

(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
2017 年 1 月 19 日(19.01.2017)



(10) 国際公開番号

WO 2017/010423 A1

- (51) 国際特許分類:
A01K 67/027 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/070276
- (22) 国際出願日: 2016 年 7 月 8 日(08.07.2016)
- (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 2015-139023 2015 年 7 月 10 日(10.07.2015) JP
特願 2016-049919 2016 年 3 月 14 日(14.03.2016) 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: 寺社下 浩一(JISHAGE, Koichi); 〒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). 上田 乙也(UEDA, Otoy) ; 〒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). 和田 直子(WADA, Naoko); 〒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). 石黒 敬弘(ISHIGURO, Takahiro); 〒1038324 東京都中央区日本橋室町 2 丁目 1 番 1 号 中外製薬株式会社内 Tokyo (JP). 木下 恭子(KINOSHITA, Yasuko); 〒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: NON-HUMAN ANIMAL HAVING HUMAN CD3 GENE SUBSTITUTED FOR ENDOGENOUS CD3 GENE

(54) 発明の名称: 内因性 CD3 遺伝子をヒト CD3 遺伝子に置換した非ヒト動物

(57) Abstract: The present invention provides a gene-modified non-human animal wherein at least one CD3 gene selected from the group consisting of endogenous CD3 ϵ , CD3 δ and CD3 γ is functionally deleted on the genome and at least one human CD3 gene selected from the group consisting of human CD3 ϵ , CD3 δ and CD3 γ is functionally expressed. By means of this gene-modified non-human animal, mature T cells can be differentiated and produced and immunocompetent cells, including T cells, can function. This gene-modified non-human animal makes possible efficient evaluation and screening in the development of therapeutic methods and agents using human CD3-mediated targeted drugs.

(57) 要約: 本発明は、内因性の CD3 ϵ 、CD3 δ 及び CD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも 1 種以上の CD3 遺伝子がゲノム上で機能的に欠損し、ヒト CD3 ϵ 、CD3 δ 及び CD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも 1 種以上のヒト CD3 遺伝子を機能的に発現する遺伝子改変非ヒト動物を提供する。本発明の遺伝子改変非ヒト動物は成熟 T 細胞を分化・生成し、T 細胞を含む免疫担当細胞が機能を発揮できる。本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒト CD3 を介した標的医薬を用いる治療法や治療薬の開発において効率的な評価やスクリーニングを可能とする。

WO 2017/010423 A1

明 細 書

発明の名称：

内因性CD3遺伝子をヒトCD3遺伝子に置換した非ヒト動物

技術分野

[0001] 本発明は、ヒトCD3遺伝子置換非ヒト動物および、ヒトCD3遺伝子置換非ヒト動物を用いた化合物の評価方法等に関する。

背景技術

[0002] T細胞受容体（T-cell Receptor、TCR）複合体は、主にT細胞上に発現する抗原受容体分子である。抗原と結合するTCR α 鎖および β 鎖（あるいは δ 鎖および γ 鎖）と、主に細胞内へのシグナル伝達機能を有する複数のCD3分子（CD3イプシロン（ ϵ ）、CD3デルタ（ δ ）、CD3ガンマ（ γ ））およびCD247から構成される。

[0003] TCR α およびTCR β は、可変領域と定常領域から形成されるが、その可変領域は、抗体分子と同様に、V（D）J遺伝子再構成を起こすことによって、細胞クローン毎に異なる多様な抗原分子に対する結合活性を呈するレパトアとなる。T細胞はTCR複合体を介して、樹状細胞やマクロファージの細胞表面の主要組織適合性複合体（Major Histocompatibility Complex、MHC）に提示される抗原分子に特異的に結合することにより、活性化される。しかしながら、TCR α 鎖、 β 鎖はいずれも細胞内へのシグナル伝達ドメインを持たず、TCR複合体を形成するCD3各分子（CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ ）およびCD247が担っている。これらのうちCD3 ϵ は、CD3 δ あるいはCD3 γ との二量体を形成、CD247はホモ二量体を形成し、さらにそれらがTCR α 鎖、TCR β 鎖とともに複合体を形成することにより、機能的なTCR複合体となる。CD3複合体（ $\epsilon\gamma$ 、 $\delta\epsilon$ ）およびCD247ホモ二量体は、その細胞内ドメインにimmunoreceptor tyrosine-based activation motif（ITAM）を持ち、このITAMが

細胞内への活性化シグナルの伝達に関与する。

[0004] C d 3 ϵ 、C d 3 δ 、C d 3 γ のうち、C d 3 ϵ の遺伝子欠損マウスは正常なT C R複合体を形成することができないことから、C d 3 ϵ はT C R複合体形成において必要かつ不可欠な役割を果たす分子であることが知られている。すなわち、C d 3 ϵ 遺伝子欠損マウスは胸腺内でのT細胞分化の過程において、T C R β 再構成後のT C R α 再構成および細胞表面への発現が起こらず、T C R複合体が発現しない。そのため、成熟T細胞への分化段階におけるD o u b l e N e g a t i v e (D N) 3-4以降の増殖および分化が起こらない。その結果、C d 3 ϵ 遺伝子欠損マウスは、成熟したT細胞を欠損する（非特許文献1，2，3）。

[0005] また、C D 3 ϵ はT細胞活性化の際に最も重要な分子であることも示唆されている。すなわち、T C Rが、M H Cに提示された抗原などのリガンドと結合した際にはC D 3 ϵ の細胞内ドメインのコンフォーメーションが変化して、L c kやF y nといったS r cファミリー・チロシンキナーゼのリクルートを導き、さらに下流に位置するシグナル伝達分子であるS r c H o m o l o g y 2 D o m a i n - c o n t a i n i n g ζ -C h a i n - a s s o c i a t e d p r o t e i n (Z A P - 7 0)などを活性化することが知られている（非特許文献4，5）。また、アゴニスト活性を有する抗C D 3抗体を作用させることにより、抗原提示細胞による活性化と同様の活性化をもたらすことが可能であり、抗C D 3アゴニスト抗体を用いたT細胞の活性賦活化など、免疫細胞療法の癌治療への応用研究が数多くなされている。

[0006] しかしながら、上述のようなT細胞活性化の機能を付加した治療用抗体を、前臨床研究での動物実験にて評価することは難しい。なぜなら、C D 3 ϵ 、C D 3 δ 、C D 3 γ の細胞外領域の種間における配列相同性は低く、ヒト用の抗体は霊長類以外の動物のC D 3分子には結合しないことが予測されるからである。

このため、上述の治療用抗体や治療用化合物を評価するために、ヒト由来

の造血幹細胞を再構築することにより、ヒトT細胞をもつ実験動物を作出するか、CD3分子をヒト化した実験動物を作出する試みがなされてきた。

[0007] まず、このようなモデル動物としては、重症複合免疫不全 (Severe Combined Immunodeficiency, scid) マウスなどの免疫不全マウスに対して、ヒト由来の造血幹細胞を移植したモデル動物が利用されている。生着した造血幹細胞に由来する血球系の細胞は、T細胞も含めてヒト由来である。しかしながら、このようなモデル動物では、ヒト造血幹細胞が増殖して分化するために必要なサイトカイン、成長因子や微小環境を形成する細胞は、すべてマウス由来のままであるため、ヒト血球系の分化を完全に再現したものではない。NOD-scidマウスにてヒト造血幹細胞を移植してもヒトT細胞が十分に分化しないこと、NOGマウスに移植した場合にはT細胞分化は認められるが、それらのT細胞が、Human Leukocyte Antigen (HLA) 拘束性に免疫応答を発揮できないことが知られ、マウス体内において完全に機能する免疫細胞系が構築できているとは言えない (非特許文献6)。最近、Interleukin-3 (IL-3)、GM-CSFおよびStem Cell Factor (SCF) をヒト化することにより、より改良されてきてはいるが、T細胞がHLA拘束性に免疫応答できない問題は残されている (非特許文献7)。

[0008] 実験動物にヒトCD3分子を遺伝子導入により遺伝的にヒト化する試みがなされてきた。その一つとして、ヒトCD3分子 ϵ 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスが、すでに報告されている (非特許文献8)。しかしながら、このトランスジェニックマウスでは胸腺細胞数が著しく減少しており、免疫機能が正常なマウスであると言い難い。しかも、T細胞分化への影響は、ヒトCD3 ϵ の発現量に依存し、発現量の高いトランスジェニックマウス系統においてはNatural Killer (NK) 細胞の欠損も認められている。

また、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ について、細胞外領域から細胞質領域を含めた

全長をヒト化した遺伝子改変マウスの報告は無く、該ヒト化マウスにおいて、TCRの形成、下流へのシグナル伝達を含め、マウス内在性のCd3 ϵ 、Cd3 δ 、Cd3 γ と同等に、免疫系が正常に機能することは確認されていない。このように、T細胞を含めた免疫担当細胞が正常なヒトCD3発現マウスは、未だ存在していなかった。

先行技術文献

非特許文献

- [0009] 非特許文献1: Malissen et. al. (1995) EMBO. J. 14: 4641-4653
- 非特許文献2: DeJarnette et. al. (1998) PNAS. 95: 14909-14914
- 非特許文献3: Wang et. al. (1998) Int. Immunol. 10: 1777-1788
- 非特許文献4: Bettini et. al. (2014) J. Immunol. 193: 258-267
- 非特許文献5: Xu et. al. (2008) Cell. 135: 702-713
- 非特許文献6: Billerbeck et. al. (2011) Blood. 117: 3076-3086
- 非特許文献7: Rongvaux et. al. (2014) Nat Biotechnol. 32: 364-372
- 非特許文献8: Wang et. al. (1994) PNAS. 91: 9402-9406

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0010] 本発明は上記のような状況に鑑みてなされたものであり、ヒトCD3遺伝子を機能的に発現する遺伝子改変非ヒト動物、すなわちT細胞を含めた正常な機

能を有する免疫担当細胞を有する遺伝子改変非ヒト動物、該遺伝子改変非ヒト動物の作製方法、及び該遺伝子改変動物を用いた種々の疾患の治療薬のスクリーニング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

[0011] 本発明者らは、上述のヒトCD3 ϵ 遺伝子を導入したトランスジェニックマウスでは、内因性のマウスCd3 ϵ の発現が残っており、また、二量体形成のパートナー分子であるCd3 γ およびCd3 δ もマウス由来の分子であるため、TCR複合体の形成過程や、その後のT細胞の分化の過程に何らかの異常が生じている可能性があると考えた。そこで、上記課題を解決すべく、内因性のCd3 ϵ 、Cd3 γ およびCd3 δ からなる群より選ばれる1以上のCd3遺伝子の発現を機能的に欠損させ、ヒトCD3 ϵ 、CD3 γ およびCD3 δ からなる群より選ばれる1以上のCD3遺伝子を機能的に発現させることができるマウスの作製を試みた。そして、鋭意検討の結果、Cre-loxPおよびDre-Roxシステムを利用して内因性の上記遺伝子領域を欠損させ、さらにヒトCD3 ϵ 、CD3 γ およびCD3 δ 遺伝子からなる群より選択されるCD3遺伝子を導入したマウスを作製した。当該マウスにおいて、驚くべきことに、成熟T細胞の細胞数および機能が、正常マウスと同等であることを見出した。すなわち、回収した脾臓細胞を、抗ヒトCD3抗体、抗Cd4抗体および抗Cd8抗体を用いて、Fluorescence activated cell sorting (FACS) 解析により主要なT細胞の分化マーカーの発現が正常であることが確認された。つまり、内因性のCd3 ϵ 、 δ および γ からなる群より選択される1以上のCd3遺伝子を機能的に欠損させ、ヒトCD3 ϵ 、 δ 、 γ からなる群より選択されるCD3を機能的に発現させることにより、T細胞の分化過程の異常やT細胞数の減少を回避することができた。しかも、T細胞のうち、Cd4陽性あるいはCd8陽性の細胞数は、正常マウスと同等であることから、成熟T細胞への分化の過程も正常であることが確認された。さらに、当該マウスに対して、外来抗原としてニワトリ卵白アルブミンを感作させることにより、外来抗原に特異

的な抗体を正常マウスと同等のレベルで産生することが確認され、当該マウスのヘルパーT細胞が、外来抗原に対する抗体産生の過程において正常に機能することが確認された。

このように本発明において、マウス内因性のCd3ε、Cd3δおよびCd3γからなる群より選択される1以上のCd3遺伝子を機能的に欠損させ、ヒトCD3ε、CD3δおよびCD3γからなる群より選択されるCD3を生理的に妥当なレベルにて発現させることにより、T細胞の分化および成熟の過程に異常を生じさせることなく、その機能を維持したまま、CD3分子をヒト化したマウス系統を樹立できたこと、しかも、本発明において、CD3分子の細胞質領域もヒト化したマウスにおいて、マウス内在性のCd3分子と同等かつ正常に機能し得ることを見出したことは予想外の知見である。

CD3を標的とし、細胞内外の関連分子との相互作用を調節する化合物は、T細胞機能を賦活化あるいは阻害する作用を有する免疫調節薬として利用することが期待される。細胞内外での関連分子との相互作用を阻害する化合物の開発を考慮した場合、ヒトCD3ε、CD3δ、CD3γの細胞外あるいは細胞質領域に対して特異性の高い化合物を設計することによって、治療用の化合物をヒトCD3ε、CD3δ、CD3γの細胞外領域のみならず、細胞質領域も標的とすることが可能となる。

さらに、当該マウスに対して、ヒト癌抗原遺伝子を導入したマウス癌細胞株を移植した場合には、当該癌抗原とヒトCD3分子の両者を特異的に認識する抗体の癌細胞増殖抑制効果を確認することができるため、該評価系を利用することにより、所望の活性を有する治療用抗体などの開発を効率的に行うことが可能である。

[0012] 本発明はこのような知見に基づいて完成されたものであり、具体的な態様において、例えば、以下の発明に関する。

[1] 内因性のCD3ε、CD3δ及びCD3γからなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損し、ヒトCD3ε、CD3δ及びCD3γからなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子を機能的に発

現する遺伝子改変非ヒト動物。

〔2〕 ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなるヒトCD3遺伝子を機能的に発現する、〔1〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔3〕 ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子の全長塩基配列がゲノム上に挿入されている、〔1〕または〔2〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔4〕 前記非ヒト動物が有するT細胞は、その細胞膜上で非ヒト動物由来のT細胞受容体とヒトCD3分子が複合体を形成することを特徴とする、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔5〕 ヒト免疫チェックポイント遺伝子、ヒト癌特異的抗原遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子の遺伝子をさらに発現する、〔1〕から〔4〕のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔6〕 前記非ヒト動物が非ヒトほ乳動物である、〔1〕から〔5〕のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔7〕 前記非ヒトほ乳動物がマウスである、〔6〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔8〕 悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬をスクリーニングするための、〔1〕から〔7〕のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔9〕 前記非ヒト動物に癌細胞が移植されていることを特徴とする、悪性腫瘍性疾患の治療薬をスクリーニングするための、〔8〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔10〕 前記癌細胞が肺癌、胃癌、肝癌、食道癌又は卵巣癌由来の細胞である、〔9〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔11〕 前記癌細胞がHER2陽性の細胞である、〔9〕に記載の遺伝子改変非ヒト動物。

〔12〕 以下の工程（1）～（2）：

（1）内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子をゲノム上で機能的に欠損させる工程、及び

(2) ヒトCD3 ϵ 、ヒトCD3 δ 及びヒトCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子をゲノム上に導入する工程、
を含む、遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[13] 工程(2)において、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなるヒトCD3遺伝子をゲノム上に導入する、[12]に記載の遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[14] 前記非ヒト動物に癌細胞を移植する工程をさらに含む、[12]または[13]に記載の遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[15] 前記癌細胞が、肺癌、胃癌、肝癌、食道癌又は卵巢癌由来の細胞である、[14]に記載の遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[16] ヒト免疫チェックポイント遺伝子、ヒト癌特異的抗原遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子の遺伝子を前記非ヒト動物のゲノム上に導入する工程をさらに含む、[12]から[15]のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[17] ヒト免疫チェックポイント遺伝子、ヒト癌特異的抗原遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子の遺伝子をゲノム上に導入する工程が、それぞれヒト免疫チェックポイント遺伝子、ヒト癌特異的抗原遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子の遺伝子がゲノム上に導入された、前記非ヒト動物とは異なる非ヒト動物と前記非ヒト動物を交雑する工程である、[16]に記載の遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[18] 以下の工程(1)～(2)：

(1) [1]から[11]のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物、その臓器、組織または細胞と被験物質を接触させる工程、及び

(2) 該遺伝子改変非ヒト動物個体、その臓器、組織または細胞に対する被験物質の薬効及び／又は毒性を指標として、候補被験物質を選択する工程、
を含む、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬のスクリーニング方法。

[19] 以下の工程(1)～(3)：

(1) ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを含む抗原結合分子のライブラリーのうち1つを被験物質として、[1]から[11]のいずれかに記載の第1の遺伝子改変非ヒト動物に投与する工程、

(2) 該癌特異的抗原を発現する細胞に対する該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を測定する工程、及び

(3) 該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を、該第1の非ヒト動物とは異なる第2の遺伝子改変非ヒト動物に投与された対照抗体の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性と比較する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

発明の効果

[0013] 一態様において、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のCD3遺伝子の発現が機能的に欠損しており、かつヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ 遺伝子からなる群より選択される1種以上のヒトCD3遺伝子を機能的に発現する。すなわち、本発明は、T細胞を含む免疫担当細胞の機能が正常である、ヒトCD3分子を発現する遺伝子改変非ヒト動物の提供を可能にするものであり、本発明の遺伝子改変非ヒト動物を利用すれば、ヒトCD3を介した抗体医薬品、免疫賦活剤、免疫細胞療法等を開発する目的において、ヒトCD3に対して特異性の高い治療法や治療薬を適切に評価できる。

図面の簡単な説明

[0014] [図1A]図1Aは、マウスCd3 ϵ 、Cd3 δ およびCd3 γ 遺伝子を含むゲノムDNAの構造(1)と、当該遺伝子領域の全域を含むバクテリア人工染色体(BAC)クローンを改変することにより構築したマウスCd3遺伝子改変ベクター(2)、上述のベクターによってLoxP配列およびRoX配列を標的位置に挿入したゲノムDNAの構造(3)、さらに組換え酵素CreおよびDreの作用によるCd3 ϵ 、Cd3 δ およびCd3 γ 遺伝子の欠損アレルの構造(4)を示すものである。

[図1B]図1Bは、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ 遺伝子を含むBA

C クローン (a)、およびその B A C クローンを改変するための 5' 改変カセット (b) および 3' 改変カセット (c)、および、それらを用いた改変により構築したヒト C D 3 遺伝子領域導入ベクター (d) の構造を示す。

[図2]図 2 は、マウス C d 3 遺伝子改変 E S 細胞の樹立のための解析した P C R の代表例を示す。

[図3A]図 3 は、マウス C d 3 遺伝子改変 E S 細胞に、C r e 発現ベクターおよび D r e 発現ベクターとともに、ヒト C D 3 遺伝子領域導入ベクターを導入し、得られた E S 細胞クローンの遺伝子型を解析した P C R の代表例を示す。図 3 A はマウス C d 3 遺伝子領域の欠損を検出する P C R 結果の代表例を示す。

[図3B]図 3 B は、ヒト C D 3 遺伝子領域の導入を検出する P C R 結果の代表例を示す。

[図4]図 4 は、樹立した各ラインのヒト C D 3 遺伝子置換マウス、C d 3 遺伝子欠損マウス、野生型およびヒト C D 3 ϵ 遺伝子導入マウスから採取した胸腺の代表的なマクロ写真である。各遺伝子型とも 12 – 13 週齢の雄より摘出した胸腺である。

[図5]図 5 は、樹立した各ラインのヒト C D 3 遺伝子置換マウス、C d 3 遺伝子欠損マウス、野生型およびヒト C D 3 ϵ 遺伝子導入マウスから採取した脾臓および胸腺の組織重量を測定した結果を示している。体重あたりの組織重量比を算出し、個体毎に得られた値を黒点にてプロット、平均値をカラムにて表す。

[図6]図 6 は、樹立した各ラインのヒト C D 3 遺伝子置換マウス、C d 3 遺伝子欠損マウス、野生型マウスおよびヒト C D 3 ϵ 遺伝子導入 (h C D 3 ϵ T g) マウスにおける各ヒト C D 3 分子および各マウス C d 3 の遺伝子発現を R T – P C R によって検討した結果を示す。樹立したヒト C D 3 遺伝子置換マウスのラインのうちライン番号 1 C 3 および 8 I 1 2 において h C D 3 ϵ 、h C D 3 δ および h C D 3 γ に特異的なシグナルが検出された。ライン番号 3 B 1 および 2 A 4 には検出されなかった。

[図7]図7は、樹立した各ラインのヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3、8112および4HH3）の胸腺（A）および脾臓（B）について実施したCD3の組織免疫染色の代表例を示す。いずれの組織においても、野生型マウスと同様にT細胞ゾーンにのみ染色が認められた。また、Cd3遺伝子欠損マウスでは染色が認められておらず、ヒトCD3遺伝子置換マウスにおける染色は導入したヒトCD3遺伝子の発現によるものであることが示された。

[図8]図8は、樹立した各ラインのヒトCD3置換マウスの脾臓における成熟T細胞の存在比率をFACSにて解析した代表的な結果を示す。

[図9]図9は、ヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3）、Cd3遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脾臓細胞のマイトジェン刺激における細胞増殖活性を示す。樹立したヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3）は野生型の90%の細胞増殖活性があることが示された。

[図10]図10は、ヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3）、Cd3遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脾臓細胞のマイトジェン刺激におけるサイトカイン産生を示す。樹立したヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3）は、Cd3遺伝子欠損マウスにおいて機能欠失したサイトカイン産生能を回復できていることが示された。

[図11A]図11A～Dは、ヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3）、Cd3遺伝子欠損マウスと野生型マウスの脾臓細胞の抗CD3抗体刺激における細胞増殖活性（図11A、B）、およびサイトカイン産生（図11C、D）を示す。樹立したヒトCD3遺伝子置換マウス（1C3）は、抗ヒトCD3抗体の刺激に特異的に反応し、細胞増殖活性、およびサイトカイン産生が示された。

[図11B]図11A欄の説明を参照。

[図11C]図11A欄の説明を参照。

[図11D]図11A欄の説明を参照。

[図12]図12は、樹立した各ラインのヒトCD3置換マウスへのニワトリ卵白アルブミン（Ovalbumin, OVA）を免疫した際のOVA特異

的 IgG1 および IgE の血清中濃度を測定した結果を示す。個体毎のOVA特異的な血清中 IgG1 および IgE 濃度を棒グラフで示す。棒グラフの下に数字は個体番号を示す。

[図13]図13は、Hepa1-6/HER2細胞を移植したhCD3トランスジェニックマウスモデルにおける、HER2_CD3抗体を投与した際の腫瘍体積の変化を示す。矢印は抗体投与を示す (*: $P < 0.05$ (t-test))。

[図14]図14は、Hepa1-6/hGPC3細胞を移植したhCD3トランスジェニックマウスモデルにおける、抗マウスCTLA-4抗体、抗マウスPD-1抗体、抗マウスPD-L1抗体を投与した際の腫瘍体積の変化を示す。矢印は抗体投与を示す。

[図15]図15は、Colon38細胞株を移植したマウスモデルにおける、MDX10//TR01H113、もしくはControlとしてのバッファを投与した際の腫瘍体積の変化を示す(図中、それぞれ「MDX10//TR001H1333」および「ベヒクル」)。各点是一群 $n=5$ の腫瘍体積の平均値を示す。最終計測点で平均値を比較したところ、MDX10//TR01H113投与群とバッファ投与群の2群間には有意な差が認められた ($p=0.0021$ 、Studentのt検定)。

発明を実施するための形態

[0015] 本発明は、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損し、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子を機能的に発現する遺伝子改変非ヒト動物に関する。

[0016] ここで遺伝子名の記述方法に関し、一般的に、生物種によってはCD3 ϵ をCD3E、CD3 δ をCD3D、CD3 γ をCD3Gなどと表記することもあるが、本明細書においては、生物種に依存することなく、CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ という遺伝子表記を用いる。すなわち本発明においてCD3 ϵ にはCD3EおよびCD3eが含まれ、CD3 δ にはCD3DおよびCD3dが含まれ、CD3 γ にはCD3GおよびCD3gが含まれる。例えば、本明細書で「ヒトCD3 ϵ 」と記載するときはヒト遺伝子のCD3イプシロンを意味し、「マウスCd3 ϵ 」と記載するときはマウス遺伝子のCd3イ

プシロンを意味する。また、本明細書で「ヒトCD3 δ 」と記載するときはヒト遺伝子のCD3デルタを意味し、「マウスCd3 δ 」と記載するときはマウス遺伝子のCd3デルタを意味する。さらに、本明細書で「ヒトCD3 γ 」と記載するときはヒト遺伝子のCD3ガンマを意味し、「マウスCd3 γ 」と記載するときはマウス遺伝子のCd3ガンマを意味する。

[0017] 本発明における「内因性の遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する」とは、非ヒト動物ゲノム上における内因性の標的遺伝子（例えば、CD3 ϵ 、CD3 δ 又はCD3 γ ）がその機能を発現しない限り、特にその態様は限定されず、非ヒト動物ゲノム上における内因性の標的遺伝子（例えば、CD3 ϵ 、CD3 δ 又はCD3 γ ）または蛋白質が発現しないものであってよい。例えば、相同組み換え技術やクリスパー・キャス（CRISPR/Cas9）、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Zinc Finger Nucleases）、あるいはテイレン（TALEN）等のゲノム編集技術によるノックアウト技術を用いて、非ヒト動物のゲノム上で、標的とした遺伝子を欠損（無効化）させてもよいし、siRNA等を用いて標的とした遺伝子の発現を完全に抑制させる手法を用いてもよい。また、内因性の標的遺伝子が発現しない限り、例えば、ノックイン技術を用いて、非ヒト動物ゲノム上の標的遺伝子の位置に外来遺伝子を挿入してもよい。

[0018] 本発明における非限定の一態様において、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する動物は、ヒトCD3遺伝子などの外来CD3を発現させない場合、成熟T細胞の分化および生成が阻害される。ここで成熟T細胞とは、例えばCD4またはCD8のどちらか一方（両方ではなく）が陽性のT細胞（それぞれCD4単一陽性細胞、CD8単一陽性細胞という）である。より具体的には、ヒトCD3遺伝子などの外来CD3を発現しない場合、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する動物の脾臓におけるCD4単一陽性細胞およびCD8単一陽性細胞の合計は、野生型のレベル、または通常正常とされるレベルに比べ、例えば70%以下、好ましくは60%以下、より好ましくは50%以下、40%以下、30%以下、20%以下

、10%以下、5%以下、3%以下、または1%以下である。成熟T細胞の計数を行う発達ステージは、野生型において成熟T細胞が生成するステージである限りいずれでもよいが、一般にアダルト（繁殖可能）となる齢であることが好ましく、例えばマウスであれば8～12週齢、例えば12週齢であってよい。

[0019] また本発明における非限定の一態様において、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する動物は、ヒトCD3遺伝子などの外来CD3を発現しない場合、抗体産生が阻害される。ここで抗体の型は特に限定されず、例えばIgG（例えばIgG1）の産生が阻害されることであってもよく、および/または、IgEの産生が阻害されることであってもよい。抗体産生が阻害されているかどうかは、外来抗原を接種して、抗体が産生されるか否か、あるいは抗体産生量を測定することにより決定することができる。外来抗原としては特に制限はなく、例えばニワトリ卵白アルブミン（OVA）などの所望の抗原を用いて抗体産生を確認することができる。ヒトCD3遺伝子などの外来CD3を発現しない場合、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損する動物における抗体価は、野生型のレベルまたは通常正常とされるレベルに比べ、例えば70%以下、好ましくは60%以下、より好ましくは60%以下、50%以下、40%以下、30%以下、20%以下、10%以下、5%以下、3%以下、または1%以下である。抗体産生を測定する発達ステージは、野生型において抗体が生成するステージである限りいずれでもよいが、一般にアダルトとなる齢であることが好ましく、例えばマウスであれば8～12週齢、例えば12週齢であってよい。

