

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 11 月 17 日(17.11.2016)



(10) 国際公開番号
WO 2016/182064 A1

- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C07K 14/00* (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/28* (2006.01)
A61K 47/42 (2006.01) *C07K 16/32* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01) *C07K 19/00* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01) *C12P 21/08* (2006.01)
C07K 7/00 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/064301
- (22) 国際出願日: 2016 年 5 月 13 日(13.05.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-098208 2015 年 5 月 13 日(13.05.2015) JP
- (71) 出願人: 中外製薬株式会社(CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) [JP/JP]; 〒1158543 東京都北区浮間 5 丁目 5 番 1 号 Tokyo (JP).
- (72) 発明者: 井川 智之(IGAWA, Tomoyuki); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 廣庭 奈緒香(HIRONIWA, Naoka); 〒4128513 静岡県御殿場市駒門 1 丁目 1 3 5 番地 中外製薬株式会社内 Shizuoka (JP). 河内 宏樹(KAWAUCHI, Hiroki); 〒2478530 神奈川県鎌倉市梶原 2 0 0 番地 中外製薬株式会社内 Kanagawa (JP).
- (74) 代理人: 春名 雅夫, 外(HARUNA, Masao et al.); 〒3000847 茨城県土浦市卸町 1 - 1 - 1 関鉄つくばビル 6 階 Ibaraki (JP).

- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

規則 4.17 に規定する申立て:

- 出願し及び特許を与えられる出願人の資格に関する申立て (規則 4.17(ii))

添付公開書類:

- 国際調査報告 (条約第 21 条(3))
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト (規則 5.2(a))

(54) Title: MULTIPLE ANTIGEN BINDING MOLECULAR FUSION, PHARMACEUTICAL COMPOSITION, METHOD FOR IDENTIFYING LINEAR EPITOPE, AND METHOD FOR PREPARING MULTIPLE ANTIGEN BINDING MOLECULAR FUSION

(54) 発明の名称: 多重抗原結合分子融合体、医薬組成物、線状エピトープの同定方法、および多重抗原結合分子融合体の製造方法

(57) Abstract: Provided is a multiple antigen binding molecular fusion including: a multiple antigen binding molecule (α) having an immune cell antigen binding region and a cancer antigen binding region; a cancer tissue-specific protease cleavage linker (β); and a masking molecule (γ) having a polypeptide with the amino acid sequence, QD G N E, wherein the multiple antigen binding molecule (α) and the masking molecule (γ) are linked through the cancer tissue-specific protease cleavage linker (β).

(57) 要約: 免疫細胞抗原結合領域と、癌抗原結合領域とを有する多重抗原結合分子 (α)、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β)、および、アミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドを有するマスキング分子 (γ) を含み、前記多重抗原結合分子 (α) と前記マスキング分子 (γ) とが前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を介して結合している、多重抗原結合分子融合体。

WO 2016/182064 A1

明 細 書

発明の名称：

多重抗原結合分子融合体、医薬組成物、線状エピトープの同定方法、および多重抗原結合分子融合体の製造方法

技術分野

[0001] 本発明は、多重抗原結合分子融合体、医薬組成物、線状エピトープの同定方法、および多重抗原結合分子融合体の製造方法に関する。

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、これまでに、CD20抗原に対するリツキサン（登録商標）、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（登録商標）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対して結合し、ADCC等によって癌細胞に対する傷害活性を発揮する。こうしたADCC等による細胞傷害活性は、治療用抗体の標的細胞に発現する抗原の数に依存することが知られている（非特許文献4）ため、標的となる抗原の発現量が高いことが治療用抗体の効果の観点からは好ましい。しかし、抗原の発現量が高くても、正常組織に抗原が発現していると、正常細胞に対してADCC等の傷害活性を発揮してしまうため、副作用が大きな問題となる。そのため、癌治療薬として治療用抗体が標的とする抗原は、癌細胞に特異的に発現していることが好ましい。例えば、癌抗原として知られているEpCAM抗原に対する抗体分子は、癌治療薬として有望と考えられていたが、EpCAM抗原は膵臓にも発現していることが知られており、実際、臨床試験において、抗EpCAM抗体を投与することによって、膵臓に対する細胞傷害活性により膵炎の副作用がみられることが報告されている（非特許文献5）。

[0004] ADCC活性による細胞傷害活性を発揮する抗体医薬の成功を受けて、天然型ヒトIgG1のFc領域のN型糖鎖のフコースを除去することによるADCC活性の増強（非特許文献6）、天然型ヒトIgG1のFc領域のアミノ酸置換によりFc γ 受容体IIIaへの結合を増強することによるADCC活性の増強（非特許文献7）等によって強力な細胞傷害活性を発揮する第二世代の改良抗体分子が報告されている。上述のNK細胞が介在するADCC活性以外のメカニズムで癌細胞に傷害活性を発揮する抗体医薬として、強力な細胞傷害活性のある薬物を抗体とコンジュゲートしたAntibody Drug Conjugate（ADC）（非特許文献8）、および、T細胞を癌細胞にリクルートすることによって癌細胞に対する傷害活性を発揮する低分子抗体（非特許文献9）等の、より強力な細胞傷害活性を発揮する改良抗体分子も報告されている。

[0005] こうした、より強力な細胞傷害活性を発揮する抗体分子は、抗原の発現が多くはない癌細胞に対しても細胞傷害活性を発揮することができる一方で、抗原の発現が少ない正常組織に対しても同様に細胞傷害活性を発揮してしまう。実際、EGFRに対する天然型ヒトIgG1であるセツキシマブと比較して、CD3とEGFRに対する二重特異性抗体であるEGFR-BiTEは、T細胞を癌細胞にリクルートすることによって癌細胞に対して強力な細胞傷害活性を発揮し抗腫瘍効果を発揮することができる。その一方で、EGFRは正常組織においても発現しているため、EGFR-BiTEをカニクイザルに投与した際に深刻な副作用が現れることも認められている（非特許文献10）。また、癌細胞で高発現しているCD44v6に対する抗体にmertansineを結合させたADCであるbivatuzumab mertansineは、CD44v6が正常組織においても発現していることから、臨床において重篤な皮膚毒性および肝毒性が認められている（非特許文献11）。

[0006] このように抗原の発現が少ないような癌細胞に対しても強力な細胞傷害活性を発揮することができる抗体を用いた場合、標的抗原が極めて癌特異的に発現している必要があるが、ハーセプチン（登録商標）の標的抗原であるHER2やセツキシマブの標的抗原であるEGFRは正常組織にも発現しているように、極度に癌特異的に発現している癌抗原の数は限られていると考えられる。そ

のため、癌に対する細胞傷害活性を強化することはできるものの、正常組織に対する細胞傷害作用による副作用が問題となり得る。

[0007] また、最近、癌における免疫抑制に寄与しているCTLA4を阻害することによって腫瘍免疫を増強するイプリムマブが、転移性メラノーマに対して全生存（Overall survival）を延長させることが示された（非特許文献12）。しかしながら、イプリムマブはCTLA4を全身的に阻害するため、腫瘍免疫が増強される一方で、全身的に免疫が活性化されることによる自己免疫疾患様の重篤な副作用を示すことが問題となっている（非特許文献13）。

[0008] 一方、癌以外の疾患に対する抗体医薬として、炎症性・自己免疫疾患において炎症サイトカインを阻害することで治療効果を発揮する抗体医薬が知られている（非特許文献14）。例えばTNFを標的とするレミケード（登録商標）やヒュミラ（登録商標）、および、IL-6受容体を標的とするアクテムラ（登録商標）は、関節リウマチに対して高い治療効果を発揮するが、一方、これらのサイトカインを全身的に中和することにより感染症の副作用が見られることも知られている（非特許文献15）。

[0009] 第二世代の抗体医薬に適用可能な技術として様々な技術が開発されており、エフェクター機能、抗原結合能、薬物動態、安定性を向上させる、あるいは、免疫原性リスクを低減させる技術等が報告されているが（非特許文献16）、上記のような副作用を解決するための、抗体医薬を標的組織で特異的に作用可能とする技術はほとんど報告されていない。例えば、癌組織や炎症性組織のような病変部位については、これらの標的組織におけるpHが酸性条件であることを利用したpH依存性抗体が報告されている（特許文献1、および2）。しかしながら、癌組織や炎症性組織における正常組織と比較したpHの低下（すなわち水素イオン濃度の上昇）は僅かであり、分子量が極めて小さい水素イオン濃度の僅かな上昇を検知して作用する抗体を作製することは困難であると同時に、破骨細胞骨吸収窩領域等の正常組織や対象とする病変以外の組織でもpHが酸性条件である場合もあり、pHの条件が病変部位に特異的な環境因子として利用するにはなお多くの課題があると考えられた。

[0010] 一方、癌組織や炎症性組織のような病変部位で発現するプロテアーゼで切断されることによって、初めて抗原結合活性を発揮する抗体を作製する方法が報告されている（特許文献3、および4）。本方法は、標的抗原に対する抗体の抗原結合部位に対して結合活性を有する人工ペプチドをプロテアーゼで切断されうるリンカーを介して抗体に融合させることで、プロテアーゼでリンカーが切断されると人工ペプチドが抗体から遊離することで標的抗原に結合できるようになる。

また、CD3 ϵ 部分タンパク質をリンカーで抗CD3 ϵ 抗体（OKT3）に結合させ、CD3 ϵ 結合活性をマスクし、プロテアーゼによるリンカーの切断によりCD3 ϵ 結合活性を回復させる分子が報告されている（特許文献5）。

先行技術文献

特許文献

- [0011] 特許文献1：国際公開第2003／105757号
特許文献2：国際公開第2012／033953号
特許文献3：国際公開第2010／081173号
特許文献4：国際公開第2009／025846号
特許文献5：国際公開第2013／128194号

非特許文献

- [0012] 非特許文献1：Janice M Reichert, Clark J Rosensweig, et al., 'Monoclonal antibody successes in the clinic.' Nat. Biotechnol., 2005, Vol. 23, pp. 1073 - 1078.
非特許文献2：Pavlou AK, Belsey MJ., 'The therapeutic antibodies market to 2008', Eur. J. Pharm. Biopharm., 2005, Vol. 59, No. 3, pp. 389-396.
非特許文献3：Weiner LM, Surana R, et al., 'Monoclonal antibodies: versatile platforms for cancer immunotherapy', Nat. Rev. Immunol., 2010, Vol. 10, No. 5, pp. 317-327.
非特許文献4：Lewis GD, Figari I, et al., 'Differential responses of h

uman tumor cell lines to anti-p185HER2 monoclonal antibodies', *Cancer Immunol. Immunotherapy*, 1993, Vol. 37, pp. 255-263.

非特許文献5: de Bono JS, Tolcher AW, et al., 'ING-1, a monoclonal antibody targeting Ep-CAM in patients with advanced adenocarcinomas', *Clin. Cancer Res.*, 2004, Vol. 10, No. 22, pp. 7555-7565.

非特許文献6: Satoh M, Iida S, et al., 'Non-fucosylated therapeutic antibodies as next-generation therapeutic antibodies', *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2006, Vol. 6, No. 11, pp. 1161-1173.

非特許文献7: Desjarlais JR, Lazar GA, et al., 'Optimizing engagement of the immune system by anti-tumor antibodies: an engineer's perspective', *Drug Discov. Today*, 2007, Vol. 12, No. 21-22, pp. 898-910.

非特許文献8: Alley SC, Okeley NM, et al., 'Antibody-drug conjugates: targeted drug delivery for cancer', *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2010, Vol. 14, No. 4, pp. 529-537.

非特許文献9: Baeuerle PA, Kufer P, et al., 'BiTE: Teaching antibodies to engage T-cells for cancer therapy', *Curr. Opin. Mol. Ther.*, 2009, Vol. 11, No. 1, pp. 22-30.

非特許文献10: Lutterbuese R, Raum T, et al., 'T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potentially eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells', *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2010, Vol. 107, No. 28, pp. 12605-12610.

非特許文献11: Riechelmann H, Sauter A, et al., 'Phase I trial with the CD44v6-targeting immunoconjugate bivatuzumab mertansine in head and neck squamous cell carcinoma', *Oral Oncol.*, 2008, Vol. 44, No. 9, pp. 823-829.

非特許文献12: Trinh VA, Hwu WJ., 'Ipilimumab in the treatment of melanoma', *Expert Opin. Biol. Ther.*, 2012, Apr., 14 (doi:10.1517/14712598.2012.675325).

非特許文献13 : Juszcak A, Gupta A, et al., 'IPILIMUMAB - A NOVEL IMMUNOMODULATING THERAPY CAUSING AUTOIMMUNE HYPOPHYSITIS: A CASE REPORT AND REVIEW' Eur. J. Endocrinol., 2012, Apr., 10 (doi: 10.1530/EJE-12-0167).

非特許文献14 : Takeuchi T, Kameda H., 'The Japanese experience with biologic therapies for rheumatoid arthritis', Nat. Rev. Rheumatol., 2010, Vol. 6, No. 11, pp. 644-652.

非特許文献15 : Nam JL, Winthrop KL, et al., 'Current evidence for the management of rheumatoid arthritis with biological disease-modifying antirheumatic drugs: a systematic literature review informing the EULAR recommendations for the management of RA', Ann. Rheum. Dis., 2010 Vol. 69, No. 6, pp. 976-986.

非特許文献16 : Kim SJ, Park Y, et al., 'Antibody engineering for the development of therapeutic antibodies', Mol. Cells., 2005, Vol. 20, No. 1, pp. 17-29.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0013] 本発明は、癌抗原とCD3とを認識する、副作用を低減させた多重抗原結合分子（「多重特異的抗原結合分子」とも称する）を汎用的に作製するための誘導体（本明細書においては、「多重抗原結合分子融合体」とも称する。）を創製、提供し、さらに、該多重抗原結合分子融合体を含有する医薬組成物、該多重抗原結合分子融合体に有用な線状エピトープの同定方法、および多重抗原結合分子融合体の製造方法を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0014] 本発明者らは、上記の目的を達成するために鋭意研究を進めたところ、特定のアミノ酸配列を有するポリペプチドによってCD3に対する結合活性が阻害された、癌抗原とCD3とを認識する多重抗原結合分子融合体を創作した。該ポリペプチドは、特定のリンカーによって多重抗原結合分子に結合しており、

該リンカーが癌組織特異的プロテアーゼによって切断されることによって、癌組織において特異的に活性を発揮する多重抗原結合分子融合体を創出した。また、本発明者らは、多重抗原結合分子融合体に有用な線状エピトープの同定方法、ならびに当該多重抗原結合分子融合体の製造方法を創作して本発明を完成させた。

[0015] すなわち、本発明は以下を提供するものである。

[1] アミノ酸配列 Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有する抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域と、癌抗原を認識する癌抗原結合領域とを有する多重抗原結合分子（ α ）、癌組織特異的プロテアーゼの標的配列からなるポリペプチドを有する癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）、および、アミノ酸配列 Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有するマスキング分子（ γ ）を含み、前記多重抗原結合分子（ α ）と前記マスキング分子（ γ ）とが前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を介して結合している、多重抗原結合分子融合体。

[2] 前記免疫細胞抗原結合領域が、前記アミノ酸配列 Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有する抗原以外に少なくとも1種の免疫細胞抗原を認識する、[1]に記載の多重抗原結合分子融合体。

[3] 前記免疫細胞抗原結合領域が、2以上の免疫細胞抗原を同時には認識し得ない、[2]に記載の多重抗原結合分子融合体。

[4] 前記多重抗原結合分子（ α ）が、抗体または少なくとも2つのFv領域を有する抗体断片であり、前記癌抗原結合領域と前記免疫細胞抗原結合領域とが別々のFv領域により形成されている、[1]乃至[3]のいずれかに記載の多重抗原結合分子融合体。

[5] 前記抗体または少なくとも2つのFv領域を有する抗体断片における軽鎖が、いずれも同じアミノ酸配列を有する、[4]に記載の多重抗原結合分子融合体。

[6] 前記抗体または少なくとも2つのFv領域を有する抗体断片がさらにFc領域を有し、前記Fc領域がFc γ 受容体を認識する機能を欠損するように改変

されている、[4] または [5] に記載の多重抗原結合分子融合体。

[7] 前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が、前記免疫細胞抗原結合領域を形成する前記Fv領域の重鎖N末端または軽鎖N末端に融合している、[4] 乃至 [6] のいずれかに記載の多重抗原結合分子融合体。

[8] 前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) と前記マスキング分子 (γ) とが直鎖状の融合ポリペプチドであり、前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が前記免疫細胞抗原結合領域を形成する前記Fv領域の重鎖N末端に融合している場合には、前記融合ポリペプチドのアミノ酸数は11以上65以下であり、前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が前記免疫細胞抗原結合領域を形成する前記Fv領域の軽鎖N末端に融合している場合には、前記融合ポリペプチドのアミノ酸数は16以上65以下である、[7] に記載の多重抗原結合分子融合体。

[9] 前記標的配列がアミノ酸配列PLGLAG (配列番号: 9) である、[1] 乃至 [8] のいずれかに記載の多重抗原結合分子融合体。

[10] [1] 乃至 [9] のいずれかに記載の多重抗原結合分子融合体および薬学的に許容される担体を含有する、医薬組成物。

[11] 癌治療用である、[10] に記載の医薬組成物。

[12] [10] または [11] に記載の医薬組成物を患者に投与する工程を含む、癌の治療方法。

[13] 免疫細胞抗原と前記免疫細胞抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域とのタンパク質複合体を用いたタンパク質立体構造解析のデータに基づき、前記免疫細胞抗原に含まれ、かつ、前記免疫細胞抗原結合領域により認識される線状エピトープを同定する工程を有する、線状エピトープの同定方法。

[14] 癌抗原を認識する癌抗原結合領域および免疫細胞抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域を有する多重抗原結合分子 (α) に、線状エピトープを、前記癌抗原を発現する癌組織で特異的に発現するプロテアーゼにより切断され得る領域を有する癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を介して融合した融合タンパク質を発現する工程を有する、多重抗原結合分子融

合体の製造方法。

[15] 癌の治療において使用するための、[1]乃至[9]のいずれかに記載の多重抗原結合分子融合体または[10]もしくは[11]に記載の医薬組成物。

[16] 抗癌剤の製造における、[1]乃至[9]のいずれかに記載の多重抗原結合分子融合体または[10]もしくは[11]に記載の医薬組成物の使用。

[17] [1]乃至[9]のいずれかに記載の多重抗原結合分子融合体または[10]もしくは[11]に記載の医薬組成物を使用する工程を含む、抗癌剤の製造方法。

発明の効果

[0016] 本発明によれば、癌抗原とCD3とを認識する、副作用を低減させた多重抗原結合分子を汎用的に作製するための誘導体（多重抗原結合分子融合体）を提供し、さらに、該多重抗原結合分子融合体を含有する医薬組成物、該多重抗原結合分子融合体に有用な線状エピトープの同定方法、および多重抗原結合分子融合体の製造方法を提供することができる。

図面の簡単な説明

[0017] [図1]ヒトのCD3 ϵ （配列番号：37）とカニクイザルのCD3 ϵ （配列番号：38）のアミノ酸配列のアライメントを示す。

[図2]本発明の多重抗原結合分子融合体の一実施態様の全体概念図を示す。

[図3]本発明の多重抗原結合分子融合体の他の実施態様の部分概念図を示す。

上図は重鎖N末融合体を示し、下図は軽鎖N末融合体を示す。

[図4]CE115のCD3 ϵ に対する細胞ELISAの結果を示すグラフである。

[図5]抗CD3抗体Fabフラグメントとエピトープペプチドの結合サイトにおける2Fo-Fc電子密度マップを示す図である。図中、当該抗体を細線で、エピトープペプチドを太線で示す。また、エピトープペプチドのN末端から5アミノ酸残基までについて、各残基をアミノ酸一文字表記およびN末端側からの通し番号にて示す。電子密度マップはメッシュ表示により示した。

[図6]エピトープコア配列と当該抗体の可変領域の重鎖N末端をGlyリンカーにより接続した場合のモデルを表面表示した図である。図中、当該抗体の重鎖を黒色、軽鎖を灰色、リンカーを白色太線で示した。(A)：6残基のアミノ酸からなるリンカーで接続した場合のモデルを示す。(B)：9残基のアミノ酸からなるリンカーで接続した場合のモデルを示す。(C)：12残基のアミノ酸からなるリンカーで接続した場合のモデルを示す。(D)：16残基のアミノ酸からなるリンカーで接続した場合のモデルを示す。

[図7]エピトープコア配列と当該抗体の可変領域の軽鎖N末端をGlyリンカーにより接続した場合のモデルを表面表示した図である。図中、当該抗体の重鎖を黒色、軽鎖を灰色、リンカーを白色太線で示した。(A)：11残基のアミノ酸からなるリンカーで接続した場合のモデルを示す。(B)：12残基のアミノ酸からなるリンカーで接続した場合のモデルを示す。(C)：14残基のアミノ酸からなるリンカーで接続した場合のモデルを示す。(D)：16残基のアミノ酸からなるリンカーで接続した場合のモデルを示す。

[図8-1]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ(uPA)処理後のCD3 ϵ 結合活性を評価した結果である。抗原を加えていないウエルの発光値を1としたときの割合で示している。

(i)重鎖N末端にペプチドを付加した抗体のCD3 ϵ 結合活性、(ii)軽鎖N末端にペプチドを付加した抗体のCD3 ϵ 結合活性を示す。

[図8-2]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ(uPA)処理後のCD3 ϵ 結合活性を評価した結果である。抗原を加えていないウエルの発光値を1としたときの割合で示している。

(iii)(ii)と同様に軽鎖N末端にペプチドを付加した抗体(TWO arm)のCD3 ϵ 結合活性である。(iv)AN121の重鎖N末端にペプチドを付加した抗体のCD3 ϵ 結合活性である。

[図9]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ(ヒトMT-SP1)処理後のCD3 ϵ 結合活性を評価した結果である。抗原を加えていないウエルの発光値を1としたときの割合で示している

。(i)重鎖N末端にペプチドを付加した抗体のCD3 ϵ 結合活性、(ii)軽鎖N末端にペプチドを付加した抗体のCD3 ϵ 結合活性を示す。

[図10]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ(MMP-2)処理後のCD3 ϵ 結合活性を評価した結果である。抗体1 μ g/mLの発光値を1としたときの割合で示している。(i)重鎖N末端にペプチドを付加した抗体のCD3 ϵ 結合活性、(ii)軽鎖N末端にペプチドを付加した抗体のCD3 ϵ 結合活性を示す。

[図11]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3 ϵ 活性化評価結果である。誘導体は重鎖がhCE115HA、軽鎖がGLS3000である抗体をもとに調製されている。(i)はペプチドを付加していない未修飾の抗体と、切断を受けないGSリンカーを用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。(ii)は癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)を用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。それぞれCD3 ϵ のN末端から7アミノ酸(リンカー部分にGG配列が含まれるため、CD3 ϵ のN末端と同じ配列は9アミノ酸目までである)、20アミノ酸、27アミノ酸の配列がマスキング分子(γ)となっている抗体である。(i)(ii)はいずれも実線がプロテアーゼ処理した抗体、破線がプロテアーゼ処理をしなかった抗体を表す。

[図12]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3 ϵ 活性化評価結果である。誘導体はhCE115HAのCD3 ϵ 結合力を増強したAN121と軽鎖がGLS3000である抗体をもとに調製されている。(i)はペプチドを付加していない未修飾の抗体と、切断を受けないGSリンカーを用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。(ii)は癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)を用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。それぞれCD3 ϵ のN末端から7アミノ酸(リンカー部分にGG配列が含まれるため、CD3 ϵ のN末端と同じ配列は9アミノ酸目までである)、20アミノ酸、27アミノ酸の配列がマスキング分子(γ)となっている抗体である。(i)(ii)はいずれも実線がプロテアーゼ処理した抗体、破線が

プロテアーゼ処理をしなかった抗体を表す。

[図13]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3 ϵ 活性化評価結果である。誘導体は重鎖がrCE115H、軽鎖がGLS3000である抗体をもとに調製されている。(i)はペプチドを付加していない未修飾の抗体と、切断を受けないGSリンカーを用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。(ii)は癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)を用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。それぞれCD3 ϵ のN末端から7アミノ酸(リンカー部分にGG配列が含まれるため、CD3 ϵ のN末端と同じ配列は9アミノ酸目までである)、20アミノ酸、27アミノ酸の配列がマスキング分子(γ)となっている抗体である。(i)(ii)はいずれも実線がプロテアーゼ処理した抗体、破線がプロテアーゼ処理をしなかった抗体を表す。

[図14]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3 ϵ 活性化評価結果である。誘導体は重鎖がrCE115H、軽鎖がrCE115Lである抗体をもとに調製されている。(i)はペプチドを付加していない未修飾の抗体と、切断を受けないGSリンカーを用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。(ii)は癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)を用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。それぞれCD3 ϵ のN末端から7アミノ酸(リンカー部分にGG配列が含まれるため、CD3 ϵ のN末端と同じ配列は9アミノ酸目までである)、20アミノ酸、27アミノ酸の配列がマスキング分子(γ)となっている抗体である。(i)(ii)はいずれも実線がプロテアーゼ処理した抗体、破線がプロテアーゼ処理をしなかった抗体を表す。

[図15]CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3 ϵ 活性化評価結果である。誘導体は重鎖がhCE115HA、軽鎖がGLS3000である抗体をもとに調製されている。(i)はペプチドを付加していない未修飾の抗体と、切断を受けないGSリンカーを用いてマスキング分子(γ)を付加した抗体である。(ii)は癌組織特異的プロテ

