

明 細 書

発明の名称：キメラ受容体を発現する細胞を含む医薬組成物

技術分野

[0001] 本発明は、キメラ受容体、キメラ受容体を発現する細胞、および当該細胞を利用した疾患の処置方法、例えば、養子細胞免疫療法、特にキメラ受容体を発現するT細胞を用いた養子細胞免疫療法に関する。

背景技術

[0002] キメラ抗原受容体（Chimeric Antigen Receptor：以下「CAR」とも称される）は、細胞表面の抗原を認識する抗原結合分子と、免疫細胞の活性化を誘導するシグナル伝達領域を人工的に融合させたキメラタンパク質である。免疫細胞にCARをコードする遺伝子を導入することにより、CARを発現する免疫細胞が作製される。CAR発現細胞は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）との相互作用に依存することなく、標的抗原を発現する細胞に対し細胞傷害性を発揮し、養子細胞免疫療法によるがんなどの疾患の治療に用いられる（非特許文献1）。

[0003] CAR遺伝子をT細胞やナチュラルキラー細胞に導入した、CAR-T細胞やCAR-NK細胞を用いた養子細胞免疫療法の臨床試験が、世界中で展開されている。特に、白血病やリンパ腫などの造血器悪性腫瘍に対して有効性を示す結果が得られており、CD19を抗原とするCAR-TであるKymriah（登録商標）（Novartis, tisagenlecleucel）およびYescarta（登録商標）（Gilead Sciences, axicabtagene ciloleucel）が医薬品として承認されている。

[0004] 様々な抗原を発現する標的細胞を普遍的に認識できる免疫細胞を作製するための技術確立は、養子細胞免疫療法を汎用化する上で重要な臨床的意義を有する。これまでに、そのような研究に関する報告例がある（特許文献1～5、および非特許文献2～5）

[0005] また、がんに対する別の治療法として、抗原結合分子によって内在性の免疫細胞を活性化し、腫瘍免疫を賦活化する方法が開発されている。これまでに、免疫チェックポイント分子であるCTLA-4, PD-1, およびPD-L1を阻害する抗体の治療効果が報告されており（非特許文献6～7）、医薬品として承認されている。また、免疫細胞上に発現する共刺激因子をアゴニスト抗体によって活性化することで、抗腫瘍効果を発現することがマウスモデルにて実証されている（非特許文献8）。さらに、免疫細胞を活性化するCD137アゴニスト抗体とCAR-Tを共投与することで、薬効を高める治療法が考案されている（特許文献6、非特許文献9）。

先行技術文献

特許文献

- [0006] 特許文献1：WO2012/082841
特許文献2：WO2016/040441
特許文献3：WO2017/161333
特許文献4：WO2018/002358
特許文献5：WO2018/177966
特許文献6：WO2019/140425

非特許文献

- [0007] 非特許文献1：June CH and Sadelain M, N Engl J Med. (2018) 379, 64
非特許文献2：Tamada et al, Clin Cancer Res. (2012) 18, 6436
非特許文献3：Urbanska K et al, J Transl Med. (2014) 12, 347
非特許文献4：Kudo K et al, Cancer Res. (2014) 74, 93
非特許文献5：Karches CH et al, Clin Cancer Res. (2019) 25, 5890
非特許文献6：Hodi FS et al, N Engl J Med. (2010) 363, 711
非特許文献7：Robert C et al, N Engl J Med. (2015) 372, 320
非特許文献8：Houot R et al, Blood. (2009) 114, 3431
非特許文献9：Mardiana S et al, Cancer Res. (2017) 77, 1296

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] CARを用いた養子細胞免疫療法によるがんの治療の課題として、固形がんに対する治療効果が乏しいことが挙げられる。この原因として、がん組織における個々のがん細胞上に発現する腫瘍抗原が不均一であるため単一の標的抗原しか認識しないCAR発現細胞が全ての腫瘍細胞を認識できないことに加えて、腫瘍微小環境における免疫抑制機構が考えられる。この課題を解決するための戦略として、CAR発現細胞のみならず内在性の免疫細胞を活性化し、内在性の免疫細胞と協調して抗腫瘍効果を発現させることが考えられ、そのための手段の一つとして、免疫細胞を活性化するCD137アゴニスト抗体との併用療法が考えられる。しかしながら、臨床ならびに非臨床において、CD137アゴニスト抗体は肝臓をはじめとする非腫瘍組織における免疫細胞の活性化を誘導し、毒性を発現することが課題となっている。

また、CARを用いた養子細胞免疫療法によるがんの治療の別の課題として、以下の点が挙げられる。第一に、腫瘍細胞の表面に発現する腫瘍抗原は、がん細胞ごとに異なるため、CARの抗原認識部位は標的とする腫瘍抗原毎に構築する必要がある。第二に、CARが標的とする腫瘍抗原は治療によって発現量が低下したり突然変異したりすることで、腫瘍抗原逃避を引き起こすことがある。現行のCAR発現細胞の多くは単一の標的抗原しか認識しないため、腫瘍抗原逃避は治療効果を低下させる。第三に、様々な腫瘍抗原に対する抗原結合分子を同定し、それを融合したCAR発現細胞を樹立するための経済的コストや労働的負担が課題となる。したがって、様々な複数の標的抗原を普遍的に認識でき、患者の標的抗原細胞の性状や治療段階に応じて、認識する腫瘍抗原を変更することが可能な、汎用的なCAR発現細胞の作製およびそれを用いた治療方法の開発が求められている。

課題を解決するための手段

[0009] 本開示は、免疫受容体に対しアゴニスト活性を発揮する部位および標的抗原を認識する部位を有する多重特異性抗原結合分子と、当該抗原結合分子に

よって認識される免疫受容体を細胞外ドメインに有するキメラ受容体が形質導入された免疫細胞とを組み合わせた治療法を提供するものである。一態様において、本開示における抗原結合分子は標的抗原を発現する病変部位に集積するため、そのアゴニスト活性は病変部位で選択的に発現し、結果として毒性の発現を回避することが可能である。また、本開示におけるキメラ受容体は、従来型のCARと異なり標的抗原に対する結合性を有さないため、本開示における抗原結合分子の標的抗原への結合を阻害しない特徴を有する。さらに、本開示におけるキメラ受容体は、本開示における抗原結合分子との結合性を有するため、抗原結合分子単剤によって、内在性の免疫細胞の活性化とキメラ受容体を発現する免疫細胞の活性化を同時に誘起することが可能である。

すなわち、本発明は以下を開示するものである。

[0010] より具体的には、本開示の一つの側面において、下記の発明が提供される。

[0011] [1] 抗原結合分子の投与と組み合わせるための、キメラ受容体を発現する細胞を含む医薬組成物であって、

キメラ受容体は細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含み、

抗原結合分子は、標的抗原認識部位および前記免疫受容体を認識する免疫受容体認識部位を有する多重特異性抗原結合分子である、医薬組成物。

[2] キメラ受容体を発現する細胞の投与と組み合わせるための、抗原結合分子を含む医薬組成物であって、

キメラ受容体は細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含み、

抗原結合分子は、標的抗原認識部位および前記免疫受容体を認識する免疫受容体認識部位を有する多重特異性抗原結合分子である、医薬組成物。

〔３〕免疫受容体認識部位が、キメラ受容体の細胞外ドメインおよび内因性の免疫受容体を認識する、〔１〕または〔２〕に記載の医薬組成物。

〔４〕キメラ受容体の細胞外ドメインが、内因性の免疫受容体のリガンドとの結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、〔１〕～〔３〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔５〕免疫受容体が共刺激分子である、〔１〕～〔４〕のいずれかに記載の医薬組成物。

[0012] 〔６〕免疫受容体がヒトＣＤ１３７である、〔１〕～〔５〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔７〕キメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトＣＤ１３７細胞外ドメインのシステインリッチドメイン３およびシステインリッチドメイン４の一部又は全部を少なくとも欠失させたヒトＣＤ１３７細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、〔１〕～〔６〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔８〕キメラ受容体が細胞内シグナル伝達ドメインを含み、細胞内シグナル伝達ドメインがＣＤ３ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、〔１〕～〔７〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔９〕標的抗原が受容体、腫瘍抗原、ＭＨＣ抗原、または分化抗原である、〔１〕～〔８〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１０〕標的抗原が腫瘍抗原である、〔１〕～〔９〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１１〕抗原結合分子が二重特異性抗体である、〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載の医薬組成物。

[0013] 〔１２〕がんの治療または予防において用いるための、〔１〕～〔１１〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１３〕免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含む細胞外ドメインを含む、キメラ受容体。

〔１４〕キメラ受容体の細胞外ドメインが、内因性の免疫受容体のリガンドとの結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体又はその断片で

ある、[13]に記載のキメラ受容体。

[15] 免疫受容体が共刺激分子である、[13]または[14]に記載のキメラ受容体。

[16] 免疫受容体がヒトCD137である、[13]～[15]のいずれかに記載のキメラ受容体。

[17] キメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトCD137細胞外ドメインのシステインリッチドメイン3およびシステインリッチドメイン4の一部または全部を少なくとも欠失させたヒトCD137改変体またはその断片を含む、[13]～[16]のいずれかに記載のキメラ受容体。

[18] キメラ受容体が細胞内シグナル伝達ドメインを含み、細胞内シグナル伝達ドメインがCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、[13]～[17]のいずれかに記載のキメラ受容体。

[0014] [19] [13]～[18]のいずれか1項に記載のキメラ受容体を発現する細胞。

[20] [19]の細胞を含む組成物。

[21] [13]～[18]のいずれかに記載のキメラ受容体をコードする核酸。

[22] [21]に記載の核酸が挿入されたベクター。

[23] [21]に記載の核酸または[22]に記載のベクターを用いて細胞をトランスフェクトまたは形質導入することを含む、[19]に記載の細胞を製造する方法。

[24] キメラ受容体が膜貫通ドメインをさらに含む、[1]～[12]のいずれかに記載の医薬組成物、または[13]～[18]のいずれかに記載のキメラ受容体。

[0015] [A1] 抗原結合分子の投与と組み合わせて用いるための、キメラ受容体を発現する細胞を含む医薬組成物であって、

キメラ受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含み、該細胞外ドメインは免疫受容体の細胞外ドメイン、免

疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含み、

抗原結合分子は、標的抗原認識部位および前記免疫受容体を認識する免疫受容体認識部位を有する二重特異性抗原結合部位を含む、医薬組成物。

〔A 2〕キメラ受容体を発現する細胞の投与と組み合わせて用いるための、抗原結合分子を含む医薬組成物であって、

キメラ受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含み、該細胞外ドメインは免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含み、

抗原結合分子は、標的抗原認識部位および前記免疫受容体を認識する免疫受容体認識部位を有する二重特異性抗原結合部位を含む、医薬組成物。

〔A 3〕免疫受容体認識部位が、キメラ受容体の細胞外ドメインおよび内因性の免疫受容体を認識する、〔A 1〕または〔A 2〕に記載の医薬組成物。

〔A 4〕キメラ受容体の細胞外ドメインが、内因性免疫リガンドとの結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、〔A 1〕～〔A 3〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔A 5〕免疫受容体が共刺激分子である、〔A 1〕～〔A 4〕のいずれかに記載の医薬組成物。

[0016] 〔A 6〕免疫受容体がヒトCD137である、〔A 1〕～〔A 5〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔A 7〕キメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトCD137細胞外ドメインのシステインリッチドメイン3およびシステインリッチドメイン4の一部または全部を少なくとも欠失させた細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、〔A 1〕～〔A 6〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔A 8〕細胞内シグナル伝達ドメインがCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、〔A 1〕～〔A 7〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔A 9〕標的抗原が受容体、腫瘍抗原、MHC抗原、または分化抗原である、〔A 1〕～〔A 8〕のいずれかに記載の医薬組成物。

[A 1 0] 標的抗原が腫瘍抗原である、[A 1] ~ [A 9] のいずれかに記載の医薬組成物。

[A 1 1] 抗原結合分子が二重特異性抗体である、[A 1] ~ [A 1 0] のいずれかに記載の医薬組成物。

[0017] [A 1 2] がんの治療または予防において用いるための、[A 1] ~ [A 1 1] のいずれかに記載の医薬組成物。

[A 1 3] 細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含み、該細胞外ドメインは免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、キメラ受容体。

[A 1 4] キメラ受容体の細胞外ドメインが、内因性免疫リガンドとの結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、[A 1 3] に記載のキメラ受容体。

[A 1 5] 免疫受容体が共刺激分子である、[A 1 3] または [A 1 4] に記載のキメラ受容体。

[A 1 6] 免疫受容体がヒトCD137である、[A 1 3] ~ [A 1 5] のいずれかに記載のキメラ受容体。

[A 1 7] キメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトCD137細胞外ドメインのシステインリッチドメイン3およびシステインリッチドメイン4の一部または全部を少なくとも欠失させた細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、[A 1 3] ~ [A 1 6] のいずれかに記載のキメラ受容体。

[A 1 8] 細胞内シグナル伝達ドメインがCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、[A 1 3] ~ [A 1 7] のいずれかに記載のキメラ受容体。

[0018] [A 1 9] [A 1 3] ~ [A 1 8] のいずれかに記載のキメラ受容体を発現する細胞。

[A 2 0] [A 1 9] の細胞を含む組成物。

[A 2 1] [A 1 3] ~ [A 1 7] のいずれかに記載のキメラ受容体をコードする核酸。

〔A 2 2〕〔A 2 1〕に記載の核酸が挿入されたベクター。

〔A 2 3〕〔A 2 1〕に記載の核酸または〔A 2 2〕に記載のベクターを用いて細胞をトランスフェクトまたは形質導入することを含む、〔A 1 8〕に記載の細胞を製造する方法。

[0019] 〔B 1〕疾患の治療方法であって、

治療を必要とする対象に有効量の抗原結合分子の投与すること、

前記対象にキメラ受容体を発現する細胞を投与すること、

を含み、

キメラ受容体は細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含み、

抗原結合分子は、標的抗原認識部位および前記免疫受容体を認識する免疫受容体認識部位を有する多重特異性抗原結合分子である、前記方法。

〔B 2〕キメラ受容体が膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む、〔B 1〕に記載の方法。

〔B 3〕免疫受容体認識部位が、キメラ受容体の細胞外ドメインおよび内因性の免疫受容体を認識する、〔B 1〕または〔B 2〕に記載の方法。

〔B 4〕キメラ受容体の細胞外ドメインが、内因性の免疫受容体のリガンドとの結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、〔B 1〕～〔B 3〕のいずれかに記載の方法。

〔B 5〕免疫受容体が共刺激分子である、〔B 1〕～〔B 4〕のいずれかに記載の方法。

[0020] 〔B 6〕免疫受容体がヒトCD137である、〔B 1〕～〔B 5〕のいずれかに記載の方法。

〔B 7〕キメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトCD137細胞外ドメインのシステインリッチドメイン3およびシステインリッチドメイン4の一部又は全部を少なくとも欠失させたヒトCD137細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、〔B 1〕～〔B 6〕のいずれかに記載の方法。

〔B 8〕キメラ受容体が細胞内シグナル伝達ドメインを含み、細胞内シグナル伝達ドメインがCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、〔B 1〕～〔B 7〕のいずれかに記載の方法。

〔B 9〕標的抗原が受容体、腫瘍抗原、MHC抗原、または分化抗原である、〔B 1〕～〔B 8〕のいずれかに記載の方法。

〔B 10〕標的抗原が腫瘍抗原である、〔B 1〕～〔9〕のいずれかに記載の方法。

〔B 11〕抗原結合分子が二重特異性抗体である、〔B 1〕～〔B 10〕のいずれかに記載の方法。

[0021] 〔B 12〕疾患ががんである、〔B 1〕～〔B 11〕のいずれかに記載の方法。

〔B 13〕がんが、原発性または転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺がん、結腸直腸がん、肝臓がん、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がん、および腺癌、例えば乳がん、前立腺がん、卵巣がん、および膵臓がんから選択される、〔B 12〕に記載の方法。

[0022] 〔C 1〕疾患の治療方法であって、

治療を必要とする対象に有効量の抗原結合分子の投与すること、
前記対象にキメラ受容体を発現する細胞を投与すること、
を含み、

キメラ受容体は、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含み、該細胞外ドメインは免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含み、

抗原結合分子は、標的抗原認識部位および前記免疫受容体を認識する免疫受容体認識部位を有する二重特異性抗原結合部位を含む、前記方法。

〔C 2〕キメラ受容体が膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインをさらに含む、〔C 1〕に記載の方法。

〔C 3〕免疫受容体認識部位が、キメラ受容体の細胞外ドメインおよび内

因性の免疫受容体を認識する、[C 1] または [C 2] に記載の方法。

[C 4] キメラ受容体の細胞外ドメインが、内因性免疫リガンドとの結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、[C 1] ~ [C 3] のいずれかに記載の方法。

[C 5] 免疫受容体が共刺激分子である、[C 1] ~ [C 4] のいずれかに記載の方法。

[0023] [C 6] 免疫受容体がヒトCD137である、[C 1] ~ [C 5] のいずれかに記載の方法。

[C 7] キメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトCD137細胞外ドメインのシステインリッチドメイン3およびシステインリッチドメイン4の一部または全部を少なくとも欠失させた細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、[C 1] ~ [C 6] のいずれかに記載の方法。

[C 8] 細胞内シグナル伝達ドメインがCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、[C 1] ~ [C 7] のいずれかに記載の方法。

[C 9] 標的抗原が受容体、腫瘍抗原、MHC抗原、または分化抗原である、[C 1] ~ [C 8] のいずれかに記載の方法。

[C 10] 標的抗原が腫瘍抗原である、[C 1] ~ [C 9] のいずれかに記載の方法。

[C 11] 抗原結合分子が二重特異性抗体である、[C 1] ~ [C 10] のいずれかに記載の方法。

[0024] [C 12] がんの治療または予防において用いるための、[C 1] ~ [C 11] のいずれかに記載の方法。

[C 13] がんが、原発性または転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺がん、結腸直腸がん、肝臓がん、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がん、および腺癌、例えば乳がん、前立腺がん、卵巣がん、および膵臓がんから選択される、[C 12] に記載の方法。

図面の簡単な説明

[0025] [図1]図1は、免疫受容体に対しアゴニスト活性を発揮する抗原結合分子（例として二重特異性抗体）と、当該抗原結合分子によって認識される免疫受容体を細胞外ドメインに有するキメラ受容体が形質導入された免疫細胞とを組み合わせた治療法の概念図であり、キメラ受容体発現細胞に加えて内在性免疫細胞を動員する本発明の特徴を示す図である。

[図2]図2は、キメラ受容体CD137-CD8-CD28-CD137-CD3ゼータ（CD137-CR1）、trCD137-CD8-CD28-CD137-CD3ゼータ（trCD137-CR）及びCD137-CR1と比較して、CD137の細胞外ドメインにI64RおよびV71R変異を有するキメラ受容体CD137-CR2を示す模式図である。

[図3]図3は、実施例3-1に記載のpCDH-CD137-CR1を発現するレンチウイルスベクター構築物及び5'末端から3'末端へのフレーム単位の構成要素の配列順序の概略図である。

[図4]図4は、実施例3-4に記載のレポーターアッセイによる、標的抗原としてヒトGPC3を発現した細胞と、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体と共培養したときのCD137-CR1 Jurkat細胞の活性化能の評価結果を示す図である。横軸は二重特異性抗体（H000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0）の濃度、縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図5]図5は、実施例3-5に記載のレポーターアッセイによる、標的抗原としてヒトGPC5Dを発現した細胞と、抗GPC5D抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体と共培養したときのCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞の活性化能の評価結果を示す図である。2種の二重特異性抗体、すなわち、GPA0018H-F760mnN17/GPA0018L-k0C//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0（GPA0018/CD137）、GPA0039H-F760mnN17/GPA0039L-k0C//hCD137VH-F7

60mnP17/hCD137VL-k0 (GPA0039/CD137)

を用い、横軸はその存否を示し、縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図6]図6は、実施例3-6に記載のレポーターアッセイによる、標的抗原としてヒトIL-6Rを発現した細胞と、抗IL-6R抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体と共培養したときの、キメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞(copGFP)及びCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞(CD137-CR1)の活性化能の評価結果を示す図である。横軸は二重特異性抗体(MRAH, v1-F760mnN17/MRAL, v1-k0, v1//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)の存否を示し、縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図7]図7は、実施例4-1に記載のpMSGV1-CD137-CR1を発現するレトロウイルスベクター構築物及び5'末端から3'末端へのフレーム単位の構成要素の配列順序の概略図である。

[図8A]図8Aは、実施例4-4に記載の、ヒト肝癌細胞株(SK-Hep-1)と、標的抗原としてヒトGPC3を発現したSK-pca60細胞が用いられ、3種の二重特異性抗体(抗GPC3抗体と抗KLH抗体、抗KLH抗体と抗CD137抗体、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる)と共培養したときの、残存腫瘍細胞数を指標としたCD137-CR1-eGFP発現T細胞の細胞傷害活性の評価を行った結果を示すグラフである。縦軸に残存腫瘍細胞数を示し、横軸に3種の二重特異性抗体の存否を示す。

[図8B]図8Bは、実施例4-5に記載の、ヒト肝癌細胞株(SK-Hep-1)と、標的抗原としてヒトGPC3を発現したSK-pca60細胞が用いられ、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体と共培養したときの、xCELLIGENCEシステムを用いたCD137-CR1-eGFP発現T細胞の細胞傷害活性の評価を行った結果を示すグラフである。エフェクター細胞対標的細胞(E:T)の割合及び二重特異性抗体の存否を変えて(図8Bでは「抗体あり」、「抗体なし」と表記する)評価し

ている。縦軸に細胞増殖活性（％）を示し、横軸にエフェクター細胞および抗体を添加してからの日数を示す。

[図9]図9は、リガンドを発現する細胞との結合による、キメラ受容体発現細胞の標的抗原非依存的な活性化メカニズムを示す模式図である。

[図10]図10は、実施例6-4に記載のレポーターアッセイによる、標的抗原としてヒトGPC3を発現した細胞と、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体と共培養したときのtrCD137-CR-copGFP Jurkat細胞（trCD137-CR）の活性化能の評価を行った結果を示すグラフである。横軸は二重特異性抗体（H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0）の濃度、縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図11]図11は、実施例7-4に記載のレポーターアッセイによる、標的抗原としてヒトGPC3を発現した細胞と、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体と共培養したときのCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞（CD137-CR2）の活性化能の評価を行った結果を示すグラフである。横軸は二重特異性抗体（H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0）の濃度、縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図12A]図12Aは、実施例3-2で調製されたCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞（CD137-CR1）について、実施例8に記載のリガンド（ヒトCD137L）発現細胞（Raji）存在下・非存在下におけるキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価を行った結果を示すグラフである。縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図12B]図12Bは、実施例6-2で調製されたtrCD137-CR-copGFP Jurkat細胞（trCD137-CR）について、実施例8に記載のリガンド（ヒトCD137L）発現細胞（Raji）存在下・非存在下におけるキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価を行った結果を示すグ

ラフである。縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図12C]図12Cは、実施例7-2で調製されたCD137-CR2-cop GFP Jurkat細胞(CD137-CR2)について、実施例8に記載のリガンド(ヒトCD137L)発現細胞(Raji)存在下・非存在下におけるキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価を行った結果を示すグラフである。縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図13]図13は、実施例9-3-1に記載の、BB0000及びBB0077の生体内リガンド(ヒトCD137L)への結合活性測定を行った結果を示すグラフである。横軸はCD137Lの濃度、縦軸はBB0000及びBB0077の補足量に対するCD137Lの結合量を示す。

[図14]図14は、実施例9-3-2に記載のBB0000およびBB0077のECM結合評価を行った結果を示すグラフである。縦軸にECM結合を示す発光強度を示す。

[図15]図15は、実施例9-3-4に記載の、BB0124からBB0138までの生体内リガンド(ヒトCD137L)への結合活性測定を行った結果を示すグラフである。横軸は評価したCD137改変体、縦軸は各改変体の補足量に対するCD137Lの結合量を示す。

[図16A]図16Aは、実施例9-3-5に記載のCD137改変体BB0124からBB0138までのECM結合評価を行った結果を示すグラフである。縦軸にECM結合を示す発光強度を示す。

[図16B]図16Bは、実施例9-3-3に記載のCD137改変体BB0139のECM結合評価を行った結果を示すグラフである。縦軸にECM結合を示す発光強度を示す。

[図17]図17は、実施例10-4に記載のレポーターアッセイによる標的細胞存在下における抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体(図17ではAbと示す)依存的な活性化能の評価を行った結果を示すグラフである。横軸はBB0000、BB0077、BB0127、BB0128、BB0131、BB0133、BB0134、BB0139の8種の

CD137 改変体を細胞外ドメインとして、CD8-CD28-CD137-CD3ゼータの細胞質領域が連結されたキメラ受容体を発現する Jurkat 細胞及び遺伝子導入されていない NFAT-RE-luc2 Jurkat 細胞の親株 (Mock) を示し、縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図18] 図18は、実施例10-5に記載のレポーターアッセイによるリガンド発現細胞存在下におけるCD137 改変体を細胞外ドメインに持つ Jurkat 細胞の活性化能の評価を行った結果を示すグラフである。軸はBB000、BB0077、BB0127、BB0128、BB0131、BB0133、BB0134、BB0139の8種を細胞外ドメインとして、CD8-CD28-CD137-CD3ゼータの細胞質領域が連結されたキメラ受容体を発現する Jurkat 細胞及び遺伝子導入されていない NFAT-RE-luc2 Jurkat 細胞の親株 (Mock) を示し、縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図19] 図19は、実施例11-1に記載するレンチウイルスベクターがコードするキメラ受容体CD137-CD8-CD3ゼータを示す模式図である。

[図20] 図20は、実施例11-4に記載のレポーターアッセイによる標的細胞存在下における抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体依存的な3種のJurkat細胞のCD137 活性化能の評価を行った結果を示すグラフである。横軸に、実施例11-2で調製した3種のJurkat細胞、すなわち、CD137-CR1 Jurkat 細胞 (CD137-CR1)、CD137-CR3-copGFP Jurkat 細胞 (CD137-CR3)、キメラ受容体を発現せず copGFPのみ発現する NF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat 細胞 (copGFP) と二重特異性抗体の存否を示す。縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

[図21] 図21は、実施例12-1に記載するレンチウイルスベクターがコードする膜貫通ドメインにヒトCD8を用いたコンストラクト (CD28-C

R1) 及びヒトCD28を用いたコンストラクト(CD28-CR2)を示す模式図である。

[図22]図22は、実施例12-4に記載のCD28-CR1 Jurkat細胞、およびCD28-CR2 Jurkat細胞の標的細胞存在下における活性化能の評価を行った結果を示すグラフである。横軸に、3種のJurkat細胞、すなわち、キメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞(copGFP)、実施例12-2で調製されたCD28-CR1-copGFPを発現するJurkat細胞(CD28-CR1-copGFP)及びCD28-CR2-copGFPを発現するJurkat細胞(CD28-CR2-copGFP)と、3種の二重特異性抗体、すなわち抗GPC3抗体と抗CD28抗体からなる二重特異性抗体(GPC3/CD28)、抗KLH抗体と抗CD28抗体からなる二重特異性抗体(KLH/CD28)及び抗GPC3抗体と抗KLH抗体からなる二重特異性抗体(GPC3/KLH)の存否を示す。縦軸はルシフェラーゼの発光強度を示す。

発明を実施するための形態

[0026] 本開示の他の特徴および利点は、以下の詳細な説明から明らかとなる。しかしながら、この詳細な説明から当業者には本開示の趣旨および範囲内で種々の変更および改変が自明となるので、本開示の好ましい実施態様を示す詳細な説明および具体例は説明のためだけに与えられているものと理解されるべきである。

以下、本開示の実施態様を図面に関して説明する。

[0027] 本発明におけるポリペプチドとは、通常、4アミノ酸程度以上の長さを有するペプチド、およびタンパク質を指す。また、本発明におけるポリペプチドは通常、人工的に設計された配列からなるポリペプチドであるが、特に限定されず、例えば、生物由来のポリペプチドであってもよい。また、天然ポリペプチド、あるいは合成ポリペプチド、組換えポリペプチド等のいずれであってもよい。さらに、上記のポリペプチドの断片もまた、本発明のポリペ

プチドに含まれる。

[0028] 本明細書において、たとえば、Ala/A、Leu/L、Arg/R、Lys/K、Asn/N、Met/M、Asp/D、Phe/F、Cys/C、Pro/P、Gln/Q、Ser/S、Glu/E、Thr/T、Gly/G、Trp/W、His/H、Tyr/Y、Ile/I、Val/Vと表されるように、アミノ酸は1文字コードまたは3文字コード、またはその両方で表記されている。特定の位置にあるアミノ酸を表現するとき、特定の位置を表す数字とアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードを併記した表現が適宜使用され得る。例えば、単ドメイン抗体に含まれるアミノ酸である37Vというアミノ酸は、Kabatナンバリングで表される37位の位置にあるValを表す。

[0029] 抗体などのポリペプチドのアミノ酸配列中のアミノ酸の改変のためには、部位特異的変異誘発法（Kunkelら（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1985) 82, 488-492））やOverlap extension PCR等の公知の方法が適宜採用され得る。また、天然のアミノ酸以外のアミノ酸に置換するアミノ酸の改変方法として、複数の公知の方法もまた採用され得る（Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. (2006) 35, 225-249、Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2003) 100 (11), 6353-6357）。例えば、終止コドンの1つであるUAGコドン（アンバーコドン）の相補的アンバーサプレッサー tRNA に非天然アミノ酸が結合された tRNA が含まれる無細胞翻訳系システム（Clover Direct (Protein Express)）等も好適に用いられる。本明細書においては、改変として置換が挙げられるがこれに限定されない。

[0030] 本明細書において、アミノ酸の改変位置を表す際に用いられる「および／または」の用語の意義は、「および」と「または」が適宜組み合わせられたあらゆる組合せを含む。具体的には、例えば「37番、45番、および／または47番のアミノ酸が置換されている」とは以下のアミノ酸の改変位置のバリエーションが含まれる；（a）37番、（b）45番、（c）47番、（d）37番および45番、（e）37番および47番、（f）45番および47番、（g）37番および45番および47番。

[0031] 本明細書において、また、アミノ酸の改変を表す表現として、特定の位置

を表す数字の前後に改変前と改変後のアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードを併記した表現が適宜使用され得る。例えば、抗体可変領域または単ドメイン抗体に含まれるアミノ酸の置換を加える際に用いられるF37VまたはP h e 3 7 V a l という改変は、K a b a tナンバリングで表される37位のP h eのV a lへの置換を表す。すなわち、数字はK a b a tナンバリングで表されるアミノ酸の位置を表し、その前に記載されるアミノ酸の1文字コード又は3文字コードは置換前のアミノ酸、そのあとに記載されるアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードは置換後のアミノ酸を表す。同様に、抗体定常領域に含まれるF c領域にアミノ酸の置換を加える際に用いられるP238AまたはP r o 2 3 8 A l a という改変は、E Uナンバリングで表される238位のP r oのA l aへの置換を表す。すなわち、数字はE Uナンバリングで表されるアミノ酸の位置を表し、その前に記載されるアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードは置換前のアミノ酸、そのあとに記載されるアミノ酸の1文字コードまたは3文字コードは置換後のアミノ酸を表す。

[0032] 本明細書で用語「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の抗原結合活性を示す限りは、それだけに限定されるものではないが、モノクローナル抗体、ポリクローナル抗体、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、単ドメイン抗体、および抗体断片を含む、種々の抗体構造を包含する。

[0033] 本発明において「多重特異性抗原結合分子」とは、異なる多種の抗原、具体的には多種の抗原に含まれる多種のエピトープと特異的に結合し得る分子を言う。つまり、多重特異性抗原結合分子は少なくとも2種類の異なるエピトープに対して特異性を有する分子であり、異なる抗原に結合する分子のほか、同一の抗原上の異なるエピトープに結合する分子も含まれる。多重特異性抗原結合分子は二重特異性抗原結合分子を包含する概念であり、その例として、多重特異性抗体、二重特異性抗体などが挙げられる。二重特異性抗体（b i s p e c i f i c抗体）は、このような分子は2個の抗原と結合するものであるが、多重特異性抗体は、2個の抗原、またはそれ以上の（例えば

、3種類の) 抗原に対して特異性を有していてもよい。二重特異性抗体および多重特異性抗体は、全長抗体としてまたは抗体断片を含む分子として調製され得る。

[0034] 「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、それだけ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体を含む。

[0035] 用語「全長抗体」は、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] 本明細書で用語「ホモ抗体」は、単一抗原に結合する抗体であり、軽鎖、重鎖の二つのポリペプチド鎖が二本ずつある4本鎖構造をもつ抗体をいう。

[0037] 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。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つの相補性決定領域(CDR) 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。

[0038] 本明細書で用いられる用語「相補性決定領域」または「CDR」は、配列において超可変であり、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」)、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CDR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CDR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. Bio

l, 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 al. 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。

[0039] 別段示さない場合は、CDR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。

[0040] 「フレームワーク」または「FR」は、相補性決定領域 (CDR) 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、CDR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。

[0041] 本明細書で用語「定常領域」または「定常ドメイン」は、抗体の可変領域以外の部分を言う。例えば、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り、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、CH1ドメイン、ヒンジ領域、CH2ドメイン、CH3ドメインを含む重鎖定常領域（CH）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。天然型抗体の軽鎖は、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。

[0042] 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。一実施態様において、ヒトIgG1の場合、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。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。

[0043] 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、アルファ、デルタ、イプシロン、ガンマ、およびミューと呼ぶ。

[0044] 本明細書において、「標的抗原認識部位」は目的とする抗原（標的抗原）を認識し標的抗原に特異的に結合することができる抗原結合分子の部位であり、標的抗原結合ドメインと称することもできる。標的抗原認識部位は、目

的とする抗原に結合するかぎりどのような構造の部位であってもよい。そのような部位の例として、それだけに限定するものではないが、例えば、抗体の重鎖可変領域（VH）および抗体の軽鎖可変領域（VL）、単ドメイン抗体（sdAb）、生体内に存在する細胞膜タンパクであるAvimerに含まれる35アミノ酸程度のAドメインと呼ばれるモジュール（国際公開W02004/044011、W02005/040229）、細胞膜に発現する糖タンパク質であるfibronection中のタンパク質に結合するドメインである10Fn3ドメインを含むAdnectin（国際公開W02002/032925）、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束（bundle）を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody（国際公開W01995/001937）、33アミノ酸残基を含むターンと2つの逆並行ヘリックスおよびループのサブユニットが繰り返し積み重なった構造を有するアンキリン反復（ankyrin repeat: AR）の分子表面に露出する領域であるDARPin（Designed Ankyrin Repeat proteins）（国際公開W02002/020565）、好中球セラチナーゼ結合リポカリン（neutrophil gelatinase-associated lipocalin（NGAL））等のリポカリン分子において高度に保存された8つの逆並行ストランドが中央方向にねじれたバレル構造の片側を支える4つのループ領域であるAnticalin等（国際公開W02003/029462）、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体（variable lymphocyte receptor（VLR））のロイシン残基に富んだリピート（leucine-rich-repeat（LRR））モジュールが繰り返し積み重なった馬てい形の構造の内部の並行型シート構造のくぼんだ領域（国際公開W02008/016854）が挙げられる。

- [0045] 本発明の標的抗原認識部位の好適な例として、抗体の重鎖可変領域（VH）および抗体の軽鎖可変領域（VL）が挙げられ、特に好適な例として、免疫受容体認識部位を併せ持つ多重特異性抗体における標的抗原認識部位、例

えば二重特異性抗体における標的抗原認識部位が挙げられる。なお、本発明の抗原結合分子が有する特定の抗原を認識し結合することができる部位を抗原結合ドメインと称する場合がある。例えば、多重特異性抗体は複数の抗原結合ドメインを有し、そのうち、標的抗原を認識し結合することができる抗原結合ドメインは標的抗原結合部位として機能し、免疫受容体を認識し結合することができる抗原結合ドメインは免疫受容体認識部位として機能する。したがって、いずれも多重特異性抗体の標的抗原結合部位および免疫受容体認識部位は、いずれも多重特異性抗体の抗原結合ドメインに該当する。二重特異性抗原結合部位を含むとは二種類の抗原結合ドメインを持つことを言う。

[0046] 本明細書において、「抗原」は抗体などの分子が標的として認識する物質を意味し、本発明において「標的抗原」とは抗原結合分子が標的抗原認識部位を介して結合することができる抗原を意味する。標的抗原は標的抗原認識部位が結合することができるエピトープを含む。本発明において標的抗原は、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であり、その好適な例として、それだけに限定されないが、例えば、標的細胞（例：癌細胞、炎症細胞）の表面に発現する分子や、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、標的細胞を含む組織の間質中に存在する大分子等が挙げられる。以下に示す抗原は、標的抗原の例として挙げることができる。

