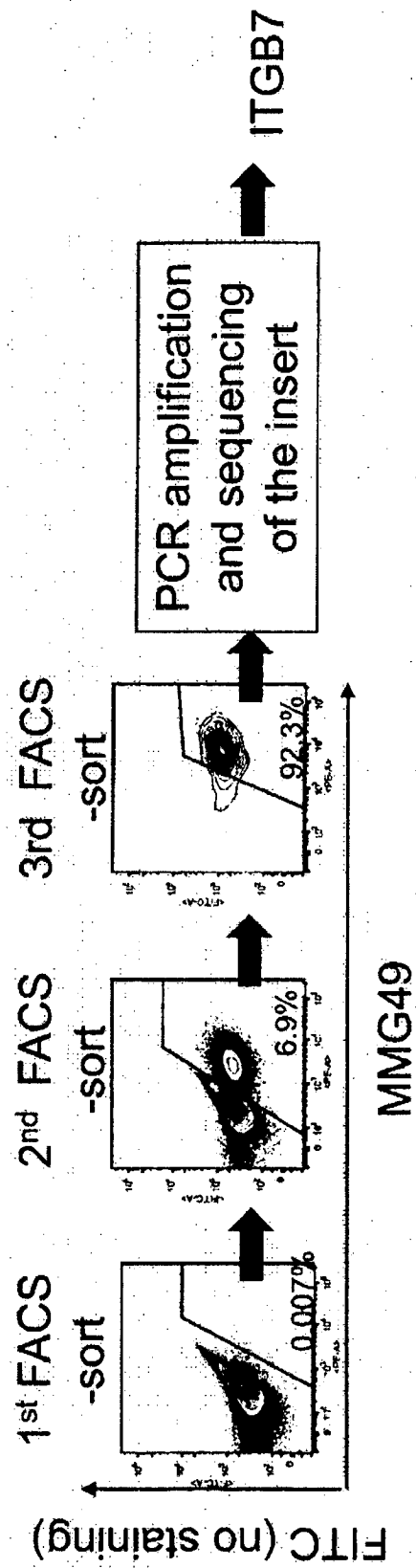


Fig. 4

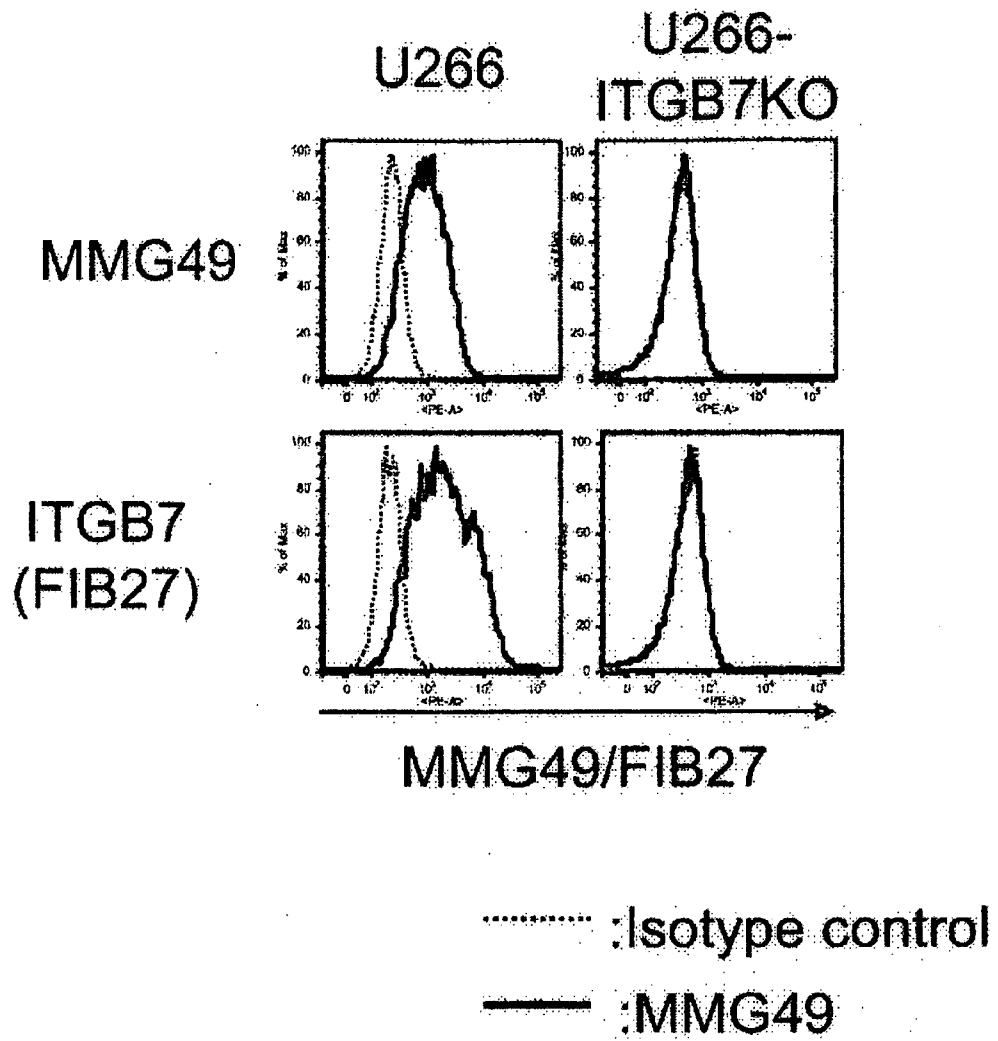


Fig. 5

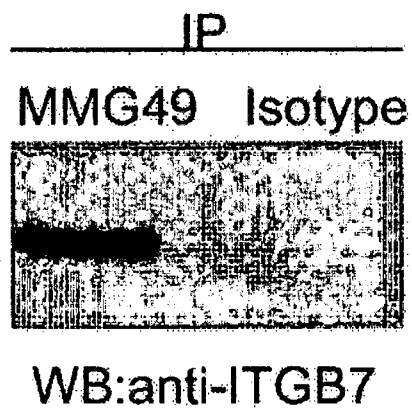


Fig. 6

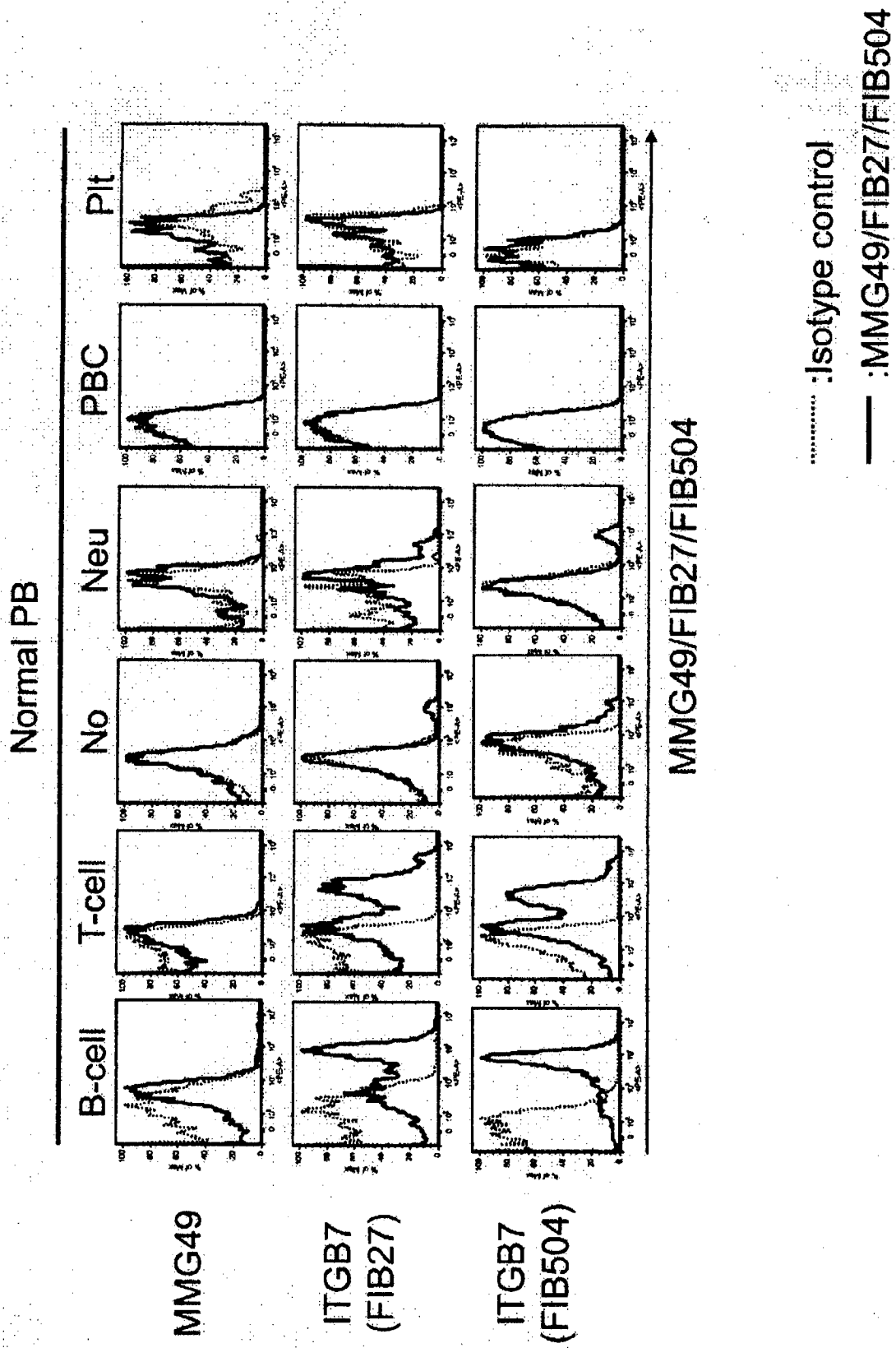


Fig. 7

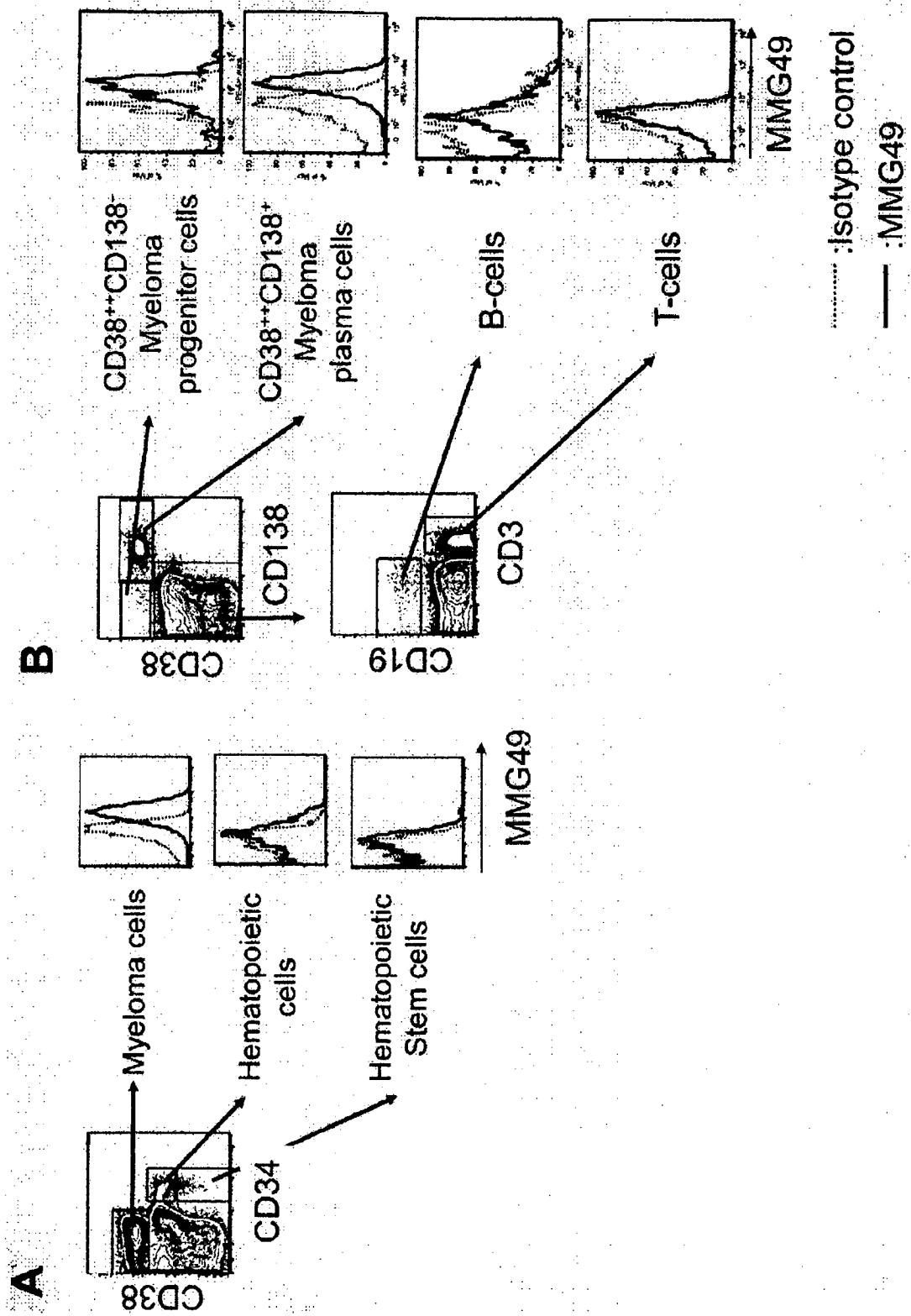


Fig. 8