ーゼ切断性リンカー (β) を用いてマスキング分子 (γ) を付加した抗体である。それぞれCD3 ϵ のN末端から7アミノ酸 (リンカー部分にGG配列が含まれるため、CD3 ϵ のN末端と同じ配列は9アミノ酸目までである)、20アミノ酸、27アミノ酸の配列がマスキング分子 (γ) となっている抗体である。(i)(ii) はいずれも実線がプロテアーゼ処理した抗体、破線がプロテアーゼ処理をしなかった抗体を表す。

発明を実施するための形態

[0018] 本明細書において、「認識する」とは、抗原結合領域、抗原結合分子、抗体、および抗体断片等が抗原に結合することを意味する。また、「特異的に認識する」とは、抗原結合領域、抗原結合分子、抗体、および抗体断片等が、抗原中の特定の立体構造を識別し結合することを意味する。

また、「抗原結合領域」とは、分子中に存在し、抗原を認識できる領域を意味する。抗原結合領域は、ポリペプチドから形成されるものであってもよく、ポリペプチドを除く低分子化合物により形成されるものであってもよい。「免疫細胞抗原結合領域」は、免疫細胞が特異的に発現する抗原を認識でき、「癌抗原結合領域」は、癌抗原を認識できる。

また、「マスキング効果」とは、マスキング分子が抗原結合領域に結合することにより、該抗原結合領域が対象の抗原に結合するのを妨げる効果を意味する。

また、「線状ペプチド」とは、高次構造を形成しない、または、高次構造を形成しても α ヘリックス構造や β シート構造、ループ、ターンなどの二次構造を形成するが、三次構造や四次構造を形成しないポリペプチドを意味する。「線状エピトープ」とは、抗原中の部分線状ペプチドであり、抗原結合領域により認識されるものを意味する。

本明細書において、「重鎖」は「H鎖」と称することがあり、「軽鎖」は「L鎖」と称することがある。

[0019] 本明細書で用いられているアミノ酸の3文字表記と1文字表記の対応は以下の通りである。

アラニン : Ala : A アルギニン : Arg : R アスパラギン : Asn : N アスパラギン酸 : Asp : D システイン : Cys : C グルタミン : Gln : Q グルタミン酸 : Glu : E
グリシン : Gly : G ヒスチジン : His : H イソロイシン : Ile : I ロイシン : Leu : L
リジン : Lys : K メチオニン : Met : M フェニルアラニン : Phe : F プロリン : Pro : P
セリン : Ser : S スレオニン : Thr : T トリプトファン : Trp : W
チロシン : Tyr : Y バリン : Val : V

[0020] A. 多重抗原結合分子融合体

本発明の多重抗原結合分子融合体は、多重抗原結合分子 (α)、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) およびマスキング分子 (γ) を含む。

該多重抗原結合分子融合体は、多重抗原結合分子 (α) とマスキング分子 (γ) とが癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を介して結合している。

多重抗原結合分子 (α) と癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) との結合、および癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) とマスキング分子 (γ) との結合の種類は、特に限定されない。好適な結合の種類は、ペプチド結合である。

以下、本発明の多重抗原結合分子融合体の各構成について詳述する。

[0021] (多重抗原結合分子 (α))

本発明の多重抗原結合分子 (α) は、免疫細胞抗原結合領域と癌抗原結合領域とを有する。すなわち、多重抗原結合分子 (α) は、同一分子内に免疫細胞抗原結合領域と癌抗原結合領域とを有しているものであり、同一分子内に少なくとも一つの免疫細胞抗原結合領域と一つの癌抗原結合領域とを有しているものであれば、特に限定されない。

多重抗原結合分子 (α) の一態様としては、同一分子内に一つの免疫細胞抗原結合領域と一つの癌抗原結合領域とを有しているものが挙げられる。具体的には、二重特異性抗体が挙げられる。

多重抗原結合分子 (α) の他の態様としては、例えば、DART技術を用いた

もの（国際公開第2012/162067号）、Dual-Fab技術を用いたもの（PCT/JP2014/079785）、2+1 IgG Crossfab技術を用いたもの（国際公開第2013/026833号）、BiTE技術を用いたもの等（Spiess C et al., Mol Immunol (2015) 67 (2) 95-106）が挙げられる。

[0022] 免疫細胞抗原結合領域と癌抗原結合領域とは直接結合していてもよく、生体適合性のリンカーを介して結合していてもよい。ただし、免疫細胞抗原結合領域と癌抗原結合領域とがリンカーを介して結合している場合、十分な細胞傷害活性を誘導できるようにするため、該リンカーは後述する癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）でないことが好ましい。

[0023] ・免疫細胞抗原結合領域について

免疫細胞抗原結合領域は、アミノ酸配列Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有する抗原を認識する。「アミノ酸配列Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有する抗原を認識する」とは、アミノ酸配列Q D G N Eを欠失させた場合に、該抗原への結合活性が低下する、または失われることを意味する。

結合活性の低下は、例えば、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。アミノ酸配列Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有する抗原からアミノ酸配列Q D G N Eを欠失させた場合に、欠失させる前の抗原に比べ、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。

[0024] ここでアミノ酸配列Q D G N Eは、ヒトCD3 ϵ の細胞外領域内に存在するアミノ酸配列であり、ヒトとカニクイザルとでアミノ酸配列が一致している（図1矢印参照）。

アミノ酸配列Q D G N Eからなるポリペプチドを有する抗原は、全体がヒ

トCD3 ϵ の部分ポリペプチドであることが好ましい。さらに、該ヒトCD3 ϵ の部分ポリペプチドは、アミノ酸配列Q D G N EをN末端に有するヒトCD3 ϵ 部分ポリペプチドであることが好ましい。該アミノ酸配列Q D G N EをN末端に有するヒトCD3 ϵ 部分ポリペプチドは、カニクイザルCD3 ϵ の対応する部分ポリペプチドとの相同性が高い領域であることが好ましい。該相同性は90%以上であることが好ましく、95%以上であることがより好ましく、100%であることが最も好ましい。相同性が高ければ、カニクイザルを用いた非臨床毒性試験で使用した多重抗原結合分子融合体を臨床試験でそのまま用いても、カニクイザルを用いた非臨床毒性試験で得られた試験結果が臨床試験の結果を反映しやすくなる。

アミノ酸配列Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有する抗原は、化学修飾されていてもよい。化学修飾は公知の修飾でよい。化学修飾としては、例えば、アセチル化、アルキル化、ピログルタミル化等が挙げられる。中でも、アミノ酸配列Q D G N E中のQがピログルタミル化されていることが好ましい。

[0025] アミノ酸配列Q D G N Eからなるポリペプチドを有する抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域は、例えば、公知の抗体の作製方法を用いた方法により得られる。

該作製方法により得られた抗体は、そのまま免疫細胞抗原結合領域に用いてもよく、得られた抗体のうちFv領域のみを用いてもよく、該Fv領域が一本鎖（「sc」とも称する。）で抗原を認識し得る場合には、該一本鎖のみを用いてもよい。また、Fv領域を含むFab領域を用いてもよい。

[0026] 具体的な抗体の作製方法は当業者によく知られているが、例えばモノクローナル抗体の場合、ハイブリドーマ法（Kohler and Milstein, *Nature* 256:495 (1975)）、組換え方法（米国特許第4,816,567号）により製造してもよい。また、ファージ抗体ライブラリーから単離してもよい（Clackson et al., *Nature* 352:624-628 (1991)；Marks et al., *J.Mol.Biol.* 222:581-597 (1991)）。また、単一のB細胞クローンから単離してもよい（N. *Biotechnol.* 28

(5): 253-457 (2011))。

- [0027] 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、例えばマウス抗体の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、例えばOverlap Extension PCRが公知である。
- [0028] 3つのCDRと4つのFRが連結された抗体可変領域をコードするDNAとヒト抗体定常領域をコードする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、ヒト化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 (欧州特許出願公開第239400号明細書、国際公開第1996/002576号参照)。
- [0029] 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。例えば、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。
- [0030] 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 (国際公開第1993/012227号、国際公開第1992/003918号、国際公開第1994/002602号、国際公開第1994/025585号、国際公開第1996/034096号、国際公開第1996/033735号参照) 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。
- [0031] 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Fv領域が一本鎖抗体 (「scFv」) とも称する。) 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Fv

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Fv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（国際公開第1992/001047号、国際公開第1992/020791号、国際公開第1993/006213号、国際公開第1993/011236号、国際公開第1993/019172号、国際公開第1995/001438号、国際公開第1995/015388号参照）。

パンニングにより免疫細胞抗原結合領域の免疫細胞抗原との結合活性を向上させることもできる。免疫細胞抗原結合領域の免疫細胞抗原との結合活性は、表面プラズモン共鳴（SPR）法（例えばBiacoreT200を用いる）等を用いた結合アッセイのデータから算出される。結合活性はKD(M)で示され、KD(M)が小さいほど結合活性が高いことを意味する。KD(M)は、 10^{-6} より小さいことが好ましく、 10^{-7} より小さいことがより好ましい。

[0032] アミノ酸配列Q D G N Eからなるポリペプチドを有する抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域には、上述のような抗体の作製方法により新たに得られた抗体または抗体断片を利用してもよく、該抗原を認識し得る公知の抗体または抗体断片を利用してもよい。アミノ酸配列Q D G N Eからなるポリペプチドを有する抗原を認識し得る公知の抗体または抗体断片としては、例えば、国際公開第2007/042261号や国際公開第2002008/119567号の実施例で作製されたscFvが挙げられる。

該scFvのほかに、P C T / J P 2 0 1 4 / 0 7 9 7 8 5で開示されているC E 1 1 5等が挙げられる。C E 1 1 5の作製方法は、後述する参考実施例1で示す。

[0033] 本発明における免疫細胞抗原結合領域は、アミノ酸配列Q D G N Eからなるポリペプチドを有する抗原のみを認識するものでもよく、アミノ酸配列Q D G N Eからなるポリペプチドを有する抗原に加えて該抗原以外に少なくとも

も 1 種の免疫細胞抗原を認識するものでもよい。

本発明における免疫細胞抗原結合領域は、アミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドを有する抗原に加えて該抗原以外に少なくとも 1 種の免疫細胞抗原を認識するものであることが好ましい。

[0034] アミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドを有する抗原以外の免疫細胞抗原としては、例えば、T細胞表面分子、NK細胞表面分子、樹状細胞表面分子、B細胞表面分子、NKT細胞表面分子、MDSC細胞表面分子、マクロファージ類表面分子等が挙げられる。

具体的なT細胞表面分子としては、CD3、T細胞レセプターが挙げられる。ただし、CD3の場合には、アミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドを有しない分子である。T細胞表面分子は、アミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドを有しない限り、例えば、ヒトCD3の場合、ヒトCD3を構成する γ 鎖、 δ 鎖または ε 鎖配列に存在するエピトープであればいずれのエピトープに結合するものであってもよい。

T細胞表面分子以外の具体的な免疫細胞抗原としては、Fc γ 受容体、TLR、レクチン、IgA、免疫チェックポイント分子、TNFスーパーファミリー分子、TNF受容体スーパーファミリー分子、NK受容体分子等が挙げられる。

[0035] 中でも、T細胞に加えて、T細胞以外のNK細胞等の種々の免疫細胞を癌細胞にリクルートして癌細胞に対する細胞傷害活性をさらに優れたものとする観点から、アミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドを有する抗原以外に認識する免疫細胞抗原は、NK細胞表面分子、樹状細胞表面分子、B細胞表面分子、NKT細胞表面分子、MDSC細胞表面分子およびマクロファージ類表面分子の群から選択される少なくとも 1 種であることが好ましい。

[0036] 免疫細胞抗原結合領域をアミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドを有する抗原に加えて該抗原以外に少なくとも 1 種の免疫細胞抗原を認識するものとした場合、該免疫細胞抗原結合領域は、2 以上の免疫細胞抗原を同時には認識し得ないものとするのが好ましい。該免疫細胞抗原結合領域が 2 以上の免疫細胞抗原を同時には認識し得ないものとするにより、多重抗

原結合分子融合体は複数の免疫細胞を同時に認識し得ないものとなる。多重抗原結合分子融合体が複数の免疫細胞を同時に認識し得る場合には、これら複数の免疫細胞が互いに干渉しあった結果として異常な免疫応答を引き起こし、副作用が生じやすくなるおそれがある。したがって、該免疫細胞抗原結合領域が2以上の免疫細胞抗原を同時に認識し得ないものとするにより、副作用の可能性を低減することができる。

[0037] 免疫細胞抗原結合領域をアミノ酸配列Q D G N Eからなるポリペプチドを有する抗原に加えて該抗原以外に少なくとも1種の免疫細胞抗原を認識するものとし、かつ、該免疫細胞抗原結合領域が2以上の免疫細胞抗原を同時に認識し得ないものとする技術としては、例えば、Dual-Fab技術が挙げられる。Dual-Fab技術とは、1つのFabが2種以上の抗原を認識できるようにする技術であり、P C T / J P 2 0 1 4 / 0 7 9 7 8 5で開示されている。Dual-Fab技術による抗原結合分子の製造方法の具体例としては、以下の工程(i)～(iv)を含む製造方法を挙げることができる。

(i)第1の抗原または第2の抗原に結合する抗体の可変領域の少なくとも1つのアミノ酸が改変された抗原結合分子であって、該改変された可変領域のアミノ酸の少なくとも1つが互いに異なる可変領域を含む抗原結合分子のライブラリーを作製する工程、

(ii)作製されたライブラリーの中から、第1の抗原および第2の抗原に対して結合活性を有するが、当該第1の抗原および第2の抗原と同時に結合しない可変領域を含む抗原結合分子を選択する工程、

(iii)工程(ii)で選択された抗原結合分子の該可変領域をコードする核酸を含む宿主細胞を培養して、第1の抗原と第2の抗原に結合することができるが該第1の抗原と第2の抗原とが同時に結合しない抗体の可変領域を含む、免疫細胞抗原結合領域を発現させる工程、ならびに

(iv)前記宿主細胞培養物から抗原結合分子を回収する工程。

[0038] なお、本製造方法では、工程(ii)は、以下の工程(v)であってもよい。

(v)作製されたライブラリーの中から、第1の抗原および第2の抗原に対して

結合活性を有するが、それぞれ異なる細胞上で発現している第1の抗原と第2の抗原に同時には結合しない可変領域を含む抗原結合分子を選択する工程。

[0039] ・癌抗原結合領域について

癌抗原結合領域は、癌抗原を認識する。該領域の機能の一つとして、癌抗原を認識することにより癌組織に多重抗原結合分子融合体を高濃度に存在させることが挙げられる。

癌抗原結合領域は、癌抗原を認識し得るものであれば特に限定されない。すなわち、癌抗原結合領域は、癌抗原を認識する抗体のFv等のポリペプチドであってもよく、葉酸等のポリペプチド以外の低分子化合物であってもよい。低分子化合物である場合には、多重抗原結合分子(α)を製造する際、癌抗原結合領域を免疫細胞抗原結合領域に結合する工程を要する。したがって、細胞に発現するだけで多重抗原結合分子(α)を産生でき、製造効率を高めることができる点から、癌抗原結合領域はポリペプチドであることが好ましい。

[0040] 癌抗原は、腫瘍細胞に特異的な抗原であり、細胞の悪性化に伴って発現する抗原の他、細胞が、がん化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も含まれる。

癌抗原としては、具体的には、グリピカン3 (GPC3)、ALK受容体(プレイオトロフィン受容体)、プレイオトロフィン、KS 1/4膀胱癌抗原、卵巣癌抗原(CA125)、前立腺酸リン酸、前立腺特異的抗原(PSA)、メラノーマ関連抗原p97、メラノーマ抗原gp75、高分子量メラノーマ抗原(HMW-MAA)、前立腺特異的膜抗原、癌性胚抗原(CEA)、多型上皮ムチン抗原、ヒト乳脂肪球抗原、CEA、TAG-72、C017-1A、GICA 19-9、CTA-1およびLEAなどの結腸直腸腫瘍関連抗原、バーキットリンパ腫抗原-38.13、CD19、ヒトBリンパ腫抗原-CD20、CD33、ガングリオシドGD2、ガングリオシドGD3、ガングリオシドGM2およびガングリオシドGM3などのメラノーマ特異的抗原、腫瘍特異的移植型細胞表面抗原(TSTA)、T抗原、DNA腫瘍ウイルスおよびRNA腫瘍ウイルスのエンベロープ

抗原などのウイルスにより誘導される腫瘍抗原、結腸のCEA、5T4癌胎児トロポブラスト糖タンパク質および膀胱腫瘍癌胎児抗原などの癌胎児抗原 α -フェトプロテイン、ヒト肺癌抗原L6およびL20などの分化抗原、線維肉腫の抗原、ヒト白血病T細胞抗原-Gp37、新生糖タンパク質、スフィンゴ脂質、EGFR（上皮増殖因子受容体）などの乳癌抗原、NY-BR-16、NY-BR-16およびHER2抗原（p185HER2）、多型上皮ムチン（PEM）、悪性ヒトリンパ球抗原-AP0-1、胎児赤血球に認められるI抗原などの分化抗原、成人赤血球に認められる初期内胚葉I抗原、移植前の胚、胃癌に認められるI（Ma）、乳腺上皮に認められるM18、M39、骨髄細胞に認められるSSEA-1、VEP8、VEP9、Myl、VIM-D5、結腸直腸癌に認められるD156-22、TRA-1-85（血液群H）、精巣および卵巣癌に認められるSCP-1、結腸癌に認められるC14、肺癌に認められるF3、胃癌に認められるA H6、Yハプテン、胚性癌細胞に認められるLey、TL5（血液群A）、A431細胞に認められるEGFR、膵臓癌に認められるE1シリーズ（血液群B）、胚性癌細胞に認められるFC10.2、胃癌抗原、腺癌に認められるC0-514（血液群Lea）、腺癌に認められるNS-10、C0-43（血液群Leb）、A431細胞のEGFRに認められるG49、結腸癌に認められるMH2（血液群ALeb/Ley）、結腸癌に認められる19.9、胃癌ムチン、骨髄細胞に認められるT5A7、メラノーマに認められるR24、胚性癌細胞に認められる4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2、およびM1:22:25:8ならびに4〜8細胞段階の胚に認められるSSEA-3およびSSEA-4、皮下T細胞リンパ腫抗原、MART-1抗原、シアリルTn（STn）抗原、結腸癌抗原NY-C0-45、肺癌抗原NY-LU-12変異体A、腺癌抗原ART1、腫瘍随伴性関連脳-精巣癌抗原（癌神経抗原MA2、腫瘍随伴性神経抗原）、神経癌腹部抗原2（NOVA2）、血液細胞癌抗原遺伝子520、腫瘍関連抗原C0-029、腫瘍関連抗原MAGE-C1（癌／精巣抗原CT7）、MAGE-B1（MAGE-XP抗原）、MAGE-B2（DAM6）、MAGE-2、MAGE-4a、MAGE-4bおよびMAGE-X2、癌-精巣抗原（NY-E0S-1）、YKL-40および上記ポリペプチドのいずれかの断片またはこれらに対して修飾された構造等（前記の修飾リン酸基や糖鎖等）、EpCAM、EREG、CA19-9、CA15-3、シリアルSSEA-1（SLX）、HER2、PSMA、CEA、CLEC12A等が挙げられる。中でも、GPC3、EGFR、p185HER

2が好ましく、GPC3がより好ましい。

また、癌抗原は、これら例示したような癌細胞が直接発現する抗原の他、癌細胞が発現するものでないが、癌組織の内部または近傍に存在し、癌細胞の増殖や転移を促進するような抗原であってもよい。

[0041] 癌抗原結合領域は、例えば、公知の抗体の作製方法を用いた方法により得られる。

該作製方法により得られた抗体は、そのまま癌抗原結合領域に用いてもよく、得られた抗体のうちFv領域のみを用いてもよく、該Fv領域が一本鎖で抗原を認識し得る場合には、該一本鎖のみを用いてもよい。また、Fv領域を含むFab領域を用いてもよい。

具体的な抗体の作製方法は、上述した免疫細胞抗原結合領域における具体的な抗体の作製方法と同様にして行うことができる。

また、免疫細胞抗原結合領域の免疫細胞抗原との結合活性と同様に、癌抗原結合領域の癌抗原との結合活性はパンニングにより向上させることができる。免疫細胞抗原結合領域の免疫細胞抗原との結合活性は、表面プラズモン共鳴（SPR）法（例えばBiacoreT200を用いる）を用いた結合アッセイのデータから算出される。結合活性はKD(M)で示され、KD(M)が小さいほど結合活性が高いことを意味する。KD(M)は、 10^{-6} より小さいことが好ましく、 10^{-7} より小さいことがより好ましく、 10^{-8} より小さいことがさらに好ましい。

[0042] ・多重抗原結合分子（ α ）の一の態様

多重抗原結合分子（ α ）の一の態様としては、例えば、抗体および抗体断片ならびにこれらの融合体や複合体等が挙げられる。

[0043] ここで「抗体」は、最も広い意味で使用され、所望の生物学的活性を示す限り、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体、抗体変異体、抗体断片、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、キメラ抗体、ヒト化抗体等、如何なる抗体も含まれる。

また、抗体は、抗原の種類、抗体の由来などは限定されず、いかなる抗体でもよい。抗体の由来としては、特に限定されないが、ヒト抗体、マウス抗

体、ラット抗体、ウサギ抗体などを挙げることができる。

[0044] 上述の中でも、好適な抗体としては、多重特異性抗体が挙げられる。多重特異性抗体とは、2以上の抗原を認識することができる抗体である。多重抗原結合分子(α)に多重特異性抗体を用いた場合には、癌抗原結合領域と免疫細胞抗原結合領域とが別々のFv領域により形成されていることが好ましい。

[0045] 多重特異性抗体は、公知の製造方法により製造すればよい。具体的には、以下の手法が挙げられる。

[0046] 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(国際公開第1996/027011号、Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681)。

[0047] 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)。

[0048] 他に、国際公開第2011/028952号や国際公開第2014/018572号やNat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8.に記載の抗体のCH1とCLの会合化、H鎖可変領域(以下、「VH」と略称する)、L鎖可変領域(以下、「VL」と略称する)の会合化を利用した抗体作製技術、国際公開第2008/119353号や国際公開第2011/131746号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 (「FAE」と略称されることもある))、国際公開第2012/0

5 8 7 6 8 号や国際公開第 2 0 1 3 / 0 6 3 7 0 2 号に記載の抗体重鎖のCH3間の会合を制御する技術、国際公開第 2 0 1 2 / 0 2 3 0 5 3 号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。

[0049] さらに、第一のエピトープに結合する可変領域を形成する軽鎖、および第二のエピトープに結合する可変領域を形成する軽鎖を、各々、第一のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖、および第二のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖に会合させる異種の軽鎖の会合技術として知られるCrossMab技術 (Scaferら (Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. (2011) 108, 11187-11192)) も、多重特異性抗体を作製するために使用され得る。

[0050] 多重特異性抗体を製造するこれらの手法の中でも、FAEが好ましい。FAEとしては、例えば、国際公開第 2 0 0 6 / 1 0 6 9 0 5 号、国際公開第 2 0 1 5 / 0 4 6 4 6 7 号に開示されている、抗体H鎖の第二の定常領域 (CH2) または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手法が挙げられる。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、該手法によれば、高収率で二重特異性抗体を製造することができる。以下、該手法について詳述する。

[0051] CH2または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。

[0052] 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。

[0053] さらに、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。

[0054] 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。

[0055] 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）。

[0056] 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

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。

[0057] 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。

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。

[0058] これらの多重特異性抗体を製造する手法は、複数、例えば2個以上組合せて用いることもできる。また、これらの手法は、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。

[0059] 多重特異性抗体を効率的に形成させることができない場合、産生された多重特異性抗体の中から目的の多重特異性抗体を分離、精製することも可能である。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（国際公開第2007/114325号）。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（国際公開第98/050431号、国際公開第95/033844号）。さらに、IgGとプロテインA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などのプロテインA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鎖とプロテインAとの相互作用を変化させ、プロテイン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。

[0060] 本態様の多重抗原結合分子 (α) として抗体断片を用いる場合の抗体断片としては、単一のポリペプチド鎖内に重鎖および軽鎖の両方を含むが、定常領域を欠いているものが挙げられる。そのような抗体断片の具体例としては、ダイアボディ (diabody ; Db)、単鎖抗体、sc(Fab')₂ が挙げられる。

[0061] 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、W093/11161号等) であり、各々のポリペプチド鎖は、同じ鎖中でVLおよび 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。

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できず、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。

[0062] 単鎖抗体としては、例えばsc(Fv)₂が挙げられる。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inker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inker等のリンカーで結ぶことによって作製され得る。

[0063] 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および二つの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]

[0064] sc(Fv)2の分子形態については国際公開第2006/132352号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、本態様の多重抗原結合分子 (α) 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。

[0065] 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inker、また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、本態様においてはペプチドリinkerが好ましい。ペプチドリinker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inkerが含まれる場合には、全て同じ長さのペプチドリinkerを用いてもよいし、異なる長さのペプチドリinkerを用いてもよい。

[0066] 例えば、ペプチドリinkerの場合：

Ser

Gly · Ser

Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly

Gly · Gly · Gly · Ser（配列番号：1）

Ser · Gly · Gly · Gly（配列番号：2）

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser（配列番号：3）

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly（配列番号：4）

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 5)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 6)

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 7)

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 8)

(Gly · Gly · Gly · Gly · Ser (配列番号 : 3))_n

(Ser · Gly · Gly · Gly · Gly (配列番号 : 4))_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、ペプチドリッ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。

[0067] 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（BSO₂COES）、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。

