明　細　書

発明の名称 ： 安定性が改善されたＣＤ３標的抗原結合分子

技術分野

[0001] 本開示は、安定性が改善されたCD3結合ドメインを含む抗原結合分子、当該抗原結合分子を含む医薬組成物、およびその使用等に関する。

背景技術

[0002] 抗体は血漿中での安定性が高く、副作用が少ないことから医薬品として注目されている（非特許文献１および非特許文献２）。抗体は、抗原に結合する作用、アゴニスト作用やアンタゴニスト作用だけでなく、ADCC（Antibody Dependent Cytotoxicity：抗体依存性傷害活性），ADCP（Antibody Dependent Cell phagocytosis：抗体依存性細胞食作用），CDC（補体依存性細胞傷害活性）といったエフェクター細胞による細胞傷害活性（エフェクター機能とも言う）を誘導し、がん細胞に対する抗腫瘍効果を発揮することが知られている（非特許文献３）。抗体のFc領域がNK細胞やマクロファージなどのエフェクター細胞上に存在するFcレセプターに結合することにより、抗体が結合した標的のがん細胞に対してこれらのエフェクター細胞が発揮する細胞傷害がADCCである。

[0003] 天然型の免疫グロブリンは、可変領域で抗原と結合し、定常領域でFcγR、FcRn、FcαR、FcεRといったレセプターや補体と結合する。通常の天然型のIgG型の抗体は、その可変領域（Fab）により１つのエピトープを認識して結合することから、１つの抗原にしか結合することが出来ない。一方で、がんや炎症においては多種類のタンパク質が関与することが知られており、タンパク質同士がクロストークしていることがある。

[0004] 複数のターゲットを阻害する分子として、1分子で2種類以上の抗原と結合する抗体（Bispecific抗体、二重特異性抗体）が研究されている。天然型のIgG型の抗体を改良することにより、異なる２つの抗原(第１の抗原と第２の抗原)への結合活性を付与することが可能である（非特許文献４）。そのため、

2種類以上の抗原を1つの分子で中和する、または細胞傷害活性をもつ細胞とがん細胞をクロスリンクすることで抗腫瘍活性を高めることが可能である。

[0005] Bispecific抗体の一つとして、T細胞をエフェクター細胞として動員する細胞傷害をその抗腫瘍効果のメカニズムとする抗体であるT細胞リダイレクティング抗体（T cell-redirecting抗体）が1980年代から知られている（非特許文献５、６、７）。NK細胞やマクロファージをエフェクター細胞として動員するADCCをその抗腫瘍効果のメカニズムとする抗体とは異なり、T細胞リダイレクティング抗体は、T細胞上のT細胞レセプター（TCR）複合体の構成サブユニットのいずれかに対する抗体、特にCD3ε鎖に結合する抗体と、標的であるがん細胞上の抗原に結合する抗体を含むbi-specific抗体である。T細胞リダイレクティング抗体がCD3ε鎖とがん抗原に同時に結合することにより、T細胞ががん細胞に接近する。その結果、T細胞の持つ細胞傷害作用によりがん細胞に対する抗腫瘍効果が発揮されると考えられている。

[0006] T細胞リダイレクティング抗体の一つとして知られているCatumaxomabは、2つのFabでそれぞれがん抗原（EpCAM）とT細胞に発現しているCD3ε鎖に結合する。Catumaxomabは、がん抗原およびCD3εと同時に結合することによってT細胞による細胞傷害活性を誘導し、かつ、がん抗原およびFcγRと同時に結合することによってNK細胞やマクロファージ等の抗原提示細胞による細胞傷害活性を誘導するtrifunctional抗体である。しかし、trifunctional抗体は、がん抗原が存在しない場合でもCD3εおよびFcγRと同時に結合するため、がん細胞が存在しない環境でもCD3εを発現しているT細胞とFcγRを発現している細胞がクロスリンクされ、各種サイトカインが大量に産生される。このようながん抗原非依存的な各種サイトカインの産生誘導により、trifunctional抗体の投与は現状、腹腔内に限定されており（非特許文献８）、重篤なサイトカインストーム様の副作用により全身投与は極めて困難である。

[0007] 一方、BiTE（bispecific T-cell engager）はcatumaxomabとは異なりFcγ受容体に対する結合部位を持たないため、がん抗原非依存的にT細胞とNK細胞やマクロファージなどに発現する受容体が架橋されることはない。そのため

、catumaxomabが投与された場合に観察されたがん抗原非依存的なサイトカインの誘導は起こらないことが示されている。しかしながら、BiTEはFc領域を欠く低分子量型の改変抗体分子であるために、治療用抗体として通常用いられるIgG型の抗体に比較して、患者に投与されたBiTEの血中半減期は著しく短いという問題点が存在する。

[0008] 近年、FcγRに対する結合活性を低減させたFc領域を用いることで、T細胞を標的がん細胞に近接させることにより発揮する抗腫瘍活性と、がん抗原非依存的にサイトカインストームなどを誘導しないという安全性上の優れた性質と、長い血中半減期とを併せ持つ、新たなポリペプチド会合体が提供されている（特許文献１）。このような有利な効果を有する新たなT細胞リダイレクティング抗体は、がん細胞を標的とするだけでなく、がん微小環境に存在する免疫応答を抑制する機能を有する細胞である制御性T細胞や疲弊T細胞を標的とする場合にも有用であることが報告されている（特許文献２、３）。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：WO2012/073985

特許文献2：WO2016/047722

特許文献3：WO2015/174439

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078

非特許文献2：Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396

非特許文献3：Drug Des Devel Ther (2009) 3, 7-16

非特許文献4：MAbs. (2012) Mar 1, 4(2)

非特許文献5：Nature (1985) 314 (6012), 628-31

非特許文献6：Int J Cancer (1988) 41 (4), 609-15.

非特許文献7：Proc Natl Acad Sci USA (1986) 83 (5), 1453-7

非特許文献8：Cancer Immunol Immunother. (2007) 56(9), 1397-406

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0011] 本発明は上記の情況に鑑みてなされたものであり、特にT細胞リダイレクティング抗体で用いられるCD3結合ドメインに着目し、従来のT細胞リダイレクティング抗体で用いられているCD3結合ドメインよりも優れた安定性を有する新規CD3結合ドメイン、当該CD3結合ドメインを含む抗原結合分子、当該抗原結合分子の製造方法、および当該抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物、ならびにそれらの使用を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0012] 本発明者らは、WO2015174439に記載されている二重特異性抗体に含まれるCD3結合FabのCDRに様々な改変を導入し、常温以上の環境下で保存した際のCD3結合活性の低下の程度が親Fabと比べて小さい改変体を得ることに成功した。本発明者らはさらに、それらの改変されたCD3結合ドメインを、がん特異的抗原結合ドメイン等の他の抗原結合ドメインと組み合わせて二重特異性抗原結合分子を調製したところ、それらを常温以上の環境下で保存した際のT細胞依存性細胞傷害活性の低下の程度も小さいことを見出した。本発明者らは、かかる発見に基づいて、本発明に係る多重特異性抗原結合分子が、がん特異的抗原等の標的抗原を発現する標的細胞を含む組織を傷害し得ることを明らかにした。

[0013] 本開示はこのような知見に基づくものであり、具体的には以下に例示的に記載する実施態様を包含するものである。

〔１〕 第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であって、第一の抗原結合ドメインが、CD3に対する結合活性を有する抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域を含み、

前記H鎖可変領域が、

アミノ酸配列NAWMH（配列番号：1）を含むH鎖CDR1；

アミノ酸配列QIX$_1$DKSQNYATX$_2$VAESVKG（配列番号：2）を含むH鎖CDR2であって、X$_1$がKまたはRであり、X$_2$がYまたはFである、H鎖CDR2；及び

アミノ酸配列VHYX$_3$AGYGVDX$_4$（配列番号：3）を含むH鎖CDR3であって、X$_3$がAまたはPであり、X$_4$がI、MまたはLである、H鎖CDR3

を含み、

前記L鎖可変領域が、

アミノ酸配列RSX$_5$X$_6$X$_7$VVHENRX$_8$TYLH（配列番号：4）を含むL鎖CDR1であって、X$_5$がSまたはTであり、X$_6$がQまたはMであり、X$_7$がSまたはTであり、X$_8$がQまたはNである、L鎖CDR1；

アミノ酸配列KVSNRFS（配列番号：5）を含むL鎖CDR2；及び

アミノ酸配列GQGTQVPYT（配列番号：6）を含むL鎖CDR3

を含む、抗原結合分子。

〔２〕 CD3に対する結合活性を有する前記抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域が、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖CDR1、CDR2及びCDR3、並びに、L鎖CDR1、CDR2及びCDR3の組合せのうちのいずれかを含む、〔１〕に記載の抗原結合分子：

(a1) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：7に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：10に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a2) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a3) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：16に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示される

アミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a4) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a5) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：13に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a6) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：17に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a7) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：18に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a8) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：19に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ。

〔３〕 CD3に対する結合活性を有する前記抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域が、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖可変領域及びL鎖可変領域の組合せの

うちのいずれかを含む、〔１〕または〔２〕に記載の抗原結合分子：

(a1)配列番号：20に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a2) 配列番号：21に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a3) 配列番号：21に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：26に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a4) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a5) 配列番号：23に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a6) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：27に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a7) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：28に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a8) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：29に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ。

〔４－１〕 Fc領域をさらに含む、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔４－２〕 Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域をさらに含む、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔４－３〕抗原結合分子が、以下の(a1)～(a8)から選ばれる重鎖及び軽鎖の組合せのうちのいずれかを含む、〔４－１〕または〔４－２〕に記載の抗原結合分子：

(a1)配列番号：30に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

(a2) 配列番号：31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a3）配列番号：31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：36に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a4）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a5）配列番号：33に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a6）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a7）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：38に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a8）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：39に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ。

〔５－１〕 単一特異性抗原結合分子である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔５－２〕 第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインが、同じアミノ酸配列を含む、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔５－３〕 第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインが、互いに異なるアミノ酸配列を含む、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔６－１〕 多重特異性抗原結合分子である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔６－２〕 二重特異性抗原結合分子である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔６－３〕 三重以上の特異性を有する抗原結合分子である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔７－１〕 第二の抗原結合ドメインが、がん抗原に対する結合活性を有する抗体可変領域を含む、〔６〕に記載の抗原結合分子。

〔７－２〕 第二の抗原結合ドメインが、免疫応答を抑制する機能を有する細

胞の表面に発現する分子に対する結合活性を有する抗体可変領域を含む、〔６〕に記載の抗原結合分子。

〔８〕 抗体である、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔９〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子をコードする核酸。

〔１０〕 〔９〕に記載された核酸が導入されたベクター。

〔１１〕 〔９〕に記載の核酸または〔１０〕に記載のベクターを含む、細胞。

〔１２〕 〔１１〕に記載の細胞を培養する工程を含む、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子を製造する方法。

〔１３〕 〔１２〕に記載の方法によって製造された、抗原結合分子。

〔１４〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

〔１５－１〕 細胞傷害を誘導するための、〔１４〕に記載の医薬組成物。

〔１５－２〕 T細胞依存的細胞傷害を誘導するための、〔１４〕に記載の医薬組成物。

〔１５－３〕 がんの治療または予防に使用するための、〔１４〕に記載の医薬組成物。

〔１６－１〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子または〔１４〕に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、細胞傷害を誘導する方法。

〔１６－２〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子または〔１４〕に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、T細胞依存的細胞傷害を誘導する方法。

〔１６－３〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子または〔１４〕に記載の医薬組成物を投与する工程を含む、がんを治療または予防する方法。

〔１７－１〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子または〔１４〕に記載の医薬組成物と、使用のための説明書とを含む、細胞傷害を誘導するためのキット。

〔１７－２〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子または〔１４〕に記載の医薬組成物と、使用のための説明書とを含む、T細胞依存的細胞傷害を誘導するためのキット。

〔１７－３〕 〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子または〔１４〕に記載の医薬組成物と、使用のための説明書とを含む、がんの治療または予防のためのキット。

〔１８－１〕 細胞傷害の誘導における使用のための、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔１８－２〕 T細胞依存的細胞傷害の誘導における使用のための、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔１８－３〕 がんの治療または予防における使用のための、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔１９－１〕 細胞傷害誘導剤の製造における、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子の使用。

〔１９－２〕 T細胞依存的細胞傷害誘導剤の製造における、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子の使用。

〔１９－３〕 がんの治療剤または予防剤の製造における、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の抗原結合分子の使用。

〔Ａ１〕単一の抗原結合ドメインを含む一価の抗原結合分子であって、前記単一の抗原結合ドメインが、CD3に対する結合活性を有する抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域を含み、

前記H鎖可変領域が、

アミノ酸配列NAWMH（配列番号：1）を含むH鎖CDR1；

アミノ酸配列QIX$_1$DKSQNYATX$_2$VAESVKG（配列番号：2）を含むH鎖CDR2であって、X$_1$がKまたはRであり、X$_2$がYまたはFである、H鎖CDR2；及び

アミノ酸配列VHYX$_3$AGYGVDX$_4$（配列番号：3）を含むH鎖CDR3であって、X$_3$がAまたはPであり、X$_4$がI、MまたはLである、H鎖CDR3

を含み、

前記L鎖可変領域が、

アミノ酸配列RSX$_5$X$_6$X$_7$VVHENRX$_8$TYLH（配列番号：4）を含むL鎖CDR1であって、X$_5$がSまたはTであり、X$_6$がQまたはMであり、X$_7$がSまたはTであり、X$_8$がQまたはNである、L鎖CDR1；

アミノ酸配列KVSNRFS（配列番号：5）を含むL鎖CDR2；及び

アミノ酸配列GQGTQVPYT（配列番号：6）を含むL鎖CDR3

を含む、抗原結合分子。

〔Ａ２〕 CD3に対する結合活性を有する前記抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域が、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖CDR1、CDR2及びCDR3、並びに、L鎖CDR1、CDR2及びCDR3の組合せのうちのいずれかを含む、〔Ａ１〕に記載の抗原結合分子：

(a1) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：7に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：10に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a2) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a3) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：16に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a4) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列

を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a5) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：13に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a6) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：17に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a7) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：18に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a8) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：19に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ。

〔Ａ３〕 CD3に対する結合活性を有する前記抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域が、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖可変領域及びL鎖可変領域の組合せのうちのいずれかを含む、〔Ａ１〕または〔Ａ２〕に記載の抗原結合分子：

(a1)配列番号：20に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a2）配列番号：21に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a3）配列番号：21に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：26に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a4）配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a5）配列番号：23に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a6）配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：27に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a7）配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：28に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a8）配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：29に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ。

〔Ａ４－１〕 Fc領域をさらに含む、〔Ａ１〕～〔Ａ３〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔Ａ４－２〕 Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域をさらに含む、〔Ａ１〕～〔Ａ３〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔Ａ４－３〕抗原結合分子が、以下の(a1)～(a8)から選ばれる重鎖及び軽鎖の組合せのうちのいずれかを含む、〔Ａ４－１〕または〔Ａ４－２〕に記載の抗原結合分子：

(a1)配列番号：30に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a2）配列番号：31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a3）配列番号：31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：36に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a4）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に

示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a5）配列番号：33に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a6）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a7）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：38に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a8）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：39に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ。

〔Ａ５〕　〔Ａ１〕～〔Ａ４〕のいずれかに記載の抗原結合分子をコードする核酸。

〔Ａ６〕　〔Ａ５〕に記載された核酸が導入されたベクター。

〔Ａ７〕　〔Ａ５〕に記載の核酸または〔Ａ６〕に記載のベクターを含む、細胞。

〔Ａ８〕　〔Ａ７〕に記載の細胞を培養する工程を含む、〔Ａ１〕～〔Ａ４〕のいずれかに記載の抗原結合分子を製造する方法。

〔Ａ９〕　〔Ａ８〕に記載の方法によって製造された、抗原結合分子。

発明を実施するための形態

[0014] Ⅰ．定義

以下の定義は、本明細書において説明する本発明の理解を容易にするために提供される。

[0015] 用語「抗原結合分子」は、その抗原に充分なアフィニティで結合することのできる分子のことをいう。一態様において、その抗原とは無関係なタンパク質への抗原結合分子の結合の程度は、（例えば、放射免疫測定法（radioimmunoassay: RIA）により）測定したとき、当該抗原結合分子の当該抗原への結合の約10%未満である。特定の態様において、抗原結合分子は、その抗原に対して、≦1μM、≦100nM、≦10nM、≦1nM、≦0.1nM、≦0.01nM、または≦0.001nM（例えば、10^{-8}M以下、例えば10^{-8}M～10^{-13}M、例えば、10^{-9}M～10^{-13}M）の

解離定数（Kd）を有する。特定の態様において、抗原結合分子は、異なる種からのその抗原の間で保存されている当該抗原のエピトープに結合する。いくつかの態様において、抗原結合分子は抗体である。

[0016] 本明細書において、「抗体」とは、天然のものであるかまたは部分的もしくは完全合成により製造された免疫グロブリンをいう。抗体はそれが天然に存在する血漿や血清等の天然資源や抗体を産生するハイブリドーマ細胞の培養上清から単離され得るし、または遺伝子組換え等の手法を用いることによって部分的にもしくは完全に合成され得る。抗体の例としては免疫グロブリンのアイソタイプおよびそれらのアイソタイプのサブクラスが好適に挙げられる。ヒトの免疫グロブリンとして、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgMの9種類のクラス（アイソタイプ）が知られている。本発明の抗体には、これらのアイソタイプのうちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれ得る。

[0017] 抗体の「クラス」は、抗体の重鎖に備わる定常ドメインまたは定常領域のタイプのことをいう。抗体には5つの主要なクラスがある：IgA、IgD、IgE、IgG、およびIgMである。そして、このうちいくつかはさらにサブクラス（アイソタイプ）に分けられてもよい。例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、およびIgA2である。異なるクラスの免疫グロブリンに対応する重鎖定常ドメインを、それぞれ、α、δ、ε、γ、およびμと呼ぶ。

[0018] 「天然型抗体」は、天然に生じる様々な構造を伴う免疫グロブリン分子のことをいう。例えば、天然型IgG抗体は、ジスルフィド結合している2つの同一の軽鎖と2つの同一の重鎖から構成される約150,000ダルトンのヘテロ四量体糖タンパク質である。N末端からC末端に向かって、各重鎖は、可変重鎖ドメインまたは重鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VH）を有し、それに3つの定常ドメイン（CH1、CH2、およびCH3）が続く。同様に、N末端からC末端に向かって、各軽鎖は、可変軽鎖ドメインまたは軽鎖可変ドメインとも呼ばれる可変領域（VL）を有し、それに定常軽鎖（CL）ドメインが続く。抗体の軽鎖は、その定常ドメインのアミノ酸配列に基づいて、カッパ（κ）および

ラムダ（λ）と呼ばれる、2つのタイプの1つに帰属させられてよい。

[0019] 用語「可変領域」または「可変ドメイン」は、抗体を抗原へと結合させることに関与する、抗体の重鎖または軽鎖のドメインのことをいう。天然型抗体の重鎖および軽鎖の可変ドメイン（それぞれVHおよびVL）は、通常、各ドメインが4つの保存されたフレームワーク領域（FR）および3つの超可変領域（HVR）を含む、類似の構造を有する。（例えば、Kindt et al. Kuby Immunology, 6th ed., W.H. Freeman and Co., page 91 (2007) 参照。）1つのVHまたはVLドメインで、抗原結合特異性を与えるに充分であろう。さらに、ある特定の抗原に結合する抗体は、当該抗原に結合する抗体からのVHまたはVLドメインを使ってそれぞれVLまたはVHドメインの相補的ライブラリをスクリーニングして、単離されてもよい。例えばPortolano et al., J. Immunol. 150:880-887 (1993)； Clarkson et al., Nature 352:624-628 (1991) 参照。

[0020] 本明細書で用いられる用語「超可変領域」または「HVR」は、配列において超可変であり（「相補性決定領域」または「CDR」(complementarity determining region)）、および／または構造的に定まったループ（「超可変ループ」）を形成し、および／または抗原接触残基（「抗原接触」）を含む、抗体の可変ドメインの各領域のことをいう。通常、抗体は6つのHVRを含む：VHに3つ（H1、H2、H3）、およびVLに3つ（L1、L2、L3）である。本明細書での例示的なHVRは、以下のものを含む：

(a) アミノ酸残基26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)、および96-101 (H3)のところで生じる超可変ループ (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))；

(b) アミノ酸残基24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2)、 および95-102 (H3)のところで生じるCDR (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))；

(c) アミノ酸残基27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2)、および93-101 (H3) のところで生じる抗原接触 (MacCallum et a

l. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；ならびに、

(d) HVRアミノ酸残基46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)、および94-102 (H3)を含む、(a)、(b)、および／または(c)の組合せ。

別段示さない限り、HVR残基および可変ドメイン中の他の残基（例えば、FR残基）は、本明細書では上記のKabatらにしたがって番号付けされる。

[0021] 「フレームワーク」または「FR」は、超可変領域（HVR）残基以外の、可変ドメイン残基のことをいう。可変ドメインのFRは、通常4つのFRドメイン：FR1、FR2、FR3、およびFR4からなる。それに応じて、HVRおよびFRの配列は、通常次の順序でVH（またはVL）に現れる：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0022] 本明細書で用語「Fc領域」は、少なくとも定常領域の一部分を含む免疫グロブリン重鎖のC末端領域を定義するために用いられる。この用語は、天然型配列のFc領域および変異体Fc領域を含む。一態様において、ヒトIgG重鎖Fc領域はCys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで延びる。ただし、Fc領域のC末端のリジン（Lys447）またはグリシン‐リジン（Gly446-Lys447）は、存在していてもしていなくてもよい。一態様において、Fc領域のC末端のリジン（Lys447）またはグリシン‐リジン（Gly446-Lys447）は、分解によって除去されてもよい。本明細書では別段特定しない限り、Fc領域または定常領域中のアミノ酸残基の番号付けは、Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD 1991 に記載の、EUナンバリングシステム（EUインデックスとも呼ばれる）にしたがう。

[0023] 「天然型配列Fc領域」は、自然界で見出されるFc領域のアミノ酸配列と同一のアミノ酸配列を含む。天然型配列ヒトFc領域は、天然型配列ヒトIgG1 Fc領域（非AおよびAアロタイプ）；天然型配列ヒトIgG2 Fc領域；天然型配列ヒトIgG3 Fc領域；および天然型配列ヒトIgG4 Fc領域、ならびに天然に存在するそれらの変異体を含む。

