

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7519990号
(P7519990)

(45)発行日 令和6年7月22日(2024.7.22)

(24)登録日 令和6年7月11日(2024.7.11)

(51)国際特許分類		F I		
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/28	Z N A
C 1 2 N	1/15 (2006.01)	C 1 2 N	1/15	
C 1 2 N	1/19 (2006.01)	C 1 2 N	1/19	
C 1 2 N	1/21 (2006.01)	C 1 2 N	1/21	
C 1 2 N	5/10 (2006.01)	C 1 2 N	5/10	
請求項の数 13 (全173頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-512587(P2021-512587)	(73)特許権者	000003311	
(86)(22)出願日	令和1年9月27日(2019.9.27)		中外製薬株式会社	
(65)公表番号	特表2022-502010(P2022-502010 A)		東京都北区浮間5丁目5番1号	
(43)公表日	令和4年1月11日(2022.1.11)	(74)代理人	100102978	
(86)国際出願番号	PCT/JP2019/038138		弁理士 清水 初志	
(87)国際公開番号	WO2020/067419	(74)代理人	100205707	
(87)国際公開日	令和2年4月2日(2020.4.2)		弁理士 小寺 秀紀	
審査請求日	令和4年9月2日(2022.9.2)	(74)代理人	100160923	
(31)優先権主張番号	特願2018-185120(P2018-185120)		弁理士 山口 裕孝	
(32)優先日	平成30年9月28日(2018.9.28)	(74)代理人	100119507	
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)		弁理士 刑部 俊	
(31)優先権主張番号	特願2019-104308(P2019-104308)	(74)代理人	100142929	
(32)優先日	令和1年6月4日(2019.6.4)		弁理士 井上 隆一	
最終頁に続く		(74)代理人	100148699	
			弁理士 佐藤 利光	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 C D 3 および C D 1 3 7 に結合することができるが、同時には結合しない、抗原結合分子

(57)【特許請求の範囲】
【請求項1】

C D 3 および C D 1 3 7 に結合することができるが、C D 3 と C D 1 3 7 に同時には結合しない抗体可変領域を含み、C D 1 3 7 に対するアゴニスト活性を有する、抗原結合分子であって、前記抗体可変領域が、以下のうちのいずれか1つを含む、前記抗原結合分子：

(b 1) 配列番号：2 0 のアミノ酸配列を含むH C D R 1、配列番号：3 4 のアミノ酸配列を含むH C D R 2、配列番号：4 8 のアミノ酸配列を含むH C D R 3、配列番号：6 3 のアミノ酸配列を含むL C D R 1、配列番号：6 8 のアミノ酸配列を含むL C D R 2、および配列番号：7 3 のアミノ酸配列を含むL C D R 3；

(b 2) 配列番号：1 7 のアミノ酸配列を含むH C D R 1、配列番号：3 1 のアミノ酸配列を含むH C D R 2、配列番号：4 5 のアミノ酸配列を含むH C D R 3、配列番号：6 4 のアミノ酸配列を含むL C D R 1、配列番号：6 9 のアミノ酸配列を含むL C D R 2、および配列番号：7 4 のアミノ酸配列を含むL C D R 3；

(b 3) 配列番号：1 8 のアミノ酸配列を含むH C D R 1、配列番号：3 2 のアミノ酸配列を含むH C D R 2、配列番号：4 6 のアミノ酸配列を含むH C D R 3、配列番号：6 3 のアミノ酸配列を含むL C D R 1、配列番号：6 8 のアミノ酸配列を含むL C D R 2、および配列番号：7 3 のアミノ酸配列を含むL C D R 3；

(b 4) 配列番号：1 9 のアミノ酸配列を含むH C D R 1、配列番号：3 3 のアミノ酸配列を含むH C D R 2、配列番号：4 7 のアミノ酸配列を含むH C D R 3、配列番号：6 3 のアミノ酸配列を含むL C D R 1、配列番号：6 8 のアミノ酸配列を含むL C D R 2、および配列番号：7

3のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b5) 配列番号：19のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：33のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：47のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：65のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：70のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：75のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b6) 配列番号：16のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：30のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：44のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b7) 配列番号：22のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：36のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：50のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

10

(b8) 配列番号：23のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：37のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：51のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b9) 配列番号：23のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：37のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：51のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：66のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：71のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：76のアミノ酸配列を含むLCDR3；

20

(b10) 配列番号：24のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：38のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：52のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b11) 配列番号：25のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：39のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：53のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：66のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：71のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：76のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b12) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：40のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：54のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：66のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：71のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：76のアミノ酸配列を含むLCDR3；

30

(b13) 配列番号：26のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：40のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：54のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b14) 配列番号：27のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：41のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：55のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

40

(b15) 配列番号：28のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：42のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：56のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3。

【請求項2】

CD3およびCD137に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合しない抗体可変領域を含み、CD137に対するアゴニスト活性を有する、抗原結合分子であって、

前記抗体可変領域が、以下のうちのいずれか1つを含む、前記抗原結合分子：

(d1) 配列番号：6の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメ

50

イン (VL) ;

(d 2) 配列番号 : 3 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 9 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 3) 配列番号 : 4 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 4) 配列番号 : 5 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 5) 配列番号 : 5 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 6 0 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 6) 配列番号 : 2 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

10

(d 7) 配列番号 : 8 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 8) 配列番号 : 9 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 9) 配列番号 : 9 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 6 1 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 10) 配列番号 : 1 0 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 11) 配列番号 : 1 1 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 6 1 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

20

(d 12) 配列番号 : 1 2 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 6 1 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 13) 配列番号 : 1 2 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 14) 配列番号 : 1 3 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) ;

(d 15) 配列番号 : 1 4 の重鎖可変ドメイン (VH) 、および配列番号 : 5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL) 。

【請求項 3】

30

以下の (1) ~ (3) からなる群より選択される少なくとも 1 つの特徴を有する、請求項 1 または 2 に記載の抗原結合分子：

(1) 抗原結合分子が、各々が異なる細胞上で発現している CD3 と CD137 に同時には結合しない；ならびに

(2) 抗原結合分子が、配列番号 : 1 の VH 配列および配列番号 : 5 7 の VL 配列を含む参照抗体と比較して、同等のまたは 10 倍、20 倍、50 倍、100 倍低い、ヒト CD137 に対する結合についての KD 値を有し、ここで、該 KD 値は、SPR によって以下の条件：

37°C、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子が CM4 センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定される。

40

【請求項 4】

CD3 および CD137 とは異なる第 3 の抗原に結合することができる抗体可変領域をさらに含む、請求項 1 ~ 3 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 5】

第 3 の抗原が、がん組織において特異的に発現している分子である、請求項 4 に記載の抗原結合分子。

【請求項 6】

抗体 Fc 領域をさらに含む、請求項 1 ~ 5 のいずれか一項に記載の抗原結合分子。

【請求項 7】

前記 Fc 領域が、天然型ヒト IgG1 抗体の Fc 領域と比較して FcγR に対する結合活性が低下

50

しているFc領域である、請求項6に記載の抗原結合分子。

【請求項8】

請求項1～7のいずれか一項に記載の抗原結合分子と、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬組成物。

【請求項9】

請求項1～7のいずれか一項に記載の抗原結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

【請求項10】

請求項9に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

【請求項11】

請求項9に記載のポリヌクレオチドまたは請求項10に記載の発現ベクターで形質転換されたかまたはそれをトランスフェクトされた、宿主細胞。

【請求項12】

請求項11に記載の宿主細胞を培養する工程を含む、多重特異性抗原結合分子または多重特異性抗体を作製する方法。

【請求項13】

以下の工程を含む、CD3およびCD137に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合しない抗体可変領域を取得するかまたはスクリーニングする方法：

- (a) 複数の抗体可変領域を含むライブラリーを提供する工程、
- (b) 工程(a)において提供されたライブラリーを、第1の抗原としてのCD3またはCD137のいずれかと接触させ、第1の抗原に結合した抗体可変領域を収集する工程、
- (c) 工程(b)において収集された抗体可変領域を、CD3およびCD137のうちの第2の抗原と接触させ、第2の抗原に結合した抗体可変領域を収集する工程、ならびに
- (d) 以下の抗体可変領域：

(1) SPRによって以下の条件：

37°C、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子がCM4センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定した場合に、約 5×10^{-6} M未満もしくは 5×10^{-6} M～ 3×10^{-8} Mの平衡解離定数(KD)でCD137に結合し、CD137に対するアゴニスト活性を有する、抗体可変領域；および／または

(2) SPRによって以下の条件：

25°C、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子がCM4センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定した場合に、 2×10^{-6} M～ 1×10^{-8} Mの平衡解離定数(KD)でCD3に結合する、抗体可変領域を選択する工程。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、CD3およびCD137(4-1BB)に結合する抗原結合分子、ならびにそれを使用する方法に関する。

【背景技術】

【0002】

抗体は、血漿中での安定性が高く、有害反応をほとんど生じないため、医薬として注目されている(Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078 (非特許文献1)およびEur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396 (非特許文献2))。抗体は、抗原に結合する作用、およびアゴニスト作用またはアンタゴニスト作用を有するだけでなく、ADCC(抗体依存性細胞傷害活性)、ADCP(抗体依存性細胞貪食作用)、またはCDC(補体依存性細胞傷害活性)などの、エフェクター細胞によって媒介される細胞傷害活性(エフェクター機能とも言う)を誘導する。特に、IgG1サブクラスの抗体は、がん細胞に対してエ

10

20

30

40

50

フェクター機能を示すため、多数の抗体医薬が、腫瘍学の分野において開発されている。

【0003】

抗体がADCC、ADCP、またはCDCを発揮するためには、そのFc領域が、エフェクター細胞（NK細胞またはマクロファージなど）上に存在する抗体受容体（FcγR）および様々な補体成分に結合しなければならない。ヒトでは、FcγRのタンパク質ファミリーとして、FcγRIa、FcγRIIa、FcγRIIb、FcγRIIIa、およびFcγRIIIbのアイソフォームが報告されており、それぞれのアロタイプも報告されている（Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65（非特許文献3））。これらのアイソフォームのうち、FcγRIa、FcγRIIa、およびFcγRIIIaは、その細胞内ドメインにITAM（免疫受容体活性化チロシンモチーフ）と呼ばれるドメインを有し、これは活性化シグナルを伝達する。対照的に、FcγRIIbのみが、その細胞内ドメインにITIM（免疫受容体抑制性チロシンモチーフ）と呼ばれるドメインを有し、これは抑制シグナルを伝達する。FcγRのこれらのアイソフォームはすべて、免疫複合体などによる架橋によって、シグナルを伝達することが知られている（Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47（非特許文献4））。実際に、抗体ががん細胞に対してエフェクター機能を発揮する時には、エフェクター細胞膜上のFcγR分子が、がん細胞膜上に結合した複数の抗体のFc領域によってクラスターとなり、それによってエフェクター細胞を通して活性化シグナルが伝達される。その結果、殺細胞効果が発揮される。この点において、FcγRの架橋は、がん細胞近くに位置するエフェクター細胞に限られ、これは、免疫の活性化ががん細胞に局限化されることを示している（Ann. Rev. Immunol. (1988). 6, 251-81（非特許文献5））。

【0004】

天然型の免疫グロブリンは、その可変領域により抗原に結合し、その定常領域によりFcγR、FcRn、FcαR、およびFcεRなどの受容体または補体に結合する。FcRn（IgGのFc領域で相互作用する結合分子）の各分子は、抗体の各重鎖に1分子ずつ結合する。したがって、IgG型の抗体1分子に対して2分子のFcRnが結合することが報告されている。FcRnなどとは異なり、FcγRは、抗体のヒンジ領域およびCH2ドメインで相互作用し、IgG型の抗体1分子に対して1分子のみのFcγRが結合する（J. Bio. Chem., (20001) 276, 16469-16477）。FcγRと抗体のFc領域との間の結合には、抗体のヒンジ領域およびCH2ドメイン中のいくつかのアミノ酸残基、ならびにCH2ドメインのAsn 297（EUナンバリング）に付加された糖鎖が重要であることが見出されている（Chem. Immunol. (1997), 65, 88-110（非特許文献6））、Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104（非特許文献7）、およびImmunol. (1995) 86, 319-324（非特許文献8））。この結合部位を中心に、様々なFcγR結合特性を有するFc領域バリエーションがこれまでに研究されて、活性化FcγRに対するより高い結合活性を有するFc領域バリエーションが得られている（WO2000/042072（特許文献1）およびWO2006/019447（特許文献2））。例えば、Lazarらは、ヒトIgG1のSer 239、Ala 330、およびIle 332（EUナンバリング）をそれぞれAsn、Leu、およびGluにより置換することによって、ヒトFcγRIIIa（V158）に対するヒトIgG1の結合活性を約370倍に増加させることに成功している（Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103, 4005-4010（非特許文献9）およびWO2006/019447（特許文献2））。この改変形態は、FcγRIIbに対するFcγRIIIaの比（A/I比）の点で、野生型に比べて結合活性が約9倍になっている。あるいは、Shinkawaらは、Asn 297（EUナンバリング）に付加される糖鎖のフコースを欠損させることによって、FcγRIIIaに対する結合活性を約100倍に増加させることに成功している（J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473（非特許文献10））。これらの方法によって、天然型ヒトIgG1と比較してヒトIgG1のADCC活性を大幅に改善することができる。

【0005】

天然型のIgG型抗体は、典型的には、その可変領域（Fab）により1つのエピトープを認識して結合するため、1つの抗原にしか結合することができない。一方で、がんまたは炎症においては多種類のタンパク質が関与することが知られており、これらのタンパク質は、互いにクロストークしていることがある。例えば、免疫疾患では、いくつかの炎症性サ

イトカイン（TNF、IL1、およびIL6）が関与していることが知られている（Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10（非特許文献11））。また、がんによる薬剤耐性の獲得の基となる1つのメカニズムとして、他の受容体が活性化することが知られている（Endocr Rel at Cancer (2006) 13, 45-51（非特許文献12））。このような場合、1つのエピトープを認識する通常の抗体では、複数のタンパク質を阻害することができない。

【0006】

複数の標的を阻害する分子として、1つの分子で2種類以上の抗原に結合する抗体（これらの抗体を二重特異性抗体と言う）が研究されている。天然型のIgG型抗体を改良することによって、2つの異なる抗原（第1の抗原および第2の抗原）に対する結合活性を付与することができる（mAbs. (2012) Mar 1, 4(2)）。そのため、そのような抗体は、これらの2種類以上の抗原を1つの分子で中和する作用だけでなく、細胞傷害活性を有する細胞をがん細胞に架橋することによって抗腫瘍活性を高める作用を有する。二重特異性抗体の分子形として、抗体のN末端またはC末端に抗原結合部位を付加した分子（DVD-Ig、TCB、およびscFv-IgG）、抗体の2つのFab領域が異なる配列を有する分子（共通L鎖二重特異性抗体およびハイブリッドハイブリドーマ）、1つのFab領域が2つの抗原を認識する分子（Two-in-one IgGおよびDutaMab）、ならびにCH3ドメインループを別の抗原結合部位として有する分子（Fcab）が、これまでに報告されている（Nat. Rev. (2010), 10, 301-316（非特許文献13）およびPeds(2010), 23(4), 289-297（非特許文献14））。これらの二重特異性抗体はいずれも、そのFc領域でFcγRと相互作用するため、抗体のエフェクター機能はそれにおいて保存されている。

【0007】

二重特異性抗体により認識される抗原がすべて、がんにおいて特異的に発現している抗原であれば、抗原のいずれかに結合する二重特異性抗体は、がん細胞に対して細胞傷害活性を示すため、1つの抗原を認識する従来の抗体医薬よりも効率的な抗がん効果が期待できる。しかし、二重特異性抗体により認識される抗原のうちのいずれか1つが、正常組織において発現している場合、または免疫細胞において発現している細胞である場合は、FcγRとの架橋によって正常組織の障害またはサイトカインの放出が起こる（J. Immunol. (1999) Aug 1, 163(3), 1246-52（非特許文献15））。その結果、強い有害反応が誘導される。

【0008】

例えば、T細胞に発現しているタンパク質とがん細胞に発現しているタンパク質（がん抗原）とを認識する二重特異性抗体として、カツマキシマブ（catumaxomab）が知られている。カツマキシマブは、2つのFabで、それぞれがん抗原（EpCAM）およびT細胞に発現しているCD3ε鎖に結合する。カツマキシマブは、がん抗原とCD3εに同時に結合することによって、T細胞媒介性の細胞傷害活性を誘導し、がん抗原とFcγRに同時に結合することによって、NK細胞または抗原提示細胞（例えば、マクロファージ）媒介性の細胞傷害活性を誘導する。これらの2つの細胞傷害活性を使用することにより、カツマキシマブは、腹腔内投与によって悪性腹水症に対して高い治療効果を示しており、したがって欧州で承認されている（Cancer Treat Rev. (2010) Oct 36(6), 458-67（非特許文献16））。さらに、カツマキシマブの投与によって、がん細胞に対して反応する抗体が出現した例が報告され、獲得免疫が誘導されることが実証された（Future Oncol. (2012) Jan 8(1), 73-85（非特許文献17））。この結果から、T細胞媒介性の細胞傷害活性と、FcγRを介したNK細胞またはマクロファージなどの細胞によってもたらされる作用との両方を有するこのような抗体（これらの抗体を特に三機能性抗体と言う）は、強い抗腫瘍効果と獲得免疫の誘導が期待できるため、注目されている。

【0009】

しかし、三機能性抗体は、がん抗原の非存在下でも、CD3εとFcγRに同時に結合するため、がん細胞が存在しない環境でもCD3εを発現しているT細胞をFcγRを発現している細胞に架橋して、様々なサイトカインを大量に産生させる。このようながん抗原非依存的な様々なサイトカインの産生の誘導に起因して、三機能性抗体の投与は現状、腹腔内経路

10

20

30

40

50

に限られている (Cancer Treat Rev. 2010 Oct 36(6), 458-67 (非特許文献 16))。三機能性抗体は、重篤なサイトカインストーム様の有害反応のゆえに、全身投与が非常に困難である (Cancer Immunol Immunother. 2007 Sep; 56(9): 1397-406 (非特許文献 18))。

従来技術の二重特異性抗体は、両方の抗原、すなわち、第 1 の抗原であるがん抗原 (EpCAM) および第 2 の抗原である CD3 ϵ に、Fc γ R への結合と同時に結合し得るため、Fc γ R および第 2 の抗原である CD3 ϵ に同時に結合することによって引き起こされるこのような有害反応は、その分子構造的に回避することができない。

近年、Fc γ R に対する結合活性を低下させた Fc 領域を用いることで、有害反応を回避しつつ、T 細胞によって媒介される細胞傷害活性を引き起こす改良型抗体が提供されている (WO2012/073985)。

しかしながら、このような抗体であっても、その分子構造を踏まえると、がん抗原に結合しつつ 2 つの免疫受容体、すなわち、CD3 ϵ および Fc γ R に作用することはできない。

有害反応を回避しつつ、がん抗原特異的な様式で、T 細胞によって媒介される細胞傷害活性と、T 細胞以外の細胞によって媒介される細胞傷害活性との両方を発揮する抗体は、まだ知られていない。

【0010】

T 細胞は、腫瘍免疫において重要な役割を果たし、1) 主要組織適合複合体 (MHC) クラス I 分子によって提示される抗原ペプチドに対する T 細胞受容体 (TCR) の結合および TCR の活性化；ならびに 2) 抗原提示細胞上のリガンドに対する T 細胞の表面上の共刺激分子の結合および共刺激分子の活性化、の 2 つのシグナルによって活性化されることが知られている。さらに、腫瘍壊死因子 (TNF) スーパーファミリーおよび TNF 受容体スーパーファミリーに属する分子、例えば T 細胞の表面上の CD137 (4-1BB) の活性化は、T 細胞活性化に重要であると説明されている (Vinay, 2011, Cellular & Molecular Immunology, 8, 281-284 (非特許文献 19))。

【0011】

CD137 アゴニスト抗体は、抗腫瘍効果を示すことが既の実証されており、これは、主に CD8 陽性 T 細胞および NK 細胞の活性化により、実験的に示されている (Houot, 2009, Blood, 114, 3431-8 (非特許文献 20))。細胞外ドメインとしての腫瘍抗原結合ドメイン、ならびに細胞内ドメインとしての CD3 および CD137 シグナル伝達ドメインからなるキメラ抗原受容体分子を有するように操作された T 細胞 (CAR-T 細胞) は、効力の存続性を増強することができる (Porter, N ENGL J MED, 2011, 365:725-733 (非特許文献 21))。しかし、そのような CD137 アゴニスト抗体のその非特異的肝毒性による副作用は、临床上および非临床上問題であり、薬剤の開発は前進していない (Dubrot, Cancer Immunol. Immunother., 2010, 28, 512-22 (非特許文献 22))。副作用の主な原因は、抗体定常領域を介した Fc γ 受容体に対する抗体の結合が関与していることが示唆されている (Schabowsky, Vaccine, 2009, 28, 512-22 (非特許文献 23))。さらに、TNF 受容体スーパーファミリーに属する受容体を標的とするアゴニスト抗体がインビボでアゴニスト活性を発揮するためには、Fc γ 受容体発現細胞 (Fc γ RII 発現細胞) による抗体架橋が必要であることが報告されている (Li, Proc Natl Acad Sci USA. 2013, 110(48), 19501-6 (非特許文献 24))。WO2015/156268 (特許文献 3) は、CD137 アゴニスト活性を有する結合ドメインと腫瘍特異的抗原に対する結合ドメインとを有する二重特異性抗体が、腫瘍特異的抗原を発現する細胞の存在下でのみ、CD137 アゴニスト活性を発揮し、かつ免疫細胞を活性化することができ、それによって CD137 アゴニスト抗体の肝毒性有害事象が、抗体の抗腫瘍活性を保持しつつ避けられ得ることを記載している。WO2015/156268 はさらに、この二重特異性抗体を、CD3 アゴニスト活性を有する結合ドメインと腫瘍特異的抗原に対する結合ドメインとを有する別の二重特異性抗体と組み合わせることで、抗腫瘍活性をさらに高めることができ、かつこれらの有害事象が避けられ得ることを記載している。CD137、CD3、および腫瘍特異的抗原 (EGFR) に対する 3 つの結合ドメインを有する三重特異的抗体もまた、報告されている (WO2014/1168

10

20

30

40

50

46（特許文献4））。しかし、有害反応を回避しつつ、がん抗原特異的な様式で、T細胞によって媒介される細胞傷害活性と、CD137を介するT細胞および他の免疫細胞の活性化活性とを両方とも発揮する抗体は、まだ知られていない。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0012】

【文献】WO2000/042072

【文献】WO2006/019447

【文献】WO2015/156268

【文献】WO2014/116846

10

【非特許文献】

【0013】

【文献】Nat. Biotechnol. (2005) 23, 1073-1078

【文献】Eur J Pharm Biopharm. (2005) 59 (3), 389-396

【文献】Immunol. Lett. (2002) 82, 57-65

【文献】Nat. Rev. Immunol. (2008) 8, 34-47

【文献】Ann. Rev. Immunol. (1988). 6. 251-81

【文献】Chem. Immunol. (1997), 65, 88-110

【文献】Eur. J. Immunol. (1993) 23, 1098-1104

【文献】Immunol. (1995) 86, 319-324

20

【文献】Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2006) 103, 4005-4010

【文献】J. Biol. Chem. (2003) 278, 3466-3473

【文献】Nat. Biotech., (2011) 28, 502-10

【文献】Endocr Relat Cancer (2006) 13, 45-51

【文献】Nat. Rev. (2010), 10, 301-316

【文献】Peds (2010), 23 (4), 289-297

【文献】J. Immunol. (1999) Aug 1, 163 (3), 1246-52

【文献】Cancer Treat Rev. (2010) Oct 36 (6), 458-67

【文献】Future Oncol. (2012) Jan 8 (1), 73-85

【文献】Cancer Immunol Immunother. 2007 Sep; 56 (9): 1397-406

30

【文献】Vinay, 2011, Cellular & Molecular Immunology, 8, 281-284

【文献】Houot, 2009, Blood, 114, 3431-8

【文献】Porter, N ENGL J MED, 2011, 365;725-733

【文献】Dubrot, Cancer Immunol. Immunother., 2010, 28, 512-22

【文献】Schabowsky, Vaccine, 2009, 28, 512-22

【文献】Li, Proc Natl Acad Sci USA. 2013, 110(48), 19501-6

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0014】

腫瘍特異的抗原（EGFR）結合ドメイン、CD137結合ドメイン、およびCD3結合ドメインを含む三重特異性抗体が、既に報告されている（WO2014116846）。しかし、このような分子形式を有する抗体は、3つの異なる抗原に同時に結合し得るため、本発明者らは、それらの三重特異性抗体が、CD3とCD137とに同時に結合することによって、CD3 ϵ 発現T細胞とCD137発現細胞（例えば、T細胞、B細胞、NK細胞、DCなど）との間の架橋をもたらし得ると推測した。

40

さらに、CD8およびCD3 ϵ に対する二重特異性抗体は、それらを架橋するため、CD8陽性T細胞同士の間で相互の細胞傷害活性を誘導することが既に報告されている（Wong, Clin. Immunol. Immunopathol. 1991, 58(2), 236-250）。したがって、本発明者らは、T細胞上で発現している分子およびCD3 ϵ に対する二重特異性抗体もまた、該分子を発現する細胞とCD3 ϵ を発現する細胞とを架橋するため、T細胞同士の間で相互の細胞傷害

50

活性を誘導するであろうと推測した。

【課題を解決するための手段】

【0015】

本発明は、CD3およびCD137に結合する抗原結合ドメイン、ならびにそれを使用する方法を提供する。本発明はまた、T細胞依存性細胞傷害活性を誘導する抗原結合分子をより効率的に取得する方法も提供する。

【0016】

本発明者らは、CD3およびCD137（4-1BB）に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合しない抗体可変領域と、CD3およびCD137とは異なる第3の抗原、好ましくは、がん組織において特異的に発現している分子、より好ましくはグリピカン-3（GPC3）に結合する可変領域とを含む、抗原結合分子を調製することに成功した。本発明者らは、CD3および／またはCD137に対する結合活性を改善することにより、3つの異なる抗原に対する結合を通して、これらの抗原結合分子によって誘導される増強されたT細胞依存性細胞傷害活性を示す、抗原結合分子を調製することに成功した。そのような抗原結合分子は、多重特異性抗原結合分子を医薬として使用した場合に有害反応の原因となると考えられる、異なる細胞上で発現している抗原に対する従来の多重特異性抗原結合分子の結合から生じる異なる細胞間の架橋を回避することができつつ、免疫療法において使用することができる。

【0017】

より具体的には、本発明は、以下に関する。

[1] CD3およびCD137に結合することができるがCD3とCD137に同時には結合しない抗体可変領域を含む、抗原結合分子であって、好ましくはSPRによって以下の条件：37°C、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子がCM4センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定した場合に、 5×10^{-6} M未満、 5×10^{-7} M未満、 5×10^{-8} M未満、または 3×10^{-8} M未満の平衡解離定数（KD）でCD137に結合する、前記抗原結合分子。

[1A]好ましくはSPRによって以下の条件：

37°C、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子がCM4センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定した場合に、 5×10^{-6} M～ 3×10^{-8} Mの平衡解離定数（KD）でCD137に結合する、[1]の抗原結合分子。

[1B]好ましくはSPRによって以下の条件：

25°C、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子がCM4センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定した場合に、 2×10^{-6} M～ 1×10^{-8} Mの平衡解離定数（KD）でCD3に結合する、[1]～[1A]の抗原結合分子。

[2]（a）配列番号：159のアミノ酸配列を含むCD3ε（CD3イプシロン）の細胞外ドメインの、少なくとも1個、2個、3個、もしくはそれよりも多いアミノ酸残基；ならびに／または

（b）ヒトCD137のLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTTRKECSSTSNAEC（配列番号：152）、好ましくはLQDPCSN、NNRNQI、および／もしくはGQRTCDIのアミノ酸配列を含むCD137のN末端領域の、少なくとも1個、2個、3個、もしくはそれよりも多いアミノ酸残基に結合する、[1]～[1B]の抗原結合分子。

[3]前記抗体可変領域が、1～25アミノ酸の改変を有する抗体可変領域であり、改変されるアミノ酸が、ループ中のアミノ酸、FR3領域中のアミノ酸、または、抗体H鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング31～35位、50～65位、71～74位、および95～102位、ならびにL鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング24～34位、50～56位、および89～97位から選択されるアミノ酸である、[1]～[2]の抗原結合分子。

[3A]重鎖可変ドメイン（VH）および／または軽鎖可変ドメイン（VL）が、表1. 3

(a)～表1.3(d)から選択される1個または複数個のアミノ酸置換を含み、該1個または複数個のアミノ酸置換が、表1.3(a)～表1.3(d)に示されるようにCD3および／またはCD137に対して少なくとも0.2、0.3、0.5、0.8、1、1.5、または2倍の結合親和性の増加を示す、[1]～[3]のいずれかの抗原結合分子。いくつかの態様において、抗体可変領域は、

(a)以下の位置(すべてKabatナンバリングによる)の各々に、その位置について示される以下のアミノ酸残基のうちの1個または複数個を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列：

アミノ酸26位のA、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W、もしくはY；

アミノ酸27位のD、F、G、I、M、もしくはL；

アミノ酸28位のD、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸29位のFもしくはW；

アミノ酸30位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸31位のF、I、N、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸32位のA、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸33位のW；

アミノ酸34位のF、I、L、M、もしくはV；

アミノ酸35位のF、H、S、T、V、もしくはY；

アミノ酸50位のE、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W、もしくはY；

アミノ酸51位のI、K、もしくはV；

アミノ酸52位のK、M、R、もしくはT；

アミノ酸52b位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、もしくはY；

アミノ酸52c位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸53位のA、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸54位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸55位のE、F、G、H、L、M、N、Q、W、もしくはY；

アミノ酸56位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸57位のA、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸58位のA、F、H、K、N、P、R、もしくはY；

アミノ酸59位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸60位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸61位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸62位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸63位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸64位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸65位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸93位のHもしくはR；

アミノ酸94位のF、G、H、L、M、S、T、V、もしくはY；

10

20

30

40

50

アミノ酸95位のIもしくはV；
アミノ酸96位のF、H、I、K、L、M、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸97位のF、Y、もしくはW；
アミノ酸98位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸99位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100a位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100b位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100c位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100d位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100e位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100f位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100g位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100h位のA、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T、もしくはV；
アミノ酸100i位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸101位のA、D、F、I、L、M、N、Q、S、T、もしくはV；
アミノ酸102位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
ならびに／または
（b）以下の位置（すべてKabatナンバリングによる）の各々に、その位置について示される以下のアミノ酸残基のうちの1個または複数個を含む、軽鎖可変ドメインアミノ酸配列：
アミノ酸24位のA、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸25位のA、G、N、P、S、T、もしくはV；
アミノ酸26位のA、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、もしくはV；
アミノ酸27位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸27a位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸27b位のA、I、L、M、P、T、もしくはV；
アミノ酸27c位のA、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W、もしくはY；
アミノ酸27d位のA、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸27e位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸28位のG、N、S、もしくはT；
アミノ酸29位のA、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W、もしくはY；
アミノ酸30位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W、もしくはY；
アミノ酸31位のI、L、Q、S、T、もしくはV；
アミノ酸32位のF、W、もしくはY；
アミノ酸33位のA、F、H、L、M、Q、もしくはV；
アミノ酸34位のA、H、もしくはS；

10

20

30

40

50

アミノ酸50位のI、K、L、M、もしくはR；
アミノ酸51位のA、E、I、K、L、M、Q、R、S、T、もしくはV；
アミノ酸52位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸53位のA、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、もしくはY；
アミノ酸54位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸55位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、もしくはY；
アミノ酸56位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸89位のA、G、K、S、もしくはY；
アミノ酸90位のQ；
アミノ酸91位のG；
アミノ酸92位のA、D、H、K、N、Q、R、S、もしくはT；
アミノ酸93位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸94位のA、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T、もしくはV；
アミノ酸95位のP；
アミノ酸96位のFもしくはY；および
アミノ酸97位のA、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、もしくはVを含むことが好ましい。

10

20

〔4〕前記抗体可変領域が、以下のうちのいずれか1つを含む、〔1〕～〔3A〕のいずれかに記載の抗原結合分子：

（a1）配列番号：16に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1（HCDR1）、配列番号：30に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2（HCDR2）、配列番号：44に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3（HCDR3）、配列番号：63に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1（LCDR1）、配列番号：68に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2（LCDR2）、および配列番号：73に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3（LCDR3）；

30

（a2）配列番号：17に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1（HCDR1）、配列番号：31に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2（HCDR2）、配列番号：45に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3（HCDR3）、配列番号：64に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1（LCDR1）、配列番号：69に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2（LCDR2）、および配列番号：74に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3（LCDR3）；

40

（a3）配列番号：18に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1（HCDR1）、配列番号：32に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2（HCDR2）、配列番号：46に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3（HCDR3）、配列番号：63に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1（LCDR1）、配列番号：68に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2（LCDR2）、および配列番号：73に対して少なくとも70%、80%、

50

(a 1 4) 配列番号：27に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1 (HCDR1)、配列番号：41に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2 (HCDR2)、配列番号：55に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3 (HCDR3)、配列番号：63に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1 (LCDR1)、配列番号：68に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2 (LCDR2)、および配列番号：73に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3 (LCDR3)；

50

(a 1 5) 配列番号：28に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1 (HCDR1)、配列番号：42に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2 (HCDR2)、配列番号：56に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3 (HCDR3)、配列番号：63に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1 (LCDR1)、配列番号：68に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2 (LCDR2)、および配列番号：73に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3 (LCDR3)；

(b 1) 配列番号：16のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：30のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：44のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 2) 配列番号：17のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：31のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：45のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：64のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：69のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：74のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 3) 配列番号：18のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：32のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：46のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 4) 配列番号：19のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：33のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：47のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 5) 配列番号：19のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：33のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：47のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：65のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：70のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：75のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 6) 配列番号：20のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：34のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：48のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 7) 配列番号：22のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：36のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：50のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 8) 配列番号：23のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：37のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：51のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 9) 配列番号：23のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：37のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：51のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：66のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：71のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：76のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 10) 配列番号：24のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：38のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：52のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

(b 11) 配列番号：25のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：39のアミノ酸配列

10

20

30

40

50

(c 1 1) 配列番号：1 1 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミ

50

ノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：61に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）；

（c12）配列番号：12に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：61に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）；

（c13）配列番号：12に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）；

（c14）配列番号：13に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）；

（c15）配列番号：14に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d1）配列番号：2の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d2）配列番号：3の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：59の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d3）配列番号：4の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d4）配列番号：5の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d5）配列番号：5の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：60の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d6）配列番号：6の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d7）配列番号：8の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d8）配列番号：9の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d9）配列番号：9の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：61の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d10）配列番号：10の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d11）配列番号：11の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：61の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d12）配列番号：12の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：61の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d13）配列番号：12の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d14）配列番号：13の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（d15）配列番号：14の重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：58の軽鎖可変ドメイン（VL）；

（e）CD3に対する結合について、（a1）～（d15）の抗体可変領域のいずれか1つと競合する、抗体可変領域；

（f）CD137に対する結合について、（a1）～（d15）の抗体可変領域のいずれか1つと競合する、抗体可変領域；

（g）（a1）～（d15）の抗体可変領域のいずれか1つと同じCD3上のエピトープに結合する、抗体可変領域；

10

20

30

40

50

(h) (a1) ~ (d15) の抗体可変領域のいずれか1つと同じCD137上のエピトープに結合する、抗体可変領域。

[4A]重鎖可変ドメイン(VH)および／または軽鎖可変ドメイン(VL)が、表1.3(a)~表1.3(d)から選択される1個または複数個のアミノ酸置換を含み、該1個または複数個のアミノ酸置換が、表1.3(a)~表1.3(d)に示されるようにCD3および／またはCD137に対して少なくとも0.2、0.3、0.5、0.8、1、1.5、または2倍の結合親和性の増加を示す、[4][c1]~[c15]の抗原結合分子。

[4B]前記抗体可変領域が、

(a) 以下の位置(すべてKabatナンバリングによる)の各々に、その位置について示される以下のアミノ酸残基のうちの1個または複数個を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列：

アミノ酸26位のA、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W、もしくはY；

アミノ酸27位のD、F、G、I、M、もしくはL；

アミノ酸28位のD、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸29位のFもしくはW；

アミノ酸30位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸31位のF、I、N、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸32位のA、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸33位のW；

アミノ酸34位のF、I、L、M、もしくはV；

アミノ酸35位のF、H、S、T、V、もしくはY；

アミノ酸50位のE、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W、もしくはY；

アミノ酸51位のI、K、もしくはV；

アミノ酸52位のK、M、R、もしくはT；

アミノ酸52b位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、もしくはY；

アミノ酸52c位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸53位のA、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸54位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸55位のE、F、G、H、L、M、N、Q、W、もしくはY；

アミノ酸56位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸57位のA、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸58位のA、F、H、K、N、P、R、もしくはY；

アミノ酸59位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸60位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸61位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸62位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸63位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸64位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸65位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もし

10

20

30

40

50

くはY；
アミノ酸93位のHもしくはR；
アミノ酸94位のF、G、H、L、M、S、T、V、もしくはY；
アミノ酸95位のIもしくはV；
アミノ酸96位のF、H、I、K、L、M、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸97位のF、Y、もしくはW；
アミノ酸98位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸99位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100a位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100b位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100c位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100d位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100e位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100f位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100g位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸100h位のA、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T、もしくはV；
アミノ酸100i位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸101位のA、D、F、I、L、M、N、Q、S、T、もしくはV；
アミノ酸102位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
ならびに／または
(b) 以下の位置（すべてKabatナンバリングによる）の各々に、その位置について示される以下のアミノ酸残基のうちの1個または複数個を含む、軽鎖可変ドメインアミノ酸配列：
アミノ酸24位のA、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸25位のA、G、N、P、S、T、もしくはV；
アミノ酸26位のA、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、もしくはV；
アミノ酸27位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸27a位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸27b位のA、I、L、M、P、T、もしくはV；
アミノ酸27c位のA、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W、もしくはY；
アミノ酸27d位のA、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸27e位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸28位のG、N、S、もしくはT；
アミノ酸29位のA、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W、もしくはY；
アミノ酸30位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W、もしくはY；
アミノ酸31位のI、L、Q、S、T、もしくはV；

10

20

30

40

50

アミノ酸32位のF、W、もしくはY；
アミノ酸33位のA、F、H、L、M、Q、もしくはV；
アミノ酸34位のA、H、もしくはS；
アミノ酸50位のI、K、L、M、もしくはR；
アミノ酸51位のA、E、I、K、L、M、Q、R、S、T、もしくはV；
アミノ酸52位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸53位のA、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、もしくはY；
アミノ酸54位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸55位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、もしくはY；
アミノ酸56位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸89位のA、G、K、S、もしくはY；
アミノ酸90位のQ；
アミノ酸91位のG；
アミノ酸92位のA、D、H、K、N、Q、R、S、もしくはT；
アミノ酸93位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸94位のA、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T、もしくはV；
アミノ酸95位のP；
アミノ酸96位のFもしくはY；および
アミノ酸97位のA、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、もしくはVを含む、[4A]の抗原結合分子。

[5] 以下の(1)～(3)からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する、[1]～[4B]のいずれかの抗原結合分子：

(1) 抗原結合分子が、各々が異なる細胞上で発現しているCD3とCD137に同時には結合しない；

(2) 抗原結合分子が、CD137に対するアゴニスト活性を有する；ならびに

(3) 抗原結合分子が、配列番号：1のVH配列および配列番号：57のVL配列を含む参照抗体と比較して、同等のまたは10倍、20倍、50倍、100倍低い、ヒトCD137に対する結合についてのKD値を有し、ここで、該KD値は、好ましくはSPRによって以下の条件：37℃、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子がCM4センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定される。

[6]CD3およびCD137とは異なる第3の抗原に結合することができる抗体可変領域をさらに含む、[1]～[5]のいずれか1つの抗原結合分子。

[7]第3の抗原が、がん組織において特異的に発現している分子である、[6]の抗原結合分子。

[7A]第3の抗原が、グリピカン-3 (GPC3) である、[6]～[7]のいずれか1つの抗原結合分子。

[7B]グリピカン-3 (GPC3) に結合することができる抗体可変領域が、配列番号：206のアミノ酸配列を有するVH配列および配列番号：207のアミノ酸配列を有するVL配列を含む、[7A]の抗原結合分子。

[7C]以下の(1)～(5)からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する、[6]～[7B]のいずれか1つの抗原結合分子：

(1) 抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞のCD3活性化を誘導するが、CD137を発現する細胞に対するT細胞のCD3活性化は誘導しない；

(2) 抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞の細胞傷害活性

10

20

30

40

50

を誘導するが、CD137を発現する細胞に対するT細胞の細胞傷害活性は誘導しない；

(3) 抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞の非存在下では、PBMCからのサイトカインの放出を誘導しない；

(4) 抗原結合分子が、配列番号：1のVH配列および配列番号：57のVL配列を含む参照抗体と比較して、同等のまたは2倍、5倍、10倍、20倍、もしくは100倍高い、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞のCD137活性化および／または細胞傷害活性を誘導する；ならびに／または

(5) 抗原結合分子が、第3の抗原およびCD3を標的とする参照二重特異性抗体と比較して、2倍、5倍、10倍、20倍、もしくは100倍高い、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞の細胞傷害活性を誘導し、一方、PBMCからのサイトカイン（IL-6）放出は誘導しない。

10

[8]抗体Fc領域をさらに含む、[1]～[7C]のいずれか1つの抗原結合分子。

[9]前記Fc領域が、天然型ヒトIgG1抗体のFc領域と比較してFcγRに対する結合活性が低下しているFc領域である、[8]の抗原結合分子。

[10][1]～[9]のいずれかに記載の抗原結合分子と、薬学的に許容し得る担体とを含む、医薬組成物。

[10A]がんの処置における使用のための、[10]の医薬組成物または[1]～[9]の抗原結合分子。

[10B]がんの処置における使用に向けた薬の製造のための、[10]の医薬組成物または[1]～[9]の抗原結合分子の使用。

20

[10C][10]の医薬組成物または[5]～[9]の抗原結合分子を、がん罹患している哺乳動物対象に投与する工程を含む、がんを予防する、処置する、または抑制するための方法。

[10D][10]の医薬組成物または[5]～[9]の抗原結合分子を、がん罹患している哺乳動物対象に投与する工程を含む、対象において細胞傷害活性、好ましくはT細胞依存性細胞傷害活性を誘導するための方法。

[10E][10]の医薬組成物または[5]～[9]の抗原結合分子を、がん罹患している哺乳動物対象に投与する工程を含む、対象のがん細胞を低減させるかまたは死滅させるための方法。

[10F][10]の医薬組成物または[5]～[9]の抗原結合分子を、がん罹患している哺乳動物対象に投与する工程を含む、がん患者の寿命または生存率を延ばすための方法。

30

[10G]前記がんが、第3の抗原、好ましくはグリピカン-3（GPC3）の発現または上方向制御された発現を特徴とする、[10A]～[10F]のいずれかに記載の使用のための医薬組成物もしくは抗原結合分子、使用、または方法。

[11][1]～[9]のいずれかの抗原結合分子をコードするヌクレオチド配列を含む、単離されたポリヌクレオチド。

[12][11]に記載のポリヌクレオチドを含む、発現ベクター。

[13][11]に記載のポリヌクレオチドまたは[12]に記載の発現ベクターで形質転換されたかまたはそれをトランスフェクトされた、宿主細胞。

[14][13]の宿主細胞を培養する工程を含む、多重特異性抗原結合分子または多重特異性抗体を作製する方法。

40

[15][14]の方法によって作製された、多重特異性抗原結合分子または多重特異性抗体。

[16]以下の工程を含む、CD3およびCD137に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合しない抗体可変領域を取得するかまたはスクリーニングする方法：

(a) 複数の抗体可変領域を含むライブラリーを提供する工程、

(b) 工程(a)において提供されたライブラリーを、第1の抗原としてのCD3またはCD137のいずれかと接触させ、第1の抗原に結合した抗体可変領域を収集する工程、

(c) 工程(b)において収集された抗体可変領域を、CD3およびCD137のうちの第2の抗原と接触させ、第2の抗原に結合した抗体可変領域を収集する工程、ならびに

50

(d) 以下の抗体可変領域：

(1) 好ましくはSPRによって以下の条件：

37°C、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子がCM4センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定した場合に、約 5×10^{-6} M未満もしくは 5×10^{-6} M～ 3×10^{-8} Mの平衡解離定数(KD)でCD137に結合する、抗体可変領域；および／または

(2) 好ましくはSPRによって以下の条件：

25°C、pH 7.4、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃；抗原結合分子がCM4センサーチップ上に固定化され、抗原がアナライトとなるで測定した場合に、 2×10^{-6} M～ 1×10^{-8} Mの平衡解離定数(KD)でCD3に結合する、抗体可変領域
を選択する工程。

[16A]工程(c)から(d)までに、工程(c)において収集された抗体可変領域に対して1個または複数個のアミノ酸改変を導入する工程をさらに含む、[16]の方法。

[17]工程(a)または工程(c)から(d)までにおける抗体可変領域が、1～25アミノ酸の改変を有する抗体可変領域であり、改変されるアミノ酸が、ループ中のアミノ酸、FR3領域中のアミノ酸、または、抗体H鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング31～35位、50～65位、71～74位、および95～102位、ならびにL鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング24～34位、50～56位、および89～97位から選択されるアミノ酸である、[16]または[16A]のいずれかの方法。

[18]重鎖可変ドメイン(VH)および／または軽鎖可変ドメイン(VL)が、表1.3(a)～表1.3(d)から選択される1個または複数個のアミノ酸置換を含み、該1個または複数個のアミノ酸置換が、表1.3(a)～表1.3(d)に示されるようにCD3および／またはCD137に対して少なくとも0.2、0.3、0.5、0.8、1、1.5、または2倍の結合親和性の増加を示す、[17]の方法。いくつかの態様において、抗体可変領域は、(a)以下の位置(すべてKabatナンバリングによる)の各々に、その位置について示される以下のアミノ酸残基のうちの1個または複数個を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配列：

アミノ酸26位のA、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W、もしくはY；

アミノ酸27位のD、F、G、I、M、もしくはL；

アミノ酸28位のD、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸29位のFもしくはW；

アミノ酸30位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸31位のF、I、N、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸32位のA、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸33位のW；

アミノ酸34位のF、I、L、M、もしくはV；

アミノ酸35位のF、H、S、T、V、もしくはY；

アミノ酸50位のE、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W、もしくはY；

アミノ酸51位のI、K、もしくはV；

アミノ酸52位のK、M、R、もしくはT；

アミノ酸52b位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、もしくはY；

アミノ酸52c位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸53位のA、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸54位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸55位のE、F、G、H、L、M、N、Q、W、もしくはY；

アミノ酸56位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸57位のA、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸58位のA、F、H、K、N、P、R、もしくはY；

アミノ酸59位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸60位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸61位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

10

アミノ酸62位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸63位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸64位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸65位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸93位のHもしくはR；

アミノ酸94位のF、G、H、L、M、S、T、V、もしくはY；

20

アミノ酸95位のIもしくはV；

アミノ酸96位のF、H、I、K、L、M、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸97位のF、Y、もしくはW；

アミノ酸98位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸99位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100a位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100b位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

30

アミノ酸100c位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100d位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100e位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100f位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100g位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

40

アミノ酸100h位のA、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T、もしくはV；

アミノ酸100i位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸101位のA、D、F、I、L、M、N、Q、S、T、もしくはV；

アミノ酸102位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

ならびに／または

(b) 以下の位置（すべてKabatナンバリングによる）の各々に、その位置について示される以下のアミノ酸残基のうちの1個または複数個を含む、軽鎖可変ドメインアミノ酸配

50

列：

アミノ酸24位のA、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸25位のA、G、N、P、S、T、もしくはV；

アミノ酸26位のA、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸27位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸27a位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸27b位のA、I、L、M、P、T、もしくはV；

アミノ酸27c位のA、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W、もしくはY；

10

アミノ酸27d位のA、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸27e位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸28位のG、N、S、もしくはT；

アミノ酸29位のA、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W、もしくはY；

アミノ酸30位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W、もしくはY；

アミノ酸31位のI、L、Q、S、T、もしくはV；

アミノ酸32位のF、W、もしくはY；

アミノ酸33位のA、F、H、L、M、Q、もしくはV；

アミノ酸34位のA、H、もしくはS；

20

アミノ酸50位のI、K、L、M、もしくはR；

アミノ酸51位のA、E、I、K、L、M、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸52位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸53位のA、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、もしくはY；

アミノ酸54位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸55位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、もしくはY；

アミノ酸56位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

30

アミノ酸89位のA、G、K、S、もしくはY；

アミノ酸90位のQ；

アミノ酸91位のG；

アミノ酸92位のA、D、H、K、N、Q、R、S、もしくはT；

アミノ酸93位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸94位のA、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸95位のP；

アミノ酸96位のFもしくはY；および

40

アミノ酸97位のA、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、もしくはVを含むことが好ましい。

別の局面において、本発明は、ヒトCD137のLQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPN SFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTTRKECSSTSNAEC（配列番号：152）、好ましくはLQDPCSN、NNRNQI、および／またはGQRTCDIのアミノ酸配列を含む、CD137のN末端領域の少なくとも1個、2個、3個、またはそれよりも多いアミノ酸残基に結合する抗原結合分子、例えば抗体に関する。

【0018】

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、CD3に対するそのアゴニスト活性によってT細胞を活性化することができ、かつ、CD137およびCD3に対するその共刺激ア

50

ゴニスト活性によって、標的細胞に対するT細胞の細胞傷害活性を誘導し、T細胞の活性化、生存、およびメモリーT細胞への分化を強化することができる。一方、本発明の抗原結合分子は、CD3とCD137に同時には結合しないため、CD137とCD3との架橋によって引き起こされる有害事象を回避することができる。

【0019】

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子はまた、CD137に対するアゴニスト活性によって、CD137を発現する免疫細胞を活性化し、標的細胞への免疫応答を強化することもできる。

【図面の簡単な説明】

【0020】

【図1. 1】親和性成熟GPC3/Dual-Igバリエーション三重特異性抗体のCD3アゴニスト活性の測定。プレート1（上のパネル）およびプレート2（下のパネル）に分けた選択された抗体による、E:T比 5で24時間、NFAT-luc2 Jurkatレポーター細胞と共培養したSK-pca60細胞株によって検出された、平均発光単位 $\pm$ 標準偏差（s.d.）。抗体を、0.02、0.2、および2 nMで添加した。

【図1. 2】親和性成熟GPC3/Dual-Igバリエーション三重特異性抗体のCD137アゴニスト活性の測定。プレート1（上のパネル）およびプレート2（下のパネル）に分けた選択された抗体による、E:T比 5で5時間、CD137を過剰発現するJurkat NF κ Bレポーター細胞と共培養したSK-pca60細胞株によって検出された、平均発光単位 $\pm$ 標準偏差（s.d.）。抗体を、0.5、2.5、および5 nMで添加した。

【図1. 3 a】選択されたGPC3/Dual-Ig三重特異性分子（プレート1）の存在下でのPBMCとの共培養による、GPC3を発現するSK-pca60細胞株に対する細胞傷害活性。およそ120時間で得られた平均細胞増殖抑制（%）値 $\pm$ s.d.をプロットした。

【図1. 3 b】選択されたGPC3/Dual-Ig三重特異性分子（プレート2）の存在下でのPBMCとの共培養による、GPC3を発現するSK-pca60細胞株に対する細胞傷害活性。およそ120時間で得られた平均細胞増殖抑制（%）値 $\pm$ s.d.をプロットした。

【図1. 3 c】選択されたGPC3/Dual-Ig三重特異性分子の存在下での、GPC3を発現するSK-pca60細胞株とPBMCとの共培養において測定された、サイトカイン（IFN γ ）放出。共培養の上清を、48時間の時点で解析した。グラフは、IFN γ の平均濃度 $\pm$ s.d.を示す。抗体を、評価のためにプレート1（上のパネル）およびプレート2（下のパネル）に分けた。

【図1. 3 d】選択されたGPC3/Dual-Ig三重特異性分子の存在下での、GPC3を発現するSK-pca60細胞株とPBMCとの共培養において測定された、サイトカイン（IL-2）放出。共培養の上清を、48時間の時点で解析した。グラフは、IL-2の平均濃度 $\pm$ s.d.を示す。抗体を、評価のためにプレート1（上のパネル）およびプレート2（下のパネル）に分けた。

【図1. 3 e】選択されたGPC3/Dual-Ig三重特異性分子の存在下での、GPC3を発現するSK-pca60細胞株とPBMCとの共培養において測定された、サイトカイン（IL-6）放出。共培養の上清を、48時間の時点で解析した。グラフは、IL-6の平均濃度 $\pm$ s.d.を示す。抗体を、評価のためにプレート1（上のパネル）およびプレート2（下のパネル）に分けた。

【図2. 1】三重特異性抗体（mAb AB）の設計および構築。

【図2. 2】調製された三重特異性抗体の命名規則。

【図2. 3 a】GPC3陰性細胞に対する抗原非依存性のJurkat活性化。親CHO細胞を、E:T 5で24時間、NFAT-luc2 Jurkatレポーター細胞と共培養した。0.5、5、および50 nMでインキュベートされた様々な抗体形式の平均発光単位 $\pm$ 標準偏差（s.d.）を図示するグラフ。

【図2. 3 b】GPC3陰性細胞に対する抗原非依存性のJurkat活性化。CD137を過剰発現するCHO細胞を、E:T 5で24時間、NFAT-luc2 Jurkatレポーター細胞と共培養した。0.5、5、5、および50 nMでインキュベートされた様々な抗体形式の平均発光単位 $\pm$ 標準偏差

10

20

30

40

50

(s.d.)を図示するグラフ。

【図2. 4 a】PBMC溶液における抗原非依存性のサイトカイン (IFN γ) 放出。PBMC溶液に3.2、16、および80 nMで添加した、親和性成熟GPC3/Dual-IgバリエーションまたはGPC3/CD137xCD3三重特異性抗体の上清を、48時間の時点で解析した。グラフは、IFN γ の平均濃度 $\pm$ s.d.を示す。抗体を、評価のためにプレート1 (上のパネル) およびプレート2 (下のパネル) に分けた。

【図2. 4 b】PBMC溶液における抗原非依存性のサイトカイン (TNF α) 放出。PBMC溶液に3.2、16、および80 nMで添加した、親和性成熟GPC3/Dual-IgバリエーションまたはGPC3/CD137xCD3三重特異性抗体の上清を、48時間の時点で解析した。グラフは、TNF α の平均濃度 $\pm$ s.d.を示す。抗体を、評価のためにプレート1 (上のパネル) およびプレート2 (下のパネル) に分けた。

10

【図2. 4 c】PBMC溶液における抗原非依存性のサイトカイン (IL-6) 放出。PBMC溶液に3.2、16、および80 nMで添加した、親和性成熟GPC3/Dual-IgバリエーションまたはGPC3/CD137xCD3三重特異性抗体の上清を、48時間の時点で解析した。グラフは、IL-6の平均濃度 $\pm$ s.d.を示す。抗体を、評価のためにプレート1 (上のパネル) およびプレート2 (下のパネル) に分けた。

【図3. 1 a】ヒト化CD3/CD137マウスモデルにおけるLLC1/hGPC3異種移植片に対する抗体のインビボ有効性。Y軸は、腫瘍体積 (mm³) を意味し、X軸は、腫瘍移植後の日数を意味する。

【図3. 1 b】ヒト化CD3/CD137マウスモデルにおけるLLC1/hGPC3異種移植片に対する抗体のインビボ有効性。Y軸は、腫瘍体積 (mm³) を意味し、X軸は、腫瘍移植後の日数を意味する。

20

【図3. 1 c】血漿IL-6濃度。抗体注射の2時間後にマウスから採血し、Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th1 Panelを用いて血漿IL-6濃度を測定した。

【図3. 2】huNOGマウスモデルにおけるsk-pca-13a異種移植片に対する抗体のインビボ有効性。Y軸は、腫瘍体積 (mm³) を意味し、X軸は、腫瘍移植後の日数を意味する。

【図3. 3 a】CD137上のH0868L0581 Fab接触領域のエピトープ。CD137アミノ酸配列におけるエピトープマッピング (黒色: H0868L0581から3.0オングストロームよりも近い、縞: 4.5オングストロームよりも近い)。

【図3. 3 b】CD137上のH0868L0581 Fab接触領域のエピトープ。結晶構造におけるエピトープマッピング (暗灰色の球: H0868L0581から3.0オングストロームよりも近い、薄灰色の棒: 4.5オングストロームよりも近い)。

30

【図4】ジスルフィド結合リンカーによりビオチン標識されているC3NP1-27、CD3 ϵ ペプチド抗原の設計を示す。

【図5】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたクローンのファージELISAの結果を示すグラフである。Y軸はCD137-Fcに対する特異性を意味し、X軸は各クローンのCD3に対する特異性を意味する。

【図6】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたクローンのファージELISAの結果を示すグラフである。Y軸は、各クローンのビーズELISAでのCD137-Fcに対する特異性を意味し、X軸は、図5と同じプレートELISAでのCD3に対する特異性を意味する。

40

【図7】ヒトCD137アミノ酸配列とカニクイザルCD137アミノ酸配列との比較データを示す。

【図8】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGのELISAの結果を示すグラフである。Y軸は、各クローンのカニクイザルCD137-Fcに対する特異性を意味し、X軸は、ヒトCD137に対する特異性を意味する。

【図9】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGのELISAの結果を示すグラフである。Y軸はCD3eに対する特異性を意味する。

【図10】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGの競合ELISAの結果を示すグラフである。Y軸は、ビオチン-ヒトCD137-Fcまたはビオチン-ヒトFcに

50

対するELISAの反応を意味する。過剰量のヒトCD3またはヒトFcを競合物として用いた。

【図11A】CD3およびCD137に対するファージディスプレイパニングアウトプットプールのファージELISAの結果を示すグラフである。Y軸はヒトCD137に対する特異性を意味する。X軸は、パニングアウトプットプールを意味し、初期は、ファージディスプレイパニング前のプールであり、R1からR6は、それぞれラウンド1からラウンド6のファージディスプレイパニング後のパニングアウトプットプールを意味する。

【図11B】CD3およびCD137に対するファージディスプレイパニングアウトプットプールのファージELISAの結果を示すグラフである。Y軸はカニクイザルCD137に対する特異性を意味する。X軸は、パニングアウトプットプールを意味し、初期は、ファージディスプレイパニング前のプールであり、R1からR6は、それぞれラウンド1からラウンド6のファージディスプレイパニング後のパニングアウトプットプールを意味する。

10

【図11C】CD3およびCD137に対するファージディスプレイパニングアウトプットプールのファージELISAの結果を示すグラフである。Y軸はCD3に対する特異性を意味する。X軸は、パニングアウトプットプールを意味し、初期は、ファージディスプレイパニング前のプールであり、R1からR6は、それぞれラウンド1からラウンド6のファージディスプレイパニング後のパニングアウトプットプールを意味する。

【図12.1】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGのELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、各クローンのヒトCD137-Fcに対する特異性を意味し、X軸は、カニクイザルCD137またはCD3に対する特異性を意味する。

【図12.2】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGのELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、各クローンのヒトCD137-Fcに対する特異性を意味し、X軸は、カニクイザルCD137またはCD3に対する特異性を意味する。

20

【図12.3】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGのELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、各クローンのヒトCD137-Fcに対する特異性を意味し、X軸は、カニクイザルCD137またはCD3に対する特異性を意味する。

【図13】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGのELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、各クローンのヒトCD137-Fcに対する特異性を意味し、X軸は、カニクイザルCD137またはCD3に対する特異性を意味する。

【図14】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGの競合ELISAの結果を示すグラフである。Y軸は、ビオチン-ヒトCD137-Fcまたはビオチン-ヒトFcに対するELISAの反応を意味する。過剰量のヒトCD3を競合物として用いた。

30

【図15】各クローンのエピトープドメインを同定するための、CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGのELISAの結果を示すグラフである。Y軸は、ヒトCD137の各ドメインに対するELISAの反応を意味する。

【図16】CD3およびCD137に対するファージディスプレイ親和性成熟で取得されたIgGのELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、各クローンのヒトCD137-Fcに対する特異性を意味し、X軸は、カニクイザルCD137またはCD3に対する特異性を意味する。

【図17.1】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGの競合ELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、ビオチン-ヒトCD137-Fcまたはビオチン-ヒトFcに対するELISAの反応を意味する。過剰量のヒトCD3を競合物として用いた。

40

【図17.2】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGの競合ELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、ビオチン-ヒトCD137-Fcまたはビオチン-ヒトFcに対するELISAの反応を意味する。過剰量のヒトCD3を競合物として用いた。

【図17.3】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGの競合ELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、ビオチン-ヒトCD137-Fcまたはビオチン-ヒトFcに対するELISAの反応を意味する。過剰量のヒトCD3を競合物として用いた。

【図17.4】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGの競合ELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、ビオチン-ヒトCD137-Fcまたはビオチン-ヒトFcに対するELISAの反応を意味する。過剰量のヒトCD3を競合物として用いた。

【図17.5】CD3およびCD137に対するファージディスプレイで取得されたIgGの競合

50

ELISAの結果を示す一連のグラフである。Y軸は、ビオチン-ヒトCD137-Fcまたはビオチン-ヒトFcに対するELISAの反応を意味する。過剰量のヒトCD3を競合物として用いた。

【図18A】抗ヒトGPC3/Dual-Fab抗体を介した活性化B細胞からのIL-6分泌のメカニズムを図式的に示す図である。

【図18B】活性化B細胞から分泌されるIL-6の産生のレベルによって、様々な抗ヒトGPC3/Dual-Fab抗体のCD137媒介性アゴニスト活性を評価した結果を示すグラフである。Ctrlは、陰性対照ヒトIgG1抗体を示す。

【図19A】抗ヒトGPC3/Dual-Fab抗体を介した活性化Jurkat T細胞におけるルシフェラーゼ発現のメカニズムを図式的に示す図である。

【図19B】活性化Jurkat T細胞において発現するルシフェラーゼの産生のレベルによって、様々な抗ヒトGPC3/Dual-Fab抗体のCD3媒介性アゴニスト活性を評価した結果を示す一連のグラフである。Ctrlは、陰性対照ヒトIgG1抗体を示す。

