明　細　書

発明の名称 ：

免疫抑制機能を有する細胞に対するＴ細胞リダイレクト抗原結合分子

技術分野

[0001] 本発明は、免疫応答を抑制する機能を有する細胞を傷害することにより、癌の治療を可能とする抗原結合分子、当該抗原結合分子を含む様々な癌腫を治療するための医薬組成物または当該医薬組成物を用いる癌の治療方法に関する。

背景技術

[0002] 抗体は血漿中での安定性が高く、副作用も少ないことから医薬品として注目されている。中でもIgG型の抗体医薬は多数上市されており、現在も数多くの抗体医薬が開発されている（非特許文献１、および非特許文献２）。

[0003] 抗体医薬を用いた癌治療薬として、これまでCD20抗原に対するリツキサン、EGFR抗原に対するセツキシマブ、HER2抗原に対するハーセプチン等が承認されている（非特許文献３）。これらの抗体分子は、癌細胞に発現している抗原に結合し、ADCC等によって癌細胞に対する傷害活性を発揮する。

[0004] このように直接癌細胞に対して傷害活性を示す抗体医薬に対して、最近、CTLA4に対するIgG1型の抗体であるイピリムマブが転移性メラノーマに対して奏効することが確認され、２０１１年にFDAの承認を受けた。固形癌の微小環境においては、腫瘍を認識するエフェクターT細胞が癌微小環境の様々な因子により抑制されていることが知られている（非特許文献４）。中でも免疫チェックポイント分子であるCTLA4はT細胞の活性化を抑制する機能を有することが知られており、活性化したエフェクターT細胞および制御性T細胞において強く発現されている。癌微小環境においては、腫瘍を認識するエフェクターT細胞がCTLA4によって抑制されていると考えられている。イピリムマブはCTLA4に対する中和抗体であり、エフェクターT細胞の活性化抑制を阻害することにより、腫瘍を認識するエフェクターT細胞を活性化し、抗腫瘍効果を発揮

すると考えられている（非特許文献５）。同様に、免疫チェックポイント分子であるPD1に対する中和抗体であるニボルマブも、PD1によって抑制されている腫瘍を認識するエフェクターT細胞を活性化することにより、転移性メラノーマに対して高い効果を示すことが最近報告された（非特許文献６）。また、癌微小環境においては、制御性T細胞だけでなく、疲弊T細胞が存在していることが知られており、疲弊T細胞は細胞傷害活性（抗腫瘍活性）が無いだけでなく、腫瘍内の免疫抑制に貢献していることが知られている（非特許文献７）。

[0005] このように免疫チェックポイント分子に対する抗体医薬は、免疫チェックポイント分子のT細胞抑制作用を阻害することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられていた。しかしながら、最近、イピリムマブのようなCTLA4に対する抗体の抗腫瘍効果は、CTLA4に対する中和効果によるものだけではなく、CTLA4発現細胞に対する抗体依存的細胞傷害活性（ＡＤＣＣ活性）が重要であることが報告された（非特許文献８、９）。腫瘍微小環境においては、制御性T細胞および疲弊T細胞がCTLA4を強く発現していることが知られており、ＡＤＣＣ活性を有する抗CTLA4抗体は制御性T細胞および疲弊T細胞を殺すことができると考えられる。非特許文献８、９において、ＡＤＣＣ活性を有する抗CTLA4抗体はマウスにおいて、腫瘍中の制御性T細胞を除去し、強い抗腫瘍効果を発揮するが、アミノ酸置換によりＡＤＣＣ活性を無くした抗CTLA4抗体は腫瘍中の制御性T細胞を除去できず抗腫瘍効果を発揮することができなかった。

[0006] このように、ＡＤＣＣ活性が抗CTLA4抗体の抗腫瘍効果に重要な役割を果たし、ＡＤＣＣ活性により制御性T細胞を殺すことが重要な作用機序であることが見出されている。

[0007] 一方、抗体によるＡＤＣＣ活性は、そのFc領域がFcγ受容体と結合することによって発揮される。例えば、IgG1抗体のFc領域のアミノ酸を置換（改変）することによりFcγ受容体との結合を強化することによって、ＡＤＣＣ活性を増強することが可能であることが報告されている（非特許文献１０）。実際、Fc領域の改変によりＡＤＣＣ活性を増強した抗CD19抗体は、天然型抗C

D19抗体より強い抗腫瘍効果を発揮した（非特許文献１０）。

[0008] これらのことから、抗CTLA4抗体に対して、Fc領域の改変によりＡＤＣＣ活性を増強することができれば、より強く腫瘍中の制御性T細胞を除去することができ、強い抗腫瘍効果を発揮できると考えられる。

先行技術文献

非特許文献

[0009] 非特許文献1：Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, Laura B Faden & Matthew C Dewitz, Monoclonal antibody successes in the clinic., Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073 - 1078

非特許文献2：Pavlou AK, Belsey MJ., The therapeutic antibodies market to 2008., Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396

非特許文献3：Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy. Weiner LM, Surana R, Wang S. Nat Rev Immunol. 2010 May;10(5):317-27.

非特許文献4：Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment, Thomas F Gajewski, Hans Schreiber & Yang-Xin Fu. Nature Immunology 14, 1014-1022 (2013)

非特許文献5：Anti-cytotoxic T lymphocyte antigen-4 antibodies in melanoma. Tosti G, Cocorocchio E, Pennacchioli E. Clin Cosmet Investig Dermatol. 2013 Oct 17;6:245-56

非特許文献6：PD-1 as a potential target in cancer therapy. McDermott DF, Atkins MB. Cancer Med. 2013 Oct;2(5):662-73.

非特許文献7：T cell exhaustion. E John Wherry. Nature Immunology, VOLUME 12 NUMBER 6 JUNE 2011:492-499.

非特許文献8：Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4 therapy against melanoma. Simpson TR1, Li F, Montalvo-Ortiz W, Sepulveda MA, Bergerhoff K, Arce F, Roddie C, Henry JY, Yagita H, Wolchok JD, Peggs KS, Ravetch J

V, Allison JP, Quezada SA. J Exp Med. 2013 Aug 26;210(9):1695-710.

非特許文献9：Anti-CTLA-4 Antibodies of IgG2a Isotype Enhance Antitumor Activity through Reduction of Intratumoral Regulatory T Cells, Mark J. Selby, John J. Engelhardt, Michael Quigley, Karla A. Henning, Timothy Chen, Mohan Srinivasan, and Alan J. Korman, Cancer Immunol Res; 1(1); 1-11.

非特許文献10：The impact of Fc engineering on an anti-CD19 antibody: increased Fcgamma receptor affinity enhances B-cell clearing in nonhuman primates. Zalevsky J, Leung IW, Karki S, Chu SY, Zhukovsky EA, Desjarlais JR, Carmichael DF, Lawrence CE. Blood. 2009 Apr 16;113(16):3735-43.

非特許文献11：Curiel, T. J. et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. Nature medicine 10, 942-949, doi:10.1038/nm1093 (2004).

非特許文献12：Sato, E. et al. Intraepithelial CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8+/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 102, 18538-18543, doi:10.1073/pnas.0509182102 (2005).

非特許文献13：Kawaida, H. et al. Distribution of CD4+CD25high regulatory T-cells in tumor-draining lymph nodes in patients with gastric cancer. The Journal of surgical research 124, 151-157, doi:10.1016/j.jss.2004.10.004 (2005).

非特許文献14：Kono, K. et al. CD4+CD25high regulatory T cells increase with tumor stage in patients with gastric and esophageal cancers. Cancer immunology, immunotherapy : CII 55, 1064-1071, doi:10.1007/s00262-005-0092-8 (2006).

非特許文献15：Hiraoka, N., Onozato, K., Kosuge, T. & Hirohashi, S. Prevalence of FOXP3+ regulatory T cells increases during the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma and its premalignant lesions. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 12, 5423-5434, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0369 (2006).

非特許文献16：Liotta, F. et al. Frequency of regulatory T cells in peripheral blood and in tumour-infiltrating lymphocytes correlates with poor prognosis in renal cell carcinoma. BJU international 107, 1500-1506, doi:10.1111/j.1464-410X.2010.09555.x (2011).

非特許文献17：Kobayashi, N. et al. FOXP3+ regulatory T cells affect the development and progression of hepatocarcinogenesis. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 13, 902-911, doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-2363 (2007).

非特許文献18：Gobert, M. et al. Regulatory T cells recruited through CCL22/CCR4 are selectively activated in lymphoid infiltrates surrounding primary breast tumors and lead to an adverse clinical outcome. Cancer research 69, 2000-2009, doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-2360 (2009).

非特許文献19：Bates, G. J. et al. Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology 24, 5373-5380, doi:10.1200/JCO.2006.05.9584 (2006).

非特許文献20：Gerber, A. L. et al. High expression of FOXP3 in primary melanoma is associated with tumour progression. The British journal of dermatology 170, 103-109, doi:10.1111/bjd.12641 (2014).

非特許文献21：Wang, Y. Y., He, X. Y., Cai, Y. Y., Wang, Z. J. & Lu, S

. H. The variation of CD4+CD25+ regulatory T cells in the periphery blood and tumor microenvironment of non-small cell lung cancer patients and the downregulation effects induced by CpG ODN. Targeted oncology 6, 147-154, doi:10.1007/s11523-011-0182-9 (2011).

非特許文献22：de Vos van Steenwijk, P. J. et al. Tumor-infiltrating CD14-positive myeloid cells and CD8-positive T-cells prolong survival in patients with cervical carcinoma. International journal of cancer. Journal international du cancer 133, 2884-2894, doi:10.1002/ijc.28309 (2013).

非特許文献23：Wainwright, D. A., Dey, M., Chang, A. & Lesniak, M. S. Targeting Tregs in Malignant Brain Cancer: Overcoming IDO. Frontiers in immunology 4, 116, doi:10.3389/fimmu.2013.00116 (2013).

非特許文献24：Yu, P. et al. Simultaneous inhibition of two regulatory T-cell subsets enhanced Interleukin-15 efficacy in a prostate tumor model. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 109, 6187-6192, doi:10.1073/pnas.1203479109 (2012).

非特許文献25：Zheng, J., Liu, P. & Yang, X. YB-1 immunization combined with regulatory T-cell depletion induces specific T-cell responses that protect against neuroblastoma in the early stage. Acta biochimica et biophysica Sinica 44, 1006-1014, doi:10.1093/abbs/gms089 (2012).

非特許文献26：D'Arena, G. et al. Regulatory T-cell number is increased in chronic lymphocytic leukemia patients and correlates with progressive disease. Leukemia research 35, 363-368, doi:10.1016/j.leukres.2010.08.010 (2011).

非特許文献27：French, J. D. et al. Tumor-associated lymphocytes and increased FoxP3+ regulatory T cell frequency correlate with more aggressive papillary thyroid cancer. The Journal of clinical endocrinology and metabolism 95, 2325-2333, doi:10.1210/jc.2009-2564 (2010).

非特許文献28：Khan, A. R., Dovedi, S. J., Wilkinson, R. W. & Pritchard, D. I. Tumor infiltrating regulatory T cells: tractable targets for immunotherapy. International reviews of immunology 29, 461-484, doi:10.3109/08830185.2010.508854 (2010).

非特許文献29：Yang, Z. Z., Novak, A. J., Ziesmer, S. C., Witzig, T. E. & Ansell, S. M. Attenuation of CD8+ T-cell function by CD4+CD25+ regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin's lymphoma. Cancer research 66, 10145-10152, doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-1822 (2006).

非特許文献30：Yang, Z. Z., Novak, A. J., Stenson, M. J., Witzig, T. E. & Ansell, S. M. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. Blood 107, 3639-3646, doi:10.1182/blood-2005-08-3376 (2006).

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0010] 本発明は上記のような情況に鑑みてなされたものであり、免疫応答を抑制する機能を有する細胞を傷害することで、優れた抗腫瘍効果を発揮する抗原結合分子を提供すること、および、当該抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物、または当該医薬組成物による癌の治療方法を提供することである。

課題を解決するための手段

[0011] 本発明者らは、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメイン及びT細胞受容体（TCR）複合体に結合するドメインを含む抗原結合分子が、免疫応答を抑制する機能を有する細胞を傷害し、これまでの制御性T細胞および疲弊T細胞の表面に発現する分子に結合し且つADCC活性を有する抗原結合分子よりも優れた抗腫瘍活性を発揮することを見出した。また、当該抗原結合分子を有効成分として含むことで、様々な癌腫を治療することが可能な医薬組成物を見出した。

[0012] すなわち、本発明は以下を提供するものである。

〔１〕下記のドメイン；

（１）免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメイン、及び

（２）T細胞受容体複合体に結合するドメイン

を含み、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の免疫応答抑制活性を阻害する抗原結合分子。

〔２〕免疫応答を抑制する機能を有する細胞が、制御性T細胞又は疲弊T細胞である、〔１〕に記載の抗原結合分子。

〔３〕免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子が、CTLA4、PD1、TIM3、LAG3、CD244 (2B4)、CD160、GARP、OX40、CD137 (4-1BB)、CD25、VISTA、BTLA、TNFR25、CD57、KLRG1、CCR2、CCR5、CCR6、CD39、CD73、CD4、CD18、CD49b、CD1d、CD5、CD21、TIM1、CD19、CD20、CD23、CD24、CD38、CD93、IgM、B220(CD45R)、CD317、PD-L1、CD11b、Ly6G、ICAM-1、FAP、PDGFR、Podoplanin及びTIGITから選ばれるいずれかの分子である、〔１〕に記載の抗原結合分子。

〔４〕免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子が、CTLA4、TIM3、LAG3、CD137 (4-1BB)、CD25、CCR5、CCR6、CD38、TIGIT、およびOX40から選ばれるいずれかの分子である、〔３〕に記載の抗原結合分子。

〔５〕T細胞受容体複合体結合ドメインがT細胞受容体結合ドメインである、〔１〕から〔４〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔６〕T細胞受容体複合体結合ドメインがCD3結合ドメインである、〔１〕から〔４〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔７〕FcRn結合ドメインをさらに含む、〔１〕から〔６〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔８〕FcRn結合ドメインが、抗体のFc領域である、〔７〕に記載の抗原結合分子。

〔９〕FcRn結合ドメインが、Fcγ受容体に対する結合活性が低下している抗体のFc領域である、〔８〕に記載の抗原結合分子。

〔１０〕多重特異性抗体である、〔１〕から〔９〕のいずれかに記載の抗原結合分子。

〔１１〕〔１〕から〔１０〕のいずれかに記載の抗原結合分子を有効成分として含む、医薬組成物。

〔１２〕〔１〕から〔１０〕のいずれかに記載の抗原結合分子を有効成分として含む、免疫応答の抑制活性を阻害するための医薬組成物。

〔１３〕免疫応答の抑制活性の阻害が、T細胞による阻害である、〔１２〕に記載の医薬組成物。

〔１４〕T細胞による阻害が、T細胞の細胞傷害活性による阻害である、〔１３〕に記載の医薬組成物。

〔１５〕免疫応答の抑制活性が、制御性T細胞又は疲弊T細胞による活性である、〔１２〕から〔１４〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１６〕免疫応答の抑制活性が、CTLA4、PD1、TIM3、LAG3、CD244 (2B4)、CD160、GARP、OX40、CD137 (4-1BB)、CD25、VISTA、BTLA、TNFR25、CD57、KLRG1、CCR2、CCR5、CCR6、CD39、CD73、CD4、CD18、CD49b、CD1d、CD5、CD21、TIM1、CD19、CD20、CD23、CD24、CD38、CD93、IgM、B220(CD45R)、CD317、PD-L1、CD11b、Ly6G、ICAM-1、FAP、PDGFR、 Podoplanin及びTIGITから選ばれるいずれかの分子を発現する細胞の活性である、〔１２〕から〔１４〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１７〕癌治療剤である、〔１１〕から〔１６〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔１８〕卵巣癌、胃癌、食道癌、膵臓癌、腎細胞癌、肝細胞癌、乳癌、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、子宮頸癌、膠芽腫、前立腺癌、神経芽腫瘍、慢性リンパ性白血病、甲状腺乳頭癌、大腸癌、ホジキンリンパ腫および子宮内膜症から選ばれるいずれかの癌の治療剤である、〔１７〕に記載の医薬組成物。

