

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号

特許第7070932号

(P7070932)

(45)発行日 令和4年5月18日(2022.5.18)

(24)登録日 令和4年5月10日(2022.5.10)

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

Z N A

C 1 2 N 15/12 (2006.01)

C 1 2 N 15/12

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/62

Z

C 1 2 N 5/10 (2006.01)

C 1 2 N 5/10

C 1 2 N 5/0783(2010.01)

C 1 2 N 5/0783

請求項の数 11 (全80頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願2019-516099(P2019-516099)

(86)(22)出願日 平成29年6月6日(2017.6.6)

(65)公表番号 特表2019-521704(P2019-521704
A)

(43)公表日 令和1年8月8日(2019.8.8)

(86)国際出願番号 PCT/US2017/036178

(87)国際公開番号 WO2017/214167

(87)国際公開日 平成29年12月14日(2017.12.14)

審査請求日 令和2年6月4日(2020.6.4)

(31)優先権主張番号 62/346,324

(32)優先日 平成28年6月6日(2016.6.6)

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(31)優先権主張番号 62/396,767

(32)優先日 平成28年9月19日(2016.9.19)

最終頁に続く

(73)特許権者 598004424

シティ・オブ・ホープ

City of Hope

アメリカ合衆国カリフォルニア州910

10-0269,デュアーテ,イースト

・デュアーテ・ロード 1500

1500 East, Duarte Ro

ad, Duarte, Californ

ia 91010-0269, Unit

ed States of America

(73)特許権者 507410113

ボード オブ リージェンツ, ザ ユニヴ

ァーシティー オブ テキサス システム

アメリカ合衆国, テキサス州, オース

ティン, ウェスト 7ストリート 210

最終頁に続く

(54)【発明の名称】 B A F F - R 標的化キメラ抗原受容体修飾T細胞及びその使用

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

キメラ抗原受容体をコードする核酸分子であって、前記キメラ抗原受容体が、B A F F - Rを標的とするs c F v; C D 4膜貫通ドメインまたは1~5のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、C D 8膜貫通ドメインまたは1~5のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、C D 2 8膜貫通ドメインまたは1~5のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、及びC D 3 膜貫通ドメインまたは1~5のアミノ酸修飾を有するそのバリエーションから選択される、膜貫通ドメイン; 共刺激ドメイン; 及びC D 3 シグナル伝達ドメインまたは1~5のアミノ酸修飾を有するそのバリエーションを含み、前記s c F vが軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、前記軽鎖可変領域がC D R L 1(配列番号1)、C D R L 2(配列番号2)及びC D R L 3(配列番号3)を含み; 前記重鎖可変領域がC D R H 1(配列番号4)、C D R H 2(配列番号5)及びC D R H 3(配列番号6)を含む、前記核酸分子。

【請求項2】

前記共刺激ドメインが、C D 2 8の共刺激ドメインまたは1~5のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、4-1 B Bの共刺激ドメインまたは1~5のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、及びO X 4 0の共刺激ドメインまたは1~5のアミノ酸修飾を有するそのバリエーションからなる群から選択される、請求項1に記載の核酸分子。

【請求項3】

前記4-1 B Bの共刺激ドメインが配列番号41のアミノ酸配列を含む、請求項2に記載

の核酸分子。

【請求項 4】

前記 C D 3 シグナル伝達ドメインが配列番号 4 2 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 5】

3 ~ 1 5 のアミノ酸のリンカーが、前記共刺激ドメインと前記 C D 3 シグナル伝達ドメインまたはそのバリエーションとの間に所在する、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 6】

前記 s c F v が、配列番号 1 4、1 8、2 0、及び 2 2 から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

10

【請求項 7】

前記 s c F v が、配列番号 1 6、2 4、2 6、及び 2 8 から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインを含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 8】

前記 s c F v が、配列番号 4 3 のアミノ酸配列を含む、請求項 1 に記載の核酸分子。

【請求項 9】

請求項 1 ~ 8 のいずれか一項に記載の核酸分子を含む発現カセットを含むベクターによって形質導入された、ヒト T 細胞の集団。

【請求項 1 0】

請求項 9 に記載のヒト T 細胞の集団を含む、がんを治療するための医薬組成物。

20

【請求項 1 1】

請求項 9 に記載のヒト T 細胞の集団を含む、自己免疫疾患を治療するための医薬組成物。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0 0 0 1】

関連出願の相互参照

本出願は、2 0 1 6 年 6 月 6 日に提出された米国仮出願第 6 2 / 3 4 6 , 3 2 4 号及び 2 0 1 6 年 9 月 1 9 日に提出された米国仮出願第 6 2 / 3 9 6 , 7 6 7 号の優先権を主張し、それらの全体は参照により本明細書に援用される。

【背景技術】

30

【0 0 0 2】

腫瘍特異的 T 細胞ベースの免疫療法（操作された T 細胞を用いる治療法が挙げられる）は、抗腫瘍治療のために研究されてきた。B 細胞活性化因子受容体（B A F F - R）は、B A F F（B 細胞及び T 細胞の機能の調節因子）についての 3 つの既知の受容体のうちの 1 つである。

【発明の概要】

【0 0 0 3】

B 細胞活性化因子受容体（B A F F - R）を標的とするキメラ抗原受容体（C A R）を発現する T 細胞が、本明細書において提供される。本明細書において記載される B A F F - R を標的とする C A R（B A F F - R C A R）は、B A F F - R と結合するドメインを含む。B A F F - R C A R を作製及び使用する方法も提供される。

40

【図面の簡単な説明】

【0 0 0 4】

【図 1 - 1】図 1 A、1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、ヒト B A F F - R に対する新規のモノクローナル抗体の生成及び特異性を示す、F A C S 画像である。図 1 A は、マウス線維芽細胞（L 細胞）における h B A F F - R - G F P 融合タンパク質の細胞表面発現の F A C S 分析である。G F P 陽性細胞についてゲートして、操作された L 細胞クローン（右側プロット）を親 L 細胞（左側プロット）に比較する。クローン D 2 C をさらなる研究のために選択した。図 1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、細胞株及び患者サンプルと結合する抗 B A F F - R 抗体の蛍光カウントの F A C S トレースである。図 1 B は、0 . 0 5 μ g m

50

A b / 1 0 ⁶ 細胞の濃度で B A F F - R 陽性のヒト M C L 株 (M i n o , J e K o - 1 , R E C - 1 , J V M - 1 3 及び Z - 1 3 8 が含まれる) と結合する、親和性精製されたハイブリドーマ m A b (C 9 0 , C 6 7 , C 5 5 及び C 5 3) を示す。B A F F - R 陰性 2 9 3 T 胚腎臓細胞株を対照として使用した。図 1 C は、h B A F F - R 発現 L 細胞を高濃度及び低濃度で結合する、キメラ抗体 C 5 5 及び C 9 0 を示す。親 L 細胞及び二次抗 h I g G - A P C 抗体のみを対照として使用した。図 1 D は、a l e x a f l u o r 4 8 8 コンジュゲートキメラ抗体結合 N H L 細胞株のパネルを示す。図 1 E は、3 つのタイプの N H L 原発性患者サンプルと結合するキメラ抗体を示す。データは 3 つの独立した実験の代表である。図 1 B ~ 1 E のすべてについて、図中で示されるような上から下へのトレースは、図の下にまたは図の隣りに示された使用される変数 (例えば抗体タイプまたは細胞タイプ) の上から下と相関する。

10

【図 1 - 2】図 1 A、1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、ヒト B A F F - R に対する新規のモノクローナル抗体の生成及び特異性を示す、F A C S 画像である。図 1 A は、マウス線維芽細胞 (L 細胞) における h B A F F - R - G F P 融合タンパク質の細胞表面発現の F A C S 分析である。G F P 陽性細胞についてゲートして、操作された L 細胞クローン (右側プロット) を親 L 細胞 (左側プロット) に比較する。クローン D 2 C をさらなる研究のために選択した。図 1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、細胞株及び患者サンプルと結合する抗 B A F F - R 抗体の蛍光カウントの F A C S トレースである。図 1 B は、0 . 0 5 μ g m A b / 1 0 ⁶ 細胞の濃度で B A F F - R 陽性のヒト M C L 株 (M i n o , J e K o - 1 , R E C - 1 , J V M - 1 3 及び Z - 1 3 8 が含まれる) と結合する、親和性精製されたハイブリドーマ m A b (C 9 0 , C 6 7 , C 5 5 及び C 5 3) を示す。B A F F - R 陰性 2 9 3 T 胚腎臓細胞株を対照として使用した。図 1 C は、h B A F F - R 発現 L 細胞を高濃度及び低濃度で結合する、キメラ抗体 C 5 5 及び C 9 0 を示す。親 L 細胞及び二次抗 h I g G - A P C 抗体のみを対照として使用した。図 1 D は、a l e x a f l u o r 4 8 8 コンジュゲートキメラ抗体結合 N H L 細胞株のパネルを示す。図 1 E は、3 つのタイプの N H L 原発性患者サンプルと結合するキメラ抗体を示す。データは 3 つの独立した実験の代表である。図 1 B ~ 1 E のすべてについて、図中で示されるような上から下へのトレースは、図の下にまたは図の隣りに示された使用される変数 (例えば抗体タイプまたは細胞タイプ) の上から下と相関する。

20

【図 1 - 3】図 1 A、1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、ヒト B A F F - R に対する新規のモノクローナル抗体の生成及び特異性を示す、F A C S 画像である。図 1 A は、マウス線維芽細胞 (L 細胞) における h B A F F - R - G F P 融合タンパク質の細胞表面発現の F A C S 分析である。G F P 陽性細胞についてゲートして、操作された L 細胞クローン (右側プロット) を親 L 細胞 (左側プロット) に比較する。クローン D 2 C をさらなる研究のために選択した。図 1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、細胞株及び患者サンプルと結合する抗 B A F F - R 抗体の蛍光カウントの F A C S トレースである。図 1 B は、0 . 0 5 μ g m A b / 1 0 ⁶ 細胞の濃度で B A F F - R 陽性のヒト M C L 株 (M i n o , J e K o - 1 , R E C - 1 , J V M - 1 3 及び Z - 1 3 8 が含まれる) と結合する、親和性精製されたハイブリドーマ m A b (C 9 0 , C 6 7 , C 5 5 及び C 5 3) を示す。B A F F - R 陰性 2 9 3 T 胚腎臓細胞株を対照として使用した。図 1 C は、h B A F F - R 発現 L 細胞を高濃度及び低濃度で結合する、キメラ抗体 C 5 5 及び C 9 0 を示す。親 L 細胞及び二次抗 h I g G - A P C 抗体のみを対照として使用した。図 1 D は、a l e x a f l u o r 4 8 8 コンジュゲートキメラ抗体結合 N H L 細胞株のパネルを示す。図 1 E は、3 つのタイプの N H L 原発性患者サンプルと結合するキメラ抗体を示す。データは 3 つの独立した実験の代表である。図 1 B ~ 1 E のすべてについて、図中で示されるような上から下へのトレースは、図の下にまたは図の隣りに示された使用される変数 (例えば抗体タイプまたは細胞タイプ) の上から下と相関する。

30

40

【図 1 - 4】図 1 A、1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、ヒト B A F F - R に対する新規のモノクローナル抗体の生成及び特異性を示す、F A C S 画像である。図 1 A は、マウス線維芽細胞 (L 細胞) における h B A F F - R - G F P 融合タンパク質の細胞表面発現の F A

50

C S 分析である。G F P 陽性細胞についてゲートして、操作された L 細胞クローン（右側プロット）を親 L 細胞（左側プロット）に比較する。クローン D 2 C をさらなる研究のために選択した。図 1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、細胞株及び患者サンプルと結合する抗 B A F F - R 抗体の蛍光カウントの F A C S トレースである。図 1 B は、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ の濃度で B A F F - R 陽性のヒト M C L 株（M i n o、J e K o - 1、R E C - 1、J V M - 1 3 及び Z - 1 3 8 が含まれる）と結合する、親和性精製されたハイブリドーマ m A b（C 9 0、C 6 7、C 5 5 及び C 5 3）を示す。B A F F - R 陰性 2 9 3 T 胚腎臓細胞株を対照として使用した。図 1 C は、h B A F F - R 発現 L 細胞を高濃度及び低濃度で結合する、キメラ抗体 C 5 5 及び C 9 0 を示す。親 L 細胞及び二次抗 h I g G - A P C 抗体のみを対照として使用した。図 1 D は、a l e x a f l u o r 4 8 8 コンジュゲートキメラ抗体結合 N H L 細胞株のパネルを示す。図 1 E は、3 つのタイプの N H L 原発性患者サンプルと結合するキメラ抗体を示す。データは 3 つの独立した実験の代表である。図 1 B ~ 1 E のすべてについて、図中で示されるような上から下へのトレースは、図の下にまたは図の隣りに示された使用される変数（例えば抗体タイプまたは細胞タイプ）の上から下と相関する。

【図 1 - 5】図 1 A、1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、ヒト B A F F - R に対する新規のモノクローナル抗体の生成及び特異性を示す、F A C S 画像である。図 1 A は、マウス線維芽細胞（L 細胞）における h B A F F - R - G F P 融合タンパク質の細胞表面発現の F A C S 分析である。G F P 陽性細胞についてゲートして、操作された L 細胞クローン（右側プロット）を親 L 細胞（左側プロット）に比較する。クローン D 2 C をさらなる研究のために選択した。図 1 B、1 C、1 D 及び 1 E は、細胞株及び患者サンプルと結合する抗 B A F F - R 抗体の蛍光カウントの F A C S トレースである。図 1 B は、 $0.05 \mu\text{g/ml}$ の濃度で B A F F - R 陽性のヒト M C L 株（M i n o、J e K o - 1、R E C - 1、J V M - 1 3 及び Z - 1 3 8 が含まれる）と結合する、親和性精製されたハイブリドーマ m A b（C 9 0、C 6 7、C 5 5 及び C 5 3）を示す。B A F F - R 陰性 2 9 3 T 胚腎臓細胞株を対照として使用した。図 1 C は、h B A F F - R 発現 L 細胞を高濃度及び低濃度で結合する、キメラ抗体 C 5 5 及び C 9 0 を示す。親 L 細胞及び二次抗 h I g G - A P C 抗体のみを対照として使用した。図 1 D は、a l e x a f l u o r 4 8 8 コンジュゲートキメラ抗体結合 N H L 細胞株のパネルを示す。図 1 E は、3 つのタイプの N H L 原発性患者サンプルと結合するキメラ抗体を示す。データは 3 つの独立した実験の代表である。図 1 B ~ 1 E のすべてについて、図中で示されるような上から下へのトレースは、図の下にまたは図の隣りに示された使用される変数（例えば抗体タイプまたは細胞タイプ）の上から下と相関する。

【図 2 - 1】図 2 A、2 B 及び 2 C は、B A F F - R モノクローナル抗体が B 細胞腫瘍株に対して特異的なインビトロの細胞毒性を表わしたことを示す、グラフである。抗体誘導性細胞毒性を、C 5 5、C 9 0 またはリツキシマブ及びエフェクター（NK 細胞または補体含有血清）によるインキュベーション後の、クロム - 5 1 放出によって測定した。2 0 : 1 の NK エフェクター細胞：標的の比（E : T）。標的細胞の細胞特異的溶解のパーセンテージは以下の通りである。第 1 のパネルは、B A F F - R 発現 L 細胞または対照の親 L 細胞を示し；第 2 及び第 3 のパネルは、B A F F - R 陽性 J e K o - 1 M C L または B A F F - R 陰性 U 2 6 6 多発性骨髄腫細胞を示し、変動する抗体濃度による用量応答曲線として示される。図 2 B は、活性のある補体含有ヒト血清と混合された抗体（1 : 3 希釈）の、C D C 感受性（R a j i）及び C D C 耐性（R a j i - 2 P）に対する特異的溶解を示す。図 2 C は、N H L 株 J e K o - 1、S U - D H L - 6、R a j i 及び R L に対する、NK エフェクター細胞（E : T = 2 0 : 1）有りまたは無しの B A F F - R キメラ抗体による A D C C 効果を示す。データは三重サンプルの平均 ± 標準偏差として示される。* 両側スチューデントの t 検定によって NK 細胞と比較して、 $P < 0.05$ 。

【図 2 - 2】図 2 A、2 B 及び 2 C は、B A F F - R モノクローナル抗体が B 細胞腫瘍株に対して特異的なインビトロの細胞毒性を表わしたことを示す、グラフである。抗体誘導性細胞毒性を、C 5 5、C 9 0 またはリツキシマブ及びエフェクター（NK 細胞または補

体含有血清)によるインキュベーション後の、クロム - 51放出によって測定した。20 : 1のNKエフェクター細胞：標的の比(E : T)。標的細胞の細胞特異的溶解のパーセンテージは以下の通りである。第1のパネルは、BAFF-R発現L細胞または対照の親L細胞を示し；第2及び第3のパネルは、BAFF-R陽性Jeko-1 MCLまたはBAFF-R陰性U266多発性骨髄腫細胞を示し、変動する抗体濃度による用量応答曲線として示される。図2Bは、活性のある補体含有ヒト血清と混合された抗体(1 : 3希釈)の、CDC感受性(Raji)及びCDC耐性(Raji-2P)に対する特異的溶解を示す。図2Cは、NHL株Jeko-1、SU-DHL-6、Raji及びRLに対する、NKエフェクター細胞(E : T = 20 : 1)有りまたは無しのBAFF-Rキメラ抗体によるADCC効果を示す。データは三重サンプルの平均±標準偏差として示される。*両側スチューデントのt検定によってNK細胞と比較して、 $P < 0.05$ 。

10

【図2-3】図2A、2B及び2Cは、BAFF-Rモノクローナル抗体がB細胞腫瘍株に対して特異的なインビトロの細胞毒性を表わしたことを示す、グラフである。抗体誘導性細胞毒性を、C55、C90またはリツキシマブ及びエフェクター(NK細胞または補体含有血清)によるインキュベーション後の、クロム - 51放出によって測定した。20 : 1のNKエフェクター細胞：標的の比(E : T)。標的細胞の細胞特異的溶解のパーセンテージは以下の通りである。第1のパネルは、BAFF-R発現L細胞または対照の親L細胞を示し；第2及び第3のパネルは、BAFF-R陽性Jeko-1 MCLまたはBAFF-R陰性U266多発性骨髄腫細胞を示し、変動する抗体濃度による用量応答曲線として示される。図2Bは、活性のある補体含有ヒト血清と混合された抗体(1 : 3希釈)の、CDC感受性(Raji)及びCDC耐性(Raji-2P)に対する特異的溶解を示す。図2Cは、NHL株Jeko-1、SU-DHL-6、Raji及びRLに対する、NKエフェクター細胞(E : T = 20 : 1)有りまたは無しのBAFF-Rキメラ抗体によるADCC効果を示す。データは三重サンプルの平均±標準偏差として示される。*両側スチューデントのt検定によってNK細胞と比較して、 $P < 0.05$ 。

20

【図3-1】図3A及び3Bは、BAFF-Rモノクローナル抗体が原発性B細胞腫瘍に対してインビトロの抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)を誘導することを示す、グラフである。抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)効果を、C55、C90またはリツキシマブ及びエフェクター(NK細胞)によるインキュベーション後の、クロム - 51放出によって測定した。標的細胞の細胞特異的溶解のパーセンテージは以下の通りである。図3Aは、NHL患者サンプル(E : T = 20 : 1または10 : 1)を示し；図3Bは、リツキシマブ治療不応性患者からの原発性MCL及びCLLサンプル(E : T = 20 : 1)を示す。データは三重サンプルの平均±標準偏差として示される。*両側スチューデントのt検定によってNK細胞と比較して、 $P < 0.05$ 。

30

【図3-2】図3A及び3Bは、BAFF-Rモノクローナル抗体が原発性B細胞腫瘍に対してインビトロの抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)を誘導することを示す、グラフである。抗体依存性細胞媒介性細胞毒性(ADCC)効果を、C55、C90またはリツキシマブ及びエフェクター(NK細胞)によるインキュベーション後の、クロム - 51放出によって測定した。標的細胞の細胞特異的溶解のパーセンテージは以下の通りである。図3Aは、NHL患者サンプル(E : T = 20 : 1または10 : 1)を示し；図3Bは、リツキシマブ治療不応性患者からの原発性MCL及びCLLサンプル(E : T = 20 : 1)を示す。データは三重サンプルの平均±標準偏差として示される。*両側スチューデントのt検定によってNK細胞と比較して、 $P < 0.05$ 。

40

【図4-1】図4Aは、腫瘍の最小致死用量による0日目腫瘍の攻撃投与に後続する治療スケジュールを示す、概略図である。治療はIV尾静脈注射から与えられた。図4B及び4Cは、B細胞腫瘍に対する、ヒトBAFF-Rを標的とするキメラ抗体誘発インビボ治療有効性を示す、画像である。ルシフェラーゼ発現腫瘍：Jeko-1(MCL)(図4B)またはRS4;11(ALL)(図4C)により攻撃投与されたマウスの生物発光画像。実験群に、キメラBAFF-R mAb(示されるようにC55またはC90)の治療を投与した。対照群マウスに、同じスケジュールでPBS、NK細胞単独、またはリツ

50

キシマブを投与した。データは3つの独立した実験の代表である。

【図4-2】図4Aは、腫瘍の最小致死用量による0日目腫瘍の攻撃投与に後続する治療スケジュールを示す、概略図である。治療はIV尾静脈注射から与えられた。図4B及び4Cは、B細胞腫瘍に対する、ヒトBAFF-Rを標的とするキメラ抗体誘発インビボ治療有効性を示す、画像である。ルシフェラーゼ発現腫瘍：JeKo-1(MCL)(図4B)またはRS4;11(ALL)(図4C)により攻撃投与されたマウスの生物発光画像。実験群に、キメラBAFF-R mAb(示されるようにC55またはC90)の治療を投与した。対照群マウスに、同じスケジュールでPBS、NK細胞単独、またはリツキシマブを投与した。データは3つの独立した実験の代表である。

【図4-3】図4Aは、腫瘍の最小致死用量による0日目腫瘍の攻撃投与に後続する治療スケジュールを示す、概略図である。治療はIV尾静脈注射から与えられた。図4B及び4Cは、B細胞腫瘍に対する、ヒトBAFF-Rを標的とするキメラ抗体誘発インビボ治療有効性を示す、画像である。ルシフェラーゼ発現腫瘍：JeKo-1(MCL)(図4B)またはRS4;11(ALL)(図4C)により攻撃投与されたマウスの生物発光画像。実験群に、キメラBAFF-R mAb(示されるようにC55またはC90)の治療を投与した。対照群マウスに、同じスケジュールでPBS、NK細胞単独、またはリツキシマブを投与した。データは3つの独立した実験の代表である。

【図5-1】図5A、5B及び5Cは、キメラBAFF-R抗体が薬物耐性リンパ腫モデル上でADCCをインビトロで誘導することを示す、画像またはグラフである。図5Aは、CD20遺伝子のCRISPR/HDRノックアウトに後続するJeKo-1細胞上で結合するCD20を示す、FACS分析のスクATTERプロットである。選択されたCD20-/クローン番号25についてのCD20発現を、野生型JeKo-1に比較した。ADCC効果を、C55、C90またはリツキシマブ及びエフェクターNK細胞(E:T=20:1)によるインキュベーション後の、クロム-51放出によって測定した。標的細胞の細胞特異的溶解のパーセンテージは以下の通りである。リツキシマブ耐性JeKo-1-CD20-KO(図5B)及びイブルチニブ耐性Z-138及びSP49-IR(図5C)。すべてのデータは2つ以上の同一実験の代表である。データは三重サンプルの平均±標準偏差として示される。*両側スチューデントのt検定によってNK細胞と比較して、 $P < 0.05$ 。

【図5-2】図5A、5B及び5Cは、キメラBAFF-R抗体が薬物耐性リンパ腫モデル上でADCCをインビトロで誘導することを示す、画像またはグラフである。図5Aは、CD20遺伝子のCRISPR/HDRノックアウトに後続するJeKo-1細胞上で結合するCD20を示す、FACS分析のスクATTERプロットである。選択されたCD20-/クローン番号25についてのCD20発現を、野生型JeKo-1に比較した。ADCC効果を、C55、C90またはリツキシマブ及びエフェクターNK細胞(E:T=20:1)によるインキュベーション後の、クロム-51放出によって測定した。標的細胞の細胞特異的溶解のパーセンテージは以下の通りである。リツキシマブ耐性JeKo-1-CD20-KO(図5B)及びイブルチニブ耐性Z-138及びSP49-IR(図5C)。すべてのデータは2つ以上の同一実験の代表である。データは三重サンプルの平均±標準偏差として示される。*両側スチューデントのt検定によってNK細胞と比較して、 $P < 0.05$ 。

【図5-3】図5A、5B及び5Cは、キメラBAFF-R抗体が薬物耐性リンパ腫モデル上でADCCをインビトロで誘導することを示す、画像またはグラフである。図5Aは、CD20遺伝子のCRISPR/HDRノックアウトに後続するJeKo-1細胞上で結合するCD20を示す、FACS分析のスクATTERプロットである。選択されたCD20-/クローン番号25についてのCD20発現を、野生型JeKo-1に比較した。ADCC効果を、C55、C90またはリツキシマブ及びエフェクターNK細胞(E:T=20:1)によるインキュベーション後の、クロム-51放出によって測定した。標的細胞の細胞特異的溶解のパーセンテージは以下の通りである。リツキシマブ耐性JeKo-1-CD20-KO(図5B)及びイブルチニブ耐性Z-138及びSP49-IR

10

20

30

40

50

(図5C)。すべてのデータは2つ以上の同一実験の代表である。データは三重サンプルの平均±標準偏差として示される。* 両側スチューデントのt検定によってNK細胞と比較して、 $P < 0.05$ 。

【図6-1】薬物耐性B細胞腫瘍に対する、ヒトBAFF-Rを標的とするキメラ抗体誘発インビボ治療有効性を示す、画像(図6A及び6B)及びグラフ(図6C)である。ルシフェラーゼ発現腫瘍のJeko-1-CD20-KO細胞(図6A)またはイブルチニブ耐性Z-138細胞(図6B)により攻撃投与され、図4中でのような抗体治療が後続した、マウスの生物発光画像。対照群マウスに、同じスケジュールでPBS、NK細胞単独、またはリツキシマブを投与した。図6Cは、(A)及び(B)中で示されるマウスの80日の無腫瘍曲線及び全生存曲線をそれぞれ示す。実験群とすべての対照群との間の無腫瘍率及び生存の差を、ログランク検定によって分析した(* * $P < 0.001$)。データは3つの独立した実験の代表である。

10

【図6-2】薬物耐性B細胞腫瘍に対する、ヒトBAFF-Rを標的とするキメラ抗体誘発インビボ治療有効性を示す、画像(図6A及び6B)及びグラフ(図6C)である。ルシフェラーゼ発現腫瘍のJeko-1-CD20-KO細胞(図6A)またはイブルチニブ耐性Z-138細胞(図6B)により攻撃投与され、図4中でのような抗体治療が後続した、マウスの生物発光画像。対照群マウスに、同じスケジュールでPBS、NK細胞単独、またはリツキシマブを投与した。図6Cは、(A)及び(B)中で示されるマウスの80日の無腫瘍曲線及び全生存曲線をそれぞれ示す。実験群とすべての対照群との間の無腫瘍率及び生存の差を、ログランク検定によって分析した(* * $P < 0.001$)。データは3つの独立した実験の代表である。

20

【図6-3】薬物耐性B細胞腫瘍に対する、ヒトBAFF-Rを標的とするキメラ抗体誘発インビボ治療有効性を示す、画像(図6A及び6B)及びグラフ(図6C)である。ルシフェラーゼ発現腫瘍のJeko-1-CD20-KO細胞(図6A)またはイブルチニブ耐性Z-138細胞(図6B)により攻撃投与され、図4中でのような抗体治療が後続した、マウスの生物発光画像。対照群マウスに、同じスケジュールでPBS、NK細胞単独、またはリツキシマブを投与した。図6Cは、(A)及び(B)中で示されるマウスの80日の無腫瘍曲線及び全生存曲線をそれぞれ示す。実験群とすべての対照群との間の無腫瘍率及び生存の差を、ログランク検定によって分析した(* * $P < 0.001$)。データは3つの独立した実験の代表である。

30

【図7-1】図7A及び7Bは抗ヒトBAFF-Rモノクローナル抗体の生成及びクローン選択を示す。図7Aは、L細胞クローンD2C(それは細胞内ドメイン上のC末端GFPTagを備えたヒトhBAFF-Rを安定的に発現する)を使用して、示されたスケジュールに従ってBALB/cマウスを免疫付与したことを示す、概略図である。脾臓組織を20日目に収穫し、B細胞ハイブリドーマクローンを確立した。図7Bは、抗マウスIgG-HRPを使用する、5つのハイブリドーマ上清からのELISA結果を示す、表である。クローン53、55、67及び90はBAFF-R特異的mAbを産生したが、クローン37は産生しなかった(他の陰性クローンの代表)。

【図7-2】図7A及び7Bは抗ヒトBAFF-Rモノクローナル抗体の生成及びクローン選択を示す。図7Aは、L細胞クローンD2C(それは細胞内ドメイン上のC末端GFPTagを備えたヒトhBAFF-Rを安定的に発現する)を使用して、示されたスケジュールに従ってBALB/cマウスを免疫付与したことを示す、概略図である。脾臓組織を20日目に収穫し、B細胞ハイブリドーマクローンを確立した。図7Bは、抗マウスIgG-HRPを使用する、5つのハイブリドーマ上清からのELISA結果を示す、表である。クローン53、55、67及び90はBAFF-R特異的mAbを産生したが、クローン37は産生しなかった(他の陰性クローンの代表)。

40

【図8】選択されたハイブリドーマクローンがMCL細胞と結合するという確認を示す、フローサイトメトリーの結果である。Mino(マントル細胞リンパ腫)細胞株及び293T(陰性対照)細胞株へのハイブリドーマクローン53、55、67及び90の上清(1/10、1/50及び1/200の希釈)の結合を、抗マウスIgG-APCにより遂

50

行されるフローサイトメトリーによって査定した。

【図 9】精製された mAb のヒト B A F F - R への用量依存的結合を示す、グラフである。ハイブリドーマクローン 53、55、67、90 からのマウス mAb を、プロテイン A 親和性クロマトグラフィーによって精製した。連続的に希釈された ($1 \mu\text{g} / 10^6$ 細胞 $\sim 1.6 \text{ ng} / 10^6$ 細胞) 精製マウス mAb の M i n o 細胞への結合を、抗マウス I g G - A P C 二次抗体によるフローサイトメトリーによって査定した。

【図 10】h B A F F - R mAb がインビトロで非ホジキンリンパ腫細胞株を認識したことを示す、F A C S スクリーニング分析の結果である。マウス mAb クローン 55 及び 90 は、高用量 ($2 \mu\text{g}$ mAb / 10^6 細胞) 及び低用量 ($0.05 \mu\text{g}$ mAb / 10^6 細胞) で、追加の細胞株: J e K o - 1 (マントル細胞リンパ腫)、S U - D H L - 6 (びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫)、R a j i (バーキットリンパ腫) 及び R L (濾胞性リンパ腫) と結合した。フローサイトメトリー分析を抗マウス I g G - A P C により遂行した。図中で示されるような上から下へのトレースは、図の隣りに示された使用される変数 (例えば抗体タイプまたは細胞タイプ) の上から下と相関する。

10

【図 11】h B A F F - R mAb がリンパ腫患者サンプルを認識したことを示す、グラフである。マントル細胞リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、及び濾胞性リンパ腫の患者サンプルを、高用量 ($2 \mu\text{g} / 10^6$ 細胞) 及び低用量 ($0.05 \mu\text{g} / 10^6$ 細胞) で、マウス mAb C 55 及び C 90 により染色した。フローサイトメトリー分析を抗マウス I g G - A P C により遂行した。図中で示されるような上から下へのトレースは、図の下に示された使用される変数 (例えば抗体タイプまたは細胞タイプ) の左から右と相関する。

20

【図 12】キメラ抗体が B A F F - R 発現 L 細胞に対して A D C C を誘導したことを示す、グラフである。B A F F - R 発現 D 2 C L 細胞 (標的) をクロム - 51 により標識し、後続して、キメラ mAb + N K 細胞 (エフェクター対標的の比、20 : 1) により一晩インキュベーションした。培養上清を放出されたクロムについて分析した。

【図 13】腫瘍細胞に対する細胞毒性のために N K 細胞に要求されるキメラ抗体を示す、グラフである。J e K o - 1 細胞 (標的) をクロム - 51 により標識した。細胞を、キメラ mAb (C 55、C 90 またはリツキシマブ) により、及び 20 : 1 のエフェクター対標的の比で、N K 細胞 (エフェクター) 有りまたは無しでインキュベーションした。キメラ抗体を $50 \sim 0.005 \mu\text{g} / \text{mL}$ の濃度で添加した。培養上清を放出されたクロムについて分析した。

30

【図 14】h B A F F - R mAb が B A F F / B A F F - R 相互作用をブロックしたことを示す、F A C S の結果である。B A F F - R 発現 D 2 C L 細胞クローンを C 90 ($0 \sim 1000 \text{ ng} / 10^6$ 細胞) により 4 で 45 分間インキュベーションし、後続して、組み換え B A F F リガンド ($0.5 \mu\text{g} / 10^6$ 細胞) により 4 で 90 分間インキュベーションした。フローサイトメトリーを遂行し、抗 B A F F - P E についてゲートした。シグナルプロットは、各々の mAb 濃度の存在下における B A F F / B A F F - R の結合シグナルを示す。シグナルプロットにおいて示される濃度は、F A C S の結果の各々の上部に示される。

【図 15】限定的な内部移行が B A F F - R mAb により観察されたことを示す、F A C S の結果である。M i n o 細胞を mAb C 90 ($0.05 \mu\text{g} / 10^6$ 細胞) により 4 で 20 分間インキュベーションし、後続して、37 で 1 時間インキュベーションした。フローサイトメトリー分析を抗マウス I g G - A P C により遂行した。細胞を、表面局在化抗体 (アウト) 及び細胞表面染色の喪失 (イン) についてゲートした。

40

【図 16 - 1】C D 20 ノックアウトクローンが C R I S P R により生成されたことを示す、F A C S の結果 (図 16 A) 及びゲル画像 (16 B) である。J e K o - 1 の C D 20 ノックアウトクローンは、C D 20 遺伝子座で R F P を置換する商業的 C R I S P R / H D R システムにより生成した。図 16 A では、クローンを、C D 20 - / R F P + 発現についてフローサイトメトリーによってスクリーニングし選別した。図 16 B では、抗 C D 20 抗体によるウエスタンブロットを、C D 20 - / R F P + クローンからの全細胞溶

50

解物について遂行した。 - アクチンをローディング対照としてプロットした。図 16 C は、BAFF-R / RFP + 発現についてスクリーニングして、BAFF-R の発現が CD20 の CRISPR / HDR 操作によって影響を受けていなかったことを確認した、図 16 A 中と同じクローンについての FACS の結果を示す。

【図 16 - 2】CD20 ノックアウトクローンが CRISPR により生成されたことを示す、FACS の結果 (図 16 A) 及びゲル画像 (16 B) である。JeKo-1 の CD20 ノックアウトクローンは、CD20 遺伝子座で RFP を置換する商業的 CRISPR / HDR システムにより生成した。図 16 A では、クローンを、CD20 - / RFP + 発現についてフローサイトメトリーによってスクリーニングし選別した。図 16 B では、抗 CD20 抗体によるウエスタンブロットを、CD20 - / RFP + クローンからの全細胞溶解物について遂行した。 - アクチンをローディング対照としてプロットした。図 16 C は、BAFF-R / RFP + 発現についてスクリーニングして、BAFF-R の発現が CD20 の CRISPR / HDR 操作によって影響を受けていなかったことを確認した、図 16 A 中と同じクローンについての FACS の結果を示す。

【図 16 - 3】CD20 ノックアウトクローンが CRISPR により生成されたことを示す、FACS の結果 (図 16 A) 及びゲル画像 (16 B) である。JeKo-1 の CD20 ノックアウトクローンは、CD20 遺伝子座で RFP を置換する商業的 CRISPR / HDR システムにより生成した。図 16 A では、クローンを、CD20 - / RFP + 発現についてフローサイトメトリーによってスクリーニングし選別した。図 16 B では、抗 CD20 抗体によるウエスタンブロットを、CD20 - / RFP + クローンからの全細胞溶解物について遂行した。 - アクチンをローディング対照としてプロットした。図 16 C は、BAFF-R / RFP + 発現についてスクリーニングして、BAFF-R の発現が CD20 の CRISPR / HDR 操作によって影響を受けていなかったことを確認した、図 16 A 中と同じクローンについての FACS の結果を示す。

【図 17 - 1】正常な B 細胞に対する BAFF-R 結合の特徴評価を示す、FACS の結果である。健康なドナーからの PBMC を、APC コンジュゲート C90 キメラ抗体、及び (A) リンパ球マーカーパネル (抗 CD20 - PE、抗 CD3 - Pacific Blue、及び抗 CD56 - FITC) または (B) 骨髄系細胞マーカーパネル (抗 CD45 - PE、抗 CD15 - PerCP - Cy5.5、及び抗 CD14 - Pacific Blue) により共染色した。各々の特異的免疫細胞亜集団を、BAFF-R 抗体との結合についてゲートし分析した。

【図 17 - 2】正常な B 細胞に対する BAFF-R 結合の特徴評価を示す、FACS の結果である。健康なドナーからの PBMC を、APC コンジュゲート C90 キメラ抗体、及び (A) リンパ球マーカーパネル (抗 CD20 - PE、抗 CD3 - Pacific Blue、及び抗 CD56 - FITC) または (B) 骨髄系細胞マーカーパネル (抗 CD45 - PE、抗 CD15 - PerCP - Cy5.5、及び抗 CD14 - Pacific Blue) により共染色した。各々の特異的免疫細胞亜集団を、BAFF-R 抗体との結合についてゲートし分析した。

【図 18】図 18 A 及び 18 B は、末梢血からの正常な免疫細胞における hBAFF-R mAb の特徴評価を示す、FACS の結果である。マウス mAb クローン 55 及び 90 を、単離されたヒト免疫細胞亜集団への結合について試験した。B 細胞、T 細胞及び NK 細胞を、商業的な特異的細胞タイプ単離キットにより単離し、C55 及び C90 (0.05 µg mAb / 10⁶ 細胞) により染色した。フローサイトメトリー分析を抗マウス IgG により遂行した。PBMC からの骨髄系細胞を CD66b + についてゲートし、mAb C55 及び C90 についての染色を分析した。図中で示されるような上から下へのトレースは、図の隣りに示された使用される変数 (例えば抗体タイプまたは細胞タイプ) の上から下と相関する。