[0047] 一実施態様では、本発明における標的抗原は、例えば、受容体、腫瘍抗原、MHC抗原、分化抗原等が好適に挙げられる。

[0048] 標的抗原としては下記のような分子：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、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、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、CX3CR1、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、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、EP0、ERCC、E-セレクトリン、ET-1、ファクターIIa、ファクターVII、ファクターVIIIc、ファクターIX、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、FGF3、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、GPR20、GR0、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、ヘパラーゼ、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-12、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、MCA M、MCK-2、MCP、M-CSF、MDC、Mer、METALLOPROTEASES、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、ミューラー管抑制物質、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、ニューロツリン、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、リウマイト因子、RLIP76、RPA2、RSK、S100、SCF/KL、SDF-1、SE RINE、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SM DF、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RI Ib、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、Tmpe、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）、TNFRSF 10C（TRAIL R3 DcR1、LIT、TRID）、TNFRSF10D（TRAIL R4 DcR2、TRUNDD）、 TNFRSF11A（RANK ODF R、TRANCE R）、TNFRSF11B（OPG OCIF、TR1）、TNFRSF 12（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）、TNFRSF1 9L（RELT）、TNFRSF1A（TNF RI CD120a、p55-60）、TNFRSF1B（TNF RII CD12 0b、p75-80）、TNFRSF26（TNFRH3）、TNFRSF3（LTbR TNF RIII、TNFC R）、T NFRSF4（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（DcT RAIL 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）、TN FSF11（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、T ALL1、THANK、TNFSF20）、TNFSF14（LIGHT 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 A po-1リガンド、APT1リガンド)、TNFSF7 (CD27リガンド CD70)、TNFSF8 (CD 30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、TLR 5、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-Cadherin、VE-cadherin-2、VEGFR-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、WNT 1、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7 B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9A、WNT9B、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、X CL1、XCL2、XCR1、XCR1、XEDAR、XIAP、XPD、HMGB1、IgA、A β 、CD81、CD97、CD98、DDR1、DDR2、DKK1、EREG、Hsp90、IL-17/IL-17R、IL-20/IL-20R、酸化LDL、PCSK9、prekallikrein、RON、TMEM16F、SOD1、Chromogranin A、Chromogranin B、tau、VAP1、高分子キニノーゲン、IL-31、IL-31R、Nav1.1、Nav 1.2、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、C 5b、C6、C7、C8、C9、factor B、factor D、factor H、properdin、sclerost in、fibrinogen、fibrin、prothrombin、thrombin、組織因子、factor V、fa ctor Va、factor VII、factor VIIa、factor VIII、factor VIIa、factor I X、factor IXa、factor X、factor Xa、factor XI、factor XIa、factor XII , factor XIIa、factor XIII、factor XIIIa、TFPI、antithrombin III、EPC R、トロンボモデュリン、TAPI、tPA、plasminogen、plasmin、PAI-1、PAI-2 、GPC3、Syndecan-1、Syndecan-2、Syndecan-3、Syndecan-4、LPA、S1Pなら びにホルモンおよび成長因子のための受容体が例示され得る。

- [0049] 上記の標的抗原の例示には受容体も記載されるが、これらの受容体が生体液中に可溶型で存在する場合にも、本発明の標的抗原認識部位が結合する抗原として使用され得る。そのような可溶型受容体の非限定な一態様として、例えば、Mullbergら (J. Immunol. (1994) 152 (10), 4958-4968) によって記載されているような可溶型IL-6Rであるタンパク質が例示され得る。
- [0050] 受容体の例としては、例えば、造血因子受容体ファミリー、サイトカイン受容体ファミリー、チロシンキナーゼ型受容体ファミリー、セリン／スレオニンキナーゼ型受容体ファミリー、TNF受容体ファミリー、Gタンパク質共役型受容体ファミリー、GPIアンカー型受容体ファミリー、チロシンホスファターゼ型受容体ファミリー、接着因子ファミリー、ホルモン受容体ファミリー、等の受容体ファミリーに属する受容体などを挙げることができる。これら受容体ファミリーに属する受容体、及びその特徴に関しては、多数の文献、例えば、Cooke BA., King RJB., van der Molen HJ. ed. New Comprehensive Biochemistry Vol.18B Hormones and their Actions Part II pp.1-46 (1988) Elsevier Science Publishers BV.、又は、宮坂昌之監修、細胞工学別冊ハンドブックシリーズ「接着因子ハンドブック」(1994) (秀潤社、東京、日本) 等のレビューの他、Patthy (Cell (1990) 61 (1), 13-14)、Ullrichら (Cell (1990) 61 (2), 203-212)、Massague (eにはアキュート・アクセント記号が付く) (Cell (1992) 69 (6), 1067-1070)、Miyajimaら (Annu. Rev. Immunol. (1992) 10, 295-331)、Tagaら (FASEB J. (1992) 6, 3387-3396)、Fantlら (Annu. Rev. Biochem. (1993), 62, 453-481)、Smithら (Cell (1994) 76 (6) 959-962)、Flower DR. Biochim. Biophys. Acta, Flower (Biochim. Biophys. Acta (1999) 1422 (3) 207-234等に記載されている。
- [0051] 上記受容体ファミリーに属する具体的な受容体としては、例えば、ヒト又はマウスエリスロポエチン (EP0) 受容体 (Blood (1990) 76 (1), 31-35、Cell (1989) 57 (2), 277-285)、ヒト又はマウス顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) 受容体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1990) 87 (22), 8702-8706、mG-CSFR、Cell (1990) 61 (2), 341-350)、ヒト又はマウストロンボポイエチ

ン (TP0) 受容体 (Proc Natl Acad Sci U S A. (1992) 89 (12), 5640-5644、EMBO J. (1993) 12(7), 2645-53)、ヒト又はマウスインスリン受容体 (Nature (1985) 313 (6005), 756-761)、ヒト又はマウスFlt-3リガンド受容体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1994) 91 (2), 459-463)、ヒト又はマウス血小板由来増殖因子 (PDGF) 受容体 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA. (1988) 85 (10) 3435-3439)、ヒト又はマウスインターフェロン (IFN) -アルファ、ベータ受容体 (Cell (1990) 60 (2), 225-234. 及びCell (1994) 77 (3), 391-400)、ヒト又はマウスレプチン受容体、ヒト又はマウス成長ホルモン (GH) 受容体、ヒト又はマウスインターロイキン (IL) -10受容体、ヒト又はマウスインスリン様増殖因子 (IGF) -I受容体、ヒト又はマウス白血病抑制因子 (LIF) 受容体、ヒト又はマウス毛様体神経栄養因子 (CNTF) 受容体等が好適に例示される。

[0052] 上記の標的抗原の例示には、細胞膜に発現する膜型分子、および細胞から細胞外に分泌される可溶型分子が含まれる。本発明の抗原結合ドメインが細胞から分泌された可溶型分子に結合する場合、当該抗原結合ドメインとしては中和活性を有していることが好適である。

[0053] 可溶型分子が存在する溶液に限定はなく生体液、すなわち生体内の脈管又は組織・細胞の間を満たす全ての液体に本可溶型分子は存在し得る。非限定な一態様では、本発明の標的抗原認識部位が結合する可溶型分子は、細胞外液に存在することができる。細胞外液とは、脊椎動物では血漿、組織間液、リンパ液、密な結合組織、脳脊髄液、髄液、穿刺液、または関節液等の骨および軟骨中の成分、肺胞液（気管支肺胞洗浄液）、腹水、胸水、心嚢水、嚢胞液、または眼房水（房水）等の細胞透過液（細胞の能動輸送・分泌活動の結果生じた各種腺腔内の液、および消化管腔その他の体腔内液）の総称をいう。

[0054] 用語「腫瘍抗原」は、がん細胞に発現する抗原をいい、その発現が細胞の悪性変化に関連して認識されるようになる、抗原性を有する生体分子を意味する。腫瘍抗原には、腫瘍特異的抗原（腫瘍細胞のみに存在し、他の正常細

胞には見られない抗原)、および腫瘍関連抗原(他の器官および組織もしくは異種および同種異系の正常細胞にも存在する抗原、または発生および／もしくは分化の際に発現される抗原)が含まれる。又、細胞が癌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も腫瘍抗原であり、癌糖鎖抗原とも呼ばれる。本発明の一つの態様において、標的抗原は腫瘍抗原である。

[0055] 腫瘍抗原の例としては、例えば、上記の受容体としてGPIアンカー型受容体ファミリーに属するが肝癌を初めとする幾つかの癌において発現しているGPC3 (Int J Cancer, (2003) 103 (4), 455-65)、肺癌を初めとする複数の癌で発現するEpCAM (Proc Natl Acad Sci U S A, (1989) 86 (1), 27-31) (そのポリヌクレオチド配列はRefSeq登録番号NM_002354.2に、ポリペプチド配列はRefSeq登録番号NP_002345.2にそれぞれ記載されている。)、EGFR、CA19-9、CA15-3、シリアルSSEA-1 (SLX)、Her2、Her3、前立腺幹細胞抗原 (PSCA)、アルファフェトプロテイン (AFP)、癌胎児性抗原 (CEA)、腫瘍抗原-125 (CA-125)、カルレチニン、MUC-1、MUC-16、上皮性膜タンパク質 (EMA)、上皮性腫瘍抗原 (ETA)、チロシナーゼ、メラノーマ関連抗原 (MAGE)、クロモグラニン、サイトケラチン、デスミン、グリア線維酸性タンパク質 (GFAP)、肉眼的嚢胞性疾患液体タンパク質 (gross cystic disease fluid protein) (GCDFP-15)、HMB-45抗原、タンパク質メラニン-A (Tリンパ球に認識されるメラノーマ抗原; MART-1)、myo-D1、筋特異的アクチン (MSA)、ニューロフィラメント、神経特異的エノラーゼ (NSE)、胎盤アルカリホスファターゼ、シナプトファイシス、チログロブリン、甲状腺転写因子-1、ピルビン酸キナーゼイソ酵素タイプM2の二量体形 (腫瘍M2-PK)、GD2 (ガングリオシドG2)、EGFRvIII (表皮性成長因子バリエーションIII)、精子タンパク質17 (Sp17)、メソセリン、PAP (前立腺酸性ホスファターゼ)、プロステイン、TARP (T細胞受容体ガンマオルターネイトリーディングフレームタンパク質)、Trp-p8、STEAP1 (プロステイト1の6回膜貫通型上皮性抗原)、TROP-2、クローディン6、RNF43a、異常rasタンパク質、又は異常p53タンパク質、インテグリン

アルファvベータ3 (CD61)、ガレクチン、K-Ras (V-Ki-ras2キルステンラット肉腫ウイルス癌遺伝子)、又はRal-B等が好適に挙げられる。

[0056] さらに、腫瘍抗原の例としては、例えば、甲状腺刺激ホルモン受容体(TSHR); CD171; CS-1(CD2サブセット1、CRACC、SLAMF7、CD319および19A24); C型レクチン様分子-1(CLL-1); ガングリオシドGD3(aNeu5Ac(2-8)aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); Tn抗原(TnAg); T抗原(TAg); Fms様チロシンキナーゼ3(FLT3); CD38; CD44v6; B7H3(CD276); KIT(CD117); インターロイキン-13受容体サブユニットアルファ-2(IL-13Ra2); インターロイキン11受容体アルファ(IL-11Ra); インターロイキン2受容体アルファ(IL-2Ra); 前立腺幹細胞抗原(PSCA); プロテアーゼセリン21(PRSS21); 血管内皮細胞増殖因子受容体2(VEGFR2); ルイス(Y)抗原; CD24; 血小板由来増殖因子受容体ベータ(PDGFR-ベータ); ステージ特異的胚性抗原-4(SEEA-4); 神経細胞接着分子(NCAM); 炭酸脱水酵素IX(CAIX); プロテアソーム(プロソーム、マクロパイン)サブユニット、ベータ型、9(LMP2); エフリンA型受容体2(EphA2); フコシルGM1; シアリルルイス接着分子(sLe); ガングリオシドGM3(aNeu5Ac(2-3)bDGalp(1-4)bDGlc(1-1)Cer); TGS5; 高分子量黒色腫関連抗原(HMWMAA); o-アセチル-GD2ガングリオシド(OAcGD2); 葉酸受容体ベータ; 腫瘍内皮マーカー1(TEM1/CD248); 腫瘍内皮マーカー7関連(TEM7R); クローディン6(CLDN6); Gタンパク質共役受容体クラスCグループ5、メンバーD(GPRC5D); 染色体Xオープンリーディングフレーム61(CXORF61); CD97; CD179a; 未分化リンパ腫キナーゼ(ALK); ポリシアル酸; 胎盤特異的1(PLAC1); globoHグリコセラミド(GloboH)の六糖部分; 乳腺分化抗原(NY-BR-1); ウロプラキン2(UPK2); A型肝炎ウイルス細胞性受容体1(HAVCR1); アドレナリン受容体ベ

ータ3 (ADRB3); パンネキシン3 (PANX3); Gタンパク質共役受容体20 (GPR20); リンパ球抗原6複合体、座位K9 (LY6K); 嗅覚受容体51E2 (OR51E2); TCRガンマ選択的リーディングフレームタンパク質 (TARP); ウィルムス腫瘍タンパク質 (WT1); 染色体12pに位置するETS転座変異体遺伝子6 (ETV6-AML); 精子タンパク質17 (SPA17); X抗原ファミリー、メンバー1A (XAGE1); アンギオポエチン結合細胞表面受容体2 (Tie2); 黒色腫瘍精巣抗原-1 (MAD-C1); 黒色腫瘍精巣抗原-2 (MAD-C2); Fos関連抗原1; p53変異体; ヒトテロメラーゼ逆転写酵素 (hTERT); 肉腫転座切断点; アポトーシスの黒色腫阻害剤 (ML-1AP); ERG (膜貫通型プロテアーゼ、セリン2 (TMPRSS2) ETS融合遺伝子); N-アセチルグルコサミニルトランスフェラーゼV (NA17); ペアードボックスタンパク質 Pax-3 (PAX3); アンドロゲン受容体; サイクリンB1; v-mycトリ骨髄細胞腫ウイルス癌遺伝子神経芽腫由来ホモログ (MYCN); RasホモログファミリーメンバーC (RhoC); チトクロムP450 1B1 (CYP1B1); CCCTC結合因子 (亜鉛フィンガータンパク質) 様 (BORIS); T細胞3により認識される扁平上皮細胞腫瘍抗原 (SART3); ペアードボックスタンパク質 Pax-5 (PAX5); プロアクロシン結合タンパク質 p32 (OY-TES1); リンパ球特異的タンパク質チロシンキナーゼ (LCK); Aキナーゼアンカータンパク質4 (AKAP-4); 滑膜肉腫、X切断点2 (SSX2); CD79a; CD79b; CD72; 白血球関連免疫グロブリン様受容体1 (LAIR1); IgA受容体のFcフラグメント (FCAR); 白血球免疫グロブリン様受容体サブファミリーAメンバー2 (LILRA2); CD300分子様ファミリーメンバーf (CD300LF); C型レクチンドメインファミリー12メンバーA (CLEC12A); 骨髄間質細胞抗原2 (BST2); EGF様モジュール含有ムチン様ホルモン受容体様2 (EMR2); リンパ球抗原75 (LY75); グリピカン-3 (GPC3); Fc受容体様5 (FCRL5); および免疫グロブリンラムダ様ポリペプチド1 (IGLL1)

)等も挙げられる。

[0057] 「MHC抗原」は、主要組織適合遺伝子複合体（MHC）の遺伝子産物であり、そのうち、細胞膜に発現される糖タンパク質は主にMHC class I抗原とMHC class II抗原に分類される。MHC class I抗原には、HLA-A、-B、-C、-E、-F、-G、-Hが含まれ、MHC class II抗原には、HLA-DR、-DQ、-DPが含まれる。また、これらのMHC抗原に提示される腫瘍抗原由来ペプチドも含まれる。GP100、MART-1、MAGE-1、MAGE-A4、NY-ESO-1などの腫瘍抗原、あるいは、RASやp53などの変異部分を提示したMHCとの複合体についても、腫瘍抗原の一つとしてとらえられる。

[0058] 「分化抗原」とは、マクロファージ、T細胞、B細胞などが骨髄幹細胞からの分化に伴って消長する細胞表面分子の総称である。分化抗原には、CD1、CD2、CD4、CD5、CD6、CD7、CD8、CD10、CD11a、CD11b、CD11c、CD13、CD14、CD15s、CD16、CD18、CD19、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD27、CD28、CD29、CD30、CD32、CD33、CD34、CD35、CD38、CD40、CD41a、CD41b、CD42a、CD42b、CD43、CD44、CD45、CD45RO、CD48、CD49a、CD49b、CD49c、CD49d、CD49e、CD49f、CD51、CD54、CD55、CD56、CD57、CD58、CD61、CD62E、CD62L、CD62P、CD64、CD69、CD70、CD71、CD73、CD95、CD99、CD102、CD106、CD117、CD122、CD126、CDw130が含まれ得る。

[0059] 用語「腫瘍」は、一般に、組織、細胞が生体内の制御に反して自律的に過剰に増殖することによってできる組織塊を総称する。腫瘍には自律性増殖、浸潤と転移、悪液質の3つの特徴を有する悪性と、自律性増殖のみを特徴とする良性があり、悪性腫瘍である「がん」は、異常な細胞の制御不能な成長を特徴とする疾患を指す。がん細胞は、局所的に、または血流およびリンパ系を介して体の他の部分に蔓延する可能性がある。様々ながんの例が本開示で説明されており、これらに限定されないが、乳がん、前立腺がん、卵巣がん、子宮頸がん、皮膚がん、膵臓がん、結腸直腸がん、腎臓がん、肝臓がん、脳がん、リンパ腫、白血病、肺がんおよび同種のものが挙げられる。用語「腫瘍」および「がん」は、本開示において同義的に使用され、例えば、ど

これらの用語も、固体および液性、例えば、びまん性または循環性の腫瘍を含む。用語「がん」または「腫瘍」は、本開示で使用される場合、前がん性の、同様に悪性のがんおよび腫瘍を含む。

[0060] 本開示の抗がん剤や、後述するがんの治療方法におけるがんとしては、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、未分化がん、大細胞がん、小細胞がん、皮膚がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、子宮がん、肝臓がん、腎臓がん、膵臓がん、脾臓がん、肺がん、気管がん、気管支がん、結腸直腸がん、小腸がん、胃がん、食道がん、胆嚢がん、精巣がん、卵巣がんなどのがんや、骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがんのほか、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫などの肉腫や、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、網膜芽腫などの芽腫や、胚細胞腫瘍や、リンパ腫や、白血病を挙げることができる。

[0061] 一実施態様において、がん種との関連において腫瘍抗原は、正常細胞とがん細胞の両方によって発現されるマーカー、例えば系統マーカー、例えば、B細胞上のCD19である。ある特定の態様において、本開示の腫瘍抗原は、原発性または転移性黒色腫、胸腺腫、リンパ腫、肉腫、肺がん、結腸直腸がん、肝臓がん、非ホジキンリンパ腫、ホジキンリンパ腫、白血病、子宮がん、子宮頸がん、膀胱がん、腎臓がん、および腺癌、例えば乳がん、前立腺がん、卵巣がん、膵臓がんおよび同種のを包含するがこれらに限定されない、がん由来する。一実施態様において、腫瘍抗原は、特定の増殖性障害に共通である抗原である。一実施態様において、がん関連抗原は、正常細胞と比較してがん細胞において過剰発現される、例えば、正常細胞と比較して、1倍の発現、2倍の過剰発現、3倍の過剰発現またはそれ以上である細胞表面分子である。一部の実施態様において、がん関連抗原は、がん細胞において不適切に合成される細胞表面分子、例えば、正常細胞で発現された分子と比較して欠失、付加または突然変異を含有する分子である。一実施態様において、がん関連抗原は、全体が、またはフラグメント（例えば、MHC

／ペプチド)として、排他的にがん細胞の細胞表面で発現され、正常細胞の表面では合成も発現もされない。通常、内因性タンパク質由来のペプチドは、主要組織適合複合体(MHC)クラスⅠ分子のポケットを満たし、CD8⁺ Tリンパ球上のT細胞受容体(TCR)によって認識される。MHCクラスⅠ複合体は、全ての有核細胞によって構成的に発現される。がんにおいて、ウイルス特異的および／または腫瘍特異的ペプチド／MHC複合体は、免疫療法のための細胞表面標的の特有なクラスの代表である。ヒト白血球抗原(HLA)－A1またはHLA－A2の状況においてウイルスまたは腫瘍抗原由来のペプチドを標的とするTCR様抗体が、説明されている[例えば、Sas try et al., J Virol. 2011 85(5):1935-1942; Sergeeva et al., Bood, 2011 117(16):4262-4272; Verma et al., J Immunol 2010 184(4):2156-2165; Wil lmsen et al., Gene Ther 2001 8(21):1601-1608; Dao et al., Sci Trans l Med 2013 5(176):176ra33; Tassev et al., Cancer Gene Ther 2012 19(2):84-100を参照されたい]。例えば、TCR様抗体は、ヒト s c F v ファージ 提示型ライブラリなどのライブラリをスクリーニングすることにより同定することができる。

[0062] 本開示の抗原結合分子が結合する抗原の例としては、ウイルス抗原、細菌(特に、感染性細菌)抗原、寄生虫抗原、特定の病態に関連する標的細胞上の細胞表面マーカー(例えば、腫瘍抗原)、および自己免疫を生じる免疫細胞の表面分子が含まれる。

[0063] 本開示は、一側面において、レトロウイルス科(例えば、ヒト免疫不全ウイルス、例えば、HIV－1およびHIV－LP)、ピコルナウイルス科(例えば、ポリオウイルス、A型肝炎ウイルス、エンテロウイルス、ヒトコクサッキーウイルス、ライノウイルス、およびエコーウイルス)、風疹ウイルス、コロナウイルス、水疱性口内炎ウイルス、狂犬病ウイルス、エボラウイルス、パラインフルエンザウイルス、流行性耳下腺炎ウイルス、麻疹ウイルス、呼吸器合胞体ウイルス、インフルエンザウイルス、B型肝炎ウイルス、パルボウイルス、アデノウイルス科、ヘルペスウイルス科[例えば、1型お

よび2型単純ヘルペスウイルス(HSV)、水痘-帯状疱疹ウイルス、サイトメガロウイルス(CMV)、およびヘルペスウイルス]、ポックスウイルス科(例えば、痘瘡ウイルス、ワクシニアウイルス、およびポックスウイルス)、またはC型肝炎ウイルスに由来する抗原と抗原結合分子を介して結合し得るキメラ受容体を提供する。

[0064] 本開示は、別の側面において、ブドウ球菌属(*Staphylococci*)、連鎖球菌属(*Streptococcus*)、大腸菌(*Escherichia coli*)、シュードモナス(*Pseudomonas*)、またはサルモネラ菌属(*Salmonella*)の菌株に由来する抗原と抗原結合分子を介して結合し得るキメラ受容体を提供する。特に、本開示は、感染性細菌、例えば、ピロリ菌(*Helicobacter pylori*)、レジオネラ・ニューモフィラ(*Legionella pneumophila*)、マイコバクテリア種の菌株(例えば、結核菌(*M. tuberculosis*)、鳥結核菌(*M. avium*)、*M. イントラセルラーレ*(*M. intracellulare*)、*M. カンサシー*(*M. kansasii*)、または*M. ゴルドネ*(*M. goodii*)、黄色ブドウ球菌(*Staphylococcus aureus*)、淋菌(*Neisseria gonorrhoeae*)、髄膜炎菌(*Neisseria meningitidis*)、リステリア菌(*Listeria monocytogenes*)、化膿連鎖球菌(*Streptococcus pyogenes*)、A群連鎖球菌属、B群連鎖球菌属(ストレプトコッカス・アガラクティエ(*Streptococcus agalactiae*)、肺炎連鎖球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、または破傷風菌(*Clostridium tetani*))に由来する抗原と、抗原結合分子を介して結合し得るキメラ受容体を提供する。

[0065] 本開示は、別の側面において、抗原結合分子は、5T4、アルファ5ベータ1-インテグリン、707-AP、AFP、ART-4、B7H4、B7H3、BAGE、ベーターカテニン/m、Bcr-abl、MN/CIX抗体、CA125、CAMEL、CAP-1、CASP-8、CD4、CD19、CD20、CD22、CD25、CDC27/m、CD30、CD33、CD52、CD56、CD80、CDK4/m、CEA、CT、Cyp-B、DAM、EGFR、Erbb3、ELF2M、EMMPRIN、EpCam、ETV6-AML1、G250、GAGE、GnT-V、Gp100

O、Gpc3、Gpr20、HAGE、HER-2/neu、HLA-A*0201-R1701、HPV-E7、HSP70-2M、HST-2、hTERT（またはhTRT）、iCE、IGF-1R、IL-2R、IL-5、KIAA0205、LAGE、LDLR/FUT、MAGE、MART-1/melan-A、MART-2/Ski、MC1R、ミオシン/m、MUC1、MUC-16、MUM-1、MUM-2、MUM-3、NA88-A、PAP、プロテイナーゼ-3、p190 minor bcr-abl、Pml/RARアルファ、PRAME、PSA、PSM、PSMA、RAGE、RU1またはRU2、SAGE、SART-1またはSART-3、サバイビン、TEL/AML1、TGFベータ、TPI/m、Trop-2、TRP-1、TRP-2、TRP-2/INT2、VEGF、WT1、NY-Eso-1またはNY-Eso-Bなどの腫瘍抗原と結合し得る。本開示において当該抗体はまた、細胞表面接着分子、自己免疫疾患に見られる炎症性細胞の表面分子、または自己免疫を生じるTCRと結合し得る。

[0066] 本明細書において、「免疫受容体認識部位」は目的とする免疫受容体を認識し免疫受容体に特異的に結合することができる抗原結合分子の部位であり、免疫受容体結合ドメインと称することもできる。免疫受容体認識部位は、目的とする免疫受容体に結合するかぎりどのような構造の部位であってもよい。そのような部位の例として、それだけに限定するものではないが、例えば、免疫受容体を抗原として認識する抗体の重鎖可変領域（VH）および抗体の軽鎖可変領域（VL）、単ドメイン抗体（sdAb）、生体内に存在する細胞膜タンパクであるAvimerに含まれる35アミノ酸程度のAドメインと呼ばれるモジュール（国際公開W02004/044011、W02005/040229）、細胞膜に発現する糖タンパク質であるfibronectin中のタンパク質に結合するドメインである10Fn3ドメインを含むAdnectin（国際公開W02002/032925）、ProteinAの58アミノ酸からなる3つのヘリックスの束（bundle）を構成するIgG結合ドメインをscaffoldとするAffibody（国際公開W01995/001937）、33アミノ酸残基を含むターンと2つの逆並行ヘリックスおよびループのサブユニットが繰り返し積み重な

った構造を有するアンキリン反復 (ankyrin repeat : AR) の分子表面に露出する領域であるDARPs (Designed Ankyrin Repeat proteins) (国際公開W02002/020565)、好中球ゲラチナーゼ結合リポカリン (neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL)) 等のリポカリン分子において高度に保存された8つの逆並行ストランドが中央方向にねじれたバレル構造の片側を支える4つのループ領域であるAnticalin等 (国際公開W02003/029462)、ヤツメウナギ、ヌタウナギなど無顎類の獲得免疫システムとしてイムノグロブリンの構造を有さない可変性リンパ球受容体 (variable lymphocyte receptor (VLR)) のロイシン残基に富んだリピート (leucine-rich-repeat (LRR)) モジュールが繰り返り積み重なった馬てい形の構造の内部の並行型シート構造のくぼんだ領域 (国際公開W02008/016854) が挙げられる。

[0067] 本発明の免疫受容体認識部位の好適な例として、免疫受容体を抗原として認識する抗体の重鎖可変領域 (VH) および抗体の軽鎖可変領域 (VL) が挙げられ、特に好適な例として、標的抗原認識部位を併せ持つ多重特異性抗体における免疫受容体認識部位、例えば二重特異性抗体における免疫受容体認識部位が挙げられる。なお、本発明の抗原結合分子が有する特定の免疫受容体を認識し結合することができる部位が免疫受容体を抗原として認識する抗体の一部である場合、免疫受容体認識部位を抗原結合ドメインと称する場合がある。例えば、多重特異性抗体は複数の抗原結合ドメインを有し、そのうち、標的抗原を認識し結合することができる抗原結合ドメインは標的抗原結合部位として機能し、免疫受容体を認識し結合することができる抗原結合ドメインは免疫受容体認識部位として機能する。したがって、いずれも多重特異性抗体の標的抗原結合部位および免疫受容体認識部位は、いずれも多重特異性抗体の抗原結合ドメインに該当する。

[0068] 抗原結合分子が認識する免疫受容体の例としては、T細胞上の免疫受容体、およびナチュラルキラー(NK)細胞上の免疫受容体が挙げられる。その具体的な例としては、TIGIT、PD-1、PD-L1、TIM-3、LAG-3、BTLA、CD268、CD267、CD266、CD226、CD160、CD137、CD96、CD70、CD47、CD40、CD30、CD28、CD27、

CD18, NKG2D, VISTA, ICOS, B7-HE, GITR, OX40, KIR, SLAMF7, CTLA-4, RANK, オステオプロテゲリン, BCMA, TNFR1, TNFR2, Fas, DR1, DR2, DR3, DR4, DR5, DR6, HVEM, NGFR, EDA2R, TR6, TROYなどが挙げられる。

[0069] 一つの態様において、抗原結合分子の免疫受容体認識部位は、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー（TNFRSF）に属する共刺激分子に対するアゴニスト抗体（以下、TNFRSFのアゴニスト抗体と称する）またはその抗原結合断片を用いることができる。TNFRSFのアゴニスト抗体は、100%の活性化が、等モル量の結合パートナーにより生理学的条件下で達成される活性化レベルである場合に、TNF受容体スーパーファミリーを発現する細胞、組織または生体に付加されると、該TNF受容体スーパーファミリーを発現する細胞を少なくとも約5%、具体的には少なくとも約10%、より具体的には少なくとも約15%活性化する抗体を意味する。種々の具体例において、本発明の医薬組成物として使用するTNFRSFのアゴニスト抗体は、該細胞の活性を、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%、1000%またはそれ以上活性化させることができる。本発明の1つの態様において、抗原結合分子の免疫受容体認識部位は、内因性の免疫受容体にアゴニストとして結合し、かつ本発明のキメラ受容体に対してもアゴニストとして結合する。

[0070] TNFRSFのアゴニスト抗体の標的分子としては、TNF受容体スーパーファミリーを発現する細胞（例えば、T細胞やNK細胞など）を活性化する因子である限り特に制限されない。好ましい因子としては、例えばCD137、CD40が挙げられる。さらに好ましい因子としては、例えばCD137が挙げられる。例えば、CD137アゴニスト抗体の例としては、Urelumab（CAS登録番号：934823-49-1）や種々の公知のCD137アゴニスト抗体を挙げることができる。

[0071] CD137アゴニスト抗体の例として、例えばWO2015/15626

8に記載の配列番号などで示される以下の抗体が挙げられる：

[1] 重鎖可変領域として配列番号66に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号85に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[2] 重鎖可変領域として配列番号67に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号86に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[3] 重鎖可変領域として配列番号70に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号89に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[4] 重鎖可変領域として配列番号76に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号95に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[5] 重鎖可変領域として配列番号77に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号96に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[6] 重鎖可変領域として配列番号78に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号97に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[7] [1]～[6]いずれかに記載の抗体であって、重鎖定常領域として配列番号99に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖定常領域として配列番号59に記載のアミノ酸配列又は配列番号60に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[8] [1]～[7]いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体；

[9] [1]～[7]いずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

[0072] 上記[8]に記載の抗体において、「同等の活性」とは、CD137へのアゴニスト活性が上記[1]～[7]いずれかに記載の抗体の結合活性の70%以上、好ましくは80%以上、より好ましくは90%以上であること、をいう。

[0073] また本発明は、上記[9]に記載の、本発明で開示された抗CD137抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体もまた提供する。このような抗体は、例えば、以下の方法により得ることができる。

[0074] 上記[1]から[7]いずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体の好ましい例として、例えば、CD137タンパク質中のSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQEL

TKKGCの配列(WO 2 0 1 5 / 1 5 6 2 6 8に記載の配列番号 1 5)を有する領域を認識する抗体を挙げることができる。さらには、CD 1 3 7 タンパク質中のDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCの配列(WO 2 0 1 5 / 1 5 6 2 6 8に記載の配列番号 1 6)を有する領域を認識する抗体を挙げることができる。

[0075] 上述した抗ヒトCD 1 3 7抗体を腫瘍特異的抗原抗体(例えば、抗ヒトGPC 3抗体)との二重特異性抗体へ改変し、腫瘍特異的抗原依存的CD 1 3 7アゴニスト能を評価することで、所望の効果を発揮する抗腫瘍抗原/抗ヒトCD 1 3 7二重特異性抗体を提供することができ、当該抗体は本発明の抗原結合分子として使用することができる。

[0076] 抗原中に存在する抗原決定基を意味するエピトープは、本明細書において開示される抗原結合分子が結合する抗原(標的抗原または免疫受容体)上の部位を意味する。よって、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。

[0077] 線状エピトープは、アミノ酸一次配列が認識されたエピトープを含むエピトープである。線状エピトープは、典型的には、少なくとも3つ、および最も普通には少なくとも5つ、例えば約8ないし約10個、6ないし20個のアミノ酸が固有の配列において含まれる。

[0078] 立体エピトープは、線状エピトープとは対照的に、エピトープを含むアミノ酸の一次配列が、認識されたエピトープの単一の規定成分ではないエピトープ(例えば、アミノ酸の一次配列が、必ずしもエピトープを規定する抗体により認識されないエピトープ)である。立体エピトープは、線状エピトープに対して増大した数のアミノ酸を包含するかもしれない。立体エピトープの認識に関して、抗原結合分子の標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位は、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、例えば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。

- [0079] 標的抗原または免疫受容体のエピトープに結合する抗原結合分子の標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位の構造はパラトープと呼ばれる。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。複数の抗原と複数の抗原結合ドメイン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。複数の抗原結合ドメインを含む (すなわち多価の) 抗体等が複数のエピトープに結合する際には、結合力 (affinity) 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。
- [0080] 特定の実施態様において、本明細書で提供される抗原結合分子は、 $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ または $\leq 0.001\text{nM}$ (例えば、 10^{-8} ($1 \text{ E} - 08$) M以下、例えば 10^{-8} ($1 \text{ E} - 08$) M $\sim 10^{-13}$ ($1 \text{ E} - 13$) M、例えば 10^{-9} ($1 \text{ E} - 09$) M $\sim 10^{-13}$ ($1 \text{ E} - 13$) M) の解離定数 (Kd) を有する。
- [0081] 以下に抗原に対する抗原結合ドメイン、または標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位としての抗原結合ドメインを含む抗原結合分子によるエピトープへの結合の確認方法が以下の例示に準じて適宜実施され得る。
- [0082] 例えば、抗原が細胞表面に発現する受容体の場合にその抗原に対する抗原結合ドメインが、ある抗原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ある抗原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、ある抗原の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、ある抗原に対する抗原結合ドメイン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ドメインの結合活性が評価され得る。あるいは、ある抗原発現細胞に対する当該抗原結合ドメインの結合における、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ドメインの結合活性が明らかにされ得る。

[0083] また、標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位が立体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。標的抗原または免疫受容体を発現する細胞が調製される。標的抗原または免疫受容体に対する標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位がある前記細胞に接触した際に当該細胞に強く結合する一方で、前記認識部位が、固定化されたある標的抗原または免疫受容体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、またはグアニジン等の一般的な変性剤を用いて変性させられたある標的抗原または免疫受容体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、後者の結合活性が、標的抗原または免疫受容体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%以下の場合をいう。

[0084] また、抗原結合分子の標的抗原または免疫受容体に対する結合活性を確認する方法として、例えば、放射性標識抗原結合測定法 (radiolabeled antigen binding assay: RIA) によってK_d値を測定する方法がある。一実施態様において、RIAは、抗原結合分子および標的抗原または免疫受容体またはそれらの断片を用いて実施される。例えば、抗原結合分子の溶液中結合アフィ

ニティは、非標識抗原の漸増量系列の存在下で最小濃度の（1251）標識抗原により抗原結合ドメインを平衡化させ、次いで結合した抗原を抗原結合ドメインでコーティングされたプレートにより捕捉することによって測定される（例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881(1999) を参照のこと）。