[0024] 「変異Fc領域」は、少なくとも1つのアミノ酸修飾、好ましくは1つまたは複数のアミノ酸置換によって天然型配列Fc領域のそれと相違するアミノ酸配列を含む。好ましくは、変異Fc領域は、天然型配列Fc領域または親ポリペプチドのFc領域と比較して、天然型配列Fc領域中または親ポリペプチドのFc領域中に少なくとも1つのアミノ酸置換、例えば約1～約10個のアミノ酸置換、好ましくは約1～約5個のアミノ酸置換を有する。本明細書の変異Fc領域は、好ましくは、天然型配列Fc領域および／または親ポリペプチドのFc領域と少なくとも約80％の配列同一性、より好ましくはそれらと少なくとも約90％の配列同一性、最も好ましくはそれらと少なくとも約95％の配列同一性を備える。

[0025] 「Fc受容体」または「FcR」は、抗体のFc領域に結合する受容体のことをいう。いくつかの態様において、FcRは、天然型ヒトFcRである。いくつかの態様において、FcRは、IgG抗体に結合するもの（ガンマ受容体）であり、FcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIサブクラスの受容体を、これらの受容体の対立遺伝子変異体および選択的スプライシングによる形態を含めて、含む。FcγRII受容体は、FcγRIIA（「活性化受容体」）およびFcγRIIB（「阻害受容体」）を含み、これらは主としてその細胞質ドメインにおいて相違する類似のアミノ酸配列を有する。活性化受容体FcγRIIAは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン活性化モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based activation motif: ITAM）を含む。阻害受容体FcγRIIBは、その細胞質ドメインに免疫受容体チロシン阻害モチーフ（immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif: ITIM）を含む。（例えば、Daeron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997) を参照のこと。）FcRは、例えば、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92 (1991)；Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994)；およびde Haas et al., J. Lab. Clin. Med 126:330-41 (1995)において総説されている。将来同定されるものを含む他のFcRも、本明細書の用語「FcR」に包含される。

[0026] 用語「Fc受容体」または「FcR」はまた、母体のIgGの胎児への移動（Guyer

et al., J. Immunol. 117:587 (1976)およびKim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)) ならびに免疫グロブリンのホメオスタシスの調節を担う、新生児型受容体FcRnを含む。FcRnへの結合を測定する方法は公知である（例えば、Ghetie and Ward., Immunol. Today 18(12):592-598 (1997); Ghetie et al., Nature Biotechnology, 15(7):637-640 (1997); Hinton et al., J. Biol. Chem. 279(8):6213-6216 (2004); WO2004/92219 (Hinton et al.)を参照のこと）。

[0027] インビボでのヒトFcRnへの結合およびヒトFcRn高アフィニティ結合ポリペプチドの血漿半減期は、例えばヒトFcRnを発現するトランスジェニックマウスもしくはトランスフェクトされたヒト細胞株においてまたは変異Fc領域を伴うポリペプチドが投与される霊長類において測定され得る。血漿半減期の代わりに、血中半減期または血清半減期が測定され得る。WO2000/42072 (Presta) は、FcRに対する結合が増加したまたは減少した抗体変異体を記載している。例えば、Shields et al. J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604 (2001) も参照のこと。

[0028] 用語「Fc領域含有抗体」は、Fc領域を含む抗体のことをいう。Fc領域のC末端リジン（EUナンバリングシステムにしたがえば残基447）またはFc領域のC末端グリシン－リジン（残基446-447）は、例えば抗体の精製の間にまたは抗体をコードする核酸の組み換え操作によって除去され得る。したがって、本発明によるFc領域を有する抗体を含む組成物は、G446-K447を伴う抗体、G446を伴いK447を伴わない抗体、G446-K447が完全に除去された抗体（IgGの場合、C末端がP445である抗体若しくはP445にアミド基（NH2）が付加したプロリンアミド（Pro-NH2）となっている抗体）、または上記3つのタイプの抗体の混合物を含み得る。

[0029] 「エフェクター機能」は、抗体のFc領域に起因する、抗体のアイソタイプによって異なる生物学的活性のことをいう。抗体のエフェクター機能の例には次のものが含まれる：C1q結合および補体依存性細胞傷害（complement dependent cytotoxicity:CDC）；Fc受容体結合；抗体依存性細胞介在性細胞傷害

（antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity: ADCC）；貪食作用；細胞表面受容体（例えば、B細胞受容体）の下方制御；および、B細胞活性化。

[0030] 「抗体依存性細胞介在性細胞傷害」または「ADCC」は、分泌されたIgが特定の細胞傷害性細胞（例えば、NK細胞、好中球およびマクロファージ）上に存在するFc受容体（FcR）に結合しそれによってこれらの細胞傷害性エフェクター細胞が抗原を有する標的細胞に特異的に結合することができそしてその後にその標的細胞を細胞毒によって殺傷することができるようになる、細胞傷害の一形態のことをいう。ADCCを媒介するプライマリ細胞であるNK細胞はFcγRIIIのみを発現し、単球はFcγRI、FcγRII、およびFcγRIIIを発現する。造血細胞上のFcRの発現は、Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol 9:457-92（1991）の第464頁の表3にまとめられている。目的の分子のADCC活性を評価するために、インビトロADCC測定法、例えば米国特許第5,500,362号もしくは第5,821,337号または米国特許第6,737,056号（Presta）に記載のものが実施され得る。そのような測定法に有用なエフェクター細胞は、PBMCおよびNK細胞を含む。あるいはまたは加えて、目的の分子のADCC活性は、例えばClynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998)に開示される動物モデルのような動物モデルにおいて、インビボで評価されてもよい。

[0031] 本明細書でいう用語「モノクローナル抗体」は、実質的に均一な抗体の集団から得られる抗体のことをいう。すなわち、その集団を構成する個々の抗体は、生じ得る変異抗体（例えば、自然に生じる変異を含む変異抗体、またはモノクローナル抗体調製物の製造中に発生する変異抗体。そのような変異体は通常若干量存在している。）を除いて、同一でありおよび／または同じエピトープ（決定基）に結合する。異なるエピトープに対する異なる抗体を典型的に含むポリクローナル抗体調製物とは対照的に、モノクローナル抗体調製物に含まれる各モノクローナル抗体は、抗原上の単一のエピトープに対するものである。したがって、修飾語「モノクローナル」は、実質的に均一な抗体の集団から得られるものである、という抗体の特徴を示し、何らかの特定の方法による抗体の製造を求めるものと解釈されるべきではない。例え

ば、本発明にしたがって用いられるモノクローナル抗体は、これらに限定されるものではないが、ハイブリドーマ法、組換えDNA法、ファージディスプレイ法、ヒト免疫グロブリン遺伝子座の全部または一部を含んだトランスジェニック動物を利用する方法を含む、様々な手法によって作製されてよい。

[0032] 用語「キメラ」抗体は、重鎖および／または軽鎖の一部分が特定の供給源または種に由来する一方で、重鎖および／または軽鎖の残りの部分が異なった供給源または種に由来する抗体のことをいう。

[0033] 「ヒト化」抗体は、非ヒトHVRからのアミノ酸残基およびヒトFRからのアミノ酸残基を含む、キメラ抗体のことをいう。ある態様では、ヒト化抗体は、少なくとも1つ、典型的には2つの可変ドメインの実質的にすべてを含み、当該可変領域においては、すべてのもしくは実質的にすべてのHVR（例えばCDR）は非ヒト抗体のものに対応し、かつ、すべてのもしくは実質的にすべてのFRはヒト抗体のものに対応する。ヒト化抗体は、任意で、ヒト抗体に由来する抗体定常領域の少なくとも一部分を含んでもよい。抗体（例えば、非ヒト抗体）の「ヒト化された形態」は、ヒト化を経た抗体のことをいう。

[0034] 「ヒト抗体」は、ヒトもしくはヒト細胞によって産生された抗体またはヒト抗体レパートリーもしくは他のヒト抗体コード配列を用いる非ヒト供給源に由来する抗体のアミノ酸配列に対応するアミノ酸配列を備える抗体である。このヒト抗体の定義は、非ヒトの抗原結合残基を含むヒト化抗体を、明確に除外するものである。

[0035] 用語「全長抗体」、「完全抗体」、および「全部抗体」は、本明細書では相互に交換可能に用いられ、天然型抗体構造に実質的に類似した構造を有する、または本明細書で定義するFc領域を含む重鎖を有する抗体のことをいう。

[0036] 「抗体断片」は、完全抗体が結合する抗原に結合する当該完全抗体の一部分を含む、当該完全抗体以外の分子のことをいう。抗体断片の例は、これらに限定されるものではないが、Fv、Fab、Fab’、Fab’-SH、$F(ab')_2$；ダイアボディ；線状抗体；単鎖抗体分子（例えば、scFv）；および、抗体断片から形

成された多重特異性抗原結合分子を含む。

[0037] 本明細書において、「Fv（variable fragment）」という用語は、抗体の軽鎖可変領域（VL（light chain variable region））と抗体の重鎖可変領域（VH（heavy chain variable region））とのペアからなる抗体由来の抗原結合ドメインの最小単位を意味する。1988年にSkerraとPluckthunは、バクテリアのシグナル配列の下流に抗体の遺伝子を挿入し大腸菌中で当該遺伝子の発現を誘導することによって、Fvが均一でかつ活性を保持した状態で大腸菌のペリプラズム画分から調製されることを見出した（Science（1988）240（4855），1038-1041）。ペリプラズム画分から調製されたFvは、抗原に対する結合を有する態様でVHとVLが会合していた。

[0038] 本明細書において、「scFv」、「単鎖抗体」、または「$sc(Fv)_2$」という用語は、単一のポリペプチド鎖内に、重鎖および軽鎖の両方に由来する可変領域を含むが、定常領域を欠いている抗体断片を意味する。一般に、単鎖抗体は、抗原結合を可能にすると思われる所望の構造を形成するのを可能にする、VHドメインとVLドメインの間のポリペプチドリンカーをさらに含む。単鎖抗体は、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，113巻，Rosenburg、及び、Moore編，Springer-Verlag，New York，269～315（1994）においてPluckthunによって詳細に考察されている。同様に、国際特許出願公開WO1988/001649および米国特許第4,946,778号および同第5,260,203号を参照。特定の態様において、単鎖抗体はまた、二重特異性であるか、かつ／またはヒト化され得る。

[0039] scFvはFvを構成するVHとVLとがペプチドリンカーによって連結された抗原結合ドメインである（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.（1988）85（16），5879-5883）。当該ペプチドリンカーによってVHとVLとが近接した状態に保持され得る。

[0040] $sc(Fv)_2$は二つのVLと二つのVHの4つの可変領域がペプチドリンカー等のリンカーによって連結され一本鎖を構成する単鎖抗体である（J Immunol. Methods（1999）231（1-2），177-189）。この二つのVHとVLは異なるモノクローナル

抗体から由来することもあり得る。例えば、Journal of Immunology (1994) 152 (11), 5368-5374に開示されるような同一抗原中に存在する二種類のエピトープを認識する二重特異性$sc(Fv)_2$も好適に挙げられる。$sc(Fv)_2$は、当業者に公知の方法によって作製され得る。例えば、scFvをペプチドリンカー等のリンカーで結ぶことによって作製され得る。

[0041] 本明細書における$sc(Fv)_2$を構成する抗原結合ドメインの構成としては、二つのVH及び二つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点としてVH、VL、VH、VL（［VH］リンカー［VL］リンカー［VH］リンカー［VL］）の順に並んでいることを特徴とする抗原結合分子が挙げられるが、二つのVHと2つのVLの順序は特に上記の構成に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような、順序の構成も挙げることができる。

［VL］リンカー［VH］リンカー［VH］リンカー［VL］

［VH］リンカー［VL］リンカー［VL］リンカー［VH］

［VH］リンカー［VH］リンカー［VL］リンカー［VL］

［VL］リンカー［VL］リンカー［VH］リンカー［VH］

［VL］リンカー［VH］リンカー［VL］リンカー［VH］

[0042] $sc(Fv)_2$の分子形態についてはWO2006/132352においても詳細に記載されており、当業者であればこれらの記載に基づいて、本明細書で開示される抗原結合分子の作製のために適宜所望の$sc(Fv)_2$を作製することが可能である。

[0043] また本発明の抗原結合分子は、PEG等のキャリアー高分子や抗がん剤等の有機化合物をコンジュゲートしてもよい。また、本発明の抗原結合分子のアミノ酸配列に糖鎖付加配列を挿入することによって、糖鎖による所望の効果を得ることを目的として、好適に抗原結合分子に糖鎖が付加され得る。

[0044] 抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996に開示されるリンカー等）を用いることができるが、本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能

であるが、好ましい長さは5アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは15アミノ酸である。sc(Fv)$_2$に3つのペプチドリンカーが含まれる場合には、全て同じ長さのペプチドリンカーを用いてもよいし、異なる長さのペプチドリンカーを用いてもよい。ペプチドリンカーの例としては、グリシンとセリンで構成されるフレキシブルなポリペプチドリンカーが広く知られている。ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0045] 合成化学物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ－EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ－DST）、ビス［2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（BSOCOES）、ビス［2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホ-BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0046] 4つの抗体可変領域を結合する場合には、通常、3つのリンカーが必要となるが、全て同じリンカーを用いてもよいし、異なるリンカーを用いてもよい。

[0047] 「Fab」は、一本の軽鎖、ならびに一本の重鎖のCH1領域および可変領域から構成される。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とのジスルフィド結合を形成できない。

[0048] 「F(ab')$_2$」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前

後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理することにより、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（L鎖可変領域）とCL（L鎖定常領域）からなるL鎖、及びVH（H鎖可変領域）とCHγ1（H鎖定常領域中のγ1領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントが製造され得る。これら2つの相同な抗体フラグメントはそれぞれFab'といわれる。

[0049] 「$F(ab')_2$」は、二本の軽鎖、ならびに、鎖間のジスルフィド結合が2つの重鎖間で形成されるようにCH1ドメインおよびCH2ドメインの一部分の定常領域を含む二本の重鎖を含む。本明細書において開示される抗原結合分子を構成する$F(ab')_2$は、所望の抗原結合ドメインを有する全長モノクローナル抗体等をペプシン等のタンパク質分解酵素にて部分消化した後に、Fc断片をプロテインAカラムに吸着させて除去することにより、好適に取得され得る。かかるタンパク質分解酵素としてはpH等の酵素の反応条件を適切に設定することにより制限的に$F(ab')_2$を生じるように全長抗体を消化し得るものであれば特段の限定はされず、例えば、ペプシンやフィシン等が例示できる。

[0050] 「アフィニティ」は、分子（例えば、抗体）の結合部位1個と、分子の結合パートナー（例えば、抗原）との間の、非共有結合的な相互作用の合計の強度のことをいう。別段示さない限り、本明細書で用いられる「結合アフィニティ」は、ある結合対のメンバー（例えば、抗体と抗原）の間の１：１相互作用を反映する、固有の結合アフィニティのことをいう。分子Xのそのパートナー Yに対するアフィニティは、一般的に、解離定数（Kd）により表すことができる。アフィニティは、本明細書に記載のものを含む、当該技術分野において知られた通常の方法によって測定され得る。結合アフィニティを測定するための具体的な実例となるおよび例示的な態様については、下で述べる。

[0051] 「特異的結合」とは、特異的に結合する分子の一方の分子がその一または複数の結合する相手方の分子以外の分子に対しては何ら有意な結合を示さないことをいう。また、抗体可変領域を含むドメインが、ある抗原中に含まれ

る複数のエピトープのうち特定のエピトープに対して特異的である場合にも用いられる。また、抗体可変領域を含むドメインが結合するエピトープが複数の異なる抗原に含まれる場合には、当該抗体可変領域を含むドメインを有する抗原結合分子は当該エピトープを含む様々な抗原と結合することができる。

[0052] 「エピトープ」という用語は、タンパク質性、非タンパク質性を問わず、抗原結合分子（例えば、抗体）が結合する抗原上の部位を指す。例えば、エピトープは、その構造によって定義され得る。また、当該エピトープを認識する抗原結合分子（例えば、抗体）の抗原に対する結合活性によっても当該エピトープが定義され得る。抗原がペプチド又はポリペプチドである場合には、エピトープを構成するアミノ酸残基によってエピトープを特定することも可能である。また、エピトープが糖鎖である場合には、特定の糖鎖構造によってエピトープを特定することも可能である。

[0053] 線状エピトープは、アミノ酸の一次構造が認識されたエピトープを含むエピトープである。線状エピトープには、典型的には、少なくとも3個、および最も普通には少なくとも5個、例えば約8個～約10個、または6個～20個のアミノ酸が固有の配列で含まれる。

[0054] 立体構造エピトープは、線状エピトープとは対照的に、典型的にはエピトープを構成するアミノ酸は一次構造として連続的に存在しておらず、不連続のアミノ酸残基からなるエピトープである（不連続エピトープという場合もある）。立体構造エピトープは、線状エピトープと比べて増加した数のアミノ酸を包含する場合がある。立体構造エピトープの認識に関して、抗原結合分子（例えば、抗体）は、ペプチドまたはタンパク質の三次元構造を認識する。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて三次元構造を形成する場合には、立体構造エピトープを形成するあるアミノ酸および／またはポリペプチド主鎖は並列となり、抗原結合分子（例えば、抗体）がエピトープを認識するのを可能にする。エピトープの立体構造を決定する方法には、X線結晶学、二次元核磁気共鳴分光学並びに部位特異的なスピン標識および電磁常磁性共鳴

分光学が含まれるが、これらには限定されない。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology （1996）、第66巻、Morris（編）を参照。

[0055] エピトープに結合する抗原結合分子（例えば、抗体）の構造は、「パラトープ」、「抗原結合部位」、「抗原結合領域」、または「抗原結合ドメイン」と呼ばれる。エピトープとパラトープの間に作用する、水素結合、静電気力、ファンデルワールス力、疎水結合等により、エピトープとパラトープは安定して結合する。このエピトープとパラトープの間の結合力はアフィニティ（affinity）と呼ばれる。複数の抗原に対して複数の抗原結合分子（例えば、抗体）が結合するときの結合力の総和はアビディティ（avidity）と呼ばれる。例えば、複数の抗原結合ドメインを含む抗原結合分子（すなわち多価の抗原結合分子）が複数のエピトープに結合する際には、アフィニティが相乗的に働くため、アビディティはアフィニティよりも高くなる。

[0056] 参照抗原結合分子と「競合する抗原結合分子」は、競合アッセイにおいてその参照抗原結合分子の自身の抗原への結合を50%以上阻止する抗原結合分子のことをいい、また逆にいえば、参照抗原結合分子は、競合アッセイにおいて前述の抗原結合分子の自身の抗原への結合を50%以上阻止する。競合する抗原結合分子は参照抗原結合分子と同一又は重複するエピトープに結合する抗原結合分子、および参照抗原結合分子が結合するエピトープの十分近位にある隣接エピトープに結合し立体障害を起こす抗原結合分子を含む。例示的な競合アッセイが、本明細書で提供される。

[0057] 「単離された」抗体は、そのもともとの環境の成分から分離されたものである。いくつかの態様において、抗体は、例えば、電気泳動（例えば、SDS-PAGE、等電点分離法（isoelectric focusing: IEF)、キャピラリー電気泳動）またはクロマトグラフ（例えば、イオン交換または逆相HPLC）で測定して、95%または99%を超える純度まで精製される。抗体の純度の評価のための方法の総説として、例えば、Flatman et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007) を参照のこと。

[0058] 「単離された」核酸は、そのもともとの環境の成分から分離された核酸分子のことをいう。単離された核酸は、その核酸分子を通常含む細胞の中に含まれた核酸分子を含むが、その核酸分子は染色体外に存在しているかまたは本来の染色体上の位置とは異なる染色体上の位置に存在している。

[0059] 「抗原結合分子をコードする単離された核酸」は、好ましくは抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む抗原結合分子をコードする1つまたは複数の核酸分子のことをいい、1つのベクターまたは別々のベクターに乗っている核酸分子、および、宿主細胞中の1つまたは複数の位置に存在している核酸分子を含む。

[0060] 本明細書で用いられる用語「ベクター」は、それが連結されたもう1つの核酸を増やすことができる、核酸分子のことをいう。この用語は、自己複製核酸構造としてのベクター、および、それが導入された宿主細胞のゲノム中に組み入れられるベクターを含む。あるベクターは、自身が動作的に連結された核酸の、発現をもたらすことができる。そのようなベクターは、本明細書では「発現ベクター」とも称される。ベクターはウイルスを用いる方法やエレクトロポレーション法などにより宿主細胞に導入することができるが、ベクターの導入は生体外での導入に限られるものではなく、ベクターを直接生体に導入することも可能である。

[0061] 用語「宿主細胞」、「宿主細胞株」、および「宿主細胞培養物」は、相互に交換可能に用いられ、外来核酸を導入された細胞（そのような細胞の子孫を含む）のことをいう。宿主細胞は「形質転換体」および「形質転換細胞」を含み、これには初代の形質転換細胞および継代数によらずその細胞に由来する子孫を含む。子孫は、親細胞と核酸の内容において完全に同一でなくてもよく、変異を含んでいてもよい。オリジナルの形質転換細胞がスクリーニングされたまたは選択された際に用いられたものと同じ機能または生物学的活性を有する変異体子孫も、本明細書では含まれる。

[0062] 用語「薬学的製剤」および「医薬組成物」は、その中に含まれた有効成分の生物学的活性が効果を発揮し得るような形態にある調製物であって、かつ

製剤が投与される対象に許容できない程度に毒性のある追加の要素を含んでいない、調製物のことをいう。

[0063] 「薬学的に許容される担体」は、対象に対して無毒な、薬学的製剤中または医薬組成物中の有効成分以外の成分のことをいう。薬学的に許容される担体は、これらに限定されるものではないが、緩衝液、賦形剤、安定化剤、または保存剤を含む。

[0064] 「個体」または「対象」は哺乳動物である。哺乳動物は、これらに限定されるものではないが、飼育動物（例えば、ウシ、ヒツジ、ネコ、イヌ、ウマ）、霊長類（例えば、ヒト、およびサルなどの非ヒト霊長類）、ウサギ、ならびに、げっ歯類（例えば、マウスおよびラット）を含む。特定の態様では、個体または対象は、ヒトである。