〔１９〕前記〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載の抗原結合分子または前記〔１１〕～〔１８〕のいずれかに記載の医薬組成物を投与する工程を含む、細胞障害を誘導する、細胞増殖を抑制する、癌細胞もしくは癌細胞を含む腫

瘍組織に対する免疫を活性化する、または癌を治療もしくは予防する方法。

〔２０〕細胞障害の誘導、細胞増殖の抑制、癌細胞もしくは癌細胞を含む腫瘍組織に対する免疫の活性化またはがんの治療もしくは予防において使用するための前記〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載の抗原結合分子または前記〔１１〕～〔１８〕のいずれかに記載の医薬組成物。

〔２１〕前記〔１１〕～〔１８〕のいずれかに記載の医薬組成物の製造における、前記〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載の抗原結合分子の使用。

〔２２〕前記〔１〕～〔１０〕のいずれかに記載の抗原結合分子を使用する工程を含む、前記〔１１〕～〔１８〕のいずれかに記載の医薬組成物を製造する方法。

[0013] また、本発明は、本発明の抗原結合分子または本発明の医薬組成物を治療が必要な患者に投与することを特徴とする、癌を治療もしくは予防する方法または免疫応答の抑制を阻害する方法に関する。また、本発明は、本発明の抗原結合分子を含む、本発明の方法に用いるためのキットに関する。また、本発明は、本発明の抗原結合分子の、免疫応答の抑制を阻害するための医薬組成物の製造における使用に関する。また、本発明は、本発明の方法に使用するための、本発明の抗原結合分子または本発明の医薬組成物に関する。

図面の簡単な説明

[0014] [図1]癌細胞上に発現する癌抗原とT細胞上に発現するCD3に対する二重特異性抗体による癌細胞傷害活性を示す概念図である。

[図2-1]抗CD3抗体による異なるT細胞上のCD3間の架橋によるT細胞間架橋を示す概念図である。

[図2-2]抗CD3抗体による同一T細胞上のCD3間の架橋を示す概念図である。

[図3]抗CTLA4/CD3二重特異性抗体では、同一制御性T細胞上のCTLA4とCD3における架橋が起こることにより、エフェクターT細胞と制御性T細胞の細胞間架橋は起こらないことを示す概念図である。本概念図では標的細胞が制御性T細胞であり抗原がCTLA4と記載されているが、これらに限定されることはない。

[図4]抗CTLA4/CD3二重特異性抗体によるエフェクターT細胞上のCD3と制御性T

細胞上のCTLA4の間の架橋による細胞間架橋を示す概念図である。本概念図では標的細胞が制御性T細胞であり抗原がCTLA4と記載されているが、これらに限定されることはない。

[図5]抗マウスCTLA4抗体hUH02hUL01-mFa55のマウスCTLA4発現細胞に対するADCC活性を示す図である。

[図6]抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）のマウスCTLA4発現細胞に対する細胞傷害活性を示す図である。

[図7-1]マウスCTLA4結合ビーズとマウスCD3結合ビーズの、抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体による架橋の概念図である。

[図7-2]マウスCTLA4結合ビーズとマウスCD3結合ビーズの、抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体による架橋実験の結果（N=3）を表した図である。グラフは各測定結果の平均値と標準偏差を示している。

[図7-3]マウスCTLA4/マウスCD3結合ビーズとマウスCD3結合ビーズの、抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体による架橋実験の結果を表した図である。グラフは各測定結果の平均値と標準偏差を示している。

[図7-4]マウスCTLA4/マウスCD3結合ビーズとマウスCD3結合ビーズの、抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体による架橋の概念図である。

[図8]抗マウスCTLA4抗体（hUH02hUL01-mFa55、ADCC増強抗体）および抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760、T細胞リダイレクト抗体（T cell redirecting antibody））の腫瘍内投与（i.t.）によるマウス大腸癌細胞株CT26.WTに対するin vivo抗腫瘍効果を示す図である（各群n=2、プロットは各個体の腫瘍体積を示す）。

[図9]抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760、T細胞リダイレクト抗体）の腫瘍内投与（i.t.）および静脈内投与（i.v.）によるマウス大腸癌細胞株CT26.WTに対するin vivo抗腫瘍効果を示す図である（各群n=5、プロットは各群の腫瘍体積平均値+標準偏差を示す）。

[図10-1]健常人由来のPBMCに対して、コントロール抗体（control）および抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、CD25およびCD4

5RAの発現に基づいてCD4陽性細胞を解析した結果を示す図である。

[図10-2]健常人由来のPBMCに対して、コントロール抗体（control）および抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、CD25およびCD45RAの発現に基づいて計算されたCD4陽性T細胞中の制御性T細胞（Treg）の割合を示す図である。

[図10-3]健常人由来のPBMCに対して、コントロール抗体（control）および抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、CD25およびCD45RAの発現に基づいて計算されたエフェクターT細胞（Teff）と制御性T細胞（Treg）の比（Teff/Treg）を示す図である。

[図11-1]健常人由来のPBMCに対して、コントロール抗体（control）および抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、FoxP3およびCD45RA発現に基づいてCD4陽性細胞を解析した結果を示す図である。

[図11-2]健常人由来のPBMCに対して、コントロール抗体（control）および抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、FoxP3およびCD45RA発現に基づいて計算されたCD4陽性T細胞中の制御性T細胞（Treg）の割合を示す図である。

[図11-3]健常人由来のPBMCに対して、コントロール抗体（control）および抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、FoxP3およびCD45RA発現に基づいて計算されたエフェクターT細胞（Teff）と制御性T細胞（Treg）の比（Teff/Treg）を示す図である。

[図12]IgG1、IgG2、IgG3及びIgG4のFc領域を構成するアミノ酸残基と、kabatのEUナンバリング（本明細書においてEU INDEXとも呼ばれる）との関係を表す図である。

[図13]健常人由来のPBMCに対して、抗ヒトLAG3/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を4または6日間反応後、CD25およびCD45RAの発現に基づいてCD4陽性細胞を解析した結果を示す図である。

[図14]健常人由来のPBMCに対して、抗ヒトLAG3/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を4または6日間反応後、CD25およびCD45RAの発現に基づいて計算された

CD4陽性T細胞中の制御性T細胞（Treg）の割合を示す図である。

[図15]健常人由来のPBMCに対して、抗ヒトLAG3/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を4または6日間反応後、CD25およびCD45RAの発現に基づいて計算されたCD4陽性T細胞中のエフェクターT細胞（Teff）と制御性T細胞（Treg）の比（Teff/Treg）を示す図である。

[図16]健常人由来のPBMCに対して、抗ヒトOX40/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、CD25およびCD45RAの発現に基づいてCD4陽性細胞を解析した結果を示す図である。

[図17]健常人由来のPBMCに対して、抗ヒトOX40/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、CD25およびCD45RA発現に基づいて計算されたCD4陽性T細胞中の制御性T細胞（Treg）の割合を示す図である。

[図18]健常人由来のPBMCに対して、抗ヒトOX40/抗ヒトCD3二重特異性抗体（TRAB）を7日間反応後、CD25およびCD45RA発現に基づいて計算されたCD4陽性T細胞中のエフェクターT細胞（Teff）と制御性T細胞（Treg）の比（Teff/Treg）を示す図である。

発明を実施するための形態

[0015] 以下の定義は、本明細書において説明する本発明の理解を容易にするために提供される。

[0016] 抗原結合分子

本発明における「抗原結合分子」とは、本発明の「結合ドメイン」を含む分子であれば特に限定されず、さらに、５アミノ酸程度以上の長さを有するペプチドやタンパク質が含まれていてもよい。生物由来のペプチドやタンパク質に限定されず、例えば、人工的に設計された配列からなる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。

[0017] 本発明の抗原結合分子の好ましい例として、抗体のFc領域に含まれるFcRn結合ドメインを含む抗原結合分子を挙げることができる。生体内に投与されたタンパク質の血中半減期を延ばす方法として、目的タンパク質に抗体のFcR

n結合ドメインを付加し、FcRnを介したリサイクリング機能を利用する方法が良く知られている。

[0018] 本発明において、「FcRn結合ドメイン」は、FcRnに対して結合活性を有するものであれば特に限定されず、FcRnに直接結合するドメインであってもよいし、間接的に結合するドメインであってもよい。FcRnに直接結合するドメインとしては、例えば、FcRnを抗原とする抗体の可変領域、Fab、抗体のFc領域、これらの断片、アルブミン、アルブミンドメイン３、ヒト血清アルブミン(HSA)、トランスフェリン等が挙げられる。また、FcRnと間接的に結合するドメインとしては、例えば、上述のFcRnに直接結合するドメインに対して結合活性を有するドメインが挙げられる。本発明の好ましい態様の１つとして、抗体のFc領域、或いは、Fc領域中のFcRn結合領域を含む断片が挙げられる。ここで、「Fc領域」として、例えば、天然型IgG由来のFc領域を用いることができる。天然型IgGとは、天然に見出されるIgGと同一のアミノ酸配列を包含し、免疫グロブリンガンマ遺伝子により実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを意味する。例えば天然型ヒトIgGとは天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3、天然型ヒトIgG4などを意味する。天然型IgGにはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、ヒトIgG4抗体の定常領域としては、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列がSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されているが、本発明においてはそのいずれであっても良い。特にヒトIgG1の配列としては、EUナンバリング３５６～３５８番目のアミノ酸配列がDELであってもEEMであってもよい。

[0019] 抗体のFc領域としては、例えばIgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgMタイプのFc領域が存在している。本発明の抗体のFc領域は、例えば天然型ヒトIgG抗体由来のFc領域を用いることができる。本発明のFc領域として、例えば、天然型IgGの定常領域、具体的には、天然型ヒトIgG1を起源とする定常領域（配列番号：１）、天然型ヒトIgG2を起源とする定常領域（配列番号：２）、天然型ヒトIgG3を起源とする定常領域（配列番号：３）、天

然型ヒトIgG4を起源とする定常領域（配列番号：４）由来のFc領域を用いることができる。天然型IgGの定常領域にはそれから自然に生じる変異体等も含まれる。

[0020] このような抗体のFc領域は、例えば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を例示できる。

[0021] 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、Cγ1、Cγ2、Cγ3、Cγ4と呼ばれている。ヒトCγ1、Cγ2、Cγ3、Cγ4のFc領域を構成するポリペプチドのアミノ酸配列が、配列番号：５、６、７、８に例示される。各アミノ酸配列を構成するアミノ酸残基と、kabatのEUナンバリング（本明細書においてEU INDEXとも呼ばれる）との関係は図１２に示されている。

[0022] 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分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。

[0023] 本発明のFcRn結合ドメインとしては、特にFcγ受容体に対する結合活性が低下しているドメインが好ましい。ここで、Fcγ受容体（本明細書ではFcγレセプター、FcγRまたはFcgRと記載することがある）とは、IgG1、IgG2、Ig

G3、IgG4のFc領域に結合し得る受容体をいい、実質的にFcγレセプター遺伝子にコードされるタンパク質のファミリーのいかなるメンバーをも意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIbおよびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131（H型）およびR131（R型）を含む）、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；およびアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）、並びにいかなる未発見のヒトFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されるものではない。FcγRは、ヒト、マウス、ラット、ウサギおよびサル由来のものが含まれるが、これらに限定されず、いかなる生物由来でもよい。マウスFcγR類には、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）およびFcγRIII-2（CD16-2）、並びにいかなる未発見のマウスFcγR類またはFcγRアイソフォームまたはアロタイプも含まれるが、これらに限定されない。こうしたFcγ受容体の好適な例としてはヒトFcγRI（CD64）、FcγRIIa（CD32）、FcγRIIb（CD32）、FcγRIIIa（CD16）及び／又はFcγRIIIb（CD16）が挙げられる。

[0024] FcγRには、ITAM(Immunoreceptor tyrosine-based activation motif)をもつ活性型レセプターとITIM(immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif)をもつ抑制型レセプターが存在する。FcγRはFcγRI、FcγRIIa R、FcγRIIa H、FcγRIIIa、FcγRIIIbの活性型FcγRと、FcγRIIbの抑制型FcγRに分類される。

[0025] FcγRIのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれNM_000566.3及びNP_000557.1に、FcγRIIaのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれBC020823.1及びAAH20823.1に、FcγRIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれBC146678.1及びAAI46679.1に、FcγRIIIaのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれBC033678.1及びAAH33678.1に、並びにFcγRIIIbのポリヌクレオチド配列及びアミノ酸配列は、それぞれ

BC128562.1及びAAI28563.1に記載されている（RefSeq登録番号）。尚、FcγRIIaには、FcγRIIaの131番目のアミノ酸がヒスチジン（H型）あるいはアルギニン（R型）に置換された2種類の遺伝子多型が存在する（J. Exp. Med, 172, 19-25, 1990）。また、FcγRIIbには、FcγRIIbの232番目のアミノ酸がイソロイシン（I型）あるいはスレオニン（T型)に置換された2種類の遺伝子多型が存在する（Arthritis. Rheum. 46: 1242-1254 (2002)）。また、FcγRIIIaには、FcγRIIIaの158番目のアミノ酸がバリン（V型）あるいはフェニルアラニン（F型）に置換された2種類の遺伝子多型が存在する（J. Clin. Invest. 100(5): 1059-1070 (1997)）。また、FcγRIIIbには、NA1型、NA2型の2種類の遺伝子多型が存在する（J. Clin. Invest. 85: 1287-1295 (1990)）。

[0026] Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているかどうかは、FACS、ELISAフォーマット、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、周知の方法によって確認することができる(Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010)。

[0027] 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、発光シグナルを検出される。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。

[0028] 例えば、抗原結合分子がFcRn結合ドメインとして抗体のFc領域を含む場合、野生型Fc領域を有する抗原結合分子と、Fcγ受容体に対する結合を変化さ

せるためのアミノ酸変異が加えられた変異Fc領域を有する抗原結合分子を準備し、ドナービーズにビオチン標識された抗原結合分子を結合させ、アクセプタービーズにはグルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ化されたFcγ受容体を結合させる。変異Fc領域を有する抗原結合分子の存在下では、野生型Fc領域を有する抗原結合分子とFcγ受容体とは相互作用し520-620 nmのシグナルを生ずる。変異Fc領域を有する抗原結合分子をタグ化しない場合、野生型Fc領域を有する抗原結合分子とFcγ受容体間の相互作用と競合する。競合の結果表れる蛍光の減少を定量することによって相対的な結合親和性が決定され得る。抗原結合分子をSulfo-NHS-ビオチン等を用いてビオチン化することは公知である。Fcγ受容体をGSTでタグ化する方法としては、Fcγ受容体をコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドをインフレームで融合した融合遺伝子を発現可能なベクターを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。