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。

[0068] 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。多重抗原結合分子（ α ）を構成するF(ab')₂は、所望の抗原結合ドメインを有する全長モノクローナル抗体等をペプシン等のタンパク質分解酵素にて部分消化した後に、Fc断片をプロテインAカラムに吸着させて除去することにより、好適に取得され得る。かかるタンパク質分解酵素

としてはpH等の酵素の反応条件を適切に設定することにより制限的にF(ab')₂を生じるように全長抗体を消化し得るものであれば特段の限定はされず、例えば、ペプシンやフィシン等が例示できる。

[0069] 抗体断片は、優れた細胞傷害性が得られる点から、少なくとも2つのFvを有し、癌抗原結合領域と免疫細胞抗原結合領域とが別々のFv領域により形成されていることが好ましい。

[0070] 抗体断片は、Fc領域を有していてもよく、Fc領域を有していなくてもよい。

Fc領域としては、例えば、天然型IgG由来のFc領域であってもよく、天然型IgG由来のFc領域に人工的な変異が加えられたFc領域であってもよい。

ここで、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。該変異体としては、例えば、遺伝子多型による複数のアロタイプ配列が挙げられる (Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242)。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。

[0071] 免疫細胞抗原結合領域によりリクルートされた免疫細胞と、Fc領域によりリクルートされた免疫細胞が干渉しあって免疫細胞の活性が亢進しすぎるなどの異常により副作用が生じることを防ぐ点から、多重抗原結合分子 (α) は、Fc領域を有していないことが好ましい。しかし、Fc領域を有していてもFc領域がFc γ 受容体を認識する機能を欠損するように改変されていれば、上述の副作用を低減できる。

[0072] Fc領域のアミノ酸配列の改変は、当分野において公知の種々の方法により行うことができる。これらの方法には、次のものに限定されるわけではないが、部位特異的変異誘導法 (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)、PCR変異法、カセット変異法等の方法により行うことができる。

[0073] Fc領域がFc γ 受容体を認識する機能を欠損するように改変されているかどうかは、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)。

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。

[0074] 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。

[0075] 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。

[0076] Fc領域がFc γ 受容体を認識する機能を欠損しているとは、例えば、上記の解析方法に基づいて、被験Fc領域のFc γ 受容体に対する結合活性が、対照のFc領域と比較して、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。

対照のFc領域としては、例えば、上述の天然型IgG由来のFc領域が挙げられる。また、被験Fc領域がある特定のアイソタイプ抗体のFc領域の変異体である場合には、当該特定のアイソタイプ抗体のFc領域を対照のFc領域として用いることによって、当該変異体がFc γ 受容体を認識する機能を欠損しているか否かが検証される。

このようにして、Fc γ 受容体を認識する機能を欠損していることが検証されたFc領域が適宜抗体断片に用いられる。

[0077] ・ 共通軽鎖について

抗体または少なくとも2つのFv領域を有する抗体断片における軽鎖は、いずれも同じアミノ酸配列を有することが好ましい。抗体または少なくとも2つのFv領域を有する抗体断片における軽鎖が、いずれも同じアミノ酸配列を有することにより、重鎖と軽鎖の組み合わせ数が少なくなるため、製造の際に望まない組み合わせの抗体または抗体断片を除去する工程を容易にすることができる。そのため、多重抗原結合分子融合体の製造の効率化が図れる。

[0078] (癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β))

癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) は、癌組織特異的プロテアーゼの標的配列からなるポリペプチドを有する。癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) は、癌組織特異的プロテアーゼの標的配列のみからなってもよく、標的配列のほかにペプチドリンカーを融合したものであってもよい。そのようなペプチドリンカーとしては、上述の可変領域を結合

するリンカーと同じものが挙げられる。

癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) は、癌組織において癌組織特異的プロテアーゼにより加水分解される。癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が加水分解されると、マスキング分子 (γ) が多重抗原結合分子 (α) から遊離できる状態になる。マスキング分子 (γ) が多重抗原結合分子 (α) から遊離すると、該多重抗原結合分子 (α) 中の免疫細胞抗原結合領域は免疫細胞に結合できるようになる。

また、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) は、マスキング分子 (γ) が多重抗原結合分子 (α) 中の免疫細胞抗原結合領域をマスクできるようにするためのスペーサーとしての機能を有する。

[0079] ・癌組織特異的プロテアーゼの標的配列について

癌組織特異的プロテアーゼとしては、例えば、国際公開第2013/128194号、国際公開第2010/081173号、国際公開第2009/025846号等で開示される癌組織に特異的に発現するプロテアーゼが挙げられる。限定して解釈されるものではないが、具体的なプロテアーゼとしては、システインプロテアーゼ（カテプシンファミリーB、L、Sなどを含む）、アスパルチルプロテアーゼ（カテプシンD、E、K、O等）、セリンプロテアーゼ（カテプシンAおよびG、トロンビン、プラスミン、ウロキナーゼ（uPA）、組織プラスミノゲン活性化因子（tPA）を含む）、メタロプロテアーゼ（膜結合型（MMP14-17およびMMP24-25）および分泌型（MMP1-13およびMMP18-23およびMMP26-28）の両方を含むメタロプロテアーゼ（MMP1-28）、プロテアーゼのAディスインテグリンおよびメタロプロテアーゼ（ADAM）、Aディスインテグリンまたはトロンボスポンジンモチーフを有するメタロプロテアーゼ（ADAMTS））、CD10（CALLA）、ならびに前立腺特異的抗原（PSA）等が挙げられる。

[0080] 癌組織特異的プロテアーゼの種類は、治療対象の癌組織での発現の特異性が高いほど、マスキング分子 (γ) による副作用低減効果が得られる。癌組

組織特異的プロテアーゼは、癌組織における濃度が正常組織における濃度の5倍以上高いことが好ましく、10倍以上高いことがより好ましく、100倍以上高いことがさらに好ましく、500倍以上高いことが特に好ましく、1000倍以上高いことが最も好ましい。

また、癌組織特異的プロテアーゼは、癌細胞の細胞膜に結合しているものでもよく、細胞膜に結合しておらず細胞外に分泌されるものでもよい。癌組織特異的プロテアーゼが癌細胞の細胞膜に結合していない場合、免疫細胞による細胞傷害が癌細胞に特異的であるためには、癌組織特異的プロテアーゼは癌組織の内部または近傍に存在するものであることが好ましい。本明細書で「癌組織の近傍」とは、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が切断されて、多重抗原結合分子 (α) が免疫細胞をリクルートして癌細胞を傷害する範囲内であることを意味する。ただし、できるだけ正常細胞を傷害しない範囲であることが好ましい。

癌組織特異的プロテアーゼは、1種単独でもよく、2種以上が組み合わされてもよい。癌組織特異的プロテアーゼの種類数は、治療対象の癌種を考慮して、当業者が適宜設定することができる。

[0081] 以上の観点から、癌組織特異的プロテアーゼとしては、上記例示したプロテアーゼの中でも、メタロプロテアーゼが好ましく、メタロプロテアーゼの中でも、MMP-2、MMP-9が好ましく、MMP-2がより好ましい。

[0082] 標的配列は、水溶液中でポリペプチドが癌組織特異的プロテアーゼによって加水分解を受ける際に、該癌組織特異的プロテアーゼにより特異的に認識される特定のアミノ酸配列である。

標的配列は、副作用低減の点から、治療対象の癌組織においてより特異的に発現している癌組織特異的プロテアーゼにより、高い特異性で加水分解されるアミノ酸配列であることが好ましい。

具体的な標的配列としては、例えば、国際公開第2013/128194号、国際公開第2010/081173号、国際公開第2009/025846号等で開示されている上記で例示した癌組織に特異的に発現するプロテ

アーゼによって特異的に加水分解される標的配列が挙げられる。また、標的配列は、Nature Biotechnology 19, 661 - 667 (2001)に記載のような当業者公知の方法で同定したものをを用いてもよい。

標的配列は、上述のように、好適な癌組織特異的プロテアーゼであるMMP-2により特異的に加水分解されるアミノ酸配列であることが好ましい。MMP-2により特異的に加水分解されるアミノ酸配列の中でも、以下のアミノ酸配列（配列番号：9）であることが好ましい。

P L G L A G（配列番号：9）

[0083] 癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）は、多重抗原結合分子（ α ）のいずれの箇所に結合していてもよい。マスキング分子（ γ ）が多重抗原結合分子（ α ）中の免疫細胞抗原結合領域にアクセスしやすくなり、免疫細胞抗原結合領域に対するマスキング効果を発揮しやすくなる点から、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）は、多重抗原結合分子（ α ）中の免疫細胞抗原結合領域に結合していることが好ましい。

多重抗原結合分子（ α ）が多重特異性抗体であり、癌抗原結合領域と免疫細胞抗原結合領域とが別々のFv領域により形成されている場合には、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）は、免疫細胞抗原結合領域を形成する側のFv領域（Fab領域）の重鎖N末端または軽鎖N末端に融合していることが好ましい（図3参照。図中、それぞれを「重鎖N末端融合体」または「軽鎖N末端融合体」と呼ぶ）。癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）が免疫細胞抗原結合領域を形成する側のFv領域の重鎖N末端または軽鎖N末端に融合していることにより、多重抗原結合分子（ α ）の作製後癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を結合する工程が必要なくなるため、多重抗原結合分子融合体の製造効率が優れたものとなる。また、後述する癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）とマスキング分子（ γ ）のアミノ酸長が設定しやすくなる。

[0084] 癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）は、例えば、公知のポリペプチドの産生方法により得られる。

[0085] (マスキング分子 (γ))

マスキング分子 (γ) は、アミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドを有する。アミノ酸配列 Q D G N E からなるポリペプチドは、ヒト CD3 ϵ に由来するヒト CD3 ϵ の部分ペプチドである。

マスキング分子 (γ) は、多重抗原結合分子融合体中で、多重抗原結合分子 (α) の免疫細胞抗原結合領域をマスクすることにより、該免疫細胞抗原結合領域が免疫細胞抗原と結合するのを防ぐ機能を有する。マスキング分子 (γ) による免疫細胞抗原結合領域のマスキングは、多重抗原結合分子融合体間で生じて、多重抗原結合分子融合体が複合体を形成している状態であってもよい。その状態でも、当該機能は発揮され得る。

癌組織では、該癌組織で発現する癌組織特異的プロテアーゼにより上述の癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が切断される。そうすると、マスキング分子 (γ) は多重抗原結合分子 (α) から遊離できる状態になる。マスキング分子 (γ) が多重抗原結合分子融合体から遊離すると、多重抗原結合分子 (α) の免疫細胞抗原結合領域は免疫細胞抗原と結合することができるようになる。

一方、正常組織では、癌組織特異的プロテアーゼが発現していないか発現していても濃度が低く、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が切断されにくい環境にあるため、マスキング分子 (γ) は多重抗原結合分子 (α) から遊離できず、免疫細胞抗原結合領域に対するマスキング効果が維持される。すなわち、正常組織では、マスキング分子 (γ) が癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を介して多重抗原結合分子 (α) に結合していることによって免疫細胞抗原結合領域がマスクされ、免疫細胞がリクルートされにくいことから、多重抗原結合分子 (α) による副作用が低減される。

[0086] マスキング分子 (γ) は、アミノ酸配列 Q D G N E 以外のアミノ酸配列を有していてもよく、有していなくてもよい。いずれの場合も、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が切断されていない状態ではそのマスキ

ング効果が充分に発揮でき、かつ、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）が切断された状態では、多重抗原結合分子（ α ）から遊離しやすい。

マスキング分子（ γ ）の安定性をより向上させる点およびCD3 γ やCD3 δ との結合によるマスキング効果の減弱をより防ぐ点から、マスキング分子（ γ ）は、アミノ酸配列Q D G N E以外のアミノ酸配列を有していないことが好ましい。

アミノ酸配列Q D G N E以外のアミノ酸配列を有する場合、マスキング分子（ γ ）は、ヒトCD3 ϵ の部分ポリペプチドであることが好ましい。マスキング分子（ γ ）の安定性をより向上させる点およびCD3 γ やCD3 δ との結合によるマスキング効果の減弱をより防ぐ点から、ヒトCD3 ϵ の部分ポリペプチドは、免疫細胞抗原結合領域が結合し得る線状ペプチド（線状エピトープ）であることが好ましい。また、線状ペプチドとすることにより、多重抗原結合分子融合体の分子量を抑えることができ、投与量を抑え、患者の負担を軽減できる。

ヒトCD3 ϵ の部分ポリペプチドは、具体的には、アミノ酸配列Q D G N EをN末端に有し、アミノ酸数が30以下のヒトCD3 ϵ 部分ポリペプチドであることが好ましく、アミノ酸配列Q D G N EをN末端に有し、アミノ酸数が25以下のヒトCD3 ϵ 部分ポリペプチドであることがより好ましく、アミノ酸配列Q D G N EをN末端に有し、アミノ酸数が20以下のヒトCD3 ϵ 部分ポリペプチドであることがさらに好ましく、アミノ酸配列Q D G N EをN末端に有し、アミノ酸数が15以下のヒトCD3 ϵ 部分ポリペプチドであることが特に好ましく、アミノ酸配列Q D G N EをN末端に有し、アミノ酸数が10以下のヒトCD3 ϵ 部分ポリペプチドであることが最も好ましい。

マスキング分子（ γ ）は、化学修飾されていてもよい。化学修飾は公知の修飾でよい。化学修飾としては、例えば、アセチル化、アルキル化、ピログルタミル化等が挙げられる。中でも、アミノ酸配列Q D G N E中のQがピログルタミル化されていることが好ましい。

[0087] マスキング分子 (γ) は、公知のポリペプチドの産生方法により得られる。また、化学修飾する場合の該修飾は、公知のポリペプチドの化学修飾方法により行えばよい。

[0088] (癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) とマスキング分子 (γ) のアミノ酸長)

癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) とマスキング分子 (γ) とが直鎖状の融合ポリペプチドである場合、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) とマスキング分子 (γ) の合計のアミノ酸長は、マスキング分子 (γ) による免疫細胞抗原結合領域のマスキング効果が十分に得られるように最適化され得る。

癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が免疫細胞抗原結合領域を形成するFv領域の重鎖N末端に融合している場合 (図3の上図) には、融合ポリペプチドのアミノ酸数は11以上65以下であることが好ましく、14以上27以下であることがより好ましく、17以上20以下であることが最も好ましい。

癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) が免疫細胞抗原結合領域を形成するFv領域の軽鎖N末端に融合している場合 (図3の下図) には、融合ポリペプチドのアミノ酸数は16以上65以下であることが好ましく、17以上30以下であることがより好ましく、19以上25以下であることが最も好ましい。

[0089] (多重抗原結合分子融合体の製造方法)

多重抗原結合分子融合体の製造方法としては、多重抗原結合分子 (α)、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) およびマスキング分子 (γ) をそれぞれ作製し、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) に、多重抗原結合分子 (α) およびマスキング分子 (γ) を結合する方法が挙げられる。

該方法における結合の種類は、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) と、多重抗原結合分子 (α) およびマスキング分子 (γ) とが化学結

合していれば、特に限定されない。化学結合の中でも共有結合が好ましく、さらに該共有結合がペプチド結合により形成されていることが好ましい。

[0090] 該方法のほか、多重抗原結合分子融合体が、糖鎖修飾されていてもよい、融合タンパク質または融合タンパク質の集合体である場合、多重抗原結合分子融合体は公知のタンパク質発現法、例えば、宿主細胞と発現ベクターとを組み合わせた方法により製造してもよい。

真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞また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 (Chinese hamster ovary cell line)、COS (Monkey kidney cell line)、ミエローマ (Sp2/0、NS0等)、BHK (baby hamster kidney cell line)、HEK293 (human embryonic kidney cell line with sheared adenovirus (Ad)5 DNA)、PER.C6 cell (human embryonic retinal cell line transformed with the Adenovirus Type 5 (Ad5) E1A and E1B genes)、Hela、Vero、など (Current Protocols in Protein Science (May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1))

(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

また、多重抗原結合分子融合体は大腸菌 (mAbs 2012 Mar-Apr; 4(2): 217-225.) や酵母 (国際公開第2000/023579号) でも作製することができる。大腸菌で作製した多重抗原結合分子融合体は糖鎖が付加されていない。一方、酵母で作製した多重抗原結合分子融合体は糖鎖が付加される。

発現ベクターは、宿主細胞の種類に応じて、当業者により適宜選択される。

[0091] 多重抗原結合分子融合体の回収は、例えば、形質転換した細胞を培養した後、分子形質転換した細胞の細胞内または培養液より分離することによって行うことができる。多重抗原結合分子融合体の分離、精製には、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、C1q、FcRn、プロテインA、プロテインGカラム、

アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせて行うことができる。

[0092] 多重抗原結合分子融合体の効率的な作製方法として、Knobs-into-holes技術（国際公開第1996/027011号、Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621、Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681）や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（国際公開第2006/106905号、国際公開第2015/046467号）等の、前述の技術を適用することができる。

[0093] B. 医薬組成物

本発明の医薬組成物は、上述の多重抗原結合分子融合体および薬学的に許容される担体を含む。医薬組成物は、上述の多重抗原結合分子融合体および薬学的に許容される担体を含むことで、公知の方法で製剤化することが可能である。

例えば、水もしくはそれ以外の薬学的に許容し得る溶液との無菌性溶液、または懸濁液剤の注射剤の形で非経口的に使用できる。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、結合剤など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することが考えられる。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。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するものである。

[0094] 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

製剤実施に従って処方することができる。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を含む等張液、例えばD-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、塩化ナトリウムが挙げられ、適当な溶解補助剤、例えばアルコール、具体的にはエタノール、ポリアルコール、例えばプロピレングリコール、ポリエチレングリコール、非イオン性界面活性剤、例えばポリソルベート80、HCO-50と併用してもよい。

[0095] 油性液としてはゴマ油、大豆油があげられ、溶解補助剤として安息香酸ベンジル、ベンジルアルコールと併用してもよい。また、緩衝剤、例えばリン酸塩緩衝液、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、フェノール、酸化防止剤と配合してもよい。調製された注射液は通常、適当なアンプルに充填させる。

投与は好ましくは非経口投与であり、具体的には、注射剤型、経鼻投与剤型、経肺投与剤型、経皮投与型などが挙げられる。注射剤型の例としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などにより全身または局所的に投与することができる。

[0096] 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。多重抗原結合分子融合体および薬学的に許容される担体を含有する医薬組成物の投与量としては、例えば、一回につき体重1kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で選ぶことが可能である。あるいは、例えば、患者あたり0.001から10000 mg/bodyの範囲で投与量を選ぶことができるが、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、投与方法は、患者の体重や年齢、症状などにより変動するが、当業者であれば適宜選択することが可能である。

[0097] 医薬組成物は、癌治療用であることが好ましい。治療対象の癌種は、用いる多重抗原結合分子融合体に含まれる多重抗原結合分子 (α) 中の癌抗原結合領域が認識する癌抗原を特異的に発現していることが好ましい。治療対象の癌種は、固形癌であってもよく、血液の癌であってもよい。

また、本発明の医薬組成物によれば、該医薬組成物を患者に投与する工程を含む癌の治療方法を提供できる。

[0098] C. 線状エピトープの同定方法

本発明の線状エピトープの同定方法は、免疫細胞抗原と前記免疫細胞抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域とのタンパク質複合体を用いたタンパク質立体構造解析のデータに基づき、前記免疫細胞抗原に含まれ、かつ、前記免疫細胞抗原結合領域により認識される線状エピトープを同定する工程を有する。

免疫細胞抗原結合領域は、その種類によっては、免疫細胞抗原中の線状ペプチド部分を認識する場合もあれば、より高次構造を形成したポリペプチドの該高次構造部分を認識する場合もある。本発明の線状エピトープの同定方法は、免疫細胞抗原結合領域が免疫細胞抗原中の線状ペプチド部分を認識する場合であって、該免疫細胞抗原結合領域が結合し得る線状ペプチドを同定する方法である。

同定された線状ペプチドは、高次構造の形成を要しないマスキング分子（ γ ）として有用である。該線状ペプチドは、高次構造の形成を要しないため、マスキング効果を安定的に発揮できる。

[0099] D. 多重抗原結合分子融合体の製造方法

本発明の多重抗原結合分子融合体の製造方法は、癌抗原を認識する癌抗原結合領域および免疫細胞抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域を有する多重抗原結合分子（ α ）に、線状エピトープ（例えば、上述の線状エピトープの同定方法により同定された線状エピトープ）を、前記癌抗原を発現する癌組織で特異的に発現するプロテアーゼにより切断され得る領域を有する癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を介して融合した融合タンパク質を発現する工程を有する。

多重抗原結合分子（ α ）および癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）は、上述の「A. 多重抗原結合分子融合体」におけるものと同様である。

線状エピトープは、本明細書における定義を満たしていればよく、特に限定されない。

線状エピトープは、上述の線状エピトープの同定方法により同定された線状エピトープであってもよく、種々の抗原の部分ペプチドを用いて、ELISA、質量分析、ファージライブラリー等を行うような、公知のエピトープマッピングで同定されたものでよい。線状エピトープは、免疫細胞抗原と免疫細胞抗原結合領域との結合状態が詳細かつより正確に解析できることによって最小単位のエピトープが得られる点、また、最小単位のエピトープが得られることによって高次構造の形成を要しないマスキング効果を安定的に発揮できる多重抗原結合分子融合体を得られる点から、上述の線状エピトープの同定方法により同定された線状エピトープであることが好ましい。

[0100] E. 本発明による作用効果

本発明の多重抗原結合分子融合体は、癌組織の内部または近傍に存在するプロテアーゼにより特異的に活性化され、T細胞等の免疫細胞を癌細胞にリクルートすることができる。そのため、癌抗原とCD3とを認識する多重抗原結合分子において、優れた副作用の低減効果が得られる。

本発明の多重抗原結合分子融合体においては、アミノ酸配列Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有するマスキング分子が用いられる。該マスキング分子は、少なくともアミノ酸配列Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有していればよく、国際公開第2013/128194号に開示されるマスキング分子よりも分子量が小さいため、製造しやすい。また、マスキング分子の分子量を小さくできるのに伴い、多重抗原結合分子融合体の分子量を小さくできるため、投与量を抑え、患者の負担を軽減できる。

[0101] CD3 ϵ は、一般にホモダイマーあるいはCD3 γ やCD3 δ などとヘテロダイマーを形成することが知られている（Scand J Immunol, 2002 Vol. 56, pp. 436-442.）。そのため、CD3 ϵ またはCD3 ϵ の部分タンパク質は、モノマーとして存在すると安定性が低下する可能性が考えられる。また、CD3 ϵ またはCD3 ϵ の部分タンパク質は、マスキング分子として用いた場合、分子同士や内在性のタンパク質とダイマーを形成しやすく、マスキング効果が十分に得られにく

くなる可能性が考えられる。

一方、本発明の多重抗原結合分子融合体中のマスキング分子は、少なくともアミノ酸配列Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有していればよい。ため、安定性とマスキング効果に優れる。

[0102] 国際公開第2013/128194号で使用された抗CD3 ϵ 抗体であるOKT3の抗原結合領域のエピトープは、ヒトとカニクイザルで異なる。したがって、OKT3は、ヒトCD3 ϵ 特異的な抗体であり、カニクイザルCD3 ϵ に結合することが確認されていない。そのため、カニクイザルを用いた非臨床毒性試験を行うことができないか、または、カニクイザルを用いた非臨床毒性試験を行っても、臨床試験の結果を反映しないと考えられる。

一方、本発明の免疫細胞抗原結合領域が認識する抗原中のアミノ酸配列Q D G N E（配列番号：15）は、ヒトとカニクイザルで同じである。そのため、カニクイザルを用いた非臨床毒性試験で得られた試験結果が臨床試験の結果を反映しやすくなる。

[0103] 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。

また、本明細書に記載の1また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。

実施例

[0104] 本発明は、以下の実施例によってさらに例示されるが、下記の実施例に限定されるものではない。

[0105] （実施例1）

「プロテアーゼで活性化される抗癌抗原／抗CD3多重抗原結合分子融合体のコンセプト」

抗癌抗原／抗CD3多重抗原結合分子は、その強力な細胞傷害活性から有望な抗がん剤の分子フォーマットとして期待されているが、一方で癌抗原が正常組織にわずかでも発現している場合、その正常組織に対しても傷害活性を発

揮してしまう可能性があるため、副作用が少ない安全性により優れた抗癌抗原／抗CD3多重抗原結合分子が望まれている。この際、抗癌抗原／抗CD3多重抗原結合分子を誘導体化し、プロテアーゼによって活性化される抗癌抗原／抗CD3多重抗原結合分子融合体を作製することができれば、副作用が少ない安全性により優れた抗癌抗原／抗CD3多重抗原結合分子を容易に作製することが可能である（図2）。

また、プロテアーゼで活性化される抗癌抗原／抗CD3多重抗原結合分子融合体は、さらに副作用が少ない安全性に優れたものとするため、以下の3つの構造的特徴を有することが好ましい。第一は、抗CD3抗体の結合活性を阻害するマスキング分子（ γ ）が、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を介して抗CD3抗体可変領域の重鎖N末端あるいは軽鎖N末端に接続されているという特徴である。第二は、マスキング分子（ γ ）は抗CD3抗体の天然エピトープ配列からなり、免疫原性の観点から非天然配列を含まず、種間（例えば、ヒトとカニクイザル間）で対応するアミノ酸配列の相同性が高いという特徴である。第三は、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）が癌組織の内部または近傍において高濃度で存在するプロテアーゼによって切断される標的配列を含むという特徴である。