【図 19 - 1】図 19 A 及び 19 B は免疫組織化学画像である。図 19 A では、免疫組織化学を遂行して、抗 BAFF-R 抗体の組織特異性を同定した。1 mg / mL の抗体の 1 : 150 希釈を使用して、組織サンプルを染色した。ヒト BAFF-R に対する C55

10

20

30

40

50

mAbの組織特異性(20×対物レンズ): 1mg/mLのストックの1:150希釈。
図19Bでは、免疫組織化学を追加で扁桃腺組織及び乳房組織で遂行して、抗BAFF-R抗体の組織特異性を同定した。1mg/mLの抗体の1:150希釈を使用して、組織サンプルを染色した。ヒトBAFF-Rに対するmAbの組織特異性(上部パネル: 扁桃腺組織; 下部パネル: 乳房組織; 20×対物レンズ)。

【図19-2】図19A及び19Bは免疫組織化学画像である。図19Aでは、免疫組織化学を遂行して、抗BAFF-R抗体の組織特異性を同定した。1mg/mLの抗体の1:150希釈を使用して、組織サンプルを染色した。ヒトBAFF-Rに対するC55 mAbの組織特異性(20×対物レンズ): 1mg/mLのストックの1:150希釈。
図19Bでは、免疫組織化学を追加で扁桃腺組織及び乳房組織で遂行して、抗BAFF-R抗体の組織特異性を同定した。1mg/mLの抗体の1:150希釈を使用して、組織サンプルを染色した。ヒトBAFF-Rに対するmAbの組織特異性(上部パネル: 扁桃腺組織; 下部パネル: 乳房組織; 20×対物レンズ)。

10

【図20-1】図20A及び20Bは、ヒト化バリエーションに対して遂行された機能的なインビトロのアッセイを示す、グラフである。図20Aでは、ELISAアッセイをC90の9つのヒト化バリエーションに対して遂行した。ヒトBAFF-Rの組み換え細胞外ドメインを抗原として使用した。抗体を0.78~100ng/mLの変動濃度で投与し、それらの吸光度を450nmで採取した。図20Bでは、ヒト化バリエーションをクロム放出アッセイにおいてJeKo-1細胞に対して試験した。細胞にクロムを取込ませ、後続して、ヒト化C90バリエーション及びエフェクターNK細胞により処理した。細胞を6時間インキュベーションし、上清をクロム量のためにサンプリングした。

20

【図20-2】図20A及び20Bは、ヒト化バリエーションに対して遂行された機能的なインビトロのアッセイを示す、グラフである。図20Aでは、ELISAアッセイをC90の9つのヒト化バリエーションに対して遂行した。ヒトBAFF-Rの組み換え細胞外ドメインを抗原として使用した。抗体を0.78~100ng/mLの変動濃度で投与し、それらの吸光度を450nmで採取した。図20Bでは、ヒト化バリエーションをクロム放出アッセイにおいてJeKo-1細胞に対して試験した。細胞にクロムを取込ませ、後続して、ヒト化C90バリエーション及びエフェクターNK細胞により処理した。細胞を6時間インキュベーションし、上清をクロム量のためにサンプリングした。

【図21-1】図21A及び21Bは、様々なリンパ腫株の特異的細胞毒性についてのヒト化抗体C90-4及びC90-5の分析を示す、グラフである。図21Aでは、JeKo-1、Z138及びRS4に、ヒト化抗体C90-4及びC90-5によるクロム放出アッセイを行った。0~5µg/mLの間の濃度で抗体を細胞株へ投与し、20:1のE:T比でNK細胞により6時間インキュベーションした。細胞上清をクロム含有量について分析した。図21Bでは、LY-10、MEC-2、RL及びRajiリンパ腫株に、ヒト化抗体C90-4及びC90-5によるクロム放出アッセイを行った。5µg/mLで抗体を細胞株へ投与し、20:1のE:T比でNK細胞により6時間インキュベーションした。細胞上清をクロム含有量について分析した。

30

【図21-2】図21A及び21Bは、様々なリンパ腫株の特異的細胞毒性についてのヒト化抗体C90-4及びC90-5の分析を示す、グラフである。図21Aでは、JeKo-1、Z138及びRS4に、ヒト化抗体C90-4及びC90-5によるクロム放出アッセイを行った。0~5µg/mLの間の濃度で抗体を細胞株へ投与し、20:1のE:T比でNK細胞により6時間インキュベーションした。細胞上清をクロム含有量について分析した。図21Bでは、LY-10、MEC-2、RL及びRajiリンパ腫株に、ヒト化抗体C90-4及びC90-5によるクロム放出アッセイを行った。5µg/mLで抗体を細胞株へ投与し、20:1のE:T比でNK細胞により6時間インキュベーションした。細胞上清をクロム含有量について分析した。

40

【図22-1】図22A及び22Bは、原発性MCLサンプルに対する結合及び細胞毒性について試験されたヒト化C90抗体最有力候補を示す、FACSの結果及びグラフである。図22Aでは、3つの原発性MCL腫瘍サンプルをCD20-APC及びビオチン化

50

ヒト化C90により共染色し、後続して、PEコンジュゲートストレプトアビジンを使用してシグナルを検出した。図22Bでは、原発性腫瘍サンプルに対するヒト化C90の細胞毒性を、クロム放出アッセイにより評価した。細胞をクロム-51によりインキュベーションし、後続して、抗体及びエフェクターNK細胞により処理した。一晚のインキュベーションに後続して、上清をサンプリングし、クロム含有量を決定した。

【図22-2】図22A及び22Bは、原発性MCLサンプルに対する結合及び細胞毒性について試験されたヒト化C90抗体最有力候補を示す、FACSの結果及びグラフである。図22Aでは、3つの原発性MCL腫瘍サンプルをCD20-APC及びビオチン化ヒト化C90により共染色し、後続して、PEコンジュゲートストレプトアビジンを使用してシグナルを検出した。図22Bでは、原発性腫瘍サンプルに対するヒト化C90の細胞毒性を、クロム放出アッセイにより評価した。細胞をクロム-51によりインキュベーションし、後続して、抗体及びエフェクターNK細胞により処理した。一晚のインキュベーションに後続して、上清をサンプリングし、クロム含有量を決定した。

10

【図23】ビオチン化ヒト化C90-4及びC90-5のフローサイトメトリー分析を示す、FACSの結果である。抗体を使用してPBMCを染色し、後続して、蛍光PEストレプトアビジンプローブにより検出した。PBMCを、顆粒球マーカーCD66b-PerCP-Cy5.5、単球マーカーCD14-PE-Cy7、B細胞マーカーCD20-APC、T細胞マーカーCD3-PE-Cy5、及びNK細胞マーカーCD56-FITCでも標識した。PBMCをフローサイトメトリーによって分析した。

【図24】BAFF-Rキメラ抗原受容体(CAR)のT細胞のインビボの腫瘍治療を示す、画像である。ドナーT細胞を、4-1BBモチーフを備えたT細胞受容体シグナル伝達ドメインの上にキメラC55抗BAFF-R一本鎖(sFv)を発現するように操作した。NSGマウスを、最小致死用量(1×10^6 細胞)のNHL JeKo-1-Luc細胞により攻撃投与した。腫瘍が生物発光画像化によって検出可能であるまで、腫瘍細胞を生着させた(9日目)。腫瘍攻撃投与の9及び15日後に、T細胞療法(5×10^6 CAR-T細胞)または対照のいずれかをマウスに投与した。マウスを3日ごとに厳密にモニタリング及び画像化して腫瘍発達を追跡した。

20

【図25-1】図25Aは例示的なCARコンストラクトの概略図であり、図25Bは例示的なCAR-T細胞株の産生スケジュールの概略図である。

【図25-2】図25Aは例示的なCARコンストラクトの概略図であり、図25Bは例示的なCAR-T細胞株の産生スケジュールの概略図である。

30

【図26】BAFF-R CARを発現する様々なT細胞亜集団を使用するインビトロのアッセイの結果を示す、グラフである。この4時間の51Cr放出アッセイにおいて、BAFF-R CAR T細胞を、様々なエフェクター対標的の比で、51Cr標識BAFF-R陽性標的細胞(JeKo-1)と、またはPBMCの陰性対照と共培養した。グラフの隣りに示された凡例は、グラフの左側から右側のバーと上から下に相関する。

【図27】細胞の分裂増殖アッセイの結果を示す、シグナルプロットである。BAFF-R CAR発現T細胞(H90 BAFF-R CARを発現するCD8+ TCM)を、U266細胞(陰性対照)、CD3ビーズ(陽性対照)、またはJeKo-1細胞へ曝露した。

40

【図28-1】図28Aは、腫瘍刺激に応答した細胞の分裂増殖を示す、FACS結果である。図28Bは、示されるような標的細胞/ビーズと共に24時間のインキュベーションに後続する、サイトカインIFN-、TNF-及びグランザイムBの上清濃度のELISA測定を示す、グラフである。

【図28-2】図28Aは、腫瘍刺激に応答した細胞の分裂増殖を示す、FACS結果である。図28Bは、示されるような標的細胞/ビーズと共に24時間のインキュベーションに後続する、サイトカインIFN-、TNF-及びグランザイムBの上清濃度のELISA測定を示す、グラフである。

【図29】BAFF-R CAR-T細胞が、BAFF-R発現B細胞悪性腫瘍に対して細胞毒性をインビトロで誘発することを示す、グラフである。クロム-51放出によって

50

標的細胞の特異的溶解を測定する細胞毒性Ｔリンパ球アッセイ。クロム - 51 標識標的細胞（悪性Ｂ細胞株または対照、ＢＡＦＦ - Ｒ + Ｌ細胞；ＢＡＦＦ - Ｒ - 親Ｌ細胞）を、示されたエフェクター対標的の比でＴ細胞とインキュベーションした。ＢＡＦＦ - Ｒ ＣＡＲ - Ｔ細胞は、ＣＤ４ + ＴＮまたはＣＤ８ + ＴＣＭの単離Ｔ細胞に由来した。放出されたクロム - 51 を、インキュベーションの４時間後の上清中で測定した。すべてのデータは２つ以上の同一実験の代表である。データは三重サンプルの平均 ± 標準偏差として示される。グラフの下に示された凡例は、グラフの左側から右側のバーと左側から右側に相関する。

【図３０】図３０Ａ及び３０Ｂは、ＢＡＦＦ - Ｒ ＣＡＲ - Ｔ細胞が、インビボで、確立している腫瘍を消失させ、再攻撃投与された腫瘍に対して存続したこと示す、画像及びグラフである。ルシフェラーゼ発現ＪｅＫｏ - 1 による０日目の静脈内の（ＩＶ）腫瘍攻撃投与（ 1×10^6 細胞 / マウス）に後続する、ＮＳＧマウスの群（ $n = 5$ ）の生物発光画像。活性化ＣＡＲ - Ｔ細胞治療を、１０及び１７日目にＩＶで点滴した。治療は、 2.5×10^6 のＣＤ４ + ＴＮ + 2.5×10^6 のＣＤ８ + ＴＣＭ ＣＡＲ - Ｔ細胞、または 5×10^6 の選別されない（汎）ＣＡＲ - Ｔ細胞のいずれかからなっていた。ＰＢＳを腫瘍対照として使用した。生存マウス（１群あたり $n = 4$ ）に、追加の治療無しで、１００日目に 1×10^6 のＪｅＫｏ - 1 細胞を再攻撃投与した。以前に無治療であるＮＳＧマウス（ $n = 3$ ）に、腫瘍対照として同数のＪｅＫｏ - 1 細胞を攻撃投与した。画像を図３０Ａ中で示す。図３０Ｂは、１００日の経過にわたる全生存のカプラン - マイヤープロットである。

【図３１】ＪｅＫｏ - 1 モデルにおいて、Ｈ５５ ＢＡＦＦ - Ｒ ＣＡＲ - Ｔ細胞及びＣＤ１９標的化ＣＡＲ - Ｔ細胞の活性のインビボアッセイの結果を示す、画像である。ルシフェラーゼ（*ffluc*）及び緑色蛍光タンパク質（*GFP*）を発現するように操作された細胞である、 2×10^6 の *ffluc GFP* - ＪｅＫｏ - 1 細胞を、*NOD / Scid IL2R Cnull*（*NSG*）マウスの中へ静脈内で注射した。腫瘍の攻撃投与後９日目に、マウスに、 1×10^6 のＨ５５ ＢＡＦＦ - Ｒ ＣＡＲ - Ｔ細胞、ＰＢＳ、 1×10^6 のＣＤ１９標的化ＣＡＲ - Ｔ細胞、またはモック形質導入した（対照）Ｔ細胞を、静脈内で注射した。腫瘍シグナルを、示されるように、*Xenogen* 画像化によりモニタリングした。

【図３２ - １】図３２Ａ、３２Ｂ及び３２Ｃは、インビボでのＢＡＦＦ - Ｒ ＣＡＲ - Ｔ細胞治療存続性について至適化されたＴ細胞出発材料を示す、画像及びグラフである。ルシフェラーゼ発現ＪｅＫｏ - 1 による０日目の静脈内の（ＩＶ）腫瘍攻撃投与（ 1×10^6 細胞 / マウス）に後続する、ＮＳＧマウスの群（ $n = 5$ ）の生物発光画像。活性化ＣＡＲ - Ｔ細胞治療をＩＶで点滴した。治療を、１０及び１７日目（図３２Ａ）ならびに１０日目のみ（図３２Ｂ及び３２Ｃ）に与えた。ＣＤ８ + のＴＣＭ、ＴＮ、またはＴＳＣＭのＣＡＲ - Ｔ細胞のいずれかと組み合わせた、ＣＤ４ + ＴＮ ＣＡＲ - Ｔ細胞の出発材料及び治療用量について、治療を至適化した。示された治療は、指摘されたＴ細胞サブセットに由来する、（図３２Ａ） 2.5×10^6 のＣＤ４ + ＴＮ + 2.5×10^6 のＣＤ８ + Ｔ細胞、（図３２Ｂ） 2.5×10^6 のＣＤ４ + ＴＮ + 1×10^6 のＣＤ８ + Ｔ細胞、（図３２Ｃ） 1×10^6 のＣＤ４ + ＴＮ + 1×10^6 のＣＤ８ + Ｔ細胞、からなるＣＡＲ - Ｔ細胞である。同じドナーサンプルからの形質導入されていないＣＤ４ + / ＣＤ８ + Ｔ細胞を同種異系対照として使用し、ＰＢＳを腫瘍対照として使用した。図３２Ｂ及び３２Ｃは、１００日の経過にわたる全生存のカプラン - マイヤープロットも示す。

【図３２ - ２】図３２Ａ、３２Ｂ及び３２Ｃは、インビボでのＢＡＦＦ - Ｒ ＣＡＲ - Ｔ細胞治療存続性について至適化されたＴ細胞出発材料を示す、画像及びグラフである。ルシフェラーゼ発現ＪｅＫｏ - 1 による０日目の静脈内の（ＩＶ）腫瘍攻撃投与（ 1×10^6 細胞 / マウス）に後続する、ＮＳＧマウスの群（ $n = 5$ ）の生物発光画像。活性化ＣＡＲ - Ｔ細胞治療をＩＶで点滴した。治療を、１０及び１７日目（図３２Ａ）ならびに１０日目のみ（図３２Ｂ及び３２Ｃ）に与えた。ＣＤ８ + のＴＣＭ、ＴＮ、またはＴＳＣＭのＣＡＲ - Ｔ細胞のいずれかと組み合わせた、ＣＤ４ + ＴＮ ＣＡＲ - Ｔ細胞の出発材料及び治

10

20

30

40

50

療用量について、治療を至適化した。示された治療は、指摘されたT細胞サブセットに由来する、(図32A) 2.5×10^6 のCD4+ TN+ 2.5×10^6 のCD8+ T細胞、(図32B) 2.5×10^6 のCD4+ TN+ 1×10^6 のCD8+ T細胞、(図32C) 1×10^6 のCD4+ TN+ 1×10^6 のCD8+ T細胞、からなるCAR-T細胞である。同じドナーサンプルからの形質導入されていないCD4+ / CD8+ T細胞を同種異系対照として使用し、PBSを腫瘍対照として使用した。図32B及び32Cは、100日の経過にわたる全生存のカプラン-マイヤープロットも示す。

【図32-3】図32A、32B及び32Cは、インビボでのBAFF-R CAR T細胞治療持続性について至適化されたT細胞出発材料を示す、画像及びグラフである。ルシフェラーゼ発現Jeko-1による0日目の静脈内の(IV)腫瘍攻撃投与(1×10^6 細胞/マウス)に後続する、NSGマウスの群($n = 5$)の生物発光画像。活性化CAR T細胞治療をIVで点滴した。治療を、10及び17日目(図32A)ならびに10日目のみ(図32B及び32C)に与えた。CD8+のTCM、TN、またはTSCMのCAR-T細胞のいずれかと組み合わせた、CD4+ TN CAR-T細胞の出発材料及び治療用量について、治療を至適化した。示された治療は、指摘されたT細胞サブセットに由来する、(図32A) 2.5×10^6 のCD4+ TN+ 2.5×10^6 のCD8+ T細胞、(図32B) 2.5×10^6 のCD4+ TN+ 1×10^6 のCD8+ T細胞、(図32C) 1×10^6 のCD4+ TN+ 1×10^6 のCD8+ T細胞、からなるCAR-T細胞である。同じドナーサンプルからの形質導入されていないCD4+ / CD8+ T細胞を同種異系対照として使用し、PBSを腫瘍対照として使用した。図32B及び32Cは、100日の経過にわたる全生存のカプラン-マイヤープロットも示す。

【図33-1】図33A、33B及び33Cは、BAFF-R CAR-T治療マウスが腫瘍の再攻撃投与に対して持続的なCAR-T細胞を実証したことを示す、画像及びグラフである。図33Aでは、CD8+ TN及びCD8+ TCMの実験群中の図32Bからの生存する無腫瘍マウス(1群あたり $n = 4$)に、追加の治療無しで、初回攻撃投与の100日後に 1×10^6 のJeko-1細胞を再攻撃投与した。以前に無治療であるNSGマウス($n = 5$)に、腫瘍対照として同数のJeko-1細胞を攻撃投与した。各々の実験マウスからの血液を、腫瘍の再攻撃投与の0及び5日目でサンプリングした。白血球をRBC溶解によって血液から単離し、フローサイトメトリーによって検査した。図33Bは、GFP+ BAFF-R CAR-T細胞についてゲートし、後続してCD4 T細胞及びCD8 T細胞についてゲートした、白血球の各々の実験群及び日からの代表的なFACSプロットを示す。図33Cは、各々のマウスについて計算及びプロットした、全白血球中のBAFF-R+ CAR-T細胞のパーセンテージを示す。CD4 T細胞集団及びCD8 T細胞集団のパーセンテージを各々の積層バー内に示す。

【図33-2】図33A、33B及び33Cは、BAFF-R CAR-T治療マウスが腫瘍の再攻撃投与に対して持続的なCAR-T細胞を実証したことを示す、画像及びグラフである。図33Aでは、CD8+ TN及びCD8+ TCMの実験群中の図32Bからの生存する無腫瘍マウス(1群あたり $n = 4$)に、追加の治療無しで、初回攻撃投与の100日後に 1×10^6 のJeko-1細胞を再攻撃投与した。以前に無治療であるNSGマウス($n = 5$)に、腫瘍対照として同数のJeko-1細胞を攻撃投与した。各々の実験マウスからの血液を、腫瘍の再攻撃投与の0及び5日目でサンプリングした。白血球をRBC溶解によって血液から単離し、フローサイトメトリーによって検査した。図33Bは、GFP+ BAFF-R CAR-T細胞についてゲートし、後続してCD4 T細胞及びCD8 T細胞についてゲートした、白血球の各々の実験群及び日からの代表的なFACSプロットを示す。図33Cは、各々のマウスについて計算及びプロットした、全白血球中のBAFF-R+ CAR-T細胞のパーセンテージを示す。CD4 T細胞集団及びCD8 T細胞集団のパーセンテージを各々の積層バー内に示す。

【図33-3】図33A、33B及び33Cは、BAFF-R CAR-T治療マウスが腫瘍の再攻撃投与に対して持続的なCAR-T細胞を実証したことを示す、画像及びグラフである。図33Aでは、CD8+ TN及びCD8+ TCMの実験群中の図32Bから

の生存する無腫瘍マウス（1群あたり $n = 4$ ）に、追加の治療無しで、初回攻撃投与の100日後に 1×10^6 の J e K o - 1 細胞を再攻撃投与した。以前に無治療である N S G マウス（ $n = 5$ ）に、腫瘍対照として同数の J e K o - 1 細胞を攻撃投与した。各々の実験マウスからの血液を、腫瘍の再攻撃投与の0及び5日目でサンプリングした。白血球を R B C 溶解によって血液から単離し、フローサイトメトリーによって検査した。図33Bは、G F P + B A F F - R C A R - T 細胞についてゲートし、後続して C D 4 T 細胞及び C D 8 T 細胞についてゲートした、白血球の各々の実験群及び日からの代表的な F A C S プロットを示す。図33Cは、各々のマウスについて計算及びプロットした、全白血球中の B A F F - R + C A R - T 細胞のパーセンテージを示す。C D 4 T 細胞集団及び C D 8 T 細胞集団のパーセンテージを各々の積層バー内に示す。

10

【図34】至適化された B A F F - R C A R T 細胞療法が、C D 19 耐性腫瘍をインビボで消失させることを示す、画像及びグラフである。ルシフェラーゼ発現 R a j i - 1 による0日目の静脈内の（I V）腫瘍攻撃投与（ 0.5×10^6 細胞/マウス）に後続する、N S G マウスの群（ $n = 5$ ）の生物発光画像。単回の活性化 C A R T 細胞治療を、7日目に I V で点滴した。標準的な作業治療用量は、C D 4 + T N 2 . 5×10^6 + C D 8 + T N 1 $\times 10^6$ B A F F - R C A R T 細胞または C D 19 C A R - T 細胞からなっていた。s c F v（抗 B A F F - R または抗 C D 19）でのみ異なる、等価な第2世代の C A R プラットフォームを使用した。同じドナーサンプルからの形質導入されていない C D 4 + / C D 8 + T 細胞を同種異系対照として使用し、P B S を腫瘍対照として使用した。80日の経過にわたる全生存のカプラン - マイヤープロットが、右側にある。

20

【発明を実施するための形態】

【0005】

とりわけ、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む B A F F - R 抗体が本明細書において提供される。抗体の機能的断片も提供される。本明細書において提供される B A F F - R 抗体及びその機能的断片は、ヒト B A F F - R タンパク質へ結合することが可能であり、B A F F - R 発現する細胞（例えば B 細胞）に抗体依存性細胞性細胞傷害（A D C C）を誘導する。随意に、本明細書において提供される抗体の軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、キメラ抗原受容体（C A R）の一部を形成する。したがって、本明細書において提供される組成物及び方法は、とりわけ、がん（例えば B 細胞悪性腫瘍）または自己免疫疾患の治療のために使用され得る。

30

【0006】

本明細書において参照される時、B A F F - R、B A F F 受容体または B A F F - R タンパク質としては、B 細胞活性化因子受容体（B A F F - R）の組み換え形態または天然に存在する形態のうちの任意のものが挙げられ、それらは、B A F F - R 活性を維持する（例えば B A F F - R に比較して、少なくとも 50%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% 内の活性）、腫瘍壊死因子受容体スーパーファミリーメンバー 13 C（T N F R S F 13 C）またはそのバリエーションもしくはホモログとしても公知である。随意に、バリエーションまたはホモログは、天然に存在する B A F F - R に比較して、全体の配列または配列の部分（例えば 50、100、150 または 200 の連続的なアミノ酸部分）にわたって、少なくとも 90%、95%、96%、97%、98%、99% または 100% のアミノ酸配列同一性を有する。随意に、B A F F - R は、U n i P r o t 参照番号 Q 9 6 R J 3 またはそれへの実質的な同一性を有するバリエーションもしくはホモログによって同定されるタンパク質に実質的に同一である。随意に、B A F F - R は、U n i P r o t 参照番号 Q 9 D 8 D 0 またはそれへの実質的な同一性を有するバリエーションもしくはホモログによって同定されるタンパク質に実質的に同一である。随意に、B A F F - R は、N C B I 参照番号 G I : 1 6 4 4 5 0 2 7 またはそれへの実質的な同一性を有するバリエーションもしくはホモログによって同定されるタンパク質に実質的に同一である。随意に、B A F F - R は、N C B I 参照番号 G I : 1 6 3 0 6 4 8 1 またはそれへの実質的な同一性を有するバリエーションもしくはホモログによって同定されるタンパク質に実質的に同一である。

40

50

【 0 0 0 7 】

軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含む B 細胞活性化因子受容体 (B A F F - R) 抗体が提供される。軽鎖可変領域は、配列番号 1 中で明記される通りの C D R L 1、配列番号 2 中で明記される通りの C D R L 2、及び配列番号 3 中で明記される通りの C D R L 3 を含む。そして、重鎖可変領域は、配列番号 4 中で明記される通りの C D R H 1、配列番号 5 中で明記される通りの C D R H 2、及び配列番号 6 中で明記される通りの C D R H 3 を含む。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号 7 中で明記される通りの C D R L 1、配列番号 8 中で明記される通りの C D R L 2、及び配列番号 9 中で明記される通りの C D R L 3 を含む。そして、重鎖可変領域は、配列番号 10 中で明記される通りの C D R H 1、配列番号 11 中で明記される通りの C D R H 2、及び配列番号 12 中で明記される通りの C D R H 3 を含む。随意に、抗体はヒト化抗体である。開示される抗体の機能的断片も提供される。

10

【 0 0 0 8 】

本明細書において提供されるようなヒト化抗体は、B A F F - R タンパク質と結合することが可能であり、本明細書において提供される B A F F - R 抗体の少なくとも 1 つのマウス C D R またはその機能的断片もしくはバリエーション (例えば配列番号 1 または 7 の C D R L 1、配列番号 2 または 8 の C D R L 2、配列番号 3 または 9 の C D R L 3、配列番号 4 または 10 の C D R H 1、配列番号 5 または 11 の C D R H 2、配列番号 7 または 13 の C D R H 3) を含む。C D R の機能的断片は完全な C D R アミノ酸配列の部分であるが、機能的断片を含有する抗体またはその断片は、抗原 (例えば B A F F - R) へそれでもまだ結合することが可能である。C D R の機能的なバリエーションは、C D R 配列への 1 つまたは複数の変化を備えた C D R であるが、機能的なバリエーションを含有する抗体またはその機能的断片は、抗原 (例えば B A F F - R) へそれでもまだ結合することが可能である。例えば、C D R をコードする核酸配列の機能的なバリエーションは、1 つまたは複数の変化を含み得るが、それでもまだ C D R の同じアミノ酸配列をコードする。さらに、抗体またはその機能的断片が抗原へ結合する限り、C D R のポリペプチド配列の機能的なバリエーションは 1 つまたは複数のアミノ酸変化を含むことができる。したがって、C D R の機能的断片またはバリエーションは、典型的には、抗原 (例えば B A F F - R) への抗体結合のために要求されるアミノ酸残基を含む。ヒト化抗体が少なくとも 1 つの C D R を含む場合に、少なくとも 1 つの C D R またはその機能的断片は、ドナー抗体に由来する。随意に、ドナー抗体はマウス抗体である。当業者は、少なくとも 1 つのマウス C D R を含むヒト化抗体がドナー抗体に由来する少なくとも 1 つのマウス C D R を備えたヒト化抗体であり、追加の C D R がアクセプター抗体に由来することを直ちに認識するだろう (例えば軽鎖が合計 3 つの C D R を含み、重鎖が合計 3 つの C D R を含む場合)。

20

30

【 0 0 0 9 】

本明細書において提供される B A F F - R 抗体がヒト化抗体である場合に、抗体は、ヒト化重鎖可変領域及び/またはヒト化軽鎖可変領域を含み得る。随意に、ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域は、組み合わせられた 1 つのマウス C D R またはマウス C D R の機能的断片もしくはバリエーションを含む。したがって、ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域は、6 つの C D R のうちの少なくとも 1 つがマウス C D R である、6 つの組み合わせられた C D R を含み得る。ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域が、組み合わせられた 1 つのマウス C D R を含む場合に、ヒト化軽鎖可変領域またはヒト化重鎖可変領域は 1 つのマウス C D R を含む。例えば、ヒト化抗体は、ドナー抗体に由来する C D R L 3 (例えばマウス、本明細書においてマウス C D R L 3 と称される)、ならびにアクセプター抗体に由来する C D R L 1、C D R L 2、C D R H 1、C D R H 2 及び C D R H 3 (すなわちヒト) を含み得る。

40

【 0 0 1 0 】

随意に、ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域は、2 つの組み合わせられたマウス C D R を含む。ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域が、組み合わせられた 2 つのマウス C D R を含む場合に、ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域は各々 1 つのマ

50

ウスCDRを含む(i)か、ヒト化軽鎖可変領域は2つのマウスCDRを含む(ii)か、または、ヒト化重鎖可変領域は2つのマウスCDRを含む(iii)。例えば、ヒト化抗体は、ドナー抗体に由来するCDR L3及びCDR H3(例えばマウス、本明細書においてそれぞれマウスCDR L3及びマウスCDR H3とも称される)、ならびにアクセプター抗体に由来するCDR L1、CDR L2、CDR H1、及びCDR H2(すなわちヒト)を含み得る。

【0011】

随意に、ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域は、3つの組み合わせられたマウスCDRを含む。ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域が、組み合わせられた3つのマウスCDRを含む場合に、ヒト化軽鎖可変領域は1つのマウスCDRを含み、ヒト化重鎖可変領域は2つのマウスCDRを含み得る(i)か、ヒト化軽鎖可変領域は2つのマウスCDRを含み、ヒト化重鎖可変領域は1つのマウスCDRを含む(ii)か、ヒト化軽鎖可変領域は3つのマウスCDRを含む(iii)か、または、ヒト化重鎖可変領域は3つのマウスCDRを含む(iv)。例えば、ヒト化抗体は、ドナー抗体に由来するCDR L3、CDR H3及びCDR L2(例えばマウス、本明細書においてそれぞれマウスCDR L3、マウスCDR H3及びマウスCDR L2とも称される)、ならびにアクセプター抗体に由来するCDR L1、CDR H1、及びCDR H2(すなわちヒト)を含み得る。

【0012】

ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域は、4つの組み合わせられたマウスCDRを含み得る。ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域が、組み合わせられた4つのマウスCDRを含む場合に、ヒト化軽鎖可変領域は1つのマウスCDRを含み、ヒト化重鎖可変領域は3つのマウスCDRを含む(i)か、ヒト化軽鎖可変領域は3つのマウスCDRを含み、ヒト化重鎖可変領域は1つのマウスCDRを含む(ii)か、または、ヒト化軽鎖可変領域は2つのマウスCDRを含み、ヒト化重鎖可変領域は2つのマウスCDRを含む(iii)。例えば、ヒト化抗体は、ドナー抗体に由来するCDR L3、CDR H3、CDR L2及びCDR L1(例えばマウス、本明細書においてそれぞれマウスCDR L3、マウスCDR H3、マウスCDR L2及びマウスCDR L1とも称される)、ならびにアクセプター抗体に由来するCDR H1、及びCDR H2(すなわちヒト)を含み得る。

【0013】

ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域は各々、少なくとも1つのマウスCDRを含み得る。ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域が各々、少なくとも1つのマウスCDRを含む場合に、ヒト化軽鎖可変領域は少なくとも1つのマウスCDRを含み、ヒト化重鎖可変領域は少なくとも1つのマウスCDRを含む。したがって、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L1を含み、ヒト化重鎖はマウスCDR H1を含み得る。随意に、マウスCDR L1は配列番号1のアミノ酸配列を含み、マウスCDR H1は配列番号4のアミノ酸配列を含む。随意に、マウスCDR L1は配列番号1のアミノ酸配列であり、マウスCDR H1は配列番号4のアミノ酸配列である。随意に、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L2を含み、ヒト化重鎖可変領域はマウスCDR H2を含む。随意に、マウスCDR L2は配列番号2のアミノ酸配列を含み、マウスCDR H2は配列番号5のアミノ酸配列を含む。随意に、マウスCDR L2は配列番号2のアミノ酸配列であり、マウスCDR H2は配列番号5のアミノ酸配列である。随意に、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L3を含み、ヒト化重鎖可変領域はマウスCDR H3を含む。随意に、マウスCDR L3は配列番号3のアミノ酸配列を含み、マウスCDR H3は配列番号6のアミノ酸配列を含む。随意に、CDR L3は配列番号3のアミノ酸配列であり、マウスCDR H3は配列番号6のアミノ酸配列である。

【0014】

随意に、マウスCDR L1は配列番号7のアミノ酸配列を含み、マウスCDR H1は配列番号10のアミノ酸配列を含む。随意に、マウスCDR L1は配列番号7のアミノ酸

10

20

30

40

50

配列であり、マウスCDR H1は配列番号10のアミノ酸配列である。随意に、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L2を含み、ヒト化重鎖可変領域はマウスCDR H2を含む。随意に、マウスCDR L2は配列番号8のアミノ酸配列を含み、マウスCDR H2は配列番号11のアミノ酸配列を含む。随意に、マウスCDR L2は配列番号8のアミノ酸配列であり、マウスCDR H2は配列番号11のアミノ酸配列である。随意に、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L3を含み、ヒト化重鎖可変領域はマウスCDR H3を含む。随意に、マウスCDR L3は配列番号9のアミノ酸配列を含み、マウスCDR H3は配列番号12のアミノ酸配列を含む。随意に、CDR L3は配列番号9のアミノ酸配列であり、マウスCDR H3は配列番号12のアミノ酸配列である。

【0015】

マウスCDR L3及びマウスCDR H3の存在は、ヒト化抗体のBAFF-Rへの結合のために十分であり得る。したがって、ヒト化抗体は、マウスCDR L1、マウスCDR L2、CDR H1またはマウスCDR H2を含まなくてもよい。ヒト化抗体がマウスCDR L1、マウスCDR L2、マウスCDR H1またはマウスCDR H2を含まない場合に、ヒト化抗体は、アクセプター抗体（すなわちヒト）に由来するCDR L1、CDR L2、CDR H1またはCDR H2を含む。したがって、マウスCDR L1、マウスCDR L2、マウスCDR H1またはマウスCDR H2を含まないヒト化抗体は、ドナー抗体（例えばマウス、ラット、ウサギ）からのCDR L1、CDR L2、CDR H1またはCDR H2を含まないが、アクセプター抗体（すなわちヒト）からのCDR L1、CDR L2、CDR H1またはCDR H2を含む。したがって、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L1またはマウスCDR L2を含まなくてもよく、ヒト化重鎖可変領域はマウスCDR H1またはマウスCDR H2を含まない。随意に、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L1及びマウスCDR L2を含まず、ヒト化重鎖可変領域はマウスCDR H1及びマウスCDR H2を含まない。

【0016】

随意に、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L2及びマウスCDR L3を含み、ヒト化重鎖可変領域はマウスCDR H2及びマウスCDR H3を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域はマウスCDR L1、マウスCDR L2及びマウスCDR L3を含み、ヒト化重鎖可変領域はマウスCDR H1、マウスCDR H2及びマウスCDR H3を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は、配列番号1中で明記される通りのマウスCDR L1、配列番号2中で明記される通りのマウスCDR L2、及び配列番号3中で明記される通りのマウスCDR L3を含み、ヒト化重鎖可変領域は、配列番号4中で明記される通りのマウスCDR H1、配列番号5中で明記される通りのマウスCDR H2、及び配列番号6中で明記される通りのマウスCDR H3を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は、配列番号7中で明記される通りのマウスCDR L1、配列番号8中で明記される通りのマウスCDR L2、及び配列番号9中で明記される通りのマウスCDR L3を含み、ヒト化重鎖可変領域は、配列番号10中で明記される通りのマウスCDR H1、配列番号11中で明記される通りのマウスCDR H2、及び配列番号12中で明記される通りのマウスCDR H3を含む。

【0017】

CDR及びFRの位置はKabatナンバリングシステムによって定義され得る（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest、第5版、U.S. Department of Health and Human Services、U.S. Government Printing Office（1991））。同様に、抗体の軽鎖または重鎖内の個別の残基によって占められる位置は、Kabatナンバリングシステムによって定義され得る。したがって、ヒト化抗体のヒト化軽鎖及びヒト化重鎖内での結合のために要求される残基の所在位置は、当該技術分野において周知であるように、Kabatナンバリングシステムに従った残基の位置によって定義され得る。上記のように、ヒト化抗体は、ドナー抗体（例えばマウス）からのCDR及びヒト抗体からの可変領域フレームワーク（FR）を有

10

20

30

40

50

する抗体であり得る。フレームワーク領域 (F R) は、ヒト化抗体中で正しい場所に C D R を保持するとされる。アミノ末端から進行して、これらの領域は、軽鎖について F R L 1、F R L 2、F R L 3 及び F R L 4 ならびに重鎖について F R H 1、F R H 2、F R H 3 及び F R H 4 と、それぞれ表記される。フレームワーク領域内の 1 つまたは複数の残基を含む、ヒト化抗体が本明細書において提供される。随意に、これらの残基は、ヒト化抗体のエピトープ結合のために重要である。エピトープ結合 (例えば B A F F - R 結合) に関与 (または重要) であるフレームワーク領域残基は、本明細書において結合フレームワーク領域残基と称される。結合フレームワーク領域残基は、ヒト化軽鎖可変領域のフレームワーク領域 (すなわち F R L 1、F R L 2、F R L 3、F R L 4) 中に存在し得るか、または、それらは、ヒト化重鎖可変領域のフレームワーク (すなわち F R H 1、F R H 2、F R H 3、F R H 4) 中に存在し得る。ヒト化軽鎖の F R L 3 領域中に存在する結合フレームワーク残基は、F R L 3 結合フレームワーク領域残基と本明細書において称される。したがって、ヒト化重鎖の F R H 3 領域中に存在する結合フレームワーク領域残基は、F R H 3 結合フレームワーク領域残基と本明細書において称される。