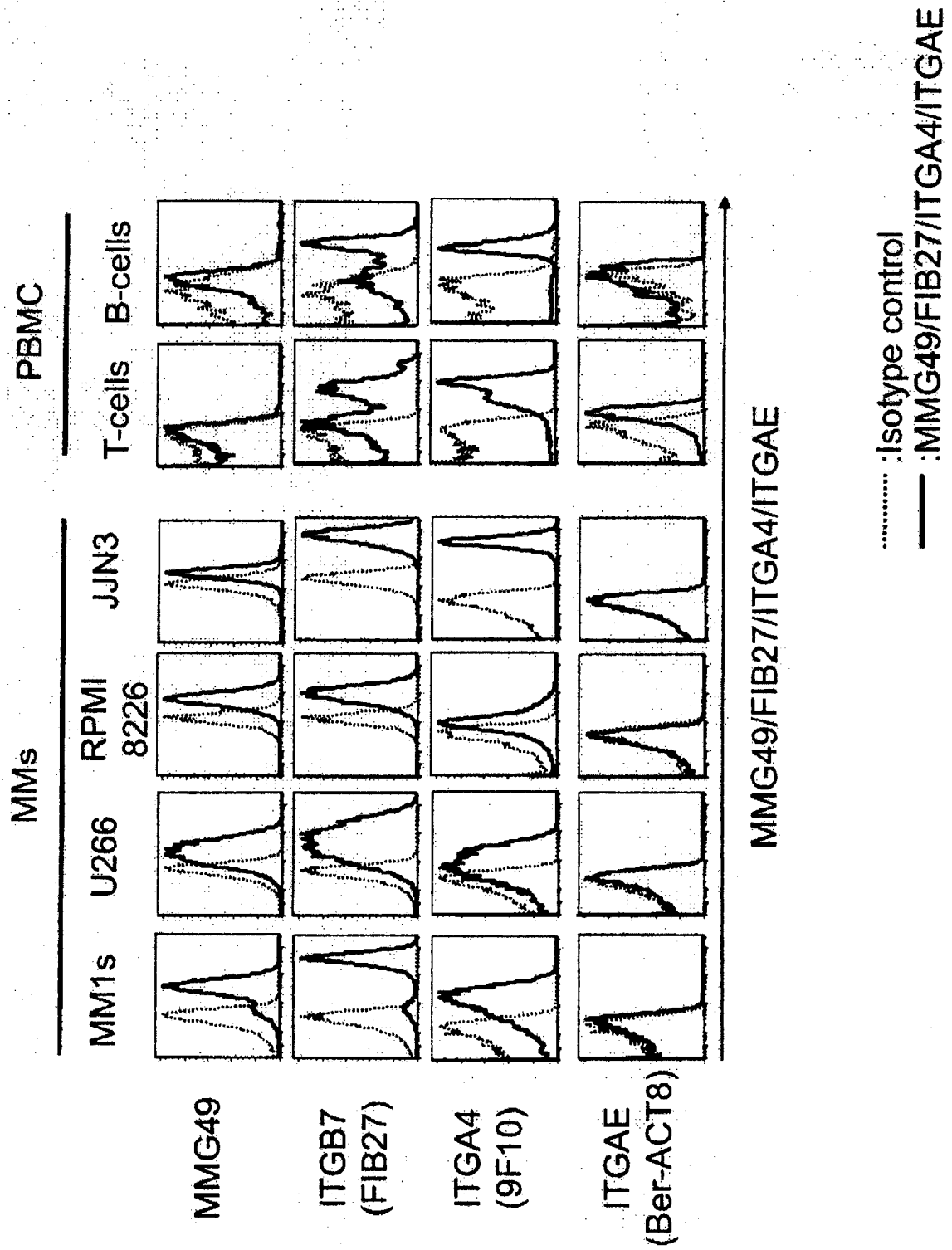


Fig. 9

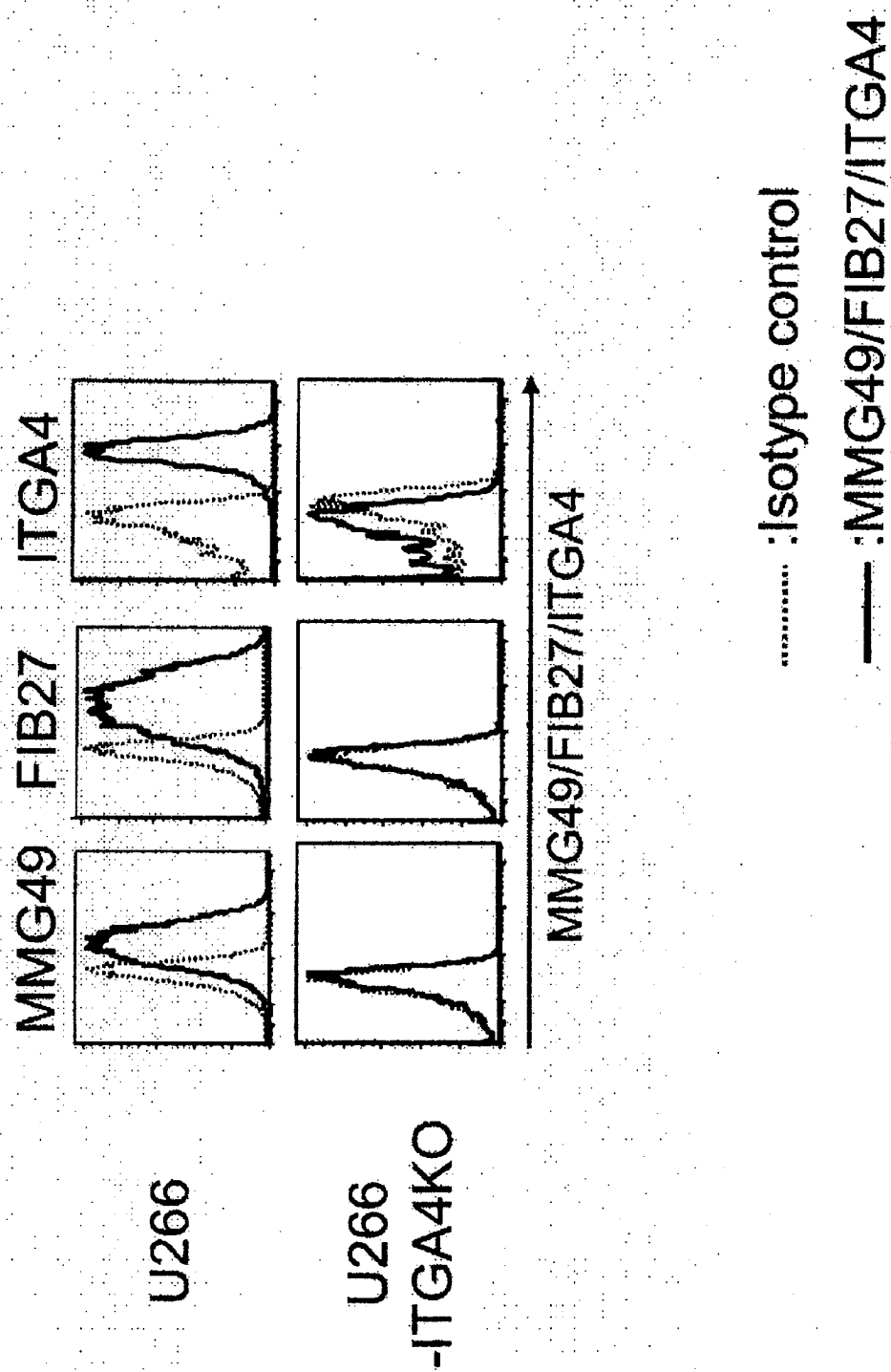


Fig. 10

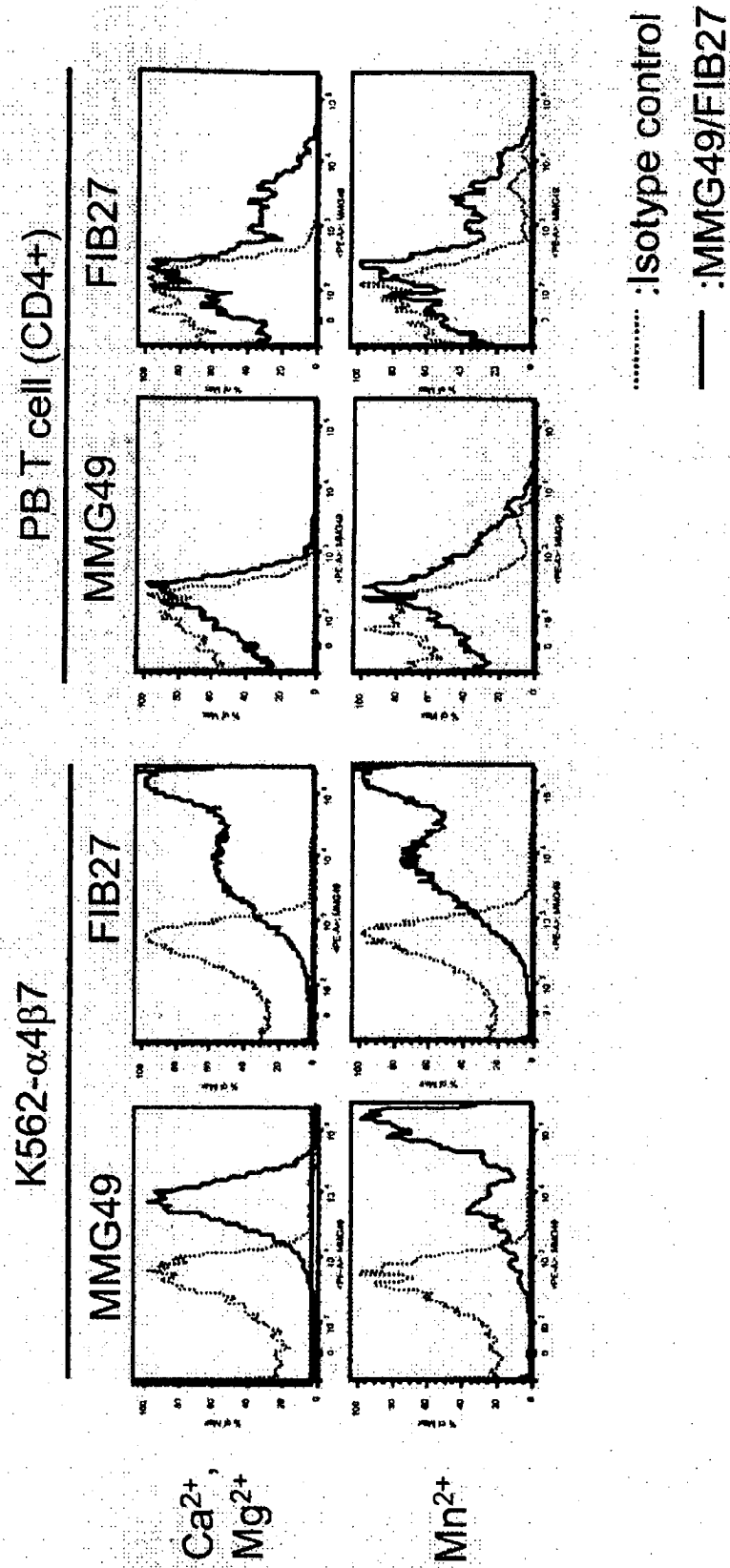


Fig. 11

Integrin $\beta 7$

1	20	97	149	391	476	513	561	598	643	727	747	798
signal	PSI	Hybrid	β I domain	Hybrid	I-EGF	I-EGF	I-EGF	I-EGF	I-EGF	β -tail domain	TM	cyto-plasmic
					1	2	3	4				

MMG49 Antibody

Reactivity

#4927	+++											
#4944	+											
#4945	+											
#4946	-											
#4947	-											
#4959	+											
#4960	++											
#4961	+++											