[0065] ある剤（例えば、薬学的製剤）の「有効量」は、所望の治療的または予防的結果を達成するために有効である、必要な用量におけるおよび必要な期間にわたっての、量のことをいう。

[0066] 用語「添付文書」は、治療用品の商用パッケージに通常含まれ、そのような治療用品の使用に関する、適応症、用法、用量、投与方法、併用療法、禁忌、および／または警告についての情報を含む使用説明書のことをいうために用いられる。

[0067] 本明細書で用いられる「治療」（および、その文法上の派生語、例えば「治療する」、「治療すること」など）は、治療される個体の自然経過を改変することを企図した臨床的介入を意味し、予防のためにも、臨床的病態の経過の間にも実施され得る。治療の望ましい効果は、これらに限定されるものではないが、疾患の発生または再発の防止、症状の軽減、疾患による任意の直接的または間接的な病理的影響の減弱、転移の防止、疾患の進行速度の低減、疾患状態の回復または緩和、および寛解または改善された予後を含む。いくつかの態様において、本発明の抗体は、疾患の発症を遅らせる、または疾患の進行を遅くするために用いられる。

[0068] 用語「細胞増殖性障害」および「増殖性障害」は、一定程度の異常な細胞

増殖に関連する障害のことをいう。一態様において、細胞増殖性障害は、がんである。

[0069] 用語「がん」および「がん性」は、調節されない細胞成長／増殖によって典型的に特徴づけられる哺乳動物における生理学的状態のことをいうまたは説明するものである。がんの例は、がん腫、リンパ腫（例えば、ホジキンおよび非ホジキンリンパ腫）、芽細胞腫、肉腫、および白血病を含むが、これらに限定されない。そのようながんのより詳細な例は、扁平上皮細胞がん、小細胞肺がん、非小細胞肺がん、肺の腺がん、肺の扁平上皮がん、腹膜のがん、肝細胞がん、消化管がん、膵がん、神経膠腫、子宮頸がん、卵巣がん、肝がん、膀胱がん、ヘパトーマ、乳がん、結腸がん、結腸直腸がん、子宮内膜または子宮がん、唾液腺がん、腎がん、肝がん、前立腺がん、外陰部がん、甲状腺がん、肝細胞がん、白血病および他のリンパ球増殖性障害、ならびに様々なタイプの頭頸部がんを含む。

[0070] 用語「腫瘍」は、悪性か良性かによらず、すべての新生物性細胞成長および増殖ならびにすべての前がん性およびがん性細胞および組織のことをいう。用語「がん」、「がん性」、「細胞増殖性障害」、「増殖性障害」および「腫瘍」は、本明細書でいう場合、相互に排他的でない。

[0071] 「細胞成長または増殖の阻害」は、細胞の成長または増殖を少なくとも10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、または100%だけ減少させることを意味し、細胞死を誘導することを含む。

[0072] 参照ポリペプチド配列に対する「パーセント（%）アミノ酸配列同一性」は、最大のパーセント配列同一性を得るように配列を整列させてかつ必要ならギャップを導入した後の、かつ、いかなる保存的置換も配列同一性の一部と考えないとしたときの、参照ポリペプチド配列中のアミノ酸残基と同一である候補配列中のアミノ酸残基の、百分率比として定義される。パーセントアミノ酸配列同一性を決める目的のアラインメントは、当該技術分野における技術の範囲内にある種々の方法、例えば、BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign（DNASTAR）ソフトウェア、またはGENETYX（登録商標）（株式会社ゼネテ

ィックス）などの、公に入手可能なコンピュータソフトウェアを使用することにより達成することができる。当業者は、比較される配列の全長にわたって最大のアラインメントを達成するために必要な任意のアルゴリズムを含む、配列のアラインメントをとるための適切なパラメーターを決定することができる。

[0073] ALIGN-2配列比較コンピュータプログラムは、ジェネンテック社の著作であり、そのソースコードは米国著作権庁（U.S. Copyright Office, Wasington D.C., 20559）に使用者用書類とともに提出され、米国著作権登録番号TXU510087として登録されている。ALIGN-2プログラムは、ジェネンテック社（Genentech, Inc., South San Francisco, California）から公に入手可能であるし、ソースコードからコンパイルしてもよい。ALIGN-2プログラムは、Digital UNIX V4.0Dを含むUNIXオペレーティングシステム上での使用のためにコンパイルされる。すべての配列比較パラメーターは、ALIGN-2プログラムによって設定され、変動しない。

アミノ酸配列比較にALIGN-2が用いられる状況では、所与のアミノ酸配列Aの、所与のアミノ酸配列Bへの、またはそれとの、またはそれに対する％アミノ酸配列同一性（あるいは、所与のアミノ酸配列Bへの、またはそれとの、またはそれに対する、ある％アミノ酸配列同一性を有するまたは含む所与のアミノ酸配列A、ということもできる）は、次のように計算される：分率X／Yの100倍。ここで、Xは配列アラインメントプログラムALIGN-2によって、当該プログラムのAおよびBのアラインメントにおいて同一である一致としてスコアされたアミノ酸残基の数であり、YはB中のアミノ酸残基の全数である。アミノ酸配列Aの長さがアミノ酸配列Bの長さと等しくない場合、AのBへの％アミノ酸配列同一性は、BのAへの％アミノ酸配列同一性と等しくないことが、理解されるであろう。別段特に明示しない限り、本明細書で用いられるすべての％アミノ酸配列同一性値は、直前の段落で述べたとおりALIGN-2コンピュータプログラムを用いて得られるものである。

[0074] 本明細書で用語「および／または」は、「および／または」の前後に記載

される各対象またはそれらの任意の組合せを示すために用いられる。例えば、「A、Bおよび／またはC」は、「A」、「B」、「C」の各対象のほか、組み合わせ「AおよびB」、「AおよびC」、「BおよびC」、ならびに「AおよびBおよびC」も含む。

[0075] II．発明の詳細な説明

本開示の発明は、概して、優れた安定性を有するCD3結合ドメインを含む抗原結合分子、それらを含む医薬組成物、およびそれらの使用に関する。具体的には、本発明の抗原結合分子は、従来のT細胞リダイレクティング抗体（例えば、WO2015174439に記載されている二重特異性抗体）に含まれるCD3結合ドメインと比べて安定性が改善されたCD3結合ドメインを含む。本発明の抗原結合分子は、安定性が改善された本発明のCD3結合ドメインを含む分子であればその構造は特に限定されず、天然型抗体構造を有する分子であってもよいし、他の人工的に設計された構造を有するポリペプチドであってもよい。

[0076] いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は抗体である。いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、キメラ、ヒト化、またはヒト抗体を含む、モノクローナル抗体である。一態様において、本発明の抗原結合分子は、例えば、Fv、Fab、Fab'、scFv、ダイアボディ、シングルドメイン抗体、または$F(ab')_2$断片などの、抗体断片である。別の態様において、抗体は、例えば、完全IgG1抗体、完全IgG2抗体、完全IgG3抗体、または完全IgG4抗体などの、全長抗体である。

[0077] 優れた安定性を有するCD3結合ドメインを含む抗原結合分子

一局面において、本発明は、CD3に対する結合活性を有する第一の抗原結合ドメイン（CD3結合ドメイン）と、第二の抗原結合ドメインとを含む、抗原結合分子を提供する。別の局面において、本発明は、CD3に対する結合活性を有する単一の抗原結合ドメイン（CD3結合ドメイン）を含む、一価の抗原結合分子を提供する。本発明の抗原結合分子に含まれるCD3結合ドメインは、優れた安定性を有し、常温以上での保管後のCD3結合活性の低下が小さいことを特徴とする。一態様において、本発明の抗原結合分子に含まれるCD3結合ドメイン

は、所定の時間（例えば3日間）にわたって常温以上（例えば50℃）で保存した後のCD3結合活性が、低温（例えば4℃）で保存した後のCD3結合活性の65%以上、70%以上、または75%以上を維持する。いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子に含まれるCD3結合ドメインは、CD3ε鎖に対する結合活性を有する。いくつかの態様において、CD3は哺乳動物のCD3である。特定の態様において、CD3はヒトCD3である。いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインは、Fv、Fab、Fab'、またはscFvである。

[0078] CD3結合ドメイン

一態様において、本発明の抗原結合分子に含まれるCD3結合ドメインは、CD3に対する結合活性を有する抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域を含み、

前記H鎖可変領域は、

アミノ酸配列NAWMH（配列番号：1）を含むH鎖CDR1；

アミノ酸配列QIX$_1$DKSQNYATX$_2$VAESVKG（配列番号：2）を含むH鎖CDR2であって、X1がKまたはRであり、X$_2$がYまたはFである、H鎖CDR2；及び

アミノ酸配列VHYX$_3$AGYGVDX$_4$（配列番号：3）を含むH鎖CDR3であって、X$_3$がAまたはPであり、X$_4$がI、MまたはLである、H鎖CDR3

を含み、

前記L鎖可変領域は、

アミノ酸配列RSX$_5$X$_6$X$_7$VVHENRX$_8$TYLH（配列番号：4）を含むL鎖CDR1であって、X$_5$がSまたはTであり、X$_6$がQまたはMであり、X$_7$がSまたはTであり、X$_8$がQまたはNである、L鎖CDR1；

アミノ酸配列KVSNRFS（配列番号：5）を含むL鎖CDR2；及び

アミノ酸配列GQGTQVPYT（配列番号：6）を含むL鎖CDR3

を含む。なお、本明細書において、H鎖及び重鎖は相互に交換可能に用いられ、L鎖と軽鎖は相互に交換可能に用いられる。

[0079] 特定の態様において、CD3に対する結合活性を有する抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域は、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖CDR1、CDR2及びCDR3、並び

に、L鎖CDR1、CDR2及びCDR3の組合せのうちのいずれかを含む：

（a1）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：7に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：10に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a2）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a3）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：16に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a4）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a5）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：13に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a6）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列

を含むH鎖CDR3、配列番号：17に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a7) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：18に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a8) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：19に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ。

[0080] 一態様において、CD3に対する結合活性を有する抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域は、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖可変領域及びL鎖可変領域の組合せのうちのいずれかを含む：

(a1)配列番号：20に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖可変領域と、配列番号：25に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖可変領域との組合せ、

(a2) 配列番号：21に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖可変領域と、配列番号：25に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖可変領域との組合せ、

(a3) 配列番号：21に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖可変領域と、配列番号：26に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖可変領域との組合せ、

(a4) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖可変領域と、配列番号：25に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖可変領域との組合せ、

(a5) 配列番号：23に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖可変領域と、配列番号：25に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖可変領域との組合せ、

(a6) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖可変領域と、配列番号：27に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖可変領域との組合せ、

(a7) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖可変領域と、配列番号：28に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖可変領域との組合せ、

(a8) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するH鎖可変領域と、配列番号：29に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有するL鎖可変領域との組合せ。

[0081] 一態様において、CD3に対する結合活性を有する抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域は、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖可変領域と、L鎖可変領域との組合せのうちのいずれかを含む：

(a1)配列番号：20に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：7に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：10に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、H鎖可変領域と、配列番号：25に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少な

くとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、L鎖可変領域との組合せ、

（a2）配列番号：21に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、H鎖可変領域と、配列番号：25に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、L鎖可変領域との組合せ、

（a3）配列番号：21に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、H鎖可変領域と、配列番号：26に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：16に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、L鎖可変領域との組合せ、

（a4）配列番号：22に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、H鎖可変領域と、配列番号：25に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：15に示されるアミノ酸配列

を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、L鎖可変領域との組合せ、

(a5) 配列番号：23に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：13に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、H鎖可変領域と、配列番号：25に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、L鎖可変領域との組合せ、

(a6) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、H鎖可変領域と、配列番号：27に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：17に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、L鎖可変領域との組合せ、

(a7) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、H鎖可変領域と、配列番号：28に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：18に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配

列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、L鎖可変領域との組合せ、

(a8) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、H鎖可変領域と、配列番号：29に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：19に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、L鎖可変領域との組合せ。

[0082] 特定の態様において、CD3に対する結合活性を有する抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域は、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖可変領域及びL鎖可変領域の組合せのうちのいずれかを含む：

(a1)配列番号：20に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a2) 配列番号：21に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a3) 配列番号：21に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：26に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a4) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a5) 配列番号：23に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a6) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：27に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a7) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：28に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a8) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：29に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ。

[0083] 一態様において、本発明の抗原結合分子は、CD3に対する結合活性を有する重鎖及び軽鎖として、以下の(a1)～(a8)から選ばれる重鎖及び軽鎖の組合せのうちのいずれかを含む：

(a1)配列番号：30に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖と、配列番号：35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖との組合せ、

(a2) 配列番号：31に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖と、配列番号：35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖との組合せ、

(a3) 配列番号：31に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖と、配列番号：36に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖との組合せ、

(a4) 配列番号：32に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖と、配列番号：35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖との組合せ、

(a5) 配列番号：33に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖と、配列番号：35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖との組合せ、

(a6) 配列番号：32に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖と、配列番号：37に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有す

る軽鎖との組合せ、

(a7) 配列番号：32に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖と、配列番号：38に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖との組合せ、

(a8) 配列番号：32に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する重鎖と、配列番号：39に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有する軽鎖との組合せ。

[0084] 一態様において、本発明の抗原結合分子は、CD3に対する結合活性を有する重鎖及び軽鎖として、以下の(a1)～(a8)から選ばれる重鎖と、軽鎖との組合せのうちのいずれかを含む：

(a1)配列番号：30に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：7に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：10に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、重鎖と、配列番号：35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、軽鎖との組合せ、

(a2) 配列番号：31に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、重鎖と、配列番号：35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90%または少なくとも95%の配列同一性を有し、かつ配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、軽鎖との組合せ、

（a3）配列番号：31に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、重鎖と、配列番号：36に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：16に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、軽鎖との組合せ、

（a4）配列番号：32に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、重鎖と、配列番号：35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、軽鎖との組合せ、

（a5）配列番号：33に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：13に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、重鎖と、配列番号：35に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、軽鎖との組合せ、

（a6）配列番号：32に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、重鎖と、配列番

号：37に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：17に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、軽鎖との組合せ、

(a7) 配列番号：32に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、重鎖と、配列番号：38に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：18に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、軽鎖との組合せ、

(a8) 配列番号：32に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む、重鎖と、配列番号：39に示されるアミノ酸配列に対して少なくとも90％または少なくとも95％の配列同一性を有し、かつ配列番号：19に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む、軽鎖との組合せ。

[0085] 特定の態様において、本発明の抗原結合分子は、CD3に対する結合活性を有する重鎖及び軽鎖として、以下の(a1)～(a8)から選ばれる重鎖及び軽鎖の組合せのうちのいずれかを含む：

(a1)配列番号：30に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

(a2) 配列番号：31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

(a3) 配列番号：31に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：36に

示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a4）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a5）配列番号：33に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：35に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a6）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：37に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a7）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：38に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ、

（a8）配列番号：32に示されるアミノ酸配列を含む重鎖及び配列番号：39に示されるアミノ酸配列を含む軽鎖の組合せ。

[0086] 第二の抗原結合ドメイン

本発明の抗原結合分子において、第二の抗原結合ドメインは、標的とする抗原に対する結合活性を有する限り、その構造は特に限定されない。いくつかの態様において、第二の抗原結合ドメインは、抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域を含む。

[0087] 単一特異性抗原結合分子

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は単一特異性抗原結合分子であり、第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインは、いずれもCD3（例えば、ヒトCD3）に対する結合活性を有する。一態様において、第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインは、CD3における同じエピトープに対する結合活性を有する。特定の態様において、第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインは、いずれもCD3ε鎖（例えば、ヒトCD3ε鎖）に対する結合活性を有する。

特定の態様において、第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインは、同じアミノ酸配列を含む。別の特定の態様において、第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインは、互いに異なるアミノ酸配列を含む。

[0088] 多重特異性抗原結合分子

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、少なくとも2つの異なる部位に結合特異性を有する、多重特異性抗原結合分子である。特定の態様において、本発明の多重特異性抗原結合分子は二重特異性抗原結合分子である。別の特定の態様において、本発明の多重特異性抗原結合分子は三重以上の特異性を有する抗原結合分子であり、例えば、三重特異性抗原結合分子、四重特異性抗原結合分子、五重特異性抗原結合分子、または六重特異性抗原結合分子である。

[0089] 本発明の多重特異性抗原結合分子の一態様において、第一の抗原結合ドメインはCD3に対する結合活性を有し、第二の抗原結合ドメインはCD3以外の抗原に対する結合活性を有する。このような態様において、第二の抗原結合ドメインが認識および結合する「CD3以外の抗原」は、好ましくはT細胞の持つ細胞傷害作用（T細胞依存的細胞傷害活性）の標的とされる細胞の表面に発現する分子であり、例えば、がん細胞の表面に特異的に発現する分子（本明細書において、がん抗原またはがん特異的抗原とも称される）、および免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現する分子（本明細書において、免疫抑制細胞表面抗原とも称される）が挙げられる。

[0090] 一態様において、第二の抗原結合ドメインは、がん抗原に対する結合活性を有する。このような態様において、本発明の多重特異性抗原結合分子は、第一の抗原結合ドメインを介してCD3に結合し、第二の抗原結合ドメインを介してがん抗原に結合することによって、T細胞を標的がん細胞に近接せしめ、T細胞による標的がん細胞を含む組織に対する細胞傷害活性を通じて、がんを治療または予防することができる。

別の態様において、第二の抗原結合ドメインは、免疫抑制細胞表面抗原に対する結合活性を有する。このような態様において、本発明の多重特異性抗原結合分子は、第一の抗原結合ドメインを介してCD3に結合し、第二の抗原結合ドメインを介して免疫抑制細胞表面抗原に結合することによって、T細胞を、免疫応答を抑制する機能を有する細胞（本明細書において免疫抑制細胞と

も称される）に近接せしめ、T細胞による免疫応答抑制細胞に対する細胞傷害活性を通じて、がんを治療または予防することができる。

本発明の多重特異性抗原結合分子において、第二の抗原結合ドメインとして、がん抗原または免疫抑制細胞表面抗原に対する結合活性を有する、公知の抗原結合ドメインおよび将来同定されるものを含む他の抗原結合ドメインを用いることができる。

[0091] 好ましい態様において、本発明の多重特異性抗原結合分子は、CD3に対する結合活性を有する第一の抗原結合ドメインとして、配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：7に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、及び配列番号：10に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3を含む抗体H鎖可変領域（例えば、配列番号：20に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域）と、配列番号：14に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3を含む抗体L鎖可変領域（例えば、配列番号：24に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域）とを含む対照多重特異性抗原結合分子の細胞傷害活性と比較して、同等又はそれ以上の細胞傷害活性を有する。そのような多重特異性抗原結合分子としては、例えば、後掲の表５に記載の抗体番号2，14，25，29，30～32，34の重鎖および軽鎖CDR、重鎖および軽鎖可変領域、または重鎖および軽鎖を、CD3に対する結合活性を有する第一の抗原結合ドメインとして含む、多重特異性抗原結合分子（例えば二重特異性抗原結合分子、例えば二重特異性抗体）を挙げることができる。

[0092] CD3に対する結合活性を有する抗体可変領域を含むドメイン

本明細書において「CD3に対する結合活性を有する抗体可変領域」及び「CD3に対する結合活性を有する抗体可変領域を含むドメイン」は相互に交換可能に用いられ、T細胞受容体とともにT細胞受容体複合体を構成するアダプター分子であるCD3の一部または全部に特異的に結合し且つ相補的である領域を含んで成る抗CD3抗体の部分をいう。好ましくは、当該ドメインは抗CD3抗体の軽鎖可変領域（VL）と抗CD3抗体の重鎖可変領域（VH）とを含む。こうしたド

メインの例としては、「scFv（single chain Fv）」、「単鎖抗体（single chain antibody）」、「Fv」、「$scFv_2$（single chain Fv 2）」、「Fab」または「$F(ab')_2$」等が好適に挙げられる。

[0093] 本発明に係るCD3結合ドメイン（CD3に対する結合活性を有する抗体可変領域を含むドメイン）は、CD3を構成するγ鎖、δ鎖又はε鎖配列に存在するエピトープであればいずれのエピトープに結合するものであってもよい。本発明において、好ましくはヒトCD3複合体のε鎖の細胞外領域に存在するエピトープに結合する抗CD3抗体の軽鎖可変領域（VL）と重鎖可変領域（VH）とを含むドメインが好適に用いられる。こうしたドメインとしては、実施例に記載の抗CD3抗体の軽鎖可変領域(VL)と抗CD3抗体の重鎖可変領域(VH)が好適に用いられる。CD3結合活性を有する抗体可変領域を含むドメインの起源となる抗CD3抗体は前記のとおり適宜ヒト化された抗体やヒト抗体が適宜用いられる。CD3を構成するγ鎖、δ鎖、及びε鎖の構造は、そのポリヌクレオチド配列が、それぞれRefSeq登録番号NM_000073.2、NM_000732.4、及びNM_000733.3に、そのポリペプチド配列が、それぞれRefSeq登録番号NP_000064.1、NP_000723.1、及びNP_000724.1にて登録されている。

[0094] CD3以外の抗原に対する結合活性を有する抗体可変領域を含むドメイン

本明細書において「CD3以外の抗原に対する結合活性を有する抗体可変領域」及び「CD3以外の抗原に対する結合活性を有する抗体可変領域を含むドメイン」は相互に交換可能に用いられ、当該抗原（例えば、がん抗原：本明細書において、がん特異的抗原とも称される）の一部または全部に特異的に結合し且つ相補的である領域を含んで成る抗体の部分をいう。抗体可変領域を含むドメインは一または複数の抗体の可変ドメインより提供され得る。好ましくは、抗体可変領域を含むドメインは抗体軽鎖可変領域（VL）と抗体重鎖可変領域（VH）とを含む。こうした抗体可変領域を含むドメインの例としては、「scFv（single chain Fv）」、「単鎖抗体（single chain antibody）」、「Fv」、「$scFv_2$（single chain Fv 2）」、「Fab」または「$F(ab')_2$」等が好適に挙げられる。

[0095] 抗原

本明細書において、「抗原」は、抗原結合ドメインが結合するエピトープを含むことのみで制限される。抗原の好適な例として、それだけに限定されないが、動物またはヒト由来のペプチド、ポリペプチド、およびタンパク質が挙げられる。標的組織に起因する疾患を治療するために用いられる抗原の好適な例として、それだけに限定されないが、標的細胞（例：がん細胞および炎症細胞）の表面に発現する分子、標的細胞を含む組織中の他の細胞表面に発現する分子、標的細胞と標的細胞を含む組織に対して免疫学的役割を持つ細胞の表面に発現する分子、ならびに標的細胞を含む組織の間質中に存在する大分子が挙げられる。