【 0 0 1 8 】

随意に、ヒト化抗体は少なくとも 1 つの結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は少なくとも 1 つの結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は、1 つまたは複数の F R L 1、F R L 2、F R L 3 または F R L 4 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は 1 つまたは複数の F R L 1 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は 1 つまたは複数の F R L 2 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は 1 つまたは複数の F R L 3 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は 1 つまたは複数の F R L 4 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は、1 つまたは複数の F R H 1、F R H 2、F R H 3 または F R H 4 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は 1 つまたは複数の F R H 1 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は 1 つまたは複数の F R H 2 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は 1 つまたは複数の F R H 3 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は 1 つまたは複数の F R H 4 結合フレームワーク領域残基を含む。

【 0 0 1 9 】

ヒト化軽鎖可変領域は少なくとも 1 つの結合フレームワーク領域残基 (例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 以上の残基) を含み、ヒト化重鎖可変領域は少なくとも 1 つの結合フレームワーク領域残基 (例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 以上の残基) を含み得る。ヒト化抗体内の結合フレームワーク領域残基の位置は、C D R 残基の位置に類似する K a b a t ナンバリングシステムによって定義され得る。

【 0 0 2 0 】

随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 7 に対応する位置でセリンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 8 に対応する位置でプロリンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 15 に対応する位置でバリンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 22 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 24 に対応する位置でグルタミンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 41 に対応する位置でグリシンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 42 に対応する位置でリジンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 43 に対応する位置でアラニ

ンを含む。随意に、軽鎖可変領域はK a b a t 位置 4 4 に対応する位置でプロリンを含む。随意に、軽鎖可変領域はK a b a t 位置 5 6 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、軽鎖可変領域はK a b a t 位置 7 2 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、軽鎖可変領域はK a b a t 位置 7 3 に対応する位置でフェニルアラニンを含む。随意に、軽鎖可変領域はK a b a t 位置 7 9 に対応する位置でグルタミンを含む。随意に、軽鎖可変領域はK a b a t 位置 1 0 4 に対応する位置でバリンを含む。

【 0 0 2 1 】

随意に、軽鎖可変領域は、K a b a t 位置 7 に対応する位置でセリン、K a b a t 位置 8 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 2 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 2 4 に対応する位置でグルタミンもしくはセリン、K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でグリシン、K a b a t 位置 4 2 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 4 3 に対応する位置でアラニンもしくはスレオニン、K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 5 6 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 3 に対応する位置でフェニルアラニンもしくはリジン、K a b a t 位置 7 9 に対応する位置でグルタミン、またはK a b a t 位置 1 0 4 に対応する位置でバリンを含む。

10

【 0 0 2 2 】

随意に、軽鎖可変領域は、K a b a t 位置 7 に対応する位置でセリン、K a b a t 位置 8 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 2 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 2 4 に対応する位置でグルタミンまたはセリン、K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でグリシン、K a b a t 位置 4 2 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 4 3 に対応する位置でアラニンまたはスレオニン、K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 5 6 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 3 に対応する位置でフェニルアラニンまたはリジン、K a b a t 位置 7 9 に対応する位置でグルタミン、及びK a b a t 位置 1 0 4 に対応する位置でバリンを含む。

20

【 0 0 2 3 】

随意に、軽鎖可変領域は、K a b a t 位置 7 に対応する位置でセリン、K a b a t 位置 8 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 2 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 2 4 に対応する位置でグルタミンもしくはセリン、K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でグリシン、K a b a t 位置 4 2 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 4 3 に対応する位置でアラニンもしくはスレオニン、K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 5 6 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 3 に対応する位置でフェニルアラニンもしくはリジン、K a b a t 位置 7 9 に対応する位置でグルタミン、またはK a b a t 位置 1 0 4 に対応する位置でバリンである、結合フレームワーク領域残基を含む。

30

【 0 0 2 4 】

随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 1 0 に対応する位置でスレオニンまたはアラニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 1 1 に対応する位置でリジンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 1 2 に対応する位置でバリンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 1 5 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 1 9 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 2 3 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 4 1 に対応する位置でプロリンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 4 4 に対応する位置でアラニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 6 1 に対応する位置でプロリンまたはスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 6 6 に対応する位置でアルギニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 7 0 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 7 5 に対応する位置でリジンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 7 9 に対応する位置でバリン

40

50

【 0 0 2 5 】

20

【 0 0 2 6 】

30

【 0 0 2 7 】

50

ームワーク領域残基を含む。

【0028】

マウスCDR L1、マウスCDR L2またはマウスCDR L3を含むヒト化軽鎖可変領域、及びマウスCDR H1またはマウスCDR H2またはマウスCDR H3を含むヒト化重鎖可変領域を含む、ヒト化BAFF-R抗体が提供される。ヒト化軽鎖可変領域は、配列番号1中で明記される通りのマウスCDR L1、配列番号2中で明記される通りのマウスCDR L2、または配列番号3中で明記される通りのマウスCDR L3を含み得る。ヒト化軽鎖可変領域は、配列番号1中で明記される通りのマウスCDR L1、配列番号2中で明記される通りのマウスCDR L2、及び配列番号3中で明記される通りのマウスCDR L3を含み得る。ヒト化重鎖可変領域は、配列番号4中で明記される通りのマウスCDR H1、配列番号5中で明記される通りのマウスCDR H2、または配列番号6中で明記される通りのマウスCDR H3を含み得る。ヒト化重鎖可変領域は、配列番号4中で明記される通りのマウスCDR H1、配列番号5中で明記される通りのマウスCDR H2、及び配列番号6中で明記される通りのマウスCDR H3を含み得る。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号1中で明記される通りのマウスCDR L1を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号2中で明記される通りのマウスCDR L2を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号3中で明記される通りのマウスCDR L3を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は配列番号4中で明記される通りのマウスCDR H1を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は配列番号5中で明記される通りのマウスCDR H2を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号6中で明記される通りのマウスCDR H3を含む。さらなる実施形態において、ヒト化軽鎖可変領域は少なくとも1つの結合フレームワーク領域残基を含む。他のさらなる実施形態において、ヒト化重鎖可変領域は少なくとも1つの結合フレームワーク領域残基を含む。

【0029】

マウスCDR L1、マウスCDR L2またはマウスCDR L3を含むヒト化軽鎖可変領域、及びマウスCDR H1またはマウスCDR H2またはマウスCDR H3を含むヒト化重鎖可変領域を含む、ヒト化BAFF-R抗体が提供される。ヒト化軽鎖可変領域は、配列番号7中で明記される通りのマウスCDR L1、配列番号8中で明記される通りのマウスCDR L2、または配列番号9中で明記される通りのマウスCDR L3を含み得る。ヒト化軽鎖可変領域は、配列番号7中で明記される通りのマウスCDR L1、配列番号8中で明記される通りのマウスCDR L2、及び配列番号9中で明記される通りのマウスCDR L3を含み得る。ヒト化重鎖可変領域は、配列番号10中で明記される通りのマウスCDR H1、配列番号11中で明記される通りのマウスCDR H2、または配列番号12中で明記される通りのマウスCDR H3を含み得る。ヒト化重鎖可変領域は、配列番号10中で明記される通りのマウスCDR H1、配列番号11中で明記される通りのマウスCDR H2、及び配列番号12中で明記される通りのマウスCDR H3を含み得る。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号7中で明記される通りのマウスCDR L1を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号8中で明記される通りのマウスCDR L2を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号9中で明記される通りのマウスCDR L3を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は配列番号10中で明記される通りのマウスCDR H1を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は配列番号11中で明記される通りのマウスCDR H2を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号12中で明記される通りのマウスCDR H3を含む。さらなる実施形態において、ヒト化軽鎖可変領域は少なくとも1つの結合フレームワーク領域残基を含む。他のさらなる実施形態において、ヒト化重鎖可変領域は少なくとも1つの結合フレームワーク領域残基を含む。

【0030】

随意に、軽鎖可変領域は、配列番号18、配列番号20、または配列番号22の配列を含む。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号18の配列を含む。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号20の配列を含む。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号22の配列を含む。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号18の配列である。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号20

10

20

30

40

50

の配列である。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号 22 の配列である。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 24、配列番号 26、または配列番号 28 の配列を含む。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 24 の配列を含む。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 26 の配列を含む。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 28 の配列を含む。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 24 の配列である。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 26 の配列である。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 28 の配列である。したがって、別の態様において、ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域を含むヒト化 B A F F - R 抗体が提供され、そこで、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号 18 の配列を含み、重鎖可変領域は配列番号 24 の配列を含む。別の態様において、ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域を含むヒト化 B A F F - R 抗体が提供され、そこで、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号 20 の配列を含み、重鎖可変領域は配列番号 26 の配列を含む。別の態様において、ヒト化軽鎖可変領域及びヒト化重鎖可変領域を含むヒト化 B A F F - R 抗体が提供され、そこで、ヒト化軽鎖可変領域は配列番号 22 の配列を含み、重鎖可変領域は配列番号 28 の配列を含む。

10

【0031】

随意に、抗体はキメラ抗体である。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号 14 の配列を含む。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 16 の配列を含む。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号 14 の配列である。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 16 の配列である。したがって、別の態様において、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含むキメラ B A F F - R 抗体が提供され、そこで、軽鎖可変領域は配列番号 14 の配列を含み、重鎖可変領域は配列番号 16 の配列を含む。

20

【0032】

随意に、軽鎖可変領域は、配列番号 30 の配列を含む。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 32 の配列を含む。随意に、軽鎖可変領域は、配列番号 30 の配列である。随意に、重鎖可変領域は、配列番号 32 の配列である。したがって、別の態様において、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含むキメラ B A F F - R 抗体が提供され、そこで、軽鎖可変領域は配列番号 30 の配列を含み、重鎖可変領域は配列番号 32 の配列を含む。

【0033】

抗体が本明細書において列挙される各々の事例において、機能的断片は使用され得る。したがって、例えば、重鎖（例えば定常領域及び可変領域を含む）及び軽鎖（例えば定常領域及び可変領域を含む）を含み得る、F a b ' 断片が提供される。随意に、F a b ' 断片は、ヒト化重鎖（例えば定常領域及び可変領域を含む）及びヒト化軽鎖（例えば、定常領域及び可変領域を含む）を含む。

30

【0034】

随意に、B A F F - R 抗体またはその断片はヒト定常領域を含む。随意に、B A F F - R 抗体またはその断片は I g G である。随意に、B A F F - R 抗体またはその断片は I g G 1 である。随意に、B A F F - R 抗体またはその断片は I g G 2 である。随意に、B A F F - R 抗体またはその断片は I g G 3 である。随意に、B A F F - R 抗体またはその断片は I g G 4 である。随意に、B A F F - R 抗体またはその断片は I g A である。随意に、B A F F - R 抗体またはその断片は I g M である。

【0035】

随意に、B A F F - R 抗体またはその断片は一本鎖抗体である。一本鎖抗体は可変軽鎖及び可変重鎖を含む。当業者は、免疫グロブリン抗体（それは 2 つの同一ペアのポリペプチド鎖を含み、各々のペアは 1 つの軽鎖及び 1 つの重鎖を有する）とは対照的に、一本鎖抗体が単一軽鎖及び単一重鎖を含むことを、直ちに認識するだろう。そして各々の軽鎖及び重鎖は、2 つの領域：標的抗原の結合に関与する可変（「V」）領域（すなわち可変軽鎖及び可変重鎖）、及び免疫系の他の構成要素と相互作用する定常（「C」）領域からなる。一本鎖抗体中の可変軽鎖及び可変重鎖は、リンカーペプチドを介して連結され得る。一本鎖抗体のリンカーペプチドについての例は、Bird, R. E., et al., Science, 242 (4877): 423-6 (1988) 中で記載される。s c F v 抗体を作製する方法が記載されている。Huse et al., Science 246:

40

50

1 2 7 5 - 1 2 8 1 (1 9 8 9) ; W a r d e t a l . , N a t u r e 3 4 1 : 5 4 4 - 5 4 6 (1 9 8 9) ; 及び V a u g h a n e t a l . , N a t u r e B i o t e c h . 1 4 : 3 0 9 - 3 1 4 (1 9 9 6) を参照されたい。簡潔には、免疫付与された動物からの B 細胞からの mRNA を単離し、cDNA を調製する。免疫グロブリンの重鎖及び軽鎖の可変領域についての特異的プライマーを使用して、cDNA を増幅する。PCR 産物を精製し、核酸配列を連結する。リンカーペプチドが所望されるならば、ペプチドをコードする核酸配列を重鎖核酸配列と軽鎖核酸配列との間に挿入する。scFv をコードする核酸はベクターの中へ挿入され、適切な宿主細胞中で発現される。

【 0 0 3 6 】

抗体またはその機能的断片が特異的エピトープ（例えば B A F F - R ）と結合する能力は、平衡解離定数（ K_D ）によって記載され得る。本明細書において定義されるような平衡解離定数（ K_D ）は、B A F F - R タンパク質への B A F F - R 抗体の解離速度（K - オフ）及び会合速度（K - オン）の比である。それは以下の式： $K_D = K - \text{オフ} / K - \text{オン}$ 、によって記載される。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 5 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 4 . 5 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 4 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 3 . 5 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 3 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 2 . 5 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 2 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 1 . 5 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 1 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体は、B A F F - R タンパク質を、約 0 . 5 nM よりも低い平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。

【 0 0 3 7 】

随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 0 . 5 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 1 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 1 . 5 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 2 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 2 . 5 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 3 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 3 . 5 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 4 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 4 . 5 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 5 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、B A F F - R タンパク質を、約 0 . 5、1、1 . 5、2、2 . 5、3、3 . 5、4、4 . 5 または 5 nM の平衡解離定数（ K_D ）により結合することが可能である。

【 0 0 3 8 】

随意に、B A F F - R を約 4 n M よりも低い K_D により結合することが可能である提供されるヒト化 B 細胞活性化因子受容体 (B A F F - R) 抗体が、提供される。随意に、B A F F - R を約 4 n M よりも低い K_D で結合するヒト化 B 細胞活性化因子受容体 (B A F F - R) 抗体が、提供される。随意に、抗体は B A F F - R 活性を誘導しない。

【 0 0 3 9 】

随意に、B A F F - R 抗体は B A F F - R タンパク質へ結合される。随意に、B A F F - R タンパク質はヒト B A F F - R タンパク質である。随意に、B A F F - R タンパク質は、N C B I 遺伝子識別番号 1 1 5 6 5 0 によって同定される核酸配列によってコードされる。随意に、B A F F - R タンパク質は細胞の一部を形成する。随意に、B A F F - R タンパク質は前記細胞の表面上に発現される。随意に、細胞はリンパ球様細胞である。随意に、細胞は B 細胞である。随意に、細胞はがん細胞である。随意に、がん細胞はリンパ腫細胞である。

10

【 0 0 4 0 】

様々な診断用部分及び治療用部分ならびにその組み合わせは、本明細書において提供される B A F F - R 抗体またはその機能的断片 (その実施形態を含む) ヘコンジュゲートされ得、それによって、高度に安定的及び / もしくは多用性のある薬物送達ならびに / または診断組成物を提供する。随意に、B A F F - R 抗体またはその機能的断片は治療用部分または診断用部分を含む。随意に、治療用部分または診断用部分は、化学的リンカーを介して B A F F - R 抗体またはその機能的断片へ結合される。随意に、化学的リンカーは共有結合リンカーまたは非共有結合リンカーである。抗体への治療用部分のコンジュゲートのための技法は周知である (例えば Arnon et al., Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy (Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Reisfeld et al. (編) 中のページ 2 4 3 - 5 6 (Alan R. Liss, Inc. 1985)); Hellstrom et al., Antibodies For Drug Delivery in Controlled Drug Delivery (第 2 版), Robinson et al. (編), ページ 6 2 3 - 5 3 (Marcel Dekker, Inc. 1987)); Thorpe, Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review in Monoclonal Antibodies ' 8 4 : Biological And Clinical Applications, Pinchera et al. (編), ページ 4 7 5 - 5 0 6 (1985)); 及び Thorpe et al., The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody - Toxin Conjugates, Immunol. Rev., 6 2 : 1 1 9 - 5 8 (1982) を参照)。本明細書において使用される時、抗体医薬コンジュゲートまたは ADC という用語は、抗体またはその機能的断片ヘコンジュゲートされた治療用部分、またはそうでなければ共有結合された治療用部分を指す。

20

30

【 0 0 4 1 】

本明細書において提供されるような治療用部分という用語は、その平易な通常の意味に従って使用され、それを必要とする対象へ与えられた場合に治療利益 (例えば治療されている根底にある障害の予防、根絶、改善) を有する一価化合物を指す。本明細書において提供されるような治療用部分としては、ペプチド、タンパク質、核酸、核酸類似体、小分子、抗体、酵素、プロドラッグ、細胞毒性剤 (例えば毒素) が限定されずに挙げられ、これらには、リシン、ドキソルビシン、ダウノルビシン、タキソール、臭化エチジウム、マイトマイシン、エトポシド、テノポシド (tenoposide)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、コルヒチン、ジヒドロキシアントラシンジオン (dihydroxy anthracin dione)、アクチノマイシン D、ジフテリア毒素、緑膿菌外毒素 (PE) A、PE 4 0、アブリン、及びグルココルチコイドが含まれるがこれらに限定され

40

50

ない。随意に、治療用部分は、本明細書において記載されるような抗がん剤または化学療法剤である。随意に、治療用部分は、核酸部分、ペプチド部分または小分子薬物部分である。随意に、治療用部分は核酸部分である。随意に、治療用部分は抗体部分である。随意に、治療用部分はペプチド部分である。随意に、治療用部分は小分子薬物部分である。随意に、治療用部分はヌクレアーゼである。随意に、治療用部分は免疫促進物質である。随意に、治療用部分は毒素である。随意に、治療用部分はヌクレアーゼである。

【0042】

本明細書において提供される B A F F - R 抗体またはその機能的断片（その実施形態を含む）をコードする単離された核酸が、提供される。単離された核酸によってコードされる B A F F - R 抗体またはその機能的断片は、本出願（上の記載及び実施例切片を含む）を通して詳細に記載される。例えば、核酸は、少なくとも1つの C D R、エピトープの結合に關与する特異的残基、または結合フレームワーク残基をコードし得る。例えば、核酸は、配列番号1の配列を含む軽鎖をコードし得る。

10

【0043】

随意に、単離された核酸は、配列番号13、配列番号15、配列番号29、または配列番号31の配列を含む。随意に、単離された核酸は、配列番号13の配列及び配列番号15の配列を含む。随意に、単離された核酸は、配列番号29の配列及び配列番号31の配列を含む。

【0044】

随意に、単離された核酸は、配列番号17、配列番号19、配列番号21、配列番号23、配列番号25、または配列番号27の配列を含む。随意に、単離された核酸は、配列番号17の配列及び配列番号23の配列を含む。随意に、単離された核酸は、配列番号19の配列及び配列番号25の配列を含む。随意に、単離された核酸は、配列番号21の配列及び配列番号27の配列を含む。

20

【0045】

治療有効量の本明細書において提供される B A F F - R 抗体またはその機能的断片及び薬学的に許容される賦形剤を含む医薬組成物が提供される。

【0046】

本明細書において提供されるような治療有効量は、その意図された目的を達成するのに有効な量を指す。特定の適用のために有効な実際の量は、とりわけ治療されている病態に依存するだろう。疾患を治療する方法において投与される場合に、本明細書において記載される医薬組成物は、所望される結果（例えば標的分子（例えば B A F F - R ）の活性を修飾すること、及び／または、疾患症状（例えばがん、自己免疫疾患）の進行を低減、消失もしくは減速すること）を達成するのに有効な活性のあるヒト化抗体の量を含有するだろう。本明細書において提供される B A F F - R 抗体の治療有効量の決定は、特に本明細書における詳細な開示に照らして、当業者の能力内で十分に行われる。

30

【0047】

許容される担体、賦形剤または安定化物質は用いられる投薬量及び濃度でレシピエントへ非毒性であり、典型的には、5.0～8.0（随意に6.0～7.0）の pH でバッファー（リン酸塩、クエン酸塩または酢酸塩等）；等張にするための塩（塩化ナトリウム、塩化カリウム、及び同種のもの等）；抗酸化物質；防腐物質；低分子量ポリペプチド；タンパク質；親水性ポリマー（ポリソルベート80等）；アミノ酸（グリシン等）；炭水化物；キレート剤；糖；及び当業者に公知の他の標準的な成分（Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版、Lloyd V. Allen et al. 編、Pharmaceutical Press（2012））を含む。mAb は、0.1～100 mg/ml（例えば1～10 mg/ml または10～50 mg/ml、例えば5、10、20、30、40、50または60 mg/ml）の濃度で存在し得る。

40

【0048】

抗体（例えばヒト化抗体）または本明細書において記載されるようなその機能的断片を含

50

む、医薬組成物は、当技術分野において公知の多様な方法によって投与され得る。経路及び/または投与モードは、所望される結果に依存して変動する。随意に、投与は、静脈内、筋肉内、腹腔内もしくは皮下であるか、または標的の部位に近位に投与される。薬学的に許容される賦形剤は、静脈内、筋肉内、皮下、非経口、脊柱、表皮の投与（例えば注射または点滴によって）に好適であり得る。

【0049】

抗体またはその機能的断片の医薬組成物は、周知のルーチンに当技術分野において実践された方法に従って調製され得る。例えば Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版、Lloyd V. Allen et al. 編、Pharmaceutical Press (2012); 及び Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J. R. Robinson 編、Marcel Dekker, Inc., New York、1978を参照されたい。医薬組成物は、好ましくはGMP条件下で製造される。典型的には、治療有効用量または有効用量のヒト化抗体は、医薬組成物中で用いられる。提供されるヒト化抗体は、当業者に公知の従来の方法によって薬学的に許容される投薬形態へと製剤化され得る。投薬量レジメンは、至適の所望の応答（例えば治療応答）を提供するように調整される。例えば、単一ボースは投与され得るか、複数の分割用量は経時的に投与され得るか、または、用量は治療状況の要件によって指摘されるように比例して低減もしくは増加され得る。他の治療法または薬剤と組み合わせでヒト化抗体を製剤化することは有利であり得る。投与の容易性及び投薬量の均一性のために、非経口組成物を投薬量単位形態で製剤化することは有利であり得る。投薬量単位形態は、本明細書において使用される時、治療される対象のための一体型投薬量として適した物理的に分離した単位を指し；各々の単位は、要求される医薬賦形剤と共同して、所望される治療上の効果を産生することが意図される既定の量のヒト化抗体を含有する。

【0050】

医薬組成物中の実際の投薬量レベルの活性成分は、患者への毒性無しに、特定の患者、組成物及び投与モードについて所望の治療応答を達成するのに有効な活性成分の量を得るように、変動され得る。選択される投薬レベルは、様々な薬物動態因子に依存し、それらには、用いられる特定の組成物の活性、投与経路、投与の時間、用いられる特定の抗体の排泄の率、治療の継続期間、用いられる特定の組成物と組み合わせで使用される他の薬物、化合物及び/または材料、治療される患者の年齢、性別、体重、病態、全体的な健康及び従来の病歴、ならびに同種の因子が含まれる。

【0051】

医師または獣医師は、医薬組成物中で用いられる抗体またはその機能断片の用量を、所望される治療効果の達成に要求されるものよりも低いレベルで開始し、所望される効果が達成されるまで徐々に投薬量を増加させることができる。一般に、組成物の有効用量は、異なる因子（治療される具体的な疾患または病態、投与の手段、標的部位、患者の生理的状态、患者がヒトまたは動物であるか、投与される他の医薬物、及び処置が予防または治療であるか、が挙げられる）に依存して、変動し得る。治療投薬量は、安全性及び有効性を至適化するように力価測定する必要がある。抗体による投与のために、投薬量は、宿主体重について約0.0001~100mg/kg（通常は0.01~5mg/kg）の範囲である。例えば、投薬量は、1mg/kgの体重もしくは10mg/kgの体重であり得るか、または1~10mg/kgの範囲内であり得る。例示的な治療レジームは、2もしくは3週間ごとに1回、または月に1回、または3~6か月ごとに1回の投与を伴う。

【0052】

本明細書において提供されるBAFF-R抗体またはその機能的断片は、複数の機会に投与され得る。単一投薬量の間の間隔は、週1回、月1回または年1回であり得る。間隔は、患者中のヒト化抗体の血中レベルを測定することによって指摘されるように、不規則でもあり得る。いくつかの方法において、投薬量は、1~1000µg/ml、及びいくつかの方法において、25~300µg/mlの血漿抗体濃度を達成するように調整される

。あるいは、抗体は持続放出製剤として投与され得、その場合には、よりそれほど頻繁でない投与が要求される。投薬量及び頻度は患者中での抗体の半減期に依存して変動する。一般に、ヒト化抗体は、キメラ抗体及び非ヒト抗体よりも長い半減期を示す。投与の投薬量及び頻度は、処置が予防または治療であるかどうかによって依存して変動し得る。予防上の適用において、比較的低い投薬量が、比較的頻繁でない間隔で長い期間にわたって投与される。ある患者は、人生の残りの間治療を受け続ける。治療上の適用において、疾患の進行が低減または終了するまで、及び好ましくは患者が疾患の症状の部分的または完全な改善を示すまで、時には比較的高い投薬量が比較的短い間隔で要求される。その後は、患者は予防レジームを投与され得る。

【 0 0 5 3 】

ヒト B A F F - R タンパク質またはその断片を発現するマウス線維芽細胞が提供され、ヒト B A F F - R タンパク質またはその断片は細胞の細胞表面上で発現される。随意に、ヒト B A F F - R タンパク質またはその断片は検出可能な部分を含む。随意に、検出可能な部分は蛍光部分である。随意に、検出可能な部分は増強緑色蛍光タンパク質 (e G F P) である。

【 0 0 5 4 】

それを必要とする対象においてがんを治療する方法が提供される。方法は、治療有効量の本明細書において提供されるキメラ抗原受容体を対象へ投与し、それによって対象におけるがんを治療することを含む。

【 0 0 5 5 】

別の態様において、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法は、治療有効量の本明細書において提供される抗体またはその機能的断片を対象へ投与し、それによって対象におけるがんを治療することを含んで提供される。随意に、がんは、リンパ腫、白血病、または骨髓腫である。随意に、がんはリンパ腫である。随意に、リンパ腫は、マンツル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、またはバーキットリンパ腫である。随意に、リンパ腫はマンツル細胞リンパ腫である。随意に、リンパ腫は濾胞性リンパ腫である。随意に、リンパ腫はびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫である。随意に、リンパ腫は辺縁帯リンパ腫である。随意に、リンパ腫はバーキットリンパ腫である。

【 0 0 5 6 】

随意に、がんは白血病である。随意に、白血病は、リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、または有毛細胞白血病である。随意に、白血病はリンパ芽球性白血病である。随意に、白血病は慢性リンパ球性白血病である。随意に、白血病は有毛細胞白血病である。

【 0 0 5 7 】

随意に、がんは骨髓腫である。随意に、骨髓腫は多発性骨髓腫である。

【 0 0 5 8 】

随意に、方法は、第 2 の治療剤を対象へ投与することをさらに含む。随意に、治療剤は、C D 2 0 抗原と結合することが可能なキメラモノクローナル抗体である。随意に、治療剤はリツキシマブである。「リツキシマブ」という用語は、A T C コード L 0 1 X C 0 2 によって同定される、タンパク質 C D 2 0 に対するモノクローナル抗体を、通常の意味で指す。

【 0 0 5 9 】

それを必要とする対象における自己免疫疾患を治療する方法も提供される。方法は、治療有効量の対象を本明細書において提供されるような抗体またはその機能的断片を投与し、それによって対象における自己免疫疾患を治療することを含む。随意に、自己免疫疾患は、関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、または自己免疫性溶血性貧血である。随意に、自己免疫疾患は関節リウマチである。随意に、自己免疫疾患は全身性紅斑性狼瘡である。随意に、自己免疫疾患は多発性硬化症である。随意に、自己免疫疾患は糸球体腎炎である。随意に、自己免疫疾患はシェーグレン症候群である。随意に、自己免疫疾患は自己免疫性溶血性貧血である。随意に、方法は、第

10

20

30

40

50

2 の治療剤を対象へ投与することをさらに含む。

【 0 0 6 0 】

別の態様において、細胞の分裂増殖を阻害する方法が提供される。方法は、本明細書において提供されるような B A F F - R 抗体またはその機能的断片（その実施形態を含む）と細胞を接触させ、それによって接触させられた細胞を形成することを含む。B A F F - R 抗体またはその機能的断片が、接触させた細胞上の B A F F - R タンパク質と結合するようにし、それによって細胞の分裂増殖を阻害する。随意に、細胞はリンパ球様細胞である。随意に、細胞は B 細胞である。随意に、細胞はがん細胞である。随意に、細胞はリンパ腫細胞である。

【 0 0 6 1 】

別の態様において、抗ヒト B A F F - R 抗体を産生する方法が提供される。方法は、本明細書において提供されるようなマウス線維芽細胞をマウスへ投与し、それによって免疫付与された B A F F - R マウスを形成することを含む。免疫付与された B A F F - R マウスからの脾細胞はヒトミエローム細胞と融合され、それによって B A F F - R ハイブリドーマ細胞を形成する。次いで B A F F - R ハイブリドーマ細胞が、B A F F - R 抗体を発現するようにし、それによって抗 B A F F - R 抗体を産生する。随意に、抗 B A F F - R 抗体は、本明細書において提供されるような抗体である。

【 0 0 6 2 】

キメラ抗原受容体（C A R）（本明細書において提供される抗体またはその機能的断片を含む）に加えて、B A F F - R C A R を作製及び使用する方法も本明細書において提供される。実施例において以下でより詳細に記載されるように、B A F F - R C A R - T 細胞は、インビトロで抗原（B A F F - R）発現腫瘍細胞へ良好に応答する。B A F F - R C A R - T 細胞療法は強力なインビボの抗腫瘍効果を誘導し、それは確立された腫瘍の根絶によって明らかである。ナイーブ T 細胞集団から調製される C A R - T 細胞は、至適の抗腫瘍効果及び治療持続性を実証した。抗腫瘍効果は、C D 4 及び C D 8 C A R - T 細胞の協調的な活性により達成される。さらに、B A F F - R C A R - T 細胞療法は、C D 1 9 C A R - T 細胞療法の耐性モデルにおける抗腫瘍効果を実証した。

【 0 0 6 3 】

本明細書において記載される B A F F - R C A R 中に存在する B A F F - R s c F v 配列は、2つのモノクローナル抗体（全体にわたってより詳しく記載されるクローン 9 0 及びクローン 5 5）に由来する。2つのモノクローナル抗体は以下の C D R 配列を有する。

C 9 0 C D R L 1 : E S V D N Y G I S F（配列番号 1）

C 9 0 C D R L 2 : A A S（配列番号 2）

C 9 0 C D R L 3 : Q Q S K E V P W T（配列番号 3）

C 9 0 C D R H 1 : G D S I T S G Y（配列番号 4）

C 9 0 C D R H 2 : I S Y S G S T（配列番号 5）

C 9 0 C D R H 3 : A S P N Y P F Y A M D Y（配列番号 6）

C 5 5 C D R L 1 : Q D I S N Y（配列番号 7）

C 5 5 C D R L 2 : Y T S（配列番号 8）

C 5 5 C D R L 3 : F S E L P W T（配列番号 9）

C 5 5 C D R H 1 : G F S L S T S G M G（配列番号 1 0）

C 5 5 C D R H 2 : I W W D D D K（配列番号 1 1）

C 5 5 C D R H 3 : A R S F G Y G L D Y（配列番号 1 2）

【 0 0 6 4 】

B A F F - R C A R の s c F v 部分における使用のために好適な重鎖可変ドメインの中には、モノクローナル抗体クローン 9 0（全体にわたって記載される）に由来する、以下の重鎖可変ドメインがある。これらのうちで、H u 9 0 H C - 1、H C - 2 及び H C - 3 はヒト化されている。

【 0 0 6 5 】

C h i 9 0 H c :

MYRMQLLSLCIALSLALVTNSEVQLQESGPSLVKPSQTLSSL
TCSVTGDSITSGYWNWIRKFPGNKLEYMGYISYSGSTYYN
PSLKSRISITRDTSKNQYYLQLNSVTPEDTATYYCASP
NYPFYAMDYWGQGTSVTVSSDI (配列番号16)

【0066】

Hu90 HC - 1 :

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGQVQLQESGPGLVKPSQ
TLSSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHHPGKGLEYIGYISYSGS
TYYNPSLKSRVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA
SPNYPFYAMDYWGQGTSLVTVSS (配列番号24)

10

【0067】

Hu90 HC - 2 :

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLQESGPGLVKPSQ
TLSSLTCTVSGDSITSGYWNWIRQHHPGKGLEYIGYISYSGS
TYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLKLSSVTAADTAVYYCA
SPNYPFYAMDYWGQGTSLVTVSS (配列番号26)

【0068】

Hu90 HC - 3 :

MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGEVQLQESGPGLVKPS
E TLSSLTCSVSGDSITSGYWNWIRQPPGKGLEYIGYISYSGS
TYYNPSLKSRVTISRDTSKNQYSLRLSSVTAADTALYYCA
SPNYPFYAMDYWGQGTRVTVSS (配列番号28)

20

【0069】

BAFF - R CARのscFv部分における使用のために好適な軽鎖可変ドメインの中
には、モノクローナル抗体クローン90 (全体にわたって記載される) に由来する、以下の
軽鎖可変ドメインがある。これらのうちで、Hu90 LC - 1、LC - 2 及びLC -
3はヒト化されている。

【0070】

Chi90 LC :

MYRMQLLSLCIALSLALVTNSDIVLTQSPASLAVSLGQRAT
ISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS
GVPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQSKEVPW
TFGGGGTKLEIKTMEIKR (配列番号14)

30

【0071】

HuC90 LC - 1 :

METDTLLLWVLLLWVPGSTGEIVLTQSPATLSLSPGERAT
LSCRASESVDNYGISFLNWFQQKPGQAPRLLIYAASN
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQSKEVPW
TFGGGGTKVEIKRTV (配列番号18)

【0072】

40

Hu90 LC - 2 :

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPATLSLSPGERAT
LSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQAPRLLIYAASN
RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQSKEVPW
TFGGGGTKVEIKRTV (配列番号20)

【0073】

HuC90 LC - 3 :

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVMTQSPSSLSASVGD
RVTITCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGKAPKLLIYA
ASNLGSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSSLQPEDFA
TYYCQQSKEVPW

50

T F G Q G T K V E I K R T V (配列番号 2 2)

【 0 0 7 4 】

B A F F - R C A R の s c F v 部分における使用のために好適な重鎖可変ドメインの中には、モノクローナル抗体クローン 5 5 (全体にわたって記載される) に由来する、以下の重鎖可変ドメインがある。これらのうちで、H u 5 5 H C - 1、H C - 2 及び H C - 3 はヒト化されている。

【 0 0 7 5 】

C h i 5 5 H c :

M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S Q V T L K E S G P G I L K P S Q T L S L
T C S F S G F S L S T S G M G V G W I R Q P S G K G L E W L A H I W W D D D K Y
Y N S S L K S H L T I S K D T S R N Q V F L K I T S V D T A D T A T Y Y C A R S
F G Y G L D Y W G Q G T T L T V S S A S (配列番号 2 3)

10

【 0 0 7 6 】

H u 5 5 H C - 1 :

M D P K G S L S W R I L L F L S L A F E L S Y G Q V T L K E S G P T L V K P T Q
T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R Q P P G K A L E W L A H I W W D
D D K Y Y N P S L K S R L T I T K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y
C A R S F G Y G L D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 3 3)

【 0 0 7 7 】

H u 5 5 H C - 2 :

M D P K G S L S W R I L L F L S L A F E L S Y G Q V T L K E S G P T L V K P T Q
T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R Q P P G K A L E W L A H I W W D
D D K Y Y N S S L K S R L T I T K D T S K N Q V V L T M T N M D P V D T A T Y Y
C A R S F G Y G L D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 3 4)

20

【 0 0 7 8 】

H u 5 5 H C - 3 :

M D P K G S L S W R I L L F L S L A F E L S Y G Q V T L K E S G P A L V K P T Q
T L T L T C T F S G F S L S T S G M G V G W I R Q P P G K A L E W L A H I W W D
D D K Y Y N T S L K S R L T I T K D T S K N Q V V L K M T N M D P V D T A T Y Y
C A R S F G Y G L D Y W G Q G T L V T V S S (配列番号 3 5)

30

【 0 0 7 9 】

B A F F - R C A R の s c F v 部分における使用のために好適な軽鎖可変ドメインの中には、モノクローナル抗体クローン 5 5 (全体にわたって記載される) に由来する、以下の軽鎖可変ドメインがある。これらのうちで、H u 5 5 L C - 1、L C - 2 及び L C - 3 はヒト化されている。

【 0 0 8 0 】

C h i 5 5 L C :

M Y R M Q L L S C I A L S L A L V T N S D I Q M T Q T T S S L S A S L G D R V T
I S C S A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P D G T V K L L I Y Y T S S L H S G V P S
R F S G S G S G T D Y S L T I S S L E P E D I A T Y Y C H Q F S E L P W T F G G
G T K L E I K R T (配列番号 3 0)

40

【 0 0 8 1 】

H u 5 5 L C - 1 :

M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T
I T C Q A S Q D I S N Y L N W Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y T S S L H T G V P S
R F S G S G S G T D Y T F T I S S L Q P E D I A T Y Y C H Q F S E L P W T F G G
G T K V E I K R T V (配列番号 3 6)

【 0 0 8 2 】

H u 5 5 L C - 2 :

M E T D T L L L W V L L L W V P G S T G D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T

50

ITCSASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSSSLHTGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDIATYYCHQFSELPWTFGG
GTKVEIKRTV (配列番号37)

【0083】

Hu55 LC-3:

METDTLLWLWVLLWVPGSTGDIQMTQSPSSLSASVGDRT
ITCQASQDISNYLNWYQQKPGKTPKLLIYYTSSSLHTGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISSSLQPEDIATYYCHQFSELPWTFGG
GTKVEIKRTV (配列番号38)

【0084】

本明細書において記載されるCARは、CARのscFv部分中の1、2、3、4または5のアミノ酸の置換によって修飾され得る一方で、依然としてBAFF-Rについての特異性を保持する。したがって、CARのscFv部分中の、各々のHu90 LC-1、Hu90 LC-2、Hu90 LC-3、Hu90 HC-1、Hu90 HC-2及びHu90 HC-3、Hu55 LC-1、Hu55 LC-2、Hu55 LC-3、Hu55 HC-1、Hu55 HC-2及びHu90 HC-3は、1、2、3、4または5のアミノ酸置換を含み得る。随意に、置換はCDRではなくフレームワーク領域(FR)に制限される。随意に、置換は保存的置換である。