[0029] 相互作用を観察する物質の一方（リガンド）をセンサーチップの金薄膜上に固定し、センサーチップの裏側から金薄膜とガラスの境界面で全反射するように光を当てると、反射光の一部に反射強度が低下した部分（SPRシグナル）が形成される。相互作用を観察する物質の他方（アナライト）をセンサーチップの表面に流しリガンドとアナライトが結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加し、センサーチップ表面の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に結合が解離するとシグナルの位置は戻る）。Biacoreシステムは上記のシフトする量、すなわちセンサーチップ表面での質量変化を縦軸にとり、質量の時間変化を測定データとして表示する（センサーグラム）。センサーグラムのカーブからカイネティクス：結合速度定数（ka）と解離速度定数(kd）が、当該定数の比からアフィニティー（KD）が求められる。BIACORE法では阻害測定法も好

適に用いられる。阻害測定法の例はProc.Natl.Acad.Sci.USA (2006) 103 (11), 4005-4010において記載されている。

[0030] 本明細書において、「Fcγ受容体に対する結合活性が低下している」とは、例えば、上記の解析方法に基づいて、対照（コントロール）とするFc領域を有する抗原結合分子の結合活性に比較して、被験抗原結合分子の結合活性が、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。

[0031] 対照とする抗原結合分子としては、例えば、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4モノクローナル抗体のFc領域を含むドメインを有する抗原結合分子が適宜使用され得る。当該Fc領域の構造は、配列番号：1 (RefSeq登録番号AAC82527.1のN末にA付加）、配列番号：2 (RefSeq登録番号AAB59393.1のN末にA付加）、配列番号：3 (RefSeq登録番号CAA27268.1のN末にA付加）、配列番号：4 (RefSeq登録番号AAB59394.1のN末にA付加）に記載されている。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Fcγ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、Fcγ受容体に対する結合活性が低下していることが検証されたFc領域の変異体を有する抗原結合分子が適宜作製される。

[0032] 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。

[0033] 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、22

6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、天然型ヒトIgG1抗体を起源とするFc領域が好適に利用される。

[0034] 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後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

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。

[0035] 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後のアミノ酸残基をそれぞれ表す）：

(e) H268Q、V309L、A330S、P331S

(f) V234A

(g) G237A

(h) V234A、G237A

(i) A235E、G237A

（j）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。

[0036] 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後のアミノ酸残基をそれぞれ表す）：

（k）F241A

（l）D265A

（m）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。

[0037] 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後のアミノ酸残基をそれぞれ表す）：

（n）L235A、G237A、E318A

（o）L235E

（p）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。

[0038] その他の好ましい例として、天然型ヒト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。

[0039] その他の好ましい例として、天然型ヒト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。

[0040] その他の好ましい例として、IgG1抗体のFc領域を構成するアミノ酸のうち、EUナンバリングに従って特定される265位のアミノ酸が他のアミノ酸によって置換されているFc領域を有する抗原結合分子が好適に挙げられる。置換後に存在するアミノ酸の種類は特に限定されないが、265位のアミノ酸がアラニンに置換されているFc領域を有する抗原結合分子が特に好ましい。

[0041] 本発明の抗原結合分子に含まれる「免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメイン」及び「T細胞受容体複合体結合ドメイン」(以下、これらの結合ドメインをまとめて抗原結合ドメインという)は、それぞれの抗原の一部または全部に特異的に結合する領域を意味し、そのような結合ドメインとして、例えば、抗体の抗原結合領域を含む領域が結合ドメインとして挙げられる。抗原の分子量が大きい場合、抗体の抗原結合領域は抗原の特定部分にのみ結合することができる。当該特定部分はエピトープと呼ばれる。抗原結合ドメインは一または複数の抗体の可変ドメインより提供され得る。好ましくは、抗原結合ドメインは抗体軽鎖可変領域（VL）と抗体重鎖可変領域（VH）とを含む。こうした抗原結合ドメインの例としては、「scFv (single chain Fv)」、「単鎖抗体 (single chain antibody)」、「Fv」、「scFv2 (single chain Fv 2)」、「Fab」または「$F(ab')_2$」等が好適に挙げられる。

[0042] ここで、「免疫応答を抑制する機能を有する細胞」は、免疫応答を抑制する機能を有していれば特に限定されず、例えば、制御性T細胞(regulatory T cell (Treg))、疲弊T細胞(exhausetd T cell)、MDSC (myeloma derived stromal cell)、TAM (tumor associated macrophage)、Tr1 (induced regulatory T cell)、TADC(tumor-associated dendritic cell)、TAN(tumor-associated neutrophil)、CAF (cancer-associated fibroblast)、Breg (regulatory B

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

[0043] 本発明において、「制御性T細胞」とは、免疫応答の抑制的制御を司るT細胞の一種を意味する。当該細胞は、過剰な免疫応答を抑制するための負の制御機構や、免疫の恒常性維持において重要な役割を果たし、CD4もしくはCD8を発現する二種類の制御性T細胞（Treg）に分類される。CD4 Tregは定常的にCD25とFoxP3を発現している内在性Treg細胞（natural Tregsもしくはn Tregs）と、ナイーブCD4陽性T細胞から分化し自己認識能の低い能動的あるいは誘導的なTreg（iTregs） に分類される。iTregには$Foxp3^{+}$ TregとFop3^{-} Tregが存在し、FoxP3^{-} Tregはタイプ I Treg (Tr1)と呼ばれる。Tr1に極めて類似した性質を持つTregとして$CD4^{+}CD25^{+}LAG3^{+}$ Tregが同定されている (Proc Natl Acad Sci USA.2009) 。またTreg細胞では、CD127の発現が低下していることも知られており、$CD127^{lo}CD25^{hi-int}$ (CD127が低発現、CD25が高～中程度の発現を示す集団）の分画は、Foxp3陽性の全てのTreg集団を含む。CD8 Tregも内在性Tregと誘導性Tregに分けられる。前者は$CD8^{+}CD122^{+}$ Tregとして分類され、後者はQa-1a拘束性$CD8^{+}$ Tregとして分類されている。Tregは、制御性の分子を発現することが知られており、CTLA4、PD1、TIM3、LAG3などの発現量が上昇して

おり、本発明の抗原結合分子の結合ドメインが結合する分子としては、このような分子が好ましい。

[0044] また、本発明において、「疲弊T細胞」は、持続的抗原刺激によりサイトカイン産生やエフェクター機能が著しく弱まり、増殖能や長期生存能が低下したT細胞を意味する。これらの疲弊T細胞はPD1などの制御性レセプターと、制御性サイトカインを産生することから、機能不全のみならず、免疫応答において抑制的にも働く。疲弊T細胞は主にPD1の発現が上昇している（Nature 439, 682-687 (2006)）。またPD1の他に、LAG-3、CD244 (2B4)、CD160、TIM-3、CTLA-4などの分子の発現も上昇している（Nature Immunology Volume: 12, Pages: 492-499 Year published: (2011) ）。本発明の抗原結合分子の結合ドメインが結合する分子としては、このような分子が好ましい。

[0045] また、「T細胞受容体複合体」は、T細胞受容体自身でもよいし、T細胞受容体とともにT細胞受容体複合体を構成するアダプター分子でもよい。アダプター分子として好適なものはCD3である。

[0046] T細胞受容体としては、可変領域でもよいし、定常領域でもよいが、好ましいT細胞受容体結合ドメインが結合するエピトープは定常領域に存在するエピトープである。定常領域の配列として、例えばRefSeq登録番号CAA26636.1のT細胞受容体α鎖（配列番号：９）、RefSeq登録番号C25777のT細胞受容体β鎖（配列番号：１０）、RefSeq登録番号A26659のT細胞受容体γ1鎖（配列番号：１１）、RefSeq登録番号AAB63312.1のT細胞受容体γ2鎖（配列番号：１２）、RefSeq登録番号AAA61033.1のT細胞受容体δ鎖（配列番号：１３）の配列を挙げることができる。

[0047] 本発明において、T細胞受容体複合体結合ドメインとして「CD3結合ドメイン」を用いる場合、CD3結合ドメインは一または複数の抗体の可変ドメインより提供され得る。好ましくは、CD3結合ドメインはCD3抗体の軽鎖可変領域（VL）とCD3抗体の重鎖可変領域（VH）とを含む。こうしたCD3結合ドメインの例としては、「scFv (single chain Fv) 」、「単鎖抗体 (single chain antibody) 」、「Fv」、「scFv2 (single chain Fv 2) 」、「Fab」または「F(ab'

$)_2$」等が好適に挙げられる。

[0048] 本発明に係るCD3結合ドメインは、ヒトCD3を構成するγ鎖、δ鎖又はε鎖配列に存在するエピトープであればいずれのエピトープに結合するものでもあり得る。本発明において、好ましくはヒトCD3複合体のε鎖の細胞外領域に存在するエピトープに結合するCD3抗体の軽鎖可変領域（VL）とCD3抗体の重鎖可変領域（VH）とを含むCD3結合ドメインが好適に用いられる。こうしたCD3結合ドメインとしては、OKT3抗体（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4914-4917）や種々の公知のCD3抗体の軽鎖可変領域（VL）とCD3抗体の重鎖可変領域（VH）とを含むCD3結合ドメインが好適に用いられる。また、ヒトCD3を構成するγ鎖、δ鎖又はε鎖を前記の方法によって所望の動物に免疫することによって取得された所望の性質を有するCD3抗体を起源とするCD3結合ドメインが適宜使用され得る。CD3結合ドメインの起源となるCD3抗体は下記のとおり適宜ヒト化された抗体やヒト抗体が適宜用いられる。CD3を構成するγ鎖、δ鎖又はε鎖の構造は、そのポリヌクレオチド配列が、配列番号：１４（NM_000073.2）、１６（NM_000732.4）及び１８（NM_000733.3）に、そのポリペプチド配列が、配列番号：１５（NP_000064.1）、１７（NP_000723.1）及び１９（NP_000724.1）に記載されている（カッコ内はRefSeq登録番号を示す）。

[0049] また、本発明の「抗原結合分子」の好ましい態様の１つとして、本発明の抗体の可変領域を含む、抗体を挙げることができる。

[0050] 抗体

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

、IgE、IgMの9種類のクラス（アイソタイプ）が知られている。本発明の抗体には、これらのアイソタイプのうちIgG1、IgG2、IgG3、IgG4が含まれ得る。

[0051] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知であり、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得され得る。本発明の抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの等が含まれる。

[0052] 抗体取得のために免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、ハイブリドーマ作製のための細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。

[0053] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫される。例えば、一般的な方法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下に注射によって投与されることにより免疫が実施される。具体的には、PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈された感作抗原が、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合され、乳化された後に、該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与される。また、感作抗原の免疫時には適当な担体が使用され得る。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合した該感作抗原ペプチドを免疫することが望ましい場合もある。

[0054] 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

[0055] DNA免疫によって本発明のモノクローナル抗体を得るために、まず、抗原タンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。抗原タンパク質をコードするDNAは、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得る。たとえば、発現ベクターが吸着した金粒子が、gene gunで免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。

[0056] このように哺乳動物が免疫され、血清中における抗原に結合する抗体力価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0057] 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。

[0058] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン（以下8AGと省略する）、あるいは5'ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択さ

れ得る。これらのピリミジンアナログをDNA中に取り込む正常な細胞は死滅する。他方、これらのピリミジンアナログを取り込めないこれらの酵素を欠損した細胞は、選択培地の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプタミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0059] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519)、MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415)、SP2/0 (Nature (1978) 276 (5685), 269-270)、FO (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21)、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323)、R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 等が好適に使用され得る。

[0060] 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。

[0061] 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。

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] このようにして得られたハイブリドーマは、通常の選択培養液、例えばHAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間（通常、係る十分な時間は数日から数週間である）上記HAT培養液を用いた培養が継続され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施される。

[0065] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択され得る。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖し得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、所望のハイブリドーマが選択され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単一クローニングが実施され得る。

[0066] 所望の抗体のスクリーニングおよび単一クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。所望の抗体は、例えば、FACS（fluorescence activated cell sorting）によってスクリ

ーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面への抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

[0067] FACSによって本発明のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするためには、まず産生される抗体が結合する抗原を発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、当該抗原を強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面の抗原に対する抗体の結合活性が選択的に検出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、抗原を強制発現させた細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0068] あるいは対象となる抗原を発現した細胞を固定化し、当該抗原発現細胞に対する抗体の結合活性がELISAの原理に基づいて評価され得る。たとえば、ELISAプレートのウェルに抗原発現細胞が固定化される。ハイブリドーマの培養上清をウェル内の固定化細胞に接触させ、固定化細胞に結合する抗体が検出される。モノクローナル抗体がマウス由来の場合、細胞に結合した抗体は、抗マウスイムノグロブリン抗体によって検出され得る。これらのスクリーニングによって選択された、抗原に対する結合能を有する所望の抗体を産生するハイブリドーマは、限界希釈法等によりクローニングされ得る。

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

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 抗体の可変領域（V領域）をコードするcDNAを取得するためには、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出するための方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

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

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

[0072] 抽出されたmRNAは、例えばmRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）等を使用して精製され得る。あるいは、QuickPrep mRNA Purification Kit （GEヘルスケアバイオサイエンス製）などのように、細胞から直接全mRNAを抽出するためのキットも市販されている。このようなキットを用いて、ハイブリドーマからmRNAが取得され得る。得られたmRNAから逆転写酵素を用いて抗体V領域をコードするcDNAが合成され得る。cDNAは、AMV Reverse Transcriptase First-strand cDNA Synthesis Kit（生化学工業社製）等によって合成され得る。また、cDNAの合成および増幅のために、SMART RACE cDNA 増幅キット（Clontech製）およびPCRを用いた5'-RACE法（Proc. Natl. Acad. Sci. USA（1988）85（23），8998-9002、Nucleic Acids Res.（1989）17（8），2919-2932）が適宜利用され得る。更にこうしたcDNAの合成の過程においてcDNAの両末端に後述する適切な制限酵素サイトが導入され得る。

[0073] 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。

[0074] 可変領域をコードする遺伝子を取得するためには、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使った5'-RACE法を利用するのが簡便である。まずハイブリドーマ細胞より抽出されたRNAを鋳型としてcDNAが合成され、5'-RACE cDNAライブラリーが得られる。5'-RACE cDNAライブラリーの合成にはSMART RACE cDNA 増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。

[0075] 得られた5'-RACE cDNAライブラリーを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子が増幅される。公知の抗体遺伝子配列をもとにマウス抗体遺伝子増幅用のプライマーがデザインされ得る。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列である。したがって、サブクラスは予めIso Stripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット（ロシュ・ダイアグノスティックス）などの市販キットを用いて決定しておくことが望ましい。

[0076] 具体的には、たとえばマウスIgGをコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖としてγ1、γ2a、γ2b、γ3、軽鎖としてκ鎖とλ鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーが利用され得る。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'側のプライマーには可変領域に近い定常領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方5'側のプライマーには、5' RACE cDNAライブラリー作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0077] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合せからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、抗原に対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。たとえば次のようにしてスクリーニングされ得る；