【図20】各固定化抗体の存在下でヒトPBMC由来T細胞からのサイトカイン（IL-2、IFN- γ 、およびTNF- α ）放出を評価した結果を示す一連のグラフである。Y軸は、分泌された各サイトカインの濃度を意味し、X軸は、固定化された抗体の濃度を意味する。対照抗CD137抗体（B）、対照抗CD3抗体（CE115）、陰性対照抗体（Ctrl）、およびdual抗体のうちの1つ（H183L072）を、アッセイのために用いた。

【図21】各二重特異性抗体によるGPC3陽性標的細胞（SK-pca60およびSK-pca13a）に対するT細胞依存性細胞傷害活性（TDCC）を評価した結果を示す一連のグラフである。Y軸は、細胞増殖抑制（CGI）の比率を意味し、X軸は、各二重特異性抗体の濃度を意味する。抗GPC3/Dual二重特異性抗体（GC33/H183L072）、陰性対照/Dual二重特異性抗体（Ctrl/H183L072）、抗GPC3/抗CD137二重特異性抗体（GC33/B）、および陰性対照/抗CD137二重特異性抗体（Ctrl/B）を、このアッセイのために用いた。5倍量のエフェクター（E）細胞を、腫瘍（T）細胞に加えた（ET5）。

【図22】CD3eに対するCE115の細胞ELISAの結果を示すグラフである。

【図23】EGFR_ERY22_CE115の分子形態を示す図である。

【図24】EGFR_ERY22_CE115のTDCC（SK-pca13a）の結果を示すグラフである。

【図25】結合量の比が0.8未満の抗体の例示的なセンサーグラムである。

【図26】GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体および抗GPC3/dual-Fab抗体の同時結合のBiacore解析の結果を示す一連のグラフである。Y軸は、各抗原に対する結合レスポンスを意味する。最初に、ヒトCD3（hCD3）をアナライトとして用い、次いで、hCD3（破線として示す）またはヒトCD137（hCD137）とhCD3との混合物（実線として示す）もアナライトとして用いた。

【図27】各抗体のCD137陽性CHO細胞またはJurkat細胞に対するFACS解析の結果を示す一連のセンサーグラムである。図27（a）および（c）は、ヒトCD137陽性CHO細胞に対する結合の結果であり、図27（b）および（d）は、親CHO細胞に対する結果である。図27（a）および（b）において、実線は、抗GPC3/dual抗体（GC33/H183L072、すなわちGPC33/H183L072）の結果を示し、塗りつぶしは、対照抗体（Ctrl）の結果を示す。図27（c）および（d）において、実線、暗灰色での塗りつぶし、および薄灰色での塗りつぶしは、それぞれ、GPC3/CD137xCtrl三重特異性抗体、GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体、およびCtrl/CtrlxCD3三重特異性抗体の結果を示す。図27（e）および（f）は、Jurkat CD3陽性細胞に対する結合の結果である。図27（e）において、実線および塗りつぶしは、それぞれ、抗GPC3/dual抗体（GC33/H183L072、すなわちGPC33/H183L072）および対照抗体（Ctrl）の結果を示す。図27（f）において、実線、暗灰色での塗りつぶし、および薄灰色での塗りつぶしは、それぞれ、GPC3/CtrlxCD3三重特異性抗体、GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体、およびCtrl/CD137xCtrl三重特異性抗体の結果を示す。

【図28】活性化Jurkat T細胞において発現するルシフェラーゼの産生のレベルによって、GPC3陽性標的細胞SK-pca60に対する様々な抗体のCD3媒介性アゴニスト活性を評価した結果を示すグラフを提示する。6種類の三重特異性抗体、抗GPC3/Dual-Fab抗体（GPC

3/H183L072)、および対照/Dual-Fab抗体(Ctrl/H183L072)を、このアッセイのために用いた。X軸は、各抗体の用いた濃度を意味する。

【図29】活性化Jurkat T細胞において発現するルシフェラーゼの産生のレベルによって、ヒトCD137陽性CHO細胞および親CHO細胞に対する様々な抗体のCD3媒介性アゴニスト活性を評価した結果を示すグラフを提示する。6種類の三重特異性抗体、抗GPC3/Dual-Fab抗体(GPC3/H183L072)、および対照/Dual-Fab抗体(Ctrl/H183L072)を、このアッセイのために用いた。X軸は、各抗体の用いた濃度を意味する。

【図30】各可溶性抗体の存在下でヒトPBMCからのサイトカイン(IL-2、IFN- γ 、およびTNF- α)放出を評価した結果を示す一連のグラフである。Y軸は、分泌された各サイトカインの濃度を意味し、X軸は、用いた抗体の濃度を意味する。Ctrl/CD137xCD3三重特異性抗体および対照/Dual-Fab抗体(Ctrl/H183L072)を、このアッセイのために用いた。

【発明を実施するための形態】

【0021】

態様の説明

本発明において、「抗体可変領域」とは、通常、4つのフレームワーク領域(FR)およびそれが隣接する3つの相補性決定領域(CDR)によって構成されるドメインを含む領域を意味し、またその部分配列も、その部分配列が抗原の一部または全部に結合する活性を有する限り含む。特に、抗体軽鎖可変ドメイン(VL)および抗体重鎖可変ドメイン(VH)を含む領域が好ましい。本発明の抗体可変領域は、任意の配列を有してもよく、マウス抗体、ラット抗体、ウサギ抗体、ヤギ抗体、ラクダ抗体、およびこれらの非ヒト抗体のいずれかのヒト化によって得られたヒト化抗体、およびヒト抗体などの、任意の抗体に由来する可変領域であってもよい。「ヒト化抗体」は、再構成(reshaped)ヒト抗体とも呼ばれ、非ヒト哺乳動物由来の抗体、例えばマウス抗体の相補性決定領域(CDR)をヒト抗体のCDRへ移植することによって取得される。CDRを同定するための方法は、当技術分野において公知である(Kabat et al., Sequence of Proteins of Immunological Interest (1987), National Institute of Health, Bethesda, Md.; および Chothia et al., Nature (1989) 342: 877)。そのための一般的な遺伝子組換え手法もまた、当技術分野において公知である(欧州特許出願公開番号EP 125023およびWO 96/02576参照)。

【0022】

「CD3とCD137(4-1BB)に同時には結合しない」本発明の「抗体可変領域」とは、本発明の抗体可変領域が、CD3と結合している状態ではCD137に結合できず、逆に、可変領域が、CD137と結合している状態ではCD3に結合できないことを意味する。ここで、「CD3とCD137に同時には結合しない」という句には、CD3を発現する細胞とCD137を発現する細胞とを架橋しないこと、または、各々が異なる細胞上で発現しているCD3とCD137に同時には結合しないことも含まれる。この句にはさらに、CD3およびCD137が可溶性タンパク質のように細胞膜上に発現していないか、または両方が同じ細胞上に存在する時には、可変領域が、CD3とCD137の両方に同時に結合することができるが、各々が異なる細胞上で発現しているCD3とCD137には同時には結合することができない場合も含まれる。そのような抗体可変領域は、これらの機能を有している限り、特に限定されない。その例には、所望の抗原に結合するようにそのアミノ酸の一部を改変した、IgG型の抗体可変領域に由来する可変領域が含まれ得る。改変されるアミノ酸は、例えば、CD3またはCD137に結合する抗体可変領域における、その改変が抗原に対する結合を喪失させないアミノ酸から選択される。

ここで、「異なる細胞上で発現している」という句は、単に、抗原が別々の細胞上で発現していることを意味する。そのような細胞の組み合わせは、例えば、T細胞と別のT細胞のように同じ種類の細胞であってもよいし、またはT細胞とNK細胞のように異なる種類の細胞であってもよい。

【0023】

アミノ酸改変は、単独で用いられてもよく、または複数のアミノ酸改変が、組み合わせ

て用いられてもよい。

複数のアミノ酸改変を組み合わせる場合、組み合わせる改変の数は、特に限定されず、発明の目的を達成できる範囲内で適宜設定することができる。組み合わせる改変の数は、例えば、2個以上30個以下、好ましくは2個以上25個以下、2個以上22個以下、2個以上20個以下、2個以上15個以下、2個以上10個以下、2個以上5個以下、または2個以上3個以下である。

組み合わせる複数のアミノ酸改変は、抗体の重鎖可変ドメインまたは軽鎖可変ドメインのみに加えられてもよく、または重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインの両方に適宜分配されてもよい。

【0024】

可変領域中の1個または複数個のアミノ酸残基が、抗原結合活性が維持される限り、改変されるアミノ酸残基として許容される。可変領域中のアミノ酸を改変する場合、結果として生じた可変領域は、対応する未改変の抗体の結合活性を好ましくは維持し、好ましくは、例えば、改変前よりも50%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは100%以上高い結合活性を有するが、本発明による可変領域はそれらに限定されない。結合活性は、アミノ酸改変によって上昇していてもよく、例えば、改変前の結合活性の2倍、5倍、または10倍であってもよい。

【0025】

アミノ酸改変にとって好ましい領域の例には、可変領域中の溶媒に露出している領域およびループが含まれる。中でも、CDR1、CDR2、CDR3、FR3、およびループが好ましい。具体的には、H鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング31～35位、50～65位、71～74位、および95～102位、ならびにL鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング24～34位、50～56位、および89～97位が好ましい。H鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング31位、52a～61位、71～74位、および97～101位、ならびにL鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング24～34位、51～56位、および89～96位がより好ましい。また、アミノ酸改変時に、抗原結合活性を上昇させるアミノ酸がさらに導入されてもよい。

【0026】

本明細書において用いられる「超可変領域」または「HVR」という用語は、配列（「相補性決定領域」もしくは「CDR」）が超可変であり、かつ/または構造的に定義されるループ（「超可変ループ」）を形成し、かつ/または抗原に接触する残基（「抗原接触部」）を含有する抗体可変ドメインの領域の各々を指す。概して、抗体は、6つのHVR：VHにおける3つ（H1、H2、H3）およびVLにおける3つ（L1、L2、L3）を含む。本明細書における例示的なHVRは、以下を含む：

- (a) アミノ酸残基26～32（L1）、50～52（L2）、91～96（L3）、26～32（H1）、53～55（H2）、および96～101（H3）に存在する超可変ループ（Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))；
- (b) アミノ酸残基24～34（L1）、50～56（L2）、89～97（L3）、31～35b（H1）、50～65（H2）、および95～102（H3）に存在するCDR（Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))；
- (c) アミノ酸残基27c～36（L1）、46～55（L2）、89～96（L3）、30～35b（H1）、47～58（H2）、および93～101（H3）に存在する抗原接触部（MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996))；ならびに
- (d) HVRアミノ酸残基46～56（L2）、47～56（L2）、48～56（L2）、49～56（L2）、26～35（H1）、26～35b（H1）、49～65（H2）、93～102（H3）、および94～102（H3）を含む、(a)、(b)、および/または(c)の組み合わせ。

特に示されない限り、HVR残基および可変ドメイン中の他の残基（例えば、FR残基）は、上記のKabat et al.に従って、本明細書においてナンバリングされる。

【0027】

本発明において、「ループ」とは、免疫グロブリンのβバレル構造の維持に関与しない

10

20

30

40

50

残基を含有する領域を意味する。

本発明において、アミノ酸改変とは、置換、欠失、付加、挿入、もしくは修飾、またはそれらの組み合わせを意味する。本発明において、アミノ酸改変は、アミノ酸変異と互換的に用いられ、それと同じ意味で用いられ得る。

【0028】

アミノ酸残基の置換は、例えば、以下の(a)～(c)のいずれかを改変する目的で、別のアミノ酸残基での置き換えによって実施される：(a) シート構造またはらせん構造を有する領域のポリペプチドバックボーン構造；(b) 標的部位の電荷もしくは疎水性；および(c) 側鎖のサイズ。

アミノ酸残基は、一般的な側鎖の性質に基づいて以下のグループに分類される：(1) 疎水性残基：ノルロイシン、Met、Ala、Val、Leu、およびIle；(2) 中性親水性残基：Cys、Ser、Thr、Asn、およびGln；(3) 酸性残基：AspおよびGlu；(4) 塩基性残基：His、Lys、およびArg；(5) 鎖の配向に影響する残基：GlyおよびPro；ならびに(6) 芳香族残基：Trp、Tyr、およびPhe。

【0029】

これらのグループの各々内でのアミノ酸残基の置換は、保存的置換と呼ばれ、一方、これらのグループのうちの1つにおけるアミノ酸残基の別のグループにおけるアミノ酸残基による置換は、非保存的置換と呼ばれる。

本発明による置換は、保存的置換であってもよく、または非保存的置換であってもよい。あるいは、保存的置換と非保存的置換とが組み合わせられてもよい。

【0030】

アミノ酸残基の改変にはまた、CD3またはCD137に結合する抗体可変領域において、その改変が抗原に対する結合を喪失させないアミノ酸のランダム改変によって得られたものからの、CD3およびCD137に結合することができるがこれらの抗原に同時には結合することができない可変領域の選択；ならびに、所望の抗原に対して結合活性を有することが以前に知られているペプチドを上述の領域に挿入する改変も含まれる。

【0031】

本発明の抗体可変領域において、上述の改変は、当技術分野において公知の改変と組み合わせられてもよい。例えば、可変領域のN末端グルタミンのピログルタミル化によるピログルタミン酸への修飾は、当業者によく知られている修飾である。したがって、その重鎖のN末端にグルタミンを有する本発明の抗体は、このN末端グルタミンがピログルタミン酸に修飾された可変領域を含有してもよい。

【0032】

そのような抗体可変領域は、例えば、抗原結合、薬物動態、安定性、または抗原性を改善するためのアミノ酸改変をさらに有してもよい。本発明の抗体可変領域は、抗原に対してpH依存的な結合活性を有し、それによって抗原に繰り返し結合することができるように、改変されてもよい(WO2009/125825)。

【0033】

また、例えば、第3の抗原に結合するそのような抗体可変領域に対して、標的組織特異的な化合物の濃度に従って抗原結合活性を変化させるアミノ酸改変が加えられてもよい(WO2013/180200)。

【0034】

可変領域は、例えば、結合活性の増強、特異性の改善、pIの低下、pH依存的な抗原結合特性の付与、結合の熱安定性の改善、溶解性の改善、化学修飾に対する安定性の改善、糖鎖に由来する不均一性の改善、免疫原性の低下のためのインシリコ予測もしくはインビトロT細胞ベースアッセイの使用によって同定されたT細胞エピトープの回避、または制御性T細胞を活性化するためのT細胞エピトープの導入を目的として、さらに改変されてもよい(mAbs 3:243-247, 2011)。

【0035】

本発明の抗体可変領域が「CD3およびCD137に結合することができる」かどうかは、当

10

20

30

40

50

技術分野において公知の方法によって判定することができる。

これは、例えば、電気化学発光法（ECL法）によって判定することができる（BMC Research Notes 2011, 4:281）。

具体的には、例えば、ビオチン標識された被験抗原結合分子の、CD3およびCD137に結合することができる領域、例えば、Fab領域から構成される低分子抗体、またはその一価抗体（通常の抗体が有する2つのFab領域のうち1つが欠けている抗体）を、sulfo-tag（Ru錯体）で標識されたCD3またはCD137と混合し、混合物をストレプトアビジン固定化プレート上に添加する。この操作において、ビオチン標識された被験抗原結合分子は、プレート上のストレプトアビジンに結合する。sulfo-tagから光を発生させ、その発光シグナルを、Sector Imager 600または2400（MSD K.K.）などを用いて検出し、それによって、CD3またはCD137に対する被験抗原結合分子の上述の領域の結合を確認することができる。

あるいは、このアッセイは、ELISA、FACS（蛍光活性化細胞選別）、ALPHAScreen（増幅発光近接ホモジニアスアッセイスクリーン）、表面プラズモン共鳴（SPR）現象に基づくBIAcore法などによって実施されてもよい（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010）。

【0036】

具体的には、アッセイは、例えば、表面プラズモン共鳴（SPR）現象に基づく相互作用解析機器であるBiacore（GE Healthcare Japan Corp.）を用いて実施することができる。Biacore解析機器には、Biacore T100、T200、X100、A100、4000、3000、2000、1000、またはCなどの任意の機種が含まれる。CM7、CM5、CM4、CM3、C1、SA、NTA、L1、HPA、またはAuチップなどの任意のBiacore用センサーチップを、センサーチップとして用いることができる。プロテインA、プロテインG、プロテインL、抗ヒトIgG抗体、抗ヒトIgG-Fab、抗ヒトL鎖抗体、抗ヒトFc抗体、抗原タンパク質、または抗原ペプチドなどの、本発明の抗原結合分子を捕捉するためのタンパク質を、アミンカップリング、ジスルフィドカップリング、またはアルデヒドカップリングなどのカップリング法によって、センサーチップ上に固定化する。その上にCD3またはCD137をアナライトとしてインジェクトし、相互作用を測定してセンサーグラムを取得する。この操作において、CD3またはCD137の濃度は、アッセイサンプルの相互作用の強さ（例えば、KD）に従って数 μ Mから数pMの範囲内で選択することができる。

【0037】

あるいは、CD3またはCD137を、抗原結合分子の代わりにセンサーチップ上に固定化して、次に、評価したい抗体サンプルを相互作用させてもよい。本発明の抗原結合分子の抗体可変領域がCD3またはCD137に対する結合活性を有するかどうかを、相互作用のセンサーグラムから算出された解離定数（KD）値に基づいて、または抗原結合分子サンプルの作用前のレベルを上回る、作用後のセンサーグラムの増加の程度に基づいて、確認することができる。

【0038】

いくつかの態様において、目的の抗原（すなわち、CD3またはCD137）に対する本発明の抗体可変領域の結合活性または親和性を、例えば、Biacore T200機器（GE Healthcare）またはBiacore 8K機器（GE Healthcare）を用いて、37°C（CD137について）または25°C（CD3について）で評価する。抗ヒトFc（例えば、GE Healthcare）を、アミンカップリングキット（例えば、GE Healthcare）を用いてCM4センサーチップのすべてのフローセル上に固定化する。抗原結合分子または抗体可変領域を、抗Fcセンサー表面上に捕捉し、次いで、抗原（CD3またはCD137）をフローセル上にインジェクトする。抗原結合分子または抗体可変領域の捕捉レベルは、200レゾナンスユニット（RU）を目指してもよい。組換えヒトCD3またはCD137を、2倍連続希釈によって調製した400~25 nMでインジェクトし、その後解離させてもよい。すべての抗原結合分子または抗体可変領域およびアナライトは、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃を含有するACES pH 7.4において調製する。センサー表面は、サイクル毎に3M MgCl₂

で再生させる。結合親和性は、例えば、Biacore T200 Evaluation software, version 2.0 (GE Healthcare) またはBiacore 8K Evaluation software (GE Healthcare) を用いて、データをプロセッシングし、1:1結合モデルにフィットさせることによって決定する。本発明の抗原結合ドメインの特異的結合活性または親和性を評価するために、KD値を算出する。

【0039】

ALPHAScreenは、2種類のビーズ（ドナーおよびアクセプター）を用いるALPHAテクノロジーによって、以下の原理に基づいて実施される：ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子との間の生物学的相互作用によりこれら2つのビーズが近接して位置する時にのみ、発光シグナルが検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ中のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換する。一重項酸素は、ドナービーズ周辺に拡散し、それに近接して位置するアクセプタービーズに到達すると、それによってビーズにおける化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子との間の相互作用がない場合には、ドナービーズによって産生される一重項酸素がアクセプタービーズに到達しない。したがって、化学発光反応は起きない。

【0040】

その間の相互作用を観察する物質の一方（リガンド）を、センサーチップの金薄膜上に固定する。金薄膜とガラスとの境界面で全反射するように、センサーチップの裏側から光を当てる。結果として、反射光の一部に、反射強度が低下した部位（SPRシグナル）が形成される。その間の相互作用を観察する物質の他方（アナライト）を、センサーチップの表面上にインジェクトする。アナライトがリガンドに結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加して、センサーチップ表面上の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に、結合した分子が解離すると、シグナルは元の位置に戻る）。Biacoreシステムは、シフトの量、すなわち、センサーチップ表面上の質量変化を縦座標にプロットし、質量の時間依存的変化をアッセイデータとして表示する（センサーグラム）。センサーチップ表面上に捕捉されたリガンドに結合したアナライトの量（アナライトを相互作用させた前後でのセンサーグラム上でのレスポンスの変化の量）を、センサーグラムから決定することができる。しかし、結合量はリガンドの量にも依存するため、比較は、実質的に同じ量のリガンドの量を用いる条件下で行わなければならない。カインेटクス、すなわち、結合速度定数（ k_a ）および解離速度定数（ k_d ）は、センサーグラムのカーブから決定することができ、一方、親和性（KD）は、これらの定数の比から決定することができる。阻害アッセイもまた、BIACORE法において好適に用いられる。阻害アッセイの例は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010に記載されている。

【0041】

本発明の抗原結合分子が「CD3とCD137に同時には結合しない」かどうかは、抗原結合分子がCD3およびCD137の両方に対する結合活性を有することを確認すること；次いで、この結合活性を有する可変領域を含む抗原結合分子に、CD3またはCD137のいずれかを予め結合させること；および次いで、上述の方法によってもう1つのものに対するその結合活性の有無を判定すること、によって確認することができる。あるいは、これはまた、ELISAプレート上またはセンサーチップ上に固定化されたCD3またはCD137のいずれかに対する抗原結合分子の結合が、溶液中へのもう1つのものの添加によって阻害されるかどうかを判定することによって、確認することもできる。いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子のCD3またはCD137のいずれかに対する結合は、もう1つに対する抗原結合分子の結合によって、少なくとも50%、好ましくは60%以上、より好ましくは70%以上、より好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、またはいっそうより好ましくは95%以上阻害される。

【0042】

1つの局面において、1つの抗原（例えば、CD3）を固定化している間に、CD3に対する

抗原結合分子の結合の阻害を、先行技術において公知の方法（すなわち、ELISA、BIACOREなど）によって、他の抗原（例えば、CD137）の存在下で決定することができる。別の局面において、CD137を固定化している間に、CD137に対する抗原結合分子の結合の阻害もまた、CD3の存在下で決定することができる。上述の2つの局面のうちのいずれか1つが実施される時に、結合が、少なくとも50%、好ましくは60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、またはいっそうより好ましくは95%以上阻害されるならば、本発明の抗原結合分子は、CD3とCD137に同時には結合しないと判定される。

いくつかの態様において、アナライトとしてインジェクトされる抗原の濃度は、固定化される他の抗原の濃度よりも少なくとも1倍、2倍、5倍、10倍、30倍、50倍、または100倍高い。

10

好ましい様式において、アナライトとしてインジェクトされる抗原の濃度は、固定化される他の抗原の濃度よりも100倍高く、結合は、少なくとも80%阻害される。

1つの態様において、抗原結合分子のCD137（固定化）結合活性についてのKD値に対する抗原結合分子のCD3（アナライト）結合活性についてのKD値の比（ $KD(CD3)/KD(CD137)$ ）を算出し、CD137（固定化）濃度よりもKD値の比（ $KD(CD3)/KD(CD137)$ ）の10倍、50倍、100倍、または200倍高い、CD3（アナライト）濃度を、上記の競合測定のために用いることができる。（例えば、KD値の比が0.1である場合は、1倍、5倍、10倍、または20倍高い濃度を選択することができる。さらに、KD値の比が10である場合は、100倍、500倍、1000倍、または2000倍高い濃度を選択することができる。）

20

【0043】

1つの局面において、1つの抗原（例えば、CD3）を固定化している間に、CD3に対する抗原結合分子の結合シグナルの減弱を、先行技術において公知の方法（すなわち、ELISA、ECLなど）によって、他の抗原（例えば、CD137）の存在下で決定することができる。別の局面において、CD137を固定化している間に、CD137に対する抗原結合分子の結合シグナルの減弱もまた、CD3の存在下で決定することができる。上述の2つの局面のうちのいずれか1つが実施される時に、結合シグナルが、少なくとも50%、好ましくは60%以上、好ましくは70%以上、さらに好ましくは80%以上、さらに好ましくは90%以上、またはいっそうより好ましくは95%以上減弱されるならば、本発明の抗原結合分子は、CD3とCD137に同時には結合しないと判定される。

30

いくつかの態様において、アナライトとしてインジェクトされる抗原の濃度は、固定化される他の抗原の濃度よりも少なくとも1倍、2倍、5倍、10倍、30倍、50倍、または100倍高い。

好ましい様式において、アナライトとしてインジェクトされる抗原の濃度は、固定化される他の抗原の濃度よりも100倍高く、結合は、少なくとも80%阻害される。

1つの態様において、抗原結合分子のCD137（固定化）結合活性についてのKD値に対する抗原結合分子のCD3（アナライト）結合活性についてのKD値の比（ $KD(CD3)/KD(CD137)$ ）を算出し、CD137（固定化）濃度よりもKD値の比（ $KD(CD3)/KD(CD137)$ ）の10倍、50倍、100倍、または200倍高い、CD3（アナライト）濃度を、上記の測定のために用いることができる。（例えば、KD値の比が0.1である場合は、1倍、5倍、10倍、または20倍高い濃度を選択することができる。さらに、KD値の比が10である場合は、100倍、500倍、1000倍、または2000倍高い濃度を選択することができる。）

40

【0044】

具体的には、例えば、ECL法を用いる場合、ビオチン標識された被験抗原結合分子、sulfo-tag（Ru錯体）で標識されたCD3、および標識されていないCD137を準備する。被験抗原結合分子が、CD3およびCD137に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合しない場合、被験抗原結合分子と標識されたCD3との混合物をストレプトアビジン固定化プレート上に添加すること、およびその後の発光によって、sulfo-tagの発光シグナルが、標識されていないCD137の非存在下で検出される。対照的に、発光シグナルは、標識されていないCD137の存在下で減少する。この発光シグナルの減少を定量して、相対

50

的な結合活性を決定することができる。この解析は、標識されたCD137および標識されていないCD3を用いて、同様に実施され得る。

【0045】

ALPHAScreenの場合、被験抗原結合分子は、競合するCD137の非存在下でCD3と相互作用して、520～620 nmのシグナルを生成する。タグ付けされていないCD137は、被験抗原結合分子との相互作用についてCD3と競合する。競合の結果として引き起こされる蛍光の減少を定量し、それによって相対的な結合活性を決定することができる。スルホ-NHS-ビオチンなどを用いたポリペプチドのビオチン化は、当技術分野において公知である。例えば、CD3をコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドとをインフレーションで融合すること；および、結果として生じた融合遺伝子を、その発現が可能なベクターを保有する細胞などによって発現させ、その後グルタチオンカラムを用いて精製することを含む、適宜採用される方法によって、CD3をGSTでタグ付けすることができる。得られたシグナルは、好ましくは、例えば、非線形回帰解析に基づく一部位競合（one-site competition）モデルに適合したソフトウェアGRAPHPAD PRISM（GraphPad Software, Inc., San Diego）を用いて解析される。この解析は、タグ付けされたCD137およびタグ付けされていないCD3を用いて、同様に解析され得る。

あるいは、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）を用いた方法が用いられてもよい。FRETとは、励起エネルギーが、近接して位置する2つの蛍光分子の間で互いに、電子共鳴によって直接移動する現象である。FRETが起ると、ドナー（励起状態を有する蛍光分子）の励起エネルギーがアクセプター（ドナーの近くに位置するもう1つの蛍光分子）に移動するため、ドナーから放射される蛍光が消失し（正確には、蛍光の寿命が短縮し）、代わりにアクセプターから蛍光が放射される。この現象の使用によって、CD3とCD137に同時に結合するか否かを解析することができる。例えば、蛍光ドナーを有するCD3および蛍光アクセプターを有するCD137が、被験抗原結合分子に同時に結合すると、ドナーの蛍光は消失し、一方、アクセプターから蛍光が放射される。そのため、蛍光波長の変化が観察される。そのような抗体は、CD3とCD137に同時に結合するものと確認される。他方で、CD3、CD137、および被験抗原結合分子の混合が、CD3と結合した蛍光ドナーの蛍光波長を変化させないならば、この被験抗原結合分子は、CD3およびCD137に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合しない抗原結合ドメインとみなすことができる。

【0046】

例えば、ビオチン標識された被験抗原結合分子を、ドナービーズ上のストレプトアビジンに結合させ、一方、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ付けされたCD3を、アクセプタービーズに結合させる。被験抗原結合分子は、競合する第2の抗原の非存在下でCD3と相互作用して、520～620 nmのシグナルを生成する。タグ付けされていない第2の抗原は、被験抗原結合分子との相互作用についてCD3と競合する。競合の結果として引き起こされる蛍光の減少を定量し、それによって相対的な結合活性を決定することができる。スルホ-NHS-ビオチンなどを用いたポリペプチドのビオチン化は、当技術分野において公知である。例えば、CD3をコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドとをインフレーションで融合すること；および、結果として生じた融合遺伝子を、その発現が可能なベクターを保有する細胞などによって発現させ、その後グルタチオンカラムを用いて精製することを含む、適宜採用される方法によって、CD3をGSTでタグ付けすることができる。得られたシグナルは、好ましくは、例えば、非線形回帰解析に基づく一部位競合モデルに適合したソフトウェアGRAPHPAD PRISM（GraphPad Software, Inc., San Diego）を用いて解析される。

【0047】

タグ付けは、GSTタグ付けに限定されず、ヒスチジンタグ、MBP、CBP、Flagタグ、HAタグ、V5タグ、c-mycタグなどであるがそれらに限定されない、任意のタグで実施されてもよい。被験抗原結合分子のドナービーズへの結合は、ビオチン-ストレプトアビジン反応を用いた結合に限定されない。特に、被験抗原結合分子がFcを含む場合、可能な方法には、ドナービーズ上のプロテインAまたはプロテインGなどのFc認識タンパク質を介して被

験抗原結合分子を結合させることが含まれる。

【0048】

また、CD3およびCD137が、可溶性タンパク質のように細胞膜上に発現していない時、または両方が同じ細胞上に存在する時には、可変領域が、CD3とCD137に同時に結合することができるが、各々が異なる細胞上で発現しているCD3とCD137に同時に結合することができない場合もまた、当技術分野において公知の方法によってアッセイすることができる。

具体的には、CD3およびCD137に対する同時の結合を検出するためのECL-ELISAにおいて陽性であると確認されている被験抗原結合分子をまた、CD3を発現する細胞およびCD137を発現する細胞と混合する。被験抗原結合分子は、抗原結合分子およびこれらの細胞が互いに同時に結合しない限り、異なる細胞上で発現しているCD3およびCD137に同時に結合できないことが示され得る。このアッセイは、例えば、細胞ベースのECL-ELISAによって実施することができる。CD3を発現する細胞を、予めプレート上に固定化する。被験抗原結合分子をそれに結合させた後に、CD137を発現する細胞をプレートに添加する。CD137を発現する細胞上でのみ発現している異なる抗原は、この抗原に対するsulfo-tagで標識された抗体を用いて検出される。抗原結合分子が、それぞれ2つの細胞上で発現している2つの抗原に同時に結合する場合は、シグナルが観察される。抗原結合分子がこれらの抗原に同時に結合しない場合は、いかなるシグナルも観察されない。

あるいは、このアッセイは、ALPHAScreen法によって実施されてもよい。被験抗原結合分子を、ドナービーズに結合したCD3を発現する細胞およびアクセプタービーズに結合したCD137を発現する細胞と混合する。抗原結合分子が、それぞれ2つの細胞上で発現している2つの抗原に同時に結合する場合は、シグナルが観察される。抗原結合分子がこれらの抗原に同時に結合しない場合は、シグナルは観察されない。

あるいは、このアッセイは、Octet相互作用解析法によって実施されてもよい。最初に、ペプチドタグを付加したCD3を発現する細胞を、ペプチドタグを認識するバイオセンサーに結合させる。CD137を発現する細胞および被験抗原結合分子を、ウェルに入れて、相互作用について解析する。抗原結合分子が、それぞれ2つの細胞上で発現している2つの抗原に同時に結合する場合は、被験抗原結合分子およびCD137を発現する細胞のバイオセンサーへの結合によって引き起こされる大きな波長シフトが観察される。抗原結合分子がこれらの抗原に同時に結合しない場合は、被験抗原結合分子のみのバイオセンサーへの結合によって引き起こされる小さな波長シフトが観察される。

【0049】

結合活性に基づくこれらの方法の代わりに、生物活性に基づくアッセイが実施されてもよい。例えば、CD3を発現する細胞およびCD137を発現する細胞を、被験抗原結合分子と混合して培養する。それぞれ2つの細胞上で発現している2つの抗原は、抗原結合分子がこれらの2つの抗原に同時に結合する場合は、被験抗原結合分子を介して相互に活性化される。そのため、抗原のそれぞれの下流のリン酸化レベルの増加などの活性化シグナルの変化を、検出することができる。あるいは、サイトカインの産生が、活性化の結果として誘導される。そのため、産生されるサイトカインの量を測定し、それによって、2つの細胞に同時に結合するか否かを確認することができる。あるいは、CD137を発現する細胞に対する細胞傷害活性が、活性化の結果として誘導される。あるいは、レポーター遺伝子の発現が、活性化の結果として、CD137またはCD3のシグナル伝達経路の下流で活性化されるプロモーターによって誘導される。そのため、細胞傷害活性または産生されるレポータータンパク質の量を測定し、それによって、2つの細胞に同時に結合するか否かを確認することができる。

【0050】

1つの態様において、細胞性細胞傷害活性は、T細胞依存性細胞傷害活性(TDCC)である。別の態様において、細胞傷害活性は、その表面上にCD3またはCD137を発現する細胞に対する細胞性細胞傷害活性である。本発明の抗体(または抗原結合分子)の(細胞性)細胞傷害活性またはTDCCは、当技術分野において公知の任意の適している方法によって

評価することができる。例えば、TDCCは、実施例2.3.2に記載されるようなリアルタイム細胞増殖抑制アッセイによって測定することができる。このアッセイにおいては、標的細胞を、96ウェルプレート上で試験抗体の存在下でT細胞（例えば、PBMC）または増大させたT細胞とインキュベートし、標的細胞の増殖を、当技術分野において公知の方法によって、例えば、適している解析機器（例えば、xCELLigence Real-Time Cell Analyzer）を用いることによってモニタリングする。細胞増殖抑制率（CGI：%）は、 $CGI(\%) = 100 - (CI_{Ab} \times 100 / CI_{NoAb})$ として与えられる式に従って、セルインデックス値から決定される。「 CI_{Ab} 」は、特定の実験時間での抗体を含むウェルのセルインデックス値を表し、「 CI_{NoAb} 」は、抗体を含まないウェルの平均セルインデックス値を表す。抗体のCGI率が高い、すなわち、有意に陽性の値を有するならば、抗体がTDCC活性を有するということができる。

10

【0051】

好ましい局面において、T細胞活性化は、その活性化に応答してレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ）を発現する操作されたT細胞株（例えば、Jurkat / NFAT-RE Reporter Cell Line (T Cell Activation Bioassay, Promega)）を用いる方法などの、当技術分野において公知の方法によってアッセイすることができる。この方法においては、標的細胞（例えば、CD3を発現する細胞およびCD137を発現する細胞）を、試験抗体の存在下でT細胞と培養し、次いで、レポーター遺伝子の発現産物のレベルまたは活性を、適切な方法によってT細胞活性化の指標として測定する。レポーター遺伝子がルシフェラーゼ遺伝子である場合、ルシフェラーゼとその基質との間の反応から生じる発光を、T細胞活性化の指標として測定してもよい。上記のように測定されたT細胞活性化がより高いならば、試験抗体は、より高いT細胞活性化活性を有すると判定される。1つの局面において、CD3シグナル伝達に応答してレポーター遺伝子を発現する組換えT細胞を、抗原結合分子の存在下でCD137を発現する細胞と共培養した時に、レポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性が、最大でも約50%、30%、20%、10%、5%、または1%であるならば、抗原結合分子は、CD137を発現する細胞に対するT細胞の活性化を誘導しないと判定され、ここで100%の活性化とは、CD3とCD137に同時に結合する抗原結合分子によって達成される活性化のレベルである。1つの局面において、CD3シグナル伝達に応答してレポーター遺伝子を発現する組換えT細胞を、抗原結合分子の存在下でCD137を発現する細胞と共培養した時に、レポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性が、最大でも約50%、30%、20%、10%、5%、または1%であるならば、抗原結合分子は、CD137を発現する細胞に対するT細胞の活性化を誘導しないと判定され、ここで100%の活性化とは、第3の抗原の分子を発現する細胞に対する同じ抗原結合分子によって達成される活性化のレベルである。

20

30

【0052】

1つの態様において、抗原結合分子がサイトカインの放出を誘導しないかどうかは、例えば、PBMCと抗原結合分子とをインキュベートすること、ならびに、当技術分野において公知の方法を用いて、PBMCから培養上清中に放出されたIL-2、IFN γ 、およびTNF α などのサイトカインを測定することによって判定することができる。抗原結合分子とインキュベートしたPBMCの培養上清において、有意なレベルのサイトカインが検出されないか、または有意なサイトカイン発現の誘導が起こらないならば、抗原結合分子は、PBMCからのサイトカイン放出を誘導しないと判定される。1つの局面において、「有意なレベルのサイトカインが検出されない」とはまた、最大でも約50%、30%、20%、10%、5%、または1%であるサイトカイン濃度のレベルを指し、ここで100%とは、CD3とCD137に同時に結合する抗原結合分子によって達成されるサイトカイン濃度である。1つの局面において、「有意なレベルのサイトカインが検出されない」とはまた、最大でも約50%、30%、20%、10%、5%、または1%であるサイトカイン濃度のレベルを指し、ここで100%とは、第3の抗原の分子を発現する細胞の存在下で達成されるサイトカイン濃度である。1つの局面において、「有意なサイトカイン発現の誘導が起こらない」とはまた、抗原結合分子を添加する前の各サイトカインの濃度の最大でも5倍、2倍、または1倍である

40

50

、サイトカイン濃度増加のレベルを指す。

【0053】

本発明において、「Fc領域」とは、抗体分子中の、ヒンジまたはその一部、ならびにCH2およびCH3ドメインからなる断片を含む領域を指す。IgGクラスのFc領域は、例えば、システイン226（EUナンバリング（本明細書においてEUインデックスとも言う））からC末端まで、またはプロリン230（EUNナンバリング）からC末端までの領域を意味するが、それに限定されない。Fc領域は、好ましくは、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4モノクローナル抗体を、ペプシンなどのタンパク質分解酵素で部分消化した後に、プロテインAカラムまたはプロテインGカラムに吸着された画分を再溶出することによって取得することができる。そのようなタンパク質分解酵素は、適宜設定される酵素の反応条件（例えば、pH）の下で制限的にFabまたはF(ab')₂を形成するように全長抗体を消化することができる限り、特に限定されない。その例には、ペプシンおよびパパインが含まれ得る。

10

【0054】

いくつかの態様において、「抗原結合分子」は、本発明の「抗体可変領域」を含む限り、特に限定されない。抗原結合分子は、およそ5アミノ酸以上の長さを有するペプチドまたはタンパク質をさらに含んでもよい。ペプチドまたはタンパク質は、生物に由来するペプチドまたはタンパク質に限定されず、例えば、人工的に設計された配列からなるポリペプチドであってもよい。また、天然ポリペプチド、合成ポリペプチド、組換えポリペプチドなどが用いられてもよい。

【0055】

いくつかの態様において、本発明の「抗原結合分子」は、「抗体可変領域」を含む分子に特に限定されるわけではない。ある特定の態様において、可変領域を含む抗体以外であり、2つの異なる抗原に結合することができる抗原結合分子、例えば、アフイボディなどが、当業者に一般的に知られている方法によって取得されてもよい（PLoS One. 2011;6(10):e25791; PLoS One. 2012;7(8):e42288; J Mol Biol. 2011 Aug 5;411(1):201-19; Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Aug 23;108(34):14067-72）。

20

【0056】

本発明の抗原結合分子の好ましい例には、抗体Fc領域を含む抗原結合分子が含まれ得る。

【0057】

本発明において、例えば、天然型IgGに由来するFc領域を、本発明の「Fc領域」として用いることができる。ここで、天然型IgGとは、天然に見出されるIgGと同一のアミノ酸配列を含有し、免疫グロブリンγ遺伝子により実質的にコードされる抗体のクラスに属するポリペプチドを意味する。天然型ヒトIgGとは、例えば、天然型ヒトIgG1、天然型ヒトIgG2、天然型ヒトIgG3、または天然型ヒトIgG4を意味する。天然型IgGにはまた、自然発生的にそれに由来するバリエーションなども含まれる。遺伝子多型に基づく複数のアロタイプ配列が、ヒトIgG1、ヒトIgG2、ヒトIgG3、およびヒトIgG4抗体の定常領域としてSequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No.91-3242に記載されており、それらはいずれも、本発明において用いることができる。特に、ヒトIgG1の配列は、EUナンバリング356～358位のアミノ酸配列として、DELまたはEEMを有してもよい。

30

【0058】

抗体Fc領域は、例えば、IgA1、IgA2、IgD、IgE、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、またはIgMタイプのFc領域として見出される。例えば、天然型ヒトIgG抗体に由来するFc領域を、本発明の抗体Fc領域として用いることができる。例えば、天然型IgGの定常領域、具体的には、天然型ヒトIgG1を起源とする定常領域（配列番号：208）、天然型ヒトIgG2を起源とする定常領域（配列番号：209）、天然型ヒトIgG3を起源とする定常領域（配列番号：210）、または天然型ヒトIgG4を起源とする定常領域（配列番号：211）に由来するFc領域を、本発明のFc領域として用いることができる。天然型IgGの定常領域にはまた、自然発生的にそれに由来するバリエーションなども含まれる。

40

50

【0059】

本発明のFc領域は、特に好ましくは、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているFc領域である。ここで、Fcγ受容体（本明細書においてFcγRとも言う）とは、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4のFc領域に結合することができる受容体を指し、Fcγ受容体遺伝子によって実質的にコードされるタンパク質ファミリーの任意のメンバーを意味する。ヒトでは、このファミリーには、アイソフォームFcγRIa、FcγRIb、およびFcγRIcを含むFcγRI（CD64）；アイソフォームFcγRIIa（アロタイプH131（H型）およびR131（R型）を含む）、FcγRIIb（FcγRIIb-1およびFcγRIIb-2を含む）、およびFcγRIIcを含むFcγRII（CD32）；ならびにアイソフォームFcγRIIIa（アロタイプV158およびF158を含む）およびFcγRIIIb（アロタイプFcγRIIIb-NA1およびFcγRIIIb-NA2を含む）を含むFcγRIII（CD16）；ならびに、任意の未発見のヒトFcγRまたはFcγRアイソフォームもしくはアロタイプも含まれるが、それらに限定されない。FcγRには、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、およびサルに由来するものが含まれる。FcγRは、これらの分子に限定されず、任意の生物に由来してもよい。マウスFcγRには、FcγRI（CD64）、FcγRII（CD32）、FcγRIII（CD16）、およびFcγRIII-2（CD16-2）、ならびに任意の未発見のマウスFcγRまたはFcγRアイソフォームもしくはアロタイプが含まれるが、それらに限定されない。そのようなFcγ受容体の好ましい例には、ヒトFcγRI（CD64）、FcγRIIa（CD32）、FcγRIIb（CD32）、FcγRIIIa（CD16）、および／またはFcγRIIIb（CD16）が含まれる。

【0060】

FcγRは、ITAM（免疫受容体活性化チロシンモチーフ）を有する活性型受容体およびITIM（免疫受容体抑制性チロシンモチーフ）を有する抑制型受容体の形態で見出される。FcγRは、活性型FcγR（FcγRI、FcγRIIa R、FcγRIIa H、FcγRIIIa、およびFcγRIIIb）と抑制型FcγR（FcγRIIb）とに分類される。

FcγRIのポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれNM_000566.3およびNP_000557.1に記載されている；FcγRIIaのポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれBC020823.1およびAAH20823.1に記載されている；FcγRIIbのポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれBC146678.1およびAAI46679.1に記載されている；FcγRIIIaのポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれBC033678.1およびAAH33678.1に記載されている；ならびにFcγRIIIbのポリヌクレオチド配列およびアミノ酸配列は、それぞれBC128562.1およびAAI28563.1に記載されている（RefSeq登録番号）。FcγRIIaには、FcγRIIaの131番目のアミノ酸がヒスチジン（H型）またはアルギニン（R型）によって置換された2種類の遺伝子多型が存在する（J. Exp. Med, 172, 19-25, 1990）。FcγRIIbには、FcγRIIbの232番目のアミノ酸がイソロイシン（I型）またはスレオニン（T型）によって置換された2種類の遺伝子多型が存在する（Arthritis. Rheum. 46: 1242-1254 (2002)）。FcγRIIIaには、FcγRIIIaの158番目のアミノ酸がバリン（V型）またはフェニルアラニン（F型）によって置換された2種類の遺伝子多型が存在する（J. Clin. Invest. 100(5): 1059-1070 (1997)）。FcγRIIIbには、2種類の遺伝子多型（NA1型およびNA2型）が存在する（J. Clin. Invest. 85: 1287-1295 (1990)）。

【0061】

Fcγ受容体に対する結合活性が低下していることは、FACS、ELISA形式、ALPHA Screen（増幅発光近接ホモジニアスアッセイスクリーン）、または表面プラズモン共鳴（SPR）現象に基づくBIACORE法などの、周知の方法によって確認することができる（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2006) 103 (11), 4005-4010）。

ALPHA Screen法は、2種類のビーズ（ドナーおよびアクセプター）を用いるALPHAテクノロジーによって、以下の原理に基づいて実施される：ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子との間の生物学的相互作用によりこれら2つのビーズが近接して位置する時にのみ、発光シグナルが検出される。レーザーによって励起されたドナービーズ中のフォトセンシタイザーは、周辺の酸素を励起状態の一重項酸素に変換す

る。一重項酸素は、ドナービーズ周辺に拡散し、それに近接して位置するアクセプタービーズに到達すると、それによってビーズにおける化学発光反応を引き起こし、最終的に光が放出される。ドナービーズに結合した分子とアクセプタービーズに結合した分子との間の相互作用がない場合には、ドナービーズによって産生される一重項酸素がアクセプタービーズに到達しない。したがって、化学発光反応は起きない。

【0062】

例えば、ビオチン標識された被験抗原結合分子を、ドナービーズに結合させ、一方、グルタチオンSトランスフェラーゼ（GST）でタグ付けされたFcγ受容体を、アクセプタービーズに結合させる。競合する変異Fc領域を有する抗原結合分子の非存在下では、野生型Fc領域を有する抗原結合分子は、Fcγ受容体と相互作用して、520～620 nmのシグナルを生成する。タグ付けされていない変異Fc領域を有する抗原結合分子は、Fcγ受容体との相互作用について、野生型Fc領域を有する抗原結合分子と競合する。競合の結果として引き起こされる蛍光の減少を定量し、それによって相対的な結合親和性を決定することができる。スルホ-NHS-ビオチンなどを用いた抗原結合分子（例えば、抗体）のビオチン化は、当技術分野において公知である。例えば、Fcγ受容体をコードするポリヌクレオチドとGSTをコードするポリヌクレオチドとをインフレームで融合すること；および、結果として生じた融合遺伝子を、その発現が可能なベクターを保有する細胞などによって発現させ、その後グルタチオンカラムを用いて精製することを含む、適宜採用される方法によって、Fcγ受容体をGSTでタグ付けすることができる。得られたシグナルは、好ましくは、例えば、非線形回帰解析に基づく一部位競合モデルに適したソフトウェアGRAPHPAD PRISM（GraphPad Software, Inc., San Diego）を用いて解析される。

【0063】

その間の相互作用を観察する物質の一方（リガンド）を、センサーチップの金薄膜上に固定化する。金薄膜とガラスとの境界面で全反射するように、センサーチップの裏側から光を当てる。結果として、反射光の一部に、反射強度が低下した部位（SPRシグナル）が形成される。その間の相互作用を観察する物質の他方（アナライト）を、センサーチップの表面上にインジェクトする。アナライトがリガンドに結合すると、固定化されているリガンド分子の質量が増加して、センサーチップ表面上の溶媒の屈折率が変化する。この屈折率の変化により、SPRシグナルの位置がシフトする（逆に、結合した分子が解離すると、シグナルは元の位置に戻る）。Biacoreシステムは、シフトの量、すなわち、センサーチップ表面上の質量変化を縦座標にプロットし、質量の時間依存的変化をアッセイデータとして表示する（センサーグラム）。カインेटクス、すなわち、結合速度定数（ k_a ）および解離速度定数（ k_d ）は、センサーグラムのカーブから決定することができ、一方、親和性（ K_D ）は、これらの定数の比から決定することができる。阻害アッセイもまた、BIA CORE法において好適に用いられる。阻害アッセイの例は、Proc. Natl. Acad. Sci. USA（2006）103（11），4005-4010に記載されている。

【0064】

本明細書において、Fcγ受容体に対する結合活性が低下しているとは、被験抗原結合分子が、上記の解析方法に基づいて、Fc領域を含む対照抗原結合分子の結合活性と比較して、例えば、50%以下、好ましくは45%以下、40%以下、35%以下、30%以下、20%以下、または15%以下、特に好ましくは10%以下、9%以下、8%以下、7%以下、6%以下、5%以下、4%以下、3%以下、2%以下、または1%以下の結合活性を示すことを意味する。

IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4モノクローナル抗体のFc領域を有する抗原結合分子を、対照抗原結合分子として適宜用いることができる。Fc領域の構造は、配列番号：212（RefSeq登録番号AAC82527.1のN末にA付加）、配列番号：213（RefSeq登録番号AAB59393.1のN末にA付加）、配列番号：214（RefSeq登録番号CAA27268.1のN末にA付加）、または配列番号：215（RefSeq登録番号AAB59394.1のN末にA付加）に記載されている。ある特定のアイソタイプの抗体のFc領域のバリエーションを有する抗原結合分子を試験物質として用いる場合には、このある特定のアイソタイプの抗体のFc領域を

有する抗原結合分子を対照として用いて、バリエーションにおける変異の、Fcγ受容体に対する結合活性への効果を試験する。Fcγ受容体に対する結合活性が低下していることがこのように確認されたFc領域バリエーションを有する抗原結合分子が、適宜調製される。

【0065】

例えば、231A~238S欠失 (WO 2009/011941)、C226S、C229S、P238S、(C220S) (J.Rheumatol (2007) 34, 11)、C226S、C229S (Hum.Antibod.Hybridomas (1990) 1(1), 47-54)、C226S、C229S、E233P、L234V、またはL235A (Blood (2007) 109, 1185-1192) (これらのアミノ酸はEUナンバリングに従って定義される) バリエーションが、そのようなバリエーションとして当技術分野において公知である。

その好ましい例には、以下の構成アミノ酸：EUナンバリングに従って定義される220位、226位、229位、231位、232位、233位、234位、235位、236位、237位、238位、239位、240位、264位、265位、266位、267位、269位、270位、295位、296位、297位、298位、299位、300位、325位、327位、328位、329位、330位、331位、および332位のアミノ酸のいずれかの置換による、ある特定のアイソタイプの抗体のFc領域に由来するFc領域を有する抗原結合分子が含まれる。Fc領域の起源である抗体のアイソタイプは、特に限定されず、IgG1、IgG2、IgG3、またはIgG4モノクローナル抗体を起源とするFc領域が、適宜用いられ得る。天然型ヒトIgG1抗体を起源とするFc領域が、好適に用いられる。

例えば、EUナンバリングに従って定義される、構成アミノ酸の以下の置換群 (数字は、EUナンバリングに従って定義されるアミノ酸残基の位置を表し；数字の前に位置する一文字アミノ酸表記は、置換前のアミノ酸残基を表し；および数字の後に位置する一文字アミノ酸表記は、置換前のアミノ酸残基を表す)：

- (a) L234F、L235E、およびP331S、
- (b) C226S、C229S、およびP238S、
- (c) C226SおよびC229S、ならびに
- (d) C226S、C229S、E233P、L234V、およびL235A

のいずれかによる、または231~238位のアミノ酸配列の欠失による、IgG1抗体Fc領域に由来するFc領域を有する抗原結合分子もまた、適宜用いられ得る。

【0066】

EUナンバリングに従って定義される、構成アミノ酸の以下の置換群 (数字は、EUナンバリングに従って定義されるアミノ酸残基の位置を表し；数字の前に位置する一文字アミノ酸表記は、置換前のアミノ酸残基を表し；および数字の後に位置する一文字アミノ酸表記は、置換前のアミノ酸残基を表す)：

- (e) H268Q、V309L、A330S、およびP331S、
- (f) V234A、
- (g) G237A、
- (h) V234AおよびG237A、
- (i) A235EおよびG237A、ならびに
- (j) V234A、A235E、およびG237A

のいずれかによる、IgG2抗体Fc領域に由来するFc領域を有する抗原結合分子もまた、適宜用いられ得る。

【0067】

EUナンバリングに従って定義される、構成アミノ酸の以下の置換群 (数字は、EUナンバリングに従って定義されるアミノ酸残基の位置を表し；数字の前に位置する一文字アミノ酸表記は、置換前のアミノ酸残基を表し；および数字の後に位置する一文字アミノ酸表記は、置換前のアミノ酸残基を表す)：

- (k) F241A、
- (l) D265A、および
- (m) V264A

のいずれかによる、IgG3抗体Fc領域に由来するFc領域を有する抗原結合分子もまた、適

10

20

30

40

50

宜用いられ得る。

【0068】

EUナンバリングに従って定義される、構成アミノ酸の以下の置換群（数字は、EUナンバリングに従って定義されるアミノ酸残基の位置を表し；数字の前に位置する一文字アミノ酸表記は、置換前のアミノ酸残基を表し；および数字の後に位置する一文字アミノ酸表記は、置換前のアミノ酸残基を表す）：

(n) L235A、G237A、およびE318A、

(o) L235E、ならびに

(p) F234AおよびL235A

のいずれかによる、IgG4抗体Fc領域に由来するFc領域を有する抗原結合分子もまた、適宜用いられ得る。

【0069】

その他の好ましい例には、以下の構成アミノ酸：EUナンバリングに従って定義される233位、234位、235位、236位、237位、327位、330位、および331位のアミノ酸のいずれかの、カウンターパートのIgG2またはIgG4のFc領域における対応するEUナンバリングの位置のアミノ酸での置換による、天然型ヒトIgG1抗体のFc領域に由来するFc領域を有する抗原結合分子が含まれる。

【0070】

その他の好ましい例には、以下の構成アミノ酸：EUナンバリングに従って定義される234位、235位、および297位のアミノ酸のいずれか1つまたは複数の、異なるアミノ酸での置換による、天然型ヒトIgG1抗体のFc領域に由来するFc領域を有する抗原結合分子が含まれる。置換後に存在するアミノ酸の種類は、特に限定されない。234位、235位、および297位のアミノ酸のいずれか1つまたは複数がアラニンによって置換されているFc領域を有する抗原結合分子が、特に好ましい。

【0071】

その他の好ましい例には、EUナンバリングに従って定義される265位の構成アミノ酸の、異なるアミノ酸での置換による、IgG1抗体Fc領域に由来するFc領域を有する抗原結合分子が含まれる。置換後に存在するアミノ酸の種類は、特に限定されない。265位のアミノ酸がアラニンによって置換されているFc領域を有する抗原結合分子が、特に好ましい。

【0072】

本発明の「抗原結合分子」の1つの好ましい形は、例えば、本発明の抗体可変領域を含む多重特異性抗体であり得る。

【0073】

多重特異性抗体の会合には、抗体H鎖の第2の定常ドメイン（CH2）または第3の定常ドメイン（CH3）の間の界面に電荷反発を導入することによって、意図されないH鎖間の会合を抑制する技術を、適用することができる（WO2006/106905）。

CH2またはCH3の界面に電荷反発を導入することによって意図されないH鎖間の会合を抑制する技術において、H鎖定常ドメイン間の界面で互いに接触するアミノ酸残基の例には、1つのCH3ドメインにおけるEUナンバリング356位の残基、EUナンバリング439位の残基、EUナンバリング357位の残基、EUナンバリング370位の残基、EUナンバリング399位の残基、およびEUナンバリング409位の残基、ならびにもう1つのCH3ドメインにおけるそれらのパートナー残基が含まれ得る。

【0074】

より具体的には、例えば、第1のH鎖CH3ドメインにおける以下のアミノ酸残基のペア（1）～（3）から選択される1つ～3つのペアのアミノ酸残基が同種の電荷を有する抗原結合分子として、2つのH鎖CH3ドメインを含む抗体を調製することができる：（1）H鎖CH3ドメインに含有される、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ドメインに含有される、EUナンバリング357位および370位のアミノ酸残基；ならびに（3）H鎖CH3ドメインに含有される、EUナンバリング399位および409位のアミノ酸残基。

10

20

30

40

50

【0075】

抗体は、1つ～3つのペアのアミノ酸残基が、第1のH鎖CH3ドメインにおける同種の電荷を有するアミノ酸残基のペア(1)～(3)に対応するように、かつ第1のH鎖CH3ドメイン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ように、第1のH鎖CH3ドメインとは異なる第2のH鎖CH3ドメインにおけるアミノ酸残基のペア(1)～(3)から選択されている抗体として、さらに調製することができる。

【0076】

ペア(1)～(3)に記載される各アミノ酸残基は、会合したH鎖においてそのパートナーの近くに位置している。当業者は、所望のH鎖CH3ドメインまたはH鎖定常ドメインについて、市販のソフトウェアを用いたホモロジーモデリングなどに従い、ペア(1)～(3)の各々に記載されるアミノ酸残基に対応する位置を見出すことができ、その位置のアミノ酸残基を適宜改変することができる。

10

【0077】

上記の抗体において、「電荷を有するアミノ酸残基」の各々は、好ましくは、例えば、以下の群(a)および(b)のいずれかに含まれるアミノ酸残基から選択される：

(a) グルタミン酸(E)およびアスパラギン酸(D)；ならびに

(b) リジン(K)、アルギニン(R)、およびヒスチジン(H)。

【0078】

上記の抗体において、「同種の電荷を有する」という句は、例えば、2つ以上のアミノ酸残基のすべてが、群(a)および(b)のいずれか1つに含まれるアミノ酸残基であることを意味する。「反対の電荷を有する」という句は、例えば、2つ以上のアミノ酸残基の中の少なくとも1つのアミノ酸残基が、群(a)および(b)のいずれか1つに含まれるアミノ酸残基であってもよく、一方、残りのアミノ酸残基は、他の群に含まれるアミノ酸残基であることを意味する。

20

【0079】

好ましい態様において、抗体は、第1のH鎖CH3ドメインと第2のH鎖CH3ドメインとがジスルフィド結合により架橋されていてもよい。

本発明に従って改変されるアミノ酸残基は、上述の抗体可変領域または抗体定常領域におけるアミノ酸残基に限定されない。当業者は、ポリペプチドバリエーション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などに従い、界面を構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、その位置のアミノ酸残基を改変することができる。

30

【0080】

本発明の多重特異性抗体の会合はまた、当技術分野において公知の代替技術によって実施することもできる。1つの抗体H鎖の可変ドメインに存在するアミノ酸側鎖を、より大きい側鎖によって置換し(ノブ)、もう1つのH鎖の可変ドメインに存在するそのパートナーのアミノ酸側鎖を、より小さい側鎖によって置換する(ホール)。アミノ酸配列の異なるFcドメインのポリペプチドが効率的に会合するように、ノブをホール中に配置することができる(WO1996/027011; Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621; および Merchant AM et al. Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681)。

40

【0081】

この技術に加えて、当技術分野において公知のさらなる代替技術が、本発明の多重特異性抗体を形成させるために用いられてもよい。1つの抗体のH鎖のCH3の一部を、その対応するIgA由来の配列に変換し、もう1つのH鎖のCH3におけるその相補的な部分を、その対応するIgA由来の配列に変換する。結果として生じた鎖交換操作ドメインCH3を用いることにより、配列が異なるポリペプチド間の効率的な会合を、相補的CH3会合によって引き起こすことができる(Protein Engineering Design & Selection, 23; 195-202, 2010)。当技術分野において公知のこの技術の使用によって、目的の多重特異性抗体も、効率的に形成させることができる。

50

【0082】

あるいは、多重特異性抗体は、例えば、WO2011/028952に記載されているような抗体のCH1-CL会合およびVH-VL会合を用いた抗体調製技術、WO2008/119353およびWO2011/131746に記載されているような別々に調製されたモノクローナル抗体を用いて二重特異性抗体を調製する技術（Fabアーム交換）、WO2012/058768およびWO2013/063702に記載されているような抗体重鎖CH3ドメイン間の会合を制御する技術、WO2012/023053に記載されているような2種類の軽鎖および1種類の重鎖から構成される二重特異性抗体を調製する技術、またはChristoph et al. (Nature Biotechnology Vol. 31, p 753-758 (2013))に記載されているような1本のH鎖および1本のL鎖からなる抗体の半分子を各々が発現する2つの細菌細胞株を用いて二重特異性抗体を調製する技術によって、形成され得る。これらの会合技術に加えて、第1のエピトープに結合する可変領域を形成する軽鎖および第2のエピトープに結合する可変領域を形成する軽鎖を、それぞれ、第1のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖および第2のエピトープに結合する可変領域を形成する重鎖に会合させる、公知の異種軽鎖会合技術であるCrossMabテクノロジー（Scafer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2011) 108, 11187-11192）もまた、本発明によって提供される多重特異性または多重パラトピック抗原結合分子を調製するために用いることができる。別々に調製されたモノクローナル抗体を用いて二重特異性抗体を調製する技術の例には、重鎖CH3ドメインにおける特定のアミノ酸を置換したモノクローナル抗体を還元条件下に置くことによって抗体のヘテロ二量体化を促進して、所望の二重特異性抗体を取得することを含む方法が含まれ得る。この方法にとって好ましいアミノ酸置換部位の例には、CH3ドメインにおけるEUナンバリング392位の残基およびEUナンバリング397位の残基が含まれ得る。さらに、二重特異性抗体はまた、第1のH鎖CH3ドメインにおける以下のアミノ酸残基のペア（1）～（3）から選択される1つ～3つのペアのアミノ酸残基が同種の電荷を有する抗体の使用によって、調製することもできる：（1）H鎖CH3ドメインに含有される、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ドメインに含有される、EUナンバリング357位および370位のアミノ酸残基；ならびに（3）H鎖CH3ドメインに含有される、EUナンバリング399位および409位のアミノ酸残基。二重特異性抗体はまた、1つ～3つのペアのアミノ酸残基が、第1のH鎖CH3ドメインにおける同種の電荷を有するアミノ酸残基のペア（1）～（3）に対応するように、かつ第1のH鎖CH3ドメイン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ように、第1のH鎖CH3ドメインとは異なる第2のH鎖CH3ドメインにおけるアミノ酸残基のペア（1）～（3）から選択されている抗体の使用によって、調製することもできる。