【0085】

CDR及びFRの位置はKabatナンバリングシステムによって定義され得る(Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版、U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991))。同様に、抗体の軽鎖または重鎖内の個別の残基によって占められる位置は、Kabatナンバリングシステムによって定義され得る。したがって、ヒト化抗体のヒト化軽鎖及びヒト化重鎖内での結合のために要求される残基の所在位置は、当該技術分野において周知であるように、Kabatナンバリングシステムに従った残基の位置によって定義され得る。本明細書において記載されるように、ヒト化抗体は、ドナー抗体(例えばマウス)からのCDR及びヒト抗体からの可変領域フレームワーク(FR)を有する抗体であり得る。フレームワーク領域(FR)は、ヒト化抗体中で正しい場所にCDRを保持するとされる。アミノ末端から進行して、これらの領域は、軽鎖についてFR L1、FR L2、FR L3及びFR L4ならびに重鎖についてFR H1、FR H2、FR H3及びFR H4と、それぞれ表記される。

【0086】

したがって、CARのscFv部分は、本明細書において記載されるBAFF-R標的化scFv配列のうちの任意のものから構成され得る。scFvに加えて、細胞外ドメインは、例えばヒトFcドメインの部分を含むスペーサーを含み得る。膜貫通ドメインとしては、CD4膜貫通ドメイン、CD8膜貫通ドメイン、CD28膜貫通ドメイン、CD3膜貫通ドメイン、または4-1BB膜貫通ドメインが挙げられ得る。細胞内シグナル伝達ドメインとしては、ヒトCD3複合体の鎖(CD3)からのシグナル伝達ドメイン及び1つまたは複数の共刺激ドメイン(例えば4-1BBの共刺激ドメイン)が挙げられる。CARは、T細胞の表面上で発現された場合に、細胞外ドメインによってBAFF-R(マントル細胞リンパ腫細胞の表面上で発現される受容体)を発現する細胞、及び特定の他の腫瘍細胞へT細胞活性を向けることができる。T細胞は、共刺激ドメイン(細胞内領域中のCD3と直列の4-1BB(CD137)共刺激ドメイン等)の包含によって、共刺激シグナルを受け取ることができる。T細胞(例えば患者特異的自己由来T細胞)は本明細書において記載されるCARを発現するように操作され、操作された細胞は増やされ、抗体について概して本明細書において記載されるように、様々なB細胞リンパ腫及び自己免疫障害の治療のための治療法において使用され得る。様々なT細胞サブセットは使用され得る。加えて、CARは、他の免疫細胞(NK細胞等)中で発現され得る。患者が本

10

20

30

40

50

明細書において記載されるC A Rを発現する免疫細胞により治療される場合に、細胞は、自己由来T細胞または同種異系T細胞であり得る。随意に、使用される細胞は、C D 4 + ナイーブT細胞 (C D 4 + T N) 及びC D 8 + セントラルメモリーT細胞 (C D 8 + T C M) の混合物である。随意に、使用される細胞は、C D 4 + ナイーブT細胞 (C D 4 + T N) 及びC D 8 + ナイーブT細胞 (C D 8 + T N) の混合物である。

【0087】

B A F F - R s c F vまたは1 ~ 5 (例えば1または2) のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション; C D 4 膜貫通ドメインもしくは1 ~ 5 (例えば1または2) のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、C D 8 膜貫通ドメインもしくは1 ~ 5 (例えば1または2) のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、C D 2 8 膜貫通ドメインもしくは1 ~ 5 (例えば1または2) のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、またはC D 3 膜貫通ドメインもしくは1 ~ 5 (例えば1または2) のアミノ酸修飾を有するそのバリエーションから選択される、膜貫通ドメイン; 共刺激ドメイン; 及びC D 3 シグナル伝達ドメインまたは1 ~ 5 (例えば1または2) のアミノ酸修飾を有するそのバリエーションを含む、C A Rも記載される。

10

【0088】

随意に、B A F F - R 標的化C A Rのs c F v部分は軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、そこで、軽鎖可変領域は、配列番号1中で明記される通りのC D R L 1、配列番号2中で明記される通りのC D R L 2、及び配列番号3中で明記される通りのC D R L 3を含み; 重鎖可変領域は、配列番号4中で明記される通りのC D R H 1、配列番号5中で明記される通りのC D R H 2、及び配列番号6中で明記される通りのC D R H 3を含む。

20

【0089】

随意に、B A F F - R 標的化C A Rのs c F v部分は軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、そこで、軽鎖可変領域は、配列番号7中で明記される通りのC D R L 1、配列番号8中で明記される通りのC D R L 2、及び配列番号9中で明記される通りのC D R L 3を含み; 重鎖可変領域は、配列番号10中で明記される通りのC D R H 1、配列番号11中で明記される通りのC D R H 2、及び配列番号12中で明記される通りのC D R H 3を含む。随意に、抗体はヒト化抗体である。

【0090】

随意に、B A F F - R 標的化C A Rのs c F v部分は、配列番号1または7のC D R L 1、配列番号2または8のC D R L 2、配列番号3または9のC D R L 3、配列番号4または10のC D R H 1、配列番号5または11のC D R H 2、及び配列番号6または12のC D R H 3を含む。

30

【0091】

随意に、B A F F - R 標的化C A Rのs c F v部分は、モノクローナル抗体H 9 0の軽鎖可変ドメイン及びモノクローナル抗体H 9 0の重鎖可変ドメインまたはモノクローナル抗体H 5 5の軽鎖可変ドメイン及びモノクローナル抗体H 5 5の重鎖可変ドメインを含む。重鎖及び軽鎖可変ドメインは、5 ~ 100、10 ~ 50または10 ~ 20のアミノ酸のリンカー (例えばG G G G S G G G G S G G G G S (配列番号45)) によって連結され得る。

40

【0092】

随意に、B A F F - R 標的化C A Rのs c F v部分は、a) モノクローナル抗体H 9 0の軽鎖可変ドメインのヒト化バリエーション及びモノクローナル抗体H 9 0の重鎖可変ドメインのヒト化バリエーション; またはb) モノクローナル抗体H 5 5の軽鎖可変ドメインのヒト化バリエーション及びモノクローナル抗体H 5 5の重鎖可変ドメインのヒト化バリエーションを含む。重鎖及び軽鎖可変ドメインは、10 ~ 20のアミノ酸のリンカー (例えばG G G G S G G G G S G G G G S (配列番号45)) によって連結され得る。随意に、H 9 0軽鎖可変ドメインのヒト化バリエーションは、H u 9 0 L C - 1、H u 9 0 L C - 2及びH u 9 0 L C - 3から選択され、H 9 0重鎖可変ドメインのヒト化バリエーションは、H u 9 0 H C

50

- 1、Hu90 HC - 2 及び Hu90 HC - 3 から選択される。随意に、H55 軽鎖可変ドメインのヒト化バリエーションは、Hu55 LC - 1、Hu55 LC - 2 及び Hu55 LC - 3 から選択され、H55 重鎖可変ドメインのヒト化バリエーションは、Hu55 HC - 1、Hu55 HC - 2 及び Hu90 HC - 3 から選択される。

【0093】

随意に、scFv の軽鎖可変ドメイン部分及び重鎖可変ドメイン部分は各々、1、2、3、4 または 5 の単一アミノ酸置換を有する。したがって、CAR の scFv 部分中の、各々の Hu90 LC - 1、Hu90 LC - 2、Hu90 LC - 3、Hu90 HC - 1、Hu90 HC - 2 及び Hu90 HC - 3、Hu55 LC - 1、Hu55 LC - 2、Hu55 LC - 3、Hu55 HC - 1、Hu55 HC - 2 及び Hu90 HC - 3 は、1、2、3、4 または 5 の単一アミノ酸置換を含み得る。随意に、置換はフレームワーク領域に制限される。いくつかの事例において、置換は保存的置換である。

10

【0094】

本明細書において記載される CAR の scFv 部分は、エピトープ結合のために重要なフレームワーク領域内の 1 つまたは複数の残基を含み得る。エピトープ結合（例えば BAF - R 結合）に関与（または重要）であるフレームワーク領域残基は、本明細書において結合フレームワーク領域残基と称される。結合フレームワーク領域残基は、ヒト化軽鎖可変領域のフレームワーク領域（すなわち FR L1、FR L2、FR L3、FR L4）中に存在し得るか、または、それらは、ヒト化重鎖可変領域のフレームワーク（すなわち FR H1、FR H2、FR H3、FR H4）中に存在し得る。ヒト化軽鎖の FR L3 領域中に存在する結合フレームワーク残基は、FR L3 結合フレームワーク領域残基と本明細書において称される。ヒト化重鎖の FR H3 領域中に存在する結合フレームワーク領域残基は、FR H3 結合フレームワーク領域残基と本明細書において称される。

20

【0095】

随意に、scFv は少なくとも 1 つの結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は少なくとも 1 つの結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は、1 つまたは複数の FR L1、FR L2、FR L3 または FR L4 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は 1 つまたは複数の FR L1 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は 1 つまたは複数の FR L2 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は 1 つまたは複数の FR L3 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化軽鎖可変領域は 1 つまたは複数の FR L4 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は、1 つまたは複数の FR H1、FR H2、FR H3 または FR H4 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は 1 つまたは複数の FR H1 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は 1 つまたは複数の FR H2 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は 1 つまたは複数の FR H3 結合フレームワーク領域残基を含む。随意に、ヒト化重鎖可変領域は 1 つまたは複数の FR H4 結合フレームワーク領域残基を含む。

30

【0096】

随意に、ヒト化軽鎖可変領域は少なくとも 1 つの結合フレームワーク領域残基（例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 以上の残基）を含み、ヒト化重鎖可変領域は少なくとも 1 つの結合フレームワーク領域残基（例えば 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50 以上の残基）を含む。ヒト化抗体内の結合フレームワーク領域残基の位置は、上

40

50

記されるような C D R 残基の位置に類似する K a b a t ナンバリングシステムによって定義され得る。

【 0 0 9 7 】

随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 7 に対応する位置でセリンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 8 に対応する位置でプロリンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でバリンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 2 2 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 2 4 に対応する位置でグルタミンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でグリシンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 4 2 に対応する位置でリジンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 4 3 に対応する位置でアラニンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でプロリンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 5 6 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 7 2 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 7 3 に対応する位置でフェニルアラニンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 7 9 に対応する位置でグルタミンを含む。随意に、軽鎖可変領域は K a b a t 位置 1 0 4 に対応する位置でバリンを含む。

10

【 0 0 9 8 】

随意に、軽鎖可変領域は、K a b a t 位置 7 に対応する位置でセリン、K a b a t 位置 8 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 2 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 2 4 に対応する位置でグルタミンもしくはセリン、K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でグリシン、K a b a t 位置 4 2 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 4 3 に対応する位置でアラニンもしくはスレオニン、K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 5 6 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 3 に対応する位置でフェニルアラニンもしくはリジン、K a b a t 位置 7 9 に対応する位置でグルタミン、または K a b a t 位置 1 0 4 に対応する位置でバリンを含む。

20

【 0 0 9 9 】

随意に、軽鎖可変領域は、K a b a t 位置 7 に対応する位置でセリン、K a b a t 位置 8 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 2 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 2 4 に対応する位置でグルタミンもしくはセリン、K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でグリシン、K a b a t 位置 4 2 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 4 3 に対応する位置でアラニンもしくはスレオニン、K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 5 6 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 2 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 3 に対応する位置でフェニルアラニンもしくはリジン、K a b a t 位置 7 9 に対応する位置でグルタミン、または K a b a t 位置 1 0 4 に対応する位置でバリンである、結合フレームワーク領域残基を含む。

30

【 0 1 0 0 】

随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 1 0 に対応する位置でスレオニンまたはアラニンを含む。複数の実施形態において、重鎖可変領域は K a b a t 位置 1 1 に対応する位置でリジンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 1 2 に対応する位置でバリンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 1 9 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 2 3 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でプロリンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でアラニンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 6 1 に対応する位置でプロリンまたはスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 6 6 に対応する位置でアルギニンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 7 0 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 7 5 に対応する位置でリジンを含む。随意に、重鎖可変領域は K a b a t 位置 7 9 に対

40

50

応する位置でバリンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 8 1 に対応する位置でスレオニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 8 2 に対応する位置でメチオニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 8 2 B に対応する位置でアスパラギンを含む。随意に、重鎖可変領域は、K a b a t 位置 8 2 C に対応する位置でメチオニンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 8 4 に対応する位置でプロリンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 8 5 に対応する位置でバリンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 1 0 8 に対応する位置でリジンを含む。随意に、重鎖可変領域はK a b a t 位置 1 0 9 に対応する位置でバリンを含む。

【 0 1 0 1 】

随意に、重鎖可変領域は、K a b a t 位置 1 0 に対応する位置でスレオニンもしくはアラニン、K a b a t 位置 1 1 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 1 2 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 1 9 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 2 3 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でアラニン、プロリン、K a b a t 位置 6 1 に対応する位置でセリンもしくはスレオニン、K a b a t 位置 6 6 に対応する位置でアルギニン、K a b a t 位置 7 0 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 5 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 7 9 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 8 1 に対応する位置でスレオニンもしくはリジン、K a b a t 位置 8 2 に対応する位置でメチオニン、K a b a t 位置 8 2 B に対応する位置でアスパラギン、K a b a t 位置 8 2 C に対応する位置でメチオニン、K a b a t 位置 8 4 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 8 5 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 1 0 8 に対応する位置でリジン、またはK a b a t 位置 1 0 9 に対応する位置でバリンを含む。

【 0 1 0 2 】

随意に、重鎖可変領域は、K a b a t 位置 1 0 に対応する位置でスレオニンもしくはアラニン、K a b a t 位置 1 1 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 1 2 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 1 5 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 1 9 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 2 3 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 4 1 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 4 4 に対応する位置でアラニン、プロリン、K a b a t 位置 6 1 に対応する位置でセリンもしくはスレオニン、K a b a t 位置 6 6 に対応する位置でアルギニン、K a b a t 位置 7 0 に対応する位置でスレオニン、K a b a t 位置 7 5 に対応する位置でリジン、K a b a t 位置 7 9 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 8 1 に対応する位置でスレオニンもしくはリジン、K a b a t 位置 8 2 に対応する位置でメチオニン、K a b a t 位置 8 2 B に対応する位置でアスパラギン、K a b a t 位置 8 2 C に対応する位置でメチオニン、K a b a t 位置 8 4 に対応する位置でプロリン、K a b a t 位置 8 5 に対応する位置でバリン、K a b a t 位置 1 0 8 に対応する位置でリジン、またはK a b a t 位置 1 0 9 に対応する位置でバリンである、結合フレームワーク領域残基を含む。

【 0 1 0 3 】

キメラ抗原受容体をコードする核酸分子も提供され、そこで、キメラ抗原受容体は、(i) B A F F - R を標的とする s c F v ; (i i) C D 4 膜貫通ドメインもしくは 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、C D 8 膜貫通ドメインもしくは 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、C D 2 8 膜貫通ドメインもしくは 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、または C D 3 膜貫通ドメインもしくは 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有するそのバリエーションから選択される、膜貫通ドメイン ; (i i i) 共刺激ドメイン ; 及び (i v) C D 3 シグナル伝達ドメインまたは 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有するそのバリエーションを含む。

【 0 1 0 4 】

随意に、共刺激ドメインは、C D 2 8 の共刺激ドメインまたは 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、4 - 1 B B の共刺激ドメインまたは 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有するそのバリエーション、及び O X 4 0 の共刺激ドメインまたは 1 ~ 5 のアミノ酸修飾を有するそ

10

20

30

40

50

のバリエーションからなる群から選択される。随意に、*s c F v*は軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、そこで、軽鎖可変領域はCDR L 1（配列番号1）、CDR L 2（配列番号2）及びCDR L 3（配列番号3）を含み；重鎖可変領域はCDR H 1（配列番号4）、CDR H 2（配列番号5）及びCDR H 3（配列番号6）を含む。随意に、*s c F v*は軽鎖可変領域及び重鎖可変領域を含み、そこで、軽鎖可変領域はCDR L 1（配列番号7）、CDR L 2（配列番号8）及びCDR L 3（配列番号9）を含み；重鎖可変領域はCDR H 1（配列番号10）、CDR H 2（配列番号11）及びCDR H 3（配列番号12）を含む。随意に、*s c F v*は、Chi 90 HC、Hu 90 HC - 1、Hu 90 HC - 2、Hu 90 HC - 3、Chi 55 HC、Hu 55 HC - 1、Hu 55 HC - 2及びHu 55 HC - 3から選択される重鎖可変ドメイン、ならびにChi 90 LC、Hu 90 LC - 1、Hu 90 LC - 2、Hu 90 LC - 3、Chi 55 LC、Hu 55 LC - 1、Hu 55 LC - 2及びHu 55 LC - 3から選択される軽鎖可変ドメインを含む。随意に、*s c F v*は、重鎖可変ドメインと軽鎖可変ドメインとの間にスペーサーを含む。随意に、キメラ抗原受容体は、*s c F v*またはそのバリエーションと膜貫通ドメインとの間に所在するスペーサー領域を含む。随意に、4 - 1 BBシグナル伝達ドメインは、配列番号41のアミノ酸配列を含む。随意に、CD3シグナル伝達ドメインは、配列番号42のアミノ酸配列を含む。随意に、3 ~ 15のアミノ酸のリンカーは、共刺激ドメインとCD3シグナル伝達ドメインまたはそのバリエーションとの間に所在する。随意に、*s c F v*は、配列番号14、18、20、22、30、36、37または38から選択されるアミノ酸配列を有する軽鎖可変ドメインを含む。随意に、*s c F v*は、配列番号16、24、26、28、23、33、34及び35から選択されるアミノ酸配列を有する重鎖可変ドメインを含む。随意に、*s c F v*は、配列番号43または44から選択されるアミノ酸配列を含む。

【0105】

本明細書において記載される核酸分子を含む発現カセットを含むベクターによって形質導入されたヒトT細胞の集団も、本明細書において記載される。ヒトT細胞の集団は、T細胞を含むことができ、そこで、*s c F v*は、Chi 90 HC、Hu 90 HC - 1、Hu 90 HC - 2、Hu 90 HC - 3、Chi 55 HC、Hu 55 HC - 1、Hu 55 HC - 2及びHu 55 HC - 3から選択される重鎖可変ドメイン、ならびにChi 90 LC、Hu 90 LC - 1、Hu 90 LC - 2、Hu 90 LC - 3、Chi 55 LC、Hu 55 LC - 1、Hu 55 LC - 2及びHu 55 LC - 3から選択される軽鎖可変ドメインを含む。随意に、T細胞は、CD4 + TN細胞及びCD8 + TCM細胞を含む。随意に、T細胞は、CD4 + TN細胞及びCD8 + TN細胞を含む。

【0106】

B細胞活性化因子受容体(BAFF-R)を標的とするキメラ抗原受容体(CAR)を発現するT細胞を使用して、B細胞悪性腫瘍を治療する方法が、本明細書において記載される。本明細書において記載されるBAFF-Rを標的とするCAR(BAFF-R CAR)は、BAFF-Rと結合する*s c F v*ドメイン（例えばヒト化*s c F v*）、膜貫通ドメイン（例えばCD8膜貫通ドメイン）、共刺激ドメイン（例えば4 - 1 BBの共刺激ドメイン）、CD3シグナル伝達ドメイン、またはその任意の組み合わせを含み得る。CARは、例えば*s c F v*ドメインと膜貫通ドメインとの間、膜貫通ドメインと共刺激ドメインとの間、及び/または共刺激ドメインとCD3シグナル伝達ドメインとの間に、スペーサー配列も含み得る。

【0107】

治療有効量の明細書において記載されるヒトT細胞の集団を含む組成物を対象へ投与し、それによって対象におけるがんを治療することを含む、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法も、本明細書において記載される。

【0108】

随意に、がんは、リンパ腫、白血病、または骨髄腫である。随意に、リンパ腫は、マントル細胞リンパ腫、濾胞性リンパ腫、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫、辺縁帯リンパ腫、

またはパーキットリンパ腫である。随意に、白血病は、リンパ芽球性白血病、慢性リンパ球性白血病、または有毛細胞白血病である。随意に、骨髄腫は多発性骨髄腫である。随意に、方法は、第2の治療剤を前記対象へ投与することをさらに含む。随意に、T細胞の集団は、自己由来であるか、または患者へ同種異系である。随意に、ヒトT細胞の集団は、CD4+ T_N細胞及びCD8+ T_CM細胞を含む細胞を含む。

【0109】

治療有効量の本明細書において記載されるヒトT細胞の集団を含む組成物を対象へ投与し、それによって対象における自己免疫疾患を治療することを含む、それを必要とする対象におけるがんを治療する方法が、本明細書において記載される。随意に、自己免疫疾患は、関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡、多発性硬化症、糸球体腎炎、シェーグレン症候群、または自己免疫性溶血性貧血である。したがって、本明細書において記載されるCAR T細胞を使用して、様々な自己免疫疾患を治療することができる。自己免疫疾患は、例えば対象の身体中に通常は存在する物質、組織及び/または細胞に対する対象の免疫系による免疫反応の変更から生じる疾患または障害である。自己免疫疾患としては、関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、若年性特発性関節炎、硬皮症、全身性強皮症、多発性硬化症、全身性紅斑性狼瘡(SLE)、重症筋無力症、若年型糖尿病、1型糖尿病、ギラン-バレー症候群、橋本の脳炎、橋本甲状腺炎、強直性脊椎炎、乾癬、シェーグレン症候群、血管炎、糸球体腎炎、自己免疫性甲状腺炎、ベーチェット病、クローン病、潰瘍性大腸炎、水疱性類天疱瘡、サルコイドーシス、乾癬、魚鱗癬、グレーブス眼症、炎症性大腸疾患、アジソン病、白斑、喘息、及びアレルギー喘息が挙げられるがこれらに限定されない。

【0110】

全体にわたって記載されるように、医薬組成物は、周知の当技術分野においてルーチンに実践される方法に従って調製され得る。例えばRemington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版、Lloyd V. Allen et al. 編、Pharmaceutical Press (2012); 及びSustained and Controlled Release Drug Delivery Systems、J. R. Robinson編、Marcel Dekker, Inc., New York、1978を参照されたい。かかる組成物は、ヒトT細胞またはBAFF-R CAR T細胞の集団の提供されたものを含み得る。医薬組成物は、好ましくはGMP条件下で製造される。典型的には、治療有効用量または有効用量の細胞は、医薬組成物中で用いられる。提供される細胞は、当業者に公知の従来の方法によって薬学的に許容される投薬形態へと製剤化され得る。投薬量レジメンは、至適の所望の応答(例えば治療応答)を提供するように調整される。例えば、単一ボラスは投与され得るか、複数の分割用量は経時的に投与され得るか、または、用量は治療状況の要件によって指摘されるように比例して低減もしくは増加され得る。他の治療法または薬剤と組み合わせる細胞を製剤化することは有利であり得る。投与の容易性及び投薬量の均一性のために、非経口組成物を投薬量単位形態で製剤化することは有利であり得る。投薬量単位形態は、本明細書において使用される時、治療される対象のための一体型投薬量として適した物理的に分離した単位を指し; 各々の単位は、要求される医薬賦形剤と共同して、所望される治療上の効果を産生することが意図される既定の量のヒト化抗体を含有する。

【0111】

一例として、細胞は、細胞の絶対数によって対象へ投与され得、例えば前記対象は、約1000細胞/注射~約100億細胞/注射まで(1注射あたり、約、少なくとも約、または多くとも約 1×10^8 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^3 、 5×10^3 (など)のBAFF-R CAR T細胞等、または任意の2つの数の間の任意の範囲(エンドポイントを包含する)で)を投与され得る。随意に、 $1 \times 10^6 \sim 1 \times 10^8$ 細胞が対象へ投与される。随意に、細胞は、1または数週間の間、週に1または数回投与される。随意に、細胞は、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10週間以上の間、週に1または2回投与される。

【0112】

10

20

30

40

50

随意に、対象は、約 1000 細胞 / 注射 / m^2 ~ 約 100 億細胞 / 注射 / m^2 まで (1 注射あたり、約、少なくとも約、または多くとも約 $1 \times 10^8 / m^2$ 、 $1 \times 10^7 / m^2$ 、 $5 \times 10^7 / m^2$ 、 $1 \times 10^6 / m^2$ 、 $5 \times 10^6 / m^2$ 、 $1 \times 10^5 / m^2$ 、 $5 \times 10^5 / m^2$ 、 $1 \times 10^4 / m^2$ 、 $5 \times 10^4 / m^2$ 、 $1 \times 10^3 / m^2$ 、 $5 \times 10^3 / m^2$ (など) の B A F F - R C A R T 細胞等、または任意の 2 つの数の間の任意の範囲 (エンドポイントを包含する) で) を投与される。

【0113】

随意に、B A F F - R C A R T 細胞は、細胞の相対的数によってかかる個体へ投与され得、例えば前記個体は、個体のキログラムあたり、約 1000 細胞 ~ 約 100 億細胞まで (個体のキログラムあたり、約、少なくとも約、または多くとも約 1×10^8 、 1×10^7 、 5×10^7 、 1×10^6 、 5×10^6 、 1×10^5 、 5×10^5 、 1×10^4 、 5×10^4 、 1×10^3 、 5×10^3 (など) の B A F F - R C A R T 細胞等、または任意の 2 つの数の間の任意の範囲 (エンドポイントを包含する) で) を投与され得る。

10

【0114】

随意に、全用量は、体表面積 m^2 によって計算され得、 $1 m^2$ あたり約 1×10^{11} 、 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 、または任意の 2 つの数の間の任意の範囲 (エンドポイントを包含する) を含む。随意に、約 10 億 ~ 約 30 億の間の B A F F - R C A R T 細胞が、患者へ投与される。随意に、1 用量あたりの注射される B A F F - R C A R T 細胞の量は、体表面積 m^2 によって計算され得、 $1 m^2$ あたり 1×10^{11} 、 1×10^{10} 、 1×10^9 、 1×10^8 、 1×10^7 を含む。

20

【0115】

随意に、B A F F - R C A R T 細胞は、B A F F - R C A R T 細胞及び培地 (ヒト血清またはその等価物等) を含む組成物において投与される。随意に、培地はヒト血清アルブミンを含む。随意に、培地はヒト血漿を含む。随意に、培地は、約 1% ~ 約 15% のヒト血清またはヒト血清等価物を含む。随意に、培地は、約 1% ~ 約 10% のヒト血清またはヒト血清等価物を含む。随意に、培地は、約 1% ~ 約 5% のヒト血清またはヒト血清等価物を含む。随意に、培地は、約 2.5% のヒト血清またはヒト血清等価物を含む。随意に、血清はヒト A B 血清である。随意に、ヒト治療物質中の使用が許容される血清代替物は、ヒト血清の代わりに使用される。かかる血清代替物は当技術分野において公知であり得る。随意に、B A F F - R C A R T 細胞は、B A F F - R C A R T 細胞、及び細胞生存を支持する等張溶液を含む組成物において投与される。随意に、B A F F - R C A R T 細胞は、冷凍保存サンプルから再構成された組成物において投与される。

30

【0116】

様々な実施形態及び態様が本明細書において示され記載されるが、かかる実施形態及び態様が単なる例として提供されることは当業者へ明らかだろう。多数の変動、変化及び置換がここで当業者に思い浮かぶだろう。本明細書において記載される実施形態への様々な代替が用いられ得ることが理解されるべきである。

【0117】

抗体は、複雑な内部構造を備えた大きな複合体分子 (約 $150,000$ Da の分子量または約 1320 アミノ酸) である。天然の抗体分子は 2 つの同一ペアのポリペプチド鎖を含有し、各々のペアは 1 つの軽鎖及び 1 つの重鎖を有する。そして各々の軽鎖及び重鎖は、2 つの領域: 標的抗原の結合に関与する可変 (「V」) 領域、及び免疫系の他の構成要素と相互作用する定常 (「C」) 領域からなる。抗原 (例えば細胞の表面上の受容体) と結合する可変領域を形成するように、軽鎖可変領域及び重鎖可変領域は、三次元空間において一緒になる。各々の軽鎖可変領域または重鎖可変領域内に、相補性決定領域 (「CDR」) と呼ばれる 3 つの短いセグメント (長さで平均 10 のアミノ酸) がある。抗体可変ドメイン中の 6 つの CDR (軽鎖から 3 つ及び重鎖から 3 つ) は、実際の抗体結合部位 (パラトープ) を形成するように三次元空間において一緒に折り畳まれ、それは標的抗原 (エピトープ) の上にドッキングする。CDR の位置及び長さは、Kabat, E. et al., Sequences of Proteins of Immunological

40

50

Interest、U.S. Department of Health and Human Services、1983、1987によって正確に定義された。CDR中に含まれない可変領域のパーツはフレームワーク(「FR」と呼ばれ、それは、CDRのための環境を形成する。

【0118】

抗体という用語は、当技術分野における通常の公知の意味に従って使用される。抗体は例えばインタクトな免疫グロブリンとして存在する。しかしながら、抗体(複数可)という用語が本明細書において列挙される場合は常に、機能的抗体断片(複数可)が使用され得る。例えば、多くの十分に特徴づけられた機能的抗体断片は、様々なペプチダーゼによる消化によって産生することができる。したがって、例えば、ペプシンは、ヒンジ領域中のジスルフィド結合の下で抗体を消化して、 $F(ab)'_2$ (Fab (軽鎖がジスルフィド結合によって $V_H - C_H1$ へ連結されたもの自体)の二量体)を産生する。 $F(ab)'_2$ はヒンジ領域中のジスルフィド結合を破壊する穏やかな条件下で還元され、それによって $F(ab)'_2$ 二量体を Fab' 単量体に変換することができる。 Fab' 単量体は本質的にヒンジ領域の一部を備えた Fab である(Fundamental Immunology (Paul 編、第3版(1993))を参照)。様々な抗体断片がインタクトな抗体の消化の面から定義されるが、当業者は、かかる断片が化学的にまたは組み換えDNA方法論を用いることによってのいずれかで、デノボに合成され得ることを認識するだろう。したがって、抗体という用語は本明細書において使用される時例示的であり、全体の抗体の修飾によって産生される抗体断片、または組み換えDNA方法論を用いてデノボに合成されるもの(例えば一本鎖 F_v)またはファージディスプレイライブラリーを使用して同定されたもの(例えばMcCafferty et al., Nature 348:552-554(1990))を参照)が、抗体についての記載として使用され得る。

【0119】

モノクローナル抗体またはポリクローナル抗体の調製のために、当技術分野において公知の任意の技法が使用され得る(例えばKohler & Milstein, Nature 256:495-497(1975); Kozbor et al., Immunology Today 4:72(1983); Cole et al. (Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy(1985)中でページ77-96)を参照)。モノクローナル抗体(mAb)は、単クローンに由来する抗体を指す。一本鎖抗体の産生のための技法(米国特許第4,946,778号)は、本明細書において記載されるポリペプチドへの抗体を産生するように適合され得る。遺伝子導入マウスまたは他の生物体(他の哺乳動物等)も使用して、ヒト化抗体を発現することができる。あるいは、ファージディスプレイ技術を使用して、選択された抗原へ特異的に結合する抗体及びヘテロマーの Fab 断片を同定することができる(例えばMcCafferty et al., Nature 348:552-554(1990); Marks et al., Biotechnology 10:779-783(1992)を参照)。

【0120】

mAb のエピトープは、 mAb が結合するその抗原の領域である。各々が他のものの抗原への結合を競合的に阻害する(ブロックする)ならば、2つの抗体が同じまたはオーバーラップするエピトープへ結合する。すなわち、競合結合アッセイにおいて測定されるように、 $1\times$ 、 $5\times$ 、 $10\times$ 、 $20\times$ または $100\times$ 過剰量の1つの抗体は、少なくとも30%だが、好ましくは50%、75%、90%または場合によっては99%まで、他のものの結合を阻害する(例えばJungmans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990を参照)。あるいは、1つの抗体の結合を低減または消失させる抗原中の本質的にすべてのアミノ酸突然変異が、他のものの結合を低減または消失させるならば、2つの抗体は同じエピトープを有する。1つの抗体の結合を低減または消失させるいくつかのアミノ酸突然変異が、他のものの結合を低減または消失させるならば、2つの抗体はオーバーラップするエピトープを有する。

【0121】

10

20

30

40

50

リガンドは、受容体分子（例えば抗体）へ結合することが可能な薬剤（例えばポリペプチドまたは他の分子）を指す。

【0122】

標識または検出可能な部分は、分光学的手段、光化学的手段、生化学的手段、免疫化学的手段、化学的手段、または他の物理的手段によって検出可能な組成物である。例えば、有用な標識としては、 ^{32}P 、蛍光色素、高電子密度の試薬、酵素（例えば通常はELISAにおいて使用されるような）、ビオチン、ジゴキシゲニン、または例えば標的ペプチドと特異的な反応性のあるペプチドもしくは抗体の中へ放射性同位体標識を援用することによって検出可能にすることができる、ハプテン及びタンパク質もしくは他の実体が挙げられる。標識への抗体のコンジュゲートのために当技術分野において公知の任意の適切な方法が用いられ得る（例えばHermanson, Bioconjugate Techniques 1996, Academic Press, Inc., San Diego中に記載される方法を使用して）。

10

【0123】

接触することは、その平易な通常の意味に従って使用され、少なくとも2つの別種のもの（例えば生体分子または細胞を含む、化学化合物）が、反応するか、相互作用するか、または物理的に接するために十分に近くなることを可能にするプロセスを指す。しかしながら、もたらされる反応産物は、添加された試薬間の反応から、または反応混合物中で産生され得る添加された試薬のうちの1つもしくは複数からの中間体から、直接産生され得ることは認識すべきである。

20

【0124】

接触することという用語は、2つの種が反応するか、相互作用するか、または物理的に接することを可能にすることを含み、そこで、2つの種は、例えば本明細書において記載されるような抗体及びBAFF-Rタンパク質であり得る。接触することは、例えば本明細書において記載されるようなヒト化抗体がBAFF-Rと相互作用することを可能にすることを含む。

【0125】

本明細書において使用される時、病態、疾患もしくは障害、または病態、疾患もしくは障害と関連する症状を治療することまたはそれらの治療は、有益または所望の結果（臨床結果を含む）を得るためのアプローチを指す。有益または所望の臨床結果としては、1つまたは複数の症状または病態の緩和または改善、病態、障害または疾患の程度の縮小、病態、障害または疾患の状態の安定化、病態、障害または疾患の発生の予防、病態、障害または疾患の伝播の予防、病態、障害または疾患の進行の遅延または減速、病態、障害または疾患の開始の遅延または減速、病態、障害または疾患の状態の寛解または緩和、及び寛解（部分的または全体的であるかにかかわらず）が挙げられ得るがこれらに限定されない。治療は、治療の非存在下において予想されるものを超える対象の長期生存も意味し得る。治療は、いくつかの事例において、病態、障害または疾患の進行を恒久的に停止させることを包含するが、病態、障害または疾患の進行の阻害、病態、障害または疾患の進行の一時的な減速も意味し得る。本明細書において使用される時、治療、治療する、または治療することという用語は、プロテアーゼの発現によって特徴づけられる疾患もしくは病態の1つまたは複数の症状の影響、またはプロテアーゼの発現によって特徴づけられる疾患もしくは病態の症状を低減させる方法を指す。したがって、開示した方法において、治療は、確立された疾患、病態、または疾患もしくは病態の症状の重症度における10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%または100%の低減を指し得る。例えば、疾患を治療する方法は、対照と比較して、対象における疾患の1つまたは複数の症状に10%の低減があるならば、治療であると判断される。したがって、低減は、ネイティブのレベルまたは対照レベルと比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、または10%～100%の間の任意のパーセント低減であり得る。治療は、疾患、病態、または疾患もしくは病態の症状の治癒または完全な除去を必ずしも指さないことが理解される。さらに、本明細書にお

30

40

50

いて使用される時、減少、低減または阻害への参照には、対照レベルに比較して、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%以上の変化が含まれ、かかる用語には完全な消失が含まれ得るが、必ず含まれるわけではない。

【0126】

ポリペプチド、ペプチド及びタンパク質という用語はアミノ酸残基のポリマーを指すように本明細書において互換的に使用され、そこで、ポリマーはアミノ酸からならない部分へコンジュゲートされ得る。この用語は、天然に存在するアミノ酸ポリマー及び天然に存在しないアミノ酸ポリマーに加えて、1つまたは複数のアミノ酸残基が対応する天然に存在するアミノ酸の人工的な化学的模倣物である、アミノ酸ポリマーへ適用される。融合タンパク質は、単一部分として組み換えにより発現される、2つ以上の分離したタンパク質配列をコードするキメラのタンパク質を指す。ペプチジル及びペプチジル部分という用語は一価ペプチドを意味する。

10

【0127】

アミノ酸という用語は、本明細書において使用される時、天然に存在するアミノ酸及び合成アミノ酸に加えて、天然に存在するアミノ酸に類似する様式で機能するアミノ酸類似体及びアミノ酸模倣物を指す。天然に存在するアミノ酸は、遺伝コードによってコードされたものに加えて、後に修飾されるそれらのアミノ酸（例えばヒドロキシプロリン、 γ -カルボキシグルタミン酸及びO-フォスホセリン）である。アミノ酸類似体は、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造（すなわち水素へ結合された炭素、カルボキシル基、アミノ基、及びR基）を有する化合物（例えばホモセリン、ノルロイシン、メチオニンスルホキシド、メチオニンメチルスルホニウム）を指す。かかる類似体は、修飾されたR基（例えばノルロイシン）または修飾されたペプチド骨格を有するが、天然に存在するアミノ酸と同じ基本的化学構造を保持する。アミノ酸模倣物は、アミノ酸の一般的化学構造とは異なるが、天然に存在するアミノ酸に類似する様式で機能する構造を有する化学化合物を指す。天然に存在しないアミノ酸及び非天然アミノ酸という用語は、天然で見出されないアミノ酸類似体、合成アミノ酸、及びアミノ酸模倣物を指す。

20

【0128】

アミノ酸は、IUPAC - IUB Biochemical Nomenclature Commissionによって推奨された、それらの一般的に公知である3文字記号または1文字記号のいずれかによって本明細書において参照され得る。ヌクレオチドは、同様にそれらの一般的に認められる1文字コードによって参照され得る。