[0106]（参考実施例1）ヒトまたはカニクイザル抗CD3 ϵ 抗体「CE115」の作製

1-1. ヒトCD3、カニクイザルCD3発現細胞免疫ラットを用いたハイブリドーマの作製

SDラット（雌、免疫開始時6週齢、日本チャールス・リバー）に、ヒトCD3 ϵ γ またはカニクイザルCD3 ϵ γ 発現Ba/F3細胞を以下の通り免疫した。初回免疫時を0日目とすると、0日目にフロイント完全アジュバント（Difco）とともに、 5×10^7 個のヒトCD3 ϵ γ 発現Ba/F3細胞を腹腔内投与した。14日目にフロイント不完全アジュバント（Difco）とともに 5×10^7 個のカニクイザルCD3 ϵ γ 発現Ba/F3細胞を腹腔内投与し、その後、1週間おきに4回 5×10^7 個のヒトまたはカニクイザルCD3 ϵ γ 発現Ba/F3細胞を交互に腹腔内投与した。CD3 ϵ γ の最終投与1週間後に（49日目）、ブーストとしてヒトCD3 ϵ γ 発現Ba/F3細胞

を静脈内投与し、その3日後に、ラットの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞SP2/0とを、PEG1500 (Roche Diagnostics) を用いた常法に従い細胞融合した。融合細胞、すなわちハイブリドーマは、10% FBSを含むRPMI1640培地（以下、10%FBS/RPMI1640と称す）にて培養した。

[0107] 融合の翌日に、(1)融合細胞を半流動培地 (Stem Cells) に懸濁し、ハイブリドーマの選択培養を行うと共に、ハイブリドーマのコロニー化を実施した。

[0108] 融合後9日目または10日目にハイブリドーマのコロニーをピックアップし、HAT選択培地（10% FBS/RPMI1640、2 vol% HAT 50x concentrate（大日本製薬）、5 vol% BM-Condimed H1 (Roche Diagnostics)）の入った96-ウェルプレートに、1ウェル当り1コロニーを播種した。3～4日培養後、各ウェルの培養上清を回収し、培養上清中のラットIgG濃度を測定した。ラットIgGが確認できた培養上清について、ヒトCD3 ϵ γ 発現Ba/F3細胞、もしくはヒトCD3 ϵ γ を発現しないBa/F3を付着させたcell-ELISAによってヒトCD3 ϵ γ に特異的に結合する抗体を産生するクローンを選抜した（図4）。さらに、カニクイザルCD3 ϵ γ 発現Ba/F3細胞を付着させたcell-ELISAを行うことにより、サルCD3 ϵ γ に対する交差性も評価した（図4）。

[0109] 1－2. 抗ヒト、サルCD3 ϵ キメラ抗体の作製

ハイブリドーマ細胞から、RNeasy Mini Kits (QIAGEN) を用いてトータルRNAを抽出し、SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences) によりcDNAを合成した。作製したcDNAを用いて、PCRにより、抗体の可変領域遺伝子をクローニングベクターに挿入した。各DNA断片の塩基配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用い、DNAシーケンサーABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems) にて、添付説明書記載の方法に従い決定した。CE115 H鎖可変領域およびCE115 L鎖可変領域のCDR、FRの決定はKabat numberingに従って行った。

[0110] 重鎖可変領域（配列番号：10）と軽鎖可変領域（配列番号：11）からなるラット抗CD3抗体、および当業者公知の方法でヒト化した重鎖可変領域（

配列番号：12）と軽鎖可変領域（配列番号：13）からなるヒト化抗CD3抗体を調製した。

[0111] （参考実施例2）抗体の発現ベクターの作製および抗体の発現と精製

アミノ酸置換の導入はQuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene)、PCRまたはIn fusion Advantage PCR cloning kit (TAKARA)等を用いて当業者公知の方法で行い、発現ベクターを構築した。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した。作製したプラスミドをヒト胎児腎癌細胞由来HEK293H株 (Invitrogen)、またはFreeStyle293細胞 (Invitrogen社)に、一過性に導入し、抗体の発現を行った。得られた培養上清から、rProtein A Sepharose (登録商標) Fast Flow (GEヘルスケア)を用いて当業者公知の方法で、抗体を精製した。精製抗体濃度は、分光光度計を用いて280 nmでの吸光度を測定し、得られた値からPACE法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した (Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423)。

[0112] （実施例2）抗CD3抗体とCD3との複合体のX線構造解析

重鎖（可変領域（配列番号：12）、定常領域（配列番号：38））と軽鎖（可変領域（配列番号：13）、定常領域（配列番号：36））とKn010G3（配列番号：37）からなる抗CD3抗体は参考実施例1の方法でOne arm抗体として発現・調製された。得られたOne arm抗体から、papain protease (Roche Applied Science) による切断処理とプロテインA担体カラムによるFcフラグメントの除去、陽イオン交換カラムならびにゲル濾過カラムによる精製を、当業者公知の手法でおこない、抗CD3抗体のFabフラグメントが調製された。

得られた抗CD3抗体のFabフラグメントは限外濾過により濃縮され、蒸気拡散法を用いて、200mM Potassium Sulfate、20% PEG3350のリザーバー条件下、20℃に静置することで結晶が得られた。本結晶を用いて、既知のFabフラグメントの結晶構造をもとに、当業者公知の方法によりX線結晶構造解析をおこなうことで、分解能25-2.12 Åの回折強度データに対し、抗CD3抗体のFabフラ

グメント単体の結晶構造が得られ、その結晶学的信頼度因子 R 値ならびに Free R 値は、それぞれ、22.21%と26.28%となった。

[0113] さらに、得られた抗CD3抗体のFabフラグメントにCD3のN端から15番目までの配列に相当する以下の配列番号：14に示す合成ペプチド（エピトープペプチド）

XDGNEEMGGITQTPY（X: L-ピログルタミン酸）（配列番号：14）

を2 mMになるよう加えたサンプルから、蒸気拡散法を用いて、100 mM MES緩衝液pH7.0、0.91% PEG3350、1.0M Sodium citrate tribasic dihydrate のリザーバー条件下、20℃に静置することで結晶が得られた。本結晶を用いて、上記の抗CD3抗体のFabフラグメント単体の結晶構造をもとに、当業者公知の方法によりX線結晶構造解析をおこなうことで、分解能25-3.5 Åの回折強度データに対し、抗CD3抗体のFabフラグメントとエピトープペプチドの複合体の結晶構造が得られ、その結晶学的信頼度因子 R 値ならびに Free R 値は、それぞれ、18.55%と26.53%となった。

[0114] 得られた結晶構造より、抗CD3抗体のFabフラグメントとエピトープペプチドの複合体のエピトープ近傍の構造と電子密度マップを図5に示した。エピトープペプチドのN末端から5残基目のGluまでしか電子密度は十分に観測されておらず、エピトープペプチドの6残基目以降の配列については、モデルを構築することができなかった。このように、当該抗体は、Fabフラグメントの重鎖と軽鎖の間に形成されるポケットにおいて、CD3のN末端から5残基目までのペプチド配列（エピトープコア配列）（図1矢印を参照）を主に認識してCD3と結合することが判明した。

[0115] このように当該抗体のCD3上のエピトープコア配列を同定できたことから、同エピトープコア配列と抗CD3抗体の重鎖N末端を接続するのに適切なリンカーの長さ、ならびに、同エピトープコア配列と抗CD3抗体の軽鎖N末端を接続するのに適切なリンカーの長さの推定を、プログラムMOE（Chemical Computing Group Inc.）により実施した。

まず、得られたFabフラグメントとエピトープペプチドの複合体の結晶構造

をもとに、重鎖N末端とエピトープペプチド5残基目のGluのC末端にそれぞれGlyを付加したモデル、ならびに、軽鎖N末端とエピトープペプチドの5残基目のGluのC末端にそれぞれGlyを付加した2つのモデルを作成した。

次に、両モデルに対してprotonate 3D機能により水素原子を付加、力場としてAMBER10:EHTを、solvationはR-fieldを指定し、Linker modeler機能を用いて、1から60残基の長さを探査範囲としてProtein Data Bankデータベースに対してサンプリングを行い、付加したGly同士をリンクするための、Glyリンカーの探索をおこなった。

[0116] その結果、同エピトープコア配列と抗CD3抗体の重鎖N末端をリンカーにより接続する場合、最短では6アミノ酸のリンカーにより接続することができることが示唆された（図6A）。しかしながら、6アミノ酸残基からなるリンカーでは、当該抗体表面とほぼ接するような経路をたどり、例えばGly以外を含むリンカーによる接続を試みた場合、当該抗体との間で立体障害を生じることなどが予想される。一方、図6B、図6C、図6Dに示す通り、9アミノ酸、12アミノ酸、16アミノ酸からなるリンカーで接続した場合、リンカーと抗体表面との間に余裕を持った形となり、Gly以外を含むリンカーでも接続できる可能性が高いと推察される。

[0117] 同様に、同エピトープコア配列と抗CD3抗体の軽鎖N末端をリンカーにより接続する場合、最短では11アミノ酸のリンカーにより接続することができることが示唆された（図7A）。しかしながら、11アミノ酸残基からなるリンカーでは、当該抗体表面とほぼ接するような経路をたどり、例えばGly以外を含むリンカーによる接続を試みた場合、当該抗体との間で立体障害を生じることが予想される。一方、図7B、図7C、図7Dに示す通り、12アミノ酸、14アミノ酸、16アミノ酸からなるリンカーで接続した場合、リンカーと抗体表面との間に余裕を持った形となり、Gly以外を含むリンカーでも接続できる可能性が高いと推察される。

[0118] 以上の結果から、同エピトープ配列と抗CD3抗体の重鎖N末端を接続する場合（図3の上図）、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）とマス

キング分子（ γ ）のアミノ酸長は、11アミノ酸以上65アミノ酸以下、より好ましくは14アミノ酸から27アミノ酸、さらに好ましくは、17アミノ酸から20アミノ酸、が適切であると推定された。

また、同エピトープ配列と抗CD3抗体の軽鎖N末端を接続する場合（図3の下図）、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）とマスキング分子（ γ ）のアミノ酸長は、16アミノ酸以上65アミノ酸以下、より好ましくは17アミノ酸から30アミノ酸、さらに好ましくは、19アミノ酸から25アミノ酸、が適切であると推定された。

[0119] （実施例3）CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体の作製

以下の表1に示すように、参考実施例1で作製したヒト化抗CD3抗体の重鎖N末端にマスキング分子（ γ ）と癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を融合した抗CD3抗体誘導体を作製する。なお、表1で用いられる癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）は、MMP-2の標的配列を有しており（国際公開第2010/081173号、国際公開第2009/025846号）、長さの異なるペプチドである。該標的配列はMMP-9によっても切断されることが知られている（Integr Biol (Camb). 2009 Jun; 1(5-6): 371-381.）。

[0120] [表1]

抗体名	マスキング分子（ γ ）	癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）	抗体可変領域＋定常領域	重鎖全長配列	軽鎖全長配列
CD3H1	配列番号15	配列番号16	配列番号20	配列番号21	配列番号25
CD3H2	配列番号15	配列番号17	配列番号20	配列番号22	配列番号25
CD3H3	配列番号15	配列番号18	配列番号20	配列番号23	配列番号25
CD3H4	配列番号15	配列番号19	配列番号20	配列番号24	配列番号25

[0121] また、表2に示すように、参考実施例1で作製したヒト化抗CD3抗体の軽鎖N末端にマスキング分子（ γ ）と癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を融合した抗CD3抗体誘導体を作製する。なお、表1と同様に、表で用いられる癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）は、MMP-2の標的配列を有しており（国際公開第2010/081173号、国際公開第2009

／025846号)、長さの異なるペプチドである。該標的配列はMMP-9によっても切断されることが知られている (Integr Biol (Camb). 2009 Jun; 1(5-6): 371-381.)。

[0122] [表2]

抗体名	マスキング分子 (γ)	癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β)	抗体可変領域 + 定常領域	軽鎖全長配列	重鎖全長配列
CD3L1	配列番号 15	配列番号 26	配列番号 29	配列番号 30	配列番号 34
CD3L2	配列番号 15	配列番号 27	配列番号 29	配列番号 31	配列番号 34
CD3L3	配列番号 15	配列番号 28	配列番号 29	配列番号 32	配列番号 34
CD3L4	配列番号 15	配列番号 19	配列番号 29	配列番号 33	配列番号 34

[0123] 表1のCD3H1、CD3H2、CD3H3、CD3H4、および表2のCD3L1、CD3L2、CD3L3、CD3L4は、それぞれ重鎖全長配列をコードするプラスミドおよび軽鎖全長配列の発現ベクターを用いて、公知の抗体の製造方法にて調製する。

[0124] (実施例4) CD3と抗CD3抗体の結合評価

参考実施例2の方法に従い、抗CD3抗体を作製した。具体的には、まず、重鎖可変領域 (配列番号: 10) とpE22Hh (配列番号: 35) とを融合したポリペプチドの動物細胞発現用の発現ベクター、軽鎖可変領域 (配列番号: 11) とKappa鎖 (配列番号: 36) とを融合したポリペプチドの動物細胞発現用の発現ベクター、および、重鎖定常領域のヒンジ部からC末端側 (Kn0101G3 (配列番号: 37)) の動物細胞発現用の発現ベクターを用いて、これらのポリペプチドを細胞に共発現させ、One arm抗体として抗CD3抗体を産生させた。次いで、培養上清から、抗CD3抗体を精製した。

抗CD3抗体とヒトCD3の結合評価は、BiacoreT200を用いて行った。具体的には、CM4チップにストレプトアビジンを介してビオチン化CD3ペプチドを結合させ、作製した抗体をアナライトとして流し、37°Cで結合アフィニティを解析した。

以下の表3に、結合評価の結果を示す。

[0125]

[表3]

sample	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
抗 CD3 抗体	1.09E+05	4.19E-02	3.83E-07

[0126] (参考実施例3) CD3 ϵ への結合が増強された抗CD3抗体誘導体の選択

参考実施例3-1. CD3結合を増強する方法

国際公開第2015/068847号に記載した抗CD3抗体由来の抗体ライブラリー (Dual Fab Library) を利用する方法として、CD3への結合が増大した抗体を得る方法が考えられる。一般に、結合力を増強する方法 (Affinity maturation) は、取得された抗体配列に対して部位特異的変異法によってアミノ酸を改変して結合力を測定する方法と、Phage displayをはじめとするIn vitro display法を用いる方法が挙げられる。In vitro display法では、取得された配列に対してError prone PCR法等によって変異が導入された多種類の抗体配列をライブラリーとして、結合力が強い配列を選択する。

CD3への結合が、従来の抗CD3抗体 (例えば、上述のテンプレート配列を有するCD3結合抗体) の場合の80%以上であるアミノ酸を選定したDual Fab Libraryを用いることで、CD3への結合が強い配列を効率よく見つけられると考えられる。

[0127] 参考実施例3-2. ヒトCD3に対して結合が増強されているFabドメインの取得

国際公開第2015/068847号で開示したDual Fab libraryからヒトCD3に対して結合するFabドメイン (抗体断片) を同定した。抗原として、ビオチン標識されたCD3ペプチドを用いて、ヒトCD3に対して結合能をもつ抗体断片の濃縮を行った。

構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保持した大腸菌からファージ産生が行われた。ファージ産生が行われた大腸菌の培養液に2.5 M NaCl/10%PEGを添加することによって沈殿させたファージの集団をTBSにて希釈することによってファージライブラリー液が得られた。次に、ファージライブラリー液に終濃度4%BSAとなるようにBSAが添加された。パンニング方法とし

て、一般的な方法である磁気ビーズに固定化した抗原を用いたパンニング方法が参照された (J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9、J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203、Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20、Mol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9)。磁気ビーズとして、NeutrAvidin coated beads (Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated) もしくはStreptavidin coated beads (Dynabeads M-280 Streptavidin) が用いられた。

[0128] 具体的には、調製されたファージライブラリー液に250 pmolのビオチン標識抗原を加えることによって、当該ファージライブラリー液を室温にて60分間抗原と接触させた。BSAでブロッキングされた磁気ビーズが加えられ、抗原とファージとの複合体を磁気ビーズと室温にて15分間結合させた。ビーズはTBS (0.1%Tween20を含有するTBS, TBSはTaKaRa社製) にて3回洗浄された後、1 mLのTBSにてさらに2回洗浄された。その後、0.5 mLの1 mg/mLのトリプシンが加えられたビーズは室温で15分懸濁された後、即座に磁気スタンドを用いてビーズが分離され、ファージ溶液が回収された。回収されたファージ溶液が、対数増殖期 (OD₆₀₀が0.4-0.5) となった10 mLの大腸菌株ER2738に添加された。37°Cで1時間緩やかに上記大腸菌の攪拌培養を行うことによって、ファージを大腸菌に感染させた。感染させた大腸菌は、225 mm x 225 mmのプレートへ播種された。次に、播種された大腸菌の培養液からファージを回収することによって、ファージライブラリー液が調製された。このサイクルをパンニングと呼び、全部で7回繰り返した。なお2回目以降のパンニングでは、ヒトCD3は40、10、10、1、1、0.1pmolとした。また5回目以降はヒトCD3を加える際にそれぞれ1000倍量のヒトCD3 ε ホモダイマーを加えた。

[0129] 参考実施例 3 - 3. 取得したFabドメインを有するIgGの調製

参考実施例 3 - 2 で得られたCD3結合能をもつ抗体断片の集団はFabドメインのみで構成される。そこで、IgG型 (FabおよびFcの結合体) へ変換を行った。CD3結合能をもつ抗体断片を有する大腸菌からDual Fab LibraryのH鎖に特異的に結合するプライマーを用いて、PCRによってVH断片を増幅した。増幅

したVH断片は参考実施例2の方法でF760mnP17（配列番号：39）が組み込まれた動物細胞発現用のプラスミドに組み込まれた。具体的には、重鎖としてAN121H-F760mnP17（配列番号：40）、L鎖としてGLS3000（配列番号：13）とKappa配列（配列番号：36）を連結した配列（配列番号：25）を採用し、参考実施例1に従って発現精製が行われた。この抗体をAN121と呼ぶ。

[0130] （実施例5）CD3 ϵ δ ヘテロダイマーへの結合評価

参考実施例で調製された抗体のCD3 ϵ δ ヘテロダイマーに対する結合を表面プラズモン法（SPR法）で評価した。

[0131] 5-1. CD3 ϵ δ ヘテロダイマーの調製

CD3 ϵ δ ヘテロダイマーは以下の方法で調製した。まず、CD3 ϵ の細胞外ドメインをコードする遺伝子の3'末端にFactor Xa切断サイトをコードする遺伝子とEU numbering 349番目がCys, 366番目がTrpとなっているヒト免疫グロブリン（IgG1）のヒンジ領域よりもC末端のアミノ酸をコードする遺伝子を融合し、さらにTEV protease切断サイトとBAPタグ配列をコードする遺伝子を融合した遺伝子（配列番号：41をコードする遺伝子）を動物細胞発現ベクターに挿入した。つぎにCD3 δ の細胞外ドメインをコードする遺伝子の3'末端にFactor Xa切断サイトをコードする遺伝子とEU numbering 356番目がCys, 366番目がSer, 368番目がAla, 407番目がValとなっているヒト免疫グロブリン（IgG1）のヒンジ領域よりもC末端をコードする遺伝子を融合し、さらにFlagタグ配列をコードする遺伝子を融合した遺伝子（配列番号：42をコードする遺伝子）を動物細胞発現ベクターに挿入した。参考実施例2と同様に、配列番号：41をコードする遺伝子と配列番号：42をコードする遺伝子を持った動物細胞発現ベクターをFreeStyle293細胞（Invitrogen）に導入した。導入後プロトコルに従って37℃で振とう培養し、5日後に上清を回収した。上清からProteinAカラム（Eshmuno A（Merck））を用いて、抗体の定常領域（特にFc）が融合しているCD3 ϵ δ ヘテロダイマーを得た。さらにヘテロダイマーを取得する目的でAnti-FLAG M2カラム（Sigma）を用いて、抗体の定常領域が融合しているCD3 ϵ δ ヘテロダイマーを分画した。引き続き、ゲル濾過クロマトグ

ラフィー (Superdex200、GE Healthcare) を実施して目的のCD3 ϵ δ ヘテロダイマーを分取した。

[0132] 分取した抗体の定常領域が融合しているCD3 ϵ δ にFactor Xa (NEB) を加え、CD3 ϵ δ ヘテロダイマーと抗体の定常領域を分離した。プロテアーゼを除去するために、Benzamidineカラム (GE Healthcare) を通過させ、Mabselect Sureカラム (GE Healthcare) とイオン交換クロマトグラフィー (Q sepharose HP、GE Healthcare) とゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex 200、GE Healthcare) を用いて目的のCD3 ϵ δ ヘテロダイマーを得た。

[0133] 5-2. CD3 ϵ δ ヘテロダイマーへの結合測定

参考実施例1に記載の重鎖可変領域 (配列番号: 10) と軽鎖可変領域 (配列番号: 11) を可変領域として含むラット抗CD3抗体、当業者公知の方法で軽鎖をヒト化した重鎖可変領域 (配列番号: 12) と軽鎖可変領域 (配列番号: 13) を可変領域として含むラット抗CD3抗体とヒト抗CD3抗体の組み合わせ、当業者公知の方法でヒト化した重鎖可変領域 (配列番号: 12) と軽鎖可変領域 (配列番号: 13) を可変領域として含むヒト化抗CD3抗体、および重鎖可変領域 (配列番号: 43) と軽鎖可変領域 (配列番号: 13) を可変領域として含むAN121のCD3 ϵ δ ヘテロダイマーへの結合活性を測定した。重鎖可変領域は定常領域としてのF760mnP17 (配列番号: 39) と融合し、軽鎖可変領域は定常領域としてのKappa鎖 (配列番号: 36) と融合して、参考実施例2の方法に従って抗体を発現させた。

CD3 ϵ δ ヘテロダイマーへの結合活性はBiacoreT200を用いて評価した。具体的には、CM3 chipにProteinGを当業者公知の方法で固定化し、固定化されたProteinGへ評価したい抗体を結合させた。その後、4000, 1000, 250, 62.5, 15.6, 3.9nMに調製したCD3 ϵ δ ヘテロダイマーを結合させ、シングルサイクルカイネティクスモードで結合を評価した。測定は、20mM ACES, 150mM NaCl, pH7.4の条件で、37°Cで実施した。その結果を表4に示す。

[0134]

[表4]

抗体名	重鎖 配列 番号	軽鎖 配列 番号	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
CE115VH-F760mnP17/rCE115VL-k0 (ラット抗 CD3 抗体)	44	45	4.04E+04	7.71E-03	1.91E-07
ラット抗 CD3 抗体とヒト抗 CD3 抗体 の組み合わせ (CE115VH-F760mnP17/GLS3000-k0)	44	25	4.73E+04	1.24E-02	2.62E-07
CE115HA000-F760mnP17/GLS3000-k0 (ヒト化抗 CD3 抗体)	46	25	5.18E+04	2.88E-02	5.56E-07
AN121H-F760mnP17/GLS3000-k0 (AN121)	40	25	7.47E+04	7.23E-04	9.68E-09

[0135] 表4に示すように、参考実施例3で得られたAN121はCD3 ϵ δ への結合が増強されていることが示された。

[0136] (実施例6) CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体の作製

癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を介したマスキング分子 (γ) の付加によりCD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体と、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を持たない切断を受けないリンカーを用いてマスキング分子 (γ) を付加した抗CD3抗体誘導体 (表5に示す) とを参考実施例2の方法に従い、作製した。癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) として、国際公開第2013/163631号に報告されている配列 (LSGRSDNH: 配列番号: 47) を用いた。対照として、実施例3に示したMMP-2の切断配列 (PLGLAG: 配列番号: 106) やGlyとSerで構成されるリンカーペプチドを癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) の部位に挿入した配列も作製した。具体的には、まず、重鎖可変領域とpE22Hh (配列番号: 35) とを融合したポリペプチドの動物細胞発現用の発現ベクター、軽鎖可変領域とKappa鎖 (配列番号: 36) とを融合したポリペプチドの動物細胞発現用の発現ベクター、および、重鎖定常領域のヒンジ部からC末端側 (Kn010 (配列番号: 48)) の動物細胞発現用の発現ベクターを

用いて、これらのポリペプチドを細胞に共発現させ、One arm抗体として抗CD3抗体を産生させた。次いで、培養上清から、抗CD3抗体を精製した。または、重鎖定常領域としてF760mP17（配列番号：39）を重鎖可変領域に連結し、軽鎖全長と共に発現させてTwo arm抗体として抗CD3抗体を産生させ、培養上清から抗CD3抗体を精製した。

[0137] [表5]