【0083】

目的の多重特異性抗体を効率的に形成させることができない場合であっても、本発明の多重特異性抗体は、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取得され得る。例えば、以前に報告された方法には、2種類のホモ二量体および目的のヘテロ二量体化抗体をイオン交換クロマトグラフィーによって別々に精製できるように、2種類のH鎖の可変ドメインにアミノ酸置換を導入して、等電点の差を付与することが含まれる（WO2007114325）。プロテインAに結合することができるマウスIgG2aのH鎖およびプロテインAに結合することができないラットIgG2bのH鎖からなるヘテロ二量体化抗体を精製するためにプロテインAを用いる方法が、ヘテロ二量体を精製するための方法として以前に報告されている（WO98050431およびWO95033844）。あるいは、IgGのプロテインA結合部位を構成するEUナンバリング435位および436位のアミノ酸残基を、異なるプロテインA結合の強度を提供する、TyrおよびHisなどのアミノ酸に置換してもよく、結果として生じたH鎖を、各H鎖とプロテインAとの相互作用を変化させるために用いる。結果として、ヘテロ二量体化抗体のみを、プロテインAカラムの使用によって効率的に精製することができる。

【0084】

これらの技術の複数、例えば2つ以上を、組み合わせて用いてもよい。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。本発明の抗原結合分子は、このように改変された形態に基づくがそれとは別に、同一のアミノ酸配列を有する抗原結合分子として調製されてもよい。

【0085】

アミノ酸配列の改変は、当技術分野において公知の様々な方法によって行うことができる。行われてもよいこれらの方法の例には、部位特異的変異誘発 (Hashimoto-Gotoh, T, Mizuno, T, Ogasahara, Y, and Nakagawa, M. (1995) An oligodeoxyribonucleotide-directed dual amber method for site-directed mutagenesis. *Gene* 152, 271-275 ; Zoller, MJ, and Smith, M.(1983) Oligonucleotide-directed mutagenesis of DNA fragments cloned into M13 vectors. *Methods Enzymol.* 100, 468-500 ; Kramer, W, Drutsa, V, Jansen, HW, Kramer, B, Pflugfelder, M, and Fritz, HJ (1984) The gapped duplex DNA approach to oligonucleotide-directed mutation construction. *Nucleic Acids Res.* 12, 9441-9456 ; Kramer W, and Fritz HJ (1987) Oligonucleotide-directed construction of mutations via gapped duplex DNA *Methods. Enzymol.* 154, 350-367 ; および Kunkel, TA (1985) Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 82, 488-492)、PCR変異誘発、およびカセット変異誘発などの方法が含まれ得るが、それらに限定されない。

【0086】

本発明の「抗原結合分子」は、本発明の「抗体可変領域」を構成する重鎖および軽鎖の両方を単一のポリペプチド鎖中に含むが、定常領域が欠けている、抗体断片であってもよい。そのような抗体断片は、例えば、ダイアボディ (diabody) (Db)、一本鎖抗体、または sc(Fab')₂ であってもよい。

【0087】

Dbは、2本のポリペプチド鎖によって構成される二量体である (例えば、Holliger P et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993) ; EP404,097 ; および W093/11161)。これらのポリペプチド鎖は、同じポリペプチド鎖上のL鎖可変ドメイン (VL) およびH鎖可変ドメイン (VH) が互いにペア形成できないほど短い、例えば、およそ5残基のリンカーを通して連結されている。

この短いリンカーのために、同じポリペプチド鎖上にコードされるVLおよびVHは、一本鎖Fvを形成することができず、その代わりに、別のポリペプチド鎖上のVHおよびVLとそれぞれ二量体化して、2つの抗原結合部位を形成する。

【0088】

一本鎖抗体の例には、sc(Fv)₂が含まれる。sc(Fv)₂は、ペプチドリンカーなどのリンカーを介して連結された4つの可変ドメイン、すなわち、2つのVLおよび2つのVHによって構成される1つの鎖を有する一本鎖抗体である (*J Immunol. Methods* (1999) 231 (1-2), 177-189)。これらの2つのVHおよびVLは、異なるモノクローナル抗体に由来してもよい。その好ましい例には、*Journal of Immunology* (1994) 152 (11), 5368-5374において開示されるような、同じ抗原中に存在する2種類のエピトープを認識する二重特異性sc(Fv)₂が含まれる。sc(Fv)₂は、当業者に一般的に知られている方法によって調製することができる。例えば、sc(Fv)₂は、ペプチドリンカーなどのリンカーを介して2つのsc Fvを接続することによって調製することができる。

【0089】

本明細書に記載されるsc(Fv)₂を構成する抗原結合ドメインの構成の例には、2つのVHおよび2つのVLが、一本鎖ポリペプチドのN末端から開始してVH、VL、VH、およびVL (すなわち、[VH]-リンカー-[VL]-リンカー-[VH]-リンカー-[VL]) の順序で整列している抗体が含まれる。2つのVHと2つのVLの順序は、上記の構成に特に限定されず、任意の配置の順序であってもよい。その例にはまた、以下の配置も含まれ得る：

[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]、および
[VL]-リンカー-[VH]-リンカー-[VL]-リンカー-[VH]。

【0090】

sc(Fv)2の分子形態はまた、WO2006/132352においても詳細に記載されている。その中の記載に基づいて、当業者は、本明細書において開示される抗原結合分子を調製するために、所望のsc(Fv)2を適宜調製することができる。

【0091】

本発明の抗原結合分子は、PEGなどの担体ポリマーまたは抗がん剤などの有機化合物とコンジュゲートされてもよい。また、所望の効果を生じることを目的とした糖鎖付加配列の挿入によって、本発明の抗原結合分子に糖鎖を好適に付加することができる。

【0092】

例えば、遺伝子工学によって導入することができる任意のペプチドリンカー、または合成化合物リンカー（例えば、Protein Engineering, 9 (3), 299-305, 1996において開示されるリンカー）を、抗体可変ドメインを連結するためのリンカーとして用いることができる。本発明において、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できる。その長さは、好ましくは5アミノ酸以上であり（上限は、特に限定されず、通常30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下である）、特に好ましくは15アミノ酸である。sc(Fv)2が3つのペプチドリンカーを含有する場合、用いられるこれらのペプチドリンカーのすべては、同じ長さを有してもよく、または異なる長さを有してもよい。

【0093】

ペプチドリンカーの例には、

Ser、

Gly-Ser、

Gly-Gly-Ser、

Ser-Gly-Gly、

Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：216）、

Ser-Gly-Gly-Gly（配列番号：217）、

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：218）、

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号：219）、

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：220）、

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号：221）、

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：222）、

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号：223）、

(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号：218）)_n、および

(Ser-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号：219）)_n、

（ここで、_nは1以上の整数である）が含まれ得る。

しかし、ペプチドリンカーの長さまたは配列は、目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

【0094】

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ラート（DSS）、ビス(スルホスクシンイミジル)スベラート（BS3）、ジチオビス(スクシンイミジルプロピオナート)（DSP）、ジチオビス(スルホスクシンイミジルプロピオナート)（DTSSP）、エチレングリコールビス(スクシンイミジルスクシナート)（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ナート)（スルホ-EGS）、ジスクシンイミジルタルトラート（DST）、ジスルホスクシンイミジルタルトラート（スルホ-DST）、ビス[2-(スクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン（BSOCOES）、またはビス[2-(スルホスクシンイミドオキシカルボニルオキシ)エチル]スルホン（スルホ-BSOCOES）である。

これらの架橋剤は、市販されている。

4つの抗体可変ドメインを連結するためには、3つのリンカーが通常必要である。用いられるこれらのリンカーのすべては、同じリンカーであってもよく、または異なるリンカーであってもよい。

【0095】

F(ab')₂は、2本の軽鎖、ならびに、鎖間ジスルフィド結合が2本の重鎖の間で形成されるように定常領域（CH1ドメインおよびCH2ドメインの一部分）を含有する2本の重鎖を含む。本明細書において開示されるポリペプチド会合体を構成するF(ab')₂は、好ましくは、例えば、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を、ペプシンなどのタンパク質分解酵素で部分消化した後に、プロテインAカラムに吸着したFc断片を除去することによって取得することができる。そのようなタンパク質分解酵素は、適宜設定される酵素の反応条件（例えば、pH）の下で制限的にF(ab')₂を形成するように全長抗体を消化することができる限り、特に限定されない。その例には、ペプシンおよびフィシンが含まれ得る。

【0096】

本発明の抗原結合分子は、上述のアミノ酸改変に加えて、追加的な改変をさらに含有することができる。追加的な改変は、例えば、アミノ酸置換、欠失、および修飾、ならびにそれらの組み合わせから選択することができる。

例えば、本発明の抗原結合分子は、分子の意図される機能を実質的に変化させることなく、さらに任意に改変することができる。そのような変異は、例えば、アミノ酸残基の保存的置換によって行うことができる。あるいは、本発明の抗原結合分子の意図される機能を変化させる改変であっても、そのような改変によって変化した機能が本発明の目的の範囲内である限り、実施されてもよい。

【0097】

本発明によるアミノ酸配列の改変にはまた、翻訳後修飾も含まれる。具体的には、翻訳後修飾とは、糖鎖の付加または欠失を指すことができる。例えば、IgG1型の定常領域を有する本発明の抗原結合分子は、EUナンバリング297位に、糖鎖で修飾されたアミノ酸残基を有することができる。修飾における使用のための糖鎖構造は、限定されない。概して、真核細胞が発現する抗体は、定常領域に糖鎖修飾を含む。したがって、以下の細胞が発現する抗体は、通常、いくつかの糖鎖で修飾されている：

哺乳動物の抗体産生細胞；および

抗体をコードするDNAを含む発現ベクターで形質転換された真核細胞。

ここで、真核細胞には、酵母および動物細胞が含まれる。例えば、CHO細胞またはHEK 293H細胞は、抗体をコードするDNAを含む発現ベクターでの形質転換のための典型的な動物細胞である。他方、本発明の抗体には、その位置に糖鎖修飾がない抗体も含まれる。糖鎖で修飾されていない定常領域を有する抗体は、これらの抗体をコードする遺伝子の、大腸菌などの原核細胞における発現によって取得することができる。

【0098】

本発明による追加的な改変は、より具体的には、例えば、Fc領域における糖鎖へのシアル酸の付加であってもよい（mAbs, 2010 Sep-Oct;2(5):519-27）。

【0099】

本発明の抗原結合分子が、Fc領域を有する場合、例えば、FcRnに対する結合活性を改善するアミノ酸置換（J Immunol, 2006 Jan 1;176(1):346-56；J Biol Chem, 2006 Aug 18;281(33):23514-24；Int Immunol, 2006 Dec;18(12):1759-69；Nat Biotechnol, 2010 Feb;28(2):157-9；WO2006/019447；WO2006/053301；およびWO2009/086320）、または抗体の不均一性もしくは安定性を改善するためのアミノ酸置換（WO2009/041613）を加えてもよい。

【0100】

本発明において、「抗体」という用語は、最も広い意味で用いられ、所望の生物活性を示す限り、モノクローナル抗体（全長モノクローナル抗体を含む）、ポリクローナル抗体

、抗体バリエーション、抗体断片、多重特異性抗体（例えば、二重特異性抗体）、キメラ抗体、およびヒト化抗体などの任意の抗体をも含む。

【0101】

本発明の抗体は、その抗原の種類、その起源などによって限定されず、任意の抗体であってもよい。抗体の起源の例には、ヒト抗体、マウス抗体、ラット抗体、およびウサギ抗体が含まれ得るが、特にそれらに限定されることはない。

【0102】

抗体は、当業者によく知られている方法によって調製することができる。例えば、モノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法（Kohler and Milstein, Nature 256:495 (1975)）または組換え法（米国特許第4,816,567号）によって産生させてもよい。あるいは、モノクローナル抗体を、ファージディスプレイ抗体ライブラリーから単離してもよい（Clackson et al., Nature 352:624-628 (1991)；およびMarks et al., J.Mol.Biol. 222:581-597 (1991)）。また、モノクローナル抗体を、単一のB細胞クローンから単離してもよい（N. Biotechnol. 28(5): 253-457 (2011)）。

【0103】

ヒト化抗体はまた、再構成ヒト抗体とも呼ばれる。具体的には、例えば、非ヒト動物（例えば、マウス）抗体のCDRを移植したヒト抗体からなるヒト化抗体が、当技術分野において公知である。ヒト化抗体を取得するための一般的な遺伝子組換え手法もまた、公知である。具体的には、例えば、オーバーラップ伸長PCRが、マウス抗体のCDRをヒトのFRに移植するための方法として、当技術分野において公知である。

【0104】

連結された3つのCDRおよび4つのFRを各々が含む抗体可変ドメインをコードするDNA、およびヒト抗体定常ドメインをコードするDNAを、可変ドメインDNAが定常ドメインDNAとインフレームで融合するように発現ベクター中に挿入して、ヒト化抗体発現用ベクターを調製することができる。インサートを有するこれらのベクターを宿主に移入して、組換え細胞を樹立する。次いで、ヒト化抗体をコードするDNAの発現のために組換え細胞を培養して、ヒト化抗体を培養細胞の培養物中に産生させる（欧州特許公開番号EP 239400および国際公開番号WO1996/002576参照）。

【0105】

必要な場合は、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してもよい。例えば、マウスCDRのヒトFRへの移植において用いられるPCR法の応用によって、FRのアミノ酸配列を変異させることができる。

【0106】

所望のヒト抗体は、ヒト抗体遺伝子のすべてのレパートリーを有するトランスジェニック動物（国際公開番号WO1993/012227、WO1992/003918、WO1994/002602、WO1994/025585、WO1996/034096、およびWO1996/033735参照）を免疫動物として用いるDNA免疫によって、取得することができる。

【0107】

加えて、ヒト抗体ライブラリーを用いたパニングによって、ヒト抗体を取得する技術も公知である。例えば、ヒト抗体V領域を、ファージディスプレイ法によってファージの表面上に、一本鎖抗体（scFv）として発現させる。抗原結合scFvを発現するファージを選択することができる。選択されたファージの遺伝子を解析して、抗原結合ヒト抗体のV領域をコードするDNA配列を決定することができる。抗原結合scFvのDNA配列を決定した後、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、次いで、適切な発現ベクターに挿入して、発現ベクターを調製することができる。発現ベクターを、ヒト抗体をコードする遺伝子の発現のために上記に列挙される好ましい発現細胞に移入して、ヒト抗体を取得する。これらの方法は、当技術分野において既知である（国際公開番号WO1992/001047、WO1992/020791、WO1993/006213、WO1993/011236、WO1993/019172、WO1995/001438、およびWO1995/015388参照）。

【0108】

ファージディスプレイ技術に加えて、例えば、無細胞翻訳システムを用いた技術、細胞またはウイルスの表面上に抗原結合分子を提示する技術、およびエマルジョンを用いた技術が、ヒト抗体ライブラリーを用いたパニングによって、ヒト抗体を取得するための技術として公知である。例えば、終止コドンの除去などにより、リボソームを介してmRNAと翻訳されたタンパク質との複合体を形成させることを含むリボソームディスプレイ法、ピュロマイシンなどの化合物を用いて、翻訳されたタンパク質を遺伝子配列に共有結合させることを含むcDNAもしくはmRNAディスプレイ法、または核酸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との複合体を形成させることを含むCISディスプレイ法を、無細胞翻訳システムを用いた技術として用いることができる。ファージディスプレイ法、および大腸菌ディスプレイ法、グラム陽性細菌ディスプレイ法、酵母ディスプレイ法、哺乳動物細胞ディスプレイ法、ウイルスディスプレイ法などを、細胞またはウイルスの表面上に抗原結合分子を提示する技術として用いることができる。例えば、エマルジョンに封入された遺伝子および翻訳関連分子を用いたインビトロウイルスディスプレイ法を、エマルジョンを用いた技術として用いることができる。これらの方法は、当技術分野において既知である (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 ; およびMethods Mol Biol. 2012; 911: 183-98) 。

【0109】

本発明の第3の抗原に結合する可変領域は、任意の抗原を認識する可変領域であり得る。本発明の第3の抗原に結合する可変領域は、がん組織において特異的に発現している分子を認識する可変領域であり得る。

【0110】

本明細書において、「第3の抗原」は、特に限定されず、任意の抗原であってもよい。抗原の例には、17-IA、4Dc、6-ケト-PGF1a、8-イソ-PGF2a、8-オキソ-dG、A1アデノシン受容体、A33、ACE、ACE-2、アクチビン、アクチビンA、アクチビンAB、アクチビンB、アクチビンC、アクチビンRIA、アクチビンRIA ALK-2、アクチビンRIB ALK-4、アクチビンRIIA、アクチビンRIIB、ADAM、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAM8、ADAM9、ADAMTS、ADAMTS4、ADAMTS5、アドレシン、アディポネクチン、ADPリボシルシクラーゼ-1、aFGF、AGE、ALCAM、ALK、ALK-1、ALK-7、アレルゲン、 α 1-アンチケモトリプシン (antichemotrypsin)、 α 1-アンチトリプシン、 α -シヌクレイン、 α -V/ β -1 アンタゴニスト、アミニン (aminin)、アミリン、アミロイド β 、アミロイド免疫グロブリン重鎖可変領域、アミロイド免疫グロブリン軽鎖可変領域、アンドロゲン、ANG、アンジオテンシノーゲン、アンジオポエチンリガンド-2、抗Id、アンチトロンビンIII、炭疽、APAF-1、APE、APJ、アポA1、アポ血清アミロイドA、Apo-SAA、APP、APRIL、AR、ARC、ART、アルテミン (Artemin)、ASPARTIC、心房性ナトリウム利尿因子、心房性ナトリウム利尿ペプチド、心房性ナトリウム利尿ペプチドA、心房性ナトリウム利尿ペプチドB、心房性ナトリウム利尿ペプチドC、av/b3インテグリン、Axl、B7-1、B7-2、B7-H、BACE、BACE-1、炭疽菌 (Bacillus anthracis) 防御抗原、Bad、BAFF、BAFF-R、Bag-1、BAK、Bax、BCA-1、BCAM、Bcl、BCMA、BDNF、b-ECGF、 β -2-ミクログロブリン、 β ラクタマーゼ、bFGF、BID、Bik、BIM、BLC、BL-CAM、BLK、Bリンパ球刺激因子 (BlyS)、BMP、BMP-2 (BMP-2a)、BMP-3 (オステオゲニン)、BMP-4 (BMP-2b)、BMP-5、BMP-6 (Vgr-1)、BMP-7 (OP-1)、BMP-8 (BMP-8a)、BMPR、BMPR-IA (ALK-3)、BMPR-IB (ALK-6)、BMPR-II (BRK-3)、BMPs、BOK、ボンベシン、骨由来神経栄養因子、ウシ成長ホルモン、BPDE、BPDE-DNA、BRK-2、BTC、Bリンパ球細胞接着分子、C10、C1インヒビター、C1q、C3、C3a、C4、C5、C5a (補体5a)、CA125、CAD-8、カドヘリン-3、カルシトニン、cAMP、炭酸脱水酵素-IX、がん胎児性抗原 (CEA)、がん関連抗原、カル

ジオトロフィン-1、カテプシンA、カテプシンB、カテプシンC/DPPI、カテプシンD、カテプシンE、カテプシンH、カテプシンL、カテプシンO、カテプシンS、カテプシンV、カテプシンX/Z/P、CBL、CCI、CCK2、CCL、CCL1/I-309、CCL11/エオタキシン、CCL12/MCP-5、CCL13/MCP-4、CCL14/HCC-1、CCL15/HCC-2、CCL16/HCC-4、CCL17/TARC、CCL18/PARC、CCL19/ELC、CCL2/MCP-1、CCL20/MIP-3- α 、CCL21/SLC、CCL22/MDC、CCL23/MPIF-1、CCL24/エオタキシン-2、CCL25/TECK、CCL26/エオタキシン-3、CCL27/CTACK、CCL28/MEC、CCL3/M1P-1- α 、CCL3L1/LD-78- β 、CCL4/MIP-1- β 、CCL5/RANTES、CCL6/C10、CCL7/MCP-3、CCL8/MCP-2、CCL9/10/MTP-1- γ 、CCR、CCR1、CCR10、CCR2、CCR3、CCR4、CCR5、CCR6、CCR7、CCR8、CCR9、CD1、CD10、CD105、CD11a、CD11b、CD11c、CD123、CD13、CD137、CD138、CD14、CD140a、CD146、CD147、CD148、CD15、CD152、CD16、CD164、CD18、CD19、CD2、CD20、CD21、CD22、CD23、CD25、CD26、CD27L、CD28、CD29、CD3、CD30、CD30L、CD32、CD33 (p67タンパク質)、CD34、CD37、CD38、CD3E、CD4、CD40、CD40L、CD44、CD45、CD46、CD49a、CD49b、CD5、CD51、CD52、CD54、CD55、CD56、CD6、CD61、CD64、CD66e、CD7、CD70、CD74、CD8、CD80 (B7-1)、CD89、CD95、CD105、CD158a、CEA、CEACAM5、CFTR、cGMP、CGRP受容体、CINC、CKb8-1、クロードイン18、CLC、クロストリジウム・ボツリヌム (*Clostridium botulinum*) 毒素、クロストリジウム・ディフィシレ (*Clostridium difficile*) 毒素、クロストリジウム・パーFRINGENS (*Clostridium perfringens*) 毒素、c-Met、CMV、CMV UL、CNTF、CNTN-1、補体因子3 (C3)、補体因子D、コルチコステロイド結合グロブリン、コロニー刺激因子-1受容体、COX、C-Ret、CRG-2、CRTH2、CT-1、CTACK、CTGF、CTLA-4、CX3CL1/フラクタルカイン、CX3CR1、CXCL、CXCL1/Gro- α 、CXCL10、CXCL11/I-TAC、CXCL12/SDF-1- α/β 、CXCL13/BCA-1、CXCL14/BRAK、CXCL15/ラングカイン (Lungkine)、CXCL16、CXCL16、CXCL2/Gro- β 、CXCL3/Gro- γ 、CXCL3、CXCL4/PF4、CXCL5/ENA-78、CXCL6/GCP-2、CXCL7/NAP-2、CXCL8/IL-8、CXCL9/Mig、CXCL10/IP-10、CXCR、CXCR1、CXCR2、CXCR3、CXCR4、CXCR5、CXCR6、シスタチンC、サイトケラチン腫瘍関連抗原、DAN、DCC、DcR3、DC-SIGN、崩壊促進因子、Delta様タンパク質リガンド4、des(1-3)-IGF-1 (脳IGF-1)、Dhh、DHICAオキシダーゼ、Dickkopf-1、ジゴキシン、ジペプチジルペプチダーゼIV、DKI、DNAM-1、Dnアーゼ、Dpp、DPPIV/CD26、Dtk、ECAD、EDA、EDA-A1、EDA-A2、EDAR、EGF、EGFR (ErbB-1)、EGF様ドメイン含有タンパク質7、エラスターゼ、エラスチン、EMA、EMMPRIN、ENA、ENA-78、エンドシアリン、エンドセリン受容体、エンドトキシン、エンケファリナーゼ、eNOS、Eot、エオタキシン、エオタキシン-2、エオタキシニ (eotaxini)、EpCAM、エフリンB2/EphB4、Epha2チロシンキナーゼ受容体、上皮成長因子受容体 (EGFR)、ErbB2受容体、ErbB3チロシンキナーゼ受容体、ERCC、EREG、エリスロポエチン (EPO)、エリスロポエチン受容体、E-セレクチン、ET-1、Exodus-2、RSVのFタンパク質、F10、F11、F12、F13、F5、F9、第Ia因子、第IX因子、第Xa因子、第VII因子、第VIII因子、第VIIIc因子、Fas、Fc α R、Fc ϵ RI、Fc γ IIb、Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa、Fc γ RIIIb、FcRn、FEN-1、フェリチン、FGF、FGF-19、FGF-2、FGF-2受容体、FGF-3、FGF-8、FGF-酸性、FGF-塩基性、フィブリン、線維芽細胞活性化タンパク質 (FAP)、線維芽細胞増殖因子、線維芽細胞増殖因子-10、フィブロネクチン、FL、FLIP、Flt-3、FLT3リガンド、葉酸受容体、卵胞刺激ホルモン (FSH)、フラクタルカイン (CX3C)、フリーの重鎖、フリーの軽鎖、FZD1、FZD10、FZD2、FZD3、FZD4、FZD5、FZD6、FZD7、FZD8、FZD9、G250、Gas 6、GCP-2、GCSF、G-CSF、G-CSF受容体、GD2、GD3、GDF、GDF-1、GDF-15 (MIC-1)、GDF-3 (VgR-2)、GDF-5 (BMP-14/CDMP-1)、GDF-6 (BMP-13/CDMP-2)、GDF-7 (BMP-12/CDMP-3)、GDF-8 (ミオスタチン)、GDF-9、GDNF、ゲルソリン、GFAP、GF-CSF、GFR- α 1、GFR- α 2、GFR- α 3、GF- β 1、gHエンベロープ糖タンパク質、GITR、グルカゴン、グルカゴン受容体、グルカゴン様ペプチド1受容体、Glut 4、グルタミン酸カル

10

20

30

40

50

ボキシペプチダーゼII、糖タンパク質ホルモン受容体、糖タンパク質IIb/IIIa (GP IIb/IIIa)、グリピカン-3、GM-CSF、GM-CSF受容体、gp130、gp140、gp72、顆粒球-CSF (G-CSF)、GRO/MGSA、成長ホルモン放出因子、GRO- β 、GRO- γ 、H. ピロリ (H. pylori)、ハプテン (NP-capまたはNIP-cap)、HB-EGF、HCC、HCC 1、HCMV gBエンベロープ糖タンパク質、HCMV UL、造血成長因子 (HGF)、Hep B gp120、ヘパラーゼ、ヘパリン補因子II、肝増殖因子 (hepatic growth factor)、炭疽菌防御抗原、C型肝炎ウイルスE2糖タンパク質、E型肝炎、ヘプシジン、Her1、Her2/neu (ErbB-2)、Her3 (ErbB-3)、Her4 (ErbB-4)、単純ヘルペスウイルス (HSV) gB糖タンパク質、HGF、HGFA、高分子量メラノーマ関連抗原 (HMW-MAA)、HIVエンベロープタンパク質、例えばGP120、HIV MIB gp 120 V3ループ、HLA、HLA-DR、HM1.24、HMFG PEM、HMGB-1、HRG、Hrk、HSP47、Hsp90、HSV gD糖タンパク質、ヒト心筋ミオシン、ヒトサイトメガロウイルス (HCMV)、ヒト成長ホルモン (hGH)、ヒト血清アルブミン、ヒト組織型プラスミノゲンアクチベーター (t-PA)、ハンチンチン、HVEM、IAP、ICAM、ICAM-1、ICAM-3、ICE、ICOS、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 、IgA、IgA受容体、IgE、IGF、IGF結合タンパク質、IGF-1、IGF-1 R、IGF-2、IGFBP、IGFR、IL、IL-1、IL-10、IL-10受容体、IL-11、IL-11受容体、IL-12、IL-12受容体、IL-13、IL-13受容体、IL-15、IL-15受容体、IL-16、IL-16受容体、IL-17、IL-17受容体、IL-18 (IGIF)、IL-18受容体、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-1受容体、IL-2、IL-2受容体、IL-20、IL-20受容体、IL-21、IL-21受容体、IL-23、IL-23受容体、IL-2受容体、IL-3、IL-3受容体、IL-31、IL-31受容体、IL-3受容体、IL-4、IL-4受容体、IL-5、IL-5受容体、IL-6、IL-6受容体、IL-7、IL-7受容体、IL-8、IL-8受容体、IL-9、IL-9受容体、免疫グロブリン免疫複合体、免疫グロブリン、INF- α 、INF- α 受容体、INF- β 、INF- β 受容体、INF- γ 、INF- γ 受容体、I型IFN、I型IFN受容体、インフルエンザ、インヒビン、インヒビン α 、インヒビン β 、iNOS、インスリン、インスリンA鎖、インスリンB鎖、インスリン様成長因子1、インスリン様成長因子2、インスリン様成長因子結合タンパク質、インテグリン、インテグリン α 2、インテグリン α 3、インテグリン α 4、インテグリン α 4/ β 1、インテグリン α -V/ β -3、インテグリン α -V/ β -6、インテグリン α 4/ β 7、インテグリン α 5/ β 1、インテグリン α 5/ β 3、インテグリン α 5/ β 6、インテグリン α σ (α V)、インテグリン α θ 、インテグリン β 1、インテグリン β 2、インテグリン β 3 (GPIIb-IIIa)、IP-10、I-TAC、JE、カリクレイン (kallikrein)、カリクレイン (Kallikrein) 11、カリクレイン12、カリクレイン14、カリクレイン15、カリクレイン2、カリクレイン5、カリクレイン6、カリクレインL1、カリクレインL2、カリクレインL3、カリクレインL4、カリスタチン、KC、KDR、ケラチノサイト増殖因子 (KGF)、ケラチノサイト増殖因子2 (KGF-2)、KGF、キラー免疫グロブリン様受容体、kitリガンド (KL)、Kitチロシンキナーゼ、ラミニン5、LAMP、LAPP (アミリン、膵島アミロイドポリペプチド)、LAP (TGF-1)、潜伏関連ペプチド、潜伏型TGF-1、潜伏型TGF-1 bp1、LBP、LDGF、LDL、LDL受容体、LECT2、Lefty、レプチン、黄体形成 (leutinizing) ホルモン (LH)、ルイス-Y抗原、ルイス-Y 関連抗原、LFA-1、LFA-3、LFA-3受容体、Lfo、LIF、LIGHT、リポタンパク質、LIX、LKN、Lptn、L-セレクチン、LT-a、LT-b、LTB4、LTBP-1、肺表面活性物質、黄体形成 (Luteinizing) ホルモン、リンホタクチン、リンホトキシン β 受容体、リゾスフィンゴ脂質受容体、Mac-1、マクロファージ-CSF (M-CSF)、MAdCAM、MAG、MAP2、MARC、マスピン、MCAM、MCK-2、MCP、MCP-1、MCP-2、MCP-3、MCP-4、MCP-I (MCAF)、M-CSF、MDC、MDC (67 a.a.)、MDC (69 a.a.)、メグシン (megsin)、Mer、METチロシンキナーゼ受容体ファミリー、メタロプロテアーゼ (METALLOPROTEASES)、膜糖タンパク質OX2、メソテリン、MGDF受容体、MGM T、MHC (HLA-DR)、微生物タンパク質、MIF、MIG、MIP、MIP-1 α 、MIP-1 β 、MIP-3 α 、MIP-3 β 、MIP-4、MK、MMAC1、MMP、MMP-1、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-2、MMP-24、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、単球誘引タンパク質、単球コロニー抑制因子、マウスゴナドトロピン関連ペプチド、MPIF、Mpo、MSK、MSP、MUC-16、MUC18、ムチン (Mud)、ミュラ

10

20

30

40

50

一管抑制物質、Mug、MuSK、ミエリン関連糖タンパク質、骨髄前駆細胞阻害因子-1 (M PIF-I)、NAIP、ナノボディ、NAP、NAP-2、NCA 90、NCAD、N-カドヘリン、NCAM、ネプリライシン、神経細胞接着分子、ニューロセルピン、神経成長因子 (NGF)、ニューロトロフィン-3、ニューロトロフィン-4、ニューロトロフィン-6、ニューロピリン1、ニールツリン、NGF- β 、NGFR、NKG20、N-メチオニルヒト成長ホルモン、nNOS、NO、Nogo-A、Nogo受容体、C型肝炎ウイルス由来の非構造タンパク質3型 (NS3)、NOS、Npn、NRG-3、NT、NT-3、NT-4、NTN、OB、OGG1、オンコスタチンM、OP-2、OPG、OPN、OSM、OSM受容体、骨誘導因子、オステオポンチン、OX40L、OX40R、酸化LDL、p150、p95、PADPr、副甲状腺ホルモン、PARC、PARP、PBR、PBSF、PCAD、P-カドヘリン、PCNA、PCSK9、PDGF、PDGF受容体、PDGF-AA、PDGF-AB、PDGF-BB、PDGF-D、PDK-1、PECAM、PEDF、PEM、PF-4、PGE、PGF、PGI2、PGJ2、PIGF、PIN、PLA2、胎盤成長因子、胎盤アルカリホスファターゼ (PLAP)、胎盤性ラクトゲン、プラスミノゲンアクチベーターインヒビター-1、血小板増殖因子、plgR、PLP、様々なサイズのポリグリコール鎖 (例えば、PEG-20、PEG-30、PEG40)、PP14、プレカリクレイン、プリオンタンパク質、プロカルシトニン、プログラム細胞死タンパク質1、プロインスリン、プロラクチン、プロタンパク質転換酵素PC9、プロリラキシン、前立腺特異的膜抗原 (PSMA)、プロテインA、プロテインC、プロテインD、プロテインS、プロテインZ、PS、PSA、PSCA、PsmAr、PTEN、PTHrp、Ptk、PTN、P-セレクチン糖タンパク質リガンド-1、R51、RAGE、RANK、RANKL、RANTES、リラキシン、リラキシンA鎖、リラキシンB鎖、レニン、呼吸器合胞体ウイルス (RSV) F、Ret、レチキュロン (reticulon) 4、リウマチ因子、RLI P76、RPA2、RPK-1、RSK、RSV Fgp、S100、RON-8、SCF/KL、SCGF、スクレロスチン、SDF-1、SDF1 α 、SDF1 β 、SERINE、血清アミロイドP、血清アルブミン、sFRP-3、Shh、志賀様毒素II、SIGIRR、SK-1、SLAM、SLPI、SMAC、SMDF、SMOH、SOD、SPARC、スフィンゴシン1-リン酸受容体1、ブドウ球菌リポテイコ酸、Stat、STEAP、STEAP-II、幹細胞因子 (SCF)、ストレプトキナーゼ、スーパーオキシドジスムターゼ、シンデカン-1、TACE、TACI、TAG-72 (腫瘍関連糖タンパク質-72)、TARC、TB、TCA-3、T-細胞受容体 α/β 、TdT、TECK、TEM1、TEM5、TEM7、TEM8、テネイシン、TERT、精巢PLAP様アルカリホスファターゼ、TfR、TGF、TGF- α 、TGF- β 、Pan特異的TGF- β 、TGF- β RII、TGF- β RIIb、TGF- β RIII、TGF- β RI (ALK-5)、TGF- β 1、TGF- β 2、TGF- β 3、TGF- β 4、TGF- β 5、TGF-I、トロンビン、トロンボポエチン (TPO)、胸腺間質性リンホプロテイン (Thymic stromal lymphoprotein) 受容体、胸腺Ck-1、甲状腺刺激ホルモン (TSH)、チロキシン、チロキシン結合グロブリン、Tie、TIMP、TIQ、組織因子、組織因子プロテアーゼインヒビター、組織因子タンパク質、TMEFF2、Tmpe、TM PRSS2、TNF受容体I、TNF受容体II、TNF- α 、TNF- β 、TNF- β 2、TNFc、TNF-RI、TNF-RII、TNFRSF10A (TRAIL R1 Apo-2/DR4)、TNFRSF10B (TRAIL R2 DR5/KILLER/TRICK-2A/TRICK-B)、TNFRSF10C (TRAIL R3 DcR1/LIT/TRID)、TNFRSF10D (TRAIL R4 DcR2/TRUND)、TNFRSF11A (RANK ODF R/TRANCER)、TNFRSF11B (OPG OCIF/TR1)、TNFRSF12 (TWEAK R FN14)、TNFRSF12A、TNFRSF13B (TACI)、TNFRSF13C (BAFF R)、TNFRSF14 (HVEM ATAR/HveA/LIGHT R/TR2)、TNFRSF16 (NGFR p75NTR)、TNFRSF17 (BCMA)、TNFRSF18 (GITRAITR)、TNFRSF19 (TROY TAJ/TRADE)、TNFRSF19L (RELT)、TNFRSF1A (TNFR1 CD120a/p55-60)、TNFRSF1B (TNF RII CD120b/p75-80)、TNFRSF21 (DR6)、TNFRSF22 (DcTRAIL R2 TNFRH2)、TNFRSF25 (DR3 Apo-3/LARD/TR-3/T RAMP/WSL-1)、TNFRSF26 (TNFRH3)、TNFRSF3 (LTbR TNF RIII/TNFC R)、TNFRSF4 (OX40 ACT35/TXGP1 R)、TNFRSF5 (CD40 p50)、TNFRSF6 (Fas Apo-1/APT1/CD95)、TNFRSF6B (DcR3 M68/TR6)、TNFRSF7 (CD27)、TNFRSF8 (CD30)、TNFRSF9 (4-1 BB CD137/ILA)、TNFRST23 (DcTRAIL R1 TNFRH1)、TNFSF10 (TRAIL Apo-2リガンド/TL2)、TNFSF11 (TRANCER/RANKリガンドODF/OPGリガンド)、TNFSF12 (TWEAK Apo-3リガンド/DR3リガンド)、TNFSF

10

20

30

40

50

13 (APRIL TALL2)、TNFSF13B (BAFF BLYS/TALL1/THANK/TNFSF20)、TNFSF14 (LIGHT HVEMリガンド/LTg)、TNFSF15 (TL1A/VEGI)、TNFSF18 (GITRリガンドAITRリガンド/TL6)、TNFSF1A (TNF- α コネクチン (Conectin) /DIF/TNFSF2)、TNFSF1B (TNF-b LTa/TNFSF1)、TNFSF3 (LTb TNFC/p33)、TNFSF4 (OX40リガンドgp34/TXGP1)、TNFSF5 (CD40リガンドCD154/gp39/HIGM1/IMD3/TRAP)、TNFSF6 (FasリガンドApo-1リガンド/APT1リガンド)、TNFSF7 (CD27リガンドCD70)、TNFSF8 (CD30リガンドCD153)、TNFSF9 (4-1 BBリガンドCD137リガンド)、TNF- α 、TNF- β 、TNIL-I、毒性代謝産物、TP-1、t-PA、Tpo、TRAIL、TRAIL R、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRANCE、トランスフェリン受容体、トランスフォーミング成長因子 (TGF)、例えばTGF- α およびTGF- β 、膜貫通糖タンパク質NMB、トランスサイレチン、TRF、Trk、TROP-2、栄養膜糖タンパク質、TSG、TSLP、腫瘍壊死因子 (TNF)、腫瘍関連抗原CA 125、ルイスY関連糖質を発現する腫瘍関連抗原、TWEAK、TXB2、Ung、uPAR、uPAR-1、ウロキナーゼ、VAP-1、血管内皮増殖因子 (VEGF)、バスピ (vaspin)、VCAM、VCAM-1、VECAD、VE-カドヘリン、VE-カドヘリン-2、VEGFR-1 (flt-1)、VEGFR-2、VEGF受容体 (VEGFR)、VEGFR-3 (flt-4)、VEGI、VIM、ウイルス抗原、VitB12受容体、ビトロネクチン受容体、VLA、VLA-1、VLA-4、VNRインテグリン、フォン・ウィルブランド因子 (vWF)、WIF-1、WNT1、WNT10A、WNT10B、WNT11、WNT16、WNT2、WNT2B/13、WNT3、WNT3A、WNT4、WNT5A、WNT5B、WNT6、WNT7A、WNT7B、WNT8A、WNT8B、WNT9A、WNT9B、XCL1、XCL2/SCM-I- β 、XCL1/リンホタクチン、XCR1、XEDAR、XIAP、ならびにXP D含まれる。

【0111】

T細胞上で特異的に発現している分子の具体例には、CD3およびT細胞受容体が含まれる。特に、CD3が好ましい。例えば、ヒトCD3の場合には、本発明の抗原結合分子が結合するCD3中の部位は、ヒトCD3を構成する γ 鎖、 δ 鎖、または ϵ 鎖の配列中に存在する任意のエピトープであってもよい。特に、ヒトCD3複合体における ϵ 鎖の細胞外領域中に存在するエピトープが好ましい。CD3を構成する γ 鎖、 δ 鎖、および ϵ 鎖の構造のポリヌクレオチド配列は、配列番号：224 (NM_000073.2)、226 (NM_000732.4)、および228 (NM_000733.3) に示され、そのポリペプチド配列は、配列番号：225 (NP_000064.1)、227 (NP_000723.1)、および229 (NP_000724.1) に示される (RefSeq登録番号を括弧内に示す)。

【0112】

本発明の抗原結合分子中に含まれる抗体の2つの可変領域のうちの1つは、上述の「CD3」および「CD137」とは異なる「第3の抗原」に結合する。いくつかの態様において、第3の抗原は、ヒト、マウス、ラット、サル、ウサギ、またはイヌに由来する。いくつかの態様において、第3の抗原は、ヒト、マウス、ラット、サル、ウサギ、またはイヌに由来する細胞または臓器上に特異的に発現している分子である。第3の抗原は、好ましくは、細胞または臓器上に全身的には発現していない分子である。第3の抗原は、好ましくは、例えば、腫瘍細胞特異的抗原であり、また、細胞の悪性化に伴って発現する抗原、および細胞の悪性形質転換中に細胞表面またはタンパク質分子上に現れる異常な糖鎖も含む。その具体例には、ALK受容体 (プレイオトロフィン受容体)、プレイオトロフィン、KS 1/4膀胱がん抗原、卵巣がん抗原 (CA125)、前立腺酸リン酸 (prostatic acid phosphate)、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、がん胎児性抗原 (CEA)、多型上皮ムチン抗原、ヒト乳脂肪球抗原、結腸直腸腫瘍関連抗原 (例えば、CEA、TAG-72、CO17-1A、GICA 19-9、CTA-1、およびLEA)、パーキットリンパ腫抗原38.13、CD19、ヒトBリンパ腫抗原CD20、CD33、メラノーマ特異的抗原 (例えば、ガングリオシドGD2、ガングリオシドGD3、ガングリオシドGM2、およびガングリオシドGM3)、腫瘍特異的移植抗原 (TSTA)、T抗原、ウイルスにより誘導される腫瘍抗原 (例えば、DNA腫瘍ウイルスおよびRNA腫瘍ウイルスのエンベロープ抗原)、結腸CEA、腫瘍胎児性抗原 α -フェ

10

20

30

40

50

トプロテイン（例えば、腫瘍胎児性栄養膜糖タンパク質5T4および腫瘍胎児性膀胱腫瘍抗原）、分化抗原（例えば、ヒト肺がん抗原L6およびL20）、線維肉腫抗原、ヒトT細胞白血病関連抗原Gp37、新生糖タンパク質、スフィンゴ脂質、乳がん抗原（例えば、EGFR（上皮成長因子受容体））、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APO-1、胎児赤血球において見出されるI抗原などの分化抗原、成人赤血球において見出される初期内胚葉I抗原、移植前の胚または胃がんにおいて見出されるI（Ma）、乳腺上皮において見出されるM18、M39、骨髄細胞において見出されるSSEA-1、VEP8、VEP9、Myl、VIM-D5、結腸直腸がんにおいて見出されるD156-22、TRA-1-85（血液型H）、精巣および卵巣がんにおいて見出されるSCP-1、結腸がんにおいて見出されるC14、肺がんにおいて見出されるF3、胃がんにおいて見出されるAH6、Yハプテン、胚性がん細胞において見出されるLey、TL5（血液型A）、A431細胞において見出されるEGF受容体、膵臓がんにおいて見出されるE1シリーズ（血液型B）、胚性がん細胞において見出されるFC10.2、胃がん抗原、腺がんにおいて見出されるCO-514（血液型Lea）、腺がんにおいて見出されるNS-10、CO-43（血液型Leb）、A431細胞のEGF受容体において見出されるG49、結腸がんにおいて見出されるMH2（血液型ALeb/Ley）、結腸がんにおいて見出される19.9、胃がんムチン、骨髄細胞において見出されるT5A7、メラノーマにおいて見出されるR24、胚性がん細胞において見出される4.2、GD3、D1.1、OFA-1、GM2、OFA-2、GD2、およびM1:22:25:8、4細胞期～8細胞期の胚において見出されるSSEA-3およびSSEA-4、皮膚T細胞リンパ腫関連抗原、MART-1抗原、シアリルTn（STn）抗原、結腸がん抗原NY-CO-45、肺がん抗原NY-LU-12バリエーションA、腺がん抗原ART1、腫瘍随伴関連脳-精巣がん抗原（腫瘍神経抗原MA2および腫瘍随伴性神経抗原）、神経腫瘍学的腹部抗原2（NOVA2）、血液細胞がん抗原遺伝子520、腫瘍関連抗原CO-029、腫瘍関連抗原MAGE-C1（がん／精巣抗原CT7）、MAGE-B1（MAGE-XP抗原）、MAGE-B2（DAM6）、MAGE-2、MAGE-4a、MAGE-4b、MAGE-X2、がん-精巣抗原（NY-EOS-1）、YKL-40、ならびにこれらのポリペプチドの任意の断片、ならびにその修飾された構造（前述の修飾されたリン酸基、糖鎖など）、EpCAM、EREG、CA19-9、CA15-3、シアリルSSEA-1（SLX）、HER2、PSMA、CEA、ならびにCLEC12Aが含まれる。

【0113】

本明細書において、用語「CD137」は、4-1BBとも呼ばれ、腫瘍壊死因子（TNF）受容体ファミリーのメンバーである。TNFスーパーファミリーまたはTNF受容体スーパーファミリーに属する因子の例としては、CD137、CD137L、CD40、CD40L、OX40、OX40L、CD27、CD70、HVEM、LIGHT、RANK、RANKL、CD30、CD153、GITR、およびGITRLが挙げられる。

【0114】

1つの局面において、本発明の抗原結合分子は、以下の（1）～（4）からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する：

- （1）可変領域が、配列番号：159のアミノ酸配列を含むCD3ε（イプシロン）の細胞外ドメインに結合する、
- （2）抗原結合分子が、CD137に対するアゴニスト活性を有する、
- （3）抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞のCD3活性化を誘導するが、CD137を発現する細胞に対するT細胞の活性化は誘導しない、および
- （4）抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞の非存在下では、PBMCからのサイトカインの放出を誘導しない。

【0115】

1つの局面において、本発明の抗原結合分子は、以下の（1）～（4）からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する：

- （1）可変領域が、配列番号：159のアミノ酸配列を含むCD3ε（イプシロン）の細胞外ドメインに結合する、
- （2）抗原結合分子が、CD137に対するアゴニスト活性を有する、

(3) 抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞の細胞傷害活性を誘導するが、CD137を発現する細胞に対するT細胞の活性化は誘導しない、および

(4) 抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞の非存在下では、PBMCからのサイトカインの放出を誘導しない。

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、以下の(1)～(2)からなる群より選択される少なくとも1つの特徴を有する：

(1) 抗原結合分子が、CD137に対する結合についてCD137リガンドと競合しない、および

(2) 抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞の細胞傷害活性を誘導するが、CD137を発現する細胞に対するT細胞の細胞傷害活性は誘導しない。

【0116】

1つの局面において、本発明の「CD137アゴニスト抗体」または「CD137に対するアゴニスト活性を有する抗原結合分子」とは、CD137を発現する細胞、組織、または生体に添加された時に、CD137を発現する細胞を少なくとも約5%、具体的には少なくとも約10%、またはより具体的には少なくとも約15%活性化する抗体または抗原結合分子を指し、ここで0%の活性化とは、CD137を発現する非活性化細胞のバックグラウンドレベル（例えば、IL6分泌など）である。様々な具体例において、本発明の医薬組成物としての使用のためのCD137アゴニスト抗体は、細胞の活性を少なくとも約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%、または1000%活性化することができる。

1つの局面において、本発明の「CD137アゴニスト抗体」または「CD137に対するアゴニスト活性を有する抗原結合分子」とはまた、CD137を発現する細胞、組織、または生体に添加された時に、CD137を発現する細胞を少なくとも約5%、具体的には少なくとも約10%、またはより具体的には少なくとも約15%活性化する抗体または抗原結合分子を指し、ここで100%の活性化とは、生理学的条件下で等モル量の結合パートナーによって達成される活性化のレベルである。様々な具体例において、本発明の医薬組成物としての使用のためのCD137アゴニスト抗体は、細胞の活性を少なくとも約5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、350%、400%、450%、500%、750%、または1000%活性化することができる。いくつかの態様において、本明細書において用いられる「結合パートナー」とは、CD137に結合し、かつCD137を発現する細胞の活性化を誘導することが知られている分子である。さらなる態様において、結合パートナーの例には、WO2005/035584A1に記載されているウレルマブ（Urelumab）（CAS登録番号934823-49-1）およびそのバリエーション、WO2012/032433A1に記載されているウトミルマブ（Utomilumab）（CAS登録番号1417318-27-4）およびそのバリエーション、ならびに様々な公知のCD137アゴニスト抗体が含まれる。ある特定の態様において、結合パートナーの例には、CD137リガンドが含まれる。さらなる態様において、抗CD137アゴニスト抗体による、CD137を発現する細胞の活性化は、IL6分泌を特徴決定するELISAを用いて判定されてもよい（例えば、本明細書における参考実施例5-2参照）。結合パートナーとして用いられる抗CD137抗体および測定のための抗体濃度は、参考実施例5-2を参照とすることができ、ここで100%の活性化とは、抗体によって達成される活性化のレベルである。さらなる態様において、配列番号：142の重鎖アミノ酸配列および配列番号：144の軽鎖アミノ酸配列を含む抗体を、結合パートナーとして測定のために30 µg/mLで用いることができる（例えば、本明細書における参考実施例5-2参照）。いくつかの態様において、抗CD137アゴニスト抗体によるCD137を発現する細胞の活性化は、例えば、CD137シグナル伝達に応答してレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ）を発現する組換えT細胞を用いること、および、T細胞の活性化の指標としてレポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性を検出することによって、判定されてもよい。CD137シグナル伝達に

応答してレポーター遺伝子を発現する組換えT細胞を抗原結合分子と共培養した時に、レポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性が、陰性対照のものより10

10

20

30

40

50

%、20%、30%、40%、50%、90%、100%、またはそれよりも大きく上回っているならば、抗原結合分子は、CD137を発現する細胞に対するT細胞の活性化を誘導すると判定される（例えば、本明細書における実施例2.2参照）。

【0117】

非限定的な態様として、本発明は、Fc領域を含む「CD137アゴニスト抗体」を提供し、該Fc領域は、抑制性Fcγ受容体に対する結合活性が増強している。

【0118】

非限定的な態様として、CD137アゴニスト活性は、その表面上にCD137を発現することが公知である、B細胞を用いて確認することができる。非限定的な態様として、HDL M-2 B細胞株を、B細胞として用いることができる。CD137の活性化の結果として、IL-6の発現が誘導されるため、CD137アゴニスト活性は、産生されるヒトインターロイキン-6（IL-6）の量によって評価することができる。この評価において、IL-6の量を用いることにより0%バックグラウンドレベルとしての非活性化B細胞からのIL-6発現の増加量を評価することによって、評価される分子が、何%のCD137アゴニスト活性を有するかを判定することが可能である。

【0119】

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞のCD3活性化を誘導するが、CD137を発現する細胞に対するT細胞のCD3活性化を誘導しない。抗原結合分子が、第3の抗原の分子を発現する細胞に対するT細胞のCD3活性化を誘導するかどうかは、例えば、抗原結合分子の存在下で、第3の抗原を発現する細胞とT細胞を共培養し、T細胞のCD3活性化をアッセイすることによって、判定することができる。T細胞活性化は、例えば、CD3シグナル伝達に応答してレポーター遺伝子（例えば、ルシフェラーゼ）を発現する組換えT細胞を用いること、および、T細胞の活性化の指標として、レポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性を検出することによって、アッセイすることができる。CD3シグナル伝達に応答してレポーター遺伝子を発現する組換えT細胞を、抗原結合分子の存在下で第3の抗原を発現する細胞と共培養した時に、抗原結合分子の用量に依存した様式でのレポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性の検出は、抗原結合分子が、第3の抗原を発現する細胞に対するT細胞の活性化を誘導することを示す。同様に、抗原結合分子が、CD137を発現する細胞に対するT細胞のCD3活性化を誘導しないかどうかは、例えば、抗原結合分子の存在下で、CD137を発現する細胞とT細胞を共培養し、上記のようにT細胞のCD3活性化をアッセイすることによって、判定することができる。CD3シグナル伝達に応答してレポーター遺伝子を発現する組換えT細胞を、抗原結合分子の存在下でCD137を発現する細胞と共培養した時に、レポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性がないか、または検出限界よりも下であるか、または陰性対照のものよりも下であるならば、抗原結合分子は、CD137を発現する細胞に対するT細胞の活性化を誘導しないと判定される。1つの局面において、CD3シグナル伝達に応答してレポーター遺伝子を発現する組換えT細胞を、抗原結合分子の存在下でCD137を発現する細胞と共培養した時に、レポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性が、最大でも約50%、30%、20%、10%、5%、または1%であるならば、抗原結合分子は、CD137を発現する細胞に対するT細胞の活性化を誘導しないと判定され、ここで100%の活性化とは、CD3とCD137に同時に結合する抗原結合分子によって達成される活性化のレベルである。1つの局面において、CD3シグナル伝達に応答してレポーター遺伝子を発現する組換えT細胞を、抗原結合分子の存在下でCD137を発現する細胞と共培養した時に、レポーター遺伝子の発現またはレポーター遺伝子産物の活性が、最大でも約50%、30%、20%、10%、5%、または1%であるならば、抗原結合分子は、CD137を発現する細胞に対するT細胞の活性化を誘導しないと判定され、ここで100%の活性化とは、第3の抗原の分子を発現する細胞に対する同じ抗原結合分子によって達成される活性化のレベルである。

【0120】

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、第3の抗原の分子を発現する細胞

の非存在下では、PBMCからのサイトカイン放出を誘導しない。抗原結合分子が、第3の抗原を発現する細胞の非存在下でサイトカインの放出を誘導しないかどうかは、例えば、第3の抗原を発現する細胞の非存在下でPBMCと抗原結合分子とをインキュベートすること、ならびに、当技術分野において公知の方法を用いて、PBMCから培養上清中に放出されたIL-2、IFN γ 、およびTNF α などのサイトカインを測定することによって判定することができる。第3の抗原を発現する細胞の非存在下で抗原結合分子とインキュベートしたPBMCの培養上清において、有意なレベルのサイトカインが検出されないか、または有意なサイトカイン発現の誘導が起こらないならば、抗原結合分子は、第3の抗原を発現する細胞の非存在下でPBMCからのサイトカイン放出を誘導しないと判定される。1つの局面において、「有意なレベルのサイトカインが検出されない」とはまた、サイトカイン濃度のレベルが最大でも約50%、30%、20%、10%、5%、または1%であることを指し、ここで100%とは、CD3とCD137に同時に結合する抗原結合分子によって達成されるサイトカイン濃度である。1つの局面において、「有意なレベルのサイトカインが検出されない」とはまた、サイトカイン濃度のレベルが最大でも約50%、30%、20%、10%、5%、または1%であることを指し、ここで100%とは、第3の抗原の分子を発現する細胞の存在下で達成されるサイトカイン濃度である。1つの局面において、「有意なサイトカイン発現の誘導が起こらない」とはまた、サイトカイン濃度増加のレベルが、抗原結合分子を添加する前の各サイトカインの濃度の最大でも5倍、2倍、または1倍であることを指す。

【0121】

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、以下からなる群より選択される抗体と、CD137に対する結合について競合するか、またはCD137上の同じエピトープに結合する：

(a1) 配列番号：16に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、配列番号：30に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2(HCDR2)、配列番号：44に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3(HCDR3)、配列番号：63に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、配列番号：68に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2(LCDR2)、および配列番号：73に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3(LCDR3)；

(a2) 配列番号：17に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、配列番号：31に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2(HCDR2)、配列番号：45に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3(HCDR3)、配列番号：64に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、配列番号：69に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2(LCDR2)、および配列番号：74に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3(LCDR3)；

(a3) 配列番号：18に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1(HCDR1)、配列番号：32に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2(HCDR2)、配列番号：46に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3(HCDR3)、配列番号：63に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1(LCDR1)、配列番号：68に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2(LCDR2)、および配列番号：73に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3(LCDR3)；

(a4) 配列番号：19に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ

(a 9) 配列番号：23 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域1 (HCDR1)、配列番号：37 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2 (HCDR2)、配列番号：51 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3 (HCDR3)、配列番号：66 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1 (LCDR1)、配列番号

50

%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域2（HCDR2）、配列番号：56に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖相補性決定領域3（HCDR3）、配列番号：63に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域1（LCDR1）、配列番号：68に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域2（LCDR2）、および配列番号：73に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖相補性決定領域3（LCDR3）；

（b1）配列番号：16のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：30のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：44のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

10

（b2）配列番号：17のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：31のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：45のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：64のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：69のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：74のアミノ酸配列を含むLCDR3；

（b3）配列番号：18のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：32のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：46のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

（b4）配列番号：19のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：33のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：47のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

20

（b5）配列番号：19のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：33のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：47のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：65のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：70のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：75のアミノ酸配列を含むLCDR3；

（b6）配列番号：20のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：34のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：48のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

30

（b7）配列番号：22のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：36のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：50のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

（b8）配列番号：23のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：37のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：51のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

（b9）配列番号：23のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：37のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：51のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：66のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：71のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：76のアミノ酸配列を含むLCDR3；

40

（b10）配列番号：24のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：38のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：52のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：63のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：68のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：73のアミノ酸配列を含むLCDR3；

（b11）配列番号：25のアミノ酸配列を含むHCDR1、配列番号：39のアミノ酸配列を含むHCDR2、配列番号：53のアミノ酸配列を含むHCDR3、配列番号：66のアミノ酸配列を含むLCDR1、配列番号：71のアミノ酸配列を含むLCDR2、および配列番号：

50

(c 1 1) 配列番号：1 1 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン（VH）、および配列番号：6 1 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン（VL）；

50

(c 1 2) 配列番号：1 2 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：6 1 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (VL)；

(c 1 3) 配列番号：1 2 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (VL)；

(c 1 4) 配列番号：1 3 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (VL)；

(c 1 5) 配列番号：1 4 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 に対して少なくとも70%、80%、または90%同一であるアミノ酸配列を含む軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 1) 配列番号：2 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 2) 配列番号：3 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 9 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 3) 配列番号：4 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 4) 配列番号：5 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 5) 配列番号：5 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：6 0 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 6) 配列番号：6 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 7) 配列番号：8 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 8) 配列番号：9 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 9) 配列番号：9 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：6 1 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 1 0) 配列番号：1 0 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 1 1) 配列番号：1 1 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：6 1 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 1 2) 配列番号：1 2 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：6 1 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 1 3) 配列番号：1 2 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 1 4) 配列番号：1 3 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)；

(d 1 5) 配列番号：1 4 の重鎖可変ドメイン (VH)、および配列番号：5 8 の軽鎖可変ドメイン (VL)。

【0 1 2 2】

試験抗体が、ある特定の抗体と共通のエピトープを共有するかどうかは、同じエピトープに対する2つの抗体間の競合に基づいて評価することができる。抗体間の競合は、クロスブロッキングアッセイ (cross-blocking assay) などによって検出することができる。例えば、競合ELISAアッセイは、好ましいクロスブロッキングアッセイである。具体的には、クロスブロッキングアッセイにおいて、マイクロタイタープレートのウェルをコーティングするために用いるCD137タンパク質を、候補競合抗体の存在下または非存在下でプレインキュベートし、次いで、本発明の抗CD137抗体をそれに添加する。ウェル中のC

10

20

30

40

50

D137タンパク質に結合した本発明の抗CD137抗体の量は、同じエピトープへの結合について競合する候補競合抗体（試験抗体）の結合能力と間接的に相関する。すなわち、同じエピトープに対する試験抗体の親和性が高いほど、CD137タンパク質でコーティングされたウェルに結合した本発明の抗CD137抗体の量は少なく、かつCD137タンパク質でコーティングされたウェルに結合した試験抗体の量は多い。

【0123】

ウェルに結合した抗体の量は、抗体を予め標識することによって、容易に決定することができる。例えば、ビオチン標識された抗体は、アビジン／ペルオキシダーゼコンジュゲートおよび適切な基質を用いて測定することができる。特に、ペルオキシダーゼなどの酵素標識を用いるクロスブロッキングアッセイは、「競合ELISAアッセイ」と呼ばれる。抗体は、検出または測定を可能にする他の標識物質で標識することができる。具体的には、放射標識、蛍光標識などが公知である。

10

【0124】

さらに、試験抗体が、本発明の抗CD137抗体の種とは異なる種に由来する定常領域を有する場合、ウェルに結合した抗体の量を、その抗体の定常領域を認識する標識された抗体の使用によって測定することができる。あるいは、抗体が、同じ種に由来するが異なるクラスに属するならば、ウェルに結合した抗体の量を、個々のクラスを区別する抗体を用いて測定することができる。

【0125】

候補抗体が、候補競合抗体の非存在下で行われる対照実験において得られる結合活性と比較して少なくとも20%、好ましくは少なくとも20%～50%、およびさらにより好ましくは少なくとも50%、抗CD137抗体の結合をブロックすることができるならば、候補競合抗体は、本発明の抗CD137抗体と同じエピトープに実質的に結合する抗体、または同じエピトープへの結合について競合する抗体のいずれかである。

20

【0126】

別の態様において、試験抗体が別の抗体と競合的にまたは交差競合的に結合する能力は、当技術分野において公知のBIAcore解析またはフローサイトメトリーなどの標準的な結合アッセイを用いて、当業者が適宜決定することができる。

【0127】

エピトープの空間的立体構造を決定するための方法には、例えば、X線結晶学および二次元核磁気共鳴が含まれる（Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, G. E. Morris (ed.), Vol. 66 (1996)参照）。

30

【0128】

試験抗体が、CD137リガンドと共通のエピトープを共有するかどうかもまた、同じエピトープに対する試験抗体とCD137リガンドとの間の競合に基づいて評価することができる。抗体とCD137リガンドとの間の競合は、上述のようなクロスブロッキングアッセイなどによって検出することができる。別の態様において、試験抗体がCD137リガンドと競合的にまたは交差競合的に結合する能力は、当技術分野において公知のBIAcore解析またはフローサイトメトリーなどの標準的な結合アッセイを用いて、当業者が適宜決定することができる。

40

【0129】

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子の好都合な例には、以下からなる群より選択される抗体が結合するヒトCD137エピトープと同じエピトープに結合する抗原結合分子が含まれる：

ヒトCD137タンパク質における

SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC配列（配列番号：154）を含む領域を認識する抗体、

DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC配列（配列番号：149）を含む領域を認識する抗体、

LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTS

50

NAEC配列（配列番号：152）を含む領域を認識する抗体、および

LQDPCSNCPAGTFCDNRRNQIC配列（配列番号：147）を含む領域を認識する抗体。

【0130】

標的とされるがん抗原に応じて、当業者は、がん特異的抗原結合ドメインに含まれる重鎖可変領域および軽鎖可変領域について、がん抗原に結合する重鎖可変領域配列および軽鎖可変領域配列を適宜選択することができる。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有されている場合、該抗原結合ドメインを含有する抗原結合分子は、該エピトープを有する様々な抗原に結合し得る。