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

（２）該抗原発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および

（３）該抗原発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0078] 抗体と該抗原発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体と該抗原発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するために該抗原発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0079] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリーとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結することによってシングルチェインFv（scFv）を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0080] 目的とする抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に１コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のようにして消化された抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域（C領域）をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合されれば、キメラ抗体が取得される。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることをいう。したがって、マウス－ヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒト－ヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベ

クターに、前記V領域遺伝子を挿入することによって、キメラ抗体発現ベクターが構築され得る。具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレームで融合されることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

[0081] モノクローナル抗体の製造には、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に付加され得る。発現されたポリペプチドから、シグナル配列がそのカルボキシル末端部分から切断され、抗体が細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗体をコードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0082] 抗体遺伝子の発現のために、抗体重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）をコードするDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターによって、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）されることによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが単一の発現ベクターに組み込まれることによって宿主細胞が形質転換され得る（国際公開WO 94/11523を参照のこと）。

[0083] 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、いずれも本発明の免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメインやT細胞受容体複合体結合ドメインを単離するのに応用され得る。

[0084] 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

[0085] 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。

[0086] 更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

－酵母：サッカロミセス・セレビシエ（Saccharomyces serevisiae）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

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

[0087] 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。

[0088] 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）。

[0089] 本明細書において記載される抗原結合分子がヒトに投与される場合、例えば、当該分子における各種結合ドメインとして、抗体の可変領域を含むドメインを用いる場合は、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体由来の抗原結合ドメインが適宜採用され得る。遺伝子組換え型抗体には、例えば、ヒト化（Humanized）抗体等が含まれる。これらの改変抗体は、公知の方法を用いて適宜製造される。

[0090] 本明細書において記載される抗原結合分子における各種結合ドメインを作製するために用いられる抗体の可変領域は、通常、４つのフレームワーク領域（FR）にはさまれた３つの相補性決定領域（complementarity-determining region ; CDR）で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い同一性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるとされている。

[0091] 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。

[0092] 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。

[0093] 最終的に３つのCDRと４つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することによって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開EP 239400、国際公開WO1996/002576参照）。

[0094] 上記のように作製したヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変

異FR配列が選択され得る（Sato, K.et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856）。

[0095] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、WO1996/033735参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0096] さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードする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WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、WO1995/015388参照）。

[0097] ファージディスプレイ法以外にも、ヒト抗体ライブラリを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術として、無細胞翻訳系を使用する技術、細胞またはウイルス表面に抗原結合分子を提示する技術、エマルジョンを使用する技術等が知られている。例えば、無細胞翻訳系を使用する技術としては、終止コドンの除去等によりリボゾームを介してmRNAと翻訳されたタンパク質の複合体を形成させるリボゾームディスプレイ法、ピューロマイシン等の化合物を用いて遺伝子配列と翻訳されたタンパク質を共有結合させるcDNAディスプレイ法、mRNAディスプレイ法や、核酸に対する結合タンパク質を用いて遺伝子と翻訳されたタンパク質の複合体を形成させるCISディスプレイ法

等が使用され得る。また、細胞またはウイルス表面に抗原結合分子を提示する技術としては、ファージディスプレイ法以外にも、E. coliディスプレイ法、グラム陽性菌ディスプレイ法、酵母ディスプレイ法、哺乳類細胞ディスプレイ法、ウイルスディスプレイ法等が使用され得る。エマルジョンを使用する技術としては、エマルジョン中に遺伝子及び翻訳関連分子を内包させることによる、インビトロウイルスディスプレイ法等が使用され得る。これらの方法は既に公知である（Nat Biotechnol. 2000 Dec;18(12):1287-92、Nucleic Acids Res. 2006;34(19):e127、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2;101(9):2806-10、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 22;101(25):9193-8、Protein Eng Des Sel. 2008 Apr;21(4):247-55、Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):10701-5、MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5):508-18、Methods Mol Biol. 2012;911:183-98）。

[0098] 本発明において「特異的」とは、特異的に結合する分子の一方の分子がその一または複数の結合する相手方の分子以外の分子に対しては何ら有意な結合を示さない状態をいう。また、抗原結合ドメインが、ある抗原中に含まれる複数のエピトープのうち特定のエピトープに対して特異的である場合にも用いられる。また、抗原結合ドメインが結合するエピトープが複数の異なる抗原に含まれる場合には、当該抗原結合ドメインを有する抗原結合分子は当該エピトープを含む様々な抗原と結合することができる。

[0099] また、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中の各種結合ドメインが結合する抗原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中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。

[0100] 直線状エピトープは、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。直線状エピトープは、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～約１０個、６～２０個のアミノ酸が固有の配列において含まれる。

[0101] 立体構造エピトープは、直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。立体構造エピトープは、直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。立体構造エピトープの認識に関して、抗体は、ペプチドまたはタンパク質の三次元構造を認識する。例えば、タンパク質分子が折り畳まれて三次元構造を形成する場合には、立体構造エピトープを形成するあるアミノ酸および／またはポリペプチド主鎖は、並列となり、抗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。

[0102] 下記に被験抗原結合分子による、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子中のエピトープへの結合の確認方法が例示されるが、他の結合ドメインの対象抗原中のエピトープへの結合の確認方法も下記の例示に準じて適宜実施され得る。

[0103] 例えば、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子としてCTLA4を選択した場合、当該分子に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、該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例えばCTLA4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、CTLA4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、CTLA4に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子との結合活性が評価される。たとえば、固定化された線状ペプチドを抗原とするELISAによって、当該ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が評価され得る。あるいは、CTLA4を発現する細胞に対する当該抗原結合分子の結合における、線状ペプチドによる阻害のレベルに基づいて、線状ペプチドに対する結合活性が明らかにされ得る。これらの試験によって、線状ペプチドに対する当該抗原結合分子の結合活性が明らかにされ得る。

[0104] 上記抗原に対する抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が立体構造エピトープを認識することは、次のようにして確認され得る。例えば、上述のCTLA4に対する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子がCTLA4発現細胞に接触した際に当該細胞に強く結合する一方で、当該抗原結合分子が固定化されたCTLA4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、抗原発現細胞に対する結合活性の80%以下、通常50%以下、好ましくは30%以下、特に好ましくは15%以下の結合活性をいう。

[0105] 抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原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、抗原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。

[0106] ELISAフォーマットにおいて、抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原発現細胞に対する結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、抗原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、該細胞に結合した被験抗原結合分子が、被験抗原結合分子を認識する酵素標識抗体を利用して検出される。あるいはFACSにおいては、被験抗原結合分子の希釈系列を作成し、

抗原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、抗原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。

[0107] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原に対する被験抗原結合分子の結合は、フローサイトメーターによって検出することができる。フローサイトメーターとしては、例えば、次のような装置が知られている。

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

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

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

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

[0108] 例えば、上述の抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原に対する結合活性の好適な測定方法の一例として、次の方法が挙げられる。まず、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、10μg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用され得る。次に、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体の結合量は、CELL QUEST Software（BD社）を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、被験抗原結合分子の結合量によって表される被験抗原結合分子の結合活性が測定され得る。

[0109] 本発明の抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が、ある抗原結合分子とエピトープを共有することは、両者の同じエピトープに対する競合によっ

て確認され得る。抗原結合分子間の競合は、交叉ブロッキングアッセイなどによって検出される。例えば競合ELISAアッセイは、好ましい交叉ブロッキングアッセイである。

[0110] 具体的には、交叉ブロッキングアッセイにおいては、マイクロタイタープレートのウェル上にコートした抗原が、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。ウェル中の抗原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抗原をコートしたウェルへの結合活性は低下する。

[0111] 抗原を介してウェルに結合した被験抗原結合分の量は、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。

[0112] 候補の競合抗原結合分子の非存在下で実施されるコントロール試験において得られる結合活性と比較して、競合抗原結合分子が、抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の結合を少なくとも20%、好ましくは少なくとも20－50%、さらに好ましくは少なくとも50%ブロックできるならば、当該被験抗原結合分子は競合抗原結合分子と実質的に同じエピトープに結合するか、又は同じエピトープへの結合に対して競合する抗原結合分子である。

[0113] 本発明の抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子が結合するエピトープの構造が同定されている場合には、被験抗原結合分子と対照抗原結合分とがエピトープを共有することは、当該エピトープを構成するペプチドにアミノ酸変異を導入したペプチドに対する両者の抗原結合分子の結合活性を比較す

ることによって評価され得る。

[0114] 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。

[0115] 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、抗原結合ドメインの対象となってい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、10μg/mlから10 ng/mlまでの間のいずれかの濃度で使用される。当該細胞に対する標識抗体の結合量は、CELL QUEST Software (BD社) を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、標識抗体の結合量によって表される被験抗原結合分子と対照抗原結合分子の結合活性を測定することができる。

[0116] また、本発明の「抗原結合分子」は、単一のポリペプチド鎖内に、本発明の「抗体の可変領域」を形成する重鎖および軽鎖の両方を含むが、定常領域を欠いている抗体断片であってもよい。そのような抗体断片としては、例え

ば、ダイアボディ(diabody；Db)、scFv、単鎖抗体、$sc(Fv)_2$、$sc(Fab')_2$であってもよい。

[0117] Dbは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマー(Holliger P et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 6444-6448 (1993)、EP404, 097号、WO93/11161号等)であり、各々のポリペプチド鎖は、同じ鎖中でL鎖可変領域(VL)及びH鎖可変領域(VH)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。

[0118] 同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず、二量体化することにより、2つの抗原結合部位を形成する。

[0119] また、本明細書において、「scFv」、「単鎖抗体」、または「$sc(Fv)_2$」という用語は、単一のポリペプチド鎖内に、重鎖および軽鎖の両方に由来する可変領域を含むが、定常領域を欠いている抗体断片を意味する。一般に、単鎖抗体は、抗原結合を可能にすると思われる所望の構造を形成するのを可能にする、VHドメインとVLドメインの間のポリペプチドリンカーをさらに含む。単鎖抗体は、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113巻, Rosenburg、及び、Moore編, Springer-Verlag, New York, 269～315 (1994) においてPluckthunによって詳細に考察されている。同様に、国際特許出願公開WO 1988/001649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。

[0120] 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。

[0121] $sc(Fv)_2$は二つのVLと二つのVHの4つの可変領域がペプチドリンカー等のリンカーによって連結され一本鎖を構成する単鎖抗体である (J Immunol. Methods (1999) 231 (1-2), 177-189)。この二つのVHとVLは異なるモノクローナル

抗体から由来することもあり得る。例えば、Journal of Immunology (1994) 152 (11), 5368-5374に開示されるような同一抗原中に存在する二種類のエピトープを認識する二重特異性$sc(Fv)_2$ (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。

[0122] 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。

［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］

[0123] $sc(Fv)_2$の分子形態についてはWO2006/132352においても詳細に記載されており、当業者であればこれらの記載に基づいて、本明細書で開示される抗原結合分子の作製のために適宜所望の$sc(Fv)_2$を作製することが可能である。

[0124] ここで、Fv (variable fragment) 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。

[0125] 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。

[0126] 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。

[0127] 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（配列番号：20）

Ser・Gly・Gly・Gly（配列番号：21）

Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：22）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：23）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：24）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：25）

Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：26）

Ser・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：27）

(Gly・Gly・Gly・Gly・Ser（配列番号：22）)n

(Ser・Gly・Gly・Gly・Gly（配列番号：23）)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。

[0128] 合成化合物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ－EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ－DST）、ビス［2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（BSOCOES）、ビス［2-（スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル］スルホン（スルホ-BSOCOES）などであり、これらの架橋剤は市販されている。

[0129] 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。

[0130] また、「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。

[0131] 「$F(ab')_2$」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理することにより、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（L鎖可変領域）とCL（L鎖定常領域）からなるL鎖、及びVH（H鎖可変領域）とCHγ1（H鎖定常領域中のγ1領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントが製造され得る。これら2つの相同な抗体フラグメントは

それぞれFab'といわれる。

[0132] 「$F(ab')_2$」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。

[0133] 本発明の「抗原結合分子」の好ましい態様の１つとして、多重特異性抗体を挙げることができる。多重特異性抗体のFc領域として、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域を用いる場合、多重特異性抗体を起源とするFc領域も適宜使用される。本発明の多重特異性抗体としては、特に二重特異性抗体が好ましい。

[0134] 多重特異性抗体の会合化には、抗体H鎖の第二の定常領域（CH2）又はH鎖の第三の定常領域（CH3）の界面に電荷的な反発を導入して目的としないH鎖同士の会合を抑制する技術を適用することができる（WO2006/106905）。

[0135] 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。

[0136] 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。

[0137] 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。

[0138] 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。

[0139] 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）。

[0140] 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。

[0141] 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。

[0142] 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。

[0143] また、本発明の多重特異性抗体の会合化には更に他の公知技術を用いることもできる。抗体の一方のH鎖の可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(knob; 突起)に置換し、もう一方のH鎖の相対する可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(hole; 空隙)に置換することによって、突起が空隙に配置され得るようにすることで効率的にFc領域を有する異なるアミノ酸を有するポリペプチド同士の会合化を起こすことができる (WO1996/027011、Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681、US20130336973)。

[0144] これに加えて、本発明の多重特異性抗体の形成には更に他の公知技術を用いることもできる。抗体の一方のH鎖のCH3の一部をその部分に対応するIgA由来の配列にし、もう一方のH鎖のCH3の相補的な部分にその部分に対応するIgA由来の配列を導入したstrand-exchange engineered domain CH3を用いることで、異なる配列を有するポリペプチドの会合化をCH3の相補的な会合化によって効率的に引き起こすことができる (Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010)。この公知技術を使っても効率的に目的の多重特異性抗体の形成させることができる。

[0145] 他にも多重特異性抗体の形成には、WO2011/028952やWO2014/018572やNat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8.に記載の抗体のCH1とCLの会合化、VH、VLの会合化を利用した抗体作製技術、WO2008/119353やWO2011/131746に記載の別々に調製したモノクローナル抗体同士を使用して二重特異性抗体を作製す

る技術(Fab Arm Exchange)、WO2012/058768やWO2013/063702に記載の抗体重鎖のCH3間の会合を制御する技術、WO2012/023053に記載の二種類の軽鎖と一種類の重鎖とから構成される二重特異性抗体を作製する技術、Christophら（Nature Biotechnology Vol. 31, p 753-758 (2013)）に記載の1本のH鎖と1本のL鎖からなる抗体の片鎖をそれぞれ発現する２つのバクテリア細胞株を利用した二重特異性抗体を作製する技術等を用いることもできる。

[0146] 多重特異性抗体の形成の一態様としては、上述したように、二種類のモノクローナル抗体を還元剤存在下で混合し、コアヒンジのdisulfide結合を開裂させたのちに、再会合させてヘテロ二量化した二重特異性抗体を得る方法が挙げられるが（FAE）、CH3領域の相互作用界面に静電相互作用（WO2006/106905）を導入することにより、再会合時にさらに効率的にヘテロ二量化を誘起することができる（WO2015/046467）。天然型IgGを用いたFAEでは再会合がランダムに起こるため理論上50%の効率でしか二重特異性抗体が得られないが、当該方法では高収率で二重特異性抗体を製造することができる。