[0085] 別の実施態様によれば、 K_d は、B I A C O R E（登録商標）を用いた表面プラズモン共鳴法で測定される。例えば、B I A C O R E（登録商標）－2000またはB I A C O R E（登録商標）－3000（BIAcore, Inc., Piscataway, NJ）を用いる測定法が、およそ10反応単位（response unit: RU）の抗原が固定されたCM5チップを用いて25℃で実施される。一実施態様において、カルボキシメチル化デキストランバイオセンサーチップ（CM5、BIAcore, Inc.）は、供給元の指示にしたがいN-エチル-N'-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミドヒドロクロリド（EDC）およびN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）を用いて活性化される。抗原は、およそ10反応単位（RU）のタンパク質の結合を達成するよう、5 μ l/分の流速で注入される前に、10mM酢酸ナトリウム、pH4.8を用いて5 μ g/ml（およそ0.2 μ M）に希釈される。抗原の注入後、未反応基をブロックするために1Mエタノールアミンが注入される。キネティクスの測定のために、25℃、およそ25 μ l/分の流速で、0.05%ポリソルベート20（TWEEN-20（登録商標））界面活性剤含有PBS（PBST）中の抗原結合分子（標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位）の2倍段階希釈物（0.78nM～500nM）が注入される。結合速度（ k_{on} ）および解離速度（ k_{off} ）は、単純な1対1ラングミュア結合モデル（BIAcore（登録商標）評価ソフトウェアバージョン3.2）を用いて、結合および解離のセンサーグラムを同時にフィッティングすることによって計算される。平衡解離定数（ K_d ）は、 k_{off}/k_{on} 比として計算される。さらに、平衡法解析を用いることで、見かけの解離定数（ K_d ）を求めることも可能である。これらの方法はBIAcore（登録商標）に付属されているプロトコルを参照する。例えば、Chen et al., J. Mol. Biol. 293:865-881（1999）やMethods Enzymol. 2000;323:325-40.を参照のこと。

また、表面プラズモン共鳴アッセイにおいて、固相化するタンパク質量や反応に用いるタンパク質量、温度、溶液組成は当業者であればいかようにも変えられる。上記の表面プラズモン共鳴アッセイによってオン速度が $10^6 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ を超える場合、オン速度は、分光計（例えばストップフロー式分光光度計（Avi v Instruments）または攪拌キュベットを用いる8000シリーズのSLM-AMINCO（商標）分光光度計（ThermoSpectronic））において測定される、漸増濃度の抗原の存在下でのPBS、pH7.2中20nMの抗原結合ドメインの25℃での蛍光発光強度（励起=295nm；発光=340nm、バンドパス16nm）の増加または減少を測定する蛍光消光技術を用いることによって決定され得る。

[0086] 更に、抗原結合分子の標的抗原または免疫受容体への結合活性は、電気化学発光法等、既知の分子間相互作用の測定方法でも測定し得る。また本明細書に記載されるアッセイにおいて使用される抗原結合分子に代えて、標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位に対応する断片を用いることができ、標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位として、標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位に対応する断片、または抗原結合分子を用いることができる。

[0087] 抗原結合分子の標的抗原または免疫受容体の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。即ち標的抗原または免疫受容体の発現細胞を抗原とするELISAやFACS（fluorescence activated cell sorting）の原理によって評価され得る。

[0088] ELISAフォーマットにおいて、抗原結合分子の結合活性は、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、ある抗原の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、被験抗原結合ドメイン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、ある抗原の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、ある抗原の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。

[0089] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している標的抗原または免疫受容体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)。

[0090] 抗原結合分子の標的抗原または免疫受容体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、ある抗原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、当該抗原結合分子が所望の濃度に調製して用いられる。例えば、 $10\mu\text{g/ml}$ 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、FACSCalibur™ (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原結合分子の結合量は、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。

[0091] ある抗原結合分子が、別の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。

[0092] 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ウェル上にコートしたある標的抗原由来または免疫受容体由来の抗原タンパク質が、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。ウェル中のある抗原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ある抗原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。

[0093] 抗原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。

[0094] 候補の競合抗原結合分子会合体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、ある抗原に対する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。

[0095] 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あるいは

ポリ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。

[0096] 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。

[0097] また、同定されたエピトープが立体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、ある抗原を発現する細胞とエピトープに変異が導入されたある抗原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、10 µg/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。

[0098] 更に、抗原結合分子が別の抗原結合分子と同じエピトープに対する競合の確認は、上記のELISAやFACS以外に、放射性標識抗原結合測定法 (r

adiolabeled antigen binding assay: RIA)、B I A C O R E (登録商標) 表面プラズモン共鳴アッセイ、電気化学発光法等を利用することもできる。

- [0099] 解析によって得られる被験抗原結合分子の変異したある抗原の発現細胞に対する結合量が反映されたGeometric Mean比較値(変異したある抗原の分子 Δ Geo-Mean値)を、被験抗原結合分子のある抗原の発現細胞に対する結合量が反映された Δ Geo-Mean比較値と比較する。この場合において、変異したある抗原の発現細胞及びある抗原の発現細胞に対する Δ Geo-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製されることが特に好ましい。予めある抗原の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。
- [0100] 被験抗原結合分子の変異したある抗原の発現細胞に対する Δ Geo-Mean比較値が、被験抗原結合分子のある抗原の発現細胞に対する Δ Geo-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、「変異したある抗原の発現細胞に実質的に結合しない」ものとする。Geo-Mean値(Geometric 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。
- [0101] 本明細書で用語「運搬部分」は、抗原結合分子中の標的抗原認識部位および免疫受容体認識部位以外の部分を言う。本発明の運搬部分は通常、アミノ酸により構成されたペプチドまたはポリペプチドであり、具体的な一実施態様として、抗原結合分子中の運搬部分は標的抗原認識部位および免疫受容体認識部位と連結されている。本発明の運搬部分は、アミド結合により繋がれた一連のペプチドもしくはポリペプチドであっても良く、複数のペプチドもしくはポリペプチドがジスルフィド結合等の共有結合もしくは水素結合、疎水性相互作用等の非共有結合により形成された複合体であっても良い。
- [0102] 抗原結合分子が抗体である場合、血中半減期を延長する一実施態様として

、抗原結合分子にFcRn結合性を付与することが挙げられる。FcRn結合性を付与するには、通常、抗原結合分子中にFcRn結合領域を設ける方法がある。FcRn結合領域とは、FcRnへ結合性を持つ領域を言い、FcRnへの結合性を持つ限りどんな構造でも使用可能である。

- [0103] FcRn結合領域を含むことにより、FcRnのサルベージ経路により細胞内に取り込まれた後に再び血漿中に戻ることが可能となる。例えば、IgG分子の血漿中滞留性が比較的長い（消失が遅い）のは、IgG分子のサルベージレセプターとして知られているFcRnが機能しているためである。ピノサイトーシスによってエンドソームに取り込まれたIgG分子は、エンドソーム内の酸性条件下においてエンドソーム内に発現しているFcRnに結合する。FcRnに結合できなかったIgG分子はライソソームへと進みそこで分解されるが、FcRnへ結合したIgG分子は細胞表面へ移行し血漿中の中性条件下においてFcRnから解離することで再び血漿中に戻る。
- [0104] FcRn結合領域は、直接FcRnと結合する領域であることが好ましい。FcRn結合領域の好ましい例として、抗体のFc領域を挙げることができる。しかしながら、アルブミンやIgGなどのFcRnとの結合能を有するポリペプチドに結合可能な領域は、アルブミンやIgGなどを介して間接的にFcRnと結合することが可能であるので、本発明におけるFcRn結合領域はそのようなFcRnとの結合能を有するポリペプチドに結合する領域であってもよい。
- [0105] 本発明におけるFcRn結合領域のFcRn、特にヒトFcRnに対する結合活性は、前記結合活性の項で述べられているように、当業者に公知の方法により測定することが可能であり、条件については当業者が適宜決定することが可能である。ヒトFcRnへの結合活性は、KD (Dissociation constant: 解離定数)、見かけのKD (Apparent dissociation constant: 見かけの解離定数)、解離速度であるkd (Dissociation rate: 解離速度)、又は見かけのkd (Apparent dissociation: 見かけの解離速度) 等として評価され得る。これらは当業者公知の方法で測定され得る。例えばBiacore (GE healthcare)、スキャッチャードプロット、フローサイトメーター等を使用され得る。

[0106] FcRn結合領域のFcRnに対する結合活性を測定する際の条件は当業者が適宜選択することが可能であり、特に限定されない。例えば、W02009/125825に記載されているようにMESバッファー、37℃の条件において測定され得る。また、本発明のFcRn結合領域のFcRnに対する結合活性の測定は当業者公知の方法により行うことが可能であり、例えば、Biacore (GE Healthcare) などを用いて測定され得る。

[0107] 測定条件に使用されるpHとして、FcRn結合領域とFcRnとの結合アフィニティは、pH4.0～pH6.5の任意のpHで評価してもよい。好ましくは、FcRn結合領域とヒトFcRnとの結合アフィニティを決定するために、生体内の早期エンドソーム内のpHに近いpH5.8～pH6.0のpHが使用される。測定条件に使用される温度として、FcRn結合領域とFcRnとの結合アフィニティは、10℃～50℃の任意の温度で評価してもよい。好ましくは、FcRn結合領域とヒトFcRnとの結合アフィニティを決定するために、15℃～40℃の温度が使用される。より好ましくは、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、および35℃のいずれか1つのような20℃から35℃までの任意の温度も同様に、FcRn結合領域とFcRnとの結合アフィニティを決定するために使用される。25℃という温度は本発明の態様の非限定な一例である。

[0108] FcRn結合領域の一つの例として、それだけに限定されないが、例えば、IgG抗体Fc領域が挙げられる。IgG抗体のFc領域を用いる場合、その種類は限定されず、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4などのFc領域を用いることが可能である。

[0109] また、天然型IgG抗体のFc領域はもちろん、FcRn結合性を有する限り、一つまたはそれ以上のアミノ酸が置換された改変Fc領域も使用可能である。

例えば、IgG抗体Fc領域におけるEUナンバリング237番目、238番目、239番目、248番目、250番目、252番目、254番目、255番目、256番目、257番目、258番目、265番目、270番目、286番目、289番目、297番目、298番目、303番目、305番目、307番目、308番目、309番目、311番目、312番目、314番目、315番目、317番目、325番目、332番目、334番目、360番目、376番目、380番目、382番目、384番目、385番目、386番目、387番目、389番目、424番目、428番

目、433番目、434番目および436番目から選択される少なくとも1つのアミノ酸を他のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を含む改変Fc領域を使用ことは可能である。

- [0110] より具体的には、IgG抗体Fc領域におけるEUナンバリング
- 237番目のGlyをMetに置換するアミノ酸置換、
 - 238番目のProをAlaに置換するアミノ酸置換、
 - 239番目のSerをLysに置換するアミノ酸置換、
 - 248番目のLysをIleに置換するアミノ酸置換、
 - 250番目のThrをAla、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、
 - 252番目のMetをPhe、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、
 - 254番目のSerをThrに置換するアミノ酸置換、
 - 255番目のArgをGluに置換するアミノ酸置換、
 - 256番目のThrをAsp、Glu、またはGlnに置換するアミノ酸置換、
 - 257番目のProをAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、またはValに置換するアミノ酸置換、
 - 258番目のGluをHisに置換するアミノ酸置換、
 - 265番目のAspをAlaに置換するアミノ酸置換、
 - 270番目のAspをPheに置換するアミノ酸置換、
 - 286番目のAsnをAlaまたはGluに置換するアミノ酸置換、
 - 289番目のThrをHisに置換するアミノ酸置換、
 - 297番目のAsnをAlaに置換するアミノ酸置換、
 - 298番目のSerをGlyに置換するアミノ酸置換、
 - 303番目のValをAlaに置換するアミノ酸置換、
 - 305番目のValをAlaに置換するアミノ酸置換、
 - 307番目のThrをAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、
 - 308番目のValをAla、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、またはThrに置換す

るアミノ酸置換、

309番目のLeuまたはValをAla、Asp、Glu、Pro、またはArgに置換するアミノ酸置換、

311番目のGlnをAla、His、またはIleに置換するアミノ酸置換、

312番目のAspをAlaまたはHisに置換するアミノ酸置換、

314番目のLeuをLysまたはArgに置換するアミノ酸置換、

315番目のAsnをAlaまたはHisに置換するアミノ酸置換、

317番目のLysをAlaに置換するアミノ酸置換、

325番目のAsnをGlyに置換するアミノ酸置換、

332番目のIleをValに置換するアミノ酸置換、

334番目のLysをLeuに置換するアミノ酸置換、

360番目のLysをHisに置換するアミノ酸置換、

376番目のAspをAlaに置換するアミノ酸置換、

380番目のGluをAlaに置換するアミノ酸置換、

382番目のGluをAlaに置換するアミノ酸置換、

384番目のAsnまたはSerをAlaに置換するアミノ酸置換、

385番目のGlyをAspまたはHisに置換するアミノ酸置換、

386番目のGlnをProに置換するアミノ酸置換、

387番目のProをGluに置換するアミノ酸置換、

389番目のAsnをAlaまたはSerに置換するアミノ酸置換、

424番目のSerをAlaに置換するアミノ酸置換、

428番目のMetをAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、

433番目のHisをLysに置換するアミノ酸置換、

434番目のAsnをAla、Phe、His、Ser、Trp、またはTyrに置換するアミノ酸置換、および

436番目のTyrまたはPheをHisに置換するアミノ酸置換

から選択される少なくとも1つのアミノ酸置換を含む、改変Fc領域を使用す

ることは可能である。

[0111] 別の面から見れば、IgG抗体Fc領域における、EUナンバリング

237番目のアミノ酸におけるMet、

238番目のアミノ酸におけるAla、

239番目のアミノ酸におけるLys、

248番目のアミノ酸におけるIle、

250番目のアミノ酸におけるAla、Phe、Ile、Met、Gln、Ser、Val、Trp、またはTyr、

252番目のアミノ酸におけるPhe、Trp、またはTyr、

254番目のアミノ酸におけるThr、

255番目のアミノ酸におけるGlu、

256番目のアミノ酸におけるAsp、Glu、またはGln、

257番目のアミノ酸におけるAla、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Ser、Thr、またはVal、

258番目のアミノ酸におけるHis、

265番目のアミノ酸におけるAla、

270番目のアミノ酸におけるPhe、

286番目のアミノ酸におけるAlaまたはGlu、

289番目のアミノ酸におけるHis、

297番目のアミノ酸におけるAla、

298番目のアミノ酸におけるGly、

303番目のアミノ酸におけるAla、

305番目のアミノ酸におけるAla、

307番目のアミノ酸におけるAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、Trp、またはTyr、

308番目のアミノ酸におけるAla、Phe、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、またはThr、

309番目のアミノ酸におけるAla、Asp、Glu、Pro、またはArg、

311番目のアミノ酸におけるAla、His、またはIle、
312番目のアミノ酸におけるAlaまたはHis、
314番目のアミノ酸におけるLysまたはArg、
315番目のアミノ酸におけるAlaまたはHis、
317番目のアミノ酸におけるAla、
325番目のアミノ酸におけるGly、
332番目のアミノ酸におけるVal、
334番目のアミノ酸におけるLeu、
360番目のアミノ酸におけるHis、
376番目のアミノ酸におけるAla、
380番目のアミノ酸におけるAla、
382番目のアミノ酸におけるAla、
384番目のアミノ酸におけるAla、
385番目のアミノ酸におけるAspまたはHis、
386番目のアミノ酸におけるPro、
387番目のアミノ酸におけるGlu、
389番目のアミノ酸におけるAlaまたはSer、
424番目のアミノ酸におけるAla、
428番目のアミノ酸におけるAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、Trp、またはTyr、
433番目のアミノ酸におけるLys、
434番目のアミノ酸におけるAla、Phe、His、Ser、Trp、またはTyr、および
436番目のアミノ酸におけるHis
から選択される少なくとも1つのアミノ酸を含むFc領域を使用することは可能である。

[0112] また、血中半減期を延長する一実施態様として、抗原結合分子とアルブミンを結合させる方法がある。アルブミンは腎排泄を受けず、かつFcRn結合性を有するため、血中半減期が17～19日と長い (J Clin Invest. 1953 Aug

; 32(8): 746-768.)。そのためアルブミンと結合しているタンパク質は嵩高くなり、かつ間接的にFcRnと結合することが可能となるため、血中半減期が増加することが報告されている (Antibodies 2015, 4(3), 141-156)。

[0113] 更に、血中半減期を延長する一実施態様として、抗原結合分子をPEG化する方法がある。タンパク質をPEG化することでタンパク質を嵩高くし、同時に血中のプロテアーゼによる分解を抑えることで、タンパク質の血中半減期が延長すると考えられている (J Pharm Sci. 2008 Oct;97(10):4167-83.)。

[0114] 本発明のいくつかの実施態様において、抗原結合分子は抗体Fc領域を含む。具体的な一実施態様として、抗原結合分子はヒトIgG抗体のCH2ドメイン及びCH3ドメインを含む。具体的な一実施態様として、抗原結合分子は、ヒトIgG1抗体重鎖Cys226から、またはPro230から、重鎖のカルボキシル末端まで伸びる部分を含む。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。

[0115] 本発明のいくつかの実施態様において、抗原結合分子は抗体定常領域を含む。より好ましい実施態様において、抗原結合分子はIgG抗体定常領域を含む。より好ましい実施態様において、抗原結合分子はヒトIgG抗体定常領域を含む。さらに好ましい実施態様において、抗原結合分子は二重特異性抗体であって、ヒトIgG抗体定常領域を含む。

[0116] 更なる本発明のいくつかの実施態様において、抗原結合分子は抗体重鎖定常領域と実質的に類似する構造を有する領域と、当該領域とジスルフィド結合等の共有結合または水素結合、疎水性相互作用等の非共有結合により結合されている、抗体軽鎖と実質的に類似する構造を有する領域とを含む。

[0117] 本明細書で用いられる用語「IgG抗体様分子」は、IgG抗体のような定常ドメインまたは定常領域の構造と実質的に類似する部分と、IgG抗体のような可変ドメインまたは可変領域の構造と実質的に類似する部分を有し、IgG抗体と実質的に類似した立体構造を持つ分子を定義するために用いられる。ただし、本明細書の「IgG抗体様分子」は、IgG抗体と類似する構造を保持したまま抗原結合活性を発揮することに限定されない。

- [0118] 抗原結合分子がIgG抗体様分子である場合、IgG抗体の二つの可変領域に相当する部分にそれぞれ標的抗原認識部位および免疫受容体認識部位を設ける実施態様は、本発明に包含される。
- [0119] 本明細書において、用語「特異性」とは、抗原結合分子の標的抗原認識部位または免疫受容体認識部位がそれぞれ特定の標的抗原または免疫受容体以外の分子に対して実質的に結合しない性質をいう。抗原結合分子が特定の標的抗原中または免疫受容体中に含まれるエピトープに特異性を有する場合にも用いられる。実質的に結合しないとは結合活性測定に関して記載される上記方法に準じて決定され、前記特定の標的抗原または免疫受容体以外の分子に対する特結合分子の結合活性が、前記相手方の分子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%以下の結合活性を示すことをいう。
- [0120] 本発明における抗原結合分子は、それをコードする核酸を、通常、適当なベクターへ担持（挿入）され、宿主細胞へ導入し、通常の方法により作成することができる。該ベクターとしては、挿入した核酸を安定に保持するものであれば特に制限されず、例えば宿主に大腸菌を用いるのであれば、クローニング用ベクターとしてはpBluescriptベクター（Stratagene社製）などが好ましいが、市販の種々のベクターを利用することができる。本発明の実施において使用するポリペプチド（例えば、キメラ受容体、IgG抗体、二重特異性抗体、抗原結合分子など）を生産する目的においてベクターを用いる場合には、特に発現ベクターが有用である。発現ベクターとしては、試験管内、大腸菌内、培養細胞内、生物個体内でポリペプチドを発現するベクターであれば特に制限されないが、例えば、試験管内発現であればpBESTベクター（プロメガ社製）、大腸菌であればpETベクター（Invitrogen社製）、培養細胞であればpME18S-FL3ベクター（GenBank Accession No. AB009864）、生物個体であればpME18Sベクター（Mol Cell Biol. 8:466-472(1988)）などが好ましい。ベクターへの本発明のDNAの挿入は、常法により、例えば、制限酵素サイトをういたりガーゼ反応により行うことができる（Current protocols in

Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 11.4-11.11)。

- [0121] 上記宿主細胞としては特に制限はなく、目的に応じて種々の宿主細胞が用いられる。抗原結合分子を発現させるための細胞としては、例えば、細菌細胞（例：ストレプトコッカス、スタフィロコッカス、大腸菌、ストレプトミセス、枯草菌）、真菌細胞（例：酵母、アスペルギルス）、昆虫細胞（例：ドロソフィラS2、スポドプテラSF9）、動物細胞（例：CHO、COS、HeLa、C127、3T3、BHK、HEK293、Bowes メラノーマ細胞）および植物細胞を例示することができる。宿主細胞へのベクター導入は、例えば、リン酸カルシウム沈殿法、電気パルス穿孔法（Current protocols in Molecular Biology edit. Ausubel et al. (1987) Publish. John Wiley & Sons. Section 9.1-9.9）、リポフェクタミン法（GIBCO-BRL社製）、マイクロインジェクション法などの公知の方法で行うことが可能である。
- [0122] 宿主細胞において発現した抗原結合分子を小胞体の内腔に、細胞周辺腔に、または細胞外の環境に分泌させるために、適当な分泌シグナルを目的の抗原結合分子をコードする核酸に組み込むことができる。これらのシグナルは目的のポリペプチドに対して内因性であっても、異種シグナルであってもよい。
- [0123] 上記製造方法における抗原結合分子の回収は、本発明の抗原結合分子が培地に分泌される場合は、培地を回収する。本発明の抗原結合分子が細胞内に産生される場合は、その細胞をまず溶解し、その後に抗原結合分子を回収する。
- [0124] 組換え細胞培養物から本発明の抗原結合分子を回収し精製するには、硫酸アンモニウムまたはエタノール沈殿、酸抽出、アニオンまたはカチオン交換クロマトグラフィー、ホスホセルロースクロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィー、ヒドロキシルアパタイトクロマトグラフィーおよびレクチンクロマトグラフィーを含めた公知の方法を用いることができる。

- [0125] 本発明に記載するアミノ酸配列に含まれるアミノ酸は翻訳後に修飾（例えば、N末端のグルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は当業者によく知られた修飾である）を受ける場合もあるが、そのようにアミノ酸が翻訳後修飾された場合であっても当然のことながら本発明に記載するアミノ酸配列に含まれる。
- [0126] 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る。本発明において、標的細胞（病変細胞）の表面に発現する分子を抗原（標的抗原）とする抗原結合分子を用いることができる。標的細胞が腫瘍細胞またはがん細胞の場合には、当該抗原は腫瘍抗原として本明細書に例示される以下に、腫瘍抗原に結合する抗体を作製する方法が例示される。
- [0127] 腫瘍抗原に結合する抗体は、公知の手段を用いて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。該抗体としては、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。
- [0128] モノクローナル抗体産生ハイブリドーマは、公知技術を使用することによって、例えば以下のように作製され得る。すなわち、腫瘍抗原タンパク質を感作抗原として使用して、通常の免疫方法にしたがって哺乳動物が免疫される。得られる免疫細胞が通常の細胞融合法によって公知の親細胞と融合される。次に、通常のスクリーニング法によって、モノクローナルな抗体産生細胞をスクリーニングすることによって抗腫瘍抗原抗体を産生するハイブリドーマが選択され得る。
- [0129] 具体的には、モノクローナル抗体の作製は例えば以下に示すように行われる。まず、腫瘍抗原遺伝子を発現させることによって、抗体取得の感作抗原として使用される腫瘍抗原タンパク質が取得され得る。すなわち、腫瘍抗原をコードする遺伝子配列を公知の発現ベクターに挿入することによって適当な宿主細胞が形質転換される。当該宿主細胞中または培養上清中から所望の

ヒト腫瘍抗原タンパク質が公知の方法で精製される。培養上清中から可溶型の腫瘍抗原を取得するためには、例えば、腫瘍抗原ポリペプチド配列のうち、疎水性領域を構成する部分を欠失させたタンパク質を用いることができる。また、精製した天然のGPC3タンパク質もまた同様に感作抗原として使用され得る。

[0130] 哺乳動物に対する免疫に使用する感作抗原として当該精製腫瘍抗原タンパク質が使用できる。腫瘍抗原の部分ペプチドもまた感作抗原として使用できる。この際、該部分ペプチドはヒト腫瘍抗原のアミノ酸配列より化学合成によっても取得され得る。また、腫瘍抗原遺伝子の一部を発現ベクターに組込んで発現させることによっても取得され得る。さらにはタンパク質分解酵素を用いて腫瘍抗原タンパク質を分解することによっても取得され得るが、部分ペプチドとして用いる腫瘍抗原ペプチドの領域および大きさは特に特別の態様に限定されない。感作抗原とするペプチドを構成するアミノ酸の数は少なくとも5以上、例えば6以上、或いは7以上であることが好ましい。より具体的には8~50、好ましくは10~30残基のペプチドが感作抗原として使用され得る。

[0131] また、腫瘍抗原タンパク質の所望の部分ポリペプチドやペプチドを異なるポリペプチドと融合した融合タンパク質が感作抗原として利用され得る。感作抗原として使用される融合タンパク質を製造するために、例えば、抗体のFc断片やペプチドタグなどが好適に利用され得る。融合タンパク質を発現するベクターは、所望の二種類又はそれ以上のポリペプチド断片をコードする遺伝子がインフレームで融合され、当該融合遺伝子が前記のように発現ベクターに挿入されることにより作製され得る。融合タンパク質の作製方法はMolecular Cloning 2nd ed. (Sambrook, J et al., Molecular Cloning 2nd ed., 9.47-9.58 (1989) Cold Spring Harbor Lab. press) に記載されている。一例として、感作抗原として用いられるGPC3の取得方法及びそれを用いた免疫方法は、W02003/000883、W02004/022754、W02006/006693等にも具体的に記載されている。

- [0132] 該感作抗原で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、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
- [0133] 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を使用され得る。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。
- [0134] 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。蛋白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。
- －膜蛋白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。
- [0135] 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、腫瘍抗原タンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。腫瘍抗原をコードする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。さらに、腫瘍抗原を認識する抗体の作製は国際公開W02003/104453に記載された方法を用いても作製され得る。

[0136] このように哺乳動物が免疫され、血清中における腫瘍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。

[0137] 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。

[0138] 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-デオキシストレプトタミン系抗生物質（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。

[0139] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8, 653) (J. Immu

mol. (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)、F0 (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。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] 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。

- [0144] 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クローニングが実施される。
- [0145] 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クローニングが実施され得る。
- [0146] 所望の抗体のスクリーニングおよび単クローニングが、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。例えば、GPC3に結合するモノクローナル抗体は、細胞表面に発現したGPC3に結合することができる。このようなモノクローナル抗体は、たとえば、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。
- [0147] 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GPC3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、用いた腫瘍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、細胞表面の腫瘍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、GPC3強制発現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、腫瘍抗原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。

[0148] あるいは固定化した腫瘍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。例えば、ELISAプレートのウェルにGPC3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。

[0149] 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。

[0150] 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。

[0151] 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。

- [0152] 例えば、腫瘍抗原に結合する抗体を産生するハイブリドーマ細胞から、該抗体の可変領域（V領域）をコードするcDNAが取得される。そのために、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：ーグアニジン超遠心法（Biochemistry (1979) 18 (24), 5294-5299）ーAGPC法（Anal. Biochem. (1987) 162 (1), 156-159）。
- [0153] 抽出されたmRNAは、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。
- [0154] 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。
- [0155] 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

ライブラリが得られる。5' -RACE cDNAライブラリの合成にはSMART RACE cDNA増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。

[0156] 得られた5' -RACE cDNAライブラリを鋳型として、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。

[0157] 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 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$ 、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ライブラリ作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0158] 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わ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GPC3に対する抗体の取得を目的とするとき、抗体のGPC3への結合は、特異的であることがさらに好ましい。本発明において使用する抗体は、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領域を含む抗体を抗原発現細胞に接触させる工程、

(2) 抗原発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

(3) 抗原発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0159] 抗体と腫瘍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、抗体と腫瘍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腫瘍抗原発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0160] 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として取得した場合には、ファージ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ーン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。

[0161] 目的とする腫瘍抗原に結合する抗体の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。上記のように消化された抗GPC3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、マウスーヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒトー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ション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。

[0162] モノクローナル抗体を製造するために、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。後に記載される実施例ではシグナル配列として、例えばアミノ酸配列MGWSCIIILFLVATATGVHSを有するペプチド等が使用されているが、これ以外にも適したシグナル配列が付加される。発現されたポリペプチドは上記配列のカルボキシル末端部分で切断され、切断されたポリペプチドが成熟ポリペプチドとして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、標的となる腫瘍抗原に結合する抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0163] 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W0 94/11523を参照のこと）。

[0164] 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体可変領域を含むドメインを単離するのに応用され得る。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。

[0165] 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。

[0166] 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。

ー酵母：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 pastoris*) などの *Pichia* 属

ー糸状菌：アスペルギルス・ニガー (*Aspergillus niger*) などのアスペルギルス (*Aspergillus*) 属。

[0167] 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。

[0168] 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)。

- [0169] 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、当該抗原結合分子における抗体可変領域を含むドメインとして、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。
- [0170] 本明細書において記載される抗原結合分子における抗体可変領域を含む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) には含まれた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。
- [0171] 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。

- [0172] 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。
- [0173] 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W01996/002576参照）。
- [0174] 上記のように作製され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）。

- [0175] 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W01993/012227、W01992/003918、W01994/002602、W01994/025585、W01996/034096、W01996/033735参照）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。
- [0176] さらに、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DNA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W01992/001047、W01992/020791、W01993/006213、W01993/011236、W01993/019172、W01995/001438、W01995/015388参照）。
- [0177] 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、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。
- [0178] 本明細書において、Fvとしては、例えば以下の抗原結合分子；
二価のscFvのうち一価のscFvがCD3結合ドメインを構成する重鎖Fv断片を介

してFc領域を構成する一つのポリペプチドに、他方の一価のscFvがCD3結合ドメインを構成する軽鎖Fv断片を介してFc領域を構成する他方の一つのポリペプチドに連結された二価の抗原結合ドメインが二価のscFvである（１）二価の抗原結合ドメイン、（２）IgG1、IgG2a、IgG3又はIgG4のFc領域を構成するアミノ酸のうちFcガンマ受容体に対する結合活性を有しないFc領域を含むドメイン、及び、（３）少なくとも一価のCD3結合ドメイン、を含む抗原結合分子等において軽鎖Fv断片及び重鎖Fv断片が、抗原であるCD3に対する結合を有する態様で会合しCD3結合ドメインを構成する一組のFvも好適に含まれる。

[0179] 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, Rosenberg、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W01988/001649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。

[0180] 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。

[0181] 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 (bispecific 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。

[0182] 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体が挙げられるが、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。

[0183] [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]

[0184] sc(Fv)_2 の分子形態については W02006/132352 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。

[0185] 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。また糖鎖付加配列を挿入し、糖鎖が所望の効果を得ることを目的として好適に付加され得る。

[0186] 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 参照) 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。

[0187] 例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser
 Gly · Ser
 Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly
 Gly · Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly · Gly
 Gly · Gly · Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly
 Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser
 Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly
 $(\text{Gly} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Ser})_n$
 $(\text{Ser} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Gly} \cdot \text{Gly})_n$

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。但し、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。

[0188] 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（BSOC0ES

）、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-BSO₂COES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0189] 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。

[0190] 「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。

[0191] 「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CH₁ガンマ1（H鎖定常領域中のガンマ1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。

[0192] 「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蛋白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。かかる蛋白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。

[0193] 本明細書において開示される抗原結合分子を構成するFc領域はモノクロー

ナル抗体等の抗体をペプシン等の蛋白質分解酵素にて部分消化した後に、断片をプロテインAカラム、あるいはプロテインGカラムに吸着させた後に、適切な溶出バッファー等により溶出させることにより好適に取得され得る。かかる蛋白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モノクローナル抗体等の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。

[0194] 本明細書に記載される抗原結合分子にはIgG1、IgG2、IgG3又はIgG4のFc領域を構成するアミノ酸のうちFcガンマ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域が含まれる。

[0195] 抗体のアイソタイプは、定常領域の構造によって決定される。IgG1、IgG2、IgG3、IgG4の各アイソタイプの定常領域は、それぞれ、Cガンマ1、Cガンマ2、Cガンマ3、Cガンマ4と呼ばれている。

[0196] Fc領域は、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ドメイン間の定常領域の一部を含む二本の重鎖を含むF(ab')₂を除いた領域のことをいう。本明細書において開示される抗原結合分子を構成するFc領域は、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4モノクローナル抗体等をペプシン等の蛋白質分解酵素にて部分消化した後に、プロテインAカラムに吸着された画分を再溶出することによって好適に取得され得る。かかる蛋白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。

[0197] 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 (CD 64) ; 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 (C

D32) ; およびアイソフォームFc γ RIIIa (アロタイプV158およびF158を含む) およびFc γ RIIIb (アロタイプFc γ RIIIb-NA1およびFc γ RIIIb-NA2を含む) を含むFc γ RIII (CD16) 、並びにいかなる未発見のヒトFc γ R類またはFc γ R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。Fc γ R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Fc γ R類には、Fc γ RI (CD64) 、Fc γ RII (CD32) 、Fc γ RIII (CD16) およびFc γ RIII-2 (CD16-2) 、並びにいかなる未発見のマウスFc γ R類またはFc γ R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Fc γ 受容体の好適な例としてはヒトFc γ RI (CD64) 、Fc γ RIIA (CD32) 、Fc γ RIIB (CD32) 、Fc γ RIIIA (CD16) 及び／又はFc γ RIIIB (CD16) が挙げられる。Fc γ RI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登録番号で、NM_000566.3及びNP_000557.1に、Fc γ RIIA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登録番号で、BC020823.1及び3 OAAH20823.1に、Fc γ RIIB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登録番号で、BC146678.1及びAAI46679.1に、Fc γ RIIIA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登録番号で、BC033678.1及びAAH33678.1に、及びFc γ RIIIB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登録番号で、BC128562.1及びAAI28563.1に記載されている。Fc γ 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) 。

[0198] また、「Fcリガンド」または「エフェクターリガンド」は、抗体のFc領域に結合してFc/Fcリガンド複合体を形成する、任意の生物に由来する分子、好ましくはポリペプチドを意味する。FcリガンドのFcへの結合は、好ましくは、1つまたはそれ以上のエフェクター機能を誘起する。Fcリガンドには、F

c受容体、Fc γ R、Fc α R、Fc ϵ R、FcRn、C1q、C3、マンナン結合レクチン、マンノース受容体、スタフィロコッカスのプロテインA、スタフィロコッカスのタンパク質GおよびウイルスのFc γ Rが含まれるが、これらに限定されない。Fcリガンドには、Fc γ Rに相同なFc受容体のファミリーであるFc受容体相同体 (FcRH) (Davis et al., (2002) Immunological Reviews 190, 123-136) も含まれる。Fcリガンドには、Fcに結合する未発見の分子も含まれ得る

[0199] Fc領域がFc γ I、Fc γ IIA、Fc γ IIB、Fc γ IIIA及び／又はFc γ IIIBのいずれかのFc γ 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)。

[0200] 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。

[0201] 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Fc γ 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Fc γ 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Fc γ 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。Fc γ 受容体をGSTでタグ化する方法としては、Fc γ 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。

[0202] 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 (k_a) と解離速度定数 (k_d) が、当該定数の比からアフィニティ (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。

[0203] 抗腫瘍効果を示す複数の治療用抗体は、癌細胞の増殖に必要なシグナルの阻害、細胞死シグナルの誘発、あるいはADCC (Antibody Dependent Cell-mediated Cytotoxicity; 抗体依存性細胞傷害作用)、CDC (Complement Dependent

nt Cytotoxicity ; 補体依存性細胞傷害作用) によって、癌細胞に対する抗腫瘍効果を発揮する。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受容体に結合することにより、抗体が結合した標的の癌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。抗体の構造中に存在する補体結合部位には補体複合体が結合する。抗体が結合した細胞の細胞膜上に当該複合体中に存在する補体成分が孔を形成することにより、水やイオンの細胞内への流入が促進され細胞が破壊されて起こる細胞傷害がCDCである。Fc受容体のうち、Fc γ 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、Fc γ 受容体に対する結合活性が低い場合、癌抗原非依存的に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、癌抗原非依存的なサイトカインの誘導は起こらない。Fc領域がFc γ I、Fc γ IIA、Fc γ IIB、Fc γ IIIA及び／又はFc γ IIIBのいずれかのFc γ 受容体に対する結合活性が低下している抗体は、抗原結合分子として望ましい。

[0204] 本明細書において、Fc γ 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、対照とする抗原結合分子の競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

[0205] 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。当該Fc領域の構造として、RefSeq登録番号AAC82527.1のN末にAを付加した配列、RefSeq登録番号AAB59393.1のN末にAを付加した配列、RefSeq登録番号CAA27268.1のN末にAを付加した配列、RefSeq登録番号AAB59394.1のN末にAを付加した配列が例示される。また、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Fc γ 受容体への結合活性に対する効果が検証される。上記のようにして、Fc γ 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。