【0131】

「エピトープ」とは、抗原における抗原決定基を意味し、本明細書において開示される抗原結合分子中の様々な結合ドメインが結合する抗原部位を指す。したがって、例えば、エピトープを、その構造に従って定義することができる。あるいは、エピトープを、該エピトープを認識する抗原結合分子の抗原結合活性に従って定義してもよい。抗原がペプチドまたはポリペプチドである場合、エピトープを、該エピトープを形成するアミノ酸残基によって特定化することができる。あるいは、エピトープが糖鎖である場合、エピトープは、その特異的な糖鎖構造によって特定化することができる。

【0132】

直鎖状エピトープとは、その一次アミノ酸配列が認識されるエピトープを含有するエピトープである。そのような直鎖状エピトープは、典型的には、その特異的配列中に少なくとも3個、および最も一般的には少なくとも5個、例えば、約8〜10個または6〜20個のアミノ酸を含有する。

【0133】

直鎖状エピトープとは対照的に、「立体構造エピトープ」とは、エピトープを含有する一次アミノ酸配列が、認識されるエピトープの唯一の決定基ではないエピトープである（例えば、立体構造エピトープの一次アミノ酸配列は、エピトープを規定する抗体によって必ずしも認識されない）。立体構造エピトープは、直鎖状エピトープと比較してより多くの数のアミノ酸を含有し得る。立体構造エピトープを認識する抗体は、ペプチドまたはタンパク質の三次元構造を認識する。例えば、タンパク質分子がフォールディングして三次元構造を形成する時に、立体構造エピトープを形成するアミノ酸および／またはポリペプチド主鎖が整列し、エピトープが抗体によって認識可能になる。エピトープの立体構造を決定するための方法には、例えば、X線結晶学、二次元核磁気共鳴分光法、部位特異的スピン標識、および電子常磁性共鳴分光法が含まれるが、それらに限定されない。例えば、Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology (1996), Vol. 66, Morris (ed.)参照。

【0134】

試験抗原結合分子によるがん特異的抗原中のエピトープの結合を評価するための方法の例を、以下に示す。以下の実施例に従って、別の結合ドメインによる標的抗原中のエピトープの結合を評価するための方法もまた、適宜実施することができる。

【0135】

例えば、がん特異的抗原に対する抗原結合ドメインを含む試験抗原結合分子が、抗原分子中の直鎖状エピトープを認識するかどうかは、例えば、以下に述べるように確認することができる。例えば、がん特異的抗原の細胞外ドメインを形成するアミノ酸配列を含む直鎖状ペプチドを、上記の目的で合成する。ペプチドは、化学合成することができ、または、細胞外ドメインに対応するアミノ酸配列をコードするがん特異的抗原のcDNA中の領域を用いて、遺伝子操作技術によって取得することができる。次いで、がん特異的抗原に対する抗原結合ドメインを含有する試験抗原結合分子を、細胞外ドメインを構成するアミノ酸配列を含む直鎖状ペプチドに対するその結合活性について評価する。例えば、固定化された直鎖状ペプチドを抗原として用いて、ELISAにより、ペプチドに対する抗原結合分子の結合活性を評価することができる。あるいは、直鎖状ペプチドに対する結合活性を、該直鎖状ペプチドががん特異的抗原発現細胞に対する抗原結合分子の結合を阻害するレベル

10

20

30

40

50

に基づいて、評価することができる。直鎖状ペプチドに対する抗原結合分子の結合活性は、これらの試験によって実証することができる。

【0136】

上述の抗原に対する抗原結合ドメインを含有する試験抗原分子が、立体構造エピトープを認識するかどうかは、以下のように確認することができる。例えば、がん特異的抗原に対する抗原結合ドメインを含む抗原結合分子は、接触時にがん特異的抗原発現細胞に強く結合するが、がん特異的抗原の細胞外ドメインを形成するアミノ酸配列を含む固定化された直鎖状ペプチドには実質的に結合しない。本明細書において、「実質的に結合しない」とは、抗原として抗原発現細胞を用いたELISAまたは蛍光活性化細胞選別（FACS）の抗原発現細胞に対する結合活性と比較して、結合活性が80%以下、概して50%以下、好ましくは30%以下、および特に好ましくは15%以下であることを意味する。

10

【0137】

ELISA形式において、抗原発現細胞に対する抗原結合ドメインを含む試験抗原結合分子の結合活性を、酵素反応によって生じたシグナルのレベルを比較することによって、定量的に評価することができる。具体的には、抗原発現細胞が固定化されたELISAプレートに、試験抗原結合分子を添加する。次いで、細胞に結合した試験抗原結合分子を、試験抗原結合分子を認識する酵素標識された抗体を用いて検出する。あるいは、FACSを用いる場合は、試験抗原結合分子の希釈系列を調製し、抗原発現細胞に対する抗原結合力価を決定して、抗原発現細胞に対する試験抗原結合分子の結合活性を比較することができる。

【0138】

緩衝液などに懸濁した細胞の表面上に発現している抗原に対する試験抗原結合分子の結合は、フローサイトメーターを用いて検出することができる。公知のフローサイトメーターには、例えば、以下のデバイスが含まれる：

FACSCanto（商標）II

FACSAria（商標）

FACSArray（商標）

FACSVantage（商標）SE

FACSCalibur（商標）（すべてBD Biosciencesの商品名である）

EPICS ALTRA HyPerSort

Cytomics FC 500

EPICS XL-MCL ADC EPICS XL ADC

Cell Lab Quanta/Cell Lab Quanta SC（すべてBeckman Coulterの商品名である）。

20

【0139】

上述の抗原に対する抗原結合ドメインを含む試験抗原結合分子の結合活性をアッセイするための適している方法には、例えば、以下の方法が含まれる。最初に、抗原発現細胞を、試験抗原結合分子と反応させ、次いで、これを、FITC標識された二次抗体で染色し、FACSCalibur（BD）を用いる。CELL QUEST Software（BD）を用いた解析によって得られた蛍光強度、すなわち、幾何平均値は、細胞に結合した抗体の量を反映する。すなわち、結合した試験抗原結合分子の量によって表される試験抗原結合分子の結合活性を、幾何平均値の決定によって測定することができる。

30

40

【0140】

本発明の抗原結合ドメインを含む試験抗原結合分子が、別の抗原結合分子と共通のエピトープを共有するかどうかは、同じエピトープに対する2つの分子間の競合に基づいて評価することができる。抗原結合分子間の競合は、クロスブロッキングアッセイなどによって検出することができる。例えば、競合ELISAアッセイは、好ましいクロスブロッキングアッセイである。

【0141】

具体的には、クロスブロッキングアッセイにおいて、マイクロタイタープレートのウェルをコーティングしている抗原を、候補競合抗原結合分子の存在下または非存在下でプレインキュベートし、次いで、試験抗原結合分子をそれに添加する。ウェル中の抗原に結合

50

した試験抗原結合分子の量は、同じエピトープへの結合について競合する候補競合抗原結合分子の結合能力と間接的に相関する。すなわち、同じエピトープに対する競合抗原結合分子の親和性が高いほど、抗原でコーティングされたウェルに対する試験抗原結合分子の結合活性は低い。

【0142】

抗原を介してウェルに結合した試験抗原結合分子の量は、抗原結合分子を予め標識することによって、容易に決定することができる。例えば、ビオチン標識された抗原結合分子は、アビジン／ペルオキシダーゼコンジュゲートおよび適切な基質を用いて測定することができる。特に、ペルオキシダーゼなどの酵素標識を用いるクロスブロッキングアッセイは、「競合ELISAアッセイ」と呼ばれる。抗原結合分子はまた、検出または測定を可能にする他の標識物質で標識することもできる。具体的には、放射標識、蛍光標識などが公知である。

10

候補競合抗原結合分子が、競合抗原結合分子の非存在下で実施される対照実験における結合活性と比較して少なくとも20%、好ましくは少なくとも20~50%、およびより好ましくは少なくとも50%、抗原結合ドメインを含む試験抗原結合分子の結合をブロックすることができる場合、試験抗原結合分子は、競合抗原結合分子が結合する同じエピトープに実質的に結合するか、または同じエピトープへの結合について競合すると判定される。

【0143】

本発明の抗原結合ドメインを含む試験抗原結合分子が結合するエピトープの構造が、既に同定されている場合、試験抗原結合分子および対照抗原結合分子が共通のエピトープを共有するかどうかは、エピトープを形成するペプチド中へのアミノ酸変異の導入によって調製されるペプチドに対する2つの抗原結合分子の結合活性を比較することによって、評価することができる。

20

【0144】

そのような結合活性を測定するための方法として、例えば、変異が導入されている直鎖状ペプチドに対する試験抗原結合分子および対照抗原結合分子の結合活性は、上記のELISA形式での比較によって測定される。ELISA法の他にも、試験抗原結合分子および対照抗原結合分子をカラムに通過させること、および次いで、溶出液中の溶出された抗原結合分子を定量することによって、カラムに結合した変異体ペプチドに対する結合活性を決定することができる。例えば、GST融合ペプチドの形態で、変異体ペプチドをカラムに吸着させるための方法が、公知である。

30

【0145】

あるいは、同定されたエピトープが立体構造エピトープである場合、試験抗原結合分子および対照抗原結合分子が共通のエピトープを共有するかどうかは、以下の方法によって評価することができる。最初に、抗原結合ドメインが標的とする抗原を発現する細胞、および変異が導入されたエピトープを有する抗原を発現する細胞を調製する。これらの細胞をPBSなどの適切な緩衝液に懸濁することによって調製される細胞懸濁液に、試験抗原結合分子および対照抗原結合分子を添加する。次いで、細胞懸濁液を緩衝液で適宜洗浄し、試験抗原結合分子および対照抗原結合分子を認識することができるFITC標識された抗体をそれに添加する。標識された抗体で染色された細胞の蛍光強度および数を、FACSCalibur (BD) を用いて決定する。試験抗原結合分子および対照抗原結合分子は、適している緩衝液を用いて適宜希釈し、所望の濃度で用いる。例えば、それらを、10 $\mu\text{g/ml}$ ~ 10 ng/ml の範囲内の濃度で用いてもよい。CELL QUEST Software (BD) を用いた解析によって決定された蛍光強度、すなわち、幾何平均値は、細胞に結合した標識された抗体の量を反映する。すなわち、結合した標識された抗体の量によって表される試験抗原結合分子および対照抗原結合分子の結合活性を、幾何平均値の決定によって測定することができる。

40

【0146】

いくつかの態様において、本発明の抗原結合分子は、
(a) 以下の位置（すべてKabatナンバリングによる）の各々に、その位置について示される以下のアミノ酸残基のうちの1個または複数個を含む、重鎖可変ドメインアミノ酸配

50

列：

アミノ酸26位のA、D、E、I、G、K、L、M、N、R、T、W、もしくはY；

アミノ酸27位のD、F、G、I、M、もしくはL；

アミノ酸28位のD、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸29位のFもしくはW；

アミノ酸30位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸31位のF、I、N、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸32位のA、H、I、K、L、N、Q、R、S、T、もしくはV；

10

アミノ酸33位のW；

アミノ酸34位のF、I、L、M、もしくはV；

アミノ酸35位のF、H、S、T、V、もしくはY；

アミノ酸50位のE、F、H、I、K、L、M、N、Q、S、T、W、もしくはY；

アミノ酸51位のI、K、もしくはV；

アミノ酸52位のK、M、R、もしくはT；

アミノ酸52b位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、もしくはY；

アミノ酸52c位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸53位のA、E、F、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

20

アミノ酸54位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸55位のE、F、G、H、L、M、N、Q、W、もしくはY；

アミノ酸56位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸57位のA、D、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸58位のA、F、H、K、N、P、R、もしくはY；

アミノ酸59位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸60位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

30

アミノ酸61位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸62位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸63位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸64位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸65位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

40

アミノ酸93位のHもしくはR；

アミノ酸94位のF、G、H、L、M、S、T、V、もしくはY；

アミノ酸95位のIもしくはV；

アミノ酸96位のF、H、I、K、L、M、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸97位のF、Y、もしくはW；

アミノ酸98位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸99位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

50

アミノ酸100a位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100b位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100c位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100d位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100e位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

10

アミノ酸100f位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100g位のA、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸100h位のA、D、E、G、H、I、L、M、N、P、S、T、もしくはV；

アミノ酸100i位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸101位のA、D、F、I、L、M、N、Q、S、T、もしくはV；

アミノ酸102位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

20

ならびに／または

(b) 以下の位置（すべてKabatナンバリングによる）の各々に、その位置について示される以下のアミノ酸残基のうちの1個または複数個を含む、軽鎖可変ドメインアミノ酸配列：

アミノ酸24位のA、D、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸25位のA、G、N、P、S、T、もしくはV；

アミノ酸26位のA、D、E、F、G、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸27位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸27a位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

30

アミノ酸27b位のA、I、L、M、P、T、もしくはV；

アミノ酸27c位のA、E、F、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、T、W、もしくはY；

アミノ酸27d位のA、E、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸27e位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸28位のG、N、S、もしくはT；

アミノ酸29位のA、F、G、H、K、L、M、N、Q、R、S、T、W、もしくはY；

アミノ酸30位のA、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、V、W、もしくはY；

アミノ酸31位のI、L、Q、S、T、もしくはV；

40

アミノ酸32位のF、W、もしくはY；

アミノ酸33位のA、F、H、L、M、Q、もしくはV；

アミノ酸34位のA、H、もしくはS；

アミノ酸50位のI、K、L、M、もしくはR；

アミノ酸51位のA、E、I、K、L、M、Q、R、S、T、もしくはV；

アミノ酸52位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

アミノ酸53位のA、E、F、G、H、K、L、M、N、P、Q、R、S、V、W、もしくはY；

アミノ酸54位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；

50

アミノ酸55位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、もしくはY；
アミノ酸56位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸89位のA、G、K、S、もしくはY；
アミノ酸90位のQ；
アミノ酸91位のG；
アミノ酸92位のA、D、H、K、N、Q、R、S、もしくはT；
アミノ酸93位のA、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、V、W、もしくはY；
アミノ酸94位のA、D、H、I、M、N、P、Q、R、S、T、もしくはV；
アミノ酸95位のP；
アミノ酸96位のFもしくはY；および
アミノ酸97位のA、D、E、G、H、I、K、L、M、N、Q、R、S、T、もしくはVを含む。

【0147】

本発明の抗原結合分子は、当業者に一般に知られている方法によって作製することができる。例えば、抗体を、以下に示す方法によって調製することができるが、本発明の抗体を調製するための方法は、それに限定されない。ポリペプチドをコードする単離された遺伝子の適切な宿主中への移入による抗体調製のために、宿主細胞と発現ベクターの多くの組み合わせが、当技術分野において公知である。これらの発現系のすべてを、本発明の抗原結合分子の単離に適用することができる。宿主細胞として真核細胞を用いる場合には、動物細胞、植物細胞、または真菌細胞を、適宜用いることができる。具体的には、動物細胞の例には、以下の細胞が含まれ得る：

(1) 哺乳類細胞、例えばCHO（チャイニーズハムスター卵巣細胞株）、COS（サル腎臓細胞株）、骨髓腫細胞（Sp2/O、NS0など）、BHK（ベビーハムスター腎臓細胞株）、HEK293（切断されたアデノウイルス(Ad)5 DNAを伴うヒト胎児腎臓細胞株）、PER.C6細胞（アデノウイルス5型(Ad5) E1AおよびE1B遺伝子で形質転換されたヒト胎児網膜細胞株）、Hela、およびVero（Current Protocols in Protein Science (May, 2001, Unit 5.9, Table 5.9.1)）；

(2) 両生類細胞、例えばアフリカツメガエル（Xenopus）卵母細胞；ならびに

(3) 昆虫細胞、例えばsf9、sf21、およびTn5。

抗体はまた、大腸菌（mAbs 2012 Mar-Apr; 4(2): 217-225）または酵母（WO200023579）を用いて調製することもできる。大腸菌を用いて調製された抗体は、糖鎖が付加されていない。他方、酵母を用いて調製された抗体は、糖鎖が付加されている。

【0148】

可変ドメイン中の1個または複数個のアミノ酸残基が目的の異なるアミノ酸によって置換された重鎖をコードする、抗体重鎖をコードするDNA、および抗体の軽鎖をコードするDNAを発現させる。可変ドメイン中の1個または複数個のアミノ酸残基が目的の異なるアミノ酸によって置換された重鎖または軽鎖をコードするDNAは、例えば、ある特定の抗原に対して当技術分野において公知の方法によって調製された抗体可変ドメインをコードするDNAを取得すること、および、該ドメイン中の特定のアミノ酸をコードするコドンが目的の異なるアミノ酸をコードするように、適宜置換を導入することによって、取得することができる。

【0149】

あるいは、ある特定の抗原に対して当技術分野において公知の方法によって調製された抗体可変ドメイン中の1個または複数個のアミノ酸残基が目的の異なるアミノ酸によって置換されたタンパク質をコードするDNAを、予め設計し、化学合成して、可変ドメイン中の1個または複数個のアミノ酸残基が目的の異なるアミノ酸によって置換された重鎖をコードするDNAを取得してもよい。アミノ酸置換部位および置換の種類は、特に限定されな

い。アミノ酸改変にとって好ましい領域の例には、可変領域中の溶媒に露出している領域およびループが含まれる。中でも、CDR1、CDR2、CDR3、FR3、およびループが好ましい。具体的には、H鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング31～35位、50～65位、71～74位、および95～102位、ならびにL鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング24～34位、50～56位、89～97位が好ましい。H鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング31位、52a～61位、71～74位、および97～101位、ならびにL鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング24～34位、51～56位、および89～96位がより好ましい。

アミノ酸改変は、置換に限定されず、欠失、付加、挿入、もしくは修飾、またはそれらの組み合わせであってもよい。

【0150】

可変ドメイン中の1個または複数のアミノ酸残基が目的の異なるアミノ酸によって置換された重鎖をコードするDNAはまた、別々の部分DNAとして作製することができる。部分DNAの組み合わせの例には、可変ドメインをコードするDNAと定常ドメインをコードするDNA；およびFabドメインをコードするDNAとFcドメインをコードするDNAが含まれるが、それらに限定されない。同様に、軽鎖をコードするDNAもまた、別々の部分DNAとして作製することができる。

【0151】

これらのDNAは、以下の方法によって発現させることができる：例えば、重鎖可変ドメインをコードするDNAを、重鎖定常ドメインをコードするDNAとともに発現ベクターに組み込んで、重鎖発現ベクターを構築する。同様に、軽鎖可変ドメインをコードするDNAを、軽鎖定常ドメインをコードするDNAとともに発現ベクターに組み込んで、軽鎖発現ベクターを構築する。これらの重鎖および軽鎖の遺伝子を、単一のベクターに組み込んでもよい。

【0152】

目的の抗体をコードするDNAは、発現制御領域、例えば、エンハンサーおよびプロモーターの制御下で発現するように、発現ベクターに組み込む。次に、結果として生じた発現ベクターで宿主細胞を形質転換し、抗体を発現させる。この場合には、適切な宿主と発現ベクターを、組み合わせて用いることができる。

【0153】

ベクターの例には、M13系ベクター、pUC系ベクター、pBR322、pBluescript、およびpCR-Scriptが含まれる。これらのベクターに加えて、例えば、pGEM-T、pDIRECT、またはpT7も、cDNAのサブクローニングおよび切り出しの目的で用いることができる。

【0154】

特に、本発明の抗体を作製する目的でベクターを用いるためには、発現ベクターが有用である。例えば、宿主がJM109、DH5 α 、HB101、またはXL1-Blueなどの大腸菌である場合は、発現ベクターは、大腸菌における効率的な発現を可能にするプロモーター、例えば、lacZプロモーター（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるWard et al., Nature (1989) 341, 544-546；およびFASEB J. (1992) 6, 2422-2427）、araBプロモーター（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるBetter et al., Science (1988) 240, 1041-1043）、またはT7プロモーターを有することが不可欠である。そのようなベクターの例には、上述のベクター、ならびにpGEX-5X-1（Pharmacia製）、「QIAexpress system」（Qiagen N.V.製）、pEGFP、およびpET（この場合、宿主は好ましくは、T7 RNAポリメラーゼを発現しているBL21である）が含まれる。

【0155】

ベクターは、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列を含有してもよい。大腸菌のペリプラズムにおける産生の場合には、pelBシグナル配列（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるLei, S. P. et al., J. Bacteriol. (1987) 169, 4397）を、ポリペプチド分泌のためのシグナル配列として用いることができる。ベクターは、例えば、リポフェクション法、リン酸カルシウム法、またはDEAE-デキストラン法の使用によって、宿主細胞に移入することができる。

【0156】

大腸菌用の発現ベクターに加えて、本発明のポリペプチドを作製するためのベクターの例には、哺乳動物由来の発現ベクター（例えば、pcDNA3（Invitrogen Corp.製）、pEGF-BOS（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるNucleic Acids. Res.1990, 18(17),p5322）、pEF、およびpCDM8）、昆虫細胞由来の発現ベクター（例えば、「Bac-to-BACバキュロウイルス発現系」（GIBCO BRL製）、およびpBacPAK8）、植物由来の発現ベクター（例えば、pMH1およびpMH2）、動物ウイルス由来の発現ベクター（例えば、pHSV、pMV、およびpAdexLcw）、レトロウイルス由来の発現ベクター（例えば、pZIPneo）、酵母由来の発現ベクター（例えば、「Pichia Expression Kit」（Invitrogen Corp.製）、pNV11、およびSP-Q01）、ならびに枯草菌（*Bacillus subtilis*）由来の発現ベクター（例えば、pPL608およびpKTH50）が含まれる。

10

【0157】

CHO細胞、COS細胞、NIH3T3細胞、またはHEK293細胞などの動物細胞における発現を目的として、ベクターは、細胞内発現のために必要なプロモーター、例えば、SV40プロモーター（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるMulligan et al., Nature (1979) 277, 108）、MMTV-LTRプロモーター、EF1 α プロモーター（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるMizushima et al., Nucleic Acids Res. (1990) 18, 5322）、CAGプロモーター（参照によりその全体が本明細書に組み込まれるGene. (1991) 108, 193）、またはCMVプロモーターを有することが不可欠であり、より好ましくは、形質転換された細胞をスクリーニングするための遺伝子（例えば、薬剤（ネオマイシン、G418など）によりマーカーとして働くことができる薬剤耐性遺伝子）を有する。このような性質を有するベクターの例には、pMAM、pDR2、pBK-RSV、pBK-CMV、pOPRSV、およびpOP13が含まれる。加えて、遺伝子コピー数を増加させる目的で、EBNA1タンパク質を共発現させてもよい。この場合、複製起点OriPを有するベクターを用いる（Biotechnol Bioeng. 2001 Oct 20;75(2):197-203；およびBiotechnol Bioeng. 2005 Sep 20;91(6):670-7）。

20

【0158】

遺伝子を安定的に発現させ、かつ細胞内の遺伝子コピー数を増加させるように意図される例示的な方法には、核酸合成経路が欠損したCHO細胞を、それを相補するものとして働くDHFR遺伝子を有するベクター（例えば、pCHO1）で形質転換すること、および遺伝子増幅においてメトトレキサート（MTX）を用いることが含まれる。遺伝子を一過性に発現させるように意図される例示的な方法には、SV40 T抗原遺伝子をその染色体上に有するCOS細胞を用いて、SV40の複製起点を有するベクター（pcDなど）で細胞を形質転換することが含まれる。ポリオーマウイルス、アデノウイルス、ウシバピローマウイルス（BPV）などに由来する複製起点もまた、用いることができる。宿主細胞系において遺伝子コピー数を増加させるために、発現ベクターは、アミノグリコシドホスホトランスフェラーゼ（APH）遺伝子、チミジンキナーゼ（TK）遺伝子、大腸菌キサンチングアニホスホリボシルトランスフェラーゼ（Ecogpt）遺伝子、またはジヒドロ葉酸還元酵素（dhfr）遺伝子などの選択マーカーを含有することができる。

30

【0159】

抗体は、例えば、形質転換された細胞を培養すること、次いで、分子形質転換された細胞内からまたはその培養液から抗体を分離することによって、回収することができる。抗体は、遠心分離、硫酸分画、塩析、限外濾過、C1q、FcRn、プロテインAおよびプロテインGカラム、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、ならびにゲル濾過クロマトグラフィーなどの方法を適宜組み合わせることで用いることによって、分離し、精製することができる。

40

【0160】

ノブ-イントゥ-ホールテクノロジー（WO1996/027011；Ridgway JB et al., Protein Engineering (1996) 9, 617-621；およびMerchant AM et al., Nature Biotechnology (1998) 16, 677-681）または電荷反発の導入によってH鎖間の意図されない会合

50

を抑制する技術（WO2006/106905）などの上述の技術を、多重特異性抗体を効率的に調製するための方法に適用することができる。

【0161】

本発明は、さらに、本発明の抗原結合分子を作製するための方法を提供し、具体的には、2つの異なる抗原（第1の抗原および第2の抗原）に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合しない抗体可変領域（この可変領域を第1の可変領域と言う）と、CD3およびCD137とは異なる第3の抗原に結合する可変領域（この可変領域を第2の可変領域と言う）とを含む抗原結合分子を作製するための方法であって、第1の可変領域の多様なアミノ酸配列を含有する抗原結合分子ライブラリーを調製する工程を含む、方法を提供する。

10

【0162】

その例には、以下の工程を含む作製方法が含まれ得る：

(i) 各々がCD3またはCD137に結合するその抗体可変領域において少なくとも1個のアミノ酸が改変された抗原結合分子のライブラリーを調製する工程であって、該改変された可変領域の少なくとも1個のアミノ酸が互いに異なる、工程；

(ii) 調製されたライブラリーから、CD3およびCD137に対する結合活性を有するが、CD3とCD137に同時には結合しない可変領域を含む抗原結合分子を選択する工程；

(iii) 工程(ii)において選択された抗原結合分子の可変領域をコードする核酸と、第3の抗原に結合する抗原結合分子の可変領域をコードする核酸とを含む宿主細胞を培養して、CD3およびCD137に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合しない抗体可変領域と、第3の抗原に結合する可変領域とを含む抗原結合分子を発現させる工程；
ならびに

20

(iv) 宿主細胞培養物から抗原結合分子を回収する工程。

【0163】

この作製方法において、工程(ii)は、以下の選択工程であってもよい：

(v) 調製されたライブラリーから、CD3およびCD137に対する結合活性を有するが、各々が異なる細胞上で発現しているCD3とCD137に同時には結合しない可変領域を含む抗原結合分子を選択する工程。

【0164】

工程(i)において用いられる抗原結合分子は、これらの分子が抗体可変領域を各々含む限り、特に限定されない。抗原結合分子は、Fv、Fab、もしくはFab'などの抗体断片であってもよく、またはFc領域を含有する抗体であってもよい。

30

【0165】

改変されるアミノ酸は、例えば、CD3またはCD137に結合する抗体可変領域における、その改変が抗原に対する結合を喪失させないアミノ酸から選択される。

【0166】

本発明において、1つのアミノ酸改変が、単独で用いられてもよく、または複数のアミノ酸改変が、組み合わせて用いられてもよい。

複数のアミノ酸改変を組み合わせて用いる場合、組み合わせる改変の数は、特に限定されず、例えば、2個以上30個以下、好ましくは2個以上25個以下、2個以上22個以下、2個以上20個以下、2個以上15個以下、2個以上10個以下、2個以上5個以下、または2個以上3個以下である。

40

組み合わされる複数のアミノ酸改変は、抗体の重鎖可変ドメインもしくは軽鎖可変ドメインのみに加えられてもよく、または重鎖可変ドメインおよび軽鎖可変ドメインの両方に適宜分配されてもよい。

【0167】

アミノ酸改変にとって好ましい領域の例には、可変領域中の溶媒に露出している領域およびループが含まれる。中でも、CDR1、CDR2、CDR3、FR3、およびループが好ましい。具体的には、H鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング31～35位、50～65位、71～74位、および95～102位、ならびにL鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング24～34位、

50

50～56位、および89～97位が好ましい。H鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング31位、52a～61位、71～74位、および97～101位、ならびにL鎖可変ドメイン中のKabatナンバリング24～34位、51～56位、および89～96位がより好ましい。

【0168】

アミノ酸残基の改変にはまた、CD3またはCD137に結合する抗体可変領域中の上述の領域におけるアミノ酸のランダム改変；および、CD3またはCD137に対する結合活性を有することが以前に知られているペプチドの上述の領域への挿入も含まれる。本発明の抗原結合分子は、CD3およびCD137に結合することができるが、これらの抗原に同時には結合することができない可変領域を、このように改変された抗原結合分子の中から選択することによって、取得することができる。

10

【0169】

可変領域が、CD3およびCD137に結合することができるが、これらの抗原に同時には結合することができないかどうか、ならびにさらに、可変領域が、CD3およびCD137のいずれか一方が細胞上に存在し、他方の抗原が単独で存在するか、抗原の両方が各々単独で存在するか、または抗原の両方が同じ細胞上に存在する場合には、CD3およびCD137の両方に同時に結合することができるが、各々が異なる細胞上で発現しているこれらの抗原に同時には結合することができないかどうかもまた、上述の方法に従って確認することができる。

【0170】

本発明は、さらに、本発明の抗原結合分子をコードする核酸を提供する。本発明の核酸は、DNAまたはRNAなどの任意の形態であってもよい。

20

【0171】

本発明は、さらに、本発明の核酸を含むベクターを提供する。ベクターの種類は、ベクターを受ける宿主細胞に従って、当業者が適宜選択することができる。例えば、上述のベクターのいずれかをを用いることができる。

【0172】

本発明は、さらに、本発明のベクターで形質転換された宿主細胞に関する。宿主細胞は、当業者が適宜選択することができる。例えば、上述の宿主細胞のいずれかをを用いることができる。

【0173】

本発明はまた、本発明の抗原結合分子と薬学的に許容し得る担体とを含む医薬組成物も提供する。本発明の医薬組成物は、本発明の抗原結合分子に薬学的に許容し得る担体を添加することによって、当技術分野において公知の方法に従って製剤化することができる。例えば、医薬組成物は、水または任意の他の薬学的に許容し得る溶液を伴う無菌性溶液または懸濁液の非経口注射の形態で用いることができる。例えば、医薬組成物は、抗原結合分子を、薬理学的に許容し得る担体または媒体、具体的には、滅菌水、生理食塩水、植物油、乳化剤、懸濁剤、界面活性剤、安定剤、香味剤、賦形剤、ビヒクル、防腐剤、結合剤などとの適切な組み合わせで、一般に認められた製薬実施に要求される単位剤形で混合して、製剤化され得る。担体の具体例には、軽質無水ケイ酸、ラクトース、結晶セルロース、マンニトール、デンプン、カルメロースカルシウム、カルメロースナトリウム、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ポリビニルアセタールジエチルアミノアセタート、ポリビニルピロリドン、ゼラチン、中鎖脂肪酸トリグリセリド、ポリオキシエチレン硬化ヒマシ油60、サッカライド、カルボキシメチルセルロース、コーンスターチ、および無機塩が含まれ得る。そのような調製物における活性成分の量は、指示された範囲内の適切な用量が達成され得るように決定される。

30

【0174】

注射用の無菌組成物は、注射用蒸留水などのビヒクルを用いて、従来の製薬実施に従って製剤化することができる。注射用の水溶液の例には、生理食塩水、グルコースならびに他の補助薬（例えば、D-ソルビトール、D-マンノース、D-マンニトール、および塩化ナトリウム）を含有する等張液が含まれる。これらの溶液は、適切な溶解補助剤、例えば、ア

50

ルコール（具体的には、エタノール）もしくはポリアルコール（例えば、プロピレングリコールおよびポリエチレングリコール）、または非イオン性界面活性剤、例えば、ポリソルベート80（商標）もしくはHCO-50と組み合わせて用いられ得る。

【0175】

油性溶液の例には、ゴマ油および大豆油が含まれる。これらの溶液は、溶解補助剤としての安息香酸ベンジルまたはベンジルアルコールと組み合わせて用いられ得る。溶液は、さらに、緩衝剤（例えば、リン酸塩緩衝液および酢酸ナトリウム緩衝液）、無痛化剤（例えば、塩酸プロカイン）、安定剤（例えば、ベンジルアルコールおよびフェノール）、ならびに酸化防止剤と混合され得る。このように調製された注射液は、通常、適切なアンプル中に充填される。本発明の医薬組成物は、好ましくは非経口投与される。その剤形の具体例には、注射剤、鼻腔内投与剤、経肺投与剤、および経皮投与剤が含まれる。注射の例には、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射、および皮下注射が含まれ、それを通して医薬組成物を全身にまたは局所に投与することができる。

【0176】

投与方法は、患者の年齢および症状に応じて適宜選択することができる。ポリペプチドまたはポリペプチドをコードするポリヌクレオチドを含有する医薬組成物の用量は、例えば、1用量につき体重1kgあたり0.0001~1000 mgの範囲内で選択することができる。あるいは、用量は、例えば、1患者あたり0.001~100000 mgの範囲内で選択することができるが、必ずしもこれらの数値に限定されない。用量および投与方法は、患者の体重、年齢、症状などに応じて変動するが、当業者は、用量および方法を適宜選択することができる。

【0177】

本発明はまた、本発明の抗原結合分子を投与する工程を含む、がんを処置するための方法、がんの処置における使用のための本発明の抗原結合分子、がんの治療剤の作製における本発明の抗原結合分子の使用、および、本発明の抗原結合分子を使用する工程を含む、がんの治療剤を作製するためのプロセスも提供する。

【0178】

本明細書において用いられるアミノ酸の三文字表記および対応する一文字表記は、以下のように定義される：アラニン：AlaおよびA、アルギニン：ArgおよびR、アスパラギン：AsnおよびN、アスパラギン酸：AspおよびD、システイン：CysおよびC、グルタミン：GlnおよびQ、グルタミン酸：GluおよびE、グリシン：GlyおよびG、ヒスチジン：HisおよびH、イソロイシン：IleおよびI、ロイシン：LeuおよびL、リジン：LysおよびK、メチオニン：MetおよびM、フェニルアラニン：PheおよびF、プロリン：ProおよびP、セリン：SerおよびS、スレオニン：ThrおよびT、トリプトファン：TrpおよびW、チロシン：TyrおよびY、ならびにバリン：ValおよびV。

【0179】

本明細書に記載される局面の1つまたはその2つ以上の任意の組み合わせもまた、当業者の技術常識に基づいて技術的矛盾が生じない限り、本発明に含まれることを、当業者は理解すべきである。

【0180】

本明細書において引用される参考文献はすべて、参照によりその全体が本明細書に組み入れられる。

【0181】

本発明は、以下の実施例に関連してさらに例示される。しかし、本発明は、以下の実施例によって限定されるようには意図されない。

【実施例】

【0182】

【実施例1】腫瘍細胞に対するインビトロ細胞傷害活性の改善のための、親Dual-Fab H183L072に由来する親和性成熟バリエーションのスクリーニング

1. 1. 親和性成熟バリエーションの配列

親Dual-Fab H183L072（重鎖：配列番号：1；軽鎖：配列番号：57）の結合親和性を増加させるために、H183L072を鋳型として用いて、可変領域に単一のまたは複数の変異を導入することにより、1,000個よりも多いDual-Fabバリエーションを生成した。抗体を、Expi293（Invitrogen）で発現させ、プロテインA精製、続いて、ゲル濾過が必要な場合にはゲル濾過によって精製した。複数の変異を有する15個の示されたバリエーションの配列を、表1.1および1.2に列記し、結合動態を、実施例1.2.2において、下記のBiacore T200機器（GE Healthcare）を用いて25℃および／または37℃で評価する。可変領域上の単一の変異による、ヒトCD137およびヒトCD3に対する親和性の変化の倍率を、表1.3に列記する。

【0183】

【表1.1a】

親和性測定に用いたヒトCD3およびCD137抗原の配列番号

抗体名	配列番号
ヒトCD3eg リンカー	84
ヒトCD137 ECD	201

【0184】

【表1.1b】

抗体、VH、VL、ならびにCDR1、2、および3を含む可変領域の名称および配列番号

抗体名	VHR 名	VLR 名	VHR	VHR_CDR1	VHR_CDR2	VHR_CDR3	VLR	VLR_CDR1	VLR_CDR2	VLR_CDR3
H183/L072	dBBDu183H	dBBDu072L	001	015	029	043	057	062	067	072
H0868L0581	dBBDu183H0868	dBBDu072L0581	002	016	030	044	058	063	068	073
H1550L0918	dBBDu183H1550	dBBDu072L0918	003	017	031	045	059	064	069	074
H1571L0581	dBBDu183H1571	dBBDu072L0581	004	018	032	046	058	063	068	073
H1610L0581	dBBDu183H1610	dBBDu072L0581	005	019	033	047	058	063	068	073
H1610L0939	dBBDu183H1610	dBBDu072L0939	005	019	033	047	060	065	070	075
H1643L0581	dBBDu183H1643	dBBDu072L0581	006	020	034	048	058	063	068	073
H1647L0581	dBBDu183H1647	dBBDu072L0581	008	022	036	050	058	063	068	073
H1649L0581	dBBDu183H1649	dBBDu072L0581	009	023	037	051	058	063	068	073
H1649L0943	dBBDu183H1649	dBBDu072L0943	009	023	037	051	061	066	071	076
H1651L0581	dBBDu183H1651	dBBDu072L0581	010	024	038	052	058	063	068	073
H1652L0943	dBBDu183H1652	dBBDu072L0943	011	025	039	053	061	066	071	076
H1673L0943	dBBDu183H1673	dBBDu072L0943	012	026	040	054	061	066	071	076
H1673L0581	dBBDu183H1673	dBBDu072L0581	012	026	040	054	058	063	068	073
H2591L0581	dBBDu183H2591	dBBDu072L0581	013	027	041	055	058	063	068	073
H2594L0581	dBBDu183H2594	dBBDu072L0581	014	028	042	056	058	063	068	073
CD3ε	CD3εVH	CD3εVL	077				078			
CD137	CD137VH	CD137VL	079				080			

【0185】

10

20

30

40

50

【表 1 . 2 a】
抗原のアミノ酸配列

抗原名	配列番号	アミノ酸配列
ヒト CD3eg リンカー	84	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIG GDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYL RARVGSADDAKKDAAKKDDAKKDDAKKDGSQSIKGNHLVKVYDY QEDGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSSNAKD PRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMDYKDDDDK
ヒト CD137 ECD	201	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQC KGVFRTRKECSSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELT KKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKERDVV CGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQHSHHHHHGGGGSGGLND IFEAQKIEWHE

10

20

30

40

50

【 0 1 8 6 】

【表 1 . 2 b】

可変領域ならびにCDR1、2、および3のアミノ酸配列

VHR、VLR、CDRの名称	配列番号	アミノ酸配列
dBBDu183H	001	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAWMHWRQAPG KGLEWVAQIKDKGNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYASASTVLPAGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H0868	002	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWMHWRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1550	003	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWMHWRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1571	004	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYATYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNS LKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1610	005	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWMHWRQAPG KGLEWVAQIKDKWNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAEGIDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1643	006	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDYNNAYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNS LKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1647	008	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNTWFHWVRQAPGK GLEWVAQIKDYNDYAAYYAPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMNSL KTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1649	009	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYADYYAPSVKERFTISRDDSKNSIYLQMNS LKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1651	010	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKYNAYADYYAPSVVEGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1652	011	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDYNNAYADYYAPSVVEGRFTISRDDSKNSIYLQMNS LKTEDTAVYYCHYVHYASASTLLPAEGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H1673	012	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFVFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDKWNAYADYYAPSVKERFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYIHYASASTLLPAEGIDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H2591	013	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYAAASTLLPAEGVDAGWGQGTTVTVSS
dBBDu183H2594	014	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFKFSNVWFHWVRQAPG KGLEWVAQIKDYNNAYAGYYHPSVKGRFTISRDDSKNSIYLQMN SLKTEDTAVYYCHYVHYAAASQLLPAEGVDAGWGQGTTVTVSS

10

20

30

40

50

VHR、VLR、CDRの名称	配列番号	アミノ酸配列
dBBDu183H_VHR_CDR1	015	NAWMH
dBBDu183H0868_VHR_CDR1	016	NVWMH
dBBDu183H1550_VHR_CDR1	017	NVWMH
dBBDu183H1571_VHR_CDR1	018	NVWFH
dBBDu183H1610_VHR_CDR1	019	NVWMH
dBBDu183H1643_VHR_CDR1	020	NVWFH
dBBDu183H1647_VHR_CDR1	022	NTWFH
dBBDu183H1649_VHR_CDR1	023	NVWFH
dBBDu183H1651_VHR_CDR1	024	NVWFH
dBBDu183H1652_VHR_CDR1	025	NVWFH
dBBDu183H1673_VHR_CDR1	026	NVWFH
dBBDu183H2591_VHR_CDR1	027	NVWFH
dBBDu183H2594_VHR_CDR1	028	NVWFH
dBBDu183H_VHR_CDR2	029	QIKDKGNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H0868_VHR_CDR2	030	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1550_VHR_CDR2	031	QIKDKYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1571_VHR_CDR2	032	QIKDKYNAYATYYAPSVKG
dBBDu183H1610_VHR_CDR2	033	QIKDKWNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1643_VHR_CDR2	034	QIKDYYNAYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1647_VHR_CDR2	036	QIKDYNDYAAYYAPSVKG
dBBDu183H1649_VHR_CDR2	037	QIKDKYNAYADYYAPSVKE
dBBDu183H1651_VHR_CDR2	038	QIKDKYNAYADYYAPSVKE
dBBDu183H1652_VHR_CDR2	039	QIKDYYNAYADYYAPSVKE
dBBDu183H1673_VHR_CDR2	040	QIKDKWNAYADYYAPSVKE
dBBDu183H2591_VHR_CDR2	041	QIKDYYNAYAGYYHPSVKG
dBBDu183H2594_VHR_CDR2	042	QIKDYYNAYAGYYHPSVKG
dBBDu183H_VHR_CDR3	043	VHYASASTVLPAGVDA
dBBDu183H0868_VHR_CDR3	044	VHYASASTLLPAGVDA
dBBDu183H1550_VHR_CDR3	045	IHYASASTLLPAGVDA
dBBDu183H1571_VHR_CDR3	046	VHYASASTLLPAGVDA
dBBDu183H1610_VHR_CDR3	047	IHYASASTLLPAEGIDA
dBBDu183H1643_VHR_CDR3	048	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1647_VHR_CDR3	050	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1649_VHR_CDR3	051	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1651_VHR_CDR3	052	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1652_VHR_CDR3	053	VHYASASTLLPAEGVDA
dBBDu183H1673_VHR_CDR3	054	IHYASASTLLPAEGIDA
dBBDu183H2591_VHR_CDR3	055	VHYAAASTLLPAEGVDA
dBBDu183H2594_VHR_CDR3	056	VHYAAASQLLPAEGVDA

10

20

30

40

50

VHR、VLR、CDRの名称	配列番号	アミノ酸配列
dBBDu072L	057	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISQASQELVHMNRNTYLHWYQQ KPGQAPRLIIYKVSNRFPDGFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV VYYCAQGTSPFTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0581	058	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISQPSQEVVHMNRNTYLHWYQQ KPGQAPRLIIYKVSNRFPDGFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV VYYCAQGTSHPTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0918	059	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISQPSQEVVHMNNVYLHWYQQ KPGQAPRLIIYKVSNRFPDGFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV VYYCAQGTSHPTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0939	060	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISQPSQEVVHMNRNTYLHWYQQ KPGQAPRLIIYKVSNVFPDGFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV VYYCAQGTTHPTFGQGTKLEIK
dBBDu072L0943	061	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISQPSQEEVHMNRNTYLHWYQQK PGQAPRLIIYKVSNFLPFPDGFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV VYYCAQGTTHPTFGQGTKLEIK
dBBDu072L_VLR_CDR1	062	QASQELVHMNRNTYLH
dBBDu072L0581_VLR_CDR1	063	QPSQEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L0918_VLR_CDR1	064	QPSQEVVHMNNVYLH
dBBDu072L0939_VLR_CDR1	065	QPSQEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L0943_VLR_CDR1	066	QPSEEVVHMNRNTYLH
dBBDu072L_VLR_CDR2	067	KVSNRFP
dBBDu072L0581_VLR_CDR2	068	KVSNRFP
dBBDu072L0918_VLR_CDR2	069	KVSNRFP
dBBDu072L0939_VLR_CDR2	070	KVSNVFP
dBBDu072L0943_VLR_CDR2	071	KVSNFLP
dBBDu072L_VLR_CDR3	072	AQGTSPFT
dBBDu072L0581_VLR_CDR3	073	AQGTSHPT
dBBDu072L0918_VLR_CDR3	074	AQGTSHPT
dBBDu072L0939_VLR_CDR3	075	AQGTTHPT
dBBDu072L0943_VLR_CDR3	076	AQGTTHPT

10

20

30

VHR、VLR、CDRの名称	配列番号	アミノ酸配列
CD3εVH	077	QVQLVESGGGVVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMHWVRQAP GKGLEWVAQIKDKSQNYATYVAESVKGRFTISRADSKNSIYLM NSLKTEDTAVYYCRYVHYAAGYGVDIWGQGTITVTVSS
CD3εVL	078	DIVMTQSPLSLPVTGPGEASISCRSSQPLVHSNRNTYLHWYQQK GQAPRLIIYKVSNRFPDGFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVY YCGQGTQVPYTFGQGTKLEIK
CD137VH	079	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEK GLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAAD TAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVSS
CD137VL	080	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPR LLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQR NWPPALTFGGGTKVEIK

40

【表 1. 3 a】
重鎖可変領域における単一変異による、CD137に対する親和性の変化倍率

Kabatナンバリング																					
鎖型配列名																					
dBBDu183H																					
すべて (元およびGys無し)																					
Ala	A	0.4	0.3	0.4	0.0	1.2	0.3		0.0	0.0											
Ile	I	0.3	0.7	0.8	0.3	0.6	0.3	2.2	0.0	1.4	0.0										
Leu	L	0.3	0.5	0.9	0.3	0.5	0.3	1.2	0.0	1.8	0.0										
Met	M	0.3	0.9	0.7	0.3	0.8	0.0	1.6	0.0		0.0										
Pro	P	0.1	0.3	0.5	0.1	0.9	0.4	0.0	0.0	0.3	0.0										
Val	V	0.0	0.3	1.2	0.1	0.8	0.2	3.7	0.0	1.0	0.5										
Gly	G		0.4	0.3	0.0	0.9	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0										
Asn	N	0.5	0.3	0.0	0.0	0.6		0.3	0.0	0.0	0.4										
Gln	Q	0.4	0.2	0.5	0.0	0.7	0.2	1.6	0.0	0.0	0.0										
Ser	S	0.4	0.3	0.0	0.0		0.3	0.9	0.0	0.0	0.0										
Thr	T	0.5	0.3		0.1	0.9	0.5	3.9	0.0	0.0	0.5										
Asp	D	0.8	0.5	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0										
Glu	E	0.5	0.2	0.3	0.0	0.6	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0										
His	H	0.4	0.3	1.1	0.0	0.6	0.4	0.2	0.0	0.1											
Lys	K	0.0	0.2	1.1	0.0	0.7	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0										
Arg	R	0.3	0.2	1.5	0.0	0.7	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0										
Phe	F	0.3		1.3		0.7	0.2	0.1	0.0	2.5	4.3										
Trp	W	0.3	0.3	0.8	0.1	0.5	0.3	0.0		0.0	0.0										
Tyr	Y	0.3	0.4	1.1	0.2	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	3.9										

Kabatナンバリング																					
鎖型配列名																					
dBBDu183H																					
すべて (元およびGys無し)																					
Ala	A	0.0	0.0	0.0	0.0			1.4													
Ile	I	0.0	0.0	0.3	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0
Leu	L	0.0	0.0	0.2	0.8	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.1	3.3				0.0	1.2	0.0	0.1	0.0	0.9
Met	M	0.0	3.2	0.0	1.4	0.0	0.0	0.8	0.7	0.0	0.5	1.3	0.9	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Pro	P	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0		0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Val	V	0.0	0.0		0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0		0.5	0.0	0.0	0.5	0.0			0.0	0.0
Gly	G	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.6	0.0		0.0	0.0	1.6	0.0
Asn	N	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.7	0.0	0.0
Gln	Q	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.6	0.0	0.3	1.4	0.5	0.4	0.0	0.8	0.0	0.0	1.7	0.0	0.0
Ser	S	0.0	1.4	0.0	0.0	0.0	0.3		0.0		1.0	0.5	0.6	0.4	0.7	0.4	0.0	0.0	3.3	0.9	0.0
Thr	T	0.0	0.6	0.0	0.5	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0		0.5	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.2	3.3	0.0	0.0
Asp	D	0.0	0.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.0
Glu	E	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.0	0.5	0.0	0.0	0.5	0.4	0.8	0.0	1.9	0.0	0.0	2.2	0.0	0.0
His	H		0.0	0.0		0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.5	0.0	0.1	1.0	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Lys	K	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.2	1.1	0.0	0.0	0.5	0.7	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Arg	R	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.1	0.5	0.0	0.0	0.7	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Phe	F	0.0	1.8	0.0	1.4	1.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Trp	W	0.0	0.0	0.0	1.6	0.8	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.6	0.2	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Tyr	Y	0.0		0.0	3.3			0.0	0.5	0.0	0.0	0.6	0.0	0.0	0.0	1.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0

【 0 1 8 8 】

10

20

30

40

50

【表 1 . 3 b】

軽鎖可変領域における単一変異による、
CD137に対する親和性の変化倍率

Kabataナンバリング																					
鎖型配列名																					
dBBDu072L																					
すべて (元およびGys無し)																					
Ala	A	1.0																			
Ile	I	0.9	0.2	0.7	0.8	1.1	1.0	0.8	0.9	0.3	0.3	0.3	0.3	0.9	0.0	0.1	0.0				
Leu	L	0.9	0.1	0.3	0.8	0.9		0.8	0.6	0.8	0.3	0.9	0.3	0.5	0.2		0.1				
Met	M	1.0	0.1	0.6	0.9	0.9	0.4	0.9	0.6												
Pro	P	0.0	1.4	0.2	0.1	0.8	0.8	0.5	0.8	1.0	0.4	0.2	0.4	0.4	0.0	0.2	0.0				
Val	V	0.9	0.5	0.3	0.8	0.9	1.1														
Gly	G	1.0	0.7	0.9	0.9	1.0	0.1	0.4	0.6	0.7	0.5	1.1	0.9	0.0	0.1	0.1	0.0				
Asn	N	0.9	0.2	0.7	0.8	0.9	0.0	0.5	0.5	0.8		0.9									
Gln	Q		0.1	0.8			1.1	0.2	0.8	0.6	1.0	0.4	0.9	1.0	0.5	0.2	1.4	0.0			
Ser	S	1.0	1.1					0.8	0.6	0.3	0.3	0.6	0.9	0.5	0.9	0.2	0.4	0.0	0.0		
Thr	T	1.0	0.7	1.0	0.9	0.5	0.4	0.7	0.6	0.9	0.5	0.8	0.3								
Asp	D	0.9	0.0	0.8	0.9	1.1	0.2	0.3	0.3	0.7	0.0	0.3	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0				
Glu	E	0.0	0.0	0.8	1.0			0.2	0.7	0.6	0.9	0.2	0.4	0.1	0.4	0.0	0.1	0.0			
His	H	1.0	0.0	0.2	0.9	1.1	0.3	0.6													
Lys	K	1.0	0.0	0.5	0.9	0.9	0.3	0.9	0.6	1.1	0.3	1.1	0.6	0.4	0.0	0.0	0.0				
Arg	R	0.9	0.0	0.3	0.9	0.9	0.0	0.9	0.6	1.0	0.4										
Phe	F	0.9	0.0	0.2	0.6	1.1	0.3	0.6	0.4	0.7	0.4	0.7	0.9	0.2	1.7	0.3	0.0				
Trp	W	1.0	0.0	0.1	0.5	1.0	0.3	0.7	0.5	0.7	0.3	0.6	0.9	0.1	0.7	0.1	0.0				
Tyr	Y	0.9	0.0	0.2	0.7	1.1	0.0	0.7	0.5	0.7	0.4	0.6	0.6	0.1		0.1	0.0				

【 0 1 8 9 】

10

20

30

40

50

【表 1 . 3 c】

重鎖可変領域における単一変異による、CD3に対する親和性の変化倍率

[illegible]

Kabataナンバリング																										
銚型配列名																										
dBBDu183H		H	97	98	99	00	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
すべて (元および05s無し)																										
Ala	A	0.0	0.4	0.0	0.3	0.0									1.0		0.8	1.1	1.1	1.2	1.2					
Ile	I	0.0	0.0	7.5	0.0	0.0	4.6	0.7	1.4	1.0	1.4	1.0	1.2	1.4	1.0	1.2	1.4	1.0	1.2	1.4	1.0	1.2	2.6	0.8	0.6	0.9
Leu	L	0.0	0.8	0.0	0.0	0.0	3.7	0.8	1.2	1.1	1.1	1.2			1.3	1.2	1.3	0.8	1.8	2.3	0.7					
Met	M	0.0	0.0	0.3	0.1	0.0	1.0	0.9	1.0	0.8	1.0	1.2	1.0	1.8	1.3	1.4	4.2	5.6	0.7	1.0						
Pro	P	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.2	0.6	1.3	1.1	1.1	1.0	1.4		0.6	1.8	0.6	1.2	0.0	0.0						
Val	V	0.0	2.6	0.0	0.0	0.0	4.7	0.8	1.2	1.0	1.2	1.2	1.0	1.5	1.0	1.2	3.4		0.5	1.0						
Gly	G	0.0	1.1	0.0	0.2	0.0	1.4	1.0	1.4	1.2	1.1	1.5	2.0	1.6	1.5	1.2		1.8	0.4	1.0						
Asn	N	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.6	0.8	0.8	1.0	1.0	1.2	1.3	1.3	0.9	0.8	5.0	1.1	1.5						
Gln	Q	0.0	0.4	0.0	0.3	0.0	0.7	1.0	0.8	0.5	1.1	1.4	1.1	1.5	1.2	1.4	3.6	0.0	1.3							
Ser	S	0.0	0.0	0.0	0.2	0.0	1.0		1.1		1.5	1.1	1.2	1.2	1.7	1.4	1.1	1.9	0.6	1.9						
Thr	T	0.0	0.3	0.0	0.0	0.0	2.0	0.9	0.9			1.0	1.3	1.4	1.6	1.3	2.3	1.0	0.2	0.5						
Asp	D	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.4	0.3	0.5	0.6	0.6	0.8	1.0	0.7	0.4	0.3	0.5	2.4	1.3							
Glu	E	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.3	0.5	0.6	0.6	0.8	0.7	1.0	0.5	1.5	1.2	0.4	1.0	1.1						
His	H	0.5	0.0				0.0	5.9	0.7	1.2	1.1	1.2	1.2	1.3	1.5	1.2	1.8	0.5	2.2	0.4	3.6					
Lys	K	0.2	0.0	0.0	0.6	0.0	4.6	1.8	1.9	0.9	1.3	1.2	1.8	2.1	1.4	1.7	0.3	2.4	0.0	1.5						
Arg	R	2.4	0.3	0.0	0.3	0.0	2.7	2.0	2.1	0.6	1.8	1.5	1.8	2.2	1.6	3.4	0.4	4.0	0.0	1.0						
Phe	F	0.0	0.4	0.0	0.0	0.0	12.1	1.0	1.4	1.6	1.2	1.8	1.3	1.9	1.1		0.4	3.2	2.5	2.0						
Trp	W	0.0	0.4	0.0	0.0	0.2	7.0	0.9	1.9	1.6	1.8	1.5	1.7	1.7	0.7	0.9	0.0	4.9	0.0	3.3						
Tyr	Y	0.0	0.0	0.0	0.0		25.1	0.8	1.7	1.2	1.8	1.3	1.4	2.0	1.5	1.2	0.0	3.0	0.0	2.5						

【表 1. 3 d】

軽鎖可変領域における単一変異による、
CD3に対する親和性の変化倍率

Kabatナンバリング 鎖型配列名 dBBDu072L すべて (元および6ys無し)																																		
Q	A	S	Q	E	L	V	H	M	N	R	N	T	Y	L	H		K	V	S	N	R	F	P	A	Q	G	T	S	V	P	F	T		
1.1		0.8	1.2	1.2	0.7	0.4	0.3	1.3	0.0	0.6	0.3	0.2	0.0	0.6	0.6		0.0	0.6	1.2	0.6	1.0	7.2	4.1				0.0	0.0	0.1	1.1	1.0	0.0	0.0	0.8
1.2	0.3	0.5	0.8	1.1	0.5	1.0	0.0	0.9	0.0	0.2	0.5	0.7	0.0	0.0	0.0		0.0	1.4	1.5	0.0	1.3	3.4	3.1		0.0	0.0	0.0	0.8	0.8	0.0	0.0	0.5		
1.2	0.0	0.5	1.0	1.2		0.8	0.0	1.0	0.0	0.8	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0		0.0	0.6	1.6	0.6	1.3	2.9	3.1		0.0	0.0	0.0	0.3	0.9	0.0	0.0	0.4		
1.1	0.0	0.6	1.2	1.2	0.7	1.1	0.0		0.0	0.7	1.6	0.0	1.1	0.0			0.0	0.5	1.4	0.9	1.7	3.6	3.9		0.1	0.0	0.0	0.3	1.0	0.8	0.0	0.7		
Pro	0.1	0.2	0.0	1.0	1.8	0.0	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0	0.6	0.9	8.1				0.0	0.0	0.0	0.0	1.5	0.0	0.0	0.0		
Val	1.2	0.9	0.6	0.9	1.0	1.7	0.0	0.8	0.0	0.3	0.5	0.7	0.0	0.4	0.0		0.0	1.6	0.3	1.1	4.4	3.4		0.4	0.0	0.0	0.4	0.7	0.0	0.0	0.6			
Gly	1.2	0.9	0.9	1.0	1.4	0.0	0.0	0.9	0.0	1.2	0.0	0.0	0.0	0.3			0.0	0.4	1.4	0.6	1.1	3.7		0.7	0.0	0.2	0.8	0.0	0.0	1.0	0.0			
Asn	1.1	0.5	0.9	1.0	1.1	0.0	0.3	0.0	0.9	0.6		0.0	0.0	0.2			0.0	0.0	1.5		1.0	3.9	3.3		0.0	0.0	0.2	0.8	0.9	0.0	0.0	0.5		
Gln	Q	0.0	0.8		1.2	0.0	1.0	0.0	1.1	0.0	0.7	1.2	0.4	0.0	1.7	0.0		0.0	0.5	1.4	0.8	1.2	2.9	3.7		0.2	0.0	0.0	1.0	1.0	0.0	0.5		
Ser	S	1.1	1.3		1.1	1.3	0.0	0.0	1.2	0.0	0.8	0.0	0.5	0.0	0.5			0.0	0.3	0.9	1.2	6.6	4.1		0.6	0.0	0.0	0.5	0.7	0.0	0.0	1.1		
Thr	T	1.1	1.1	1.4	1.0	1.3	0.6	0.8	0.0	1.2	0.0	0.8	0.1	0.0	0.3	0.4		0.0	0.2	1.3	0.4	0.8	4.2	3.9		0.0	0.0	0.0	0.7	0.5	0.0	0.6		
Asp	D	1.2	0.0	0.8	1.1	0.0	0.1	0.0	0.8	0.3	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0			0.0	1.0	0.2	0.5	6.1	3.0		0.0	0.0	0.2	0.9	0.8	0.0	0.5			
Glu	E	0.0	0.0	0.7	1.1	0.0	0.7	1.0	0.0	0.3	0.3	0.4	0.0	0.0	0.0			0.0	0.4	1.0	0.5	0.8	3.4	3.4		0.0	0.4	0.0	1.0	0.4	0.0	0.6		
His	H	1.1	0.0	0.4	1.2	1.4	0.0	0.3		0.9	0.0	0.8	0.1	0.0	1.4			0.0	0.2	1.7	1.2	1.9	7.4	2.9		0.0	0.1	0.0	0.2	0.9	0.8	0.0		
Lys	K	1.0	0.0	0.7	0.8	1.1	0.0	1.1	0.0	1.4	0.0	1.1	0.3	0.4	0.0	0.4		0.0	0.8	1.9	1.4	1.7	8.3	5.6		1.1	0.0	0.8	1.0	0.4	0.0	0.6		
Arg	R	1.0	0.0	0.5	1.0	1.2	0.0	1.2	0.0	1.4	0.0	1.5	0.4	0.0	0.0			0.0	0.9	1.8	1.8	4.0	5.5		0.2	0.0	0.5	1.0	0.5	0.0	0.4			
Phe	F	0.9	0.0	0.6	0.9	1.1	0.3	0.5	0.2	0.9	0.0	0.6	0.9	0.0	1.1	0.0		0.0	0.0	1.6	0.7	1.5	3.3		0.2	0.0	0.3	1.0	0.2	0.0	0.3			
Trp	W	1.1	0.0	0.3	0.7	1.1	0.0	0.3	0.0	1.0	0.5	0.9	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0	1.4	0.7	1.4	0.2	3.0		0.1	0.0	0.0	1.1	0.0	0.0	0.0		
Tyr	Y	1.0	0.0	0.4	0.9	1.2	0.0	0.5	0.0	0.9	0.5	0.8	0.0	0.0	0.0			0.0	0.0	1.5	0.7	1.6	10.6	2.7		0.5	0.0	0.0	0.7	0.2	0.0	0.4		

号：84、表1.1aおよび1.2a)。この構築物を、FreeStyle293F細胞株（Thermo Fisher）を用いて一過性に発現させた。ヒトCD3εリンカーを発現する馴化培地を、Q HP樹脂（GE healthcare）を充填したカラムを用いて濃縮し、次いで、FLAG-タグ親和性クロマトグラフィーに適用した。ヒトCD3εリンカーを含有する画分を収集し、続いて、1×D-PBSで平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラム（GE healthcare）に供した。次いで、ヒトCD3εリンカーを含有する画分をプールし、-80℃で保管した。