30

【0129】

「保存的に修飾されたバリエーション」は、アミノ酸及び核酸配列の両方へ適用される。特定の核酸配列に関して、保存的に修飾されたバリエーションは、同一または本質的に同一のアミノ酸配列をコードする核酸を指す。遺伝コードの縮重があるので、多くの核酸配列が任意の与えられたタンパク質をコードするだろう。例えば、コドンGCA、GCC、GCG及びGCUはすべてアミノ酸アラニンをコードする。したがって、コドンによってアラニンが規定されるすべての位置で、コドンは、コードされるポリペプチドを変更せずに、記載された対応するコドンのうちの任意のものへ変更され得る。かかる核酸バリエーションはサイレントバリエーションであり、それは保存的に修飾されたバリエーションの一種である。ポリペプチドをコードする本明細書におけるすべての核酸配列は、核酸のすべての可能なサイレントバリエーションも記述する。当業者は、核酸中の各々のコドン（通常メチオニンについてのただ一つのコドンであるAUG及び通常トリプトファンについてのただ一つのコドンであるTGG以外）が、機能的に同一の分子をもたらすように修飾され得ることを認識するだろう。したがって、ポリペプチドをコードする核酸の各々のサイレントバリエーションは、各々の記載された配列において黙示的である。

40

【0130】

アミノ酸配列に関して、当業者は、核酸、ペプチド、ポリペプチドまたはタンパク質配列への個別の置換、欠失または添加（それはコードされた配列中の単一アミノ酸またはアミノ酸のわずかなパーセンテージを変更、添加または欠失させる）は、改変が化学的に類似

50

するアミノ酸によるアミノ酸の置換をもたらす場合に、保存的に修飾されたバリエーションであると認識するだろう。機能的に類似するアミノ酸を提供する保存的置換の目録は、当技術分野において周知である。かかる保存的に修飾されたバリエーションは、多型バリエーション、異種間のホモログ、及び対立遺伝子に加えられ、これらを除外しない。

【0131】

以下の8群：

- 1) アラニン (A)、グリシン (G)；
- 2) アスパラギン酸 (D)、グルタミン酸 (E)；
- 3) アスパラギン (N)、グルタミン (Q)；
- 4) アルギニン (R)、リジン (K)；
- 5) イソロイシン (I)、ロイシン (L)、メチオニン (M)、バリン (V)；
- 6) フェニルアラニン (F)、チロシン (Y)、トリプトファン (W)；
- 7) セリン (S)、スレオニン (T)；及び
- 8) システイン (C)、メチオニン (M)

は各々、互いについて保存的置換であるアミノ酸を含有する（例えば Creighton, Proteins (1984) を参照）。

【0132】

配列同一性のパーセンテージは比較ウィンドウにわたって2つの至適にアライメントさせた配列の比較によって決定され、そこで、2つの配列の至適のアライメントのために、参照配列（それは追加または欠失を含まない）に比較して、比較ウィンドウ中のポリヌクレオチド配列またはポリペプチド配列の部分は、追加または欠失（すなわちギャップ）を含み得る。パーセンテージは、同一の核酸塩基またはアミノ酸残基が両方の配列中で生じる位置の数を決定して一致した位置の数を得ること、比較のウィンドウ中の位置の合計数によって一致した位置の数を割ること、及び結果に100を掛けて配列同一性のパーセンテージを得ることによって計算される。

【0133】

2つ以上の核酸またはポリペプチド配列の文脈において、同一であるまたはパーセント同一性という用語は、比較ウィンドウ、または以下の配列比較アルゴリズムのうちの1つを使用してもしくは手動アライメント及び視覚的検査によって測定されるような指定の領域にわたって、最大の対応のために比較及びアライメントさせた場合に、同じであるか、または同じであるアミノ酸残基もしくはヌクレオチドの規定のパーセンテージ（すなわち、例えばポリペプチドの全体のポリペプチド配列または個別のドメインの規定の領域にわたって、60%の同一性、随意に65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%または99%の同一性）を有する、2つ以上の配列またはサブ配列を指す。かかる配列は実質的に同一であるとされる。この定義は試験配列の相補物も指す。随意に、同一性は、長さで少なくとも約50のヌクレオチドである領域にわたって、より好ましくは長さで100～500または1000以上のヌクレオチドである領域にわたって、存在する。

【0134】

配列比較のために、典型的には、1つの配列が参照配列として働き、それへ試験配列が比較される。配列比較アルゴリズムを使用する場合、試験配列及び参照配列はコンピューターへと入力され、必要であるならばサブ配列座標が指定され、配列アルゴリズムプログラムパラメーターが指定される。デフォルトプログラムパラメーターが使用され得るか、または、代替パラメーターが指定され得る。次いで、配列比較アルゴリズムは、プログラムパラメーターに基づいて、参照配列に比した試験配列についてのパーセント配列同一性を計算する。

【0135】

比較ウィンドウは、本明細書において使用される時、例えば全長配列、または20～600、約50～約200もしくは約100～約150のアミノ酸もしくはヌクレオチドからなる群から選択される連続した位置の数のうちの任意の1つのセグメントへの参照を含み

10

20

30

40

50

、そこで、配列は、2つの配列が至適にアライメントされた後に、連続した位置の同じ数の参照配列へ比較され得る。比較のための配列のアライメントの方法は当技術分野において周知である。比較のための配列の至適のアライメントは、例えばSmith and Waterman (1970) Adv. Appl. Math. 2: 482 cの局部的相同性アルゴリズムによって、Needleman and Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48: 443の相同性アライメントアルゴリズムによって、Pearson and Lipman (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85: 2444の類似性のためのサーチ方法によって、これらのアルゴリズムのコンピューター化実装 (Wisconsin Genetics Software Package (Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI) 中の、GAP、BESTFIT、FASTA及びTFASTA) によって、または手動アライメント及び視覚的検査 (例えばAusubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (1995 supplement) を参照) によって、遂行され得る。

【0136】

パーセント配列同一性及び配列類似性の決定のために好適なアルゴリズムの例は、BLASTアルゴリズム及びBLAST 2.0アルゴリズムであり、それらは、それぞれ、Altschul et al. (1977) Nuc. Acids Res. 25: 3389-3402及びAltschul et al. (1990) J. Mol. Biol. 215: 403-410中で記載される。BLASTリアルタイム分析の遂行のためのソフトウェアは、National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) を介して公的に利用可能である。このアルゴリズムは、データベース配列中の長さWのワードとアライメントさせた場合に、クエリ配列中の同じ長さのショートワード (一致するかまたはいくつかの正値閾値スコアTを満たすかのいずれかである) の同定によって、高スコア配列ペア (HSP) を最初に同定することを包含する。Tは近隣ワードスコア閾値と称される (Altschul et al., 前出)。これらの最初の近隣ワードヒットはサーチを開始するためのシードとして働いて、シードを含有するより長いHSPが見出される。ワードヒットは、累積アライメントスコアが増加し得る限り、各々の配列に沿って両方向で伸長される。累積スコアは、ヌクレオチド配列について、パラメーターM (一致する残基のペアのための報酬スコア; 常に >0) 及びN (残基のミスマッチのためのペナルティスコア; 常に <0) を使用して計算される。アミノ酸配列については、スコアリングマトリックスを使用して、累積スコアを計算する。各々の方向でのワードヒットの伸長は、累積アライメントスコアがその最大達成値から量Xだけ落ちるか; 累積スコアが1つもしくは複数の負スコアの残基アライメントの蓄積に起因して0以下になるか; または、いずれかの配列の末端に到達する場合に、停止される。BLASTアルゴリズムパラメーターW、T及びXは、アライメントの感度及びスピードを決定する。BLASTNプログラムは、ヌクレオチド配列に関して、デフォルトとして11のワード長 (W)、10の期待値 (E)、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、及び両鎖の比較を使用する。アミノ酸配列に関して、BLASTPプログラムは、デフォルトとして3のワード長、及び10の期待値 (E)、及びBLOSUM62スコアリングマトリックス (Henikoff and Henikoff (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 10915を参照)、50のアライメント (B)、10の期待値 (E)、 $M=5$ 、 $N=-4$ 、及び両鎖の比較を使用する。

【0137】

BLASTアルゴリズムは、2つの配列の間の類似性の統計解析も遂行する。(例えばKarlin and Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 5873-5787参照)。BLASTアルゴリズムによって提供される類似性の1つの測定値は、最小和確率 ($P(N)$) であり、これは、2つのヌクレオチドまたはアミノ酸の配列の間の一致が偶然によって起こる確率の指標を提供する。例え

10

20

30

40

50

ば、参照核酸への試験核酸の比較において、最小和確率が約 0.2 未満、より好ましくは約 0.01 未満、及び最も好ましくは約 0.001 未満ならば、核酸は参照配列に類似すると判断される。

【0138】

2つの核酸配列またはポリペプチドが実質的に同一であるという指標は、以下に記載されるように、第1の核酸によってコードされるポリペプチドが、第2の核酸によってコードされるポリペプチドに対して作製された抗体と免疫学的に交差反応性であることである。したがって、ポリペプチドは、例えば2つのペプチドが保存的置換でのみ異なる場合に、第2のポリペプチドへ典型的には実質的に同一である。2つの核酸配列が実質的に同一であるという別の指標は、以下に記載されるように、2つの分子またはそれらの相補物がストリンジェントな条件下で互いにハイブリダイズすることである。2つの核酸配列が実質的に同一であるというさらに別の指標は、同じプライマーを使用して配列を増幅することができることである。

10

【0139】

与えられた残基と抗体内の同じ必須の構造的位置を占める場合に、抗体中のアミノ酸残基は与えられた残基に対応する。例えば、比較抗体中の選択された残基は、選択された残基が、当技術分野において適用可能な方法を使用して査定されるような Kabat 位置 48 に同じ必須の空間的關係または構造的關係を占める場合に、本明細書において提供される抗体中の位置 48（本明細書において記載されるような Kabat ナンバリングシステムに従って）に対応する。例えば、比較抗体は本明細書において提供された抗体と最大の配列相同性でアライメントされ、Kabat 位置 48 とアライメントするアライメント比較抗体中の位置は、それに対応すると決定され得る。あるいは、上記のような一次配列アライメントの代わりに（またはそれに加えて）、例えば比較抗体の構造が本明細書において提供される抗体と最大の対応でアライメントされ、全体構造が比較された場合に、三次元の構造的アライメントも使用され得る。この事例において、構造モデル中の Kabat 位置 48 と同じ必須の位置を占めるアミノ酸は、対応すると言える。

20

【0140】

単離されたという用語は、タンパク質に適用される場合に、タンパク質が天然状態において結び付いている他の細胞構成要素が、本質的にないことを表わす。それは乾燥または水溶液のいずれかであり得るが、好ましくは均一の状態である。純度及び均一性は、典型的にはポリアクリルアミドゲル電気泳動または高速液体クロマトグラフィー等の分析化学技法を使用して決定される。調製物中に存在する優勢種のタンパク質が、実質的に精製される。単離されたという用語は、タンパク質が電気泳動ゲル中で本質的に1つのバンドを生じることを表わす。特に、それは、タンパク質が少なくとも85%純粋、より好ましくは少なくとも95%純粋、及び最も好ましくは少なくとも99%純粋であることを意味する。

30

【0141】

特異的に（または選択的に）抗体へ結合する、または特異的に（または選択的に）～と免疫反応性である、という語句は、タンパク質またはペプチドを参照する場合に、タンパク質及び他の生物製剤の不均一集団中でのタンパク質の存在の決定要因である、結合反応を指す。したがって、指定の免疫アッセイ条件下で、規定の抗体はバックグラウンドの少なくとも2倍で特定のタンパク質へ結合し、サンプル中に存在する他のタンパク質へ有意な量で実質的に結合しない。典型的には、特異的または選択的な反応は、バックグラウンドシグナルまたはノイズの少なくとも2倍、及びより典型的にはバックグラウンドの10～100倍以上であるだろう。

40

【0142】

細胞は、本明細書において使用される時、ゲノムDNAを維持または複製するのに十分な代謝機能または他の機能を実行する細胞を指す。細胞は当技術分野において周知の方法（例えばインタクトな膜の存在、特定の色素による染色、子孫を産生する能力、または配偶子の事例において、第2の配偶子と合体して生存可能な子を産生する能力が挙げられる）によって同定され得る。細胞としては原核生物及び真核生物細胞が挙げられ得る。原核生

50

物細胞としては細菌が挙げられるがこれらに限定されない。真核生物細胞としては、酵母細胞ならびに植物及び動物に由来する細胞（例えば哺乳動物細胞、昆虫（例えば *spodoptera* 属）細胞及びヒト細胞）が挙げられるがこれらに限定されない。

【0143】

本明細書において定義される時、阻害、阻害する、阻害することという用語、及び同種のものは、タンパク質阻害物質（例えば本明細書において提供される B A F F - R 抗体）相互作用に関して、阻害物質（例えば B A F F - R 抗体）の非存在下におけるタンパク質の活性または機能と比べて、タンパク質の活性または機能に負に影響する（例えば減少させる）（例えば B A F F - R の活性を減少させる）ことを意味する。阻害は、疾患、または疾患（例えばがんまたは自己免疫疾患）の症状の低減を含む。したがって、阻害は、少なくとも一部分、部分的にもしくは完全に、刺激をブロックすること、シグナル伝達または酵素活性またはタンパク質の量を減少すること、防止すること、活性化を遅延すること、不活性化すること、脱感作すること、またはダウンレギュレートすることを含む。同様に、阻害物質は、例えば結合すること、部分的もしくは完全にブロックすること、減少させること、防止すること、遅延すること、不活性化すること、脱感作すること、または活性（例えば B A F F - R シグナル伝達活性）をダウンレギュレートすることによって、B A F F - R 活性を阻害する化合物またはタンパク質である。

10

【0144】

本明細書において提供される薬剤（例えば抗体または細胞）は、活性のある治療剤及び多様な他の薬学的に許容される構成要素を含む、医薬組成物として多くの場合投与される。Remington: The Science and Practice of Pharmacy、第22版、Lloyd V. Allen et al. 編、Pharmaceutical Press (2012) を参照されたい。好ましい形態は意図される投与モード及び治療上の適用に依存する。組成物は、所望される製剤に依存して、薬学的に許容される非毒性の担体または希釈物質（通常は動物またはヒト投与のための医薬組成物の製剤化に使用されるベヒクルとして定義される）も含み得る。希釈物質は、組み合わせたものの生物学的活性に影響を与えないように選択される。かかる希釈物質の例は、蒸留水、生理的リン酸緩衝食塩水、リンゲル液、デキストロース溶液、及びハंकス液である。加えて、医薬組成物または製剤としては、他の担体、アジュバント、または非毒性の非治療用の非免疫原性の安定物質及び同種のものも挙げられる。

20

30

【0145】

組成物は、治療的処置または予防的処置のために投与され得る。治療上の適用において、組成物は、治療有効用量で疾患（例えばがん）を患う患者へ投与される。この使用のために有効な量は、疾患の重症度及び患者の健康の一般的な状態に依存するだろう。組成物の単回投与または複数回投与は、必要に応じて投薬量及び頻度に依存して投与され、患者に忍容され得る。患者または対象としては、ヒト及び他の動物（特に哺乳動物）の両方が挙げられる。したがって、方法は、ヒト治療及び動物への適用の両方へ適用可能である。随意に、患者は、哺乳動物、霊長動物またはヒトである。

【0146】

経口投与のために好適な製剤は、(a) 溶液（水または食塩水または P E G 400 等の希釈物質中で懸濁された、有効量の明細書において提供される抗体等）；(b) カプセル、分包または錠剤（各々は、液体、固体、顆粒またはゼラチンとして、活性成分の所定量を含有する）；(c) 適切な液体中の懸濁物；及び (d) 好適なエマルションからなり得る。錠剤形態は、ラクトース、スクロース、マンニトール、ソルビトール、リン酸カルシウム、トウモロコシデンプン、ジャガイモデンプン、微結晶性セルロース、ゼラチン、コロイド状二酸化ケイ素、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ステアリン酸及び他の賦形剤、着色物質、充填物質、結合物質、希釈物質、緩衝剤、湿潤剤、防腐物質、着香剤、色素、崩壊剤、ならびに薬学的適合性のある担体のうちの1つまたは複数を含み得る。ロゼンジ形態は、香料（例えばスクロース）中で活性成分を含み、同様に、トローチは、不活性基剤（ゼラチン及びグリセリンまたはスクロース及びアカシアエマルション、ゲル等

40

50

）中で活性成分を含み、同種のものは、活性成分に加えて当技術分野において公知の担体を含有し得る。

【0147】

医薬組成物は、大きな緩慢に代謝されるマクロ分子、例えばタンパク質、多糖（キトサン等）、ポリ乳酸、ポリグリコール酸及びコポリマー（ラテックス、官能化セファロース（TM）、アガロース、セルロース及び同種のもの等）、ポリマー性アミノ酸、アミノ酸コポリマー、ならびに脂質凝集物（油滴またはリポソーム等）も含み得る。加えて、これらの担体は免疫刺激剤（すなわちアジュバント）として機能し得る。

【0148】

直腸投与のために好適な製剤としては、例えば坐剤（坐剤基剤によりパッケージングされた核酸からなる）が挙げられる。好適な坐剤基剤としては、天然または合成のトリグリセリドまたはパラフィン炭化水素が挙げられる。加えて、基剤（例えば液体トリグリセリド、ポリエチレングリコール及びパラフィン炭化水素が挙げられる）と選択化合物の組み合わせからなる、ゼラチン直腸カプセルを使用することも可能である。

【0149】

非経口投与（例えば関節内（関節中）、静脈内、筋肉内、腫瘍内、皮内、腹腔内及び皮下の経路によって等）のために好適な製剤としては、水性及び非水性の等張滅菌済み注射液（抗酸化物質、バッファー、静菌物質、及び製剤を意図されるレシピエントの血液と等張にする溶質を含有し得る）、ならびに水性及び非水性の滅菌済み懸濁物（懸濁化剤、可溶化物質、増粘剤、安定化物質、及び防腐物質を含み得る）が挙げられる。組成物は、例えば静脈内点滴によって、経口、局所、腹腔内、膀胱内、または鞘内に投与され得る。非経口投与、経口投与及び静脈内投与は、投与の好ましい方法である。化合物の製剤は、単位用量または複数用量の密封容器（アンプル及びバイアル等）で提供され得る。

【0150】

注射溶液及び懸濁物は、これまでに記載された種類の滅菌済み粉末、顆粒及び錠剤から調製され得る。エクスピボの治療法のための核酸が形質導入された細胞も、静脈内または非経口的に上記のように投与され得る。

【0151】

医薬調製物は単位投薬形態であり得る。かかる形態において、調製物は、適切な量の活性のある構成要素を含有する単位用量へと細分される。単位投薬形態はパッケージングされた調製物であり得、パッケージは離散量の調製物（バイアルまたはアンプル中で小分けした錠剤、カプセル剤及び粉末等）を含有する。さらに、単位投薬形態はカプセル、錠剤、カシェー、もしくはロゼンジそれ自体であり得るか、または、それはパッケージングされた形態でのこれらのうちの任意のものの適切な数であり得る。組成物は、所望されるならば、他の適合性のある治療剤も含有し得る。

【0152】

組み合わせ投与は、分離した製剤または単一医薬製剤を使用する共投与、及びいずれかの順序での一続きの投与を企図し、そこで、好ましくは、両方（またはすべて）の活性薬剤がそれらの生物学的活性を同時に発揮する期間がある。

【0153】

本明細書において提供される組成物の有効用量は、異なる因子（投与の手段、標的部位、患者の生理的状态、患者がヒトまたは動物であるか、投与される他の医薬物、及び処置が予防または治療であるかが挙げられる）に依存して、変動し得る。しかしながら、当業者は、ガイダンスのための、がんを治療及び予防するために認可された組成物の投薬量を考慮して、適切な及び/または等価な用量を直ちに認識するだろう。

【0154】

疾患または病態という用語は、本明細書において提供される化合物、医薬組成物もしくは方法により治療されている状態、または、そのように治療されることが可能な患者または対象の健康状況を指す。随意に、疾患は、がん（例えば肺癌、卵巣癌、骨肉腫、膀胱癌、子宮頸癌、肝臓癌、腎臓癌、皮膚癌（例えばメルケル細胞癌）、精巣癌、白血病、リンパ

10

20

30

40

50

腫、頭頸部癌、結腸直腸癌、前立腺癌、膵臓癌、メラノーマ、乳癌、神経芽細胞腫）である。疾患は、自己免疫疾患、炎症性疾患、がん性疾患、感染性疾患、代謝疾患、発育性疾患、心血管性疾患、肝疾患、消化管疾患、内分泌疾患、神経系疾患、または他の疾患であり得る。

【0155】

本明細書において使用される時、がんという用語は、哺乳動物において見出されるすべてのタイプのがん、新生物または悪性腫瘍を指し、白血病、リンパ腫、メラノーマ、神経内分泌腫瘍、癌腫及び肉腫が挙げられる。本明細書において提供される化合物、医薬組成物または方法により治療され得る例示的ながんとしては、リンパ腫、肉腫、膀胱癌、骨癌、脳腫瘍、子宮頸癌、結腸癌、食道癌、胃癌、頭頸部癌、腎臓癌、骨髄腫、甲状腺癌、白血病、前立腺癌、乳癌（例えばトリプルネガティブ、ER陽性、ER陰性、化学療法耐性、ハーセプチン耐性、HER2陽性、ドキシソルビシン耐性、タモキシフェン耐性、腺管癌、小葉癌、原発性、転移性）、卵巣癌、膵臓癌、肝臓癌（例えば肝細胞癌）、肺癌（例えば非小細胞肺癌、扁平上皮肺癌、腺癌、大細胞肺癌、小細胞肺癌、カルチノイド、肉腫）、多形性神経膠芽腫、神経膠腫、メラノーマ、前立腺癌、去勢抵抗性前立腺癌、乳癌、トリプルネガティブ乳癌、神経膠芽細胞腫、卵巣癌、肺癌、扁平上皮細胞癌（例えば頭部、頸部または食道）、結腸直腸癌、白血病、急性骨髄白血病、リンパ腫、B細胞リンパ腫、または多発性骨髄腫が挙げられる。追加の例としては、甲状腺癌、内分泌系癌、脳腫瘍、乳癌、子宮頸癌、大腸、頭頸部癌、食道癌、肝臓癌、腎臓癌、肺癌、非小細胞肺癌、メラノーマ、中皮腫、卵巣癌、肉腫、胃癌、子宮癌もしくは胚芽細胞腫、ホジキン病、非ホジキンリンパ腫、多発性骨髄腫、神経芽細胞腫、神経膠腫、多形性神経膠芽腫、卵巣癌、横紋筋肉腫、原発性血小板血症、原発性マクログロブリン血症、原発性脳腫瘍、がん、悪性胚性インスリノーマ、悪性カルチノイド、膀胱癌、前悪性皮膚損傷、精巣癌、リンパ腫、甲状腺癌、神経芽細胞腫、食道癌、尿生殖器癌、悪性高カルシウム血症、子宮内膜癌、副腎皮質癌、膵臓内分泌もしくは膵臓外分泌腺の新生物、甲状腺髄様癌、甲状腺髄様癌、メラノーマ、結腸直腸癌、甲状腺乳頭癌、肝細胞癌、乳房パジェット病、葉状腫瘍、小葉癌、腺管癌、胚性細胞の癌、肝星細胞の癌、または前立腺癌が挙げられる。

【0156】

白血病という用語は造血臓器の進行性の悪性疾患を広く指し、血液及び骨髄中の白血球及びそれらの前駆体の歪んだ分裂増殖及び発生によって一般的には特徴づけられる。白血病は、一般的には、（１）疾患の継続期間及び特徴（急性または慢性）；（２）関与する細胞のタイプ；骨髄性（骨髄原性）、リンパ性（リンパ原性）、または単球性；（３）血液中の異常細胞数の増加または非増加（白血性または非白血性（亜白血性））、に基づいて臨床的に分類される。本明細書において提供される化合物、医薬組成物または方法により治療され得る例示的な白血病は、例えば急性非リンパ性白血病、慢性リンパ球性白血病、急性顆粒球性白血病、慢性顆粒球性白血病、急性前骨髄球性白血病、成人T細胞白血病、非白血性白血病、白血球血症性白血病（leukocytchemic leukemia）、好塩基球性白血病、芽細胞白血病、ウシ白血病、慢性骨髄性白血病、皮膚白血病、幹細胞性白血病、好酸球性白血病、グロス白血病、有毛細胞白血病、血芽球性白血病、血球芽細胞性白血病、組織球白血病、幹細胞性白血病、急性単球性白血病、白血球減少性白血病、リンパ性白血病、リンパ芽球性白血病、リンパ球性白血病、リンパ行性白血病、リンパ性白血病、リンパ肉腫細胞性白血病、肥満細胞白血病、巨核球性白血病、小骨髄芽球性白血病、単球性白血病、骨髄芽球性白血病、骨髄性白血病、骨髄性顆粒球性白血病、骨髄単球性白血病、ネーグリー白血病、形質細胞白血病、多発性骨髄腫、形質細胞性白血病、前骨髄性白血病、リーダー細胞性白血病、シリング白血病、幹細胞性白血病、亜白血性白血病、または未分化細胞性白血病が挙げられる。

【0157】

本明細書において使用される時、転移及び転移がんという用語は互換的に使用され、１つの器官または別の非隣接器官または身体部分からの分裂増殖性疾患または障害（例えばがん）の伝播を指し得る。がんは起源の部位（例えば乳房）で起こり、その部位は原発性腫

10

20

30

40

50

瘍（例えば原発性乳癌）と称される。原発性腫瘍または起源の部位中のいくつかのがん細胞は、局部領域中の周囲の正常な組織を透過及び浸潤する能力、ならびに／または、身体中の他の部位及び組織へ系を介して循環リンパ系もしくは血管系の壁を透過する能力を取得する。原発性腫瘍のがん細胞から形成された第2の臨床的に検出可能な腫瘍は、転移性腫瘍または二次腫瘍と称される。がん細胞が転移する場合に、転移性腫瘍及びその細胞はもとの腫瘍のものに類似することが推定される。したがって、肺癌が乳房へ転移するならば、乳房の部位での二次腫瘍は異常な乳腺細胞ではなく異常な肺細胞からなる。乳房中の二次腫瘍は転移性肺癌と称される。したがって、転移がんという語句は、対象が原発性腫瘍を有するかまたは有していた、そして1つまたは複数の二次腫瘍を有する疾患を指す。非転移がん、または転移性でないがんに罹患する対象、という語句は、対象が原発性腫瘍を有するが1つまたは複数の二次腫瘍を有していない疾患を指す。例えば、転移性肺癌は、原発性肺腫瘍に罹患するかまたはその病歴があり、第2の所在位置または複数の所在位置での（例えば乳房中での）1つまたは複数の二次腫瘍に罹患する、対象中の疾患を指す。

【0158】

関連する、または、～と関連する、という用語は、疾患（例えばがん（例えば白血病、リンパ腫、B細胞リンパ腫または多発性骨髄腫））と関連する物質または物質の活性もしくは機能の文脈において、物質または物質の活性もしくは機能によって、その疾患（例えばがん（例えば白血病、リンパ腫、B細胞リンパ腫または多発性骨髄腫））が（全部または部分的に）もたらされるか、または、その疾患の症状が（全部または部分的に）もたらされることを意味する。

【0159】

本明細書において使用される時、自己免疫疾患は、例えば対象の身体中に通常は存在する物質組織及び／または細胞に対する対象の免疫系による免疫反応の変更から生じる疾患または障害を指す。自己免疫疾患としては、関節炎、関節リウマチ、乾癬性関節炎、若年性特発性関節炎、硬皮症、全身性強皮症、多発性硬化症、全身性紅斑性狼瘡（SLE）、重症筋無力症、若年型糖尿病、1型糖尿病、ギラン-バレー症候群、橋本の脳炎、橋本甲状腺炎、強直性脊椎炎、乾癬、シェーグレン症候群、血管炎、糸球体腎炎、自己免疫性甲状腺炎、ベーチェット病、クローン病、潰瘍性大腸炎、水疱性類天疱瘡、サルコイドーシス、乾癬、魚鱗癬、グレーブス眼症、炎症性大腸疾患、アジソン病、白斑、喘息、及びアレルギー喘息が挙げられるがこれらに限定されない。

【0160】

本明細書において使用される時、炎症性疾患は、炎症の異常または変更と関連する疾患または障害を指す。炎症は、病原体、損傷した細胞もしくは組織または刺激物に応答する治癒プロセスの一部として免疫系によって開始される生物学的応答である。慢性炎症は多様な疾患を導き得る。炎症性疾患としては、アテローム性動脈硬化症、アレルギー、喘息、関節リウマチ、移植拒絶、セリアック病、慢性前立腺炎、炎症性大腸疾患、骨盤内炎症性疾患、及び炎症性筋疾患が挙げられるがこれらに限定されない。

【0161】

ヒト化抗体は遺伝子操作抗体であり、そこで、マウス抗体（「ドナー抗体」、それはラット、ハムスターまたは他の非ヒト種でもあり得る）からの少なくとも1つのCDR（またはその機能的断片またはパリアント）が、ヒト抗体フレームワーク（「アクセプター抗体」）の上ヘグラフトされる。随意に、2つ以上のマウスCDRがグラフトされる（例えばすべての6つのマウスCDRがグラフトされる）。アクセプター抗体の配列は、例えば成熟ヒト抗体配列（またはその断片）、ヒト抗体配列のコンセンサス配列（またはその断片）、または生殖細胞系列領域配列（またはその断片）であり得る。したがって、ヒト化抗体は、ドナー抗体からの1つまたは複数のCDR、及び可変領域フレームワーク（FR）を有する抗体であり得る。FRは、ヒト抗体内の定常領域及び／または可変領域の一部を形成し得る。加えて、高い結合親和性を保持するために、ヒトアクセプター配列中のアミノ酸は、例えば（1）アミノ酸がCDR中にある、または（2）アミノ酸がヒトフレームワーク領域中にある（例えばアミノ酸がCDRのうちの1つにじかに隣接する）、ドナー

10

20

30

40

50

配列からの対応するアミノ酸によって、置き換えられ得る。ヒト化抗体の構築のための詳細なインストラクションを提供する、米国特許第5,530,101号及び同第5,585,089号(参照により本明細書に援用される)を参照されたい。ヒト化抗体は、多くの場合マウス抗体からすべての6つのCDR(例えばKabatatによって定義されるように、しかし多くの場合Chothiaによって定義されるとように超可変ループH1も含む)を取込むが、それらは、より少ない数のマウスCDR及び/または完全なマウスCDR配列よりも小さなもの(例えばCDRの機能的断片)によっても作製することができる(例えばPascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320:415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al., Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000)。

【0162】

典型的には、本明細書において提供されるようなヒト化抗体は、(i)マウス抗体からの少なくとも1つのCDR(多くの場合3つのCDR)(本明細書においてマウスCDRとも称される)及びヒト可変領域フレームワークを含む軽鎖可変領域;ならびに(ii)マウス抗体から少なくとも1つのCDR(多くの場合3つのCDR)及びヒト可変領域フレームワーク(FR)を含む重鎖可変領域を含み得る。軽鎖及び重鎖の可変領域フレームワーク(FR)は各々、成熟ヒト抗体可変領域フレームワーク配列(またはその断片)、生殖細胞系可変領域フレームワーク配列(J領域配列と組み合わせて)(またはその断片)であり得る。随意に、ヒト化抗体は、(i)中で記載されるような軽鎖可変領域、(ii)中で記載されるような重鎖可変領域を、軽鎖ヒト定常領域及び重鎖ヒト定常領域と一緒に、含む。

【0163】

キメラ抗体は、マウス(または他の齧歯動物)抗体の可変領域がヒト抗体の定常領域と組み合わせられる抗体であり;遺伝子操作を用いたキメラ抗体の構築は周知である。かかる抗体はマウス抗体の結合特異性を保持する一方で、約3分の2はヒトである。マウス抗体、キメラ抗体及びヒト化抗体中に存在する非ヒト配列の比率は、キメラ抗体の免疫原性がマウス抗体とヒト化抗体との間の中間であることを示唆する。マウス抗体に比べて低減された免疫原性を有し得る他のタイプの遺伝子操作抗体としては、ファージディスプレイ法を使用して(Dower et al., WO91/17271; McCafferty et al., WO92/001047; Winter, WO92/20791; 及びWinter, FEBS Lett. 23:92, 1998、その各々は参照により本明細書に援用される)、または遺伝子導入動物を使用して(Lonberg et al., WO93/12227; Kucherlapati WO91/10741、その各々は参照により本明細書に援用される)、作製されたヒト抗体が挙げられる。

【0164】

ヒト化抗体をデザインする他のアプローチを使用しても、米国特許第5,530,101号及び同第5,585,089号中の方法と同じ結果を達成することができる。例えば、Tan et al., J. Immunol. 169:1119, 2002及び米国特許第6,881,557号またはStudnicak et al., Protein Eng. 7:805, 1994の方法中で記載されるような超ヒト化である。さらに、遺伝子操作された低減された免疫原性のmAbを産生する他のアプローチとしては、例えばVaswami et al., Annals of Allergy, Asthma and Immunology 81:105, 1998; Roguska et al., Protein Eng. 9:895, 1996;ならびに米国特許第6,072,035号及び同第5,639,641号中で記載されるような、再成形(reshaping)、超キメラ化、及びベニヤ化(veneering)/表面再建(resurfacing)が挙げられる。

【 0 1 6 5 】

開示される方法及び組成物のために使用され得るか、それらと併用して使用され得るか、それらの調製において使用され得るか、またはそれらの産物である、材料、組成物及び構成要素が開示される。これら及び他の材料は本明細書において開示され、これらの材料の組み合わせ、サブセット、相互作用及び群などが開示される場合に、これらの化合物の各々の様々な個別の及び集合的な組み合わせ及び順列の具体的な参照が明示的に開示されなくてもよいが、各々は本明細書において具体的に企図及び記載されることが理解される。例えば、方法が開示及び検討され、多くの分子へ行われ得る多くの修飾（方法を含む）が検討されるならば、各々及びすべての方法の組み合わせ及び順列ならびに可能な修飾は、相反することが具体的に指摘されない限り、具体的に企図される。同様に、任意のサブセットまたはこれらの組み合わせも具体的に企図及び開示される。この概念は、本開示のすべての態様（開示される組成物を使用する方法におけるステップが挙げられるがこれらに限定されない）へ適用される。したがって、遂行され得る多様な追加のステップがあるならば、任意の具体的な方法ステップまたは開示される方法の方法ステップの組み合わせにより、これらの追加のステップのうちの各々が遂行され得ること、及び、かかる組み合わせまたは組み合わせのサブセットは各々具体的に企図及び開示されたと判断されるべきであることが理解される。

10

【 0 1 6 6 】

以下の実施例は、本明細書において記載される方法及び組成物の特定の態様をさらに例示することが意図され、特許請求の範囲を限定するようには意図されない。

20

【 実施例 】

【 0 1 6 7 】

実施例 1。ネイティブに折り畳まれた組み換えタンパク質への新規の B A F F 受容体抗体は、薬剤耐性のヒト B 細胞悪性腫瘍をインビボで消失させる。

m A b の開発のために細菌において産生された従来の組み換え免疫原タンパク質は翻訳後修飾を欠如し、原核生物は真核生物と比較してシャペロンタンパク質及び酸化環境を欠如するので、単純化して折り畳まれる。結果として、かかるタンパク質は、対応する原形質膜にアンカーされた天然タンパク質とは立体配座の構造で異なり得る。さらに、抗体は、標的外のドメイン（標的タンパク質の膜貫通ドメインまたは細胞内ドメイン等）に対して作製され得る。本明細書において記載されるように、真核生物細胞上で発現されるネイティブに折り畳まれ糖鎖付加された免疫原に対する m A b を生成する戦略が適用された。特に、ヒト B A F F - R はマウス線維芽細胞上でネイティブタンパク質としてあり、マウスにおける免疫原として操作された細胞クローンを使用した。ヒト悪性 B 細胞株及び原発性リンパ腫をインビトロで特異的に結合及び溶解し、異種の腫瘍モデルにおいて薬剤耐性リンパ腫細胞株の増殖をインビボで阻害する、新規の m A b の生成が本明細書において記載される。

30

【 0 1 6 8 】

材料及び方法

動物、細胞株及び原発性ヒト腫瘍サンプル。抗体開発のために B A L B / c マウス及び N O D s c i d (N S G) 繁殖ペアを、J a c k s o n L a b o r a t o r y (B a r H a r b o r , M E) から購入した。N S G 繁殖コロニーは C i t y o f H o p e の A n i m a l R e s o u r c e C e n t e r によって維持された。マウスは、施設のガイドラインに従って病原体除去動物施設中で飼育した。すべての動物研究は、I n s t i t u t i o n a l A n i m a l C a r e a n d U s e C o m m i t t e e (I A C U C : 1 5 0 2 0) によって承認された。J e K o - 1、S U - D H L - 6、R a j i、U 2 6 6 及び R L は、A T C C (M a n a s s a s (V A)) から購入した。Z - 1 3 8 株は、D r . M i c h a e l W a n g (M D A n d e r s o n C a n c e r C e n t e r) によって提供された。イブルチニブ耐性 S P 4 9 - I R 株は、D r . J i a n g u o T a o (U n i v e r s i t y o f S o u t h F l o r i d a) によって開発され提供された。イブルチニブ耐性 S P 4 9 細胞株 (S P 4 9 - I R) は、漸増用量のイ

40

50

ブルチニブにより細胞を処理することによって確立した。IC50は、SP49-IRについての $>100\text{ nM}$ に比較して、親SP49では 5 nM であった。 100 nM のイブルチニブで、SP49-IR細胞の $>90\%$ と比較して、SP49細胞の約 5% が生存可能であった。ヒトNK-92 176V細胞は、Conkwest Inc. (San Diego, CA) から得た。ヒト血液及び腫瘍のサンプルのために、培養していない原発性ヒトリンパ腫を、 10% のDMSO中で冷凍保存された生存可能な単一細胞懸濁液として、施設内審査委員会に認可されたプロトコル (IRB: 2005-0656) 下で、MD Anderson Cancer CenterのLymphoma Satellite Tissue Bankから得た。原発性患者サンプルは、マントル細胞リンパ腫 (MCL) または慢性リンパ球性白血病 (CLL) に罹患する患者からの白血球除去血輸血または血液、ならびにびまん性大細胞型B細胞リンパ腫 (DLBCL) または濾胞性リンパ腫 (FL) に罹患する患者から切除されたリンパ節を含んでいた。各々のサンプル中の腫瘍細胞は、白血球除去血輸血または血液について $80\% \sim 98\%$ 及びリンパ節生検について $50\% \sim 60\%$ の範囲であった。末梢血単核細胞 (PBMC) は、City of HopeのMichael Amini Transfusion Medicine Centerによって提供された (IRB: 15283)。