[0206] このような変異体の例としては、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) 等の変異体が公知である。

[0207] 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が、IgG1抗体を起源とするFc領域が好適に利用される。

[0208] 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。

[0209] 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。

[0210] 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。

[0211] 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。

[0212] 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。

[0213] 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。

[0214] 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；265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、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。

[0215] IgGクラスの抗体のエフェクター機能である抗体依存性細胞傷害作用（ADCC）、補体依存性細胞傷害作用（CDC）の研究は、これまでに多数行われ、ヒトIgGクラスの中では、IgG1サブクラスの抗体が最も高いADCC活性、CDC活性を有する。また、IgGクラスの抗体を介した標的細胞のファゴサイトーシスである抗体依存性細胞介在性ファゴサイトーシス（ADCP）も抗体のエフェクター機能の一つとして示唆されている。IgG1サブクラスの抗体は、これらのエフ

エクター機能を腫瘍に対して発揮させることが可能であるため、癌抗原に対するほとんどの抗体医薬としてIgG1サブクラスの抗体が用いられている。

[0216] 一方、IgG抗体が、抗体のエフェクター機能であるADCC、ADCP、または、標的細胞のファゴサイトーシスである抗体依存性細胞介在性ファゴサイトーシス（ADCP）活性を媒介するためには、IgG抗体のFc領域と、キラー細胞、ナチュラルキラー細胞、活性化されたマクロファージ等のエフェクター細胞表面上に存在するFc γ レセプター（Fc γ R）との結合が必要である。

[0217] ADCCとADCPなどの細胞傷害性のエフェクター機能の増強は、抗癌抗体の抗腫瘍効果を増強するための有望な手段である。Fc γ レセプターに対する結合が最適化されたFc領域を有する抗体は、より強力なエフェクター機能を媒介し、それにより効果的な抗腫瘍効果を発揮することが示唆される。よって、癌抗原に対する抗体医薬の抗腫瘍活性を増強あるいは向上させる抗体エンジニアリングの手法としてこれまで様々な報告（例えばW02013047752など）がされている。

[0218] Fc領域とFc γ レセプターの結合については、抗体のヒンジ領域及びCH2ドメイン内のいくつかのアミノ酸残基およびCH2ドメインに結合しているEUナンバリング297番目のAsnに付加される糖鎖が重要であることが示されている（Clark, M., Chemical Immunology (1997) 65, 88-110、Greenwood J, Clark M, Waldmann H., Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104、Morgan A, Jones N D, Nesbitt AM, Chaplin L, Bodmer MW, Emtage JS., Immunology (1995) 86, 319-324）。この結合箇所を中心に、これまでに様々なFc γ レセプター結合特性を持つFc領域の変異体が研究され、より高い活性化Fc γ レセプターに対する親和性を有するFc領域変異体が得られている（W02000/042072、W02006/019447）。

[0219] このように、膜型抗原を標的とした抗体においては、Fc γ レセプターに対する結合活性は細胞傷害活性に重要な役割を果たしていることから、細胞傷害活性が必要な場合、Fc γ Rに対する結合活性が高いヒトIgG1のアイソタイプが用いられ、さらにFc γ レセプターに対する結合活性を増強することにより

細胞傷害活性を増強させられることは広く用いられている技術である。また、可溶性抗原を標的とした抗体においても、Fc γ レセプターに対する結合活性を増強することは試みられている（W02013047752）。

[0220] Fc領域が、Fc領域のEUナンバリングで表される部位のうち；

221位のアミノ酸がLysまたはTyrのいずれか、

222位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

223位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはLysのいずれか、

224位のアミノ酸がPhe、Trp、GluまたはTyrのいずれか、

225位のアミノ酸がGlu、LysまたはTrpのいずれか、

227位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

228位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

230位のアミノ酸がAla、Glu、GlyまたはTyrのいずれか、

231位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

232位のアミノ酸がGlu、Gly、LysまたはTyrのいずれか、

233位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

234位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

235位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

236位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

237位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

238位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

239位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

240位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、
241位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、
243位のアミノ酸がLeu、Glu、Leu、Gln、Arg、TrpまたはTyrのいずれか、
244位のアミノ酸がHis、
245位のアミノ酸がAla、
246位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、
247位のアミノ酸がAla、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Thr、ValまたはTyrのいずれか、
249位のアミノ酸がGlu、His、GlnまたはTyrのいずれか、
250位のアミノ酸がGluまたはGlnのいずれか、
251位のアミノ酸がPhe、
254位のアミノ酸がPhe、MetまたはTyrのいずれか、
255位のアミノ酸がGlu、LeuまたはTyrのいずれか、
256位のアミノ酸がAla、MetまたはProのいずれか、
258位のアミノ酸がAsp、Glu、His、SerまたはTyrのいずれか、
260位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、
262位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、IleまたはThrのいずれか、
263位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、
264位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、
265位のアミノ酸がAla、Leu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
266位のアミノ酸がAla、Ile、MetまたはThrのいずれか、
267位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
268位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTrpのいずれか、
269位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、

Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

270位のアミノ酸がGlu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

271位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

272位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

273位のアミノ酸がPheまたはIleのいずれか、

274位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

275位のアミノ酸がLeuまたはTrpのいずれか、

276位のアミノ酸が、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

278位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、

279位のアミノ酸がAla、

280位のアミノ酸がAla、Gly、His、Lys、Leu、Pro、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

281位のアミノ酸がAsp、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

282位のアミノ酸がGlu、Gly、Lys、ProまたはTyrのいずれか、

283位のアミノ酸がAla、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、ArgまたはTyrのいずれか、

284位のアミノ酸がAsp、Glu、Leu、Asn、ThrまたはTyrのいずれか、

285位のアミノ酸がAsp、Glu、Lys、Gln、TrpまたはTyrのいずれか、

286位のアミノ酸がGlu、Gly、ProまたはTyrのいずれか、

288位のアミノ酸がAsn、Asp、GluまたはTyrのいずれか、

290位のアミノ酸がAsp、Gly、His、Leu、Asn、Ser、Thr、TrpまたはTyrのいずれか、

- 291位のアミノ酸がAsp、Glu、Gly、His、Ile、GlnまたはThrのいずれか、
- 292位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Pro、ThrまたはTyrのいずれか、
- 293位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
- 294位のアミノ酸がPhe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
- 295位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
- 296位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、ThrまたはValのいずれか、
- 297位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
- 298位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、His、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
- 299位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、
- 300位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、ValまたはTrpのいずれか、
- 301位のアミノ酸がAsp、Glu、HisまたはTyrのいずれか、
- 302位のアミノ酸がIle、
- 303位のアミノ酸がAsp、GlyまたはTyrのいずれか、
- 304位のアミノ酸がAsp、His、Leu、AsnまたはThrのいずれか、
- 305位のアミノ酸がGlu、Ile、ThrまたはTyrのいずれか、
- 311位のアミノ酸がAla、Asp、Asn、Thr、ValまたはTyrのいずれか、
- 313位のアミノ酸がPhe、
- 315位のアミノ酸がLeu、
- 317位のアミノ酸がGluまたはGln、
- 318位のアミノ酸がHis、Leu、Asn、Pro、Gln、Arg、Thr、ValまたはTyrの

いずれか、

320位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Asn、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

322位のアミノ酸がAla、Asp、Phe、Gly、His、Ile、Pro、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

323位のアミノ酸がIle、

324位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

325位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

326位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Gly、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

327位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

328位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

329位のアミノ酸がAsp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

330位のアミノ酸がCys、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

331位のアミノ酸がAsp、Phe、His、Ile、Leu、Met、Gln、Arg、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

332位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

333位のアミノ酸がAla、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Pro、Ser、Thr、ValまたはTyrのいずれか、

334位のアミノ酸がAla、Glu、Phe、Ile、Leu、ProまたはThrのいずれか、

335位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、His、Ile、Leu、Met、Asn、Pro、Arg、

Ser、Val、TrpまたはTyrのいずれか、

336位のアミノ酸がGlu、LysまたはTyrのいずれか、

337位のアミノ酸がGlu、HisまたはAsnのいずれか、

339位のアミノ酸がAsp、Phe、Gly、Ile、Lys、Met、Asn、Gln、Arg、SerまたはThrのいずれか、

376位のアミノ酸がAlaまたはValのいずれか、

377位のアミノ酸がGlyまたはLysのいずれか、

378位のアミノ酸がAsp、

379位のアミノ酸がAsn、

380位のアミノ酸がAla、AsnまたはSerのいずれか、

382位のアミノ酸がAlaまたはIleのいずれか、

385位のアミノ酸がGlu、

392位のアミノ酸がThr、

396位のアミノ酸がLeu、

421位のアミノ酸がLys、

427位のアミノ酸がAsn、

428位のアミノ酸がPheまたはLeuのいずれか、

429位のアミノ酸がMet、

434位のアミノ酸がTrp、

436位のアミノ酸がIle、および

440位のアミノ酸がGly、His、Ile、LeuまたはTyrのいずれか、の群から選択される少なくともひとつ以上のアミノ酸を含むFc領域を有するIgG抗体、またIgG抗体様分子が二次分子であるADCC活性を有する抗体として好ましい。

[0221] 本発明の抗原結合分子として、多重特異性抗体を挙げることができる。ここで、多重特異性抗体とは、複数の異なる特異性を有する抗体である。多重特異性抗体の例としては二重特異性抗体が挙げられる。IgG型の二重特異性抗体はIgG抗体を産生するハイブリドーマ二種を融合することによって生じるhybrid hybridoma (quadroma) によって分泌させることが出来る (Milstein C

et al. Nature (1983) 305, 537-540)。二重特異性抗体のFc領域として、Fc γ 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、二重特異性抗体を起源とするFc領域も適宜使用される。

[0222] 多重特異性抗体を作製するための手法は、これらに限定されるものではないが、異なる特異性を有する2つの免疫グロブリン重鎖-軽鎖ペアの組み換え共発現 (Milstein and Cuello, Nature 305: 537 (1983)、W093/08829、およびTraunecker et al., EMBO J. 10: 3655 (1991) 参照)、およびknob-in-hole技術 (例えば、米国特許第5,731,168号参照) を含む。多重特異性抗体は、Fcヘテロ二量体分子を作製するために静電ステアリング効果 (electrostatic steering effects) を操作すること (W02009/089004A1) ; 2つ以上の抗体または断片を架橋すること (米国特許第4,676,980号およびBrennan et al., Science, 229: 81 (1985)参照) ; ロイシンジッパーを用いて2つの特異性を有する抗体を作成すること (Kostelny et al., J. Immunol., 148(5):1547-1553 (1992) 参照) ; 「ダイアボディ」技術を用いて二重特異性抗体断片を作製すること (Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993) 参照) ; および、単鎖Fv (scFv) 二量体を用いること (Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994) 参照) ; および、例えばTutt et al. J. Immunol. 147: 60 (1991) に記載されるように三重特異性抗体を調製すること、によって作製してもよい。

[0223] 「オクトパス抗体」を含む、3つ以上の機能的抗原結合部位を伴う改変抗体も、本明細書では含まれる (例えば、米国特許出願公開第2006/0025576号A1参照)。

[0224] 本発明の一つの態様において、抗原結合分子は、標的抗原認識部位および免疫受容体認識部位を有する二重特異性抗原結合部位を含む。ここで抗原結合分子は、二重特異性抗原結合部位に加えてさらなる抗原結合部位を有していてもよく、当該態様の抗原結合分子の例として、二重特異性抗原結合分子、および3種類以上の抗原結合部位を有する多重特異性抗原結合分子が挙げられ、より具体的には、二重特異性抗体および3種類以上の抗原結合部位を

有する多重特異性抗体が挙げられる。

[0225] IgG型の二重特異性抗体は目的の二種のIgGを構成するL鎖及びH鎖の遺伝子、合計四種の遺伝子を細胞に導入しそれらを共発現させることによって分泌される。しかし、これらの方法で産生されるIgGのH鎖とL鎖の組合せは理論上10通りにもなる。10種類のIgGから目的の組み合わせのH鎖L鎖からなるIgGを精製することは困難である。さらに目的の組み合わせのものの分泌量も理論上著しく低下するため、大きな培養規模が必要になり、製造上のコストはさらに増大する。

[0226] 本発明の二重特異性抗体には、目的の組合せのH鎖間及びL鎖H鎖間の会合を促進するための技術を適用することができる。

例えば、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（W02006/106905）。

[0227] 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。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。

[0228] 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。

[0229] 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。

[0230] 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)。

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。

[0231] 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。

[0232] 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。

[0233] また、本発明の二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Fc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Fc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、突起が空隙内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 (W01996/027011、Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681、US20130336973)。

[0234] これに加えて、本発明の二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二重特異性抗体を形成させることができる。

[0235] 他にも二重特異性抗体の形成には、W02011/028952やW02014/018572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、W02008/119353やW02011/131746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)、W02012/058768やW02013/063702に記載の抗体重鎖のCH3間の会合を制御する技術、W02012/023053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。

[0236] また、効率的に目的の二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二重特異性抗体を分離、精製することによっても、本発明の二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(pI)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(W02007114325)。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(W098050431、W095033844)。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、或いは、参考実施例5に記載の方法に従って取得されたProteinAへの結合力の異なる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。

[0237] 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、二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二重特異性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(W02004/065611)。

[0238] 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IgG4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。

[0239] これらの技術を複数、例えば2個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Fc γ 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。

[0240] 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、上述の表1～3に記載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。

[0241] 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。

[0242] また、「機能的に同等の抗体可変領域」には、例えば、上述の表1～3に記載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。

[0243] 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。

[0244] 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）のウェブサイト参照；<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>）。

[0245] 本発明の二重特異性抗体に含まれるFc領域は、Fc γ 受容体に対する結合活性が低下しているFc領域である限り特に制限されないが、本発明の好ましいFc領域としては、例えば、W02016/047722A1に記載の E22HhのFc領域部分とE22HkのFc領域部分の組合せ、E2702GsKscのFc領域部分とE2704sEpScのFc領域部分の組合せ、E2702sKscのFc領域部分とE2704sEpScのFc領域部分の組合せを挙げることができる。

[0246] また、本発明の抗原結合分子をコードする遺伝子を遺伝子治療用ベクターに組み込み、遺伝子治療を行うことも考えられる。投与方法としては、nakedプラスミドによる直接投与の他、リポソーム等にパッケージングするか、レトロウイルスベクター、アデノウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクター、ポックスウイルスベクター、アデノウイルス関連ベクター、HVJベクター等の各種ウイルスベクターとして形成するか（Adolph『ウィルスゲノム法』，CRC Press, Florid（1996）参照）、または、コロイド金粒子等のビーズ担体に被覆（W093/17706等）して投与することができる。また、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、またエレクトロポレーション法により直接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、W02013/120629参照）。しかしながら、生体内において抗原結合分子が発現され、その作用を発揮できる限りいかなる方法により投与してもよい。好ましくは、適当な非経口経路（静脈内、腹腔内、皮下、皮内、脂肪組織内、乳腺組織内、吸入または筋肉内の経路を介して注射、注入、またはガス誘導性粒子衝撃法（電子銃等による）、点鼻薬等粘膜経路を介する方法等）により十分な量が投与

される。ex vivoにおいてリポソームトランスフェクション、粒子衝撃法（米国特許第4,945,050号）、またはウイルス感染を利用して血液細胞及び骨髓由来細胞等に投与して、該細胞を動物に再導入することにより本発明の抗原結合分子をコードする遺伝子を投与してもよい。

[0247] 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、それだけ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。いくつかの実施態様において、本発明の医薬組成物は、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。

[0248] 本発明において医薬組成物とは、通常、疾患の治療もしくは予防、あるいは検査・診断のための薬剤をいう。本発明において、医薬組成物を他の成分の投与と組み合わせて用いる場合、医薬組成物は、他の成分の投与と、同時に、別々に、または連続して投与することができる。本発明の医薬組成物は、他の成分を成分として含んでもよい。

[0249] 本発明の抗原結合分子を含む医薬組成物は、当業者に公知の方法を用いて製剤化され得る。例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る液との無菌性溶液、又は懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用され得る。例えば、薬理学上許容される担体もしくは媒体、具体的には、滅菌水や生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ベヒクル、防腐剤、結合剤等と適宜組み合わせて、一般に認められた製薬実施に要求される単位用量形態で混和することによって製剤化され得る。これら製剤における有効成分量は、指示された範囲の適当な容量が得られるように設定される。

[0250] 注射のための無菌組成物は注射用蒸留水のようなベヒクルを用いて通常の

製剤実施にしたがって処方され得る。注射用の水溶液としては、例えば生理食塩水、ブドウ糖やその他の補助薬（例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウム）を含む等張液が挙げられる。適切な溶解補助剤、例えばアルコール（エタノール等）、ポリアルコール（プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（ポリソルベート80（TM）、HCO-50等）が併用され得る。

[0251] 油性液としてはゴマ油、大豆油が挙げられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル及び/またはベンジルアルコールも併用され得る。また、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液及び酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸プロカイン）、安定剤（例えば、ベンジルアルコール及びフェノール）、酸化防止剤と配合され得る。調製された注射液は通常、適切なアンプルに充填される。

[0252] 本発明の抗原結合分子を含む医薬組成物は、好ましくは非経口投与により投与される。例えば、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型の組成物が投与される。例えば、静脈内注射、動脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、髄内注射、関節内注射、滑液嚢内注射、頭蓋内注射、髄腔内注射、くも膜下注射、皮内注射、皮下注射、心臓内注射、腫瘍などの病変内注射や、カテーテルを利用する方法などにより全身または局所的に投与され得る。

[0253] 投与方法は、患者の年齢、症状により適宜選択され得る。本発明の医薬組成物の投与量は、例えば、一回につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲に設定され得る。または、例えば、患者あたり0.001~100000 mgの投与量が設定され得るが、本発明はこれらの数値に必ずしも制限されるものではない。投与量及び投与方法は、患者の体重、年齢、症状などにより変動するが、当業者であればそれらの条件を考慮し適当な投与量及び投与方法を設定することが可能である。

[0254] 本発明の必要に応じ本発明の医薬組成物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二重特異性抗原結合分子に適用され得る(J. Bio med. Mater. 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)。

[0255] 用語「キメラ受容体」は、少なくとも、細胞外ドメイン、膜貫通ドメインおよび細胞内シグナル伝達ドメインを含む、免疫エフェクター細胞に発現したとき、標的細胞、例えば癌細胞に対する特異性および細胞内シグナル産生をさせる、組換えポリペプチドを指す。

[0256] キメラ受容体の細胞外ドメインは、所定の分子と特異的に結合し得る任意のタンパク質性分子またはその一部を意味する。本発明では、キメラ受容体の細胞外ドメインは免疫受容体の細胞外ドメインまたはその改変体の配列を含むポリペプチドである。本発明の一つの態様において、キメラ受容体の細胞外ドメインは、免疫受容体の細胞外ドメインまたはその改変体の配列のみからなるポリペプチドであってもよく、免疫受容体の細胞外ドメインまたはその改変体の配列に追加のポリペプチドまたはアミノ酸残基を含んでいてもよい。本発明の別の態様において、キメラ受容体の細胞外ドメインは、免疫受容体の細胞外ドメインまたはその改変体の断片の配列を含んでいてもよい。

[0257] 本発明における免疫受容体の細胞外ドメインは、内因性免疫リガンドと結合し得る免疫受容体の細胞外部分を言う。例えばCD137においては配列番号129、配列番号130、配列番号131や配列番号132を指す。

[0258] 本発明において、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体とは、免疫受容体の細胞外ドメインのうち一部を付加、欠失、置換させたポリペプチドを意味する。免疫受容体の細胞外ドメイン改変体は、好ましくは内因性免疫リガンド

との結合を減弱させたものであり、例えば文献に記載されたX線結晶構造解析により特定される免疫受容体とその内在性リガンドとの結合部位に基づき、該免疫受容体の細胞外ドメインの内在性リガンドとの結合部位を改変したものをいう。たとえば内因性免疫リガンドとの結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体の例としては、CD137の免疫受容体の細胞外ドメインのうちシステインリッチドメイン3、システインリッチドメイン4、および膜貫通領域に接続するストーク（Genbank NM001561, 6, Cys88～Gln186）を欠失させた細胞外ドメイン改変体が挙げられる。

[0259] 本発明において、免疫受容体の細胞外ドメインの断片とは、免疫受容体の細胞外ドメインを構成するポリペプチドの断片であればよく、抗原結合分子が認識可能であれば、構成するアミノ酸の数などは特に制限されない。当該断片の例としては、免疫受容体にアゴニスト活性を有する抗体が認識するエピトープを構成するポリペプチド又はその断片が挙げられる。本発明において、キメラ受容体の細胞外ドメインが、当該エピトープの改変体を含んでいてもよく、当該エピトープが含む免疫受容体の細胞外ドメインを構成するポリペプチドの断片も、「免疫受容体の細胞外ドメインの断片」に該当する。

[0260] 用語「膜貫通ドメイン」は、該細胞外ドメインと該細胞内シグナル伝達ドメインの間に位置し、細胞膜を貫通する機能を有するポリペプチドを含む。

[0261] 用語「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、細胞内での生物学的プロセスの活性化または阻害、例えば、T細胞もしくはNK細胞などの免疫細胞の活性化を引き起こすシグナルを伝達する働きをすることが知られる任意のオリゴペプチドドメインまたはポリペプチドドメインを意味し、後述する、少なくとも1つのT細胞の刺激分子由来の「刺激分子シグナル伝達ドメイン」を含み、さらに後述する、少なくとも1つのT細胞の共刺激分子由来の「共刺激分子シグナル伝達ドメイン」を含んでもよい。

[0262] 本開示で使用する場合、「ドメイン」は、例えば、他の領域とは独立に特定の構造に折り畳まれ、および／または特定の機能を有する、ポリペプチド

の一領域を意味する。ドメインは、例えば、分子の細胞質部分またはその一部であり得る。本開示で使用する場合、分子の「細胞質ドメイン」は、全長細胞質ドメイン、または活性化された際に細胞内シグナルを伝達するその一部を意味する。

[0263] 一実施態様において、キメラ受容体は、以下で定義されるドメインを含む分子である。

一実施態様において、キメラ受容体は、細胞外ドメインと、細胞外ヒンジドメインと、膜貫通ドメインと、刺激分子由来の刺激分子シグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。

[0264] 一実施態様において、キメラ受容体は、細胞外ドメインと、細胞外ヒンジドメインと、膜貫通ドメインと、共刺激分子由来の共刺激分子シグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能的なシグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。

[0265] 一実施態様において、キメラ受容体は、細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、1つまたは複数の共刺激分子由来の2つの機能的なシグナル伝達ドメインおよび刺激分子由来の機能的なシグナル伝達ドメインを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。

[0266] 一実施態様において、キメラ受容体は、細胞外ドメインと、膜貫通ドメインと、1つまたは複数の共刺激分子由来の少なくとも2つの共刺激分子シグナル伝達ドメイン、刺激分子由来の刺激分子シグナル伝達ドメイン、およびその他の機能性ドメインおよび／またはモチーフを含む細胞内シグナル伝達ドメインとを含むキメラ融合タンパク質を含む。

[0267] 一実施態様において、i) 抗原結合分子の免疫受容体認識部位に結合し得る細胞外ドメイン、ii) 膜貫通ドメイン、およびiii) 細胞質共刺激ドメインおよび／またはインターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインと外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインとを含んでなる細

胞内セグメント（ここで、前記細胞内セグメントは、内因性のまたは外因性 J A K 結合モチーフおよび S T A T 5 関連モチーフを含んでなる）を含んでなるキメラ受容体が開示される。ある実施態様では、これらのドメインは、場合により、N末端から始まって以上の順序で、直接的または間接的に融合される。ある実施態様では、細胞内セグメント内のこれらのドメインは、逆の順序で融合される。

[0268] 一実施態様において、該細胞外ドメインと該細胞内シグナル伝達ドメインの間に細胞外ヒンジドメインおよび膜貫通ドメインを含んでもよい。用語「細胞外ヒンジドメイン」は、細胞外ドメインと膜貫通ドメインとを連結するドメインを意味する。細胞外ヒンジドメインは、細胞外ドメインと膜貫通ドメインを連結できるものであれば特に限定されない。天然タンパク質に由来するものであってもよく、人為的に設計されたものであってもよい。細胞外ヒンジドメインは、例えば、10～300個程度のアミノ酸、好ましくは20～100個程度のアミノ酸で構成することができる。細胞外ヒンジドメインは、細胞外ドメインの本開示の抗原結合分子との結合能を妨げず、かつ細胞内シグナル伝達ドメインを介したシグナル伝達を妨げないものであることが好ましい。用語「膜貫通ドメイン」は、該細胞外ドメインと該細胞内シグナル伝達ドメインの間に位置し、細胞膜を貫通する機能を有するポリペプチドであれば特に限定されない。膜貫通ドメインは、天然タンパク質に由来するものであってもよく、人為的に設計したものであってもよい。天然タンパク質に由来する膜貫通ドメインは、任意の膜結合タンパク質又は膜貫通タンパク質から取得することができる。

[0269] 一実施態様において、キメラ受容体は、キメラ受容体融合タンパク質のアミノ末端(N-末端)に付加的なリーダー配列を含む。

一実施態様において、キメラ受容体はさらに、細胞外ドメインのN-末端にリーダー配列を含み、ここで、該リーダー配列は、細胞プロセッシングおよびキメラ受容体の細胞膜への局在化の間に細胞外ドメインから切断されていてもよい。

[0270] 用語「免疫受容体」は、免疫細胞上に発現する受容体であり、免疫細胞の活性化または抑制に関与する受容体を意味する。免疫細胞の例としては、T細胞、樹状細胞、B細胞、造血幹細胞、マクロファージ、単球、NK細胞または造血細胞（好中球、好塩基球）などが挙げられる。本発明においてキメラ受容体は細胞外ドメインとして、免疫受容体の細胞外ドメインまたはその改変体を有する。ここで免疫受容体は、免疫細胞の活性化に関与する受容体が好ましく、例えば、腫瘍壊死因子レセプタースーパーファミリー（TNFRSF）に属する共刺激分子、具体的には、CD137、CD40、OX40、RANK、GITRなどが挙げられる。また免疫受容体は、刺激分子または共刺激分子であってもよく、その具体例については後述の通りである。

[0271] 本発明における抗原結合分子の免疫受容体認識部位は、キメラ受容体の細胞外結合ドメインに含まれる免疫受容体の細胞外ドメインまたはその断片を認識することができる。より好ましくは、抗原結合分子の免疫受容体認識部位は、内在性リガンドの結合部位とは異なる部分を認識する。免疫受容体上の内在性リガンド結合部位は、例えば文献に記載された構造生物学的な解析により特定される。例えばCD137においては、CD137Lとの複合体のX線結晶構造が明らかとなっており（Chin SM et al (2018) Nat Commun, 9, 4679）、CRD1上のF36、CRD2上のP49、S52、Q59、T61、C62、D63、I64、Q67、K69、V71、F72、およびCRD3上のS100、M101、C102がCD137Lとの相互作用に関与していることが報告されている。このうち、I64あるいはV71をArgに変異させた変異体が作製されており、いずれもCD137Lとの結合が減弱することが示されている。CD137Lとの相互作用に関与するアミノ酸残基を別のアミノ酸残基に変異させた変異体は、CD137Lとの結合を減弱させた細胞外ドメイン改変体として使用することができる。

[0272] 一つの態様において、キメラ受容体の細胞外ドメインは、TNFRSFに属する共刺激分子の細胞外ドメインまたはその断片を含み、抗原結合分子の免疫受容体認識部位は、TNFRSFに属する共刺激分子に対するアゴニス

ト抗体（以下、TNFRSFのアゴニスト抗体と称する）またはその抗原結合断片を用いることができる。種々の具体例において、本発明の医薬組成物として使用する抗原結合分子は、該キメラ受容体発現細胞の活性を、少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%、1000%またはそれ以上活性化させることができる。

[0273] 本発明の一つの態様において、キメラ受容体の細胞外ドメインは、TNFRSFのアゴニスト抗体の標的分子またはその断片を含む。TNFRSFのアゴニスト抗体の標的分子としては、TNF受容体スーパーファミリーを発現する細胞（例えば、T細胞やNK細胞など）を活性化する因子である限り特に制限されない。好ましい因子としては、例えばCD137、CD40が挙げられる。さらに好ましい因子としては、例えばCD137が挙げられる。例えば、CD137アゴニスト抗体の例としては、Urelumab（CAS登録番号：934823-49-1）や種々の公知のCD137アゴニスト抗体を挙げることができる。

[0274] 本発明の一つの態様において、キメラ受容体の細胞外ドメインは、免疫受容体に対してアゴニスト活性を有する抗体のエピトープを免疫受容体の断片として含む。免疫受容体の例としては上述の通りであり、好ましくはCD137が挙げられる。

[0275] 本発明の一つの態様において、キメラ受容体の細胞外ドメインは、CD137アゴニスト抗体の標的分子またはその断片を含む。CD137アゴニスト抗体の例として、例えばWO2015/156268に記載の配列番号などで示される以下の抗体が挙げら得る：

[1] 重鎖可変領域として配列番号66に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号85に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[2] 重鎖可変領域として配列番号67に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号86に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[3] 重鎖可変領域として配列番号 70 に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号 89 に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[4] 重鎖可変領域として配列番号 76 に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号 95 に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[5] 重鎖可変領域として配列番号 77 に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号 96 に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[6] 重鎖可変領域として配列番号 78 に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖可変領域として配列番号 97 に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[7] [1]～[6]いずれかに記載の抗体であって、重鎖定常領域として配列番号 99 に記載のアミノ酸配列、及び軽鎖定常領域として配列番号 59 に記載のアミノ酸配列又は配列番号 60 に記載のアミノ酸配列を有する抗体；

[8] [1]～[7]いずれかに記載の抗体と同等の活性を有する抗体；

[9] [1]～[7]いずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体。

[0276] 上記[8]に記載の抗体において、「同等の活性」とは、CD137 へのアゴニスト活性が上記[1]～[7]いずれかに記載の抗体の結合活性の 70%以上、好ましくは 80%以上、より好ましくは 90%以上であること、をいう。

[0277] 上記[1]から[7]いずれかに記載の抗体が結合するエピトープと同じエピトープに結合する抗体の好ましい例として、例えば、CD137 タンパク質中の SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC の配列を有する領域を認識する抗体を挙げることができる。さらには、CD137 タンパク質中の DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC の配列を有する領域を認識する抗体を挙げることができる。

[0278] 一実施態様において、細胞外ヒンジドメインとしては、例えば、CD8 アルファ、CD8 ベータ、CD28、CD4、NKp30、NKp44、NKp46 の細胞外ヒンジドメイン等が挙げられる。また、免疫グロブリン（例えば、IgG4 等）のヒンジ領域を使用してもよい。

[0279] 一実施態様において、膜貫通ドメインが由来するタンパク質としては、例

例えば、T細胞受容体のアルファ鎖及びベータ鎖、CD3ゼータ、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8アルファ、CD8ベータ、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、GITR、NKp30、NKp44、NKp46等を挙げることができる。一実施態様において、膜貫通ドメインが由来するタンパク質は、CD8アルファまたはCD28である。

[0280] 用語「シグナル伝達ドメイン」は、第2メッセンジャーを生成したり、またはこのようなメッセンジャーに応答してエフェクターとして機能化したりすることにより規定のシグナル伝達経路を介して細胞活性を調節するために、細胞内の情報を伝えることによって作用するタンパク質の機能的な部分を指す。

[0281] 「細胞内シグナル伝達ドメイン」は、この用語が本開示において使用される場合、分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、キメラ受容体を含有する細胞、例えばキメラ受容体発現T細胞の免疫エフェクター機能を促進するシグナルを生成することができる。例えばキメラ受容体発現T細胞における、免疫エフェクター機能の例としては、細胞溶解活性およびヘルパー活性、例えばサイトカイン分泌などが挙げられる。実施態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、エフェクター機能シグナルを伝達し、細胞に特殊化した機能を実行させる、タンパク質の部分である。細胞内シグナル伝達ドメイン全体が採用される場合もあるが、多くの場合において鎖全体を使用することは必ずしも必要ではない。細胞内シグナル伝達ドメインのトランケートされた部分を使用される限りにおいて、このようなトランケートされた部分は、それがエフェクター機能シグナルを伝達しさえすれば無傷の鎖の代わりに使用することができる。したがって細胞内シグナル伝達ドメインという用語は、エフェクター機能シグナルを伝達するのに十分な細胞内シグナル伝達ドメインのあらゆるトランケートされた部分を包含することを意味する。

- [0282] ある実施態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞内シグナル伝達ドメインを含んでいてもよい。典型的な一次細胞内シグナル伝達ドメインとしては、一次刺激、または抗原依存性刺激 (antigen dependent simulation) に関与する分子由来のものが挙げられる。ある実施態様において、細胞内シグナル伝達ドメインは、共刺激細胞内ドメインを含んでいてもよい。典型的な共刺激細胞内シグナル伝達ドメインとしては、共刺激シグナル、または抗原非依存性刺激に関与する分子由来のものが挙げられる。例えば、キメラ受容体発現T細胞の場合において、一次細胞内シグナル伝達ドメインは、T細胞受容体の細胞質内配列を含んでいてもよいし、共刺激細胞内シグナル伝達ドメインは、補助受容体または共刺激分子からの細胞質内配列を含んでいてもよい。
- [0283] 用語「CD3ゼータ」は、本開示で使用する場合、総ての哺乳動物種、好ましくは、ヒトの分化抗原群3 (CD3) T細胞共受容体を意味する。哺乳動物では、CD3は、CD3ゼータ鎖、CD3デルタ鎖および2本のCD3イプシロン鎖を含んでなる。CD3ゼータ鎖 (例えば、NCBI RefSeq : NP_932170.1) は、キメラ受容体を操作するために使用可能な細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる。本開示の特定のキメラ受容体において、CD3-ゼータの一次シグナル伝達配列は、Genbank NM000734.3の細胞質領域配列 (ヌクレオチド配列299~634) 全長、もしくは一部であるか、または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基である。
- [0284] 一実施態様において、細胞内シグナル伝達ドメインはインターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインを含んでもよい。一実施態様において、細胞内シグナル伝達ドメインはCD28、4-1BB、ICOS、あるいは、複数のシグナル伝達ドメインを繋いだ、CD3ゼータ-CD28-4-1BBやCD3ゼータ-CD28-OX40を用いてもよい。一実施態様において、膜貫通ドメインが由来するタンパク質は、CD8アルファまたはCD28であり、かつ細胞内シグナル伝達ドメインはCD28、4-1BB、ICOS、あ

るいは、複数のシグナル伝達ドメインを繋いだ、CD3ゼータ-CD28-4-1BBやCD3ゼータ-CD28-OX40であってもよい。

[0285] 一実施態様において、i) 抗原結合分子の免疫受容体認識部位に結合し得る細胞外ドメイン、ii) 膜貫通ドメイン、およびiii) 細胞質共刺激ドメインおよび／またはインターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインと外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインとを含んでなる細胞内セグメント（ここで、前記細胞内セグメントは、内因性のまたは外因性JAK結合モチーフおよびSTAT5関連モチーフを含んでなる）を含んでなるキメラ受容体が開示される。ある実施形態では、これらのドメインは、場合により、N末端から始まって以上の順序で、直接的または間接的に融合される。ある実施形態では、細胞内セグメント内のこれらのドメインは、逆の順序で融合される。

[0286] 用語「刺激」は、刺激分子（例えば、TCR/CD3複合体またはキメラ受容体）とそのリガンド（またはキメラ受容体の場合は抗原結合分子の免疫受容体認識部位）との結合により誘導される一次応答を指し、それによって、これらに限定されないが、TCR/CD3複合体を介したシグナル伝達、またはキメラ受容体の適切なNK受容体もしくはシグナル伝達ドメインを介したシグナル伝達などの、シグナル伝達事象が媒介される。刺激は、ある特定の分子の変更された発現を媒介することもある。

[0287] 用語「刺激分子」は、免疫細胞シグナル伝達経路の少なくとも一部の態様に関して、刺激の形で免疫細胞の活性化を調節する細胞質内シグナル伝達配列をもたらす免疫細胞、例えば、T細胞、NK細胞またはB細胞によって発現される分子を指す。一態様において、シグナルは、例えば、TCR/CD3複合体とペプチドを提示したMHC分子との結合によって始動する一次シグナルであり、それにより、これらに限定されないが、増殖、活性化、分化、および同種のものなどのT細胞応答の媒介が起こる。刺激の形態で作用する一次細胞質内シグナル伝達配列（また、「一次シグナル伝達ドメイン」と