[0020] 本発明における、内因性の遺伝子をゲノム上で機能的に欠損させる一態様として、非ヒト動物由来の内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のCD3遺伝子をコードするゲノム領域の5'側におよび3'側に、配列特異的に作用する組換え酵素の基質配列を挿入し、次いで組換え酵素を作用させることにより、CD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のCD3遺伝子を含むゲノム領域を完全に欠

損させる方法を挙げることができる。さらに、当該非ヒト動物に対して、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のCD3をコードするゲノム領域を導入することによって、本発明における遺伝子改変非ヒト動物を作製することができる。非限定の一態様において、当該非ヒト動物に対して、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のヒトCD3遺伝子を導入するゲノム上の位置は、該非ヒト動物の内因性のCD3遺伝子座とは異なる位置であることが好ましいが、これに限定されることはない。ヒトCD3をコードする塩基配列を導入する場合には、所望の発現分布及び／又は発現量を得る目的に適した発現調節領域（プロモーター）を、当業者が適宜選択し、ヒトCD3遺伝子の塩基配列に付加して、ゲノム上に導入することができる。

[0021] 本発明において、機能を欠損させる内因性CD3遺伝子は、CD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のいずれでもよいが、例えば内因性CD3 ϵ 遺伝子を少なくとも機能的に欠損しているものであってよい。また、2種以上を機能的に欠損するものも好ましく、例えば内因性CD3 ϵ およびCD3 δ 、あるいは内因性CD3 ϵ およびCD3 γ 、あるいは内因性CD3 δ およびCD3 γ を少なくとも機能的に欠損している。また、内因性CD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ をすべて機能的に欠損しているものであってもよい。

[0022] また本発明において、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のCD3としては特に制限はないが、例えばヒトCD3 ϵ であってよい。また、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される2種以上のCD3であってよく、例えばヒトCD3 ϵ およびCD3 δ 、あるいはヒトCD3 ϵ およびCD3 γ 、あるいはヒトCD3 δ およびCD3 γ であってよい。また、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 、およびCD3 γ からなるCD3、すなわち3種すべてであってよい。

[0023] 本発明における配列特異的に作用する組換え酵素としては、例えば、Cre、Dre、Flpなどを使用することができる。ゲノム領域に挿入する基質配列に合わせて、特異的な組換え酵素を使用する。すなわち、Creに対してはloxP配列、Dreに対してはRox配列、Flpに対してはFrt配

列を使用する。ここで、「I o x P 配列」はATAACTTTCGTATAGCATACATTATACGAAGTTATの塩基配列（配列番号：1）、「R o x 配列」はTAACTTTTAAATAATTGGCATTATTTAAAGTTAの塩基配列（配列番号：2）、「F r t 配列」はGAAGTTCCTATTCTCTAGAAAGTATAGGAACCTTCの塩基配列（配列番号：3）を利用することができるが、これに限定されるものではない。

[0024] 本発明における「ヒトCD3遺伝子を機能的に発現する」とは、非ヒト動物のT細胞上にヒトCD3分子が発現しているが、該非ヒト動物において、T細胞を含めた免疫担当細胞が正常な機能を維持している状態を意味する。ここで、免疫担当細胞が正常な機能を維持しているかどうかは、例えば、該非ヒト動物のT細胞の分化過程、T細胞の成熟過程、胸腺重量、胸腺細胞数、脾臓における機能的T細胞のCD4及びCD8陽性細胞の比率等を指標に判断することができる。

本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、好ましくは成熟T細胞を分化・生成する能力を有する。すなわち本発明においてヒトCD3遺伝子を機能的に発現するとは、当該動物において成熟T細胞が生成されることであってもよい。例えば、本発明の遺伝子改変非ヒト動物がマウスの場合、T細胞の分化および成熟過程が影響を受けず、胸腺重量や胸腺細胞数が正常なマウスと同等であることが望ましい。ここで、正常なマウスにおける胸腺細胞数と同等であるとは、遺伝子改変非ヒト動物の胸腺細胞数が少なくとも 1×10^4 個以上、好ましくは 1×10^5 個以上、 5×10^5 個以上、 1×10^6 個以上、 5×10^6 個以上、 1×10^7 個以上、特に好ましくは 5×10^7 個以上であり、遺伝子改変非ヒト動物の胸腺細胞数が $5 \sim 6 \times 10^7$ 個の範囲であることが最も好ましい。

また、機能的T細胞の表面マーカーであるCd4あるいはCd8の陽性細胞の比率も、正常なマウスと同等であることが望ましい。ここで、正常なマウスにおける成熟T細胞のCd4およびCd8陽性細胞の比率と同等であるとは、脾臓において評価した場合に、成熟T細胞全体の細胞数におけるCd

4 陽性細胞の比率が、好ましくは、10～40%、12～38%、14～36%、16～34%、18～32%、特に好ましくは20～30%の比率である。また、成熟T細胞全体の細胞数におけるCD8陽性細胞の比率が、好ましくは、5～30%、7～28%、9～26%、11～24%、13～22%、特に好ましくは15～20%の比率である。

非ヒト動物の胸腺重量および胸腺細胞数および末梢でのCD4陽性細胞、CD8陽性細胞の存在比率の評価方法としては、例えば、後述する実施例に記載の解析方法等、周知の解析方法を当業者が適宜用いることによって評価することができる。

ヒトCD3置換マウスのT細胞を含めた免疫担当細胞は、マイトジェン刺激後の細胞増殖能が、野生型マウスと比較して同等であることが望ましい。同等であるとは、マイトジェン刺激後のチミジン取り込み、ブロモデオキシウリジンの取り込み、MTSアッセイ、CFSE [5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester]アッセイ等による評価値が、好ましくは野生型の65%～135%、70%～130%、75%～125%、80%～120%であり、特に好ましくは85～115%である。

[0025] また本発明における非限定の一態様において、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒトCD3遺伝子を発現しない対照（当該動物と同じ組み合わせで内因性のCD3遺伝子を欠損する動物）と比較して、成熟T細胞の生成能が上昇している。より具体的には、脾臓におけるCD4単一陽性細胞およびCD8単一陽性細胞の合計が、当該対照に比べ、例えば1.3倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは1.6倍以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、または100倍以上である。成熟T細胞の計数を行う発達ステージは、本発明の動物において成熟T細胞が生成するステージである限りいずれでもよいが、一般にアダルトとなる齢であることが好ましく、例えばマウスであれば8～12週齢、例えば12週齢であってよい。

[0026] また、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、例えば外来抗原に対する抗体を産生する能力を有する。抗体の型は特に限定されず、例えばIgG（例えばIgG1

）であってもよく、あるいはIgEであってもよい。外来抗原は特に限定されず、ニワトリ卵白アルブミン（OVA）などの所望の抗原を用いて抗体産生を確認することができる。

[0027] また本発明における非限定の一態様において、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒトCD3遺伝子を発現しない対照（当該動物と同じ組み合わせで内因性のCD3遺伝子を欠損する動物）と比較して、高い抗体産生能を有する。ここで抗体の型は特に限定されず、例えばIgG（例えばIgG1）であってもよく、IgEであってもよい。抗体産生能が上昇しているかどうかは、外来抗原を接種して抗体が産生されるか否か、あるいは抗体産生量を測定することにより決定することができる。外来抗原としては特に制限はなく、例えばニワトリ卵白アルブミン（OVA）などの所望の抗原を用いて抗体産生を確認することができる。本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、当該対照動物に比べ、抗体価が例えば1.3倍以上、好ましくは1.5倍以上、より好ましくは1.6倍以上、2倍以上、3倍以上、4倍以上、5倍以上、10倍以上、20倍以上、50倍以上、または100倍以上である。抗体産生を誘導させる発達ステージは、本発明の動物において抗体が生成するステージである限りいずれでもよいが、一般にアダルトとなる齢であることが好ましく、例えばマウスであれば8～12週齢、例えば12週齢であってもよい。抗原の感作や抗体の測定時期は適宜設計してよいが、例えば感作は4週間間隔にて2回行い、100 μ gの抗原を、1回目は完全フロイント・アジュバンドを用いて背部皮下に感作し、その4週間後に不完全フロイント・アジュバンドを用いて同様に背部皮下に感作し、2回目の感作の1週間後に採血して抗体価を測定することができる。

[0028] また本発明における非限定の一態様において、T細胞を含めた免疫担当細胞が正常な機能を維持している状態とは、遺伝改変非ヒト動物の獲得免疫に関する機能（液性免疫、細胞性免疫）が正常な機能を維持している状態を含む。

[0029] 本発明における非限定の一態様において、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上

のヒトCD3遺伝子の全長塩基配列がゲノム上に挿入されている、遺伝子改変非ヒト動物である。ゲノム上に挿入される全長塩基配列に関し、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のCD3としては特に制限はないが、例えばヒトCD3 ϵ の全長塩基配列であってよい。また、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される2種以上のCD3であってよく、例えばヒトCD3 ϵ の全長塩基配列およびCD3 δ の全長塩基配列、あるいはヒトCD3 ϵ の全長塩基配列およびCD3 γ の全長塩基配列、あるいはヒトCD3 δ の全長塩基配列およびCD3 γ の全長塩基配列であってよい。また、ヒトCD3 ϵ の全長塩基配列、CD3 δ の全長塩基配列、およびCD3 γ の全長塩基配列からなるCD3、すなわち3種すべてであってよい。本発明における非限定の一態様において、CD3遺伝子の「全長塩基配列」とは、細胞外領域、膜貫通領域、及び細胞質領域を含む、CD3分子（CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ ）をコードする塩基配列であり、さらに発現調節領域（プロモーター）を含む塩基配列であってよい。

[0030] 本発明における「非ヒト動物」としては、特に限定することを意図しないが、非ヒト哺乳動物であることが好ましい。マウス、ラット、ハムスターなどのげっ歯類、サル、チンパンジーなどの非ヒト霊長類、ウサギ、ヒツジ、ウシ、ブタなどのその他哺乳動物や、鳥類、両生類、爬虫類、魚類などを本発明の非ヒト動物として用いることも可能である。特に好ましくはげっ歯類であり、最も好ましくはマウスである。

[0031] 本発明の遺伝子改変非ヒト動物の非限定の一態様として、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ から選択されるヒトCD3遺伝子をコードするDNA（ゲノムDNA又はcomplementary DNA(cDNA)等）が染色体上に導入されていることが好ましい。ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ から選択されるヒトCD3遺伝子をコードするDNAの導入の方法は、特に限定されないが、DNAベクターまたはレトロウイルスベクター等のウィルスベクターの受精卵前核への顕微注入、胚性幹細胞、精子幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）等の生殖系列幹細胞への電気穿孔法、リポフェクション法等による導入な

ど、公知の手法を適宜用いることが可能である。DNAベクターとしては遺伝子工学に利用されるベクターであれば特に限定されず、例えばプラスミドベクター、ウィルスベクター、コスミドベクター、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）および他の非プラスミドベクターなどを使用することができる。

[0032] 本発明における非限定の一態様として、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬をスクリーニングするための、上述の遺伝子改変非ヒト動物を提供する。また、非限定の一態様として、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の代わりに、アレルギー、T細胞の異常に関わる疾患、移植片拒絶反応等の治療又は予防薬のスクリーニングのための、上述の遺伝子改変非ヒト動物を提供する。さらに、前記の治療効果を検討するための当業者公知の疾患モデル動物に対して、上述の遺伝子改変非ヒト動物から採取した免疫担当細胞を移入することによる治療効果の検討も可能である。

[0033] また本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、細胞が移植されていてもよい。当該細胞の由来は特に限定されないが、例えば当該動物と同種の動物由来の細胞であり、より好ましくは、免疫的に拒絶を受けないようにするために、当該動物と遺伝的背景が同一の細胞であってよい。また当該細胞は癌細胞、または癌細胞から樹立された細胞株であってよい。また好ましい態様においては、当該細胞は、少なくともヒト蛋白質のエピトープを少なくとも含む蛋白質を発現する。そのような蛋白質は、例えばヒト蛋白質の断片を少なくとも含む蛋白質であってよく、例えば全長ヒト蛋白質であってもよい。当該蛋白質は、好ましくはヒトの癌の癌抗原または自己免疫疾患の自己抗原のエピトープを少なくとも含む蛋白質であり、例えばヒトの癌の癌抗原そのものまたは自己免疫疾患の自己抗原そのものであってもよい。またそのような蛋白質は、好ましくは細胞表面蛋白質であり、より好ましくは、ヒト蛋白質のエピトープを細胞外領域に含む蛋白質である。本発明の遺伝子改変非ヒト動物に移植される細胞は、好ましい態様においては、細胞表面にヒト蛋白質のエピトープを発現している。

[0034] また本発明における非限定の一態様として、前記遺伝子改変非ヒト動物に癌細胞が移植されていることを特徴とする、悪性腫瘍性疾患の治療薬をアッセイまたはスクリーニングするための遺伝子改変非ヒト動物を提供する。あるいは、癌細胞が移植されている非ヒト動物に対し、前記遺伝子改変非ヒト動物から採取した免疫担当細胞を移入することによっても、悪性腫瘍性疾患の治療薬をスクリーニングすることが可能である。また本発明は、非限定の一態様として、前記遺伝子改変非ヒト動物の、悪性腫瘍性疾患の治療薬をアッセイまたはスクリーニングするための使用にも関する。

[0035] 本発明の遺伝子改変非ヒト動物としてマウスを用いるときであって、例えば、治療用抗体の評価用に、非ヒト動物に由来する癌細胞株の同種移植モデルとして使用する場合は、ヒト癌抗原を導入したマウス癌細胞株を使用することが好ましい。「非ヒト動物に由来する癌細胞株」は、特に限定されないが、本発明の非ヒト動物に免疫的に拒絶を受けないようにするため遺伝的背景が同一であることが好ましい。「ヒト癌抗原」とはヒト正常組織では発現せず、癌化によって発現が特異的に増加する分子をいう。ここで、癌化によって発現が特異的に増加する分子とは、タンパク質、又は細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖などであり、好ましくは細胞表面タンパク質をいう。非ヒト動物の癌細胞にヒト癌抗原を発現させるための方法としては、特に限定されないが、発現ベクターの導入によって安定化株を樹立することが可能である。発現ベクターとしては遺伝子工学に利用されるベクターであれば特に限定されず、例えばプラスミドベクター、ウィルスベクター、コスミドベクター、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）および他の非プラスミドベクターなどを使用することができる。

[0036] 本発明において、悪性腫瘍性疾患の治療薬のスクリーニングのために、非ヒト動物に移植される癌細胞としては、例えば、卵巣癌、前立腺癌、乳癌、食道癌、腎臓癌、子宮癌、肝癌、肺癌、膵臓癌、胃癌、膀胱癌又は大腸癌細胞等が好適に挙げられる。なお、本明細書に記載の「癌」は、卵巣癌、胃癌等の上皮性の悪性腫瘍のみならず、慢性リンパ性白血病やホジキンリンパ腫

等の造血器がんを含む非上皮性の悪性腫瘍も意味するものとする。

[0037] 本発明における自己免疫疾患の具体的な例として、リウマチ、自己免疫性肝炎、自己免疫性甲状腺炎、自己免疫性水疱症、自己免疫性副腎皮質炎、自己免疫性溶血性貧血、自己免疫性血小板減少性紫斑病、自己免疫性萎縮性胃炎、自己免疫性好中球減少症、自己免疫性精巣炎、自己免疫性脳脊髄炎、自己免疫性レセプター病、自己免疫不妊、クローン病、全身性エリテマトーデス、多発性硬化症、バセドウ病、若年性糖尿病、アジソン病、重症筋無力症、水晶体性ブドウ膜炎、乾癬、ベーチェット病などのような疾患が挙げられる。

[0038] 本発明の非限定の一態様として、上述した遺伝子改変非ヒト動物が有するT細胞の細胞上で、非ヒト動物由来のT細胞受容体とヒトCD3分子が複合体を形成することを特徴とする、遺伝子改変非ヒト動物を提供する。

ここで、CD3 ϵ は、CD3 δ あるいはCD3 γ との二量体を形成し、さらにそれらの二量体がT細胞受容体(TCR) α 鎖、TCR β 鎖とともに複合体を形成することにより、機能的なTCR複合体を形成する。特定の理論に拘束されることは意図しないが、本発明の遺伝子改変非ヒト動物においては、該非ヒト動物のT細胞の細胞上で、非ヒト動物由来のTCR α 鎖、 β 鎖とともに、ヒト由来のCD3 ϵ 、CD3 δ 及び/又はCD3 γ が複合体を形成することができる。

[0039] 本発明における非限定の一態様として、以下の工程(1)～(2)：

- (1) 内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子をゲノム上で機能的に欠損する工程、及び
 - (2) ヒトCD3 ϵ 、ヒトCD3 δ 及びヒトCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子をゲノム上に導入する工程、
- を含む、遺伝子改変非ヒト動物の作製方法を提供する。

[0040] 本発明における「ヒトCD3遺伝子をゲノム上に導入する工程」は、ヒトCD3遺伝子(CD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ からなる群より選ばれるヒトCD3)が非ヒト動物のゲノム上に導入される限り、特にその遺伝子導入手法が限定されること

はないが、例えば、DNAベクターの受精卵前核への顕微注入、胚性幹細胞、精子幹細胞、人工多能性幹細胞（iPS細胞）等の生殖系列幹細胞への電気穿孔法、リポフェクション法等による導入など、公知の手法を適宜用いることが可能である。DNAベクターとしては遺伝子工学に利用されるベクターであれば特に限定されず、例えばプラスミドベクター、ウィルスベクター、コスミドベクター、細菌人工染色体（BAC）、酵母人工染色体（YAC）および他の非プラスミドベクターなどを使用することができる。

また、非限定の一態様として、本発明の遺伝子改変非ヒト動物の作製は、ジンクフィンガーヌクレアーゼ（Zinc Finger Nucleases, U.S. Patent Nos. 6,534,261, 6,607,882, 6,746,838, 6,794,136, 6,824,978, 6,866,997, 6,933,113, 6,979,539, 7,013,219, 7,030,215, 7,220,719, 7,241,573, 7,241,574, 7,585,849, 7,595,376, 6,903,185, 6,479,626）、テイレン（TALEN）（US 8,420,782 B2, US 8,440,431, US 8,440,432, US 8,450,471）あるいはクリスパー・キャス（CRISPR-Cas9）の技術を用い、標的遺伝子を改変することによっても作製することができる（US8697359, US8795965, US8771945, W02013/142578, W02013/176772, W02014/065596, W02014/089290, W02014/093595）。非限定の一態様において、当該非ヒト動物に対して、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ からなる群より選択される1種以上のヒトCD3遺伝子を導入するゲノム上の位置は、該非ヒト動物の内因性のCD3遺伝子座とは異なる位置であることが好ましいが、これに限定されることはない。ヒトCD3をコードする塩基配列を導入する場合には、所望の発現分布及び／又は発現量を得る目的に適した発現調節領域（プロモーター）を、当業者が適宜選択し、ヒトCD3遺伝子の塩基配列に付加して、ゲノム上に導入することができる。

[0041] また本発明において遺伝子をゲノム上で欠損させる工程、および遺伝子をゲノム上に導入する工程は、それぞれ、当該遺伝子をゲノム上で欠損した個体、および当該遺伝子がゲノム上に導入された個体が取得される限り特に制限はなく、例えば交雑によりそのような個体を取得することが包含される。例えば、目的の遺伝子をゲノム上に保持する個体を、当該遺伝子をゲノム上

で欠損する個体と1又は複数回掛け合わせるにより、当該遺伝子をゲノム上で欠損させた個体を作製することができる。逆に、目的の遺伝子を持たない個体を、当該遺伝子をゲノム上に保持する個体（ドナー）と1又は複数回掛け合わせるにより、当該遺伝子がゲノム上に導入された個体を作製することができる。例えば、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子をゲノム上で機能的に欠損する個体を、ヒトCD3 ϵ 、ヒトCD3 δ 及びヒトCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子をゲノム上に含む個体（内因性CD3遺伝子とは異なる染色体部位にヒトCD3遺伝子を持つ個体）と掛け合わせるにより、個体において結果的に、内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子をゲノム上で機能的に欠損させ、かつ、ヒトCD3 ϵ 、ヒトCD3 δ 及びヒトCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子をゲノム上に導入することが可能である。このように、本発明においてゲノム上で欠損またはゲノム上に導入することには、それぞれ交雑により欠損させること、または導入することが包含される。

[0042] 本発明において、非ヒト動物に導入されるヒトCD3遺伝子は、ヒト由来のCD3遺伝子である限り、特にその配列が限定されることを意図しないが、例えば、ヒトCD3 γ 、ヒトCD3 δ 及びヒトCD3 ϵ は、そのポリヌクレオチド配列が、配列番号：4（NM_000073.2）、6（NM_000732.4）及び8（NM_000733.3）に、そのポリペプチド配列が、配列番号：5（NP_000064.1）、7（NP_000723.1）及び9（NP_000724.1）で表される（カッコ内はRefSeq登録番号を示す）。

[0043] 本発明における非限定の一態様として、下流のシグナル伝達が正常になれる限り、非ヒト動物由来のCD3分子（ ϵ 、 δ 、および/または γ ）の細胞外領域配列を、ヒト由来のCD3分子（ ϵ 、 δ 、および/または γ ）の細胞外領域配列に改変することによって、本発明の遺伝子改変非ヒト動物を作製してもよい。

[0044] すなわち本発明は、CD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる内因性CD3蛋白質の発現が抑制または欠損されるように改変され、かつ、ヒトCD3 ϵ

、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれるヒトCD3蛋白質の細胞外領域を少なくとも保持する機能的CD3蛋白質を発現する改変非ヒト動物を提供する。当該機能的CD3蛋白質としてはCD3 ϵ 、CD3 δ またはCD3 γ のうち所望の1つ、2つ、または3つの蛋白質であってよいが、発現が抑制または欠損する内因性CD3蛋白質に対応するCD3蛋白質（例えば内因性CD3 ϵ 蛋白質の発現が抑制または欠損する場合は、ヒトCD3 ϵ 蛋白質の細胞外領域を少なくとも保持する機能的CD3蛋白質、内因性CD3 δ 蛋白質の発現が抑制または欠損する場合は、ヒトCD3 δ 蛋白質の細胞外領域を少なくとも保持する機能的CD3蛋白質、内因性CD3 γ 蛋白質の発現が抑制または欠損する場合は、ヒトCD3 γ 蛋白質の細胞外領域を少なくとも保持する機能的CD3蛋白質）を少なくとも発現することが好ましい。

[0045] ここで「内因性CD3蛋白質の発現が抑制されるように改変」とは、内因性CD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損するような改変の一態様であり、内因性CD3蛋白質をコードする遺伝子が改変（変異または欠失など）されることにより、インタクトな内因性CD3蛋白質が発現されない、または発現が低下するように改変、あるいは全く発現しないように改変されることであってもよく、あるいは内因性CD3蛋白質の発現を転写レベルまたは翻訳レベルで抑制されるように改変されることであってもよい。また、蛋白質の安定性を低下させたり、分解を促進したり、半減期を短くすることであってもよい。

[0046] また、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ の細胞外領域を保持する3種の機能的CD3蛋白質とは、それぞれ、ヒトCD3 ϵ の細胞外領域を保持する機能的CD3蛋白質、ヒトCD3 δ の細胞外領域を保持する機能的CD3蛋白質、ヒトCD3 γ の細胞外領域を保持する機能的CD3蛋白質を言う。当該機能的CD3蛋白質は、ヒトCD3蛋白質そのものであってもよく、ヒトCD3蛋白質と非ヒト動物のCD3蛋白質とのキメラCD3蛋白質であってもよい。例えば、細胞外領域はヒトCD3蛋白質に由来し、それ以外は当該動物のCD3蛋白質に由来するキメラCD3蛋白質なども含まれる。キメラCD3蛋白質の場合、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ またはCD3 γ の細胞外領域を少なくとも保持する機能的CD3蛋白質は、細胞外領域以外の領域（例えば細胞質領域）も、それぞれCD3 ϵ 、CD3 δ またはCD3 γ に由来することが好ましい。

。

[0047] また機能的CD3蛋白質とは、CD3蛋白質の機能、例えばTCR α 鎖およびTCR β 鎖と共に複合体を形成する活性、成熟T細胞を生成させる活性、および/または外来抗原に対する抗体を生成させる活性を持つ蛋白質を言う。機能的CD3蛋白質としては、具体的には、CD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上の内因性CD3蛋白質の発現が抑制されるように改変された動物と比較して、当該動物においてヒトCD3の細胞外領域を少なくとも保持する機能的CD3蛋白質発現することにより、成熟T細胞の生成および/または抗体産生が有意に上昇する蛋白質が含まれる。

[0048] 以上のような特性から、本発明の非ヒト動物は、被験物質における、疾患の治療効果、薬物動態など種々の評価に利用することが可能である。従って、本発明は、このような本発明の非ヒト動物を利用した被験物質の評価方法をも提供する。また本発明は、被験物質における疾患の治療効果、または薬物動態など種々の評価および/またはスクリーニングに用いるための本発明の非ヒト動物に関し、また、被験物質における疾患の治療効果、または薬物動態など種々の評価および/またはスクリーニングに用いるための、本発明の非ヒト動物の使用にも関する。

[0049] 本発明の非限定の一態様として、以下の工程（１）～（２）：

（１） 上述の遺伝子改変非ヒト動物、その臓器、組織または細胞と被験物質を接触させる工程、及び（２） 該非ヒト動物個体、その臓器、組織または細胞に対する被験物質の薬効及び／又は毒性を指標として、候補被験物質を選択する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬またはその候補のスクリーニング方法を提供する。

また、非限定の一態様として、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の代わりに、アレルギー、T細胞の異常に関わる疾患、移植片拒絶反応等の治療又は予防薬のスクリーニング方法が提供される。

[0050] 本発明の評価方法に用いる「被験物質」としては、特に限定されるものではなく、例えばペプチド、タンパク質、非ペプチド性化合物、合成化合物、

発酵生産物、細胞抽出物などが挙げられる。例えば、少なくともヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 、またはCD3 γ のいずれかのヒトCD3に結合する被験物質、あるいはその候補となる被験物質を用いることができる。好ましくはヒトCD3に結合する抗体であり、特に好ましくはヒトCD3と癌特異的抗原の両者に同時に結合する二重特異性抗体である。上記態様のスクリーニング方法を実施することにより、工程（２）で選択された候補被験物質を含む、様々な疾患の治療薬を選択することができる。

[0051] 本発明における遺伝子改変非ヒト動物と被験物質を接触させる工程は、被験物質の非ヒト動物への投与、例えば、尾静脈投与、皮下投与、腹腔内投与、経口投与、経鼻投与、経皮投与、経肺投与などで行うことができる。

また、本発明において「接触」は更に、別の態様では、癌特異的抗原の発現細胞を体内に移植した非ヒト動物や、内在的に当該癌特異的抗原を発現する癌細胞を有する動物に、ヒトCD3分子および当該癌特異的抗原に結合する抗原結合分子を投与することによっても行われる。投与方法は経口、非経口投与のいずれかによって実施できる。特に好ましくは非経口投与による投与方法であり、係る投与方法としては具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、皮下注射などが挙げられる。例えば注射投与によって、前記抗原結合分子を全身または局部的に投与できる。また、被験動物の年齢、症状により適宜投与方法を選択することができる。水溶液として投与される場合にあっては純粋に前記抗原結合分子のみを含有する水溶液であってもよいし、例えば上記記載の界面活性剤、賦形剤、着色料、着香料、保存料、安定剤、緩衝剤、懸濁剤、等張化剤、結合剤、崩壊剤、滑沢剤、流動性促進剤、矯味剤等を含む溶液であってもよい。投与量としては、例えば、一回の投与につき体重1 kgあたり0.0001 mgから1000 mgの範囲で投与量を選択できる。しかしながら、抗原結合分子投与量はこれらの投与量に制限されるものではない。