抗体名	重鎖N末端の改変				配列番号				2本目の重鎖
	マスキング分子	プロテアーゼ切断リンカー	重鎖可変領域	重鎖定常領域	重鎖全長	軽鎖全長	重鎖全長	軽鎖全長	
hCE115HA/GLS One arm	なし	なし	12	35	34	25	25	48	48
hCE115HAGS/GLS One arm	15	52	58	35	82	25	25	48	48
hCE115HAuPA04/GLS One arm	49	53	60	35	83	25	25	48	48
hCE115HAuPA20/GLS One arm	50	54	61	35	84	25	25	48	48
hCE115HAuPA20L/GLS One arm	50	59	62	35	85	25	25	48	48
hCE115HAuPA27/GLS One arm	51	47	63	35	86	25	25	48	48
hCE115HAMMP02/GLS One arm	15	55	64	35	87	25	25	48	48
抗体名	軽鎖N末端の改変				配列番号				2本目の重鎖
	マスキング分子	プロテアーゼ切断リンカー	軽鎖可変領域	軽鎖定常領域	軽鎖全長	重鎖全長	軽鎖全長	重鎖全長	
hCE115HA/GLS One arm	なし	なし	13	36	25	34	34	48	48
hCE115HA/GLSGS One arm	15	56	65	36	88	34	34	48	48
hCE115HA/GLSuPA02 One arm	15	54	66	36	89	34	34	48	48
hCE115HA/GLSuPA04 One arm	49	53	67	36	90	34	34	48	48
hCE115HA/GLSuPA20L One arm	50	59	68	36	91	34	34	48	48
hCE115HA/GLSuPA27 One arm	51	47	69	36	92	34	34	48	48
hCE115HA/GLSMMP02 One arm	15	55	70	36	93	34	34	48	48
hCE115HA/GLS Two arm	なし	なし	13	36	25	46	46	なし	なし
hCE115HA/GLSGS Two arm	15	56	71	36	94	46	46	なし	なし
hCE115HA/GLSuPA20 Two arm	50	54	72	36	95	46	46	なし	なし
hCE115HA/GLSMMP02 Two arm	15	55	73	36	96	46	46	なし	なし
抗体名	重鎖N末端の改変				配列番号				2本目の重鎖
	マスキング分子	プロテアーゼ切断リンカー	重鎖可変領域	重鎖定常領域	重鎖全長	軽鎖全長	重鎖全長	軽鎖全長	
AN/GLS One arm	なし	なし	43	35	97	25	25	48	48
ANGS/GLS One arm	15	52	74	35	98	25	25	48	48
ANuPA02/GLS One arm	15	57	75	35	99	25	25	48	48
ANuPA04/GLS One arm	49	53	76	35	100	25	25	48	48
ANuPA20/GLS One arm	50	54	77	35	101	25	25	48	48
ANuPA20L/GLS One arm	50	59	78	35	102	25	25	48	48
ANuPA27/GLS One arm	51	47	79	35	103	25	25	48	48
ANuPA27L/GLS One arm	51	130	80	35	104	25	25	48	48
ANMMP02/GLS One arm	15	55	81	35	105	25	25	48	48
抗体名	軽鎖N末端の改変				配列番号				2本目の重鎖
	マスキング分子	プロテアーゼ切断リンカー	軽鎖可変領域	軽鎖定常領域	軽鎖全長	重鎖全長	軽鎖全長	重鎖全長	
hCE115HA-CD3/GLS One arm	107	47	12	35	108	25	25	48	48
hCE115HA-CD3 Linker/GLS One arm	107	59	12	35	109	25	25	48	48
抗体名	重鎖N末端の改変				配列番号				2本目の重鎖
	マスキング分子	プロテアーゼ切断リンカー	重鎖可変領域	重鎖定常領域	重鎖全長	軽鎖全長	重鎖全長	軽鎖全長	
hCE115HA/GLS-CD3 One arm	107	47	13	36	110	34	34	48	48
hCE115HA/GLS-CD3 Linker One arm	107	59	13	36	111	34	34	48	48

[0138] 表6は抗体の濃度を示す。CD3εの細胞外ドメインを融合した場合、他の改変体と比較して精製後の濃度が低下しており、発現量が低いことが示唆され

た。

[0139] [表6]

抗体名	濃度 (mg/mL)
hCE115HA/GLS One arm	0.808
hCE115HAGS/GLS One arm	1.580
hCE115HA/GLSGS One arm	0.756
hCE115HA-CD3/GLS One arm	0.379
hCE115HA-CD3_Linkers/GLS One arm	0.441
hCE115HA/GLS-CD3 One arm	0.048
hCE115HA/GLS-CD3_Linkers One arm	0.056

[0140] (実施例7) CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3 ϵ 結合活性の評価

実施例6で調製された抗体をプロテアーゼで処理し、CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体がCD3 ϵ に結合するか評価した。参考実施例2に示した方法で抗体を取得し、取得した抗体5 μ gに対して終濃度25nMとなるようにuPA (Recombinant Human u-Plasminogen Activator, R&D systems)を加え、PBS中で37℃、16時間から20時間反応させた。

[0141] CD3 ϵ 細胞外ドメイン (CD3 ϵ ホモダイマー) をNo-Weigh Premeasured NHS-PE04-Biotin Microtubes(Pierce)を用いて、プロトコールに従いビオチン化した。ブロッキングバッファー (0.02% Tween20および0.05% ProClin300を含む0.5×Block ACE)を用いて、抗原の希釈、ビーズの希釈および抗体の希釈を実施した。ビオチン化した抗原と常磁性ビーズ (Dynabeads (登録商標) MyOne™ Streptavidin T1, Invitrogen)を混合し10分室温で静置した。この時、抗原を加えないウェルには、常磁性ビーズとブロッキングバッファーを加えた。プロテアーゼ処理抗体溶液またはプロテアーゼ未処理抗体溶液をPBSで4 μ g/mL、1 μ g/mL、0.25 μ g/mL、0.0625 μ g/mL、0.015625 μ g/mL、0 μ g/mLとなるように希釈し、25 μ Lずつ加えた。AN121の改変体では1 μ g/mLをトップドーズとした。ビーズと抗体をよく混合した後30分室温で静置した。0.05% Tween20(Nacalai)を含むTBS(TaKaRa)で1回洗浄した後、16000倍に希釈したHRP標

識抗Kappa鎖抗体(Anti-Human Kappa Chain antibody、Abcam、ab79115)を加えてさらに10分室温で静置した。再度3回洗浄した後、基質としてLumi-Phos-HRP(Lucmigen、PAA457009)を加えて室温で2分静置した後、発光をSynergy HT Xで検出した。検出した発光値をそれぞれ同じ抗体濃度で抗原を加えていないウェルの値に対する比で表した。その結果を図8に示す。図8に示したように、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)を含まない抗体はプロテアーゼを加えた場合(プロテアーゼ処理あり)とプロテアーゼを加えていない場合(プロテアーゼ未処理)で結合活性が変動しなかった。一方で、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)を含む抗体は、プロテアーゼ処理によってCD3 ϵ への結合が顕著に上昇した。具体的には、重鎖に癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)をつなげた場合には、hCE115HAuPA04に示されるように、マスキング分子(γ)が7アミノ酸からなり、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)がGGGSの繰り返しで構成されるGSリンカーとuPAによって切断される配列を含みかつGGGSペプチド配列で重鎖N末端に接続されている場合に切断前後で結合活性が最も変化した。一方で、マスキング分子(γ)を20アミノ酸(hCE115HAuPA20)や27アミノ酸(hCE115HAuPA27)にすると、マスキング分子(γ)が7アミノ酸であった場合(hCE115HAuPA04)と比べて、プロテアーゼ処理による結合活性の上昇率は低下した。図8の(i v)はAN121の重鎖にマスキング分子(γ)と癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)を接続した結果であるが、hCE115HAで示された結果と同様に、プロテアーゼで切断することによってCD3結合活性が上昇した。AN121においてもマスキング分子(γ)が20アミノ酸(ANuPA20)や27アミノ酸(ANuPA27)である分子よりも、短いマスキング分子(γ)が好適であることが示された。また、軽鎖に癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)をつなげた場合も同様に、GLSuPA04に示されるようにマスキング分子(γ)が7アミノ酸からなり、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー(β)がGGGSの繰り返しで構成されるGSリンカーとuPAによって切断される配列を含みかつGGGSペプチド配列で重鎖N末端に接続されている場合に切断前後で結合活性が最も変

化した。一方でマスキング分子 (γ) を20アミノ酸(GLSuPA20)や27アミノ酸(GLSuPA27)にすると、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸であった場合(GLSuPA04)と比べて、プロテアーゼ処理による結合活性の上昇率は低下した。

[0142] 本検討から、天然に由来する配列をマスキング分子 (γ) として使用可能であることが明らかとなり、マスキング分子 (γ) の長さを適切な長さとなるように本実施例で示した方法のように天然の配列に沿って変更することや癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) の長さを変更することで、所望の効果を発揮する分子を作製できることが示された。

[0143] (実施例8) CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3 ϵ 結合活性の評価

実施例7ではuPAを用いて切断を実施したが、当該配列はマトリプターゼでも切断されることが分かっている。そこで、実施例7で調製した検体がマトリプターゼでも切断され、CD3に対して結合するか評価した。抗体は実施例7の方法で調製され、その後3 μ gの抗体に対してヒトMT-SP1(Matriptase/ST14 Catalytic Domain, R&D systems)を終濃度50nMで添加した。添加後37°Cで22時間保温した後、実施例7と同じ方法で結合活性を評価した。その結果を図9に示す。図9に示したように、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を含まない抗体はプロテアーゼを加えた場合(プロテアーゼ処理あり)とプロテアーゼを加えていない場合(プロテアーゼ未処理)で結合活性が変動しなかった。一方で、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を含む抗体は、プロテアーゼ処理によってCD3 ϵ への結合が顕著に上昇した。具体的には、重鎖に癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) をつけた場合には、hCE115HAuPA04に示されるように、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸からなり、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) がGGGSの繰り返しで構成されるGSリンカーとuPAによって切断される配列を含みかつGGGSペプチド配列で重鎖N末端に接続されている場合に切断前後で結合活性が最も変化した。一方で、20アミノ酸(hCE115HAuPA20)や27アミノ酸(hCE115HAuPA27)にすると、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸であった場合(hCE115HAuP

A04)と比べて、プロテアーゼ処理による結合活性の上昇率は低下した。また、軽鎖に癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) をつなげた場合も同様に、GLSuPA04に示されるように、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸からなり、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) がGGGSの繰り返しで構成されるGSリンカーとuPAによって切断される配列を含みかつGGGSペプチド配列で重鎖N末端に接続されている場合に切断前後で結合活性が最も変化した。一方でマスキング分子 (γ) を20アミノ酸(GLSuPA20)や27アミノ酸(GLSuPA27)にすると、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸であった場合(GLSuPA04)と比べて、プロテアーゼ処理による結合活性の上昇率は低下した。この結果は実施例7で示された結果と同様であり、切断を行うためのプロテアーゼはuPAに限らず他のプロテアーゼでもよいことが示された。

[0144] (実施例9) CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3 ϵ 結合活性の評価

実施例7および8では国際公開第2013/163631号に報告されている配列(LSGRSDNH: 配列番号: 47)を用い、uPAまたはマトリプターゼ(MT-SP1)を用いて切断を実施した。次に、実施例3に示すようにMMP-2によって切断される配列を用いた場合に、uPAやMT-SP1と同様に結合活性がプロテアーゼ処理によって上昇するか検討した。実施例7と同様の方法で抗体を調製した。

[0145] あらかじめMMP-2(R&D systems)に、DMSO(ジメチルスルホキシド、純正化学)を用いて100mMとしたAPMA(酢酸4-アミノフェニル水銀、SIGMA)を100分の1量(体積)添加して37°Cで2時間保温することで、MMP-2を活性化させた。抗体3 μ gに対して終濃度50nMとなるように活性化させたMMP-2を加え、37°Cで22時間反応させた。なお、保温時は0.1% Tween20, 10mM CaCl₂が添加されているTBS(TaKaRa)が全体の半分の体積になるように調製した。保温後、電気化学発光法(ECL)法で結合を評価した。Biotinを付加したヒトCD3 ϵ ホモ二量体タンパク質(18pmol/mLまたは0pmol/mL)と、1 μ g/mL, 0.25 μ g/mL, 0.0625 μ g/mL, 0.015625 μ g/mLまたは0 μ g/mLに調製された抗体溶液と、sulfo-

tag (Ru錯体) で標識した抗ヒトKappa鎖抗体 (SouthernBiotech, 2.7 $\mu\text{g/mL}$) を、Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well round plates (Nunc) の各ウェルに25 μL ずつ添加し、混合した後、室温で1時間以上保温し、抗体抗原複合体を形成させた。0.5% BSAを含むTBST(0.1% Tween20を含むTBS (TaKaRa) 溶液) をブロッキング溶液とよび、これをstreptavidin plate(MSD)各ウェルに150 μL ずつ加えて室温で2時間以上インキュベートした。ブロッキング溶液を除いた後、0.1% Tween20を含むTBS(+)溶液250 μL で3回洗浄した。抗体抗原複合体溶液を50 μL ずつ各ウェルに添加し、室温1時間700rpmで振とうして、抗体抗原複合体をstreptavidin plateに結合させた。抗体抗原複合体溶液を除いた後、2×READ buffer(MSD)を各ウェルに150 μL ずつ加え、Sector Imager 2400(MSD)でsulfo-tagの発光シグナルを検出した。その結果を図10に示す。

[0146] 図10に示すように、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を含まない抗体はプロテアーゼを加えた場合 (プロテアーゼ処理あり) とプロテアーゼを加えていない場合 (プロテアーゼ未処理) で結合活性が変動しなかった。一方で、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を含む抗体 (hCE115HAMMP02) は、プロテアーゼ処理によってCD3 ϵ への結合が顕著に上昇した。軽鎖に癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を接続しても同様にCD3 ϵ への結合が上昇した。実施例3に記載の通り、軽鎖に接続する場合にはより長いリンカーを用いることができると考えられるが、最低でも本実施例で示されたGGGGSPSLAGGGG (配列番号: 55) という配列があれば、所望の効果を発揮することが示された。以上から、実施例7, 8に示された癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) だけでなく、本実施例に示された実施例3の癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) も利用することができることが示された。

[0147] (実施例10) CD3 ϵ への結合がマスキングされた抗CD3抗体誘導体および切断を受けない抗体のプロテアーゼ処理後のCD3活性化評価

実施例7～9で、CD3 ϵ への結合がマスクされた抗体は、プロテアーゼで処理することによってCD3 ϵ への結合が顕著に上昇することが示された。次に、

抗体のプロテアーゼ処理によってCD3の活性を誘導できるか評価した。SK-HEP1細胞にGPC3を強制発現させたSK-pca-60細胞を標的細胞とし、NFAT-RE-luc2-Jurkat細胞(Promega)をエフェクター細胞とした。NFAT-RE-luc2-Jurkat細胞(Promega)はヒト白血病T細胞株に由来し、CD3活性化に伴いNFATに応答してルシフェラーゼを発現するように改変された細胞である。参考実施例2の方法に従って、表7に示す抗CD3抗体とGCH065-F760mnN17（重鎖配列番号：112、軽鎖配列番号：113）を調製した。さらに二重特異性抗体とするために、精製したそれぞれのホモ体を当業者公知の手法（国際公開第2015/046467号）を用いて目的の片方のFabドメインがGPC3、もう片方のFabドメインがCD3に結合する二重特異性抗体を得た。二重特異性抗体は、XX/YY//ZZと表記され、XXは抗CD3抗体の重鎖可変領域を、YYは抗CD3抗体の軽鎖可変領域を、ZZは抗GPC3抗体を表す。その後、実施例7と同様にプロテアーゼで処理した。プロテアーゼ処理は、抗体に対して終濃度25nMとなるようにuPA（Recombinant Human u-Plasminogen Activator, R&D systems）を加え、PBS中で37℃、12時間以上反応させた。また、プロテアーゼ未処理の抗体もプロテアーゼ処理と同様に37℃で同じ時間保温した。

[0148] プロテアーゼ処理抗体溶液またはプロテアーゼ未処理抗体溶液25 μ Lを、SK-HEP1細胞にGPC3を強制発現させたSK-pca-60細胞（1ウェルあたり 1.25×10^4 細胞）とNFAT-RE-luc2-Jurkat細胞(Promega)（1ウェルあたり 7.5×10^4 細胞）となるように混合した細胞溶液50 μ Lに加え、24時間後にBio-Glo Luciferase assay system(Promega, G7941)を用いてルシフェラーゼ活性を測定した。ルシフェラーゼ活性は、2104 EnVision(Perkin Elmer)を用いて測定し、得られた発光値から抗体を添加していないウェルの結果を1とした場合の増加率を計算し、その結果を図11から15に示した。また、プロテアーゼ処理による増加率（プロテアーゼ処理抗体の発光値増加率をプロテアーゼ未処理抗体の発光値増加率で割った値）を表8に示した。

[0149]

[表7]

調製した抗体(CD3側)	抗体名	抗CD3抗体(数値のみ記載したセルは配列番号を示す)							
		重鎖に 付加された マスキング 分子	重鎖に 付加された プロテアーゼ 切断リンカー	重鎖 可変領域	重鎖 全長	軽鎖に 付加された マスキング 分子	軽鎖に 付加された プロテアーゼ 切断リンカー	軽鎖 可変領域	軽鎖 全長
	hCE115HA/GLS/GCH065	なし	なし	hCE115HA	12	46	なし	GLS3000	13
	hCE115HAGS/GLS/GCH065	15	52	hCE115HA	58	116	なし	GLS3000	13
	hCE115IIAuPA04/GLS/GCH065	49	53	hCE115IIA	60	117	なし	GLS3000	13
	hCE115IIAuPA20/GLS/GCH065	50	54	hCE115IIA	61	118	なし	GLS3000	13
	hCE115IIAuPA27/GLS/GCH065	51	47	hCE115IIA	63	119	なし	GLS3000	13
	hCE115HA/GLSGS/GCH065	なし	なし	hCE115HA	12	46	15	GLS3000	65
	hCE115HA/GLSuPA04/GCH065	なし	なし	hCE115HA	12	46	49	GLS3000	67
	hCE115HA/GLSuPA20/GCH065	なし	なし	hCE115HA	12	46	50	GLS3000	72
	hCE115HA/GLSuPA27/GCH065	なし	なし	hCE115HA	12	46	51	GLS3000	69
	AN/GLS/GCH065	なし	なし	AN121H	43	40	なし	GLS3000	13
	ANGS/GLS/GCH065	15	52	AN121H	74	120	なし	GLS3000	13
	ANuPA04/GLS/GCH065	49	53	AN121H	76	121	なし	GLS3000	13
	ANuPA20/GLS/GCH065	50	54	AN121H	77	122	なし	GLS3000	13
	ANuPA27/GLS/GCH065	51	47	AN121H	79	123	なし	GLS3000	13
	rCE115/GLS/GCH065	なし	なし	CE115VH	10	44	なし	GLS3000	13
	rCE115/GLSGS/GCH065	なし	なし	CE115VII	10	44	15	GLS3000	65
	rCE115/GLSuPA04/GCH065	なし	なし	CE115VH	10	44	49	GLS3000	67
	rCE115/GLSuPA20/GCH065	なし	なし	CE115VH	10	44	50	GLS3000	72
	rCE115/GLSuPA27/GCH065	なし	なし	CE115VH	10	44	51	GLS3000	69
	rCE115/rCE115GS/GCH065	なし	なし	CE115VH	10	44	15	CE115VL	114
	rCE115/rCE115/GCH065	なし	なし	CE115VH	10	44	なし	CE115VL	11
	rCE115/rCE115uPA04/GCH065	なし	なし	CE115VH	10	44	49	CE115VL	115
	hCE115HAuPA20L/GLS/GCH065	50	59	hCE115HA	68	124	なし	GLS3000	13
	ANuPA20L/GLS/GCH065	50	59	AN121H	78	125	なし	GLS3000	13

[0150] [表8]

抗体名	アッセイ中抗体濃度(nM)		
	1	0.1	0
rCE115/GLS//GCH065	0.9	0.7	1.0
rCE115/GLSGS//GCH065	0.7	1.0	1.0
rCE115/GLSuPA04//GCH065	3.1	6.4	1.0
rCE115/GLSuPA20//GCH065	1.6	2.8	1.0
rCE115/GLSuPA27//GCH065	1.5	1.0	1.0

抗体名	アッセイ中抗体濃度(nM)		
	1	0.1	0
rCE115/rCE115GS//GCH065	0.6	0.9	1.0
rCE115/rCE115//GCH065	0.9	0.7	1.0
rCE115/rCE115uPA04//GCH065	3.8	2.7	1.0
hCE115HAuPA20L/GLS//GCH065	2.4	1.2	1.0
ANuPA20L/GLS//GCH065	1.7	1.0	1.0

抗体名	アッセイ中抗体濃度(nM)		
	1	0.1	0
hCE115HA/GLS//GCH065	0.7	0.6	1.0
hCE115HAGS/GLS//GCH065	1.0	1.0	1.0
hCE115HAuPA04/GLS//GCH065	6.3	1.3	1.0
hCE115HAuPA20/GLS//GCH065	2.4	1.1	1.0
hCE115HAuPA27/GLS//GCH065	1.4	0.9	1.0

抗体名	アッセイ中抗体濃度(nM)		
	1	0.1	0
AN/GLS//GCH065	0.7	0.6	1.0
ANGS/GLS//GCH065	1.0	1.0	1.0
ANuPA04/GLS//GCH065	3.0	1.9	1.0
ANuPA20/GLS//GCH065	2.2	1.5	1.0
ANuPA27/GLS//GCH065	0.9	0.9	1.0

抗体名	アッセイ中抗体濃度(nM)		
	1	0.1	0
hCE115HA/GLS//GCH065	0.9	0.9	1.0
hCE115HA/GLSGS//GCH065	0.9	1.0	1.0
hCE115HA/GLSuPA04//GCH065	8.2	1.1	1.0
hCE115HA/GLSuPA20//GCH065	3.0	1.6	1.0
hCE115HA/GLSuPA27//GCH065	2.3	1.0	1.0

[0151] 図 1 1 から 1 5 の(i)に示されるように、未修飾の抗体ではCD3活性化が認められたが、プロテアーゼで切断されないリンカー配列を用いてマスキング分子 (γ) を付加した抗体ではCD3活性化が認められなかった。一方で、図 1 1 から 1 5 の(ii)に示されるように、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) を用いてマスキング分子 (γ) を付加した抗体では、プロテアーゼで処理することによって、プロテアーゼ切断前より高いCD3活性化が認められた。具体的には、重鎖に癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) をつなげた場合には、hCE115HAuPA04に示されるように、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸からなり、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) がGGGSの繰り返しで構成されるGSリンカーとuPAによって切断される配列を含みかつGGGSペプチド配列で重鎖N末端に接続されている場合に切断前後でCD3活性化が最も変化した。次に変化量が大きかった配列は、マスキング分子 (γ) が20アミノ酸(hCE115HAuPA20, ANuPA20)である配列であった。マスキング分子 (γ) を27アミノ酸(hCE115HAuPA27, ANuPA27)にすると、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸であった場合(hCE115HAuPA04)と比べて、プロテアーゼ処理によるCD3活性化の上昇率は顕著に低下した。また、軽鎖に癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) をつなげる場合も同様に、GLSuPA04に示されるように、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸からなり、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) がGGGSの繰り返しで構成されるGSリンカーとuPAによって切断される配列を含みかつGGGSペプチド配列で重鎖N末端に接続されている場合に切断前後でCD3活性化が最も変化した。次に変化量が大きかった配列はマスキング分子 (γ) が20アミノ酸(GLSuPA20)である配列であった。マスキング分子 (γ) を27アミノ酸(GLSuPA27)にすると、マスキング分子 (γ) が7アミノ酸であった場合(GLSuPA04)と比べて、プロテアーゼ処理によるCD3活性化の上昇率は低下した。

[0152] 実施例 6 から 1 0 より、天然のアミノ酸配列を持つマスキング分子 (γ) と、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー (β) とを含む抗体は、プロテアーゼ依存的に抗原と結合することが示され、CD3と結合することでCD3を

活性化することが示された。本検討から、天然に由来する配列をマスキング分子（ γ ）として使用可能であることが明らかとなり、マスキング分子（ γ ）の長さを適切な長さとなるように本実施例で示した方法のように天然の配列に沿って変更することやリンカーの長さを変更することで、所望の効果を発揮する分子を作製できることが示された。なお、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）は、本実施例で用いた配列以外にもJBC, August 15, 1997 vol. 272 no. 33 20456-20462、Proteomics 2005, 5, 1292-1298、Biochem. J. (2010) 426, 219-228や国際公開第2015/116933号に示されたものが利用可能である。さらに表9に示すX1X2X3X4X5X6X7X8が並んだ8アミノ酸のペプチド配列も利用可能である。

[0153] [表9]

位置	今回用いたアミノ酸	各位置のアミノ酸
X1:	L	YWFMAQNEK
X2:	S	WFAPQED
X3:	G	YWFILMPTQNHG
X4:	R	YWFIMPQNEKD
X5:	S	WILMAGQNEDKRH
X6:	D	WFMPQKRC
X7:	N	YWFLVMAGPC
X8:	H	WFIAGPTQEDKC

産業上の利用可能性

[0154] 本発明の多重抗原結合分子融合体は、試験研究用試薬や医薬品等に用いることができる。

本発明によれば、マスキング分子（ γ ）は、癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を介して多重抗原結合分子（ α ）に結合していることにより、正常組織には免疫細胞をリクルートしにくくなることから、多重抗原結合分子（ α ）による副作用を低減する効果を有するため、本発明の多重抗原結合分子融合体は特に医薬品に有用である。