も称される)は、シグナル伝達モチーフを含有していてもよく、これは、免疫受容体チロシンベースの活性化モチーフまたはITAMとして知られている。本開示において特定の用途を有する細胞質内シグナル伝達配列を含有するITAMの例としては、これらに限定されないが、CD3ゼータ、共通FcRガンマ(FcER1G)、FcガンマRIIa、FcRベータ(FcイプシロンR1b)、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD22、CD79a、CD79b、CD278(「ICOS」)、FcイプシロンRI、CD66d、CD32、DAP10、DAP12、CLEC2、CLEC7A(Dectin1)、CLEC9A、EZRIN、RADIX1NおよびMOESIN由来のものが挙げられる。本開示の特定のキメラ受容体において、本開示のいずれか1つまたは複数のキメラ受容体における細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内シグナル伝達配列、例えばCD3ゼータの一次シグナル伝達配列を含む。本発明のキメラ受容体の細胞外ドメインは、上記の刺激分子の細胞外ドメインであってもよい。

[0288] 用語「共刺激分子」は、共刺激リガンドと特異的に結合することにより、これらに限定されないが増殖などのT細胞による共刺激応答を媒介する(二次シグナル)、T細胞上の同起源の結合パートナーを指す。共刺激分子は、効率的な免疫反応の一因となる、抗原受容体以外の細胞表面分子またはそれらのリガンドである。用語「共刺激細胞内シグナル伝達ドメイン」は、共刺激分子の細胞内部分を指す。細胞内シグナル伝達ドメインは、細胞内の部分全体、もしくはそれが得られた分子の天然型細胞内シグナル伝達ドメインの全体、またはそれらの機能的なフラグメントまたは誘導体を含んでいてもよい。共刺激分子としては、これらに限定されないが、MHCクラスI分子、TNF受容体タンパク質、免疫グロブリン様タンパク質、サイトカイン受容体、インテグリン、シグナル伝達リンパ球活性化分子(SLAMタンパク質)、活性化NK細胞受容体、BTLA、Tollリガンド受容体、OX40(CD134)、CD2、CD7、CD27、CD28、CD30、CD40、CDS、ICAM-1、LFA-1(CD11a/CD18)、4-1

BB (CD137)、B7-H3、CDS、ICAM-1、ICOS (CD278)、GITR、BAFFR、LIGHT、HVEM (LIGHTR)、KIRDS2、SLAMF7、NKp80 (KLRF1)、NKp44、NKp30、NKp46、CD19、CD4、CD5、CD8アルファ、CD8ベータ、IL2Rベータ、IL2Rガンマ、IL7Rアルファ、ITGA4、VLA1、CD49a、ITGA4、IA4、CD49D、ITGA6、VLA-6、CD49f、ITGAD、CD11d、ITGAE、CD103、ITGAL、CD11a、LFA-1、ITGAM、CD11b、ITGAX、CD11c、ITGB1、CD29、ITGB2、CD18、LFA-1、ITGB7、NKG2D、NKG2C、TNFR2、TRANCE/RANKL、DNAM1 (CD226)、SLAMF4 (CD244、2B4)、CD84、CD96 (Tactile)、CEACAM1、CRTAM、Ly9 (CD229)、CD160 (BY55)、PSGL1、CD100 (SEMA4D)、CD69、SLAMF6 (NTB-A、Ly108)、SLAM (SLAMF1、CD150、IPO-3)、BLAME (SLAMF8)、SELPLG (CD162)、LTBR、LAT、GADS、SLP-76、PAG/Cbp、CD19a、CD154およびCD83と特異的に結合するリガンドが挙げられる。本発明のキメラ受容体の細胞外ドメインは、上記の共刺激分子の細胞外ドメインであってもよい。

[0289] 一実施態様において、共刺激分子は、例えば、4-1BB (すなわちCD137)、CD27、CD28および/またはOX40から選択され、T細胞受容体刺激を増強する。

[0290] 用語「4-1BB」または「CD137」は、GenBank受託番号AA62478.2として提供される配列アミノ酸配列を有するTNFRスーパーファミリーの一員、または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基を指し、「4-1BB共刺激ドメイン」は、GenBank受託番号AA62478.2のアミノ酸残基214~255、または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿

および同種のものからの等価の残基と定義される。一態様において、「4-1 B B 共刺激ドメイン」は、Genbank NM001561.5のヌクレオチド配列886~1026配列の全長、もしくは一部または非ヒト種、例えばマウス、げっ歯類、サル、類人猿および同種のものからの等価の残基である。

[0291] 用語「核酸」または「ポリヌクレオチド」は、デオキシリボ核酸（DNA）またはリボ核酸（RNA）、および一本鎖または二本鎖いずれかの形態のそれらのポリマーを指す。用語「核酸」は、遺伝子、cDNAまたはmRNAを包含する。一実施形態において、核酸分子は、合成（例えば、化学的に合成された）核酸分子または組換え核酸分子である。特に限定されない限り、この用語は、参照核酸と類似の結合特性を有し、天然に存在するヌクレオチドと類似の方式で代謝される天然ヌクレオチドの類似体または誘導体を含む核酸を包含する。特に他の指定がない限り、特定の核酸配列はまた、それらの保存的に改変された変異体（例えば、縮重コドンの置換）、対立遺伝子、オーソログ、SNP、および相補配列、加えて明確に提示された配列も事実上包含する。具体的に言えば、縮重コドンの置換は、1つまたは複数の選択された（または全ての）コドンの第三の位置が混成の塩基および／またはデオキシイノシン残基で置換されている配列を生成することによって達成される可能性がある [Batzer et al., *Nucleic Acid Res.* 19:5081 (1991); Ohtsuka et al., *J. Biol. Chem.* 260:2605-2608 (1985); and Rossolini et al., *Mol. Cell. Probes* 8:91-98 (1994)]。

[0292] 用語「核酸配列」は、本開示で使用する場合、天然の塩基、糖および糖間（主鎖）結合からなるヌクレオシドまたはヌクレオチドモノマーの配列を意味する。この用語にはまた、非天然モノマーまたはその一部を含んでなる修飾または置換配列も含まれる。本出願の核酸配列はデオキシリボ核酸配列（DNA）またはリボ核酸配列（RNA）であり得、アデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシルを含む天然塩基が含まれる。これらの配列はまた、修飾塩基も含有し得る。このような修飾塩基の例には、アザおよびデアザアデニン、グアニン、シトシン、チミンおよびウラシル；ならびにキサ

ンチンおよびヒポキサンチンが含まれる。

[0293] 用語「単離された核酸」は、本開示で使用する場合、組換えDNA技術により生産される場合には細胞材料もしくは培養培地を、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まない核酸を意味する。単離された核酸はまた、その核酸が由来する、核酸に天然に隣接している配列（すなわち、その核酸の5'末端および3'末端に位置する配列）も実質的に含まない。用語「核酸」は、DNAおよびRNAを含むものとし、二本鎖または一本鎖のいずれでもよく、センスまたはアンチセンス鎖に相当する。さらに、用語「核酸」は、相補的核酸配列、例えば、cDNAを含む。

[0294] 用語「コード（すること）」は、ヌクレオチド（例えば、rRNA、tRNAおよびmRNA）の規定の配列またはアミノ酸の規定の配列のいずれかを有する、生物学的プロセスにおける他のポリマーおよび高分子の合成のための鋳型として役立つ、遺伝子、cDNA、またはmRNAなどのポリヌクレオチド中のヌクレオチドの特異的配列の固有の特性、およびそれにより生じる生物学的な特性を指す。したがって、細胞または他の生物系中で、遺伝子に対応するmRNAの転写および翻訳によりタンパク質が産生される場合、その遺伝子、cDNA、またはRNAは、タンパク質をコードする。そのヌクレオチド配列がmRNA配列と同一であり、通常配列表に示されるコード鎖と、遺伝子またはcDNAの転写のための鋳型として使用される非コード鎖はどちらも、その遺伝子またはcDNAのタンパク質または他の生成物をコードすると称することができる。

[0295] 特に他の規定がない限り、「アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列」は、互いの縮重型であるヌクレオチド配列や同じアミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列全てを包含する。また、タンパク質またはRNAをコードするヌクレオチド配列という成句は、いくつかの場合においてそのタンパク質をコードするヌクレオチド配列がイントロンを含有し得る程度にイントロンを包含していてもよい。また、核酸分子は、キメラ受容体の発現のため

の少なくとも1個の調節エレメントと作動可能なように結合され得る。

- [0296] 用語「ペプチド」、「ポリペプチド」、および「タンパク質」は、同義的に使用され、ペプチド結合により共有結合で連結されたアミノ酸残基で構成される化合物を指す。タンパク質またはペプチドは、少なくとも2つのアミノ酸を含有していなければならない、タンパク質またはペプチドの配列を構成し得るアミノ酸の最大数に制限はない。ポリペプチドは、互いにペプチド結合で合体した2つ以上のアミノ酸を含むあらゆるペプチドまたはタンパク質を包含する。この用語は、本開示で使用される場合、当業界では一般的に例えばペプチド、オリゴペプチドおよびオリゴマーとも称される短鎖と、当業界では一般的に多くのタイプが存在するタンパク質と称されるそれより長い鎖との両方を指す。「ポリペプチド」としては、例えば、なかでも生物学的に活性なフラグメント、実質的に相同なポリペプチド、オリゴペプチド、ホモ二量体、ヘテロ二量体、ポリペプチドの変異体、改変されたポリペプチド、誘導体、類似体、融合タンパク質が挙げられる。ポリペプチドとしては、天然ペプチド、組換えペプチド、またはそれらの組合せが挙げられる。
- [0297] 本開示におけるポリペプチドとは、通常、10アミノ酸程度以上の長さを有するペプチド、およびタンパク質を指す。N末端からC末端までペプチド結合でつながるアミノ酸の連鎖を一連のペプチド鎖とする場合、本開示のポリペプチドは、複数の一連のペプチド鎖がS-S結合、疎水性相互作用、イオン結合等の相互作用により形成された複合体タンパク質であっても良い。
- [0298] 用語「単離されたポリペプチド」は、「単離されたタンパク質」とも呼ばれ、組換えDNA技術により生産される場合には細胞材料もしくは培養培地を、または化学合成される場合には化学前駆体もしくは他の化学物質を実質的に含まないポリペプチドを意味する。
- [0299] 用語「アミノ酸」は、天然アミノ酸ならびに修飾アミノ酸の総てを含む。
- [0300] 「保存的アミノ酸バリエーション」は、本開示で使用する場合、そのタンパク質の所望の特性を損なうことなくあるアミノ酸残基が別のアミノ酸残基で置換されているものである。

[0301] 本出願において具体的に示されるアミノ酸配列は、保存的配列改変を含んでいてもよい。ここで「保存的配列改変」とは、そのアミノ酸配列を含有する抗体または抗体フラグメントの結合特徴に有意に影響を与えたりまたは変更したりしないアミノ酸変異を指す。このような保存的改変としては、アミノ酸の置換、付加および欠失が挙げられる。改変は、部位特異的変異誘発およびPCR介在変異誘発などの当業界公知の標準的な技術によって本開示の抗体または抗体フラグメントに導入することができる。保存的アミノ酸置換とは、アミノ酸残基が類似の側鎖を有するアミノ酸残基で置き換えられる置換である。類似の側鎖を有するアミノ酸残基のファミリーは、当業界において定義されている。これらのファミリーは、塩基性側鎖を有するアミノ酸（例えば、リシン、アルギニン、ヒスチジン）、酸性側鎖（例えば、アスパラギン酸、グルタミン酸）、非荷電性極性側鎖（例えば、グリシン、アスパラギン、グルタミン、セリン、スレオニン、チロシン、システイン、トリプトファン）、非極性側鎖（例えば、アラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、プロリン、フェニルアラニン、メチオニン）、ベータ分岐側鎖（例えば、スレオニン、バリン、イソロイシン）および芳香族側鎖（例えば、チロシン、フェニルアラニン、トリプトファン、ヒスチジン）を包含する。したがって、本開示のキメラ受容体内の1つまたは複数のアミノ酸残基が、同じ側鎖ファミリーの他のアミノ酸残基で置き換えられていてもよく、変更されたキメラ受容体は、本開示で説明される機能アッセイを使用してテストすることができる。

[0302] 用語「発現」は、プロモーターによって駆動される特定のヌクレオチド配列の転写および／または翻訳を指す。

[0303] 本開示中の「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、本開示では含まれる。

[0304] 本開示中の「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、本開示では「発現ベクター」とも称される。

[0305] トランスフェクションとは、実際に任意のコード化配列が発現するかどうか分からない宿主細胞による発現ベクターの取り込みを意味する。トランスフェクションの多くの方法は、通常の技能を有する技術者に知られており、例えば、 CaPO_4 沈降法及び電気穿孔法がある。一般に成功したトランスフェクションは、宿主細胞内で該ベクターの働きの兆候が現れた時に認識される。

[0306] 用語「プロモーター」は、ポリヌクレオチド配列の特異的転写を開始させるのに必要な、細胞の合成機構によって認識されるDNA配列、または導入された合成機構を指す。

[0307] 用語「レンチウイルス」は、レトロウイルス科の属の1つを指す。レンチウイルスは、レトロウイルスのなかでも非分裂細胞に感染することができるという点で独特であり、これらは、宿主細胞のDNAに相当量の遺伝情報をデリバリーすることができることから、遺伝子デリバリーベクターの最も効率的な方法の1つである。HIV、SIV、およびFIVが、レンチウイルスの全ての例である。

[0308] 用語「レンチウイルスベクター」は、レンチウイルスゲノムの少なくとも一部に由来するベクターを指し、特に、Milone et al., Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)で示されるような自己不活性化レンチウイルスベクターが挙げられる。診療施設で使用される可能性があるレンチウイルスベクターの

他の例としては、これらに限定されないが、例えば、Oxford Bio Medica製のLENTIVECTOR（登録商標）遺伝子デリバリー技術、Lentigen製のLENTIMAX（商標）ベクター系および同種のものが挙げられる。非臨床タイプのレンチウイルスベクターも利用可能であり、ベクターの選択および作成は当業者が適宜行うことができる。

[0309] 本開示において、用語「薬学的に許容される」は、哺乳動物(例えば、ヒト)に投与したときに、生理学的に耐容性であり、典型的に望ましくない反応を生じない、このような組成物の分子実体および他の成分をいう。好ましくは、本開示における「薬学的に許容される」は、哺乳動物、より具体的にヒトにおける使用について、連邦政府もしくは州政府の規制当局に承認されたまたは米国薬局方もしくは他の一般に認識されている薬局方に記載されていることを意味する。

[0310] 一つの態様において、本開示のキメラ受容体は、ここに記載する2個のシグナル伝達ドメイン、すなわち、CD3ゼータおよび4-1BB/CD137あるいはCD3ゼータに加えて1個以上のシグナル伝達ドメインを含む。一つの特定の態様において、数個のシグナル伝達ドメインが、相加的または相乗的作用のために互いに融合している。有用な付加的シグナル伝達ドメインの非限定的例は、TCRゼータ鎖、CD27、CD28、OX40/CD134、4-1BB/CD137、FcγR1、ICOS/CD278、ILRB/CD122、IL-2RG/CD132、DAP-10およびCD40の1個以上の一部または全てを含む。

[0311] 本開示では、i) 所定の抗原に抗原結合分子を介して結合し得る細胞外ドメイン、ii) 膜貫通ドメイン、およびiii) 細胞質共刺激ドメインおよび/またはインターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインと外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインとを含んでなる細胞内セグメント（ここで、前記細胞内セグメントは、内因性のまたは外因性JAK結合モチーフおよびSTAT5関連モチーフを含んでなる）を含んでなるキメラ

受容体が開示される。ある実施形態では、これらのドメインは、場合により、N末端から始まって以上の順序で、直接的または間接的に融合される。ある実施形態では、細胞内セグメント内のこれらのドメインは、逆の順序で融合される。

[0312] また、本開示では、i) 抗原結合分子を介して結合し得る細胞外ドメイン、ii) 膜貫通ドメイン、およびiii) インターロイキン(IL)受容体鎖の細胞質ドメインおよび場合により少なくとも1つの補足的細胞質ドメインを含む1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメント、を含んでなるキメラ受容体も含む。ある実施形態では、これらのドメインは、場合により、N末端から始まって以上の順序で、直接的または間接的に融合される。1つの実施形態では、細胞内セグメント内のこれらのドメインは、逆の順序で融合される。

[0313] いくつかの実施形態では、IL受容体鎖は、膜貫通ドメインの近位にあり、および／またはキメラ受容体細胞内セグメントのN末端に近い、またはN末端を形成する。他の実施形態では、IL受容体鎖は、キメラ受容体の細胞内セグメントのC末端に近い、またはC末端を形成する。いくつかの実施形態では、IL受容体鎖は、外因性STAT3関連モチーフYXXQを含んでなるCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインの上流またはN末端側にある。

[0314] 細胞内セグメントがIL受容体鎖のシグナル伝達ドメインのみを含んでなる実施形態では、キメラ受容体発現細胞は、内因性TCRを介してMHC複合体内に存在する所定の抗原によって、および／または内因性CD28を介してCD80/86分子によって、例えば、B細胞によって活性化され得る。

[0315] また、本開示のキメラ受容体を発現する細胞も提供される。このような細胞は、例えば、キメラ受容体を発現しない親細胞に比べて、抗原結合分子を介してキメラ受容体が結合する所定の／予め選択された抗原をその表面に有する細胞に対して高い細胞傷害活性を持ち得る。例えば、実施例に示される

ように、本開示のキメラ受容体受容体を発現する細胞は、抗原結合分子を投与することにより、抗原結合分子依存的かつ癌抗原腫瘍抗原依存的な抗腫瘍効果を提供する。よって、ヒトでの抗腫瘍効果も期待される。

[0316] 本開示のキメラ受容体を発現する細胞においては、本開示のキメラ受容体が発現していればよく、その他の形質導入がされていてもよい。

[0317] 本開示によるキメラ受容体の細胞内セグメントは、1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなり得、同じ分子内に存在する細胞外ドメインがそのコグネイト抗原／リガンドと結合（相互作用）する際に細胞にシグナルを伝達し得る、タンパク質性分子である。

[0318] ある側面において、キメラ受容体細胞内セグメントは、外因性S T A T 3関連モチーフを含んでなるC D 3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる。加えて、キメラ受容体細胞内セグメントは、I L受容体鎖の細胞質ドメインおよび／または細胞質共刺激ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなり、前記細胞内セグメントは、内因性または外因性J A K結合モチーフおよびS T A T 5関連モチーフを含んでなる。

[0319] 一次細胞質シグナル伝達配列は、T C R複合体の一次活性化を調節する。例えば、C D 3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインは、一次細胞質シグナルを提供する。一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン活性化モチーフ（I T A M）[Nature, vol. 338, pp. 383-384 (1989)]として知られるシグナル伝達モチーフを含んでいてもよい。他方、阻害的に働く一次細胞質シグナル伝達配列は、免疫受容体チロシン阻害モチーフ（I T I M）[J Immunol., vol. 162, No. 2, pp. 897-902 (1999)]として知られるシグナル伝達モチーフを含んでいてもよい。本開示では、I T A Mおよび／またはI T I Mを有する細胞内シグナル伝達ドメインを使用することができる。

[0320] 本開示において、C D 3ゼータの細胞内ドメインは、免疫受容体チロシン活性化モチーフ（I T A M）を含んでなる。使用可能なI T A Mを有する細胞内シグナル伝達ドメインの例は、例えば、C D 3ゼータの代わりに、また

はCD3ゼータと置き換えて、FcRガンマ、FcRベータ、CD3ガンマ、CD3デルタ、CD3イプシロン、CD5、CD22、CD79a、CD79b、およびCD66dに由来するITAMを有する細胞内シグナル伝達ドメインを含む。具体的には、1以上のITAMを含んでなる細胞内ドメインの例には、CD3ゼータ (NCBI RefSeq: NP_932170.1) のアミノ酸番号52~164、FcイプシロンRIガンマ (NCBI RefSeq: NP_004097.1) のアミノ酸番号45~86、FcイプシロンRIベータ (NCBI RefSeq: NP_000130.1) のアミノ酸番号201~244、CD3ガンマ (NCBI RefSeq: NP_000064.1) のアミノ酸番号139~182、CD3デルタ (NCBI RefSeq: NP_000723.1) のアミノ酸番号128~171、CD3イプシロン (NCBI RefSeq: NP_000724.1) のアミノ酸番号153~207、CD5 (NCBI RefSeq: NP_055022.2) のアミノ酸番号402~495、CD22 (NCBI RefSeq: NP_001762.2) のアミノ酸番号707~847、CD79a (NCBI RefSeq: NP_001774.1) のアミノ酸番号166~226、CD79b (NCBI RefSeq: NP_000617.1) のアミノ酸番号182~229、およびCD66d (NCBI RefSeq: NP_001806.2) のアミノ酸番号177~252の配列を有するペプチド、ならびにこれらのペプチドと同じ機能を有するそれらの変異体が含まれる。本明細書に記載のNCBI RefSeq IDまたはGenBankのアミノ酸配列情報に基づくアミノ酸番号は、各タンパク質の前駆体 (シグナルペプチド配列などを含んでなる) の全長に基づいて符番されている。

[0321] ある実施形態では、STAT3関連モチーフYXXQにおいて「X」で表されるアミノ酸残基は、STAT3結合を保持するいずれの修飾天然アミノ酸も含む、任意の天然アミノ酸であり得る。1つの実施形態では、アミノ酸Xは、ロイシン、アルギニン、ヒスチジン、フェニルアラニン、リシン、プ

ロリン、メチオニン、バリン、グルタミン、トレオニン、アスパラギン酸から独立に選択される。例えば、アミノ酸Xはアルギニンである。例えば、アミノ酸Xはヒスチジンである。

[0322] ある実施形態では、STAT3関連モチーフYXXQのチロシン残基に隣接する2つのアミノ酸残基は、アルギニン-ヒスチジンである。さらに別の実施形態では、外因性STAT3関連モチーフは、YRHQである。

[0323] 外因性STAT3関連モチーフYXXQはCD3ゼータの細胞内ドメインのどの部分に導入されてもよいが、ある実施形態では、YXXQ関連モチーフはC末端領域付近に挿入される。特定の理論に縛られることを望むものではないが、多くの内因性YXXQモチーフは、C末端から100aa付近またはそれ以内に配置され则认为られる。また、C末端領域付近にあるYXXQモチーフは、GP130およびLIFR研究でより近位にある方が機能性が高いことが示されている(Schmitz J et al. J Immunol. 2000;164:848-54; Tomida M et al. Blood. 1999;93:1934-41)。

[0324] ある実施形態では、外因性STAT3関連モチーフYXXQは、キメラ受容体のC末端から200アミノ酸残基内にあるCD3ゼータの細胞内ドメインの任意の部分に導入される。例えば、STAT3関連モチーフは、キメラ受容体のC末端から200アミノ酸残基内、150アミノ酸残基内、100アミノ酸残基内、90アミノ酸残基内、80アミノ酸残基内、70アミノ酸残基内、60アミノ酸残基内、50アミノ酸残基内、40アミノ酸残基内、30アミノ酸残基内、20アミノ酸残基内または10アミノ酸残基内に導入される。1つの実施形態では、外因性STAT3関連モチーフは、ITAM以外の場所に導入される。

[0325] ある実施形態では、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3ゼータ細胞内ドメインは、少なくとも1つのITAMモチーフを含んでなる。1つの実施形態では、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3ゼータ細胞内ドメインは、2つのITAMモチーフを含んでなる。さらなる実施形態では、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3ゼータ細胞

内ドメインは、3つのITAMモチーフを含んでなる。

[0326] 当業者は、CD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインにSTAT3関連モチーフを導入するためにいくつかの方法が使用可能であることを認識する。例えば、外因性STAT3関連モチーフは、CD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインのアミノ酸残基104～106位のアミノ酸残基Leu-His-Metを残基104番のチロシンとそのチロシン残基に105番および106番で隣接する任意の他の2個のアミノ酸残基で置換することにより導入することができる。CD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインのアミノ酸残基104-105-106は、全長CD3ゼータ（例えば、NCBI RefSeq: NP_932170.1）のアミノ酸残基156-157-158に相当する。

[0327] 記載のように、ある実施形態におけるキメラ受容体は、IL受容体鎖および細胞質共刺激ドメインの細胞質ドメインから選択される1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメントを含んでなる。

[0328] 本開示において、IL受容体鎖の細胞質ドメインは、IL受容体の任意の鎖から選択することができ、例えば、IL-2受容体ベータ鎖（NCBI RefSeq: NP_000869.1）（IL-21受容体アルファ鎖（NCBI RefSeq: NP_068570.1）のアミノ酸番号256～538）のアミノ酸番号266～551、共通IL-2受容体ガンマ鎖（NCBI RefSeq: NP_000197.1）のアミノ酸番号284～369、IL-7Rアルファ（NCBI RefSeq: NP_002176.2）のアミノ酸番号265～459、IL-9Rアルファ（NCBI RefSeq: NP_002177.2）のアミノ酸番号292～521またはIL-4Rアルファ（NCBI RefSeq: NP_000409.1）のアミノ酸番号257～825を含んでなる細胞質ドメインが使用可能である。IL受容体鎖の細胞質ドメインの全領域が使用可能である。

[0329] あるいは、IL受容体（ILR）鎖の前記細胞質ドメインの末端切断フラグメントも使用可能である。例えば、末端切断フラグメントは、ILR細胞

質ドメインの250までのアミノ酸を含んでなるか、または50～200アミノ酸もしくは80～150アミノ酸である。

[0330] ある実施形態では、IL受容体鎖の細胞質ドメイン、場合により、IL受容体鎖の前記細胞質ドメインの末端切断フラグメントは、少なくともSTAT関連モチーフ、場合により、STAT5関連モチーフ、とJAK結合モチーフ（box-1モチーフとしても知られる）とを含んでなる。ある実施形態では、IL受容体鎖の細胞質ドメインまたはその末端切断フラグメントは、STAT5関連モチーフとJAK結合モチーフとを含んでなる。

[0331] ある実施形態では、IL受容体鎖の細胞質ドメインおよび／または末端切断フラグメントには、同じ機能を有する変異体、例えば、STATシグナル伝達、場合により、STAT5シグナル伝達および／またはJAKシグナル伝達を誘導する変異体が含まれる。

[0332] 本開示の1つの側面では、IL-2受容体（IL-2R）ベータ鎖の細胞質ドメインが使用可能である。本開示で使用可能なIL-2Rベータ鎖の細胞質ドメインの例には、IL-2Rベータ鎖（NCBI RefSeq: NP_000869.1）のアミノ酸番号266～551が含まれる。一実施態様において、アミノ酸番号266～337および530～551の配列のいずれかを有するペプチドが含まれる。本開示の1つの側面では、IL-2Rベータ鎖の細胞質ドメインの末端切断フラグメントが使用可能である。この末端切断フラグメントは、i) チロシンキナーゼJAK1との会合を可能とする、BOX-1モチーフとも呼ばれる、JAK結合モチーフ（例えば、NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号278～286）、およびii) STAT関連モチーフ、場合により、STAT5またはSTAT3関連モチーフを含んでいてもよい。IL受容体鎖の他の部分は、例えば、保存的アミノ酸バリエーションによって変更可能である。

[0333] ある実施形態では、細胞内セグメントは、外因性JAK結合モチーフ、またはJAK結合モチーフを含んでなるシグナル伝達分子を含んでいてもよい。

。例えば、JAK結合モチーフは、IL2Rガンマ（IL2RG）、エリスロポエチン受容体（EpoR）、トロンボポエチン受容体（TpoR）、顆粒球マクロファージコロニー刺激因子受容体（GM-CSFR）、および成長ホルモン受容体（GHR）に由来する。

[0334] IL-2R ベータ鎖は、STAT5会合に使用される3つの機能的STAT5結合モチーフ、YFFF、YCTFおよびYLSLを含んでなる。これらのチロシン残基の変異は、IL-2R ベータ鎖のIL-2反応性を無効にし得る(Friedmann et al., 1996)。エリスロポエチン受容体（EpoR）は、STAT5の活性化を媒介する2つのチロシン残基、すなわち、Y343とY401を含んでなり、両方ともYXXLモチーフを有することが記載されている(Klingmuller et al., 1996)。従って、YXXLは、STAT5の動員に好ましいモチーフであり得る。例えば、IL-2R ベータ鎖STAT5結合モチーフで示されているように、他のアミノ酸残基も機能的である。1つの実施形態では、STAT5関連モチーフは、IL-2R ベータ鎖STAT5関連モチーフであり、チロシン残基-510（チロシン残基510は、NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号536である）を含んでなる。

[0335] ある実施形態では、STAT5関連モチーフは、IL2Rガンマ、EpoR、TpoR、GM-CSFRおよびGHRに由来し得る。

[0336] ある実施形態では、IL-2R ベータ鎖のSTAT5関連モチーフは、アミノ酸残基YXXLを含んでなる。ある実施形態では、STAT5関連モチーフにおいて「X」で表されるアミノ酸残基は、STAT5結合を保持する任意の修飾天然アミノ酸を含む、任意の天然アミノ酸であり得る。

[0337] 同様に、細胞内セグメントは、細胞内シグナル伝達ドメインのいずれに配置または導入することもできる1以上のJAK結合モチーフを含んでなる。

[0338] 本開示の1つの側面では、IL-21受容体（IL-21R）アルファ鎖の細胞質ドメインが使用可能である。本開示で使用されるIL-21R アルファ鎖の細胞質ドメインの例には、IL-21R アルファ鎖のアミノ酸

番号256～538 (NCBI RefSeq: NP_068570.1) を含んでなる細胞内シグナル伝達ドメインが含まれる。本開示の1つの側面で、IL-21R アルファ鎖の細胞質ドメインの末端切断フラグメントが使用可能である。末端切断フラグメントには、チロシンキナーゼJAK1との会合に必要なbox-1モチーフ (NCBI RefSeq: NP_068570.1のアミノ酸番号266～274) が含まれ、また、STAT関連モチーフが含まれる。ある実施形態では、STAT関連モチーフは、チロシン残基-500 (NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号519) およびSTAT1/3会合に必要とされるチロシン残基500、すなわち、YLRQのC末端側に隣接する3残基を含んでなる。

[0339] 細胞内シグナル伝達ドメインの他の例には、TCR複合体および／または共刺激分子に由来する細胞質領域、およびそれらの配列と同じ機能を有する任意の変異体が含まれる。他の例には、引用することにより本明細書の一部とされるSadelain et al 2009の表2に挙げられている細胞質シグナル伝達ドメインが含まれる。

[0340] 天然T細胞の活性化は、2つの異なる種類の細胞内シグナル伝達ドメイン、すなわち、TCR複合体を介して抗原依存的一次活性化（例えばCD3ゼータにより提供される、例えば、一次細胞質シグナル）を誘導するためのドメインおよび二次または共刺激シグナル（二次細胞質シグナル）を提供するために抗原非依存的に作用するドメインにより伝達される。

[0341] 本開示で使用可能な二次または共刺激細胞質シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内ドメインの例には、CD2、CD4、CD5、CD8アルファ、CD8ベータ、CD28、CD134、CD137 (4-1BB)、ICOS、およびCD154、例えば、シグナル伝達モチーフを含んでなるその末端切断フラグメント、に由来する配列が含まれる。その具体例には、CD2 (NCBI RefSeq: NP_001758.2) のアミノ酸番号236～351、CD4 (NCBI RefSeq: NP_000607.1) のアミノ酸番号421～458、CD5 (NCBI RefSeq: NP

__055022, 2) のアミノ酸番号402～495、CD8アルファ (NCBI RefSeq: NP__001759, 3) のアミノ酸番号207～235、CD8ベータ (GenBank: AAA35664, 1) のアミノ酸番号196～210、CD28 (NCBI RefSeq: NP__006130, 1) のアミノ酸番号180～220、CD137 (4-1BB, NCBI RefSeq: NP__001552, 2) のアミノ酸番号214～255、CD134 (OX40, NCBI RefSeq: NP__003318, 1) のアミノ酸番号241～277、およびICOS (NCBI RefSeq: NP__036224, 1) のアミノ酸番号166～199の配列のいずれかを有するペプチド、およびこれらのペプチドが有するものと同じ機能を有するそれらの変異体が含まれる。

[0342] 好ましい開示は、1つの側面において、外因性STAT3関連モチーフを含んでなるCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインに加えて、1以上の、例えば、2または3の細胞内シグナル伝達ドメインを有する細胞内セグメントを含んでなるキメラ受容体を含む。

[0343] 本開示はまた、直列された2以上の同じ細胞内シグナル伝達ドメインを有する細胞内セグメントを含んでなるキメラ受容体を含む。1つの側面において、本開示は、IL受容体の細胞質ドメインがCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインのN末端側にあるキメラ受容体、すなわち、IL受容体の細胞質ドメインとCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインが、N末端側からこの順序で連結されたものを含んでなるキメラ受容体を提供する。本開示はまた、上述のキメラ受容体にCD28（例えば、CD28の細胞質共刺激ドメイン）の細胞内ドメインをさらに付加することにより得られるキメラ受容体、すなわち、CD28の細胞内シグナル伝達ドメインと、IL受容体の細胞質ドメインと、外因性STAT3モチーフを含んでなるCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインとが、N末端側からこの順序で連結されたものを含んでなるキメラ受容体も含む。

[0344] ある実施形態では、キメラ受容体は、外因性STAT3関連モチーフと、

インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインおよび細胞質共刺激ドメインから選択される細胞内シグナル伝達ドメインとを含んでなる、CD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメントを含んでなり、ここで、細胞内シグナル伝達ドメインの少なくとも1つは、内因性のまたは外因性JAK結合モチーフおよびSTAT5関連モチーフを含んでなる。

[0345] 1つの実施形態では、キメラ受容体は、外因性STAT3関連モチーフを有するCD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインと、内因性または外因性JAK結合モチーフおよびSTAT5関連モチーフを含んでなるIL受容体鎖フラグメントの細胞質ドメインと、CD28の細胞質共刺激ドメインとを含んでなる。

[0346] 本開示のキメラ受容体では、オリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカーが、細胞内セグメントのドメイン間に、そこでドメインを連結するように、および／またはそれらを他のドメインと連結するように挿入できる。例えば、2～10アミノ酸長を有するリンカーが使用できる。特に、グリシン-セリン連続配列を有するリンカーが使用できる。例えば、リンカーLDGGGSGGGGSGGGGSを、CD28細胞質ドメインと部分的細胞質IL-2受容体ベータドメインの間に挿入することができる。例えば、リンカーKLGGSGPを、部分的細胞質IL-2受容ベータドメインとおよびCD3ゼータ鎖の細胞内ドメインの間に挿入することができる。

[0347] 別の側面では、i) 抗原結合分子の免疫受容体認識部位に結合し得る細胞外ドメイン、ii) 膜貫通ドメイン、およびiii) インターロイキン受容体鎖の細胞質ドメインおよび場合により補足的細胞質ドメインを含む1以上の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメント、を含んでなるキメラ受容体が提供される。

[0348] IL受容体鎖の細胞質ドメインは、本明細書に記載のIL受容体のいずれの鎖から選択されてもよい。IL受容体鎖の細胞質ドメインの全領域が使用可能である。あるいは、IL受容体鎖の前記細胞質ドメインの末端切断フラグメントもまた使用可能である。全長およびその末端切断フラグメントの例

は本明細書に示される。

- [0349] ある実施形態では、末端切断フラグメントは、本明細書に記載の、少なくとも1つのチロシンキナーゼ関連モチーフ（box-1モチーフとしても知られる）およびSTAT（シグナル伝達転写活性化因子）関連モチーフを含んでいてもよい。例えば、末端切断フラグメントは、ILR細胞質ドメインの250までのアミノ酸を含んでなるか、または50～200アミノ酸もしくは80～150アミノ酸である。
- [0350] IL-2R ベータ鎖のSTAT関連モチーフは、チロシン残基-510（チロシン残基510は、NCBI RefSeq: NP_000869.1のアミノ酸番号536である）を含んでなる。ある実施形態では、STAT関連モチーフは、チロシン残基510と、チロシン残基510のC末端側に隣接する4残基、すなわち、YLSLQを含んでなる。
- [0351] 他のSTAT関連モチーフも知られており、例えば、IL-6のYXXQ、場合により、YXPQ、IL-10のYXXQ、IL-12のYLP SNID、IL-2のYLSLQ、YCTFP、YFFFH、IL-7のYVTMS、IL-9のYLPQE、ならびにIL-4のYKAFSおよびYKPFQが含まれる。いずれのSTATシグナル伝達ドメインも使用可能であり、および／またはILR鎖に導入できる。
- [0352] ある実施形態では、IL受容体の細胞質ドメインに加えて、キメラ受容体細胞内セグメントは、IL受容体内に存在するもの以外の少なくとも1つの補足的シグナル伝達ドメインを含んでなる。細胞内シグナル伝達ドメインの例には、TCR複合体由来の細胞質領域および／または共刺激分子、およびそのような配列と同じ機能を有する任意の変異体が含まれる。他の例としては、引用することにより本明細書の一部とされるSadelain et al 2009の表2に挙げられている細胞質シグナル伝達ドメインが含まれる。
- [0353] 本開示は、IL受容体の細胞質ドメインに加えて、1以上、例えば、2または3の細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメントを含んでなるキメラ受容体を含む。例えば、キメラ受容体は、IL受容体の細胞質

ドメインおよびCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる。
例えば、キメラ受容体は、IL受容体の細胞質ドメイン、CD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインおよびCD28の細胞質共刺激ドメインを含んでなる。

[0354] ある実施形態では、キメラ受容体は、CD3ゼータ細胞内シグナル伝達ドメインを含んでなる細胞内セグメント、1以上の細胞質共刺激ドメインを含んでなり、ここで、前記細胞内セグメントは、JAK結合モチーフ、STAT5および／またはSTAT3関連モチーフを含んでなる。

[0355] 本開示のキメラ受容体は、膜貫通ドメインを含んでなる。膜貫通ドメインは、天然ポリペプチドに由来してもよく、または人工的に設計されてもよい。天然ポリペプチド由来の膜貫通ドメインは、膜結合または膜貫通タンパク質から得ることができる。例えば、T細胞受容体アルファまたはベータ鎖、CD3ゼータ鎖、CD28、CD3イプシロン、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、ICOS、CD154、またはGITRの膜貫通ドメインが使用可能である。人工的に設計された膜貫通ドメインは、主として、ロイシンおよびバリンなどの疎水性残基を含んでなるポリペプチドである。例えば、フェニルアラニン、トリプトファンおよびバリンのトリプレットが合成膜貫通ドメインの各末端に見られ得る。場合により、短鎖オリゴペプチドリンカーまたはポリペプチドリンカー、例えば、2～10アミノ酸長のリンカーを、本明細書に記載の膜貫通ドメインと細胞内セグメントの間に配置することができる。特に、グリシン-セリン連続配列を有するリンカー配列が使用可能である。

[0356] 例えば、CD28 (NCBI RefSeq: NP_006130.1) のアミノ酸番号153～179の配列のいずれかを有する膜貫通ドメインが膜貫通ドメインとして使用できる。

[0357] 本開示のキメラ受容体では、スペーサドメインを、細胞外ドメインと膜貫通ドメインの間、または細胞内セグメントと膜貫通ドメインの間に配置す

ることができる。スペーサドメインは、膜貫通ドメインを細胞外ドメインと、および／または膜貫通ドメインを細胞内セグメントと連結する働きをするいずれのオリゴペプチドまたはポリペプチドも意味する。スペーサドメインは、300個までのアミノ酸、例えば、約10～100個のアミノ酸、または約25～50個のアミノ酸を含んでなる。

[0358] スペーサドメインは、好ましくは、抗原結合分子を介してのキメラ受容体の抗原との結合を促進し、かつ、細胞へのシグナル伝達を増強する配列を有する。結合を促進することが期待されるアミノ酸の例には、システイン、荷電アミノ酸、ならびに潜在的グリコシル化部位内のセリンおよびトレオニンが含まれ、これらのアミノ酸は、スペーサドメインを構成するアミノ酸として使用することができる。

[0359] ある実施形態では、スペーサドメインは、CD8アルファ（NCBI RefSeq: NP_001759.3）のアミノ酸番号118～178、すなわち、CD8アルファのヒンジ領域、CD8ベータ（GenBank: AAA35664.1）のアミノ酸番号135～195、CD4（NCBI RefSeq: NP_000607.1）のアミノ酸番号315～396、CD28（NCBI RefSeq: NP_006130.1）のアミノ酸番号114～152、またはそれらの一部を含んでなるか、またはからなるポリペプチドである。さらに、スペーサドメインは人工的合成された配列であってもよい。

[0360] 本開示のキメラ受容体は、ポリマー、特に、二量体を形成するように設計することができる。例えば、例えばジスルフィド結合を介してキメラ受容体を重合（二量体化）するために、システインがスペーサドメインおよび／または膜貫通ドメインに挿入される。

[0361] さらに、本開示のキメラ受容体では、シグナルペプチド配列をN末端に連結することができる。シグナルペプチド配列は、多くの分泌タンパク質および膜タンパク質のN末端に存在し、15～30アミノ酸長を有する。本明細書に記載の細胞内ドメインを有するタンパク質分子の多くは膜タンパク質で

あり、シグナルペプチド配列を有する。このような分泌タンパク質および膜タンパク質に由来するシグナルペプチドは、本開示のキメラ受容体のシグナルペプチドとして使用可能である。いずれのシグナルペプチドも使用可能である。例えば、シグナルペプチドは、オンコスタチンMシグナルペプチドであり得る。シグナルペプチドは、ヒト由来であってよく、また、非ヒト、例えば、昆虫細胞またはウイルス由来であってもよい。ある実施形態では、シグナルペプチドは、ヒトシグナルペプチドである。

[0362] 本開示は、本明細書に記載のキメラ受容体をコードする核酸を提供する。キメラ受容体をコードする核酸は、示されたキメラ受容体のアミノ酸配列から常法により容易に作製することができる。アミノ酸配列をコードするヌクレオチド配列は、各ドメインのアミノ酸配列に関する上述のNCBI RefSeq IDまたはGenBank受託番号から取得することができ、標準的な分子生物学的および／または化学的手順を用いて本開示の核酸を作製することができる。例えば、ヌクレオチド配列に基づいて核酸を合成することができ、cDNAライブラリからポリメラーゼ連鎖反応（PCR）を用いて得られたDNAフラグメントを組み合わせることによって本開示の核酸を作製することができる。

[0363] 本開示の核酸は、好適なプロモーターの制御下で発現されるように別の核酸に連結することができる。プロモーターの例には、遺伝子または作動可能に連結された構築物の発現を構成的に促進するプロモーター、薬物などの（例えば、テトラサイクリンまたはドキソルビシン）の作用により遺伝子または作動可能に連結された構築物の発現を誘導するプロモーターが含まれる。本開示の核酸はまた、核酸の効率的な転写を得るために、プロモーターまたは転写開始部位と協働する他の調節エレメント、例えば、エンハンサー配列またはターミネーター配列を含んでなる核酸と連結することもできる。本開示の核酸に加え、核酸の発現を確認するためのマーカーとなり得る遺伝子（例えば、薬剤耐性遺伝子、リポーター酵素をコードする遺伝子、または蛍光タンパク質をコードする遺伝子）を組み込んでもよい。

- [0364] ある実施形態では、核酸は、特定の宿主での発現のためにコドンが最適化された核酸である。
- [0365] 本開示のキメラ受容体を発現する細胞を生産するための方法は、本明細書に記載のキメラ受容体をコードする核酸を細胞に導入する工程を含む。この工程は、*ex vivo*で行われる。例えば、細胞を、本開示のキメラ受容体を発現する細胞を生産するように *ex vivo* にて本開示の核酸を運ぶウイルスベクターまたは非ウイルスベクターで形質転換することができる。
- [0366] 本開示の方法では、哺乳動物由来の細胞、例えば、ヒト細胞、またはサル、マウス、ラット、ブタ、ウマ、またはイヌなどの非ヒト哺乳動物由来の細胞を使用することができる。
- [0367] 1つの実施形態では、哺乳動物はヒトである。
- [0368] 本開示によれば、キメラ受容体、前記キメラ受容体をコードする核酸、前記キメラ受容体を発現する細胞、および該細胞を含んでなる組成物が提供される。ある実施形態では、上記の1以上が腫瘍抗原などの抗原を標的とする養子免疫遺伝子療法の分野で、および／またはスクリーニングもしくはその他のインビトロ (*in vitro*) アッセイで使用され得る。本開示のキメラ受容体を細胞に導入し、例えば、その細胞においてキメラ受容体の発現量の増強または上昇を得ることができる。このような細胞は、標的抗原を発現する細胞に対して細胞傷害活性を発揮し得る。
- [0369] a) 哺乳動物から免疫細胞を単離すること（場合により、前記免疫細胞はT細胞である）；
- b) 単離された免疫細胞（場合により、T細胞）を、本明細書に記載のキメラ受容体をコードする核酸でトランスフェクトまたは形質導入すること；
- および
- c) 場合により、トランスフェクションまたは形質導入後にキメラ受容体発現細胞（場合により、キメラ受容体発現T細胞）を単離し、および／または拡大培養することを含んでなる、本開示のキメラ受容体を発現する細胞の作製方法が提供される。

- [0370] 一実施態様では、対象への再導入前に、自己Ｔリンパ球または自己ＮＫ細胞、自己マクロファージをエキスピボで活性化および／または増殖させる。一実施態様では、Ｔリンパ球またはＮＫ細胞は同種異系Ｔリンパ球または同種異系ＮＫ細胞である。一実施態様では、同種異系Ｔリンパ球は、内在性Ｔ細胞受容体の発現が阻止されているまたは排除されているＴリンパ球である。一実施態様では、対象への導入前に、同種異系Ｔリンパ球または同種異系ＮＫ細胞をエキスピボで活性化および／または増殖させる。一実施態様では、キメラ受容体は、レトロウイルス形質導入、レンチウイルス形質導入、DNAエレクトロポレーションおよびRNAエレクトロポレーション、DNAあるいはRNAトランスフェクションもしくはGene editingによる遺伝子改変からなる群から選択される方法により、Ｔリンパ球またはＮＫ細胞またはマクロファージに導入される。
- [0371] 本開示の方法において使用するＮＫ細胞は、主要組織適合抗原Ⅰおよび／またはⅡ分子を欠くかほとんど発現せず、膜結合ⅠＬ－１５および４－１ＢＢリガンド(CD137L)を発現するように遺伝子修飾されている細胞に暴露することにより優先的に増殖され得る。このような細胞株は、K562[ATCC、CCL 243; Lozzio et al., Blood 45(3): 321-334 (1975); Klein et al., Int. J. Cancer 18: 421-431 (1976)]およびウィルムス腫瘍細胞株HFWT[Fehniger T A, Caligiuri M A. Int Rev Immunol 20(3-4):503-534 (2001); Harada H, et al., Exp Hematol 32(7):614-621 (2004)]、子宮内膜腫瘍細胞株HHUA、黒色腫細胞株HMV-II、肝芽腫細胞株HuH-6、肺小細胞癌細胞株Lu-130およびLu-134-A、神経芽腫細胞株NB 19およびN1369、精巢NEC 14由来の胚性癌細胞株、頸癌細胞株TCO-2および骨髓転移神経芽腫細胞株TNB 1[Harada H., et al., Jpn. J. Cancer Res 93: 313-319 (2002)]を含むが、必ずしもこれらに限定されない。好ましくは使用する細胞株は、K562およびHFWT細胞株のように、MHCⅠおよびⅡ分子の両者を欠くかほとんど発現しない。固体支持体を細胞株の代わりに使用し得る。このような支持体は、好ま

しくはNK細胞と結合し、初期活性化事象および／または増殖性応答を誘発するかまたはこのような作用を有する分子の結合が可能であり、それにより足場として作用する少なくとも1個の分子がその表面に結合している。支持体は、その表面にCD137リガンドタンパク質、CD137抗体、IL-15タンパク質またはIL-15受容体抗体が結合してよい。好ましくは、支持体は、その表面に結合したIL-15受容体抗体およびCD137抗体を有する。

[0372] 一実施態様では、Tリンパ球活性化を含む本開示の方法のいずれにおいても、Tリンパ球は、抗CD3／CD28、IL-2およびフィトヘマグルチニンからなる群から選択される1種以上の薬剤の存在下で活性化できる。NK細胞活性化を含む本開示の方法のいずれにおいても、NK細胞は、CD137リガンドタンパク質、CD137抗体、IL-15タンパク質、IL-15受容体抗体、IL-2タンパク質、IL-12タンパク質、IL-21タンパク質およびK562細胞株からなる群から選択される1種以上の薬剤の存在下で活性化できる。

[0373] 本開示の方法で使用される細胞は特に限定されず、いずれの細胞も使用可能である。例えば、体液、組織もしくは器官、例えば、血液（末梢血、臍帯血など）もしくは骨髓から採取、単離、もしくは精製された細胞、または上述の細胞を分化させる、もしくは多能性幹細胞（iPSC）を作製するために初期化することにより得られた細胞が使用可能である（例えば、Themeli et al 2013参照）。末梢血単核細胞（PBMC）、免疫細胞[例えば、T細胞、樹状細胞、B細胞、造血幹細胞、マクロファージ、単球、NK細胞または造血細胞（好中球、好塩基球）を含む]、臍帯血単核細胞、線維芽細胞、脂肪細胞前駆体、肝細胞、皮膚ケラチノサイト、間葉幹細胞、脂肪幹細胞、種々の癌細胞株、または神経幹細胞が使用可能である。例えば、NK細胞またはT細胞、T細胞の前駆細胞（造血幹細胞、リンパ球前駆細胞など）またはそれらを含む細胞集団が使用可能である。T細胞の例には、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、制御性T細胞、細胞傷害性T細胞、および腫瘍

浸潤リンパ球が含まれる。T細胞およびT細胞の前駆細胞を含有する細胞集団には、P B M Cが含まれる。上述の細胞は、生体から採取してもよく、生体から採取した細胞の拡大培養により得てもよく、または細胞株として樹立してもよい。生産されたキメラ受容体発現細胞または生産されたキメラ受容体発現細胞から分化させた細胞の生体への移植が望まれる場合は、その生体自体またはその同種の生体から採取した細胞に核酸を導入することができる。

[0374] ポリヌクレオチドと併せて、本開示はまたこのようなポリヌクレオチドを含むベクター(このようなポリヌクレオチドがキメラ受容体の発現のための少なくとも1個の調節エレメントと作動可能なように結合しているベクターを含む)も提供する。本開示の有用なベクターの非限定的例は、例えば、レトロウイルスベクターおよびレンチウイルスベクターのようなウイルスベクターを含む。

[0375] 一つの特定の態様において、このようなベクターはまた自殺遺伝子を含む。ここで使用する用語自殺遺伝子は、自殺遺伝子を発現する細胞を死に至らしめる遺伝子をいう。自殺遺伝子は、該遺伝子が発現された細胞に薬剤、例えば、医薬に対する感受性を付与し、該細胞が該薬剤と接触したときまたは該薬剤に暴露されたときに細胞を死に至らしめる遺伝子であり得る。自殺遺伝子は当分野で知られ(例えば、Suicide Gene Therapy: Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004参照)、例えば、単純ヘルペスウイルス(H S V)チミジンキナーゼ(T K)遺伝子、シトシンデアミナーゼ、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ、ニトロレダクターゼおよびカスパーゼ8のようなカスパーゼを含む。

[0376] 本開示のキメラ受容体をコードする核酸はベクターに導入することができ、そのベクターを細胞に導入することができる。例えば、レトロウイルスベクター(オンコレトロウイルスベクター、レンチウイルスベクター、および偽型ベクターを含む)、アデノウイルスベクター、アデノ随伴ウイルス(A

AV) ベクター、シミアンウイルスベクター、ワクシニアウイルスベクターまたはセンダイウイルスベクター、エプスタインバーウイルス (EBV) ベクター、およびHSVベクターなどのウイルスベクターが使用可能である。例えば、感染細胞内で自己複製しないように複製能を欠くウイルスベクターが使用可能である。

[0377] 加えて、非ウイルスベクターもまた、本開示において、WO 96/10038、WO 97/18185、WO 97/25329、WO 97/30170 および WO 97/31934 (引用することにより本明細書の一部とされる) に記載されているように、リポソームまたは陽イオン脂質などの縮合剤と組み合わせて使用することができる。本開示の核酸はまた、リン酸カルシウム形質導入、DEAE-デキストラン、エレクトロポレーション、または粒子衝撃により細胞に導入することもできる。

[0378] 例えば、レトロウイルスベクターが使用される場合、本開示の方法は、LTR 配列に基づき好適なパッケージング細胞とベクターによりプロセッシングされるパッケージングシグナル配列を選択すること、およびパッケージング細胞を用いてレトロウイルス粒子を作製することによって行うことができる。パッケージング細胞の例には、PG13 (ATCC CRL-10686)、PA317 (ATCC CRL-9078)、GP+E-86 および GP+envAm-12 (米国特許第5,278,056号)、および Psi-Crip [Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, vol. 85, pp. 6460-6464 (1988)] が含まれる。レトロウイルス粒子はまた、293細胞または高トランスフェクション効率を有する293T細胞を用いて作製することもできる。レトロウイルスおよびレトロウイルスベクターのパッケージングに使用可能なパッケージング細胞に基づいて生産された多くの種類のウイルスベクターが、多くの会社から広く市販されている。

[0379] 本開示はまた上記キメラ受容体を含む宿主細胞を提供する。有用な宿主細胞の非限定的例は、Tリンパ球およびNK細胞を含み、これは自己でも同種

異系でもよい(内在性T細胞受容体は除去されているかまたは保持されている)。ある特定の態様において、宿主細胞は、癌を有する患者から単離された自己Tリンパ球である。一つの特定の態様において、このような自己Tリンパ球をエキスピボで活性化および増殖する。

[0380] 本開示のキメラ受容体は、当分野で知られる任意の方法により宿主細胞に導入できる。特に有用な方法の非限定的例は、レトロウイルス形質導入、レンチウイルス形質導入およびDNAおよびmRNAエレクトロポレーションを含む。下記実施例に示すとおり、mRNAエレクトロポレーションは、Tリンパ球における本開示のキメラ受容体の有効な発現を生じる。レトロウイルス形質導入を記載する参考文献の例は、Anderson et al.、米国特許5,399,346号; Mann et al., Cell 33:153 (1983); Temin et al., U.S. Pat. No. 4,650,764; Temin et al.、米国特許5,124,263号; Dougherty et al.の国際特許公開WO 95/07358号(1995年3月16日公開); およびKuo et al., Blood 82:845 (1993)を含む。国際特許公開WO 95/07358号は、初代Bリンパ球の高効率形質導入を記載する。例えば、使用できるレトロウイルス形質導入およびmRNAエレクトロポレーションの具体的技術についてまた下の実施例の章も参照のこと。

[0381] 宿主細胞活性化および増殖を使用して、通常ウイルスベクターのゲノムへの組込みおよび本開示のキメラ受容体をコードする遺伝子の発現を可能とする。しかしながら、mRNAエレクトロポレーションを使用するならば、活性化および増殖は必要ない(エレクトロポレーションは、活性化細胞上で実施するときにより有効ではあるが)。ウイルス形質導入の結果として、宿主細胞(Tリンパ球またはNK T細胞)は、該受容体が一過性に(典型的に3~5日)発現されたときのmRNAエレクトロポレーションよりも強い効果を生じる可能性を有して、長期間本開示のキメラ受容体を発現する。しかしながら、ウイルス形質導入は複雑であり、高価であり、実行が困難であるが、一方mRNAエレクトロポレーションははるかに単純であり、実行がはるかに容易である。さらに、一過性発現は、毒性の可能性があれば有用であり、副

作用の可能性のために臨床試験の初期相で役立つはずである。

- [0382] 1つの側面は、本明細書に記載の核酸またはベクターで細胞をトランスフェクトまたは形質導入することを含んでなる、本明細書に開示される細胞の作製方法である。
- [0383] 1つの実施形態では、単離される免疫細胞は、単離されるT細胞である。
- [0384] ある実施形態では、単離される細胞はCD3⁺であり、場合により、形質導入またはトランスフェクション前に、場合により、可溶型または膜結合型の抗CD3抗体、例えば、OKT3またはmOKT3、および／またはAPCで刺激される。1つの実施形態では、APCは人工APC（aAPC）である。別の実施形態では、APCは、膜型の抗CD3モノクローナル抗体を発現する。
- [0385] 1つの実施形態では、トランスフェクションまたは形質導入工程が繰り返される。例えば、トランスフェクションまたは形質導入工程は、2回、または3回、または4回、または例えば、十分な発現レベルが達成されるまで行うことができる。例えば、トランスフェクションまたは形質導入工程は、5回行うことができる。
- [0386] 1つの実施形態では、細胞は、連続2日以上トランスフェクトまたは形質導入する。例えば、細胞は、連続2日、連続3日、または連続4日トランスフェクトまたは形質導入する。
- [0387] 1つの実施形態では、キメラ受容体形質導入細胞を、所定の抗原を発現する照射細胞で刺激する。例えば、キメラ受容体形質導入T細胞を照射細胞で、エフェクター：標的比100：1、75：1、50：1、25：1、20：1、15：1、10：1、9：1、8：1、7：1、6：1、5：1、4：1、3：1、2：1、1：1、1：2、1：3、1：4、1：5、1：6、1：7、1：8、1：9、1：10、1：15、1：20、1：25、1：50または1：100で刺激する。好ましくは、1：1である。
- [0388] 本開示のキメラ受容体を発現する細胞は、本明細書に記載のキメラ受容体をコードする核酸が本明細書に記載の生産方法によって導入および発現され

た細胞である。

[0389] 本開示の細胞は、キメラ受容体並びに抗原結合分子を介して特定の抗原と結合し、それにより、シグナルが細胞に伝達され、結果として細胞が活性化される。キメラ受容体を発現する細胞の活性化は、宿主細胞の種類およびキメラ受容体の細胞内ドメインによって異なり、指標として、例えば、サイトカインの放出、細胞増殖速度の向上、または細胞表面分子の変化などに基づいて確認することができる。例えば、活性化細胞からの細胞傷害性サイトカイン（腫瘍壊死因子、リンホトキシンなどの）放出は、抗原を発現する標的細胞の破壊を引き起こす。加えて、サイトカインの放出または細胞表面分子の変化は、他の免疫細胞、例えば、B細胞、樹状細胞、NK細胞、およびマクロファージを刺激する。

[0390] 本開示の方法において使用するTリンパ球は、最も好ましくは、先に血液サンプルから単離され、好ましくは例えば、抗CD3／CD28ビーズ、IL-2またはフィトヘマグルチニンのような標準法を用いてエキスビボで活性化および増殖（例えば、3～5日）されている、患者の自身の細胞（すなわち、自己細胞）である。あるいは、同種異系Tリンパ球を使用できる（好ましくは内在性T細胞受容体の発現が阻止されているまたは排除されている同種異系Tリンパ球）。Torikai et al., Blood, 2012 119: 5697-5705参照。単離（および所望により活性化および／または増殖）後、患者からのTリンパ球およびNK細胞に、本開示のキメラ受容体をコードするポリヌクレオチド（またはそのようなポリヌクレオチドを含むベクター）を形質導入（または電気穿孔）し、そうして、キメラ受容体がT細胞またはNK細胞の細胞表面に発現されるようにする。修飾細胞をその後患者に投与できる（例えば、治療用抗体点滴1日後）。

[0391] 1つの側面では、疾患を治療するための本明細書に記載のキメラ受容体発現細胞、核酸、ベクター、細胞または組成物の使用が提供される。

[0392] 別の側面は、哺乳動物において疾患を治療または予防する方法であって、それを必要とする哺乳動物に有効量の本明細書開示に開示される細胞または

組成物を投与することを含んでなる方法である。

- [0393] キメラ受容体を発現した細胞を有効成分として含んでなる医薬組成物は、皮内、筋肉内、皮下、腹膜内、鼻腔内、動脈内、静脈内、腫瘍内、または輸リンパ管に、非経口投与により、例えば、注射または注入により投与することができるが、投与経路は限定されない。
- [0394] さらに側面において、ウイルスベクター等を用いて本開示のキメラ受容体をコードする核酸を生体内に組み込み、当該キメラ受容体を直接発現させる方法が挙げられる。ウイルスベクターとして、アデノウイルスが例示されるがこれに限定されるものではない。またウイルスベクターを用いることなくエレクトロポレーション法や核酸を直接投与する手法等により当該キメラ受容体をコードする核酸を直接生体内に組み込むことも可能であるし、当該キメラ受容体を分泌発現させるように遺伝子改変した細胞を生体に投与することで、当該キメラ受容体を継続的に生体内で分泌させることも可能である。
- [0395] 本開示によって、患者は、約 10^5 ($1E+05$) $\sim 10^{10}$ ($1E+10$) 以上の細胞／体重キログラム(細胞／Kg)の範囲の治療上有効投与量の本開示のキメラ受容体を含むT細胞またはNK細胞の注入により処置され得る。注入は、所望の応答が達成されるまで、患者が耐受性を示し得る限り、できるだけ頻繁にかつ多くの回数、反復し得る。適切な注入用量およびスケジュールは患者毎に異なるであろうが、特定の患者について処置医が決定できる。典型的に、約 10^6 ($1E+06$) 細胞／Kgの初回投与量を注入し、 10^8 ($1E+08$) 以上の細胞／Kgまで増加させる。IL-2を、注入細胞を注入後増殖させるために併用できる。IL-2の量は、約 $1 \sim 5 \times 10^6$ ($1 \sim 5E+06$) 国際単位／体表面平方メートルであり得る。
- [0396] 医薬組成物は、有効成分として、キメラ受容体を発現する細胞を含んでなり、好適な賦形剤をさらに含んでもよい。賦形剤の例には、有効成分として本開示の核酸を含んでなる組成物のための上述の薬学上許容可能な賦形剤、種々の細胞培養培地、および等張性塩化ナトリウムを含む。

- [0397] 本開示のさらなる面は医薬組成物を提供する。一つの態様において、本開示は、(i)本開示のキメラ受容体をコードするポリヌクレオチドまたはそのようなポリヌクレオチドを含むベクターおよび(ii)薬学的に許容される担体または添加物を含む医薬組成物を提供する。
- [0398] 本開示の医薬組成物で使用するための適当な添加物は当業者に周知であり、例えば、組織培養培地(例えば、細胞をエクスピボで生存させるため)または食塩水溶液(例えば、細胞を患者に注射するとき)を含み得る。薬学的に許容される添加物の詳細な記載は、Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Pub. Co., N.J. 1991)から入手可能である。
- [0399] 本発明の医薬組成物が投与される疾患は、その疾患が用いた療法に感受性を示す限り特に限定されない。1つの実施形態では、疾患は癌である。1つの実施形態では、対象は、癌を有することが疑われるか、または癌を有する。
- [0400] 例えば、癌は、血液癌または固形腫瘍である。例えば、血液癌は、白血病、リンパ腫または骨髄腫である。例えば、固形腫瘍は、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、未分化がん、大細胞がん、小細胞がん、皮膚がん、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、子宮がん、肝臓がん、腎臓がん、膵臓がん、脾臓がん、肺がん、気管がん、気管支がん、結腸がん、小腸がん、胃がん、食道がん、胆嚢がん、精巣がん、卵巣がんなどのがんや、骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがんのほか、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫などの肉腫や、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、網膜芽腫などの芽腫や、胚細胞腫瘍である。
- [0401] ある実施形態では、疾患は、炎症性疾患／自己免疫疾患(喘息、湿疹)、肝炎、およびその原因がインフルエンザおよびHIVなどのウイルス、細菌、または真菌である感染性疾患、例えば、結核、MRSA、VRE、および深在性真菌症である。1つの実施形態では、対象は、これらの炎症性疾患を有することが疑われるか、または炎症性疾患を有する。

- [0402] 上述の疾患の治療のために低減または除去されることが望まれる細胞によってプロセッシングされる抗原、すなわち、腫瘍抗原、ウイルス抗原、または細菌抗原などと結合する本開示の医薬組成物が、これらの疾患の治療のために投与される。
- [0403] よって、1つの側面は、対象において所定の抗原を発現する細胞の数を減らす方法であって、それを必要とする対象に有効量の本明細書に記載の医薬組成物を投与することを含んでなる方法を含み、ここで、キメラ受容体発現細胞は細胞外ドメインと結合する抗原結合分子を介しては所定の抗原と特異的に結合する。
- [0404] 本開示の細胞はまた、再発性白血病の寛解などを目的とした、骨髄移植または放射線暴露、ドナーリンパ球輸血後の感染性疾患の予防のために使用できる。
- [0405] 本開示のキメラ受容体は、多様な癌細胞型に対してある1個の受容体を使用することを可能にするT細胞治療を促進する。腫瘍が利用する免疫逃避機構を考えると、最終的に有利であり得る戦略である、同時に多様な抗原のターゲティングも可能とする(Grupp et al., N. Engl. J. Med. 2013; 368(16):1509-1518)。抗体介在性細胞毒性は、抗体投与の単純な中止により、いつでも何時用であれば停止できる。本開示のキメラ受容体を発現するT細胞が、標的細胞に結合した抗体によってのみ活性化されるため、未結合免疫グロブリンは、注入されたT細胞内に何ら刺激を発揮しない。何らかの可能性のある自己免疫性反応性を制限するために、キメラ受容体を一過性に発現するためのmRNAエレクトロポレーションの使用によりさらに臨床的安全性を高め得る。
- [0406] 上記方法の一つの態様において、Tリンパ球またはNK細胞は、該対象から単離された自己T細胞またはNK細胞である。一つの特定の態様において、対象への再導入前に、自己T細胞またはNK細胞をエキスビボで活性化および／または増殖する。他の態様において、T細胞またはNK細胞は同種異系Tリンパ球またはNK細胞である。ある特定の態様において、T細胞は内

在性T細胞受容体の発現が阻止されているまたは排除されている同種異系T細胞である。一つの特定の態様において、対象への導入前に、同種異系T細胞をエキスピボで活性化および／または増殖する。Tリンパ球は、例えば、抗CD3／CD28、IL-2および／またはフィトヘマグルチニンの存在下、当分野で知られる任意の方法により活性化できる。NK細胞は、例えば、CD137リガンドタンパク質、CD137抗体、IL-15タンパク質、IL-15受容体抗体、IL-2タンパク質、IL-12タンパク質、IL-21タンパク質およびK562細胞株からなる群から選択される1個以上の薬剤の存在下、当分野で知られる任意の方法により活性化できる。例えば、NK細胞を増殖するための有用な方法の記載について米国特許7,435,596号および8,026,097号を参照のこと。

- [0407] 上記方法の一つの態様において、対象へのT細胞またはNK細胞の導入(または再導入)に続いて、PD-1／PD-L1シグナル阻害薬および／またはVEGFシグナル阻害薬の治療有効量を対象に投与する。
- [0408] 本明細書に記載する組成物および方法は、化学療法、手術、放射線、遺伝子治療などのような癌のための他のタイプの治療と組み合わせて利用し得る。このような治療は、本開示に従う免疫療法と同時にまたは逐次的に(任意の順序で)適用し得る。
- [0409] さらに医薬組成物と併用するとき、各医薬組成物の適当な治療上有効な投与量は、相加的または相乗的作用により減少させ得る。
- [0410] 本開示の処置を、例えば、治療用ワクチン(GVAX、DCワクチンなどを含むが、これらに限定されない)、チェックポイント阻害剤(CTLA4、PD1、LAG3、TIM3などを遮断する医薬組成物を含むが、これらに限定されない)またはアクティベーター(41BB、OX40などを増強する医薬組成物を含むが、これらに限定されない)のような、他の免疫調節処置と組み合わせ得る。
- [0411] 本開示の医薬組成物はまた、処置する特定の適応症にとって必要であるならば、1個以上の付加的活性化化合物、好ましくは互いに悪影響を及ぼさない

、補完的活性を有するものも含み得る。可能な付加的活性化合物の非限定的例は、例えば、PD-1/PD-L1シグナル阻害薬およびVEGFシグナル阻害薬を含む。

[0412] 他の態様において、本開示の医薬組成物は、さらに、癌細胞に対する細胞毒性を発揮できるモノクローナル抗体(例えば、リツキシマブ、トラスツズマブ、hu14.18K322Aなど)またはFc部分を含む他の抗腫瘍分子(例えば、免疫グロブリンのFc部分またはFc含有DNAもしくはRNAと組み合わせて腫瘍表面受容体に結合したリガンド(例えば、サイトカイン、免疫細胞受容体)からなる混成分子)をさらに含む。

[0413] 使用する抗体の適切な投与量は、処置する癌のタイプ、疾患の重篤度および経過、先の治療、患者の臨床歴および抗体に対する応答および処置医の裁量による。抗体を、患者に一度にまたは一連の複数処置で投与できる。本開示による治療の進行は従来の技術およびアッセイにより容易にモニターできる。

[0414] 抗体の投与は、全身投与ならびに疾患の部位への(例えば、初代腫瘍への)直接投与を含む、任意の適当な経路により実施できる。

[0415] 本開示の免疫療法との組み合わせに有用な他の治療剤の非限定的例は次のものを含む。

(i) 抗血管形成剤(例えば、TNF-470、血小板因子4、トロンボスポンジン-1、組織メタロプロテアーゼ阻害物質(TIMP1およびTIMP2)、プロラクチン(16Kdフラグメント)、アンジオスタチン(プラスミノーゲンの38Kdフラグメント)、エンドスタチン、bFGF可溶性受容体、トランスフォーミング増殖因子ベータ、インターフェロンアルファ、可溶性KDRおよびFLT-1受容体、胎盤のプロリフェリン関連タンパク質ならびにCarmelietおよびJain(2000)に記載のもの；

[0416] (ii) 抗VEGF抗体、VEGFバリエント、可溶性VEGF受容体フラグメント、VEGFまたはVEGFRが遮断できるアプタマー、中和抗VEGFR抗体、VEGFRチロシンキナーゼの阻害剤およびこれらの任意の組み

合わせのようなVEGFアンタゴニストまたはVEGF受容体アンタゴニスト；

[0417] (iii) 例えば、ピリミジンアナログ(5-フルオロウラシル、フロクスウリジン、カペシタビン、ゲムシタビンおよびシタラビン)、プリンアナログ、葉酸アンタゴニストおよび関連阻害剤(メルカプトプリン、チオグアニン、ペントスタチンおよび2-クロロデオキシアデノシン(クラドリビン))のような化学療法化合物；ビンカルカロイド(ビンブラスチン、ビンクリスチンおよびビノレルビン)のような天然産物、タキサン(パクリタキセル、ドセタキセル)、ビンクリスチン、ビンブラスチン、ノコダゾール、エポチロン類およびナベルピンのような微小管攪乱因子、エピポドフィロトキシン(エトポシド、テニポシド)、DNA傷害剤(アクチノマイシン、アムサクリン、アントラサイクリン類、ブレオマイシン、ブスルファン、カンプトテシン、カルボプラチン、クロラムブシル、シスプラチン、シクロホスファミド、サイトキサン、ダクチノマイシン、ダウノルビシン、ドキソルビシン、エピルビシン、ヘキサメチルメラミン、オキサリプラチン、イホスファミド、メルファラン、メクロレタミン、マイトマイシン、ミトキサントロン、ニトロソ尿素、プリカマイシン、プロカルバジン、タキソール、タキソテール、テニポシド、トリエチレンチオホスホロアミドおよびエトポシド(VP16))を含む抗増殖性／有糸分裂阻害剤；ダクチノマイシン(アクチノマイシンD)、ダウノルビシン、ドキソルビシン(アドリアマイシン)、イダルビシン、アントラサイクリン類、ミトキサントロン、ブレオマイシン類、プリカマイシン(ミトラマイシン)およびマイトマイシンのような抗生物質；酵素(L-アスパラギンを全身性に代謝し、自身のアスパラギンを合成する能力を有しない細胞を取り除くL-アスパラギナーゼ)；抗血小板剤；窒素マスタード類(メクロレタミン、シクロホスファミドおよびアナログ、メルファラン、クロラムブシル)、エチレンイミン類およびメチルメラミン類(ヘキサメチルメラミンおよびチオデパ)、アルキルスルホネート類-ブスルファン、ニトロソウレア類(カルムスチン(BCNU)およびアナログ、ストレプトゾシン)、トラゼン類-ダカルバジン

(D T I C)のような抗増殖性／抗有糸分裂アルキル化剤；葉酸アナログ(メトトレキサート)のような抗増殖性／抗有糸分裂代謝拮抗剤；白金配位錯体類(シスプラチン、カルボプラチン)、プロカルバジン、ヒドロキシ尿素、ミトタン、アミノグルテチミド；ホルモン類、ホルモンアナログ(エストロゲン、タモキシフェン、ゴセレリン、ビカルタミド、ニルタミド)およびアロマターゼ阻害剤(レトロゾール、アナストロゾール)；抗凝血剤(ヘパリン、合成ヘパリン塩類および他のトロンビン阻害剤)；線維素溶解性剤(例えば組織プラスミンノーゲン活性化因子、ストレプトキナーゼおよびウロキナーゼ)、アスピリン、ジピリダモール、チクロピジン、クロピドグレル、アブシキシマブ；抗遊走剤；抗分泌剤(ブレフェルジン)；免疫抑制剤(シクロスポリン、タクロリムス(F K - 5 0 6)、シロリムス(ラパマイシン)、アザチオプリン、ミコフェノール酸モフェチル)；抗血管形成化合物(例えば、T N P - 4 7 0、ゲニステイン、ベバシズマブ)および増殖因子阻害剤(例えば、線維芽細胞増殖因子(F G F)阻害剤)；アンギオテンシン受容体ブロッカー；一酸化窒素ドナー；アンチセンスオリゴヌクレオチド；抗体(トラスツズマブ)；細胞周期阻害剤および分化誘導因子(トレチノイン)；m T O R阻害剤、トポイソメラーゼ阻害剤(ドキソルビシン(アドリアマイシン)、アムサクリン、カンプトテシン、ダウノルビシン、ダクチノマイシン、テニボシド、エピルビシン、エトボシド、イダルビシンおよびミトキサントロン、トポテカン、イリノテカン)、コルチコステロイド(コルチゾン、デキサメサゾン、ヒドロコルチゾン、メチルプレドニゾン、プレドニゾンおよびプレドニゾン)；増殖因子シグナル形質導入キナーゼ阻害剤；ミトコンドリア機能不全誘導因子およびカスパーゼアクティベーター；および染色質攪乱因子。