[0096] 一実施態様において、抗原は、任意の動物種（例えば、ヒト；または非ヒト動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、モルモット、ウサギ、サル、カニクイザル、アカゲザル、マントヒヒ、チンパンジー、ヤギ、ヒツジ、イヌ、ウマ、ブタ、ウシ、またはラクダ）、または任意の鳥類に由来してもよく；抗原は好ましくは、ヒト、ウサギ、サル、ラット、またはマウスに由来する。

[0097] 本発明の抗原結合分子が認識および結合する「抗原」（例えばCD3）は、別段示さない限り、霊長類（例えば、ヒト）およびげっ歯類（例えば、マウスおよびラット）などの哺乳動物を含む、任意の脊椎動物供給源からの任意の天然型の「抗原」（例えばCD3）のことをいう。この用語は、「全長」のプロセシングを受けていない「抗原」（例えばCD3）も、細胞中でのプロセシングの結果生じるいかなる形態の「抗原」（例えばCD3）も包含する。これらの用語はまた、自然に生じる「抗原」（例えばCD3）の変異体、例えば、スプライス変異体や対立遺伝子変異体も包含する。

[0098] いくつかの態様において、抗原としては、17-IA、4-1BB、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1 アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、

アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、aFGF、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アルファ-1-アンチトリプシン、アルファ－V/ベータ-1アンタゴニスト、ANG、Ang、APAF-1、APE、APJ、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン、抗Id、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、av/b3インテグリン、Axl、b2M、B7-1、B7-2、B7-H、B-リンパ球刺激因子（BlyS）、BACE、BACE-1、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、BMP、BMP-2 BMP-2a、BMP-3/オステオゲニン（Osteogenin）、BMP-4、BMP-2b、BMP-5、BMP-6、Vgr-1、BMP-7（OP-1）、BMP-8（BMP-8a、OP-2）、BMPR、BMPR-IA（ALK-3）、BMPR-IB（ALK-6）、BRK-2、RPK-1、BMPR-II（BRK-3）、BMP、b-NGF、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、BPDE、BPDE-DNA、BTC、補体因子3（C3）、C3a、C4、C5、C5a、C10、CA125、CAD-8、カルシトニン、cAMP、癌胎児性抗原（CEA）、癌関連抗原、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPI、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL2、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL24、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9/10、CCR、CCR1、CCR10、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD2、CD3、CD3E、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27L、CD28、CD29、CD30、CD30L、CD32、CD33（p67タンパク質）、CD34、CD38、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD52、CD54、CD55、CD56、CD61、CD64、CD66e、CD74、CD80（B7-1）、CD89、CD95、CD123、CD137、CD138、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD152、CD164、CEACAM5、CFTR、cGMP、CINC、ボツリヌス菌毒素、ウェルシュ菌毒素、CKb8-1、クローディン6、CLC、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、COX、C-Ret、CRG-2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、PD1、PDL1、LAG3、TIM3、galectin-9、CX3CL1、CX

3CR1、CXCL、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、補体制御因子（Decay accelerating factor）、des（1-3）-IGF-I（脳IGF-1）、Dhh、ジゴキシン、DLL3、DNAM-1、Dnase、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR（ErbB-1）、EMA、EMMPRIN、ENA、エンドセリン受容体、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン1、EpCAM、エフリンB2/EphB4、EPO、ERCC、E-セレクチン、ET-1、第IIa因子、第VII因子、第VIIIc因子、第IX因子、線維芽細胞活性化タンパク質（FAP）、Fas、FcR1、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-3、FGF-8、FGFR、FGFR-3、フィブリン、FL、FLIP、Flt-3、Flt-4、卵胞刺激ホルモン、フラクタルカイン、FZD1、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、FZD10、G250、Gas6、GCP-2、GCSF、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-3（Vgr-2）、GDF-5（BMP-14、CDMP-1）、GDF-6（BMP-13、CDMP-2）、GDF-7（BMP-12、CDMP-3）、GDF-8（ミオスタチン）、GDF-9、GDF-15（MIC-1）、GDNF、GDNF、GFAP、GFRa-1、GFR-アルファ1、GFR-アルファ2、GFR-アルファ3、GITR、グルカゴン、Glut4、糖タンパク質IIb/IIIa（GPIIb/IIIa）、GM-CSF、gp130、gp72、GRO、成長ホルモン放出因子、ハプテン（NP-capまたはNIP-cap）、HB-EGF、HCC、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV gHエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子（HGF）、Hep B gp120、ヘパラナーゼ、Her2、Her2/neu（ErbB-2）、Her3（ErbB-3）、Her4（ErbB-4）、単純ヘルペスウイルス（HSV） gB糖タンパク質、HSV gD糖タンパク質、HGFA、高分子量黒色腫関連抗原（HMW-MAA）、HIV gp120、HIV IIIB gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HRG、Hrk、ヒト心臓ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）、ヒト成長ホルモン（HGH）、HVEM、I-309、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFNg、Ig、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1R、IGFBP、IGF-I、IGF-II、IL、IL-1、IL-1R、IL-2、IL-2R、IL-4、IL-4R、IL-5、IL-5R、IL-6、IL-6R、IL-8、IL-9、IL-10、IL-1

2、IL-13、IL-15、IL-18、IL-18R、IL-21、IL-23、IL-27、インターフェロン（INF）-アルファ、INF-ベータ、INF-ガンマ、インヒビン、iNOS、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様増殖因子1、インテグリンアルファ2、インテグリンアルファ3、インテグリンアルファ4、インテグリンアルファ4/ベータ1、インテグリンアルファ4/ベータ7、インテグリンアルファ5（アルファV）、インテグリンアルファ5/ベータ1、インテグリンアルファ5/ベータ3、インテグリンアルファ6、インテグリンベータ1、インテグリンベータ2、インターフェロンガンマ、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレイン11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子（KGF）、ラミニン5、LAMP、LAP、LAP（TGF-1）、潜在的TGF-1、潜在的TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LECT2、レフティ、ルイス－Y抗原、ルイス－Y関連抗原、LFA-1、LFA-3、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面、黄体形成ホルモン、リンホトキシンベータ受容体、Mac-1、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、MCAM、MCAM、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、メタロプロテイナーゼ、MGDF受容体、MGMT、MHC（HLA-DR）、MIF、MIG、MIP、MIP-1-アルファ、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MPIF、Mpo、MSK、MSP、ムチン（Muc1）、MUC18、ミュラー管抑制物質、Mug、MuSK、NAIP、NAP、NCAD、N-Cアドヘリン、NCA 90、NCAM、NCAM、ネプリライシン、ニューロトロフィン-3、-4、または-6、ニュールツリン、神経成長因子（NGF）、NGFR、NGF－ベータ、nNOS、NO、NOS、Npn、NRG-3、NT、NTN、OB、OGG1、OPG、OPN、OSM、OX40L、OX40R、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PDGF、PDGF、PDK-1、PECAM、PEM、PF4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIN、PLA2、胎盤性アルカリホスファターゼ（PLAP）、PlGF、PLP、PP14、プロインスリン、プロレラキシン、プロテインC、PS、PSA、PSCA、前立腺特異的膜抗原（PSMA）、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、R51

、RANK、RANKL、RANTES、RANTES、レラキシンA鎖、レラキシンB鎖、レニン、呼吸器多核体ウイルス（RSV）F、RSV Fgp、Ret、リウマトイド因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SERINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、Stat、STEAP、STEAP-II、TACE、TACI、TAG-72（腫瘍関連糖タンパク質－72）、TARC、TCA-3、T細胞受容体（例えば、T細胞受容体アルファ/ベータ）、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、TERT、睾丸PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF-アルファ、TGF-ベータ、TGF-ベータ Pan Specific、TGF-ベータRI（ALK-5）、TGF-ベータRII、TGF-ベータRIIb、TGF-ベータRIII、TGF-ベータ1、TGF-ベータ2、TGF-ベータ3、TGF-ベータ4、TGF-ベータ5、トロンビン、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、TMEFF2、Tmpo、TMPRSS2、TNF、TNF-アルファ、TNF-アルファベータ、TNF-ベータ2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A（TRAIL R1 Apo-2、DR4）、TNFRSF10B（TRAIL R2 DR5、KILLER、TRICK-2A、TRICK-B）、TNFRSF10C（TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID）、TNFRSF10D（TRAIL R4 DcR2、TRUNDD）、TNFRSF11A（RANK ODF R、TRANCE R）、TNFRSF11B（OPG OCIF、TR1）、TNFRSF12（TWEAK R FN14）、TNFRSF13B（TACI）、TNFRSF13C（BAFF R）、TNFRSF14（HVEM ATAR、HveA、LIGHT R、TR2）、TNFRSF16（NGFR p75NTR）、TNFRSF17（BCMA）、TNFRSF18（GITR AITR）、TNFRSF19（TROY TAJ、TRADE）、TNFRSF19L（RELT）、TNFRSF1A（TNF RI CD120a、p55-60）、TNFRSF1B（TNF RII CD120b、p75-80）、TNFRSF26（TNFRH3）、TNFRSF3（LTbR TNF RIII、TNFC R）、TNFRSF4（OX40 ACT35、TXGP1 R）、TNFRSF5（CD40 p50）、TNFRSF6（Fas Apo-1、APT1、CD95）、TNFRSF6B（DcR3 M68、TR6）、TNFRSF7（CD27）、TNFRSF8（CD30）、TNFRSF9（4-1BB CD137、ILA）、TNFRSF21（DR6）、TNFRSF22（DcTRAIL R2 TNFRH2）、TNFRST23（DcTRAIL R1 TNFRH1）、TNFRSF25（DR3 Apo-3、LARD、TR-3、TRAMP、WSL-1）、TNFSF10（TRAIL Apo-2リガンド、TL2）、TNFSF11（TRANCE/RANKリガンド ODF、OPGリガンド）、TNFSF12（TWEAK Apo-3リガンド、DR3リガンド）、TNFSF13（APRIL TALL2）、TNFSF13B（BAFF BLYS、TALL1、THANK、TNFSF20）、TNFSF14（LIGH

T HVEMリガンド、LTg）、TNFSF15（TL1A/VEGI）、TNFSF18（GITRリガンド AITRリガンド、TL6）、TNFSF1A（TNF-a コネクチン（Conectin）、DIF、TNFSF2）、TNFSF1B（TNF-b LTa、TNFSF1）、TNFSF3（LTb TNFC、p33）、TNFSF4（OX40リガンド gp34、TXGP1）、TNFSF5（CD40リガンド CD154、gp39、HIGM1、IMD3、TRAP）、TNFSF6（Fasリガンド Apo-1リガンド、APT1リガンド）、TNFSF7（CD27リガンド CD70）、TNFSF8（CD30リガンド CD153）、TNFSF9（4-1BBリガンド CD137リガンド）、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、TRF、Trk、TROP-2、TLR(Toll-like receptor)1、TLR2、TLR3、TLR4、TLR5、TLR6、TLR7、TLR8、TLR9、TLR10、TSG、TSLP、腫瘍関連抗原CA125、腫瘍関連抗原発現ルイスY関連炭水化物、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-カドヘリン、VE-カドヘリン-2、VEFGR-1（flt-1）、VEGF、VEGFR、VEGFR-3（flt-4）、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ヴィレブランド因子、WIF-1、WNT1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、XCL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、Aβ、CD81、CD97、CD98、DDR1、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL、PCSK9、プレカリクレイン、RON、TMEM16F、SOD1、クロモグラニンA、クロモグラニンB、tau、VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav1.2、Nav1.3、Nav1.4、Nav1.5、Nav1.6、Nav1.7、Nav1.8、Nav1.9、EPCR、C1、C1q、C1r、C1s、C2、C2a、C2b、C3、C3a、C3b、C4、C4a、C4b、C5、C5a、C5b、C6、C7、C8、C9、B因子、D因子、H因子、プロパージン、スクレロスチン、フィブリノーゲン、フィブリン、プロトロンビン、トロンビン、組織因子、第V因子、第Va因子、VII因子、第VIIa因子、第VIII因子、第VIIIa因子、第IX因子、第IXa因子、第X因子、第Xa因子、第XI因子、第XIa因子、第XII因子、第XIIa因子、第XIII因子、第XIIIa因子、TFPI、アンチトロンビンIII、EPCR、トロンボモデュリン、TAPI、tPA、プラスミノーゲン、プラスミン、PAI-1、PAI-2、GPC3、シンデカン-1、

シンデカン-2、シンデカン-3、シンデカン-4、LPA、S1Pなどが挙げられる。いくつかの態様において、抗原としては、ホルモンおよび成長因子のための受容体などが挙げられる。特定の態様において、抗原は、腫瘍組織に含まれる細胞（例えば腫瘍細胞、免疫細胞、間質細胞など）が発現または分泌する抗原分子、特に、がん細胞が特異的に発現する抗原（がん特異的抗原）である。特定の態様において、抗原は、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現する抗原分子である。

[0099] がん特異的抗原

標的細胞上の抗原の非限定的な例としての「がん特異的抗原」は、がん細胞と健常細胞を区別することを可能とする、がん細胞が発現する抗原を意味し、例えば、細胞の悪性化に伴って発現する抗原、細胞が、がん化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖が含まれる。具体的には、ALK、プレイオトロフィン(PTN)、EpCAM、CA125、前立腺酸性フォスファターゼ(PAP)、前立腺特異的抗原(PSA)、TYRP1、HMW-MAA、前立腺特異的膜抗原(PSMA)、CEA、MUC1、HMFG1、TAG-72、GICA(CA19-9)、NY-ESO-1、LEA、CD15、CD17、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD77、CD79b、CD147、CD228、GD2、GD3、GM2、GM3、TSTA、ウイルスにより誘導される腫瘍抗原（例えばDNA腫瘍ウイルスおよびRNA腫瘍ウイルスのエンベロープ抗原）、α－フェトプロテイン(AFP)、5T4、分化抗原（例えば、L6およびL20抗原)、CD165、EGFR、ANKRD17、ErbB2、APO-1、SSEA-1、SCP-1、LeY、オリゴ糖抗原、SSEA-3、SSEA-4、CTAGE1、MART-1、シアリルTn(STn)、NY-CO-45、NY-LU-12、ART1、MA2、NOVA2、TSPAN8、MAGE-C1、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-4A、 MAGE-X2、YKL-40、EREG、CA15-3、CLEC12A、Nectin4、Trop2、BCMA、Tissue factor、FRα (FOLR1)、ErbB3、Claudin18 (Claudin18.2)、B7-H3 (CD276)、MET、PSCA、PTK7、MSLN (Mesothelin)、CCR4、CDH6、IL13RA2、GPC3、XPR1、NOX1、MARVELD3 isoform 1、MARVELD3 isoform 2、SPINT2、MANSC1、SLC12A2、CDCP1、SEZ6L2、FLVCR1、SLC7A5、STEAP1、MMP14、TNFRSF21、TMPRSS4、クローディン6、DLL3ならびにこれらのポリペプチドの任意の断片、ならびにその改変された構造が

挙げられる。

[0100] 免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現する抗原

「免疫応答を抑制する機能を有する細胞」は、免疫応答を抑制する機能を有していれば特に限定されず、例えば、制御性T細胞(regulatory T cell (Treg))、疲弊T細胞(exhausetd T cell)、MDSC (myeloma derived stromal cell) 、TAM (tumor associated macrophage)、Tr1 (induced regulatory T cell)、TADC(tumor-associated dendritic cell)、TAN(tumor-associated neutrophil)、CAF (cancer-associated fibroblast)、Breg (regulatory B cell)等が挙げられ、特に制御性T細胞及び疲弊T細胞が本発明の対象細胞として好ましい。これら免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現する分子としては、具体的には、例えば、CTLA4、PD1、TIM3、LAG-3、CD244 (2B4)、CD160、GARP、OX40、CD137 (4-1BB)、CD25、VISTA、VISATA、BTLA、TNFR25、CD57、KLRG1、CCR2、CCR5、CCR6、CD39、CD73、CD4、CD18、CD49b、CD1d、CD5、CD21、TIM1、CD19、CD20、CD23、CD24、CD38、CD93、IgM、B220(CD45R)、CD317、PD-L1、CD11b、Ly6G、ICAM-1、FAP、PDGFR、Podoplanin、TIGIT等が挙げられる。これらの分子のうち、本発明の結合ドメインの対象となる好ましい分子としては、例えば、免疫応答抑制機能が高いと報告されている細胞画分（$CD4^{+}$, $CD25^{high}$, $CD45RA^{-}$）に特異的に発現している細胞表面分子であるCTLA4, TIM3, LAG3, CD137(4-1BB), CD25, CCR5, CCR6, CD38, 及びTIGITが挙げられる。本発明の結合ドメインの対象となる好ましい分子としては、特に、CTLA4、LAG3、OX40があげられる。

[0101] 抗原に対する結合活性

下記にCD3に対して結合活性を有する抗体可変領域を含むドメインを有する被験抗原結合分子によるエピトープへの結合の確認方法が例示されるが、他の抗原に対して結合活性を有する抗体可変領域を含むドメインを有する被験抗原結合分子によるエピトープへの結合の確認方法も下記の例示に準じて適宜実施され得る。

[0102] 例えば、CD3に対して結合活性を有する抗体可変領域を含むドメインを含む

被験抗原結合分子が、CD3分子中に存在する線状エピトープを認識することは、たとえば次のようにして確認することができる。上記の目的のためにCD3の細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状のペプチドが合成される。当該ペプチドは、化学的に合成され得る。あるいは、CD3のcDNA中の、細胞外ドメインに相当するアミノ酸配列をコードする領域を利用して、遺伝子工学的手法により得られる。次に、細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドと、CD3に対して結合活性を有する抗体可変領域を含むドメインを有する被験抗原結合分子との結合活性が評価される。たとえば、固定化された線状ペプチドを抗原とするELISAによって、当該ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が評価され得る。あるいは、CD3発現細胞に対する当該抗原結合分子の結合における、線状ペプチドによる阻害のレベルに基づいて、線状ペプチドに対する結合活性が明らかにされ得る。これらの試験によって、線状ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が明らかにされ得る。

[0103] また、CD3に対して結合活性を有する抗体可変領域を含むドメインを有する被験抗原結合分子が立体構造エピトープを認識することは、次のようにして確認され得る。上記の目的のために、CD3を発現する細胞が調製される。CD3に対して結合活性を有する抗体可変領域を含むドメインを有する被験抗原結合分子がCD3発現細胞に接触した際に当該細胞に強く結合する一方で、当該抗原結合分子が固定化されたCD3の細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列からなる線状ペプチドに対して実質的に結合しないとき等が挙げられる。ここで、実質的に結合しないとは、ヒトCD3発現細胞に対する結合活性の80%以下、通常50%以下、好ましくは30%以下、特に好ましくは15%以下の結合活性をいう。

[0104] CD3に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子のCD3発現細胞に対する結合活性を測定する方法としては、例えば、Antibodies A Laboratory Manual記載の方法（Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory（1988）359-420）が挙げられる。即ち、CD3発現細胞を抗原とするELISAやFA

CS（fluorescence activated cell sorting）の原理によって評価され得る。

[0105] ELISAフォーマットにおいて、CD3に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子のCD3発現細胞に対する結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、CD3発現細胞を固定化したELISAプレートに被験抗原結合分子を加え、細胞に結合した被験抗原結合分子が、被験抗原結合分子を認識する酵素標識抗体を利用して検出される。あるいはFACSにおいては、被験抗原結合分子の希釈系列を作成し、CD3発現細胞に対する抗体結合力価（titer）を決定することにより、CD3発現細胞に対する被験抗原結合分子の結合活性が比較され得る。

[0106] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原に対する被験抗原結合分子の結合は、フローサイトメーターによって検出することができる。フローサイトメーターとしては、例えば、次のような装置が知られている。

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

FACSCalibur™ （いずれもBD Biosciences社の商品名）

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta / Cell Lab Quanta SC（いずれもBeckman Coulter社の商品名）

[0107] 例えば、CD3に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原に対する結合活性の好適な測定方法の一例として、次の方法が挙げられる。まず、CD3を発現する細胞と反応させた被験抗原結合分子を認識するFITC標識した二次抗体で染色する。被験抗原結合分子を適宜好適な緩衝液によって希釈することによって、当該会合体が所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10μg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用され得る。次に、FACS

Calibur（BD社）により蛍光強度と細胞数が測定される。当該細胞に対する抗体の結合量は、CELL QUEST Software（BD社）を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、被験抗原結合分子の結合量によって表される被験抗原結合分子の結合活性が測定され得る。

[0108] CD3に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、ある抗原結合分子とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によって確認され得る。抗原結合分子間の競合は、交叉ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交叉ブロッキングアッセイである。

[0109] 具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にコートしたCD3タンパク質が、候補となる競合抗原結合分子の存在下、または非存在下でプレインキュベートされた後に、被験抗原結合分子が添加される。ウェル中のCD3タンパク質に結合した被験抗原結合分子の量は、同じエピトープへの結合に対して競合する候補となる競合抗原結合分子の結合能に間接的に相関している。すなわち同一エピトープに対する競合抗原結合分子の親和性が大きくなればなる程、被験抗原結合分子のCD3タンパク質をコートしたウェルへの結合活性は低下する。

[0110] CD3タンパク質を介してウェルに結合した被験抗原結合分子の量は、予め抗原結合分子を標識しておくことによって、容易に測定され得る。たとえば、ビオチン標識された抗原結合分子は、アビジンペルオキシダーゼコンジュゲートと適切な基質を使用することにより測定される。ペルオキシダーゼなどの酵素標識を利用した交叉ブロッキングアッセイは、特に競合ELISAアッセイといわれる。抗原結合分子は、検出あるいは測定が可能な他の標識物質で標識され得る。具体的には、放射標識あるいは蛍光標識などが公知である。

[0111] 候補の競合抗原結合分子の非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、競合抗原結合分子が、CD3に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の結合を少なくとも20%、好ましくは少な

くとも20～50%、さらに好ましくは少なくとも50%ブロックできるならば、当該被験抗原結合分子は競合抗原結合分子と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープへの結合に対して競合する抗原結合分子である。