請求の範囲

- [請求項1] アミノ酸配列 Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有する抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域と、癌抗原を認識する癌抗原結合領域とを有する多重抗原結合分子（ α ）、
- 癌組織特異的プロテアーゼの標的配列からなるポリペプチドを有する癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）、および、
- アミノ酸配列 Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有するマスキング分子（ γ ）を含み、
- 前記多重抗原結合分子（ α ）と前記マスキング分子（ γ ）とが前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を介して結合している、多重抗原結合分子融合体。
- [請求項2] 前記免疫細胞抗原結合領域が、前記アミノ酸配列 Q D G N E（配列番号：15）からなるポリペプチドを有する抗原以外に少なくとも1種の免疫細胞抗原を認識する、請求項1に記載の多重抗原結合分子融合体。
- [請求項3] 前記免疫細胞抗原結合領域が、2以上の免疫細胞抗原を同時には認識し得ない、請求項2に記載の多重抗原結合分子融合体。
- [請求項4] 前記多重抗原結合分子（ α ）が、抗体または少なくとも2つのFv領域を有する抗体断片であり、前記癌抗原結合領域と前記免疫細胞抗原結合領域とが別々のFv領域により形成されている、請求項1乃至3のいずれか一項に記載の多重抗原結合分子融合体。
- [請求項5] 前記抗体または少なくとも2つのFv領域を有する抗体断片における軽鎖が、いずれも同じアミノ酸配列を有する、請求項4に記載の多重抗原結合分子融合体。
- [請求項6] 前記抗体または少なくとも2つのFv領域を有する抗体断片がさらにFc領域を有し、前記Fc領域がFc γ 受容体を認識する機能を欠損するように改変されている、請求項4または5に記載の多重抗原結合分子融合体。

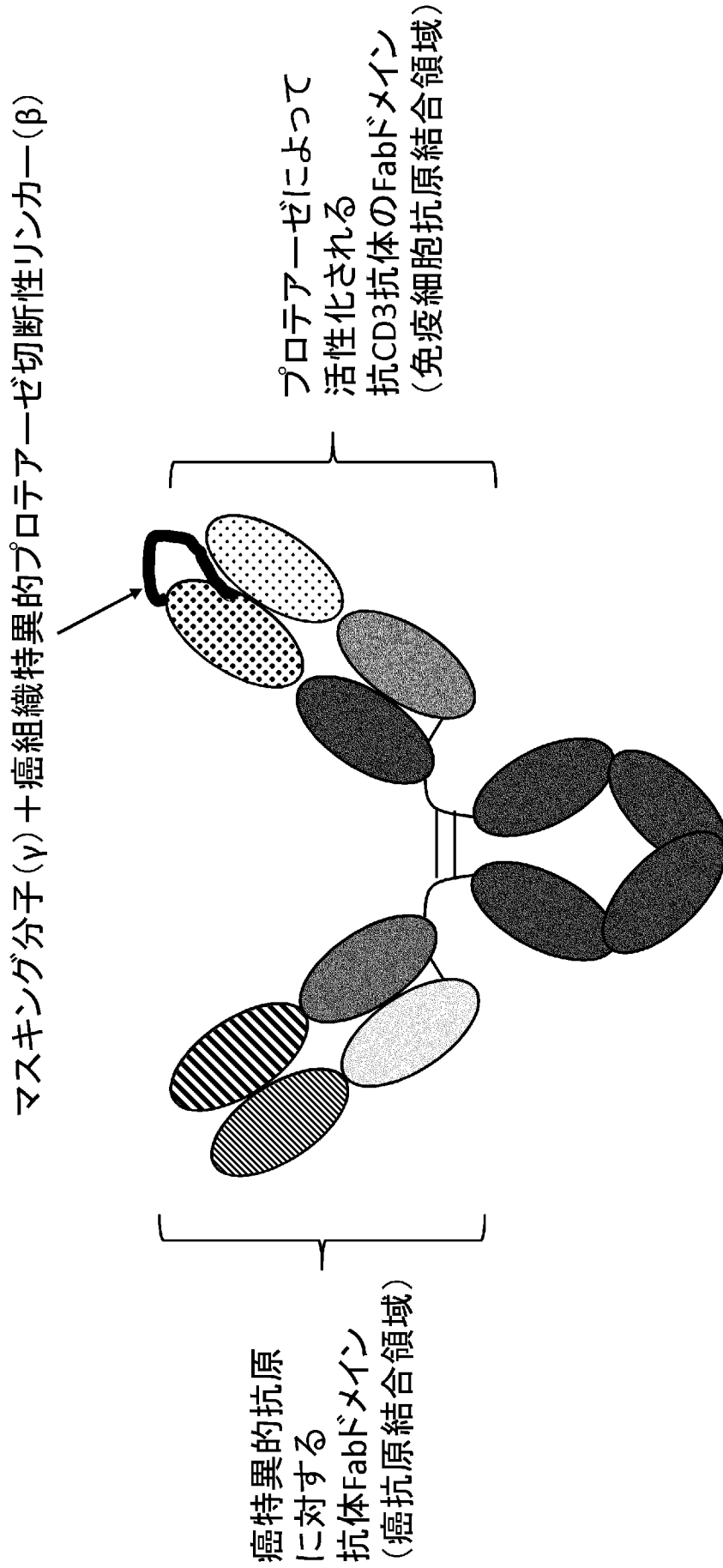
- [請求項7] 前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）が、前記免疫細胞抗原結合領域を形成する前記Fv領域の重鎖N末端または軽鎖N末端に融合している、請求項4乃至6のいずれか一項に記載の多重抗原結合分子融合体。
- [請求項8] 前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）と前記マスキング分子（ γ ）とが直鎖状の融合ポリペプチドであり、
前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）が前記免疫細胞抗原結合領域を形成する前記Fv領域の重鎖N末端に融合している場合には、前記融合ポリペプチドのアミノ酸数は11以上65以下であり、
前記癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）が前記免疫細胞抗原結合領域を形成する前記Fv領域の軽鎖N末端に融合している場合には、前記融合ポリペプチドのアミノ酸数は16以上65以下である、請求項7に記載の多重抗原結合分子融合体。
- [請求項9] 前記標的配列がアミノ酸配列P L G L A G（配列番号：9）である、請求項1乃至8のいずれか一項に記載の多重抗原結合分子融合体。
- [請求項10] 請求項1乃至9のいずれか一項に記載の多重抗原結合分子融合体および薬学的に許容される担体を含有する、医薬組成物。
- [請求項11] 癌治療用である、請求項10に記載の医薬組成物。
- [請求項12] 請求項10または11に記載の医薬組成物を患者に投与する工程を含む、癌の治療方法。
- [請求項13] 免疫細胞抗原と前記免疫細胞抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域とのタンパク質複合体を用いたタンパク質立体構造解析のデータに基づき、前記免疫細胞抗原に含まれ、かつ、前記免疫細胞抗原結合領域により認識される線状エピトープを同定する工程を有する、線状エピトープの同定方法。
- [請求項14] 癌抗原を認識する癌抗原結合領域および免疫細胞抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域を有する多重抗原結合分子（ α ）に、線状エピト

ープを、前記癌抗原を発現する癌組織で特異的に発現するプロテアーゼにより切断され得る領域を有する癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を介して融合した融合タンパク質を発現する工程を有する、多重抗原結合分子融合体の製造方法。

[図1]

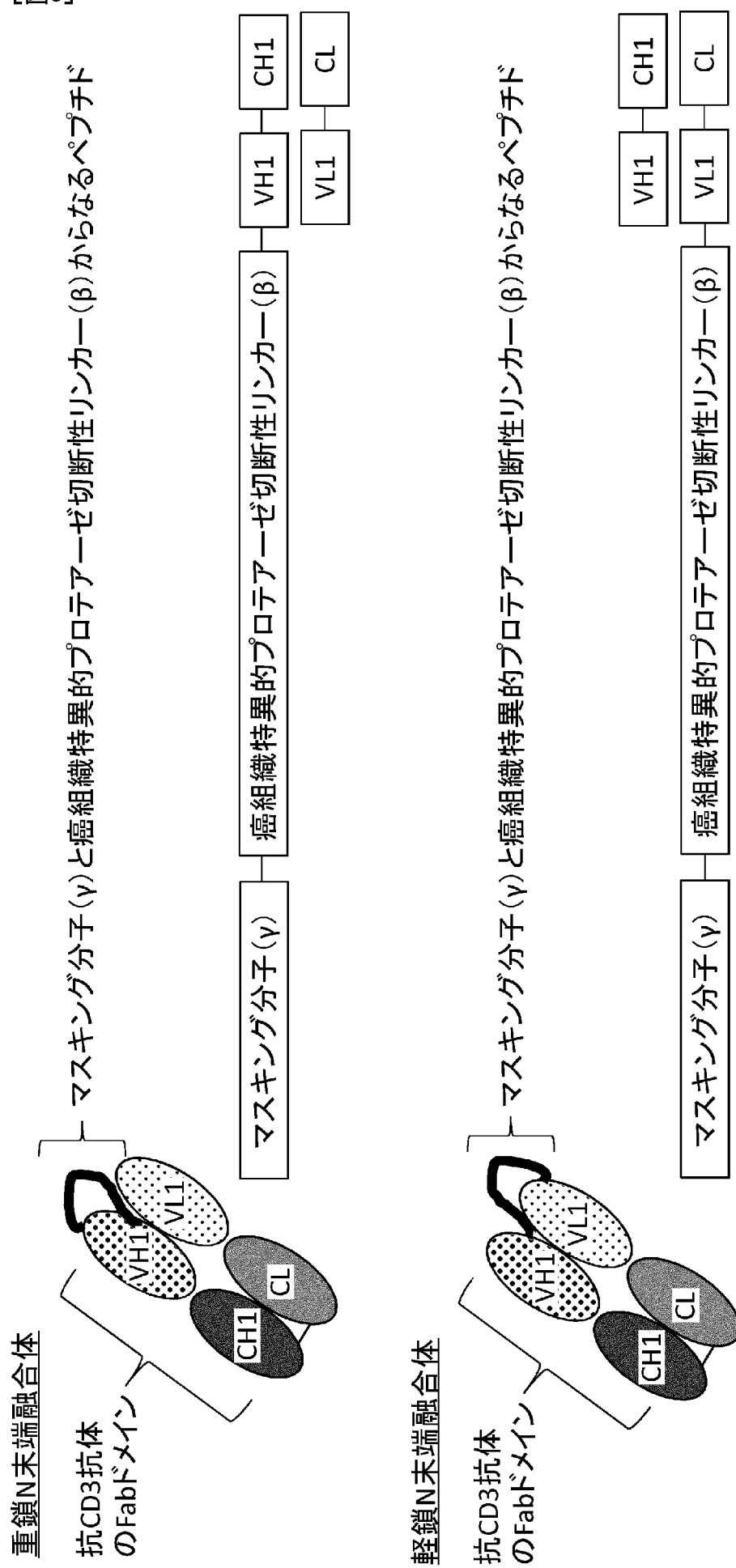
シグナル配列			
			↓
Homo sapiens_NM_000733	1	MQSGTHNRVGLGCLLSVGVWGQDGNEMGCGITQTPYKVSISGTTVILTCPPQPPGSEILNQ	60
Macaca fascicularis_AB073993	1	MQSGTRNRVGLGCLLSIGVWGQDGNEMGCGITQIPYQVVSISGTTVILICSQHLGSEAQM	60
Homo sapiens_NM_000733	61	HNCKNIGGEDDKNIGSDEHLSLKEFSELEQSGYVVCYPRGSKPEDANFYLYLRVCE	120
Macaca fascicularis_AB073993	61	HNGKN-----KEDSGDRLELPEFSEMEQSGYVVCYPRGSNPEDASHHLYLKRVCE	111
Homo sapiens_NM_000733	121	NCMEMDVMSVATIVIVDICTGGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERP	180
Macaca fascicularis_AB073993	112	NCMEMDVMAVATIVIVDICTLGLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQGRQNKERP	171
Homo sapiens_NM_000733	181	PPVPNPDYEPPIRKGQRDLYSGLNQRR	207
Macaca fascicularis_AB073993	172	PPVPNPDYEPPIRKGQQDLYSGLNQRR	198

[図2]

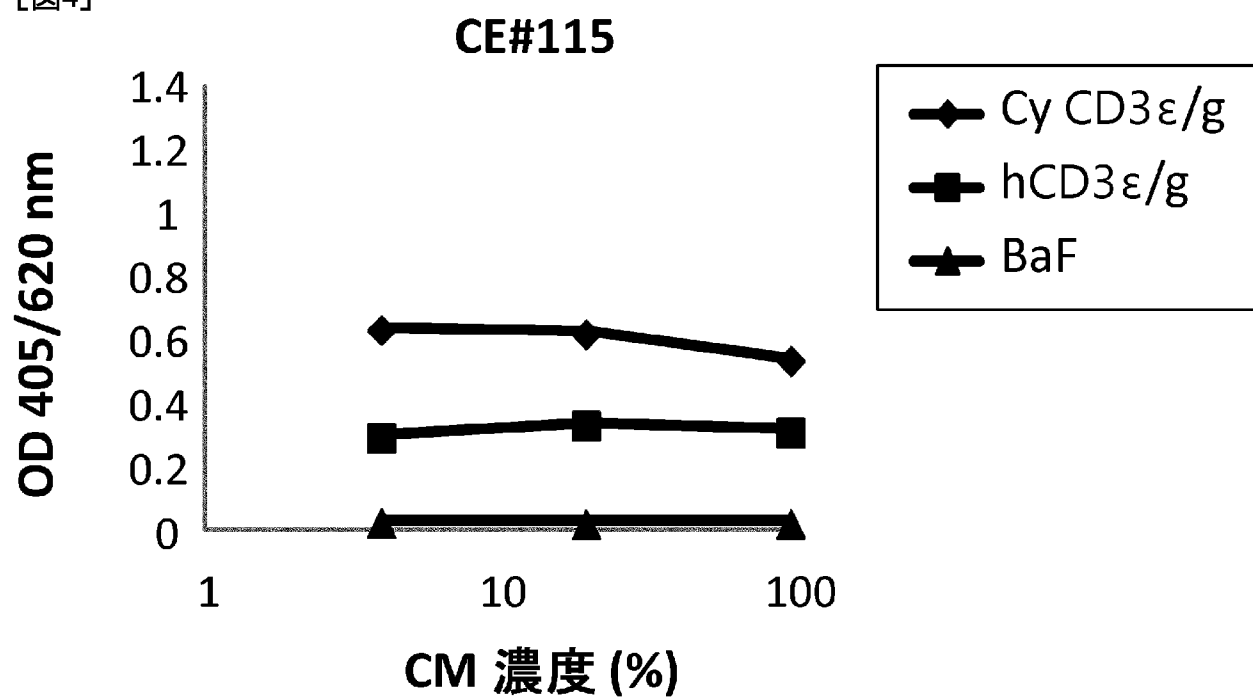


多重抗原結合分子 = 癌抗原結合領域 + 免疫細胞抗原結合領域

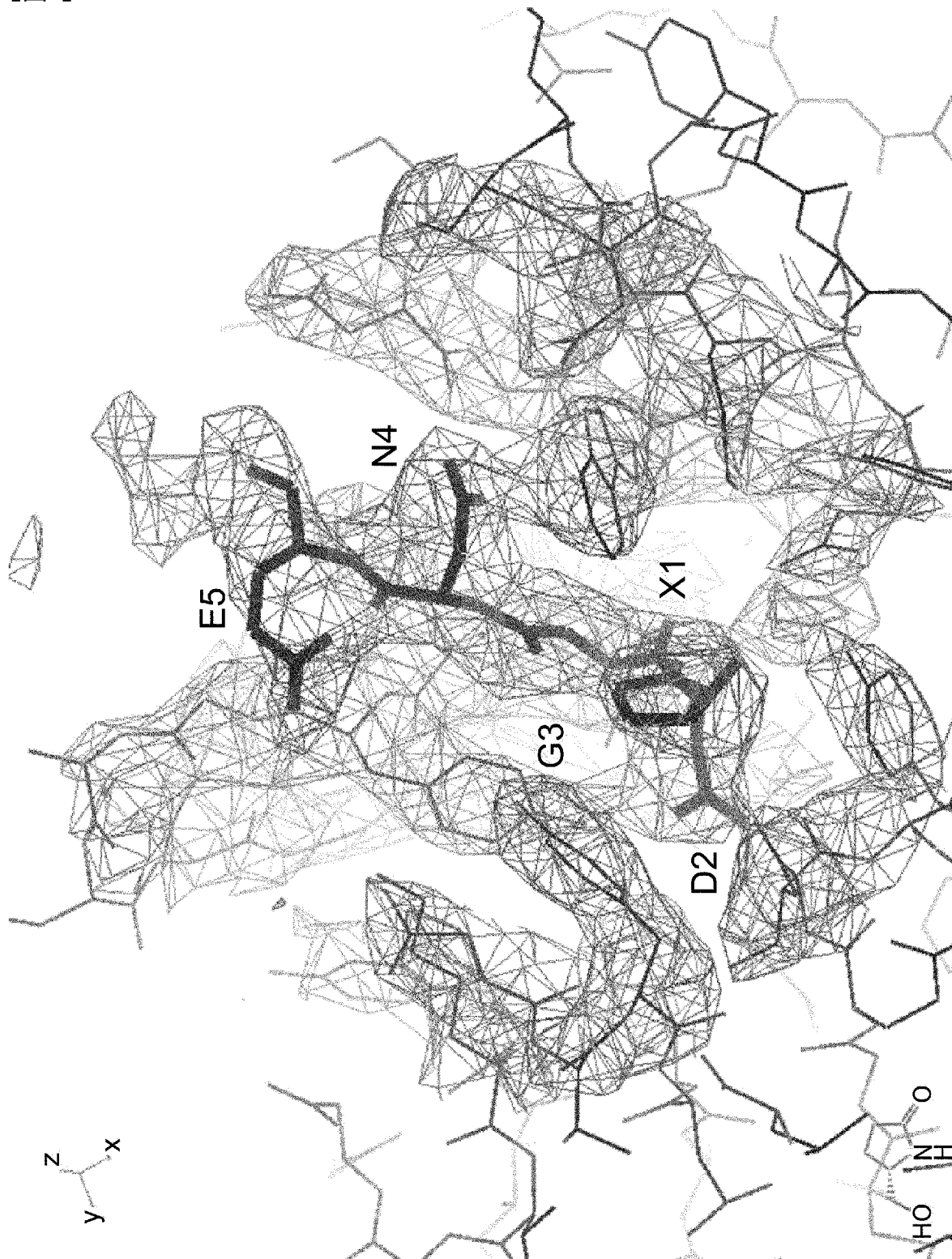
[図3]



[図4]

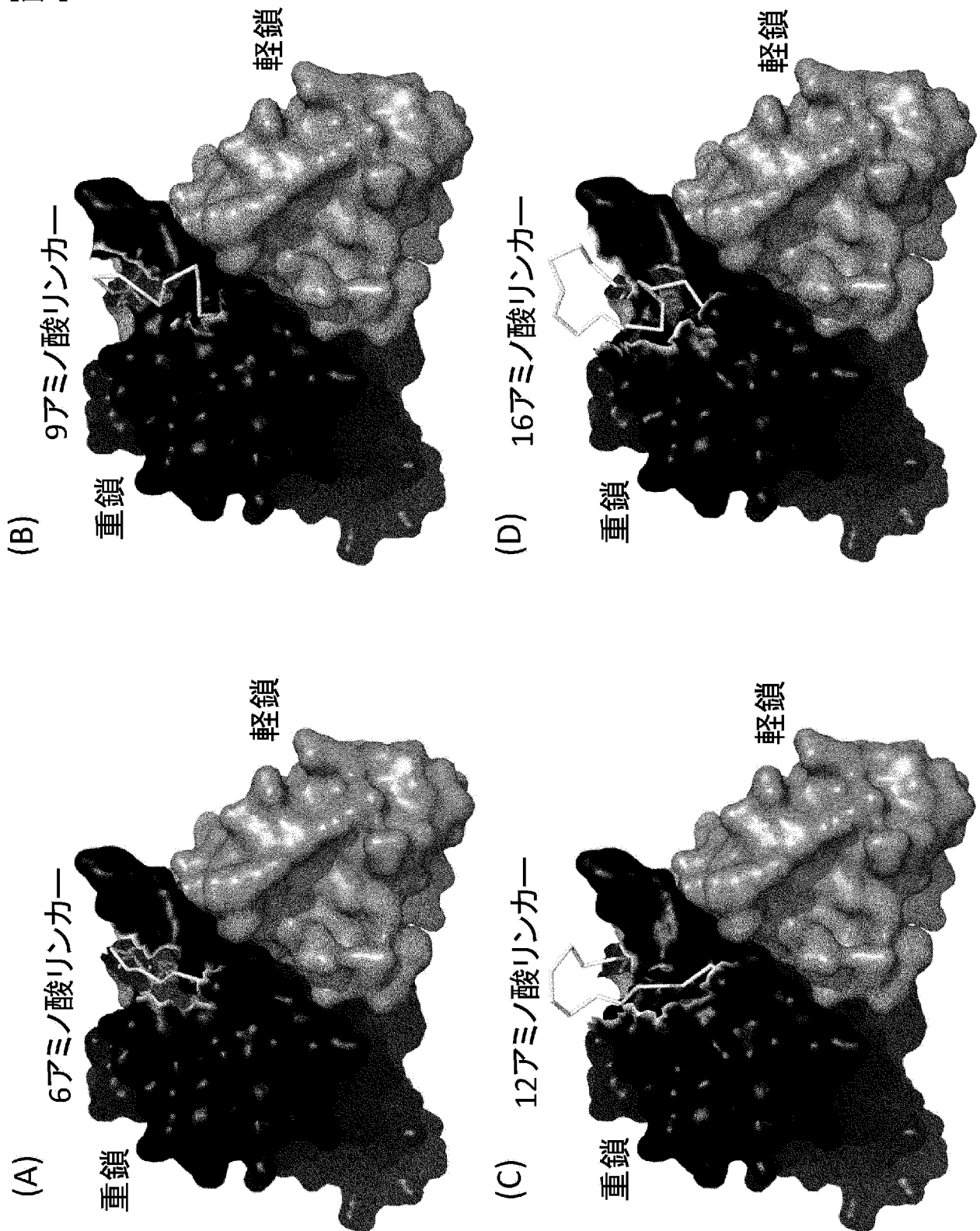


[図5]

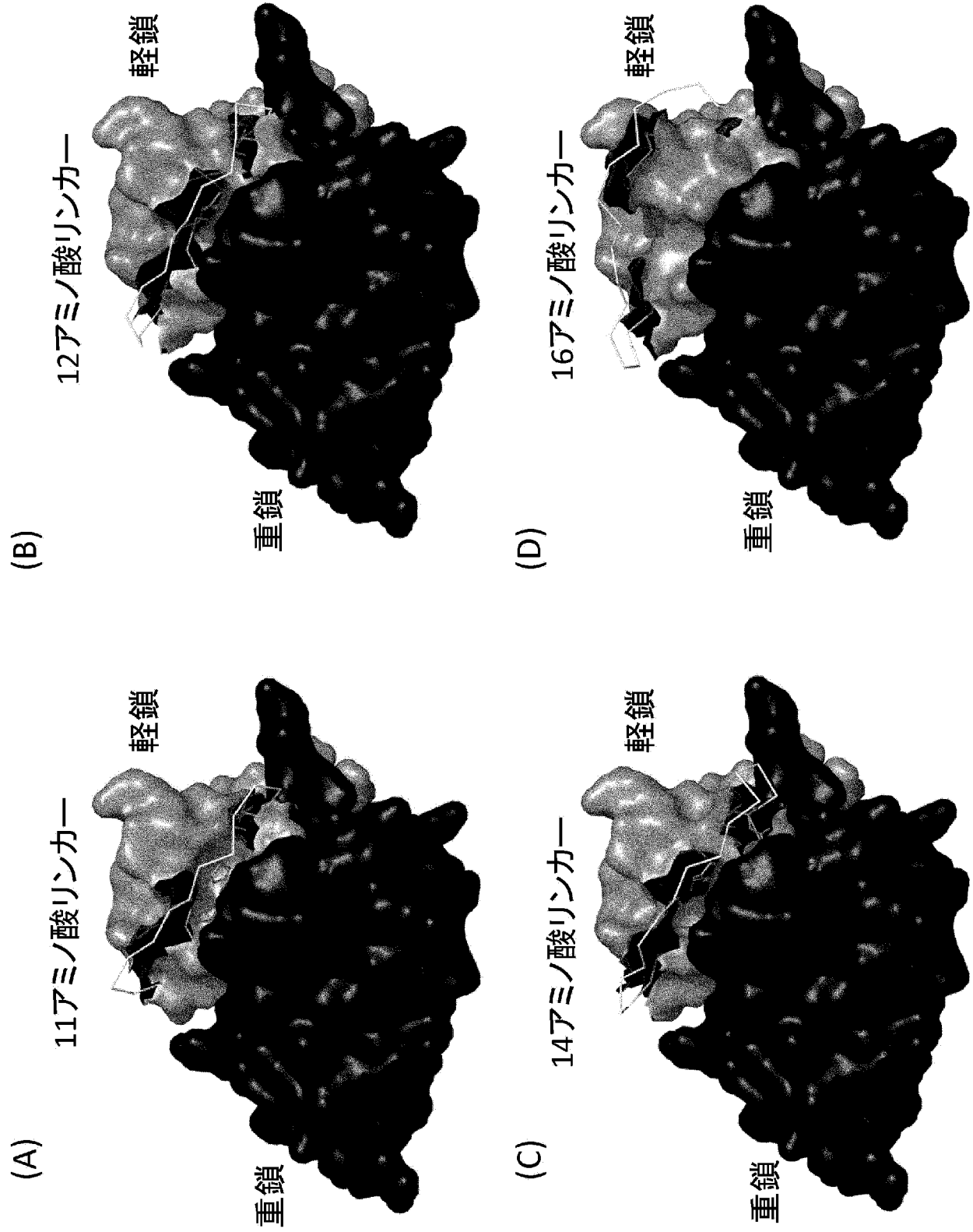


X1=ピログルタミン酸1

[図6]



[図7]



[図8-1]

(i)