human

mouse

human

417

564

722

110

110

722

379

Fig. 12

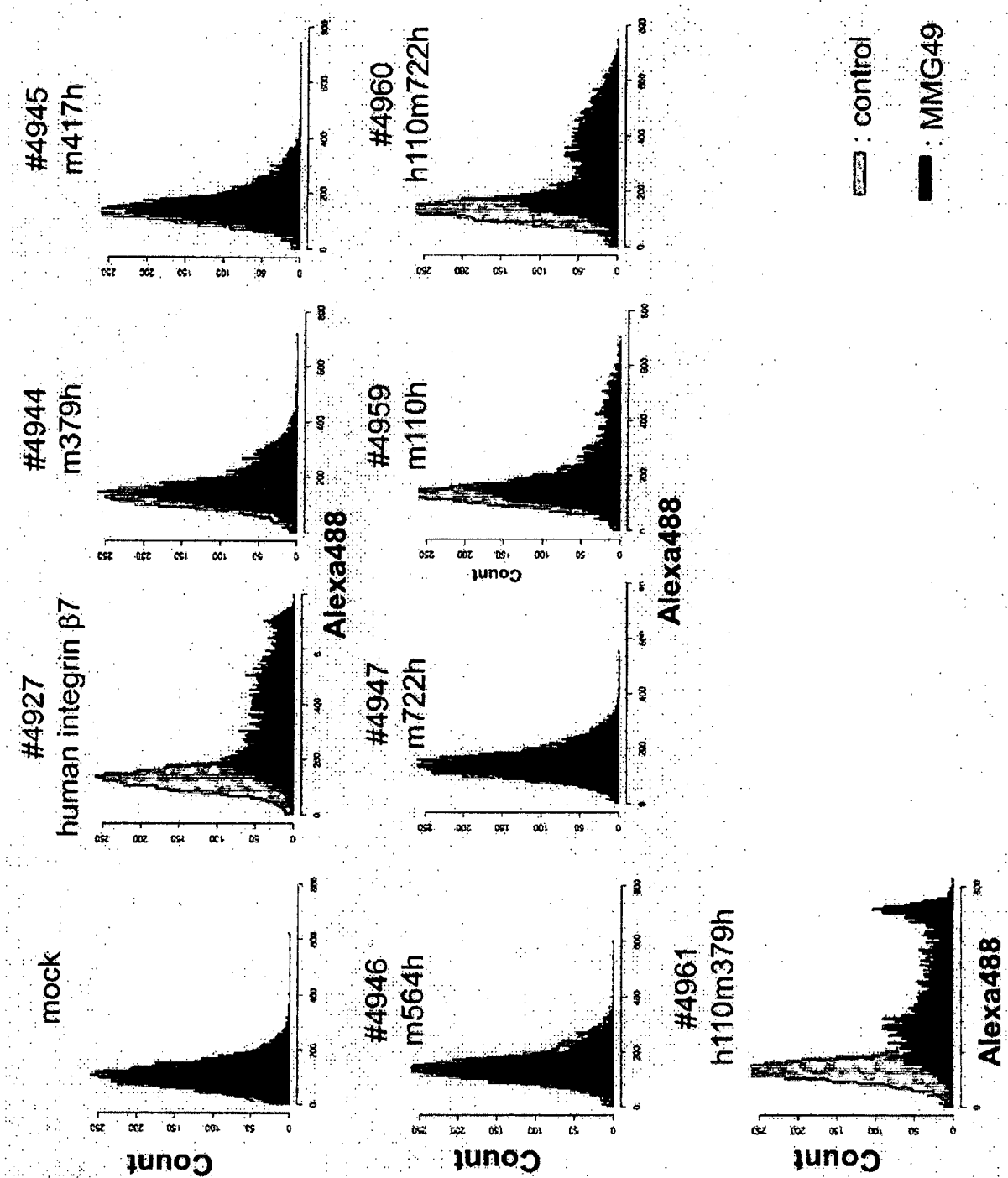


Fig. 13

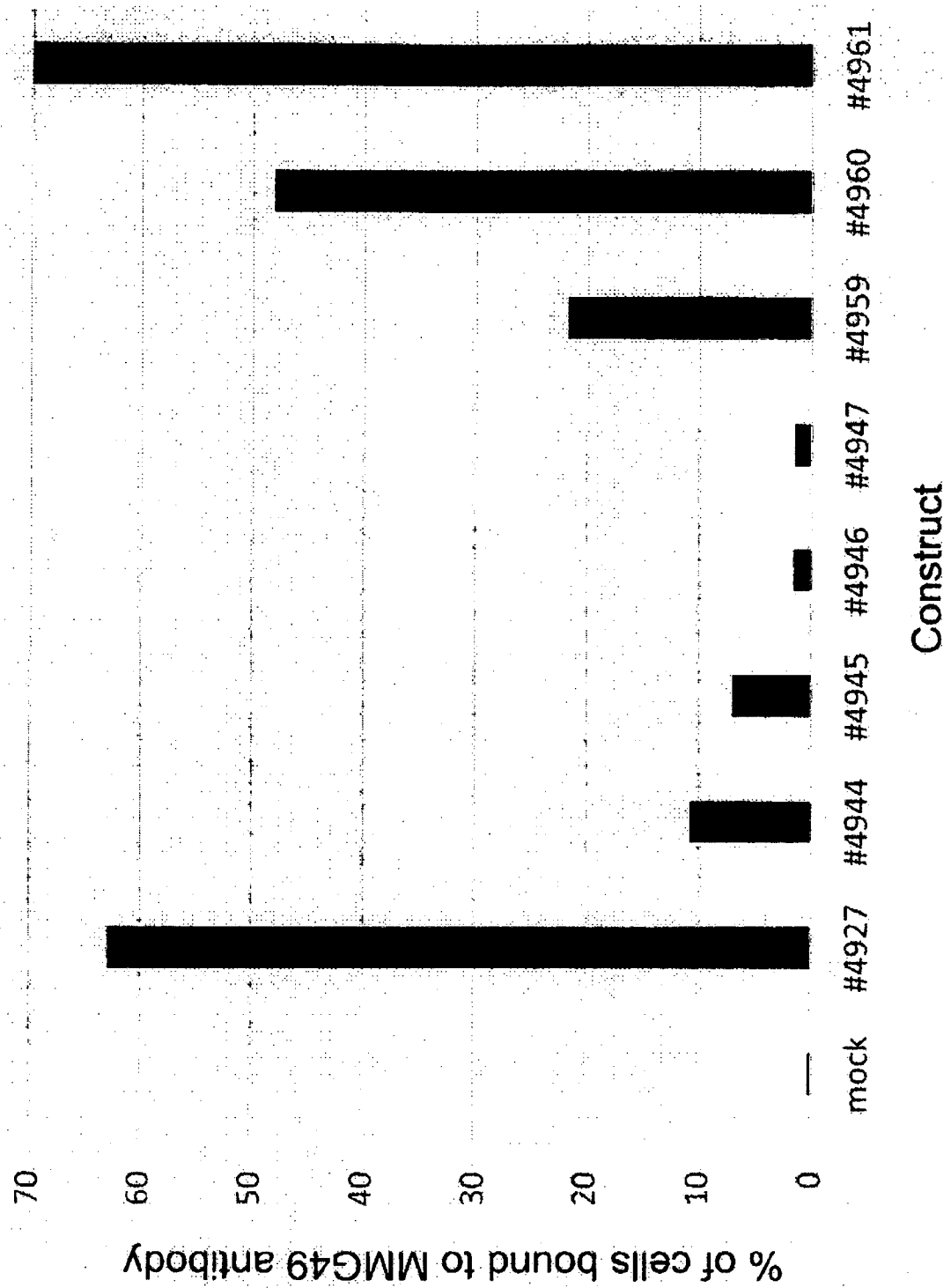


Fig. 14