[0147] また、効率的に目的の多重特異性抗体を形成させることができない場合であっても、産生された抗体の中から目的の多重特異性抗体を分離、精製することによっても、本発明の多重特異性抗体を得ることが可能である。例えば、2種類のH鎖の可変領域にアミノ酸置換を導入し等電点の差を付与することで、2種類のホモ体と目的のヘテロ抗体をイオン交換クロマトグラフィーで精製可能にする方法が報告されている（WO2007114325）。また、ヘテロ体を精製する方法として、これまでに、プロテインAに結合するマウスIgG2aのH鎖とプロテインAに結合しないラットIgG2bのH鎖からなるヘテロ二量化抗体をプロテインAを用いて精製する方法が報告されている(WO98050431、WO95033844)。更に、IgGとProteinAの結合部位であるEUナンバリング435番目および436番目のアミノ酸残基を、Tyr、HisなどのProteinAへの結合力の異なるアミノ酸に置換したH鎖を用いることで、各H鎖とProtein Aとの相互作用を変化させ、Protein Aカラムを用いることで、ヘテロ二量化抗体のみを効率的に精製することもできる。

[0148] また、異なる複数のH鎖に結合能を与え得る共通のL鎖を取得し、多重特異性抗体の共通L鎖として用いてもよい。このような共通L鎖と異なる複数のH鎖遺伝子を細胞に導入することによってIgGを発現させることで効率の良い多重特異性IgGの発現が可能となる（Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681）。共通H鎖を選択する際に、任意の異なるH鎖に対応し高い結合能を示す共通Ｌ鎖を選択する方法も利用することができる（WO2004/065611）。

[0149] 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。

[0150] 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Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域に組み合わせて用いることもできる。なお、本発明の抗原結合分子は、上記改変が加えられたものをベースにして、同一のアミノ酸配列を有する抗原結合分子を別途作製したものであってもよい。

[0151] 本発明に係る抗原結合分子は、前記の

（１）免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメイン、及び

（２）T細胞受容体複合体に結合するドメイン

を含むものであればよく、その構造は限定されない。当該抗原結合分子は、これら２つの結合ドメインを含むことにより、（１）に記載の分子を発現する細胞による免疫応答を抑制する作用を阻害することで免疫応答を活性化し、癌細胞又は当該細胞を含む腫瘍組織に対して優れた細胞傷害作用を誘導することが可能となる。本発明の（１）及び（２）に記載の結合ドメインは、それぞれ、上述の免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子あるいは、T細胞受容体複合体に属する抗原から適宜選択することがで

きる。これらの結合ドメインは、ペプチド結合で直接連結することもできるし、リンカーを介して結合することもできる。

[0152] 本発明の抗原結合分子は、さらに、FcRn結合ドメインを含んでいてもよい。該FcRn結合ドメインとして、上述の抗体のFc領域を用いる場合は、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域が好ましい。Fcγ受容体に対する結合活性を低下させることで、Fcγ受容体発現細胞とT細胞受容体複合体を発現する細胞の間の架橋によって生じるサイトカインリリース等の全身性の免疫活性化によって生じる副作用を抑制することが可能である。

[0153] 本発明の抗原結合分子は、上述の公知の方法を用いて作製することができる。

例えば、（１）免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメインとして$F(ab')_2$、（２）T細胞受容体複合体に結合するドメインとして$F(ab')_2$を用い、（３）FcRn結合ドメインとして、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域を含むドメインを用いた場合に、（１）と（２）に記載された抗原結合ドメインと（３）に記載されたFc領域を含むドメインとをペプチド結合で直接連結したときは、連結されたポリペプチドは抗体の構造を形成する。そのような抗体を作製するためには前述のハイブリドーマの培養液から精製する他、当該抗体を構成するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを安定に保持している所望の宿主細胞の培養液から当該抗体を精製することもできる。

[0154] また、その他、リンカーを介して各ドメインを結合する場合は、採用されるリンカーとしては、上記で例示されるリンカーの他、例えばHisタグ、HAタグ、mycタグ、FLAGタグ等のペプチドタグを有するリンカーも適宜使用され得る。また、水素結合、ジスルフィド結合、共有結合、イオン性相互作用またはこれらの結合の組合せにより互いに結合する性質もまた好適に利用され得る。例えば、抗体のCH1とCL間の親和性が利用されたり、ヘテロFc領域の会合に際して前述の多重特異性抗体を起源とするFc領域が用いられたりする。

[0155] また、本発明は、本発明の抗原結合分子をコードするポリヌクレオチドに

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

[0156] 医薬組成物

別の観点においては、本発明は、上述の抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物を提供する。また、本発明は、当該抗原結合分子を有効成分として含有する、免疫応答の抑制活性を阻害する医薬組成物（免疫応答抑制活性阻害剤）、免疫応答活性化剤、細胞傷害誘導剤、細胞増殖抑制剤（細胞増殖阻害剤）および抗癌剤（以下、医薬組成物等）に関する。本発明の医薬組成物は、癌治療剤または癌予防剤として用いることもできる。本発明の免疫応答抑制活性阻害剤、免疫応答活性化剤、細胞傷害誘導治療剤、細胞増殖抑制剤および抗癌剤は、癌を罹患している対象または再発する可能性がある対象に投与されることが好ましい。

[0157] また、本発明において、上述の抗原結合分子を有効成分として含む、免疫応答抑制活性阻害剤、免疫応答活性剤、細胞傷害誘導治療剤、細胞増殖抑制剤および抗癌剤は、当該抗原結合分子を対象に投与する工程を含む、免疫応答抑制活性を阻害する方法、免疫応答を活性化する方法、細胞傷害を誘導する方法、細胞増殖を抑制する方法、癌細胞もしくは癌細胞を含む腫瘍組織に対する免疫を活性化する方法、または癌を予防もしくは治療する方法と表現することができ、あるいは、免疫応答抑制活性を阻害するための医薬組成物、免疫応答を活性化するための医薬組成物、細胞傷害を誘導するための医薬組成物、細胞増殖抑制剤および抗癌剤の製造における当該抗原結合分子の使

用と表現することもでき、あるいは、免疫応答抑制活性の阻害、免疫応答の活性化、細胞傷害の誘導、細胞増殖の抑制、癌細胞もしくは癌細胞を含む腫瘍組織に対する免疫の活性化またはがんの治療もしくは予防において使用するための当該抗原結合分子と表現することもできる。

[0158] 本発明において、「抗原結合分子を有効成分として含む」とは、当該抗原結合分子を主要な活性成分として含むという意味であり、当該抗原結合分子の含有率を制限するものではない。

[0159] 更に本発明における医薬組成物等は、必要に応じて複数種類の抗原結合分子を組み合わせて用いることが可能である。たとえば、同一の抗原に結合する複数の本発明の抗原結合分子のカクテルを用いることによって、当該抗原を発現する細胞に対する作用を強化できる可能性がある。

[0160] また、必要に応じ本発明の抗原結合分子はマイクロカプセル（ヒドロキシメチルセルロース、ゼラチン、ポリ［メチルメタクリル酸］等のマイクロカプセル）に封入され、コロイドドラッグデリバリーシステム（リポソーム、アルブミンミクロスフェア、マイクロエマルジョン、ナノ粒子及びナノカプセル等）とされ得る（"Remington's Pharmaceutical Science 16th edition", Oslo Ed. (1980)等参照）。さらに、薬剤を徐放性の薬剤とする方法も公知であり、当該方法は本発明の抗原結合分子に適用され得る（J.Biomed.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）。

[0161] 本発明の医薬組成物、あるいは免疫応答活性化剤、細胞傷害誘導剤、細胞増殖抑制剤（細胞増殖阻害剤）および抗癌剤は、経口、非経口投与のいずれかによって患者に投与することができる。好ましくは非経口投与である。係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などが挙げられる。例えば注射投与によって、本発明の医薬組成物、あるいは細胞傷害誘導治療剤、細胞増殖抑制剤および抗癌剤

を全身または局部的に投与できる。また、患者の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で投与量を選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001 mg/bodyから100000 mg/bodyの範囲で投与量を選択し得る。しかしながら、本発明の医薬組成物はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0162] 本発明の医薬組成物は、常法に従って製剤化することができ（例えば、Remington's Pharmaceutical Science, latest edition, Mark Publishing Company, Easton, U.S.A）、医薬的に許容される担体や添加物を共に含むものであってもよい。例えば界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等が挙げられる。更にこれらに制限されず、その他常用の担体を適宜使用できる。具体的には、軽質無水ケイ酸、乳糖、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセテート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセライド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、白糖、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、無機塩類等を担体として挙げることができる。

[0163] また、本発明は、ある免疫応答を抑制する機能を有する細胞を、当該細胞の表面に発現する分子に結合する本発明の抗原結合分子と接触させることにより、当該細胞を傷害し、癌細胞又は癌細胞を含む腫瘍組織に傷害を引き起こす方法、或いは、癌細胞又は癌細胞を含む腫瘍組織の増殖を抑制する方法を提供する。本発明の抗原結合分子の対象となる癌細胞又は癌細胞を含む腫瘍組織としては特に限定されないが、癌の悪化に免疫応答抑制活性を有する細胞が関与している癌腫あるいは腫瘍中の制御性T細胞あるいは疲弊T細胞の数と予後が相関する癌種が好ましく、そのような癌腫として、例えば、卵巣癌（非特許文献１１、１２）、胃癌（非特許文献１３、１４）、食道癌（非

特許文献１４）、膵臓癌（非特許文献１５）、腎細胞癌（非特許文献１６）、肝細胞癌（非特許文献１７）、乳癌（非特許文献１８、１９）、悪性黒色腫（非特許文献２０）、非小細胞肺癌（非特許文献２１）、子宮頸癌（非特許文献２２）、膠芽腫（非特許文献２３）、前立腺癌（非特許文献２４）、神経芽腫瘍（非特許文献２５）、慢性リンパ性白血病（非特許文献２６）、甲状腺乳頭癌（非特許文献２７）、大腸癌（非特許文献２８）、B細胞非ホジキンリンパ腫（非特許文献２９、３０）が報告されており、本発明の好適な癌腫として挙げられる。なお、本明細書に記載の「癌」は、卵巣癌、胃癌等の上皮性の悪性腫瘍のみならず、慢性リンパ性白血病やホジキンリンパ腫等の造血器がんを含む非上皮性の悪性腫瘍も意味するものとする。

[0164] 本発明において「接触」は、例えば、インビトロで培養している対象となる抗原が発現している細胞の培養液に、当該抗原に結合する本発明の抗原結合分子を添加することにより行われる。この場合において、添加される抗原結合分子の形状としては、溶液又は凍結乾燥等により得られる固体等の形状が適宜使用され得る。水溶液として添加される場合にあっては純粋に本発明の抗原結合分子のみを含有する水溶液であり得るし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液でもあり得る。添加する濃度は特に限定されないが、培養液中の最終濃度として、好ましくは1 pg/mlから1 g/mlの範囲であり、より好ましくは1 ng/mlから1 mg/mlであり、更に好ましくは1μg/mlから1 mg/mlが好適に使用され得る。

[0165] また、本発明において「接触」は更に、別の態様では、例えば、対象となる癌細胞株を体内に移植した非ヒト動物に、当該非ヒト動物の免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合する本発明の抗原結合分子を投与する、或いは、免疫応答を抑制する機能を有するヒト由来の細胞を発現する非ヒト動物に、対象となる癌細胞株を体内に移植し、これに当該ヒト由来の細胞の表面に発現している分子に結合する本発明の分子を投与することによっても行われる。投与方法は経口、非経口投与のいずれかに

よって実施できる。特に好ましくは非経口投与による投与方法であり、係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などが挙げられる。例えば注射投与によって、本発明の医薬組成物、あるいは免疫応答抑制活性を阻害するための医薬組成物、免疫応答を活性化するための医薬組成物、細胞傷害を誘導するための医薬組成物、細胞増殖抑制剤（細胞増殖阻害剤）および抗癌剤を全身または局部的に投与できる。また、被験動物の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。水溶液として投与される場合にあっては純粋に本発明の抗原結合分子のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で投与量を選択できる。あるいは、例えば、患者あたり0.001から100000 mg/bodyの範囲で投与量を選択できる。しかしながら、本発明の抗原結合分子投与量はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0166] 本発明の抗原結合分子の接触によって、対象となる癌細胞又は癌細胞を含む腫瘍組織に引き起こされた細胞傷害を評価又は測定する方法として、以下の方法が好適に使用される。インビトロ（in vitro）で該細胞傷害活性を評価又は測定する方法としては、細胞傷害性T細胞活性などの測定法を挙げることができる。本発明の抗原結合分子がT細胞性傷害活性を有するか否かを、公知の方法により測定することができる（例えば、Current protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.,(1993)等）。活性の測定に際しては、本発明とはその抗原結合ドメインが結合する抗原が異なる抗原であって試験に使用する細胞が発現していない抗原に結合する抗原結合分子を対照として、本発明の抗原結合分子と同様に使用し、本発明の抗原結合分子が、対照として使用された抗原結合分子よりも強い細胞傷害活性を示すことにより、

活性を判定し得る。

[0167] また、生体内（in vivo）で細胞傷害活性を評価又は測定するために、例えば本発明の抗原結合分子の対象となる癌細胞又は癌細胞を含む腫瘍組織を、非ヒト被験動物の皮内又は皮下に移植後、当日又は翌日から毎日又は数日間隔で被験抗原結合分子を静脈又は腹腔内に投与する。腫瘍の大きさを経日的に測定することにより、当該腫瘍の大きさの変化の差異を細胞傷害活性と規定し得る。インビトロでの評価と同様に対照となる抗原結合分子を投与し、本発明の抗原結合分子の投与群における腫瘍の大きさが対照抗原結合分子の投与群における腫瘍の大きさよりも有意に小さいことにより、本発明の抗原結合分子が細胞傷害活性を有すると判定し得る。

[0168] 本発明の抗原結合分子の接触による、当該抗原結合分子を構成する、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメインが結合する抗原を発現する細胞の増殖に対する抑制効果を評価又は測定する方法としては、アイソトープラベルしたthymidineの細胞へ取込み測定やMTT法が好適に用いられる。また、生体内で細胞増殖抑制活性を評価又は測定する方法として、上記記載の生体内において細胞傷害活性を評価又は測定する方法と同じ方法を好適に用いることができる。

[0169] また、本発明は、本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子を含む、本発明の方法に用いるためのキットを提供する。該キットには、その他、薬学的に許容される担体、媒体、使用方法を記載した指示書等をパッケージしておくことができる。

[0170] また、本発明は、本発明の方法に使用するための、本発明の抗原結合分子または本発明の製造方法により製造された抗原結合分子に関する。

[0171] 本明細書に記載の１又は複数の態様を任意に組み合わせたものも、当業者の技術常識に基づいて技術的に矛盾しない限り、本発明に含まれることが当業者には当然に理解される。