[0112] CD3に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が結合するエピトープの構造が同定されている場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子とがエピトープを共有することは、当該エピトープを構成するペプチドにアミノ酸変異を導入したペプチドに対する両者の抗原結合分子の結合活性を比較することによって評価され得る。

[0113] こうした結合活性を測定する方法としては、例えば、前記のELISAフォーマットにおいて変異を導入した線状のペプチドに対する被験抗原結合分子及び対照抗原結合分子の結合活性を比較することによって測定され得る。ELISA以外の方法としては、カラムに結合した当該変異ペプチドに対する結合活性を、当該カラムに被検抗原結合分子と対照抗原結合分子を流下させた後に溶出液中に溶出される抗原結合分子を定量することによっても測定され得る。変異ペプチドを例えばGSTとの融合ペプチドとしてカラムに吸着させる方法は公知である。

[0114] また、同定されたエピトープが立体構造エピトープの場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子とがエピトープを共有することは、次の方法で評価され得る。まず、CD3を発現する細胞とエピトープに変異が導入されたCD3を発現する細胞が調製される。これらの細胞がPBS等の適切な緩衝液に懸濁された細胞懸濁液に対して被験抗原結合分子と対照抗原結合分子が添加される。次いで、適宜緩衝液で洗浄された細胞懸濁液に対して、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子を認識することができるFITC標識された抗体が添加される。標識抗体によって染色された細胞の蛍光強度と細胞数がFACSCalibur（BD社）によって測定される。被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の濃度は好適な緩衝液によって適宜希釈することによって所望の濃度に調製して用いられる。例えば、10μg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用さ

れる。当該細胞に対する標識抗体の結合量は、CELL QUEST Software（BD社）を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、標識抗体の結合量によって表される被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の結合活性を測定することができる。

[0115] 本方法において、例えば「変異CD3発現細胞に実質的に結合しない」ことは、以下の方法によって判断することができる。まず、変異CD3を発現する細胞に対して結合した被験抗原結合分子と対照抗原結合分子を、標識抗体で染色する。次いで細胞の蛍光強度を検出する。蛍光検出にフローサイトメトリーとしてFACSCaliburを用いた場合、得られた蛍光強度はCELL QUEST Softwareを用いて解析され得る。抗原結合分子存在下および非存在下でのGeometric Meanの値から、この比較値（ΔGeo-Mean）を下記の計算式に基づいて算出することにより、抗原結合分子の結合による蛍光強度の増加割合を求めることができる。

[0116] ΔGeo-Mean＝Geo-Mean（抗原結合分子存在下）／Geo-Mean（抗原結合分子非存在下）

[0117] 解析によって得られる被験抗原結合分子の変異CD3発現細胞に対する結合量が反映されたGeometric Mean比較値（変異CD3分子ΔGeo-Mean値）を、被験抗原結合分子のCD3発現細胞に対する結合量が反映されたΔGeo-Mean比較値と比較する。この場合において、変異CD3発現細胞及びCD3発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値を求める際に使用する被験抗原結合分子の濃度は互いに同一又は実質的に同一の濃度で調整されることが特に好ましい。予めCD3中のエピトープを認識していることが確認された抗原結合分子が、対照抗原結合分子として利用される。

[0118] 被験抗原結合分子の変異CD3発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値が、被験抗原結合分子のCD3発現細胞に対するΔGeo-Mean比較値の、少なくとも80%、好ましくは50%、更に好ましくは30%、特に好ましくは15%より小さければ、「変異CD3発現細胞に実質的に結合しない」ものとする。Geo-Mean値（Geomet

ric Mean）を求める計算式は、CELL QUEST Software User's Guide（BD biosciences社）に記載されている。比較値を比較することによってそれが実質的に同視し得る程度であれば、被験抗原結合分子と対照抗原結合分子のエピトープは同一であると評価され得る。

[0119] Fc領域に含まれるFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子

本発明の抗原結合分子の好ましい例として、抗体のFc領域に含まれるFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子を挙げることができる。生体内に投与されたタンパク質の血中半減期を延ばす方法として、目的タンパク質に抗体のFcRn結合ドメインを付加し、FcRnを介したリサイクリング機能を利用する方法が良く知られている。

[0120] 本発明において、「FcRn結合ドメイン」は、FcRnに対して結合活性を有するものであれば特に限定されず、FcRnに直接結合するドメインであってもよいし、間接的に結合するドメインであってもよい。FcRnに直接結合するドメインとしては、例えば、FcRnを抗原とする抗体の可変領域、Fab、抗体のFc領域、これらの断片、アルブミン、アルブミンドメイン３、ヒト血清アルブミン(HSA)、トランスフェリン等が挙げられる。また、FcRnと間接的に結合するドメインとしては、例えば、上述のFcRnに直接結合するドメインに対して結合活性を有するドメインが挙げられる。本発明との関連において、FcRn結合ドメインの態様の１つとして、抗体のFc領域、或いは、Fc領域中のFcRn結合領域を含む断片が挙げられる。ここで、「Fc領域」としては、例えばIgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgMタイプのFc領域が存在し、例えば天然型IgG由来のFc領域を用いることができる。天然型IgGとは、天然に見出されるIgGと同一のアミノ酸配列を包含し、免疫グロブリンガンマ遺伝子により実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを意味する。例えば天然型ヒトIgGとは天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3、天然型ヒトIgG4などを意味する。天然型IgGにはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4抗体の定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of protei

ns of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。特にヒトIgG1の配列としては、EUナンバリング356～358番目のアミノ酸配列がDELであってもEEMであってもよい。

[0121] いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、抗体のFc領域を含む。本発明の抗原結合分子が単一の抗原結合ドメインを含む場合、当該抗原結合ドメインは、二量体Fc領域を構成する2つのポリペプチドのうちの一つに連結されていてもよい。本発明の抗原結合分子が第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインを含む場合、二量体Fc領域を構成する2つのポリペプチドのうちの一方に第一の抗原結合ドメインが連結され、他方に第二の抗原結合ドメインが連結されていてもよいが、そのような態様に限定されない。特定の態様において、本発明の抗原結合分子は、Fcγ受容体に対する結合活性が低下している抗体のFc領域を含む。本発明の多重特異性抗原結合分子が抗体のFc領域を含む場合、catumaxomab等のtrifunctional抗体において見られるような標的抗原非依存的な各種サイトカインの産生誘導が生じるのを避けるため、Fcγ受容体に対する結合活性が低下している抗体のFc領域を用いることが好ましい。

抗体のFc領域における、Fcγ受容体に対する結合活性の低下をもたらす様々なアミノ酸変異（改変）が知られており、そのような公知のアミノ酸変異（改変）または将来的に同定される他の変異（改変）を有するFc領域を、本発明の抗原結合分子に用いることができる。また、抗体のFc領域とFcγ受容体との結合を介して作用するエフェクター機能の強さは、IgGサブクラスによって異なり、ヒトではIgG1およびIgG3で高く、IgG2およびIgG4で低いことが知られている。そのため、本発明の抗原結合分子に含まれる、Fcγ受容体に対する結合活性が低下している抗体のFc領域として、ヒトIgG2またはIgG4の天然型Fc領域を用いることもできる。

[0122] Fcγ受容体

Fcγ受容体とは、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に

結合し得る受容体をいい、実質的にFcγ受容体遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131およびR131を含む）、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；およびアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）、並びにいかなる未発見のヒトFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサルを含むが、これらに限定されるものではない、いかなる生物由来でもよい。マウスFcγR類には、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）およびFcγRIII-2（CD16-2）、並びにいかなる未発見のマウスFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されない。こうしたFcγ受容体の好適な例としてはヒトFcγRI（CD64）、FcγRIIA（CD32）、FcγRIIB（CD32）、FcγRIIIA（CD16）及び／又はFcγRIIIB（CD16）が挙げられる。FcγRIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれRefSeq登録番号NM_000566.3及びNP_000557.1にて、FcγRIIAのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれRefSeq登録番号BC020823.1及びAAH20823.1にて、FcγRIIBのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれRefSeq登録番号BC146678.1及びAAI46679.1にて、FcγRIIIAのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列はそれぞれRefSeq登録番号BC033678.1及びAAH33678.1にて、FcγRIIIBのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれRefSeq登録番号BC128562.1及びAAI28563.1にて登録されている。Fcγ受容体が、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体のFc領域に結合活性を有するか否かは、上記に記載されるFACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等によって確認され得る（Proc.Natl.Acad.Sci.USA（2006）

103 (11), 4005-4010)。

[0123] Fcγ受容体に対する結合活性

Fc領域がFcγI、FcγIIA、FcγIIB、FcγIIIA及び／又はFcγIIIBのいずれかのFcγ受容体に対する結合活性が低下していることは、上記に記載されるFACSやELISAフォーマットのほか、ALPHAスクリーン（Amplified Luminescent Proximity Homogeneous Assay）や表面プラズモン共鳴（SPR）現象を利用したBIACORE法等によって確認することができる（Proc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

[0124] ALPHAスクリーンは、ドナーとアクセプターの2つのビーズを使用するALPHAテクノロジーによって下記の原理に基づいて実施される。ドナービーズに結合した分子が、アクセプタービーズに結合した分子と生物学的に相互作用し、2つのビーズが近接した状態の時にのみ、発光シグナルが検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ内のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素はドナービーズ周辺に拡散し、近接しているアクセプタービーズに到達するとビーズ内の化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子が相互作用しないときは、ドナービーズの産生する一重項酸素がアクセプタービーズに到達しないため、化学発光反応は起きない。

[0125] 例えば、ドナービーズにビオチン標識された抗原結合分子が結合され、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ化されたFcγ受容体が結合される。競合する変異Fc領域を有する抗原結合分子の非存在下では、野生型Fc領域を有する抗原結合分子とFcγ受容体とは相互作用し520～620 nmのシグナルを生ずる。タグ化されていない変異Fc領域を有する抗原結合分子は、野生型Fc領域を有する抗原結合分子とFcγ受容体間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合親和性が決定され得る。抗体等の抗原結合分子をSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。Fcγ受容体をGSTでタグ化

する方法としては、Fcγ受容体をコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子を発現可能なベクターに保持した細胞等において発現し、グルタチオンカラムを用いて精製する方法等が適宜採用され得る。得られたシグナルは例えばGRAPHPAD PRISM（GraphPad社、San Diego）等のソフトウェアを用いて非線形回帰解析を利用する一部位競合（one-site competition）モデルに適合させることにより好適に解析される。

[0126] 相互作用を観察する物質の一方（リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムのカーブからカイネティクス：結合速度定数（ka）と解離速度定数(kd）が、当該定数の比からアフィニティー（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法も好適に用いられる。阻害測定法の例はProc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010において記載されている。

[0127] 本明細書において、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているとは、例えば、上記の解析方法に基づいて、対照とするFc領域を有する抗原結合分子の結合活性に比較して被検抗原結合分子の競合活性が、50%以下、好ましくは45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、20%以下、15%以下、特に好ましくは10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、1%以下の結合活性を示すことをいう。

[0128] 対照とする抗原結合分子としては、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4モノクロー

ナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子が適宜使用され得る。これらのFc領域として、それぞれ、RefSeq登録番号AAC82527.1、AAB59393.1、CAA27268.1、AAB59394.1にて登録されているアミノ酸配列のN末にAを付加した構造が使用され得る。一態様において、ある特定のアイソタイプの抗体のFc領域の変異体を有する抗原結合分子を被検物質として使用する場合には、当該特定のアイソタイプの抗体のFc領域を有する抗原結合分子を対照として用いることによって、当該変異体が有する変異によるFcγ受容体への結合活性に対する効果を検証することができる。上記のようにして、Fcγ受容体に対する結合活性が低下していることが検証されたFc領域の変異体を有する抗原結合分子が適宜作製される。別の態様において、Fcγ受容体への結合活性について、ある特定のアイソタイプの抗体のFc領域を、別の特定のアイソタイプの抗体のFc領域と比較し、Fcγ受容体に対する結合活性が低いFc領域を、本発明の抗原結合分子に用いることができる。また、そのようにFcγ受容体に対する結合活性が低いFc領域にアミノ酸変異を導入し、Fcγ受容体に対する結合活性がさらに低いFc領域を取得することもできる。

[0129] このようなFc領域における変異の例としては、EUナンバリングに従って特定されるアミノ酸である231A-238Sの欠失（WO 2009/011941）、C226S, C229S, P238S, (C220S)（J.Rheumatol (2007) 34, 11）、C226S, C229S (Hum.Antibod.Hybridomas (1990) 1(1), 47-54)、C226S, C229S, E233P, L234V, L235A (Blood (2007) 109, 1185-1192) 等の変異が公知である。

[0130] すなわち、特定のアイソタイプの抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される下記のいずれかのアミノ酸；220位、226位、229位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、264位、265位、266位、267位、269位、270位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、325位、327位、328位、329位、330位、331位、332位が置換されているFc領域を有する抗原結合分子が好適に挙げられる。Fc領域の起源である抗体のアイソタイプとしては特に限定されず、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4モノクローナル抗体を起源とするFc領域が適宜利用され得る

。

[0131] 例えば、IgG1抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される下記のいずれかの置換（数字がEUナンバリングに従って特定されるアミノ酸残基の位置、数字の前に位置する一文字のアミノ酸記号が置換前のアミノ酸残基、数字の後に位置する一文字のアミノ酸記号が置換前のアミノ酸残基をそれぞれ表す）；

(a) L234F、L235E、P331S、

(b) C226S、C229S、P238S、

(c) C226S、C229S、

(d) C226S、C229S、E233P、L234V、L235A

(e) L234A、L235A又はL235R、N297A

(f) L235A又はL235R、S239K、N297A

が施されているFc領域、又は、231位から238位のアミノ酸配列が欠失したFc領域を有する抗原結合分子も適宜使用され得る。

[0132] また、IgG2抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される下記のいずれかの置換（数字がEUナンバリングに従って特定されるアミノ酸残基の位置、数字の前に位置する一文字のアミノ酸記号が置換前のアミノ酸残基、数字の後に位置する一文字のアミノ酸記号が置換前のアミノ酸残基をそれぞれ表す）；

(g) H268Q、V309L、A330S、P331S

(h) V234A

(i) G237A

(j) V234A、G237A

(k) A235E、G237A

(l) V234A、A235E、G237A

が施されているFc領域を有する抗原結合分子も適宜使用され得る。

[0133] また、IgG3抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される下記のいずれかの置換（数字がEUナンバリングに従って特定

されるアミノ酸残基の位置、数字の前に位置する一文字のアミノ酸記号が置換前のアミノ酸残基、数字の後に位置する一文字のアミノ酸記号が置換前のアミノ酸残基をそれぞれ表す）；

（m）F241A

（n）D265A

（o）V264A

が施されているFc領域を有する抗原結合分子も適宜使用され得る。

[0134] また、IgG4抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される下記のいずれかの置換（数字がEUナンバリングに従って特定されるアミノ酸残基の位置、数字の前に位置する一文字のアミノ酸記号が置換前のアミノ酸残基、数字の後に位置する一文字のアミノ酸記号が置換前のアミノ酸残基をそれぞれ表す）；

（p）L235A、G237A、E318A

（q）L235E

（r）F234A、L235A

が施されているFc領域を有する抗原結合分子も適宜使用され得る。

[0135] その他の好ましい例として、IgG1抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される下記のいずれかのアミノ酸；233位、234位、235位、236位、237位、327位、330位、331位が、対応するIgG2またはIgG4においてそのEUナンバリングが対応するアミノ酸に置換されているFc領域を有する抗原結合分子が挙げられる。

[0136] その他の好ましい例として、IgG1抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される下記のいずれか一つ又はそれ以上のアミノ酸；234位、235位、297位が他のアミノ酸によって置換されているFc領域を有する抗原結合分子が好適に挙げられる。置換後に存在するアミノ酸の種類は特に限定されないが、234位、235位、297位のいずれか一つ又はそれ以上のアミノ酸がアラニンに置換されているFc領域を有する抗原結合分子が特に好ましい。

[0137] その他の好ましい例として、IgG1抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される265位のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されているFc領域を有する抗原結合分子が好適に挙げられる。置換後に存在するアミノ酸の種類は特に限定されないが、265位のアミノ酸がアラニンに置換されているFc領域を有する抗原結合分子が特に好ましい。

[0138] 特定の態様において、本発明の抗原結合分子は、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域を含む。そのような態様の例として、Fc領域に起因するエフェクター機能が減少した抗体が挙げられ、当該抗体は、特定のエフェクター機能（補体およびADCCなど）は不要または有害である場合に望ましい。減少したエフェクター機能を伴う抗体の例としては、Fc領域残基238、265、269、270、297、327、および329の1つまたは複数の置換を伴うものが挙げられる（米国特許第6,737,056号）。このようなFc変異体は、残基265および297のアラニンへの置換を伴ういわゆる「DANA」Fc変異体（米国特許第7,332,581号）を含む、アミノ酸ポジション265、269、270、297、および327の2つ以上の置換を伴うFc変異体を含む。

[0139] Fc領域変異体の他の例については、米国特許第5,648,260号；米国特許第5,624,821号；およびWO94/29351も参照のこと。

[0140] 抗体の作製方法

本発明の抗原結合分子の好ましい態様の１つとして、本発明の抗体の可変領域を含む、抗体を挙げることができる。

[0141] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知であり、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得され得る。本発明の抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの等が含まれる。

[0142] 抗体取得のために免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、ハイブリドーマ作製のための細胞融合に使用する親細胞と

の適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。

[0143] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫される。例えば、一般的な方法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下に注射によって投与されることにより免疫が実施される。具体的には、PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈された感作抗原が、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合され、乳化された後に、該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与される。また、感作抗原の免疫時には適当な担体が使用され得る。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合した該感作抗原ペプチドを免疫することが望ましい場合もある。

[0144] また、所望の抗体を産生するハイブリドーマは、DNA免疫を使用し、以下のようにしても作製され得る。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現され得るような態様で構築されたベクターDNAが投与された当該免疫動物中で、感作抗原が当該免疫動物の生体内で発現されることによって、免疫刺激が与えられる免疫方法である。タンパク質抗原が免疫動物に投与される一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性が期待される。

－膜タンパク質の構造を維持して免疫刺激が与えられ得る

－免疫抗原を精製する必要が無い

[0145] DNA免疫によって本発明のモノクローナル抗体を得るために、まず、抗原タンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。抗原タンパク質をコードするDNAは、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得

る。たとえば、発現ベクターが吸着した金粒子が、gene gunで免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。

[0146] このように哺乳動物が免疫され、血清中における抗原に結合する抗体力価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0147] 前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチン－グアニン－ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチン－アミノプテリン－チミジン感受性（以下HAT感受性と省略する）を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0148] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン（以下8AGと省略する）、あるいは5'ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択され得る。これらのピリミジンアナログをDNA中に取り込む正常な細胞は死滅する。他方、これらのピリミジンアナログを取り込めないこれらの酵素を欠損した細胞は、選択培地の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプタミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0149] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519)、MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415)、SP2/0 (

Nature (1978) 276 (5685), 269-270)、FO (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21)、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323)、R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 等が好適に使用され得る。

[0150] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルステインらの方法 (Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて、前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

[0151] より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施され得る。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤が添加されて使用される。

[0152] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定され得る。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用され、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液が好適に添加され得る。

[0153] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温されたPEG溶液 (例えば平均分子量1000から6000程度) が通常30から60% (w/v) の濃度で添加される。混合液が緩やかに混合されることによって所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。次いで、上記に挙げた適当な培養液が逐次添加され、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合剤等が除去され得る。

[0154] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液 (ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液) で培養することにより選択され得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞 (非融

合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、係る十分な時間は数日から数週間である）上記HAT培養液を用いた培養が継続され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施される。

[0155] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択され得る。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖し得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、所望のハイブリドーマが選択され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施され得る。

[0156] 所望の抗体のスクリーニングおよび単一クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。所望の抗体は、例えば、FACS（fluorescence activated cell sorting）によってスクリーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面への抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

[0157] FACSによって本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするためには、まず産生される抗体が結合する抗原を発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、当該抗原を強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面の抗原に対する抗体の結合活性が選択的に検出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、抗原を強制発現させた細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選

択することによって、所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0158] あるいは対象となる抗原を発現した細胞を固定化し、当該抗原発現細胞に対する抗体の結合活性がELISAの原理に基づいて評価され得る。たとえば、ELISAプレートのウェルに抗原発現細胞が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウェル内の固定化細胞に接触させ、固定化細胞に結合する抗体が検出される。モノクローナル抗体がマウス由来の場合、細胞に結合した抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出され得る。これらのスクリーニングによって選択された、抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングされ得る。

このようにして作製されるモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマは通常の培養液中で継代培養され得る。また、該ハイブリドーマは液体窒素中で長期にわたって保存され得る。

[0159] 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から所望のモノクローナル抗体が取得され得る。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖せしめ、その腹水からモノクローナル抗体が取得され得る。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに好適なものである。

[0160] 当該ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からクローニングされる抗体遺伝子によってコードされる抗体も好適に利用され得る。クローニングした抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、当該遺伝子によってコードされる抗体が発現する。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は例えば、Vandammeらによって既に確立されている（Eur.J. Biochem.（1990）192（3），767-775）。下記に述べるように組換え抗体の製造方法もまた公知である。

[0161] 抗体の可変領域（V領域）をコードするcDNAを取得するためには、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

－グアニジン超遠心法（Biochemistry（1979）18（24），5294-5299）

－AGPC法（Anal. Biochem.（1987）162（1），156-159）

[0162] 抽出されたmRNAは、例えばmRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）等を使用して精製され得る。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）などのように、細胞から直接全mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマからmRNAが取得され得る。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAが合成され得る。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等によって合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA 増幅キット（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1988）85（23），8998-9002、Nucleic Acids Res.（1989）17（8），2919-2932）が適宜利用され得る。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入され得る。

[0163] 得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製され得る。そして、該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認される。

[0164] 可変領域をコードする遺伝子を取得するためには、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使った5'-RACE法を利用するのが簡便である。まずハイブリドーマ細胞より抽出されたRNAを鋳型としてcDNAが合成され、5'-RACE cDNAライブラリーが得られる。5'-RACE cDNAライブラリーの合成にはSMART RACE cDNA 増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。

[0165] 得られた5'-RACE cDNAライブラリーを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子が増幅される。公知の抗体遺伝子配列をもとにマウス抗体遺伝子増幅用のプライマーがデザインされ得る。これらのプライマーは、イムノグロブリン

のサブクラスごとに異なる塩基配列である。したがって、サブクラスは予めIso Stripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・ダイアグノスティックス）などの市販キットを用いて決定しておくことが望ましい。