- [0418] さらに有用な薬剤の例についてはまたPhysician's Desk Reference, 59. sup.th edition, (2005), Thomson P D R, Montvale N.J.; Gennaro et al., Eds. Remington's The Science and Practice of Pharmacy 20.sup.th edition, (2000), Lippincott Williams and Wilkins, Baltimore Md.; Braunwald et al., Eds. Harrison's Principles of Internal Medicine, 15.sup.th

edition, (2001), McGraw Hill, NY; Berkow et al., Eds. The Merck Manual of Diagnosis and Therapy, (1992), Merck Research Laboratories, Rahway N.Jを参照のこと。

[0419] 上記の開示は本出願を全般的に説明する。より完全な理解は、以下の具体例を参照することにより得ることができる。これらの例は単に例示のために記載され、本出願の範囲を限定するものではない。状況が好都合であることを示唆または呈示すれば、形態の変化および等価物の置換も企図される。本開示では特定の用語が使用されているが、このような用語は記述の意味を意図し、限定を目的とするものではない。

[0420] なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0421] 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。

[0422] [実施例 1] 免疫受容体の細胞外ドメインを細胞外ドメインに有するキメラ受容体

免疫細胞表面上にあって免疫細胞の活性化に関与する免疫受容体に対しアゴニスト活性を発揮する結合ドメインと、標的細胞上の標的抗原に対する結合ドメインとを有する抗原結合分子を用いることで、免疫受容体を発現している免疫細胞と標的抗原を発現している標的細胞が抗原結合分子によって架橋され、免疫細胞が活性化することが知られている。本発明では、免疫受容体に対しアゴニスト活性を発揮する抗原結合分子と、当該抗原結合分子によって認識される免疫受容体を細胞外ドメインに有するキメラ受容体 (Chimeric Receptor: 以下「CR」とも称される) が形質導入された免疫細胞とを組み合わせた治療法を考案した (図 1)。

[0423] 具体的には、当該治療方法は、1) 免疫細胞表面上にあって免疫細胞の活性化に関与する免疫受容体に対しアゴニスト活性を発揮する結合ドメインと、治療を必要とする被験体内の標的細胞上に特異的あるいは選択的に発現す

る標的抗原に対する結合ドメインとを有する抗原結合分子を1種類又は複数種類含む第1の組成物を投与すること、2)第1の組成物に含まれる抗原結合分子が結合可能な免疫受容体の細胞外ドメインを細胞外ドメインに有するCRが形質導入された免疫細胞を投与すること、を含み、抗原結合分子はCRを発現した免疫細胞と標的細胞を架橋し、CR発現細胞を活性化する。ここで、標的抗原の種類を変更したい場合、第1の組成物の抗原結合分子を変更することにより、標的抗原の種類を変更することができ、CRを発現した免疫細胞を作製し直す必要はない。したがって、このようなCR細胞の作製は、標的細胞に特異的あるいは選択的に発現する抗原を直接的に認識するような免疫細胞の作製よりも汎用性が高く有用である。

[0424] 加えて、本治療法では抗原結合分子によって、CRが形質転換された免疫細胞のみならず、免疫受容体を内在的に発現する内在性免疫細胞が標的抗原依存的に同時に動員される。その結果、CRが形質転換された免疫細胞が活性化されることに加え、内在性免疫細胞についても、抗原結合分子のアゴニスト活性によって活性化されると考えられ、薬効の増強が期待される。

[0425] [実施例2] 二重特異性抗体の調製

(2-1) ホモ抗体の調製

表1で示す抗体が調製された。重鎖定常領域は、Fc γ 受容体への結合を低減し、2つの重鎖がヘテロ会合化するように改変を加えている。各抗体の重鎖および軽鎖の塩基配列をコードする全長の遺伝子は、PCR等を用いて当業者公知の方法で作製された。得られたプラスミド断片を動物細胞発現ベクターに挿入し、重鎖発現ベクターおよび軽鎖発現ベクターが作製された。得られた発現ベクターの塩基配列は当業者公知の方法で決定された。作製したプラスミドをヒト胎児腎癌細胞由来FreeStyle293細胞(Invitrogen)、またはExpi293細胞(Invitrogen)に、一過性に導入され、抗体の発現が行われた。得られた培養上清が回収された後、0.22 μ mフィルター(Millipore)を通して培養上清が得られた。得られた培養上清から、rProtein A Sephar

ose(R) Fast Flow (GEヘルスケア・ジャパン) または Protein G Sepharose(R) 4 Fast Flow (GEヘルスケア・ジャパン) が用いられ当業者公知の方法で、抗体が精製された。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて280nmでの吸光度が測定され、得られた値からPAC E等の方法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度が算出された (Protein Science (1995) 4, 2411-2423)。

[0426] なお、本明細書における抗体は、以下の規則に従って命名されている；
(重鎖可変領域) - (重鎖定常領域) / (軽鎖可変領域) - (軽鎖定常領域)

たとえば、H0000-F760nN17/GL4-k0aという抗体名であれば、重鎖可変領域はH0000、重鎖定常領域はF760nN17、軽鎖可変領域はGL4、軽鎖定常領域はk0aであることを意味する。

[0427] 同様に抗体の可変領域を以下の規則に従って示す場合がある；
(重鎖可変領域) / (軽鎖可変領域)

[0428]

[表1]

表1：ホモ抗体の構造

抗体名	可変領域		定常領域		標的抗原
	重鎖配列 番号	軽鎖配列 番号	重鎖配列 番号	軽鎖配列 番号	
H0000-F760nN17/ GL4-k0a	1	2	3	4	ヒト GPC3
hCD137VH-F760mnP17/ hCD137VL-k0	5	6	7	8	ヒト CD137
GPA0018H- F760mnN17/GPA0018L-k0C	9	10	11	12	ヒト GPC5D
GPA0039H- F760mnN17/GPA0039L-k0C	13	14	11	12	ヒト GPC5D
MRAL v1- F760mnN17/MRAL v1-k0 v1	15	16	11	17	ヒト IL-6R
H0000-F760mnN17/ GL4- k0a	1	2	11	4	ヒト GPC3
IC17HdK- F760mnN17/IC17L-k0	18	19	11	8	KLH
H0000-F760mnP17/GL4-k0a	1	2	7	4	ヒト GPC3
TGN1412VH- F760mnP17 v1/TGN1412VL- KTO v1	20	21	22	23	ヒト CD28

[0429] (2-2) 二重特異性抗体の調製

実施例2-1で調製された抗体を用いて、定常領域の電荷の違いを利用した当業者公知の方法 (Labriijn et al, Proc. Natl. Acad. Sci., (2013) 110, 5145) によって、表2で示す二重特異性抗体が調製された。

反応条件：PBS (pH 7.4) 中、[2-MEA (Sigma)] = 25

mM、37℃、90分。

[0430] なお、本明細書における二重特異性抗体は、以下の規則に従い命名されている；

A A（第一抗原重鎖）／X X（第一抗原軽鎖）／／B B（第二抗原重鎖）／Y
Y（第二抗原軽鎖）

[0431]

[表2-1]

表2：二重特異性抗体の構造

抗体名				
H0000-F760nN17/ GL4- k0a// hCD137VH- F760mnP17/ hCD137VL- k0	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	1	2	3	4
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	5	6	7	8
GPA0018H- F760mnN17/GPA0018L- k0C//hCD137VH- F760mnP17/hCD137VL-k0	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	9	10	11	12
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	5	6	7	8
GPA0039H- F760mnN17/GPA0039L- k0C//hCD137VH- F760mnP17/hCD137VL-k0	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	13	14	11	12
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	5	6	7	8

[0432] [表2-2]

MRAH.v1- F760mnN17/MRAL.v1- k0.v1/hCD137VH- F760mnP17/hCD137VL-k0	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	15	16	11	17
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	5	6	7	8
IC17HdK- F760mnN17/IC17L- k0/hCD137VH- F760mnP17/hCD137VL-k0	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	18	19	11	8
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	5	6	7	8
IC17HdK- F760mnN17/IC17L- k0/B0000- F760mnP17/GL4-k0a	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	18	19	11	8
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	1	2	7	4

[0433]

[表2-3]

H0000-F760nnN17/GL4-k0a//TGN1412VH-F760nnP17.v1/TGN1412VL-KT0.v1	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	1	2	11	4
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
IC17HdK-F760nnN17/IC17L-k0//TGN1412VH-F760nnP17.v1/TGN1412VL-KT0.v1	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	18	19	11	8
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
IC17HdK-F760nnN17/IC17L-k0//H0000-F760nnP17/GL4-k0a	第一の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	18	19	11	8
	第二の腕			
	可変領域		定常領域	
	重鎖配列番号	軽鎖配列番号	重鎖配列番号	軽鎖配列番号
	1	2	7	4

[0434] [実施例3] 細胞外ドメインにCD137の細胞外ドメインを有するキメ

ラ受容体発現細胞の活性化能の評価

(3-1) レンチウイルスベクターの構築

ヒトCD137細胞外ドメイン、ヒトCD8ヒンジおよび膜貫通ドメイン、および第三世代キメラ抗原受容体細胞内シグナルドメイン(CD28-CD137-CD3ゼータ)から成るキメラ受容体CD137-CD8-CD28-CD137-CD3ゼータ(図2, CD137-CR1と称される)を発現するレンチウイルスベクターが作製された。レンチウイルスベクター骨格としてpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP(System Bioscience)が用いられた。図3は、ベクター構築物及び5'末端から3'末端へのフレーム単位の構成要素の配列順序の概略図である。コドン最適化されたヒトCD137の細胞外ドメイン(Genbank NM001561.6, Leu24~Gln186)に、ヒトCD8アルファ鎖のヒンジ領域及び膜貫通領域(Genbank NM001768.7, Phe128~Asn210)、並びにヒトCD28分子(Genbank NM006139.4, Arg180~Ser220)、ヒトCD137分子(Genbank NM001561.6, Arg209~Leu255)、ヒトCD3ゼータ分子(Genbank NM000734.4, Arg52~Arg164)の細胞質領域が連結された。CD137-CR1(配列番号24)をコードする遺伝子は当業者既知の方法によって合成された。この配列をpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターのMCSへとライゲートし、CD137-CR1とcopGFPを共発現するレンチウイルスベクターが構築された。

[0435] (3-2) NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞への遺伝子導入

CD137-CR1を発現したT細胞の活性化能を、in vitroのレポーターアッセイによって解析するため、NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞(Promega社)にCD137-CR1-copGFPベクターが形質導入された。当該細胞は、転写因子nuclear factor of activated T cells(NFAT)応答エレ

メントの下流にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されており、ルシフェラーゼの発光を検出することで、NFAT経路の活性化を定量化することができる。

[0436] 形質導入は、実施例3-1で構築されたレンチウイルスベクターを用いて、レンチウイルスによる方法で実施された。具体的にはまず、Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit (Genecopoeia)を用いて、上述のCD137-CR1-copGFPベクターと、パッケージングプラスミドミックスが293Ta細胞株 (Genecopoeia) にトランスフェクションされ、CD137-CR1-copGFPベクターが導入されたレンチウイルスが作製された。トランスフェクションから48時間後ないし72時間後に前記レンチウイルスを含有する上清が回収され、Lenti-X™ concentrator (タカラバイオ)を用いて濃縮された。

[0437] 次に、回収されたレンチウイルスを含有する上清と、ポリブレン溶液 (ナカライテスク) をNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞に添加し、2000rpmにて60分遠心することで、CD137-CR1-copGFPベクターが形質導入されたNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞 (CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞) が得られた。また、実験の陰性対象として、CD137-CR1をライゲートせずcopGFPのみ発現するpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターが形質導入されたNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が同時に作製された。

[0438] (3-3) CRタンパク質発現率の確認

実施例3-2で調製されたCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞のCD137-CR1の表面発現について、CD137抗体 (BioLegend社) で染色してBD FACSAria™ IIIセルソーター (BD Biosciences) によって解析された。その結果、生細胞のうち約70%がCD137-CR1を発現することが確認された。

[0439] (3-4) 標的抗原がGPC3である場合のCD137-CR1-cop

GFP Jurkat細胞の活性化能の評価

実施例3-2で調製されたCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞が、腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞と共培養され、腫瘍抗原に対する抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体が存在する条件におけるJurkat細胞の活性化能が解析された。ここでは、モデルの腫瘍抗原として固形がんを発現するヒトGPC3が選択され、実施例2-2で調製された、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体（H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0）が実験に使用された。

[0440] ヒトGPC3を発現する腫瘍細胞株は、ヒト肝臓がん細胞株であるSK-HEP1 (ATCC) にヒトGPC3を安定発現させたSK-pca60細胞が用いられた。まず、SK-pca60細胞が、384ウェル平底プレート (Corning) に10 μ L/ウェルずつ播種された (1E+04 (1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞、あるいは陰性対象としてキメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が、それぞれ5 μ L/ウェルずつ混合された (1E+04 (1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、各濃度に調製された二重特異性抗体が5 μ L/ウェルずつ添加された (終濃度0, 16, 160, 1600, 16000 ng/mL)。24時間後に、Bio-Glo™ Luciferase (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite (Perkin Elmer) により測定され、それらの結果を図4に示す。

その結果、CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞では、二重特異性抗体の抗体濃度依存的な活性化が検出された。一方、キメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞は、二重特異性抗体存在下でも活性化は検出されなかった。このことから、CD137-CR1-copGFP-T細胞は二重特異性抗体依

存的に活性化し、腫瘍抗原であるGPC3を発現する細胞に対して細胞傷害活性を発現し、抗腫瘍効果を誘導することが示唆された。

[0441] (3-5) 標的抗原がGPC5Dである場合のCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞の活性化能の評価

実施例3-2で調製されたCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞が、腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞と共培養され、腫瘍抗原に対する抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体が存在する条件におけるJurkat細胞の活性化能が解析された。ここでは、モデルの腫瘍抗原として血液がんを発現するヒトGPC5Dが選択され、実施例2-2で調製された、抗GPC5D抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体2種(GPA0018H-F760mnN17/GPA0018L-k0C//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0、またはGPA0039H-F760mnN17/GPA0039L-k0C//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)が実験に使用された。

[0442] ヒトGPC5Dを発現する腫瘍細胞株は、ヒト形質細胞腫由来のNCI-H929(ATCC)が用いられた。まず、NCI-H929細胞が、384ウェル平底プレート(Corning)に10 μ L/ウェルずつ播種された(1E+04(1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞、あるいは陰性対象としてキメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が、それぞれ5 μ L/ウェルずつ混合された(1E+04(1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、二重特異性抗体が終濃度0または10 μ g/mLにて5 μ L/ウェルずつ添加された。24時間後に、Bio-Glo Luciferase(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite(Perkin Elmer)により測定され、それらの結果を図5に示す。

[0443] その結果、CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞では、

二重特異性抗体存在下でのみ活性化が検出された。一方、キメラ受容体を発現せず c o p G F P のみ発現する N F A T - R E - l u c 2 J u r k a t 細胞は、二重特異性抗体存在下でも活性化は検出されなかった。このことから、C D 1 3 7 - C R 1 - c o p G F P - T 細胞は二重特異性抗体依存的に活性化し、腫瘍抗原である G P R C 5 D を発現する細胞に対して細胞傷害活性を発現し、抗腫瘍効果を誘導することが示唆された。

[0444] (3-6) 標的抗原が I L - 6 R である場合の C D 1 3 7 - C R 1 - c o p G F P J u r k a t 細胞の活性化能の評価

実施例 3-2 で調製された C D 1 3 7 - C R 1 - c o p G F P J u r k a t 細胞が、標的抗原を発現する標的細胞と共培養され、標的抗原に対する抗体と抗 C D 1 3 7 抗体からなる二重特異性抗体が存在する条件における J u r k a t 細胞の活性化能が解析された。ここでは、モデルの標的抗原としてヒト I L - 6 R が選択され、実施例 2-2 で調製された、抗 I L - 6 R 抗体と抗 C D 1 3 7 抗体からなる二重特異性抗体 (M R A H, v 1 - F 7 6 0 m n N 1 7 / M R A L, v 1 - k 0, v 1 / / h C D 1 3 7 V H - F 7 6 0 m n P 1 7 / h C D 1 3 7 V L - k 0) が実験に使用された。

[0445] ヒト I L - 6 R を発現する標的細胞株は、C H O 細胞にヒト I L - 6 R 全長を安定発現させた Z 8 A G B A - 0 1 - C 2 6 - C N - 0 0 6 細胞 (I L - 6 R - C H O 細胞) が用いられた。まず、I L - 6 R - C H O 細胞が、3 8 4 ウェル平底プレート (C o r n i n g) に $10 \mu\text{L}$ / ウェルずつ播種された ($1 \text{E} + 04$ (1×10^4) 細胞 / ウェル)。次いで、C D 1 3 7 - C R 1 - c o p G F P J u r k a t 細胞、あるいは陰性対象としてキメラ受容体を発現せず c o p G F P のみ発現する N F A T - R E - l u c 2 J u r k a t 細胞が、それぞれ $5 \mu\text{L}$ / ウェルずつ混合された ($1 \text{E} + 04$ (1×10^4) 細胞 / ウェル)。次いで、二重特異性抗体が終濃度 0 または $10 \mu\text{g} / \text{mL}$ にて $5 \mu\text{L}$ / ウェルずつ添加された。24 時間後に、B i o - G l o TM L u c i f e r a s e (P r o m e g a) を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、E n V i s i o n TM X c i t e (P e r

k i n E l m e r) により測定され、それらの結果を図6に示す。

その結果、CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞では、二重特異性抗体存在下でのみ活性化が検出された。一方、キメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞は、二重特異性抗体存在下でも活性化は検出されなかった。このことから、CD137-CR1-copGFP-T細胞は二重特異性抗体依存的に活性化し、標的抗原であるIL-6Rを発現する細胞に対して細胞傷害活性を発現することが示唆された。

[0446] [実施例4] 細胞外領域にCD137を有するキメラ受容体発現細胞の i n v i t r o細胞傷害活性の評価

(4-1) レトロウイルスベクターの構築

CD137-CR1を発現するキメラ受容体のレトロウイルスベクターが作製された。レトロウイルスベクター骨格としてpMSGV1 (Tamada k et al., Clin Cancer Res 18:6436-6445(2012)) を用いた。図7は、ベクター構築物及び5'末端から3'末端へのフレーム単位の構成要素の配置順序の概略図である。CD137-CR1に、F2Aペプチド (foot and mouth disease virus由来) とeGFP分子 (ヌクレオチド配列5521~6237bp、Genebank KF957646.1) が連結された。遺伝子は当業者既知の方法によって合成され、pMSGV1へとライゲートし、CD137-CR1-eGFPレトロウイルスベクターが生成された。

[0447] (4-2) CD137-CR1-eGFP発現T細胞の作製

ヒトT細胞のレトロウイルス形質導入方法を用い、実施例4-1で構築されたレトロウイルスベクターを用い、CD137-CR1-eGFPを発現する遺伝子改変T細胞が作製された。

具体的には、まず L i p o f e c t a m i n e (R) 2000又は3000 (サーモフィッシャーサイエンティフィック) によって、上述のCD137-CR1-eGFPベクターと、pAmpHプラスミド (タカラバイオ) がGP2-293パッケージング細胞株 (タカラバイオ) にトランスフェク

ションされ、CD137-CR1-eGFPベクターが導入されたレトロウイルスが作製された。トランスフェクションから48時間後に前記レトロウイルスを含有する上清が回収され、2枚の24ウェルプレートに吸着された形質導入用プレートが作製された。

- [0448] 次に、ヒトT細胞の形質導入のために、1ウェルあたり2E+06個のヒト末梢血単核球が、抗CD3モノクローナル抗体およびレトロネクチン（登録商標：タカラバイオ）が固相化された6ウェルプレート上でIL-2存在下で72時間培養された。培養後細胞が回収され、IL-2存在下において上述で作製されたCD137-CR1-eGFPレトロウイルスが吸着された形質導入用プレート上で一晩培養されたのち、翌日細胞がもう1枚の形質導入用プレートに移されてさらに一晩培養され、CD137-CR1-eGFPベクターが導入されたヒトT細胞（CD137-CR1-eGFP発現T細胞）が得られた。

- [0449] （4-3）CRタンパク質発現率の確認

形質導入後、細胞はヒトIL-2の存在下で維持され、形質導入された末梢血単核球の培養開始から7～8日後に実験に使用された。形質導入ヒトT細胞でのCD137-CR1-eGFPの表面発現は、細胞を抗CD3抗体、抗CD8抗体、及び抗CD137抗体で染色された後にフローサイトメトリーによって決定された。平均すると、全T細胞の80%がCD137-CR1-eGFPを発現した。

- [0450] （4-4）残存腫瘍細胞数を指標としたCD137-CR1-eGFP発現T細胞の細胞傷害活性の評価

実施例4-2で作製されたCD137-CR1-eGFP発現T細胞の細胞傷害活性はCyttoFLEX（Beckman Coulter）で評価された。SK-Hep1が陰性対象として、およびSK-Hep1にヒトGPC3を安定発現させたSK-pca60が標的細胞として用意された。陰性対象および標的細胞は6well plateに1E+05（ 1×10^5 ）cellsで播種された。CD137-CR1-eGFP発現細胞をエフェクター細胞として、エフェクター細胞対標的

細胞(E:T)の割合が1:1となるように 1×10^5 cellsで混合された。次に実施例2-2で調製された、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体(H0000-F760mnN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)は1 wellあたり $10 \mu\text{g}$ で添加された。また、陰性対象として、第一または第二の腕を抗Keyhole limpet hemocyanin (KLH) 抗体に置換した二重特異性抗体(IC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0またはIC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0//H0000-F760mnP17/GL4-k0a)が、1 wellあたり $10 \mu\text{g}$ で添加された。添加から48時間後にCD137-CR1-eGFP発現T細胞及び標的細胞が回収された。回収された細胞はZombie Aqua™ Fixable Viability Kit (BioLegend, 423104) を用いて死細胞が染色され、抗ヒトCD45抗体(BioLegend, 304039)を用いてT細胞が染色された。

[0451] 細胞傷害活性は残存癌細胞数で評価された。残存癌細胞数は、共培養後の細胞数および生細胞中のCD45陰性画分の細胞の割合から算出された。

それらの結果を図8Aに示す。標的細胞がSK-pca60であり、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体を添加した条件でのみ、残存腫瘍細胞数が顕著に低下した。

[0452] この結果から、in vitroにおけるCD137-CR1-eGFP発現T細胞の添加抗体依存的な標的細胞への細胞傷害活性が示された。

[0453] (4-5) xCELLigenceシステムを用いたCD137-CR1-eGFP発現T細胞の細胞傷害活性の評価

実施例4-2で作製されたCD137-CR1-eGFP発現T細胞の細胞傷害活性はxCELLigence (Agilent technology) によっても評価された。SK-Hep1は陰性対象として、およびSK-Hep1にヒトGPC3を安定発現させたSK-pca60が標的細胞として用意された。陰性対象および標的細胞はE-

Plate 96に 1×10^4 (1×10^4) cellsで前日に播種された。翌日、CD137-CR1-eGFP発現細胞をエフェクター細胞として、エフェクター細胞対標的細胞(E:T)の割合が1:1、1:3となるように 1×10^4 (1×10^4)、 3×10^4 (3×10^4) cellsで混合された。次に実施例2-2で調製された、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体 (H0000-F760mnN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0) は1 wellあたり終濃度 $10 \mu\text{g/mL}$ になるように添加された。電気抵抗値を経時的に測定することにより、CD137-CR1-eGFP発現細胞の細胞傷害活性をリアルタイムでモニタリングした。

[0454] 細胞増殖阻害活性は以下の式で計算された。細胞増殖阻害活性 (%) = $100 \times (A-B)/(A-1)$ (A : 抗体なしのウェルのDelta Cell Indexの平均値、B : 検体のDelta Cell Index) それらの結果を図8Bに示す。標的細胞がSK-pc60であり、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体を添加した条件でのみ、細胞増殖阻害活性が顕著に認められた。

[0455] この結果から、in vitroにおけるCD137-CR1-eGFP発現T細胞の添加抗体依存的な標的細胞への細胞傷害活性が示された。

[0456] [実施例5] リガンドとの結合能を減弱させた免疫受容体を細胞外ドメインに有するキメラ受容体

免疫受容体の細胞外全長を有するキメラ受容体が形質転換された免疫細胞は、当該免疫受容体に対するリガンドとの結合により、標的抗原非依存的に活性化し得る (図9)。このことは、標的ではない細胞の傷害を引き起こすため、問題となる。この課題を解決するため、細胞外ドメインの免疫受容体を人為的に改変し、リガンドとの結合能を減弱させることが考えられた。

[0457] [実施例6] 細胞外ドメインにCD137断片を有するキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価

(6-1) trCD137-CRを発現するレンチウイルスベクターの構築

ヒトCD137の細胞外ドメインは、システインリッチドメイン（CRD）1～4で構成され、リガンドであるCD137Lとの結合には、CRD2およびCRD3が重要な役割を果たすことが知られている。そこで、CD137Lとの結合を減弱させた改変CRとして、ヒトCD137細胞外ドメインのCRD3およびCRD4を欠失させたtrCD137-CR（配列番号25）が作製された。具体的には、コドン最適化されたヒトCD137細胞外ドメインのCRD1およびCRD2（Genbank NM001561.6, Leu24～Asp87）に、ヒトCD8アルファ鎖のヒンジ領域及び膜貫通領域（Genbank NM001768.7, Phe128～Asn210）、並びにヒトCD28分子（Genbank NM006139.4, Arg180～Ser220）、ヒトCD137分子（Genbank NM001561.6, Arg209～Leu255）、ヒトCD3ゼータ分子（Genbank NM000734.4, Arg52～Arg164）の細胞質領域が連結された（図2）。trCD137-CRをコードする遺伝子は当業者既知の方法によって合成された。この配列をpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターのMCSへとライゲートし、trCD137-CRとcopGFPを共発現するレンチウイルスベクターが構築された。

[0458] (6-2) NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞への遺伝子導入
trCD137-CR-Tの活性化能を、in vitroのレポーターアッセイによって解析するため、NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞（Promega社）にtrCD137-CRベクターが形質導入された。

[0459] 形質導入は、実施例6-1で構築されたレンチウイルスベクターを用いて、レンチウイルスによる方法で実施された。具体的にはまず、Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit（Genecopoeia）を用いて、上述のtrCD137-CRベクターと、パッケージングプラスミドミックスが293Ta細胞株（Geneco

p o e i a) にトランスフェクションされ、t r C D 1 3 7 - C R - c o p G F P ベクターが導入されたレンチウイルスが作製された。トランスフェクションから48時間後ないし72時間後に前記レンチウイルスを含有する上清が回収され、L e n t i - XTM c o n c e n t r a t o r (タカラバイオ) を用いて濃縮された。

次に、回収されたレンチウイルスを含有する上清と、ポリブレン溶液(ナカライテスク)をN F A T - R E - l u c 2 J u r k a t 細胞に添加し、2000rpmにて60分遠心することで、t r C D 1 3 7 - C R - c o p G F P ベクターが形質導入されたN F A T - R E - l u c 2 J u r k a t 細胞(t r C D 1 3 7 - C R - c o p G F P J u r k a t 細胞)が得られた。また、実験の陰性対象として、t r C D 1 3 7 - C R をライゲートせず c o p G F P のみ発現するp C D H - C M V - M C S - T 2 A - c o p G F P ベクターが形質導入されたN F A T - R E - l u c 2 J u r k a t 細胞が同時に作製された。

[0460] (6-3) CRタンパク質発現率の確認

実施例6-2で調製されたt r C D 1 3 7 - C R - c o p G F P J u r k a t 細胞のt r C D 1 3 7 - C R の表面発現について、C D 1 3 7 抗体(B i o L e g e n d 社)で染色してB D F A C S A r i aTM I I I セルソーター(B D B i o s c i e n c e s)によって解析された。解析に用いた抗体のエピトープは、主にC D 1 3 7 のC R D 2 であることが知られている。解析の結果、生細胞のうち約60%がt r C D 1 3 7 - C R を発現することが確認された。

[0461] (6-4) レポーターアッセイによるt r C D 1 3 7 - C R - c o p G F P J u r k a t 細胞の活性化能の評価

実施例5-2で調製されたt r C D 1 3 7 - C R - c o p G F P J u r k a t 細胞が、腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞と共培養され、腫瘍抗原に対する抗体と抗C D 1 3 7 抗体からなる二重特異性抗体が存在する条件におけるJ u r k a t 細胞の活性化能が解析された。ここでは、モデルの腫瘍抗原と

してヒトGPC3が選択され、実施例2-2で調製された、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体（H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0）が実験に使用された。

[0462] ヒトGPC3を発現する腫瘍細胞株は、ヒト肝臓がん細胞株であるSK-HEP1（ATCC）にヒトGPC3を安定発現させたSK-pca60細胞が用いられた。まず、SK-pca60細胞が、384ウェル平底プレート（Corning）に10 μ L/ウェルずつ播種された（1E+04（1 $\times$ 10⁴）細胞/ウェル）。次いで、trCD137-CR-copGFP Jurkat細胞、あるいは陰性対象としてキメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が、それぞれ5 μ L/ウェルずつ混合された（1E+04（1 $\times$ 10⁴）細胞/ウェル）。次いで、各濃度に調製された二重特異性抗体が5 μ L/ウェルずつ添加された（終濃度0, 16, 160, 1600, 16000ng/mL）。24時間後に、Bio-Glo Luciferase（Promega）を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite（Perkin Elmer）により測定され、それらの結果を図10に示す。

[0463] その結果、trCD137-CR-copGFP Jurkat細胞では、二重特異性抗体の抗体濃度依存的な活性化が検出された。一方、キメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞は、二重特異性抗体存在下でも活性化は検出されなかった。このことから、trCD137-CR-copGFP-T細胞は二重特異性抗体依存的に活性化し、腫瘍抗原を発現する細胞に対して細胞傷害活性を発現し、抗腫瘍効果を誘導することが示唆された。

[0464] [実施例7] 細胞外ドメインにCD137改変体を有するキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価

(7-1) レンチウイルスベクターの構築

ヒトCD137のCRD2上の、I64あるいはV71をArgに変異させた変異体は、いずれもCD137Lとの結合が減弱することが知られている。そこで、CD137Lとの結合を減弱させた改変CRとして、I64およびV71をArgに変異させた改変ヒトCD137細胞外ドメインに、ヒトCD8アルファ鎖のヒンジ領域及び膜貫通領域（Genbank NM001768.7, Phe128~Asn210）、並びにヒトCD28分子（Genbank NM006139.4, Arg180~Ser220）、ヒトCD137分子（Genbank NM001561.6, Arg209~Leu255）、ヒトCD3ゼータ分子（Genbank NM000734.4, Arg52~Arg164）の細胞質領域が連結された、CD137-CR2（配列番号26）が作製された（図2）。CD137-CR2をコードする遺伝子は当業者既知の方法によって合成された。この配列をpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターのMCSへとライゲートし、CD137-CR2とcopGFPを共発現するレンチウイルスベクターが構築された。

[0465] (7-2) NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞への遺伝子導入
CD137-CR2-Tの活性化能を、in vitroのレポーターアッセイによって解析するため、NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞（Promega社）にCD137-CR2ベクターが形質導入された。

[0466] 形質導入は、実施例7-1で構築されたレンチウイルスベクターを用いて、レンチウイルスによる方法で実施された。具体的にはまず、Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit（Genecopoeia）を用いて、上述のCD137-CR2ベクターと、パッケージングプラスミドミックスが293Ta細胞株（Genecopoeia）にトランスフェクションされ、CD137-CR2-copGFPベクターが導入されたレンチウイルスが作製された。トランスフェクションから48時間後ないし72時間後に前記レンチウイルスを含有する上清が回収され、Lenti-X™ concentrator（タカラバイオ）

を用いて濃縮された。

- [0467] 次に、回収されたレンチウイルスを含有する上清と、ポリブレン溶液（ナカライテスク）をNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞に添加し、2000rpmにて60分遠心することで、CD137-CR2-copGFPベクターが形質導入されたNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞（CD137-CR2-copGFP Jurkat細胞）が得られた。また、実験の陰性対象として、CD137-CR2をライゲートせずcopGFPのみ発現するpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターが形質導入されたNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が同時に作製された。

- [0468] (7-3) CRタンパク質発現率の確認

実施例7-2で調製されたCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞のCD137-CR2の表面発現について、CD137抗体（BioLegend社）で染色してFACSARIA™IIセルソーター（BD Biosciences）によって解析された。その結果、生細胞のうち95%以上がCD137-CR2を発現することが確認された。

- [0469] (7-4) レポーターアッセイによるCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞の活性化能の評価

実施例7-2で調製されたCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞が、腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞と共培養され、腫瘍抗原に対する抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体が存在する条件におけるJurkat細胞の活性化能が解析された。ここでは、モデルの腫瘍抗原としてヒトGPC3が選択され、実施例2-2で調製された、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体（H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mNP17/hCD137VL-k0）が実験に使用された。

ヒトGPC3を発現する腫瘍細胞株は、ヒト肝臓がん細胞株であるSK-HEP1（ATCC）にヒトGPC3を安定発現させたSK-pca60細

胞が用いられた。まず、SK-pca60細胞が、384ウェル平底プレート(Corning)に10 μ L/ウェルずつ播種された(1E+04(1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、CD137-CR2-copGFP Jurkat細胞、あるいは陰性対象としてキメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が、それぞれ5 μ L/ウェルずつ混合された(1E+04(1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、各濃度に調製された二重特異性抗体が5 μ L/ウェルずつ添加された(終濃度0, 16, 160, 1600, 16000ng/mL)。24時間後に、Bio-Glo™ Luciferase (Promega)を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite (Perkin Elmer)により測定され、それらの結果を図11に示す。

[0470] その結果、CD137-CR2-copGFP Jurkat細胞では、二重特異性抗体の抗体濃度依存的な活性化が検出された。一方、キメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞は、二重特異性抗体存在下でも活性化は検出されなかった。このことから、CD137-CR2-copGFP-T細胞は二重特異性抗体依存的に活性化し、腫瘍抗原を発現する細胞に対して細胞傷害活性を発現し、抗腫瘍効果を誘導することが示唆された。

[0471] [実施例8] リガンド発現細胞存在下におけるキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価

細胞外ドメインに免疫受容体を有するキメラ受容体が、当該免疫受容体に対するリガンドとの結合により、標的抗原の存在に関わらず活性化するか否か調べた。具体的には、実施例3-2で調製されたCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞、実施例6-2で調製されたtrCD137-CR-copGFP Jurkat細胞、あるいは実施例7-2で調製されたCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞が、ヒトCD137Lを発現する細胞と共培養され、Jurkat細胞が活性化するか否か

解析された。

[0472] ヒトCD137Lを発現する細胞株は、ヒトB細胞性リンパ腫由来であるRaji細胞(ATCC)が用いられた。まず、Raji細胞の懸濁液、あるいは陰性対象としてRaji細胞を含まない培地が384ウェル平底プレート(Corning)に10 μ L/ウェルずつ添加された(1E+04(1×10^4)細胞/ウェル)。次いで、CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞、trCD137-CR-copGFP Jurkat細胞、あるいはCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞が、それぞれ5 μ L/ウェルずつ混合された(1E+04(1×10^4)細胞/ウェル)。24時間後に、Bio-Glo Luciferase(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite(Perkin Elmer)により測定され、それらの結果を図12A～図12Cに示す。

[0473] その結果、CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞では、Raji細胞と共培養した条件において活性化が検出された。一方、Raji細胞と共培養しない条件では、活性化が検出されなかった。CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞は、Raji細胞上に発現するCD137Lとの直接的な結合により、標的抗原非依存的に活性化したものと考えられた。それに対して、CD137Lとの結合が減弱したtrCD137-CR-copGFP Jurkat細胞やCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞では、Raji細胞との共培養の有無によらず活性化が検出されなかった。以上より、CD137Lとの結合を減弱させることで、リガンドとの結合による標的抗原非依存的な活性化を抑制できることが示唆された。

[0474] [実施例9] リガンド結合能が減弱したCD137改変体の最適化

実施例5に記載の通り、免疫受容体の細胞外ドメイン(CD137)全長を有するキメラ受容体が形質転換された免疫細胞は、当該免疫受容体に対する生体内リガンド(CD137L)との結合により、標的抗原非依存的に活