【0169】

ヒトBAFF-R発現マウス線維芽細胞の生成。ヒトBAFF-R (hBAFF-R) cDNAはヒトB細胞からのものであり、pEGFP-N1ベクター (Takara/Clontech, Mountain View, CA) 上のGFP遺伝子とインフレームでクローン化した。hBAFF-R cDNA配列をNCBI遺伝子配列データベース (遺伝子識別番号: 115650) に対して確認した。hBAFF-R-GFP融合物をコードするcDNAを、続いてレンチウイルス遺伝子送達系 (pLenti6/V5-DEST Gateway Vector kit, Life Technologies, Grand Island, NY) の中へクローン化して、マウス線維芽細胞 (L) 細胞の中へ形質導入された場合にhBAFF-R-GFP融合タンパク質を産生させる。単一細胞クローンを、選別したGFP陽性のL細胞から確立し、(h)BAFF-R-GFP発現L細胞クローンD2Cをさらなる研究において使用した。

【0170】

抗体産生ハイブリドーマ。2匹の6週齢のBALB/cマウスを、D2C細胞の5回の脚パッドの皮下注射によって3日ごとに1回で免疫付与した。血液サンプルを両方のマウスから得て、D2Cに対する血清抗体をELISAによって測定した。脾臓組織を20日目に収穫した。収穫した脾細胞をSp2/0骨髓腫と融合してハイブリドーマを確立し、D2Cまたは親L細胞をコーティングしたプレートを使用して、抗体についてELISAスクリーニングをした。免疫付与及びハイブリドーマの手順は、MD Anderson Cancer CenterのAntibody Core Facilityで遂行した。

【0171】

キメラ抗体産生。抗体の軽鎖及び重鎖の可変領域をコードする、選択されたハイブリドーマからのcDNAを、それぞれのヒトIgG1定常領域を含有する発現ベクターの上へ操作した。ベクターを、製造者の指示に従って、FreeStyle 293発現系 (Life Technologies, Carlsbad, CA) の中へ共トランスフェクションした。培養上清中の抗体を、製造者の指示に従って、HiTrapプロテインA親和性クロマトグラフィーカラム (GE Healthcare, Marlborough, MA) によって精製した。

【0172】

細胞毒性アッセイ。標的細胞 (L細胞、ヒト腫瘍株、原発性患者サンプル) を、 51Cr 放出アッセイのためにクロム-51 (51Cr , Perkin Elmer, Waltham, MA) により標識した。簡潔には、抗体及びエフェクター (NK細胞または補体血清スタンダード [Sigma Aldrich (St. Louis), MO]) を、標識された標的細胞へ添加し、18時間までインキュベーションした。NK細胞をPBMCか

10

20

30

40

50

らエンリッチした (NK cell enrichment kit、Stemcell Technologies、Vancouver、カナダ)。上清の中へ放出された ^{51}Cr を、Wizard Automatic Gamma Counter (Perkin Elmer) により検出した。

【0173】

JeKo-1-CD20-KOの生成。FACS選別された安定的なJeKo-1-CD20-KOを、製造者の指示に従って、CD20-CRISPR/Cas9及びHDR Plasmid Systems (Santa Cruz Biotechnology、Santa Cruz、CA) を使用して生成した。CD20ノックアウトは、フローサイトメトリー及びウエスタンブロットによって検証した。

10

【0174】

インピボの研究。腫瘍モデルのために、安定的なルシフェラーゼ発現腫瘍株をマウスモデルにおける生物発光画像化のために確立した。簡潔には、ルシフェラーゼ遺伝子を、レンチウイルス遺伝子送達系 (pLenti7.3/V5-DEST Gateway Vector Kit、Life Technologies、Carlsbad、CA) によって腫瘍株の中へ導入した。1マウスあたりの最小致死用量を、用量力価測定によって各々の腫瘍細胞株について決定した。腫瘍細胞を静脈内 (IV) 注射し、インピボの生物発光画像化によってマウスをモニタリングして最小腫瘍用量の生着を確実にした。最小致死腫瘍用量は、 1×10^6 のJeKo-1細胞、 5×10^5 のRS4;11細胞、 5×10^5 のJeKo-1-CD20-KO細胞、または 2.5×10^4 のZ-138細胞であった。

20

【0175】

生物発光画像化：イソフルランによりマウスに麻酔をかけ、画像化の10分前に腹腔内 (IP) 注射経路で 150 mg/kg のD-ルシフェリン (Life Technologies、Carlsbad、CA) を投与した。画像化は、AmiX imaging system (Spectral Instruments Imaging、Tucson、AZ) 上で遂行した。

【0176】

抗体研究：マウス (1群あたり $n = 5$) に、5日ごとに1回の4回の治療の3日前に、IVで腫瘍を攻撃投与した。治療は、 $300 \mu\text{L}$ のIV注射 ($200 \mu\text{g}$ の治療抗体、 10×10^6 のエフェクターヒトNK-92-176V細胞、及び $5 \times 10^4 \text{ IU}$ のIL-2 (Prometheus Laboratories、San Diego、CA)) であった。対照群は、対照抗体有り、または抗体及び/もしくはNK細胞無しで、同じ体積の注射を受けた。生物発光画像化は毎週で80日目まで遂行した。生存は腫瘍攻撃投与100日後まで追跡した。

30

【0177】

結果

ヒトBAFF-Rに対するモノクローナル抗体の生成。BAFF-Rの生物学的に意義のあるエピトープへの治療抗体を生成するために、真核生物細胞表面発現系が使用され、そこで、内在性細胞表面タンパク質は、適切な翻訳後修飾によりそれらのネイティブな立体配座で提供される。マウス線維芽細胞 (L) 細胞クローンを、細胞表面GFPTag付加されたヒトBAFF-Rを発現するように操作した。BAFF-R発現L細胞クローンを生成し、GFPTag発現について特徴づけた (図1A)。クローンD2Cを増やし、これを使用して、方法及び図7A中で免疫付与スケジュールに従ってBALB/cマウスに成功裡に免疫付与した。

40

【0178】

ハイブリドマクローンを生成及びスクリーニングした後に、4つのクローン (53、55、67及び90) が、BAFF-Rを発現するL細胞を特異的に結合するが親L細胞と結合しない抗体を産生すると同定された (図7B)。すべての4つのクローンの上清は、BAFF-R発現Mino細胞株 (MCL) を用量依存的様式で結合する抗体を含有した。抗体結合はBAFF-R陰性対照細胞株 (293T) において検出されなかった (図8

50

）。

【 0 1 7 9 】

4つのハイブリドーマ上清からの抗体をプロテインA親和性クロマトグラフィーによって精製した。精製された抗体は、M i n o細胞（図9）に加えて、他のヒトMCL株（J e K o - 1、R E C - 1、ならびにイブルチニブ耐性J V M - 1 3及びZ - 1 3 8が挙げられる）（図1B）を用量依存的様式で結合した。

【 0 1 8 0 】

4つの抗体上の相補性決定領域（C D R）の分析から、クローン53、55及び67はほぼ同一の配列を有するが、クローン90がユニークであることが明らかにされた。したがって、クローン55及び90をさらなる調査のために選択した。両方のクローン55及び90は、高濃度（2 μ g / 10⁶細胞）及び低濃度（0.05 μ g / 10⁶細胞）で、J e K o - 1（MCL）、S U - D H L - 6（DLBCL）、R a j i（バーキットリンパ腫）、及びR L（FL）を有効に結合した（図10）。

10

【 0 1 8 1 】

ヒトB A F F - Rに対するキメラmAbは、インビトロ及びインビボで抗腫瘍効果を誘導した。クローン55及び90を、ヒトI g G 1定常領域を含有するそれぞれのキメラmAbへとさらに発展させた（C55及びC90と称される）。キメラ抗体は、B A F F - R発現L細胞への特異的な用量依存的結合を保持した（図1C）。C55及びC90はA l e x a F l u o r 488へコンジュゲートされ、非ホジキンリンパ腫（NHL）株のJ e K o - 1、S U - D H L - 6、R a j i、及びR Lへの直接結合を表わした（図1D）。重要なことには、キメラmAbは、MCL、DLBCL、及びFLの患者原発性腫瘍サンプルを容易に結合した（図1E及び図11）。

20

【 0 1 8 2 】

C55及びC90は、特異的にB A F F - R発現L細胞及びJ e K o - 1に対する抗体依存性細胞媒介性細胞毒性（ADCC）を誘発したが、B A F F - R陰性L細胞及びB A F F - R陰性ヒト多発性骨髄腫株（U266）では誘発しない（図2A及び図12）。これとは対照的に、抗体はインビトロで補体依存性細胞傷害（CDC）を誘発しなかった（図2B）。S U - D H L - 6、R a j i及びR Lリンパ腫細胞株について示されるように、細胞毒性にはNK細胞の添加が要求され（図2C及び図13）、抗体媒介性細胞毒性の主要なメカニズムとしてADCCが示唆された。重要なことには、キメラ抗体は原発性患者腫瘍サンプルに対してADCCを誘発した（図3A）。

30

【 0 1 8 3 】

抗体はB A F F / B A F F - R結合を用量依存的様式で阻害し（図14）、腫瘍細胞におけるB A F F / B A F F - R生存シグナリングの破壊の可能性が示唆された。さらに、C55及びC90は、B A F F - Rの結合に際して限定的なインターナリゼーションを示した（図15）。

【 0 1 8 4 】

インビボで、NSGマウスにルシフェラーゼノックインJ e K o - 1 MCL細胞株を攻撃投与し、後続して、抗体による治療を行った。治療は、図4A中のスケジュールに従った。PBSまたはNK細胞単独の対照群と比較して、C55またはC90のいずれかを投与したマウスは、腫瘍増殖の有意な遅れを実証した（図4B）。同様に、C55及びC90は、リツキシマブまたは対照による阻害がないことと比較して、RS4;11（急性リンパ芽球性白血病（ALL））を攻撃投与したNSGマウスにおいても腫瘍増殖を著しく遅らせた（図4C）。

40

【 0 1 8 5 】

キメラmAbは、薬剤耐性リンパ腫に対して強力な抗腫瘍効果をインビトロ及びインビボで誘導した。以前にリツキシマブにより治療された患者からの原発性のCLL（n=3）及びMCL（n=2）サンプルに対して、抗体をさらに試験した。5つの原発性サンプルはすべてC55及びC90によるADCCによる殺傷に感受性があり、リツキシマブへの曝露後の臨床的に進行した腫瘍に対するそれらの有効性を示唆した（図3B）。

50

【0186】

薬剤耐性のリンパ腫のモデルを作成するために、J e K o - 1 の安定的な C D 2 0 ノックアウト (K O) クローンを C R I S P R / H D R 系を使用して生成した。C D 2 0 - K O クローンは、フローサイトメトリー及びウエスタンブロットによる C D 2 0 表面発現の非存在 (図 5 A ならびに図 1 6 A 及び 1 6 B) 及びフローサイトメトリーによる B A F F - R 表面発現の存在 (図 1 6 C) について確認した。さらなる研究のために選択された J e K o - 1 - C D 2 0 - K O クローン 2 5 は、C 5 5 及び C 9 0 に媒介される A D C C への感受性を保持したが、抗 C D 2 0 リツキシマブによって媒介される細胞毒性へ非感受性になった (図 5 B) 。

【0187】

薬剤耐性リンパ腫の第 2 のモデルとして、キメラ B A F F - R m A b を、天然のイブルチニブ耐性ヒト M C L 株 (Z - 1 3 8)、及び誘導されイブルチニブ耐性 M C L 株 (S P 4 9 - I R、イブルチニブへの耐性をインビトロで誘導された (方法を参照)) に対する A D C C について試験した。有意なインビトロの A D C C が、両方のイブルチニブ耐性株に対して、抗体により観察された (図 5 C) 。

【0188】

最終的に、J e K o - 1 - C D 2 0 - K O 腫瘍細胞の I V によるインビボの攻撃投与の 3 日後に、N S G マウス (1 群あたり n = 5) に、方法中で記載されるように、及び図 4 A 中のスケジュールに従って、B A F F - R 抗体治療 (C 5 5 または C 9 0) またはリツキシマブを投与した。20 日目の生物発光画像化は、対照マウス及びリツキシマブ治療マウスにおいて実質的な腫瘍量があるが、B A F F - R 抗体治療群において目視可能な腫瘍はないことを明らかにした (図 6 A)。無腫瘍モニタリング及び長期的な全生存により、両方の B A F F - R 抗体の有意な抗腫瘍効果が確認されたが、リツキシマブではなかった (図 6 C)。同様に、対照 (P B S または N K のみ) と比較して、いずれかの B A F F - R 抗体によるイブルチニブ耐性 Z - 1 3 8 担腫瘍マウスの治療に後続して、有意な効果が観察された (図 6 B ~ C) 。

【0189】

B A F F - R m A b は正常な B 細胞も結合する。正常な P B M C に対して試験された場合に、抗 B A F F - R 抗体 C 9 0 は、任意の T 細胞、N K 細胞、顆粒球または単球を染色せずに、予想されるように B 細胞に対する特異的結合を示した (図 1 7)。陽性染色結果を精製 B 細胞で検証した (図 1 8)。さらに、精製された T 細胞、N K 細胞及びゲートされた骨髄系細胞は結合しないことを示した。

【0190】

本研究の範囲を拡大すると、免疫組織化学研究は、扁桃腺及び脾臓のサンプルでの本発明の抗体の陽性染色を示し、心臓、肺、腎臓及び脳を含む他のすべての重要臓器は染色されなかった (図 1 9 A 及び 1 9 B) 。

【0191】

考察

提供された B A F F - R m A b は、N H L、C L L 及び A L L を含む複数の B 細胞腫瘍タイプに対する単一剤として着実なインビボの抗腫瘍効果を誘発した。さらに、抗体は確立された腫瘍を根絶し、それはインビボで長期の無腫瘍生存を導いた。

【0192】

B A F F - R m A b の差別的な特性は、それらの生成に使用されるアプローチに起因し得る。提供されるアプローチは、免疫付与のためにマウス線維芽細胞上のネイティブの表面タンパク質としてヒト B A F F - R を発現させ、ネイティブに折り畳まれ糖鎖付加された免疫原を提示する可能性を増加させることである。したがって、抗体が、記載される他の抗体とは異なる接近可能なヒト B A F F - R エピトープと結合している可能性は非常に高い。したがって、技術的戦略は、ネイティブに折り畳まれて真核生物的に糖鎖付加されたヒト B A F F - R に対するモノクローナル抗体 (それはインビボで B 細胞腫瘍を特異的に結合、溶解及び阻害する) の生成について実証された。これらの結果から、

10

20

30

40

50

インビトロの活性のために m A b に加えて N K 細胞が要求されたので、本発明の m A b の主要な抗腫瘍メカニズムは A D C C であることが示唆され（図 2）； C D C の証拠は観察されなかった。両方の抗体は、 B A F F リガンドが B A F F - R へ結合することを競合的に阻害することができた（図 1 4）。

【 0 1 9 3 】

リツキシマブへの耐性の 1 つの臨床的に意義のあるメカニズムは、 C D 2 0 のダウンレギュレーションである。薬物耐性のこの現象は、 C R I S P R 編集 M C L 株（ J e K o - 1、それは C D 2 0 を欠損する）によりモデル化された。この株に対して、及び同様に天然のイブルチニブ耐性 Z - 1 3 8 M C L に対しての、 C 5 5 または C 9 0 の有意なインビボの抗腫瘍効果（しかしリツキシマブ治療ではその効果はない）は、薬物耐性リンパ腫に対する有効性を示唆する（図 5）。以前にリツキシマブにより治療され、それへの応答が進行したリンパ腫患者からの原発性腫瘍に対するこれらの抗体のインビトロの細胞毒性を総合すると、これらのデータは、薬物耐性を克服する治療戦略としての C 5 5 及び C 9 0 の可能性を示唆する（図 3）。

【 0 1 9 4 】

実施例 2。 B A F F - R m A b のヒト化。

キメラ抗体（クローン 9 0）は、その結合特異性及び細胞毒性効果を保持しながらヒト化された。 C D R のコンピューター分析及び予測された構造を介して、重鎖の 3 つのバリエーション及び軽鎖の 3 つのバリエーションを、変動するヒト抗体への類似度により産生した。合計 9 つの組み合わせのバリエーションを、ヒト化された重鎖及び軽鎖から構築した。これらのバリエーションはすべて、 2 . 6 ~ 5 . 0 n M の範囲の K_D 値であり、結合親和性において親キメラ抗体に匹敵することが証明された（表 1）。

【表 1】

表 1。ヒト化 BAFF-R 抗体バリエーションの結合親和性

ローディングサンプル ID	サンプル ID	KD (M)	K _{on} (1/Ms)	K _{off} (1/s)	全 R ²	全 X ²
キメラ親	BAFF-R	3.0E-09	9.9E+05	2.0E-03	0.0049	0.9809
ヒト化 HC1 + LC1	BAFF-R	4.0E-09	6.1E+05	2.4E-03	0.0114	0.9619
ヒト化 HC1 + LC2	BAFF-R	3.7E-09	6.2E+05	2.3E-03	0.005	0.9800
ヒト化 HC1 + LC3	BAFF-R	5.0E-09	4.1E+05	2.1E-03	0.0125	0.9565
ヒト化 HC2 + LC1	BAFF-R	2.6E-09	7.7E+05	2.0E-03	0.0051	0.9790
ヒト化 HC2 + LC2	BAFF-R	3.6E-09	6.1E+05	2.2E-03	0.0047	0.9799
ヒト化 HC2 + LC3	BAFF-R	3.2E-09	8.2E+05	3.1E-03	0.0045	0.9821
ヒト化 HC3 + LC1	BAFF-R	3.8E-09	8.2E+05	3.1E-03	0.0045	0.9821
ヒト化 HC3 + LC2	BAFF-R	3.1E-09	1.2E+06	3.7E-03	0.0074	0.9793
ヒト化 HC3 + LC3	BAFF-R	3.4E-09	6.8E+05	2.3E-03	0.0025	0.9900

【 0 1 9 5 】

9 つの候補抗体をさらに査定し、最有力候補を決定した。ヒト化抗体の結合は B A F F - R への特異性を有し、すべてのものは用量依存的様式の類似の相対的結合を有することが観察された（図 2 0 A）。加えて、ヒト化抗体の A D C C 効果を査定した。この場合もやはり、ヒト化候補は特異的な細胞毒性を維持し、キメラ対照及びリツキシマブと比較して、同じように良好に動作したことが見出された（図 2 0 B）。

【 0 1 9 6 】

ヒト化クローン 9 0 バリエーション 4 及び 5 をさらなるインビトロ試験のために選択した。ヒト化抗体バリエーションをピオチン化し、蛍光ストレプトアビジンプローブにより可視化した。様々な非ホジキンリンパ腫株、リンパ芽球性白血病株、及び多発性骨髄腫株（ J e K o - 1、 L y - 1 0、 M E C - 2、 R L、 R S 4、 R a j i、 Z 1 3 8 及び U 2 6 6 が含ま

れる)に対するそれらの結合を査定した(図22A)。フローサイトメトリーの結果から、これらの細胞株の各々への有意な結合が明らかにされる。正常なPBM Cに対するヒト化バリエーションによるさらなるフロー分析から、結合における特異性が示される。正常で健康なPBM C中の顆粒球、単球、B細胞、T細胞及びNK細胞の結合について査定した場合に、抗体はB細胞集団のみと結合する(図22B)。

【0197】

2つのバリエーションを、ADCCを開始する能力についてさらに査定した。クロム取込みの期間後に、Jeko-1株、Z138株及びRS4株へ、濃度を変動させて抗体を投与した。細胞及び抗体をエフェクターNK細胞と共にインキュベーションした。上清を治療の6時間後に分析した(図21A)。抗体は、腫瘍株に対する明らかな細胞毒性効果を有し、各々の10倍希釈による用量依存性を実証する。結果はリツキシマブのものに匹敵するが、リツキシマブが活性のないRS4急性リンパ芽球性リンパ腫においても観察することができる。LY-10、MEC-2、RL及びRajiによるさらなるアッセイ(図21B)を継続して、ヒト化抗体治療の効力を実証した。見出されたすべての結果は、リツキシマブによる現行の従来の治療のものに匹敵した。

【0198】

実施例3。キメラ抗原受容体T細胞。

高い結合親和性及び生物活性を備えた抗体を使用して、インビボの研究のためのキメラ抗原受容体(CAR)T細胞を構築した。重鎖可変ドメイン及び軽鎖可変ドメインのためのDNA配列を一本鎖(sFv)フォーマットへとアレンジし、4-1BBモチーフと一緒にT細胞シグナル伝達ドメイン(鎖)へ操作した。操作されたCAR遺伝子を共発現GF Pと一緒に、精製された健康なドナー由来のCD8+ T細胞の中へレンチウイルス経路で導入した。CAR-T細胞をGF Pの発現について細胞選別し、動物研究のためにCD3及びCD28のビーズによりインビトロで増やした。NSGマウスに、ルシフェラーゼを発現するJeko-1 MCL株(Jeko-1-luci)を攻撃投与した。腫瘍を発達させ、腫瘍細胞の目視可能な集団が観察されるまで、生物発光画像化によってモニタリングし、それはおよそ腫瘍攻撃投与の9日後であった。マウスに、腫瘍攻撃投与の9及び15日後に、 5×10^6 のCAR-T細胞(抗BAFF-R及び抗CD19)の2回の用量を投与した。対照群に、無処理のT細胞または食塩水(PBS)を投与した。CAR-T療法の治療的抗腫瘍効果を評価するために、マウスを3日ごとに厳密にモニタリング及び画像化して腫瘍発達を追跡した。

【0199】

ヒト化抗BAFF-R mAbを、それらの結合及び細胞毒性について原発性患者腫瘍サンプルに対してさらに査定した。3つのマントル細胞リンパ腫の患者サンプルは、腫瘍細胞の大多数がBAFF-Rを発現することにより特徴づけられた。フローサイトメトリーの結果から、本発明のヒト化抗体によって結合されるこれらの原発性腫瘍細胞の別個の集団が明らかになる(図22A)。さらに、同じ原発性腫瘍サンプルに対するクロム放出細胞毒性アッセイから、対照に比較して、高い特異性の殺傷が明らかにされた。結果はリツキシマブの効果に匹敵し、以前に開発されていたキメラ抗体と一致していた(図22B)。ヒト化抗体の細胞タイプ特異性を、正常なPBM Cへのそれらの結合の査定によって決定した。感知可能な結合は、PBM Cの主な群(顆粒球、単球、T細胞及びNK細胞が挙げられる)について指摘されなかった。B細胞集団は抗体によって結合される唯一の検出可能な集団であった(図23)。このアッセイの結果も、以前に特徴づけられたキメラ抗体と一致している。

【0200】

抗BAFF-R mAbをさらに使用して、キメラ抗原受容体(CAR)T細胞を作成する。実験は、一本鎖(sFv)フォーマットへと操作されたキメラC55可変領域を利用した。抗BAFF-R C55 sFvを4-1BBモチーフを含有するT細胞受容体シグナル伝達ドメインへ添付し、PBM Cから単離された健康な正常なヒトドナーCD8+ T細胞の中へ成功裡に導入した。CAR-T細胞を、感知できる腫瘍量を持った担腫瘍マ

10

20

30

40

50

ウスへ投与した（図24）。食塩水または非操作T細胞の対照群のいずれかに比較した場合に、抗BAFF-R CAR-T細胞により治療されたマウスは有意な腫瘍クリアランスを有していた。加えて、本発明のCAR-T細胞の抗腫瘍効果は、抗CD-19 CAR-T治療群のものに匹敵する。

【0201】

キメラ抗BAFF-R抗体C90を複数のバリエーションによりヒト化した。ヒト化プロセスは、キメラ抗体の可変領域及び特にCDRの分析を考慮に入れた。そこから、各々の重鎖及び軽鎖について3つのバリエーションを、1（最もヒト）から3（キメラに対して最も保存的）の範囲で変動するヒトへの類似度で開発した。バリエーションを組み合わせることで9つのバリエーションを生成した。Biacore分析を、各々のバリエーションに加えてキメラの親C90で遂行して、それらの平衡解離定数 K_D を決定した。抗原は、商業的な組み換えヒトBAFF-Rの細胞外ドメインであった。

【0202】

実施例4。BAFF-R CARの発現のためのT細胞集団の調製。

以下のT細胞集団：CD4+ナイーブT細胞（CD4+ T_N）、CD8+ナイーブT細胞（CD8+ T_N）、CD8+セントラルメモリーT細胞（CD8+ T_{CM}）、CD8+メモリー幹細胞（CD8+ T_{SC}）、及び汎T細胞（汎T）を、BAFF-R CARの発現のために調製した。簡潔には、5mLの血液サンプルを5mLのhistopaque-1077（Sigma Aldrich）へ添加した。混合物を2500RPMで20分間遠心分離した（室温（RT）、ブレーキ無し）。中間の末梢血単核細胞（PBMC）層を収集し、50mLのPBS（Corning）により洗浄し、1500RPMで5分間遠心分離した（RT）。収集した細胞を、10mLのRBC溶解バッファー（Qiagen）と組み合わせ、7分間インキュベーションした。次いで細胞をPBSにより洗浄し、5分間遠心分離した（1500RPM、RT）。

【0203】

様々なT細胞集団を、StemCell Technologies, Inc. から入手可能な以下のキット：EasySep（商標）Human Naive CD4+ T Cell Enrichment Kit（CD4+ T_N）、EasySep（商標）Human Naive CD8+ T Cell Enrichment Kit（CD8+ T_N）、及びEasySep（商標）Human T Cell Enrichment Kit（汎T）を使用して製造者のインストラクション通りに調製した。CD8+ T_{CM}を、StemCell Technologies, Inc.（Vancouver, CA）からのEasySep（商標）Human CD8+ T Cell Enrichment Kitを使用して製造者のインストラクション通りに、CD8+ T細胞を単離することによって調製し、次いでCD8-PerCP-Cy5.5、CD45 RO-APC及びCD62L-PEにより染色した。次いで染色した細胞を選別して、CD8+/CD45+/CD62L+の三重陽性細胞を単離した。CD8+メモリー幹細胞（CD8+ T_{SC}）を、表1中で示される培養条件を使用して、CD8+ T_Nから生成した。他のT細胞集団を、表1中で示されるように培養した。

10

20

30

40

50

【表 2】

表 1				
集団	培地	血清	サイトカイン	追加の添加物
CD4+ T _N , CD8+ T _N , CD8+ T _{CM} 汎 T	X-VIVO 15 (Lonza)	10% ヒト Ab 血清 (Valley Biomedical)	100 U/mL hIL-2	100 U/mL ペニシリン 100 μg/mL ストレプトマイシン
CD8+ MSC	AIM-V (Thermo Fisher)	5% ヒト Ab 血清 (Valley Biomedical)	5 ng/mL IL-7 30 ng/mL IL-21 (Cellgenix)	2 mM glutamax (Thermo Fisher Scientific) 5 mM TWS119 (Cayman Chemical)

10

【0204】

実施例 5。BAFF-R を発現するレンチウイルスベクターの調製。

2つの異なるBAFF-R CARを構築した。各々は、CD3シグナル配列、後続して、BAFF-R scFv、CD8a膜貫通ドメイン（追加の細胞外アミノ酸及び細胞質アミノ酸を有する）、4-1BB共刺激ドメイン、及びCD3シグナル伝達ドメインを含んでいた。様々な領域は、以下のアミノ酸配列：

20

CD3シグナル：MLLLVTSLLLC E L P H P A F L L I P（配列番号39）

追加の細胞外アミノ酸配列及び細胞質アミノ酸配列を含む、CD8a膜貫通（下線）：

TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL
DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC（配列番号40）

共刺激4-1BB：KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL（配列番号41）

CD3シグナリング：RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNE LNLGRREEYDVLDKRRGRDP EMGGK PQR RKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALLPPR（配列番号42）

30

を有する。

【0205】

H90 CARは、以下のscFv配列：

VQLQESGPGGLVKPSQTLSTCTVSGDSITSGYWNWIRQHP
GKGLE YIGYISYSGSTYYNPSLKSRVTISRDT SKNQYSLK
LSSVTAADTAVYYCASPNYPFYAMDYWGQGT LVT VSSGGG
GSGGGGSGGGGSDIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASES
VDNYGISFMNWFQQKPGQAPRL LIYAASN RATGIPARFSG
SGSGTDFTLTIS SLEPEDFAVYYCQQSK E V P W T F G G G T K V
EIKR（配列番号43）

40

を有する。

【0206】

H55 CARは、以下のscFv配列：

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSLTSGMGVGVWR
QSPGKGLEWVAHIWDDDKYYADSVKGRFTISADTSKNTA
YLQMNSLR AEDTAIYYCSR SFGYGLDYWGQGT LVT VSSGG
GGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPILL S ASVGD RVTITCRASK
SVSTSGYSYMHWYQQR TNGSPRL LIYLVSNLES GVP S R F S

50

G S R S G T D F T L T I S S L Q P E D E A D Y Y C H Q F S E L P W T F G A G T K
V E I K R (配列番号 4 4)

を有する。

【 0 2 0 7 】

H 9 0 C A R 及び H 5 5 C A R をコードする配列を、製造者のインストラクションに従って p L e n t i 7 . 3 / V 5 - T O P O 発現ベクター (I n v i t r o g e n 、 C a r l s b a d 、 C A) の中へクローン化した。図 2 5 A は、B A F F - R C A R - T 細胞の産生において使用されるキメラ抗原受容体 (C A R) 構築の図解構造である。C A R - T 産生のために T 細胞を感染するのに使用されるレンチウイルスベクター上に、配列モチーフはコードされる。B A F F - R 一本鎖可変断片 (s c F v) は、ヒト化抗 B A F F - R 抗体に由来する。下流の G F P モチーフは選別及び C A R - T 細胞同定の目的のために使用され、C A R シグナリングを妨害しない。

【 0 2 0 8 】

実施例 6。C A R を発現する細胞の調製。

B A F F - R C A R を発現するレンチウイルスベクターによる形質導入のための調製において、1 : 1 のビーズ対細胞の比で C D 3 / C D 2 8 磁気ビーズ (T h e r m o F i s h e r 、 W a l t h a m 、 M A) と細胞を組み合わせ、一晚インキュベーションすること (加湿、5 % の C O ₂ 、3 7) によって、細胞を活性化した。インキュベーション後に、細胞をカウントし、4 8 ウェルプレート中に 1 × 1 0 ⁶ 細胞 / ウェルで播種した。細胞は 1 の M O I で感染させた。各々の事例において、全体の培養培地を 2 5 0 μ L まで補足し、3 0 分間遠心分離した (8 0 0 g 、R T) 。細胞を一晚インキュベーションし (加湿、5 % の C O ₂ 、3 7) 、次いで表 1 中で示される培地中で 1 0 日間培養した。C D 4 + T _N 、C D 8 + T _N 、C D 8 + T _{C M} 、及び汎 T 細胞の培養は、1 : 1 の細胞対ビーズの比で C D 3 / C D 2 8 磁気ビーズを含んでいた。C D 8 + T _{M S C} の培養は C D 3 / C D 2 8 磁気ビーズを含まなかった。B A F F - R C A R の発現は、フローサイトメトリーを使用して、G F P 陽性細胞のパーセンテージによって査定した。

【 0 2 0 9 】

図 2 5 B は、B A F F - R C A R - T 細胞産生に關与する主な活動を示す図解の時系列である。スケジュールは、C D 4 + ナイーブ T 細胞及び C D 8 + ナイーブ T 細胞 (- 1 4 日目) または G F P + C A R - T 細胞 (- 7 日目) を選択する、2 つの細胞単離ステップを含む。第 1 の単離ステップに後続して、2 つの T 細胞亜集団をシミュレートし、B A F F - R C A R レンチウイルスを感染させ、増やした (C D 4 + ナイーブ T 細胞及び C D 8 + ナイーブ T 細胞) 。第 2 の単離ステップに後続して、G F P + C A R - T 細胞を、7 日間さらに増やす。収穫ステップ (0 日目) で、2 つのナイーブ T 細胞に由来する C A R - T 細胞集団を、点滴のために適切な比で組み合わせる。この研究におけるすべての C A R - T 細胞を、所望の T 細胞集団に關してこのスケジュールに従って産生した (単離ステップ、- 1 4 日目) 。

【 0 2 1 0 】

実施例 7。B A F F - R - 標的化 C A R T 細胞によるインビトロの細胞殺傷。

H 9 0 B A F F - R C A R を発現する様々な T 細胞集団を使用するインビトロのアッセイを使用して、マントル細胞リンパ腫細胞の J e K o - 1 細胞 (J e o n e t a l . 1 9 9 8 B r i t i s h J o u r n a l o f H a e m a t o l o g y 1 0 2 : 1 3 2 3) に対する細胞毒性を査定する。この 4 時間の ⁵¹ C r 放出アッセイにおいて、H 9 0 B A F F - R C A R T 細胞を、様々なエフェクター対標的の比で ⁵¹ C r 標識 B A F F - R 陽性標的細胞 (J e K o - 1 細胞) と、または P B M C の陰性対照と共培養した。H 9 0 B A F F - R C A R を、汎 T 細胞、C D 4 + T _N 細胞、C D 8 + T _{C M} 細胞、または C D 4 + T _N 細胞及び C D 8 + T _{C M} 細胞の混合物において発現させた。この分析の結果を図 2 6 中で提示する。各々のエフェクター対標的の比 (E / T) にわたる T 細胞サブセットは、用量依存的細胞毒性を示した。単離された C D 4 + ナイーブ C A R T 細胞 (T _N) は最も低い細胞毒性をもたらした。インビトロの細胞毒性効果は、汎 T 細胞

胞から $T_N + T_{CM}$ (1 : 1 の混合物) へそして最終的に T_{CM} のみへと、 $CD8 +$ セン
トラルメモリー $CAR - T$ 細胞 (T_{CM}) の濃度を増加させると、より大きかった。

【0211】

H90 BAFF-R CAR を発現する $CD8 + T_{CM}$ 細胞を、U266 細胞 (BAFF-R 発現のない多発性骨髄腫；陰性対照)、 $CD3 / CD28$ ビーズ (陽性対照)、または JeKo-1 細胞へ曝露し、細胞の分裂増殖を査定した。この分析の結果は図 27 中で提示され、そこで、H90 BAFF-R CAR を発現する $CD8 + T_{CM}$ 細胞が、JeKo-1 細胞への強い分裂増殖性の応答を表わすことが観察できる。

【0212】

H90 BAFF-R CAR を発現する $CD4 + T_N$ 細胞または $CD8 + T_N$ 細胞を、U266 細胞 (BAFF-R 発現のない多発性骨髄腫；陰性対照)、 $CD3 / CD28$ ビーズ (陽性対照)、または JeKo-1 細胞へ曝露し、細胞の分裂増殖を査定した。図 28A は、細胞の分裂増殖色素 eFluor 670 - 標識 $CAR - T$ 細胞の FACS ヒストグラムを示す。細胞を、示されるような標的細胞 / ビーズによる 72 時間のインキュベーション後に、FACS 分析した。色素強度は細胞の分裂増殖に反比例する。BAFF-R CAR - T 細胞は、BAFF-R 発現腫瘍細胞株の存在下において分裂増殖することができた。図 28B は、示されるような標的細胞 / ビーズと共に 24 時間のインキュベーションに後続する、サイトカイン $IFN - \gamma$ 、 $TNF - \alpha$ 及びグランザイム B の上清濃度の ELISA 測定を示す、グラフである。同種異系の対照を、同じドナーサンプルからの形質導入されない $CD4 + T$ 細胞または $CD8 + T$ 細胞を使用して、並列して遂行した。すべてのデータは 2 つ以上の同一実験の代表である。データは三重サンプルの平均 \pm 標準偏差として示される。BAFF-R CAR - T 細胞は、BAFF-R 発現腫瘍細胞株の存在下においてサイトカイン放出することができた。

【0213】

図 29 は、クロム - 51 放出によって標的細胞の特異的溶解を測定する細胞毒性 T リンパ球アッセイを示す、グラフである。クロム - 51 標識標的細胞 (悪性 B 細胞株または対照、BAFF-R + L 細胞；BAFF-R - 親 L 細胞) を、示されたエフェクター対標的の比で T 細胞とインキュベーションした。BAFF-R CAR - T 細胞は、 $CD4 + T_N$ または $CD8 + T_{CM}$ の単離 T 細胞に由来した。放出されたクロム - 51 を、インキュベーションの 4 時間後の上清中で測定した。すべてのデータは 2 つ以上の同一実験の代表である。データは三重サンプルの平均 \pm 標準偏差として示される。

【0214】

図 29 中で示されるように、BAFF-R CAR - T 細胞は、B 細胞リンパ腫の広範囲のパネルに対して細胞毒性を誘発した。BAFF-R CAR - T についての適応症には、急性リンパ芽球性白血病及び慢性リンパ球性白血病も含まれ得る。BAFF-R CAR に誘導される細胞毒性の特異性は、親 L 細胞では発現されないヒト BAFF-R を発現するように操作されたマウス線維芽細胞 (L) 細胞に対する細胞毒性によって明らかであった。

【0215】

実施例 8。BAFF-R 標的化 CAR のインビボでの査定。

マントル細胞リンパ腫の JeKo-1 異種移植マウスモデル (Klanova et al. 2014 Laboratory Investigation 94 : 806 ; Verner et al. 2015 Leukemia & lymphoma 56 : 3198) を使用して、H90 BAFF-R CAR のインビボの活性を査定した。

【0216】

ルシフェラーゼ (ffluc) 及び緑色蛍光タンパク質 (GFP) を発現するように操作された細胞である、fflucGFP JeKo-1 細胞を、NOD / Scid IL2R Cnu11 (NSG) マウスの中へ静脈内で注射した (マウスあたり 2×10^6 細胞)。腫瘍細胞接種の 10 日及び 17 日後に、マウスに、 1×10^6 の H90 BAFF-R CAR を発現する $CD4 + T_N$ 細胞及び $CD8 + T_{CM}$ 細胞 (左側パネル) または $1 \times$