[0172] 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

[0173] 〔実施例１〕制御性T細胞の細胞表面マーカーに対するT細胞リダイレクト抗体のコンセプト

（１－１）制御性T細胞を除去することによる抗CTLA4抗体の抗腫瘍効果

上述の背景技術に記載の通り、イピリムマブはエフェクターT細胞表面に発現するCTLA4によるエフェクターT細胞の活性化抑制を阻害することで抗腫瘍効果が発揮されていると考えられていたが、最近、CTLA4発現T細胞に対する抗体依存的細胞傷害活性（ADCC活性）も重要であることが報告され、腫瘍中の制御性T細胞の除去とADCC活性が抗CTLA4抗体の抗腫瘍効果の重要な作用機序であることが見出されている。

[0174] 一方、IgG1抗体によるADCC活性は抗体の定常領域がNK細胞やマクロファージのFcγRと結合することで細胞傷害活性が誘導され、その結合を増強するような改変を加えた定常領域を有する抗体は、より強い細胞傷害活性を誘導し、抗腫瘍効果を発揮することも知られている。

[0175] このように癌微小環境において制御性T細胞あるいは疲弊T細胞に結合し、細胞傷害活性により制御性T細胞あるいは疲弊T細胞を除去することが強い抗腫瘍効果を発揮することが見出されたことから、より強力に制御性T細胞あるいは疲弊T細胞を除去することができれば、つまりより強い細胞傷害活性を発揮することができれば、より強い抗腫瘍効果が発揮されることが期待される。

[0176] （１－２）T細胞リダイレクト抗体（T cell redirecting antibody）

抗体の改良技術として、前述のADCC活性の増強や血中滞留性の延長、抗原に対する結合活性の向上、免疫原性リスクの低減が行われてきた。通常抗体は抗原の1つのエピトープを認識して結合することから、これらの改良技術を抗体に適用しても、ターゲットとなる抗原は1種類のみである。複数のターゲットを阻害する分子として、1分子で2種類以上の抗原と結合する抗体（二重特異性抗体という）が研究されている。二重特異性抗体は2種類以上の抗原と相互作用するため、2種類以上の抗原を1つの分子で中和する作用だけでなく

、細胞傷害活性をもつ細胞と癌細胞をクロスリンクすることで抗腫瘍活性を高める作用がある。

[0177] T細胞に発現しているタンパク質（CD3εやTCR）と癌細胞に発現しているタンパク質（癌抗原）を認識する二重特異性抗体として、BiTE分子であるブリナツモマブ（blinatumomab）やカツマキソマブ（Catumaxomab）が知られている。これらの分子は、2つの抗原結合ドメイン（scFvあるいはFab）によりそれぞれ癌抗原とT細胞に発現しているCD3ε鎖に結合し、T細胞と癌抗原発現細胞を細胞間架橋することができる（図１）。これにより、このようなT細胞リダイレクト抗体は、T細胞をエフェクター細胞として癌抗原発現細胞に対して強い細胞傷害活性を誘導することが可能である。

[0178] 一方、これまでT細胞をエフェクター細胞として、T細胞に対して強い細胞傷害活性を誘導するような抗体は報告されていない。例えば、CD3εは一般的なT細胞マーカーであるため、CD3εに対して両腕（２つのFab）で結合するIgG抗体（FcgR結合活性は有さない）であれば、図２－１に示すようにCD3εを発現するT細胞をエフェクター細胞として、CD3εを発現するT細胞に対して、両者を細胞間架橋することで、T細胞がT細胞に対して強い細胞傷害活性を誘導することが可能であると考えられるが、実際はこのようなことはほとんど起こらない。なぜならば、CD3εに対して両腕（２つのFab）で結合するIgG抗体は同一細胞上に発現するCD3εに対して２価でアビディティ（avidity）により強固に結合してしまうため、CD3εを発現するT細胞同士の細胞間架橋は起こらない（図２－２）。

[0179] CD3は一般的なT細胞マーカーであるため、CD3はエフェクター細胞となるT細胞、および、標的となるT細胞（例えば制御性T細胞および疲弊T細胞）の両方に発現しているため、T細胞リダイレクト抗体により標的T細胞に対して細胞傷害活性を示すことはできないと考えられてきた。すなわち、特定のT細胞ポピュレーションの表面マーカーである抗原Xを発現するT細胞に対するT細胞リダイレクト抗体（CD3εと抗原Xに対する二重特異性抗体）は、標的T細胞にはCD3εと抗原Xが発現しているため、上記T細胞リダイレクト抗体は、標的T

細胞（例えば制御性T細胞および疲弊T細胞）に対して２価でavidityにより強固に結合してしまうため、エフェクター細胞となるT細胞との細胞間架橋は起こらないと考えられてきた（図３）。実際にこれまでにT細胞抗原に対するT細胞リダイレクト抗体は報告されていない。

[0180] そのため、図４に示すような、制御性T細胞および疲弊T細胞に発現するCTLA4に対するT細胞リダイレクト抗体（CD3εとCTLA4に対する二重特異性抗体）は、標的細胞である制御性T細胞および疲弊T細胞にCD3εとCTLA4の両方が発現しているため、エフェクター細胞となるT細胞と制御性T細胞および疲弊T細胞との間で架橋は起こらず、制御性T細胞および疲弊T細胞に対して強い細胞傷害活性を誘導することはできないと考えられており、これまでに制御性T細胞または疲弊T細胞に対するT細胞リダイレクト抗体の報告もない。

[0181] すなわち、実際に生体内でCTLA4に対するT細胞リダイレクト抗体（抗CTLA4/抗CD3ε二重特異性抗体）が、細胞間架橋を起こすことで制御性T細胞を傷害し、抗腫瘍効果が発揮できるかどうかは未知であった。そこで、我々は実際にCTLA4とCD3に対する二重特異性抗体を作製しマウスin vivoおよびヒトin vitroで効果を発揮できるのかどうか検証した。

[0182] 一般的な癌抗原に対しては、T細胞リダイレクト抗体は、NK細胞を利用したＡＤＣＣ活性を有する抗体よりも抗腫瘍効果が強いことが知られているが、CTLA4に対するT細胞リダイレクト抗体の抗腫瘍効果がＡＤＣＣ活性を増強した抗CTLA4抗体よりも強いかどうか知られていなかった。

[0183] 〔実施例２〕制御性T細胞をターゲットとしたADCC活性増強抗体の作製と評価

（２－１）マウスCTLA4に特異的に結合するADCC活性増強抗体（hUH02hUL01-mFa55）の発現と精製

抗マウスCTLA4抗体hUH02hUL01の可変領域（重鎖可変領域UH02は配列番号：28、軽鎖可変領域UL01は配列番号：29）をコードする遺伝子を、それぞれマウスIgG2a/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域はマウスFcγRへの結合を増強するような改変を加えた定常領域を使用している（重鎖定常領域mFa55は配列番号：30、軽鎖定常領域mk1は配列番号：31）。

[0184] 以下の方法を用いて抗体を発現させた。FreeStyle 293 Expression Medium培地（Invitrogen）に1.33 x 10^6細胞/mLの細胞密度で懸濁し、6ウェルプレートの各ウェルへ3 mLずつ播種したヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株（Invitrogen）に対して、リポフェクション法により調製されたプラスミドを導入した。CO_2インキュベーター（37℃、8%CO_2、90 rpm）で4日間培養した培養上清から、rProtein A Sepharose™ Fast Flow（Amersham Biosciences）を用いて当業者公知の方法で抗体を精製した。分光光度計を用いて、精製した抗体溶液の280 nmでの吸光度を測定した。得られた測定値からPACE法により算出した吸光係数を用いて、精製した抗体の濃度を算出した（Protein Science（1995）4, 2411-2423）。

[0185] （２－２）抗マウスCTLA4抗体（hUH02UL01-mFa55）の各種マウスFcgRに対する結合の評価

実施例２－１に記載の方法で精製、調製した抗マウスCTLA4抗体hUH02hUL01-mFa55およびコントロール抗体hUH02hUL01-mIgG2a（重鎖可変領域UH02は配列番号：28、軽鎖可変領域UL01は配列番号：29、重鎖定常領域mIgG2aは配列番号：32、軽鎖定常領域mk1は配列番号：31）について、Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、各種マウスFcgR（mFcgRI、II、III、IV）との抗原抗体反応を解析した。ランニングバッファーとして、20 mmol/L ACES、150 mmol/L NaCl、0.05%（w/v）Tween20、pH7.4を用い、25 ℃で測定した。センサーチップCM7上にアミンカップリングによりProtein A/Gを固定化し、hUH02hUL01-mFa55をキャプチャーした後、FcgRをアナライトとして120秒間相互作用させ、その結合量の変化を観察した。hUH02hUL01-mFa55の希釈には、ランニングバッファーを使用した。測定結果は、Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）を用い、カーブフィッティングによる解析により、結合速度定数ka（1/Ms)及び解離速度定数kd（1/s)を算出し、その値を元に解離定数K_D(M)を算出した。測定結果を表1に示した。

[0186]

[表1]

No.	Fc名	mFcgRI			mFcgRII			mFcgRIII			mFcgRIV		
		1:1 binding RI=0			1:1 binding RI=0			1:1 binding RI=0			1:1 binding RI=0		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1	mIgG2a	7.8E+05	4.7E-03	6.1E-09	1.3E+06	1.1E+00	7.8E-07	2.0E+06	5.1E-01	2.5E-07	1.2E+06	1.6E-02	1.3E-08
2	mFa55	1.2E+06	3.1E-03	2.5E-09	2.1E+06	7.6E-01	3.7E-07	2.4E+06	6.2E-01	2.6E-07	1.5E+06	2.8E-03	1.9E-09

[0187] （２－３）抗マウスCTLA4抗体（hUH02UL01-mFa55）によるADCC活性増強抗体の評価

実施例２－１に記載の方法で精製、調製された抗マウスCTLA4抗体hUH02hUL01-mFa55が、マウスCTLA4発現細胞(マウスCTLA4発現細胞は、CHO細胞に対して全長マウスCTLA4遺伝子を導入することで当業者公知の方法で作成された)に対してADCC活性が発現するかを、参考実施例１の方法に従って検証した。測定の結果、抗体濃度依存的なADCC活性が認められた（図５）。

[0188] 〔実施例３〕制御性T細胞とエフェクターT細胞の表面抗原を認識する、二重特異性作製と評価

（３－１）マウスCTLA4およびマウスCD3に特異的に結合する二重特異性抗体の発現と精製

抗マウスCTLA4抗体hUH02hUL01の可変領域（重鎖可変領域UH02は配列番号：28、軽鎖可変領域UL01は配列番号：29）をコードする遺伝子を、それぞれヒトIgG1/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域は、Fcγ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た定常領域を使用している（重鎖定常領域F760nN17は配列番号：33、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）。

[0189] また、抗マウスCD3抗体2C11の可変領域（重鎖可変領域は配列番号：35、軽鎖可変領域は配列番号：36）をコードする遺伝子を、それぞれヒトIgG1/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域は、Fcγ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た定常領域を使用している（重鎖定常領域F760nP17は配列番号：37、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）。

[0190] hUH02hUL01-F760nN17、2C11-F760nP17を、それぞれ実施例２に示された方法で発現、精製した。精製したそれぞれのホモ体は定常領域の電荷の違いを利用した当業者公知の方法（Proc. Natl. Acad. Sci., 110, 5145-5150, 2013）で混合し、目的の二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）を作製した。

[0191] （３－２）マウスCTLA4およびマウスCD3に特異的に結合する二重特異性抗体

の抗原（mCTLA4、mCD3）に対する結合の評価

実施例３－１に記載の方法で精製、調製した抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）は、Biacore T200（GE Healthcare）を用いて、各抗原（mCTLA4及びmCD3）との抗原抗体反応を解析した。ランニングバッファーとしてHBS-EP+、pH7.4を用い、37 ℃で測定した。センサーチップCM4上にアミンカップリングによりProteinA/Gを固定化し、hUH02UL01/2C11-F760をキャプチャーした後、抗原（マウスCTLA4もしくはマウスCD3）をアナライトとして相互作用させ（マウスCTLA4は120秒間、マウスCD3は90秒間）、その結合量の変化を観察した。hUH02UL01/2C11-F760の希釈にはランニングバッファーを使用した。測定結果は、Biacore T200 Evaluation Software（GE Healthcare）を用い、カーブフィッティングによる解析により、結合速度定数ka（1/Ms)及び解離速度定数kd（1/s)を算出し、その値を元に解離定数K_D(M)を算出した。結果を表２に示した。

[0192] [表2]

No	アナライト	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
1	マウスCTLA4	4.30E+05	5.30E-04	1.23E-09
2	マウスCD3	6.16E+04	7.12E-02	1.16E-06

[0193] （３－２）抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）による細胞傷害活性の評価

実施例３－１に記載の方法で精製、調製した抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）がマウスCTLA4発現細胞株に対して細胞傷害活性が発現するかを、参考実施例２の方法に従って検証した。測定の結果、抗体濃度依存的な細胞傷害活性が認められた（図６）。

[0194] 〔実施例４〕抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）によるCD3およびCTLA4固定化ビーズとCD3結合ビーズの架橋の評価

抗CTLA4/抗CD3二重特異性抗体により制御性T細胞（CTLA4およびCD3が発現している）とエフェクターT細胞（CD3が発現している）の表面抗原が認識されて両細胞間の架橋が起こりうるかを、理化学的な実験によって検証した。

[0195] 最初に、PerkinElmer社のAlphaテクノロジーにより、実施例３－１に記載の方法で精製、調製した抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）を用いて、マウスCD3固定化ビーズとマウスCTLA4固定化ビーズの架橋を評価可能な系の構築を検討した。具体的には、100 nmol/Lのビオチン化マウスCTLA4、0、20、100、500 nmol/LのhUH02UL01/2C11-F760、50 μg/mLのAlphaScreen（登録商標） Streptavidin-coated Donor Beads (PerkinElmer)、50 μg/mLのマウスCD3をAlphaScreen（登録商標） Unconjugated Acceptor Beads (PerkinElmer) にコンジュゲートしたマウスCD3-acceptor beadsを用いた。この条件下では、図７－１のように、AlphaScreen（登録商標） Streptavidin-coated Donor Beadsに結合したビオチン化マウスCTLA4とマウスCD3-acceptor beadsがhUH02UL01/2C11-F760によって架橋され、化学発光すると考えられた。プレートにはAlpha384 (PerkinElmer) を用い、測定はEnvisionで実施した。いずれの実験も3回実施した。その結果、図７－２にあるように、hUH02UL01/2C11-F760の濃度依存的なビーズ間の架橋が観察された。

[0196] 次に、AlphaScreen（登録商標） Streptavidin-coated Donor Beads (PerkinElmer)に対して100 nmol/Lのビオチン化マウスCTLA4および10 nmol/Lのビオチン化マウスCD3を添加し、CTLA4およびCD3が発現している制御性T細胞を模倣したドナービーズを作成した。100 nmol/LのhUH02UL01/2C11-F760の添加によって50 μg/mLのマウスCD3-acceptor beads（エフェクターT細胞を模倣したアクセプタービーズ）存在下でドナービーズとアクセプタービーズの架橋が起こるかどうかを検証した。100 nmol/Lのビオチン化マウスCTLA4、50 μg/mLのAlphaScreen（登録商標） Streptavidin-coated Donor Beads (PerkinElmer）、50 μg/mLのマウスCD3-acceptor beadsに、hUH02UL01/2C11-F760を加えない条件を、各ビーズ間の架橋を起こさないコントロールとして用いた。いずれの実験も3回実施した。実験の結果、図７－３の結果が得られ、ビオチン化マウスCD3がマウスCTLA4と同じビーズ上に存在し得る条件下においても、抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体によって、図７－４に示すようにドナービーズとアクセプタービーズが架橋されることが確認された。