[0052] 本態様のスクリーニング方法において用いられる遺伝子改変非ヒト動物の

細胞は、該細胞自体またはそれを含む任意のもの（例、血液、組織、臓器等）であれば特に制限はない。血液、組織、臓器等は、それらを生体から単離して培養してもよいし、あるいは生体自体に被験物質を投与し、一定時間経過後にそれら生体試料を単離してもよい。

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

[0053] 被験物質の上記細胞との接触は、単離した細胞・組織等を用いる場合は、例えば、該細胞・組織等の培養に適した培地（例えば、約5～20%の胎仔ウシ血清を含む最小必須培地（MEM）、ダルベッコ改変イーグル培地（DMEM）、RPMI1640培地、199培地、F12培地など）や各種緩衝液（例えば、HEPES緩衝液、リン酸緩衝液、リン酸緩衝生理食塩水、トリス塩酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、酢酸緩衝液など）の中に被験物質を添加して、細胞を一定時間インキュベートすることにより実施することができるが、これに限定されることはなく、当業者が適宜条件を選択することが出来る。添加される被験物質の濃度は化合物の種類（溶解度、毒性等）により異なるが、当業者が適宜選択することができる。インキュベート時間としては、例えば、約10分～約24時間が挙げられる。

[0054] 本発明の遺伝子改変非ヒト動物個体、その臓器、組織または細胞に対する被験物質の薬効及び／又は毒性を測定し、薬効が認められたまたは高い被験物質を選択したり、毒性が低いまたはない被験物質を選択することができる。また、比較対照として薬効を有する物質を使用して同様に測定を実施し、対照に比べて薬効が高い、または毒性が低い被験物質を選択することもできる。薬効としては、特に制限されるものではないが、例えば細胞増殖抑制作用、細胞傷害作用、または腫瘍増殖抑制作用などが挙げられる。

[0055] 本発明の一態様として、以下の工程（１）～（３）：

（１）ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを含む抗原結合分子のライブラリーのうち１つを被験物質として、上述の第１の遺伝子改変非ヒト動物に投与する工程、

（２）該癌特異的抗原を発現する細胞に対する該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を測定する工程、及び

（３）該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を、該第１の非ヒト動物とは異なる第２の遺伝子改変非ヒト動物に投与された対照物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性と比較する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患の治療薬またはその候補のスクリーニング方法を提供する。

[0056] 第１および第２の遺伝子改変非ヒト動物は、例えば内因性CD3遺伝子について同じ改変が施されているものを使用することができる。対照物質としては、例えば対照抗体が挙げられる。対照抗体としては、ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインに結合する抗体を適宜用いてよい。対照抗体に比べ、細胞増殖抑制効果が高い被験物質を選択したり、薬物動態学的特性が良好な被験物質を選択することにより、優れた悪性腫瘍性疾患の治療薬をスクリーニングすることが可能である。

[0057] 被験物質の評価の態様としては、以下が挙げられる。例えば、癌特異的抗原を発現する癌細胞株を移植した本発明の非ヒト動物において、癌細胞株の増殖が抑制されたか否かを測定することにより、治療効果を評価することができる。該癌細胞株は、ヒト癌抗原を導入した癌細胞株であって、スクリー

ニングに用いる非ヒト動物と同種由来の癌細胞株が好ましい。移植された癌細胞株の増殖が抑制されたか否かは、癌細胞株の量や増殖塊のサイズを計測することにより評価することが可能である。

被験物質の評価の一態様としては、細胞傷害作用を測定する方法が挙げられる。被験物質である抗原結合分子の接触によって、対象となる癌細胞又は癌細胞を含む腫瘍組織に引き起こされた細胞傷害を評価又は測定する方法として、以下の方法が好適に使用される。インビトロ (in vitro) で該細胞傷害活性を評価又は測定する方法としては、細胞傷害性T細胞活性などの測定法を挙げることができる。抗原結合分子がT細胞性傷害活性を有するか否かを、公知の方法により測定することができる (例えば、Current protocols in Immunology, Chapter 7. Immunologic studies in humans, Editor, John E, Coligan et al., John Wiley & Sons, Inc.(1993)等)。活性の測定に際しては、被験物質とはその抗原結合ドメインが結合する抗原が異なる抗原であって試験に使用する移植細胞が発現していない抗原に結合する抗原結合分子を対照として、被験物質の抗原結合分子と同様に使用し、被験物質の抗原結合分子が、対照として使用された抗原結合分子よりも強い細胞傷害活性を示すことにより、活性を判定し得る。そして、そのような被験物質を選択することができる。

[0058] また、生体内 (in vivo) で細胞傷害活性を評価又は測定するために、例えば被験物質の抗原結合分子の対象となる癌細胞又は癌細胞を含む腫瘍組織を、本発明の非ヒト動物の皮内又は皮下に移植後、当日又は翌日から毎日又は数日間隔で被験抗原結合分子を静脈又は腹腔内に投与する。腫瘍の大きさを経日的に測定することにより、当該腫瘍の大きさの変化の差異を細胞傷害活性と規定し得る。インビトロでの評価と同様に対照となる抗原結合分子を投与し、被験物質の抗原結合分子の投与群における腫瘍の大きさが対照抗原結合分子の投与群における腫瘍の大きさよりも有意に小さいことにより、本発明の抗原結合分子が細胞傷害活性を有すると判定し得る。そして、そのような被験物質を選択することができる。

[0059] また、被験物質を投与した本発明の非ヒト動物において、被験物質の血中濃度を測定することにより、被験物質の薬物動態学的特性を評価することもできる。ここで「薬物動態学的特性」とは、動物の体内における被験物質の有効血中濃度、血中半減期や消失速度等の特性を意味する。例えば有効血中濃度が高い、血中半減期が長い、または消失速度が遅い物質ほど、薬物動態学的特性は優れていると判断される。被験物質の血中濃度の測定の手法については特に限定されるものではない。被験物質がタンパク質（抗体を含む）である場合には、例えば、ELISA法が挙げられ、被験物質が低分子化合物である場合には、例えば、液体クロマトグラフィー質量分析（LC-MS）法が挙げられる。血中濃度から薬物動態学的特性を評価する方法論については、文献（Igawa et al. (2010) Nat. Biotechnol. 28:1203-1207）を参照のこと。

上記本発明の被験物質の評価方法を利用することにより、所望の活性を有するヒトCD3およびヒト癌特異的抗原に対する抗体を効率的に選抜することが可能である。従って、本発明は、このような抗体の選抜方法をも提供する。

[0060] ヒト癌特異的抗原を発現するマウス癌細胞株を移植し、次いで被験物質としてのヒトCD3およびヒト癌特異的抗原に対する抗体を投与した非ヒト動物において、癌細胞株の増殖が抑制されたか否かを測定し、当該症状を抑制する抗体を選抜することにより、ヒト癌特異的抗原を発現する癌細胞の増殖を効率的に阻害する抗体を取得することができる。

また、生産した抗体を投与した非ヒト動物において、抗体の血中濃度を測定し、所望の血中濃度を有する抗体を選抜することにより、所望の体内動態を有する、ヒトCD3および癌特異的抗原の両者に結合する抗体を取得することができる。

こうして活性の評価および選抜を行った抗体がマウスモノクローナル抗体などである場合には、当該抗体をキメラ化またはヒト型化して、ヒトに投与した場合に抗原性が少なく、ひいては副作用の少ない抗体を取得することが

できる。

[0061] 本発明の一態様として、上述の悪性腫瘍性疾患の治療薬のスクリーニング方法に提供される抗原結合分子は、（１）ヒトCD3結合ドメイン、及び（２）癌特異的抗原結合ドメインを含むものであればよく、その構造は限定されない。当該抗原結合分子は、これら２つの結合ドメインを含むことにより、癌細胞又は当該細胞を含む腫瘍組織に対して、活性化T細胞による優れた細胞傷害作用を誘導することが可能となる。本発明の（１）及び（２）に記載の結合ドメインは、それぞれ、後述するヒトCD3抗原あるいは、癌特異的抗原から適宜選択することができる。これらの結合ドメインは、ペプチド結合で直接連結することもできるし、リンカーを介して結合することもできる。

[0062] 本発明の抗原結合分子は、さらに、FcRn結合ドメインを含んでいてもよい。該FcRn結合ドメインとして、後述の抗体のFc領域を用いる場合は、Fc γ 受容体に対する結合活性が低下しているFc領域が好ましい。Fc γ 受容体に対する結合活性を低下させることで、Fc γ 受容体発現細胞とT細胞受容体複合体を発現する細胞の間の架橋によって生じるサイトカインリリース等の全身性の免疫活性化によって生じる副作用を抑制することが可能である。

[0063] 本発明の抗原結合分子は、後述の公知の方法を用いて作製することができる。

例えば、（１）ヒトCD3結合ドメインとしてF(ab')₂、（２）癌特異的抗原結合ドメインとしてF(ab')₂を用い、（３）FcRn結合ドメインとして、Fc γ 受容体に対する結合活性が低下しているFc領域を含むドメインを用いた場合に、（１）と（２）に記載された抗原結合ドメインと（３）に記載されたFc領域を含むドメインとをペプチド結合で直接連結したときは、連結されたポリペプチドは抗体の構造を形成する。そのような抗体を作製するためには前述のハイブリドーマの培養液から精製する他、当該抗体を構成するポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを安定に保持している所望の宿主細胞の培養液から当該抗体を精製することもできる。

[0064] また、その他、リンカーを介して各ドメインを結合する場合は、採用され

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

[0065] 本発明における種々の疾患の治療薬のスクリーニング方法又は製造方法において、「CD3結合ドメイン」を含む抗原結合分子を被験物質として用いる場合、CD3結合ドメインは一または複数の抗体の可変ドメインより提供され得る。好ましくは、CD3結合ドメインはCD3抗体の軽鎖可変領域（VL）とCD3抗体の重鎖可変領域（VH）とを含む。こうしたCD3結合ドメインの例としては、「sc Fv (single chain Fv)」、「単鎖抗体 (single chain antibody)」、「Fv」、「scFv2 (single chain Fv 2)」、「Fab」または「F(ab')₂」等が好適に挙げられる。

[0066] 本発明に係るCD3結合ドメインは、ヒトCD3を構成する γ 鎖、 δ 鎖又は ϵ 鎖配列に存在するエピトープであればいずれのエピトープに結合するものでもあり得る。本発明において、好ましくはヒトCD3複合体の ϵ 鎖の細胞外領域に存在するエピトープに結合するCD3抗体の軽鎖可変領域（VL）とCD3抗体の重鎖可変領域（VH）とを含むCD3結合ドメインが好適に用いられる。こうしたCD3結合ドメインとしては、OKT3抗体（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1980) 77, 4914-4917）や種々の公知のCD3抗体の軽鎖可変領域（VL）とCD3抗体の重鎖可変領域（VH）とを含むCD3結合ドメインが好適に用いられる。また、ヒトCD3を構成する γ 鎖、 δ 鎖又は ϵ 鎖を後述の方法によって所望の動物に免疫することによって取得された所望の性質を有するCD3抗体を起源とするCD3結合ドメインが適宜使用され得る。CD3結合ドメインの起源となるCD3抗体は下記のとおり適宜ヒト化された抗体やヒト抗体が適宜用いられる。

[0067] 本発明に係る癌特異的抗原結合ドメインが結合する「癌特異的抗原」とは、癌細胞と健常細胞を区別することを可能とする、癌細胞が発現する抗原を

意味し、例えば、細胞の悪性化に伴って発現する抗原、細胞が、がん化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖が含まれる。具体的には、例えば、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膵臓癌抗原、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、CD 19、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GD 3、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癌胎児トロホ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、骨髓細胞に認められるSSEA-1、VEP8、VEP9、My1、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AH6、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EGF受容体、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EGF受容体に認められる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、骨髓細胞に認められるT

5A7、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-CO-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CO-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-EOS-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。本発明の癌特異的抗原結合ドメインの対象となる癌特異的抗原としては、特に、細胞表面に発現するものが好ましく、そのような癌特異的抗原としては、例えば、CD19、CD20、EGFR、HER2、EpCAM、EREG、GPC3があげられる。

[0068] 本発明における、抗原結合分子のライブラリーとは、ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを含む抗原結合分子が1又は複数含まれるライブラリーを意味する。

[0069] 本発明の非限定の一態様として、以下の工程(1)~(2)：

(1) 上述の遺伝子改変非ヒト動物、その臓器、組織または細胞と被験物質を接触させる工程、及び(2) 該非ヒト動物個体、その臓器、組織または細胞に対する被験物質の薬効及び/又は毒性を指標として、候補被験物質を選択する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬の製造方法を提供する。

例えば非限定の一態様として、薬効が認められた被験物質、及び/又は毒性が認められなかった、または許容できる被験物質を選択することができる。

また、非限定の一態様として、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の代わり

に、アレルギー、T細胞の異常に関わる疾患、移植片拒絶反応等の治療又は予防薬の製造方法が提供される。

[0070] 本発明の一態様として、以下の工程（１）～（３）：

（１）ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを含む抗原結合分子のライブラリーのうち１つを被験物質として、上述の第1の遺伝子改変非ヒト動物に投与する工程、

（２）該癌特異的抗原を発現する細胞に対する該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を測定する工程、及び

（３）該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を、該第1の非ヒト動物とは異なる第2の遺伝子改変非ヒト動物に投与された対照物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性と比較する工程、を含む、悪性腫瘍性疾患の治療薬の製造方法を提供する。

第1および第2の遺伝子改変非ヒト動物は、例えば内因性CD3遺伝子について同じ改変が施されているものを使用することができる。対照物質としては対照抗体が挙げられ、例えば、対照抗体に比べ、細胞増殖抑制効果が高い被験物質を選択したり、薬物動態学的特性が良好な被験物質を選択することにより、優れた悪性腫瘍性疾患の治療薬を製造することが可能である。

[0071] 本発明の一態様として、以下の工程（１）～（４）：

（１）ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを含む二重特異性抗体のライブラリーのうち１つを被験物質として、上述の遺伝子改変非ヒト動物に投与する工程、

（２）対照抗体と比較して、該癌特異的抗原を発現する細胞に対する該抗体の細胞増殖抑制効果が高いヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを選択する工程、

（３）（２）で選択されたヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを連結した二重特異性抗体をコードする遺伝子を得る工程、及び

（４）（３）で調製された遺伝子を用いて二重特異性抗体を製造する工程、を含む、二重特異性抗体の製造方法を提供する。

対照抗体としては、ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインに結合する抗体を適宜用いてよい。

[0072] 本発明における非限定の一態様において、上述した本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、ヒト癌特異的抗原遺伝子、ヒト免疫チェックポイント遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子の遺伝子をさらに発現する、遺伝子改変非ヒト動物であってもよい。ヒト癌特異的抗原とは、癌細胞と健常細胞を区別することを可能とする、癌細胞が発現する抗原を意味し、例えば、細胞の悪性化に伴って発現する抗原、細胞が、がん化した際に細胞表面やタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖が含まれる。「免疫チェックポイント」とは、免疫担当細胞上に発現し、リガンドと結合することによって、当該免疫担当細胞に対し免疫応答を阻害するシグナルを伝達する分子をいう。免疫チェックポイントおよびそのリガンドには、例えば、PD-1、CTLA-4、TIM3、LAG3、PD-L1、PD-L2、BTLA、B7-H3、B7-H4、CD48、CD80、CD86、CD160、CD60、CD86、またはVISTA等の分子が含まれるが、これらに限定されない。「免疫共刺激分子」とは、免疫担当細胞上に発現し、リガンドと結合することによって、当該免疫担当細胞に対し免疫応答を活性化するシグナルを伝達する分子をいう。免疫共刺激分子として、例えば、CD28、ICOS、CD137、CD137L、CD40、CD40L、OX40、OX40L、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、RANK、RANKL、CD30、CD153、GITR、GITRL等の分子が含まれるが、これに限定されることはない。ヒト癌特異的抗原遺伝子、ヒト免疫チェックポイント遺伝子、及び／又はヒト免疫共刺激分子をさらに発現する上記遺伝子改変動物は、これに限定されることはないが、ヒトCD3遺伝子を発現する遺伝子改変動物とヒト癌特異的抗原遺伝子、ヒト免疫チェックポイント遺伝子及び／又はヒト免疫共刺激分子を発現する遺伝子改変動物を交雑する等、当業者公知の方法を適宜用いることによって作製することができる。

[0073] 上述したスクリーニング方法は、「癌特異的抗原を標的とする悪性腫瘍性疾患の治療薬」、「免疫チェックポイント阻害剤」あるいは「免疫共刺激賦活剤」のスクリーニング方法としても利用することができる。本発明におけ

る「免疫チェックポイント阻害剤」とは、免疫チェックポイントとそのリガンドとの結合を阻害すること等により、当該免疫チェックポイントによるシグナル伝達を阻害する薬剤をいう。「免疫共刺激賦活剤」とは、免疫共刺激分子のリガンドの代わりに結合すること等により、当該免疫共刺激分子によるシグナル伝達を賦活化する薬剤をいう。

[0074] 非限定の一態様として、本発明の遺伝子改変非ヒト動物は、CD3分子の細胞外領域だけでなく、膜貫通領域、及び細胞質領域もヒト化されていることから、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 、CD3 γ の細胞外領域のみならず、膜貫通領域及び／又は細胞質領域を標的とした化合物のスクリーニングにも利用することができる。細胞内外の関連分子との相互作用を調節する化合物のスクリーニングにも、本発明の遺伝子改変ヒト動物を利用することができる。T細胞機能を賦活化あるいは阻害する作用を有する免疫調節薬のスクリーニングにも、本発明の遺伝子改変ヒト動物を利用することができる。

[0075] 抗体

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

[0076] 所望の結合活性を有する抗体を作製する方法は当業者において公知であり、ポリクローナルまたはモノクローナル抗体として取得され得る。本発明において抗体としては、哺乳動物由来のモノクローナル抗体が好適に作製され得る。哺乳動物由来のモノクローナル抗体には、ハイブリドーマにより産生

されるもの、および遺伝子工学的手法により抗体遺伝子を含む発現ベクターで形質転換した宿主細胞によって産生されるもの等が含まれる。

[0077] 抗体取得のために免疫される哺乳動物としては、特定の動物に限定されるものではないが、ハイブリドーマ作製のための細胞融合に使用する親細胞との適合性を考慮して選択するのが好ましい。一般的にはげっ歯類の動物、例えば、マウス、ラット、ハムスター、あるいはウサギ、サル等が好適に使用される。

[0078] 公知の方法にしたがって上記の動物が感作抗原により免疫される。例えば、一般的な方法として、感作抗原が哺乳動物の腹腔内または皮下に注射によって投与されることにより免疫が実施される。具体的には、PBS (Phosphate-Buffered Saline) や生理食塩水等で適当な希釈倍率で希釈された感作抗原が、所望により通常のアジュバント、例えばフロイント完全アジュバントと混合され、乳化された後に、該感作抗原が哺乳動物に4から21日毎に数回投与される。また、感作抗原の免疫時には適当な担体を使用され得る。特に分子量の小さい部分ペプチドが感作抗原として用いられる場合には、アルブミン、キーホールリンペットヘモシアニン等の担体タンパク質と結合した該感作抗原ペプチドを免疫することが望ましい場合もある。

[0079] また、所望の抗体を産生するハイブリドーマは、DNA免疫を使用し、以下のようにしても作製され得る。DNA免疫とは、免疫動物中で抗原タンパク質をコードする遺伝子が発現され得るような態様で構築されたベクターDNAが投与された当該免疫動物中で、感作抗原が当該免疫動物の生体内で発現されることによって、免疫刺激が与えられる免疫方法である。蛋白質抗原が免疫動物に投与される一般的な免疫方法と比べて、DNA免疫には、次のような優位性が期待される。

—膜蛋白質の構造を維持して免疫刺激が与えられ得る

—免疫抗原を精製する必要が無い

[0080] DNA免疫によってモノクローナル抗体を得るために、まず、抗原タンパク質を発現するDNAが免疫動物に投与される。抗原タンパク質をコードするDNAは

、PCRなどの公知の方法によって合成され得る。得られたDNAが適当な発現ベクターに挿入され、免疫動物に投与される。発現ベクターとしては、たとえばpcDNA3.1などの市販の発現ベクターが好適に利用され得る。ベクターを生体に投与する方法として、一般的に用いられている方法が利用され得る。たとえば、発現ベクターが吸着した金粒子が、gene gunで免疫動物個体の細胞内に導入されることによってDNA免疫が行われる。

[0081] このように哺乳動物が免疫され、血清中における抗原に結合する抗体力価の上昇が確認された後に、哺乳動物から免疫細胞が採取され、細胞融合に供される。好ましい免疫細胞としては、特に脾細胞が使用され得る。

[0082] 前記免疫細胞と融合される細胞として、哺乳動物のミエローマ細胞が用いられる。ミエローマ細胞は、スクリーニングのための適当な選択マーカーを備えていることが好ましい。選択マーカーとは、特定の培養条件の下で生存できる（あるいはできない）形質を指す。選択マーカーには、ヒポキサンチン-グアニン-ホスホリボシルトランスフェラーゼ欠損（以下HGPRT欠損と省略する）、あるいはチミジンキナーゼ欠損（以下TK欠損と省略する）などが公知である。HGPRTやTKの欠損を有する細胞は、ヒポキサンチン-アミノプテリン-チミジン感受性（以下HAT感受性と省略する）を有する。HAT感受性の細胞はHAT選択培地中でDNA合成を行うことができず死滅するが、正常な細胞と融合すると正常細胞のサルベージ回路を利用してDNAの合成を継続することができるためHAT選択培地中でも増殖するようになる。

[0083] HGPRT欠損やTK欠損の細胞は、それぞれ6チオグアニン、8アザグアニン（以下8AGと省略する）、あるいは5' ブロモデオキシウリジンを含む培地で選択され得る。これらのピリミジンアナログをDNA中に取り込む正常な細胞は死滅する。他方、これらのピリミジンアナログを取り込めないこれらの酵素を欠損した細胞は、選択培地の中で生存することができる。この他G418耐性と呼ばれる選択マーカーは、ネオマイシン耐性遺伝子によって2-デオキシストレプトアミン系抗生物質（ゲンタマイシン類似体）に対する耐性を与える。細胞融合に好適な種々のミエローマ細胞が公知である。

[0084] このようなミエローマ細胞として、例えば、P3 (P3x63Ag8.653) (J. Immunol. (1979) 123 (4), 1548-1550)、P3x63Ag8U.1 (Current Topics in Microbiology and Immunology (1978) 81, 1-7)、NS-1 (C. Eur. J. Immunol. (1976) 6 (7), 511-519)、MPC-11 (Cell (1976) 8 (3), 405-415)、SP2/0 (Nature (1978) 276 (5685), 269-270)、F0 (J. Immunol. Methods (1980) 35 (1-2), 1-21)、S194/5.XX0.BU.1 (J. Exp. Med. (1978) 148 (1), 313-323)、R210 (Nature (1979) 277 (5692), 131-133) 等が好適に使用され得る。

[0085] 基本的には公知の方法、たとえば、ケーラーとミルスティンらの方法 (Methods Enzymol. (1981) 73, 3-46) 等に準じて、前記免疫細胞とミエローマ細胞との細胞融合が行われる。

[0086] より具体的には、例えば細胞融合促進剤の存在下で通常の栄養培養液中で、前記細胞融合が実施され得る。融合促進剤としては、例えばポリエチレングリコール (PEG)、センダイウイルス (HVJ) 等が使用され、更に融合効率を高めるために所望によりジメチルスルホキシド等の補助剤が添加されて使用される。

[0087] 免疫細胞とミエローマ細胞との使用割合は任意に設定され得る。例えば、ミエローマ細胞に対して免疫細胞を1から10倍とするのが好ましい。前記細胞融合に用いる培養液としては、例えば、前記ミエローマ細胞株の増殖に好適なRPMI1640培養液、MEM培養液、その他、この種の細胞培養に用いられる通常の培養液が使用され、さらに、牛胎児血清 (FCS) 等の血清補液が好適に添加され得る。

[0088] 細胞融合は、前記免疫細胞とミエローマ細胞との所定量を前記培養液中でよく混合し、予め37℃程度に加温されたPEG溶液 (例えば平均分子量1000から6000程度) が通常30から60% (w/v) の濃度で添加される。混合液が緩やかに混合されることによって所望の融合細胞 (ハイブリドーマ) が形成される。次いで、上記に挙げた適当な培養液が逐次添加され、遠心して上清を除去する操作を繰り返すことによりハイブリドーマの生育に好ましくない細胞融合

剤等が除去され得る。

[0089] このようにして得られたハイブリドーマは、細胞融合に用いられたミエローマが有する選択マーカーに応じた選択培養液を利用することによって選択され得る。例えばHGPRTやTKの欠損を有する細胞は、HAT培養液（ヒポキサンチン、アミノプテリンおよびチミジンを含む培養液）で培養することにより選択され得る。すなわち、HAT感受性のミエローマ細胞を細胞融合に用いた場合、HAT培養液中で、正常細胞との細胞融合に成功した細胞が選択的に増殖し得る。所望のハイブリドーマ以外の細胞（非融合細胞）が死滅するのに十分な時間、上記HAT培養液を用いた培養が継続される。具体的には、一般に、数日から数週間の培養によって、所望のハイブリドーマが選択され得る。次いで、通常の限界希釈法によって、所望の抗体を産生するハイブリドーマのスクリーニングおよび単クローニングが実施され得る。

[0090] 所望の抗体のスクリーニングおよび単クローニングが、公知の抗原抗体反応に基づくスクリーニング方法によって好適に実施され得る。所望の抗体は、例えば、FACS (fluorescence activated cell sorting) によってスクリーニングされ得る。FACSは、蛍光抗体と接触させた細胞をレーザー光で解析し、個々の細胞が発する蛍光を測定することによって細胞表面への抗体の結合を測定することを可能にするシステムである。

[0091] FACSによってモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマをスクリーニングするためには、まず産生される抗体が結合する抗原を発現する細胞を調製する。スクリーニングのための好ましい細胞は、当該抗原を強制発現させた哺乳動物細胞である。宿主細胞として使用した形質転換されていない哺乳動物細胞を対照として用いることによって、細胞表面の抗原に対する抗体の結合活性が選択的に検出され得る。すなわち、宿主細胞に結合せず、抗原を強制発現させた細胞に結合する抗体を産生するハイブリドーマを選択することによって、所望のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが取得され得る。

[0092] あるいは対象となる抗原を発現した細胞を固定化し、当該抗原発現細胞に

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

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

[0093] 当該ハイブリドーマを通常の方法に従い培養し、その培養上清から所望のモノクローナル抗体が取得され得る。あるいはハイブリドーマをこれと適合性がある哺乳動物に投与して増殖せしめ、その腹水からモノクローナル抗体が取得され得る。前者の方法は、高純度の抗体を得るのに好適なものである。

[0094] 当該ハイブリドーマ等の抗体産生細胞からクローニングされる抗体遺伝子によってコードされる抗体も好適に利用され得る。クローニングした抗体遺伝子を適当なベクターに組み込んで宿主に導入することによって、当該遺伝子によってコードされる抗体が発現する。抗体遺伝子の単離と、ベクターへの導入、そして宿主細胞の形質転換のための方法は例えば、Vandammeらによって既に確立されている (Eur. J. Biochem. (1990) 192 (3), 767-775)。下記に述べるように組換え抗体の製造方法もまた公知である。

[0095] 抗体の可変領域 (V領域) をコードするcDNAを取得するためには、通常、まずハイブリドーマから全RNAが抽出される。細胞からmRNAを抽出する方法として、たとえば次のような方法を利用することができる。

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

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

[0096] 抽出されたmRNAは、例えばmRNA Purification Kit (GEヘルスケアバイオ

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

[0097] 得られたPCR産物から目的とするcDNA断片が精製され、次いでベクターDNAと連結される。このように組換えベクターが作製され、大腸菌等に導入されコロニーが選択された後に、該コロニーを形成した大腸菌から所望の組換えベクターが調製され得る。そして、該組換えベクターが目的とするcDNAの塩基配列を有しているか否かについて、公知の方法、例えば、ジデオキシヌクレオチドチェインターミネーション法等により確認される。