[0166] 具体的には、たとえばマウスIgGをコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖としてγ1、γ2a、γ2b、γ3、軽鎖としてκ鎖とλ鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーが利用され得る。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'側のプライマーには可変領域に近い定常領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方5'側のプライマーには、5' RACE cDNAライブラリー作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0167] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合せからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、抗原に対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。たとえば次のようにしてスクリーニングされ得る；

（１）ハイブリドーマから得られたcDNAによってコードされるV領域を含む抗体を所望の抗原発現細胞に接触させる工程、

（２）該抗原発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

（３）該抗原発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0168] 抗体と該抗原発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体と該抗原発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するために該抗原発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0169] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリーとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結

することによってシングルチェインFv（scFv）を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0170] 目的とする抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に１コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のようにして消化された抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域（C領域）をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合されれば、キメラ抗体が取得される。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることをいう。したがって、マウス－ヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒト－ヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記V領域遺伝子を挿入することによって、キメラ抗体発現ベクターが構築され得る。具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを保持した発現ベクターの5’側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレームで融合されることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

[0171] モノクローナル抗体の製造には、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に

付加され得る。発現されたポリペプチドから、シグナル配列がそのカルボキシル末端部分から切断され、抗体が細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0172] 抗体遺伝子の発現のために、抗体重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）をコードするDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターによって、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）されることによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが単一の発現ベクターに組み込まれることによって宿主細胞が形質転換され得る（国際公開WO 94/11523を参照のこと）。

[0173] 単離された抗体遺伝子を適当な宿主に導入することによって抗体を作製するための宿主細胞と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明の抗原結合分子に含まれる抗原結合ドメインを単離するのに応用され得る。

[0174] 真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のような細胞が例示され得る。

（１）哺乳類細胞、：CHO、COS、ミエローマ、BHK（baby hamster kidney）、Hela、Veroなど

（２）両生類細胞：アフリカツメガエル卵母細胞など

（３）昆虫細胞：sf9、sf21、Tn5など

[0175] あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバカム（Nicotiana tabacum）などのニコティアナ（Nicotiana）属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞が適宜利用され得る。

[0176] 更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

－酵母：サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces cerevisiae）などのサッカロミセス（Saccharomyces）属、メタノール資化酵母（Pichia pastori

s）などのPichia属

－糸状菌：アスペスギルス・ニガー（Aspergillus niger）などのアスペルギルス（Aspergillus）属

[0177] また、原核細胞を利用した抗体遺伝子の発現系も公知である。たとえば、細菌細胞を用いる場合、大腸菌（E. coli）、枯草菌などの細菌細胞が適宜利用され得る。これらの細胞中に、目的とする抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質転換によって導入される。形質転換された細胞をin vitroで培養することにより、当該形質転換細胞の培養物から所望の抗体が取得され得る。

[0178] 組換え抗体の産生には、上記宿主細胞に加えて、トランスジェニック動物も利用され得る。すなわち所望の抗体をコードする遺伝子が導入された動物から、当該抗体を得ることができる。例えば、抗体遺伝子は、乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入することによって融合遺伝子として構築され得る。乳汁中に分泌されるタンパク質として、たとえば、ヤギβカゼインなどを利用され得る。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片はヤギの胚へ注入され、当該注入された胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ（またはその子孫）が産生する乳汁からは、所望の抗体が乳汁タンパク質との融合タンパク質として取得され得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンがトランスジェニックヤギに対して投与され得る（Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702）。

[0179] 本明細書において記載される抗原結合分子がヒトに投与される場合、例えば、当該分子における各種結合ドメインとして、抗体の可変領域を含むドメインを用いる場合は、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体由来の抗原結合ドメインが適宜採用され得る。遺伝子組換え型抗体には、例えば、ヒト化（Humanized）抗体等が含まれる。これらの改変抗体は、公知の方法を用いて適宜製造される。

[0180] 本明細書において記載される抗原結合分子における各種結合ドメインを作

製するために用いられる抗体の可変領域は、通常、４つのフレームワーク領域（FR）にはさまれた３つの相補性決定領域（complementarity-determining region ; CDR）で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い同一性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるとされている。

[0181] ヒト化抗体は、再構成（reshaped）ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。Overlap Extension PCRにおいては、ヒト抗体のFRを合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体のCDRをコードする塩基配列が付加される。プライマーは４つのFRのそれぞれについて用意される。一般に、マウスCDRのヒトFRへの移植においては、マウスのFRと同一性の高いヒトFRを選択するのが、CDRの機能の維持において有利であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウスCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と同一性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用するのが好ましい。

[0182] また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒトFRが個別に合成される。その結果、各FRにマウスCDRをコードするDNAが付加された産物が得られる。各産物のマウスCDRをコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップしたCDR部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒトFRがマウスCDRの配列を介して連結される。

[0183] 最終的に３つのCDRと４つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5’末端と3’末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによって

その全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開EP 239400、国際公開WO1996/002576参照）。

[0184] 上記のように作製したヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変異FR配列が選択され得る（Sato, K.et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856）。

[0185] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0186] さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードするDN

A配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該V領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である（国際公開WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、WO1995/015388参照）。

[0187] ファージディスプレイ法以外にも、ヒト抗体ライブラリを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術として、無細胞翻訳系を使用する技術、細胞またはウイルス表面に抗原結合分子を提示する技術、エマルジョンを使用する技術等が知られている。例えば、無細胞翻訳系を使用する技術としては、終止コドンの除去等によりリボゾームを介してmRNAと翻訳されたタンパク質の複合体を形成させるリボゾームディスプレイ法、ピューロマイシン等の化合物を用いて遺伝子配列と翻訳されたタンパク質を共有結合させるcDNAディスプレイ法、mRNAディスプレイ法や、核酸に対する結合タンパク質を用いて遺伝子と翻訳されたタンパク質の複合体を形成させるCISディスプレイ法等が使用され得る。また、細胞またはウイルス表面に抗原結合分子を提示する技術としては、ファージディスプレイ法以外にも、E. coliディスプレイ法、グラム陽性菌ディスプレイ法、酵母ディスプレイ法、哺乳類細胞ディスプレイ法、ウイルスディスプレイ法等が使用され得る。エマルジョンを使用する技術としては、エマルジョン中に遺伝子及び翻訳関連分子を内包させることによる、インビトロウイルスディスプレイ法等が使用され得る。これらの方法は既に公知である（Nat Biotechnol. 2000 Dec;18(12):1287-92、Nucleic Acids Res. 2006;34(19):e127、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2;101(9):2806-10、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 22;101(25):9193-8、Protein Eng Des Sel. 2008 Apr;21(4):247-55、Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):10701-5、MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5):508-18、Methods

Mol Biol. 2012;911:183-98）。

[0188] 多重特異性抗体の作製方法

本発明の抗原結合分子の好ましい態様の１つとして、多重特異性抗体を挙げることができる。本発明の多重特異性抗体のFc領域として、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域を用いる場合、公知の多重特異性抗体を起源とするFc領域も適宜使用される。本発明の多重特異性抗体としては、特に二重特異性抗体が好ましい。

[0189] 多重特異性抗体の会合化には、抗体H鎖の第二の定常領域（CH2）又はH鎖の第三の定常領域（CH3）の界面に電荷的な反発を導入して目的としないH鎖同士の会合を抑制する技術を適用することができる（WO2006/106905）。

[0190] CH2又はCH3の界面に電荷的な反発を導入して意図しないH鎖同士の会合を抑制させる技術において、H鎖の他の定常領域の界面で接触するアミノ酸残基としては、例えばCH3領域におけるEUナンバリング356番目の残基、EUナンバリング439番目の残基、EUナンバリング357番目の残基、EUナンバリング370番目の残基、EUナンバリング399番目の残基、EUナンバリング409番目の残基に相対する領域を挙げることができる。

[0191] より具体的には、例えば、２種のH鎖CH3領域を含む抗体においては、第１のH鎖CH3領域における以下の（１）～（３）に示すアミノ酸残基の組から選択される１組ないし３組のアミノ酸残基が同種の電荷を有する抗体とすることができる；（１）H鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバリング356位および439位のアミノ酸残基、（２）H鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバリング357位および370位のアミノ酸残基、（３）H鎖CH3領域に含まれるアミノ酸残基であって、EUナンバリング399位および409位のアミノ酸残基。

[0192] 更に、上記第１のH鎖CH3領域とは異なる第２のH鎖CH3領域における前記（１）～（３）に示すアミノ酸残基の組から選択されるアミノ酸残基の組であって、前記第１のH鎖CH3領域において同種の電荷を有する前記（１）～（３）に示すアミノ酸残基の組に対応する１組ないし３組のアミノ酸残基が、前

記第１のH鎖CH3領域における対応するアミノ酸残基とは反対の電荷を有する抗体とすることができる。

[0193] 上記（１）～（３）に記載のそれぞれのアミノ酸残基は、会合した際に互いに接近している。当業者であれば、所望のH鎖CH3領域またはH鎖定常領域について、市販のソフトウェアを用いたホモロジーモデリング等により、上記（１）～（３）に記載のアミノ酸残基に対応する部位を見出すことができ、適宜、該部位のアミノ酸残基を改変に供することが可能である。

[0194] 上記抗体において、「電荷を有するアミノ酸残基」は、例えば、以下の（a）または（b）のいずれかの群に含まれるアミノ酸残基から選択されることが好ましい；

（a）グルタミン酸（E）、アスパラギン酸（D）、

（b）リジン（K）、アルギニン（R）、ヒスチジン（H）。

[0195] 上記抗体において、「同種の電荷を有する」とは、例えば、２つ以上のアミノ酸残基のいずれもが、上記（ａ）または（ｂ）のいずれか１の群に含まれるアミノ酸残基を有することを意味する。「反対の電荷を有する」とは、例えば、２つ以上のアミノ酸残基のなかの少なくとも１つのアミノ酸残基が、上記（a）または（b）のいずれか１の群に含まれるアミノ酸残基を有する場合に、残りのアミノ酸残基が異なる群に含まれるアミノ酸残基を有することを意味する。

[0196] 好ましい態様において上記抗体は、第１のH鎖CH3領域と第２のH鎖CH3領域がジスルフィド結合により架橋されていてもよい。

[0197] 本発明において改変に供するアミノ酸残基としては、上述した抗体の可変領域または抗体の定常領域のアミノ酸残基に限られない。当業者であれば、ポリペプチド変異体または異種多量体について、市販のソフトウェアを用いたホモロジーモデリング等により、界面を形成するアミノ酸残基を見出すことができ、会合を制御するように、該部位のアミノ酸残基を改変に供することが可能である。

[0198] また、本発明の多重特異性抗体の会合化には更に他の公知技術を用いるこ

ともできる。抗体の一方のH鎖の可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(knob; 突起)に置換し、もう一方のH鎖の相対する可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(hole; 空隙)に置換することによって、突起が空隙に配置され得るようにすることで効率的にFc領域を有する異なるアミノ酸を有するポリペプチド同士の会合化を起こすことができる（WO1996/027011、Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681、US20130336973）。

[0199] これに加えて、本発明の多重特異性抗体の形成には更に他の公知技術を用いることもできる。抗体の一方のH鎖のCH3の一部をその部分に対応するIgA由来の配列にし、もう一方のH鎖のCH3の相補的な部分にその部分に対応するIgA由来の配列を導入したstrand-exchange engineered domain CH3を用いることで、異なる配列を有するポリペプチドの会合化をCH3の相補的な会合化によって効率的に引き起こすことができる（Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010)。この公知技術を使っても効率的に目的の多重特異性抗体の形成させることができる。

[0200] 他にも多重特異性抗体の形成には、WO2011/028952やWO2014/018572やNat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8.に記載の抗体のCH1とCLの会合化、VH、VLの会合化を利用した抗体作製技術、WO2008/119353やWO2011/131746に記載の別々に調製したモノクローナル抗体同士を使用して二重特異性抗体を作製する技術(Fab Arm Exchange)、WO2012/058768やWO2013/063702に記載の抗体重鎖のCH3間の会合を制御する技術、WO2012/023053に記載の二種類の軽鎖と一種類の重鎖とから構成される二重特異性抗体を作製する技術、Christophら（Nature Biotechnology Vol. 31, p 753-758 (2013)）に記載の1本のH鎖と1本のL鎖からなる抗体の片鎖をそれぞれ発現する２つのバクテリア細胞株を利用した二重特異性抗体を作製する技術等を用いることもできる。

[0201] 多重特異性抗体の形成の一態様としては、上述したように、二種類のモノクローナル抗体を還元剤存在下で混合し、コアヒンジのdisulfide結合を開裂

させたのちに、再会合させてヘテロ二量化した二重特異性抗体を得る方法が挙げられるが（FAE）、CH3領域の相互作用界面に静電相互作用（WO2006/106905）を導入することにより、再会合時にさらに効率的にヘテロ二量化を誘起することができる（WO2015/046467）。天然型IgGを用いたFAEでは再会合がランダムに起こるため理論上50%の効率でしか二重特異性抗体が得られないが、当該方法では高収率で二重特異性抗体を製造することができる。

[0202] また、効率的に目的の多重特異性抗体を形成させることができない場合であっても、産生された抗体の中から目的の多重特異性抗体を分離、精製することによっても、本発明の多重特異性抗体を得ることが可能である。例えば、2種類のH鎖の可変領域にアミノ酸置換を導入し等電点の差を付与することで、2種類のホモ体と目的のヘテロ抗体をイオン交換クロマトグラフィーで精製可能にする方法が報告されている（WO2007114325）。また、ヘテロ体を精製する方法として、これまでに、プロテインAに結合するマウスIgG2aのH鎖と、プロテインAに結合しないラットIgG2bのH鎖からなるヘテロ二量化抗体をプロテインAを用いて精製する方法が報告されている(WO98050431、WO95033844)。更に、IgGとProteinAの結合部位であるEUナンバリング435番目および436番目のアミノ酸残基を、Tyr、HisなどのProteinAへの結合力の異なるアミノ酸に置換したH鎖を用いることで、各H鎖とProtein Aとの相互作用を変化させ、Protein Aカラムを用いることで、ヘテロ二量化抗体のみを効率的に精製することもできる。

[0203] また、異なる複数のH鎖に結合能を与え得る共通のL鎖を取得し、多重特異性抗体の共通L鎖として用いてもよい。このような共通L鎖と異なる複数のH鎖遺伝子を細胞に導入することによってIgGを発現させることで効率の良い多重特異性IgGの発現が可能となる（Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681）。共通H鎖を選択する際に、任意の異なるH鎖に対応し高い結合能を示す共通Ｌ鎖を選択する方法も利用することができる（WO2004/065611）。

[0204] また、本発明のFc領域として、Fc領域のC末端のヘテロジェニティーが改善されたFc領域が適宜使用され得る。より具体的には、IgG1、IgG2、IgG3又はI

gG4を起源とするFc領域を構成する二つのポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングに従って特定される446位のグリシン、及び447位のリジンが欠失したFc領域が提供される。

[0205] これらの技術を複数、例えば2つ以上組合せて用いることもできる。また、これらの技術は、会合させたい２つのH鎖に適宜別々に適用させることもできる。さらに、これらの技術は、上述のFcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域に組み合わせて用いることもできる。なお、本発明の抗原結合分子は、上記改変が加えられたものをベースにして、同一のアミノ酸配列を有する抗原結合分子を別途作製したものであってもよい。

[0206] 本発明に係る多重特異性抗原結合分子は、（１）前記の抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域を含む、CD3に対する結合活性を有する第一の抗原結合ドメイン、（２）第一の抗原結合ドメインとは異なるアミノ酸配列を含む第二の抗原結合ドメイン、ならびに任意で（３）Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域を含むドメインを含むものであればよく、その構造は限定されない。

本発明において、上記の各ドメインはペプチド結合で直接連結することができる。例えば、（１）及び（２）の抗原結合ドメインとして$F(ab')_2$を用い、（３）Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域を含むドメインとしてこれらのFc領域を用いた場合に、（１）及び（２）に記載された抗原結合ドメインと（３）に記載されたFc領域を含むドメインとをペプチド結合で連結したときは、連結されたポリペプチドは抗体の構造を形成する。そのような抗体を作製するためには前述のハイブリドーマの培養液から精製する他、当該抗体を構成するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドが安定に保持された所望の宿主細胞の培養液から当該抗体を精製することもできる。

[0207] 本発明の好ましいCD3結合活性を有する抗体可変領域としては、CD3εに対する結合活性を有する抗体可変領域が挙げられる。そのような抗体可変領域としては、例えば、後掲の表５に記載の抗体番号2, 14, 25, 29, 30～32, 34

の重鎖可変領域、又は重鎖CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列を有する抗体H鎖可変領域、ならびに、表５に記載の抗体番号2，14，25，29，30～32，34の軽鎖可変領域、又は軽鎖CDR1、CDR2及びCDR3のアミノ酸配列を有する抗体L鎖可変領域、或いは、当該可変領域と機能的に同等の抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域が挙げられる。

[0208] ここで、本発明において「機能的に同等」とは、所定の条件下での抗原に対する結合親和性が同等である、或いは、多重特異性抗原結合分子として用いられた場合に、標的抗原を発現している細胞又は当該細胞を含む組織に対する細胞傷害活性が同等であることを意味する。結合親和性および細胞傷害活性は、本明細書の記載に基づいて測定することができる。細胞傷害活性を測定する細胞は、標的抗原を発現している所望の細胞又は当該細胞を含む所望の組織を用いてよいが、例えば標的抗原を発現するヒトがん細胞株を用いることができる。また抗体定常領域においては、Fcγ受容体に対する結合活性の低下が同等であることでもよい。

[0209] 例えば、本願明細書に記載された抗体H鎖可変領域（元となるH鎖可変領域）と機能的に同等な抗体H鎖可変領域は、その元となるH鎖の対として本願明細書に記載されている抗体L鎖可変領域と組み合わせた場合、結合親和性が同等であることを意味する、或いは、多重特異性抗原結合分子として用いられた場合に、標的抗原を発現している細胞又は当該細胞を含む組織に対する細胞傷害活性が同等であることを意味する。また本願明細書に記載された抗体L鎖可変領域（元となるL鎖可変領域）と機能的に同等な抗体L鎖可変領域は、その元となるL鎖の対として本願明細書に記載されている抗体H鎖可変領域と組み合わせた場合、結合親和性が同等である、或いは、多重特異性抗原結合分子として用いられた場合に、標的抗原を発現している細胞又は当該細胞を含む組織に対する細胞傷害活性が同等であることを意味する。

[0210] また、「同等」とは、必ずしも同程度の活性である必要がなく、活性が増強されていてもよく、したがって「同等又はそれ以上」と表現することもできる。具体的には、抗原に対する結合親和性の場合は、「同等」とは、対照

となる抗体可変領域の結合親和性(親KD値)と比較した値(KD値/親KD値)が2.0以下の場合を挙げることができる。KD値/親KD値の値は、好ましくは1.5以下であり、より好ましくは1.3以下、1.2以下、1.1以下、1.0以下、0.9以下、0.8以下、0.7以下、0.6以下、または0.5以下である。下限に制限はないが、例えば10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、または10^{-6} であってよい。具体的には、本発明においてKD値/親KD値の値は、10^{-6}～2.0が好ましく、より好ましくは10^{-3}～1.5、より好ましくは10^{-1}～1.3、より好ましくは0.8～1.2、より好ましくは0.9～1.1、最も好ましくは1.0である。細胞傷害活性の場合は、「同等」とは、対照となる多重特異性抗原結合分子の細胞増殖抑制率(親細胞増殖抑制率)と比較した値(細胞増殖抑制率/親細胞増殖抑制率)が0.7以上の場合を挙げることができる。添加する多重特異性抗原結合分子の濃度は適宜決定されるが、好ましくは、例えば0.01nM、0.05nM、0.1nM、0.5nM、または1nM、好ましくは0.05nMまたは0.1nMで測定する。細胞増殖抑制率/親細胞増殖抑制率の値は、好ましくは0.8以上であり、より好ましくは0.9以上、1.0以上、1.2以上、1.5以上、2以上、3以上、5以上、10以上、または20以上である。上限に制限はないが、例えば10、10^{2}、10^{3}、10^{4}、10^{5}、または10^{6} であってよい。

[0211] また細胞傷害活性の場合は、元の多重特異性抗原結合分子の細胞に対する50%増殖抑制濃度(親細胞50%増殖抑制濃度)と比較した値(細胞50%増殖抑制濃度/親細胞50%増殖抑制濃度)が1.5以下の場合を挙げることができる。50%増殖抑制濃度とは、多重特異性抗原結合分子を添加しない場合に比べ、細胞増殖率を半減させるのに必要な多重特異性抗原結合分子の濃度のことである。「細胞50%増殖抑制濃度/親細胞50%増殖抑制濃度」の値は、好ましくは1.3以下であり、より好ましくは1.2以下、1.1以下、1.0以下、0.9以下、0.8以下、0.7以下、0.6以下、または0.5以下である。下限に制限はないが、例えば10^{-1}、10^{-2}、10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、または10^{-6} であってよい。具体的には 10^{-6}～$1.5x10^{-0}$ が好ましく、より好ましくは10^{-6}～10^{-1}、より好ましくは10^{-6}～10^{-2}、より好ましくは10^{-6}～10^{-3} である。

[0212] 細胞傷害活性は、実施例4に記載されているようにin vitroでのTDCC活性に

より評価することができ、その場合、「同等」とは、対照となる多重特異性抗原結合分子のTDCC活性と比較した値(TDCC活性/親TDCC活性)が0.7以上の場合を挙げることができる。TDCC活性/親TDCC活性の値は、好ましくは0.8以上であり、より好ましくは0.9以上、1.0以上、1.2以上、1.5以上、2以上、3以上、5以上、10以上、または20以上である。

[0213] また、標的抗原に対する結合活性を有する第二の抗原結合ドメインについては、標的抗原に対するKD値は、例えば 5x10^{-9} M 以下であってよく、好ましくは 4x10^{-9}M以下、例えば 3x10^{-9}M以下、2x10^{-9}M以下、1x10^{-9}M以下、8x10^{-10}M以下、5x10^{-10}M以下、4x10^{-10}M以下、3x10^{-10}M以下、2x10^{-10}M以下、1x10^{-10}M以下、8x10^{-11}M以下、5x10^{-11}M以下、4x10^{-11}M以下、3x10^{-11}M以下、2x10^{-11}M以下、1x10^{-11}M以下、8x10^{-12}M以下、5x10^{-12}M以下、4x10^{-12}M以下、3x10^{-12}M以下、2x10^{-12}M以下、1x10^{-12}M以下、8x10^{-13}M以下、5x10^{-13}M以下、4x10^{-13}M以下、3x10^{-13}M以下、2x10^{-13}M以下、または1x10^{-13}M以下であってよい。