抗体名	重鎖N末端の改変 の特性(配列番号)		プロテアーゼ 処理	調製時抗体濃度(μ g/mL)				
	マスキング 分子	プロテアーゼ 切断リンカー		4	1	0.25	0.0625	0.015625
hCE115HA/GLS One arm	なし	なし	なし	160.2	40.4	11.4	4.2	1.9
			あり	169.8	37.2	11.1	4.0	1.8
hCE115HAGS/GLS One arm	15	52(非切断性)	なし	1.5	1.0	1.0	0.9	0.9
			あり	1.4	1.1	1.0	0.9	1.0
hCE115HAuPA04/GLS One arm	49	53	なし	1.2	1.0	0.9	0.9	0.9
			あり	136.2	31.7	8.6	3.3	1.6
hCE115HAuPA20/GLS One arm	50	54	なし	1.2	1.0	0.9	0.9	0.9
			あり	3.8	1.3	1.1	0.9	0.9
hCE115HAuPA20L/GLS One arm	50	59	なし	1.1	1.0	0.9	1.0	0.9
			あり	21.4	3.3	1.5	1.0	1.0
hCE115HAuPA27/GLS One arm	51	47	なし	1.1	1.0	1.0	0.9	1.0
			あり	1.6	1.9	0.4	0.3	0.6
hCE115HAMMP/GLS One arm	15	55	なし	1.1	1.1	0.9	1.0	1.0
			あり	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

(ii)

抗体名	軽鎖N末端の改変 の特性(配列番号)		プロテアーゼ 処理	調製時抗体濃度(μ g/mL)				
	マスキング 分子	プロテアーゼ 切断リンカー		4	1	0.25	0.0625	0.015625
hCE115HA/GLS One arm	なし	なし	なし	612	257	105	43	17
			あり	726	257	136	53	18
hCE115HA/GLSGS One arm	15	56(非切断性)	なし	18	6	3	2	2
			あり	8	3	2	2	2
hCE115HA/GLSuPA02 One arm	15	54	なし	76	24	8	4	2
			あり	109	34	12	6	3
hCE115HA/GLSuPA04 One arm	49	53	なし	3	2	2	2	2
			あり	748	631	260	189	35
hCE115HA/GLSuPA20 One arm	50	54	なし	2	1	1	1	1
			あり	4	2	1	1	1
hCE115HA/GLSuPA20L One arm	50	59	なし	1	1	1	1	1
			あり	1	1	1	1	1
hCE115HA/GLSuPA27 One arm	51	47	なし	1	1	1	1	1
			あり	2	1	1	1	1
hCE115HA/GLSMMP One arm	15	55	なし	1	1	1	1	1
			あり	2	1	1	1	1

[図8-2]

(iii)

抗体名	軽鎖N末端の改変 の特性 (配列番号)		プロテアーゼ 処理	調製時抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)				
	マスキング 分子	プロテアーゼ 切断リンカー		4	1	0.25	0.0625	0.015625
hCE115HA/GLS Two arm	なし	なし	なし	1169	618	189	45	11
			あり	887	759	209	52	15
hCE115HA/GLSGS Two arm	15	56 (非切断性)	なし	54	14	4	2	1
			あり	18	4	2	1	1
hCE115HA/GLSuPA20 Two arm	50	54	なし	1	1	1	1	1
			あり	967	468	134	35	11
hCE115HA/GLSMMP02 Two arm	15	55	なし	35	8	3	2	1
			あり	28	8	1	1	1

(iv)

抗体名	重鎖N末端の改変 の特性 (配列番号)		プロテアーゼ 処理	調製時抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)				
	マスキング 分子	プロテアーゼ 切断リンカー		1	0.25	0.0625	0.015625	0
AN/GLS One arm	なし	なし	なし	274	58	13	4	1
			あり	224	53	10	3	1
ANGS/GLS One arm	15	52 (非切断性)	なし	7	2	1	1	1
			あり	8	3	1	1	1
ANuPA02/GLS One arm	15	57	なし	4	2	1	1	1
			あり	219	58	14	4	1
ANuPA04/GLS One arm	49	53	なし	2	1	1	1	1
			あり	127	31	8	3	1
ANuPA20/GLS One arm	50	54	なし	1	1	1	1	1
			あり	53	10	3	1	1
ANuPA20L/GLS One arm	50	59	なし	1	1	1	1	1
			あり	41	8	2	1	1
ANuPA27/GLS One arm	51	47	なし	1	1	1	1	1
			あり	7	2	1	1	1
ANMMP/GLS One arm	15	55	なし	1	1	1	1	1
			あり	1	1	1	1	1

[図9]

(i)

抗体名	重鎖N末端の改変 の特性(配列番号)		プロテアーゼ 処理	調製時抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)				
	マスキング 分子	プロテアーゼ 切断リンカー		4	1	0.25	0.0625	0.015625
hCE115HA/GLS One arm	なし	なし	なし あり	77 65	20 19	7 6	3 3	2 2
hCE115HAGS/GLS One arm	15	52(非切断性)	なし あり	1 1	1 1	1 1	2 1	2 2
hCE115HAuPA04/GLS One arm	49	53	なし あり	1 139	1 32	1 12	1 5	1 3
hCE115HAuPA20/GLS One arm	50	54	なし あり	1 12	1 4	1 2	1 1	1 1
hCE115HAuPA20L/GLS One arm	50	59	なし あり	2 7	1 2	1 1	1 1	1 1
hCE115HAuPA27/GLS One arm	51	47	なし あり	2 17	1 4	1 2	1 1	1 1

(ii)

抗体名	軽鎖N末端の改変 の特性(配列番号)		プロテアーゼ 処理	調製時抗体濃度 ($\mu\text{g/mL}$)				
	マスキング 分子	プロテアーゼ 切断リンカー		4	1	0.25	0.0625	0.015625
hCE115HA/GLS One arm	なし	なし	なし あり	140 114	35 32	11 7	4 3	2 2
hCE115HA/GLSGS One arm	15	56(非切断性)	なし あり	1 1	1 1	1 1	1 1	1 1
hCE115HA/GLSuPA02 One arm	15	54	なし あり	3 11	1 3	1 1	1 1	1 1
hCE115HA/GLSuPA04 One arm	49	53	なし あり	1 257	1 61	1 18	1 6	1 2
hCE115HA/GLSuPA20L One arm	50	59	なし あり	1 2	1 1	1 1	1 1	1 1
hCE115HA/GLSuPA27 One arm	51	47	なし あり	1 8	1 2	1 1	1 1	1 1

[図10]

(i)

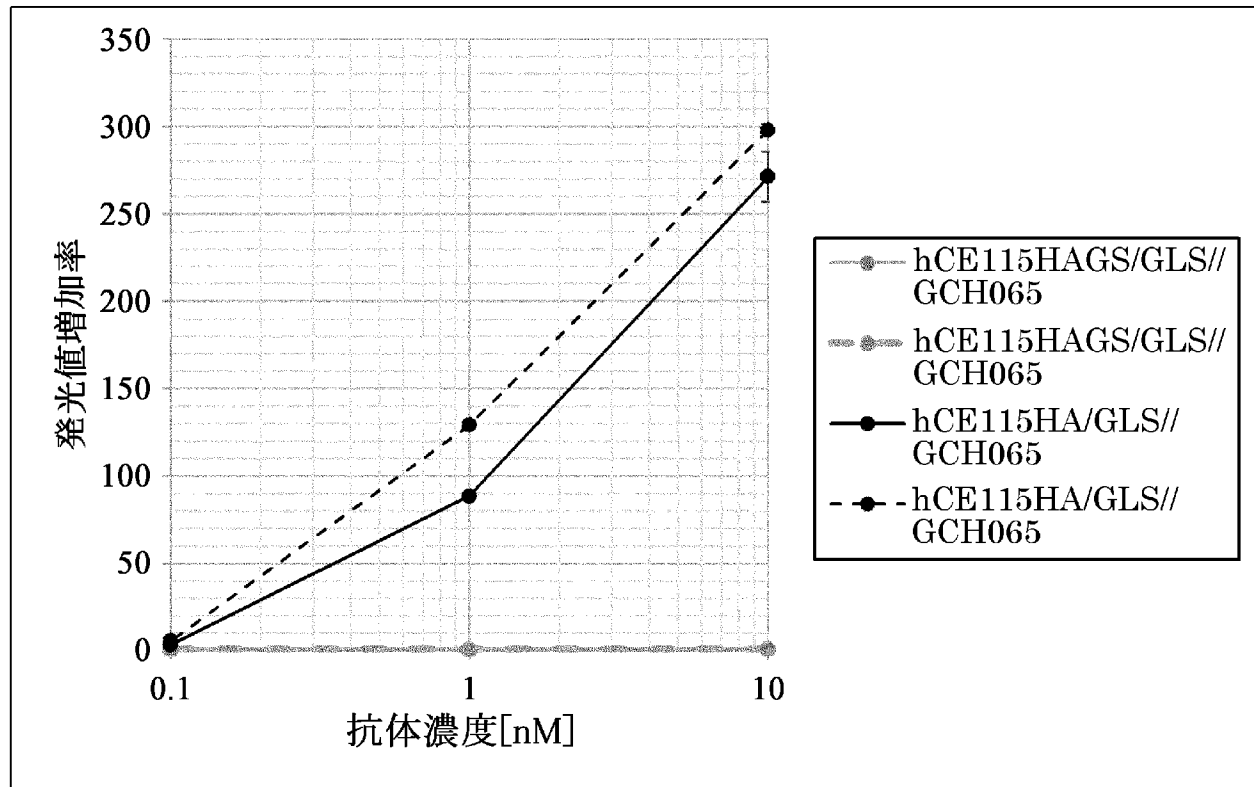
抗体名	重鎖N末端の改変 の特性(配列番号)		プロテアーゼ 処理	調製時抗体濃度 (μg/mL)			
	マスキング 分子	プロテアーゼ 切断リンカー		1	0.25	0.0625	0.015625
hCE115HA/GLS One arm	なし	なし	なし あり	255 243	54 32	12 12	3 4
hCE115HAGS/GLS One arm	15	52(非切断性)	なし あり	3 2	1 1	1 1	1 1
hCE115HAMMP02/GLS One arm	15	55	なし あり	3 45	2 6	1 1	1 1

(ii)

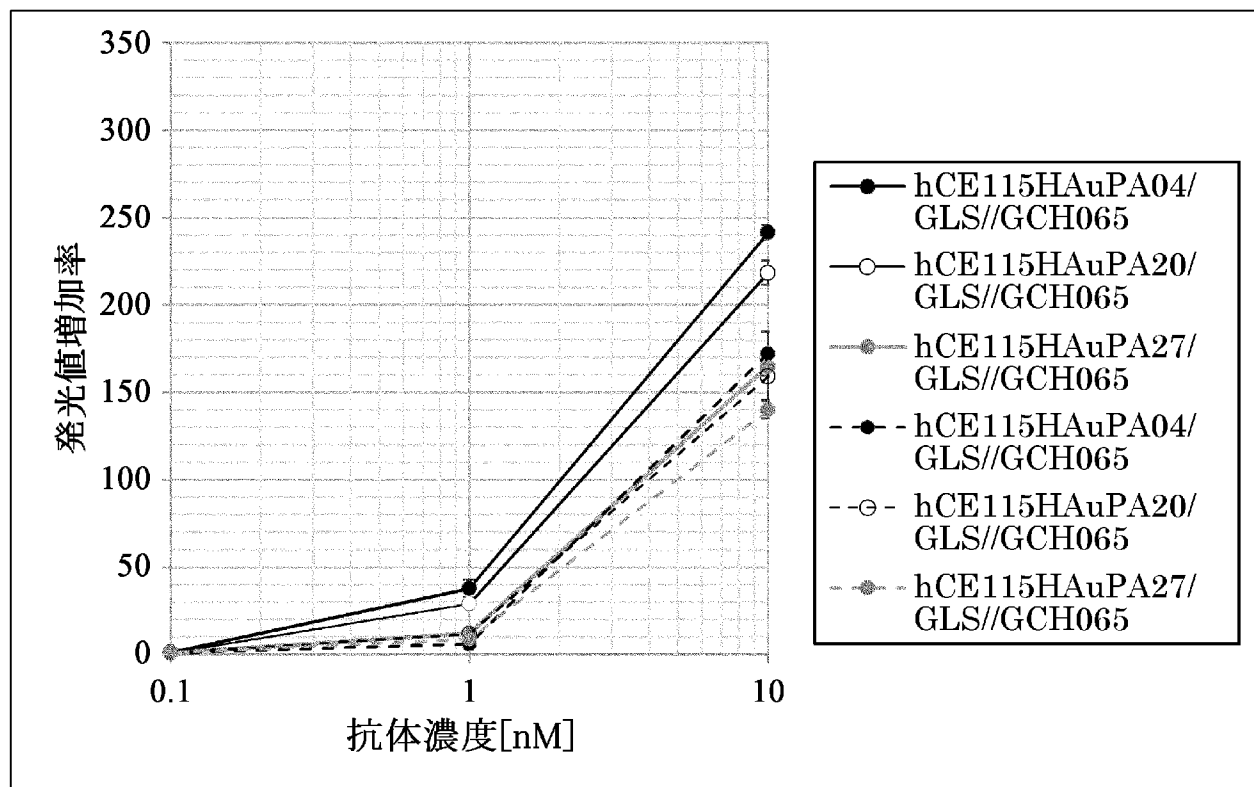
抗体名	軽鎖N末端の改変 の特性(配列番号)		プロテアーゼ 処理	調製時抗体濃度 (μg/mL)			
	マスキング 分子	プロテアーゼ 切断リンカー		1	0.25	0.0625	0.015625
hCE115HA/GLS One arm	なし	なし	なし あり	126 56	23 10	7 2	2 2
hCE115HA/GLSGS One arm	15	56(非切断性)	なし あり	1 1	1 1	1 1	1 1
hCE115HA/GLSuPA02 One arm	15	54	なし あり	1 1	1 1	1 1	1 1
hCE115HA/GLSMMP02 One arm	15	55	なし あり	1 4	1 1	1 1	1 1

[図11]

(i)

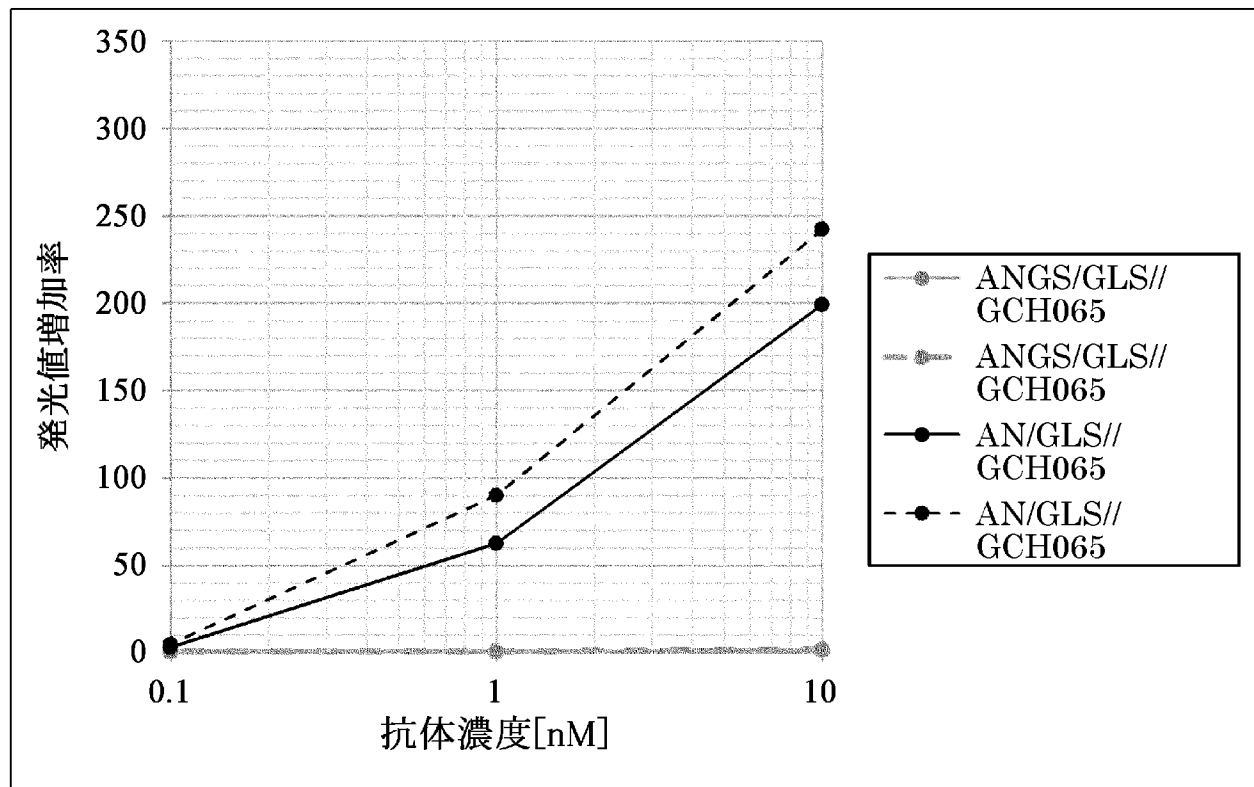


(ii)

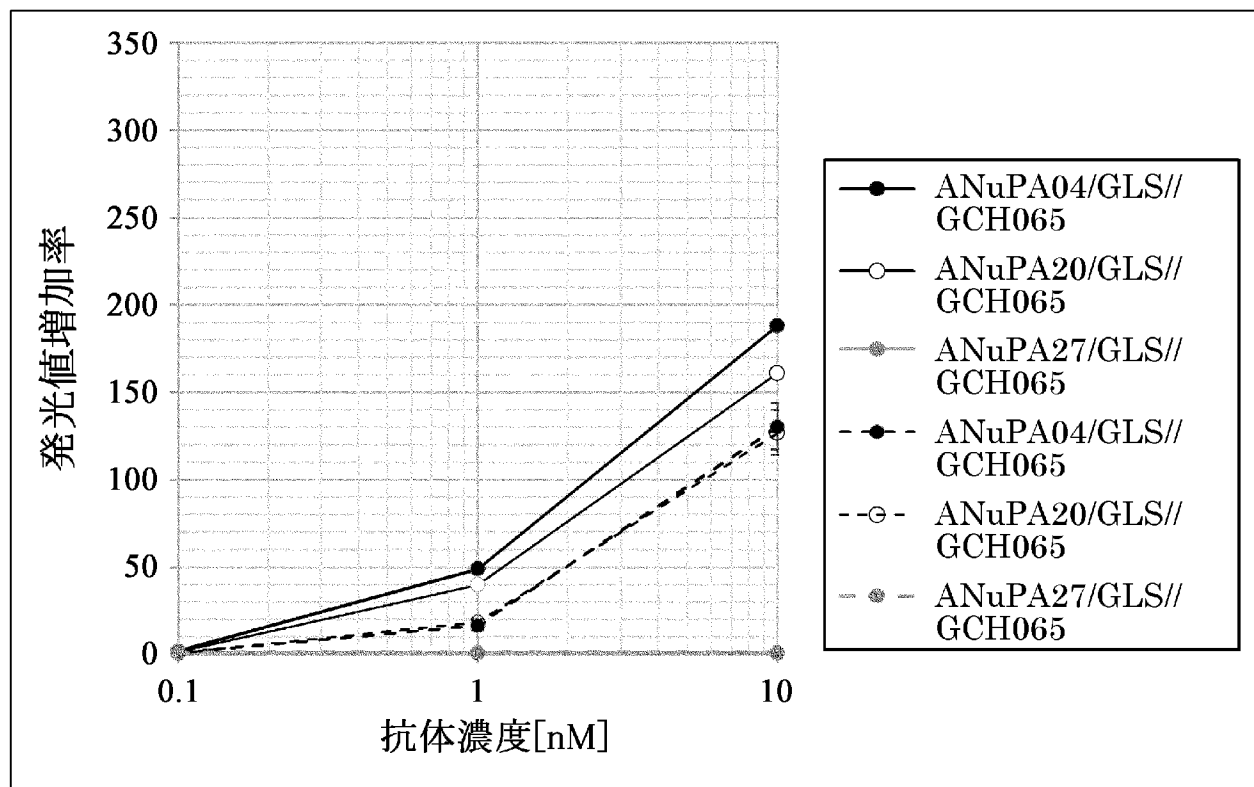


[図12]

(i)

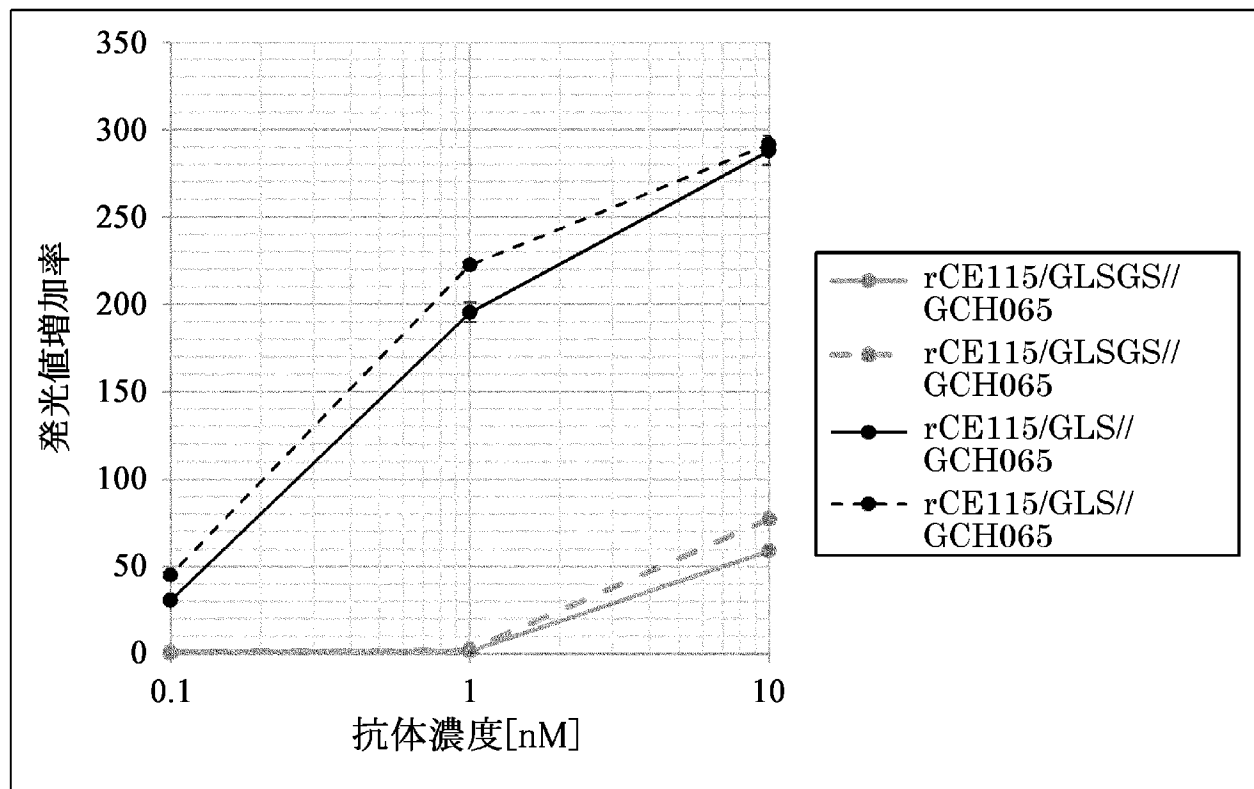


(ii)

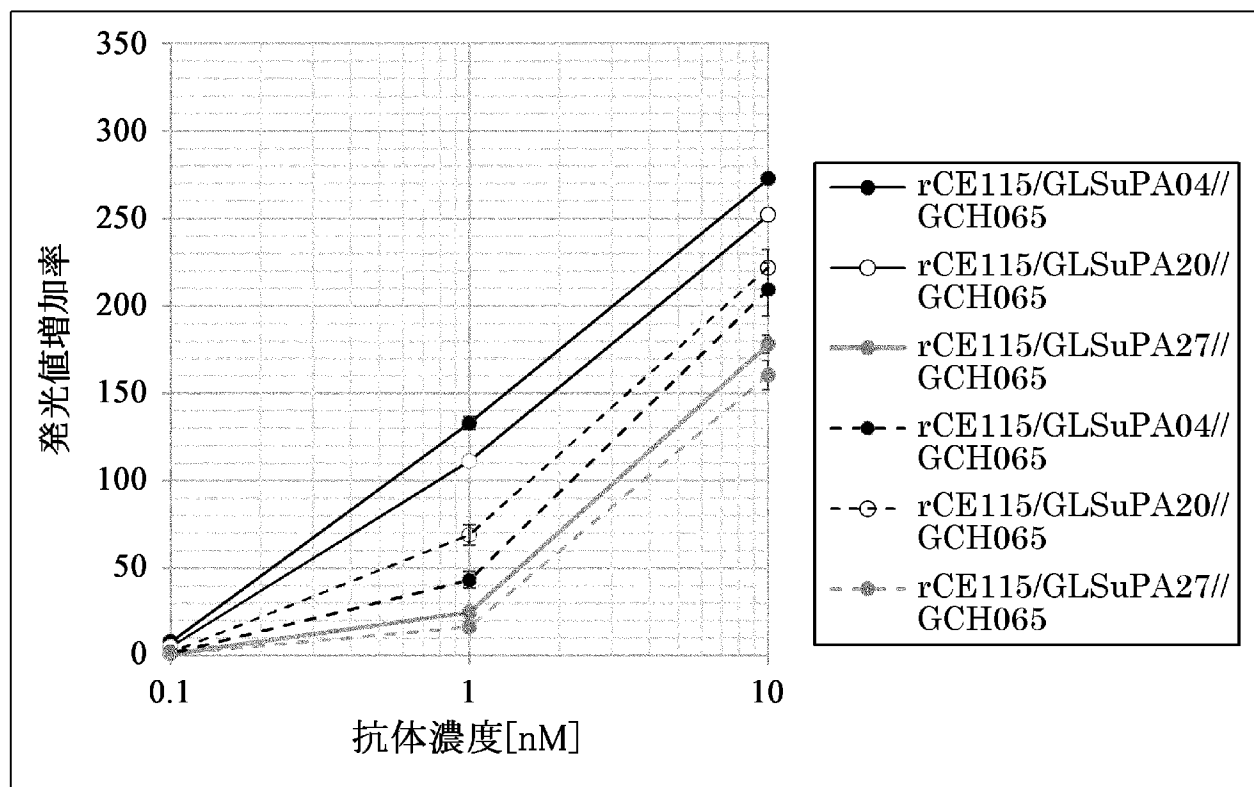


[図13]