[0098] 可変領域をコードする遺伝子を取得するためには、可変領域遺伝子増幅用のプライマーを使った5'-RACE法を利用するのが簡便である。まずハイブリドーマ細胞より抽出されたRNAを鋳型としてcDNAが合成され、5'-RACE cDNAライブラリーが得られる。5'-RACE cDNAライブラリーの合成にはSMART RACE cDNA 増幅キットなど市販のキットが適宜用いられる。

[0099] 得られた5'-RACE cDNAライブラリーを鋳型として、PCR法によって抗体遺伝子が増幅される。公知の抗体遺伝子配列をもとにマウス抗体遺伝子増幅用のプライマーがデザインされ得る。これらのプライマーは、イムノグロブリンのサブクラスごとに異なる塩基配列である。したがって、サブクラスは予めIso Stripマウスモノクローナル抗体アイソタイピングキット (ロシュ・ダイアグノスティックス) などの市販キットを用いて決定しておくことが望まし

い。

[0100] 具体的には、たとえばマウスIgGをコードする遺伝子の取得を目的とするときには、重鎖として $\gamma 1$ 、 $\gamma 2a$ 、 $\gamma 2b$ 、 $\gamma 3$ 、軽鎖として κ 鎖と λ 鎖をコードする遺伝子の増幅が可能なプライマーが利用され得る。IgGの可変領域遺伝子を増幅するためには、一般に3'側のプライマーには可変領域に近い定常領域に相当する部分にアニールするプライマーが利用される。一方5'側のプライマーには、5' RACE cDNAライブラリー作製キットに付属するプライマーが利用される。

[0101] こうして増幅されたPCR産物を利用して、重鎖と軽鎖の組み合わせからなるイムノグロブリンが再構成され得る。再構成されたイムノグロブリンの、抗原に対する結合活性を指標として、所望の抗体がスクリーニングされ得る。たとえば次のようにしてスクリーニングされ得る；

- (1) ハイブリドーマから得られたcDNAによってコードされるV領域を含む抗体を所望の抗原発現細胞に接触させる工程、
- (2) 該抗原発現細胞と抗体との結合を検出する工程、および
- (3) 該抗原発現細胞に結合する抗体を選択する工程。

[0102] 抗体と該抗原発現細胞との結合を検出する方法は公知である。具体的には、先に述べたFACSなどの手法によって、抗体と該抗原発現細胞との結合が検出され得る。抗体の結合活性を評価するために該抗原発現細胞の固定標本が適宜利用され得る。

[0103] 結合活性を指標とする抗体のスクリーニング方法として、ファージベクターを利用したパニング法も好適に用いられる。ポリクローナルな抗体発現細胞群より抗体遺伝子を重鎖と軽鎖のサブクラスのライブラリーとして取得した場合には、ファージベクターを利用したスクリーニング方法が有利である。重鎖と軽鎖の可変領域をコードする遺伝子は、適当なリンカー配列で連結することによってシングルチェーンFv (scFv) を形成することができる。scFvをコードする遺伝子をファージベクターに挿入することにより、scFvを表面に発現するファージが取得され得る。このファージと所望の抗原との接触の

後に、抗原に結合したファージを回収することによって、目的の結合活性を有するscFvをコードするDNAが回収され得る。この操作を必要に応じて繰り返すことにより、所望の結合活性を有するscFvが濃縮され得る。

[0104] 目的とする抗体のV領域をコードするcDNAが得られた後に、当該cDNAの両末端に挿入した制限酵素サイトを認識する制限酵素によって該cDNAが消化される。好ましい制限酵素は、抗体遺伝子を構成する塩基配列に出現する頻度が低い塩基配列を認識して消化する。更に1コピーの消化断片をベクターに正しい方向で挿入するためには、付着末端を与える制限酵素の挿入が好ましい。上記のようにして消化された抗体のV領域をコードするcDNAを適当な発現ベクターに挿入することによって、抗体発現ベクターが取得され得る。このとき、抗体定常領域（C領域）をコードする遺伝子と、前記V領域をコードする遺伝子とがインフレームで融合されれば、キメラ抗体が取得される。ここで、キメラ抗体とは、定常領域と可変領域の由来が異なることをいう。したがって、マウスーヒトなどの異種キメラ抗体に加え、ヒトーヒト同種キメラ抗体も、本発明におけるキメラ抗体に含まれる。予め定常領域を有する発現ベクターに、前記V領域遺伝子を挿入することによって、キメラ抗体発現ベクターが構築され得る。具体的には、たとえば、所望の抗体定常領域（C領域）をコードするDNAを保持した発現ベクターの5'側に、前記V領域遺伝子を消化する制限酵素の制限酵素認識配列が適宜配置され得る。同じ組み合わせの制限酵素で消化された両者がインフレームで融合されることによって、キメラ抗体発現ベクターが構築される。

[0105] モノクローナル抗体の製造には、抗体遺伝子が発現制御領域による制御の下で発現するように発現ベクターに組み込まれる。抗体を発現するための発現制御領域とは、例えば、エンハンサーやプロモーターを含む。また、発現した抗体が細胞外に分泌されるように、適切なシグナル配列がアミノ末端に付加され得る。発現されたポリペプチドから、シグナル配列がそのカルボキシル末端部分から切断され、抗体が細胞外に分泌され得る。次いで、この発現ベクターによって適当な宿主細胞が形質転換されることによって、抗体を

コードするDNAを発現する組換え細胞が取得され得る。

[0106] 抗体遺伝子の発現のために、抗体重鎖（H鎖）および軽鎖（L鎖）をコードするDNAは、それぞれ別の発現ベクターに組み込まれる。H鎖とL鎖が組み込まれたベクターによって、同じ宿主細胞に同時に形質転換（co-transfect）されることによって、H鎖とL鎖を備えた抗体分子が発現され得る。あるいはH鎖およびL鎖をコードするDNAが単一の発現ベクターに組み込まれることによって宿主細胞が形質転換され得る（国際公開W0 94/11523を参照のこと）。

[0107] 単離された抗体遺伝子を適当な宿主に導入することによって抗体を作製するための宿主細胞と発現ベクターの多くの組み合わせが公知である。これらの発現系は、いずれも本発明において、抗原結合分子や、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメイン、T細胞受容体複合体結合ドメイン等を単離・発現させるために応用され得る。

[0108] 真核細胞が宿主細胞として使用される場合、動物細胞、植物細胞、あるいは真菌細胞が適宜使用され得る。具体的には、動物細胞としては、次のような細胞が例示され得る。

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

（２）両生類細胞：アフリカツメガエル卵母細胞など

（３）昆虫細胞：sf9、sf21、Tn5など

[0109] あるいは植物細胞としては、ニコティアナ・タバカム（*Nicotiana tabacum*）などのニコティアナ（*Nicotiana*）属由来の細胞による抗体遺伝子の発現系が公知である。植物細胞の形質転換には、カルス培養した細胞が適宜利用され得る。

[0110] 更に真菌細胞としては、次のような細胞を利用することができる。

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

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

ギルス (Aspergillus) 属

- [0111] また、原核細胞を利用した抗体遺伝子の発現系も公知である。たとえば、細菌細胞を用いる場合、大腸菌 (E. coli)、枯草菌などの細菌細胞が適宜利用され得る。これらの細胞中に、目的とする抗体遺伝子を含む発現ベクターが形質転換によって導入される。形質転換された細胞を *in vitro* で培養することにより、当該形質転換細胞の培養物から所望の抗体が取得され得る。
- [0112] 組換え抗体の産生には、上記宿主細胞に加えて、トランスジェニック動物も利用され得る。すなわち所望の抗体をコードする遺伝子が導入された動物から、当該抗体を得ることができる。例えば、抗体遺伝子は、乳汁中に固有に産生されるタンパク質をコードする遺伝子の内部にインフレームで挿入することによって融合遺伝子として構築され得る。乳汁中に分泌されるタンパク質として、たとえば、ヤギ β カゼインなどを利用され得る。抗体遺伝子が挿入された融合遺伝子を含むDNA断片はヤギの胚へ注入され、当該注入された胚が雌のヤギへ導入される。胚を受容したヤギから生まれるトランスジェニックヤギ（またはその子孫）が産生する乳汁からは、所望の抗体が乳汁タンパク質との融合タンパク質として取得され得る。また、トランスジェニックヤギから産生される所望の抗体を含む乳汁量を増加させるために、ホルモンがトランスジェニックヤギに対して投与され得る (Bio/Technology (1994), 12 (7), 699-702)。
- [0113] 本明細書において記載される抗原結合分子がヒトに投与される場合、例えば、当該分子における各種結合ドメインとして、抗体の可変領域を含むドメインを用いる場合は、ヒトに対する異種抗原性を低下させること等を目的として人為的に改変した遺伝子組換え型抗体由来の抗原結合ドメインが適宜採用され得る。遺伝子組換え型抗体には、例えば、ヒト化 (Humanized) 抗体等が含まれる。これらの改変抗体は、公知の方法を用いて適宜製造される。
- [0114] 本明細書において記載される抗原結合分子における各種結合ドメインを製作するために用いられる抗体の可変領域は、通常、4つのフレームワーク領域 (FR) には含まれた3つの相補性決定領域 (complementarity-determining

region ; CDR) で構成されている。CDRは、実質的に、抗体の結合特異性を決定している領域である。CDRのアミノ酸配列は多様性に富む。一方FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも、高い同一性を示すことが多い。そのため、一般に、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を、他の抗体に移植することができるとされている。

[0115] ヒト化抗体は、再構成 (reshaped) ヒト抗体とも称される。具体的には、ヒト以外の動物、たとえばマウス抗体のCDRをヒト抗体に移植したヒト化抗体などが公知である。ヒト化抗体を得るための一般的な遺伝子組換え手法も知られている。具体的には、マウスの抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、たとえばOverlap Extension PCRが公知である。Overlap Extension PCRにおいては、ヒト抗体のFRを合成するためのプライマーに、移植すべきマウス抗体のCDRをコードする塩基配列が付加される。プライマーは4つのFRのそれぞれについて用意される。一般に、マウスCDRのヒトFRへの移植においては、マウスのFRと同一性の高いヒトFRを選択するのが、CDRの機能の維持において有利であるとされている。すなわち、一般に、移植すべきマウスCDRに隣接しているFRのアミノ酸配列と同一性の高いアミノ酸配列からなるヒトFRを利用するのが好ましい。

[0116] また連結される塩基配列は、互いにインフレームで接続されるようにデザインされる。それぞれのプライマーによってヒトFRが個別に合成される。その結果、各FRにマウスCDRをコードするDNAが付加された産物が得られる。各産物のマウスCDRをコードする塩基配列は、互いにオーバーラップするようにデザインされている。続いて、ヒト抗体遺伝子を鋳型として合成された産物のオーバーラップしたCDR部分を互いにアニールさせて相補鎖合成反応が行われる。この反応によって、ヒトFRがマウスCDRの配列を介して連結される。

[0117] 最終的に3つのCDRと4つのFRが連結されたV領域遺伝子は、その5'末端と3'末端にアニールし適当な制限酵素認識配列を付加されたプライマーによってその全長が増幅される。上記のように得られたDNAとヒト抗体C領域をコードするDNAとをインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入することに

よって、ヒト型抗体発現用ベクターが作成できる。該組込みベクターを宿主に導入して組換え細胞を樹立した後に、該組換え細胞を培養し、該ヒト化抗体をコードするDNAを発現させることによって、該ヒト化抗体が該培養細胞の培養物中に産生される（欧州特許公開EP 239400、国際公開W01996/002576参照）。

[0118] 上記のように作製したヒト化抗体の抗原への結合活性を定性的又は定量的に測定し、評価することによって、CDRを介して連結されたときに該CDRが良好な抗原結合部位を形成するようなヒト抗体のFRが好適に選択できる。必要に応じ、再構成ヒト抗体のCDRが適切な抗原結合部位を形成するようにFRのアミノ酸残基を置換することもできる。たとえば、マウスCDRのヒトFRへの移植に用いたPCR法を応用して、FRにアミノ酸配列の変異を導入することができる。具体的には、FRにアニーリングするプライマーに部分的な塩基配列の変異を導入することができる。このようなプライマーによって合成されたFRには、塩基配列の変異が導入される。アミノ酸を置換した変異型抗体の抗原への結合活性を上記の方法で測定し評価することによって所望の性質を有する変異FR配列が選択され得る（Sato, K. et al., Cancer Res, 1993, 53, 851-856）。

[0119] また、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開W01993/012227、W01992/003918、W01994/002602、W01994/025585、W01996/034096、W01996/033735参照）を免疫動物とし、DNA免疫により所望のヒト抗体が取得され得る。

[0120] さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている。例えば、ヒト抗体のV領域が一本鎖抗体（scFv）としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現される。抗原に結合するscFvを発現するファージが選択され得る。選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体のV領域をコードするDNA配列が決定できる。抗原に結合するscFvのDNA配列を決定した後、当該V領域配列を所望のヒト抗体C領域の配列とインフレームで融合させた後に適当な発

現ベクターに挿入することによって発現ベクターが作製され得る。当該発現ベクターを上記に挙げたような好適な発現細胞中に導入し、該ヒト抗体をコードする遺伝子を発現させることにより当該ヒト抗体が取得される。これらの方法は既に公知である（国際公開W01992/001047、W01992/020791、W01993/006213、W01993/011236、W01993/019172、W01995/001438、W01995/015388参照）。

[0121] ファージディスプレイ法以外にも、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として、無細胞翻訳系を使用する技術、細胞またはウイルス表面に抗原結合分子を提示する技術、エマルジョンを使用する技術等が知られている。例えば、無細胞翻訳系を使用する技術としては、終止コドンの除去等によりリボゾームを介してmRNAと翻訳されたタンパク質の複合体を形成させるリボゾームディスプレイ法、ピューロマイシン等の化合物を用いて遺伝子配列と翻訳されたタンパク質を共有結合させるcDNAディスプレイ法、mRNAディスプレイ法や、核酸に対する結合タンパク質を用いて遺伝子と翻訳されたタンパク質の複合体を形成させるCISディスプレイ法等が使用され得る。また、細胞またはウイルス表面に抗原結合分子を提示する技術としては、ファージディスプレイ法以外にも、E. coliディスプレイ法、グラム陽性菌ディスプレイ法、酵母ディスプレイ法、哺乳類細胞ディスプレイ法、ウイルスディスプレイ法等が使用され得る。エマルジョンを使用する技術としては、エマルジョン中に遺伝子及び翻訳関連分子を内包させることによる、インビトロウイルスディスプレイ法等が使用され得る。これらの方法は既に公知である（Nat Biotechnol. 2000 Dec;18(12):1287-92、Nucleic Acids Res. 2006;34(19):e127、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Mar 2;101(9):2806-10、Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jun 22;101(25):9193-8、Protein Eng Des Sel. 2008 Apr;21(4):247-55、Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Sep 26;97(20):10701-5、MAbs. 2010 Sep-Oct;2(5):508-18、Methods Mol Biol. 2012;911:183-98）。

[0122] 本発明において「特異的」とは、特異的に結合する分子の一方の分子がそ

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

[0123] また、抗原中に存在する抗原決定基を意味する「エピトープ」は、本明細書において開示される抗原結合分子中の各種結合ドメインが結合する抗原上の部位を意味する。よって、例えば、エピトープは、その構造によって定義され得る。また、当該エピトープを認識する抗原結合分子中の抗原に対する結合活性によっても当該エピトープが定義され得る。抗原がペプチド又はポリペプチドである場合には、エピトープを構成するアミノ酸残基によってエピトープを特定することも可能である。また、エピトープが糖鎖である場合には、特定の糖鎖構造によってエピトープを特定することも可能である。

[0124] 抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原発現細胞に対する結合活性を測定する方法としては、例えば、Antibodies A Laboratory Manual記載の方法 (Ed Harlow, David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory (1988) 359-420) が挙げられる。即ち、抗原発現細胞を抗原とするELISAやFACS (fluorescence activated cell sorting) の原理によって評価され得る。

[0125] ELISAフォーマットにおいて、抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原発現細胞に対する結合活性は、酵素反応によって生成するシグナルレベルを比較することによって定量的に評価される。すなわち、抗原発現細胞を固定化したELISAプレートに被験抗原結合分子を加え、該細胞に結合した被験抗原結合分子が、被験抗原結合分子を認識する酵素標識抗体を利用して検出される。あるいはFACSにおいては、被験抗原結合分子の希釈系列を作成し、抗原発現細胞に対する抗体結合力価 (titer) を決定することにより、抗原発現細胞に対する被験抗原結合分子の結合活性が比較され得る。

[0126] 緩衝液等に懸濁した細胞表面上に発現している抗原に対する被験抗原結合

分子の結合は、フローサイトメーターによって検出することができる。フローサイトメーターとしては、例えば、次のような装置が知られている。

FACSCanto™ II

FACSAria™

FACSArray™

FACSVantage™ SE

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

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

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

[0127] 例えば、上述の抗原結合ドメインを含む被験抗原結合分子の抗原に対する結合活性の好適な測定方法の一例として、次の方法が挙げられる。まず、抗原を発現する細胞と反応させた被験抗原結合分子を認識するFITC標識した二次抗体で染色する。被験抗原結合分子を適宜好適な緩衝液によって希釈することによって、当該抗原結合分子が所望の濃度に調製して用いられる。例えば、 $10\mu\text{g/ml}$ から 10 ng/ml までの間のいずれかの濃度で使用され得る。次に、FACSCalibur (BD社) により蛍光強度と細胞数が測定される。当該細胞に対する抗体の結合量は、CELL QUEST Software (BD社) を用いて解析することにより得られた蛍光強度、すなわちGeometric Meanの値に反映される。すなわち、当該Geometric Meanの値を得ることにより、被験抗原結合分子の結合量によって表される被験抗原結合分子の結合活性が測定され得る。

[0128] また、本発明において「抗原結合分子」は、単一のポリペプチド鎖内に、「抗体の可変領域」を形成する重鎖および軽鎖の両方を含むが、定常領域を欠いている抗体断片であってもよい。そのような抗体断片としては、例えば、ダイアボディ(diabody ; Db)、scFv、単鎖抗体、sc(Fv)₂、sc(Fab')₂であってもよい。

- [0129] 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L鎖可変領域(VL)及びH鎖可変領域(VH)が、互いに結合できない位に短い、例えば、5残基程度のリンカーにより結合されている。
- [0130] 同一ポリペプチド鎖上にコードされるVLとVHとは、その間のリンカーが短いため単鎖可変領域フラグメントを形成することが出来ず、二量体化することにより、2つの抗原結合部位を形成する。
- [0131] また、本明細書において、「scFv」、「単鎖抗体」、または「sc(Fv)2」という用語は、単一のポリペプチド鎖内に、重鎖および軽鎖の両方に由来する可変領域を含むが、定常領域を欠いている抗体断片を意味する。一般に、単鎖抗体は、抗原結合を可能にすると思われる所望の構造を形成するのを可能にする、VHドメインとVLドメインの間のポリペプチドリinkerをさらに含む。単鎖抗体は、The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113巻, Rosenberg、及び、Moore編, Springer-Verlag, New York, 269~315 (1994)においてPluckthunによって詳細に考察されている。同様に、国際特許出願公開W01988/001649および米国特許第4,946,778号および同第5,260,203号を参照。特定の態様において、単鎖抗体はまた、二重特異性であるか、かつ／またはヒト化され得る。
- [0132] scFvはFvを構成するVHとVLとがペプチドリinkerによって連結された抗原結合ドメインである(Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1988) 85 (16), 5879-5883)。当該ペプチドリinkerによってVHとVLとが近接した状態に保持され得る。
- [0133] 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sc(Fv)2 (bispecific sc(Fv)2) も好適に挙げられる。sc(Fv)2は、当業者に公知の方法によって作製され得る。例えば、sc Fvをペプチドリンカー等のリンカーで結ぶことによって作製され得る。

[0134] 本明細書におけるsc(Fv)2を構成する抗原結合ドメインの構成としては、二つのVH及び二つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端側を基点としてVH、VL、VH、VL（[VH] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VL]）の順に並んでいることを特徴とする抗体が挙げられるが、二つのVHと2つのVLの順序は特に上記の構成に限定されず、どのような順序で並べられていてもよい。例えば以下のような、順序の構成も挙げることができる。

[VL] リンカー [VH] リンカー [VH] リンカー [VL]

[VH] リンカー [VL] リンカー [VL] リンカー [VH]

[VH] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VL]

[VL] リンカー [VL] リンカー [VH] リンカー [VH]

[VL] リンカー [VH] リンカー [VL] リンカー [VH]

[0135] sc(Fv)2の分子形態についてはW02006/132352においても詳細に記載されており、当業者であればこれらの記載に基づいて、本明細書で開示される抗原結合分子の作製のために適宜所望のsc(Fv)2を作製することが可能である。

[0136] ここで、Fv (variable fragment) は、抗体の軽鎖可変領域 (VL (light chain variable region)) と抗体の重鎖可変領域 (VH (heavy chain variable region)) とのペアからなる抗体由来の抗原結合ドメインの最小単位を意味する。1988年にSkerraとPluckthunは、バクテリアのシグナル配列の下流に抗体の遺伝子を挿入し大腸菌中で当該遺伝子の発現を誘導することによって、均一でかつ活性を保持した状態で大腸菌のペリプラズム画分から調製されることを見出した (Science (1988) 240 (4855), 1038-1041)。ペリプラズム画分から調製されたFvは、抗原に対する結合を有する態様でVHとVLが会合していた。

[0137] また本発明の抗原結合分子は、PEG等のキャリアー高分子や抗がん剤等の有機化合物をコンジュゲートしてもよい。また糖鎖付加配列を挿入し、糖鎖が

所望の効果を得ることを目的として好適に付加され得る。

[0138] 抗体の可変領域を結合するリンカーとしては、遺伝子工学により導入し得る任意のペプチドリンカー、又は合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996参照）に開示されるリンカー等を用いることができるが、本発明においてはペプチドリンカーが好ましい。ペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能であるが、好ましい長さは5アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは15アミノ酸である。sc(Fv)₂に3つのペプチドリンカーが含まれる場合には、全て同じ長さのペプチドリンカーを用いてもよいし、異なる長さのペプチドリンカーを用いてもよい。

[0139] 例えば、ペプチドリンカーの場合：

Ser

Gly · Ser

Gly · Gly · Ser

Ser · Gly · Gly

Gly · Gly · Gly · Ser（配列番号：10）

Ser · Gly · Gly · Gly（配列番号：11）

Gly · Gly · Gly · Gly · Ser（配列番号：12）

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly（配列番号：13）

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser（配列番号：14）

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly（配列番号：15）

Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Ser（配列番号：16）

Ser · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly · Gly（配列番号：17）

(Gly · Gly · Gly · Gly · Ser（配列番号：12）)_n

(Ser · Gly · Gly · Gly · Gly（配列番号：13）)_n

[nは1以上の整数である]等を挙げることができる。但し、ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

- [0140] 合成化合物リンカー（化学架橋剤）は、ペプチドの架橋に通常用いられている架橋剤、例えばN-ヒドロキシスクシンイミド（NHS）、ジスクシンイミジルスベレート（DSS）、ビス（スルホスクシンイミジル）スベレート（BS3）、ジチオビス（スクシンイミジルプロピオネート）（DSP）、ジチオビス（スルホスクシンイミジルプロピオネート）（DTSSP）、エチレングリコールビス（スクシンイミジルスクシネート）（EGS）、エチレングリコールビス（スルホスクシンイミジルスクシネート）（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジル酒石酸塩（DST）、ジスルホスクシンイミジル酒石酸塩（スルホ-DST）、ビス[2-（スクシンイミドオキシカルボニルオキシ）エチル]スルホン（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。
- [0141] 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。
- [0142] また、「Fab」は、一本の軽鎖、ならびに一本の重鎖のCH1領域および可変領域から構成される。Fab分子の重鎖は、別の重鎖分子とのジスルフィド結合を形成できない。
- [0143] 「F(ab')₂」及び「Fab'」とは、イムノグロブリン（モノクローナル抗体）をタンパク質分解酵素であるペプシンあるいはパパイン等で処理することにより製造され、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の前後で消化されて生成される抗体フラグメントを意味する。例えば、IgGをパパインで処理することにより、ヒンジ領域中の2本のH鎖間に存在するジスルフィド結合の上流で切断されてVL（L鎖可変領域）とCL（L鎖定常領域）からなるL鎖、及びVH（H鎖可変領域）とCH_γ1（H鎖定常領域中のγ1領域）とからなるH鎖フラグメントがC末端領域でジスルフィド結合により結合した相同な2つの抗体フラグメントが製造され得る。これら2つの相同な抗体フラグメントはそれぞれFab'といわれる。
- [0144] 「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ドメインの一部の定常領域を含む二本の重鎖を含む。本明細書において開示される抗原結合分子を構成するF(ab')₂は、所望の抗原結合ドメインを有する全長モノクローナル抗体等をペプシン等の蛋白質分解酵素にて部分消化した後に、Fc断片をプロテインAカラムに吸着させて除去することにより、好適に取得され得る。かかる蛋白質分解酵素としてはpH等の酵素の反応条件を適切に設定することにより制限的にF(ab')₂を生じるように全長抗体を消化し得るものであれば特段の限定はされず、例えば、ペプシンやフィシン等が例示できる。

[0145] 本発明の「抗原結合分子」の好ましい態様の1つとして、多重特異性抗体を挙げることができる。多重特異性抗体のFc領域として、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域を用いる場合、多重特異性抗体を起源とするFc領域も適宜使用される。本発明の多重特異性抗体としては、特に二重特異性抗体が好ましい。

[0146] 多重特異性抗体の会合化には、抗体H鎖の第二の定常領域（CH2）又はH鎖の第三の定常領域（CH3）の界面に電荷的な反発を導入して目的としないH鎖同士の会合を抑制する技術を適用することができる（W02006/106905）。

[0147] CH2又はCH3の界面に電荷的な反発を導入して意図しないH鎖同士の会合を抑制させる技術において、H鎖の他の定常領域の界面で接触するアミノ酸残基としては、例えばCH3領域におけるEUナンバリング356番目の残基、EUナンバリング439番目の残基、EUナンバリング357番目の残基、EUナンバリング370番目の残基、EUナンバリング399番目の残基、EUナンバリング409番目の残基に相対する領域を挙げることができる。

[0148] 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。

[0149] 更に、上記第1のH鎖CH3領域とは異なる第2のH鎖CH3領域における前記（1）～（3）に示すアミノ酸残基の組から選択されるアミノ酸残基の組であって、前記第1のH鎖CH3領域において同種の電荷を有する前記（1）～（3）に示すアミノ酸残基の組に対応する1組ないし3組のアミノ酸残基が、前記第1のH鎖CH3領域における対応するアミノ酸残基とは反対の電荷を有する抗体とすることができる。

[0150] 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。

[0151] 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）。

[0152] 上記抗体において、「同種の電荷を有する」とは、例えば、2つ以上のアミノ酸残基のいずれもが、上記（a）または（b）のいずれか1の群に含まれるアミノ酸残基を有することを意味する。「反対の電荷を有する」とは、例えば、2つ以上のアミノ酸残基のなかの少なくとも1つのアミノ酸残基が、上記（a）または（b）のいずれか1の群に含まれるアミノ酸残基を有する場合に、残りのアミノ酸残基が異なる群に含まれるアミノ酸残基を有することを意味する。

[0153] 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。

[0154] 本発明において改変に供するアミノ酸残基としては、上述した抗体の可変

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

[0155] また、本発明の多重特異性抗体の会合化には更に他の公知技術を用いることもできる。抗体の一方のH鎖の可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖(knob; 突起)に置換し、もう一方のH鎖の相対する可変領域に存在するアミノ酸側鎖をより小さい側鎖(hole; 空隙)に置換することによって、突起が空隙に配置され得るようにすることで効率的にFc領域を有する異なるアミノ酸を有するポリペプチド同士の会合化を起こすことができる (W01996/027011, Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621, Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681, US20130336973)。