【0192】

そのC末端にヘキサヒスチジン（His-タグ）およびビオチンアクセプターペプチド（BAP）を有するヒトCD137細胞外ドメイン（ECD）（配列番号：201、表1.1aおよび1.2a）を、FreeStyle293F細胞株（Thermo Fisher）を用いて一過性に発現させた。ヒトCD137 ECDを発現する馴化培地をHisTrap HPカラム（GE healthcare）に適用し、イミダゾール（Nacalai）を含有する緩衝液で溶出した。ヒトCD137 ECDを含有する画分を収集し、続いて、1×D-PBSで平衡化したSuperdex 200ゲル濾過カラム（GE healthcare）に供した。次いで、ヒトCD137 ECDを含有する画分をプールし、-80℃で保管した。

【0193】

1. 2. 2. ヒトCD3およびCD137に対する親和性測定

ヒトCD3に対するDual-Fab抗体（Dual-Ig）の結合親和性を、Biacore T200機器（GE Healthcare）を用いて25℃で評価した。抗ヒトFc（GE Healthcare）を、アミンカップリングキット（GE Healthcare）を用いてCM4センサーチップのすべてのフローセルの上に固定化した。抗体を抗Fcセンサー表面の上に捕捉し、次いで、組換えヒトCD3またはCD137をフローセルの上にインジェクトした。すべての抗体およびアナライトを、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃を含有するACES pH 7.4において調製した。センサー表面は、3M MgCl₂でサイクル毎に再生させた。結合親和性は、Biacore T200 Evaluation software、version 2.0（GE Healthcare）を用いて、データをプロセッシングし、1:1結合モデルにフィットさせることによって決定させた。CD137結合親和性アッセイを、アッセイ温度を37℃に設定したことを除いて、同じ条件で行った。組換えヒトCD3およびCD137に対するDual-Fab抗体の結合親和性を表1. 4に示す。

【0194】

【表1. 4】

	CD3			CD137		
	Kon (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	KD (M)	Kon (M ⁻¹ ·s ⁻¹)	Koff (s ⁻¹)	KD (M)
H183L072	3.54E+04	1.20E-02	3.40E-07	3.47E+03	1.96E-02	5.66E-06
H0868L0581	1.23E+05	1.94E-02	1.57E-07	1.22E+04	1.36E-03	1.11E-07
H1550L0918	7.20E+04	3.16E-03	4.38E-08	1.09E+04	5.79E-03	5.30E-07
H1571L0581	1.42E+05	1.56E-02	1.10E-07	1.21E+04	1.05E-03	8.68E-08
H1610L0581	6.80E+04	1.42E-03	2.09E-08	1.07E+04	1.10E-03	1.03E-07
H1610L0939	5.00E+04	2.53E-03	5.07E-08	1.30E+04	8.01E-04	6.18E-08
H1643L0581	9.46E+04	2.51E-02	2.65E-07	1.23E+04	6.06E-04	4.94E-08
H1647L0581	4.43E+04	1.01E-01	2.28E-06	9.98E+03	6.47E-04	6.48E-08
H1649L0581	7.50E+04	3.36E-02	4.49E-07	1.29E+04	5.53E-04	4.28E-08
H1649L0943	6.10E+04	4.81E-02	7.89E-07	1.43E+04	4.68E-04	3.28E-08
H1651L0581	7.18E+04	3.71E-02	5.17E-07	1.40E+04	6.03E-04	4.32E-08
H1652L0943	6.23E+04	6.36E-02	1.02E-06	1.29E+04	4.70E-04	3.64E-08
H1673L0581	7.96E+04	1.06E-03	1.33E-08	1.19E+04	9.60E-04	8.04E-08
H1673L0943	5.50E+04	1.16E-03	2.10E-08	1.22E+04	7.22E-04	5.91E-08
H2591L0581	1.02E+05	5.35E-02	5.25E-07	2.04E+04	7.42E-04	3.63E-08
H2594L0581	9.83E+04	5.84E-02	5.93E-07	2.09E+04	1.63E-03	7.81E-08

【0195】

1. 3. 二重特異性抗体および三重特異性抗体の調製

Dual-Igバリエーションの有効性を評価するために、腫瘍抗原を認識する1つのアームと、エフェクター細胞、主にT細胞を認識する別のアームとを有する、二重特異性抗体または三重特異性抗体を生成した。腫瘍抗原グリピカン-3 (GPC3) を標的とする抗GPC3 (重鎖: 配列番号: 206; 軽鎖: 配列番号: 207)、または陰性対照であるキーホールリンペットヘモシアニン (KLH) (本明細書においてCtrlと名づけられる) 抗体を、抗標的結合アームとして用い、実施例1.1および1.2に記載される抗体を、(Proc Natl Acad Sci USA. 2013 Mar 26; 110(13): 5145-5150) に記載されている方法によるFab-アーム交換 (FAE) を用いて生成した。二重特異性抗体または三重特異性抗体の分子形式は、従来のIgGと同じ形式である。例えば、GPC3/H1643L581は、GPC3、CD3、およびCD137に結合することができる三重特異性抗体である。実施例1.1に記載されるどのDual-Ig三重特異性バリエーションが、CD137活性に起因する細胞傷害活性の向上に寄与するかを特定するために、GPC3およびCD3に結合することができるGPC3/CD3ε二重特異性抗体 (表1.1) を、対照として含めた。生成したすべての抗体は、Fcγ受容体に対する親和性が減弱したサイレントFcを含む。

【0196】

〔実施例2〕腫瘍細胞に対する、親Dual-Fab H183L072に由来する親和性成熟バリエーションによるインビトロ細胞傷害活性の評価

2.1. インビトロでの親和性成熟バリエーションのCD3アゴニスト活性の評価

親和性成熟の結果としてCD3アゴニスト活性を評価するために、NFAT-luc2 Jurkatルシフェラーゼアッセイを実施する。簡潔に述べると、細胞膜上にヒトGPC3を発現する 4×10^3 細胞/ウェルのSK-pca60細胞 (参考実施例13) を、標的細胞として用い、0.02、0.2、および2 nMの三重特異性抗体の存在下で24時間、 2.0×10^4 細胞/ウェルのNFAT-luc2 Jurkat細胞 (E:T比 5) と共培養した。バリエーションを、図1.1の上のパネルのプレート1および図1.1の下のパネルのプレート2に分けた。24時間後に、ルシフェラーゼ活性を、Bio-Gloルシフェラーゼアッセイシステム (Promega, G7940) で、製造業者の説明書に従って検出した。GloMax (登録商標) Explorer System (Promega #GM3500) を用いて、発光 (単位) を検出し、Graphpad Prism 7を用いて、捕捉値をプロットした。親三重特異性抗体GPC3/H183L072および二重特異性抗体GPC3/CD3εを、2 nMの濃度で含めた。図1.1は、大部分のバリエーションが類似したCD3アゴニスト活性を有することを示した。特に2 nMで、バリエーションは、親H183L072と類似した活性を有する。図1.1の上のパネルは、プレート1におけるすべてのバリエーションが類似したCD3アゴニスト活性を有することを示した。図1.1の下のパネルは、プレート2におけるバリエーションのうち、H1610L939がわずかにより弱いCD3アゴニスト活性を有し、他方、H2591L581が最も強いCD3アゴニスト活性を有することを示した。

【0197】

2.2. インビトロでの親和性成熟バリエーションのCD137アゴニスト活性の評価

どの抗体バリエーションが親和性成熟の結果として強いCD137アゴニスト活性をもたらしたかを評価するために、エフェクター細胞としてGloResponse (商標) NF-κB-Luc2/CD137 Jurkat細胞株 (Promega #CS196004) を用い、上記と同様に、SK-pca60細胞株 (参考実施例13) を標的細胞として用いた。 4.0×10^3 細胞/ウェルのSK-pca60細胞 (標的細胞) および 2.0×10^4 細胞/ウェルのNF-κB-Luc2/CD137 Jurkat (エフェクター細胞) の両方を、白底96ウェルアッセイプレート (Costar, 3917) の各ウェルにE:T比5で加えた。抗体を0.5 nM、2.5 nM、および5 nMの濃度で各ウェルに加え、37°C、5% CO₂で37°Cにて5時間インキュベートした。表れたルシフェラーゼを、Bio-Gloルシフェラーゼアッセイシステム (Promega, G7940) で、製造業者の説明書にしたがって検出した。GloMax (登録商標) Explorer System (Promega #GM3500) を用いて、発光 (単位) を検出し、Graphpad Prism 7を用いて、捕捉値をプロットした。

【0198】

図1.2においては、抗体バリエーションを、プレート1 (図1.2の上のパネル) およびプレート2 (図1.2の下のパネル) に分けた。両方のプレートにおけるすべてのバリエ

ントは、陰性対照として用いたGPC3/CD3εと比較して、検出可能なCD137アゴニスト活性を有する。親和性成熟前の親抗体であるGPC3/H183L072もまた、両方のプレートにおいて対象として用いた。図1.2において、すべてのバリエーションは、CD137結合についての親和性成熟後に、親抗体GPC3/H183L072よりも強いCD137アゴニスト抗体を示した。したがって、プレート1（図1.2の上のパネル）におけるGPC3/H1643L581およびGPC3/H868L581ならびにプレート2（図1.2の下のパネル）におけるGPC3/H2594L581およびGPC3/H2591L581は、より強いCD137アゴニスト活性をもたらした上位バリエーションであった。これに対して、プレート1におけるGPC3/H1550L918ならびにプレート2におけるGPC3/H1610L581およびGPC3/H1610L939などのバリエーションは、より弱いCD137活性を示した。

10

【0199】

まとめると、図1.1および1.2は、バリエーションのうち、プレート1におけるGPC3/H1643L581、GPC3/H868L581およびプレート2におけるGPC3/H2591L581が、Jurkat細胞において同様に強い活性を有するように見えるのに対して、GPC3/H1610L939は、より弱い活性を有することを示す。

【0200】

2.3. 親和性成熟バリエーションのインビトロ細胞傷害活性の評価

CD3、CD137活性化についての知見をインビトロ細胞傷害活性に拡大適用するために、前述の親和性成熟バリエーションを、ヒト末梢血単核細胞を用いたSK-pca60細胞に対するT細胞依存性細胞傷害活性（TDCC）の活性の評価に供した。

20

【0201】

2.3.1. 凍結ヒトPBMCの調製

商業的に購入したPBMCを含有するクライオバイアル（STEMCELL Technologies.）を、37℃の水浴中に置き、細胞を解凍した。次いで、細胞を、9 mLの培地（標的細胞を培養するために用いられる培地）を含有する15 mLファルコンチューブ中に分注した。次いで、細胞懸濁液を、1,200 rpmで5分間、室温での遠心分離に供した。上清を静かに吸引し、新鮮な温めた培地を再懸濁のために添加して、ヒトPBMC溶液として用いた。

【0202】

2.3.2. 抗GPC3親和性成熟Dual-Fab三重特異性抗体を用いたTDCC活性の測定

細胞傷害活性を、PBMCの存在下でxCELLigence Real-Time Cell Analyzer（Roche Diagnostics）を用いて腫瘍細胞増殖抑制率を観察することによって評価した。図1.3は、抗GPC3親和性成熟Dual-Fab三重特異性抗体のTDCC活性を示す。SK-pca60細胞株を、標的細胞として用いた。標的細胞をディッシュから剥離し、細胞を 3.5×10^3 細胞/ウェルに調整することによって100 μL/ウェルの分割量で、細胞をE-plate 96（Roche Diagnostics）にプレーティングし、xCELLigence Real-Time Cell Analyzerを用いて、細胞増殖の測定を開始した。24時間後に、プレートを取り出して、各濃度（5 nMから開始した3倍系列希釈、すなわち、0.19、0.56、1.67、および5 nM）に調製したそれぞれの抗体50 μLを、プレートに加えた。室温で15分間の反応後に、（実施例2.3.1）において調製された50 μLの新鮮なヒトPBMC溶液を、0.5のエフェクター：標的比（すなわち、 1.75×10^3 細胞/ウェル）で加え、細胞増殖の測定を、xCELLigence Real-Time Cell Analyzerを用いて再開した。反応は、5%二酸化炭素ガスの条件下、37℃で実施した。CD137シグナル伝達は、T細胞生存を増強し、かつ活性化誘導細胞死を阻止するため、TDCCアッセイを低いE:T比で実施した。CD137活性化が寄与する優れた細胞傷害活性を観察するために、期間の延長が必要とされる場合がある。よって、PBMCの添加のおよそ120時間後に、下記の式を用いて、細胞増殖抑制（CGI）率（%）を決定した。計算において用いたxCELLigence Real-Time Cell Analyzerから得られたセルインデックス値は、抗体添加の直前の時点のセルインデックス値を1として定義した正規化値であった。

30

40

$$\text{細胞増殖抑制率 (\%)} = (A - B) \times 100 / (A - 1)$$

Aは、抗体を添加していないウェル（標的細胞およびヒトPBMCのみを含有する）におけるセルインデックス値の平均値を表し、Bは、標的ウェルのセルインデックス値の平均値を

50

表す。試験は三連で実施した。

【0203】

上記の実施例でのように、親和性成熟バリエーションを2プレートに分け、GPC3/H1643L581を、図1.3における参照のために内部プレート対照とした。大部分のバリエーションは同様のTDCC活性を示すが、両方のプレートにおいて、バリエーションのうち、H1643L581が、0.56 nMおよび1.67 nMのより低い濃度で相対的に強いTDCC活性を示したことを観察することができる。0.56 nMの濃度で、図1.3aは、GPC3/H2591L581が相対的に弱いことを示し、他方、図1.3bは、GPC3/H1610L939が相対的に弱いことを示した。

【0204】

2.3.3. 抗GPC3親和性成熟Dual-Fab三重特異性抗体を用いたサイトカイン放出の測定

抗体のインビトロ効力をさらに確認するために、それらをまた、サイトカイン放出についても評価した。実施例2.3.2において同様に実施したTDCCアッセイ由来の48時間での上清を採取して、サイトカインの存在について評価した。大部分の抗体は、図1.1におけるGPC3/CD3εと同様のCD3アゴニスト活性を示すため、GPC3/CD3εをこのアッセイに加えて、CD137との相乗活性の結果としてのサイトカイン放出を評価した。同様に、GPC3/H1643L581を、内部プレート対照として用いた。総サイトカイン放出を、cytometric bead array (CBA) Human Th1/T2 Cytokine kit II (BD Biosciences # 551809) を用いて評価した。IFNγ (図1.3c)、IL-2 (図1.3d)、およびIL-6 (図1.3e) を評価した。

【0205】

図1.3cおよび1.3dに示すように、GPC3/H2591L581およびGPC3/H1643L581は、プレート1において5 nMおよび1.67 nMで高いIFNγおよびIL-2をもたらした上位2バリエーションである。プレート2において、GPC3/H1610L939、GPC3/H2594L581、およびGPC3/H1643L581は、5 nMで相対的に強いサイトカイン放出を示す。しかし、GPC3/H1643L581のみが、1.67 nMでより強いサイトカイン放出を示す。図1.3eに示すIL-6レベルについて言うと、0.56 nMおよび0.19 nMでより低いIL-6のレベルを示したGPC3/H2591L581以外は、すべてのバリエーションが、プレート1におけるGPC3/CD3εと同様のレベルを示した。同様にプレート2においては、すべてのバリエーションが、GPC3/H1643L581と同様のサイトカイン放出レベルを示す。まとめると、Dual Fabバリエーションは、IL-6レベルを有意に増加させることなく、GPC3/CD3εと比較して改善されたIFNγおよびIL-2を示すことができる。

【0206】

まとめると、親和性成熟バリエーションは、サイトカイン放出に対応するTDCC活性を惹起することができる、より強いCD137アゴニスト活性を示す。特に、バリエーションは、GPC3/CD3εと比べて改善されたIFNγおよびIL-2のレベルを示した。

【0207】

[実施例3] GPC3/CD3/ヒトCD137 (2+1) 三重特異性抗体および抗GPC3/Dual (1+1) 三重特異性抗体のオフターゲット細胞傷害活性の評価

3.1. 抗GPC3/CD137xCD3 (2+1) 三重特異性抗体の調製

標的非依存性の細胞傷害活性およびサイトカイン放出を調べるために、CrossMabおよびFAEテクノロジーを利用することによって、三重特異性抗体を生成した (図2.1および2.2)。各アームが2つの結合ドメインを有し、その結果、1つの分子中に4つの結合ドメインを有する四価IgG様分子である抗体A (mAb A) を、上述のようなCrossMabで生成した。二価IgGである抗体B (mAb B) は、従来のIgGと同じ形式である。mAb AおよびmAb Bの両方のFc領域は、Fcγ受容体に対する親和性が減弱したサイレントなFcγRであり、脱グリコシル化され、かつFAEに適用可能である。6つの三重特異性抗体を構築した。6つの三重特異性抗体における各Fv領域の標的抗原を、表2.1に示す。mAb A、mAb B、およびmAb ABの結合ドメインの各々の命名規則を、図2.2に示す。それぞれの

三重特異性抗体であるmAb ABを生成するためのmAb AとmAb Bのペア、およびその配列番号を、表2.2および表2.2に示す。WO2005/035584A1に記載された抗体CD3D(2)_i121 (AN121と省略される)を、抗CD3抗体として用いた。表2に記載された三重特異性抗体を、上記の方法によって発現させ、精製した。

【0208】

【表2.1】

抗体の各アームの標的

mAb AB名	Fv A1	Fv A2	Fv B
GPC3/CD137xCD3	抗 CD137	抗 CD3ε	抗 GPC3
Ctrl/CD137xCD3	抗 CD137	抗 CD3ε	Ctrl

10

【0209】

【表2.2】

表2.1に記載の抗体の各可変配列の配列番号

mAb AB名	mAb ABを生成するためのmAb A名	VHA1 (配列番号)	VLA1 (配列番号)	VHA2 (配列番号)	VLA2 (配列番号)	mAb ABを生成するためのmAb B名	VHB (配列番号)	VLB (配列番号)
GPC3/CD137xCD3	CD137xCD3	202	203	204	205	GPC3	206	207
Ctrl/CD137xCtrl	CD137xCtrl	202	203	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl

【0210】

【表2.3】

表2.1および2.2に記載の抗体の可変領域のアミノ酸配列

VH/VL名	アミノ酸配列
CD137VH (配列番号 202)	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPE KGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSVTA ADTAVYYCARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVSS
CD137VL (配列番号 203)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYDASNRRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYCQQ RSNWPPALTFGGGTKVEIK
CD3VH (配列番号 204)	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAWMHWWVRQAP KGLEWVVAQIKDRANSYNTYYAESVKGRFTISRDDSKNSIYLQ MNSLKTEDTAVYYCRYVHYTTYAGSSFSGVDWVGQGTTVTV SS
CD3VL (配列番号 205)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTYLHWYQQ KPGQAPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCGQGTQVPYTFGQGTKEIK
GPC3VH (配列番号 206)	QVQLVQSGAEVKKPGASVTVSCKASGYTFTDYEMHWIRQPP GEGLEWIGAIDGPTPDYAYSEKFKGRVTLTADKSTSTAYMELSSL TSEDVAVYYCTRFYSYTWGQGTTLTVSS
GPV3VL (配列番号 207)	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTYLHWYQQ KPGQAPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED VGVYYCGQGTQVPYTFGQGTKEIK

30

【0211】

3.2. GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体の結合の評価

三重特異性抗体のヒトCD3およびCD137に対する結合親和性を、Biacore T200機器 (GE Healthcare) を用いて37℃で評価した。抗ヒトFc抗体 (GE Healthcare) を、アミンカップリングキット (GE Healthcare) を用いてCM4センサーチップのすべてのフローセル上に固定化した。抗Fcセンサー表面上に抗体を捕捉し、次いで、組換えヒトCD3またはCD137を、フローセル上にインジェクトした。すべての抗体およびアナライトは、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃を含有するACES pH 7.4において調製した。センサー表面は、サイクル毎に3M MgCl₂で再生させた。結合親

50

和性は、Biacore T200 Evaluation software, version 2.0 (GE Healthcare) を用いて、データをプロセシングし、1:1結合モデルにフィットさせることによって決定した。

【0212】

三重特異性抗体の組換えヒトCD3およびCD137に対する結合親和性を、表2.4に示す。

【0213】

【表2.4】

Biacoreにより測定した、表2.1に記載の三重特異性抗体の、ヒトCD137またはCD3に対する結合親和性

抗体名	CD137			CD3		
	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	KD (M)
GPC3/CD137xCD3	5.47E+05	2.06E-02	3.77E-08	8.18E+04	1.61E-03	1.97E-08
Ctrl/CD137xCD3	5.48E+05	1.82E-02	3.31E-08	8.24E+04	1.52E-03	1.85E-08

【0214】

3.3. GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fab三重特異性抗体のヒトCD137発現細胞に対するオフターゲット細胞傷害活性の評価

2+1形式の三重特異性抗体GPC3/CD137xCD3、GPC3/CtrlxCD3、または親Dual-Fab H183L072に由来する1+1形式のGPC3/H183L072は、標的細胞であるGPC3を発現するSK-pca60の存在下でJurkat細胞の用量依存的活性化をもたらした（参考実施例15-5；図28）。2+1形式の三重特異性形式のみが、hCD137を発現するCHOの存在下でJurkat細胞活性化をもたらしたが、GPC3/H183L072を用いた1+1形式の三重特異性形式はもたらさなかったこともまた、示された（参考実施例15-6；図29）。これは、2+1形式が、T細胞の腫瘍抗原非依存性活性化を潜在的にもたらし得ることを示唆した。

【0215】

H183L072の親和性成熟が、潜在的なオフターゲット細胞傷害活性をもたらし得るかどうかを調べるために、hCD3発現Jurkat細胞をhCD137発現CHO細胞と共培養し、三重特異性2+1抗体形式に対して比較する同じ評価に、親和性成熟バリエーションを供した。 5.0×10^3 細胞/ウェルのhCD137発現CHO（図2.3b）または親CHO（図2.3a）を、0.5、5、および50 nMの三重特異性抗体の存在下で24時間、 2.5×10^4 個のNFAT-luc2 Jurkat細胞と共培養した。図2.3aは、親CHO細胞と共培養した場合に、すべての三重特異性抗体によりJurkat細胞の非特異的活性化がないことを示した。しかし、GPC3/CD137xCD3およびCtrl/CD137xCD3は両方とも、hCD137発現CHO細胞の存在下でJurkat細胞を活性化できることが観察された。1+1形式の親和性成熟バリエーションは、hCD137発現CHO細胞と共培養した場合にJurkat細胞の活性化をもたらさなかった。まとめると、これは、三重特異性形式GPC3/CD137xCD3は、CD137結合の親和性成熟後でさえもGPC3/Dual（1+1）形式のものとは異なり、標的または腫瘍抗原の結合とは独立して、Jurkat細胞活性化をもたらし、オフターゲット細胞傷害活性を生じ得ることを示唆する。

【0216】

3.4. GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体およびGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体のPBMCからのオフターゲットサイトカイン放出の評価

オフターゲット毒性についての三重特異性形式の比較をまた、ヒトPBMC溶液を用いて評価した。簡潔に述べると、実施例2.3.1に記載されるように調製された 2.0×10^5 個のPBMCを、標的細胞の非存在下で、80、16、および3.2 nMの三重特異性抗体と48時間インキュベートした。IL-2はいずれの抗体によっても検出されなかったため、上清におけるIL-6、IFN γ 、およびTNF α のレベルを、図2.4a~2.4cに示す。サイトカイン放出の測定を、実施例2.3.3に記載されるものと同様に実施した。実施例2と同様に

、親和性成熟バリエーションを2プレートに分けた。図2.4に示すように、GPC3/CD137xCD3は、PBMCからのIFN γ (図2.4a)、TNF α (図2.4b)、およびIL-6 (図2.4c)の放出をもたらしたが、抗GPC3/Dual-Fabはもたらさなかった。これらの結果は、GPC3/CD137xCD3三重特異性形式が、標的細胞の非存在下でPBMCの非特異的活性化をもたらしたことを示唆する。最後に、データは、Dual-Fab三重特異性1+1形式が、オフターゲット毒性を伴わずに標的特異的エフェクター細胞活性化を付与できることを示した。

【0217】

〔実施例4〕 GPC3/CD3 ϵ 二重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fab (1+1) 三重特異性抗体のインビボ有効性の評価

4.1. 抗GPC3/Dual-Fab、GPC3/CD3 ϵ 、およびGPC3/CD137二重特異性抗体の調製
インビボ有効性研究のための抗体を、実施例1.3に記載されるように生成した。実施例1において用いた抗GPC3/Dual-FabおよびGPC3/CD3 ϵ に加えて、抗CD137抗体を、実施例1.3においてFAEが実施される前に実施例1.1において生成された抗体 (表1.1) のように、二価形態として生成して、GPC3/CD137を取得した。ヒト化huNOGマウス研究について言うと、抗体は、Fc γ 受容体に対する親和性が減弱したヒトFcを含む。これに対して、CD137/CD3ダブルヒト化マウス研究のためには、抗体は、Fc γ 受容体に対する親和性が減弱したマウスFcを含む。

【0218】

4.2. CD137/CD3ダブルヒト化マウスの生成

ヒトCD137ノックイン (KI) マウス株を、マウス胚性幹細胞を用いてマウス内在性Cd137ゲノム領域をヒトCD137ゲノム配列で置き換えることによって生成した。ヒトCD3 EDG置換マウスは、CD3複合体の3つの成分CD3e、CD3d、およびCD3gがすべて、そのヒトカウンターパートCD3E、CD3D、およびCD3Gで置き換えられている株として確立された (Scientific Rep. 2018; 8: 46960)。CD137/CD3ダブルヒト化マウス株を、ヒトCD137 KIマウスをヒトCD3 EDG置換マウスと交配することによって確立した。

【0219】

4.3. LLC1/hGPC3細胞株の調製

マウスがん細胞株LL/2 (LLC1) (ATCC) に、pCXND3-hGPC3をトランスフェクトし、500 μ g/ml G418での単細胞クローン単離を行った。選択されたクローン (LLC1/hGPC3) の、hGPC3の発現を確認した。

【0220】

4.4. hCD3/hCD137マウスでの抗GPC3/Dual-Fab三重特異性抗体のインビボ有効性の評価

実施例4.1において調製された抗体を、そのインビボ有効性について担腫瘍モデルを用いて評価した。

インビボ有効性評価のために、以下「hCD3/hCD137マウス」と呼ばれる、実施例4.2において確立されたCD3/CD137ダブルヒト化マウスを用いた。

ヒトGPC3の安定な発現を有するLLC1/hGPC3細胞を、hCD3/hCD137マウス中に移植して、腫瘍形成が確認されたhCD3/hCD137マウスを、GPC3/H1643L0581、GPC3/CD137、またはGPC3/CD3 ϵ 抗体の投与によって処置した。

【0221】

より具体的には、LLC1/hGPC3モデルを用いたGPC3/H1643L0581の薬物有効性試験において、下記の試験を行った。LLC1/hGPC3 (1×10^6 細胞) を、hCD3/hCD137マウスの鼠径部皮下領域中に移植した。移植の日を、0日目と定義した。移植後9日目に、マウスを、その体重および腫瘍サイズに従ってランダム化して群に分けた。ランダム化の日に、GPC3/H1643L0581、GPC3/CD137、またはGPC3/CD3 ϵ 抗体を、6 mg/kgで尾静脈を通して静脈内投与した。併用療法群は、6 mg/kgのGPC3/CD3 ϵ および6 mg/kgのGPC3/CD137抗体で処置した。抗体は、1回のみ投与した。腫瘍体積および体重を、3~4日毎に抗腫瘍試験システム (ANTES version 7.0.0.0) で測定した。

10

20

30

40

50

【0222】

結果として、抗腫瘍活性は、GPC3/CD3 ϵ 群およびGPC3/CD137群よりもGPC3/H1643L0581群において、より明らかに観察された（図3.1a）。

別のインビボ有効性評価において、LLC/hGPC3細胞を、hCD3/hCD137マウスの右側腹部中に移植した。9日目に、マウスを、その腫瘍体積および体重に基づいてランダム化して群に分け、ビヒクルまたは実施例4.1において調製された抗体をi.v.注射した。腫瘍体積を、週2回測定した。IL-6解析のために、処置の2時間後にマウスから採血した。血漿サンプルを、Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Th1 Panelにより製造業者のプロトコールに従って解析した。図3.1bおよび3.1cに示すように、GPC3/Dual群は、GPC3/CD3 ϵ 群と比較してより強い抗腫瘍活性、およびより少ないIL-6産生を示した。

10

【0223】

4.5. HuNOGマウスでの抗GPC3/Dual-Fab三重特異性抗体のインビボ有効性の評価

実施例4.1において調製された抗GPC3/Dual-Fab抗体、GPC3/CD3 ϵ 二重特異性抗体、およびGPC3/CD137二重特異性抗体の抗腫瘍活性を、sk-pca-13aヒト肝がんモデルにおいて試験した。GPC3/CD3 ϵ 二重特異性抗体をまた、GPC3/CD137二重特異性抗体との組み合わせでも試験した。sk-pca-13a細胞を、NOGヒト化マウスの皮下に移植した。

sk-pca-13a細胞株を取得するためには、ヒトGPC3遺伝子を、当業者によく知られている方法によってヒト肝臓腺がん細胞株SK-HEP-1（ATCC No. HTB-52）の染色体中に組み込んだ。

【0224】

20

NOG雌マウスを、In-Vivo Scienceから購入した。ヒト化のために、マウスを、亜致死的に放射線照射し、続いて1日後に、100,000個のヒト臍帯血細胞（ALLCELLS）を注射した。16週間後に、sk-pca-13a細胞（ 1×10^7 細胞）をMatrigel（商標） Basement Membrane Matrix（Corning）と混合して、ヒト化NOGマウスの右側腹部に移植した。移植の日を、0日目と定義した。19日目に、マウスに、腫瘍体積および体重に基づいてランダム化して、ビヒクル（0.05% Tweenを含有するPBS）、5 mg/kg GPC3/CD3 ϵ 、5 mg/kg GPC3/H1643L0581、または5 mg/kg GPC3/CD3 ϵ と5 mg/kg GPC3/CD137との組み合わせのいずれかをi.v.注射した。

【0225】

結果として、抗GPC3/Dual-Fab（GPC3/H1643L0581）は、GPC3/CD3 ϵ よりも強い抗腫瘍活性を示した（図3.2）。

30

【0226】

【実施例5】 H0868L0581/hCD137複合体のX線結晶構造解析

5.1. 共結晶解析のための抗体の調製

H0868L0581を、hCD137タンパク質との共結晶解析のために選択した。二価抗体を、Expi293 Expression system（Thermo Fisher Scientific）を用いて一過性にトランスフェクトし、発現させた。培養上清を採取し、MabSelect SuRe親和性クロマトグラフィー（GE Healthcare）およびその後のSuperdex200（GE Healthcare）を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、抗体を上清から精製した。

【0227】

40

5.2. ヒトCD137の細胞外ドメイン（24～186）の発現および精製

第Xa因子切断可能リンカーを介してFcに融合したヒトCD137の細胞外ドメイン（CD137-FFc、配列番号：81）を、キフネンシンの存在下でHEK293細胞において発現させた。培養培地由来のCD137-FFcを、親和性クロマトグラフィー（HiTrap MabSelect SuRe column, GE Healthcare）およびサイズ排除クロマトグラフィー（HiLoad 16/600 Superdex 200 pg column, GE healthcare）によって精製した。Fcを第Xa因子で切断して、結果として生じたCD137細胞外ドメインを、タンデムに接続されたゲル濾過カラム（HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, GE healthcare）およびプロテインAカラム（HiTrap MabSelect SuRe 1ml, GE Healthcare）でさらに精製し、その後、Benzamidin Sepharose樹脂（GE Healthcare）を用いて精製した。CD137細胞外ドメインを含有す

50

る画分をプールして、-80℃で保管した。

【0228】

5.3. H0868L0581および抗CD137対照抗体のFab断片の調製

結晶構造解析のための抗体を、Expi293 Expression system (Thermo Fisher Scientific) を用いて一過性にトランスフェクトし、発現させた。培養上清を採取し、MabSelect SuRe親和性クロマトグラフィー (GE Healthcare) およびその後のSuperdex200 (GE Healthcare) を用いたゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、抗体を上清から精製した。H0868L0581および公知の抗CD137対照抗体 (以下137Ctrlと呼ばれる、重鎖は配列番号: 82、軽鎖は配列番号: 83) のFab断片を、Lys-C (Roche) での制限消化と、それに続く、Fc断片を除去するためのプロテインAカラム (MabSelect SuRe, GE Healthcare)、カチオン交換カラム (HiTrap SP HP, GE Healthcare)、およびゲル濾過カラム (Superdex200 16/60, GE Healthcare) 上へのローディングを用いた、従来の方法によって調製した。Fab断片を含有する画分をプールして、-80℃で保管した。

【0229】

5.4. H0868L0581 Fab、137Ctrl、およびヒトCD137複合体の調製

精製されたCD137を、脱グリコシル化のためにGST-タグ融合エンドグリコシダーゼF1 (社内) と混合し、続いて、ゲル濾過カラム (HiLoad 16/600 Superdex 200 pg, GE healthcare) およびプロテインAカラム (HiTrap MabSelect SuRe 1ml, GE Healthcare) を用いたCD137の精製を行った。精製されたCD137を、H0868L0581 Fabと混合した。複合体を、ゲル濾過カラム (Superdex 200 Increase 10/300 GL, GE healthcare) によって精製し、その後、精製されたH0868L0581 FabおよびCD137複合体を、137Ctrlと混合した。三成分複合体を、25 mM HEPES pH7.3、100 mM NaClで平衡化されたカラムを用いたゲル濾過クロマトグラフィー (Superdex200 10/300 increase, GE Healthcare) によって精製した。

【0230】

5.5. 結晶化

精製された複合体を、約10 mg/mLまで濃縮し、21℃でのシッティングドロップ蒸気拡散法によって結晶化を実施した。リザーバー溶液は、0.1Mトリス塩酸塩 pH8.5、25.0% v/vポリエチレングリコールモノメチルエーテル550からなった。

【0231】

5.6. データ収集および構造決定

X線回折データを、SLSでのX06SAによって測定した。測定の最中には、結晶を、-178℃の窒素流に常に置いて凍結状態に維持し、結晶を一回に0.25度回転させながら、ビームラインに付属したEiger X16M (DECTRIS) を用いて合計で1440枚のX線回折画像を収集した。セルパラメータの決定、回折スポットの指数付け、および回折画像から得られた回折データのプロセッシングは、autoPROC program (Acta. Cryst. 2011, D67: 293-302)、XDS Package (Acta. Cryst. 2010, D66: 125-132)、およびAIMLESS (Acta. Cryst. 2013, D69: 1204-1214) を用いて行い、最終的に、最大で3.705オングストローム解像度の回折強度データが得られた。結晶学データの統計を、表2.5に示す。

構造を、プログラムPhaserでの分子置換によって決定した (J. Appl. Cryst. 2007, 40: 658-674)。検索モデルは、公開された結晶構造 (PDBコード: 4NKIおよび6MI2) に由来した。モデルは、Cootプログラム (Acta Cryst. 2010, D66: 486-501) で作り、プログラムRefmac5 (Acta Cryst. 2011, D67: 355-367) およびPHENIX (Acta Cryst. 2010, D66: 213-221) で精密化した。77.585~3.705オングストロームの回折強度データについての結晶学的信頼度因子 (R) は、22.33%であり、フリーR値は27.50%であった。構造精密化の統計を、表2.5に示す。

【0232】

10

20

30

40

50

【表 2 . 5】

X線データ収集および精密化の統計

データ収集	
空間群	C2
単位格子	
a, b, c (Å)	233.795, 74.019, 81.986
α, β, γ (°)	90.000, 108.858, 90.000
解像度 (Å)	77.585–3.705
全反射	99,488
ユニークな反射	14,221
完全性 (最高解像度シェル) (%)	99.2 (99.7)
$R_{\text{マージ}}^a$ (最高解像度シェル)	0.161 (1.052)
精密化	
解像度 (Å)	48.822–3.705
反射	14,195
R 因子 ^b ($R_{\text{フリー}}^c$) (%)	22.33 (27.50)
rms 理想からの偏差	
結合長 (Å)	0.003
結合角 (°)	0.618

$$a; R_{\text{マージ}} = \frac{\sum hkl \sum j |I_j(hkl) - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum hkl \sum j |I_j(hkl)|}$$

式中、 $I_j(hkl)$ および $\langle I(hkl) \rangle$ は、それぞれ、指数 hkl に関する測定値 j の強度および反射の平均強度である。

$b; R$ 因子 = $\frac{\sum hkl |F_{\text{calc}}(hkl) - F_{\text{obs}}(hkl)|}{\sum hkl |F_{\text{obs}}(hkl)|}$ 式中、 F_{obs} および F_{calc} は、それぞれ、観察された構造因子の振幅および算出された構造因子の振幅である。

$c; R_{\text{フリー}}$ は、ランダムに留保される5%の反射で算出される。

【0 2 3 3】

5 . 7 . H0868L0581 FabおよびCD137の相互作用部位の特定

H0868L0581 Fab、137Ctrl、およびCD137の三成分複合体の結晶構造を、3.705 オングストローム解像度で決定した。図3 . 3 aおよび3 . 3 bでは、H0868L0581 Fab 接触領域のエピトープを、それぞれCD137アミノ酸配列においておよび結晶構造においてマッピングしている。エピトープは、結晶構造においてH0868L0581 Fabの任意の部分から4.5オングストロームの距離内に位置する1個または複数個の原子を含有するCD137のアミノ酸残基を含む。加えて、3.0オングストローム内のエピトープを、図3 . 3 aおよび3 . 3 bにおいて強調表示している。

【0 2 3 4】

図3 . 3 aおよび3 . 3 bに示すように、結晶構造により、H0868L0581 Fabの重鎖と軽鎖との間に形成されるポケットに結合したCD137のCRD1におけるL24～N30、特にL24～S29が、CD137のN末端がポケットの深部に対して方向付けられる様式で深く埋められていることが示された。加えて、CD137中のCRD1におけるN39～I44およびCRD2におけるG58～I64が、H0868L0581 Fabの重鎖CDRによって認識された。CRDとは、W02015/156268に記載されているようにCRD参照と呼ばれる、Cys-Cysにより形成される構造によって隔てられるドメインの名称である。

【0 2 3 5】

本発明者らは、ヒトCD137のN末端領域、特にL24～N30を認識する抗ヒトCD137抗体を特定し、この領域に対する抗体が細胞上のCD137を活性化できることもまた特定した。

10

20

30

40

50

【0236】

【参考実施例1】 dual FabファージディスプレイライブラリーからのCD3εおよびヒトCD137に結合するFabドメインの取得

1. 1. GLS3000軽鎖を伴う重鎖ファージディスプレイライブラリーの構築

参考実施例12において合成された抗体ライブラリー断片を用いて、ファージディスプレイのためのdual Fabライブラリーを構築した。dualライブラリーは、H鎖は参考実施例12に示すように多様化しているが、L鎖は元の配列GLS3000（配列番号：85）に固定したライブラリーとして調製した。FR（フレームワーク）にV11L/L78I変異を加えること、および（参考実施例12中の）表27に示すようにCDRをさらに多様化させることによってCE115HA000から生じたH鎖ライブラリー配列を、DNA合成会社であるDNA2.0, Inc.に委託して、抗体ライブラリー断片（DNA断片）を取得した。得られた抗体ライブラリー断片を、PCRによって増幅されたファージディスプレイ用ファージミドに挿入した。GLS3000を、L鎖としては選択した。構築されたファージディスプレイ用ファージミドを、エレクトロポレーションによって大腸菌へ移入して、抗体ライブラリー断片を保有する大腸菌を調製した。

【0237】

Fabドメインを提示するファージライブラリーを、構築されたファージミドを保有する大腸菌から、FkpAシャペロン遺伝子をコードするヘルパーファージM13KO7TC/FkpAの感染によって産生させ、次いで、0.002%アラビノースの存在下、25℃で（このファージライブラリーをDAライブラリーと名づける）、または0.02%アラビノースの存在下、20℃で（このファージライブラリーをDXライブラリーと名づける）一晩インキュベートした。M13KO7TCは、ヘルパーファージ上のpIIIタンパク質のN2ドメインとCTドメインとの間にトリプシン切断配列のインサートを有するヘルパーファージである（国際特許出願の国内公表番号2002-514413参照）。M13KO7TC遺伝子中へのインサート遺伝子の導入は、既に他所で開示されている（国際特許出願番号WO2015046554の国内公表参照）。

【0238】

1. 2. ダブルラウンド選択でのCD3εおよびヒトCD137に結合するFabドメインの取得

CD3εおよびヒトCD137に結合するFabドメインを、参考実施例1.1において構築されたdual Fabライブラリーから同定した。ビオチン標識されたCD3εペプチド抗原（アミノ酸配列：配列番号：86）、ジスルフィド結合リンカーを通してビオチン標識されたCD3εペプチド抗原（図4、C3NP1-27と呼ばれる；アミノ酸配列：配列番号：194、GenScriptが合成）、ビオチン標識されたヒトIgG1 Fc断片に融合したヒトCD137（ヒトCD137-Fcと名づける）、およびss-ビオチン化されたヒトIgG1 Fc断片に融合したヒトCD137（ss-ヒトCD137-Fcと名づける）を、抗原として用いた。ss-ヒトCD137-Fcは、ヒトIgG1 Fc断片に融合したヒトCD137に対してEZ-Link Sulfo-NHS-SS-Biotinylation Kit（PIERCE, カタログ番号21445）を用いることによって調製した。ビオチン化は、取扱説明書に従って実施した。

【0239】

構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保有する大腸菌から、ファージを産生させた。2.5 M NaCl/10% PEGを、ファージを産生した大腸菌の培養液に添加し、沈殿したファージのプールをTBSで希釈して、ファージライブラリー溶液を取得した。次に、BSA（最終濃度：4%）を、ファージライブラリー溶液に添加した。パニング法は、磁気ビーズ上に固定化された抗原を用いた一般的なパニング法を参照して行った（J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9; J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203; Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20; およびMol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9）。用いた磁気ビーズは、NeutrAvidinコーティングビーズ（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）またはストレプトアビジンコーティングビーズ（Dynabeads M-280 Streptavidin）であった。磁気ビーズ自体またはヒトIgG1 Fc領域に結合する抗体を提示するファージを排除するために、磁気ビーズおよびビオチン標識されたヒトFcについてのサブトラクションを実施した。

【0240】

具体的には、ファージ溶液を、250 pmolのヒトCD137-Fcおよび4 nmolのフリーのヒトIgG1 Fcドメインと混合して、室温で60分間インキュベートした。磁気ビーズを、フリーのストレプトアビジン（Roche）を含む2%スキムミルク/TBSによって室温で60分間以上ブロッキングして、TBSで3回洗浄し、次いで、インキュベートされたファージ溶液と混合した。室温で15分間のインキュベーション後に、ビーズを、TBST（0.1% Tween 20を含有するTBS；TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった）で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。5 μ Lの100 mg/mLトリプシンおよび495 μ LのTBSを添加し、室温で15分間インキュベートし、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。株を37°Cで1時間静かに攪拌培養することを通して、大腸菌株にファージを感染させた。感染した大腸菌を、225 mm $\times$ 225 mmのプレートに接種した。次に、接種した大腸菌の培養液からファージを回収して、ファージライブラリー溶液を調製した。

10

【0241】

このパニングラウンド1手順において、ヒトCD137に結合する抗体を提示するファージが濃縮された。パニングの第2ラウンドにおいては、250 pmolのss-ヒトCD137-Fcを、ビオチン標識された抗原として用い、洗浄は、TBSTで3回、次いでTBSで2回実施した。溶出は、25 mM DTTで、室温で15分間実施し、次いでトリプシンによって消化した。

パニングの第3ラウンドおよび第6ラウンドにおいては、62.5 pmolのC3NP1-27を、ビオチン標識された抗原として用い、洗浄は、TBSTで3回、次いでTBSで2回実施した。溶出は、25 mM DTTで、室温で15分間実施し、次いでトリプシンによって消化した。

20

パニングの第4、第5、および第7ラウンドにおいては、62.5 pmolのss-ヒトCD137-Fcを、ビオチン標識された抗原として用い、洗浄は、TBSTで3回、次いでTBSで2回実施した。溶出は、25 mM DTTで、室温で15分間実施し、次いでトリプシンによって消化した。

【0242】

1. 3. ファージによって提示されたFabドメインの、CD3 ϵ またはヒトCD137に対する結合

ファージを含有する培養上清を、上記の方法によって得られた大腸菌の各96シングルコロニーから、一般的な方法（Methods Mol. Biol. (2002) 178, 133-145）に従って回収した。ファージを含有する培養上清を、以下の手順によってELISAに供した：ストレプトアビジンコーティングマイクロプレート（384ウェル, Greiner, カタログ番号781990）を、ビオチン標識された抗原（ビオチン標識されたCD3 ϵ ペプチドまたはビオチン標識されたヒトCD137-Fc）を含有する10 μ LのTBSで、4°Cで一晩または室温で1時間コーティングした。プレートの各ウェルをTBSTで洗浄して、結合していない抗原を除去した。次いで、ウェルを、80 μ LのTBS/2%スキムミルクで1時間以上ブロッキングした。TBS/2%スキムミルクの除去後に、調製された培養上清を各ウェルに添加し、ファージに提示された抗体が各ウェルに含有される抗原に結合するように、室温で1時間、プレートを放置した。各ウェルをTBSTで洗浄し、次いで、HRP/Anti M13（GE Healthcare 27-9421-01）を各ウェルに添加した。プレートを1時間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、TMB single solution（ZYMED Laboratories, Inc.）をウェルに添加した。各ウェルにおける溶液の発色反応を、硫酸の添加によって終了させた。次いで、発色を、450 nmでの吸光度に基づいてアッセイした。結果を図5に示す。

30

40

図5に示すように、クローンはすべて、ヒトCD3 ϵ に対する結合を示したが、ヒトCD137に対するパニング手順を5回実施したにもかかわらず、ヒトCD137に対する結合を示さなかった。これは、ストレプトアビジンコーティングマイクロプレートでのこのファージELISA解析の感受性がより低いことに依存している可能性があり、したがって、ストレプトアビジンコーティングビーズでのファージELISAもまた実施した。

【0243】

1. 4. ファージによって提示されたFabドメインの、ヒトCD137に対する結合（ファ

50

ージビーズELISA)

最初に、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズであるMyOne-T1ビーズを、0.5x block Ace、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300を含むブロッキング緩衝液で3回洗浄し、次いで、このブロッキング緩衝液で、室温で60分間以上ブロッキングした。TBSTで1回洗浄した後、0.625 pmolのss-ヒトCD137-Fcを磁気ビーズに添加して、室温で10分間以上インキュベートし、次いで、磁気ビーズを、96ウェルプレート (Corning, 3792 黒色丸底PSプレート) の各ウェルにアプライした。各々12.5 μ LのFabを提示するファージ溶液を、12.5 μ LのTBSとともにウェルに添加し、各Fabを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で30分間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。0.5x block Ace、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300を含むブロッキング緩衝液で希釈した抗M13(p8) Fab-HRPを、各ウェルに添加した。プレートを10分間インキュベートした。TBSTで3回洗浄した後、LumiPhos-HRP (Lumigen) を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を図6に示す。

【0244】

いくつかのクローンは、ヒトCD137に対する明らかな結合を示した。この結果は、ヒトCD3 ϵ およびCD137の両方に結合するいくつかのFabドメインがまた、ファージディスプレイパニング戦略で、この設計されたライブラリーから取得されたことを示した。それでもなお、ヒトCD137に対する結合は、CD3 ϵ ペプチドと比較してまだ弱かった。各々のヒトCD137結合クローンのVH断片を、ファージミドベクターに特異的に結合するプライマー (配列番号: 196および197) を用いたPCRによって増幅して、DNA配列を解析した。結果は、結合クローンがすべて、同じVH配列を有することを示し、これは、1つのFabクローンのみが、ヒトCD137およびCD3 ϵ の両方に対する結合を示したことを意味した。これを改善するために、次の実験において、ダブルラウンド選択をまたファージディスプレイ戦略に適用した。

【0245】

【参考実施例2】ダブルラウンド選択法でのdual Fabファージディスプレイライブラリーからの、CD3 ϵ およびヒトCD137に結合するFabドメインの取得

2. 1. GLS3000軽鎖を伴う重鎖ファージディスプレイライブラリーの構築

Fabドメインを提示するファージライブラリーを、構築されたファージミドを保有する大腸菌から、FkpAシャペロン (配列番号: 91) をコードするヘルパーファージM13K07TC/FkpAの感染によって産生させ、次いで、0.002%アラビノースの存在下、25°Cで (このファージライブラリーをDAライブラリーと名づける)、または0.02%アラビノースの存在下、20°Cで (このファージライブラリーをDXライブラリーと名づける) 一晚インキュベートした。M13K07TCは、ヘルパーファージ上のpIIIタンパク質のN2ドメインとCTドメインとの間にトリプシン切断配列のインサートを有するヘルパーファージである (日本特許出願公表番号2002-514413参照)。M13K07TC遺伝子中へのインサート遺伝子の導入は、既に他所で開示されている (WO2015/046554参照)。

【0246】

2. 2. ダブルラウンド選択での、CD3 ϵ およびヒトCD137に結合するFabドメインの取得

CD3 ϵ およびヒトCD137に結合するFabドメインを、参考実施例2. 1. において構築されたdual Fabライブラリーから同定した。ビオチン標識されたCD3 ϵ ペプチド抗原 (アミノ酸配列: 配列番号: 86)、ジスルフィド結合リンカーを通してビオチン標識されたCD3 ϵ ペプチド抗原 (C3NP1-27: 配列番号: 194)、およびビオチン標識されたヒトIgG1 Fc断片に融合したヒトCD137 (ヒトCD137-Fcと名づける) を、抗原として用いた。

【0247】

ヒトCD137およびCD3 ϵ に結合するずっとより多くのFabドメインを作製するために、ダブルラウンド選択をまた、ファージディスプレイパニングに、パニングラウンド2およ

10

20

30

40

50

びその後のラウンドで適用した。

構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保有する大腸菌から、ファージを産生させた。2.5 M NaCl/10% PEGを、ファージを産生した大腸菌の培養液に添加し、沈殿したファージのプールをTBSで希釈して、ファージライブラリー溶液を取得した。次に、BSA（最終濃度：4%）を、ファージライブラリー溶液に添加した。パニング法は、磁気ビーズ上に固定化された抗原を用いた一般的なパニング法を参照して行った（J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9；J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203；Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20；およびMol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9）。用いた磁気ビーズは、NeutrAvidinコーティングビーズ（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）またはストレプトアビジンコーティングビーズ（Dynabeads M-280 Streptavidin）であった。磁気ビーズ自体またはヒトIgG1 Fc領域に結合する抗体を提示するファージを排除するために、磁気ビーズおよびビオチン標識されたヒトFcについてのサブトラクションを実施した。

【0248】

具体的には、パニングラウンド1で、磁気ビーズを、2%スキムミルク/TBSによって室温で60分間以上ブロッキングして、TBSで3回洗浄した。DAライブラリーまたはDXライブラリーのファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。500 pmolのビオチン標識されたヒトIgG1 Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。500 pmolのビオチン標識されたCD137-Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、8 nmolのフリーのヒトIgG1 Fcドメインも添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。

【0249】

ビーズを、TBST（0.1% Tween 20を含有するTBS；TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった）で2回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで1回洗浄した。0.5 mLの1 mg/mLトリプシンの添加後に、ビーズを室温で15分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。回収されたファージ溶液を、対数増殖期（OD600：0.4～0.5）の大腸菌株ER2738に添加した。株を37℃で1時間静かに攪拌培養することを通して、大腸菌株にファージを感染させた。感染した大腸菌を、225 mm×225 mmのプレートに接種した。次に、接種した大腸菌の培養液からファージを回収して、ファージライブラリー溶液を調製した。

【0250】

このパニングラウンド1手順において、ヒトCD137に結合する抗体を提示するファージが濃縮されたため、パニング手順の次のラウンドからは、CD3εおよびヒトCD137の両方に結合する抗体を提示するファージを回収するためにダブルラウンド選択を実施した。

【0251】

具体的には、パニングラウンド2で、磁気ビーズを、2%スキムミルク/TBSによって室温で60分間以上ブロッキングして、TBSで3回洗浄した。ファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。500 pmolのビオチン標識されたヒトIgG1 Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。

【0252】

室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。500 pmolのビオチン標識されたCD137-Fcを、

新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。ビーズを、TBST (0.1% Tween 20を含有するTBS ; TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった) で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。FabRICATOR (IdeS、IgGのヒンジ領域に対するプロテアーゼ、GENOVIS) (IdeS溶出キャンペーンと名づける) を用いて、抗体を提示するファージを回収した。その手順においては、20 μ Lの10単位/ μ L Fabricatorを80 μ LのTBS緩衝液とともに添加して、ビーズを37°Cで30分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。

10

【0253】

このパニング手順の第1サイクルにおいて、ヒトCD137に結合する抗体を提示するファージが濃縮されたため、次いで、ファージの感染および増幅の前に、CD3 ϵ にも結合する抗体を提示するファージを回収するための第2サイクルパニング手順に進んだ。500 pmolのビオチン標識されたCD3 ϵ を、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液、50 μ LのTBS、および250 μ Lの8% BSAブロッキング緩衝液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、抗体を提示するファージをヒトCD137からCD3 ϵ に移すために、37°Cで30分間、室温で60分間、4°Cで一晩、次いで室温で60分間インキュベートした。

20

【0254】

ビーズを、TBST (0.1% Tween 20を含有するTBS ; TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった) で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。0.5 mLの1 mg/mLトリプシンを添加したビーズを、室温で15分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。トリプシン処理したファージ溶液から回収されたファージを、対数増殖期 (OD600: 0.4~0.7) の大腸菌株ER2738に添加した。株を37°Cで1時間静かに攪拌培養することを通して、大腸菌株にファージを感染させた。感染した大腸菌を、225 mm $\times$ 225 mmのプレートに接種した。次に、接種した大腸菌の培養液からファージを回収して、ファージライブラリー溶液を回収した。

【0255】

30

パニングの第3ラウンドおよび第4ラウンドにおいては、洗浄の数をTBSTで5回、次いでTBSで2回に増加させた。ダブルラウンド選択の第2サイクルにおいては、C3NP1-27抗原を、ビオチン標識されたCD3 ϵ ペプチド抗原の代わりに用い、溶出は、CD3 ϵ ペプチドとビオチンとの間のジスルフィド結合を切断するためにDTT溶液で実施した。正確には、TBSで2回洗浄した後、500 μ Lの25 mM DTT溶液を添加して、ビーズを室温で15分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。0.5 mLの1 mg/mLトリプシンを、回収されたファージ溶液に添加して、室温で15分間インキュベートした。

【0256】

2. 3. 取得されたFabドメインを有するIgGの、ヒトCD137およびカニクイザルCD137に対する結合

40

ラウンド3およびラウンド4でのDAおよびDXライブラリーの各パニングアウトプットプールから、96クローンを採集し、そのVH遺伝子配列を解析した。29のVH配列が取得されたため、そのすべてをIgG形式に変換した。各クローンのVH断片を、ファージミドベクターに特異的に結合するプライマー (配列番号: 196および197) を用いたPCRによって増幅した。増幅されたVH断片を、既にヒトIgG1 CH1-Fc領域を有する動物発現プラスミド中に組み込んだ。調製されたプラスミドを、参考実施例9の方法による動物細胞における発現に用いた。GLS3000を軽鎖として用い、その発現プラスミドは、参考実施例12. 2. に示すように調製した。

【0257】

50

調製された抗体を、ELISAに供して、ヒトCD137（配列番号：195）およびカニクイザル（cyno（カニクイザル）と呼ばれる）CD137（配列番号：92）に対するその結合能力を評価した。図7は、ヒトCD137とカニクイザルCD137との間のアミノ酸配列の差を示す。それらの間では8個の残基が異なっている。

【0258】

最初に、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズであるMyOne-T1ビーズの20 μ gを、0.5x block Ace、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300を含むブロッキング緩衝液で3回洗浄し、次いで、このブロッキング緩衝液で、室温で60分間以上ブロッキングした。TBSTで1回洗浄した後、磁気ビーズを、白色丸底PSプレート（Corning, 3605）の各ウェルにアブライし、0.625 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fc、
10
ビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fc、またはビオチン標識されたヒトFcを磁気ビーズに添加して、室温で15分間以上インキュベートした。TBSTで1回洗浄した後、50 ng / μ Lの精製されたIgGの各々25 μ Lをウェルに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。

【0259】

その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSで希釈したヤギ抗ヒト κ 軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレートを1時間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、各サンプルを、96ウェルプレート（Corning, 3792 黒色丸底PSプレート）に移し、APS-5（Lumigen）を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を、表10および図19に示す。その中
20
で、クローンDXDU01_3#094、DXDU01_3#072、DADU01_3#018、DADU01_3#002、DXDU01_3#019、およびDXDU01_3#051は、ヒトCD137およびカニクイザルCD137の両方に対する結合を示した。他方、ヒトCD137に対して最も強い結合を示したDADU01_3#001は、カニクイザルCD137に対する結合を示さなかった。

【0260】

10

20

30

40

50

【表 3】

	RLU			S/N 比		配列 番号
	Fc	ヒト CD137-Fc	カニクイザル CD137-Fc	ヒト CD137- Fc/Fc	カニクイザル CD137- Fc/Fc	
DADU01_3#031	2122	1633	1783	0.7696	0.8402	
DXDU01_3#053	1935	1469	1555	0.7592	0.8036	
DADU01_3#006	3202	1842	1886	0.5753	0.5890	
DXDU01_3#035	2005	1424	1484	0.7102	0.7401	
DXDU01_3#064	1826	1369	2150	0.7497	1.1774	
DADU01_3#036	1960	1491	2173	0.7607	1.1087	
DXDU01_3#043	2311	1533	1919	0.6633	0.8304	
DXDU01_3#094	2367	24241	19145	10.2412	8.0883	97
DADU01_3#003	2349	1596	1658	0.6794	0.7058	
DADU01_3#051	2276	1595	1534	0.7008	0.6740	
DADU01_4#089	3578	1970	1894	0.5506	0.5293	
DADU01_3#013	2770	1707	1710	0.6162	0.6173	
DXDU01_3#049	2586	1559	1578	0.6029	0.6102	
DXDU01_3#072	2148	14137	3348	6.5815	1.5587	98
DADU01_3#042	2570	1779	1600	0.6922	0.6226	
DADU01_3#020	1970	1640	1641	0.8325	0.8330	
DADU01_3#050	2246	1785	1689	0.7947	0.7520	
DADU01_3#018	1899	32770	6205	17.2565	3.2675	99
DADU01_3#002	1924	39141	10775	20.3436	5.6003	100
DADU01_3#058	1931	1461	1363	0.7566	0.7059	
DADU01_3#078	1689	1374	1326	0.8135	0.7851	
DADU01_3#044	1992	1647	1606	0.8268	0.8062	
DXDU01_3#019	3264	77805	5093	23.8373	1.5604	101
DADU01_3#001	1760	95262	1209	54.1261	0.6869	102
DADU01_3#071	3389	1927	1860	0.5686	0.5488	
DADU01_3#024	3131	1783	1763	0.5695	0.5631	
DXDU01_3#051	2914	38065	10870	13.0628	3.7303	103
DADU01_3#004	3053	1918	1802	0.6282	0.5902	
DADU01_3#045	1988	1662	1573	0.8360	0.7912	

【0261】

2. 4. 取得されたFabドメインを有するIgGの、ヒトCD3εに対する結合

各抗体をまた、ELISAに供して、CD3εに対するその結合能力も評価した。

最初に、MyOne-T1ストレプトアビジンビーズを、0.625 pmolのビオチン標識されたCD3εと混合して、室温で10分間インキュベートし、次いで、0.5x block Ace、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300/TBSを含むブロッキング緩衝液を添加して、磁気ビーズをブロッキングした。混合溶液を、96ウェルプレート（Corning, 3792 黒色丸底P Sプレート）の各ウェルに分注して、室温で60分間以上インキュベートした。その磁気ビーズをTBSによって1回洗浄した後、100 ngの精製されたIgGを各ウェル中の磁気ビーズに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。

【0262】

その後、各ウェルをTBSTで洗浄し、TBSで希釈したヤギ抗ヒトκ軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレートを1

時間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、APS-5（Lumigen）を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を、表4および図9に示す。すべてのクローンは、CD3εペプチドに対する明らかな結合を示した。これらのデータから、CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137のいずれにも結合するFabドメインを、参考実施例1において実施された従来のファージディスプレイパニング手順よりも高いヒット率で、設計されたDual Fab抗体ファージディスプレイライブラリーによりダブルラウンド選択手順で効率的に取得できたことがわかる。

【0263】

【表4】

	RLU		S/N比
	コーティング無し	CD3 ペプチド	CD3 ペプチド / コーティング無し
DADU01_3#031	1505	142935	70.13
DXDU01_3#053	2082	148836	120.32
DADU01_3#006	3843	127079	107.42
DXDU01_3#035	3302	119726	103.03
DXDU01_3#064	3901	171861	147.52
DADU01_3#036	1562	159897	139.65
DXDU01_3#043	1147	168793	143.65
DXDU01_3#094	2473	164780	140.72
DADU01_3#003	3104	151738	115.65
DADU01_3#051	2489	135224	109.85
DADU01_4#089	1366	150267	127.67
DADU01_3#013	4688	136821	111.78
DXDU01_3#049	3205	141259	114.94
DXDU01_3#072	2168	176615	147.67
DADU01_3#042	4271	135203	108.86
DADU01_3#020	1454	197301	153.18
DADU01_3#050	1564	166509	132.05
DADU01_3#018	2293	181896	148.73
DADU01_3#002	2954	173838	156.47
DADU01_3#058	2618	136587	118.05
DADU01_3#078	1754	146653	124.49
DADU01_3#044	1091	196612	180.88
DXDU01_3#019	1919	190761	161.12
DADU01_3#001	1840	198383	146.41
DADU01_3#071	4237	144562	109.60
DADU01_3#024	3782	152018	129.38
DXDU01_3#051	1904	169289	144.69
DADU01_3#004	2310	166261	141.26
DADU01_3#045	1730	154444	127.85

【0264】

2. 5. 取得されたFabドメインを有するIgGの、CD3εおよびヒトCD137に対する同時の結合の評価

6つの抗体（DXDU01_3#094（#094）、DADU01_3#018（#018）、DADU01_3#002（#002）、DXDU01_3#019（#019）、DXDU01_3#051（#051）、およびDADU01_3#001（#001 またはdBBDu_126））を、さらに評価するために選択した。WO2005/035584A1に記載されている抗ヒトCD137抗体（重鎖が配列番号：93、軽鎖が配列番号：94）（Bと省略される）を、対照抗体として用いた。精製された抗体を、ELISAに供して、CD3εおよびヒトCD137に対するその同時の結合能力を評価した。