性化し得ることで、標的抗原非特異的な細胞傷害を引き起こす可能性がある。この課題を解決する目的で細胞外ドメインの免疫受容体を人為的に改変し、生体内リガンドとの結合を減弱させることが考えられた。その方法として1つは実施例6に記載の通り、細胞外ドメインの一部を欠失させることが挙げられる。もう一つの方法としてリガンドと細胞外ドメインが相互作用する部位に遺伝子変異を加えることで、生体内リガンドとの結合活性を低減することが考えられる。そこで、生体内リガンドとの結合活性を低減させる改変を同定する目的で、単変異および変異の組み合わせが検討された。

[0475] (9-1) アラニンスキャンニングによる生体内リガンドとの相互作用部位の同定

CD137Lとの相互作用部位はCRD2およびCRD3が重要な役割を果たすことが知られている。より詳細にどの残基が直接相互作用をしているのか、もしくは相互作用に大きく影響を与えるのか知る目的で、CRD2およびCRD3の全ての残基(C48~K118)およびCRD1の一部の残基(N40~P47)についてアラニンスキャンニング変異導入が行われた。具体的にはまず初めに、コドン最適化されたヒトCD137細胞外ドメイン(BB0000, 配列番号36)にFactor10切断配列(FX, 配列番号37)およびヒトIgG1抗体定常領域の断片(配列番号38)、ビオチン付加タグ(BAPタグ, 配列番号39)が連結され、哺乳動物発現ベクターに導入された(BB0000-FXFcBAP)。このベクターを鋳型として、CRD1, CRD2およびCRD3のそれぞれの残基がアラニンに置換された改変体を作成された(BB0001~BB0076, 配列番号40~115)。

[0476] 作製された改変体の配列をコードする遺伝子を有するプラスミドがリポフェクション法によりヒト胎児腎細胞由来Expi293株(Invitrogen)に導入された。4日間培養された上清から、rProtein A Sepharose^(R) Fast Flow (Amersham Biosciences)を用いて当業者公知の方法で精製することで、目的のCD

137 改変体が得られた。分光光度計を用いて、精製された改変体溶液の 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)。

[0477] (9-2) CD137 改変体の生体内リガンドへの結合評価

CD137 細胞外ドメイン、もしくはその改変体を有するキメラ受容体が形質転換された免疫細胞は、その安全性のために生体内リガンドとの結合を減弱する必要がある。そこで作製された改変体と生体内リガンド (CD137L) との相互作用解析が行われた。

[0478] (9-2-1) 抗原としての CD137L の作製

CD137L は表 3 に記載の重鎖および軽鎖のプラスミドの組み合わせで当業者公知の方法で発現精製されたのち、Lys-C (Roche) により 37℃ 1 時間処理されることで切断処理された。各断片は Mab Select SuRe (Cytiva) のアフィニティカラムに通され、非結合成分がゲル浸透クロマトグラフィーに供された。その結果 CD137L が分取された。

[0479] [表3]

表 3 : CD137L の作製

	重鎖 1	軽鎖 1	重鎖 2	軽鎖 2
CD137L	ss4G8VH-4B9CH 配列番号 116	ss28H1VL-4B9CL 配列番号 117	ssDimerichCD137L- CLFcknob 配列番号 118	ssMonohCD137L- CH1 配列番号 119

[0480] (9-2-2) Biacore を用いた相互作用解析

実施例 9-1 で作製された CD137 改変体と、CD137L との相互作用解析には Biacore™ T200 (Cytiva) を用いて以下の方法で実施された。ランニングバッファーには 20 mM ACES, 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20 (登録商標、pH 7.4) が用い

られ、25℃で測定が実施された。センサーチップにはSeries S CM4 (Cytiva) に対し、anti-Human IgG (Fc) antibody (Cytiva) が固相されたチップが用いられた。このチップに対して目的のCD137改変体がキャプチャーされた後、ランニングバッファーで希釈したCD137Lが結合分子として供された。チップは3M MgCl₂を用いて再生され、繰り返し抗体をキャプチャーして測定が行われた。各改変体の抗CD137抗体断片に対する解離定数KD (mol/L) は、Biacore™ T200 Evaluation Software Version 2.0を用い、1:1 Binding modelを用いて算出された。

[0481] アラニンスキャンニングの結果、生体内リガンドへの結合を野生型の90%以下に下げ、発現量が野生型の50%以上を維持できる個所として、CRD1のN42, Q43, I44が、CRD2のC48, P50, F53, D63, I64, D87が、さらにはCRD3のL95およびM101が見出された。

[0482] (9-2-3)

実施例9-2-2で見いだされたポジションのうち、M101の位置に、網羅的に1アミノ酸改変を導入することで、CD137Lへの結合を低減できる改変が探索された。

作製された改変体は実施例9-2-2に記載の相互作用解析と同一の方法でCD137Lへの結合活性が評価された。

その結果M101Dという改変(BB0139:配列番号120)がCD137L結合を低減できる改変として新たに見出された。

[0483] (9-3) 生体内リガンドとの相互作用を低減する改変体の作製

実施例7に記載のように、ヒトCD137のCRD2上の、I64およびV71はCD137Lへの結合を低減できる改変である。そこで両方Argに改変された改変体(BB0077, 配列番号121)が、生体内リガンドとの相互作用をより低減できる改変体になりうることを期待して作製された

。その際、BB0000-FXFcBAPが鋳型として使用された。

[0484] (9-3-1) BB0000およびBB0077の生体内リガンドへの結合活性測定

BB0077の生体内リガンドへの結合が実施例9-2-2に記載の方法で測定された。CD137Lの結合量(RU: response unit)をCD137改変体の結合量(RU)で割った比として求めた。その結果、BB0077は生体内リガンドに結合しないことが確認された(図13)。

[0485] (9-3-2) BB0000およびBB0077のECM結合評価

作製された改変体が哺乳動物細胞に対して非特異的な結合活性を有する場合、細胞に対して抗原非特異的に細胞傷害活性が発揮されてしまう可能性がある。そこで各改変体の非特異的結合の多寡を*in vitro*で評価する系として知られている、Extracellular Matrix (ECM)への結合性が評価された。本アッセイ系でBB0000およびBB0077の非特異結合が評価された(米国特許出願公報2014/0080153)。その結果、BB0077は非常に強くECMへの結合が確認され、生体内で非特異的に反応を起こしうる可能性が示唆された(図14)。

[0486] (9-3-3) CD137改変体のECM結合評価

実施例9-2-2で示されたように、BB0077は生体内リガンドとの結合が認められない一方で非特異的な結合があることにより、安全性の懸念が考えられたため、生体内リガンドへの結合および非特異結合を共に抑制できるCD137改変体の作製が取り組まれた。

[0487] 非特異結合の原因として、改変によって導入されたアルギニンの等電点の高さが着目された。細胞膜表面上あるいはECM上に帯電する負電荷に、アルギニンの持つ正電荷が引き寄せられることで非特異結合が起こっていると考え、正電荷を有さず、リガンドとの結合を阻害し得る嵩高さを有するアミノ酸として、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸に改変することで、非特異結合を低減できるのか確認した。具体的には、BB0077で変異導入されているI64、V71のうち片方あるいは双方に、アスパラギン酸

，グルタミン，グルタミン酸を導入した改変体を作製した。作製されたそれぞれの名称及びBB0000に対して導入された改変および配列番号のリストは以下の表4の通りである。

[0488] [表4]

表4：作製した改変体

名称	改変	配列番号
BB0124	I64E	1 2 2
BB0125	I64Q	1 2 3
BB0126	I64D	1 2 4
BB0127	V71E	1 2 5
BB0128	V71Q	1 2 6
BB0129	V71D	1 2 7
BB0130	I64E/V71E	1 2 8
BB0131	I64E/V71Q	1 2 9
BB0132	I64E/V71D	1 3 0
BB0133	I64Q/V71E	1 3 1
BB0134	I64Q/V71Q	1 3 2
BB0135	I64Q/V71D	1 3 3
BB0136	I64D/V71E	1 3 4
BB0137	I64D/V71Q	1 3 5
BB0138	I64D/V71D	1 3 6

[0489] (9-3-4) 新たに見出された改変体の生体内リガンドへの結合活性評価

実施例9-3-3で作製されたBB0124～BB0138の各改変体は，実施例9-2-2に記載と同様の方法で生体内リガンドへの結合活性が評価された。CD137Lの結合量(RU: response unit)をCD137改変体の結合量(R

U)で割った比として求めた。その結果BB0127～BB138の改変体が、生体内リガンド結合を強く低減した。(図15)

[0490] (9-3-5) 各改変体のECM結合評価

実施例9-2-3および9-3-4で見いだされた改変体に関して、実施例9-3-2に記載の方法で非特異結合が評価された。その結果いずれの改変体も野生型(BB0000)よりもさらに非特異結合が低減されることが確認された(図16Aおよび図16B)。

[0491] 以上の結果より、生体内CD137Lに結合せず、非特異結合も低減されたCD137改変体が、新たに見出された。本改変体をキメラ受容体の細胞外領域として使用することで、ターゲット非特異的な細胞傷害を抑えたキメラ受容体を作製できることが期待された。

[0492] [実施例10] リガンド結合能が減弱したCD137改変体を細胞外ドメインに有するキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価

(10-1) レンチウイルスベクターの構築

実施例9にて構築された、CD137Lとの結合を減弱させたCD137改変体のうちBB0127, BB0128, BB0131, BB0133, BB0134, BB0139の6種を細胞外ドメインとして、ヒトCD8アルファ鎖のヒンジ領域及び膜貫通領域(Genbank NM001768.7, Phe128~Asn210)、並びにヒトCD28分子(Genbank NM006139.4, Arg180~Ser220)、ヒトCD137分子(Genbank NM001561.6, Arg209~Leu255)、ヒトCD3ゼータ分子(Genbank NM000734.4, Arg52~Arg164)の細胞質領域が連結されたキメラ受容体を作製された(配列番号27~32)。これらの配列をpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターのMCSへとライゲートし、キメラ受容体とcopGFPを共発現するレンチウイルスベクターが構築された。

[0493] (10-2) NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞への遺伝子導入

作製したキメラ受容体の活性化能を、*in vitro*のレポーターアッセイによって解析するため、NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞（Promega社）に形質導入された。

[0494] 形質導入は、実施例10-1で構築されたレンチウイルスベクターを用いて、レンチウイルスによる方法で実施された。具体的にはまず、Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit（Genecopoeia）を用いて、レンチウイルスベクターとパッケージングプラスミドミックスが293Ta細胞株（Genecopoeia）にトランスフェクションされ、レンチウイルスが作製された。トランスフェクションから48時間後ないし72時間後に前記レンチウイルスを含有する上清が回収された。

[0495] 次に、回収されたレンチウイルスを含有する上清と、ポリブレン溶液（ナカライテスク）をNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞に添加し、3000rpmにて60分遠心することで、形質導入されたNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が得られた。

[0496] （10-3）CRタンパク質発現率の確認

実施例10-2で調製されたJurkat細胞上のキメラ受容体の表面発現について、CD137抗体（BioLegend社）で染色してBD FACSVerse™（BD Biosciences）によって解析された。その結果、生細胞のうち50%以上がキメラ受容体を発現することが確認された。

[0497] （10-4）レポーターアッセイによる活性化能の評価

実施例10-2で調製されたキメラ受容体を発現するJurkat細胞が、腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞と共培養され、腫瘍抗原に対する抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体が存在する条件におけるJurkat細胞の活性化能が解析された。ここでは、モデルの腫瘍抗原としてヒトGPC3が選択され、実施例2-2で調製された、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体（H0000-F760nN17/GL4-

k O a / / h C D 1 3 7 V H - F 7 6 0 m n P 1 7 / h C D 1 3 7 V L - k O) が実験に使用された。

[0498] ヒトGPC3を発現する腫瘍細胞株は、ヒト肝臓がん細胞株であるSK-HEP1(ATCC)にヒトGPC3を安定発現させたSK-pca60細胞が用いられた。まず、SK-pca60細胞が、384ウェル平底プレート(Corning)に5 μ L/ウェルずつ播種された(1E+04(1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、実施例10-2にて調製されたキメラ受容体を発現するJurkat細胞と、陽性対象として実施例3-2にて調製されたCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞(細胞外ドメインがBB0000)、あるいは実施例7-2にて調製されたCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞(細胞外ドメインがBB0077)、および陰性対象として遺伝子導入されていないNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞の親株(Mock)が、それぞれ10 μ L/ウェルずつ混合された(1E+04(1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、二重特異性抗体が終濃度0または10 μ g/mLにて5 μ L/ウェルずつ添加された。24時間後に、Bio-Glo Luciferase(Promega)を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite(Perkin Elmer)により測定され、それらの結果を図17に示す。

[0499] その結果、キメラ受容体を発現するJurkat細胞では、二重特異性抗体存在下でのみ活性化が検出された。このことから、CD137改変体を細胞外ドメインに有するキメラ受容体を発現するT細胞は二重特異性抗体依存的に活性化し、腫瘍抗原を発現する細胞に対して細胞傷害活性を発現し、抗腫瘍効果を誘導することが示唆された。

[0500] (10-5) リガンド発現細胞存在下におけるキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価

実施例10-2で調製されたキメラ受容体を発現するJurkat細胞が、CD137リガンドとの結合により、標的抗原の存在に関わらず活性化す

るか否か調べた。具体的には、実施例10-2で調製されたキメラ受容体を発現するJurkat細胞が、ヒトCD137Lを発現する細胞と共培養され、Jurkat細胞が活性化するか否か解析された。

ヒトCD137Lを発現する細胞株は、ヒトB細胞性リンパ腫由来であるRaji細胞(ATCC)が用いられた。まず、Raji細胞の懸濁液、あるいは陰性対象としてRaji細胞を含まない培地が384ウェル平底プレート(Corning)に5 μ L/ウェルずつ添加された(1E+04(1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。次いで、実施例10-2にて調製されたキメラ受容体を発現するJurkat細胞と、陽性対象として実施例3-2にて調製されたCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞(細胞外ドメインがBB0000)、および陰性対象として実施例7-2にて調製されたCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞(細胞外ドメインがBB0077)あるいは遺伝子導入されていないNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞の親株(Mock)が、それぞれ10 μ L/ウェルずつ混合された(1E+04(1 $\times$ 10⁴)細胞/ウェル)。24時間後に、Bio-Glo™ Luciferase (Promega)を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite (Perkin Elmer)により測定され、それらの結果を図18に示す。

[0501] その結果、陽性対象であるCD137-CR1-copGFP Jurkat細胞では、Raji細胞との共培養によって活性化が検出され、陰性対象であるCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞では、活性化が検出されなかった。これは実施例8の結果を再現しており、CD137-CR1-copGFP Jurkat細胞は、CD137Lを介してRaji細胞と結合して、標的抗原非依存的に活性化するのに対し、CD137Lとの結合が減弱したCD137-CR2-copGFP Jurkat細胞は、CD137Lを介したRaji細胞との結合が生じず、活性化しないことが確かめられた。次に、実施例10-2にて調製された、細胞外ドメイ

ンにBB0127, BB0128, BB0131, BB0133, BB0134, あるいはBB0139を有するキメラ受容体を発現するJurkat細胞は、CD137-CR2-copGFP Jurkat細胞と同様に、Raji細胞との共培養による活性化が検出されなかった。このことから、実施例9にて見出されたCD137改変体は、リガンドとの結合による標的抗原非依存的な活性化を抑制できることが示唆された。

[0502] 実施例9および実施例10の結果から、ECMとの相互作用による非特異的な活性化や、CD137L発現細胞への細胞傷害活性を同時に回避し、標的細胞に対し選択的に細胞傷害活性を発現できることが示された。

[0503] [実施例11] 二重特異性抗体によるアゴニスト作用の評価

(11-1) CD137細胞内シグナルドメインを有さないCD137-CR3を発現するレンチウイルスベクターの構築

当該システムでは、アゴニスト作用を有する抗原結合分子を投与することで、ホストの免疫細胞や同時に投与するCR発現細胞に対し、内在性の免疫受容体を介してアゴニスト活性を誘導することができると考えられる。そこで、CD137アゴニスト作用を有する抗原結合分子によって、内在性の免疫受容体を発現する細胞に対しCD137アゴニスト活性が誘導されるか検証した。

[0504] CR発現細胞に対し、内在性の免疫受容体を介してアゴニスト活性が誘導されるか検証するため、CD137細胞内シグナルドメインを有さないCRを発現する細胞を作製した。具体的には、ヒトCD137細胞外ドメイン、ヒトCD8ヒンジおよび膜貫通ドメイン、およびCD3ゼータから成るキメラ受容体CD137-CD8-CD3ゼータ（図19, CD137-CR3と称される）を発現するレンチウイルスベクターが作製された。レンチウイルスベクター骨格としてpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP (System Bioscience) が用いられた。コドン最適化されたヒトCD137の細胞外ドメイン (Genbank NM001561, 6, Leu24~Gln186) に、ヒトCD8アルファ鎖のヒンジ領域及

び膜貫通領域 (Genbank NM001768.7, Phe128~Asn210)、並びにヒトCD3ゼータ分子 (Genbank NM000734.4, Arg52~Arg164) の細胞質領域が連結された。CD137-CR3 (配列番号33) をコードする遺伝子は当業者既知の方法によって合成された。この配列をpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターのMCSへとライゲートし、CD137-CR3とcopGFPを共発現するレンチウイルスベクターが構築された。

[0505] (11-2) NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat細胞への遺伝子導入

CD137-CR3を発現したT細胞の活性化能を、*in vitro*のレポーターアッセイによって解析するため、NF- κ B-Luc2/4-1BB Jurkat細胞 (Promega社) にCD137-CR3-copGFPベクターが形質導入された。当該細胞は、CD137を安定発現しているのに加えて、転写因子nuclear factor- κ B (NF- κ B) 応答エレメントの下流にルシフェラーゼ遺伝子が挿入されており、ルシフェラーゼの発光を検出することで、NF- κ B経路の活性化を定量化することができる。

[0506] 形質導入は、実施例11-1で構築されたレンチウイルスベクターを用いて、レンチウイルスによる方法で実施された。具体的にはまず、Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit (Genecopoeia) を用いて、上述のCD137-CR3-copGFPベクターと、パッケージングプラスミドミックスが293Ta細胞株 (Genecopoeia) にトランスフェクションされ、CD137-CR3-copGFPベクターが導入されたレンチウイルスが作製された。トランスフェクションから48時間後ないし72時間後に前記レンチウイルスを含有する上清が回収され、Lenti-X™ concentrator (タカラバイオ) を用いて濃縮された。

[0507] 次に、回収されたレンチウイルスを含有する上清と、ポリブレン溶液 (ナ

カライテスク)をNF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat細胞に添加し、3000rpmにて60分遠心することで、CD137-CR3-copGFPベクターが形質導入されたNF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat細胞(CD137-CR3-copGFP Jurkat細胞)が得られた。また、実験の比較対象として、CD137-CR1ベクターが形質導入されたNF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat細胞(CD137-CR1 Jurkat細胞)、および、キメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat細胞が同時に作製された。

[0508] (11-3) CRタンパク質発現率の確認

実施例11-2で調製されたCD137-CR3-copGFP Jurkat細胞およびCD137-CR1 Jurkat細胞のキメラ受容体の表面発現について、CD137抗体(BioLegend社)で染色してFACSARIA™IIIセルソーター(BD Biosciences)によって解析された。その結果、生細胞のうち約95%以上がCD137-CR3あるいはCD137-CR1を発現することが確認された。

[0509] (11-4) レポーターアッセイによるCD137-CR Jurkat細胞のCD137活性化能の評価

実施例11-2で調製されたCD137-CR3-copGFP Jurkat細胞あるいはCD137-CR1 Jurkat細胞が、腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞と共培養され、腫瘍抗原に対する抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体が存在する条件におけるJurkat細胞へのCD137アゴニスト活性誘導能が解析された。ここでは、モデルの腫瘍抗原としてヒトGPC3が選択され、実施例2-2で調製された、抗GPC3抗体と抗CD137抗体からなる二重特異性抗体(H0000-F760nN17/GL4-k0a//hCD137VH-F760mnP17/hCD137VL-k0)が実験に使用された。

[0510] ヒトGPC3を発現する腫瘍細胞株は、ヒト肝臓がん細胞株であるSK-

HEP1 (ATCC) にヒトGPC3を安定発現させたSK-pca60細胞が用いられた。まず、SK-pca60細胞が、384ウェル平底プレート (Corning) に10 μ L/ウェルずつ播種された (1E+04 (1 $\times$ 10⁴) 細胞/ウェル)。次いで、CD137-CR3-copGFP Jurkat細胞、CD137-CR1 Jurkat細胞、およびcopGFPのみ発現するNF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat細胞が、それぞれ5 μ L/ウェルずつ混合された (1E+04 (1 $\times$ 10⁴) 細胞/ウェル)。次いで、二重特異性抗体が終濃度0または16 μ g/mLにて5 μ L/ウェルずつ添加された。24時間後に、Bio-Glo™ Luciferase (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite (Perkin Elmer) により測定され、それらの結果を図20に示す。

[0511] その結果、いずれの条件でも、二重特異性抗体存在下にてアゴニスト活性が検出された。このうちCD137-CR1は、細胞内ドメインとしてCD137が融合されており、細胞膜上のCD137を介したアゴニスト活性に加えて、遺伝子導入したCRを介することでもアゴニスト活性が誘導されと考えられる。それに対し、細胞内ドメインとしてCD137が融合されていないCD137-CR3を発現するNF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat細胞と、copGFPのみ発現するNF-kB-Luc2/4-1BB Jurkat細胞では、細胞膜上のCD137を介してアゴニスト活性が誘導されたものと考えられた。以上のことから、当該のシステムでは、アゴニスト作用を有する抗原結合分子によって、CR発現の有無を問わず、内在性の免疫受容体を発現する細胞に対してアゴニスト活性を誘導できることが示された。

[0512] [実施例12] 細胞外領域にCD28を有するキメラ受容体発現細胞の活性化能の評価

(12-1) レンチウイルスベクターの構築

ヒトCD28の細胞外ドメイン (Genbank NM006139.4

、Asn19～Pro152)が融合されたキメラ受容体を発現するレンチウイルスベクターが作製された。膜貫通ドメインにヒトCD8を用いたコンストラクトと(CD28-CR1)、ヒトCD28を用いたコンストラクト(CD28-CR2)の2種が作製された(図21)。レンチウイルスベクター骨格としてpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFP(System Bioscience)が用いられた。CD28-CR1(配列番号34)、CD28-CR2(配列番号35)をコードする遺伝子は当業者既知の方法によって合成された。この配列をpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターのMCSへとライゲートすることで、レンチウイルスベクターが構築された。

[0513] (12-2) NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞への遺伝子導入

CD28-CR1あるいはCD28-CR2を発現したT細胞の活性化能を、*in vitro*のレポーターアッセイによって解析するため、NFAT-RE-luc2 Jurkat細胞(Promega社)に対し、実施例12-1にて構築したレンチウイルスベクターが形質導入された。

[0514] 具体的にはまず、Lenti-Pac™ HIV Expression Packaging Kit(Genecopoeia)を用いて、上述のCD28-CR1-copGFPあるいはCD28-CR2-copGFPベクターと、パッケージングプラスミドミックスが293Ta細胞株(Genecopoeia)にトランスフェクションされ、CD28-CR1-copGFPあるいはCD28-CR2-copGFPベクターが導入されたレンチウイルスが作製された。トランスフェクションから48時間後ないし72時間後に前記レンチウイルスを含有する上清が回収され、Lenti-X™ concentrator(タカラバイオ)を用いて濃縮された。

[0515] 次に、回収されたレンチウイルスを含有する上清と、ポリブレン溶液(ナカライテスク)をNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞に添加し、3000rpmにて60分遠心することで、CD28-CR1-copGFP

PあるいはCD28-CR2-copGFPベクターが形質導入されたNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が得られた。また、実験の陰性対象として、copGFPのみ発現するpCDH-CMV-MCS-T2A-copGFPベクターが形質導入されたNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が同時に作製された。

[0516] (12-3) 遺伝子導入効率の確認

実施例12-2で調製された、CD28-CR1-copGFPを発現するJurkat細胞と、CD28-CR2-copGFPを発現するJurkat細胞の遺伝子導入効率について、FACSAria™IIIセルソーター (BD Biosciences) を用いて、共発現させたcopGFPの発現率を指標に解析された。その結果、CD28-CR1は約40%の細胞に対して、CD28-CR2は約20%の細胞に対し、それぞれ遺伝子導入されていることが確認された。

[0517] (12-4) レポーターアッセイによる活性化能の評価

実施例12-2で調製されたCD28-CR1-copGFP発現 Jurkat細胞と、CD28-CR2-copGFP発現 Jurkat細胞が、それぞれ腫瘍抗原を発現する腫瘍細胞と共培養され、腫瘍抗原に対する抗体と抗CD28抗体からなる二重特異性抗体が存在する条件におけるJurkat細胞の活性化能が解析された。ここでは、モデルの腫瘍抗原としてヒトGPC3が選択され、実施例2-2で調製された、抗GPC3抗体と抗CD28抗体からなる二重特異性抗体 (H0000-F760mnN17/GL4-k0a//TGN1412VH-F760mnP17, v1/TGN1412VL-KT0, v1) と、陰性対象として、第一または第二の腕を抗Keyhole limpet hemocyanin (KLH) 抗体に置換した二重特異性抗体 (IC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0//TGN1412VH-F760mnP17, v1/TGN1412VL-KT0, v1またはIC17HdK-F760mnN17/IC17L-k0//H0000-F760mnP17/GL4-k0a) が実

験に使用された。

[0518] ヒトGPC3を発現する腫瘍細胞株は、ヒト肝臓がん細胞株であるSK-HEP1 (ATCC) にヒトGPC3を安定発現させたSK-pca60細胞が用いられた。まず、SK-pca60細胞が、384ウェル平底プレート (Corning) に10 μ L/ウェルずつ播種された (1E+04 (1 $\times$ 10⁴) 細胞/ウェル)。次いで、CD28-CR1-copGFP Jurkat細胞、CD28-CR2-copGFP Jurkat細胞、あるいは陰性対象としてキメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞が、それぞれ5 μ L/ウェルずつ混合された (1E+04 (1 $\times$ 10⁴) 細胞/ウェル)。次いで、各種の二重特異性抗体が終濃度0または10 μ g/mLにて5 μ L/ウェルずつ添加された。24時間後に、Bio-Glo™ Luciferase (Promega) を用いてルシフェラーゼ活性が測定された。ルシフェラーゼ活性は、EnVision™ Xcite (Perkin Elmer) により測定され、それらの結果を図22に示す。

[0519] その結果、CD28-CR1-copGFP Jurkat細胞およびCD28-CR2-copGFP Jurkat細胞はいずれも、抗体を添加しない条件や、陰性対象の二重特異性抗体を添加した条件での活性化は弱かったのに対し、抗GPC3抗体と抗CD28抗体からなる二重特異性抗体存在下にてはじめて強く活性化した。一方、キメラ受容体を発現せずcopGFPのみ発現するNFAT-RE-luc2 Jurkat細胞は、抗GPC3抗体と抗CD28抗体からなる二重特異性抗体存在下でも活性化は検出されなかった。このことから、細胞外領域にCD28を有するキメラ受容体を発現するT細胞は二重特異性抗体依存的に活性化し、腫瘍抗原を発現する細胞に対して細胞傷害活性を発現し、抗腫瘍効果を誘導することが示唆された。

[0520]

[表5-1]

配列番号	名前	全長配列
1	H0000	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTHYEMHWIRQPPGGGLEWIGALDPK TGDAYSQKFKGRVLTADKSTSTAYMELSSLTSEDYAVYYCTRFFSYTYWGQG TLVTSS
2	GL4	DIVMTQSPFLSLPVTIPGEPASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYQQKPGQAPRLLIY KYSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHPPTFGGGTK LEIK
3	F760nN17	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHT CPPCPAPELRGGPKVFLFPPPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPYLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQESL SLSP
4	k0a	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKSTYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
5	hCD137VH	QVQLQQWAGALLKPSSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPKGLEWIGELNHG GYVTYNPSLESRTISVDTSKNQPSLELSSVTAADTAVYYCARDYGPQNYDWYF DLWGRGTLVTSS
6	hCD137VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNR ATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKEVI K
7	F760mNP17	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKHTHT CPPCPAPELRGGPKVFLFPPPKDITLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPYLDSGGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCFSVMHEALHNHYTQKSL SLSP
8	k0	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKSTYSLSSITLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
9	GPA0018H	QSVEESGGRLVTPGTPLTLCTVSGFSLSSYAMSWVRQAPGKLEWIGIINTRG STYYASWAKGRFTISKSTTVDLKITSPTTADTATYFCARGYTAYSGAVSIWGP GTLVTSS
10	GPA0018L	DVYMTQTPASVSEPVGGTVTIKQASQNTYSNLAWYQQKPGQPPLLIYAASNL ASGVSSRFKSGSGGTQFTLTISDLECADSATYYCQSDYGSSTVYGAFGGGTEVV VK

[0521]

[表5-2]

11	F760mnN17	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHT CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPYLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHINHYTQESL SLSP
12	k0C	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDCSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	GPA0039H	QSYEESGGRLVTPGGTLTFTCTVSGFSLSSYAMGWVRQAPGEGLEYIGTIDTGG SAYYATWAKGRFTISKTSSTTVGLIMTSLTAADTATYFCARVADYNIGLRRLDL WGQGTLLTVSS
14	GPA0039L	ADVVMQTTPASVSEPVGGTVTICKQASQYIYSNLAWYQQKPGKPKLLIYTTSN LESGVPSRFRGSGSGTEFTLTISDLECAAAATYYCQSAIYSSSYVFPFGGGTEV VVK
15	MRAL v1	QVQLQESGPGLVPRPQSTLSLTCTVSGYSITSDHAWSWVRQPPGRLGLEWIGYISY SGITTYNPSLKSRTVMTLRTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARSLARTTAMDY WGQGSLLTVSS
16	MRAL v1	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRL HSGVPSRFRGSGSGTDFTFTISSLPEDFATYYCQQGNTLPYTFGGGKVEIK
17	k0. v1	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDCSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	IC17HdK	QVQLQQSGPQLVRPGASVKISCKASGYSTSYWMHWVNRPGGLEWIGMIDPS YSETRLNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYCALYGNFYFDYWGQ GTLLTVSS
19	IC17L	DIQMTQSSSSFSVSLGDRVTITCKASEDIYNRLAWYQQKPGNAPRLISGATSL ETGVPSRFRGSGSGKDYTLSTISLQTEDVATYYCQQYWSPTPTFGGGKLEVK
20	TGN1412VH	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYFTSYIHWVRQAPGGGLEWIGCIYPG NVNTNYNEKFKDRATLTVDTSISTAYMELSLRLSDDTAVYFCTRSHYGLDWNFD VWGQGTITVTVSS
21	TGN1412VL	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCHASQNTYVWLNWYQQKPGKAPKLLIYKASNL HTGVPSRFRGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGQTYPTFGGGKVEIK
22	F760mnP17. v1	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTPVSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKHTHT CPPCPAPELRGGPKVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDNLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRKEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPPYLSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHINHYTQKSL SLSP
23	KT0. v1	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE SVTEQDSKDCSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0522]

[表5-3]

24	CD137-CR1	LQDPCSNCPAGTFCNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCFCGTENDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSP QAAAFVVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR
25	1rCD137-CR	LQDPCSNCPAGTFCNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDAAFVVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
26	CD137-CR2	LQDPCSNCPAGTFCNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCFCGTENDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSP QAAAFVVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPG PTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGR DPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLST ATKDTYDALHMQUALPPR
33	CD137-CR3	LQDPCSNCPAGTFCNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCFCGTENDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSP QAAAFVVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGL DFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRVKFSRSADAPAYQQGQNQL YNELNLGRREEYDVLKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEI GMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR
34	CD28-CR1	NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYVGNYSQQLQVYSKTGFNCBGLGNE SVTFYLNLYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPAAAFVVPVFLPAKPTTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRSKRSLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCS CRFPEEEEGGCEL RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLKRRGRDPENGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQUALPPR

[0523]

[表5-4]

35	CD28-CR2	NKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVVGNY SQQLQVYSKTGFNCDGKLGNESVTFYLQNLVYNQTDIYFCKIEVMYPPPYLDNE KSNGTIIHVKGKHLCPSPLEPGPSKPFVVLVVGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRSRFSVVKRGRKKLLY IFKQPFMRPVQTTQEEDGCCRFPEEEGGCELRVKFSRSADAPAYQQGQNQLY NELNLGRREEYDVLDKRRGRDPFMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSETG MKGERRRRGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
137	CD137 extracellular domain 1	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPAREPGHSP Q
138	CD137 extracellular domain 2	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE CSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPAPARE
139	CD137 extracellular domain 3	SLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKE ECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG GICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGP
140	CD137 extracellular domain 4	QDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFTRKEC SSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCCFGTFNDQKRG ICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVVCGPSP

請求の範囲

- [請求項1] 抗原結合分子の投与と組み合わせて用いるための、キメラ受容体を発現する細胞を含む医薬組成物であって、
- キメラ受容体は細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは、免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含み、
- 抗原結合分子は、標的抗原認識部位および前記免疫受容体を認識する免疫受容体認識部位を有する多重特異性抗原結合分子である、医薬組成物。
- [請求項2] キメラ受容体を発現する細胞の投与と組み合わせて用いるための、抗原結合分子を含む医薬組成物であって、
- キメラ受容体は細胞外ドメインを含み、該細胞外ドメインは免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体、またはその断片を含み、
- 抗原結合分子は、標的抗原認識部位および前記免疫受容体を認識する免疫受容体認識部位を有する多重特異性抗原結合分子である、医薬組成物。
- [請求項3] 免疫受容体認識部位が、キメラ受容体の細胞外ドメインおよび内因性の免疫受容体を認識する、請求項1または2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] キメラ受容体の細胞外ドメインが、内因性の免疫受容体のリガンドとの結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体またはその断片を含む、請求項1～3のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 免疫受容体が共刺激分子である、請求項1～4のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 免疫受容体がヒトCD137である、請求項1～5のいずれか1項に記載の医薬組成物。
- [請求項7] キメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトCD137細胞外ドメインのシステインリッチドメイン3およびシステインリッチドメイン4の

一部又は全部を少なくとも欠失させたヒトCD137細胞外ドメイン
改変体またはその断片を含む、請求項1～6のいずれか1項に記載の
医薬組成物。

[請求項8] キメラ受容体の細胞内シグナル伝達ドメインがCD3ゼータの細胞
内シグナル伝達ドメインを含む、請求項1～7のいずれか1項に記載
の医薬組成物。

[請求項9] 標的抗原が受容体、腫瘍抗原、MHC抗原、または分化抗原である、
請求項1～8のいずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項10] 標的抗原が腫瘍抗原である、請求項1～8のいずれか1項に記載の
医薬組成物。

[請求項11] 抗原結合分子が二重特異性抗体である、請求項1～10のいずれか
1項に記載の医薬組成物。

[請求項12] がんの治療または予防において用いるための、請求項1～11のい
ずれか1項に記載の医薬組成物。

[請求項13] 免疫受容体の細胞外ドメイン、免疫受容体の細胞外ドメイン改変体
、またはその断片を含む細胞外ドメインを含む、キメラ受容体。

[請求項14] キメラ受容体の細胞外ドメインが、内因性の免疫受容体のリガンド
との結合を減弱させた免疫受容体の細胞外ドメイン改変体またはその
断片を含む、請求項13に記載のキメラ受容体。

[請求項15] 免疫受容体が共刺激分子である、請求項13または14に記載のキ
メラ受容体。

[請求項16] 免疫受容体がヒトCD137である、請求項13～15のいずれか
1項に記載のキメラ受容体。

[請求項17] キメラ受容体の細胞外ドメインが、ヒトCD137細胞外ドメイン
のシステインリッチドメイン3およびシステインリッチドメイン4の
一部または全部を少なくとも欠失させたヒトCD137細胞外ドメイ
ン改変体またはその断片である、請求項13～16のいずれか1項に
記載のキメラ受容体。

- [請求項18] キメラ受容体の細胞内シグナル伝達ドメインがCD3ゼータの細胞内シグナル伝達ドメインを含む、請求項13～17のいずれか1項に記載のキメラ受容体。
- [請求項19] 請求項13～18のいずれか1項に記載のキメラ受容体を発現する細胞。
- [請求項20] 請求項19の細胞を含む組成物。
- [請求項21] 請求項13～18のいずれか1項に記載のキメラ受容体をコードする核酸。
- [請求項22] 請求項21に記載の核酸が挿入されたベクター。
- [請求項23] 請求項21に記載の核酸または請求項22に記載のベクターを用いて細胞をトランスフェクトまたは形質導入することを含む、請求項19に記載の細胞を製造する方法。