[0156] これに加えて、本発明の多重特異性抗体の形成には更に他の公知技術を用いることもできる。抗体の一方のH鎖のCH3の一部をその部分に対応するIgA由来の配列にし、もう一方のH鎖のCH3の相補的な部分にその部分に対応するIgA由来の配列を導入したstrand-exchange engineered domain CH3を用いることで、異なる配列を有するポリペプチドの会合化をCH3の相補的な会合化によって効率的に引き起こすことができる (Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010)。この公知技術を使っても効率的に目的の多重特異性抗体を形成させることができる。

[0157] 他にも多重特異性抗体の形成には、W02011/028952やW02014/018572やNat Biotechnol. 2014 Feb;32(2):191-8.に記載の抗体のCH1とCLの会合化、VH、VLの会合化を利用した抗体作製技術、W02008/119353やW02011/131746に記載の別々に調製したモノクローナル抗体同士を使用して二重特異性抗体を作製する技術(Fab Arm Exchange)、W02012/058768やW02013/063702に記載の抗体重鎖のCH3間の会合を制御する技術、W02012/023053に記載の二種類の軽鎖と一

種類の重鎖とから構成される二重特異性抗体を作製する技術、Christophら（Nature Biotechnology Vol. 31, p 753-758 (2013)）に記載の1本のH鎖と1本のL鎖からなる抗体の片鎖をそれぞれ発現する2つのバクテリア細胞株を利用して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。

[0158] 多重特異性抗体の形成の一態様としては、上述したように、二種類のモノクローナル抗体を還元剤存在下で混合し、コアヒンジのdisulfide結合を開裂させたのちに、再会合させてヘテロ二量化した二重特異性抗体を得る方法が挙げられるが（FAE）、CH3領域の相互作用界面に静電相互作用（W02006/106905）を導入することにより、再会合時にさらに効率的にヘテロ二量化を誘起することができる（W02015/046467）。天然型IgGを用いたFAEでは再会合がランダムに起こるため理論上50%の効率でしか二重特異性抗体が得られないが、当該方法では高収率で二重特異性抗体を製造することができる。

[0159] また、効率的に目的の多重特異性抗体を形成させることができない場合であっても、産生された抗体の中から目的の多重特異性抗体を分離、精製することによっても、本発明の多重特異性抗体を得ることが可能である。例えば、2種類のH鎖の可変領域にアミノ酸置換を導入し等電点の差を付与することで、2種類のホモ体と目的のヘテロ抗体をイオン交換クロマトグラフィーで精製可能にする方法が報告されている（W02007114325）。また、ヘテロ体を精製する方法として、これまでに、プロテインAに結合するマウスIgG2aのH鎖とプロテインAに結合しないラットIgG2bのH鎖からなるヘテロ二量化抗体をプロテインAを用いて精製する方法が報告されている（W098050431、W095033844）。更に、IgGとProteinAの結合部位であるEUナンバリング435番目および436番目のアミノ酸残基を、Tyr、HisなどのProteinAへの結合力の異なるアミノ酸に置換したH鎖を用いることで、各H鎖とProtein Aとの相互作用を変化させ、Protein Aカラムを用いることで、ヘテロ二量化抗体のみを効率的に精製することもできる。

[0160] また、異なる複数のH鎖に結合能を与え得る共通のL鎖を取得し、多重特異性抗体の共通L鎖として用いてもよい。このような共通L鎖と異なる複数のH鎖

遺伝子を細胞に導入することによってIgGを発現させることで効率の良い多重特異性IgGの発現が可能となる（Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681）。共通H鎖を選択する際に、任意の異なるH鎖に対応し高い結合能を示す共通L鎖を選択する方法も利用することができる（W02004/065611）。

[0161] また、本発明のFc領域として、Fc領域のC末端のヘテロジェニティーが改善されたFc領域が適宜使用され得る。より具体的には、IgG1、IgG2、IgG3又はIgG4を起源とするFc領域を構成する二つのポリペプチドのアミノ酸配列のうちEUナンバリングに従って特定される446位のグリシン、及び447位のリジンが欠失したFc領域が提供される。

[0162] これらの技術を複数、例えば2個以上組合せて用いることもできる。また、これらの技術は、会合させたい2つのH鎖に適宜別々に適用させることもできる。さらに、これらの技術は、上述のFc γ 受容体に対する結合活性が低下しているFc領域に組み合わせて用いることもできる。なお、本発明の抗原結合分子は、上記改変が加えられたものをベースにして、同一のアミノ酸配列を有する抗原結合分子を別途作製したものであってもよい。

[0163] また、本明細書においては、「1の」又は「複数の」といった数量を意味する限定を記載して用語の説明をしていない限り、本明細書に記載されている用語は、特に数量が限定されたものとして解釈されず、「1又は複数の」という意味を有する用語であるものと理解される。

[0164] 本明細書に記載の1又は複数の態様を任意に組み合わせたものも、当業者の技術常識に基づいて技術的に矛盾しない限り、本発明に含まれることが当業者には当然に理解される。

[0165] なお、本明細書において引用された全ての先行技術文献は、参照として本明細書に組み入れられる。

実施例

[0166] 次に、実施例により、本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

[0167] [実施例1] ヒトCD3遺伝子置換マウスの作出

(1) マウスC d 3 遺伝子領域改変ベクターの構築 (図1 A)

マウスC d 3 ϵ 、C d 3 δ およびC d 3 γ 遺伝子が配置するゲノム領域がクローニングされている大腸菌人工染色体 (B A C) クローンを用いた。このB A C上のマウスC d 3 ϵ をコードする遺伝子領域の5' 上流、約3. 5 k bの位置にI o x P配列を挿入するとともに、さらに上流のゲノム領域を約3. 1 k b残して除去した。その際、I o x P配列をネオマイシン耐性 (n e o) 遺伝子カセットとともに導入し、R e d / E Tシステム (G e n e B r i d g e s) を利用して相同組換えにて挿入した。その際、カナマイシン添加培地にて生育できた大腸菌クローンの中から、さらにp o l y m e r a s e C h a i n R e a c t i o n (P C R) 法により増幅が正しくなされたクローンを選抜した。次いで、B A C上のC d 3 γ 遺伝子の3' 下流にI o x P配列およびR o x配列を配置した。すなわち、I o x P配列およびR o x配列を、ハイグロマイシン耐性 (H y g) 遺伝子カセットとともに導入し、R e d / E Tシステムにより相同組換えにて挿入した。その際、ハイグロマイシン添加培地にて生育できた大腸菌クローンの中から、P C R法により、I o x P配列およびR o x配列が期待通り、挿入できたクローンをP C R法にて選抜した。次いで、H y g 遺伝子カセットより3' 下流のゲノム領域を約3. 4 k b残して除去した。

[0168] (2) マウス胚性幹細胞 (E S細胞) へのマウスC d 3 遺伝子領域改変ベクターの導入 (図1 A)

マウスE S細胞 (C 5 7 B L / 6 Nマウス由来) に上記のマウスC d 3 遺伝子領域改変ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、G 4 1 8による選択培養後に得られた薬剤耐性クローンより、相同組み換え体をP C R法によってスクリーニングした。エレクトロポレーションに用いたマウスC d 3 遺伝子領域改変ベクターは、6 0 μ gをN o t Iで直鎖状化、またはN o t I未処理による環状のベクターを、フェノール/クロロホルム抽出後、エタノール沈殿させP B Sに溶解して用いた。

スクリーニングで用いたE S細胞は9 6穴プレートで培養し、1 ウェルあ

たり200 μ lのPBS溶液で2回洗浄後、以下の組成の細胞溶解緩衝液（10 $\times$ LA緩衝液II（TAKARA LA Taq用）5 μ l；25 mM MgCl₂ 5 μ l；5% NP-40 5 μ l；プロテイナーゼK（TAKARA, 20 mg/ml）2 μ l；蒸留水33 μ l）を加えて55 $^{\circ}$ C 2時間処理し、続いて95 $^{\circ}$ Cにて15分処理することで、プロテイナーゼKを失活させてPCRサンプルとした。

PCR反応混合物は、サンプル1 μ l、10 $\times$ LA緩衝液II 2.5 μ l、25 mM MgCl₂ 2.5 μ l、dNTP（2.5 mM）4 μ l、プライマー（各50 μ M）各0.1 μ l、LA Taq（TAKARA）0.25 μ l、および蒸留水14.55 μ l（全25 μ l）とした。また、PCR条件は、94 $^{\circ}$ Cにて2分間の前加熱、98 $^{\circ}$ Cにて10秒間、68 $^{\circ}$ Cにて4分30秒間の増幅サイクル35サイクル、並びに68 $^{\circ}$ Cにて5分間の複加熱とした。

使用したプライマーは以下の通りである。プライマーは、Hyg遺伝子カセット内にHyg F1474をフォワードプライマーとして配置し、g4989RをマウスCd3遺伝子改変ベクター上の3'側相同アームよりも3'下流側のマウスゲノム領域にリバースプライマーとして配置した（図2を参照）。相同組み換えを起こしたES細胞のサンプルでは、約4 kbのバンドが増幅される。Hyg F1474（前方）5' - TATCAGAGCTTTGGTTGACGG - 3'（配列番号：18）；g4989R（後方）5' - ACTCGTTGTGGCTTAGAAGCAGTAACAATACC - 3'（配列番号：19）。さらに、上記のプライマーセットにより、増幅シグナルの得られたクローンを用いて、別プライマーセットにより確認した。すなわち、マウスCd3遺伝子改変ベクター上の5'側相同アームよりも5'上流側のマウスゲノム領域に、e27248Fをフォワードプライマーとして配置し、Neo遺伝子カセット内にNeo0635Rをリバースプライマーとして配置した。相同組み換えを起こしたES細胞のサンプルでは、約4 kbのバンドが増幅される。e27248F（前方）5' - ACTGTAATC

CTAGTACTTAGGAGGCTGAGG-3' (配列番号: 20) ; N
eo0635R (後方) 5' -AATCCATCTTGTTCAATGGC
CGATCC-3' (配列番号: 21)。

[0169] (3) ヒトCD3遺伝子領域導入ベクターの構築 (図1B)

ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ およびCD3 γ 遺伝子が配置するゲノム領域がクロニングされているBACクローンを用いた。このBAC上のヒトCD3 ϵ をコードする遺伝子領域の5'上流にIoxP配列を挿入した。その際、IoxP配列をHyg遺伝子カセットとともに導入し、Red/ETシステム (GeneBridges) を利用して相同組換にて挿入した。その際、ハイグロマイシン添加培地にて生育できた大腸菌クローンの中から、さらにPCR法により増幅が正しくなされたクローンを選抜した。次いで、BAC上のヒトCD3 γ 遺伝子の3'下流に、Frt配列で両端を挟まれたピューロマイシン耐性 (Puro) 遺伝子および、そのさらに下流にRox配列を配置すべく、Neo遺伝子カセットとともに導入し、Red/ETシステムにより相同組換にて挿入した。その際、カナマイシン添加培地にて生育できた大腸菌クローンの中から、PCR法により、Frt配列、Puro遺伝子、Rox配列およびNeo遺伝子が期待通り、挿入できたクローンをPCR法にて選抜した。

[0170] (4) Cd3遺伝領域改変したマウスES細胞へのヒトCD3遺伝子領域導入ベクターおよび組換え酵素発現ベクターの導入

上述の工程においてマウスCd3遺伝子領域の標的位置に正しくIoxP配列およびRox配列を挿入できたES細胞クローン (1D4、5H1、6I5および3A5) に対して、ヒトCD3遺伝子領域導入ベクター、組換え酵素Cre発現ベクターおよび組換え酵素Dre発現ベクターをエレクトロポレーションにより導入し、ピューロマイシンによる選択培養の後、生育したES細胞クローンを遺伝子型解析した。

まず、CreおよびDreの作用により、マウスCd3遺伝子領域に配置したIoxP配列およびRox配列間にて組換えが起こり、Cd3 ϵ からC

d3 γ までのゲノム領域を欠損したクローンを選別するためのPCRスクリーニングを実施した。スクリーニングで用いたES細胞は96穴プレートで培養し、1ウェルあたり200 μ lのPBS溶液で2回洗浄後、以下の組成の細胞溶解緩衝液（10 $\times$ LA緩衝液II（TAKARA LA Taq用）5 μ l；25mM MgCl₂ 5 μ l；5% NP-40 5 μ l；プロテイナーゼK（TAKARA, 20mg/ml）2 μ l；蒸留水33 μ l）を加えて55 $^{\circ}$ C 2時間処理し、続いて95 $^{\circ}$ Cにて15分処理することで、プロテイナーゼKを失活させてPCRサンプルとした。

PCR反応混合物は、サンプル1 μ l、10 $\times$ LA緩衝液II 2.5 μ l、25mM MgCl₂ 2.5 μ l、dNTP（2.5mM）4 μ l、プライマー（各50 μ M）各0.1 μ l、LA Taq（TAKARA）0.25 μ l、および蒸留水14.55 μ l（全25 μ l）とした。また、PCR条件は、94 $^{\circ}$ Cにて2分間の前加熱、98 $^{\circ}$ Cにて10秒間、68 $^{\circ}$ Cにて4分30秒間の増幅サイクル35サイクル、並びに68 $^{\circ}$ Cにて5分間の複加熱とした。使用したプライマーは以下の通りである。プライマーは、マウスCd3 ϵ 遺伝子の5'側上流側のゲノム領域にe30230Fをフォワードプライマーとして配置し、マウスCd3 γ 遺伝子の3'下流側のゲノム領域にg1439Rをリバースプライマーとして配置した（図3A参照）。Cd3遺伝子領域を欠損したES細胞のサンプルでは、約0.7kbのバンドが増幅される。e30230F（前方）5'-TAGCAGCCTTCAGATGAAGAGGTAGGACTC-3'（配列番号：22）；g1439R（後方）5'-TTGATGTGCCACCTCACTGCTGCACTGG-3'（配列番号：23）。

マウスCd3遺伝子領域を欠損しているES細胞クローンのうち、ヒトCD3遺伝子領域の導入されているクローンを選抜するためのPCRスクリーニングを実施した。スクリーニングにはマウスCd3遺伝子領域の欠損を検出した際に用いたPCRサンプルを用いた。PCR反応混合物は、サンプル1 μ l、10 $\times$ LA緩衝液II 2.5 μ l、25mM MgCl₂ 2.5 μ

l、dNTP (2.5 mM) 4 μ l、プライマー (各 50 μ M) 各 0.1 μ l、LA Taq (TAKARA) 0.25 μ l、および蒸留水 14.55 μ l (全 25 μ l) とした。また、PCR 条件は、94℃にて2分間の前加熱、94℃にて30秒間、58℃にて1分間、72℃にて5分間の増幅サイクル35サイクル、並びに72℃にて5分間の複加熱とした。使用したプライマーは以下の通りである。プライマーは、ヒトCD3 ϵ 遺伝子の5'側上流側のゲノム領域にhCD3 ϵ __5arm__F2をフォワードプライマーとして配置し、ヒトCD3 ϵ 遺伝子の第2エクソン内にhCD3 ϵ __ex2__R2をリバースプライマーとして配置した (図3B参照)。ヒトCD3遺伝子領域が導入されたES細胞のサンプルでは、約5.5 kbのバンドが増幅される。hCD3 ϵ __5arm__F2 (前方) 5' - AACTGACAATGGGACATCAGCTGA - 3' (配列番号: 24) ; hCD3 ϵ __ex2__R2 (後方) 5' - ATGGGACTGTTACTTTACTAAGAT - 3' (配列番号: 25)。

[0171] (5) マウスCd3遺伝子欠損かつヒトCD3遺伝子導入マウスの作出

相同組換えESクローンをトリプシン処理により浮遊させ、ES細胞培地で洗浄した。48時間間隔で5IUのウマ絨毛ゴナドトロピン (eCG) およびヒト絨毛ゴナドトロピン (hCG) を腹腔内投与することにより、過剰排卵処理を施したBALB/cの雌マウスを同系統の雄マウスと交配した。雌マウスのプラグが確認された日を0.5日とし、妊娠3.5日に子宮を灌流し、回収した胚盤胞期胚を宿主胚として10~15個のES細胞を注入した。注入後の胚は、偽妊娠2.5日齢のICR系の受容雌の子宮内に移植し、17日後に産仔を得た。ES細胞の胚盤胞への注入により得られた産仔の毛色での判別により、組換えES細胞 (黒色) と宿主胚盤胞由来の細胞 (アルビノ) の混在したキメラマウスが得られた。雄キメラマウスは性成熟後にC57BL/6N雌マウスと交配し、ノックインアレルの次世代マウスへの伝達を、次世代マウスの組織より抽出したゲノムDNAを鋳型としてPCR法により確認した。PCRは、上述のES細胞のスクリーニングの際に

利用した方法にて実施した。その結果、ヒトCD3遺伝子領域特異的な5.5 kbのシグナル、およびマウスCd3遺伝子領域欠損に特異的な0.7 kbのシグナルが検出された個体を得られ、これら個体にはヒトCD3遺伝子領域アレルとともにマウスCd3遺伝子領域欠損アレルが伝達されたことが確認された。さらに、上述の遺伝子型のマウスの繁殖により、マウスCd3遺伝子領域についてホモ欠損型であり、かつヒトCD3遺伝子領域を有するマウス個体、すなわちヒトCD3遺伝子領域置換マウスを得た。なお、ヒトCD3εのみを導入したトランスジェニックマウス（以下、hCD3εTgマウス）をWangらの報告（非特許文献8）に従って作製し、以降の実験にて比較検討した。

[0172] （6）ヒトCD3遺伝子置換マウスの胸腺および脾臓重量

マウス（12～14週齢、雄）より脾臓および胸腺を採取し、組織重量を測定した。図4に示す通り、ヒトCD3置換マウスの胸腺には肉眼的な異常は認められなかった。解析には体重当たりの組織重量を算出した。各群4匹の雄マウスについて、体重、および組織重量（脾臓、胸腺）を測定しグラフに示した。体重当たりの組織重量比を算出し、個体ごとに得られた値を黒点にてプロット、平均値をカラムにて示す（図5）。脾臓重量に関しては、Cd3遺伝子欠損マウスにて他の遺伝子型のマウスと比較して増加の傾向が認められたが、顕著な差は認められなかった。一方、胸腺重量に関しては、Cd3遺伝子欠損マウスでは野生型と比較して3分の1程度までの低下が認められた。このCd3遺伝子欠損マウスにヒトCD3遺伝子を導入したヒトCD3遺伝子置換マウスでは、胸腺重量の回復が認められ、特にライン番号1C3の個体においては野生型マウスと同等の胸腺重量にまで回復が認められた。hCD3εTgマウスでは、Wangらの報告の通り、胸腺の委縮が認められた（非特許文献8）。

[0173] （7）ヒトCD3遺伝子置換マウス各ラインにおけるヒトCD3およびマウスCd3の発現確認

－血球RNAを用いたRT-PCR法での確認－

血球RNAを用いてRT-PCR法によりヒトCD3 ϵ 、ヒトCD3 δ 、ヒトCD3 γ 、マウスCd3 ϵ 、マウスCd3 δ およびマウスCd3 γ の発現を解析した。背中足静脈あるいは腹部大静脈より採取した血液より、Catrimox-14 RNA Isolation Kit (TaKaRa Bio) を用いてトータルRNAを調製した。各1 μ gのトータルRNAを鋳型として、SuperScript III First Strand cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) により、Oligo dT (20) プライマーを用いて逆転写反応を行なうことによってcDNAを合成した。合成されたcDNAを鋳型としてPCRを行なうことによって、ヒトCD3 ϵ 、ヒトCD3 δ 、ヒトCD3 γ 、マウスCd3 ϵ 、マウスCd3 δ およびマウスCd3 γ を検出した。いずれの遺伝子発現の検出にも蛋白コーディング領域に対するプライマーを設定した。ヒトCD3 ϵ の検出は、フォワードプライマーE0333F (5' - AAGA AATGGGTGGTATTACACAGACACC-3' (配列番号: 26)) およびリバースプライマーE0912R (5' - TGGGCCAGCG GGAGGCAGTGTTCTCCAGAGG-3' (配列番号: 27)) の組合せを使用して実施した。ヒトCD3 δ の検出は、フォワードプライマーD0092F (5' - TAGTTTCGGTGACCTGGCTTTTATCT ACTGG-3' (配列番号: 28)) およびリバースプライマーD0685R (5' - ATGGCTGCTTCTAGAAAGCCACCAGTCTCAGG-3' (配列番号: 29)) の組合せを使用して実施した。ヒトCD3 γ の検出は、フォワードプライマーG0048F (5' - TGCTCCACGCTTTTGCCGGAGGACAG-3' (配列番号: 30)) およびリバースプライマーG0666R (5' - TAGGAGGAGAACACCTGGACTACTC-3' (配列番号: 31)) の組合せを使用して実施した。一方、マウスCd3 ϵ の検出は、フォワードプライマーe0065F (5' - AGCATTCTGAGAGGATGCGGTGGAACAC-3' (配列番号: 32)) およびリバースプライマーe0699R (5' - TGCTC

GGAGGGCTGGATCTGGGTCCACAG-3' (配列番号: 33)) の組合せを使用して実施した。マウスCd3 δ の検出は、フォワードプライマーd055F (5'-TCATCCTGTGGCTTGCCTCTATTGTTC-3' (配列番号: 34)) およびリバースプライマーd651R (5'-TTGCTATGGCACTTTGAGAAACCTCCATC-3' (配列番号: 35)) の組合せを使用して実施した。マウスCd3 γ の検出は、フォワードプライマーg080F (5'-AATACTTCTACTGGAGAAGCAAAGAG-3' (配列番号: 36)) およびリバースプライマーg316R (5'-TAGTTGCATTTAGAGGACTTATTATGC-3' (配列番号: 37)) の組合せを使用して実施した。

PCR反応液の組成は、サンプル1 μ l、10 $\times$ Ex緩衝液 2.5 μ l、dNTP (2.5 mM) 2 μ l、プライマー (各50 μ M) 各0.1 μ l、Ex Taq (TAKARA) 0.25 μ l、および蒸留水19.05 μ l (全25 μ l) とした。また、PCR条件は、ヒトCD3 δ 、ヒトCD3 γ 、マウスCd3 δ およびマウスCd3 γ に関しては、94 $^{\circ}$ Cにて2分間の前加熱、94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、60 $^{\circ}$ Cにて30秒間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間の増幅サイクル35サイクル、並びに72 $^{\circ}$ Cにて5分間の複加熱とした。ヒトCD3 ϵ およびマウスCd3 ϵ に関しては、94 $^{\circ}$ Cにて2分間の前加熱、94 $^{\circ}$ Cにて30秒間、60 $^{\circ}$ Cにて30秒間、72 $^{\circ}$ Cにて2分間の増幅サイクル40サイクル、並びに72 $^{\circ}$ Cにて5分間の複加熱とした。ヒトCD3 ϵ 、ヒトCD3 δ およびヒトCD3 γ の増幅産物は、それぞれ580 bp、594 bpおよび620 bp、マウスCd3 ϵ 、マウスCd3 δ およびマウスCd3 γ の増幅産物は635 bp、597 bpおよび237 bpに検出されるようPCRプライマーを設計した。

Cd3遺伝子欠損マウスではマウスの各Cd3分子由来のPCRシグナルは検出されなかった。このCd3遺伝子欠損マウスに対して、ヒトCD3遺伝子領域が導入されたヒトCD3遺伝子置換マウスのライン (ライン番号:

1 C 3, 3 B 1, 8 I 1 2 および 2 A 4) のうち、ライン 1 C 3 および 8 I 1 2 に由来するサンプルではヒト C D 3 ϵ 、ヒト C D 3 δ および ヒト C D 3 γ のみが検出され、マウス C d 3 ϵ 、マウス C d 3 δ および マウス C d 3 γ はいずれも検出されなかった (図 6)。野生型マウス由来のサンプルからはヒト C D 3 ϵ 、ヒト C D 3 δ および ヒト C D 3 γ は検出されず、マウス C d 3 ϵ 、マウス C d 3 δ および マウス C d 3 γ が検出された (図 6)。この結果より、デザイン通りにマウス C d 3 ϵ 、C d 3 δ および C d 3 γ の代わりにヒト C D 3 ϵ 、C D 3 δ および C D 3 γ が発現するマウスが得られたことが確認された。なお、図 6 中のライン 4 H H 3 は、マウス C d 3 アレルが野生型で、ヒト C D 3 遺伝子が導入されている個体にて解析しており、ヒトの各 C D 3 分子とマウスの各 C d 3 分子の両方が検出されているが、その後、C d 3 欠損マウスとの繁殖により、マウス C d 3 アレルの欠損したヒト C D 3 遺伝子の発現ラインとして樹立した。

[0174] ー組織免疫染色法による解析ー

抗 C D 3 抗体を一次抗体として用い、その組織分布を検討した。C d 3 欠損マウスではいずれの組織においても C D 3 の染色は認められなかったが、C d 3 欠損マウスにヒト C D 3 遺伝子を導入したヒト C D 3 置換マウスでは、野生型マウスと同等の C D 3 特異的な染色が認められた。すなわち、胸腺 (図 7 A) および脾臓 (図 7 B) の T 細胞ゾーンにおいて特異的な染色が認められた。いずれの組織においても、野生型マウスと同様に T 細胞ゾーンにのみ染色が認められた。また、C d 3 遺伝子欠損マウスでは染色が認められておらず、ヒト C D 3 遺伝子置換マウスにおける染色は導入したヒト C D 3 遺伝子の発現によるものであることが示された。さらに、主要臓器における C D 3 の検出は野生型と同様であり、異所性の染色は認められなかった (表 1)。

[0175]

hCD3, mCD3KOTG マウス
IACUC 14-074[illegible]

所見：一、ネガティブ；±、ペリウスライト；＋、スライト；＋＋、モデルート；＋＋＋、シビア（H&E染色）；一、ネガティブ；±、レア；＋、オケーショナル；＋＋、フリークエント；＋＋＋、コンスタント

[0176] (8) ヒトCD3遺伝子置換マウスにおける成熟T細胞の存在比率の評価
脾臓細胞を用いたFACS解析を実施した。マウス(12-14週齢、雄)より脾臓を採取し、70 μ mメッシュを用いて細胞を単離した。溶血剤(SIGMA社製)を添加して赤血球を溶解した。Fc Blocking溶液にてブロッキング後、 2×10^6 個の細胞に対して、FITC標識抗マウスCd3抗体、FITC標識抗ヒトCD3抗体、APC標識抗マウスCd4抗体、PE標識抗マウスCd8抗体を用い、各陽性細胞数をフローサイトメーターにて解析した。Cd3遺伝子欠損マウスにおいては、ほぼ完全に欠損していた成熟T細胞、すなわちCd4およびCd8単一陽性細胞が、ヒトCD3遺伝子置換マウスにおいては野生型と同等の比率にて存在していることが示された。

[0177] 成熟T細胞の存在比率

[表2]

実験群	n数	mCd3	hCD3	mCd4	mCd8
ヒトCD3s置換マウス#1C3	n=4	ND.	38.8 (± 3.1)	19.6 (± 0.7)	16.1 (± 3.6)
ヒトCD3s置換マウス#4HH3	n=2	ND.	29.8, 28.9	15.5, 13.9	17.5, 16.4
ヒトCD3s置換マウス#8I12	n=4	ND.	31.5 (± 5.4)	15.5 (± 3.1)	15.3 (± 2.7)
hCD3E Tgマウス	n=4	19.5 (± 3.76)	13.0 (± 1.4)	7.4 (± 0.6)	7.8 (± 0.8)
Cd3s欠損マウス	n=4	ND.	ND.	1.8 (± 1.3)	2.1 (± 0.6)
C57BL/6N	n=4	40.4 (± 8.42)	ND.	20.3 (± 6.7)	12.7 (± 2.1)

脾臓細胞あたりの、各マーカー陽性細胞の発現比率(単位%)を表に示した。ヒトCD3s置換マウス#4HH3を除く各実験群は4個体の平均を示し、ライン#4HH3については2個体の発現比率を示した。(括弧内は標準偏差を示す)

ND, not detected.