最初に、MyOne-T1ストレプトアビジンビーズを、0.625 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fcまたはビオチン標識されたヒトFcと混合して、室温で10分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加して、磁気ビーズをブロッキングした。混合溶液を、96ウェルプレート（Corning, 3792黒色丸底PSプレート）の各ウェルに分注して、室温で60分間以上インキュベートした。その後、磁気ビーズを、TBSによって1回洗浄した。100 ngの精製されたIgGを、62.5、6.25、もしくは0.625 pmolのフリーのヒトCD3εペプチドまたは62.5 pmolのフリーのヒトFcまたはTBSと混合し、次いで、各ウェル中の磁気ビーズに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSTで希釈したヤギ抗ヒトκ軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレートを1時間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、APS-5（Lumigen）を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を、図10および表5に示す。

【0265】

【表5】

	ビオチン-ヒト CD137-Fc		
	フリーのCD3ε 62.5 pmol	フリーの Fc 62.5 pmol	シグナルの減少
B	182548	184279	0.94%
#001	15125	80997	81.33%
#002	9966	154791	93.56%
#018	9024	116919	92.28%
#019	12850	171835	92.52%
#051	10804	128260	91.58%
#094	9664	108313	91.08%

【0266】

ヒトCD137-Fcに対する結合の、フリーのCD3εペプチドによる阻害が、すべての試験された抗体において観察されたが、対照抗CD137抗体においては観察されず、かつ阻害は、フリーのFcドメインによっては観察されなかった。この結果から、それらの取得された抗体が、CD3εペプチドの存在下ではヒトCD137-Fcに結合できなかったこと、換言すると、これらの抗体は、ヒトCD137とCD3εに同時には結合しないことが実証される。したがって、2つの異なる抗原であるCD137およびCD3εに結合することができるが、同時には結合しないFabドメインを、設計されたライブラリーおよびファージディスプレイダブ

ルラウンド選択で取得するのに成功したことが証明された。

【0267】

〔参考実施例3〕ダブルラウンド代替的選択またはクアドラブルラウンド選択での、dual Fabライブラリーからの、CD3 ϵ 、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインの取得

3. 1. カニクイザルCD137に結合するFabドメインを取得する効率を改善するためのパニング戦略

参考実施例2において、CD3 ϵ 、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインを取得することに成功したが、カニクイザルCD137に対する結合は、ヒトCD137に対するよりも弱かった。それを改善するための考慮すべき戦略の1つは、異なる抗原を異なるパニングラウンドで用いることになる、ダブルラウンド選択を伴う代替的パニングである。この方法によって、CD3 ϵ 、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137のいずれにも対する選択圧を、好ましい抗原の組み合わせであるCD3 ϵ とヒトCD137、CD3 ϵ とカニクイザルCD137、またはヒトCD137とカニクイザルCD137で、各ラウンドにおいてdual Fabライブラリーにかけることができた。それを改善するためのもう1つの戦略は、1つのパニングラウンドにおいてすべての必要な抗原を用いることができる、トリプルまたはクアドラブルラウンド選択である。

【0268】

参考実施例2のダブルラウンド選択手順において、抗体を提示するファージを第1の抗原から第2の抗原に移動させるために、一晚のインキュベーションを用いた。この方法は良好に働いたが、第1の抗原に対する親和性が第2の抗原に対するよりも強い場合、移動がほとんど起きない可能性がある（例えば、このdualライブラリーにおいて第1の抗原がCD3 ϵ であった場合）。これに対処するために、塩基溶液での結合ファージの溶出もまた実施した。各パニング手順のキャンペーン名および条件を、表6に記載する。

【0269】

CD3 ϵ 、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインを、参考実施例1. 1. において構築されたdual Fabライブラリーから同定した。ビオチン標識されたCD3 ϵ ペプチド抗原（アミノ酸配列：配列番号：86）、ジスルフィド結合リンカーを通してビオチン標識されたCD3 ϵ ペプチド抗原（C3NP1-27；アミノ酸配列：配列番号：194）、ビオチン標識されたヒトIgG1 Fc断片に融合したヒトCD3 ϵ とビオチン標識されたヒトIgG1 Fc断片に融合したヒトCD3 δ とのヘテロ二量体（CD3ed-Fcと名づける、アミノ酸配列：配列番号：95、96）、ビオチン標識されたヒトIgG1 Fc断片に融合したヒトCD137（ヒトCD137-Fcと名づける）、ビオチン標識されたヒトIgG1 Fc断片に融合したカニクイザルCD137（カニクイザルCD137-Fcと名づける）、およびビオチン標識されたカニクイザルCD137（カニクイザルCD137と名づける）を、抗原として用いた。

【0270】

10

20

30

40

50

【表 6】

キャンペーン名	ラウンド	パニング	サイクル 1		サイクル 2		サイクル 3		サイクル 4	
			抗原	溶出	抗原	溶出	抗原	溶出	抗原	溶出
DU05	ラウンド1	ダブル	ヒト CD137-Fc	IdeS	C3NP1-27	DTT				
	ラウンド2	ダブル	カニクイザルCD137-Fc	IdeS	C3NP1-27	DTT				
	ラウンド3	ダブル	ヒト CD137-Fc	IdeS	C3NP1-27	DTT				
	ラウンド4	ダブル	カニクイザルCD137-Fc	IdeS	C3NP1-27	DTT				
MP09	ラウンド1	ダブル	カニクイザルCD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS				
	ラウンド2	ダブル	ヒト CD137-Fc	IdeS	カニクイザルCD137	トリプシン				
	ラウンド3	クアドラブル	ヒト CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS	カニクイザルCD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS
	ラウンド4	クアドラブル	カニクイザルCD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS	ヒト CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS
MP11	ラウンド1	ダブル	カニクイザルCD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS				
	ラウンド2	クアドラブル	ヒト CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS				
	ラウンド3	クアドラブル	カニクイザルCD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS	カニクイザルCD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS
	ラウンド4	クアドラブル	ヒト CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS	ヒト CD137-Fc	IdeS	CD3ed-Fc	IdeS
DS01	ラウンド1	シングル	ヒト CD137-Fc	トリプシン						
	ラウンド2	ダブル	CD3 ペプチド	TEA	ヒト CD137-Fc	トリプシン				
	ラウンド3	ダブル	CD3 ペプチド	TEA	ヒト CD137-Fc	トリプシン				
	ラウンド4	ダブル	CD3 ペプチド	TEA	カニクイザルCD137-Fc	トリプシン				
	ラウンド5	ダブル	CD3 ペプチド	TEA	ヒト CD137-Fc	トリプシン				
	ラウンド6	ダブル	CD3 ペプチド	TEA	カニクイザルCD137-Fc	トリプシン				

【0271】

3. 2. ダブルラウンド選択および代替的パニングでの、CD3 ϵ 、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインの取得

キャンペーンDU05と名づけたパニング条件を、ダブルラウンド選択および代替的パニングで、CD3 ϵ 、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインを取得するために、表6に示すように実施した。

ヒトCD137-Fcを偶数のラウンドにおいて用い、カニクイザルCD137-Fcを奇数のラウンドにおいて用いた。ダブルラウンド選択の詳細なパニング手順は、参考実施例2に示すものと同じであった。DU05キャンペーンにおいては、ダブルラウンド選択をパニングの

第1ラウンドから実施した。

【0272】

3.3. 塩基溶出ダブルラウンド選択および代替的パニングでの、CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインの取得

参考実施例2に示す異なる抗原での以前のダブルラウンド選択においては、IdeSまたはDTTが、抗体とビオチンとの間のリンカー領域を切断したため、抗体を提示するファージは、その第1の抗原との複合体として溶出され、したがって第1の抗原もまた、ダブルラウンド選択の第2サイクルに持ってこられ、第2の抗原と競合する。第1の抗原の持ち込みを抑制するために、結合抗体の抗原からの解離を誘導し、かつ従来のファージディスプレイパニングにおいて非常に普及している方法である、塩基緩衝液での溶出もまた実施した（キャンペーンDS01と名づける）。

10

パニングラウンド1の詳細なパニング手順は、参考実施例2に示すものと同じであった。ラウンド1においては、ビオチン標識されたヒトCD137-Fcでの従来のパニングを実施した。

パニングラウンド1において、ヒトCD137に結合するFabを提示するファージが蓄積されたため、パニングラウンド2からは、CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインを取得するために、塩基溶出ダブルラウンド選択を実施した。

【0273】

具体的には、パニングラウンド2で、磁気ビーズを、2%スキムミルク/TBSによって室温で60分間以上ブロッキングして、TBSで3回洗浄した。ファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。500 pmolのビオチン標識されたヒトIgG1 Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。500 pmolのビオチン標識されたCD3ε ペプチドを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。

20

【0274】

室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。ビーズを、TBST（0.1% Tween 20を含有するTBS；TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった）で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。0.1M トリエチルアミンF（TEA, Wako 202-02646）を用いて、抗体を提示するファージを回収した。その手順においては、500 μLの0.1 M TEAを添加して、ビーズを室温で10分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。100 μLの1M トリス-HCl（pH 7.5）を添加して、ファージ溶液を15分間中和した。

30

【0275】

このパニング手順の第1サイクルにおいて、CD3εに結合する抗体を提示するファージが濃縮されたため、次いで、ファージの感染および増幅の前に、CD137にも結合する抗体を提示するファージを回収するための第2サイクルパニング手順に進んだ。500 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液、50 μLのTBS、および250 μLの8% BSAブロッキング緩衝液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。

40

【0276】

ビーズを、TBST（0.1% Tween 20を含有するTBS；TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった）で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。0.5 mLの1 mg/mLトリプシンを添加したビーズを、室温で15分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用い

50

てビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。トリプシン処理したファージ溶液から回収されたファージを、対数増殖期（OD600：0.4～0.7）の大腸菌株ER2738に添加した。株を37℃で1時間静かに攪拌培養することを通して、大腸菌株にファージを感染させた。感染した大腸菌を、225 mm×225 mmのプレートに接種した。次に、接種した大腸菌の培養液からファージを回収して、ファージライブラリー溶液を回収した。

【0277】

パニングの第4ラウンドおよび第6ラウンドのダブルラウンド選択の第2サイクルにおいては、ビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fcを、ビオチン標識されたヒトCD137-Fcの代わりに用いた。パニングのラウンド4からラウンド6を通して、250 pmolのビオチン標識されたヒトまたはカニクイザルのCD137-Fcを、ダブルラウンド選択の第2サイ

10

【0278】

3. 4. クアドラブルラウンド選択での、CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインの取得

以前のダブルラウンド選択においては、パニングの1ラウンドにおいて2つの異なる抗原しか用いることができなかった。この限界を突破するために、クアドラブルラウンド選択をまた実施した（表6に示す、キャンペーンMP09およびMP11との名称）。

MP09およびMP11両方のパニングラウンド1、ならびにMP09のパニングラウンド2において、ダブルラウンド選択を実施した。

【0279】

20

具体的には、磁気ビーズを、2%スキムミルク/TBSによって室温で60分間以上ブロッキングして、TBSで3回洗浄した。ファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。500 pmolのビオチン標識されたヒトIgG1 Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。268 pmolのビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。

【0280】

30

室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。ビーズを、TBST（0.1% Tween 20を含有するTBS；TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった）で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。FabRICATOR（IdeS、IgGのヒンジ領域に対するプロテアーゼ、GENOVIS）（IdeS溶出キャンペーンと名づける）を用いて、抗体を提示するファージを回収した。その手順においては、20 μLの10単位/μL Fabricatorを80 μLのTBS緩衝液とともに添加して、ビーズを37℃で30分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。

【0281】

40

このパニング手順の第1サイクルにおいて、カニクイザルCD137に結合する抗体を提示するファージが濃縮されたため、次いで、ファージの感染および増幅の前に、CD3εにも結合する抗体を提示するファージを回収するための第2サイクルパニング手順に進んだ。IdeSプロテアーゼをファージ溶液から除去するために、40 μLのヘルパーファージM13KO7（1.2E+13 pfu）および200 μLの10% PEG-2.5 M NaClを添加し、沈殿したファージのプールをTBSで希釈して、ファージライブラリー溶液を取得した。500 pmolのビオチン標識されたCD3ε-Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。

【0282】

室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収され

50

たファージ溶液および500 μ Lの8% BSAブロッキング緩衝液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。ビーズを、TBST (0.1% Tween 20を含有するTBS; TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった) で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。20 μ Lの10単位/ μ L Fabricatorを80 μ LのTBS緩衝液とともに添加して、ビーズを37°Cで30分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。5 μ Lの100 mg/mLトリプシンおよび395 μ LのTBSを添加して、室温で15分間インキュベートした。トリプシン処理したファージ溶液から回収されたファージを、対数増殖期 (OD600: 0.4~0.7) の大腸菌株ER2738に添加した。株を37°Cで1時間静かに攪拌培養することを通して、大腸菌株にファージを感染させた。感染した大腸菌を、225 mm $\times$ 225 mmのプレートに接種した。次に、接種した大腸菌の培養液からファージを回収して、ファージライブラリー溶液を回収した。

【0283】

MP09のパニングキャンペーンの第2ラウンドにおいては、表6に示すように、ビオチン標識されたヒトCD137-Fcを、第1サイクルパニング抗原として用い、ビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fcを、トリプシンによる溶出を伴って、第2サイクルパニング抗原として用いた。

【0284】

クアドラプルパニングを、MP09キャンペーンのパニングラウンド3およびラウンド4において、ならびにMP11キャンペーンのパニングラウンド2およびラウンド3において実施した。

【0285】

MP09キャンペーンのパニングラウンド3およびMP11キャンペーンのラウンド2において、磁気ビーズを、2%スキムミルク/TBSによって室温で60分間以上ブロッキングして、TBSで3回洗浄した。ファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。500 pmolのビオチン標識されたヒトIgG1 Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加して、室温で60分間以上インキュベートし、次いで、上清を回収した。250 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。

【0286】

室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。ビーズを、TBST (0.1% Tween 20を含有するTBS; TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった) で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。Fabricator (IdeS、IgGのヒンジ領域に対するプロテアーゼ、GENOVIS) (IdeS溶出キャンペーンと名づける) を用いて、抗体を提示するファージを回収した。その手順においては、20 μ Lの10単位/ μ L Fabricatorを80 μ LのTBS緩衝液とともに添加して、ビーズを37°Cで30分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。

【0287】

IdeSプロテアーゼをファージ溶液から除去するために、40 μ LのヘルパーファージM13KO7 (1.2E+13 pfu) および200 μ Lの10% PEG-2.5 M NaClを添加し、沈殿したファージのプールをTBSで希釈して、ファージライブラリー溶液を取得した。250 pmolのビオチン標識されたCD3ed-Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液および500 μ Lの8% BSAブロッキング緩衝液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。ビーズを、TBST (0.1% Tween 20を含有するTBS; TBSはTak

10

20

30

40

50

ara Bio Inc.から入手可能であった) で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。20 μ Lの10単位/ μ L Fabricatorを80 μ LのTBS緩衝液とともに添加して、ビーズを37°Cで30分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。

【0288】

クアドラブルラウンド選択の第3サイクルにおいて、40 μ LのヘルパーファージM13K07 (1.2E+13 pfu) および200 μ Lの10% PEG-2.5 M NaClを添加し、沈殿したファージのプールをTBSで希釈して、ファージライブラリー溶液を取得した。250 pmolのビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッ

10

キングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液および500 μ Lの8% BSAブロッキング緩衝液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。ビーズを、TBST (0.1% Tween 20を含有するTBS ; TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった) で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。20 μ Lの10単位/ μ L Fabricatorを80 μ LのTBS緩衝液とともに添加して、ビーズを37°Cで30分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。

【0289】

クアドラブルラウンド選択の第4サイクルにおいて、40 μ LのヘルパーファージM13K07 (1.2E+13 pfu) および200 μ Lの10% PEG-2.5 M NaClを添加し、沈殿したファージのプールをTBSで希釈して、ファージライブラリー溶液を取得した。500 pmolのビオチン標識されたCD3ed-Fcを、新たな磁気ビーズに添加して、室温で15分間インキュベートし、次いで、2%スキムミルク/TBSを添加した。室温で60分間以上ブロッキングした後、磁気ビーズを、TBSで3回洗浄した。回収されたファージ溶液および500 μ Lの8% BSAブロッキング緩衝液を、ブロッキングされた磁気ビーズに添加し、次いで、室温で60分間インキュベートした。

20

【0290】

ビーズを、TBST (0.1% Tween 20を含有するTBS ; TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった) で3回洗浄し、次いでさらに、1 mLのTBSで2回洗浄した。20 μ Lの10単位/ μ L Fabricatorを80 μ LのTBS緩衝液とともに添加して、ビーズを37°Cで30分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。5 μ Lの100 mg/mLトリプシンおよび395 μ LのTBSを添加して、室温で15分間インキュベートした。トリプシン処理したファージ溶液から回収されたファージを、対数増殖期 (OD600 : 0.4~0.7) の大腸菌株ER2738に添加した。株を37°Cで1時間静かに攪拌培養することを通して、大腸菌株にファージを感染させた。感染した大腸菌を、225 mm×225 mmのプレートに接種した。次に、接種した大腸菌の培養液からファージを回収して、ファージライブラリー溶液を回収した。

30

【0291】

MP09キャンペーンのパニングラウンド4およびMP11キャンペーンのラウンド3においては、ビオチン標識されたヒトCD137-Fcを、第1サイクル抗原として用い、ビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fcを、第3サイクル抗原として用いた。

40

【0292】

3. 5. ファージによって提示されたFabドメインの、ヒトCD137およびカニクイザルCD137に対する結合 (ファージELISA)

Fabを提示するファージ溶液を、参考実施例3. 2、3. 3、および3. 4におけるパニング手順を通して調製した。最初に、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズであるMyOne-T1ビーズの20 μ gを、0.4% block Ace、1% BSA、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300を含むブロッキング緩衝液で3回洗浄し、次いで、このブロッキング緩衝液で、室温で60分間以上ブロッキングした。

【0293】

50

TBSTで1回洗浄した後、磁気ビーズを、96ウェルプレート（Corning, 3792 黒色丸底 PSプレート）の各ウェルにアプライし、0.625 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fc、ビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fc、またはビオチン標識されたCD3εペプチドを磁気ビーズに添加して、室温で15分間以上インキュベートした。TBSTで1回洗浄した後、各々250 nLのFabを提示するファージ溶液を、24.75 μLのTBSとともにウェルに添加し、各Fabを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSで希釈した抗M13(p8) Fab-HRPを、各ウェルに添加した。プレートを10分間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、LumiPhos-HRP（Lumigen）を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を図11に示す。

10

【0294】

ヒトCD137、カニクイザルCD137、およびCD3εの各抗原に対する結合が、各パニングアウトプットファージ溶液において観察された。この結果は、塩基溶出を伴うダブルラウンド選択が、IdeS溶出法を伴う以前のダブルラウンド選択と同様に働いたこと、および、代替的パニングを伴うダブルラウンド選択がまた、3つの異なる抗原に結合するFabドメインを取得するために良好に働いたことを示した。これらの方法は、3つの異なる抗原に結合するFabドメインを収集するが、それでもなお、カニクイザルCD137に対する結合は、ヒトCD137と比較してまだ弱かった。他方、MP09またはMP11キャンペーンにおいては、CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に対する結合が、同じラウンド時点で観察され、かつカニクイザルCD137に対するその結合は、他のキャンペーンよりも高かった。この結果から、クアドラブルラウンド選択が、3つの異なる抗原に結合するFabドメインをより効率的に濃縮できることが実証された。

20

【0295】

3.6. 取得されたFabドメインを有するIgGの調製

各パニングアウトプットプールから、96クローンを採集し、そのVH遺伝子配列を解析した。32クローンを、そのVH配列がすべての解析されたプールの中で2回よりも多く出現したため、選択した。そのVH遺伝子を、PCRによって増幅し、IgG形式に変換した。各クローンのVH断片を、ライブラリー中のH鎖に特異的に結合するプライマー（配列番号：196および197）を用いたPCRによって増幅した。増幅されたVH断片を、既にヒトIgG1 CH1-Fc領域を有する動物発現プラスミド中に組み込んだ。調製されたプラスミドを、参考実施例9の方法による動物細胞における発現に用いた。これらのサンプルをクローン変換IgGと呼んだ。GLS3000を軽鎖として用いた。

30

【0296】

各パニングアウトプットプールのVH遺伝子もまた、IgG形式に変換した。ファージミドベクターライブラリーを、各パニングアウトプットプールDU05、DS01、およびMP11の大腸菌から調製し、NheIおよびSalI制限酵素で消化して、VH遺伝子を直接抽出した。抽出されたVH断片を、既にヒトIgG1 CH1-Fc領域を有する動物発現プラスミド中に組み込んだ。調製されたプラスミドを大腸菌中に導入し、各パニングアウトプットプールから、192または288コロニーを採集して、そのVH配列を解析した。MP09および11キャンペーンにおいては、異なるVH配列を有するクローンを、可能な限り採集した。各大腸菌コロニーから調製されたプラスミドを、参考実施例9の方法による動物細胞における発現に用いた。これらのサンプルをバルク変換IgGと呼んだ。GLS3000を軽鎖として用いた。

40

【0297】

3.7. 取得された抗体の、そのCD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137結合活性についての評価

調製されたバルク変換IgG抗体を、ELISAに供して、CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に対するその結合能力を評価した。

【0298】

最初に、ストレプトアビジンコーティングマイクロプレート（384ウェル, Greiner）を、ビオチン標識されたCD3εペプチド、ビオチン標識されたヒトCD137-Fc、またはビオ

50

チン標識されたカニクイザルCD137-Fcを含有する20 μ LのTBSで、室温で1時間以上コーティングした。プレートの各ウェルをTBSTで洗浄することによって、プレートに結合していないビオチン標識された抗原を除去した後、ウェルを、20 μ Lのブロッキング緩衝液（2%スキムミルク/TBS）で1時間以上ブロッキングした。ブロッキング緩衝液を、各ウェルから除去した。2%スキムミルク/TBSで2倍希釈した、IgGを含有する哺乳動物細胞上清の各々20 μ Lをウェルに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSで希釈したヤギ抗ヒト κ 軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレートを1時間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、Blue Phos Microwell Phosphatase Substrate System（KPL）を添加した各ウェルにおける溶液の発色反応を、Blue Phos Stop Solution（KPL）を添加することによって終了させた。次いで、発色を、615 nmでの吸光度によって測定した。測定結果を図12に示す。

【0299】

CD3 ϵ 、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137のいずれにも対して結合を示した多くのIgGクローンが、各パニング手順から取得されたため、代替的パニングを伴うダブルラウンド選択、塩基溶出を伴うダブル選択、およびクアドラブルラウンド選択のいずれもが、すべて期待されたように働いたことがわかる。特に、ヒトCD137に結合したクアドラブルラウンド選択由来のすべてのクローンの大部分は、他の2つのパニング条件と比較して、カニクイザルCD137に対して同等レベルの結合を示した。それらのパニング条件においては、恐らくCD3 ϵ およびヒトCD137の両方に対する結合を示したクローンの取得がより少なく、それは主に、このキャンペーンにおいて、互いに同じVH配列を有するクローンを故意に採集することを可能な限りしなかったためである。各タンパク質に対してより良好な結合を示し、かつ互いに異なるVH配列を有した54クローンを、選択してさらに評価した。

【0300】

3.8. 精製されたIgG抗体の、そのCD3 ϵ 、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137結合活性についての評価

精製されたIgG抗体の結合能力を評価した。参考実施例3.5における32のクローン変換IgG、および参考実施例3.6において選択された54のバルク変換IgGを用いた。

【0301】

最初に、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズであるMyOne-T1ビーズの20 μ gを、0.4% block Ace、1% BSA、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300を含むブロッキング緩衝液で3回洗浄し、次いで、このブロッキング緩衝液で、室温で60分間以上ブロッキングした。TBSTで1回洗浄した後、磁気ビーズを、白色丸底PSプレート（Corning, 3605）の各ウェルにアプライし、0.625 pmolのビオチン標識されたCD3 ϵ ペプチド、2.5 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fc、2.5 pmolのビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fc、または0.625 pmolのビオチン標識されたヒトFcを磁気ビーズに添加して、室温で15分間以上インキュベートした。

【0302】

TBSTで1回洗浄した後、50 ng/ μ Lの精製されたIgGの各々25 μ Lをウェルに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSで希釈したヤギ抗ヒト κ 軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレートを1時間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、各サンプルを、96ウェルプレート（Corning, 3792黒色丸底PSプレート）に移し、APS-5（Lumigen）を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を図13に示す。多くのクローンが、ヒトCD137およびカニクイザルCD137の両方に対して同等レベルの結合を示し、CD3 ϵ に対する結合もまた示した。

【0303】

3. 9. 取得されたFabドメインを有するIgGの、CD3εおよびヒトCD137に対する同時の結合の評価

参考実施例3. 7においてCD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137のいずれにも対して明らかな結合を示した37の抗体を、さらに評価するために選択した。参考実施例2. 3において取得された7つの抗体もまた、評価した（これら7つのクローンを、表7におけるように改名した）。精製された抗体を、ELISAに供して、CD3εおよびヒトCD137に対するその同時の結合能力を評価した。参考実施例2. 5に記載されるBと名づけた抗ヒトCD137抗体を、対照抗体として用いた。

【0304】

【表7】

古い名称	新たな名称
DXDU01 3 #094	dBBDu121
DXDU01 3 #072	dBBDu122
DADU01 3 #018	dBBDu123
DADU01 3 #002	dBBDu124
DXDU01 3 #019	dBBDu125
DADU01 3 #001	dBBDu126
DXDU01 3 #051	dBBDu127

【0305】

最初に、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズであるMyOne-T1ビーズの20μgを、0.4% block Ace、1% BSA、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300を含むブロッキング緩衝液で3回洗浄し、次いで、このブロッキング緩衝液で、室温で60分間以上ブロッキングした。TBSTで1回洗浄した後、磁気ビーズを、黒色丸底PSプレート（Corning, 3792）の各ウェルにアプライした。1.25 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fcを添加して、室温で10分間インキュベートした。その後、磁気ビーズをTBSによって1回洗浄した。1250 ngの精製されたIgGを、125、12.5、もしくは1.25 pmolのフリーのCD3εペプチドまたはTBSと混合し、次いで、各ウェル中の磁気ビーズに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSで希釈したヤギ抗ヒトκ軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレートを10分間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、APS-5（Lumigen）を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を、図14および表8に示す。

【0306】

10

20

30

40

50

【表 8】

	ビオチン-ヒト CD137-Fc		
	フリーの CD3e (pmol/ウェル)		シグナル の減少
	0	125	
dBBDu133	16927	2373	85.98%
dBBDu139	9436	1924	79.61%
dBBDu140	19960	1923	90.37%
dBBDu142	13665	1786	86.93%
dBBDu149	3915	1962	49.89%
dBBDu165	75488	1954	97.41%
dBBDu167	25731	1937	92.47%
dBBDu171	7394	1819	75.40%
dBBDu172	7589	2241	70.47%
dBBDu173	6544	2041	68.81%
dBBDu178	6777	2126	68.63%
dBBDu179	61009	2625	95.70%
dBBDu181	3241	1990	38.60%
dBBDu182	9081	2178	76.02%
dBBDu183	34000	2369	93.03%
dBBDu184	16701	1888	88.70%
dBBDu186	34783	2497	92.82%
dBBDu189	27434	2193	92.01%
dBBDu191	12863	2230	82.66%
dBBDu193	18193	2278	87.48%
dBBDu195	9715	2361	75.70%
dBBDu196	33099	2222	93.29%
dBBDu197	54367	2111	96.12%
dBBDu199	40880	2372	94.20%
dBBDu202	12055	1930	83.99%
dBBDu204	43663	1879	95.70%
dBBDu205	45191	2194	95.15%
dBBDu206	6967	1697	75.64%

10

20

30

40

50

dBBDu207	7466	1844	75.30%
dBBDu209	12051	1779	85.24%
dBBDu211	7284	1732	76.22%
dBBDu214	12852	1701	86.76%
dBBDu217	19093	2416	87.35%
dBBDu222	7188	3236	54.98%
dBBDu166	3437	1844	46.35%
dBBDu174	4804	1884	60.78%
dBBDu175	3257	1755	46.12%
dBBDu121	3609	1826	49.40%
dBBDu122	2698	1882	30.24%
dBBDu123	2746	1840	32.99%
dBBDu124	6621	2116	68.04%
dBBDu125	61364	2058	96.65%
dBBDu126	116289	2613	97.75%
dBBDu127	3232	2198	31.99%
Du115/DUL008	86183	2620	96.96%
Du103/DUL050	5273	5297	-0.46%
B	99359	98110	1.26%
ブランク	1860	1850	0.54%

10

20

【 0 3 0 7 】

30

対照抗CD137抗体B以外のすべての試験されたクローンのヒトCD137に対する結合は、過剰量のフリーのCD3εペプチドによって阻害され、dual Fabライブラリーで取得された抗体は、CD3εとヒトCD137に同時には結合しなかったことが実証された。

【 0 3 0 8 】

3. 10. CD3εおよびヒトCD137に対して取得されたFabドメインを有するIgGのヒトCD137エピトープの評価

参考実施例3. 8における21の抗体を、さらに評価するために選択した(表10)。精製された抗体を、ELISAに供して、ヒトCD137のその結合エピトープを評価した。

エピトープを解析するために、W02015/156268に記載されているように、断片化ヒトCD137と抗体のFc領域との融合タンパク質を作製し、そのドメインは、Cys-Cysによって形成される構造によって隔てられ、CRDと呼ばれる(表9参照)。断片化ヒトCD137-Fc融合タンパク質は、表9に示すアミノ酸配列を含み、それぞれの遺伝子断片は、完全長ヒトCD137-Fc融合タンパク質(配列番号: 90)をコードするポリヌクレオチドからPCRによって取得し、当業者に知られている方法によって動物細胞における発現用のプラスミドベクターに組み込んだ。断片化ヒトCD137-Fc融合タンパク質を、W02015/156268に記載されている方法によって抗体として精製した。

40

【 0 3 0 9 】

50

【表 9】

断片化された ヒトCD137 の名称	断片化されたヒトCD137のアミノ酸配列	含まれる ドメイン	配列 番号
完全長	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCT PGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCKDCC FGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGTKER DVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQ	CRD1,2,3 ,4	90
CRD1	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQIC	CRD1	147
CRD2	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKEC SSTSNAEC	CRD2	148
CRD3	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC	CRD3	149
CRD4	KDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNG TKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGH SPQ	CRD4	150
CRD1-3	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAECDCT PGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGC	CRD1,2,3	151
CRD1-2	LQDPCSNCPAGTFCDNNRNQICSPCPPNSFSSA GGQRTCDICRQCKGVFRTRKECSSTSNAEC	CRD1,2	152
CRD2-4	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKEC SSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQ ELTKKGCKDCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDG KSVLVNGTKERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAP AREPGHSPQ	CRD2,3,4	153
CRD2-3	SPCPPNSFSSAGGQRTCDICRQCKGVFRTRKEC SSTSNAECDCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQ ELTKKGC	CRD2,3	154
CRD3-4	DCTPGFHCLGAGCSMCEQDCKQGQELTKKGCK DCCFGTFNDQKRGICRPWTNCSLDGKSVLVNGT KERDVVCGPSPADLSPGASSVTPPAPAREPGHS PQ	CRD3,4	155

【0310】

最初に、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズであるMyOne-T1ビーズの20 µgを、0.4% block Ace、1% BSA、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300を含むブロッキング緩衝液で3回洗浄し、次いで、このブロッキング緩衝液で、室温で60分間以上ブロッキングした。TBSTで1回洗浄した後、磁気ビーズを、黒色丸底PSプレート（Corning, 3792）の各ウェルにアプライした。1.25 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fc、ヒトCD137ドメイン1-Fc、ヒトCD137ドメイン1/2-Fc、ヒトCD137ドメイン2/3-Fc、ヒトCD137ドメイン2/3/4-Fc、ヒトCD137ドメイン3/4-Fc、およびヒトFcを添加して、室温で10分間インキュベートした。その後、磁気ビーズをTBSによって1回洗浄した。1250 ngの精製されたIgGを、各ウェル中の磁気ビーズに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSで希釈したヤギ抗ヒトκ軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレ

ートを10分間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、APS-5（Lumigen）を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を図15に示す。

【0311】

各クローンは、ヒトCD137の異なるエピトープドメインを認識した。ドメイン1/2のみを認識する抗体（例えば、dBBDu183、dBBDu205）、ドメイン1/2およびドメイン2/3の両方を認識する抗体（例えば、dBBDu193、dBBDu202、dBBDu222）、ドメイン2/3、2/3/4、および3/4のいずれもを認識する抗体（例えば、dBBDu139、dBBDu217）、ヒトCD137ドメインを広く認識する抗体（dBBDu174）、ならびに各々の分離したヒトCD137ドメインには結合しない抗体（例えば、dBBDu126）。この結果から、いくつかのヒトCD137エピトープに対する多くのdual binding抗体を、この設計されたライブラリーおよびダブルラウンド選択手順により取得できることが実証される。

10

【0312】

dBBDu126のCD137結合エピトープ領域は、このELISAアッセイによって決定することができないが、dBBDu126は、参考実施例2.3に記載されるようにカニクイザルCD137と交差反応できないため、ヒトとカニクイザルとが異なる残基を有する位置を認識すると推定することができる。図7に示すように、ヒトとカニクイザルとの間には8つの異なる位置があり、カニクイザルCD137／ヒトCD137ハイブリッド分子に対する結合アッセイおよび結合複合体の結晶構造解析によって、75E（ヒトにおいては75G）が、カニクイザルCD137に対するdBBDu126の結合を干渉する原因として同定された。結晶構造からも、dBBDu126は、ヒトCD137のCRD3領域を主に認識することが明らかである。

20

【0313】

【表10】

クローン名	配列番号
dBBDu126	102
dBBDu183	104
dBBDu179	105
dBBDu196	106
dBBDu197	107
dBBDu199	108
dBBDu204	109
dBBDu205	110
dBBDu193	111
dBBDu217	112
dBBDu139	113
dBBDu189	114
dBBDu167	115
dBBDu173	116
dBBDu174	117
dBBDu181	118
dBBDu186	119
dBBDu191	120
dBBDu202	121
dBBDu222	122
dBBDu125	101

30

40

50

【0314】

【参考実施例4】設計された軽鎖ライブラリーを有するdual Fabライブラリー由来のCD3εおよびヒトCD137に結合する抗体ドメインの親和性成熟

4.1. 取得された重鎖を伴う軽鎖ライブラリーの構築

CD3εおよびヒトCD137の両方に結合する多くの抗体が、参考実施例3において取得されたが、ヒトCD137に対するその親和性はまだ低かったため、その親和性を改善する親和性成熟を実施した。

【0315】

13のVH配列、dBBDu_179、183、196、197、199、204、205、167、186、189、191、193、および222を、親和性成熟のために選択した。それらのうち、dBBDu_179、183、196、197、199、204、および205は、同じCDR3配列を有するが、異なるCDR1または2配列を有するため、これら7つのファージミドを混合して、軽鎖Fabライブラリーを作製した。dBBDu_191、193、および222の3つのファージミドもまた混合して、軽鎖Fabライブラリーを作製したが、それらは異なるCDR3配列を有していた。軽鎖ライブラリーのリストを、表11に示す。

【0316】

【表11】

ライブラリー名	VH
ライブラリー2	dBBDu_179,183,196,197,199,204,205
ライブラリー3	dBBDu_167
ライブラリー4	dBBDu_186
ライブラリー5	dBBDu_189
ライブラリー6	dBBDu_191,193,222

【0317】

参考実施例12に記載される合成された抗体VLライブラリー断片を、配列番号：198および199のプライマーでのPCR法によって増幅した。増幅されたVL断片を、SfiIおよびKpnI制限酵素によって消化して、13のVH断片を各々有するファージミドベクター中に導入した。構築されたファージディスプレイ用ファージミドを、エレクトロポレーションによって大腸菌に移入して、抗体ライブラリー断片を保有する大腸菌を調製した。

【0318】

Fabドメインを提示するファージライブラリーを、構築されたファージミドを保有する大腸菌から、FkpAシャペロン遺伝子をコードするヘルパーファージM13K07TC/FkpAの感染、およびそれに続く、0.002%アラビノースとの25℃で一晩のインキュベーションによって作製した。M13K07TCは、ヘルパーファージ上のpIIIタンパク質のN2ドメインとCTドメインとの間にトリプシン切断配列のインサートを有するヘルパーファージである（日本特許出願公表番号2002-514413参照）。M13K07TC遺伝子中へのインサート遺伝子の導入は、既に他所で開示されている（WO2015046554参照）。

【0319】

4.2. ダブルラウンド選択での、CD3εおよびヒトCD137に結合するFabドメインの取得

CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に結合するFabドメインを、参考実施例4.1において構築されたdual Fabライブラリーから同定した。ジスルフィド結合リンカーを通してビオチン標識されたCD3εペプチド抗原（C3NP1-27）、ビオチン標識されたヒトIgG1 Fc断片に融合したヒトCD137（ヒトCD137-Fcと名づける）、およびビオチン標識されたヒトIgG1 Fc断片に融合したカニクイザルCD137（カニクイザルCD137-Fcと名づける）を、抗原として用いた。

【0320】

構築されたファージディスプレイ用ファージミドを保有する大腸菌から、ファージを産生させた。2.5 M NaCl/10% PEGを、ファージを産生した大腸菌の培養液に添加し、沈殿したファージのプールをTBSで希釈して、ファージライブラリー溶液を取得した。次に、BSA（最終濃度：4%）を、ファージライブラリー溶液に添加した。パニング法は、磁気ビーズ上に固定化された抗原を用いた一般的なパニング法を参照して行った（J. Immunol. Methods. (2008) 332 (1-2), 2-9；J. Immunol. Methods. (2001) 247 (1-2), 191-203；Biotechnol. Prog. (2002) 18 (2) 212-20；およびMol. Cell Proteomics (2003) 2 (2), 61-9）。用いた磁気ビーズは、NeutrAvidinコーティングビーズ（Sera-Mag SpeedBeads NeutrAvidin-coated）またはストレプトアビジンコーティングビーズ（Dynabeads M-280 Streptavidin）であった。

10

【0321】

具体的には、ファージ溶液を、100 pmolのヒトCD137-Fcおよび4 nmolのフリーのヒトIgG1 Fcドメインと混合して、室温で60分間インキュベートした。磁気ビーズを、フリーのストレプトアビジン（Roche）を含む2%スキムミルク/TBSによって室温で60分間以上ブロッキングして、TBSで3回洗浄し、次いで、インキュベートされたファージ溶液と混合した。室温で15分間のインキュベーション後に、ビーズを、10分間TBST（0.1% Tween 20を含有するTBS；TBSはTakara Bio Inc.から入手可能であった）で3回洗浄し、次いでさらに、10分間、1 mLのTBSで2回洗浄した。FabRICATOR（IdeS、IgGのヒンジ領域に対するプロテアーゼ、GENOVIS）（IdeS溶出キャンペーンと名づける）を用いて、抗体を提示するファージを回収した。

20

【0322】

その手順においては、20 μ Lの10単位/ μ L Fabricatorを80 μ LのTBS緩衝液とともに添加して、ビーズを37°Cで30分間懸濁し、直後に磁気スタンドを用いてビーズを分離して、ファージ溶液を回収した。5 μ Lの100 mg/mLトリプシンおよび400 μ LのTBSを添加して、室温で15分間インキュベートした。回収されたファージ溶液を、対数増殖期（OD600：0.4～0.5）の大腸菌株ER2738に添加した。株を37°Cで1時間静かに攪拌培養することを通して、大腸菌株にファージを感染させた。感染した大腸菌を、225 mm×225 mmのプレートに接種した。次に、接種した大腸菌の培養液からファージを回収して、ファージライブラリー溶液を調製した。

30

【0323】

このパニングラウンド1手順において、ヒトCD137に結合する抗体を提示するファージが濃縮された。パニングの第2ラウンドにおいては、160 pmolのC3NP1-27を、ビオチン標識された抗原として用い、洗浄は、2分間TBSTで7回、次いで2分間TBSで3回実施した。溶出は、25 mM DTTで、室温で15分間実施し、次いでトリプシンによって消化した。

【0324】

パニングの第3ラウンドにおいては、16または80 pmolのビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fcを、抗原として用い、洗浄は、10分間TBSTで7回、次いで10分間TBSで3回実施した。溶出は、ラウンド1と同じようにIdeSで実施した。

【0325】

パニングの第4ラウンドにおいては、16または80 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fcを、抗原として用い、洗浄は、10分間TBSTで7回、次いで10分間TBSで3回実施した。溶出は、ラウンド1と同じようにIdeSで実施した。

40

【0326】

4. 3. 取得されたFabドメインを有するIgGの、ヒトCD137およびカニクイザルCD137に対する結合

各パニングアウトプットプールのFab遺伝子を、IgG形式に変換した。調製された哺乳動物発現プラスミドを大腸菌中に導入し、各パニングアウトプットプールから、96コロニーを採集して、そのVHおよびVL配列を解析した。それぞれ、ライブラリー2におけるVH配列の大部分は、dBBDu_183に集中しており、ライブラリー6におけるVH配列の大部分は

50

、dBBDu_193に集中していた。各大腸菌コロニーから調製されたプラスミドを、参考実施例 9 の方法による動物細胞における発現に用いた。

【0327】

調製されたIgG抗体を、ELISAに供して、CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に対するその結合能力を評価した。

【0328】

最初に、ストレプトアビジンコーティングマイクロプレート（384ウェル, Greiner）を、ビオチン標識されたCD3εペプチド、ビオチン標識されたヒトCD137-Fc、またはビオチン標識されたカニクイザルCD137-Fcを含有する20μLのTBSで、室温で1時間以上コーティングした。プレートの各ウェルをTBSTで洗浄することによって、プレートに結合していないビオチン標識された抗原を除去した後、ウェルを、20μLのブロッキング緩衝液（2%スキムミルク/TBS）で1時間以上ブロッキングした。ブロッキング緩衝液を、各ウェルから除去した。1%スキムミルク/TBSで2倍希釈した、10 ng/μLのIgGを含有する哺乳動物細胞上清の各々20μLをウェルに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSで希釈したヤギ抗ヒトκ軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレートを1時間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、Blue Phos Microwell Phosphatase Substrate System（KPL）を添加した各ウェルにおける溶液の発色反応を、Blue Phos Stop Solution（KPL）を添加することによって終了させた。次いで、発色を、615 nmでの吸光度によって測定した。測定結果を図16に示す。

【0329】

CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137のいずれにも対して結合を示した多くのIgGクローンが、各パニング手順から取得された。より良好な結合を示した96クローンを選択し、さらに評価した。

【0330】

4. 4. 取得されたFabドメインを有するIgGの、CD3εおよびヒトCD137に対する同時の結合の評価

参考実施例 4. 3においてCD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137のいずれにも対して明らかな結合を示した96の抗体を、さらに評価するために選択した。精製された抗体を、ELISAに供して、CD3εおよびヒトCD137に対するその同時の結合能力を評価した。

【0331】

最初に、ストレプトアビジンでコーティングされた磁気ビーズであるMyOne-T1ビーズの20μgを、0.5x block Ace、0.02% Tween、および0.05% ProClin 300を含むブロッキング緩衝液で3回洗浄し、次いで、このブロッキング緩衝液で、室温で60分間以上ブロッキングした。TBSTで1回洗浄した後、磁気ビーズを、黒色丸底PSプレート（Corning, 3792）の各ウェルにアブライした。0.625 pmolのビオチン標識されたヒトCD137-Fcを添加して、室温で10分間インキュベートした。その後、磁気ビーズをTBSによって1回洗浄した。250 ngの精製されたIgGを、62.5、6.25、もしくは0.625 pmolのフリーのCD3εまたは62.5 pmolのフリーのヒトIgG1 Fcドメインと混合し、次いで、各ウェル中の磁気ビーズに添加し、各IgGを各ウェル中のビオチン標識された抗原に結合させるように、室温で1時間、プレートを静置した。その後、各ウェルをTBSTで洗浄した。TBSで希釈したヤギ抗ヒトκ軽鎖アルカリホスファターゼコンジュゲート（BETHYL, A80-115AP）を、各ウェルに添加した。プレートを10分間インキュベートした。TBSTで洗浄した後、APS-5（Lumigen）を各ウェルに添加した。2分後に、各ウェルの蛍光を検出した。測定結果を、図17および表12に示す。大部分の試験されたクローンのヒトCD137に対する結合は、過剰量のフリーのCD3εペプチドによって阻害され、dual Fabライブラリーで取得された抗体は、CD3εとヒトCD137に同時には結合しなかったことが実証された。

【0332】

10

20

30

40

50

【表 1 2】

	ビオチン-ヒト CD137-Fc		
	フリーのCD3e 62.5 pmol	フリーのFc 62.5 pmol	シグナル の減少
dBBDu183/L057	2732	9025	69.73%
dBBDu183/L058	2225	11115	79.98%
dBBDu183/L059	2134	100126	97.87%
dBBDu183/L060	2169	37723	94.25%
dBBDu183/L061	2118	2723	22.22%
dBBDu183/L062	2777	27880	90.04%
dBBDu183/L063	2943	28858	89.80%
dBBDu183/L064	2206	13474	83.63%
dBBDu183/L065	2725	6024	54.76%
dBBDu183/L066	2325	34020	93.17%
dBBDu183/L067	2936	19722	85.11%
dBBDu197/L068	2786	105219	97.35%
dBBDu183/L069	2463	31769	92.25%
dBBDu183/L070	3267	92395	96.46%
dBBDu183/L071	2297	8670	73.51%
dBBDu183/L072	2840	54764	94.81%
dBBDu183/L073	2876	6724	57.23%
dBBDu196/L074	2724	12891	78.87%
dBBDu183/L075	2568	8029	68.02%
dBBDu196/L076	2188	5037	56.56%
dBBDu179/L077	3147	8018	60.75%
dBBDu167/L078	2378	27120	91.23%
dBBDu167/L079	2269	5869	61.34%
dBBDu167/L080	2236	95870	97.67%
dBBDu167/L081	2508	44240	94.33%
dBBDu167/L082	2398	177750	98.65%
dBBDu167/L083	2164	78935	97.26%
dBBDu167/L084	2182	18392	88.14%
dBBDu167/L085	2202	8724	74.76%

10

20

30

40

50

dBBDu167/L086	2627	135762	98.06%
dBBDu167/L087	2168	106703	97.97%
dBBDu167/L088	2040	2163	5.69%
dBBDu167/L089	2424	10161	76.14%
dBBDu167/L090	2595	181795	98.57%
dBBDu167/L091	11345	124409	90.88%
dBBDu167/L092	2924	123122	97.63%
dBBDu167/L093	4934	139388	96.46%
dBBDu167/L094	4374	140938	96.90%
dBBDu167/L095	2207	112225	98.03%
dBBDu186/L096	37273	84887	56.09%
dBBDu186/L097	9006	114399	92.13%
dBBDu186/L098	15908	114905	86.16%
dBBDu186/L099	2367	19583	87.91%
dBBDu186/L100	88856	102097	12.97%
dBBDu186/L101	2340	37392	93.74%
dBBDu186/L102	2427	2685	9.61%
dBBDu186/L103	21977	74203	70.38%
dBBDu186/L104	2165	2145	-0.93%
dBBDu186/L105	13426	89231	84.95%
dBBDu186/L106	3088	9857	68.67%
dBBDu186/L107	2104	2047	-2.78%
dBBDu186/L108	50796	83558	39.21%
dBBDu189/L109	3000	76770	96.09%
dBBDu189/L110	3836	119618	96.79%
dBBDu189/L111	2568	49623	94.82%
dBBDu189/L112	4768	91051	94.76%
dBBDu189/L113	3357	89648	96.26%
dBBDu189/L114	2158	2512	14.09%
dBBDu189/L115	4058	141183	97.13%
dBBDu189/L116	3149	109316	97.12%
dBBDu189/L117	2625	102489	97.44%

10

20

30

40

50

dBBDu189/L118	2446	19372	87.37%
dBBDu189/L119	20377	88058	76.86%
dBBDu189/L120	3778	113755	96.68%
dBBDu189/L121	3300	37197	91.13%
dBBDu189/L122	3949	141349	97.21%
dBBDu189/L123	4950	22574	78.07%
dBBDu189/L124	3282	111075	97.05%
dBBDu189/L125	6494	121498	94.66%
dBBDu189/L126	9750	75082	87.01%
dBBDu193/L127	2471	6084	59.39%
dBBDu193/L128	3197	120777	97.35%
dBBDu193/L129	2773	5310	47.78%
dBBDu193/L130	3055	124130	97.54%
dBBDu193/L131	15481	109233	85.83%
dBBDu193/L132	10414	115982	91.02%
dBBDu193/L133	2388	33076	92.78%
dBBDu193/L134	3046	109154	97.21%
dBBDu193/L135	2284	54304	95.79%
dBBDu193/L136	2092	113254	98.15%
dBBDu193/L137	2458	6602	62.77%
dBBDu193/L138	8165	100690	91.89%
dBBDu193/L139	2077	2190	5.16%
dBBDu222/L140	2721	22972	88.16%
dBBDu193/L141	2166	5582	61.20%
dBBDu193/L142	12085	103522	88.33%
dBBDu193/L143	2338	50082	95.33%
dBBDu193/L144	1952	2366	17.50%
dBBDu193/L145	2739	2820	2.87%

【 0 3 3 3 】

4. 5. 取得されたFabドメインを有するIgGの、CD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に対する親和性の評価

参考実施例 4. 4において取得された各IgGの、ヒトCD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に対する結合を、Biacore T200を用いて確認した。参考実施例 4. 4における結果により、16の抗体を選択した。センサーチップCM3 (GE Healthcare) に、アミンカップリングによって適切な量のsure protein A (GE Healthcare) を固定化した。選択された抗体をチップにより捕捉して、抗原としてのヒトCD3ε、ヒトCD137、およびカニクイザルCD137に対する相互作用を可能にした。用いたランニング緩衝液は、20 mmol/l ACES、150 mmol/l NaCl、0.05% (w/v) Tween20、pH 7.4であった。

すべての測定を25℃で実施した。抗原は、ランニング緩衝液を用いて希釈した。

【0334】

ヒトCD137に関しては、4000、1000、250、62.5、および15.6 nMの抗原濃度で、選択された抗体をその結合について評価した。希釈された抗原溶液、およびブランクであるランニング緩衝液を、30 μ L/分の流速で180秒間ロードして、各濃度の抗原を、センサーチップ上に捕捉された抗体と相互作用させた。次いで、ランニング緩衝液を、30 μ L/分の流速で300秒間流し、抗体からの抗原の解離を観察した。次に、センサーチップを再生するために、10 mmol/L グリシン-HCl、pH 1.5を30 μ L/分の流速で10秒間ロードし、50 mmol/L NaOHを流速30 μ L/分で10秒間ロードした。

【0335】

カニクイザルCD137に関しては、4000、1000、および250 nMの抗原濃度で、選択された抗体をその結合について評価した。希釈された抗原溶液、およびブランクであるランニング緩衝液を、30 μ L/分の流速で180秒間ロードして、抗原の各々を、センサーチップ上に捕捉された抗体と相互作用させた。次いで、ランニング緩衝液を、30 μ L/分の流速で300秒間流し、抗体からの抗原の解離を観察した。次に、センサーチップを再生するために、10 mmol/L グリシン-HCl、pH 1.5を30 μ L/分の流速で10秒間ロードし、50 mmol/L NaOHを流速30 μ L/分で10秒間ロードした。

【0336】

ヒトCD3edに関しては、1000、250、および62.5 nMの抗原濃度で、選択された抗体をその結合について評価した。希釈された抗原溶液、およびブランクであるランニング緩衝液を、30 μ L/分の流速で120秒間ロードして、抗原の各々を、センサーチップ上に捕捉された抗体と相互作用させた。次いで、ランニング緩衝液を、30 μ L/分の流速で180秒間流し、抗体からの抗原の解離を観察した。次に、センサーチップを再生するために、10 mmol/L グリシン-HCl、pH 1.5を30 μ L/分の流速で30秒間ロードし、50 mmol/L NaOHを流速30 μ L/分で30秒間ロードした。

【0337】

結合速度定数 k_a (1/Ms) および解離速度定数 k_d (1/s) などのカインेटリックパラメータを、測定によって得られたセンサーグラムに基づいて算出した。解離定数 K_D (M) を、これらの定数から算出した。各パラメータは、Biacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare) を用いて算出した。結果を表13に示す。

【0338】

10

20

30

40

50

【表 1 3】

H鎖名	L鎖名	配列 番号	ヒト CD137		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
dBBDu_183	dBBDu_L063	123	2.05E+03	3.58E-03	1.74E-06
dBBDu_183	dBBDu_L072	124	1.76E+03	4.25E-03	2.41E-06
dBBDu_167	dBBDu_L091	125	2.72E+03	1.85E-02	6.79E-06
dBBDu_186	dBBDu_L096	126	2.46E+02	5.58E-04	2.27E-06
dBBDu_186	dBBDu_L098	127	2.31E+02	5.34E-04	2.31E-06
dBBDu_186	dBBDu_L106	128	1.30E+02	4.47E-04	3.44E-06
dBBDu_189	dBBDu_L116	129	7.07E+02	2.91E-03	4.12E-06
dBBDu_189	dBBDu_L119	130	1.48E+02	4.02E-04	2.71E-06
dBBDu_183	dBBDu_L067	131	1.38E+03	4.51E-03	3.26E-06
dBBDu_186	dBBDu_L100	132	3.91E+02	7.46E-04	1.91E-06
dBBDu_186	dBBDu_L108	133	3.35E+02	8.10E-04	2.41E-06
dBBDu_189	dBBDu_L112	134	1.18E+03	3.13E-03	2.66E-06
dBBDu_189	dBBDu_L126	135	1.34E+03	6.88E-04	5.13E-07
dBBDu_167	dBBDu.L094	136	1.21E+03	1.02E-02	8.43E-06
dBBDu_193	dBBDu.L127	137	4.40E+02	1.45E-03	3.30E-06
dBBDu_193	dBBDu.L132	138	4.71E+02	2.11E-03	4.48E-06

10

20

30

40

50

H鎖名	L鎖名	配列 番号	カニクイザルCD137		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
dBBDu_183	dBBDu_L063	123	1.47E+03	4.57E-03	3.12E-06
dBBDu_183	dBBDu_L072	124	1.22E+03	5.93E-03	4.87E-06
dBBDu_167	dBBDu_L091	125	2.43E+03	1.01E-02	4.17E-06
dBBDu_186	dBBDu_L096	126	1.09E+01	2.23E-03	2.05E-04
dBBDu_186	dBBDu_L098	127	8.84E+00	1.19E-03	1.34E-04
dBBDu_186	dBBDu_L106	128	2.05E+01	1.26E-03	6.13E-05
dBBDu_189	dBBDu_L116	129	7.44E+02	8.23E-03	1.11E-05
dBBDu_189	dBBDu_L119	130	3.42E+01	1.22E-03	3.57E-05
dBBDu_183	dBBDu_L067	131	1.31E+03	8.13E-03	6.20E-06
dBBDu_186	dBBDu_L100	132	2.95E+01	2.08E-03	7.04E-05
dBBDu_186	dBBDu_L108	133	2.25E+02	3.61E-03	1.61E-05
dBBDu_189	dBBDu_L112	134	4.98E+03	2.86E-02	5.76E-06
dBBDu_189	dBBDu_L126	135	8.07E+02	2.47E-03	3.06E-06
dBBDu_167	dBBDu.L094	136	1.08E+04	7.48E-02	6.92E-06
dBBDu_193	dBBDu.L127	137	1.12E+02	3.16E-03	2.81E-05
dBBDu_193	dBBDu.L132	138	8.06E+00	6.10E-03	7.57E-04

10

20

30

40

50

H鎖名	L鎖名	配列 番号	ヒト CD3ed		
			ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
dBBDu_183	dBBDu_L063	123	5.69E+04	1.57E-02	2.76E-07
dBBDu_183	dBBDu_L072	124	3.61E+04	7.85E-03	2.17E-07
dBBDu_167	dBBDu_L091	125	5.24E+04	2.16E-02	4.13E-07
dBBDu_186	dBBDu_L096	126	1.12E+04	1.02E-01	9.11E-06
dBBDu_186	dBBDu_L098	127	1.11E+04	2.09E-02	1.88E-06
dBBDu_186	dBBDu_L106	128	1.03E+04	3.18E-02	3.09E-06
dBBDu_189	dBBDu_L116	129	2.08E+04	4.34E-03	2.09E-07
dBBDu_189	dBBDu_L119	130	1.25E+04	2.58E-02	2.06E-06
dBBDu_183	dBBDu_L067	131	8.89E+04	1.93E-02	2.17E-07
dBBDu_186	dBBDu_L100	132	1.62E+04	5.46E-02	3.36E-06
dBBDu_186	dBBDu_L108	133	1.36E+04	4.08E-02	3.01E-06
dBBDu_189	dBBDu_L112	134	3.03E+04	1.00E-02	3.31E-07
dBBDu_189	dBBDu_L126	135	1.09E+04	2.81E-02	2.57E-06
dBBDu_167	dBBDu.L094	136	6.02E+04	2.10E-02	3.49E-07
dBBDu_193	dBBDu.L127	137	1.26E+04	1.91E-02	1.51E-06
dBBDu_193	dBBDu.L132	138	9.89E+03	2.01E-02	2.03E-06

【0339】

【参考実施例5】抗ヒトGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体の調製およびそのヒトCD137アゴニスト活性の評価

5. 1. 抗ヒトGPC3/抗ヒトCD137二重特異性抗体および抗ヒトGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体の調製

ヒトIgG1定常領域を有する、抗ヒトGPC3/抗ヒトCD137二重特異性抗体および抗ヒトGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体を、以下の手順によって作製した。WO2005/035584A1に記載されている抗ヒトCD137抗体（H鎖が配列番号：93、L鎖が配列番号：94）（Bと省略される）コードする遺伝子を、対照抗体として用いた。抗体の抗ヒトGPC3側は、重鎖可変領域H0000（配列番号：139）および軽鎖可変領域GL4（配列番号：140）を共有した。

【0340】

参考実施例4および表13に記載される16のdual-Ig Fabを、候補dual-Ig抗体として用いた。これらの分子について、H鎖とL鎖との間の会合を調節するため、および二重特異性抗体を効率的に取得するために、Schaeferら（Schaefer, Proc. Natl. Acad. Sci., 2011, 108, 11187-11192）によって報告されたCrossMab技術を用いた。より具体的には、ヒトGPC3に対するFabのVHドメインおよびVLドメインを交換することによって、これらの分子を作製した。異種会合の促進のために、ノブ-イントゥ-ホールテクノロジーを、抗体H鎖の定常領域に対して用いた。ノブ-イントゥ-ホールテクノロジーとは、ノブがホール中に配置されるように、H鎖のうちの1つのCH3領域に存在するアミノ酸側鎖をより大きい側鎖で置換し（ノブ）、かつもう1つのH鎖のCH3領域中のアミノ酸側鎖をより小さい側鎖で置換する（ホール）ことによる、H鎖のヘテロ二量体化の促進を通して、目的のヘ

テロ二量体化抗体の調製を可能にする技術である (Burmeister, Nature, 1994, 372, 379-383)。

【0341】

以後、ノブ修飾が導入されている定常領域をKnと示し、ホール修飾が導入されている定常領域をH1と示す。さらに、WO2011/108714に記載されている修飾を用いて、Fc γ 結合を低下させた。具体的には、234、235、および297位 (EUナンバリング) のアミノ酸をAlaに置換する修飾を導入した。446位のGlyおよび447位のLys (EUナンバリング) を、抗体H鎖のC末端から除去した。ヒスチジンタグを、Kn Fc領域のC末端に付加し、FLAGタグを、H1 Fc領域のC末端に付加した。上述の修飾を導入することによって調製された抗ヒトGPC3 H鎖は、GC33(2)H-G1dKnHS (配列番号: 141) であった。調製された抗ヒトCD137 H鎖は、BVH-G1dHIFS (配列番号: 142) であった。抗体L鎖GC33(2)L-k0 (配列番号: 143) およびBVL-k0 (配列番号: 144) を、それぞれ、抗ヒトGPC3側および抗CD137側に共通して用いた。Dual抗体のH鎖およびL鎖もまた、表13に示す。BVH-G1dHIFSおよびBVL-k0と同じように、それぞれ、各dual抗体クローンのVHを、G1dHIFS (配列番号: 156) CH領域に融合させ、各dual抗体クローンのVLを、k0 (配列番号: 157) CL領域に融合させた。表15に示す組み合わせを有する抗体を発現させて、目的の二重特異性抗体を取得した。無関連である抗体を、対照として用いた (Ctrlと省略される)。これらの抗体を、FreeStyle293細胞 (Invitrogen) における一過性発現によって発現させ、「参考実施例9」に従って精製した。

【0342】

5. 2. 抗ヒトGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体のインビトロGPC3依存性CD137アゴニスト作用の評価

ヒトCD137についてのアゴニスト活性を、ELISAキット (R&D systems, DY206) を用いたサイトカイン産生に基づいて評価した。抗ヒトGPC3/Dual-Fab抗体のCD3 ϵ 結合ドメインの作用を避けるために、CD3 ϵ もGPC3も発現しないが、CD137を構成的に発現するB細胞株HDLM-2を用いた。HDLM-2を、20% FBSを含有するRPMI-1640培地に 8×10^5 細胞/mlの密度で懸濁した。GPC3を発現するマウスがん細胞株CT26-GPC3 (参考実施例13) を、同じ培地に 4×10^5 細胞/mlの密度で懸濁した。同じ体積の各細胞懸濁液を混合し、混合された細胞懸濁液を、96ウェルプレート中に200 μ l/ウェルの体積で播種した。抗GPC3/Ctrl抗体、抗GPC3/抗CD137抗体、および参考実施例5. 1において調製された8つの抗GPC3/Dual-Fab抗体を、各々30 μ g/ml、6 μ g/ml、1.2 μ g/ml、0.24 μ g/mlで添加した。細胞を、37 $^{\circ}$ Cおよび5% CO₂の条件下で3日間培養した。培養上清を収集し、上清中に含有されるヒトIL-6の濃度をHuman IL-6 DuoSet ELISA (R&D systems, DY206) で測定して、HDLM-2の活性化を評価した。ELISAは、キットの製造業者 (R&D systems) により提供される説明書に従うことによって行った。