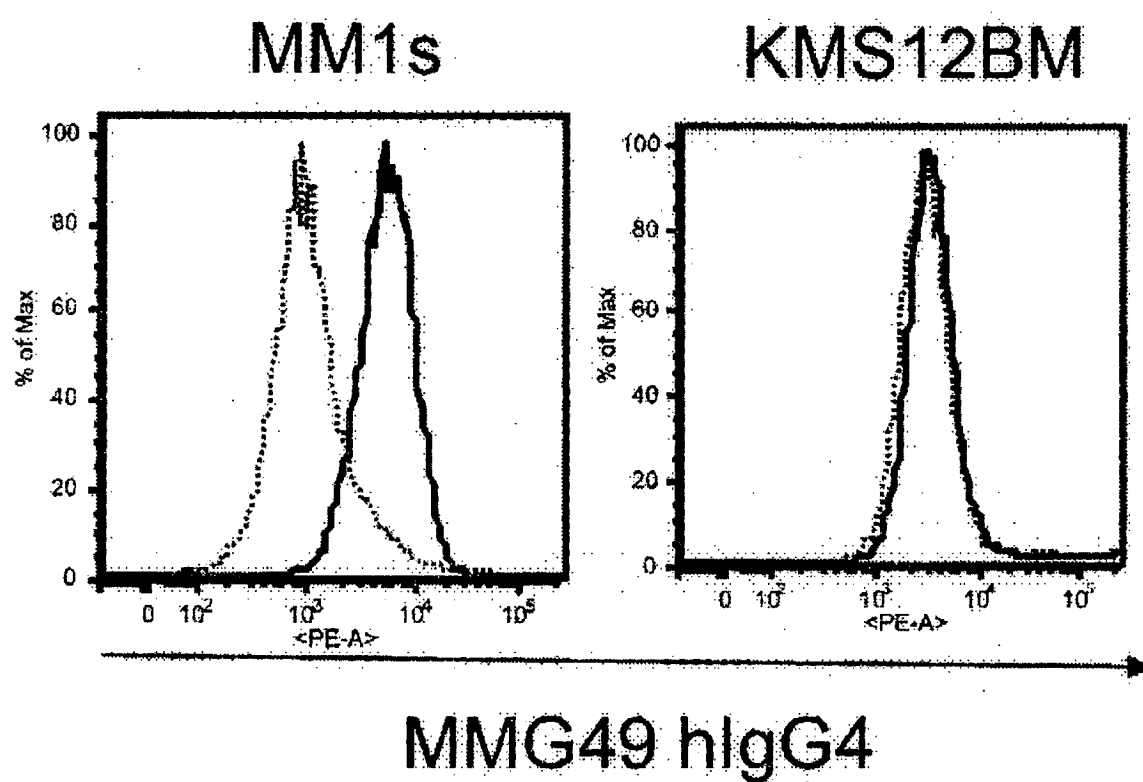


Fig. 15

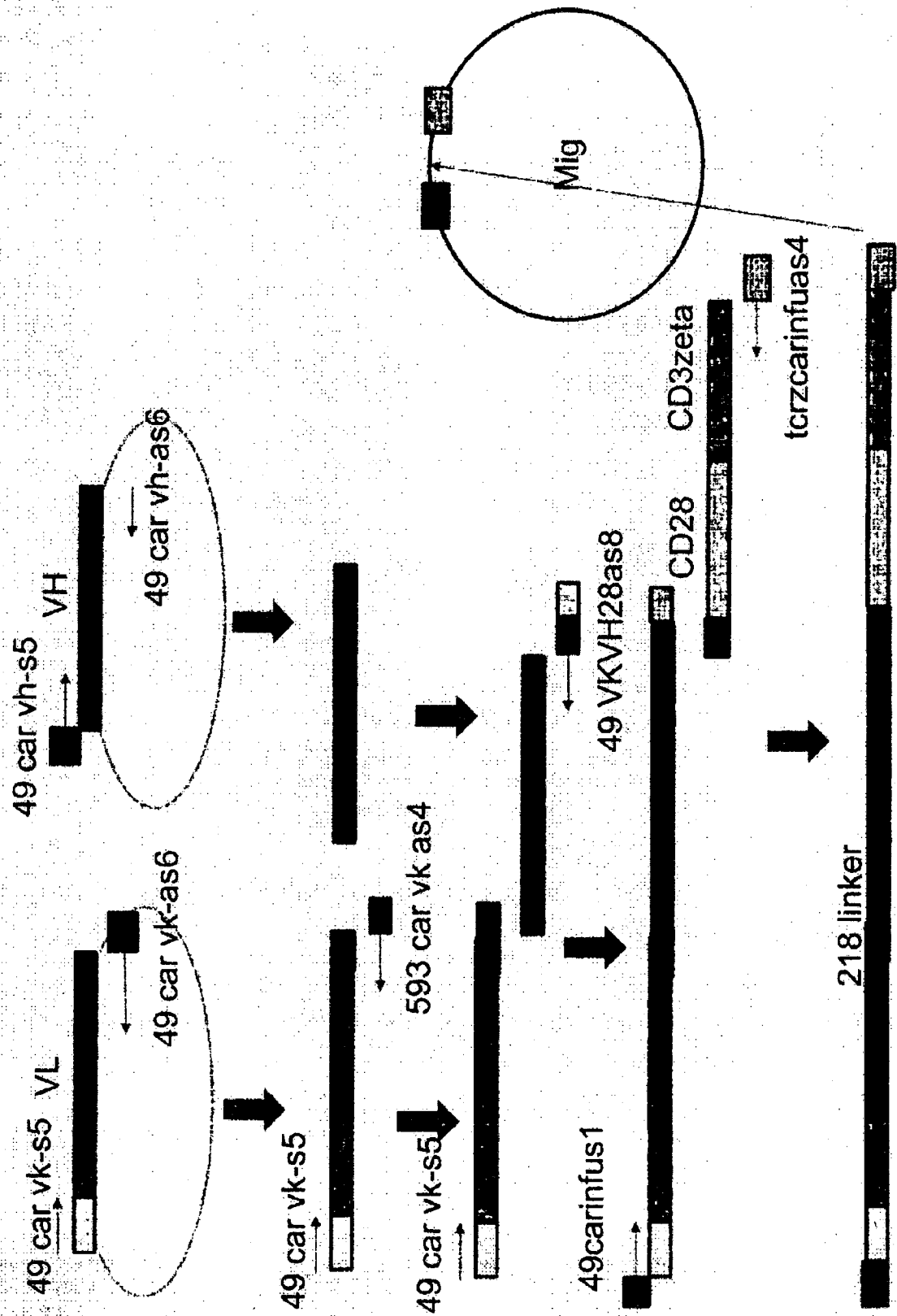


Fig. 16

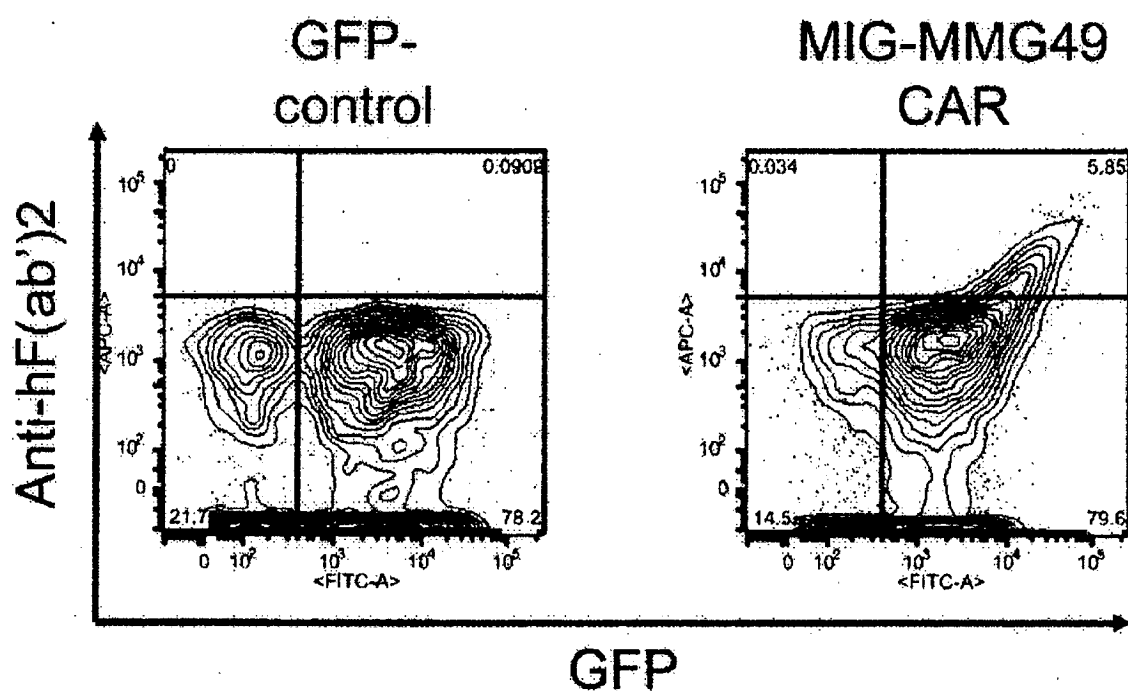


Fig. 17

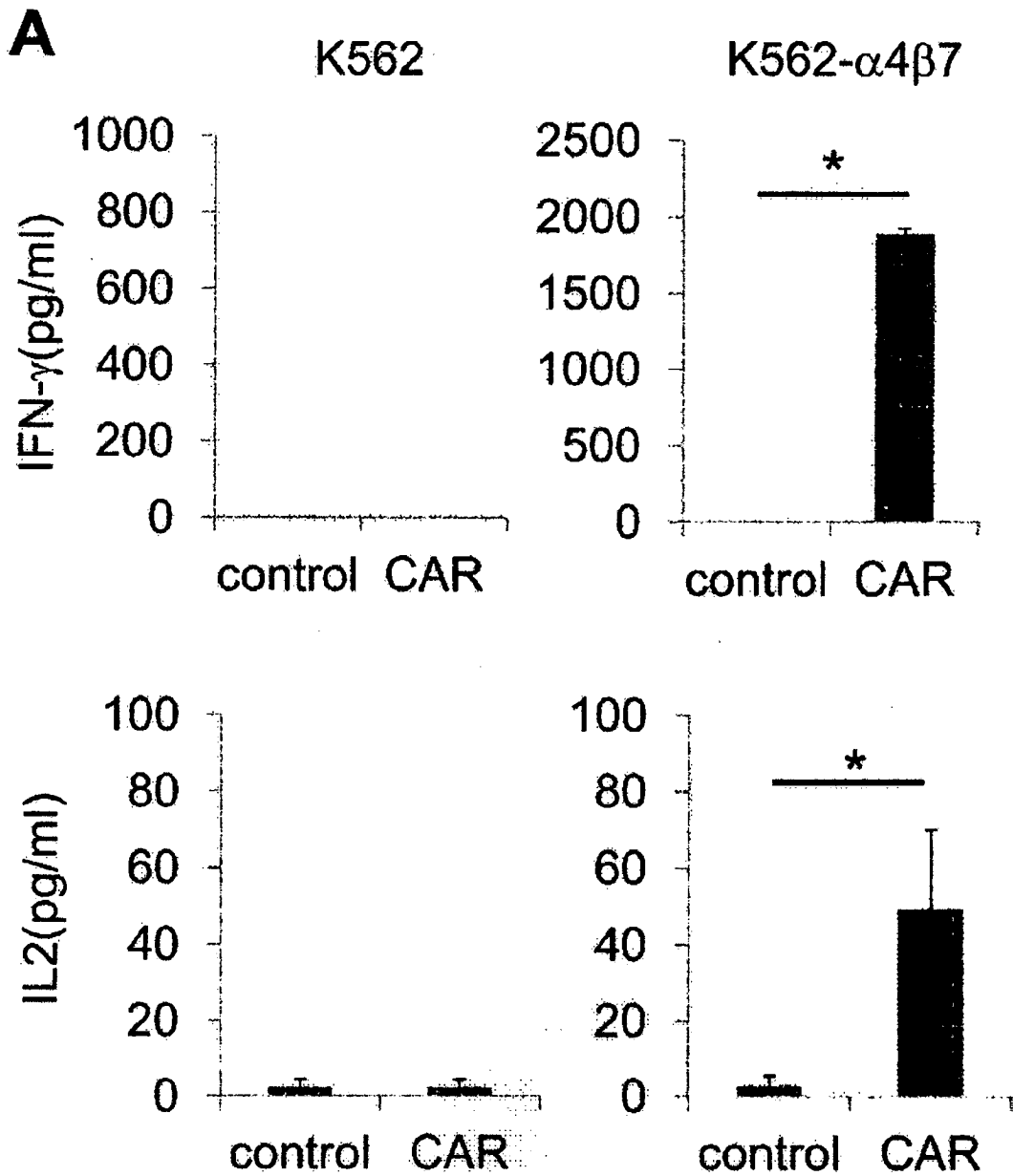