[0178] [実施例2] ヒトCD3遺伝子置換マウスにおける脾臓細胞の細胞増殖能の評価

マウス(12週齢、雄)より脾臓を採取し、70 μ mメッシュを用いて細胞を単離した。溶血剤(SIGMA社製)を添加して赤血球を溶解した。単離した脾臓細胞にT細胞マイトジェンのPHA (phytohemagg

lutinin, SIGMA社製)を添加し、5日間培養した後、細胞増殖アッセイ用試薬 (Cell Titer 96 Aqueous One Solution Reagent, Promega社製)を用いてMTSアッセイを実施した。各遺伝子型の細胞増殖活性について、マイトジェン非添加における活性を1とした場合の相対比率にて表した (図9)。

その結果、Cd3遺伝子欠損マウスの脾臓細胞では、マイトジェン刺激に対する細胞増殖活性は、マイトジェン非添加より低下の傾向が認められ、野生型マウスの約60%であった。一方、ヒトCD3遺伝子置換マウスと野生型マウスの脾臓細胞では、マイトジェン刺激により細胞増殖活性は増加し、その活性はヒトCD3遺伝子置換マウスでは野生型マウスと比較し約90%であることが示された。

[0179] [実施例3] ヒトCD3遺伝子置換マウスの脾臓細胞におけるサイトカイン産生の評価

マウスより脾臓を採取し、70 μ mメッシュを用いて細胞を単離し、溶血剤を添加して赤血球を溶解し、脾臓細胞を調製した。T細胞マイトジェンのPHA (phytohaemagglutinin)を終濃度1 μ g/mL添加した培養液にて3日間培養した後、培養液中に産生されたサイトカインを測定した (図10)。

その結果、Cd3遺伝子欠損マウスの脾臓細胞では、マイトジェン刺激によるサイトカイン産生は認められないのに対し、ヒトCD3遺伝子置換マウスでは、サイトカイン産生が認められ、その機能は回復していることが示された。

[0180] [実施例4] ヒトCD3遺伝子置換マウスの脾臓細胞におけるヒトCD3抗体に対する反応性の評価

マウスより脾臓を採取し、70 μ mメッシュを用いて細胞を単離し、溶血剤を添加して赤血球を溶解し、脾臓細胞を調製した。抗ヒトCD3抗体にて固層化を施したプレートに細胞を播種し、培養3日後の細胞増殖活性を評価するためMTSアッセイを実施した (図11A、B)。また、培養液中に産生されたサイトカインを測定した (図11C、D)。

その結果、ヒトCD3遺伝子置換マウスは抗ヒトCD3抗体の刺激に特異的に反応し、細胞増殖活性（図11B）、およびサイトカイン産生（図11D）が示された。そのレベルは、野生型マウスの抗マウスCD3抗体の刺激に対する反応性と同程度であった。この結果により、ヒトCD3遺伝子置換マウスは、正常な機能を有するヒトCD3を発現していることが示された。

[0181] [実施例5]ヒトCD3遺伝子置換マウスの免疫機能評価

(1) 外来抗原感作に対する特異的抗体産生能の検討

外来抗原に対して特異的な抗体を産生するためには、樹状細胞等、抗原提示細胞の表面に主要組織適合性抗原（Major Histocompatibility Complex, MHC）とともに提示された抗原ペプチドに結合できる機能的なヘルパーT細胞が存在し、抗体産生細胞に適切な抗体を産生させるための指令を出す機能を保有していなければならない。上述のヒトCD3遺伝子置換マウスが、正常な機能を持つヘルパーT細胞を持ち、外来抗原の感作に対して特異的抗体を産生することができるかどうかを検討した。感作抗原としては、ニワトリ卵白アルブミン（OVA）をフロイント・アジュバンドとともに感作した。OVAの感作は4週間間隔にて2回行った。すなわち、1匹当たり100 μ gのOVAを、1回目は完全フロイント・アジュバンドを用いて背部皮下に感作し、その4週間後に不完全フロイント・アジュバンドを用いて同様に背部皮下に感作した。ヒトCD3遺伝子置換マウスとしては、由来する改変ES細胞クローンの異なる2ライン（ライン番号1C3および8112）を設定し、ヒトCD3 ϵ 過剰発現マウスと比較した。さらに、対照として、野生型マウスおよびCd3遺伝子欠損マウスを設定して同様の抗原感作を行った。

2回目の感作の1週間後に、イソフルラン吸入麻酔下にて開腹し、腹部大静脈より全採血および放血することによって安楽死処置を施した。採取した血液より血清を分離し、OVA特異的IgG1およびOVA特異的IgEの濃度を測定した（図12）。

その結果、マウスCd3欠損マウスの血清中からはOVA特異的抗体は、

I g G 1 タイプも I g E タイプのいずれも検出されなかったのに対し、ヒト CD 3 遺伝子置換マウスは 2 ラインとも O V A 特異的 I g G 1 および I g E が検出され、そのレベルは野生型マウスと同等であった。この結果により、ヒト CD 3 遺伝子置換マウスは、外来抗原の感作に対して正常な抗体産生能を有していることが示された。

[0182] [実施例 6] ヒト HER2 発現マウス肝細胞ガン株移植モデルにおける抗ヒト HER2 抗ヒト CD3 二重特異性抗体の抗腫瘍効果

(1) 細胞株

ヒト HER2 を強制発現させた Hepa1-6 細胞 (Hepa1-6/HER2) を用いた。Hepa1-6/HER2 細胞は 10% FBS (BOVAGEN 社製)、0.5 mg/mL Zeocin (ナカライテスク社製) を含む Dulbecco's Modifid Eagle's Medium 培地 (SIGMA 社製) にて維持継代した。

(2) Hepa1-6/HER2 移植モデルの作製

Hepa1-6/HER2 細胞を Dulbecco's Modifid Eagle's Medium 培地 (SIGMA 社製) とマトリゲルにて 1×10^8 個/mL になるように調製した。mCd3 KO homo, hCD3 Tg 型マウス #1C3 (19 週齢) の腹部皮下へこの細胞懸濁液 100 μ L (1×10^7 個/マウス) を移植した。腫瘍体積は以下の式にて算出し、腫瘍体積が 160 ~ 234 mm³ になった時点でモデル成立とした。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$$

(3) 投与薬剤の調製

Her2 と CD3 に対する二重特異性抗体 (HER2_CD3 抗体) は P B S (一) を用いて、0.5 mg/mL (5 mg/kg 投与群) になるように調製した。HER2_CD3 抗体 (HER2 結合 H 鎖可変領域: 配列番号: 38 および 39、HER2 結合 L 鎖可変領域: 配列番号 40 および 41、CD3 結合 H 鎖可変領域: 配列番号 42 および 43、CD3 結合 L 鎖可変領域: 配列番号 44 および 45) は、当業者公知の方法に従って作製された。

(4) 薬剤投与

(2) で作製した Hepa1-6/HER2 移植モデルに対し、腫瘍体積にて群分けし

、上記（３）で調製した抗体試料を10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。陰性対照として、PBS（－）（Vehicle）を同様に10 mL/kgにて、尾静脈より投与した。

（５）抗腫瘍効果の評価

HER2_CD3抗体のHepa1-6/HER2移植モデルにおける抗腫瘍効果については移植後28日目の腫瘍体積（図13）で評価した。統計解析にはJMP（SAS Institute Inc.）を用い、統計解析は最終測定日の腫瘍体積を用いて、Wilcoxon検定にて確認した。（有意水準は両側5%）その結果、HER2_CD3抗体の投与により、腫瘍の増殖抑制が有意に認められた。

[0183] 【実施例7】 ヒトGlypican3（GPC3）発現マウス肝細胞ガン株移植モデルにおける免疫チェックポイント阻害剤の抗腫瘍効果

（１）細胞株

ヒトGPC3を強制発現させたHepa1-6細胞（Hepa1-6/hGPC3）を用いた。Hepa1-6/hGPC3細胞は10%FBS（BOVAGEN社製）、0.6 mg/mL G418（ナカライテスク社製）を含むDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地（SIGMA社製）にて維持継代した。

（２）Hepa1-6/hGPC3移植モデルの作製

Hepa1-6/hGPC3細胞をDulbecco's Modifid Eagle's Medium培地（SIGMA社製）とマトリゲルにて 5×10^7 個/mLになるように調製した。mCd3 KO homo, hCD3 Tg型マウス#103（20週齢）の腹部皮下へこの細胞懸濁液200 μ L（ 1×10^7 個/マウス）を移植した。腫瘍体積は以下の式にて算出し、腫瘍体積が160～300 mm³になった時点でモデル成立とした。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$$

（３）投与薬剤の調製

免疫チェックポイント阻害剤である、抗マウスCTLA-4抗体（clone:UC10-4F10-11, BioXcell社製）、抗マウスPD-1抗体（clone:RMP1-14, BioXcell社製）、抗マウスPD-L1抗体（clone:10F.9G2, BioXcell社製）はPBS（－）を用いて、1 mg/mL（0.2 mg/head投与）になるように調製した。

(4) 薬剤投与

(2) で作製したHepa1-6/hGPC3移植モデルに対し、腫瘍体積にて群分けし、上記(3)で調製した抗マウスCTLA-4抗体、抗マウスPD-1抗体、抗マウスPD-L1抗体を0.2 mL/mouseにて尾静脈より投与した。陰性対照として、PBS

(一) (Vehicle) を同様に尾静脈より投与した。投与は腫瘍移植後7日(群分け当日)、12日(群分け5日後)の二回実施した。

(5) 抗腫瘍効果の評価

Hepa1-6/hGPC3移植モデルにおける抗腫瘍効果については腫瘍体積の推移(図14)で評価した。その結果、免疫チェックポイント阻害剤の投与により、腫瘍の増殖抑制が認められた。

[0184] [実施例8] 抗ヒトCTLA4/抗ヒトCD3二重特異性抗体による、in vivo薬効評価

8-1. ヒトCTLA4およびヒトCD3に特異的に結合する二重特異性抗体の発現と精製

抗ヒトCTLA4側として重鎖可変領域MDX10D1H(配列番号46)および軽鎖可変領域MDX10D1L(配列番号47)を用いた。この時定常領域はFc γ 受容体への結合を低減し、2つの重鎖がヘテロ会合化するように改変を加えた重鎖定常領域mF18mN4(配列番号48)、軽鎖定常領域mk1(配列番号49)を使用している。これら遺伝子を動物発現プラスミドに挿入した。

[0185] また抗ヒトCD3側としては、重鎖可変領域TR01H113(配列番号50)、軽鎖可変領域L0011(配列番号51)、この時定常領域はFc γ 受容体への結合を低減し、2つの重鎖がヘテロ会合化するように改変を加えた重鎖定常領域mF18mP4(配列番号52)、軽鎖定常領域mk1(配列番号49)を使用している。これら遺伝子を動物発現プラスミドに挿入した。

[0186] 抗ヒトCTLA4抗体および抗ヒトCD3抗体は以下の方法を用いて抗体を発現させた。FreeStyle 293 Expression Medium培地(Invitrogen)に 1.33×10^6 細胞/mLの細胞密度で懸濁し、播種したヒト胎児腎細胞由来FreeStyle 293-F株(Invitrogen)に対して、リポフェクション法により調製されたプラスミド

を導入した。CO₂インキュベーター（37℃、8%CO₂、90 rpm）で4日間培養した培養上清から、Hi Trap™ Protein G HPカラム（GE Healthcare）を用いて当業者公知の方法で抗体を精製した。分光光度計を用いて、精製した抗体溶液の280 nmでの吸光度を測定した。得られた測定値からPACE法により算出した吸光係数を用いて、精製した抗体の濃度を算出した（Protein Science（1995）4, 2411-2423）。

[0187] 精製したそれぞれのホモ体は表3の組み合わせで、定常領域の電荷の違いを利用した当業者公知の方法（W02015/046467）で混合し、目的の二重特異性抗体）を作製した。

[表3]

No.	クローン名	抗体 1	抗体 2
1	MDX10//TR01H113	MDX10-mF18mN4	TR01H113/L0011-mF18mP4

[0188] 8-2. 同系腫瘍株移植マウスモデルにおける抗腫瘍効果の評価

8-2-1 細胞株

Colon38細胞は（公財）がん研究会から譲渡されたものを使用した。Colon38細胞は10%FBS（SIGMA社製）を含む、RPMI1640（SIGMA社製）にて維持継代した。

8-2-2 同系腫瘍株移植マウスモデルの作製

ヒトCD3遺伝子置換マウスをヒトCTLA4遺伝子置換マウス（Blood 2005 106: 3127-3133）と交雑することにより、ヒトCD3遺伝子置換かつヒトCTLA4遺伝子置換マウスを樹立し、抗腫瘍効果評価用モデルマウスとして使用した。

マウスへ自家移植する腫瘍細胞株としてColon38を用いた。マウスの皮下に細胞を移植し、移植腫瘍の体積が100mm³程度以上になったものをモデル成立とした。

移植腫瘍の体積は以下の式にて算出した。

$$\text{腫瘍体積} = \text{長径} \times \text{短径} \times \text{短径} / 2$$

8-2-3 投与薬剤の調製

Colon38細胞移植モデルへの投与薬剤としては、8-1で作製した抗ヒトCTLA

4/抗ヒトCD3バイスペシフィックモノクローナル抗体 (MDX10//TR01H113) を用いた。媒体としてヒスチジンバッファー (150mM NaCl/20mM His-HCl buffer, pH 6.0、以下単にバッファーと表記) を用い1000 μ g/mLになるように調製した。

8-2-4 薬剤投与

Colon38細胞移植モデルでのMDX10//TR01H113抗体の評価においては、移植後12日目にMDX10//TR01H113を200 μ g/mouseもしくはControl群 (ベヒクル投与群) としてバッファーを0.2 mL/mouse、尾静脈より投与した。

[0189] 薬剤処置に関する詳細は表4に示した。

[表4]

Colon38 細胞移植モデル (MDX10//TR01H113 投与実験)

群	匹数	薬剤	用量	投与方法	投与日
1	5	バッファー	-	尾静脈	移植後12日
2	5	MDX10//TR01H113	200 μ g/mouse	尾静脈	移植後12日

[0190] 8-2-5 抗腫瘍効果の評価

抗腫瘍効果については、8-2-2に記した計算式にて算出した腫瘍体積で評価した。統計解析にはJMP™ 11.2.1 (SAS Institute Inc.) を用いた。

その結果、抗マウスCTLA4/CD3バイスペシフィックモノクローナル抗体を投与すると、Control群と比較して、腫瘍の増殖抑制が有意に認められた (図15)。

産業上の利用可能性

[0191] 本発明は、非ヒト動物の内因性のCD3遺伝子の発現を欠損させ、かつ生理的に妥当なレベルでヒトCD3遺伝子を発現することができる非ヒト動物を提供するとともに、該動物を用いた化合物の評価方法等を提供するものである。従って、本発明は、特に、ヒトCD3分子を介したT細胞活性化によって腫瘍細胞を死滅させる薬効を有する治療薬の開発に利用可能である。

請求の範囲

- [請求項1] 内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のCD3遺伝子がゲノム上で機能的に欠損し、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子を機能的に発現する遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項2] ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなるヒトCD3遺伝子を機能的に発現する、請求項1に記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項3] ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子の全長塩基配列がゲノム上に挿入されている、請求項1また2に記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項4] 前記非ヒト動物が有するT細胞は、その細胞膜上で非ヒト動物由来のT細胞受容体とヒトCD3分子が複合体を形成することを特徴とする、請求項1から3のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項5] 前記非ヒト動物が非ヒトほ乳動物である、請求項1から4のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項6] 前記非ヒトほ乳動物がマウスである、請求項5に記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項7] 悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬をスクリーニングするための、請求項1から6のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項8] 前記非ヒト動物に癌細胞が移植されていることを特徴とする、悪性腫瘍性疾患の治療薬をスクリーニングするための、請求項7に記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項9] 前記癌細胞が肺癌、胃癌、肝癌、食道癌又は卵巣癌由来の細胞である、請求項8に記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項10] 前記癌細胞がHER2陽性の細胞である、請求項8に記載の遺伝子改変非ヒト動物。
- [請求項11] 以下の工程(1)～(2)：
- (1) 内因性のCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなる群より選ばれる少な

くとも1種以上のCD3遺伝子をゲノム上で機能的に欠損させる工程、及び

(2) ヒトCD3 ϵ 、ヒトCD3 δ 及びヒトCD3 γ からなる群より選ばれる少なくとも1種以上のヒトCD3遺伝子をゲノム上に導入する工程、を含む、遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[請求項12] 工程(2)において、ヒトCD3 ϵ 、CD3 δ 及びCD3 γ からなるヒトCD3遺伝子をゲノム上に導入する、請求項11に記載の遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[請求項13] 前記非ヒト動物に癌細胞を移植する工程をさらに含む、請求項11または12に記載の遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[請求項14] 前記癌細胞が、肺癌、胃癌、肝癌、食道癌又は卵巢癌由来の細胞である、請求項13に記載の遺伝子改変非ヒト動物の作製方法。

[請求項15] 以下の工程(1)～(2)：

(1) 請求項1から10のいずれかに記載の遺伝子改変非ヒト動物、その臓器、組織または細胞と被験物質を接触させる工程、及び

(2) 該遺伝子改変非ヒト動物個体、その臓器、組織または細胞に対する被験物質の薬効及び／又は毒性を指標として、候補被験物質を選択する工程、

を含む、悪性腫瘍性疾患又は自己免疫疾患の治療薬のスクリーニング方法。

[請求項16] 以下の工程(1)～(3)：

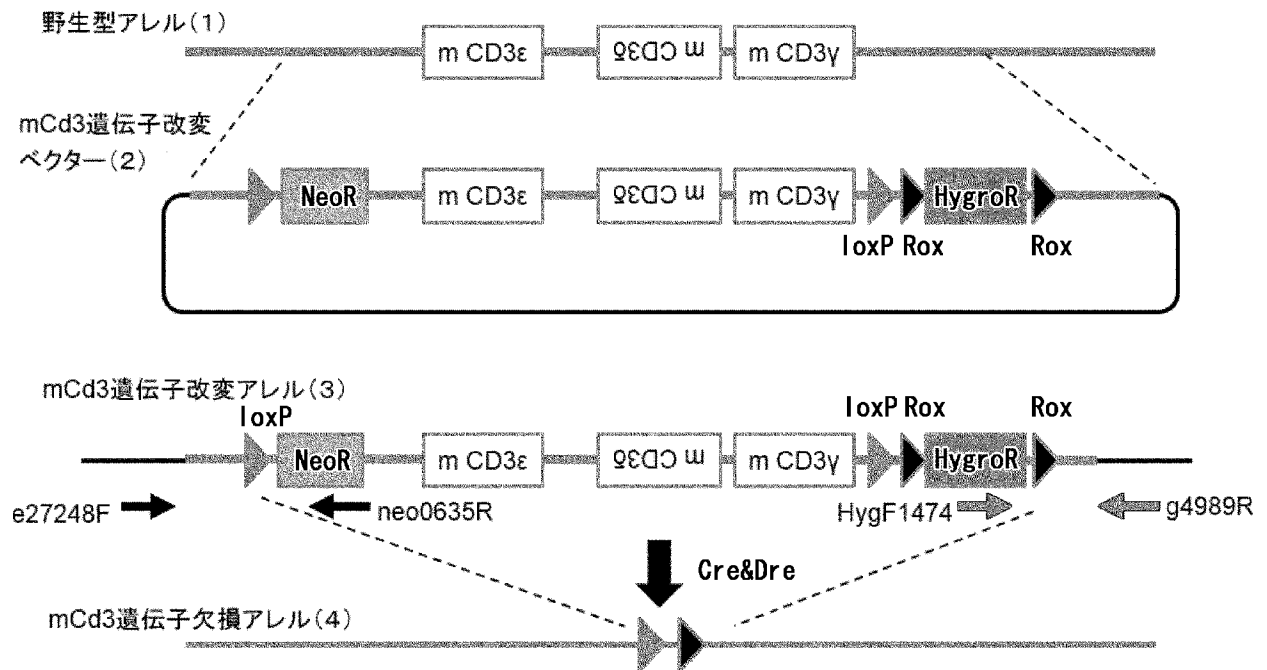
(1) ヒトCD3結合ドメイン及び癌特異的抗原結合ドメインを含む抗原結合分子のライブラリーのうち1つを被験物質として、請求項1から10のいずれかに記載の第1の遺伝子改変非ヒト動物に投与する工程、

(2) 該癌特異的抗原を発現する細胞に対する該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を測定する工程、及び

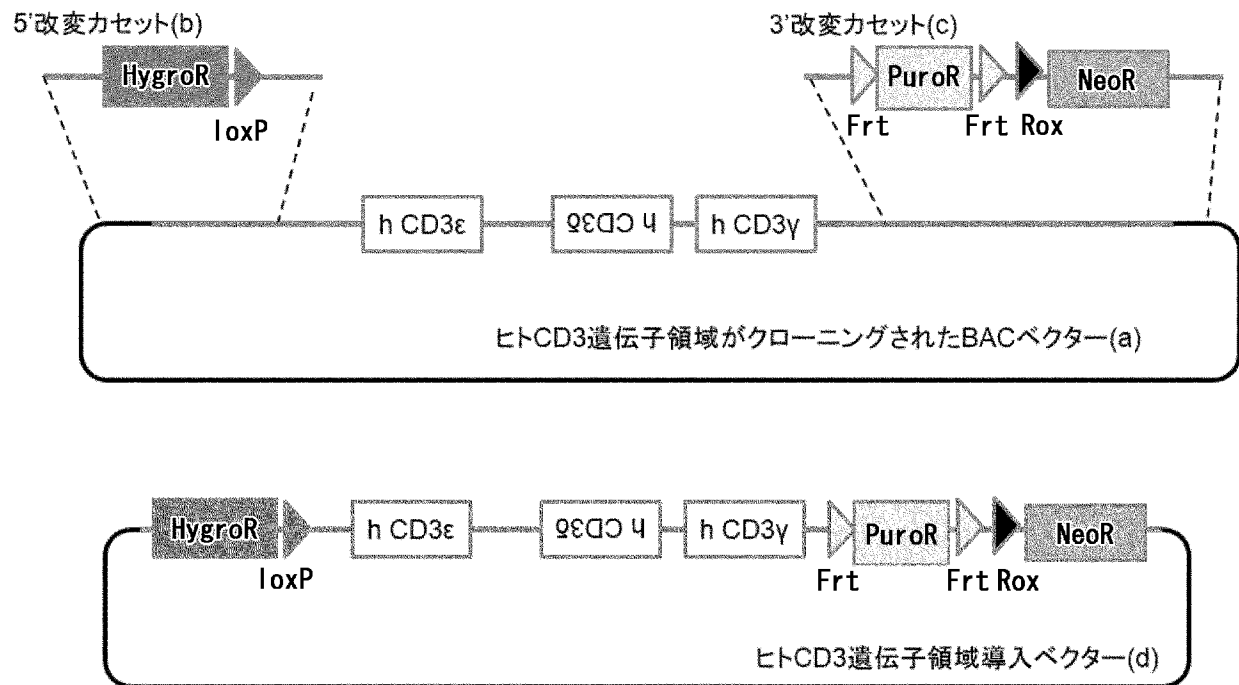
(3) 該被験物質の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性を

、該第 1 の非ヒト動物とは異なる第2の遺伝子改変非ヒト動物に投与された対照抗体の細胞増殖抑制効果及び／又は薬物動態学的特性と比較する工程、
を含む、悪性腫瘍性疾患の治療薬のスクリーニング方法。

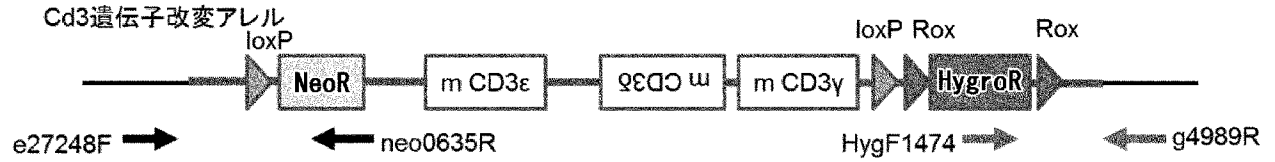
[図1A]



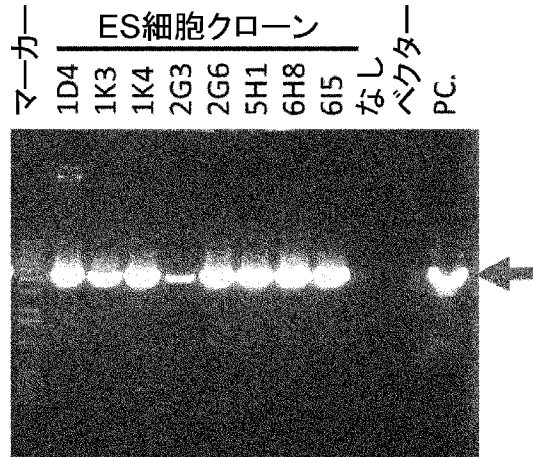
[図1B]



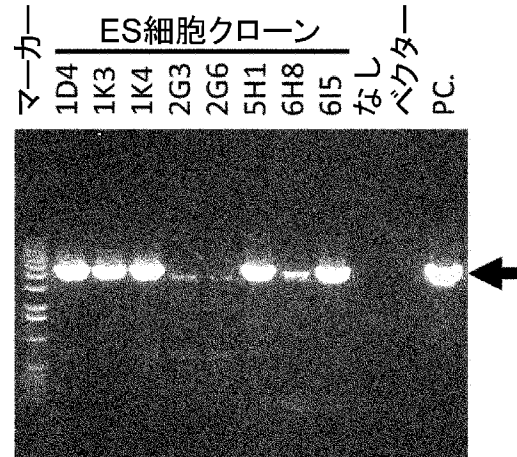
[図2]



PCR: HygF1474 – g4989R

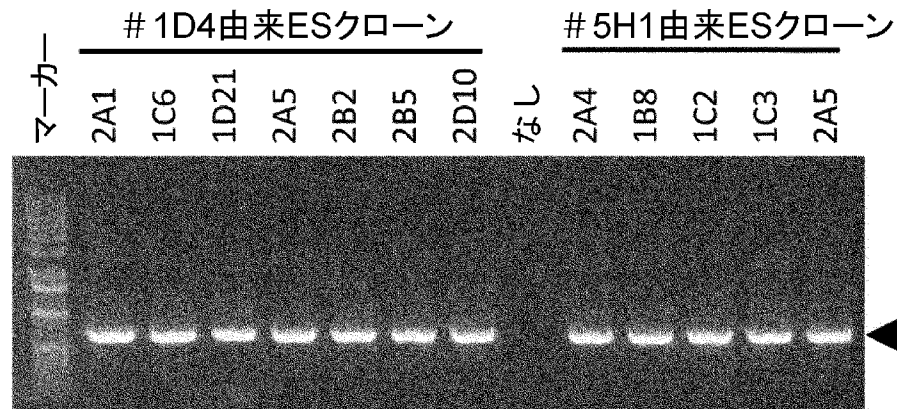
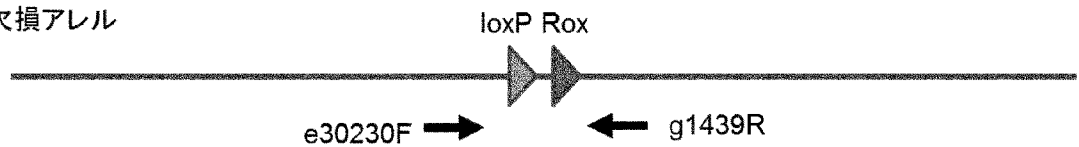