(i)

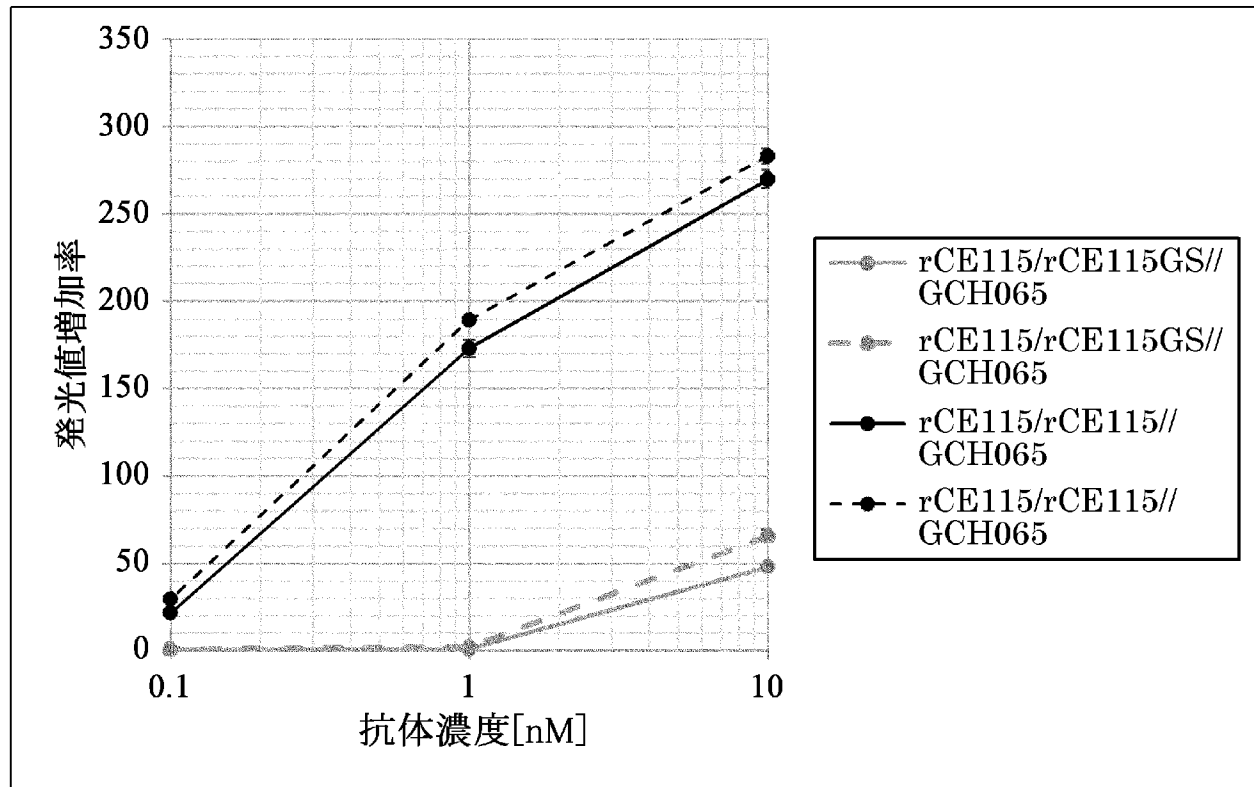


(ii)

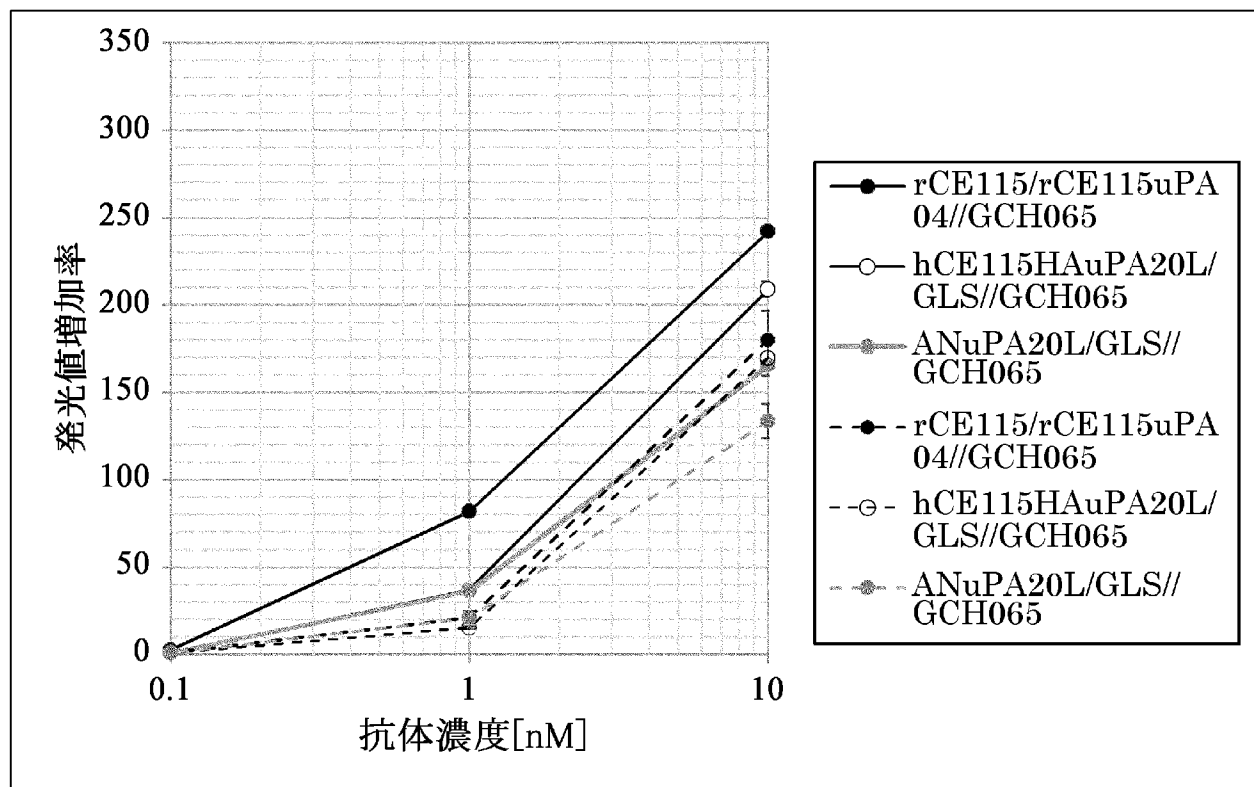


[図14]

(i)

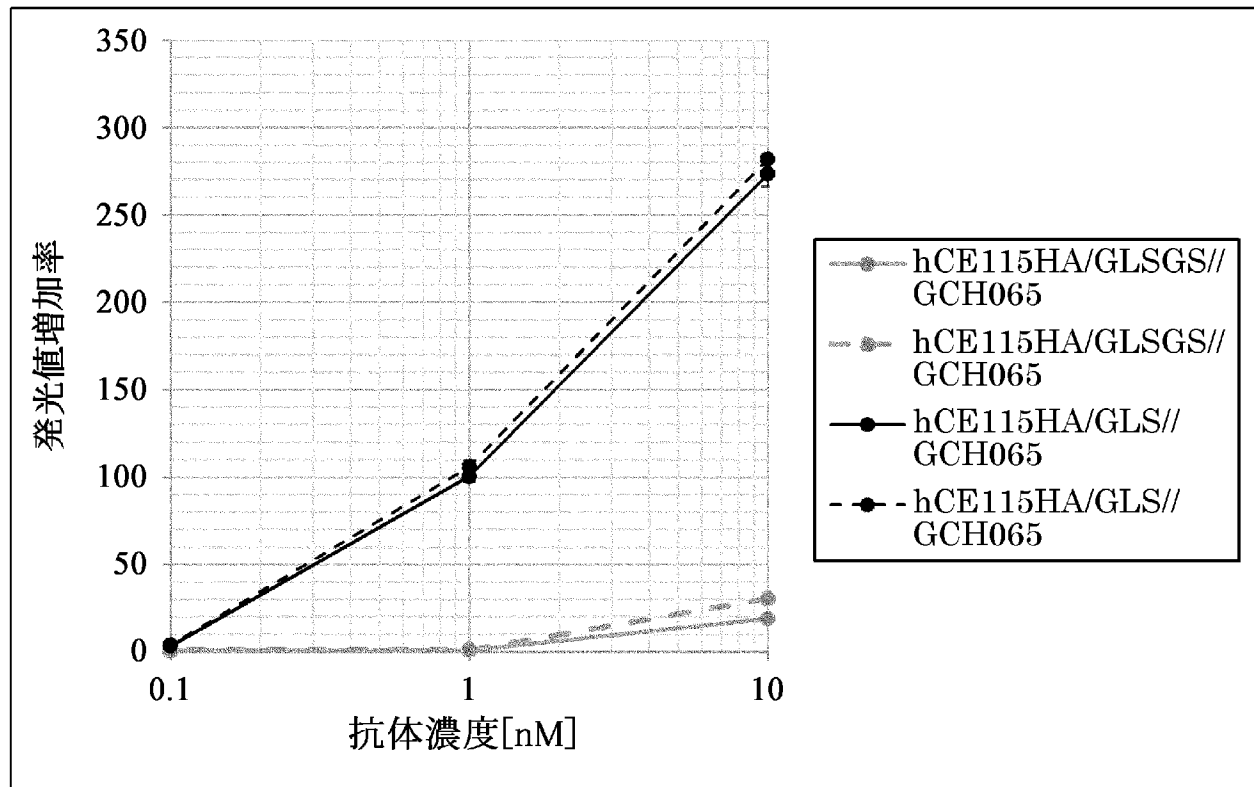


(ii)

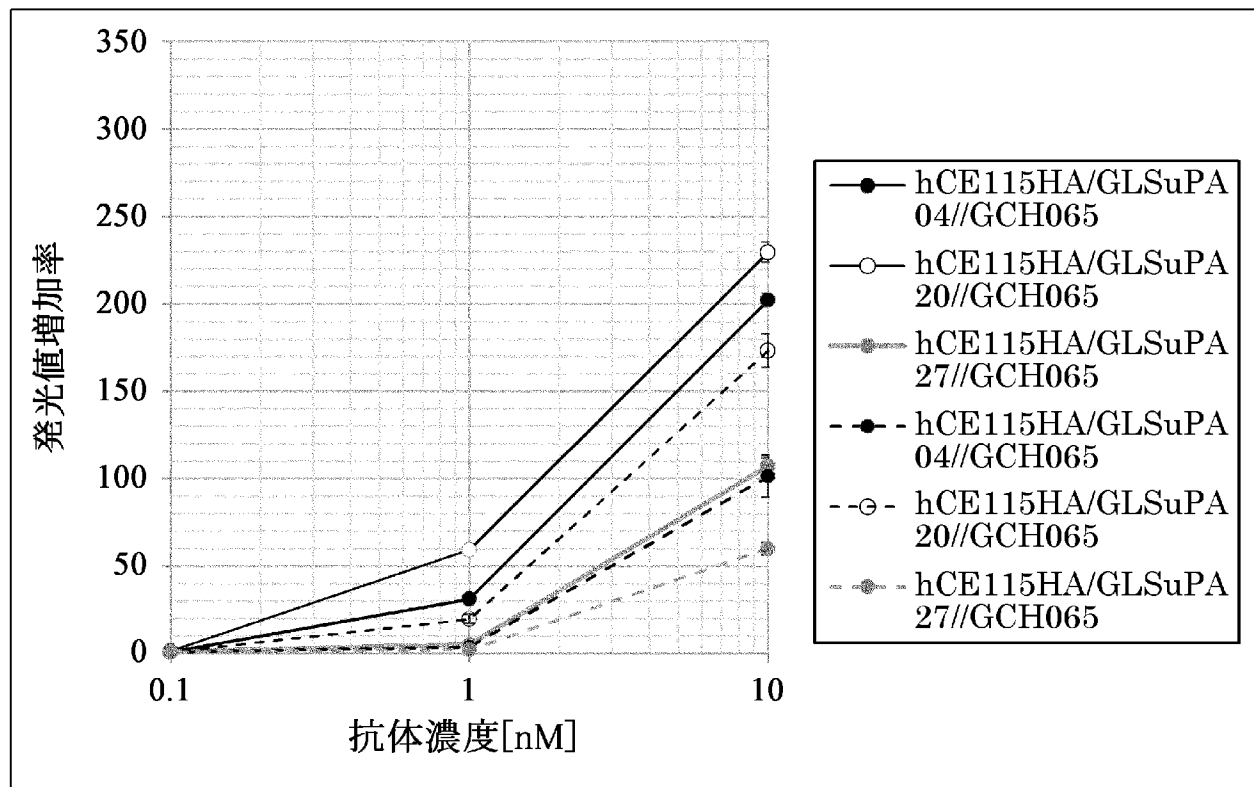


[図15]

(i)



(ii)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/064301

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i,
 A61K47/48(2006.01)i, A61P35/00(2006.01)i, C07K7/00(2006.01)i,
 C07K14/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i, C07K16/32(2006.01)i,
 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12N15/09, A61K39/395, A61K47/42, A61K47/48, A61P35/00, C07K7/00,
 C07K14/00, C07K16/28, C07K16/32, C07K19/00, C12P21/08

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

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

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

JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN),
 UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-509952 A (The University of Birmingham), 02 April 2015 (02.04.2015), claims; example 1; fig. 3; table 4; paragraphs [0024], [0044], [0126], [0181] & US 2015/0183875 A1 & EP 2819701 A1 & WO 2013/128194 A1 claims; example 1; fig. 3; table 4; pages 4, 5, 17, 42, 75	1-12, 14
Y	WO 2014/144722 A2 (AMGEN INC.), 18 September 2014 (18.09.2014), page 39 & JP 2016-516056 A & US 2014/0302037 A1 & EP 2970477 A1	1-12, 14



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
 03 August 2016 (03.08.16)

Date of mailing of the international search report
 16 August 2016 (16.08.16)

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

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/064301

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2015-509951 A (Amgen Research (Munich) GmbH), 02 April 2015 (02.04.2015), claims & US 2015/0037334 A1 & EP 2820047 A1 & WO 2013/128027 A1 claims	1-12, 14
Y	JP 2013-528569 A (Amgen Research (Munich) GmbH), 11 July 2013 (11.07.2013), paragraph [0078] & US 2013/0129730 A1 & EP 2552964 A1 & WO 2011/121110 A1 page 37	1-12, 14
Y	WO 2012/073985 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 07 June 2012 (07.06.2012), examples & US 2014/0112914 A1 & EP 2647707 A1 examples	6-12
Y	JP 2014-519322 A (Fabion Pharmaceuticals, Inc.), 14 August 2014 (14.08.2014), paragraph [0160] & US 2012/0321626 A1 & EP 2710042 A1 & WO 2012/158818 A2 page 47	9-12
Y	KJER-NIELSEN L et al., Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, Vol.101, No.20, pp.7675-7680, Fig. 4	13
Y	FERNANDES RA et al., T cell receptors are structures capable of initiating signaling in the absence of large conformational rearrangements., J. Biol. Chem., 2012, Vol.287, No.16, pp.13324-13335, FIGURE3	13
Y	PONOMARENKO J et al., ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes., BMC Bioinformatics, 2008, Vol.9, 514, Abstract	13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/064301

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GUTHRIDGE JM et al., Epitope mapping using the X-ray crystallographic structure of complement receptor type 2 (CR2)/CD21: identification of a highly inhibitory monoclonal antibody that directly recognizes the CR2-C3d interface., J. Immunol., 2001, Vol.167, No.10, pp.5758-5766, Abstract	13
A	WO 2015/046554 A1 (Chugai Pharmaceutical Co., Ltd.), 02 April 2015 (02.04.2015), examples (Family: none)	1-14
P,A	WO 2016/046778 A2 (AMGEN INC.), 31 March 2016 (31.03.2016), examples (Family: none)	1-14
P,A	WO 2016/014974 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.), 28 January 2016 (28.01.2016), examples (Family: none)	1-14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/064301

Continuation of A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
(International Patent Classification (IPC))

C07K19/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

(According to International Patent Classification (IPC) or to both national
classification and IPC)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/064301

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/064301

Continuation of Box No.III of continuation of first sheet(2)

Claims are classified into the following two inventions.

(Invention 1) claims 1-12 and 14

Claims 1-12 and 14, which have a special technical feature of "a fused protein wherein a multiple antigen-binding molecule (α), which has a cancer antigen binding region capable of recognizing a cancer antigen and an immune cell antigen binding region capable of recognizing an immune cell antigen, is fused with a linear epitope via a cancer tissue-specific protease-cleavable linker (β) which has a region cleavable with a protease expressed specifically in a cancer tissue expressing the aforesaid cancer antigen", are regarded as Invention 1.

(Invention 2) claim 13

Claim 13 have a technical feature common to claim 1 that is regarded as Invention 1, said technical feature being a linear epitope in an immune cell antigen.

However, the above-said technical feature cannot be considered to be a special technical feature, since the technical feature does not make a contribution over the prior art in the light of the contents disclosed in the following documents 1-3.

Further, there is no other same or corresponding special technical feature between these inventions.

Further, claim 13 is not dependent on claim 1.

In addition, claim 13 has no relationship such that said claim 13 is substantially same as or equivalent to any claim classified into Invention 1.

Consequently, claim 13 cannot be classified into Invention 1.

Claim 13, which has a special technical feature of "a method for identifying a linear epitope, said method comprising a step for identifying, on the basis of the data of a protein three-dimensional structure analysis with the use of a fused protein consisting of an immune cell antigen and an immune cell antigen binding region capable of recognizing the immune cell antigen, a linear epitope that is contained in the aforesaid immune cell antigen and recognized by the aforesaid immune cell antigen binding region", is regarded as Invention 2.

Document 1: WO 2014/144722 A2 (AMGEN INC.), 18 September 2014 (18.09.2014), page 39 & JP 2016-516056 A & US 2014/0302037 A1 & EP 2970477 A1

Document 2: JP 2015-509951 A (Amgen Research (Munche n) GmbH), 02 April 2015 (02.04.2015), claims & US 2015/0037334 A1 & EP 2820047 A1 & WO 2013/128027 A1 claims

Document 3: JP 2013-528569 A (Amgen Research (Munche n) GmbH), 11 July 2013 (11.07.2013), paragraph [0078] & US 2013/0129730 A1 & EP 2552964 A1 & WO 2011/121110 A1 page 37

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A61K39/395(2006.01)i, A61K47/42(2006.01)i, A61K47/48(2006.01)i,
A61P35/00(2006.01)i, C07K7/00(2006.01)i, C07K14/00(2006.01)i, C07K16/28(2006.01)i,
C07K16/32(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12P21/08(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09, A61K39/395, A61K47/42, A61K47/48, A61P35/00, C07K7/00, C07K14/00, C07K16/28, C07K16/32,
C07K19/00, C12P21/08

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1 9 2 2 - 1 9 9 6 年
日本国公開実用新案公報	1 9 7 1 - 2 0 1 6 年
日本国実用新案登録公報	1 9 9 6 - 2 0 1 6 年
日本国登録実用新案公報	1 9 9 4 - 2 0 1 6 年

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

JSTPlus/JST7580 (JDreamIII), CA/REGISTRY/MEDLINE/WPIDS/BIOSIS (STN), UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2015-509952 A (ザ ユニバーシティ オブ バーミンガム) 2015.04.02, 特許請求の範囲、実施例1、図3、表4、段落 [0024]、 [0044]、[0126]、[0181] & US 2015/0183875 A1 & EP 2819701 A1 & WO 2013/128194 A1, Claims, Example1, Figure3, Table4, p. 4, 5, 17, 42, 75	1-12, 14
Y	WO 2014/144722 A2 (AMGEN INC.) 2014.09.18, p. 39 & JP 2016-516056 A & US 2014/0302037 A1 & EP 2970477 A1	1-12, 14

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

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

の日の後に公表された文献

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

国際調査を完了した日

0 3 . 0 8 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

1 6 . 0 8 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 1 0 0 - 8 9 1 5

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

西村 亜希子

電話番号 0 3 - 3 5 8 1 - 1 1 0 1 内線 3 4 8 8

4 N

3 4 3 5

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
Y	JP 2015-509951 A (アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベアーハー) 2015.04.02, 特許請求の範囲 & US 2015/0037334 A1 & EP 2820047 A1 & WO 2013/128027 A1, Claims	1-12, 14
Y	JP 2013-528569 A (アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベアーハー) 2013.07.11, 段落 [0078] & US 2013/0129730 A1 & EP 2552964 A1 & WO 2011/121110 A1, p. 37	1-12, 14
Y	WO 2012/073985 A1 (中外製薬株式会社) 2012.06.07, 実施例 & US 2014/0112914 A1 & EP 2647707 A1, Examples	6-12
Y	JP 2014-519322 A (フェイビオン ファーマシューティカルズ, インコーポレイテッド) 2014.08.14, 段落 [0160] & US 2012/0321626 A1 & EP 2710042 A1 & WO 2012/158818 A2, p. 47	9-12
Y	KJER-NIELSEN L et al., Crystal structure of the human T cell receptor CD3 epsilon gamma heterodimer complexed to the therapeutic mAb OKT3, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2004, Vol.101, No.20, pp.7675-7680, Fig.4	13
Y	FERNANDES RA et al., T cell receptors are structures capable of initiating signaling in the absence of large conformational rearrangements., J. Biol. Chem., 2012, Vol.287, No.16, pp.13324-13335, FIGURE3	13
Y	PONOMARENKO J et al., ElliPro: a new structure-based tool for the prediction of antibody epitopes., BMC Bioinformatics, 2008, Vol.9, 514, Abstract	13
Y	GUTHRIDGE JM et al., Epitope mapping using the X-ray crystallographic structure of complement receptor type 2 (CR2)/CD21: identification of a highly inhibitory monoclonal antibody that directly recognizes the CR2-C3d interface., J. Immunol., 2001, Vol.167, No.10, pp.5758-5766, Abstract	13
A	WO 2015/046554 A1 (中外製薬株式会社) 2015.04.02, 実施例 (ファミリーなし)	1-14
P, A	WO 2016/046778 A2 (AMGEN INC) 2016.03.31, Examples (ファミリーなし)	1-14

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
P, A	WO 2016/014974 A2 (CYTOMX THERAPEUTICS, INC.) 2016.01.28, Examples (ファミリーなし)	1-14

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（P C T 17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☐ 請求項 _____ は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
2. ☐ 請求項 _____ は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求項 _____ は、従属請求の範囲であってP C T 規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。
（特別ページ参照）

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

請求の範囲は、以下の２つの発明に区分される。

（発明１）請求項１－１２，１４

請求項１－１２，１４は、「癌抗原を認識する癌抗原結合領域および免疫細胞抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域を有する多重抗原結合分子（ α ）に、線状エピトープを、前記癌抗原を発現する癌組織で特異的に発現するプロテアーゼにより切断され得る領域を有する癌組織特異的プロテアーゼ切断性リンカー（ β ）を介して融合した融合タンパク質」という特別な技術的特徴を有しているので、発明１に区分する。

（発明２）請求項１３

請求項１３は、発明１に区分された請求項１と、免疫細胞抗原における線状エピトープという共通の技術的特徴を有している。しかしながら、当該技術的特徴は、下記文献１－３の開示内容に照らして、先行技術に対する貢献をもたらすものではないから、当該技術的特徴は、特別な技術的特徴であるとはいえない。また、これらの発明の間には、他に同一の又は対応する特別な技術的特徴は存在しない。

さらに、請求項１３は、請求項１の従属請求項ではない。また、請求項１３は、発明１に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項１３は発明１に区分できない。

そして、請求項１３は、「免疫細胞抗原と前記免疫細胞抗原を認識する免疫細胞抗原結合領域とのタンパク質複合体を用いたタンパク質立体構造解析のデータに基づき、前記免疫細胞抗原に含まれ、かつ、前記免疫細胞抗原結合領域により認識される線状エピトープを同定する工程を有する、線状エピトープの同定方法。」という特別な技術的特徴を有しているので、発明２に区分する。

文献１ WO 2014/144722 A2 (AMGEN INC.) 2014.09.18, p.39 & JP 2016-516056 A & US 2014/0302037 A1 & EP 2970477 A1

文献２ JP 2015-509951 A (アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー) 2015.04.02, 特許請求の範囲 & US 2015/0037334 A1 & EP 2820047 A1 & WO 2013/128027 A1, Claims

文献３ JP 2013-528569 A (アムゲン リサーチ (ミュンヘン) ゲーエムベーハー) 2013.07.11, 段落[0078] & US 2013/0129730 A1 & EP 2552964 A1 & WO 2011/121110 A1, p.37