10

20

30

40

50

10⁶のH90 B A F F - R C A R発現汎T細胞（中央パネル）またはP B S（右側パネル）を静脈内注射した。腫瘍シグナルを、腫瘍細胞の攻撃投与の10、18、22、25、43及び100日後にX e n o g e n画像化によりモニタリングした。画像化結果を、各々の群のパーセント生存を図示する生存曲線（図30B）と一緒に図30A中で提示する。ログランク検定による生存曲線を分析したところ、B A F F - R C A R T細胞治療はP B S対照に比較して（ $P < 0.005$ ）、有意により高い生存をもたらした。

【0217】

生存マウスにJ e K o - 1細胞を再攻撃投与して、付与された記憶免疫及びC A R - T細胞の存続性を試験した。したがって、生存マウス（1群あたり $n = 4$ ）に、100日目に2 × 10⁶のf f l u c G F P J e K o - 1細胞を追加の静脈注射により再攻撃投与した。腫瘍シグナルを、再攻撃投与の11、15及び22日後にX e n o g e n画像化によりモニタリングした。画像化の結果を図30A中で提示する。

【0218】

画像化結果から、確立された腫瘍の消失が明らかにされる。治療コホート中の大多数のマウスは、腫瘍の攻撃投与後100日の経過にわたって長期的な無腫瘍生存を有していた（図30A）。腫瘍画像化から、C D 4 + T N + C D 8 + T C M治療コホートが、汎T C A R - T治療（それは軽減される前により多い腫瘍量を示した）へ比較して、より迅速な抗腫瘍応答を有していたことも示唆される。

【0219】

腫瘍の再攻撃投与において、腫瘍対照マウス（それはすべて攻撃投与後22日で有意な腫瘍量を表わした）に比較して、抗腫瘍効果は容易に明らかであった（図30A）。腫瘍を再攻撃投与したほとんどすべてマウスは腫瘍発達を回避することができ、番号10のマウスのみが22日目までに小さな腫瘍を生じた。マウス9は非腫瘍関連の原因で死亡した。

【0220】

したがって、両方のB A F F - R C A R - T治療群は、腫瘍退縮及び無腫瘍生存を実証した。腫瘍の再攻撃投与は、継続的な抗腫瘍効果を付与することができるインビボのC A R - T存続性を実証する。

【0221】

上で記載される実験において使用されるマントル細胞リンパ腫の同じマウスモデルを使用して、第2のB A F F - R C A R（H55 B A F F - R C A R）の活性をC D 19標的化C A Rに比較した。腫瘍細胞の攻撃投与後9日目に、マウスに、5 × 10⁶のH55 B A F F - R C A Rを発現するC D 8 + T細胞、または5 × 10⁶のC D 19タグ付加C A R発現C D 8 + T細胞、またはP B S（右側パネル）を静脈内注射した。腫瘍シグナルを、腫瘍細胞の攻撃投与の9、11、14及び20日後にX e n o g e n画像化によりモニタリングした。画像化の結果を図31中で提示する。C D 19 C A R - Tに比較した場合に、H55 C A R - Tはより迅速な応答に加えて、より良好に管理された腫瘍量を示した。

【0222】

実施例9。T細胞出発材料を、B A F F - R C A R T細胞治療存続性のためにインビボで至適化した。

ルシフェラーゼ発現J e K o - 1による0日目の静脈内の（I V）腫瘍攻撃投与（1 × 10⁶細胞/マウス）に後続する、N S Gマウスの群（ $n = 5$ ）の生物発光画像。活性化C A R T細胞治療をI Vで点滴した。治療を、10及び17日目（図32A）ならびに10日目のみ（図32B及び32C）に与えた。C D 8 + T C M、T N、またはT S C M C A R - T細胞のいずれかと組み合わせ、C D 4 + T N C A R - T細胞の出発材料及び治療用量について、治療を至適化した。示された治療は、指摘されたT細胞サブセットに由来する、（図32A）2.5 × 10⁶のC D 4 + T N + 2.5 × 10⁶のC D 8 + T細胞、（図32B）2.5 × 10⁶のC D 4 + T N + 1 × 10⁶のC D 8 + T細胞、（図32C）1 × 10⁶のC D 4 + T N + 1 × 10⁶のC D 8 + T細胞、からなるC A R - T細胞である。同じドナーサンプルからの形質導入されていないC D 4 + / C D 8 +

T細胞を同種異系対照として使用し、PBSを腫瘍対照として使用した。非腫瘍関連死が、炎症を示すマウスにおいて観察され；特に、(図32A)CD4⁺TN+CD8⁺TN群(4/5の死)及び(図32B)CD4⁺TN+CD8⁺TSCM群(2/4の死)において観察された。図32B及び32C中の画像については、100日の経過にわたる全生存のカプラン-マイヤープロットも示す。

【0223】

CAR-T細胞産生を、出発材料(ナイーブT細胞(TN)、セントラルメモリーT細胞(TCM)、及びメモリー幹T細胞(TSCM))のために至適化した。治療投薬量の変動(点滴される細胞の数及びCD4細胞対CD8細胞の比)により、細胞点滴数が低減されるにつれて、出発材料の異なる有効性が解明された。最も大きな差が、 1×10^6 のCD4⁺TN細胞+ 1×10^6 のCD8⁺T細胞用量で図32C中で観察され；CD8⁺TN群は、TCM及びTSCMに比較して、より高い生存率を有していた。より低いCAR-T細胞用量では、副作用(サイトカイン放出または移植片対宿主病(GVHD))に起因する可能性の高い炎症)の顕著な低減があった。まとめると、TNから調製されたCAR-T細胞は、TCM及びTSCMから調製されたCAR-T細胞に比較して、良好な持続性を付与し得ることが結論付けられた。

【0224】

実施例9。BAFF-R CAR-Tにより以前に治療したマウスは、腫瘍再投与攻撃に対する持続的CAR-T細胞を実証した。

CD8⁺TN及びCD8⁺TCMの実験群中の図32Bからの生存する無腫瘍マウス(1群あたりn=4)に、追加の治療無しで、初回攻撃投与の100日後に 1×10^6 のJeKo-1細胞を再攻撃投与した。以前に無治療であるNSGマウス(n=5)に、腫瘍対照として同数のJeKo-1細胞を攻撃投与した。生物発光画像を図33A中で示す。各々の実験マウスからの血液を、腫瘍の再攻撃投与の0及び5日目でサンプリングした。白血球をRBC溶解によって血液から単離し、フローサイトメトリーによって検査した。図33Bは、GFP+BAFF-R CAR-T細胞についてゲートし、後続してCD4⁺及びCD8⁺T細胞についてゲートした、白血球の各々の実験群及び日からの代表的なFACSプロットを示す。図33Cは、各々のマウスについて計算及びプロットした、全白血球中のBAFF-R+CAR-T細胞のパーセンテージを示す、グラフである。CD4⁺T細胞集団及びCD8⁺T細胞集団のパーセンテージを各々の積層バー内に示す。

【0225】

腫瘍の再攻撃投与は、継続的な抗腫瘍効果を付与することができるインビボのCAR-T持続性を実証する。特にCD8⁺TN治療群において、無腫瘍生存は、CD8⁺TCM治療群において2匹のマウスのみであったことに比較して、すべての4匹のマウスについて観察された。血液サンプルを分析した場合に、より高いベースラインCAR-T集団及びより高いCAR-T細胞増殖が、CD8⁺TCM治療群に比較して、CD8⁺TNにおいて、腫瘍再攻撃投与に後続して観察された。さらに、測定可能なCD8⁺CAR-T細胞集団がCD8⁺TN治療群において見出された。インビボでの長く続く持続性及び腫瘍刺激に際しての増殖能力は、出発材料としてTNをCAR-T細胞産生のために使用することをさらに支持する証拠である。

【0226】

実施例10。至適化されたBAFF-R CAR-T細胞療法はインビボでCD19耐性腫瘍を消失させる。

ルシフェラーゼ発現Raji-1による0日目の静脈内の(IV)腫瘍攻撃投与(0.5×10^6 細胞/マウス)に後続する、NSGマウスの群(n=5)の生物発光画像。単回の活性化CAR-T細胞治療を、7日目にIVで点滴した。標準的な作業治療用量は、CD4⁺TN 2.5×10^6 +CD8⁺TN 1×10^6 BAFF-R CAR-T細胞またはCD19 CAR-T細胞からなっていた。scFv(抗BAFF-Rまたは抗CD19)でのみ異なる、等価なCARプラットフォームを使用した。同じドナーサンプルからの形質導入されていないCD4⁺/CD8⁺T細胞を同種異系対照として使用し

10

20

30

40

50

、P B Sを腫瘍対照として使用した。画像を、80日の経過にわたる全生存のカプラン - マイヤープロットの隣りで、図34中で示す。

【0227】

以前に至適化されたCAR-T細胞出発材料を使用し、そして図25Aからのベクターの上へ抗CD19 scFvを操作して、CD19 CAR-T細胞を産生し、本発明のBAFF-R CAR-T細胞治療と比較した。以前に研究された侵襲性Raji（バーキットリンパ腫）細胞株は、使用されたCD19 CAR-T細胞治療に耐性があることが観察された。一対一の比較において、両方のCAR-T細胞治療は腫瘍の攻撃投与からおおよそ2週間有効であったことが観察された。しかしながら、BAFF-R CAR-T細胞治療は腫瘍をすべて完全に消失させることができたが、CD19 CAR-T細胞治療は治療21日後に目視可能な腫瘍が増加し始めて失敗した。これらのデータは、BAFF-R CAR-T細胞治療が、現行のCD19標的化治療アプローチを上回る治療であり得ることを示唆する。両方のCAR-T治療は、抗腫瘍応答を誘発し、しばらくの間腫瘍量を低減することができたが、BAFF-R CAR-T細胞は腫瘍が完全に消失するまで存続することができた。