PCR: e27248F – Neo0635R



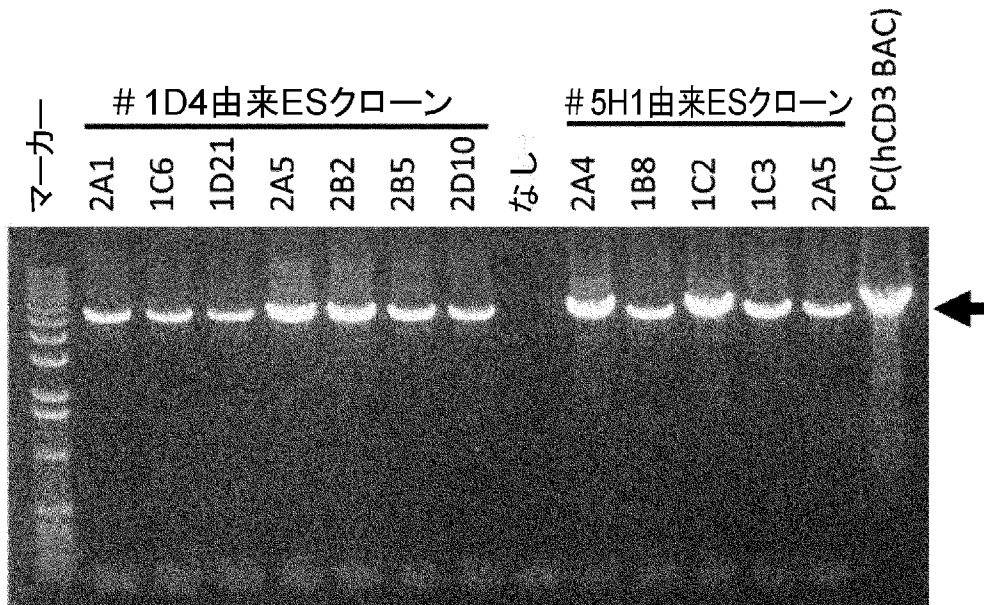
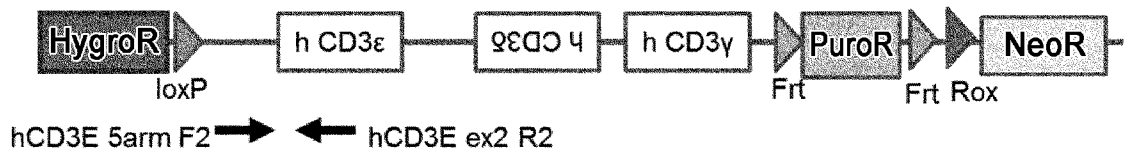
[図3A]

mCd3遺伝子欠損アレル

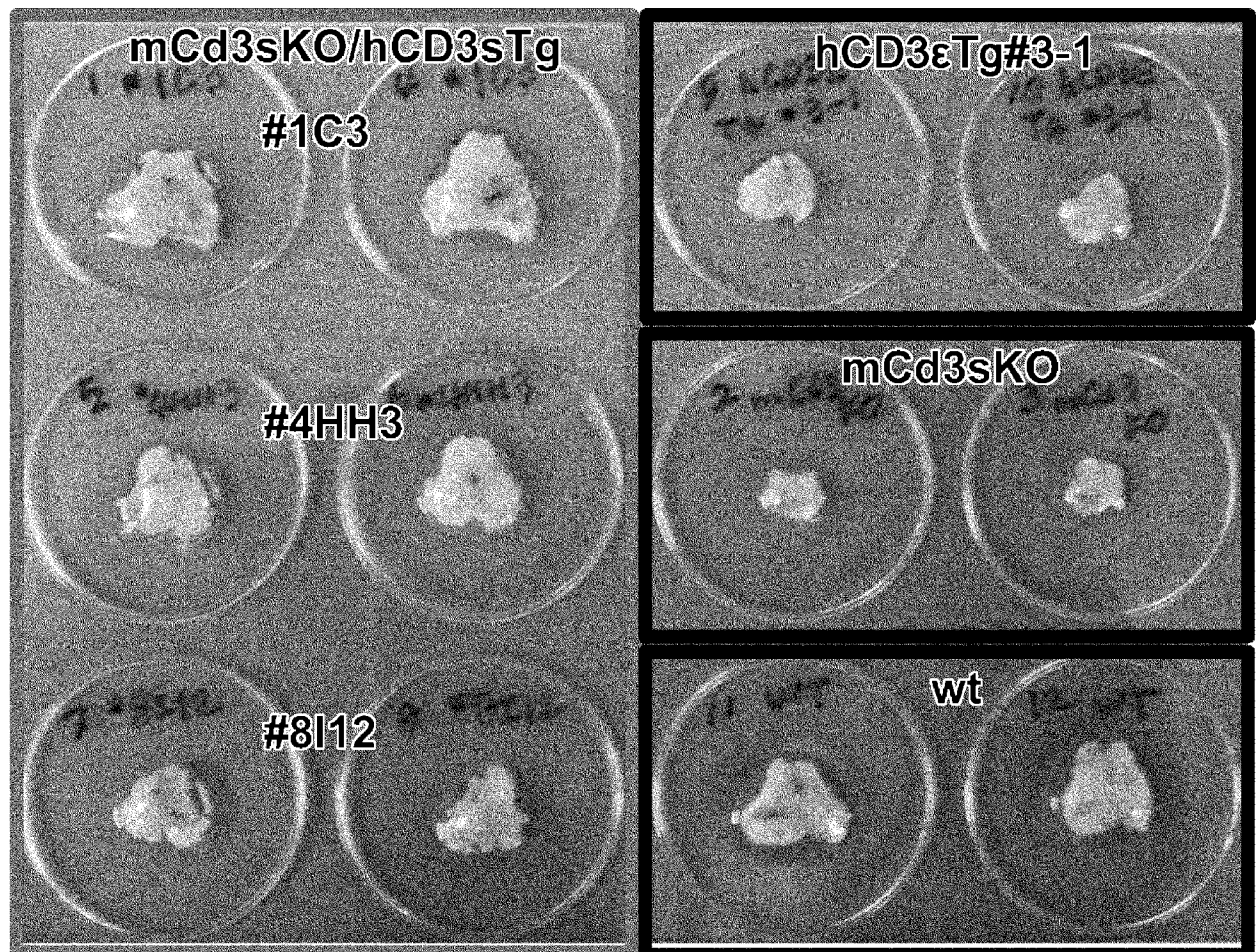


[図3B]

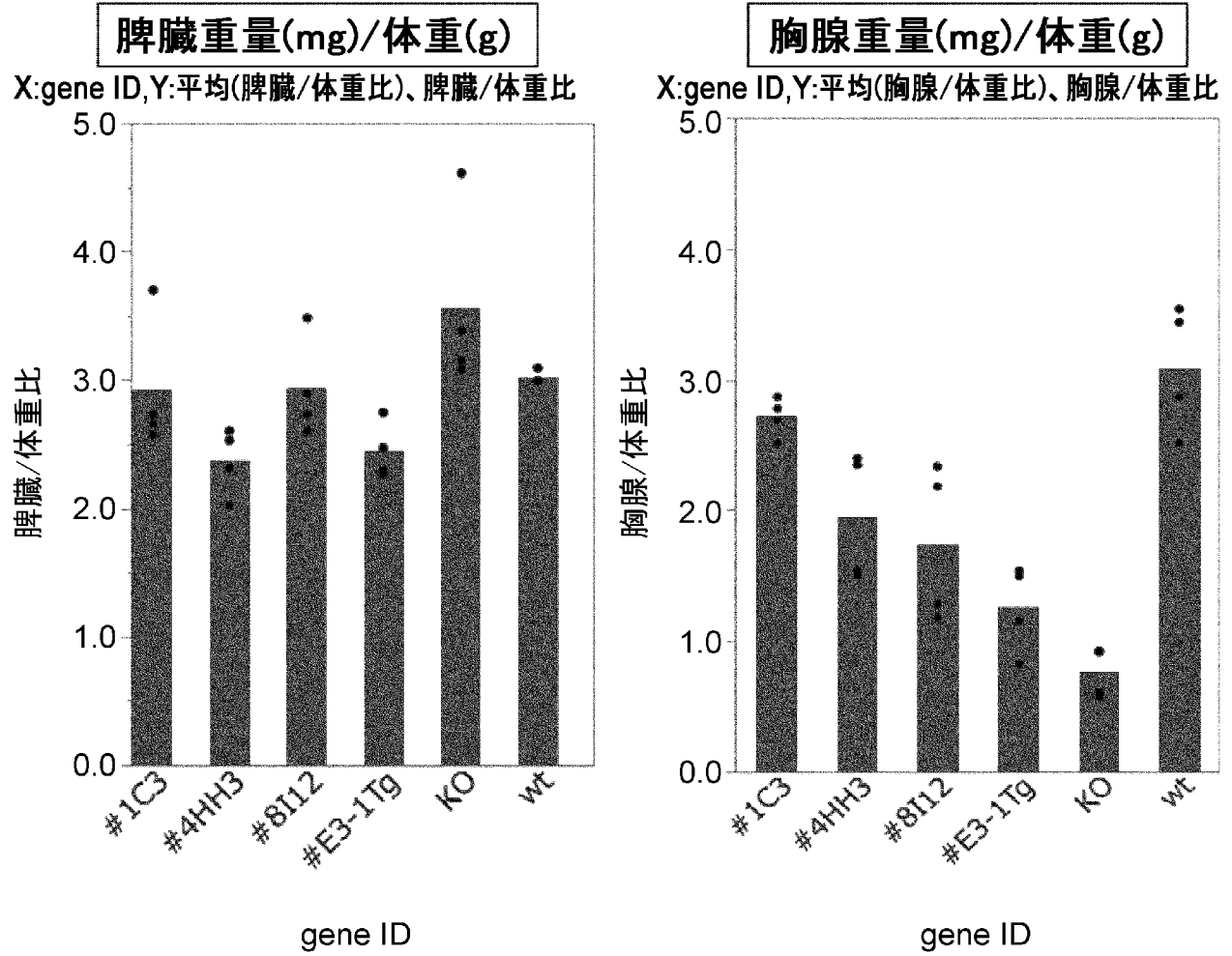
hCD3遺伝子領域Tgアレル



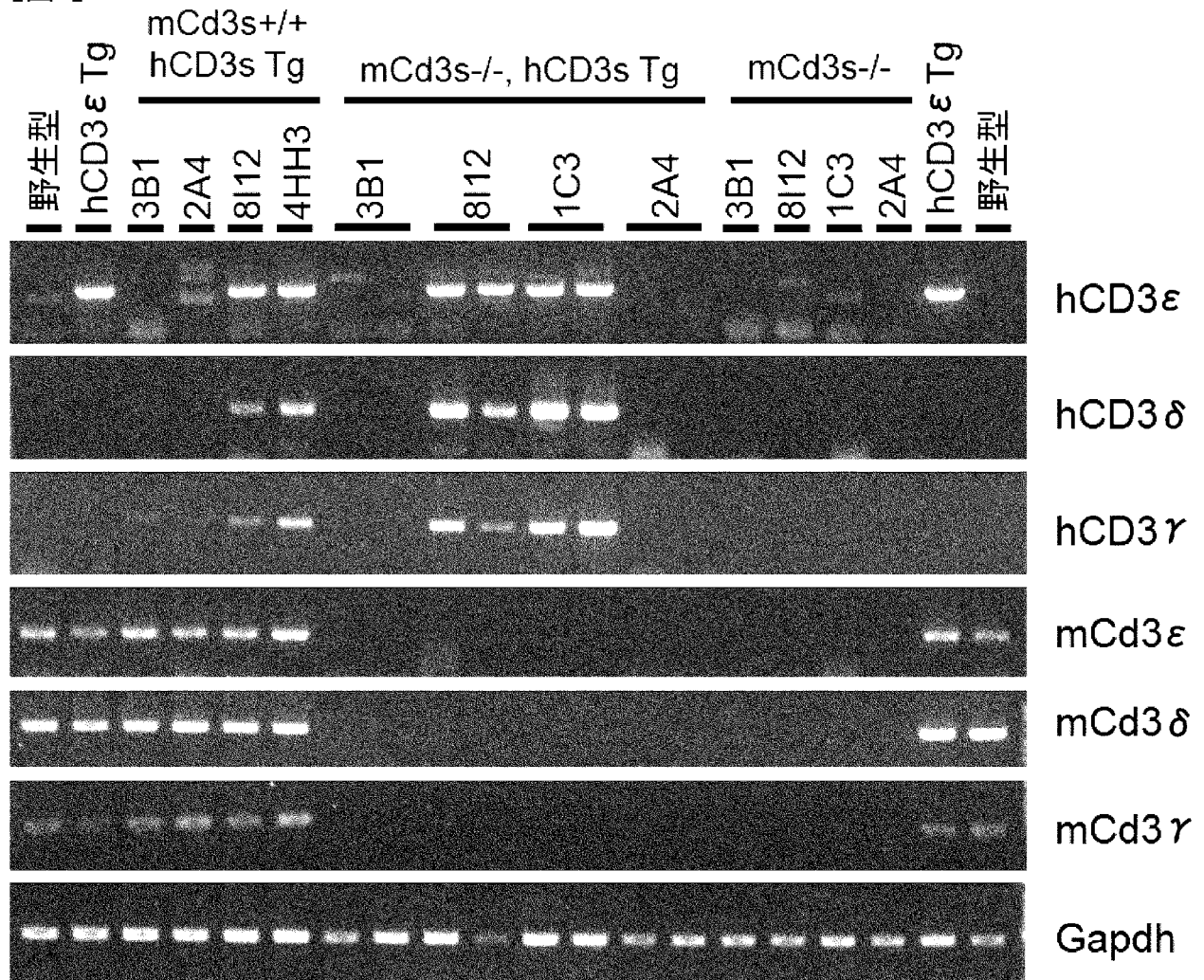
[図4]



[図5]

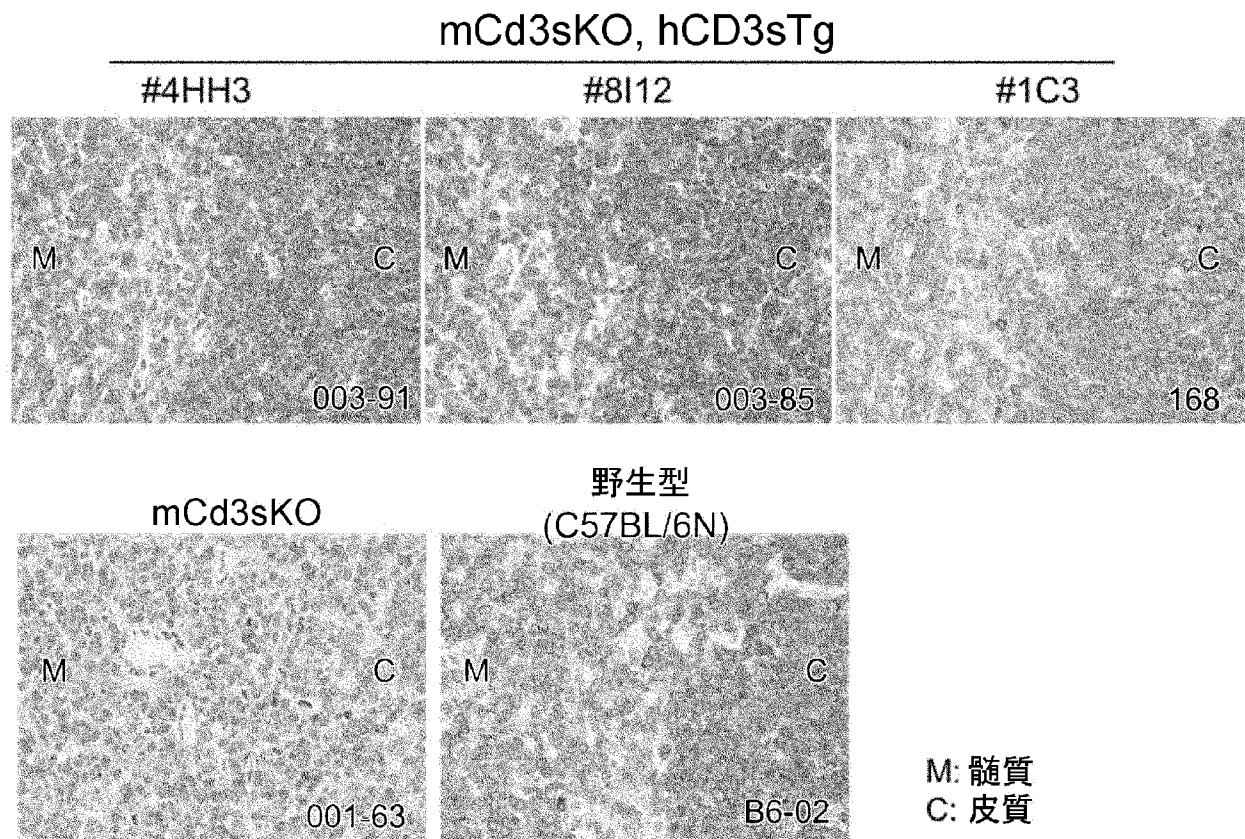


[図6]

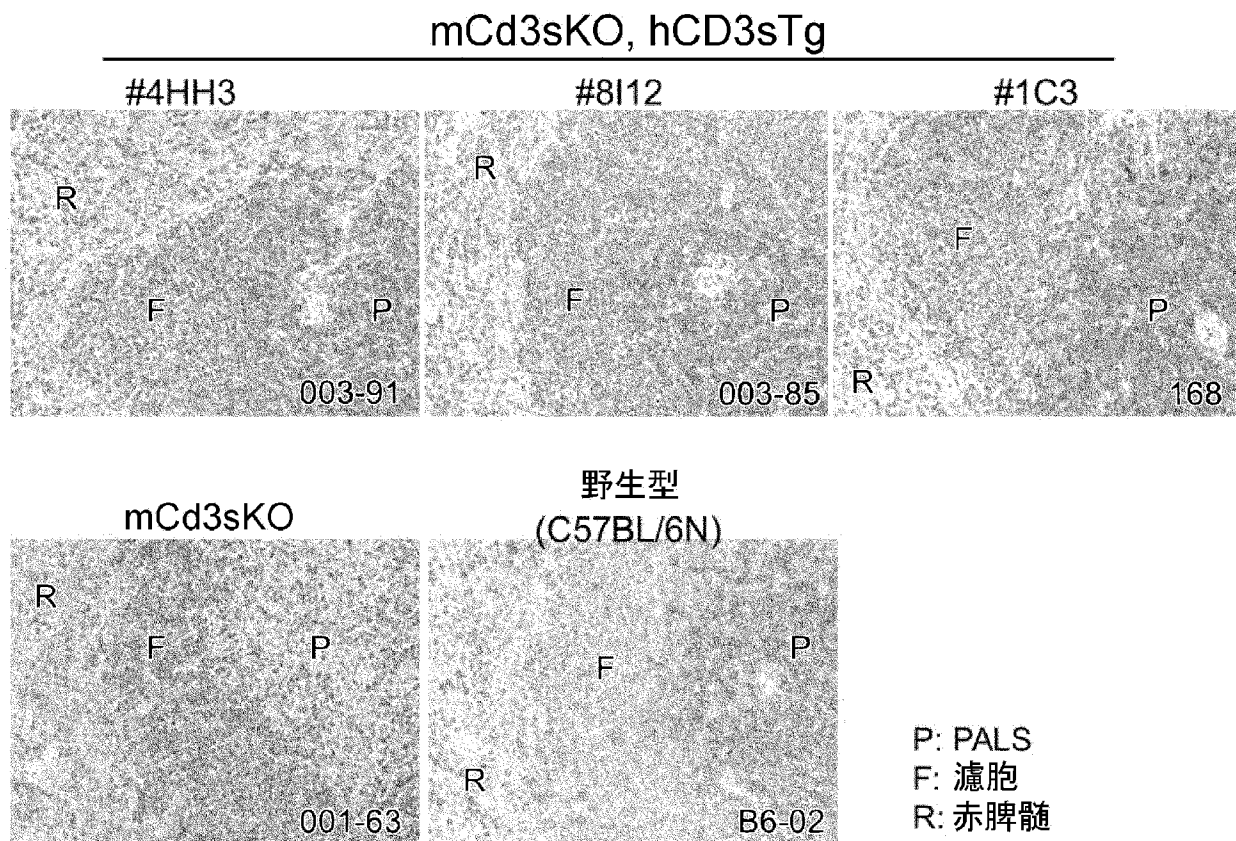


[図7]

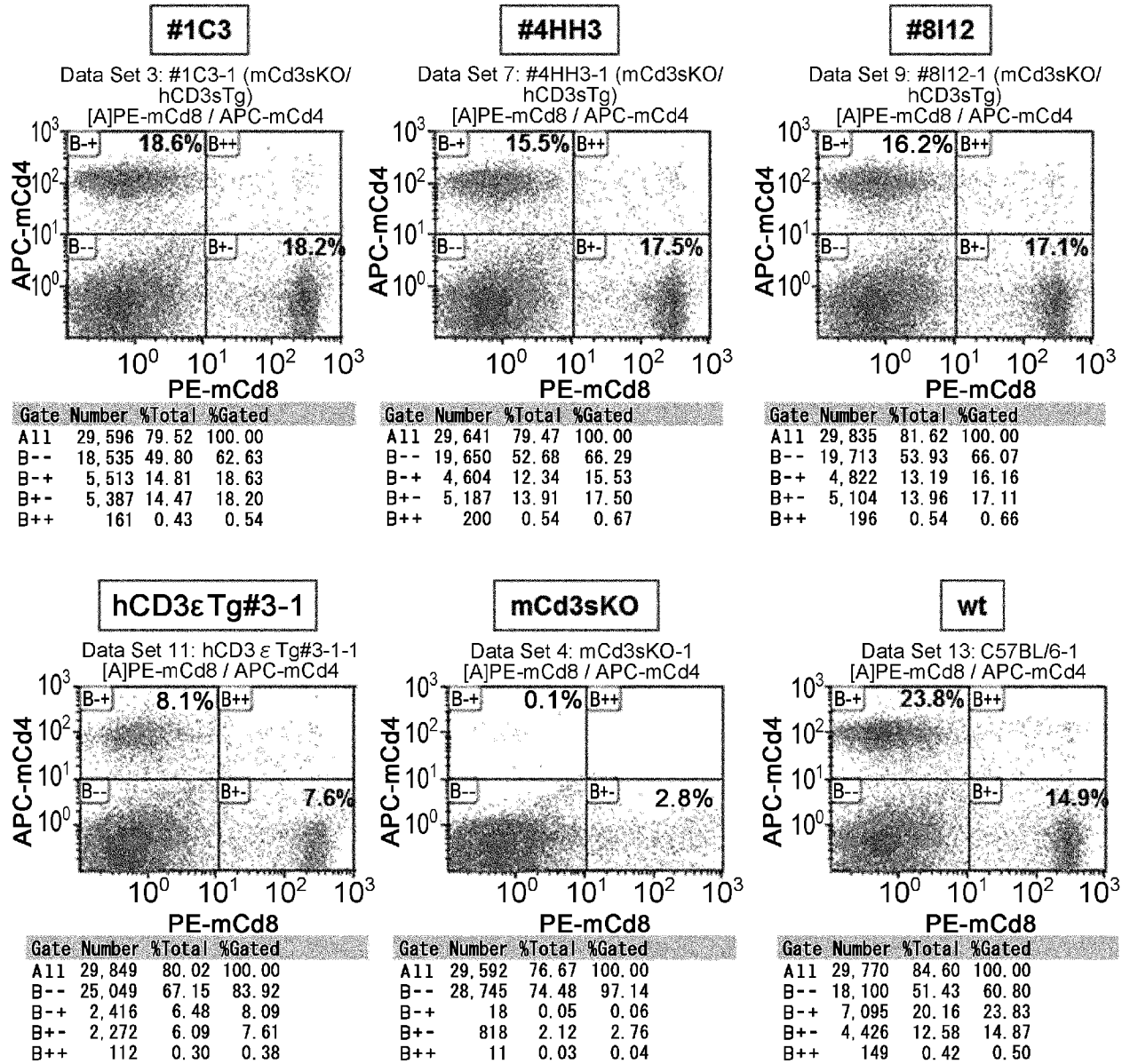
A



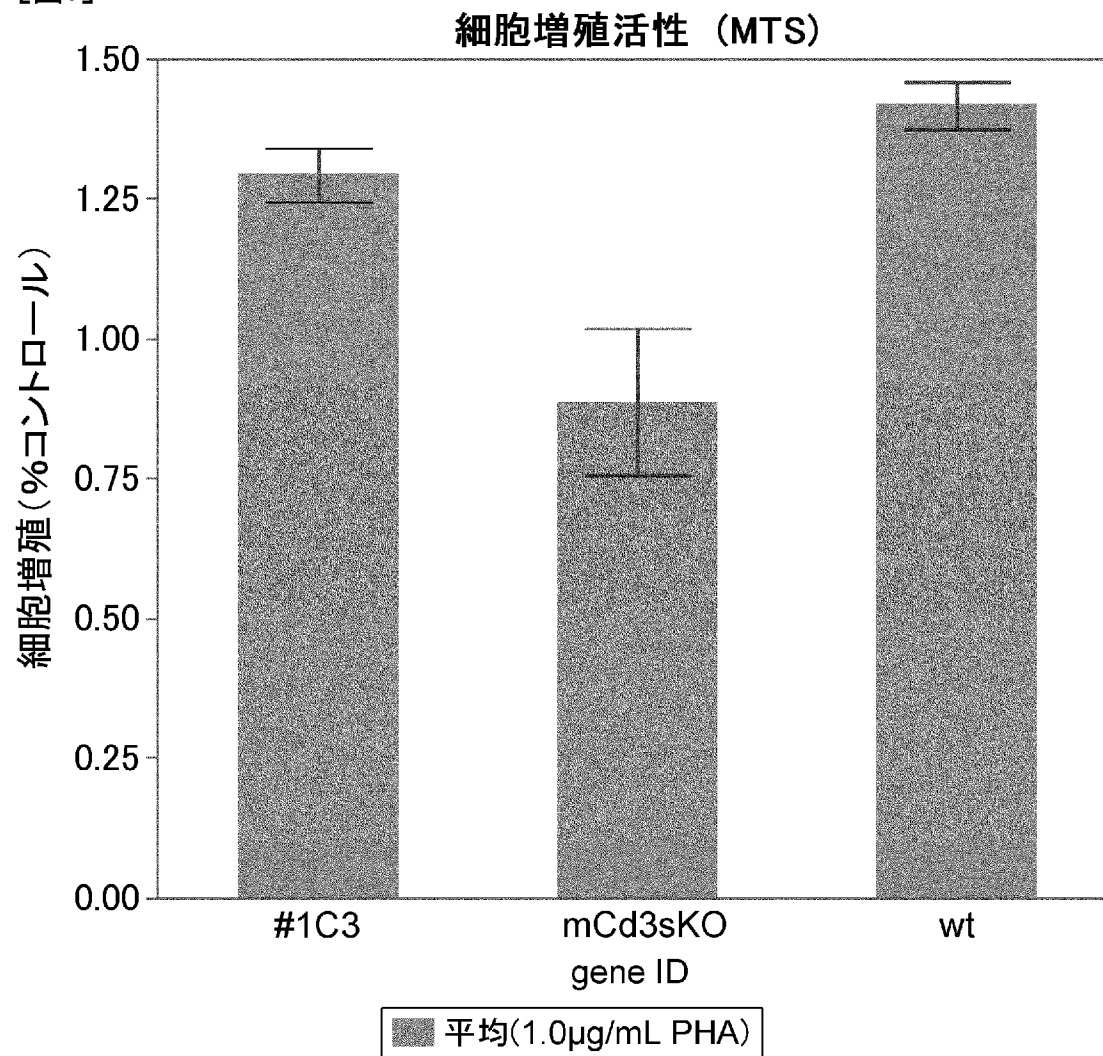
B



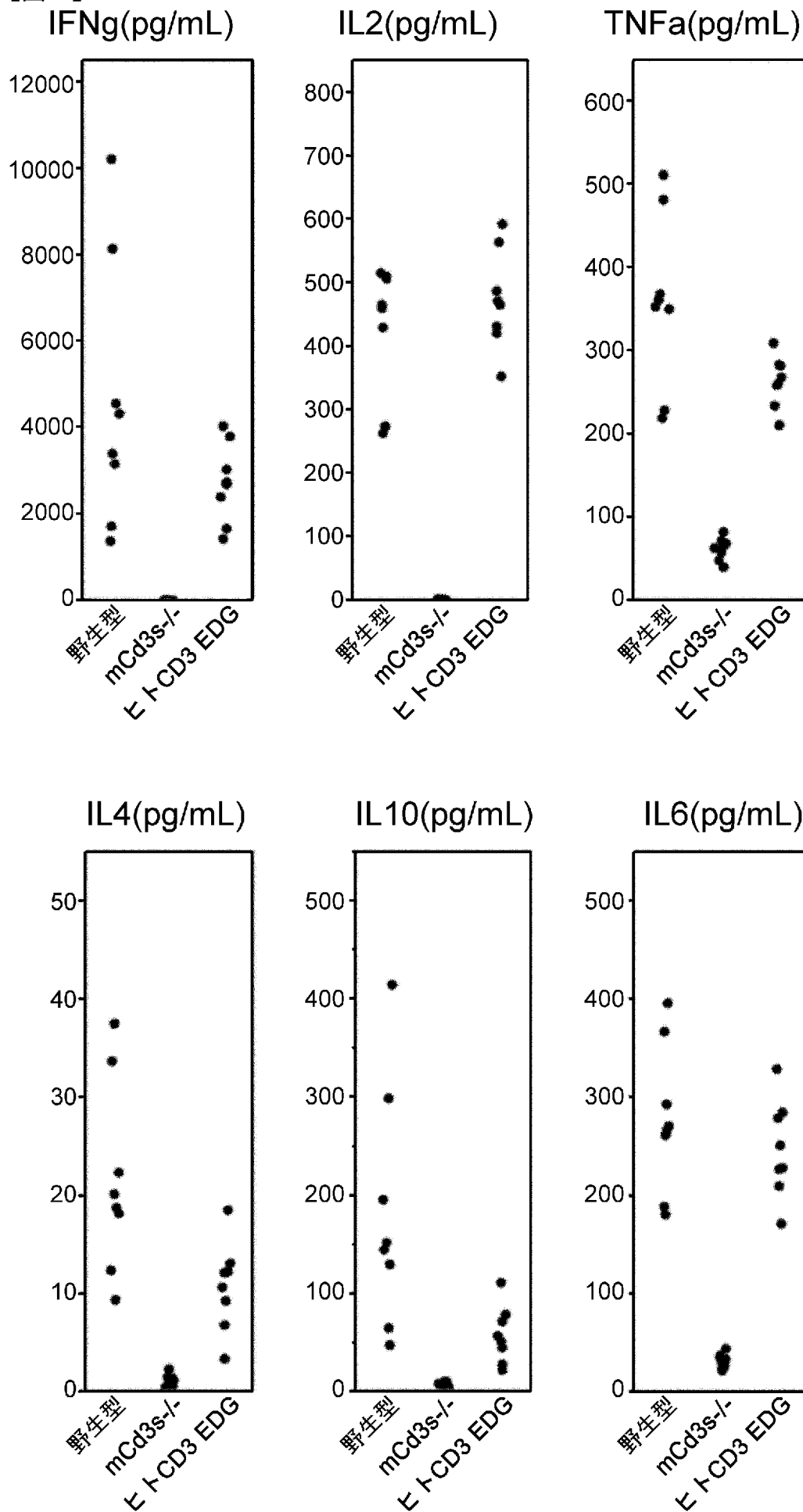
[図8]