[0197] ビオチン化マウスCD3およびマウスCTLA4がドナービーズ上に結合している状態は制御性T細胞（CTLA4およびCD3が発現している）を模擬していると考えられ、マウスCD3をコンジュゲートしたアクセプタービーズはエフェクターT細胞（CD3が発現している）を模倣していると考えられた。この条件下においても抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体によってドナービーズとアクセプタービーズが架橋されることが確認されたということから、制御性T細胞とエフェクターT細胞においても同様に抗CTLA4/抗CD3二重特異性抗体によって両細胞間を架橋することが可能であることが示唆された。

[0198] 〔実施例５〕抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）によるin vivo薬効評価（腫瘍内投与）

実施例２－１に記載の方法で精製、調製した抗マウスCTLA4抗体hUH02hUL01-mFa55および実施例３－１に記載の方法で精製、調製した抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）がマウス大腸癌細胞株に対してin vivoで薬効を示すかを検証した。マウス大腸癌細胞株CT26.WT（ATCC）1 x 10^6個を、BALB/cマウス（日本チャールスリバー）の右側腹部皮下に移植し、固形腫瘍を形成させた。移植後10日目に、hUH02hUL01-mFa55を200 μg/マウス、hUH02UL01/2C11-F760を100 μg/マウスの投与量で、腫瘍内（i.t.）へ投与した（各群n=2）。その結果、hUH02UL01/2C11-F760はhUH02hUL01-mFa55よりも強い抗腫瘍効果を示し、hUH02UL01/2C11-F760はin vivoにおいて顕著な抗腫瘍作用を示すことが明らかとなった（図８）。つまり、制御性T細胞（CTLA4およびCD3が発現している）とエフェクターT細胞（CD3が発現している）の表面抗原を認識し、両細胞間の架橋が生体内で起こりうることが示唆された。

[0199] 〔実施例６〕抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）によるin vivo薬効評価（腫瘍内投与と静脈内投与の比較）

実施例３－１に記載の方法で精製、調製した抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760）が、実施例５に記載したマウス大腸癌細胞株CT26.WT移植モデルに対して、静脈内投与（i.v.）でも薬効を示すかを

検証した。CT26.WT（ATCC）1 x 10^6個を、BALB/cマウス（日本チャールスリバー）の右側腹部皮下に移植し、固形腫瘍を形成させた。移植後8日目に、hUH02UL01/2C11-F760を100 μg/マウスの投与量で、腫瘍内（i.t.）あるいは静脈内（i.v.）へ投与した（各群n=5）。その結果、腫瘍内及び静脈内投与共に同等の抗腫瘍効果を示し、hUH02UL01/2C11-F760はin vivoにおいて局所投与、全身投与に関わらず抗腫瘍作用を示すことが明らかとなった（図９）。

[0200] 〔実施例７〕抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体によるin vitro薬効評価

（７－１）ヒトCTLA4およびヒトCD3に特異的に結合する二重特異性抗体の発現と精製

抗ヒトCTLA4抗体MDX10-F760nN17の可変領域（重鎖可変領域MDX10Hは配列番号：38、軽鎖可変領域MDX10Lは配列番号：39）をコードする遺伝子を、それぞれヒトIgG1/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域は、Fcγ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た定常領域を使用している（重鎖定常領域F760nN17は配列番号：33、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）。

[0201] また、抗ヒトCD3抗体TR01H113-F760mG3P17の可変領域（重鎖可変領域TR01H113は配列番号：40、軽鎖可変領域L0011は配列番号：41）をコードする遺伝子を、それぞれヒトIgG1/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域は、Fcγ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た定常領域を使用している（重鎖定常領域F760nG3P17は配列番号：42、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）。

[0202] MDX10-F760nN17、TR01H113-F760nG3P17は、それぞれ実施例２に示された方法で発現、精製した。精製したそれぞれのホモ体を表３の組み合わせで混合し、当業者公知の手法（WO2015/046467）を用いて目的の二重特異性抗体を作製した。

[0203] [表3]

No	クローン名	抗体 1	抗体 2
1	MDX10//TR01H113	MDX10-F760nN17	TR01H113-F760nG3P17

[0204] またこの他にも二重特異性抗体の形成技術が存在する。WO2011/028952やWO2014/018572やNat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8.に記載の抗体のCH1とCLの会合化、VH、VLの会合化を利用した抗体作製方法、Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Jul 5;108(27):11187-92やWO2009/080251,WO2009/080252, WO2009/080253に記載のCH1とCLもしくはVHとVLの会合化を利用した方法、WO2012/058768やWO2013/063702に記載の抗体重鎖のCH3間の会合を制御する方法、WO2006/106905に記載のCH1とCLの電荷制御を利用した方法、WO2013/065708に記載のVHとVLの電荷制御を利用した方法などがある。抗ヒトCTLA4抗体（重鎖可変領域MDX10Hは配列番号：38、軽鎖可変領域MDX10Lは配列番号：39）および抗ヒトCD3抗体（重鎖可変領域TR01H113は配列番号：40、軽鎖可変領域L0011は配列番号：41）に対して上記の技術を適用することで、目的の二重特異性抗体を作製することができる。

[0205] （７－２）抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体のin vitroにおける制御性T細胞に対する細胞傷害活性

健常人ドナー2名に対しヘパリン採血を行い、それぞれの血液を5%FBS（Moregate BioTech）を含むHBSS（GIBCO）にて希釈した後、Ficoll-Paque Plus（GE healthcare）に重層した。400 x gで30分間遠心分離し、末梢血単核球（PBMC）画分を分離した。得られたPBMCを10%FBS、100 Units/mL penicillin-100 μg/mL Streptomycin（GIBCO）を含むRPMI 1640（Nacalai Tesque）培地にて5 x 10^5細胞/ウェルとなるよう96 well round bottom plate（Corning）に播種した。

[0206] コントロール抗体（抗KLH ヒトIgG1重鎖可変領域IC17Hは配列番号：43、軽鎖可変領域IC17Lは配列番号：44、重鎖定常領域hIgG1dは配列番号：45、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）、またはMDX10//TR01H113をそれぞれ最終濃度0.1 μg/mL、1 μg/mL、10 μg/mLとなるように培地で希釈し、ウェルに添加した。37℃、5%CO_2に設定したCO_2インキュベーターにて、7日間培養した。

7日後に細胞をV bottom plate（Corning）に移し、400 x gで5分間遠心分離し、上清を除去した。1%FBS、2 mM EDTA（Sigma）を含むPBS（FACS buffer

）で10倍希釈したFcR blocking reagent（Miltenyi Biotec）100μLにて、細胞を再懸濁した。10分間室温でインキュベートした後、PerCP-Cy5.5 Mouse Anti-Human CD4（BD Pharmingen）を2.5μL、PE Mouse Anti-Human CD25（BD Pharmingen）を5μL、PE-Cy7 Mouse Anti-Human CD45RA（BD Pharmingen）を2.5μL各ウェルに加えた。4℃で1時間インキュベートした後、100μLのFACS bufferを加え、400 x gで5分間遠心分離し上清を除去した。

[0207] Intracellular Fixation and Permeabilization buffer set（eBioscience）のプロトコールに基づき、Human FoxP3 buffer Aを100μLずつ加えて遮光し、室温にて10分間インキュベートした。その後400 x gで5分間遠心分離し上清を除去した。Permeabilization bufferを100μLずつ加えて遮光し、30分間室温でインキュベートした。100μLのFACS bufferを加え、400 x gで5分間遠心分離し上清を除去した。この洗浄操作をもう1回行った。

[0208] 100μLのFACS bufferで再懸濁し、Alexa Fluor488 Anti-Human FoxP3（Bio Legend）を5μLずつ加えて遮光し、30分間室温にてインキュベートした。100μLのFACS bufferを加え、400 x gで5分間遠心分離し上清を除去した。この洗浄操作をもう1回行った。200μLのFACS bufferで再懸濁し、FACS CantoII フローサイトメーター(BD)で解析した。

[0209] FACSDiva Software（BD）にて発現解析を行った。解析対象となる細胞集団に対してCD4陽性細胞をゲーティングし、CD25およびCD45RAの発現を解析した。$CD25^{high}$ $CD45RA^{-}$の画分、$CD25^{-}CD45RA^{+}$の画分をそれぞれ制御性T細胞（Regulatory T cell（Treg））、エフェクターT細胞（Effector T cell（Teff））とした。また、$FoxP3^{high}CD45RA^{-}$の画分、$FoxP3^{-}CD45RA^{+}$の画分をそれぞれTreg、Teffとした。CD4陽性細胞中のTregおよびTeffの存在比率からTeff/Treg比を算出した。

[0210] CD25およびCD45RAの発現に基づいてCD4陽性細胞を解析した結果を示した（図１０－１）。ドナー1においてMDX10//TR01H113 1 μg/mL、10 μg/mL処理によりTregの減少が認められた。また、ドナー2においては1 μg/mL処理によりTregの減少傾向が見られ、10 μg/mLにより顕著な減少が認められた（図１０

－２）。両ドナーにおいて、MDX10//TR01H113 1 μg/mL、および10 μg/mL処理は、Teff/Treg比を増加させた（図１０－３）。

[0211] また、FoxP3およびCD45RA発現に基づいてTregを解析した結果を図１１－１に示した。CD25およびCD45RAでの解析と同様に、MDX10//TR01H113処理によりTregは減少し、Teff/Treg比は増加した（図１１－２、図１１－３）。

[0212] 本検討により、マウスin vivoにおいてCTLA4を発現する制御性T細胞に対する細胞傷害活性についてより強い抗腫瘍効果を示したTRAB（CTLA4とCD3に対する二重特異性抗体）は、ヒトin vitroにおいても制御性T細胞に対する強い細胞傷害活性を示したことから、癌患者に対して強い抗腫瘍効果を発揮することが期待される。

[0213] 〔実施例８〕免疫応答抑制機能が高いと報告されている細胞画分（$CD4^+$, $CD25^{high}$, $CD45RA^-$）に発現している表面分子の解析

免疫応答を抑制する機能を有する細胞のうち、CD25およびCD45RAの発現に基づいて計算されたCD4陽性T細胞中の制御性T細胞（Treg）、すなわち$CD4^+$ $CD25^{high}$ $CD45RA^-$ の細胞画分は、免疫応答抑制機能が高いと報告されている（Immunity, 2009, 30 (6), 899-911）。この情報に基づいて、CD4陽性細胞の中で、$CD25^{high}$ $CD45RA^-$の細胞画分で有意に発現の高い細胞表面分子をコードする遺伝子を、RNA-seqを用いて同定した。 その結果、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現する分子であるCTLA4、PD1、TIM3、LAG3、CD244 (2B4)、CD160、GARP、OX40、CD137 (4-1BB)、CD25、VISTA、BTLA、TNFR25、CD57、KLRG1、CCR2、CCR5、CCR6、CD39、CD73、CD4、CD18、CD49b、CD1d、CD5、CD21、TIM1、CD19、CD20、CD23、CD24、CD38、CD93、IgM、B220(CD45R)、CD317、PD-L1、CD11b、Ly6G、ICAM-1、FAP、PDGFR、 PodoplaninおよびTIGIT の分子のうち、CTLA4, TIM3, LAG3, CD137(4-1BB), CD25, CCR5, CCR6, CD38, 及びTIGITの9つの分子が、免疫応答抑制機能が高いと報告されている細胞画分（$CD4^+$, $CD25^{high}$, $CD45RA^-$）で特異的に発現の高い細胞表面分子であることが判明した。

[0214] 〔実施例９〕抗ヒトLAG3/抗ヒトCD3二重特異性抗体によるin vitro薬効評価

（９－１）ヒトLAG3およびヒトCD3に特異的に結合する二重特異性抗体の発現と精製

抗ヒトLAG3抗体25F7-F760nN17の可変領域（重鎖可変領域25F7Hは配列番号：46、軽鎖可変領域25F7Lは配列番号：47）をコードする遺伝子を、それぞれヒトIgG1/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域は、Fcγ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た定常領域を使用している（重鎖定常領域F760nN17は配列番号：33、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）。

[0215] また、抗ヒトCD3抗体TR01H113-F760nG3P17の可変領域（重鎖可変領域TR01H113は配列番号：40、軽鎖可変領域L0011は配列番号：41）をコードする遺伝子を、それぞれヒトIgG1/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域は、Fcγ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た定常領域を使用している（重鎖定常領域F760nG3P17は配列番号：42、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）。

[0216] 25F7-F760nN17、TR01H113-F760nG3P17は、それぞれ実施例２に示された方法で発現、精製した。精製したそれぞれのホモ体を表４の組み合わせで混合し、当業者公知の手法（WO2015/046467）を用いて目的の二重特異性抗体を作製した。

[0217] [表4]

No	クローン名	抗体 1	抗体 2
1	25F7//TR01H113	25F7-F760nN17	TR01H113-F760nG3P17

[0218] （９－２）抗ヒトLAG3/抗ヒトCD3二重特異性抗体のin vitroにおける制御性T細胞に対する細胞傷害活性

健常人ドナーに対しヘパリン採血を行い、それぞれの血液をPBSにて希釈した後、Leucosep チューブ(greiner bio-one)を用いてFicoll-Paque Plus (GE healthcare) と共に重層した。1000x gで10分間遠心分離し、末梢血単核球 (PBMC) 画分を分離した。得られたPBMCを10%FBS、100 Units/mL penicillin-100 μg/mL Streptomycin (GIBCO) を含むRPMI 1640 (Nacalai Tesque) 培地

にて1 x 10^6細胞/ウェルとなるよう96 well round bottom plate (Corning)に播種した。

TRAB (25F7//TR01H113) を最終濃度1 μg/mL、10 μg/mLとなるように培地で希釈し、ウェルに添加した。37℃、5%CO_2に設定したCO_2インキュベーターにて、4日間または6日間培養した。

4日後または6日後に細胞をFACS解析用チューブに移し、400 x gで5分間遠心分離し、上清を除去した。0.2% BSA (Wako) を含むCell WASH (BD Biosciences)を用意し、これをFACS Bufferとした。培地成分を完全に取り除くために、上清を除去した細胞にFACS Bufferを2mL加え、再度400 x gで5分間遠心分離し、上清を除去して洗浄を行った。

FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec) をFACS Bufferで10倍希釈し、そこに1/1000 volumeの死細胞染色用のeFluor780(eBioscience)を加えたものを用意し、これをStaining Bufferとした。Staining buffer 50μLにPerCP Mouse Anti-Human CD4 (BD Pharmingen)を5μL 、PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD45RA (BD Pharmingen)を2.5μL、PE Mouse Anti-Human CD25を5μL加えたものを各チューブに加え、4℃で1時間インキュベートした後、2mLのFACS bufferを加え、400 x gで5分間遠心分離し上清を除去した後、洗浄操作として更に2mLのFACS bufferを加え、400 x gで5分間遠心分離し上清を除去した。400 μLのFACS bufferで再懸濁し、FACSVerse™ フローサイトメーター(BD)で解析を行った。