Fig. 18

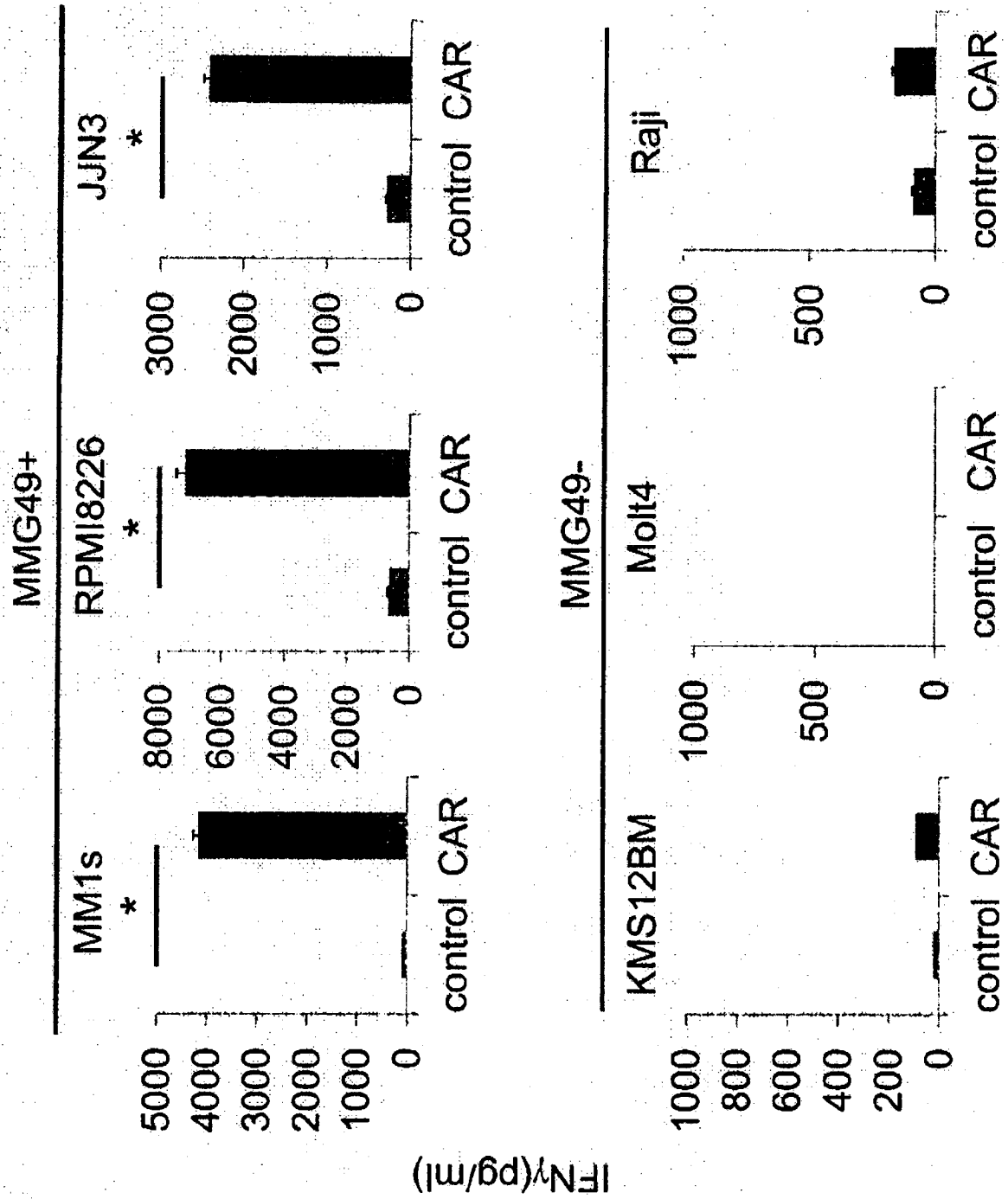


Fig. 19

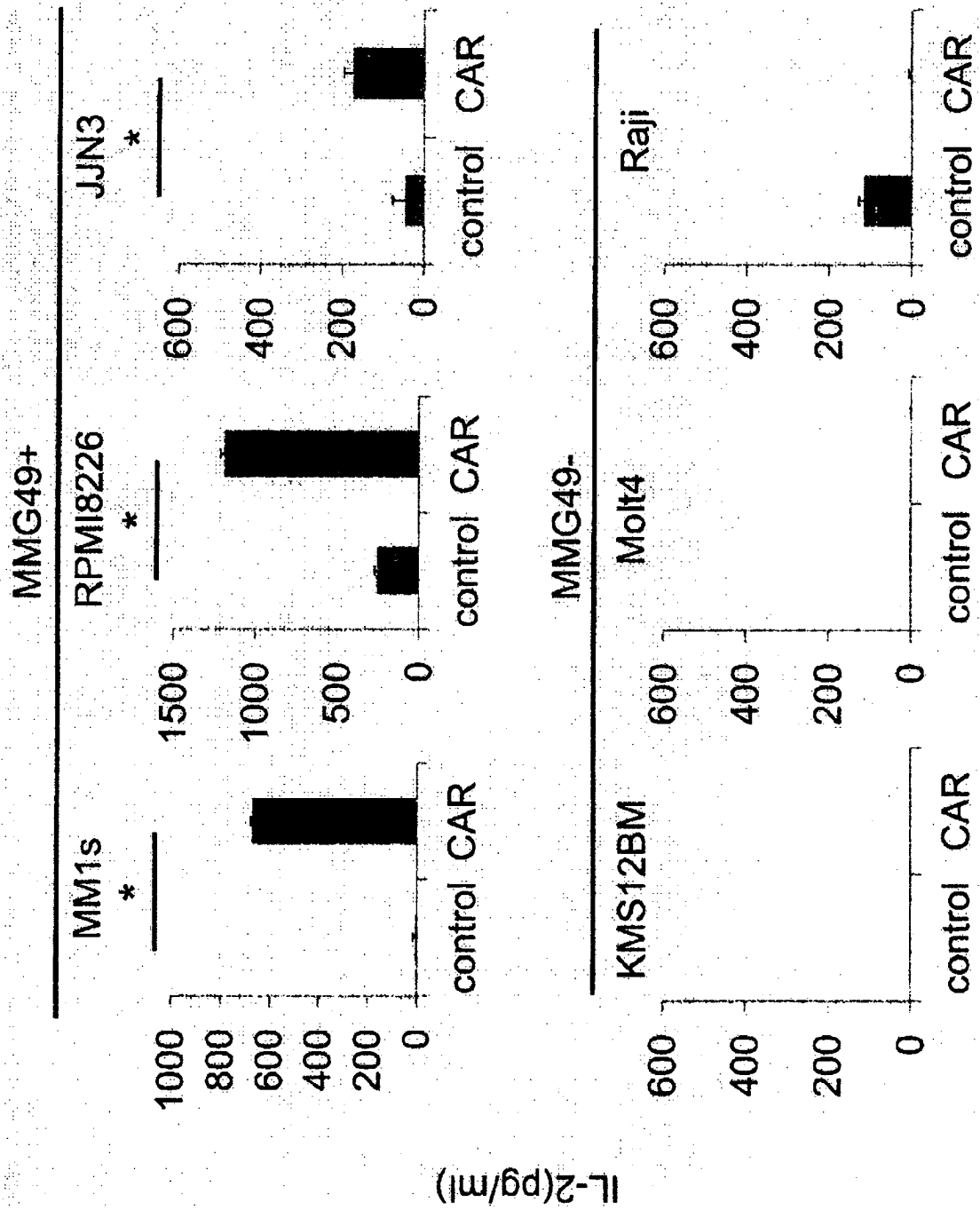


Fig. 20

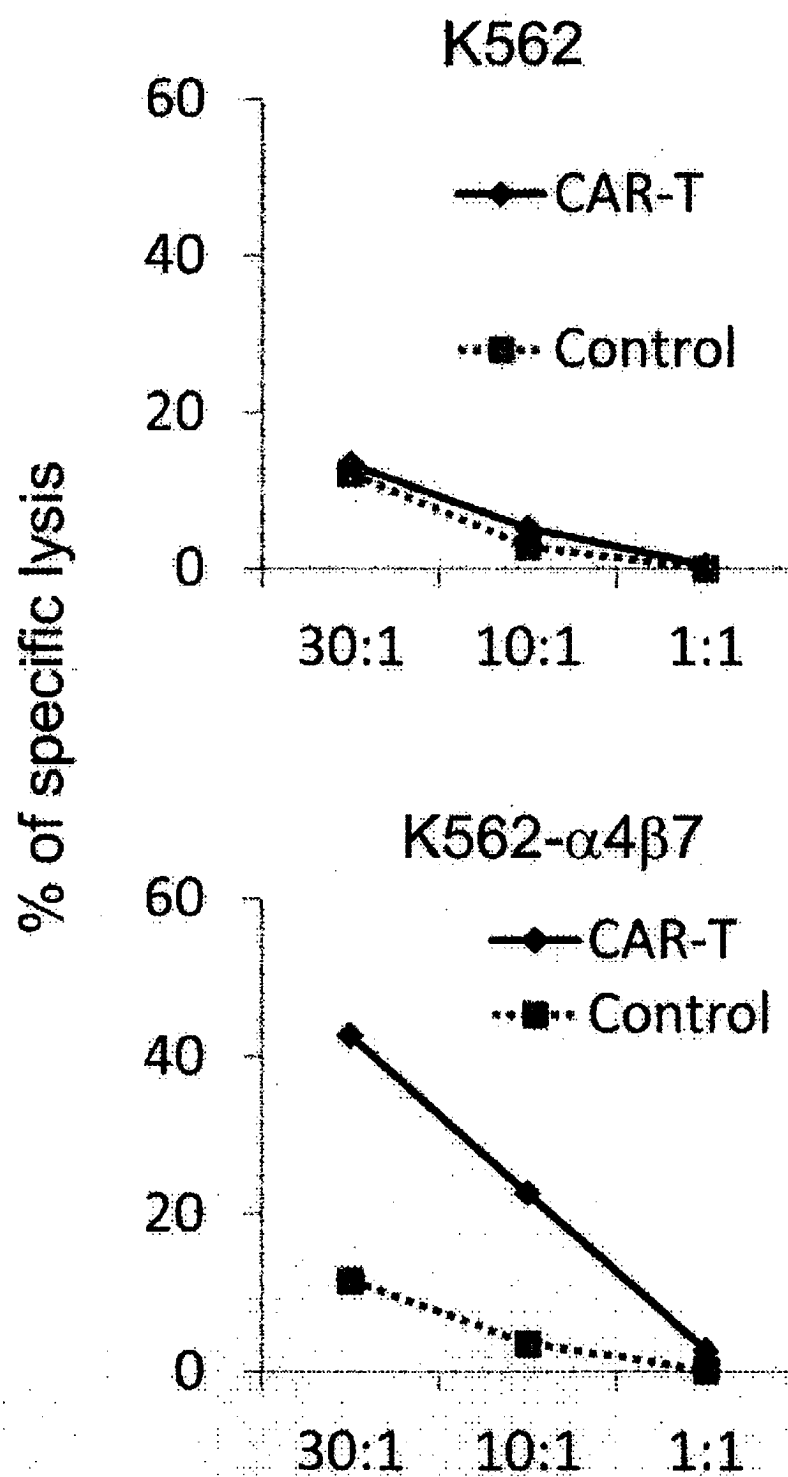


Fig. 21

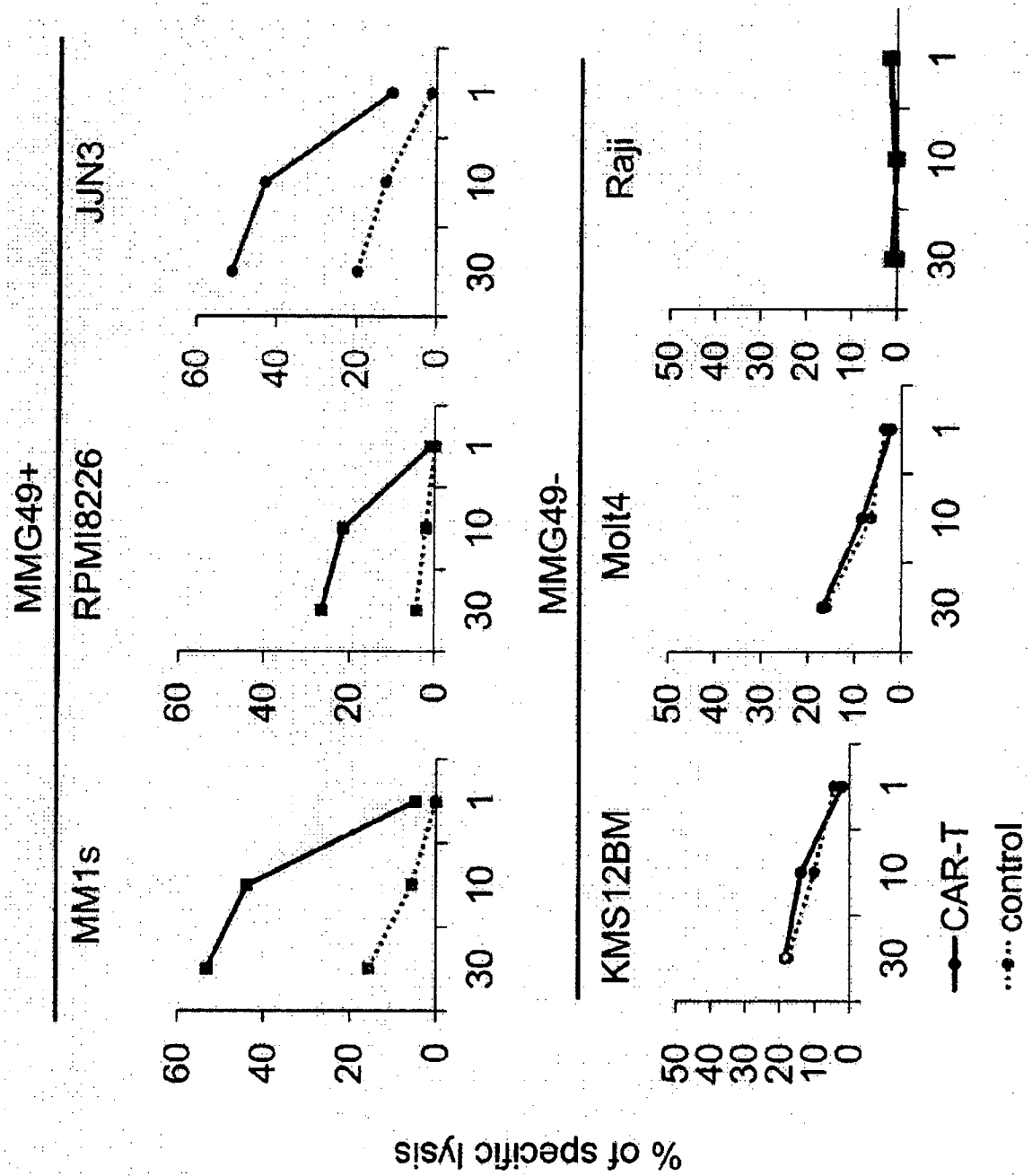