[0214] また、CD3に対する結合活性を有する抗体可変領域を含む抗原結合ドメインについては、CD3、例えばヒトCD3、より具体的には例えばヒトCD3ε鎖に対するKD値は、例えば 5x10^{-7} M 以下であってよく、好ましくは2x10^{-7} M 以下、例えば1.5x10^{-7} M 以下、1.4x10^{-7}M以下、1.3x10^{-7}M以下、1.2x10^{-7}M以下、1x10^{-7}M以下、3x10^{-8}M以下、2x10^{-8}M以下、1x10^{-8}M以下、8x10^{-9}M以下、5x10^{-9}M以下、4x10^{-9}M以下、3x10^{-9}M以下、2x10^{-9}M以下、1x10^{-9}M以下、8x10^{-10}M以下、5x10^{-10}M以下、4x10^{-10}M以下、3x10^{-10}M以下、2x10^{-10}M以下、1x10^{-10}M以下、8x10^{-11}M以下、5x10^{-11}M以下、4x10^{-11}M以下、3x10^{-11}M以下、2x10^{-11}M以下、1x10^{-11}M以下、8x10^{-12}M以下、5x10^{-12}M以下、4x10^{-12}M以下、3x10^{-12}M以下、2x10^{-12}M以下、または1x10^{-12}M以下である。

[0215] 本発明の多重特異性抗原結合分子は、好ましくは、標的抗原およびヒトCD3（例えばヒトCD3ε鎖）に対するKD値は、それぞれ5x10^{-9} M以下および 5x10^{-7} M以下であり、より好ましくは、それぞれ1x10^{-9} M以下および 5x10^{-8} M以下である。

[0216] 本発明において「機能的に同等」の抗体可変領域とは、上述の条件を満た

す抗体H鎖可変領域及び/又は抗体L鎖可変領域であれば特に限定されない。そのような抗体可変領域として、例えば、表５に記載の抗体番号2，14，25，29，30～32，34の可変領域のアミノ酸配列に1または複数のアミノ酸（例えば1、2、3、4、5または10アミノ酸）が置換、欠失、付加及び／又は挿入されていてもよい。アミノ酸配列において、1または複数のアミノ酸が置換、欠失、付加及び／又は挿入するための、当業者によく知られた方法としては、タンパク質に変異を導入する方法が知られている。例えば、当業者であれば、部位特異的変異誘発法（Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. Gene 152, 271-275、Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors.Methods Enzymol. 100, 468-500、Kramer,W, Drutsa,V, Jansen,HW, Kramer,B, Pflugfelder,M, and Fritz,HJ(1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. Nucleic Acids Res. 12, 9441-9456、Kramer W, and Fritz HJ(1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA Methods. Enzymol. 154, 350-367、Kunkel,TA(1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection.Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 488-492）などを用いてアミノ酸配列に適宜変異を導入することにより、上述の機能を有する抗体可変領域と機能的に同等な可変領域を調製することができる。

[0217] アミノ酸残基を改変する場合には、アミノ酸側鎖の性質が保存されている別のアミノ酸に変異されることが望ましい。例えばアミノ酸側鎖の性質としては、疎水性アミノ酸（A、I、L、M、F、P、W、Y、V）、親水性アミノ酸（R、D、N、C、E、Q、G、H、K、S、T）、脂肪族側鎖を有するアミノ酸（G、A、V、L、I、P）、水酸基含有側鎖を有するアミノ酸（S、T、Y）、硫黄原子含有側鎖を有するアミノ酸（C、M）、カルボン酸及びアミド含有側鎖を有するアミノ酸（D、N、E、Q）、塩基含有側鎖を有するアミノ酸（R、K、H）、及び、

芳香族含有側鎖を有するアミノ酸（H、F、Y、W）を挙げることができる（括弧内はいずれもアミノ酸の一文字標記を表す）。これらの各グループ内のアミノ酸の置換を保存的置換と称す。あるアミノ酸配列に対する１又は複数個のアミノ酸残基の欠失、付加及び／又は他のアミノ酸による置換により修飾されたアミノ酸配列を有するポリペプチドがその生物学的活性を維持することはすでに知られている（Mark, D. F. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1984)81:5662-6； Zoller, M. J. and Smith, M., Nucleic Acids Res.(1982)10:6487-500; Wang, A. et al., Science(1984)224:1431-3; Dalbadie-McFarland, G. et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA (1982)79:6409-13）。このようなアミノ酸改変を含む本発明の可変領域は、改変前の可変領域のCDR配列、FR配列又は可変領域全体のアミノ酸配列と少なくとも70%、より好ましくは少なくとも75%、より好ましくは少なくとも80%、さらに好ましくは少なくとも85%、さらにより好ましくは少なくとも90%、そして、最も好ましくは少なくとも95%のアミノ酸配列の同一性を有する。本明細書において配列の同一性は、配列同一性が最大となるように必要に応じ配列を整列化し、適宜ギャップを導入した後、元となったH鎖可変領域又はL鎖可変領域のアミノ酸配列の残基と同一の残基の割合として定義される。アミノ酸配列の同一性は、後述の方法により決定することができる。

[0218] また、「機能的に同等の抗体可変領域」には、例えば、表５に記載の抗体番号2, 14, 25, 29, 30～32, 34の可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸から得ることも可能である。可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸にストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離するための、ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件としては、6 M尿素、0.4% SDS、0.5 x SSC、37℃の条件またはこれと同等のストリンジェンシーのハイブリダイゼーション条件を例示できる。よりストリンジェンシーの高い条件、例えば、6 M尿素、0.4% SDS、0.1 x SSC、42℃の条件を用いれば、より相同性の高い核酸の単離を期待することができる。ハイブリダイゼー

ション後の洗浄条件は、例えば0.5xSSC（1xSSCは0.15 M NaCl、0.015M クエン酸ナトリウム、pH7.0）、および0.1% SDS、60℃における洗浄、より好ましくは 0.2xSSC、および0.1% SDS、60℃における洗浄、より好ましくは 0.2xSSC、および0.1% SDS、62℃における洗浄、より好ましくは 0.2xSSC、および0.1% SDS、65℃における洗浄、より好ましくは 0.1xSSC、および0.1% SDS、65℃における洗浄である。単離した核酸の配列の決定は、後述の公知の方法によって行うことが可能である。単離された核酸の相同性は、塩基配列全体で、少なくとも50%以上、さらに好ましくは70%以上、さらに好ましくは90%以上（例えば、95%、96%、97%、98%、99%以上）の配列の同一性を有する。

上記ハイブリダイゼーション技術を利用する方法にかえて、可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列情報を基に合成したプライマーを用いる遺伝子増幅法、例えば、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR) 法を利用して、可変領域のアミノ酸配列をコードする塩基配列からなる核酸とストリンジェントな条件下でハイブリダイズする核酸を単離することも可能である。

[0219] 塩基配列及びアミノ酸配列の同一性は、Karlin and Altschulによるアルゴリズム BLAST (Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90:5873-7) によって決定することができる。このアルゴリズムに基づいて、BLASTNやBLASTXと呼ばれるプログラムが開発されている (Altschul et al.,J.Mol.Biol.(1990)215:403-10)。BLASTに基づいてBLASTNによって塩基配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 100、wordlength = 12とする。また、BLASTに基づいてBLASTXによってアミノ酸配列を解析する場合には、パラメーターは例えばscore = 50、wordlength = 3とする。BLASTとGapped BLASTプログラムを用いる場合には、各プログラムのデフォルトパラメーターを用いる。これらの解析方法の具体的な手法は公知である (NCBI (National Center for Biotechnology Information) の BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) のウェブサイトを参照；http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

[0220] 核酸、ベクター、細胞

一局面において、本発明は、本発明の抗原結合分子をコードする核酸（ポ

リヌクレオチド）に関する。本発明の抗原結合分子は、任意の発現ベクターに組み込むことができる。発現ベクターで適当な宿主を形質転換し、抗原結合分子の発現細胞とすることができる。抗原結合分子の発現細胞を培養し、培養上清から発現産物を回収すれば、当該核酸（ポリヌクレオチド）によってコードされる抗原結合分子を取得することができる。即ち本発明は、本発明の抗原結合分子をコードする核酸（ポリヌクレオチド）を含むベクター、当該ベクターを保持する細胞、および当該細胞を培養し培養上清から抗原結合分子を回収することを含む抗原結合分子の製造方法に関する。これらは例えば、前記組換え抗体と同様の手法により得ることができる。

[0221] 医薬組成物

一局面において、本発明は、本発明の抗原結合分子（特に多重特異性抗原結合分子）を有効成分として含有する医薬組成物を提供する。一態様において、本発明は、当該抗原結合分子を有効成分として含有する、細胞傷害を誘導する医薬組成物を提供する。本発明の医薬組成物は、細胞傷害、特にT細胞依存的細胞傷害を誘導し、当該細胞傷害が予防又は治療に必要な疾患を罹患している対象または再発する可能性がある対象に投与されることが好ましい。一態様において、本発明の医薬組成物は、がんの治療または予防に使用するためのものである。

[0222] 本発明の抗原結合分子（特に多重特異性抗原結合分子）を有効成分として含有する医薬組成物は、当該抗原結合分子を有効成分として含有する細胞傷害誘導剤および細胞増殖抑制剤、当該抗原結合分子を対象に投与する工程を含む細胞傷害を誘導する方法および細胞増殖を抑制する方法、細胞傷害の誘導および細胞増殖の抑制における使用のための当該抗原結合分子、または、細胞傷害誘導剤および細胞増殖抑制剤の製造における当該抗原結合分子の使用と表現することもできる。

また、本発明の抗原結合分子（特に多重特異性抗原結合分子）を有効成分として含有する医薬組成物は、当該抗原結合分子を有効成分として含有する、がんの治療剤もしくは予防剤、当該抗原結合分子を対象に投与する工程を

含む、がんを治療もしくは予防する方法、がんの治療もしくは予防における使用のための当該抗原結合分子、または、がんの治療剤もしくは予防剤の製造における当該抗原結合分子の使用と表現することもできる。

[0223] 本発明において、「抗原結合分子を有効成分として含有する」とは、当該抗原結合分子を主要な活性成分として含むという意味であり、当該抗原結合分子の含有率を制限するものではない。

[0224] また、一態様において、本発明の抗原結合分子は、ベクター等を用いて本発明の抗原結合分子をコードする核酸を生体内に投与あるいは組み込み、本発明の抗原結合分子を直接生体内で発現させる方法によって投与され得るが、ベクターを用いることなく投与されてもよい。ベクターとして、ウイルスベクター、プラスミドベクターが例示され、さらにはアデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルスベクターが例示される。本発明の抗原結合分子をコードする核酸は直接生体に投与してもよく、また本発明の抗原結合分子をコードする核酸を導入した細胞を生体に投与してもよい。例えば、本発明の抗原結合分子をコードするmRNAに生体内でのmRNAの安定性を高めるための化学修飾を施し、当該mRNAをヒトに直接投与し、生体内で本発明の抗原結合分子を発現させる方法により本発明の抗原結合分子を投与しうる（EP2101823B、WO2013/120629参照）。また、本発明の抗原結合分子をコードする核酸を導入したB細胞を投与してもよい(Sci Immunol. (2019) 4(35), eaax0644)。また、本発明の抗原結合分子をコードする核酸を導入した細菌を投与してもよい(Nature Reviews Cancer (2018) 18, 727-743)。

[0225] また、必要に応じ本発明の抗原結合分子は、マイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ［メチルメタクリル酸］等のマイクロカプセル）に封入され、コロイドドラッグデリバリーシステム（リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等）とされ得る（"Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)等参照）。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、当該方法は本発明の抗原結合分子に適用され得る（J.Biomed.Mate

r.Res. (1981) 15, 267-277、Chemtech. (1982) 12, 98-105、米国特許第3773719号、欧州特許公開公報EP58481号・EP133988号、Biopolymers (1983) 22, 547-556)。

[0226] 本発明の医薬組成物、細胞傷害誘導剤、細胞増殖抑制剤、または、がんの治療剤もしくは予防剤（以下、本発明の医薬組成物と総称する）は、経口、非経口投与のいずれかによって患者に投与することができる。好ましくは非経口投与である。係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などが挙げられる。例えば注射投与によって本発明の医薬組成物が全身または局部的に投与できる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001 mg/bodyから100000 mg/bodyの範囲で投与量が選択され得る。しかしながら、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0227] 本発明の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的（薬学的）に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられる。更にこれらに制限されず、その他常用の担体が適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を担体として挙げることができる。

[0228] 本発明の抗原結合分子と組み合わせ可能な技術の非限定な例として、CD3結合ドメインを利用した、T細胞リダイレクティング抗体を分泌するT細胞の作成が例示される（Trends Immunol.(2019) 40(3) 243-257）。非限定な作成手法の一つとしては、本明細書に記載のCD3結合ドメインと、がん抗原に対する結合ドメインとを含む二重特異性抗体をコードする核酸を遺伝子改変技術によりT細胞などのエフェクター細胞に導入する手法が挙げられる。

[0229] 治療方法等

一局面において、本発明は、標的細胞と当該細胞の表面に特異的に発現する抗原に結合する本発明の多重特異性抗原結合分子とを接触させる工程を含む、当該細胞に傷害を引き起こす（誘導する）方法、或いは、該細胞の増殖を抑制する方法を提供する。一態様において、本発明は、標的がん特異的抗原を発現する細胞と当該抗原に結合する本発明の多重特異性抗原結合分子とを接触させる工程を含む、当該抗原の発現細胞、又は、当該発現細胞を含む腫瘍組織に傷害を引き起こす（誘導する）方法、或いは、該細胞又は腫瘍組織の増殖を抑制する方法を提供する。別の態様において、本発明は、免疫応答を抑制する機能を有する細胞と、当該細胞の表面に発現する抗原に結合する本発明の多重特異性抗原結合分子とを接触させる工程を含む、当該細胞に傷害を引き起こす（誘導する）方法、或いは、該細胞の増殖を抑制する方法を提供する。当該抗原に結合する多重特異性抗原結合分子は、本発明の細胞傷害誘導剤および細胞増殖抑制剤に含有される当該抗原に結合する本発明の抗原結合分子として上述したとおりである。当該抗原に結合する本発明の多重特異性抗原結合分子が結合する細胞は、当該抗原が発現している細胞であれば特に限定されない。

[0230] 本発明において「接触」は、例えば、試験管内で培養している標的抗原発現細胞の培養液に、当該抗原に結合する本発明の多重特異性抗原結合分子を添加することにより行われる。この場合において、添加される抗原結合分子の形状としては、溶液又は凍結乾燥等により得られる固体等の形状が適宜使用され得る。水溶液として添加される場合にあっては純粋に本発明の多重特

異性抗原結合分子のみを含有する水溶液であり得るし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液でもあり得る。添加する濃度は特に限定されないが、培養液中の最終濃度として、好ましくは1 pg/mlから1 g/mlの範囲であり、より好ましくは1 ng/mlから1 mg/mlであり、更に好ましくは1μg/mlから1 mg/mlが好適に使用され得る。

[0231] また本発明において「接触」は更に、別の態様では、標的抗原の発現細胞を体内に移植した非ヒト動物や、内在的に当該抗原を発現する細胞を有する動物に投与することによっても行われる。投与方法は経口、非経口投与のいずれかによって実施できる。特に好ましくは非経口投与による投与方法であり、係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などが挙げられる。例えば注射投与によって本発明の医薬組成物、あるいは細胞傷害誘導剤および細胞増殖阻害剤が全身または局部的に投与できる。また、被験動物の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。水溶液として投与される場合にあっては純粋に本発明の多重特異性抗原結合分子のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で投与量が選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000 mg/bodyの範囲で投与量が選択できる。しかしながら、本発明の多重特異性抗原結合分子の投与量はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0232] 本発明の多重特異性抗原結合分子の接触によって標的細胞（特に、本発明の多重特異性抗原結合分子の第二の抗原結合ドメインが結合する、CD3以外の標的抗原を発現する細胞）に引き起こされた細胞傷害を評価又は測定する方法として、以下の方法が好適に使用される。試験管内において該細胞傷害活

性を評価又は測定する方法としては、細胞傷害性T細胞活性などの測定法を挙げることができる。本発明の多重特異性抗原結合分子がT細胞性傷害活性を有するか否か、公知の方法により測定することができる（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.,(1993)等）。活性の測定に際しては、標的抗原とは異なる抗原であって試験に使用する細胞が発現していない抗原に結合する抗原結合分子を、本発明の多重特異性抗原結合分子と同様に対照として使用して、本発明の多重特異性抗原結合分子が対照として使用された抗原結合分子よりも強い細胞傷害活性を示すことにより活性が判定され得る。

[0233] また、生体内で細胞傷害活性を評価又は測定するために、標的抗原を発現する細胞を、非ヒト被験動物の皮内又は皮下に移植後、当日又は翌日から毎日又は数日間隔で被験抗原結合分子を静脈又は腹腔内に投与される。腫瘍の大きさを経日的に測定することにより当該腫瘍の大きさの変化の差異が細胞傷害活性と規定され得る。試験管内での評価と同様に対照となる抗原結合分子が投与され、本発明の抗原結合分子の投与群における腫瘍の大きさが対照抗原結合分子の投与群における腫瘍の大きさよりも有意に小さいことが細胞傷害活性を有すると判定され得る。

[0234] 標的抗原を発現する細胞の増殖に対する抑制効果を評価又は測定する方法としては、アイソトープラベルしたthymidineの細胞へ取込み測定やMTT法が好適に用いられる。また、生体内で細胞増殖抑制活性を評価又は測定する方法として、上記記載の生体内において細胞傷害活性を評価又は測定する方法と同じ方法を好適に用いることができる。

[0235] キット

また本発明は、本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を含む、本発明の方法に用いるためのキットを提供する。該キットには、その他、薬学的に許容される担体、媒体、使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくことができる。

また本発明は、本発明の方法に使用するための、本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子に関する。

[0236] 前述の発明は、明確な理解を助ける目的のもと、実例および例示を用いて詳細に記載したが、本明細書における記載および例示は、本発明の範囲を限定するものと解釈されるべきではない。本明細書で引用したすべての特許文献および科学文献の開示は、その全体にわたって、参照により明示的に本明細書に組み入れられる。

実施例

[0237] 以下に実施例により本発明をより詳細に説明するが、これらの実施例は本発明の範囲を制限するものではない。

[0238] 〔実施例1〕CD3抗原への結合安定性が向上したCDR改変体の作製

これまでにT細胞マーカーであるCD3と標的細胞上の抗原を認識することにより標的細胞に障害を与える二重特異性抗体は報告されているが、報告されていたCD3結合抗体可変領域には結合安定性を改善する余地が残されていた。このプロファイルを改善することにより、in vivoでの薬効の持続やin vitroでの評価の容易さといった効果が期待された。具体的には、WO2015174439に記載されている抗体可変領域は、緩衝液中で経時的に結合能を失い、結合安定性の向上のためのさらなる改変が必要であると考えられた。

まず、WO2015174439に記載されているヒトCD3に対する抗体の重鎖可変領域と、ヒトIgG1の定常領域配列とを有する抗体重鎖遺伝子TR01H113-F760mnP17（配列番号：30）、およびヒトCD3に対する抗体の軽鎖可変領域と、ヒトκ鎖の定常領域配列とを有する抗体軽鎖遺伝子L0011-KT0（配列番号：34）が作製された。この抗体遺伝子のCDRのアミノ酸配列を規定する塩基に対して、当業者公知の方法で改変を導入することによって、CDR改変抗体を規定するプラスミドが得られた。重鎖と軽鎖を規定するプラスミドを混合してヒト胎児腎細胞由来HEK293系細胞に導入した。4日間培養された上清から、当業者公知の方法で精製することにより、抗体が得られた。分光光度計を用いて、精製された抗体溶液の280 nmでの吸光度が測定された。得られた測定値から、PACE法

により算出された吸光係数を用いて、精製された抗体の濃度が算出された（Protein Science (1995) 4, 2411-2423）。

[0239] [表1]

作製されたCDR改変体

抗体番号	重鎖可変領域略称	軽鎖可変領域略称	抗体名
1	TR01H113	L0011	TR01H113-F760mnP17/L0011-KT0
2	TR01H113	L0011.71	TR01H113-F760mnP17/L0011.71-KT0
3	TR01H113.38	L0011.57	TR01H113.38-F760mnP17/L0011.57-KT0
4	TR01H113.38	L0011.71	TR01H113.38-F760mnP17/L0011.71-KT0
5	TR01H113.H96A	L0011	TR01H113.H96A-F760mnP17/L0011-KT0
6	TR01H113.412	L0011.71	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.71-KT0
7	TR01H113.453	L0011.71	TR01H113.453-F760mnP17/L0011.71-KT0
8	TR01H113.412	L0011.273	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.273-KT0

9	TR01H113.412	L0011.274	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.274-KT0
10	TR01H113.412	L0011.57	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.57-KT0
11	TR01H113.455	L0011.71	TR01H113.455-F760mnP17/L0011.71-KT0
12	TR01H113.456	L0011.71	TR01H113.456-F760mnP17/L0011.71-KT0
13	TR01H113.412	L0011.115	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.115-KT0
14	TR01H113.457	L0011.71	TR01H113.457-F760mnP17/L0011.71-KT0
15	TR01H113.458.S	L0011.71	TR01H113.458.S-F760mnP17/L0011.71-KT0
16	TR01H113.412	L0011.275	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.275-KT0
17	TR01H113.455	L0011.74	TR01H113.455-F760mnP17/L0011.74-KT0
18	TR01H113.456	L0011.74	TR01H113.456-F760mnP17/L0011.74-KT0
19	TR01H113.412	L0011.65	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.65-KT0
20	TR01H113.412	L0011.277	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.277-KT0
21	TR01H113.412	L0011.278	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.278-KT0
22	TR01H113.412	L0011.279	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.279-KT0
23	TR01H113.460	L0011.71	TR01H113.460-F760mnP17/L0011.71-KT0
24	TR01H113.412	L0011.280	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.280-KT0
25	TR01H113.457	L0011.74	TR01H113.457-F760mnP17/L0011.74-KT0
26	TR01H113.412	L0011.281	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.281-KT0
27	TR01H113.469	L0011.71	TR01H113.469-F760mnP17/L0011.71-KT0
28	TR01H113.412	L0011.283	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.283-KT0
29	TR01H113.479	L0011.71	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.71-KT0
30	TR01H113.124	L0011.71	TR01H113.124-F760mnP17/L0011.71-KT0
31	TR01H113.479	L0011.273	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.273-KT0
32	TR01H113.479	L0011.274	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.274-KT0
33	TR01H113.124	L0011.74	TR01H113.124-F760mnP17/L0011.74-KT0
34	TR01H113.479	L0011.57	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.57-KT0
35	TR01H113.480	L0011.71	TR01H113.480-F760mnP17/L0011.71-KT0
36	TR01H113.412	L0011.74	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.74-KT0