【0343】

結果として (図18および表14)、8つの抗GPC3/Dual-Fab抗体のうち7つは、抗体濃度に依存して、抗GPC3/抗CD137抗体と同様にHDLM-2のIL-6産生の活性化を示した。表14において、Ctrlと比較したアゴニスト活性とは、Ctrlの存在下でのバックグラウンドレベルを超えるhIL-6分泌の増加レベルを意味する。この結果に基づいて、これらのDual-Fab抗体は、ヒトCD137に対してアゴニスト活性を有すると考えられた。

【0344】

10

20

30

40

50

【表 1 4】

抗体 ($\mu\text{g/mL}$)	hIL-6 (pg/mL)		Bと比較した アゴニスト活性		Ctrlと比較した アゴニスト活性	
	30	6	30	6	30	6
Ctrl	906.060814	1012.42048			0.00%	0.00%
B	4344.80386	4524.76696	100.00%	100.00%	379.53%	346.93%
L063	1129.89262	967.744207	6.51%	-1.27%	24.70%	-4.41%
L072	1447.54151	1125.01544	15.75%	3.21%	59.76%	11.12%
L091	944.057133	934.684418	1.10%	-2.21%	4.19%	-7.68%
L096	1736.82678	1681.25602	24.16%	19.04%	91.69%	66.06%
L098	1753.61596	1501.11166	24.65%	13.91%	93.54%	48.27%
L106	1573.01967	1476.44391	19.40%	13.21%	73.61%	45.83%
L116	1566.84383	1303.26238	19.22%	8.28%	72.93%	28.73%
L119	1606.92382	1255.50299	20.38%	6.92%	77.35%	24.01%

【 0 3 4 5】

【参考実施例 6】 抗ヒトGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体のヒトCD3 ϵ アゴニスト活性の評価

6. 1. 抗ヒトGPC3/抗ヒトCD3 ϵ 二重特異性抗体および抗ヒトGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体の調製

ヒトIgG1定常領域を有する、抗ヒトGPC3/Ctrl二重特異性抗体および抗ヒトGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体を、参考実施例 5. 1において作製し、抗ヒトGPC3/抗ヒトCD3 ϵ 二重特異性抗体もまた、同じ構築物として調製した。参考実施 10において作製されたCE115 VH（配列番号：145）およびCE115 VL（配列番号：146）を、抗ヒトCD3 ϵ 抗体の重鎖および軽鎖に用いた。組み合わせを有する抗体を表 15に示す。これらの抗体を、FreeStyle293細胞（Invitrogen）における一過性発現によって発現させ、「参考実施例 9」に従って精製した。

【 0 3 4 6】

10

20

30

40

50

【表 15】

抗体名	H鎖遺伝子1	L鎖遺伝子1	H鎖遺伝子1	L鎖遺伝子1
GPC3 ERY22-B	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	BVH-G1dHIFS	BVL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_183/L063	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_183VH-G1dHIFS	L063VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_183/L072	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_183VH-G1dHIFS	L072VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_167/L091	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_167VH-G1dHIFS	L091VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L096	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L096VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L098	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L098VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L106	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L106VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_189/L116	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_189VH-G1dHIFS	L116VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_189/L119	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_189VH-G1dHIFS	L119VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_183/L067	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_183VH-G1dHIFS	L067VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L100	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L100VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_186/L108	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_186VH-G1dHIFS	L108VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_189/L112	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_189VH-G1dHIFS	L112VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_189/L126	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_189VH-G1dHIFS	L126VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_167/L094	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_167VH-G1dHIFS	L094VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_193/L127	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_193VH-G1dHIFS	L127VL-k0
GPC3 ERY22-dBBDu_193/L132	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	dBBDu_193VH-G1dHIFS	L132VL-k0
GPC3 ERY22-CE115	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	CE115VH-G1dHIFS	CE115VL-k0
GPC3 ERY22-Ctrl	GC33(2)H-G1dKnHS	GC33(2)L-k0	CtrlVH-G1dHIFS	CtrlVL-k0

10

20

【0347】

6. 2. 抗ヒトGPC3/Dual-Fab三重特異性抗体のインビトロGPC3依存性CD3アゴニスト作用の評価

30

ヒトCD3に対するアゴニスト活性を、GloResponse（商標）NFAT-luc2 Jurkat Cell Line（Promega, CS#176401）をエフェクター細胞として用いることによって評価した。Jurkat細胞は、ヒト急性T細胞白血病に由来するヒトTリンパ球細胞の不死化された細胞株であり、それ自体上でヒトCD3を発現する。NFAT luc2_jurkat細胞においては、CD3活性化からのシグナルによって、ルシフェラーゼの発現が誘導された。細胞膜上にヒトGPC3を発現するSK-pca60細胞株（参考実施例13）を、標的細胞として用いた。

【0348】

5.00E+03個のSK-pca60細胞（標的細胞）および3.00E+04個のNFAT-luc2 Jurkat細胞（エフェクター細胞）を両方とも、白底96ウェルアッセイプレート（Costar, 3917）の各ウェルに添加し、次いで、0.1、1、または10 mg/Lの濃度の、10 μLの各抗体を各ウェルに添加して、5% CO₂の存在下、37℃で24時間インキュベートした。発現したルシフェラーゼを、Bio-Glo luciferase assay system（Promega, G7940）で、付属の説明書に従って検出した。検出には2104 EnVisionを用いた。結果を図19に示す。

40

【0349】

大部分のDual Fabクローンは、明らかなCD3εアゴニスト活性を示し、そのうちのいくつかは、CE115抗ヒトCD3ε抗体と同等レベルの活性を示した。Dual-Fabドメインに対するCD137結合活性の付加は、CD3εアゴニスト活性の喪失を誘導しなかったこと、ならびに、Dual-Fabドメインが、1つのドメインのみによって、ヒトCD3εおよびCD137の2つの異なる抗原に対する結合だけではなく、ヒトCD3εおよびCD137の両方のアゴニスト

50

活性も示したことが実証された。

【0350】

重鎖dBDu_186を有するいくつかのDual-Fabドメインは、他のものよりも弱いCD3εアゴニスト活性を示した。これらの抗体はまた、参考実施例4.5のbiacore解析において、ヒトCD3εに対してより弱い親和性を示した。このDual Fabライブラリー由来のDual-FabのCD3εアゴニスト活性は、ヒトCD3εに対するその親和性のみに依存することが実証され、これは、CD3εアゴニスト活性がこのライブラリー設計において保持されていたことを意味する。

【0351】

[参考実施例7] PBMC T細胞サイトカイン放出アッセイにおけるDual-Fab抗体のヒトCD3ε/ヒトCD137相乗活性の評価

10

7.1. 抗体調製

WO2005/035584A1に記載されている抗CD137抗体（Bと省略される）、参考実施例5.1に記載されるCtrl抗体、および参考実施例7に記載される抗CD3εCE115抗体を、単一抗原特異的な対照として用いた。表13に記載されるDual-FabであるH183L072（重鎖：配列番号：104、軽鎖：配列番号：124）を、さらなる評価のために選択し、FreeStyle293細胞（Invitrogen）における一過性発現によって発現させて、「参考実施例9」に従って精製した。

【0352】

7.2. PBMC T細胞アッセイ

20

CD3εおよびCD137の活性化に対するDual-Fab抗体の相乗効果を調べるために、cytometric bead array (CBA) Human Th1/T2 Cytokine kit II (BD Biosciences #551809) を用いて、総サイトカイン放出を評価した。CD137の活性化に関連して、IL-2（インターロイキン-2）、IFNγ（インターフェロンγ）、およびTNFα（腫瘍壊死因子-α）を、凍結状態で購入した凍結ヒト末梢血単核細胞（PBMC）（STEMCELL）より単離されたT細胞から、評価した。

【0353】

7.2.1. 凍結ヒトPBMCの調製およびT細胞の単離

PBMCを含有するクライオバイアルを、37℃の水浴に置いて、細胞を解凍した。次いで、細胞を、9 mLの培地（標的細胞を培養するために用いられる培地）を含有する15 mL falconチューブ中に分注した。次いで、細胞懸濁液を、1,200 rpmで5分間、室温での遠心分離に供した。上清を静かに吸引し、再懸濁のために新鮮な温めた培地を添加して、ヒトPBMC溶液として用いた。T細胞を、Dynabeads Untouched Human T cell kit (Invitrogen #11344D) を用いて製造業者の説明書に従って単離した。

30

【0354】

7.2.2. サイトカイン放出アッセイ

30 μg/mLおよび10 μg/mLの、参考実施例7.1において調製された抗体を、maxisorp 96ウェルプレート（Thermofisher #442404）上に一晚コーティングした。1.00E+05個のT細胞を、抗体を含有する各ウェルに添加して、37℃で72時間インキュベートした。プレートを、1,200 rpmで5分間遠心分離して、上清を収集した。製造業者の説明書に従ってCBAを行い、結果を図20に示す。

40

【0355】

dual-FabであるH183L072抗体のみが、T細胞によるIL-2分泌を示した。抗CD137（B）も抗CD3ε抗体（CE115）も、単独でT細胞からのIL-2の誘導をもたらさなかった。加えて、抗CD137抗体単独は、サイトカインの検出をもたらさなかった。抗CD3ε抗体と比較すると、Dual-Fab抗体は、TNFαのレベルの増加およびIFNγの同様の分泌をもたらした。これらの結果は、dual-Fab抗体が、T細胞の機能的活性化のためにCD3εおよびCD137の両方の相乗的活性化を惹起できたことを示唆する。

【0356】

[参考実施例8] 抗GPC3/Dual-Fab三重特異性抗体の細胞傷害活性の評価

50

8. 1. 抗GPC3/dual-Fabおよび抗GPC3/CD137二重特異性抗体の調製

参考実施例 6 に記載される抗GPC3またはCtrl抗体、およびDual-Fab (H183L072) または抗CD137抗体を使用し、Proc Natl Acad Sci U S A. 2013 Mar 26; 110(13): 5145-5150に記載されている方法に従うFabアーム交換 (FAE) を用いて、抗GPC3/dual-Fab、抗GPC3/CD137、Ctrl/H183L072、およびCtrl/CD137抗体の4つの抗体を生成した。4つの抗体すべての分子形式は、従来のIgGと同じ形式である。抗GPC3/H183L072は、GPC3、CD3、およびCD137に結合することができる三重特異性抗体であり、抗GPC3/CD137は、GPC3およびCD137に結合することができる二重特異性抗体であり、Ctrl/H183L072およびCtrl/CD137は、対照として用いた。生成した4つの抗体はすべて、Fcγ受容体に対して減弱した親和性を有するサイレントFcからなる。

【0357】

8. 2. T細胞依存性細胞傷害活性 (TDCC) アッセイ

細胞傷害活性を、参考実施例 10. 5. 2 に記載されるようにxCELLigence Real-Time Cell Analyzer (Roche Diagnostics) を用いた細胞増殖抑制の比率によって評価した。両方ともGPC3を発現するトランスフェクタント細胞株である1.00E+04個のSK-pca60またはSK-pca13aを、標的 (Tと省略される) 細胞として用い (それぞれ、参考実施例 13および10)、参考実施例 7. 2. 1 に記載されるように調製された5.00E+04個の凍結ヒトPBMCエフェクター (Eと省略される) 細胞と共培養した。これは、腫瘍細胞に対して5倍量のエフェクター細胞を加えたことを意味し、そのためここではET 5と記載する。抗GPC3/H183L072抗体およびGPC3/CD137抗体を、0.4、5、および10 nMで添加した一方、Ctrl/H183L072抗体およびCtrl/CD137抗体は、各ウェル10 nMで添加した。細胞傷害活性の測定は、参考実施例 10. 5. 2 に記載されるのと同様に実施した。反応は、5%二酸化炭素ガスの条件下、37℃で実施した。PBMCの添加の72時間後に、細胞増殖抑制 (CGI) 率 (%) を、参考実施例 10. 5. 2 に記載される式を用いて決定し、図 21 に示すようにグラフにプロットした。参考実施例 6. 2 においてJurkat細胞に対してCD3活性化を示した抗GPC3/H183L072 dual-Fab抗体は、GPC3発現細胞の強い細胞傷害活性を、すべての濃度で両方の標的細胞株においてもたらしたが、CD3活性化を示さなかった対照/H183L072 dual-Fab抗体および抗GPC3/CD137抗体はもたらさず、Dual-Fab三重特異性抗体が細胞傷害活性をもたらし得ることが示唆された。

【0358】

【参考実施例 9】抗体発現ベクターの作製および抗体の発現と精製

アミノ酸置換またはIgG変換を、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Corp.)、PCR、またはIn fusion Advantage PCRクローニングキット (Takara Bio Inc.) 等を用いて当業者に一般に公知の方法で行い、発現ベクターを構築した。得られた発現ベクターを当業者に一般に公知の方法によって配列決定した。作製したプラスミドをヒト胎児腎がん細胞由来HEK293H株 (Invitrogen Corp.) またはFreeStyle293細胞 (Invitrogen Corp.) に一過性に導入し、抗体を発現させた。rProtein A Sepharose (商標) Fast Flow (GE Healthcare Japan Corp.) を用いて当業者に一般に公知の方法によって、各抗体を得られた培養上清から精製した。精製抗体の濃度について、分光光度計を用いて280 nmで吸光度を測定し、得られた値からPACE法により算出された吸光係数を用いて抗体濃度を算出した (Protein Science 1995 ; 4 : 2411-2423)。

【0359】

【参考実施例 10】抗ヒトおよび抗カニクイザルCD3ε抗体CE115の作製

10. 1. ヒトCD3を発現する細胞およびカニクイザルCD3を発現する細胞で免疫したラットを用いたハイブリドーマの作製

各SDラット (雌、免疫開始時6週齢、Charles River Laboratories Japan, Inc.) を、ヒトCD3εγまたはカニクイザルCD3εγを発現するBa/F3細胞で以下の通り免疫した: 0日目 (初回免疫日を0日目と定義した) に、フロイント完全アジュバント (Difco Laboratories, Inc.) とともに、ヒトCD3εγを発現する 5×10^7 個のBa/F3細胞をラットに腹腔内投与した。14日目に、フロイント不完全アジュバント (Difco Laboratories, Inc

10

20

30

40

50

.)とともに、カニクイザルCD3 ϵ γ を発現する 5×10^7 個のBa/F3細胞をラットに腹腔内投与した。その後、1週間おきに合計4回、ヒトCD3 ϵ γ を発現するBa/F3細胞またはカニクイザルCD3 ϵ γ を発現するBa/F3細胞を 5×10^7 個、交互にラットに腹腔内投与した。CD3 ϵ γ の最終投与1週間後(49日目)に、ブースターとしてヒトCD3 ϵ γ を発現するBa/F3細胞をラットに静脈内投与した。その3日後に、ラットの脾臓細胞とマウスミエローマ細胞SP2/0とを、PEG1500 (Roche Diagnostics K.K.)を用いた常法に従い融合した。融合細胞、すなわちハイブリドーマを、10%FBSを含むRPMI1640培地(以下、10%FBS/RPMI1640と称す)中で培養した。

【0360】

融合の翌日に、(1)融合細胞を半流動培地(Stemcell Technologies, Inc.)に懸濁した。ハイブリドーマを選択培養するとともに、コロニー化を実施した。

【0361】

融合後9日目または10日目に、ハイブリドーマのコロニーをピックアップし、HAT選択培地(10%FBS/RPMI1640、2重量% HAT 50 $\times$ 濃縮物(Sumitomo Dainippon Pharma Co., Ltd.)、および5重量% BM-Condimed H1 (Roche Diagnostics K.K.))を含む96-ウェルプレートに、1コロニー/ウェルで播種した。3~4日の培養後、各ウェルの培養上清を回収し、培養上清中のラットIgG濃度を測定した。ラットIgGを含むことが確認された培養上清について、ヒトCD3 ϵ γ を発現する付着Ba/F3細胞またはヒトCD3 ϵ γ を発現しない付着Ba/F3細胞を用いる細胞ELISAによって、ヒトCD3 ϵ γ に特異的に結合する抗体を産生するクローンについてスクリーニングした(図22)。さらに、カニクイザルCD3 ϵ γ を発現する付着Ba/F3細胞を用いる細胞ELISAによって、サルCD3 ϵ γ との交差反応性についてもクローンを評価した(図22)。

【0362】

10.2. 抗ヒトおよび抗サルCD3 ϵ キメラ抗体の作製

各ハイブリドーマ細胞から、RNeasy Mini Kits (Qiagen N.V.)を用いてトータルRNAを抽出し、SMART RACE cDNA Amplification Kit (BD Biosciences)を用いてcDNAを合成した。作製したcDNAをPCRで用いて、抗体の可変領域遺伝子をクローニングベクターに挿入した。各DNA断片のヌクレオチド配列は、BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Inc.)およびDNAシーケンサーABI PRISM 3700 DNA Sequencer (Applied Biosystems, Inc.)を用いて、それに含まれる添付説明書に記載の方法に従い決定された。CE115 H鎖可変ドメイン(配列番号: 162)およびCE115 L鎖可変ドメイン(配列番号: 163)のCDRおよびFRは、Kabatナンバリングに従って決定された。

【0363】

ヒト抗体IgG1鎖定常ドメインに連結させたラット抗体H鎖可変ドメインを含むキメラ抗体H鎖をコードする遺伝子、およびヒト抗体カッパ鎖定常ドメインに連結させたラット抗体L鎖可変ドメインを含むキメラ抗体L鎖をコードする遺伝子を、動物細胞用発現ベクターに組み込んだ。作製した発現ベクターを用いて、CE115キメラ抗体の発現および精製を行った(参考実施例1)。

【0364】

10.3. EGFR_ERY22_CE115の作製

次に、がん抗原(EGFR)に対するIgGを基本骨格として用いて、一方のFabをCD3 ϵ 結合ドメインに置き換えた形の分子を作製した。この操作において、基本骨格とするIgGのFcとして、上述した場合と同様に、Fc γ R(Fc γ 受容体)に対する結合活性が減弱されたサイレント型Fcを用いた。EGFR結合ドメインとして、セツキシマブの可変領域を構成するセツキシマブ-VH(配列番号: 164)およびセツキシマブ-VL(配列番号: 165)を用いた。抗体H鎖定常ドメインとして、C末端のGlyおよびLysを除去したIgG1に由来するG1d、D356KおよびH435Rの変異を導入したG1dに由来するA5、およびK439Eの変異を導入したG1dに由来するB3を用い、それぞれセツキシマブ-VHと組み合わせ、セツキシマブ-VH-G1d(配列番号: 166)、セツキシマブ-VH-A5(配列番号: 167)、および

10

20

30

40

50

セツキシマブ-VH-B3（配列番号：168）を参考実施例9の方法に従って作製した。抗体H鎖定常ドメインをH1と名づけた場合、可変ドメインとしてセツキシマブ-VHを持つ抗体のH鎖に対応する配列はセツキシマブ-VH-H1で表した。

【0365】

この文脈において、アミノ酸の改変は、例えば、D356Kで表す。最初のアルファベット（D356KのDに該当）は、改変前のアミノ酸残基の一字表記で表すアルファベットを意味する。このアルファベットに続く数字（D356Kの356に該当）は、この改変残基のEUナンバリング位置を意味する。最後のアルファベット（D356KのKに該当）は、改変後のアミノ酸残基の一字表記で表すアルファベットを意味する。

【0366】

EGFRに対するFabのVHドメインとVLドメインとの間の交換によって、EGFR_ERY22_CE115（図23）を作製した。具体的には、前述の方法と同様の方法で付加した適切な配列によるプライマーを用いて、PCR法等の当業者に一般に公知の方法により、EGFR_ERY22_Hk（配列番号：169）、EGFR_ERY22_L（配列番号：170）、CE115_ERY22_Hh（配列番号：171）、またはCE115_ERY22_L（配列番号：172）をコードする各ポリヌクレオチドが挿入された一連の発現ベクターが作製された。

【0367】

発現ベクターは以下の組み合わせでFreeStyle 293-F細胞に導入され、各目的分子を一過性に発現させた：

目的分子：EGFR_ERY22_CE115

発現ベクターに挿入されたポリヌクレオチドによりコードされるポリペプチド：EGFR_ERY22_Hk、EGFR_ERY22_L、CE115_ERY22_Hh、およびCE115_ERY22_L。

【0368】

10.4. EGFR_ERY22_CE115の精製

得られた培養上清をAnti FLAG M2カラム（Sigma-Aldrich Corp.）に添加し、該カラムを洗浄し、続いて、0.1 mg/mL FLAGペプチド（Sigma-Aldrich Corp.）で溶出した。目的分子を含む画分をHisTrap HPカラム（GE Healthcare Japan Corp.）に添加し、該カラムを洗浄し、続いて、イミダゾールの濃度勾配で溶出した。目的分子を含む画分を限外濾過によって濃縮した。その後、この画分をSuperdex 200カラム（GE Healthcare Japan Corp.）に添加した。単量体画分のみを溶出液から回収し、各精製目的分子を得た。

【0369】

10.5. ヒト末梢血単核球を用いた細胞傷害活性の測定

10.5.1. ヒト末梢血単核球（PBMC）溶液の作製

1,000単位/mLのヘパリン溶液（ノボ・ヘパリン注5,000単位、Novo Nordisk A/S）を予め100 μ L充填した注射器を用いて、各健常人ボランティア（成人）から50 mLの末梢血を採取した。末梢血をPBS（-）で2倍希釈し、次いで4等分し、そして15 mLのFicoll-Paque PLUSを予め充填しかつ予め遠心操作を行ったLeucosepリンパ球分離管（Cat. No. 227290、Greiner Bio-One GmbH）に加えた。該分離管の遠心分離（2,150 rpm、10分、室温）の後、単核球画分層が分取された。10%FBSを含むダルベッコ変法イーグル培地（Sigma-Aldrich Corp.；以下10%FBS/D-MEMと呼ぶ）で単核球画分中の細胞を1回洗浄した。その後、該細胞を10%FBS/D-MEMで 4×10^6 細胞/mLの細胞密度に調整した。このように調製した細胞溶液を、ヒトPBMC溶液として以後の試験に用いた。

【0370】

10.5.2. 細胞傷害活性の測定

細胞傷害活性は、xCeLLigenceリアルタイムセルアナライザー（Roche Diagnostics）を用いて、細胞増殖抑制率に基づいて評価された。標的細胞には、SK-HEP-1細胞株にヒトEGFRを強制発現させて樹立したSK-pca13a細胞株を用いた。SK-pca13aをディッシュから剥離し、100 μ L/ウェル（ 1×10^4 細胞/ウェル）でE-Plate 96プレート（Roche Diagnostics）に播種し、xCeLLigenceリアルタイムセルアナライザーを用いて生細胞の

10

20

30

40

50

アッセイを開始した。翌日、xCELLigenceリアルタイムセルアナライザーからプレートを取り出し、各濃度（0.004、0.04、0.4、および4 nM）に調整した各抗体50 μLを該プレートに添加した。室温にて15分間反応させた後、前述の10.5.1で調製したヒトPBMC溶液50 μL（ 2×10^5 細胞/ウェル）をそれに加えた。このプレートをxCELLigenceリアルタイムセルアナライザーに再セットし、生細胞のアッセイを開始した。反応は、5%CO₂および37℃の条件下でヒトPBMCの添加の72時間後に行われた。細胞増殖抑制率（%）を下式によりセルインデックス値から決定した。抗体の添加直前のセルインデックス値を1として、それに対して正規化した後の数値を、この算出でセルインデックス値として用いた。

$$\text{細胞増殖抑制率（\%）} = (A - B) \times 100 / (A - 1)$$

式中、Aは、抗体を追加していないウェル（標的細胞およびヒトPBMCのみ）の平均セルインデックス値を表し、Bは、各抗体を追加したウェルの平均セルインデックス値を表す。試験は三連で実施した。

【0371】

ヒト血液から調製したPBMCをエフェクター細胞として用いて、CE115を含むEGFR_ERY22_CE115の細胞傷害活性を測定した。結果として、極めて強い活性が確認された（図24）。

【0372】

〔参考実施例11〕CD3および第2の抗原に結合する抗体の作製のための抗体改変

11.1. 第2の抗原に結合できるペプチドの挿入部位および長さの試験

一方の可変領域（Fab）を通じてがん抗原に結合することができかつもう一方の可変領域を通じて第1の抗原CD3および第2の抗原に結合することができるが、CD3および第2の抗原に同時に結合することができない、Dual binding Fab分子を取得するための試験を実施した。CD3ε結合抗体CE115の重鎖のループにGGSPeプチドを挿入し、一方のFabにEGFR結合ドメインを持ちかつもう一方のFabにCD3結合ドメインを持つ各ヘテロ二量化抗体を参考実施例9に従って作製した。

【0373】

具体的には、CDR2中のK52BとS52cとの間にGGSPeプチドを挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE31 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/173/172）、この位置にGGSGGSPeプチド（配列番号：175）を挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE32 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/174/172）、およびこの位置にGGSGGSGGSPeプチド（配列番号：177）を挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE33 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/176/172）を作製した。同様に、FR3中のD72とD73との間（ループ）にGGSPeプチドを挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE34 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/178/172）、この位置にGGSGGSPeプチド（配列番号：175）を挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE35 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/179/172）、およびこの位置にGGSGGSGGSPeプチド（配列番号：177）を挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE36 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/180/172）を作製した。加えて、CDR3中のA99とY100との間にGGSPeプチドを挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE37 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/181/172）、この位置にGGSGGSPeプチドを挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE38 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/182/172）、およびこの位置にGGSGGSGGSPeプチドを挿入したEGFR ERY22_Hk/EGFR ERY22_L/CE115_CE39 ERY22_Hh/CE115_ERY22_L（配列番号：169/170/183/172）を作製した。

【0374】

11.2. GGSペプチドを挿入したCE115抗体のCD3εへの結合の確認

作製した各抗体のCD3εへの結合活性をBiacore T100を用いて確認した。ビオチン化

10

20

30

40

50

CD3ε エピトープペプチドをストレプトアビジンによってCM5チップに固定化し、作製した抗体をそれにアナライズとして注入し、その結合親和性を解析した。

【0375】

その結果を表16に示す。CD3ε に対するCE35、CE36、CE37、CE38、およびCE39の結合親和性は、親抗体であるCE115と同等であった。このことは、第2の抗原に結合するペプチドがこれらのループ中に挿入できることを示した。結合親和性は、GGSGSGSGSを挿入したCE36またはCE39では低下しなかった。このことは、これらの部位への少なくとも9アミノ酸までのペプチドの挿入はCD3ε に対する結合活性に影響を与えないことを示した。

【0376】

【表16】

サンプル	ka	kd	KD	挿入位置	リンカー
CE115_M	1.5E+05	9.8E-03	6.7E-08		
CE31	2.3E+05	3.5E-02	1.5E-07	K52b-S52c	GS3
CE32	8.5E+04	1.8E-02	2.1E-07	K52b-S52c	GS6
CE33	4.9E+05	1.1E-01	2.3E-07	K52b-S52c	GS9
CE34	1.1E+05	1.3E-02	1.2E-07	D72-D73	GS3
CE35	1.3E+05	1.1E-02	8.7E-08	D72-D73	GS6
CE36	1.2E+05	1.2E-02	9.9E-08	D72-D73	GS9
CE37	2.2E+05	2.0E-02	9.4E-08	A99-Y100	GS3
CE38	2.0E+05	1.7E-02	8.7E-08	A99-Y100	GS6
CE39	1.6E+05	1.4E-02	9.1E-08	A99-Y100	GS9

【0377】

これらの結果によって、このようなペプチド挿入CE115を用いて、第2の抗原に結合する抗体を取得することにより、CD3および第2の抗原に結合できるが、これらの抗原に同時には結合しない抗体を作製できることが示された。

この文脈において、挿入または置換で使用するためのペプチドのアミノ酸配列を、部位特異的変異誘発法 (Kunkel et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1985) 82, 488-492) またはオーバーラップ伸長PCR法などの当技術分野において公知の方法に従ってランダムに改変し、上述の方法に従って各改変体の結合活性等を比較して、アミノ酸配列の改変後であっても目的の活性を示すことのできる挿入または置換部位、ならびにこの部位のアミノ酸の種類および長さを決定することによって、ライブラリーを作製することができる。

【0378】

【参考実施例12】 CD3および第2の抗原に結合する抗体の取得のためのライブラリー設計

12.1. CD3および第2の抗原に結合する抗体の取得のための抗体ライブラリー (Dual Fab Libraryとも呼ぶ)

第1の抗原としてCD3 (CD3ε) を選択する場合、CD3 (CD3ε) および任意の第2の抗原に結合する抗体を取得する方法の例として、以下の6つの方法が挙げられる：

1. 第1の抗原に結合するFabドメインに第2の抗原に結合するペプチドまたはポリペプチドを挿入する工程を伴う方法 (この方法には、WO2016076345A1の実施例3または4に示されたペプチド挿入、あるいはAngew Chem Int Ed Engl. 2013 Aug 5; 52 (32) : 8295-8に例示されるG-CSF挿入方法もまた含まれる)、ここで、結合するペプチドまたはポリペプチドは、ペプチドまたはポリペプチドを提示するライブラリーから取得されてもよく、または天然に存在するタンパク質の全体またはその一部を使用してもよい；

2. WO2016076345A1の実施例5で示されたような、Fabループをより長い長さに改変する（延長）ことを可能にする位置に種々のアミノ酸が出現するような抗体ライブラリーを作製する工程、および任意の第2の抗原に対する結合活性を指標として用いることによって、抗体ライブラリーから該抗原に対する結合活性を有するFabを取得する工程を伴う方法；

3. CD3に結合することが既知のFabドメインから部位特異的変異誘発法によって作製した抗体の使用によってCD3に対する結合活性を維持するアミノ酸を同定する工程、および任意の第2の抗原に対する結合活性を指標として用いることによって、同定されたアミノ酸が出現する抗体ライブラリーから該抗原に対する結合活性を有するFabを取得する工程を伴う方法；

4. Fabループをより長い長さに改変する（延長）ことを可能にする位置に種々のアミノ酸が出現するような抗体ライブラリーを作製する工程、および指標として抗原に対する結合活性を用いることによって、抗体ライブラリーから任意の第2の抗原に対する結合活性を有するFabを取得する工程をさらに伴う3の方法；

5. 糖鎖付加配列（例えば、NxSおよびNxT、式中、xはP以外のアミノ酸である）が出現するように抗体を改変し、糖鎖受容体が認識する糖鎖をそれに付加する（例えば、ハイマンノース型糖鎖をそれに付加することによって、ハイマンノース受容体によって認識される；ハイマンノース型糖鎖は抗体発現時にキフネンシンの添加によって得られることが公知である（mAbs. 2012 Jul-Aug; 4（4）：475-87））工程をさらに伴う、1、2、3、または4の方法；および

6. 種々のアミノ酸に改変可能であると認められるループまたは部位にCys、Lys、または非天然アミノ酸を挿入することまたはこれらの部位をCys、Lys、または非天然アミノ酸と置換することによって、共有結合によりそれぞれが第2の抗原に結合するドメイン（ポリペプチド、糖鎖、またはTLRアゴニストに代表される核酸）をそれに付加する工程をさらに伴う1、2、3、または4の方法（この方法は、抗体薬物コンジュゲートに代表され、共有結合によるCys、Lys、または非天然アミノ酸への結合のための方法である（mAbs 6: 1, 34-45; January/February 2014; WO2009/134891 A2; およびBioconjug Chem. 2014 Feb 19; 25（2）：351-61に記載されている））。

第1の抗原および第2の抗原に結合するが、これらの抗原に同時には結合しないDual binding Fabが、これらの方法のいずれかの使用によって得られ、当業者に一般に公知の方法、例えば、共通L鎖、CrossMab、またはFabアーム交換法によって、任意の第3の抗原に結合するドメインと組み合わせることができる。

【0379】

12. 2. 部位特異的変異誘発法を用いたCD3（CD3ε）結合抗体の1アミノ酸改変抗体の作製

CD3（CD3ε）結合抗体のテンプレート配列としてVHドメインCE115HA000（配列番号：184）およびVLドメインGLS3000（配列番号：185）を選択した。各ドメインを、参考実施例9により抗原結合に関与すると推定される部位でのアミノ酸改変に供した。また、pE22Hh（L234A、L235A、N297A、D356C、T366S、L368A、およびY407Vの改変、C末端のGK配列の欠失、ならびにDYKDDDDK配列（配列番号：200）の付加による天然IgG1 CH1およびそれ以降の配列に由来する配列；配列番号：186）をH鎖定常ドメインとして用い、カップ鎖（配列番号：187）をL鎖定常ドメインとして用いた。改変部位を表17に示す。CD3（CD3ε）結合活性評価のために、各1アミノ酸改変抗体をワンアーム抗体（Fabドメインの1つを欠く天然に存在するIgG抗体）として取得した。具体的には、H鎖改変の場合、定常ドメインpE22Hhに連結させた改変H鎖、およびKn010G3（C220S、Y349C、T366W、およびH435Rの改変を有する216位からC末端までの天然に存在するIgG1アミノ酸配列；配列番号：188）をH鎖として用い、カップ鎖に3'側で連結させたGLS3000をL鎖として用いた。L鎖改変の場合、カップ鎖に3'側で連結させた改変L鎖をL鎖として用い、pE22Hhに3'側で連結させたCE115HA000、およびKn010G3をH鎖として用いた。これらの配列をFreeStyle 293細胞で発現させかつ精

10

20

30

40

50

製した（参考実施例 9 の方法を利用した）。

【0380】

【表 17】

H鎖改変部位	FR1										CDR1			FR2		CDR2													
	ドメイン																												
	11	16	19	28	29	30	31	32	33	35	43	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65
	Kabat ナンバリング																												
	V	R	R	T	F	S	N	A	W	H	K	Q	I	K	A	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G
	置換前のアミノ酸																												

ドメイン	FR3										CDR3										FR4	
	72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105		
	Kabat ナンバリング																					
	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q		
	置換前のアミノ酸																					

L鎖改変部位	CDR1										FR2		FR3		FR4			
	ドメイン																	
	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45	
	Kabat ナンバリング																	
	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q	
	置換前のアミノ酸																	

ドメイン	CDR2					FR3		CDR3					FR4							
	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107	
	Kabat ナンバリング																			
	K	V	S	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K
	置換前のアミノ酸																			

【0381】

12.3. CD3に対する1アミノ酸改変抗体の結合の評価

項12.2で構築、発現および精製した各1アミノ酸改変体をBiacore T200（GE Healthcare Japan Corp.）を用いて評価した。アミンカップリング法によって、適切な量のCD3εホモ二量体タンパク質をセンサーチップCM4（GE Healthcare Japan Corp.）の上に固定化した。次いで、適切な濃度を有する抗体をアナライトとしてそれにインジェクトし、センサーチップ上でCD3εホモ二量体タンパク質と相互作用させた。次いで、10 mm

ol/Lグリシン-HCl (pH 1.5) のインジェクトによって、センサーチップを再生した。アッセイを25℃で行い、HBS-EP+ (GE Healthcare Japan Corp.) をランニングバッファーとして用いた。アッセイ結果から、アッセイにおいて得られた結合量およびセンサーグラムについてシングルサイクルカインेटリックモデル (1:1 binding RI=0) を用いて解離定数 K_D (M) を算出した。各パラメータをBiacore T200 Evaluation Software (GE Healthcare Japan Corp.) を用いて算出した。

【0382】

12.3.1. H鎖の改変

表18は、対応する未改変の抗体であるCE115HA000の結合量に対する各H鎖改変体の結合量の比の結果を示す。具体的には、CE115HA000を含む抗体の結合量をXと定義し、H鎖1アミノ酸改変体の結合量をYと定義した時の、Z (結合量の比) = Y/Xの値を用いた。図25に示すように、0.8未満のZではセンサーグラムにおいて非常に少量の結合量が観察され、解離定数 K_D (M) が正確に算出できない可能性が示唆された。表19は、CE115HA000に対する各H鎖改変体の解離定数 K_D (M) の比 (=CE115HA000のKD値/改変体のKD値) を示す。

表18に示されたZが0.8以上の場合には、改変体は、対応する未改変の抗体であるCE115HA000と比べて結合を維持していると考えられる。したがって、これらのアミノ酸が出現するように設計された抗体ライブラリーは、Dual Fab Libraryとして機能することができる。

【0383】

10

20

30

40

50

【表 1 8】

ドメイン		FR1										CDR1					FR2		CDR2													
		11	16	19	28	29	30	31	32	33	35	43	50	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65		
Kabat ナンバリング 置換前のアミノ酸 (wt)		V	R	R	T	F	S	N	A	W	H	K	Q		I	K	A	K	S	N	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G	
A								0.5		0.1	0.17			0.24				0.67	0.96	0.7	0.65			0.98	0.22	0.85	1.09		0.82			
D					0.56		0.86	0.37		0.1	0.2		0.27	0.29	0.25	1.34	0.27	0.6	0.39	0.62	0.45	0.51			0.11	0.7	0.99	0.91	0.92	0.72	0.76	
E		0.88										0.19	0.9	0.26	0.55	0.26	0.57															
F								0.62		0.65	0.21						1.13			1.12												
G							1.01	0.39			0.22						0.81															
H								0.68		0.13																						
I								0.81			0.12			0.4										0.61								
K								1.01			0.15		0.33																1.19			
L	1									0.1	0.11		0.23																			
M											0.29																					
N											0.35		0.17																			
P																	0.15															
Q		0.9						0.49			0.13	0.99						0.6	1.04	1.1	0.84								1.07	1		
R								1.14			0.14							1.11												1.07		0.89
S				0.91				0.81			0.23		0.24					1.19	0.78	1.2												
T			0.8								0.26																					0.84
V						0.36					0.22						0.52		0.93													
W								0.63			0.22																					
Y								0.64	0.33	0.66	0.16		0.25					0.18	0.31	0.74	1.11	0.63	1.09									

ドメイン		FR3										CDR3					FR4									
		72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105					
Kabat ナンバリング 置換前のアミノ酸 (wt)		D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q					
A	1.41	0.83	1.05							0.11	0.35	0.16	1.1		0.9	0.62				1.26						
D									0.73	0.24	0.09	0.24	0.26	0.28	0.52	0.31	0.27	0.44								
E	1.05	0.73								0.24								0.26	0.46					0.94		
F														1.43		0.87	0.3		0.75							
G			1.07							0.19	0.43	0.18			1.07	1.23										
H													1.58						1.38							
I							1.34												1.21							
K		0.87								0.64	0.35		2.83	1.48	1.07	0.9			0.63							
L											0.14			1.13	0.7	0.48	0.27		0.62							
M																			1.2							
N			0.94																2.02							
P				0.91																						
Q											0.12	0.11	1.02		0.48				0.2	0.2	0.14					
R		1.04			1.01						0.42		1.22	0.91	0.8	0.56				2.35						
S						0.92					0.46	0.27	2.96							0.24						
T			0.63		0.84					0.22	0.44	0.18	1.01	0.82	0.81	0.64	0.52		1.16							
V	1.43												1.05	0.84					0.79							
W															0.6				1.33	1.43						
Y												0.17	2.22	1.59					0.49	0.91						

【 0 3 8 4 】

10

20

30

40

50

【表 19】

ドメイン	FR1										CDR1				FR2	CDR2																			
	11	16	19	28	29	30	31	32	33	35	H	W		43	50	Q	I	51	52	52a	52b	52c	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	64	65	
Kabat ナンバリング 標準のアミノ酸 (wt)	V	R	R	T	F	S	N	A	W					K								S	N	Y	A	T	Y	Y	A	E	S	K	G		
A						0.96			29.99	25.04					22.63						0.58	0.67	0.55	0.58				0.87		0.74	0.94		0.81		
D			0.93			0.79	1.14		1693.03	68.99					75.37	6.37	166.47	1.35	0.56	0.55	0.55	0.59	0.89	0.71					4.81	0.66	0.94	0.9	0.87	0.76	0.61
E	0.74								70.35	70.35				0.88	16738.09	0.84	19.38	0.69															0.82	0.84	0.61
F						1.24			0.66	53.59							4.04					0.93		0.97											
G						0.93	1.37			45.77									0.61			0.81	0.95	0.84	0.99	0.59									
H						0.96			4.96								2.65					0.55													
I						0.62				7.23					1.21				2.65				0.57				0.81								
K						0.97				14.45					0.71				3.54			0.88	0.79	0.82		1.32	1.22	0.68				0.99			
L	0.83								56573.23	4.8					1.41						0.61	0.94	0.91			0.77		1.21							
M										3.98																									
N										2.88					1.48			3.29			0.43					0.84	0.9	1.86							
P																			5																
Q	0.87					0.94				4.8				0.89							0.82	0.97	1.05	0.8		0.74		1.24			0.85		0.87		
R						0.98			15429.77								0.8				0.91														
S			0.79			0.67				2.93					47.38		92.1	0.82	0.58		0.59	0.57	5.65					1.22	0.79				0.85		
T		0.81								4.4																									
V					2.94					26.08										0.95		0.82													
W										50.42							2.69																		
Y		Y				1.07				50.42					49.09		6.47	7.71	0.61		0.87	0.94	1.03			0.83									
						1.1		2.11		0.69																									

ドメイン		FR3										CDR3										FR4				
		72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99					100	100a	100b	100c	101	102	105	FR4
Kabat ナンバリング	置換前のアミノ酸	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A					Y	Y	G	V	D	A	Q	
(wt)		1.19	0.73	0.77						3.15	1	41309	0.98						0.92	0.66			0.86			
D		0.73	0.56					0.56	108.01	7.27	64.7	2.36	1.03					0.63	1.2	6.25	1.64					
E									50.46												7.29	1.31			0.89	
F														1.15						0.98	4.37	0.73				
G		0.78							78256.33	0.8		47213						0.97	1.01			3.16				
H												1.14										0.91				
I							1.08															1.73	1.29			
K		0.74							1.15	1.56			4.85	1.4				0.93	0.79			4.37				
L										3.14				1				0.67	0.57	5.84		0.71				
M																					1.94					
N		0.7																								
P			0.7							87044.4	12429	0.88						1.3			0.97	43.42	3.51			
Q									1.36				1.04	0.85				0.77	0.51			3.55				
R		0.79		0.88					1.59	23180	4.69											5.66				
S					0.84				4.61	1.15	1178	0.98	0.76					0.7	0.59	1.25		0.91				
T		0.73		0.75		0.83						0.93	0.93									0.62				
V	1.17																	0.92				1.18	1.27			
W																		0.96								
Y									6.67				2.75	1.25							51.41		0.97	1		

【 0 3 8 5 】

1 2 . 3 . 2 . L鎖の改変

表 20 は、対応する未改変の抗体である GLS3000 の結合量に対する各 L 鎖改変体の結合量の比の結果を示す。具体的には、GLS3000 を含む抗体の結合量を X と定義し、L 鎖 1 アミノ酸改変体の結合量を Y と定義した時の、 Z (結合量の比) = Y/X の値を用いた。図 25 に示すように、0.8 未満の Z ではセンサーグラムにおいて非常に少量の結合量が観察され、解離定数 K_D (M) が正確に算出できない可能性が示唆された。表 21 は、GLS3000 に対する各 L 鎖改変体の解離定数 K_D (M) の比を示す。

表 20 において示される Z が 0.8 以上の場合には、改変体は、対応する未改変抗体である

GLS3000と比べて結合を維持していると考えられる。したがって、これらのアミノ酸が出現するように設計された抗体ライブラリーは、Dual Fab Libraryとして機能することができる。

【0386】

【表20】

ドメイン Kabat ナンバリング 置換前のアミノ酸	CDR1															FR2									
	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
A	0.86	0.92						0.48	1.03	0.25	0.63	0.5		0.24	0.85	1.06									
D	0.75	0.18	0.86	0.85	0.79	0.17	0.32	0.22	0.69	0.19	0.41	0.34	0.23	0.23	0.17	0.22	0.77								
E	0.83	0.21	0.74	0.88	0.81	0.17	0.61	0.23	0.76	0.4			0.44	0.49	0.72	0.23	0.75								
F						0.42		0.63	1.32	0.46		1.1		0.29	0.78	0.27									
G	0.89				1.03			0.3	1.04	0.46	0.67	0.47				1.02									
H									1.23	0.42		0.98													
I		0.53			1	1.19	0.96	0.26	1.07	0.44	0.37	0.61	0.97		0.83	0.65									
K								0.29	1.59	0.44		1.65	1.04			2.17									
L		0.24		0.92			0.84	0.3	1.17	0.39	0.56	0.7				0.59									
M		0.31				0.71		0.3	1.23	0.39		0.8			0.93	0.35									
N					1.1			0.3	1.16				0.32			0.65									
P	0.7	1.01	0.78	0.29	0.99	0.91	0.3	0.24	1.26	0.36	0.31	0.31	0.31	0.24	0.3	0.34									
Q	0.9							0.25	1.1	0.37		0.87				0.25	0.86								
R				1.19				0.31	1.58			1.86				0.2									
S	0.89					0.71	0.51	0.32	0.32	0.32	0.68	0.29				0.78									
T	0.88	0.83						0.29	0.97	0.45	0.63	0.29				0.89									
V		0.73				1.12		0.3	1.08	0.36	0.34	0.61			1.05	0.85									
W						0.26		0.39	1.55	0.41		0.99				0.24									
Y	0.87				1.1	0.25	0.77	0.64	1.2	0.26	0.69	1.04				0.59									

ドメイン Kabat ナンバリング 置換前のアミノ酸	CDR2															FR3									
	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74
A	0.23	0.61	0.69	0.61	0.69	1.13	1.16																		
D	0.22	0.33	0.63	0.34	0.36	0.65	0.77																		
E	0.24	0.64		0.54	0.58	0.72	0.71																		
F				0.69			1.32																		
G	0.16	0.84		0.76	0.67	1.31	0.92																		
H				1.18		0.94	1.05																		
I		0.81		0.5		0.82	0.99																		
K				1.08		1.33	1.46																		
L	0.24			0.56		0.76	1.02																		
M				0.62		0.8	1.05																		
N						0.98	0.92																		
P	0.3	0.32	0.33	0.81	0.84	1.16	0.95																		
Q	0.18		1.05	0.77	0.68	0.91	1.04																		
R	0.5			1.58		1.31	1.36																		
S	0.23			0.69	0.79	0.69	0.69																		
T	0.19			0.56	0.65	0.41	0.97	0.84																	
V				0.56		0.71	0.95																		
W				0.81	0.78	0.69	1.38																		
Y	0.24		1.12	0.67		0.92	1.46																		

【0387】

10

20

30

40

50

【表 2 1】

ドメイン		CDR1																				CDR3										FR2									
Kabat ナンバリング		24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45													
置換前のアミノ酸		R	S	S	Q	S	L	V	H	27e	S	N	R	N	Y	L	H	Q																							
親和性上昇		24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	35																							
A		1	0.73						2.57	1.01	4.18	1.15	1.16		66.77	0.82	1.18																								
D		0.83	8.86	1.06	0.89	0.94	25.07	3.21	13641	1.23	4455.11	1.58	3.82	30.86	25.92	37.53	2100	0.86																							
E		0.89	6.54	0.9	0.99	0.94	26.75	1.1	42.28	1.04	5.47		2.83	1.59		0.83	8.03	1.01																							
F							2.67		2.05	1.16	2.59		f		4.51	0.65	3.5																								
G		0.92				0.8			3.51	1.03	2.41	0.62	2.1				1.08																								
H										1.09	3																														
I			0.67			0.87	1.17	1.03	7.77	1.05	2.81	1.6	1.24	1.1		0.86	0.89																								
K									3.8	1.32	2.34		1.35	0.88			4.1																								
L			4.93					0.81	3.37	1.06	3.34	0.9	1.19				1.03																								
M			1.6				1.31		3.43	1.11	3.29		1.2			0.9	3.16																								
N						0.98			3.43	1.01				4.46			2.84																								
P		0.34	0.79	0.67	2.16	1.01	0.96	3.71	9.21	1.06	4.18	14.01	12.14	10.82	61.98	32.66	1.22																								
Q		0.87							7.48	1.08	3.48		1				4.6	0.98																							
R					1.06				2.35	1.35			1.73				85764																								
S		0.97					0.9	3.04	3.05		4.3	1.05	10.64				1.24																								
T		1.03	0.75						12973	0.98	2.67	1.02	12.72	1.1			1.1																								
V			0.74				1.11		353.86	0.95	3.73	2.25	2.62			1.26	1.04																								
W							23.6		1.86	1.32	3.17		0.97				8.45																								
Y		0.94				0.93	22.2	1.25	1.98	1.1	3.89	1.08	1.03				2.44																								

ドメイン		CDR2										FR3										CDR3										FR4									
Kabat ナンバリング		50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106													
置換前のアミノ酸		K	V	S	S	N	R	F	S	K	G	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K																				
親和性上昇		50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107																					
A		59.5		0.9	0.82	0.85	1.16	1.18			1.1	0.89	28.14	1.35	0.65	1.05	0.87																								
D		114	1.5	0.94	2.8	1.8	1.02	1.11			1.96	11.13	44.76	11.19	0.72	1.05	2.37	40.88																							
E		57.2	0.88		2.47	0.84	0.92	0.91			34.63	0.91	48.54	19.56	1.05	1.18	1.01	46.81										0.95													
F					0.96			1.12			3.34				1.75			0.86																							
G		42.4	0.83		1.33	0.88	1.15	0.99									1.94																								
H					1.31		1.02	0.96			1.44				1.16			80.34																							
I			0.69		2.69		1.28	1.01			1.11			1.91		1.46																									
K					1.05		1.22	1.21			1.8				0.91																										
L		36.4			1.62		1.43	1.03			2.38			1.61		3.06	11.66	1.84																							
M					1.21		1.29	0.93			1.96					2.74																									
N							0.91	0.9			1.2				0.96																										
P		27.7	6	7.38	0.98	1.05	1.15	0.98			1.8	15.86	23.05	26.71	39.54	1.1												3.35													
Q		8.13		1.01	1.28	1.04	1.09	0.97			2.11				1.1																										
R		1.83			1.56		1.27	1.15			4127.4				0.79	1.11																									
S		45.3			0.88	0.78	1.15			0.94		0.96	72076	0.81	0.75	0.81	1.19																								
T		25.1			2.68	0.89	2.42	1.01	0.85		1.1					1.06																									
V					2.14		1.12	0.94			1.4																														
W					1.01	0.65	1.72	1.12			2.2					1.81																									
Y		195		1.02	0.99		1.13	1.1			1.12	36.29	33.84	2.55	0.76	2.45																									

表 2 2 (H鎖) および 2 3 (L鎖) に示す値のうち、複数の改変によるECM結合増強の作用を考慮し、10倍までを有効値としてDual Fab Libraryに採用した。

【表 2 2】

ドメイン	FR3										CDR3										FR4			
	72	73	74	75	76	77	78	82a	95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	101	102	105				
Kabat ナンバリング 置換前のアミノ酸	D	D	S	K	N	S	L	N	V	H	Y	G	A	Y	Y	G	V	D	A	Q				
A	22.3							1.12	0.96		0.65	2.7		1.46				66.85						
D																0.98	1.18							
E									0.76							1.2	1.3			1.33				
F													16.97		2.81									
G												2.12	1	2.61				56.66						
H																		16.16						
I																		63.16	6.63					
K												32.29	57.13	8.2	10.3			38.94						
L													6.94											
M																		123.87						
N																		90.66						
P												3												
Q												2.99	2.12	0.94				130.29						
R				2.92								48.83												
S					1.93							2.41	3.34	1				58.7						
T				1.2		2.31						1.6	2.54											
V																		48.47	6.29					
W														10.83										
Y												27.01	30.37						2.82					

50

【表 2 3】

ドメイン	CDR1																FR2									
	24	25	26	27	27a	27b	27c	27d	27e	28	29	30	31	32	33	34	45									
Kabat ナンバリング 置換前のアミノ酸	R	S	S	Q	S	L	V	H	S	N	R	N	T	Y	L	H	Q									
A	2.62	2.28							3.25		0.87			2.21	5.92	2.61										
D	1.86	1.01	1.31	1.3	1.03	1.16	0.76				0.64		0.66	0.98	0.6		0.99									
E	2.02	1.16	1.22	1.24	1.12	1.04	0.72		1.19				0.79		1.45		1.15									
F									16.43			5.79		1.55												
G	1.53				10.04				5.42							3.9										
H									13.64		8.6															
I					11.11	2.68	56.75		4.28				2.87		4.74											
K									34.74			31.93	59.62			84.66										
L				11.8			3.16		5.89																	
M									6.53			3.32			19.8											
N					48.45				4.63																	
P		2.83			2.3	2.7			7.26																	
Q	1.26								2.58			3.45					2.31									
R				18.19					74.03			69.62														
S	2.65					3.3										2.17										
T	1.8	2.7							2.32		0.63					4.51										
V						2.82			2.31						2.68	6.43										
W									46.73			11.21														
Y	1.89				42.7				30.66			3.08														

ドメイン	CDR2																FR3										CDR3										FR4									
	50	51	52	53	54	55	56	74	77	89	90	91	92	93	94	95	96	97	107																											
Kabat ナンバリング 置換前のアミノ酸	K	V	S	N	R	F	S	K	R	G	Q	G	T	Q	V	P	Y	T	K																											
A	0.83		3.65		1.78	2.41	16.89			8.43	3.14		3.11	3.34	3.22																															
D	0.64	1.01			1.44						1.37	0.8	0.84		0.88	4.38	0.66																													
E		0.95			0.94						2.55	1	0.67	0.85		3.71	0.59		2.96																											
F							10.25			31.93							3.44																													
G	0.67	3.5			1.19	6.49	3.26																																							
H				4.88		7.39	6.83																																							
I		2.11				23.25	5.1			14.58																																				
K				19.31		5.18	31.33																																							
L							5.65			18.53																																				
M						12.14	5.15																																							
N						7.83	3.96			4.96						3.01																														
P				4.72	5.49	5.16	6																																							
Q	0.76		2.37		1.33	35.06	2.96																																							
R				34.13		16.5	19.76																																							
S	0.84																																													
T	1.03				1.39				2.37	6.79	4.37		3.12	3.82	3.78																															
V							2.48	2.05		26.88					2.63																															
W							4																																							
Y	0.88		6.28			6.18	3.87			28.25	3.75	3.26	2.96	14.49																																

【0392】

12.5. ライブラリーの多様性を増強するためのペプチドの挿入部位および長さについての試験

参考実施例11は、CD3 (CD3ε) への結合を失うことなく、GGG配列を用いてペプチドを各部位に挿入できることを示した。Dual Fab Libraryでループ延長が可能となれば、その結果生じるライブラリーはより多種類の分子を含み（またはより広範な多様性を有し）、多様な第2の抗原に結合するFabドメインの取得が可能になる可能性がある。したがって、ペプチド挿入を原因とする結合活性の低下が推定されることを踏まえ、CD3εに対する結合活性を増強するV11L/D72A/L78I/D101Q改変をCE115HA000配列に加え

10

20

30

40

50

て、pE22Hhにさらに連結させた。参考実施例 1 1 と同様に、この配列への GGS リンカーの挿入によって分子を作製し、その CD3 結合を評価した。Kabat ナンバリングで 99 位と 100 位との間に GGS 配列を挿入した。抗体分子をワンアーム抗体として発現させた。具体的には、上述の GGS リンカーを含む H 鎖および Kn010G3（配列番号：188）を H 鎖として用い、カッパ配列（配列番号：187）に連結させた GLS3000（配列番号：185）を L 鎖として採用した。これらの配列は、参考実施例 9 に従って発現および精製を行った。

【0393】

12.6. GGS ペプチドを挿入した CE115 抗体の CD3 に対する結合の確認

GGS ペプチドを挿入した改変抗体の CD3 ε に対する結合を、参考実施例 1 1 に記載の方法により Biacore を用いて確認した。表 2 4 に示すように、結果は、ループに GGS リンカーを挿入できることが明らかにした。特に、GGS リンカーは、抗原結合に重要である H 鎖 CDR3 領域に挿入することができ、CD3 ε への結合は、3、6、および 9 アミノ酸挿入のいずれの結果でも維持された。この試験は GGS リンカーを用いて実施されたが、GGS 以外の種々のアミノ酸が出現する抗体ライブラリーも許容され得る。

【0394】

【表 2 4】

挿入アミノ酸配列 (99~100)	CD3_KD [M]
GGS	6.31E-08
GGS GGS (配列番号 175)	3.46E-08
GGS GGS (配列番号 175)	3.105E-08
GGS GGS (配列番号 191)	4.352E-08
GGS GGS (配列番号 191)	3.429E-08
GGS GGS (配列番号 192)	4.129E-08
GGS GGS (配列番号 192)	3.753E-08
GGS GGS (配列番号 177)	4.39E-08
GGS GGS (配列番号 177)	3.537E-08
挿入なし	6.961E-09
CE115HA000	1.097E-07

【0395】

12.7. NNS ヌクレオチド配列を用いた H 鎖 CDR3 への挿入についてのライブラリーの試験

参考実施例 12.6 は、GGS リンカーを用いて 3、6、または 9 アミノ酸を挿入できることを示し、3、6、または 9 アミノ酸の挿入を有するライブラリーを作製して、ファージディスプレイ法によって代表される通常の抗体取得法の使用によって第 2 の抗原に結合する抗体を取得できると推論した。よって、NNS ヌクレオチド配列（全種類のアミノ酸の出現を可能にする）を用いて 6 アミノ酸挿入部位に種々のアミノ酸が出現する場合にも、CDR3 への 6 アミノ酸の挿入が CD3 への結合を維持できるかどうかについて試験を実施した。結合活性の低下が推定されることを踏まえ、CE115HA000 のものより高い CD3 ε 結合活性を有する CE115HA340 配列（配列番号：193）の CDR3 中の 99 位と 100 位（Kabat ナンバリング）との間に 6 アミノ酸が挿入されるように NNS ヌクレオチド配列を用いて、プライマーを設計した。抗体分子をワンアーム抗体として発現させた。

【0396】

具体的には、上述の改変 H 鎖および Kn010G3（配列番号：188）を H 鎖として用い、カッパ配列（配列番号：187）に連結させた GLS3000（配列番号：185）を L 鎖として採用した。これらの配列を参考実施例 9 に従って発現および精製した。得られた改変抗体を、参考実施例 12.6 に記載された方法によってその結合について評価した。結果を表 2 5 に示す。結果は、アミノ酸を延長した部位に種々のアミノ酸が出現した場合であっても、CD3（CD3 ε）に対する結合活性が維持されることを明らかにした。表 2 6 は、参考

実施例 10 に記載された方法により非特異的結合の増強の有無をさらに評価する結果を示す。結果として、CDR3の伸長したループに正電荷を持つ側鎖を有するアミノ酸が多く含まれる場合に、ECMへの結合は増強された。したがって、正電荷を持つ側鎖を有する3個以上のアミノ酸がループ内に出現するべきではないことが望まれた。

【0397】

【表25】

		CDR 3																		
VH	CD3_KD[M]	9					1	0												
CE115HA340	2.0E-08	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	1	1	2
CE115HA340	2.7E-08	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A
NNS6f17	7.4E-08	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f27	3.8E-08	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f29	9.0E-08	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f47	3.1E-08	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f50	7.1E-08	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f51	3.1E-08	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f52	5.2E-08	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f54	2.9E-08	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f55	3.1E-08	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f56	2.1E-08	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f58	4.4E-08	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f59	2.0E-07	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f62	6.1E-08	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f63	6.9E-08	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f64	7.8E-08	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f67	3.6E-08	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f68	4.5E-08	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f71	5.1E-08	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f72	1.5E-07	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.
NNS6f73	2.6E-08	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.	.