[図9]

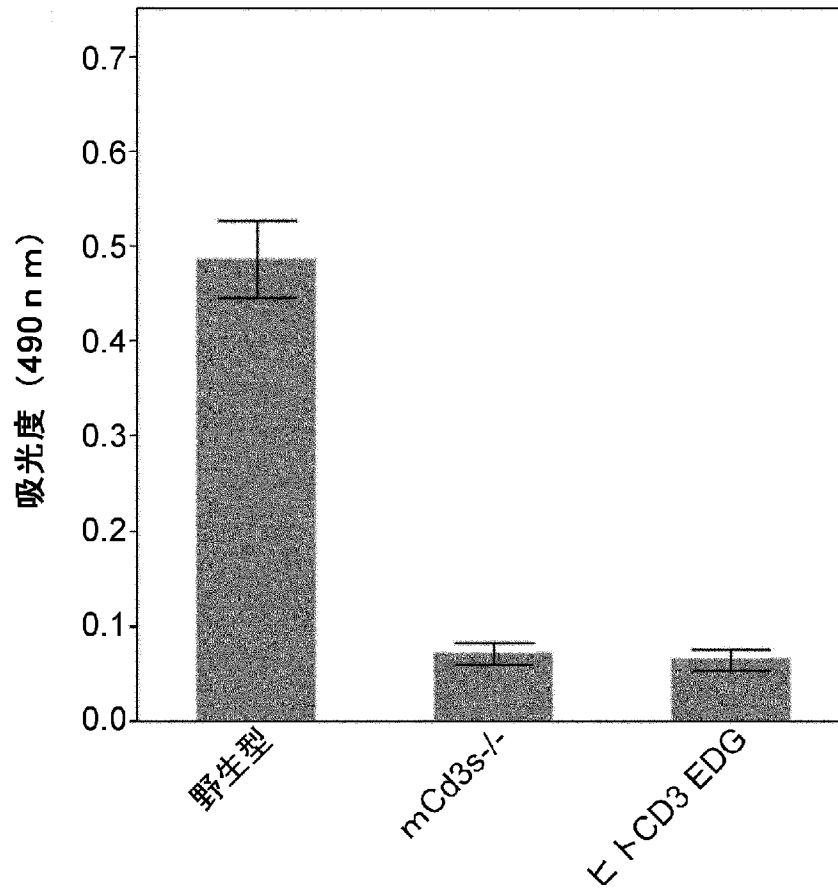


[図10]



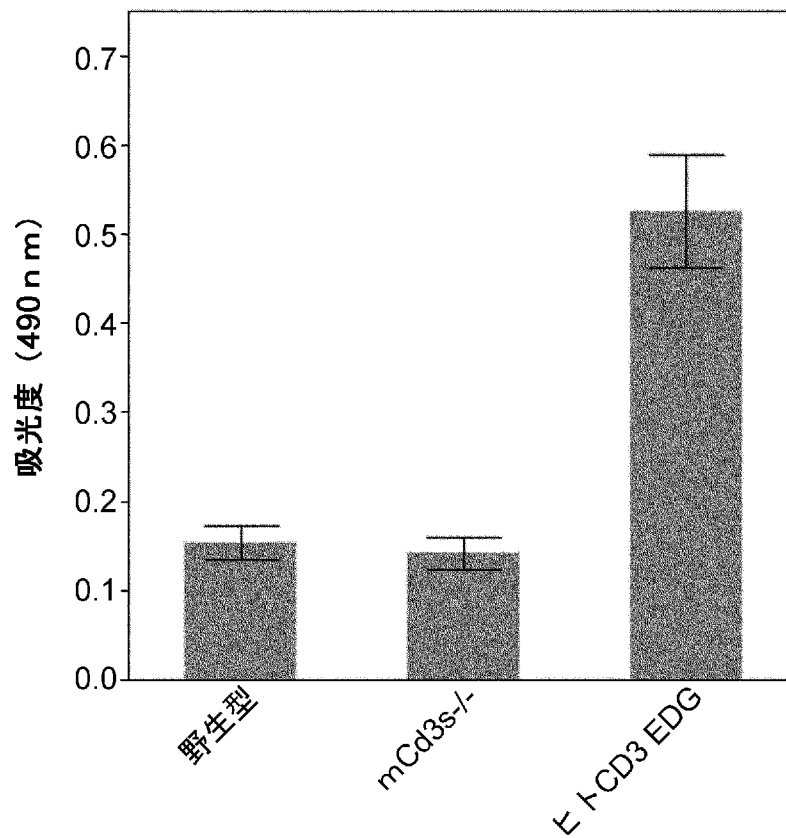
[図11A]

MTSアッセイ (抗マウスCD3抗体)



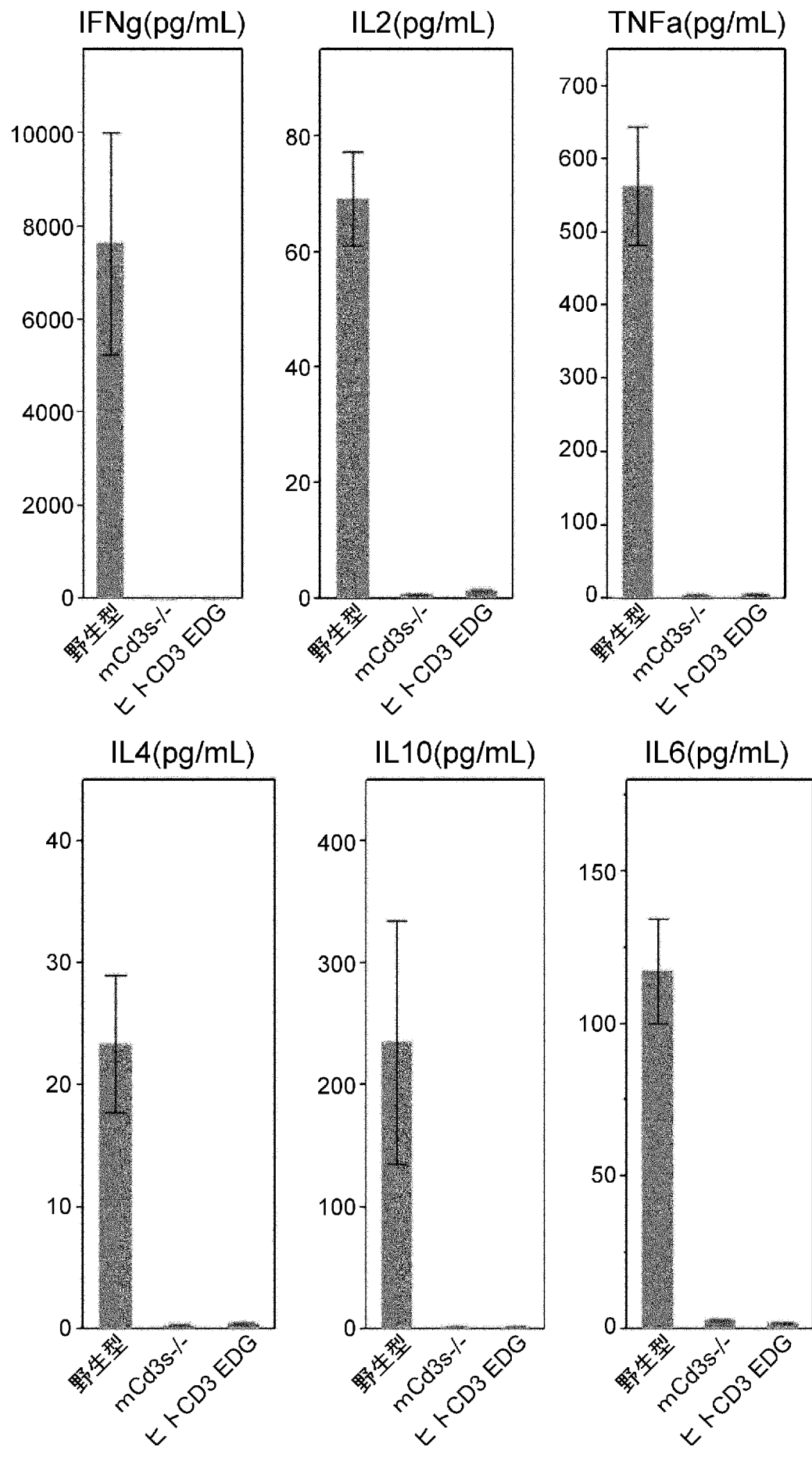
[図11B]

MTSアッセイ (抗ヒトCD3抗体)



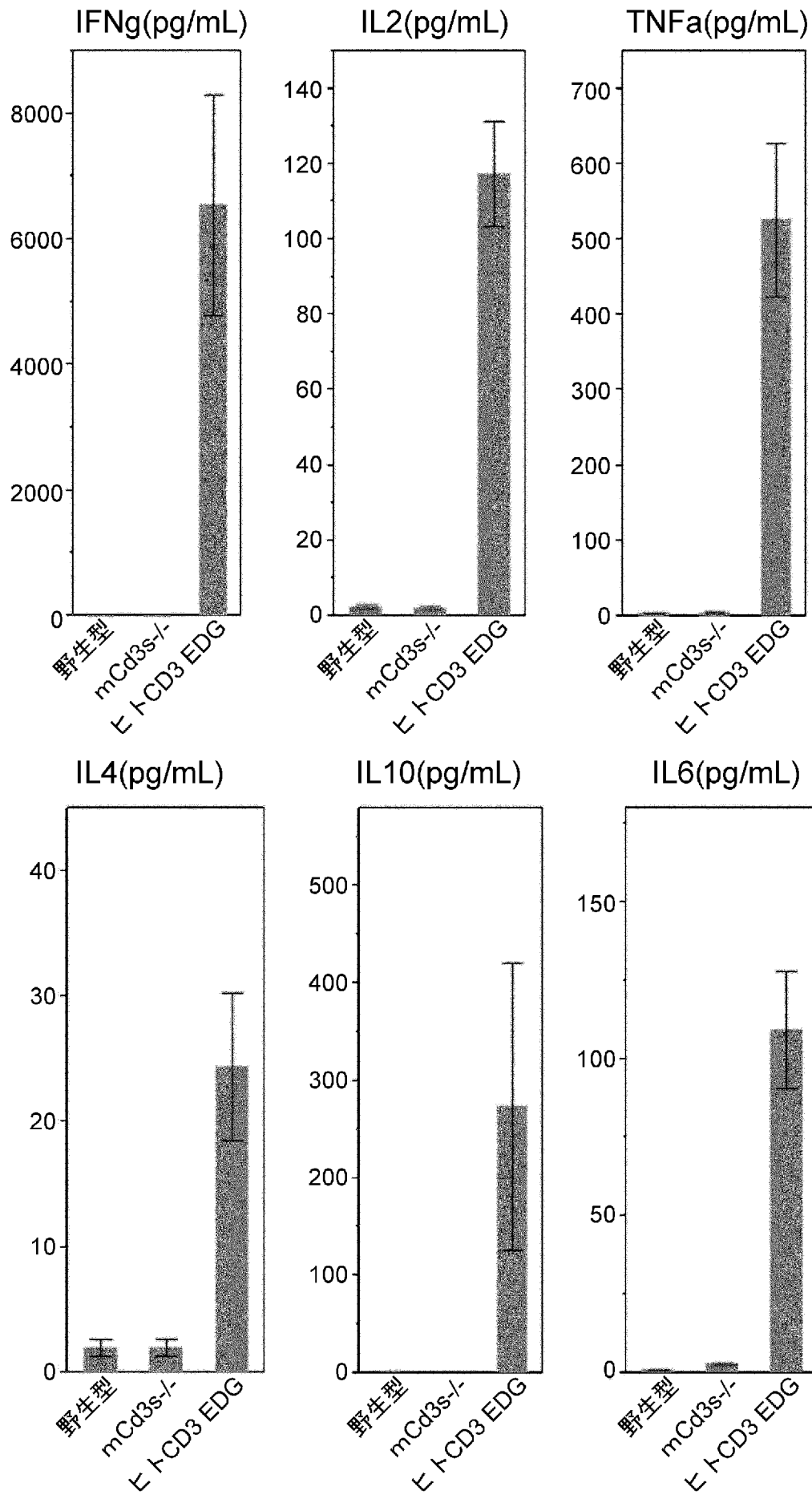
[図11C]

(抗マウスCD3抗体)



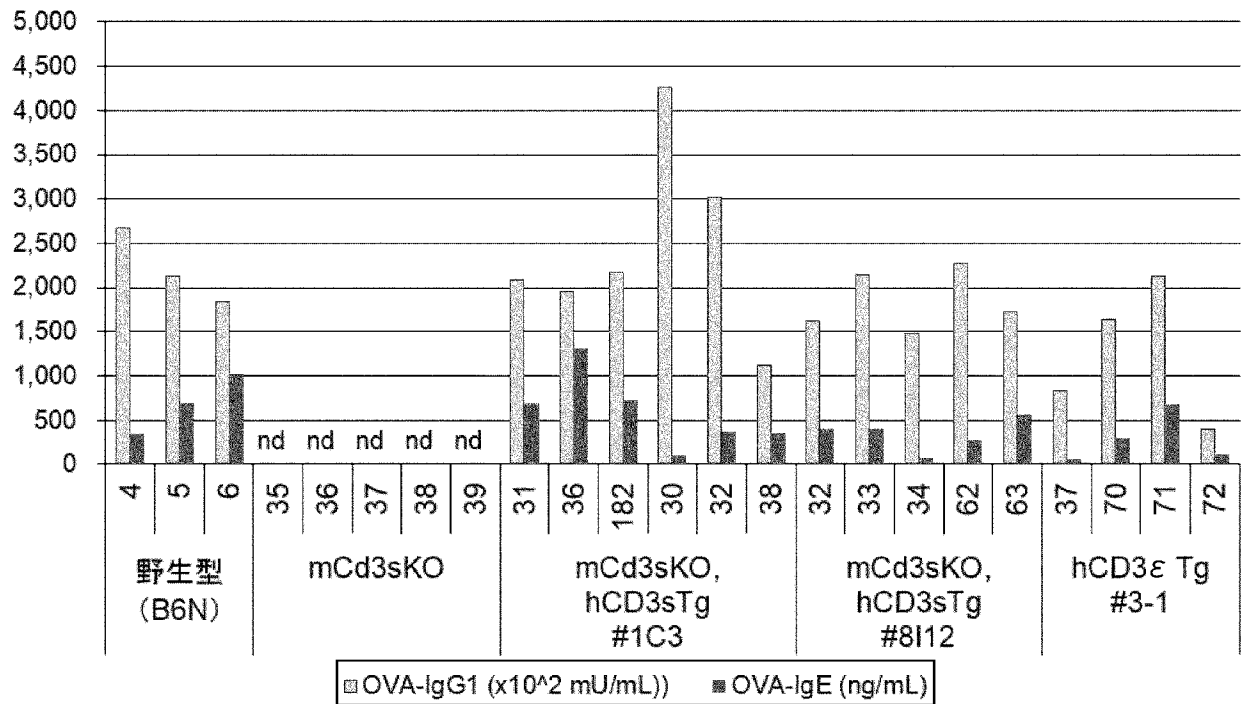
[図11D]

(抗ヒトCD3抗体)

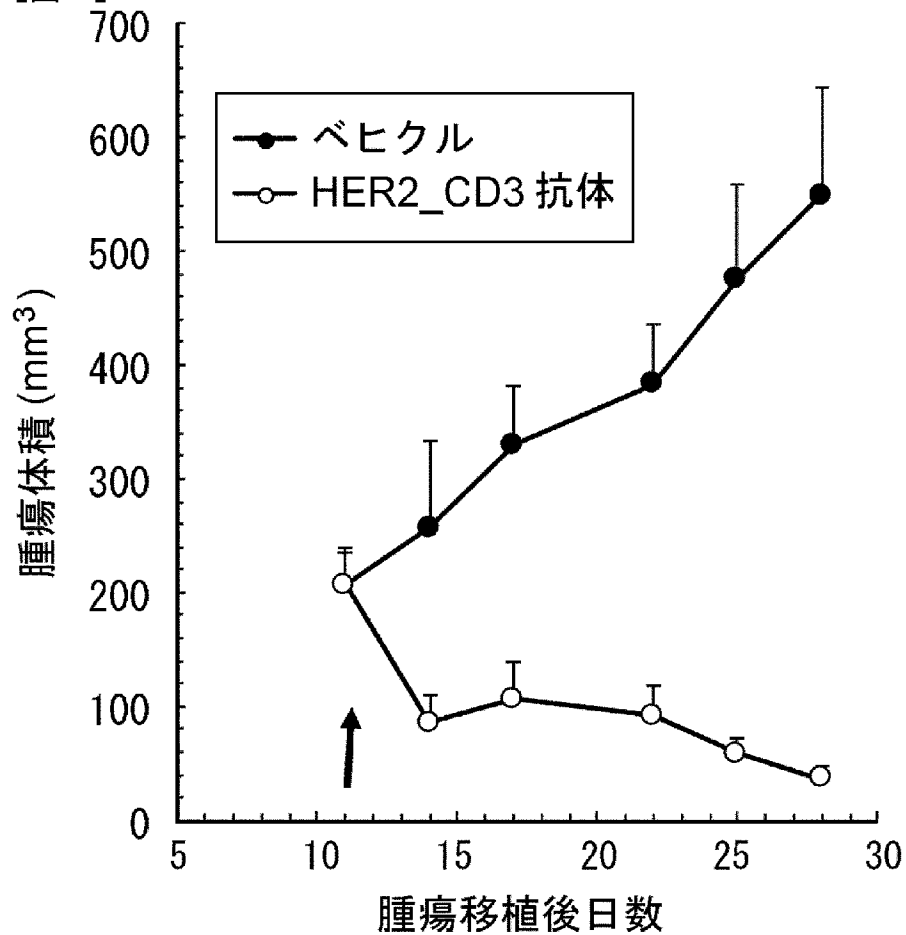


[図12]

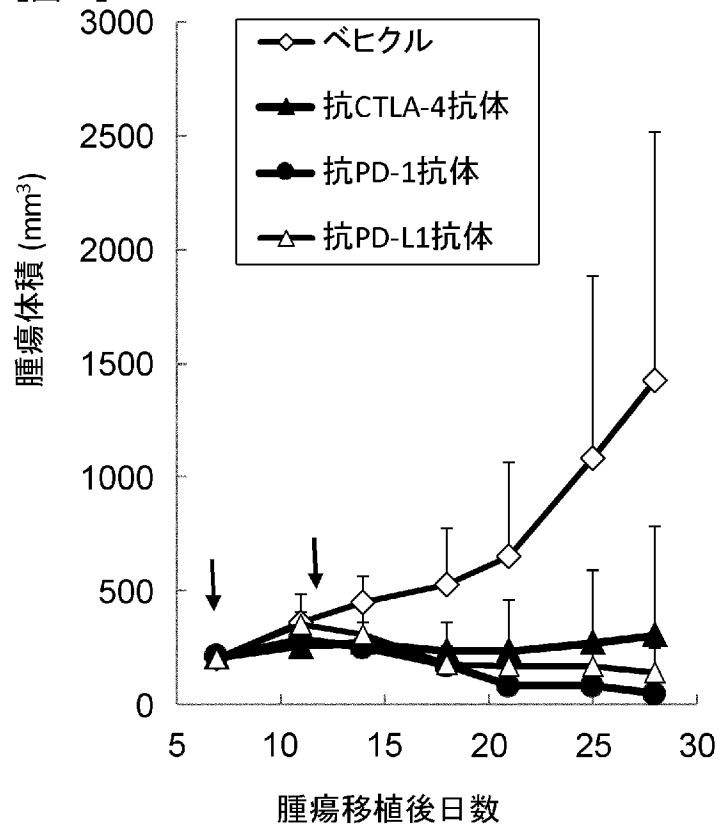
血清抗OVA抗体濃度



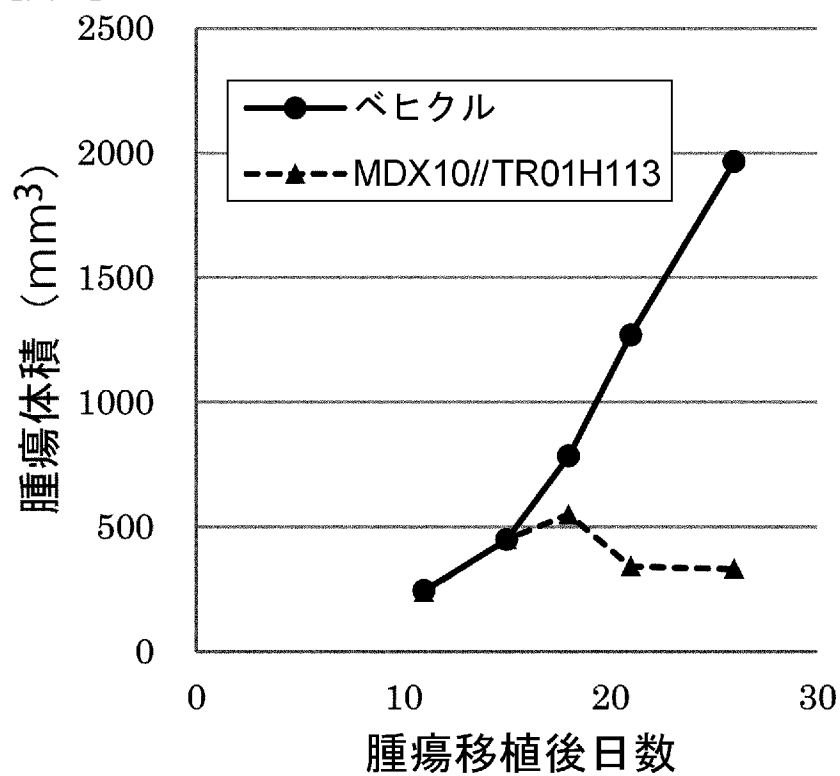
[図13]



[図14]



[図15]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/070276

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A01K67/027(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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)

A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09

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/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPLUS/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X/Y	PAN Q. et al., Different role for mouse and human CD3δ/ε heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: Human CD3δ/ε heterodimer restores the defective preTCR function in CD3γ- and CD3γδ- deficient mice, Mol. Immunol., 2006.04, Vol.43. No.11, p.1741-1750, particularly, abstract, fig. 8, page 1743, right column, lines 18 to 24	1, 3-6, 11/ 1-16
X/Y	FERNANDEZ-MALAVE E. et al., Overlapping functions of human CD3δ and mouse CD3γ in αβ T-cell development revealed in a humanized CD3γ-deficient mouse, Blood, 2006.11.15, Vol. 108, No.10, p.3420-3427, particularly, abstract, page 3426, right column, lines 15 to 22	1, 3-6, 11/ 1-16

☒ 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

"T" 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
27 September 2016 (27.09.16)Date of mailing of the international search report
04 October 2016 (04.10.16)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/JP2016/070276

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG B. et al., A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3E gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994.09.27, Vol.91, No.20, p.9402-9406, particularly, page 9402, right column, lines 27 to 37	1-16

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (I P C))

Int.Cl. A01K67/027(2006.01)i, G01N33/15(2006.01)i, G01N33/50(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)n

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 (I P C))

Int.Cl. A01K67/027, G01N33/15, G01N33/50, C12N15/09

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/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), CPlus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN)

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
X/ Y	PAN Q. et al., Different role for mouse and human CD3 δ / ϵ heterodimer in preT cell receptor (preTCR) function: Human CD3 δ / ϵ heterodimer restores the defective preTCR function in CD3 γ - and CD3 γ δ - deficient mice, Mol. Immunol., 2006.04, Vol.43. No.11, p.1741-1750, 特に要約、図 8、第 1743 頁右欄第 18-24 行	1, 3-6, 11/ 1-16

☒ 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

2 7 . 0 9 . 2 0 1 6

国際調査報告の発送日

0 4 . 1 0 . 2 0 1 6

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (I S A / 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)

小金井 悟

4 N

3 9 6 1

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

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
X/ Y	FERNANDEZ-MALAVE E. et al., Overlapping functions of human CD3 δ and mouse CD3 γ in $\alpha \beta$ T-cell development revealed in a humanized CD3 γ -deficient mouse, Blood, 2006.11.15, Vol.108, No.10, p.3420-3427, 特に要約、第 3426 頁右欄第 15-22 行	1, 3-6, 11/ 1-16
A	WANG B. et al., A block in both early T lymphocyte and natural killer cell development in transgenic mice with high-copy numbers of the human CD3E gene, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994.09.27, Vol.91, No.20, p.9402-9406, 特に第 9402 頁右欄第 27-37 行	1-16