10

20

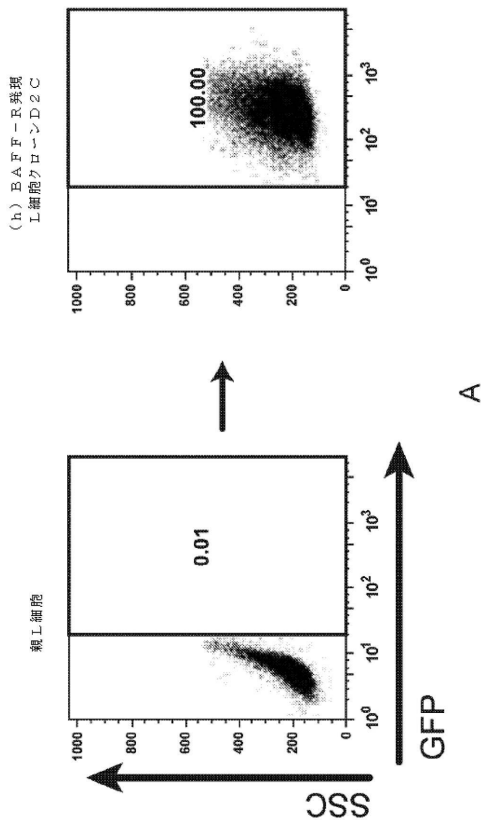
30

40

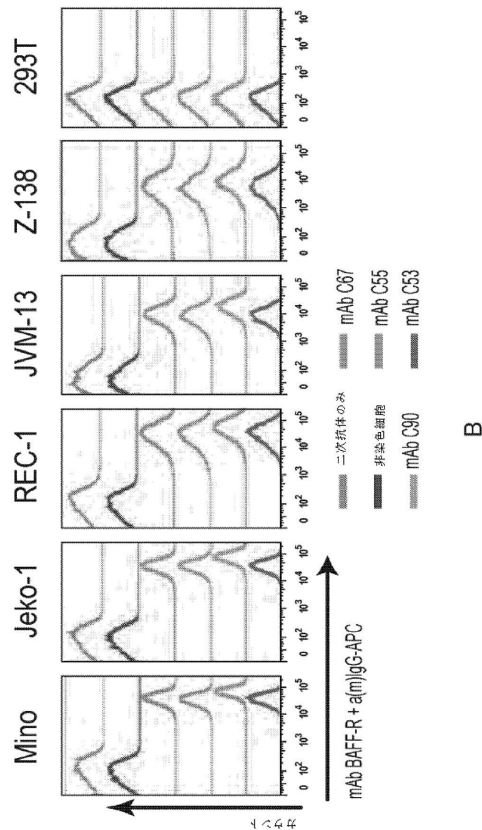
50

【図面】

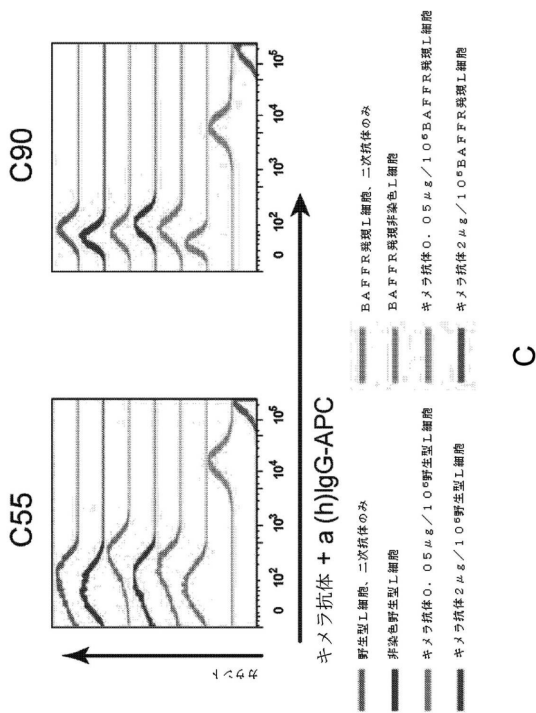
【図 1 - 1】



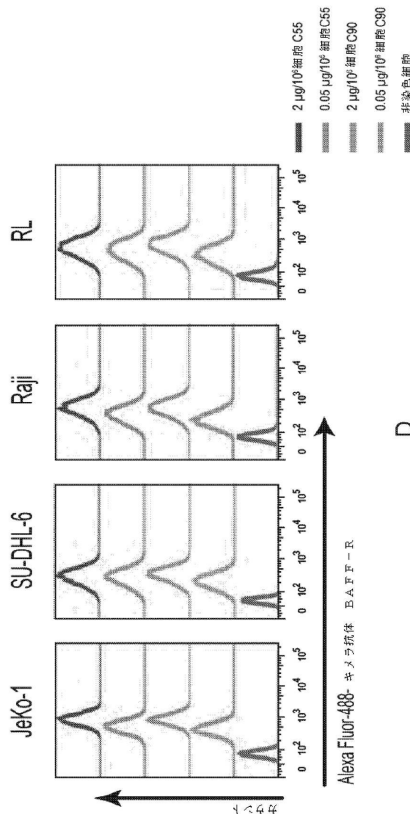
【図 1 - 2】



【図 1 - 3】



【図 1 - 4】



10

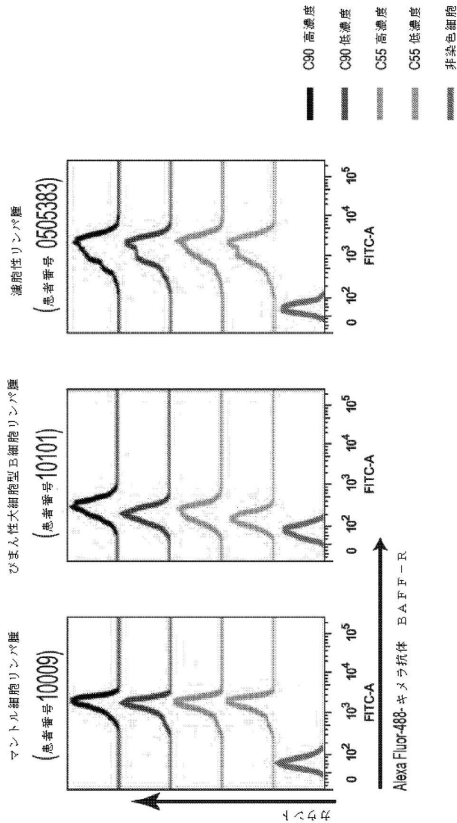
20

30

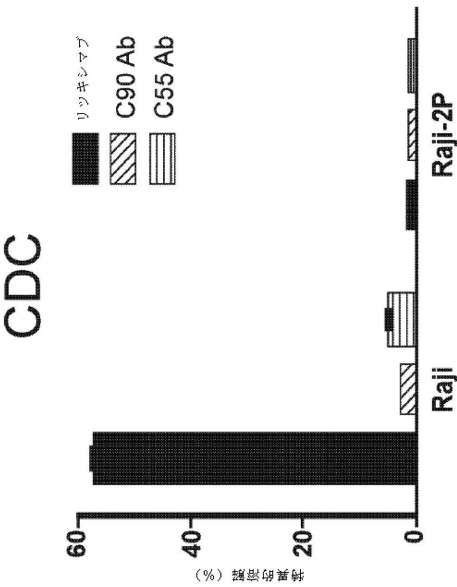
40

50

【図 1 - 5】

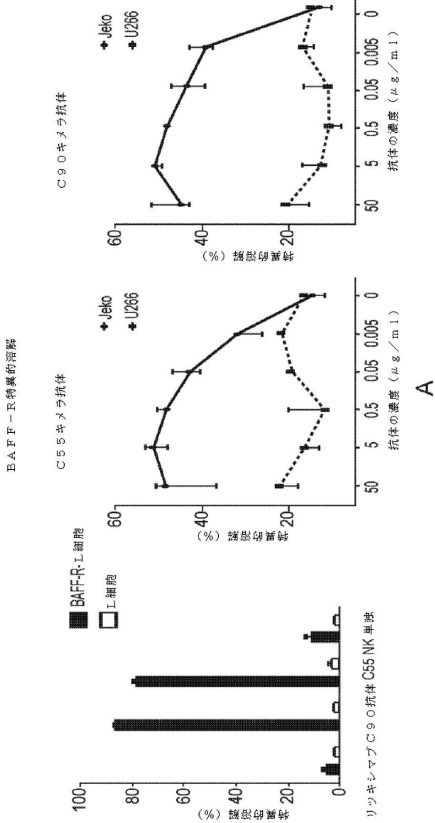


【図 2 - 2】

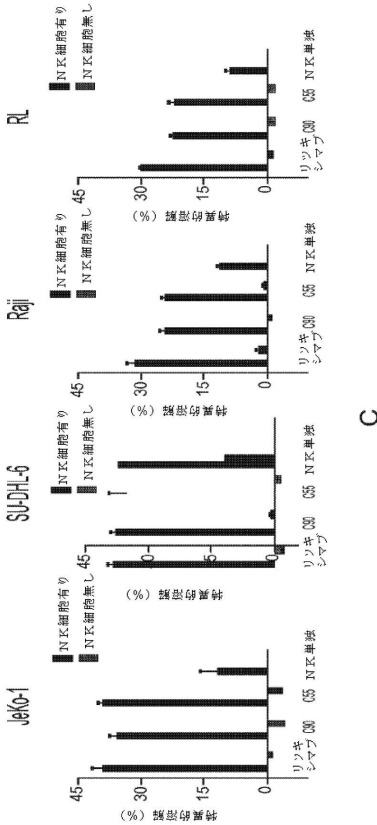


E

【図 2 - 1】



【図 2 - 3】



10

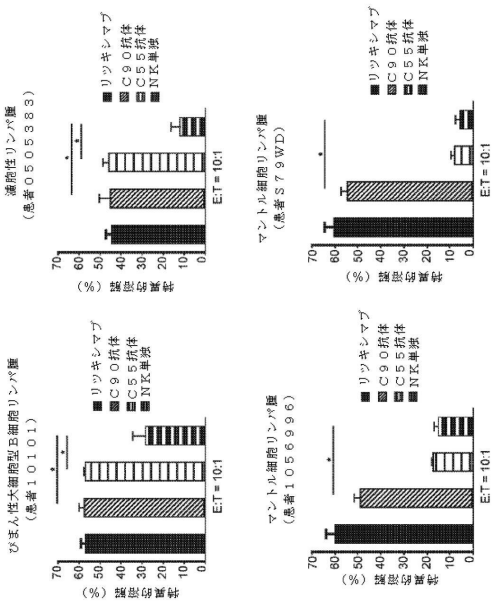
20

30

40

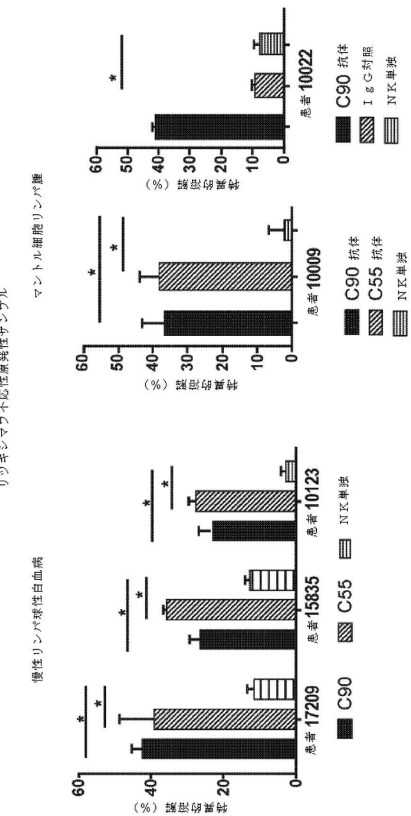
50

【図 3 - 1】



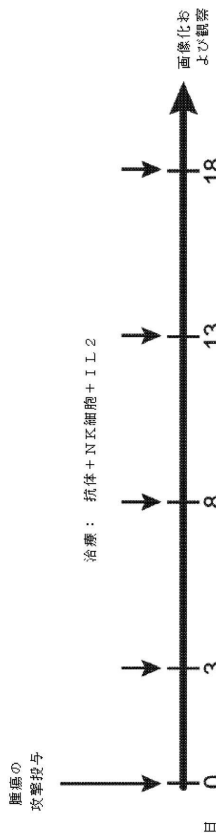
A

【図 3 - 2】



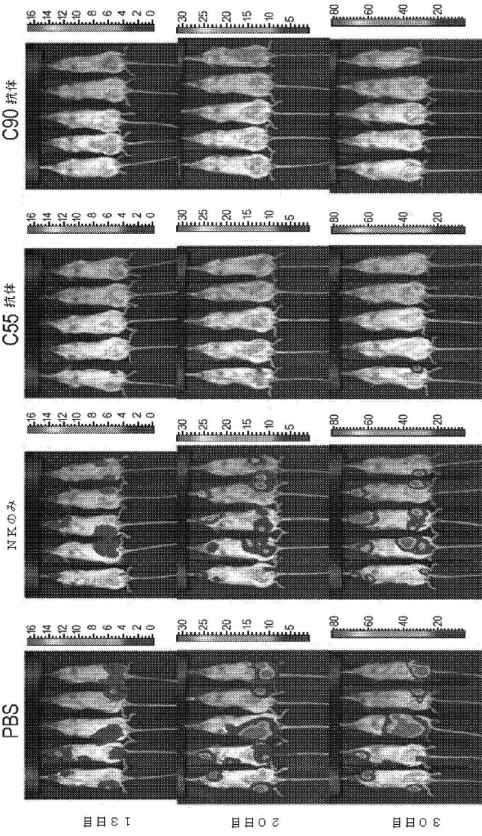
B

【図 4 - 1】



A

【図 4 - 2】



B

10

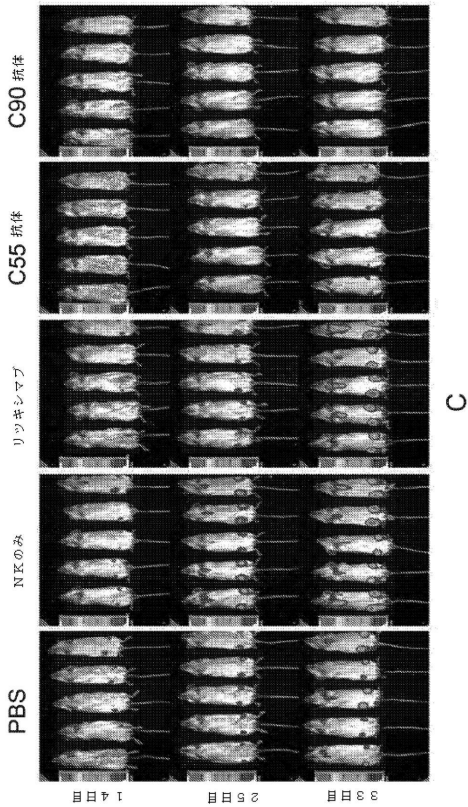
20

30

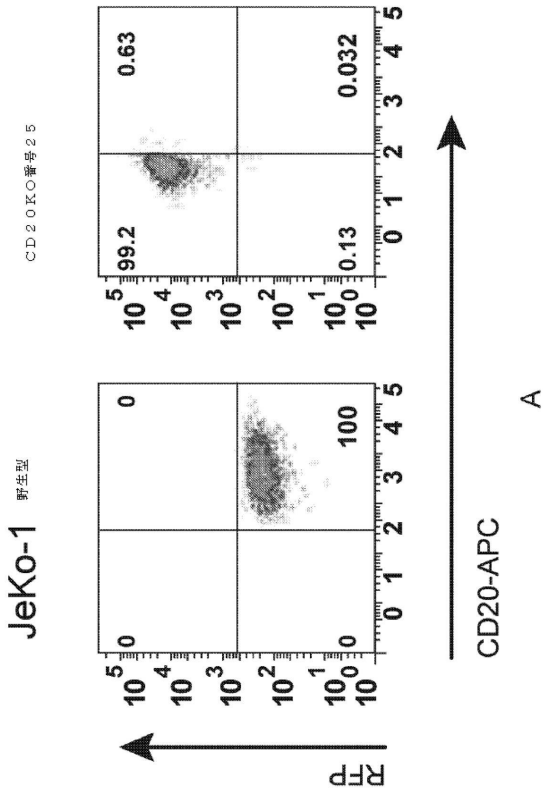
40

50

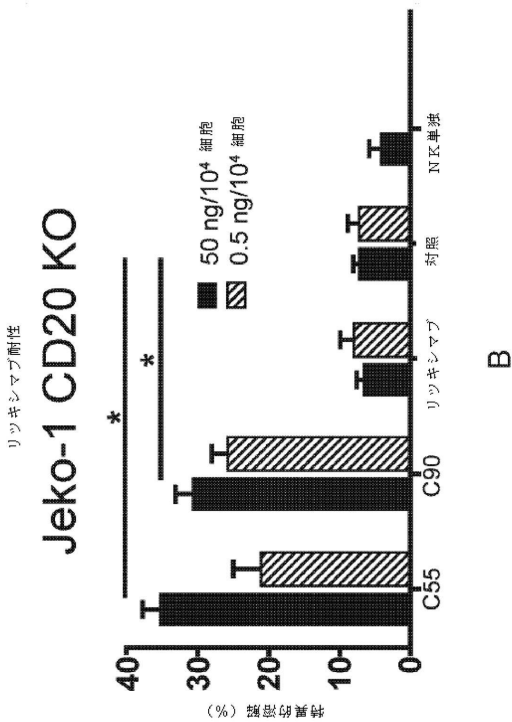
【図 4 - 3】



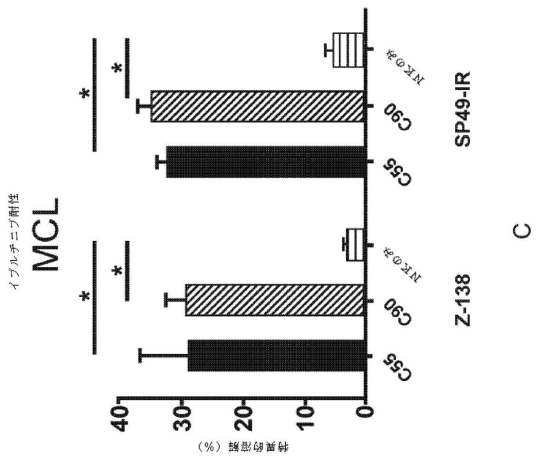
【図 5 - 1】



【図 5 - 2】



【図 5 - 3】



10

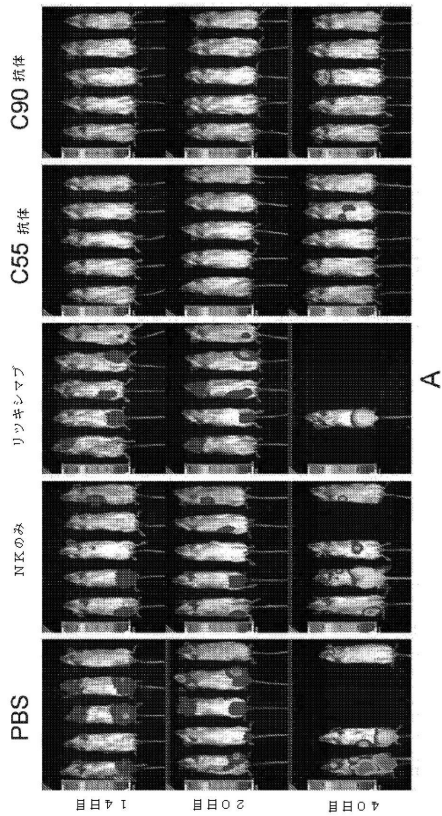
20

30

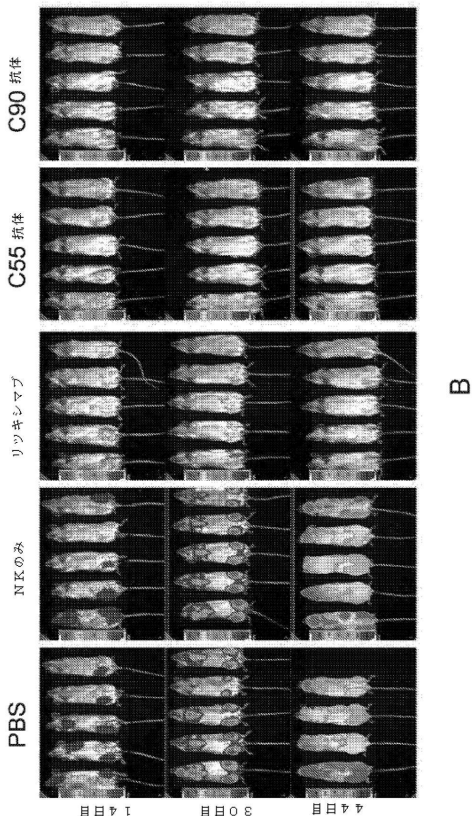
40

50

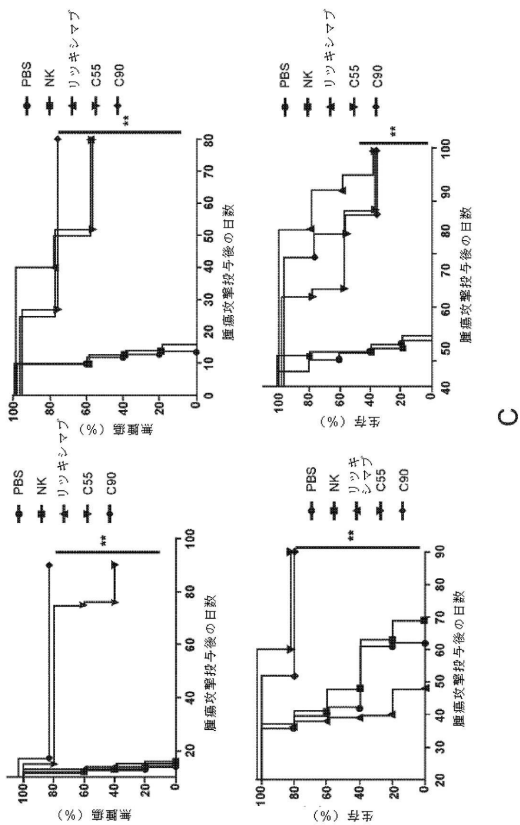
【図 6 - 1】



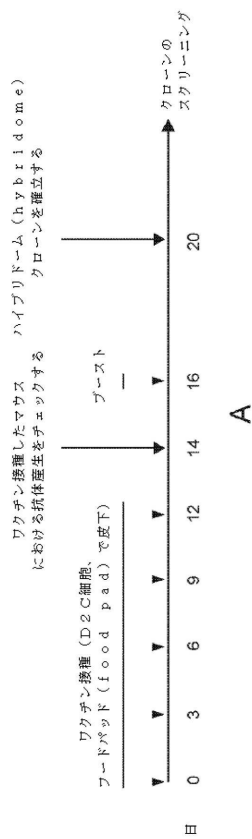
【図 6 - 2】



【図 6 - 3】



【図 7 - 1】



10

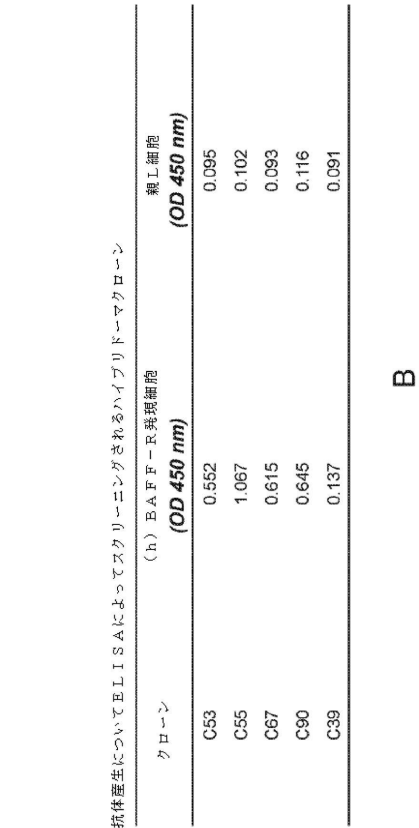
20

30

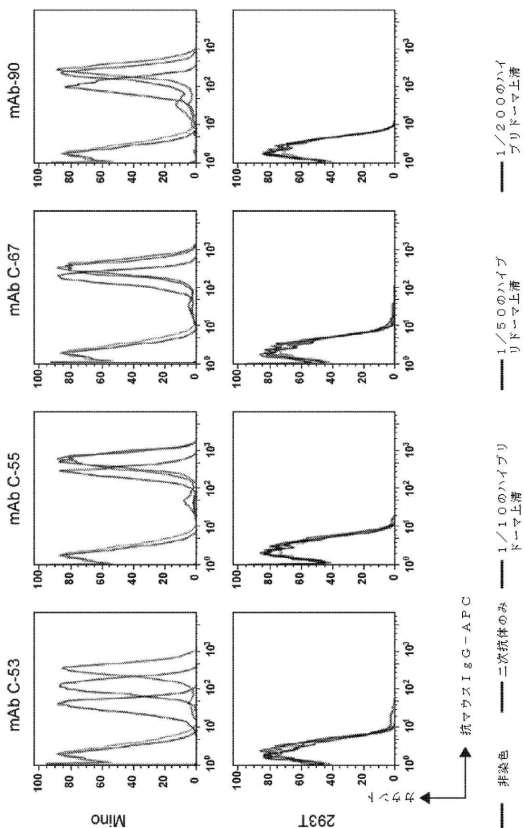
40

50

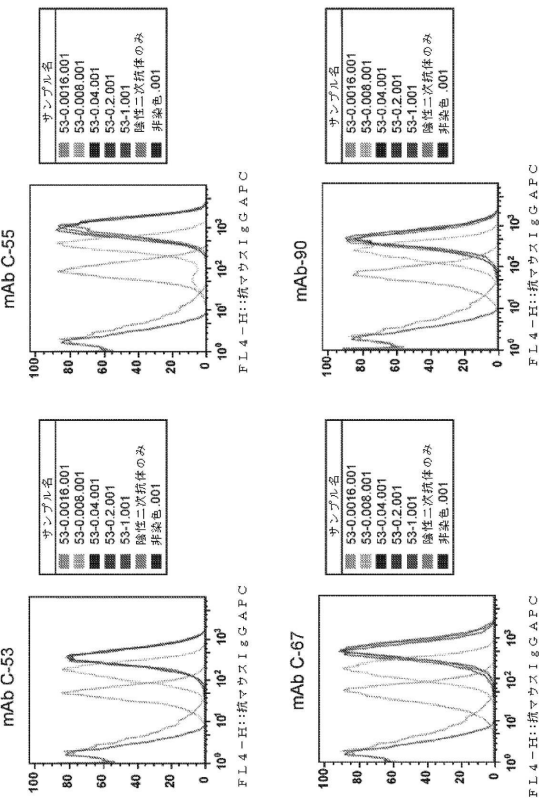
【図 7 - 2】



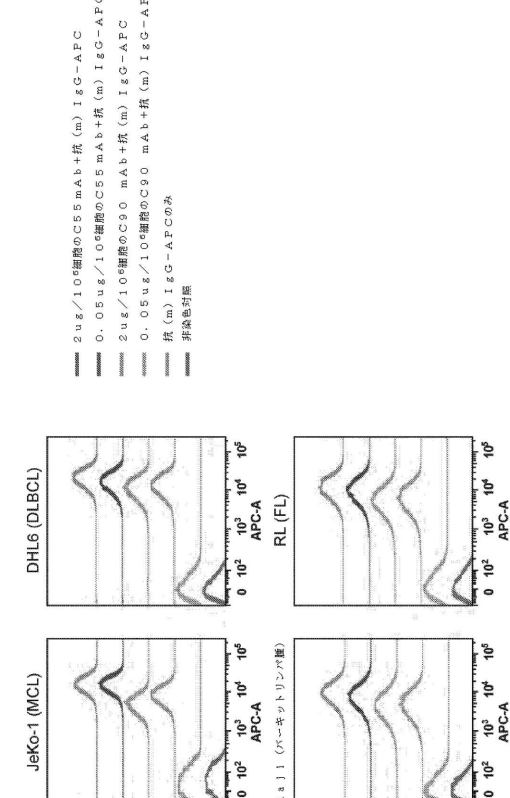
【図 8】



【図 9】



【図 10】



10

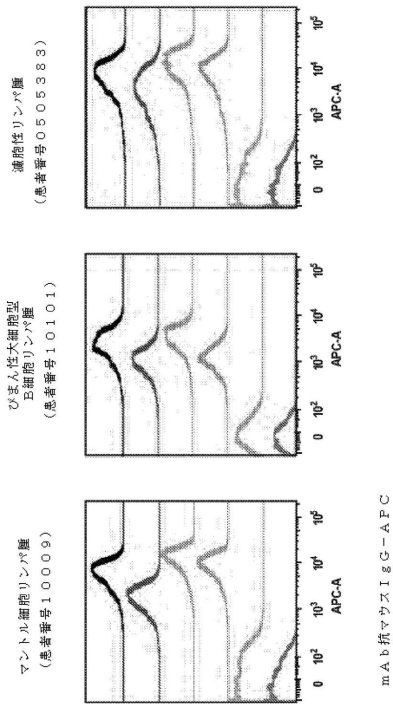
20

30

40

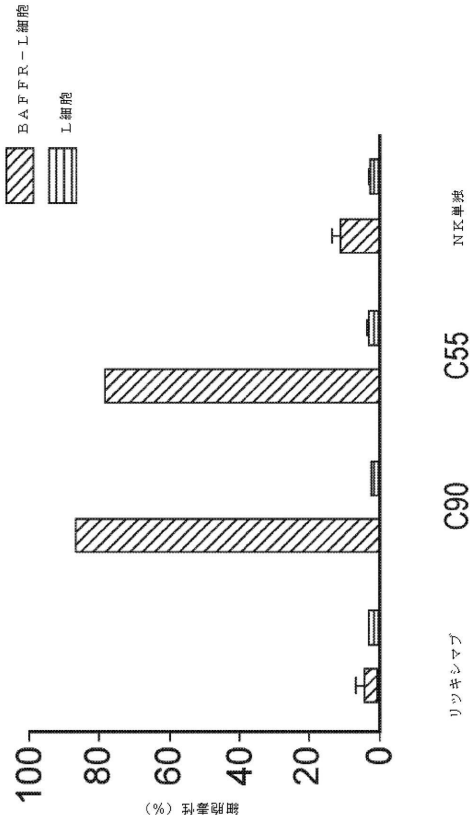
50

【図 1 1】

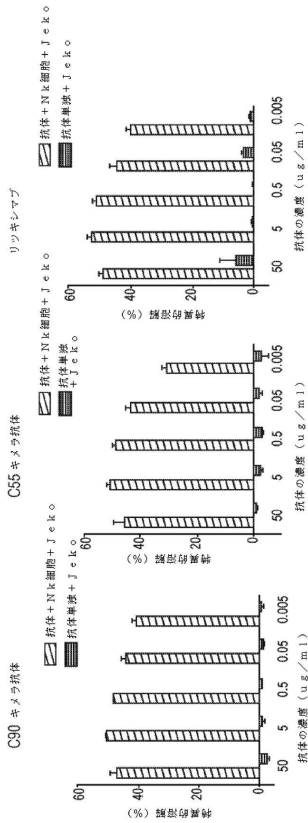


非染色 二次抗体のみ C55, 低用量 C55, 高用量 C90, 低用量 C90, 高用量

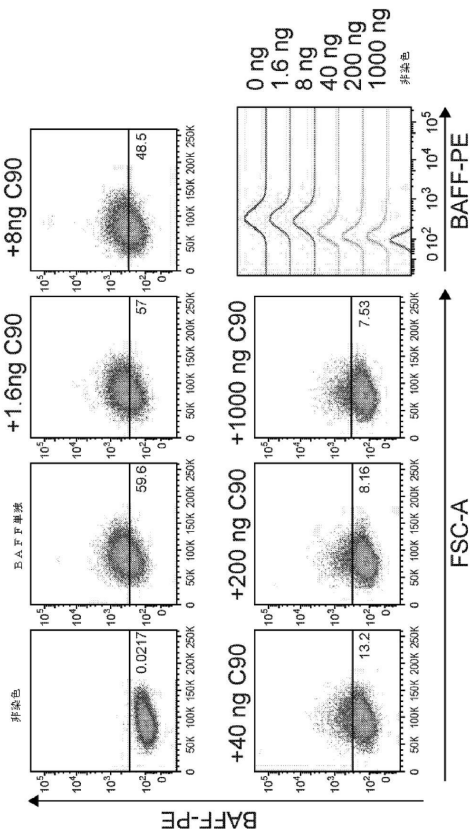
【図 1 2】



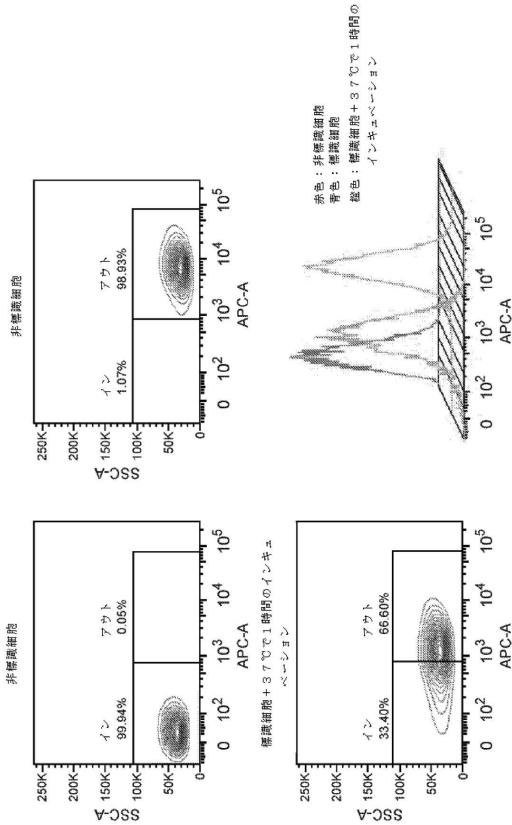
【図 1 3】



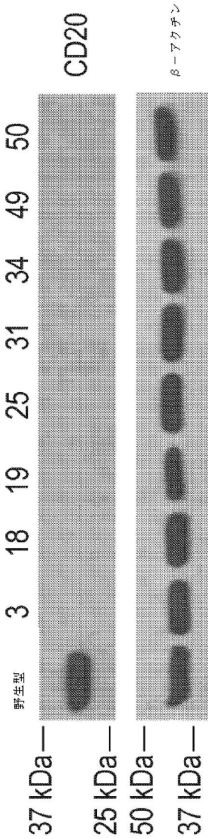
【図 1 4】



【図 15】

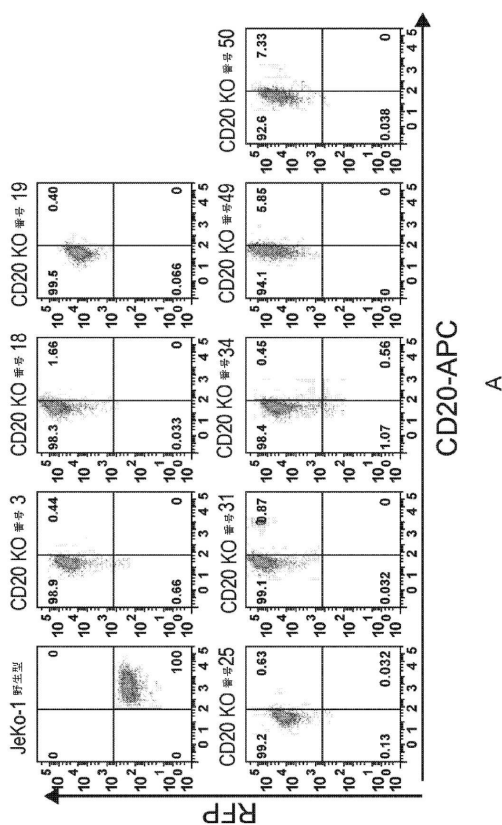


【図 16 - 2】

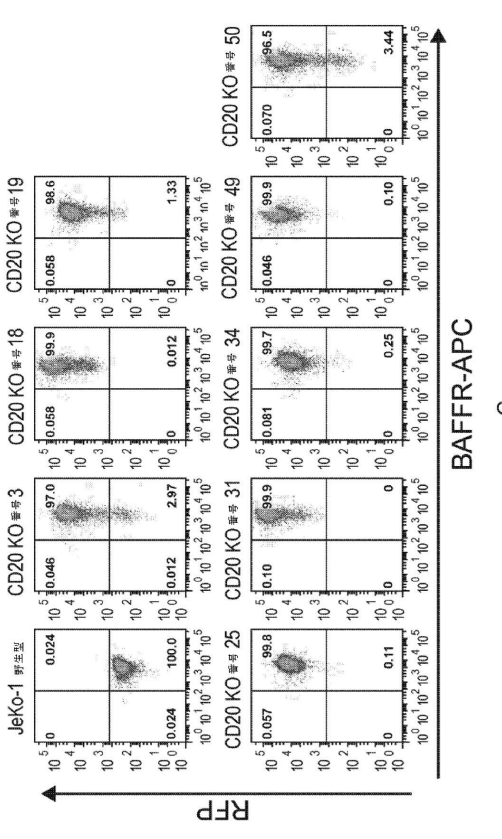


B

【図 16 - 1】



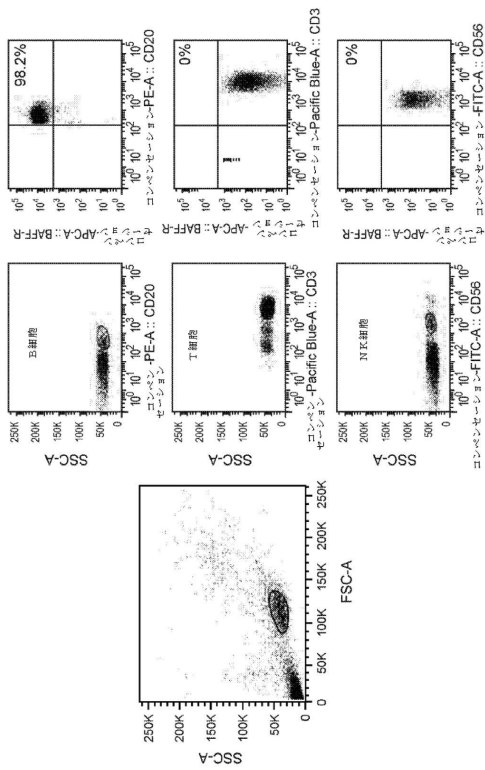
【図 16 - 3】



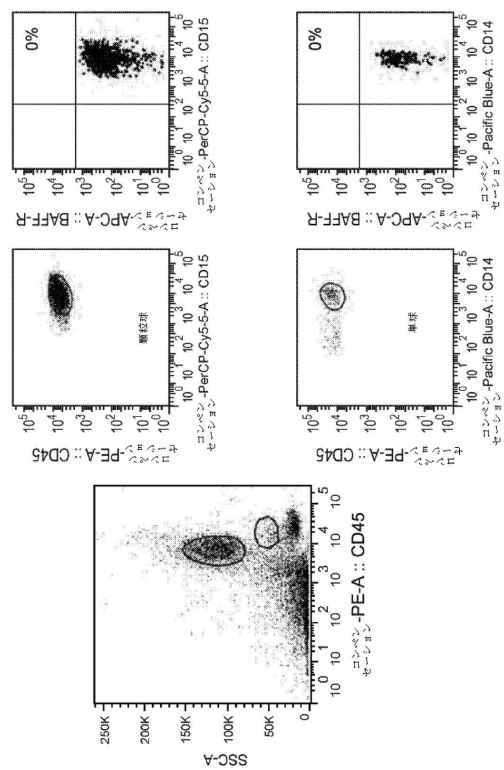
A

C

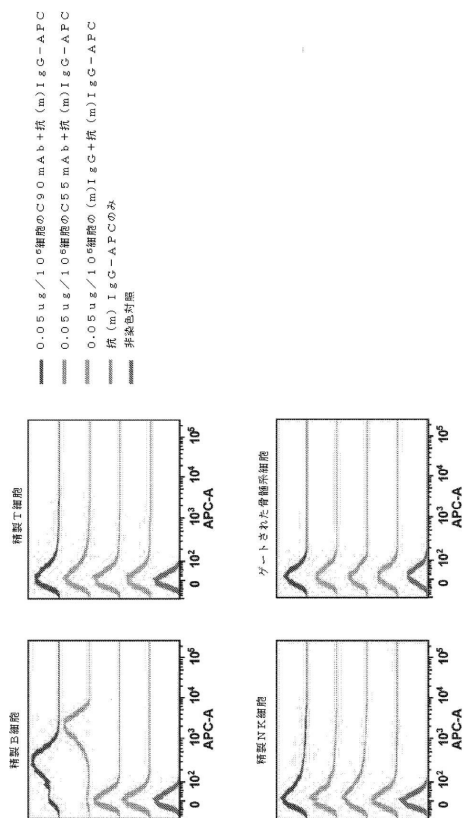
【 図 1 7 - 1 】



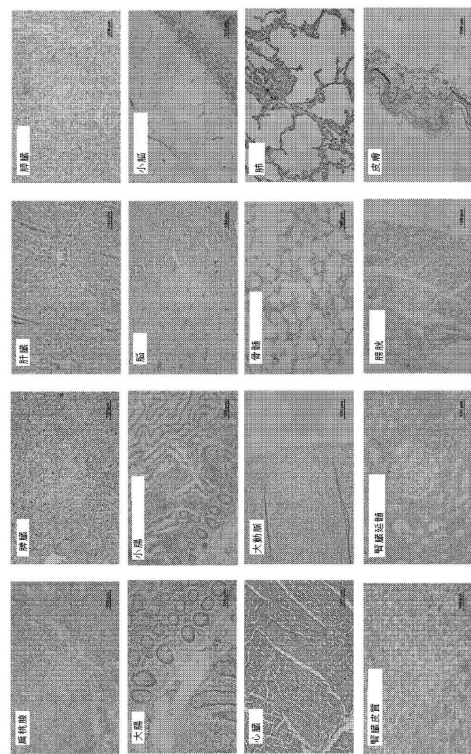
【図 17 - 2】



【 図 1 8 】



【圖 19 - 1】



10

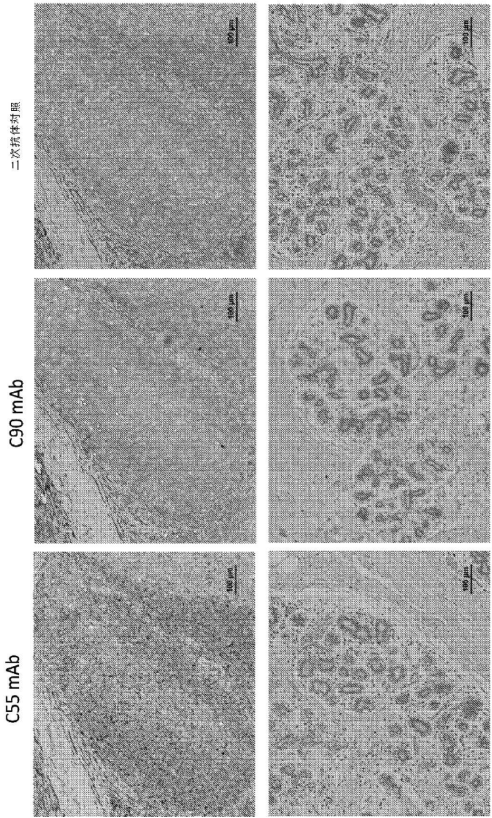
20

30

40

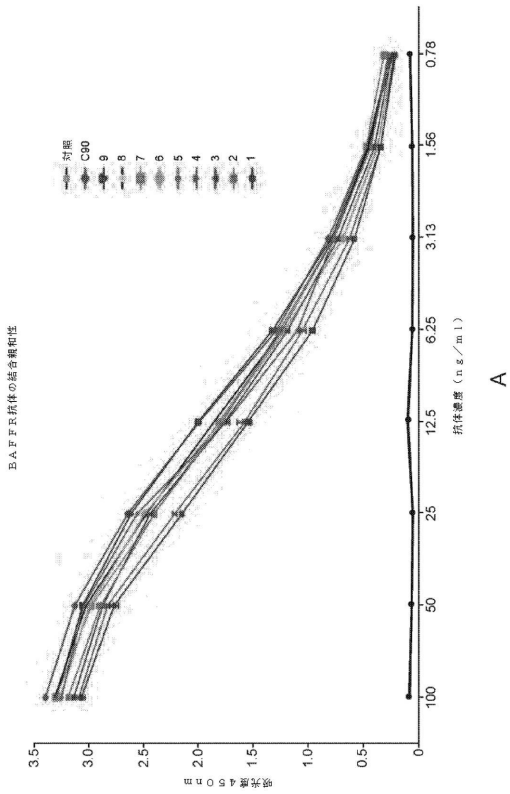
50

【図 19 - 2】



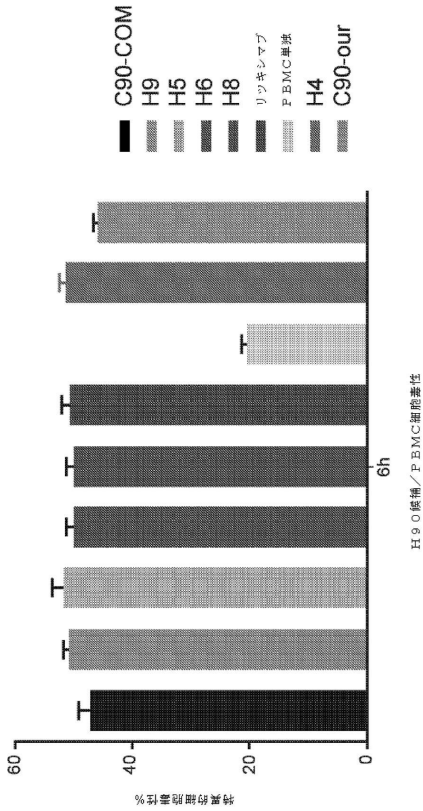
B

【図 20 - 1】



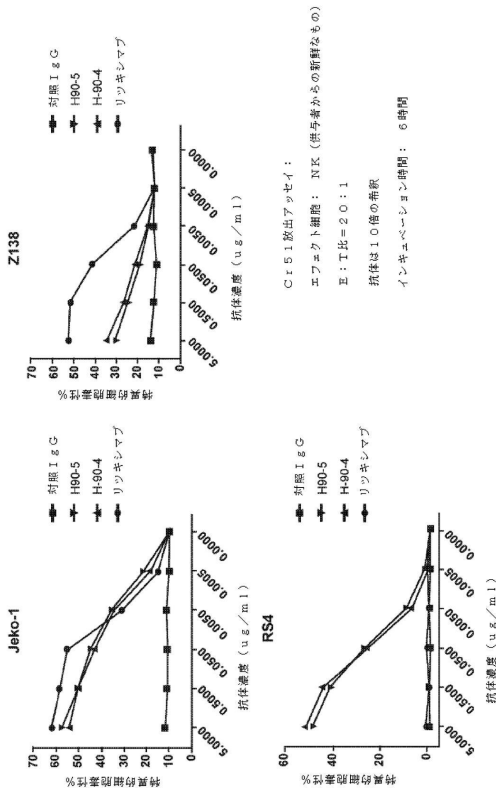
A

【図 20 - 2】



B

【図 21 - 1】



A

10

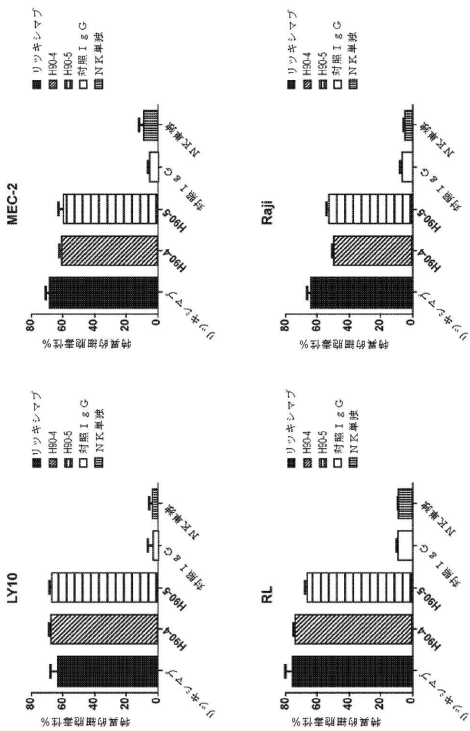
20

30

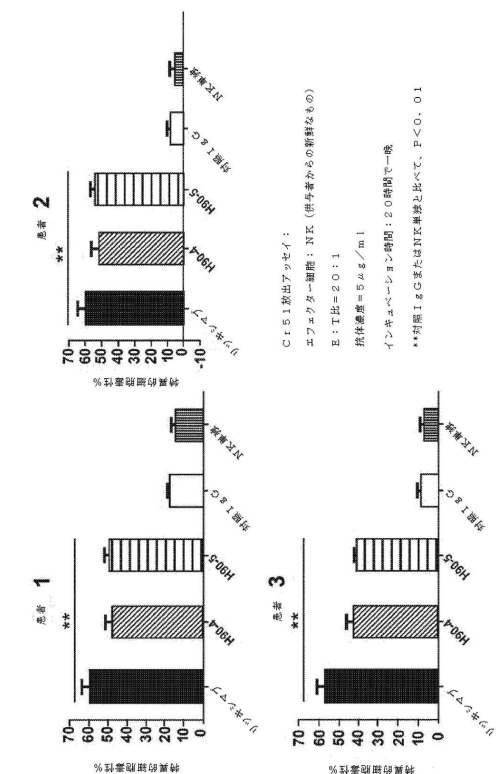
40

50

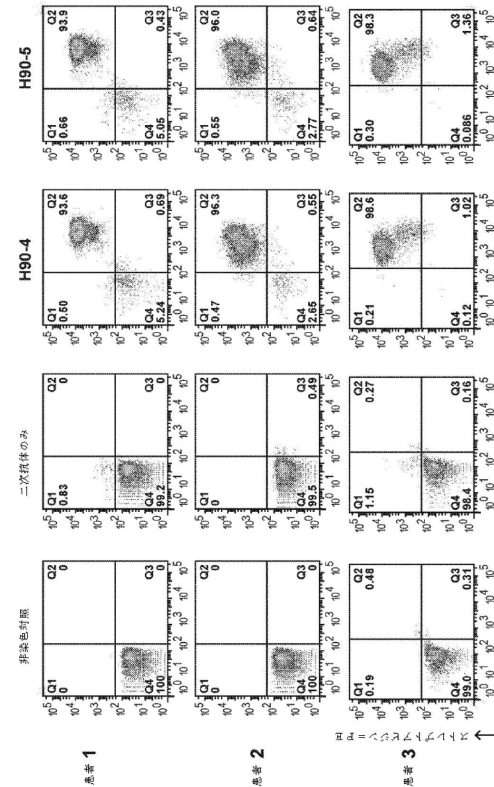
【図 2 1 - 2】



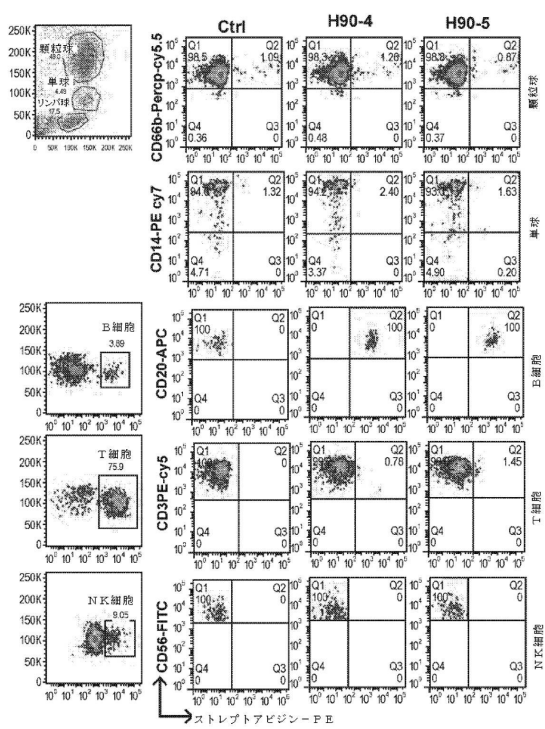
【図 2 2 - 2】



【図 2 2 - 1】



【図 2 3】



10

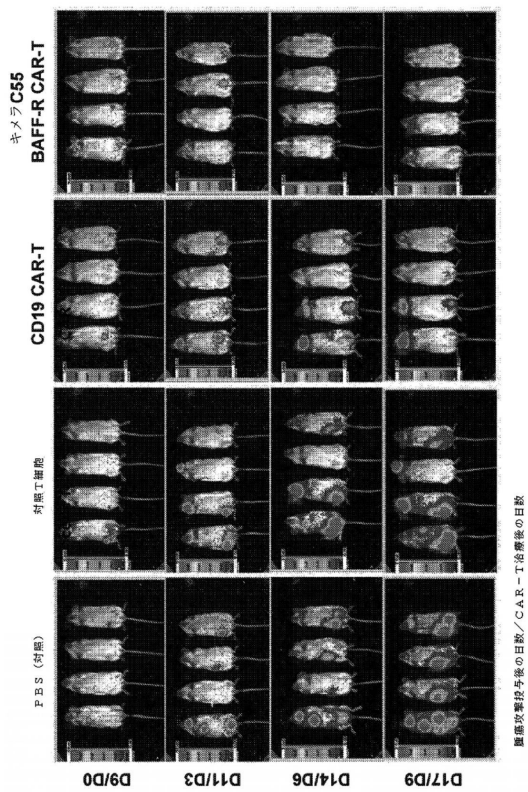
20

30

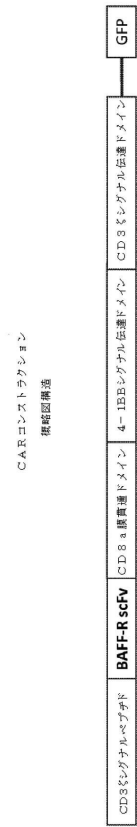
40

50

【図 2 4】



【図 2 5 - 1】

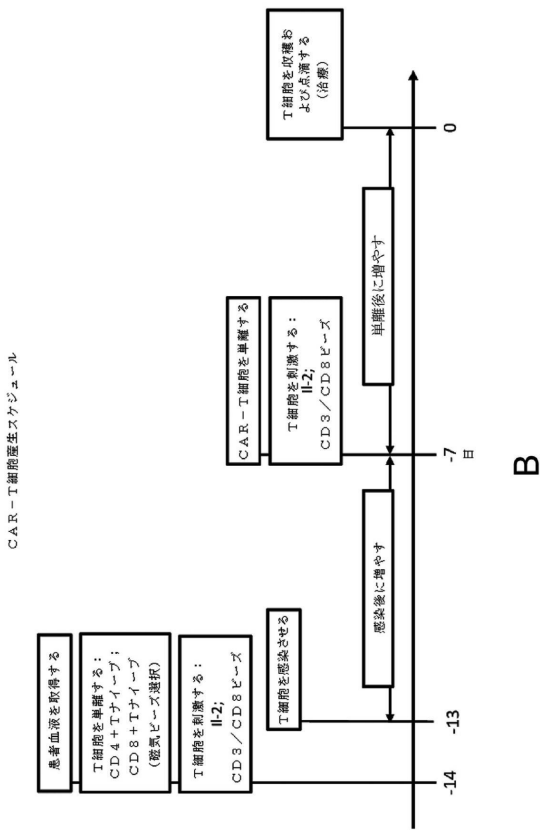


A

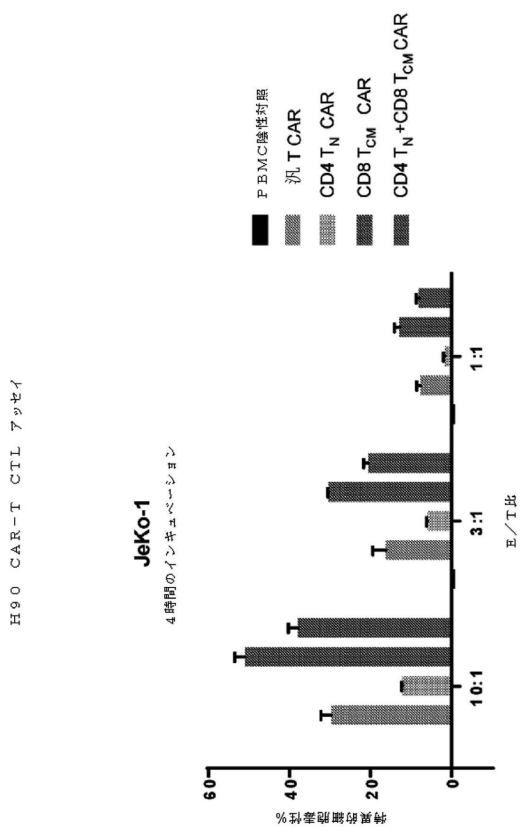
10

20

【図 2 5 - 2】



【図 2 6】

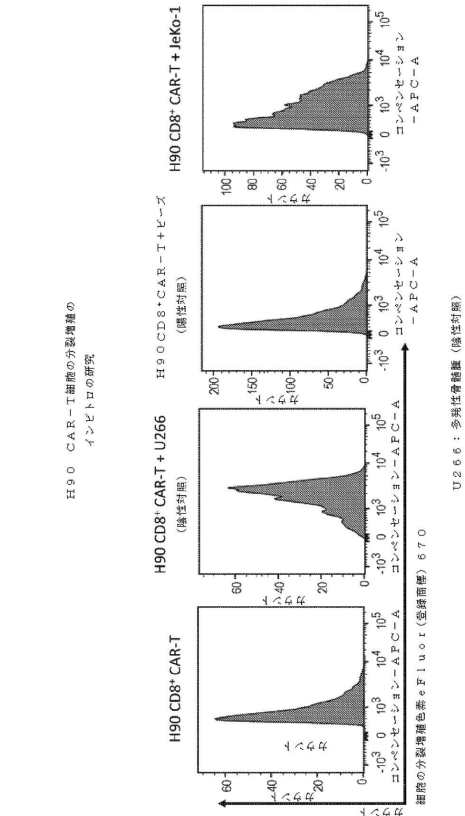


30

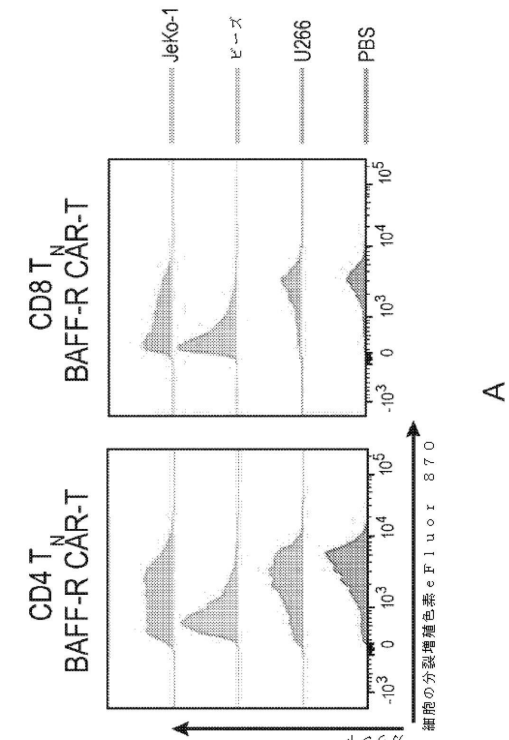
40

50

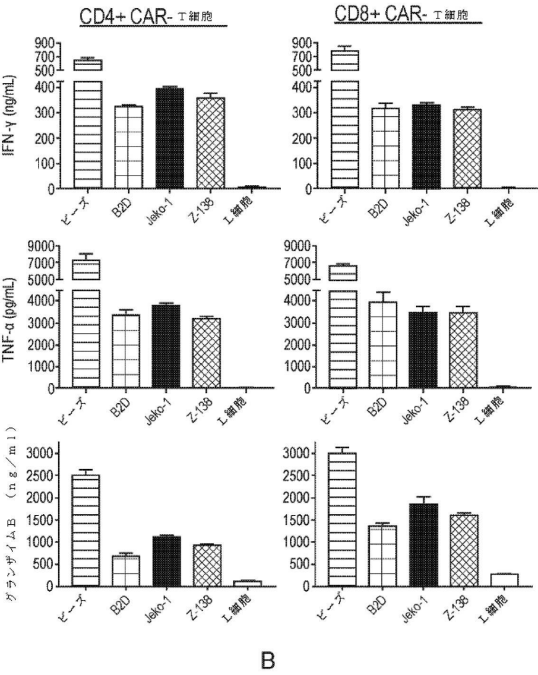
【図 27】



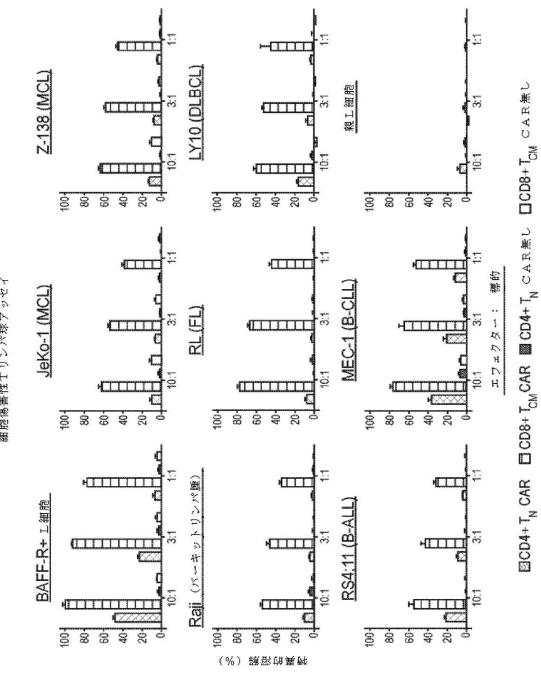
【図 28 - 1】



【図 28 - 2】



【図 29】



10

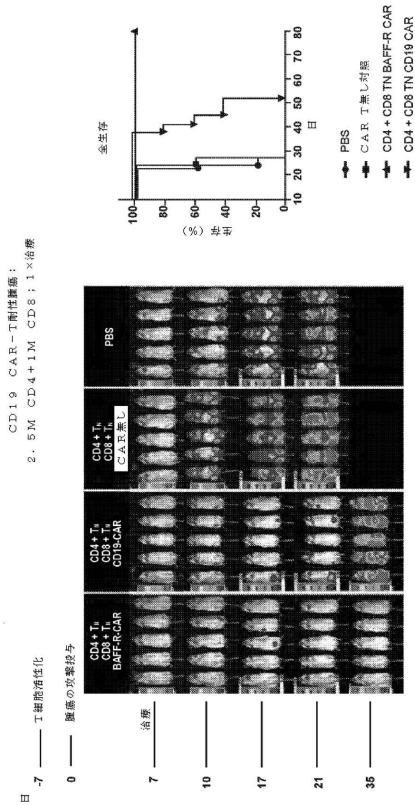
20

30

40

50

【図 3 4】



10

20

【配列表】

0007070932000001.app

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

A 6 1 P	35/00	(2006.01)	A 6 1 P	35/00	
A 6 1 P	35/02	(2006.01)	A 6 1 P	35/02	
A 6 1 P	43/00	(2006.01)	A 6 1 P	43/00	1 2 1
A 6 1 P	37/06	(2006.01)	A 6 1 P	37/06	
A 6 1 P	29/00	(2006.01)	A 6 1 P	29/00	1 0 1
A 6 1 P	19/02	(2006.01)	A 6 1 P	19/02	
A 6 1 P	17/02	(2006.01)	A 6 1 P	17/02	
A 6 1 P	25/00	(2006.01)	A 6 1 P	25/00	
A 6 1 P	13/12	(2006.01)	A 6 1 P	13/12	
A 6 1 P	7/06	(2006.01)	A 6 1 P	7/06	
A 6 1 K	45/00	(2006.01)	A 6 1 K	45/00	
A 6 1 K	35/17	(2015.01)	A 6 1 K	35/17	A

(33)優先権主張国・地域又は機関

米国(US)

(74)代理人 100107456

弁理士 池田 成人

(74)代理人 100162352

弁理士 酒巻 順一郎

(74)代理人 100123995

弁理士 野田 雅一

(72)発明者 チン, ホン

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, デュアーテ, イースト デュアーテ ロード 1 5 0 0 ,
ケアオブ シティー オブ ホープ

(72)発明者 クワック, ラリー ダブリュー.

アメリカ合衆国, カリフォルニア州, デュアーテ, イースト デュアーテ ロード 1 5 0 0 ,
ケアオブ シティー オブ ホープ

審査官 斉藤 貴子

(56)参考文献 特表 2 0 0 8 - 5 2 6 2 0 5 (J P , A)

SYED ABBAS ALI , REMISSIONS OF MULTIPLE MYELOMA DURING A FIRST-IN-HUMANS C
LINICAL TRIAL OF T CELLS EXPRESSING AN ANTI-B-CELL MATURATION ANTIGEN CHIME
RIC ANTIGEN RECEPTOR , BLOOD , 2015年 , PAGE(S):1-5 , [http://www.bloodjournal.org/
content/126/23/LBA-1?sso-checked=true&utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm
_campaign=Blood_TrendMD_0](http://www.bloodjournal.org/content/126/23/LBA-1?sso-checked=true&utm_source=TrendMD&utm_medium=cpc&utm_campaign=Blood_TrendMD_0)EISENBERG R , COMBINATION BIOLOGICS: 1 STONE, 2 BIRDS , BLOOD , 2007年12月 , V
OL:110, NR:12 , PAGE(S):3817 , [http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/110/
12/3817.full.pdf](http://www.bloodjournal.org/content/bloodjournal/110/12/3817.full.pdf)ADAM D COHEN , B-CELL MATURATION ANTIGEN (BCMA)-SPECIFIC CHIMERIC ANTIGEN
RECEPTOR T CELLS (CART-BCMA) FOR MULTIPLE MYELOMA (MM): INITIAL SAFETY AND
EFFICACY FROM A PHASE I STUDY , BLOOD , 2016年 , PAGE(S):1-6 , [http://www.bloodjo
urnal.org/content/128/22/1147](http://www.bloodjournal.org/content/128/22/1147)PARAMESWARAN R , EFFECTOR-MEDIATED ERADICATION OF PRECURSOR B ACUTE LYM
PHOBLASTIC LEUKEMIA WITH A NOVEL FC-ENGINEERED MONOCLONAL ANTIBODY TAR
GETING THE BAFF-R , MOLECULAR CANCER THERAPEUTICS , 米国 , 2014年05月13日 ,
VOL:13, NR:6 , PAGE(S):1567 - 1577 , [http://mct.aacrjournals.org/content/molcanther/13
/6/1567.full.pdf](http://mct.aacrjournals.org/content/molcanther/13/6/1567.full.pdf)

(58)調査した分野 (Int.Cl., D B 名)

C 1 2 N A 6 1 P A 6 1 K

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

U n i P r o t / G e n e S e q