Fig. 22

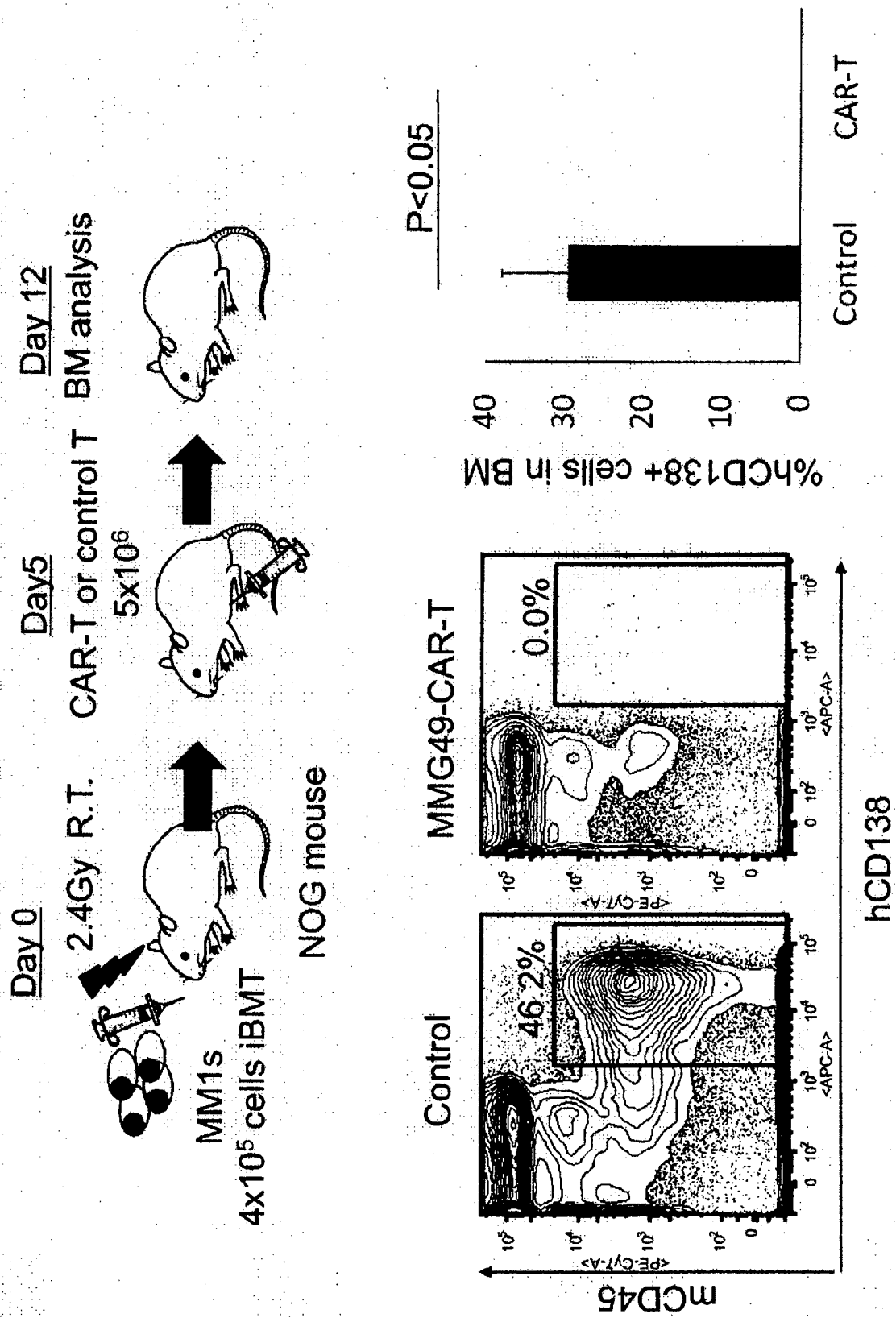
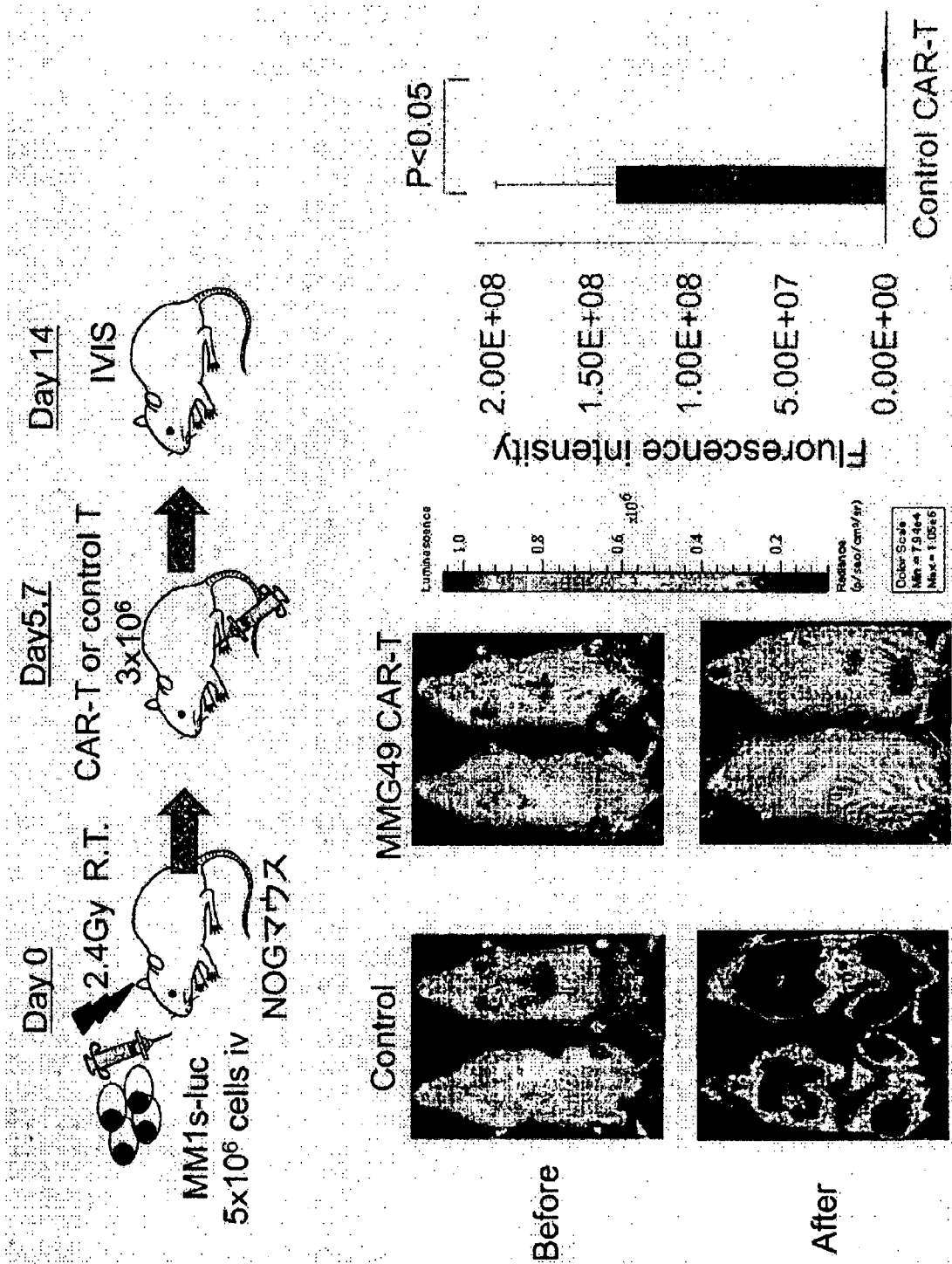


Fig. 23



Alignment: human vs. mouse $\beta 7$ integrin

[illegible]