[0240] 〔実施例2〕改変されたCDRを有する抗体のCD3抗原への結合評価

ヒトCD3εおよびCD3γならびにFLAGタグからなる抗原をコードするポリヌクレオチドをHEK293系細胞に導入し、培養上清をイオン交換クロマトグラフィー、FLAGタグによるアフィニティークロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーにより精製して抗原（以下CD3eg-linker）を得た。

作製された抗体とCD3eg-linkerとの相互作用解析は、Octet HTXを用いて以

下の方法で実施された。バッファーとして0.05% TWEEN20を含むリン酸緩衝生理食塩水（pH7.4）を使用した。センサーチップとしてProtein Aチップ（sartorius）が使用された。表1に記載の抗体は各10μg/mL、ヒトCD3eg-linkerは900, 300, 100, 33 nMに段階希釈でバッファー中にて調製された。抗体は30秒のベースラインののち、センサーチップに60秒間ローディングされ、その後30秒間のベースラインステップを経て各180秒間の抗原結合・解離のステップによって抗原結合特性が測定された。結合値として、測定295秒時点でのレスポンスの大きさが定義された。また、複数濃度でのレスポンスカーブへのグローバルフィッティング（Octet BLI Analysis Version: 12.2.2.4）により平衡解離定数KDが決定された。このグローバルフィッティングでは、結合相と解離相の全ての領域に対して1:1結合モデルによって算出された。

[0241]

[表2]

作製された改変体とヒトCD3eg-linkerの結合測定

抗体番号	重鎖可変領域略称	軽鎖可変領域略称	抗体名	結合値(nm)	KD (nM)	KD Error (nM)
1	TR01H113	L0011	TR01H113-F760mnP17/L0011-KT0	0.129	319.1	3.29
2	TR01H113	L0011.71	TR01H113-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.105	491.4	15.33
3	TR01H113.38	L0011.57	TR01H113.38-F760mnP17/L0011.57-KT0	0.084	323	12.12
4	TR01H113.38	L0011.71	TR01H113.38-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.081	383.3	13.85
5	TR01H113.H96A	L0011	TR01H113.H96A-F760mnP17/L0011-KT0	0.073	894.8	26.17
6	TR01H113.412	L0011.71	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.089	241.9	5.844
7	TR01H113.453	L0011.71	TR01H113.453-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.075	370.3	8.951
8	TR01H113.412	L0011.273	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.273-KT0	0.077	703.8	42.25
9	TR01H113.412	L0011.274	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.274-KT0	0.068	33570	78190
10	TR01H113.412	L0011.57	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.57-KT0	0.073	1822	237
11	TR01H113.455	L0011.71	TR01H113.455-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.082	618.1	23.67
12	TR01H113.456	L0011.71	TR01H113.456-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.076	1230	71.42
13	TR01H113.412	L0011.115	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.115-KT0	0.078	359.5	8.488
14	TR01H113.457	L0011.71	TR01H113.457-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.086	276.8	6.39
15	TR01H113.458.S	L0011.71	TR01H113.458.S-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.063	275.8	6.652
16	TR01H113.412	L0011.275	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.275-KT0	0.075	264.3	4.955
17	TR01H113.455	L0011.74	TR01H113.455-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.076	156.8	2.852
18	TR01H113.456	L0011.74	TR01H113.456-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.077	235.9	5.222
19	TR01H113.412	L0011.65	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.65-KT0	0.069	184.9	4.133
20	TR01H113.412	L0011.277	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.277-KT0	0.064	141	4.026
21	TR01H113.412	L0011.278	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.278-KT0	0.058	326.4	11.68
22	TR01H113.412	L0011.279	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.279-KT0	0.064	392.4	10.43
23	TR01H113.460	L0011.71	TR01H113.460-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.058	380.6	9.186
24	TR01H113.412	L0011.280	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.280-KT0	0.071	362.5	7.948
25	TR01H113.457	L0011.74	TR01H113.457-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.089	383	8.562
26	TR01H113.412	L0011.281	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.281-KT0	0.053	193.8	6.432

27	TR01H113.469	L0011.71	TR01H113.469-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.070	237.1	6.19
28	TR01H113.412	L0011.283	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.283-KT0	0.062	175.3	6.35
29	TR01H113.479	L0011.71	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.127	253.3	3.026
30	TR01H113.124	L0011.71	TR01H113.124-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.108	413.4	8.33
31	TR01H113.479	L0011.273	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.273-KT0	0.119	329.1	4.226
32	TR01H113.479	L0011.274	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.274-KT0	0.117	419.3	5.239
33	TR01H113.124	L0011.74	TR01H113.124-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.092	1250	51.8
34	TR01H113.479	L0011.57	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.57-KT0	0.134	346.3	5.967
35	TR01H113.480	L0011.71	TR01H113.480-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.085	1194	50.08
36	TR01H113.412	L0011.74	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.066	1401	99.54

[0242] 〔実施例3〕改変されたCDRを有する抗体のCD3eg-linkerへの結合安定性の評価

作成された抗体は0.1 mg/mLに希釈され、4℃で3日または50℃で3日の条件で保存され、実施例2と同様の方法で抗原結合が評価された。

[0243] [表3]

作製された改変体とヒトCD3eg-linkerの結合の安定性

抗体番号	重鎖可変領域略称	軽鎖可変領域略称	抗体名	結合値（nm）		結合H/I比
				4℃保存時	50℃保存時	
1	TR01H113	L0011	TR01H113-F760mnP17/L0011-KT0	0.129	0.078	61%
2	TR01H113	L0011.71	TR01H113-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.105	0.080	76%
3	TR01H113.38	L0011.57	TR01H113.38-F760mnP17/L0011.57-KT0	0.084	0.063	74%
4	TR01H113.38	L0011.71	TR01H113.38-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.081	0.066	81%
5	TR01H113.H96A	L0011	TR01H113.H96A-F760mnP17/L0011-KT0	0.073	0.031	42%
6	TR01H113.412	L0011.71	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.089	0.066	75%
7	TR01H113.453	L0011.71	TR01H113.453-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.075	0.049	65%
8	TR01H113.412	L0011.273	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.273-KT0	0.077	0.065	84%
9	TR01H113.412	L0011.274	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.274-KT0	0.068	0.055	80%
10	TR01H113.412	L0011.57	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.57-KT0	0.073	0.056	77%
11	TR01H113.455	L0011.71	TR01H113.455-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.082	0.066	80%
12	TR01H113.456	L0011.71	TR01H113.456-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.076	0.059	78%
13	TR01H113.412	L0011.115	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.115-KT0	0.078	0.058	75%
14	TR01H113.457	L0011.71	TR01H113.457-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.086	0.078	90%
15	TR01H113.458.S	L0011.71	TR01H113.458.S-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.063	0.050	79%
16	TR01H113.412	L0011.275	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.275-KT0	0.075	0.064	85%
17	TR01H113.455	L0011.74	TR01H113.455-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.076	0.057	75%

18	TR01H113.456	L0011.74	TR01H113.456-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.077	0.064	83%
19	TR01H113.412	L0011.65	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.65-KT0	0.069	0.053	77%
20	TR01H113.412	L0011.277	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.277-KT0	0.064	0.059	92%
21	TR01H113.412	L0011.278	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.278-KT0	0.058	0.053	92%
22	TR01H113.412	L0011.279	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.279-KT0	0.064	0.055	86%
23	TR01H113.460	L0011.71	TR01H113.460-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.058	0.050	86%
24	TR01H113.412	L0011.280	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.280-KT0	0.071	0.061	86%
25	TR01H113.457	L0011.74	TR01H113.457-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.089	0.078	87%
26	TR01H113.412	L0011.281	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.281-KT0	0.053	0.046	86%
27	TR01H113.469	L0011.71	TR01H113.469-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.070	0.061	88%
28	TR01H113.412	L0011.283	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.283-KT0	0.062	0.054	87%
29	TR01H113.479	L0011.71	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.127	0.104	81%
30	TR01H113.124	L0011.71	TR01H113.124-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.108	0.081	75%
31	TR01H113.479	L0011.273	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.273-KT0	0.119	0.097	82%
32	TR01H113.479	L0011.274	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.274-KT0	0.117	0.103	88%
33	TR01H113.124	L0011.74	TR01H113.124-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.092	0.075	81%
34	TR01H113.479	L0011.57	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.57-KT0	0.134	0.114	85%
35	TR01H113.480	L0011.71	TR01H113.480-F760mnP17/L0011.71-KT0	0.085	0.074	87%
36	TR01H113.412	L0011.74	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.74-KT0	0.066	0.061	92%

[0244] 表中の「結合H/I比」とは、各抗体について4℃での保存の条件と50℃での保存の条件で保存後の結合測定の値の比をとったものであり、各抗体が50℃の条件でどの程度結合活性を維持するかを示す値である。本発明において作成された抗体番号2, 14, 25, 29, 30～32, 34は、50℃の保存条件時の結合値が既報のコントロール抗体1の0.078以上であった。また、これら抗体については、結合H/I値が75%以上と、既報のコントロール抗体1の61%を上回る数値であった。したがって、これら改変体は緩衝液中での50℃条件での結合能の低下が大きく改善されていることが確認された。

[0245] 〔実施例4〕改変されたCDRを有する抗体のTDCC Reporter Bioassayによる評価

本発明において作成された各抗体と抗MarvelD3抗体を用いて、当業者公知の方法において二重特異性抗体が調製された。調製された抗体は各0.044mg/mLに希釈され、実施例3と同様に4℃または50℃で3日間保存された。これらの

抗体について、In vitroでのTDCC活性が測定され、保存時の温度によるTDCC活性の違いが評価された。In vitro TDCC活性測定にはTCR/CD3 Effector Cells (NFAT)、Bio-Glo luciferase assay system (Promega) が用いられ、TDCC活性はレポーター遺伝子であるLuciferaseの発光により定量された。384ウェルプレートの各ウェルに、培地により3×10^6/mLに濃度を調製されたNFAT-RE-luc2 Jurkatと、5×10^5 mLに濃度を調製されたLS 174T細胞 (ATCC)、10 nMまたは100 nMの抗体溶液を各10μL添加することで混合し、反応を開始した。ここで、LS 174TはMarvelD3抗原を発現する細胞株である。反応は37℃で終夜行われ、インキュベートした各ウェルにLuciferase基質を添加してプレートリーダーで発光を測定することでレポーター遺伝子の発現が定量された。ここで、Luciferaseレスポンス (counts per second: CPS) は、10 nMと100 nMの抗体溶液でのそれぞれの測定値の平均値を表す。

[0246]

[表4]

作製された改変体と TDCC 活性

抗体番号	重鎖可変領域略称	軽鎖可変領域略称	抗体名	Luciferase レスポンス		活性化 H/I 比
				4℃ 保存時	50℃ 保存時	
1	TR01H113	L0011	TR01H113-F760mnP17/L0011-KT0	6.4.E+05	4.3.E+05	67%
2	TR01H113	L0011.71	TR01H113-F760mnP17/L0011.71-KT0	5.9.E+05	3.5.E+05	60%
3	TR01H113.38	L0011.57	TR01H113.38-F760mnP17/L0011.57-KT0	4.2.E+05	2.9.E+05	68%
4	TR01H113.38	L0011.71	TR01H113.38-F760mnP17/L0011.71-KT0	4.3.E+05	2.9.E+05	66%
5	TR01H113.H96A	L0011	TR01H113.H96A-F760mnP17/L0011-KT0	5.0.E+05	3.3.E+05	66%
6	TR01H113.412	L0011.71	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.71-KT0	4.7.E+05	3.7.E+05	78%
7	TR01H113.453	L0011.71	TR01H113.453-F760mnP17/L0011.71-KT0	4.7.E+05	3.1.E+05	66%
8	TR01H113.412	L0011.273	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.273-KT0	5.2.E+05	3.4.E+05	66%
9	TR01H113.412	L0011.274	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.274-KT0	5.0.E+05	3.7.E+05	74%
10	TR01H113.412	L0011.57	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.57-KT0	4.6.E+05	3.0.E+05	64%
11	TR01H113.455	L0011.71	TR01H113.455-F760mnP17/L0011.71-KT0	5.3.E+05	4.0.E+05	75%
12	TR01H113.456	L0011.71	TR01H113.456-F760mnP17/L0011.71-KT0	4.5.E+05	3.0.E+05	67%
13	TR01H113.412	L0011.115	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.115-KT0	5.7.E+05	3.9.E+05	69%
14	TR01H113.457	L0011.71	TR01H113.457-F760mnP17/L0011.71-KT0	5.6.E+05	3.9.E+05	70%
15	TR01H113.458.S	L0011.71	TR01H113.458.S-F760mnP17/L0011.71-KT0	4.5.E+05	3.3.E+05	73%
16	TR01H113.412	L0011.275	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.275-KT0	5.8.E+05	4.0.E+05	69%
17	TR01H113.455	L0011.74	TR01H113.455-F760mnP17/L0011.74-KT0	5.2.E+05	3.7.E+05	71%
18	TR01H113.456	L0011.74	TR01H113.456-F760mnP17/L0011.74-KT0	4.7.E+05	3.2.E+05	68%
19	TR01H113.412	L0011.65	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.65-KT0	4.6.E+05	3.3.E+05	72%
20	TR01H113.412	L0011.277	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.277-KT0	5.0.E+05	3.3.E+05	66%
21	TR01H113.412	L0011.278	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.278-KT0	5.2.E+05	3.8.E+05	73%
22	TR01H113.412	L0011.279	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.279-KT0	4.8.E+05	3.3.E+05	69%
23	TR01H113.460	L0011.71	TR01H113.460-F760mnP17/L0011.71-KT0	5.1.E+05	3.0.E+05	58%
24	TR01H113.412	L0011.280	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.280-KT0	5.7.E+05	3.8.E+05	65%
25	TR01H113.457	L0011.74	TR01H113.457-F760mnP17/L0011.74-KT0	5.7.E+05	4.2.E+05	74%

26	TR01H113.412	L0011.281	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.281-KT0	3.9.E+05	3.2.E+05	82%
27	TR01H113.469	L0011.71	TR01H113.469-F760mnP17/L0011.71-KT0	4.7.E+05	3.1.E+05	67%
28	TR01H113.412	L0011.283	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.283-KT0	4.5.E+05	2.8.E+05	62%
29	TR01H113.479	L0011.71	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.71-KT0	6.4.E+05	5.5.E+05	86%
30	TR01H113.124	L0011.71	TR01H113.124-F760mnP17/L0011.71-KT0	6.8.E+05	6.1.E+05	90%
31	TR01H113.479	L0011.273	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.273-KT0	7.6.E+05	5.5.E+05	72%
32	TR01H113.479	L0011.274	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.274-KT0	7.5.E+05	5.7.E+05	76%
33	TR01H113.124	L0011.74	TR01H113.124-F760mnP17/L0011.74-KT0	7.2.E+05	6.8.E+05	95%
34	TR01H113.479	L0011.57	TR01H113.479-F760mnP17/L0011.57-KT0	6.2.E+05	4.9.E+05	79%
35	TR01H113.480	L0011.71	TR01H113.480-F760mnP17/L0011.71-KT0	NA	NA	NA
36	TR01H113.412	L0011.74	TR01H113.412-F760mnP17/L0011.74-KT0	3.5.E+05	2.7.E+05	78%

NAは、測定が行われていないことを示す。

[0247] 表中の「活性化H/I比」とは、各抗体について4℃での保存の条件と50℃での保存の条件で保存後のLuciferaseレスポンスの値の比をとったものであり、各抗体が50℃の条件でどの程度結合活性を失ったかを示す値である。

実施例3で選択された抗体番号2，14，25，29，30～32，34は、4℃の条件で保存された場合のLuciferaseレスポンスにおいては50℃で保存された際の既報のコントロール抗体1のレスポンスに相当する4.3.E+05以上の値を示した。また、抗体番号14，25，29，30～32，34は、50℃の条件で保存された場合に67%以上の活性化H/I TDCC活性比を示した。これは既報のコントロール抗体１よりも優れた値であり、これらの抗体はTDCC活性を保ちながら活性化H/I比を改善した改変体であった。抗体番号1，2，14，25，29，30～32，34のアミノ酸配列を表５に示す。

[0248]

[表5]

抗体番号	アミノ酸配列の配列番号									
	重鎖	軽鎖	重鎖可変領域	軽鎖可変領域	重鎖CDR1	重鎖CDR2	重鎖CDR3	軽鎖CDR1	軽鎖CDR2	軽鎖CDR3
1	30	34	20	24	1	7	10	14	5	6
2	30	35	20	25	1	7	10	15	5	6
14	31	35	21	25	1	8	11	15	5	6
25	31	36	21	26	1	8	11	16	5	6
29	32	35	22	25	1	9	12	15	5	6
30	33	35	23	25	1	9	13	15	5	6
31	32	37	22	27	1	9	12	17	5	6
32	32	38	22	28	1	9	12	18	5	6
34	32	39	22	29	1	9	12	19	5	6

産業上の利用可能性

[0249] 本発明によって、従来のT細胞リダイレクティング抗体で用いられているCD3結合ドメインと比べて優れた安定性を有する新規CD3結合ドメイン、および当該CD3結合ドメインを含む抗原結合分子が提供された。本発明のCD3結合ドメインを、がん細胞等の標的細胞の表面に発現する抗原に結合する抗原結合ドメインと組み合わせて調製した二重特異性抗原結合分子は、当該標的細胞に対してT細胞依存性細胞傷害を誘導することができ、様々ながんの治療または予防に用いることができる。本発明のCD3結合ドメインを含む抗原結合分子は、常温以上の環境下でのCD3に対する結合活性の低下の程度が小さく、患者に投与された場合、そのT細胞依存性細胞傷害活性が長期にわたって持続することが期待される。

請求の範囲

[請求項1] 第一の抗原結合ドメインおよび第二の抗原結合ドメインを含む抗原結合分子であって、第一の抗原結合ドメインが、CD3に対する結合活性を有する抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域を含み、

前記H鎖可変領域が、

アミノ酸配列NAWMH（配列番号：1）を含むH鎖CDR1；

アミノ酸配列QIX$_1$DKSQNYATX$_2$VAESVKG（配列番号：2）を含むH鎖CDR2であって、X1がKまたはRであり、X$_2$がYまたはFである、H鎖CDR2；及び

アミノ酸配列VHYX$_3$AGYGVDX$_4$（配列番号：3）を含むH鎖CDR3であって、X$_3$がAまたはPであり、X$_4$がI、MまたはLである、H鎖CDR3

を含み、

前記L鎖可変領域が、

アミノ酸配列RSX$_5$X$_6$X$_7$VVHENRX$_8$TYLH（配列番号：4）を含むL鎖CDR1であって、X$_5$がSまたはTであり、X$_6$がQまたはMであり、X$_7$がSまたはTであり、X$_8$がQまたはNである、L鎖CDR1；

アミノ酸配列KVSNRFS（配列番号：5）を含むL鎖CDR2；及び

アミノ酸配列GQGTQVPYT（配列番号：6）を含むL鎖CDR3

を含む、抗原結合分子。

[請求項2] CD3に対する結合活性を有する前記抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域が、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖CDR1、CDR2及びCDR3、並びに、L鎖CDR1、CDR2及びCDR3の組合せのうちのいずれかを含む、請求項１に記載の抗原結合分子：

(a1) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：7に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：10に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合

わせ、

（a2）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a3）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：8に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：11に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：16に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a4）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a5）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：13に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：15に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

（a6）配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：17に示されるアミノ酸配

列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a7) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：18に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ、

(a8) 配列番号：1に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR1、配列番号：9に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR2、配列番号：12に示されるアミノ酸配列を含むH鎖CDR3、配列番号：19に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR1、配列番号：5に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR2、及び配列番号：6に示されるアミノ酸配列を含むL鎖CDR3の組み合わせ。

[請求項3] CD3に対する結合活性を有する前記抗体H鎖可変領域及びL鎖可変領域が、以下の(a1)～(a8)から選ばれるH鎖可変領域及びL鎖可変領域の組合せのうちのいずれかを含む、請求項１または２に記載の抗原結合分子：

(a1)配列番号：20に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a2) 配列番号：21に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a3) 配列番号：21に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：26に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a4) 配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

(a5) 配列番号：23に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び

配列番号：25に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a6）配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：27に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a7）配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：28に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ、

（a8）配列番号：22に示されるアミノ酸配列を含むH鎖可変領域及び配列番号：29に示されるアミノ酸配列を含むL鎖可変領域の組合せ。

[請求項4] Fc領域をさらに含む、請求項１～３のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

[請求項5] 単一特異性抗原結合分子である、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

[請求項6] 二重特異性抗原結合分子である、請求項１～４のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

[請求項7] 第二の抗原結合ドメインが、がん抗原に対する結合活性を有する抗体可変領域を含む、請求項６に記載の抗原結合分子。

[請求項8] 抗体である、請求項１～７のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

[請求項9] 請求項１～８のいずれか一項に記載の抗原結合分子をコードする核酸。

[請求項10] 請求項９に記載された核酸が導入されたベクター。

[請求項11] 請求項１０に記載のベクターを含む細胞。

[請求項12] 請求項１１に記載の細胞を培養する工程を含む、請求項１～８のいずれか一項に記載の抗原結合分子を製造する方法。

[請求項13] 請求項１２に記載の方法によって製造された、抗原結合分子。

[請求項14] 請求項１～８のいずれか一項に記載の抗原結合分子と、薬学的に許容される担体とを含む、医薬組成物。

[請求項15] がんの治療または予防に使用するための、請求項１４に記載の医薬組成物。