FACSDiva Software (BD) にて発現解析を行った。死細胞を除いた解析対象となる細胞集団からCD4陽性細胞をゲーティングし、CD25およびCD45RAの発現を解析した。$CD25^{high}$ $CD45RA^-$の画分、$CD25^-CD45RA^+$の画分をそれぞれ制御性T細胞 (Regulatory T cell (Treg)) 、エフェクターT細胞 (Effector T cell (Teff)) とした。CD4陽性細胞中のTregおよびTeffの存在比率からTeff/Treg比を算出した。

CD25およびCD45RAの発現に基づいてCD4陽性細胞を解析した結果を示した(図13)。TRAB (25F7//TR01H113) 1 μg/mL、10 μg/mL処理により、4日後、6

日後ともに、TRAB抗体の用量依存的にTregの減少が認められた(図１４)。また、TRAB（25F7//TR01H113） 1 μg/mL、および10 μg/mL処理は、Teff/Treg比を増加させた（図１５)。

[0219] 〔実施例１０〕抗ヒトOX40/抗ヒトCD3二重特異性抗体によるin vitro薬効評価

（１０－１）ヒトOX40およびヒトCD3に特異的に結合する二重特異性抗体の発現と精製

抗ヒトOX40抗体12H3-F760nN17の可変領域（重鎖可変領域12H3VHは配列番号：48、軽鎖可変領域12H3VLは配列番号：49）をコードする遺伝子を、それぞれヒトIgG1/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域は、Fcγ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た定常領域を使用している（重鎖定常領域F760nN17は配列番号：33、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）。

[0220] また、抗ヒトCD3抗体TR01H113-F760nG3P17の可変領域（重鎖可変領域TR01H113は配列番号：40、軽鎖可変領域L0011は配列番号：41）をコードする遺伝子を、それぞれヒトIgG1/kappaの動物発現用プラスミドへ挿入した。この時、定常領域は、Fcγ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た定常領域を使用している（重鎖定常領域F760nG3P17は配列番号：42、軽鎖定常領域k0は配列番号：34）。

[0221] 12H3-F760nN17、TR01H113-F760nG3P17は、それぞれ実施例２に示された方法で発現、精製した。精製したそれぞれのホモ体を表５の組み合わせで混合し、当業者公知の手法（WO2015/046467）を用いて目的の二重特異性抗体を作製した。

[0222] [表5]

No	クローン名	抗体１	抗体２
1	12H3//TR01H113	12H3-F760nN17	TR01H113-F760nG3P17

[0223] （１０－２）抗ヒトOX40/抗ヒトCD3二重特異性抗体のin vitroにおける制御性T細胞に対する細胞傷害活性

2名の健常人ドナーに対しヘパリン採血を行い、それぞれの血液をPBSにて希釈した後、Leucosep チューブ(greiner bio-one)を用いてFicoll-Paque Plus (GE healthcare) と共に重層した。1000x gで10分間遠心分離し、末梢血単核球 (PBMC) 画分を分離した。得られたPBMCを10%FBS、100 Units/mL penicillin-100 μg/mL Streptomycin (GIBCO) を含むRPMI 1640 (Nacalai Tesque) 培地にて1 x 10^6細胞/ウェルとなるよう96 well round bottom plate (Corning) に播種した。

TRAB (12H3//TR01H113) を最終濃度1 μg/mL、10 μg/mLとなるように培地で希釈し、ウェルに添加した。37℃、5%CO_2に設定したCO_2インキュベーターにて、7日間培養した。

7日後に細胞をFACS解析用チューブに移し、400 x gで5分間遠心分離し、上清を除去した。0.2% BSA (Wako) を含むCell WASH (BD Biosciences)を用意し、これをFACS Bufferとした。培地成分を完全に取り除くために、上清を除去した細胞にFACS Bufferを2mL加え、再度400 x gで5分間遠心分離し、上清を除去して洗浄を行った。

FcR blocking reagent (Miltenyi Biotec) をFACS Bufferで10倍希釈し、そこに1/1000 volumeの死細胞染色用のeFluor780(eBioscience)を加えたものを用意し、これをStaining Bufferとした。Staining buffer 50μLにPerCP Mouse Anti-Human CD4 (BD Pharmingen)を5μL 、PE-Cy™7 Mouse Anti-Human CD45RA (BD Pharmingen)を2.5μL、PE Mouse Anti-Human CD25を5μL加えたものを各チューブに加え、4℃で1時間インキュベートした後、2mLのFACS bufferを加え、400 x gで5分間遠心分離し上清を除去した後、洗浄操作として更に2mLのFACS bufferを加え、400 x gで5分間遠心分離し上清を除去した。400 μLのFACS bufferで再懸濁し、FACSVerse™ フローサイトメーター(BD)で解析を行った。

FACSDiva Software (BD) にて発現解析を行った。死細胞を除いた解析対象となる細胞集団からCD4陽性細胞をゲーティングし、CD25およびCD45RAの発現を解析した。$CD25^{high}$ $CD45RA^-$の画分、$CD25^-CD45RA^+$の画分をそれぞれ制御性T

細胞（Regulatory T cell（Treg））、エフェクターT細胞（Effector T cell（Teff））とした。CD4陽性細胞中のTregおよびTeffの存在比率からTeff/Treg比を算出した。

CD25およびCD45RAの発現に基づいてCD4陽性細胞を解析した結果を示した(図１６)。双方のドナー由来のPBMCにおいて、TRAB（12H3//TR01H113） 1 μg/mL、10 μg/mL処理により、TRAB抗体の用量依存的にTregの減少が認められた(図１７)。また、TRAB（12H3//TR01H113） 1 μg/mL、および10 μg/mL処理は、Teff/Treg比を増加させた（図１８）。

[0224] 〔参考例１〕マウスFcgR4発現ヒトNK細胞株NK-92をエフェクター細胞として用いた被検抗体のADCC活性

抗マウスCTLA4抗体について、以下の方法に従い、マウスFcgR4発現ヒトNK細胞株NK-92（以下、mFcgR4-NK92と指称する。）をエフェクター細胞として用いて被検抗体の抗体濃度依存的なADCC活性を測定した。

[0225] （1）mFcgR4-NK92溶液の調製

mFcgR4-NK92を、10%FBSを含むRPMI-1640（nacalai tesque）（以下10%FBS/RPMIと称する）によって洗浄した後、当該細胞が10%FBS/RPMI中にその細胞密度が$4x10^5$ 細胞/mlとなるように懸濁した。当該細胞懸濁液をmFcgR4-NK92溶液として以後の実験に供した。

[0226] （2）標的細胞の調製

CHO細胞にマウスCTLA4を強制発現させたCHO/マウスCTLA4 $2x10^6$ 細胞に3.7MBqのCr-51を加えた。Cr-51を加えた細胞を5%炭酸ガスインキュベータ中において37℃で1時間インキュベートした後、10%FBS/RPMIで3回細胞を洗浄し、当該細胞が10%FBS/RPMI中にその細胞密度が$2x10^5$ 細胞/mlとなるように懸濁した。当該細胞懸濁液を標的細胞として以後の実験に供した。

[0227] （3）クロム遊離試験（ADCC活性）

ADCC活性をクロムリリース法による特異的クロム遊離率にて評価した。まず、各濃度（0、0.04、0.4、4、40 μg/ml）に調製した抗体溶液を96ウェルU

底プレートの各ウェル中に50μlずつ添加した。次に、（2）で調製した標的細胞を50μlずつ播種した（1x10^4 細胞/ウェル）。さらに、10%FBS/RPMIを50μlずつ添加し、室温にて15分間静置した。各ウェル中に（1）で調製したmFcgR4-NK92溶液各50μl（2x10^4 細胞/ウェル）を加えた当該プレートを、5%炭酸ガスインキュベータ中において37℃で4時間静置した後に、遠心操作した。当該プレートの各ウェル中の100μlの培養上清の放射活性をガンマカウンターを用いて測定した。下式に基づいて特異的クロム遊離率を求めた。

クロム遊離率(%)＝(A-C)×100/(B-C)

上式において、Aは各ウェル中の100μlの培養上清の放射活性（cpm）の平均値を表す。また、Bは標的細胞に50μlの4% NP-40水溶液（Nonidet P-40、ナカライテスク）および100μlの10% FBS/RPMIを添加したウェル中の100μlの培養上清の放射活性（cpm）の平均値を表す。さらに、Cは標的細胞に150μlの10% FBS/RPMIを添加したウェル中の100μlの培養上清の放射活性（cpm）の平均値を表す。試験はduplicateにて実施し、被検抗体の特異的クロム遊離率（%）の平均値を算出した。

[0228] 〔参考例２〕マウス脾臓細胞をエフェクター細胞として用いた被検抗体の細胞傷害活性の測定

抗マウスCTLA4/抗マウスCD3二重特異性抗体（hUH02UL01/2C11-F760)について、以下の方法に従い、マウス脾臓細胞をエフェクター細胞として用いて被検抗体の抗体濃度依存的な細胞傷害活性を測定した。

[0229] （1）マウス脾臓細胞溶液の調製

BALB/cマウスより摘出した脾臓に10%FBS/RPMIを10mL加え細切化した。セルストレイナーを通し、遠心分離（2,150 rpm、10分間、室温）の後、Mouse Erythrocyte Lysing Kit（R&D Systems）で溶血操作を行った。10%FBS/RPMIで1回洗浄した後、当該細胞が10%FBS/RPMI中にその細胞密度が6x10^6 細胞/mlとなるように懸濁した。当該細胞懸濁液をマウス脾臓細胞溶液として以後の実験に供した。

[0230] （2）細胞傷害活性評価試験

細胞傷害活性は、xCELLigenceリアルタイムセルアナライザー（ロシュ・ダイアグノスティックス社）を用いた細胞増殖抑制率で評価した。標的細胞には、CHOにマウスCTLA4を強制発現させたCHO/mCTLA4を用いた。当該細胞を10% FBSを含むCHO-S-SFM II (Life technologies)で懸濁し、5×10^3 細胞/ウェルとなるようにE-Plate 96プレート（ロシュ・ダイアグノスティックス社）に100μl播き、xCELLigenceリアルタイムセルアナライザーを用いて生細胞の測定を開始した。翌日xCELLigenceリアルタイムセルアナライザーからプレートを取り出し、当該プレートに各濃度（0.04、0.4、4、40 μg/ml）に調製した各抗体50μlを添加した。室温にて15分間静置した後に（1）で調製したマウス脾臓細胞溶液50μl（3×10^5 細胞/ウェル）を加え、xCELLigenceリアルタイムセルアナライザーに当該プレートを再セットすることによって、生細胞の測定を開始した。反応は5%炭酸ガス、37℃インキュベータ中において行い、マウス脾臓細胞溶液添加72時間後のCell Index値から、下式により細胞増殖抑制率（%）を求めた。なお、計算に用いたCell Index値には、抗体添加直前のCell Index値が1となるようにノーマライズした後の数値を用いた。

細胞増殖抑制率（%）＝（A-B）×100/(A-1)

Aは抗体を添加していないウェルにおけるCell Index値の平均値（標的細胞とヒトPBMCのみ）、Bは各ウェルにおけるCell Index値の平均値を示す。試験はduplicateにて実施した。

産業上の利用可能性

[0231] 本発明によって、優れた抗腫瘍活性を有する新たな抗原結合分子または医薬組成物が提供された。本発明の抗原結合分子を有効成分として含む医薬組成物が、免疫応答を抑制する機能を阻害することで、細胞傷害作用を活性化させ、様々な癌を治療又は予防することが可能となる。

請求の範囲

[請求項1] 下記のドメイン；

（１）免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメイン、及び

（２）T細胞受容体複合体に結合するドメイン

を含み、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の免疫応答抑制活性を阻害する抗原結合分子。

[請求項2] 免疫応答を抑制する機能を有する細胞が、制御性T細胞又は疲弊T細胞である、請求項１に記載の抗原結合分子。

[請求項3] 免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子が、CTLA4、PD1、TIM3、LAG3、CD244 (2B4)、CD160、GARP、OX40、CD137 (4-1BB)、CD25、VISTA、BTLA、TNFR25、CD57、KLRG1、CCR2、CCR5、CCR6、CD39、CD73、CD4、CD18、CD49b、CD1d、CD5、CD21、TIM1、CD19、CD20、CD23、CD24、CD38、CD93、IgM、B220(CD45R)、CD317、PD-L1、CD11b、Ly6G、ICAM-1、FAP、PDGFR、 PodoplaninおよびTIGITから選ばれるいずれかの分子である、請求項１に記載の抗原結合分子。

[請求項4] 免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子が、CTLA4、TIM3、LAG3、CD137 (4-1BB)、CD25、CCR5、CCR6、CD38、TIGIT、およびOX40から選ばれるいずれかの分子である、請求項３に記載の抗原結合分子。

[請求項5] T細胞受容体複合体結合ドメインがT細胞受容体結合ドメインである、請求項１から４のいずれかに記載の抗原結合分子。

[請求項6] T細胞受容体複合体結合ドメインがCD3結合ドメインである、請求項１から４のいずれかに記載の抗原結合分子。

[請求項7] FcRn結合ドメインをさらに含む、請求項１から６のいずれかに記載の抗原結合分子。

[請求項8] FcRn結合ドメインが、抗体のFc領域である、請求項７に記載の抗原結合分子。

[請求項9] FcRn結合ドメインが、Fcγ受容体に対する結合活性が低下している抗体のFc領域である、請求項８に記載の抗原結合分子。

[請求項10] 多重特異性抗体である、請求項１から９のいずれかに記載の抗原結合分子。

[請求項11] 請求項１から１０のいずれかに記載の抗原結合分子を有効成分として含む、医薬組成物。

[請求項12] 請求項１から１０のいずれかに記載の抗原結合分子を有効成分として含む、免疫応答の抑制活性を阻害するための医薬組成物。

[請求項13] 免疫応答の抑制活性の阻害が、T細胞による阻害である、請求項１２に記載の医薬組成物。

[請求項14] T細胞による阻害が、T細胞の細胞傷害活性による阻害である、請求項１３に記載の医薬組成物。

[請求項15] 免疫応答の抑制活性が、制御性T細胞又は疲弊T細胞による活性である、請求項１２から１４のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項16] 免疫応答の抑制活性が、CTLA4、PD1、TIM3、LAG3、CD244 (2B4)、CD160、GARP、OX40、CD137 (4-1BB)、CD25、VISTA、BTLA、TNFR25、CD57、KLRG1、CCR2、CCR5、CCR6、CD39、CD73、CD4、CD18、CD49b、CD1d、CD5、CD21、TIM1、CD19、CD20、CD23、CD24、CD38、CD93、IgM、B220(CD45R)、CD317、PD-L1、CD11b、Ly6G、ICAM-1、FAP、PDGFR、 Podoplanin及びTIGITから選ばれるいずれかの分子を発現する細胞の活性である、請求項１２から１４のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項17] 癌治療剤である、請求項１１から１６のいずれかに記載の医薬組成物。

[請求項18] 卵巣癌、胃癌、食道癌、膵臓癌、腎細胞癌、肝細胞癌、乳癌、悪性黒色腫、非小細胞肺癌、子宮頸癌、膠芽腫、前立腺癌、神経芽腫瘍、慢性リンパ性白血病、甲状腺乳頭癌、大腸癌、ホジキンリンパ腫および子宮内膜症から選ばれるいずれかの癌の治療剤である、請求項１７に記載の医薬組成物。