Fig. 25

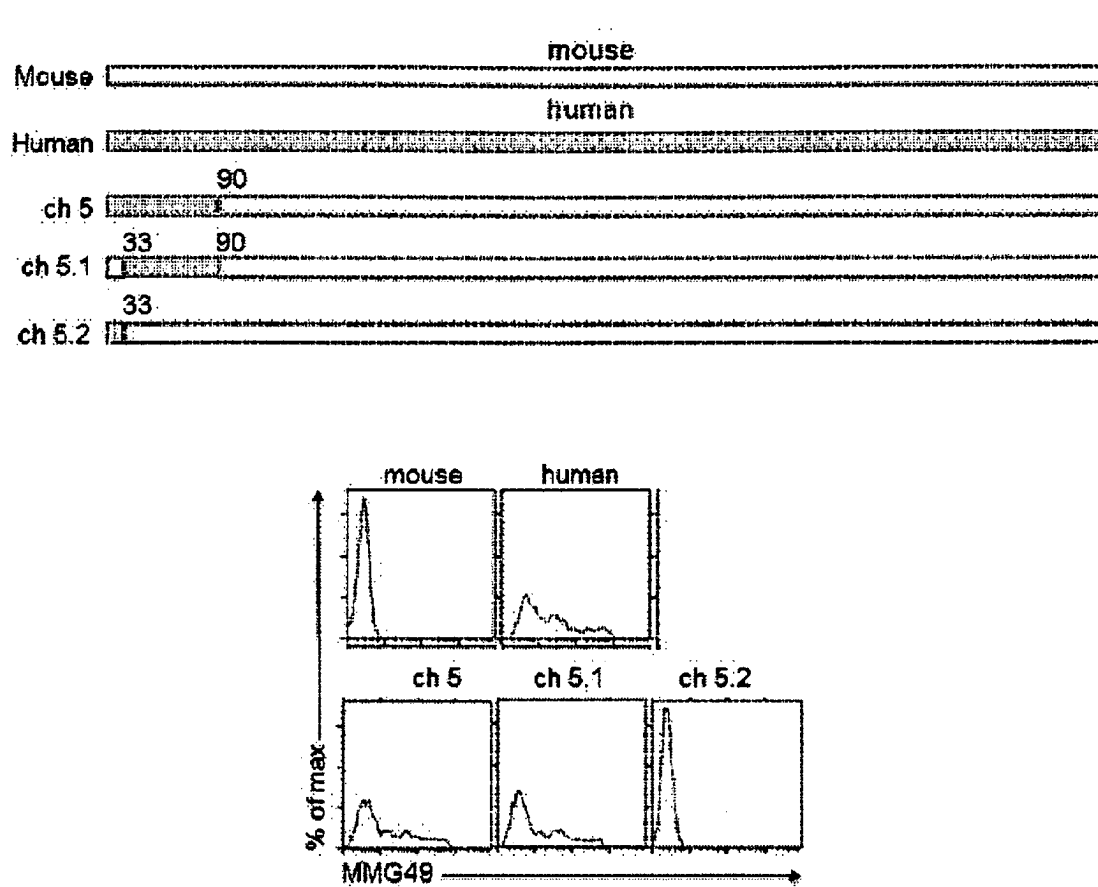
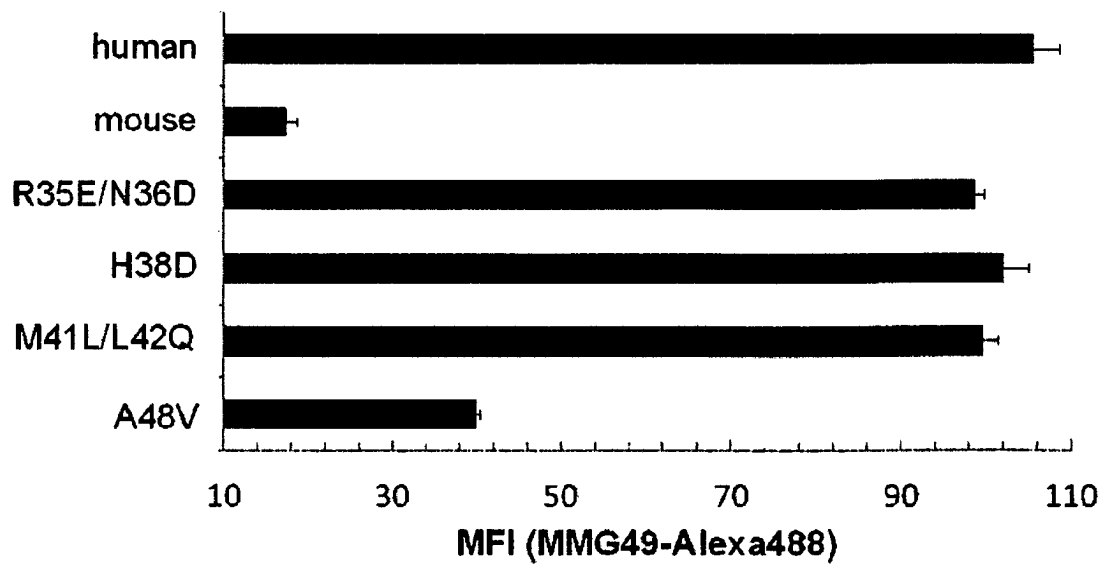


Fig. 26



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072688

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K35/17(2015.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K16/30(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i

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)

C12N15/09, A61K35/17, A61K39/395, A61P35/00, C07K16/30, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2016 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDREAMIII), CAPUS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(STN), WPIDS/WPIX(STN), GenBank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	TIDSWELL, M., et al., Structure-function analysis of the integrin beta 7 subunit: identification of domains involved in adhesion to MadCAM-1, J. Immunol., 1997, vol.159, no.3, p.1497-1505, ISSN 0022-1767, particularly, Abstract, p.1500-1501, FIGURE 3., FIGURE 7., Table I., Table II.	1, 3, 7, 8 1-10, 12-15 11
X Y A	Anti-Integrin beta 7 antibody [EP5948] (ab137058), abcam [online], [retrieved 2016.10.18], Retrieved from the Internet: <URL: http://www.abcam.com/integrin-beta-7-antibody-ep5948-ab137058.html>, entire text	1 1-10, 12-15 11

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ 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
19 October 2016 (19.10.16)

Date of mailing of the international search report
01 November 2016 (01.11.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/072688

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	KRISSANSEN, GW., et al., Immunologic and structural relatedness of the integrin beta 7 complex and the human intraepithelial lymphocyte antigen HML-1, FEBS Lett., 1992, vol.296, no.1, p.25-28, ISSN 0014-5793, particularly, Abstract, MATERIALS AND METHODS	1 1-10,12-15 11
Y	JP 6-303990 A (Kanebo, Ltd.), 01 November 1994 (01.11.1994), claims; paragraph [0020]; examples (Family: none)	1-10,12-15 11
A	JP 2015-513394 A (Seattle Children's Hospital d/b/a Seattle Children's Research Institute), 14 May 2015 (14.05.2015), claims; examples; fig. 1 & WO 2013/123061 A1 claims; examples; fig. 1 & US 2015/0038684 A1 & EP 2814846 A1	1-10,12-15 11
A	JP 2001-507210 A (Millenium Pharmaceuticals, Inc.), 05 June 2001 (05.06.2001), claims; examples & WO 1998/006248 A2 claims; examples & US 7147851 B1 & EP 918797 A2	1-15
A	CN 103374073 A (Shanghai Institutes for Biological Sciences, CAS), 30 October 2013 (30.10.2013), claims; paragraphs [0042], [0043] (Family: none)	1-15
A	GOTO, T., et al., A novel membrane antigen selectively expressed on terminally differentiated human B cells, Blood, 1994, vol.84, no.6, p.1922-1930, ISSN 0006-4971, particularly, Abstract, MATERIALS AND METHODS, RESULTS	1-15
A	JP 6-086688 A (Michio KONO), 29 March 1994 (29.03.1994), claims; examples (Family: none)	1-15
A	JP 2003-508355 A (Molecular Discoveries, L.L.C.), 04 March 2003 (04.03.2003), claims; examples & WO 2001/012674 A1 claims; examples & US 6376654 B1 & EP 1204683 A1	1-15

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (January 2015)

REFERENCES CITED IN THE DESCRIPTION

This list of references cited by the applicant is for the reader's convenience only. It does not form part of the European patent document. Even though great care has been taken in compiling the references, errors or omissions cannot be excluded and the EPO disclaims all liability in this regard.

Patent documents cited in the description

- WO 2010117059 A1 [0010]
- JP 2011527572 A [0048]
- JP 2009534401 A [0048]

Non-patent literature cited in the description

- *Journal of Clinical Oncology*, 01 June 2012, vol. 30 (16), 1953-9 [0011]
- *Journal of immunology*, 01 February 2011, vol. 186 (3), 1840-8 [0011]
- *J Biol Chem.*, 04 May 2012, vol. 287 (19), 15749-59 [0011]
- *J Immunol.*, 01 November 2009, vol. 183 (9), 5563-74 [0011]
- *N Engl J Med.*, 16 October 2014, vol. 371 (16), 1507-17 [0011]
- *Nat Biotechnol.*, January 2002, vol. 20 (1), 70-5 [0011]
- **FORSSTROM B ; AXNAS BB ; ROCKBERG J ; DANIELSSON H ; BOHLIN A ; UHLEN M.** Dissecting antibodies with regards to linear and conformational epitopes. *PLoS One*, 27 March 2015, vol. 10 (3), e0121673 [0048]
- **LAZAR GA et al.** *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, vol. 103, 4005-10 [0103]
- **SHIELDS RL et al.** *J Biol Chem*, 2001, vol. 276, 6591-604 [0103]
- **MOORE GL et al.** *J Immunol*, 1997, vol. 159, 3613-21 [0103]
- **AN Z et al.** *MAbs*, 2009, vol. 1, 572-9 [0103]
- **BRUNNER, K.T. et al.** *Immunology*, 1968, vol. 14, 181-96 [0107] [0109]

Chinese title: 抗体

English title: ANTIBODY

Abstract

本发明提供一种骨髓瘤治疗用的医药组合物的有效成分。本发明的抗体在人类整合素 β_7 的包含第20~109号氨基酸残基的区域具有表位。