【0398】

10

20

30

40

50

【表 2 6】

				CDR 3																						
H鎖	ECL 反応		比	9					1	0																
	ECM 3 μ g/ml	MRA	ECM 対 MRA	5	6	7	8	9	0	a	b	c	d	e	f	g	h	i	k	1	1	2				
CE115HA340	394	448	0.9	V	H	Y	A	A	X	X	X	X	X	X	Y	Y	G	V	-	-	D	A				
NNS6f17	409	448	0.9	.	.	.	.	.	W	G	E	G	V	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f27	3444	448	7.7	.	.	.	.	.	V	W	G	S	V	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f29	481	448	1.1	.	.	.	.	.	I	Y	Y	P	T	N	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f47	94137	448	210.3	.	.	.	.	.	H	F	M	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f50	385	564	0.7	.	.	.	.	.	L	T	G	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f51	20148	564	35.7	.	.	.	.	.	G	F	L	V	L	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f52	790	564	1.4	.	.	.	.	.	Y	M	L	G	L	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f54	1824	564	3.2	.	.	.	.	.	F	E	W	V	G	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f55	14183	564	25.1	.	.	.	.	.	A	G	R	W	L	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f56	6534	564	11.6	.	.	.	.	.	R	E	A	T	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f58	2700	564	4.8	.	.	.	.	.	S	W	Q	V	S	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f59	388	564	0.7	.	.	.	.	.	L	L	V	Q	E	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f62	554	564	1.0	.	.	.	.	.	N	G	G	T	R	H	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f63	624	564	1.1	.	.	.	.	.	G	G	G	G	W	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f64	603	564	1.1	.	.	.	.	.	L	V	S	L	T	V	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f67	1292	564	2.3	.	.	.	.	.	G	L	L	R	A	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f68	2789	564	4.9	.	.	.	.	.	V	E	W	G	R	W	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f71	618	564	1.1	.	.	.	.	.	G	W	V	L	G	S	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f72	536	564	0.9	.	.	.	.	.	E	G	I	W	W	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	
NNS6f73	2193	564	3.9	.	.	.	.	.	W	V	V	G	V	R	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	

【0399】

12.8. Dual Fab Libraryの設計および構築

参考実施例12に記載の試験に基づき、CD3および第2の抗原に結合する抗体を取得するための抗体ライブラリー（Dual Fab Library）を以下のように設計した：

ステップ1：CD3（CD3 ϵ ）への結合能を維持するアミノ酸を選択する（CD3への結合量がCE115HA000の80%以上を確保する）；

ステップ2：改変前と比較してMRAの10倍以内のECM結合を保持するアミノ酸を選択する；

ステップ3：H鎖CDR3内の99位と100位（Kabatナンバリング）との間に6アミノ酸を挿入する。

Fabの抗原結合部位は、ステップ1のみを実施することによっても多様化することができる。そのため、その結果生じるライブラリーは、第2の抗原に結合する抗原結合分子を同定するために用いることができる。Fabの抗原結合部位は、ステップ1および3のみを実施することによっても多様化することができる。そのため、その結果生じるライブラリーは、第2の抗原に結合する抗原結合分子を同定するために用いることができる。ステップ2を行わないライブラリー設計であっても、取得された分子をECM結合についてアッセイおよび評価することが可能である。

【0400】

このように、Dual Fab Libraryでは、FR（フレームワーク）にV11L/L78I変異を加えかつ表27に示すようにCDRをさらに多様化することによるCE115HA000に由来する配列をH鎖として用い、表28に示すようにCDRを多様化することによるGLS3000に由来する配列をL鎖として用いた。これらの抗体ライブラリー断片は、当業者に一般に公知のDNA合成方法によって合成することができる。Dual Fab Libraryは、（1）H鎖が表27に示したように多様化され、L鎖が元の配列GLS3000または参考実施例12に記載されたCD

3 ε 結合を増強させたL鎖に固定されているライブラリー、(2) H鎖が元の配列 (CE115 HA000) または参考実施例 1 に記載されたCD3 ε 結合を増強させたH鎖に固定され、L鎖が表 2 8 に示したように多様化されているライブラリー；および (3) H鎖が表 2 7 に示したように多様化され、L鎖が表 2 8 に示したように多様化されているライブラリーとして作製される可能性がある。FR (フレームワーク) にV11L/L78I 変異を加えかつ表 2 7 に示すようにCDRをさらに多様化することによるCE115HA000に由来するH鎖ライブラリー配列は、DNA合成会社であるDNA2.0, Inc.に委託し、抗体ライブラリー断片 (DNA断片) を取得した。取得した抗体ライブラリー断片は、PCR法によって増幅されたファージディスプレイ用ファージミドに挿入された。GLS3000をL鎖として選択した。構築したファージディスプレイ用ファージミドをエレクトロポレーションによって大腸菌に移入し、抗体ライブラリー断片を保有する大腸菌を作製した。

10

表 2 8 に基づき、発明者らは、表 2 9 に示すようにGLS3000について新たな多様化ライブラリーを設計した。L鎖ライブラリー配列は、GLS3000に由来し、表 2 9 に示すように多様化した (DNAライブラリー)。DNAライブラリーはDNA合成会社によって構築された。次いで、種々のGLS3000由来配列を含むL鎖ライブラリーおよび種々のCE115HA000由来配列を含むH鎖ライブラリーをファージミドに挿入し、ファージディスプレイライブラリーを構築した。

【 0 4 0 1 】

20

30

40

50

【表 2 7】

[illegible]

10

20

30

40

50

【 0 4 0 2 】

【表 28】

[illegible]

10

20

30

40

【 0 4 0 3 】

50

呼ぶ。

当業者に周知の方法によって、ヒトCD137遺伝子をチャイニーズハムスター卵巣細胞株 CHO-DG44の染色体に組み込み、高発現CHO-hCD137細胞株を取得した。製造者の指示書によってPE抗ヒトCD137 (4-1BB) 抗体 (BioLegend, Cat. No. 309803) を用いて、ヒトCD137の発現レベルをFACS解析により決定した。NCI-H446 細胞株およびHuh7細胞株はそれぞれ、RPMI1640 (Gibco) 中およびDMEM (低グルコース) 中で維持した。培地は両方とも、10%ウシ胎児血清 (Bovogen Biologicals)、100ユニット/mLのペニシリン、および100 µg/mLのストレプトマイシンを補充し、細胞を、37℃および5% CO₂の条件下で培養した。

【0405】

【参考実施例14】ECM (細胞外マトリックス) に対する抗体の結合の評価

ECM (細胞外マトリックス) に対する各抗体の結合を、W02012093704 A1を参照して以下の手法により評価した: ECMフェノールレッドフリー (BD Matrigel #356237) をTBSで2 mg/mLに希釈し、氷上で冷却したECLアッセイ用のプレート (L15XB-3、MSD K.K.、高結合) の各ウェルの中心に5 µL/ウェルで液滴添加した。次いで、プレートをプレートシールで覆い、4℃で一晩静置した。ECM固定化プレートを室温に戻した。ECLブロッキングバッファー (0.5% BSAおよび0.05% Tween 20を追加したPBS) を150 µL/ウェルでプレートに加え、プレートを室温で2時間以上または4℃で一晩静置した。次いで、各抗体サンプルをPBS-T (0.05% Tween 20を追加したPBS) で9 µg/mLに希釈した。二次抗体をECLDB (0.1% BSAおよび0.01% Tween 20を追加したPBS) で2 µg/mLに希釈した。20 µLの抗体溶液および30 µLの二次抗体溶液を、10 µL/ウェルで分注したECLDBを含む丸底プレートの各ウェルに添加し、遮光しながら室温で1時間攪拌した。ECLブロッキングバッファーを、ECLブロッキングバッファーを含むECMプレートを反転させることによって除去した。このプレートに対して、前述の抗体および二次抗体の混合溶液を50 µL/ウェルで添加した。次いで、プレートを、遮光しながら、室温で1時間静置した。プレートを反転させることによってサンプルを除去し、次いで、READバッファー (MSD K.K.) を150 µL/ウェルでプレートに添加し、続いて、Sector Imager 2400 (MSD K.K.) を用いてsulfo-tagの発光シグナルを検出した。

【参考実施例15】抗GPC3/CD3/ヒトCD137三重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fab抗体のオフターゲット細胞傷害活性の評価

(15-1) 抗GPC3/CD3/ヒトCD137三重特異性抗体の調製

標的非依存性細胞傷害活性およびサイトカイン放出を調べるために、CrossMabおよびFAEテクノロジーを利用することによって、三重特異性抗体を生成した (図2. 1)。各アームが2つの結合ドメインを有し、その結果、1つの分子中に4つの結合ドメインを有する四価IgG様分子である抗体A (mAb A) を、上述のようなCrossMabにより生成した。二価IgGである抗体B (mAb B) は、従来のIgGと同じ形式である。mAb AおよびmAb Bの両方のFc領域は、Fcγ受容体に対する親和性が減弱したサイレントなFcγRであり、脱グリコシル化され、かつFAEに適用可能であった。6つの三重特異性抗体を構築した。6つの三重特異性抗体における各Fv領域の標的抗原を、表30に示した。mAb A、mAb B、およびmAb ABの結合ドメインの各々の命名規則を、図2. 2に示す。6つの三重特異性抗体であるmAb ABの各々を生成するためのmAb AおよびmAb Bのペア、ならびにその配列番号を、それぞれ表31および表32に示した。W02005/035584A1に記載された抗体CD3D(2)_i121 (AN121と省略される) を、抗CD3ε抗体として用いた。6つの三重特異性抗体をすべて、上記の方法によって発現させ、精製した。

【0406】

10

20

30

40

50

【表 3 0】

抗体の各アームの標的

mAb AB名	Fv A1	Fv A2	Fv B
GPC3/CD137xCD3	抗 CD137	抗 CD3ε	抗 GPC3
GPC3/CD137xCtrl	抗 CD137	Ctrl	抗 GPC3
GPC3/CtrlxCD3	Ctrl	抗 CD3ε	抗 GPC3
Ctrl/CD137xCD3	抗 CD137	抗 CD3ε	Ctrl
Ctrl/CD137xCtrl	抗 CD137	Ctrl	Ctrl
Ctrl/CtrlxCD3	Ctrl	抗 CD3ε	Ctrl

10

【 0 4 0 7】

20

30

40

50

【表 3 1】

mAb AB名	mAb ABを生成する ためのmAb A名	VHA1 (配列番号)	VLA1 (配列番号)	VHA2 (配列番号)	VLA2 (配列番号)	mAb ABを生成する ためのmAb B名	VHB (配列番号)	VLB (配列番号)
GPC3/CD137xCD3	CD137xCD3	85	86	87	88	GPC3	89	90
GPC3/CD137xCtrl	CD137xCtrl	85	86	Ctrl	Ctrl	GPC3	89	90
GPC3/CtrlxCD3	CtrlxCD3	Ctrl	Ctrl	87	88	GPC3	89	90
Ctrl/CD137xCD3	CD137xCD3	85	86	87	88	Ctrl	Ctrl	Ctrl
Ctrl/CD137xCtrl	CD137xCtrl	85	86	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl	Ctrl
Ctrl/CtrlxCD3	CtrlxCD3	Ctrl	Ctrl	87	88	Ctrl	Ctrl	Ctrl

【 0 4 0 8 】

10

20

30

40

50

【表 3 2】

VHまたはVLの 名称	配列 番号	アミノ酸配列
CD137 VHA1	85	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWS WIRQSPEKGLEWIGEINHGGYVTYNPSLESRTISVD TSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARDYGPNGYDWY FDLWGRGTLTVTVSS
CD137 VLA1	86	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWY QQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFT LTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWPPALTFGGGTKVEIK
CD3 VHA2	87	QVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFSNAWMH WVRQAPGKGLEWVAQIKDRANSYNTYYAESVKGRF TISRDDSKNSIYLQMNSLKTEDTAVYYCRYVHYTTYA GSSFSYGVDAWGQGTTTVTVSS
CD3 VLA2	88	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTY LHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQVPYTFGQGTK LEIK
GPC3 VHB	89	QVQLVQSGAEVKKPGASVTVSCKASGYTFTDYEMH WIRQPPGEGLEWIGAIDGPTPDYAYSEKFKGRVTLT ADKSTSTAYMELSSLTSEDVAVYYCTRFYSYTYWGQ GTLTVTVSS
GPC3 VLB	90	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQPLVHSNRNTY LHWYQQKPGQAPRLLIYKVSNRFSGVDPDRFSGSGS GTDFTLKISRVEAEDVGVYYCGQGTQVPYTFGQGTK LEIK

(15-2) GPC3/CD3/ヒトCD137三重特異性抗体の結合の評価

三重特異性抗体のヒトCD3およびCD137に対する結合親和性を、用いて37℃で評価した。三重特異性抗体のヒトCD3およびCD137に対する結合親和性を、Biacore T200機器 (GE Healthcare) を用いて37℃で評価した。抗ヒトFc抗体 (GE Healthcare) を、アミンカップリングキット (GE Healthcare) を用いてCM4センサーチップのすべてのフローセル上に固定化した。抗Fcセンサー表面上に抗体を捕捉し、次いで、組換えヒトCD3またはCD137を、フローセル上にインジェクトした。すべての抗体およびアナライトは、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃を含有するACES pH 7.4において調製した。センサー表面は、サイクル毎に3M MgCl₂で再生させた。結合親和性は、Biacore T200 Evaluation software, version 2.0 (GE Healthcare) を用いて、データをプロセッシングし、1:1結合モデルにフィットさせることによって決定した。

三重特異性抗体の組換えヒトCD3およびCD137に対する結合親和性を、表 3 3 に示す。

【0409】

10

20

30

40

50

【表 3 3】

抗体名	CD137			CD3		
	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)	ka (M ⁻¹ s ⁻¹)	kd (s ⁻¹)	KD (M)
GPC3/CD137xCD3	5.47E+05	2.06E-02	3.77E-08	8.18E+04	1.61E-03	1.97E-08
GPC3/CD137xCtrl	5.72E+05	2.04E-02	3.57E-08	結合無し		
GPC3/CtrlxCD3	結合無し			8.50E+04	1.51E-03	1.78E-08
Ctrl/CD137xCD3	5.48E+05	1.82E-02	3.31E-08	8.24E+04	1.52E-03	1.85E-08
Ctrl/CD137xCtrl	5.59E+05	1.79E-02	3.21E-08	結合無し		
Ctrl/CtrlxCD3	結合無し			8.37E+04	1.47E-03	1.75E-08

(15-3) GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fabの、ヒトCD137およびCD3に対する同時結合の評価

Biacoreタンデムブロッキングアッセイ (Biacore in-tandem blocking assay) を行って、三重特異性抗体またはDual-Fab抗体のCD3およびCD137の両方に対する同時結合を特徴決定した。アッセイは、Biacore T200機器 (GE Healthcare) 上で、20 mM ACES、150 mM NaCl、0.05% Tween 20、0.005% NaN₃を含有するACES pH 7.4において25℃で行った。抗ヒトFc抗体 (GE Healthcare) を、アミンカップリングキット (GE Healthcare) を用いてCM4センサーチップのすべてのフローセル上に固定化した。抗Fcセンサー表面上に抗体を捕捉し、次いで、8 μM CD3をフローセル上にインジェクトし、

その後、 $8\mu\text{M}$ CD3の存在下での $8\mu\text{M}$ CD137の同一のインジェクションを行った。第2のインジェクションに対する結合レスポンスの増加は、異なるパラトープに対する結合を示し、したがって、同時の結合相互作用を示した。一方、第2のインジェクションに対する結合レスポンスの増強がないか減少したことは、同じまたはオーバーラップするまたは隣接するパラトープに対する結合を示し、したがって、同時ではない結合相互作用を示した。

【0410】

このアッセイの結果を、図26に示し、そこでは、GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体は、CD3およびCD137に対する同時結合特性を示したが、抗GPC3/Dual-Fab抗体は示さなかった。

【0411】

(15-4) GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fab抗体の、ヒトCD137発現CHO細胞またはJurkat細胞に対する結合の評価

図27は、FACS解析によって判定された、三重特異性抗体およびDual-Fab抗体の、参考実施例13において生成されたhCD137トランスフェクタント、親CHO細胞、またはJurkat細胞上に発現しているhCD3（参考実施例6-2）に対する結合を示す。簡潔に述べると、三重特異性抗体およびDual-Fab抗体を、各細胞株と2時間、室温でインキュベートして、FACS緩衝液（PBS中、2% FBS、2mM EDTA）で洗浄した。次いで、Goat F(ab')₂ anti-Human IgG, Mouse ads-PE（Southern Biotech, カタログ2043-09）を添加し、30分間4℃でインキュベートして、FACS緩衝液で洗浄した。データの獲得を、FACS Verse（Becton Dickinson）で行い、その後、FlowJo software（Tree Star）を用いた解析を行った。

【0412】

図27は、50 nMの抗GPC3/H183L072（黒線）抗体が、Ctrl抗体（灰色塗りつぶし）と比べて、hCD137トランスフェクタント上のhCD137に特異的に結合する（図27a）が、CHO親細胞に対しては結合が観察されない（図27b）ことを示す。同様に、2 nMの抗GPC3/CD137xCD3（暗灰色塗りつぶし）および抗GPC3/CD137xCtrl（黒線）三重特異性抗体は、Ctrl/CtrlxCD3三重特異性対照抗体（薄灰色、塗りつぶし）と比べて、トランスフェクタント細胞上のhCD137に対する特異的結合を示した（図27c）。CHO親細胞においては、非特異的結合は観察されなかった（図27d）。

【0413】

50 nMの、図27eにおける抗GPC3/H183L072（黒線）抗体および図27fにおけるGPC3/CD137xCD3（暗灰色塗りつぶし）またはGPC3/CD137xCtrl（黒線）三重特異性抗体は両方とも、そのそれぞれの対照（薄灰色塗りつぶし）と比べて、Jurkat細胞上に発現しているCD3に結合することが示された。

【0414】

(15-5) GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fab三重特異性抗体の、ヒトGPC3発現細胞に対するT細胞上のCD3活性化の評価

三重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fab抗体の両方の形式が、標的依存的様式でエフェクター細胞を活性化することができるかどうかを調べるために、参考実施例6-2に記載されるようにNFAT-luc2 Jurkatルシフェラーゼアッセイを実施した。5.00E+03個のSK-pca60細胞（参考実施例13）を標的細胞として用いて、0.1、1、および10 nMの三重特異性抗体またはDual-Fab抗体の存在下で24時間、2.50E+04個のNFAT-luc2 Jurkat細胞と共培養した。24時間後に、ルシフェラーゼ活性を、Bio-Glo luciferase assay system（Promega, G7940）により、製造業者の説明書に従って検出した。発光（単位）は、GloMax（登録商標） Explorer System（Promega #GM3500）を用いて検出し、捕捉された値を、Graphpad Prism 7を用いてプロットした。図28に示すように、GPC3/CD137xCD3、GPC3/CtrlxCD3、または抗GPC3/H183L072などの抗GPC3結合および抗CD3結合の両方から構成される三重特異性抗体のみが、標的細胞の存在下で、Jurkat細胞の用量依存的な活性化をもたらした。注目すべきことに、参考実施例（15-4）に

10

20

30

40

50

におけるFACS解析によるJurkat細胞に対する抗GPC3/H183L072抗体の結合はより弱いにもかかわらず、抗GPC3/H183L072抗体は、GPC3/CD137xCD3またはGPC3/CtrlxCD3抗体と同様の程度のJurkat活性化を惹起することができた。全体的に、三重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fab抗体は両方とも、エフェクター細胞の標的依存性活性化をもたらすことができる。

【0415】

(15-6) GPC3/CD137xCD3三重特異性抗体および抗GPC3/Dual-Fab抗体の、ヒトCD137発現細胞に対するT細胞上のCD3活性化の評価

三重特異性抗体形式および抗GPC3/Dual-Fab抗体が両方とも、hCD137発現細胞とhCD3発現エフェクター細胞との架橋をもたらすことができるかどうかを調べるために、参考実施例(15-5)に記載されるように、 $5.00\text{E}+03$ 個のhCD137発現CHOを、0.1、1、および10 nMの三重特異性抗体の存在下で24時間、 $2.50\text{E}+04$ 個のNFAT-luc2 Jurkat細胞と共培養した。図29は、親CHO細胞と共培養した時に、すべての三重特異性抗体によるJurkat細胞の非特異的な活性化がないことを示した。しかし、GPC3/CD137xCD3およびCtrl/CD137xCD3三重特異性抗体は両方とも、hCD137発現CHO細胞の存在下でJurkat細胞を活性化できることが観察された。抗GPC3/H183L072抗体は、hCD137発現CHO細胞と共培養した時に、Jurkat細胞の活性化をもたらさなかった。10 nMの抗GPC3/H183L072抗体は、10 nMのGPC3/CD137xCD3三重特異性抗体のものの約0.96%の発光を示し、1 nMの抗GPC3/H183L072抗体は、1 nMのGPC3/CD137xCD3三重特異性抗体のものの約1.93%の発光を示した。参考実施例15-5において評価されたGPC3陽性細胞に対するCD3活性化と比較した場合、10 nMまたは1 nMの抗GPC3/H183L072抗体を用いた時には、約1.36%または1.89%の発光が、CD137陽性細胞に対して検出されたが、10 nMおよび1 nMのGPC3/CD137xCD3三重特異性抗体は、それぞれ、GPC3陽性細胞に対するものと比較して約127.77%および107.22%の発光を、CD137陽性細胞に対して示した。

まとめると、これは、CD3とCD137に同時に結合する三重特異性形式GPC3/CD137xCD3は、CD3とCD137に同時には結合しない抗GPC3/Dual-Fab形式とは異なり、標的または腫瘍抗原の結合とは独立して、hCD137発現細胞に対するJurkat細胞活性化をもたらす、オフターゲット細胞傷害活性を生じ得ることを示唆する。参考実施例8、15-5、および15-6に示すこれらの結果から、CD3とCD137に同時には結合しない抗体のみが、標的抗原発現細胞を特異的に死滅させ得ることがわかる。

【0416】

(15-7) Ctrl/CD137xCD3三重特異性抗体およびCtrl/Dual-Fab抗体の、PBMCからのオフターゲットサイトカイン放出の評価

オフターゲット毒性についての三重特異性抗体形式とDual-Fab抗体との比較をまた、ヒトPBMC溶液を用いて評価した。簡潔に述べると、参考実施例(7-2-1)に記載されるように調製された $2.00\text{E}+05$ 個のPBMCを、80、16、および3.2 nMの三重特異性抗体またはDual-Fab抗体と、標的細胞の非存在下で48時間インキュベートした。上清におけるIL-2、IFN γ 、およびTNF α を、参考実施例(7-2-2)に記載されるようなサイトカイン放出アッセイを用いて測定した。図30に示すように、Ctrl/CD137xCD3三重特異性抗体は、PBMCからのIL-2、IFN γ 、およびTNF α の放出をもたらす得るが、Ctrl/Dual-Fab抗体はもたらさない。80 nM Ctrl/Dual-Fab抗体は、80 nM Ctrl/CD137xCD3三重特異性抗体のものの約50%のIL-2濃度を示し、16 nMの抗体を用いた時には、10%未満のIL-2濃度が観察された。IFN γ およびTNF α について言うと、Ctrl/Dual-Fab抗体は、各抗体濃度において、Ctrl/CD137xCD3三重特異性抗体でのものの10%未満のIL-2濃度を示した。

これらの結果は、Ctrl/CD137xCD3三重特異性形式が、標的細胞の非存在下でPBMCの非特異的活性化をもたらしたことを示唆する。最後に、データは、Dual-Fab形式が、オフターゲット毒性を伴わずに標的的特異的エフェクター細胞活性化を付与できることを示した。

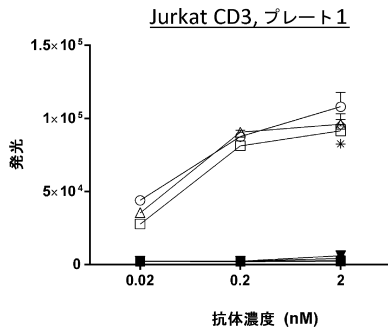
【産業上の利用可能性】

【0417】

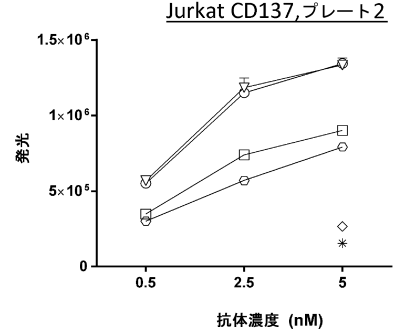
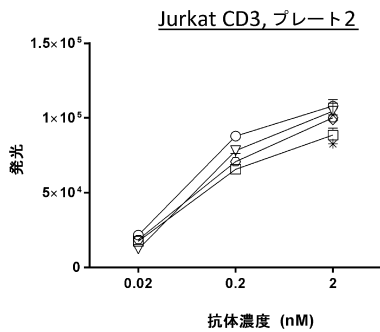
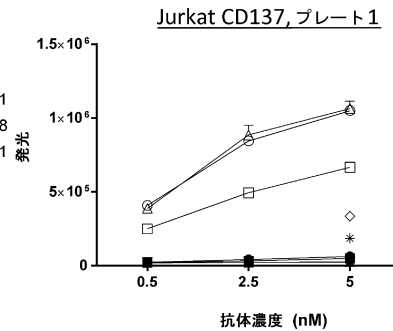
本発明は、CD3およびCD137（4-1BB）に結合することができるが、CD3とCD137に同時には結合することができない、抗原結合分子を提供する。本発明の抗原結合分子は、3つの異なる抗原に対する結合を通して、これらの抗原結合分子によって誘導される増強されたT細胞依存性細胞傷害活性を示す。

【図面】

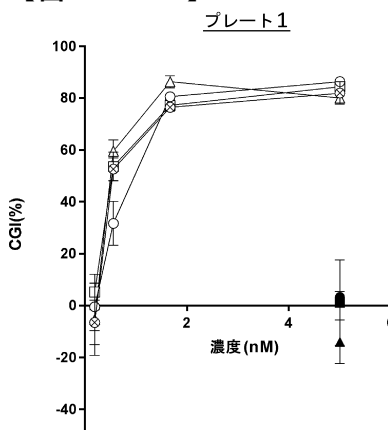
【図1. 1】



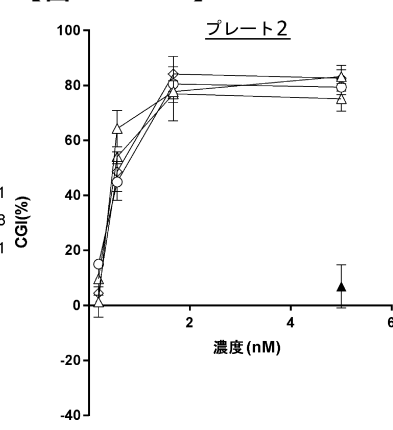
【図1. 2】



【図1. 3 a】



【図1. 3 b】



10

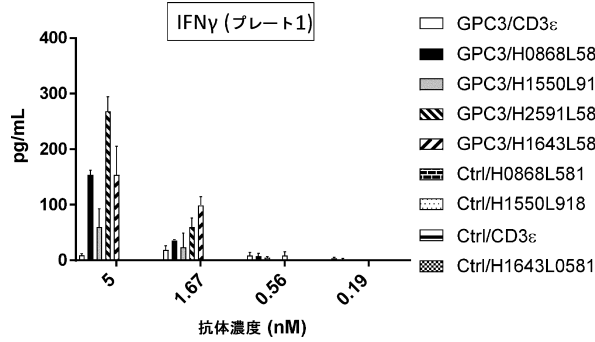
20

30

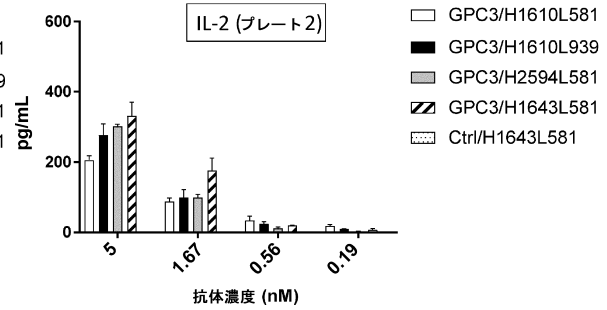
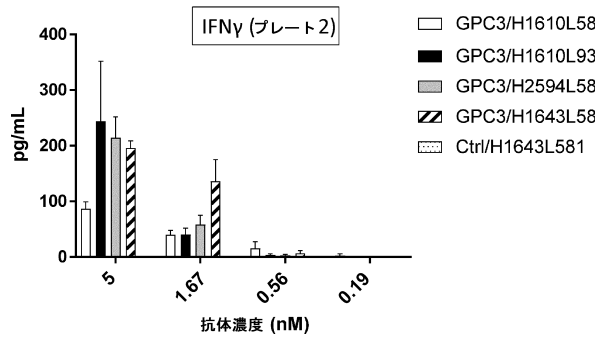
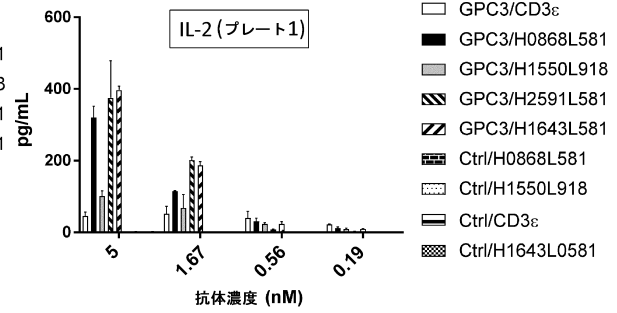
40

50

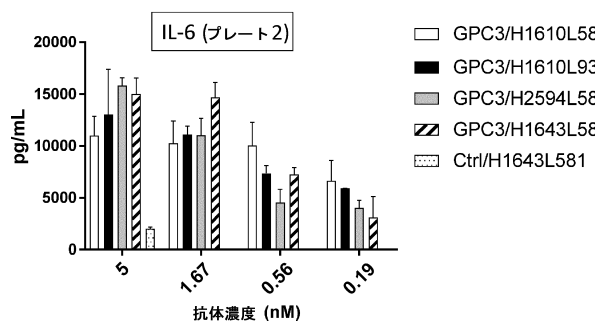
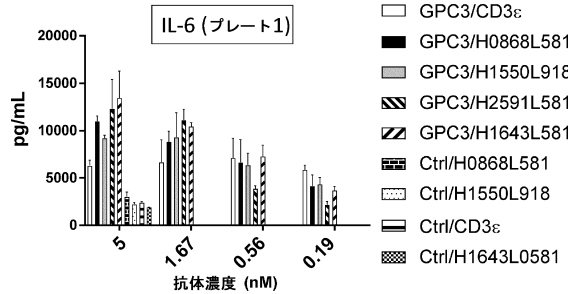
【図 1. 3 c】



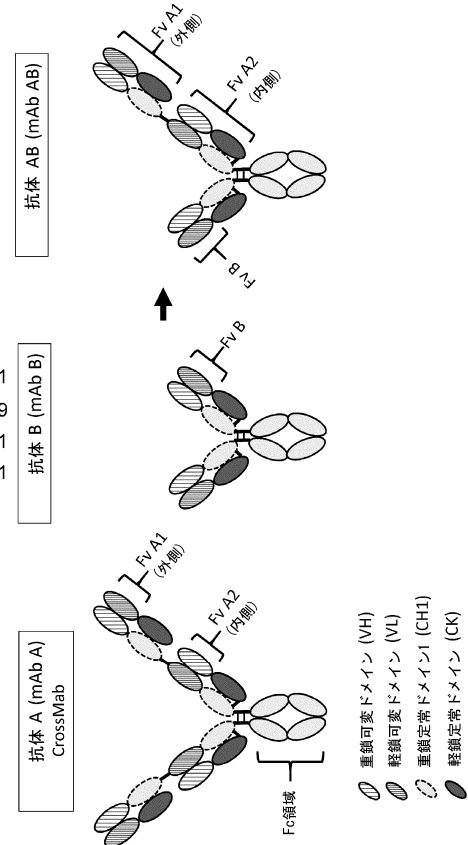
【図 1. 3 d】



【図 1. 3 e】



【図 2. 1】



10

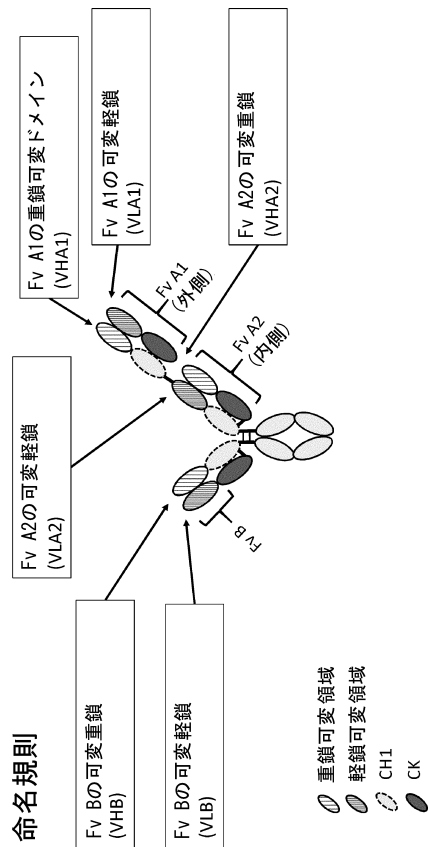
20

30

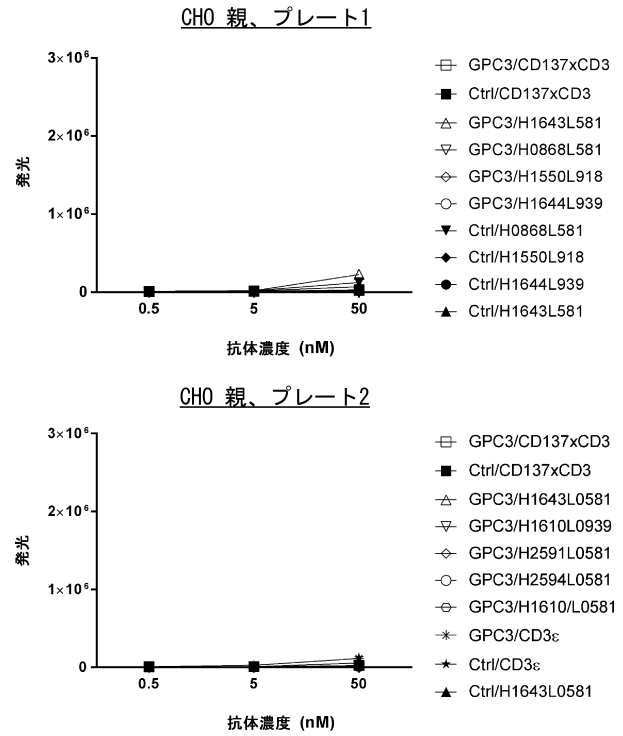
40

50

【図 2. 2】



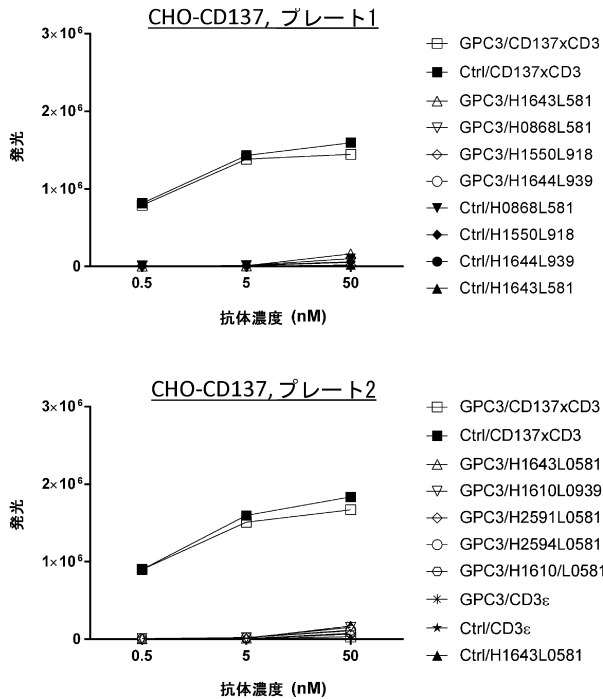
【図 2. 3 a】



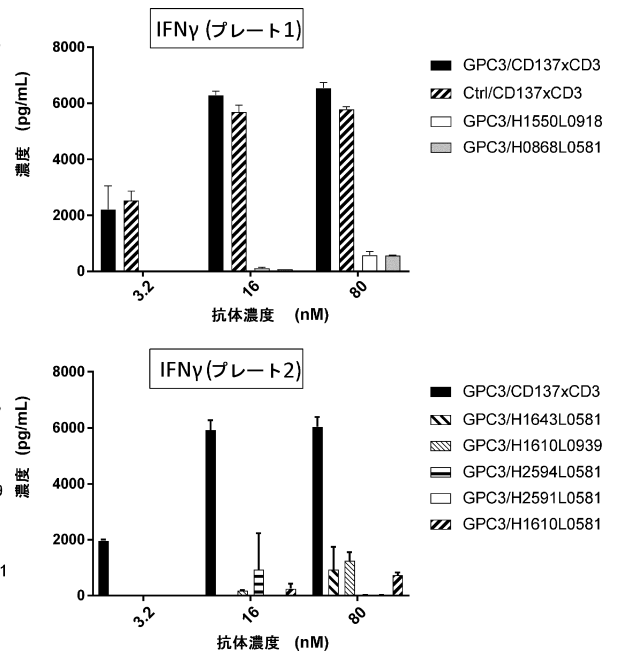
10

20

【図 2. 3 b】



【図 2. 4 a】

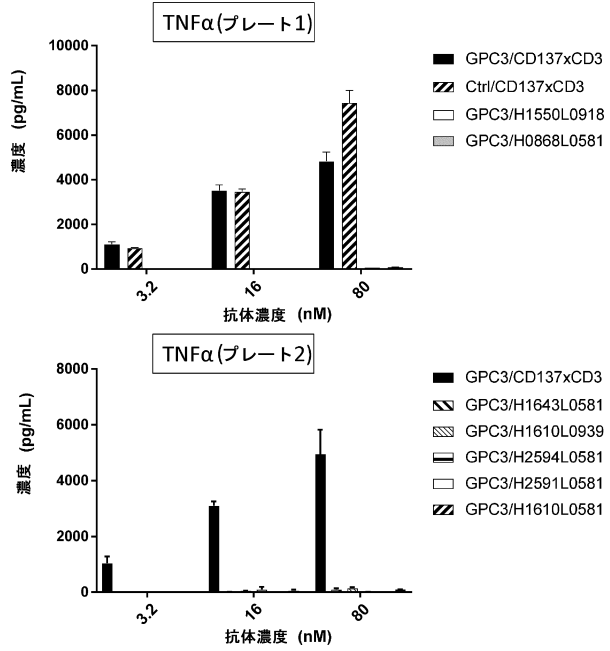


30

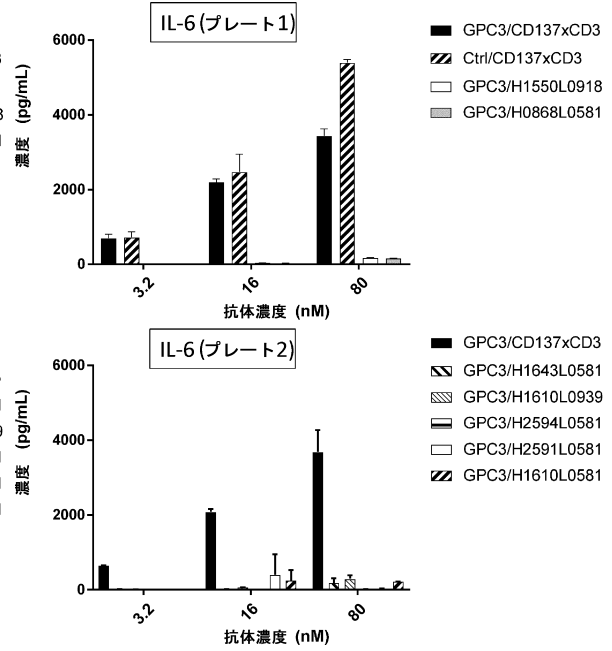
40

50

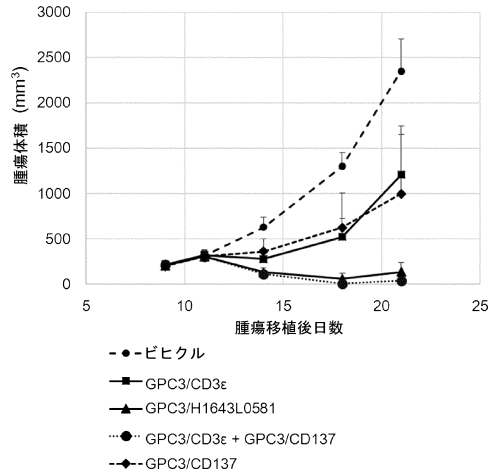
【図 2 . 4 b】



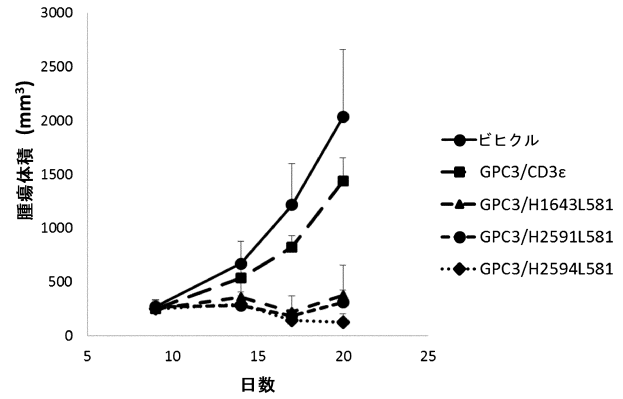
【図 2 . 4 c】



【図 3 . 1 a】



【図 3 . 1 b】



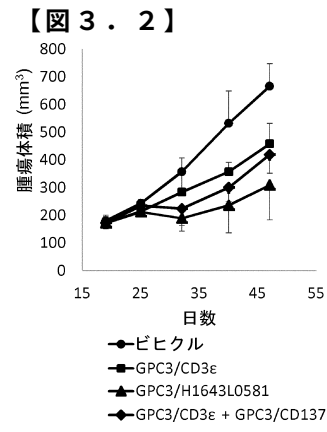
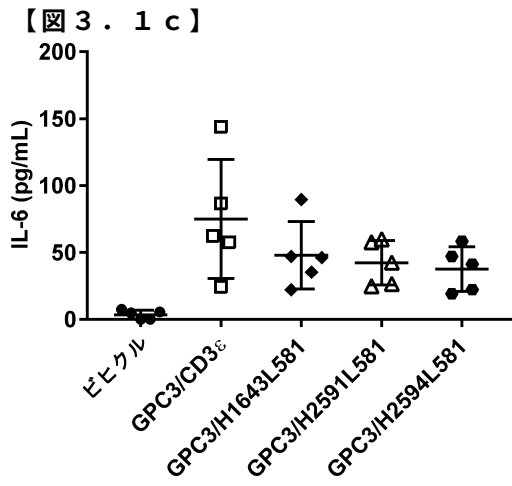
10

20

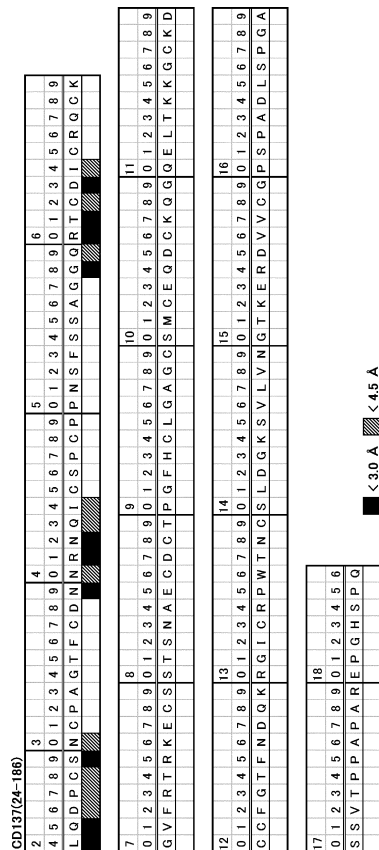
30

40

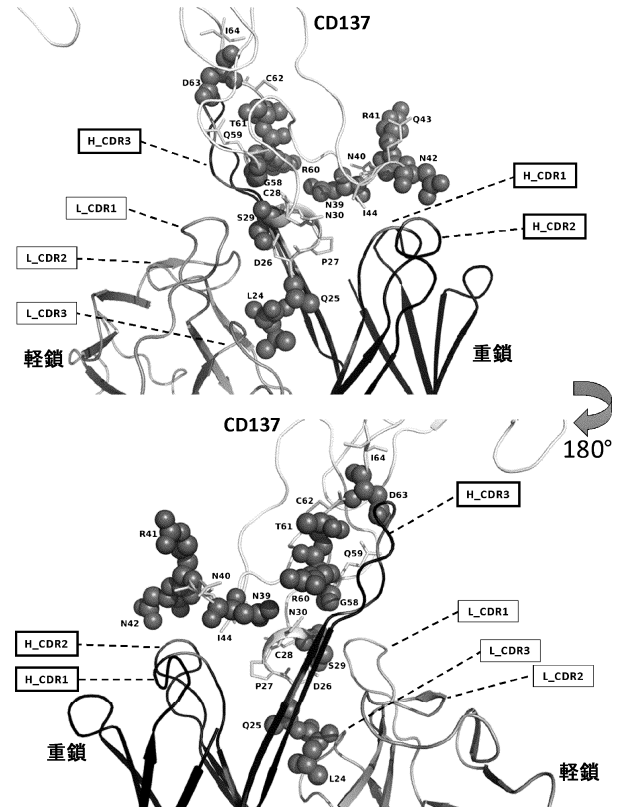
50



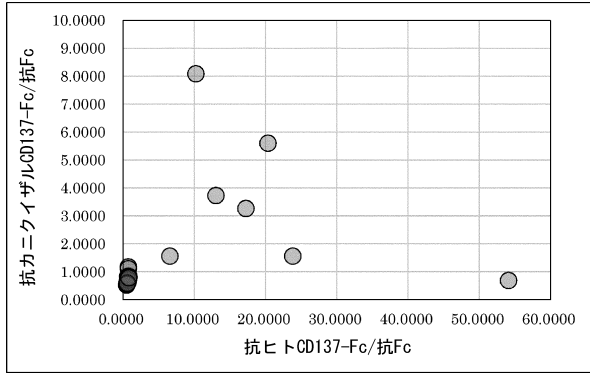
【図 3 . 3 a】



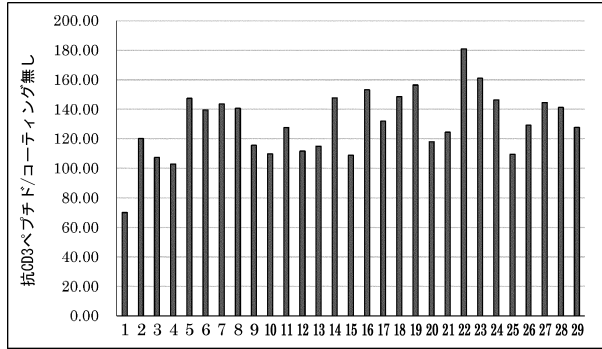
【図 3 . 3 b】



【図 8】

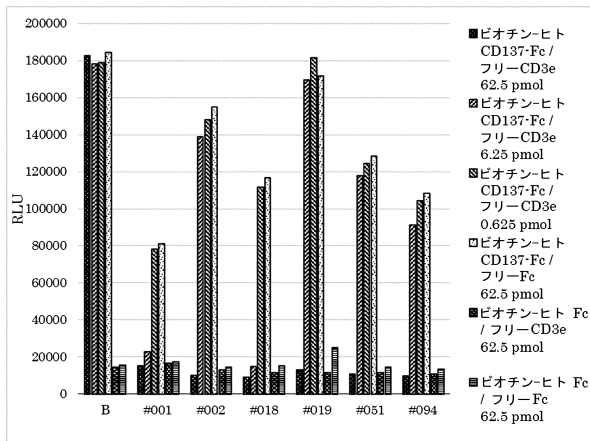


【図 9】

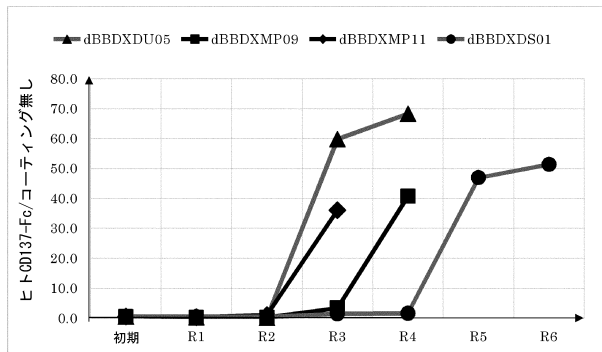


10

【図 10】

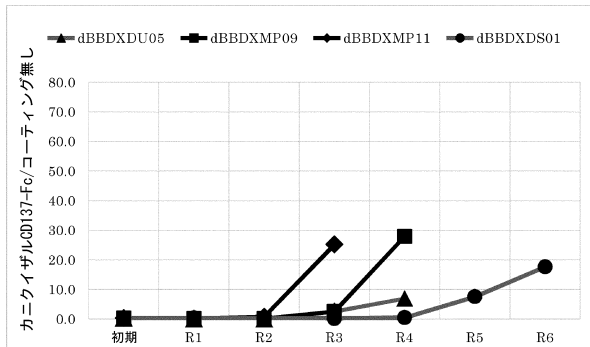


【図 11 A】

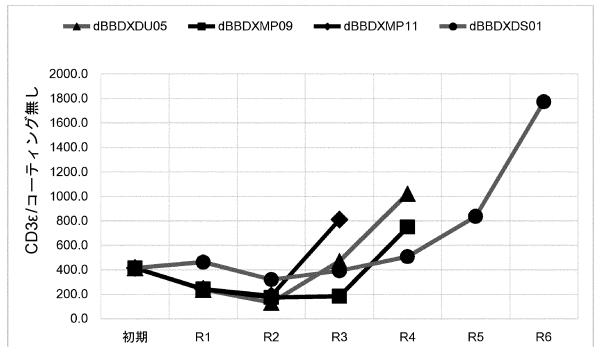


20

【図 11 B】



【図 11 C】

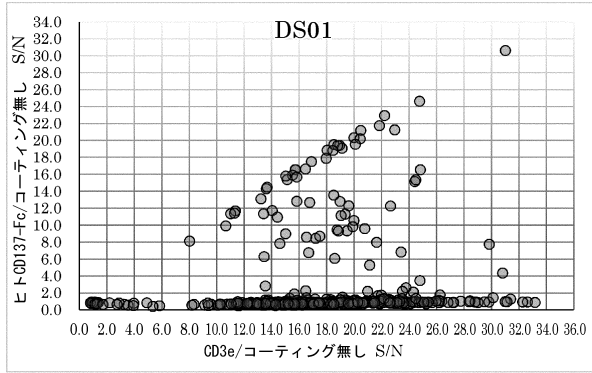


30

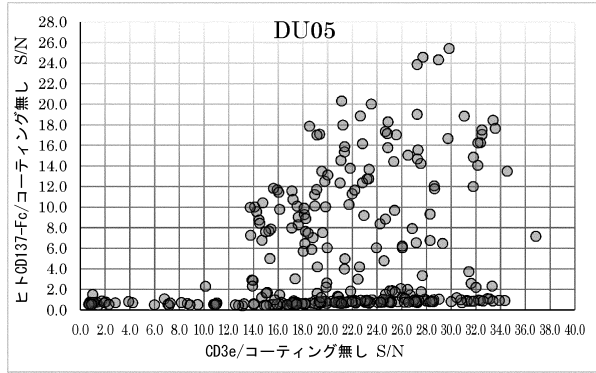
40

50

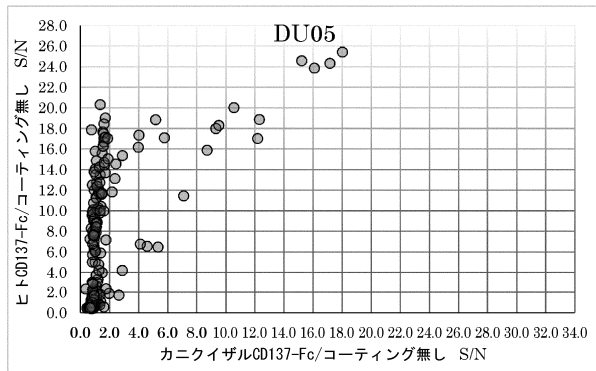
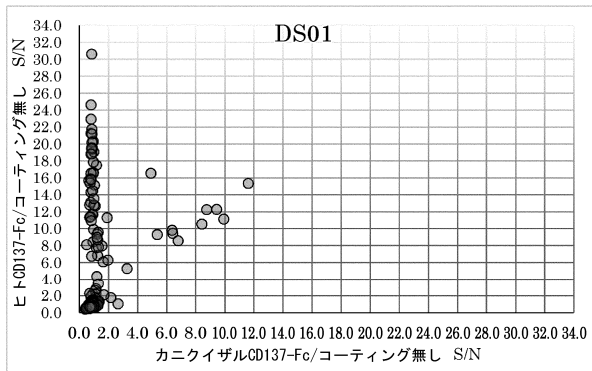
【図 1 2 . 1】



【図 1 2 . 2】

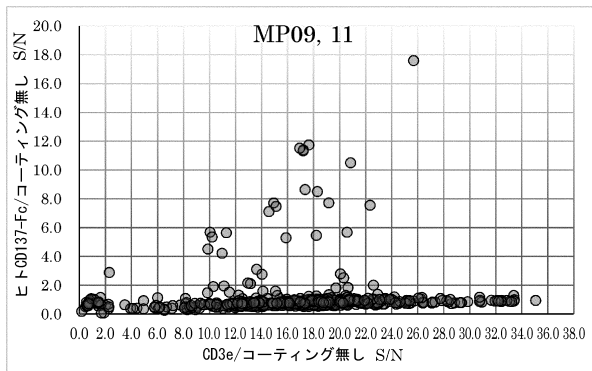


10

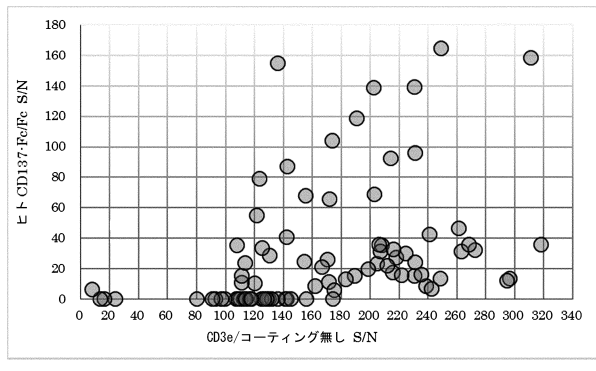


20

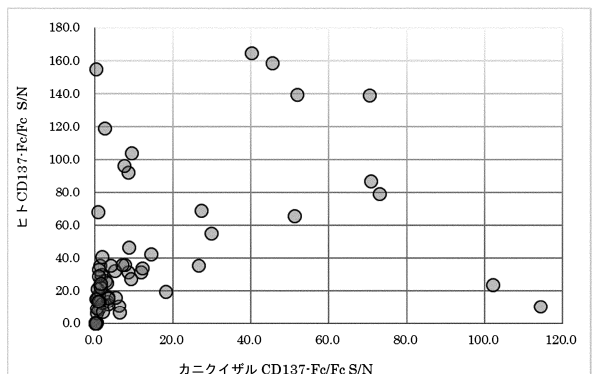
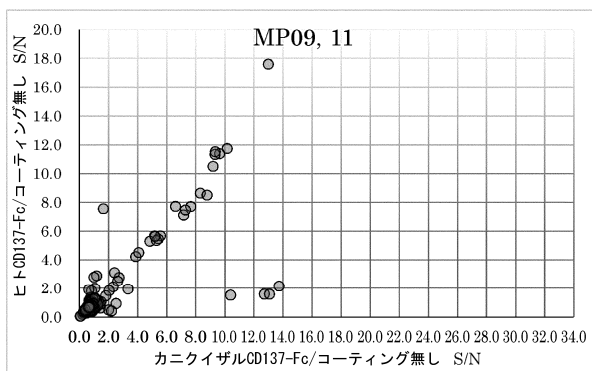
【図 1 2 . 3】



【図 1 3】



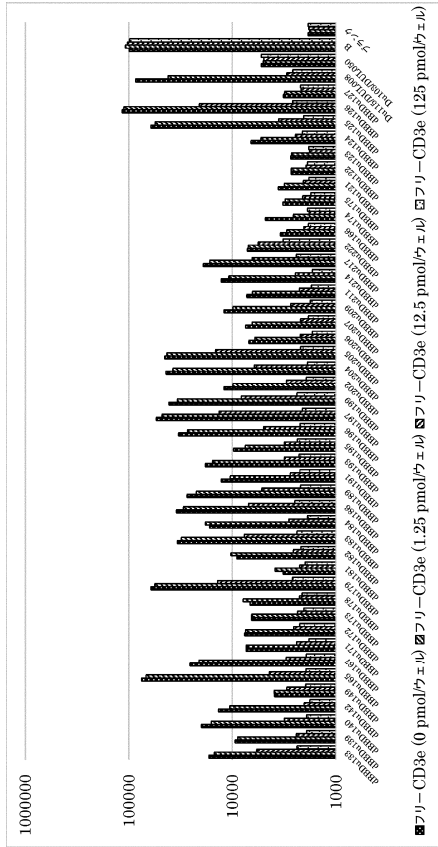
30



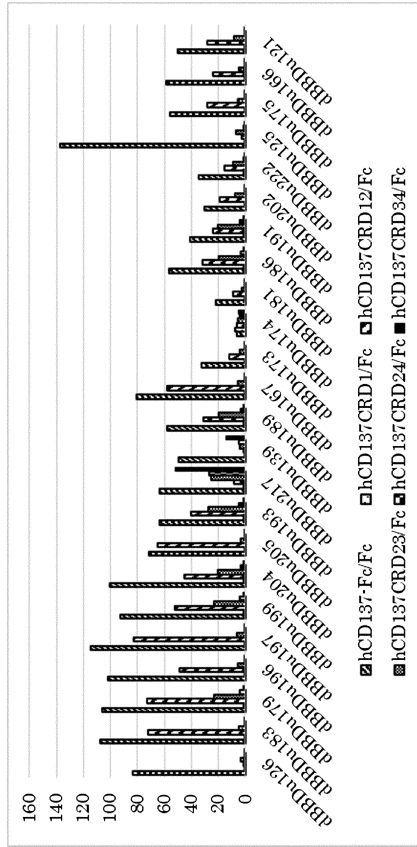
40

50

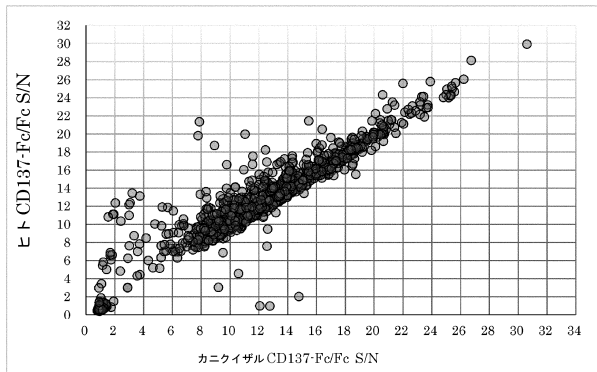
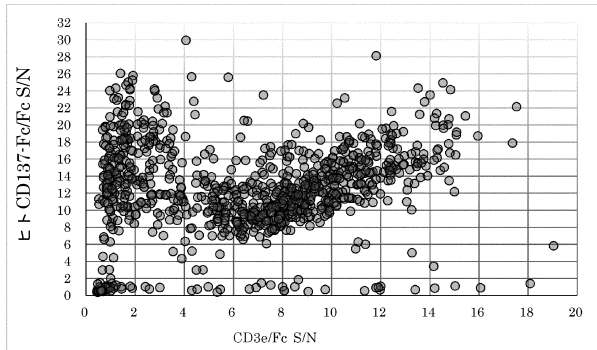
【図 14】



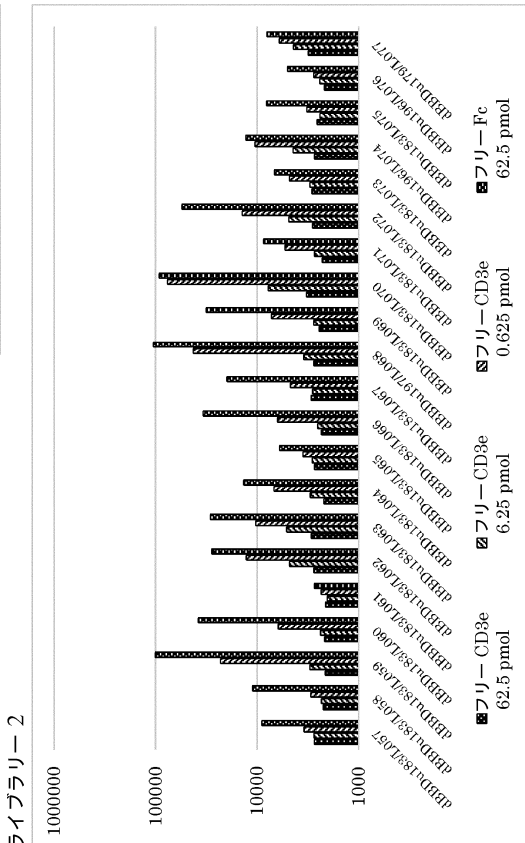
【図 15】



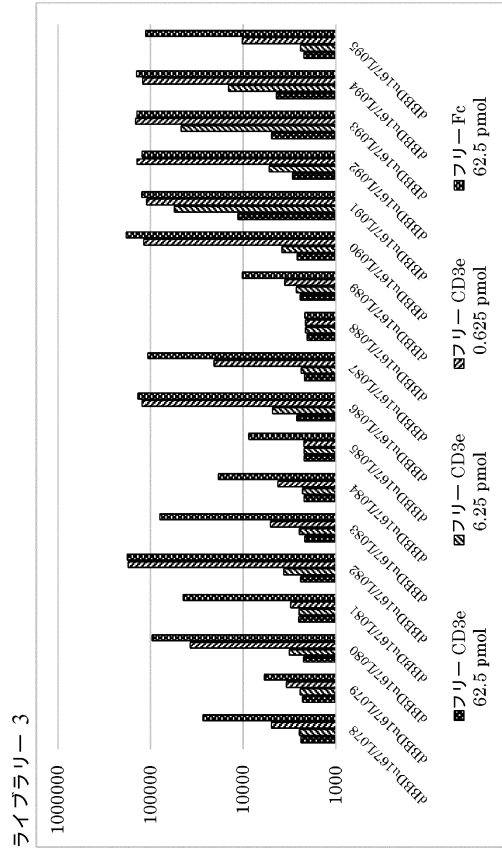
【図 16】



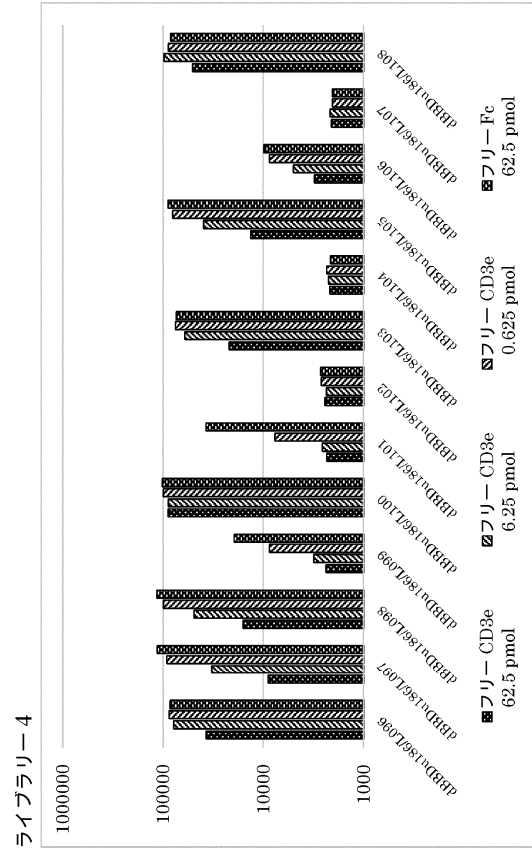
【図 17. 1】



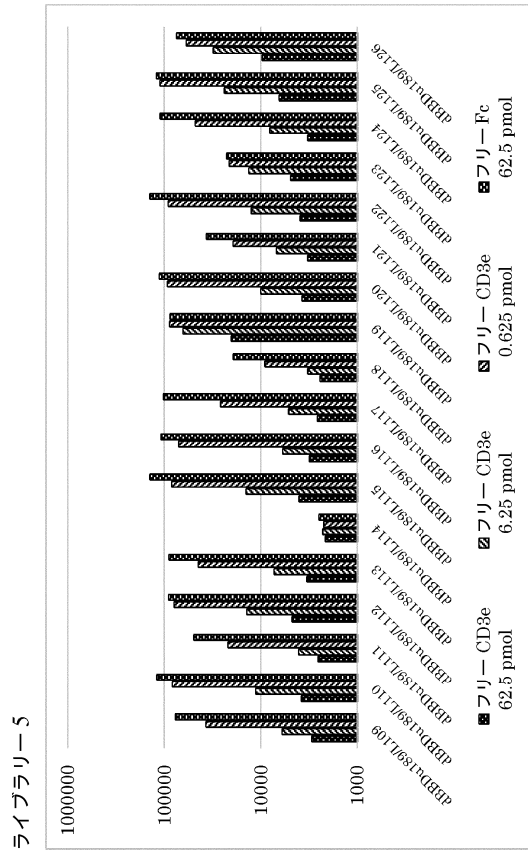
【図 17. 2】



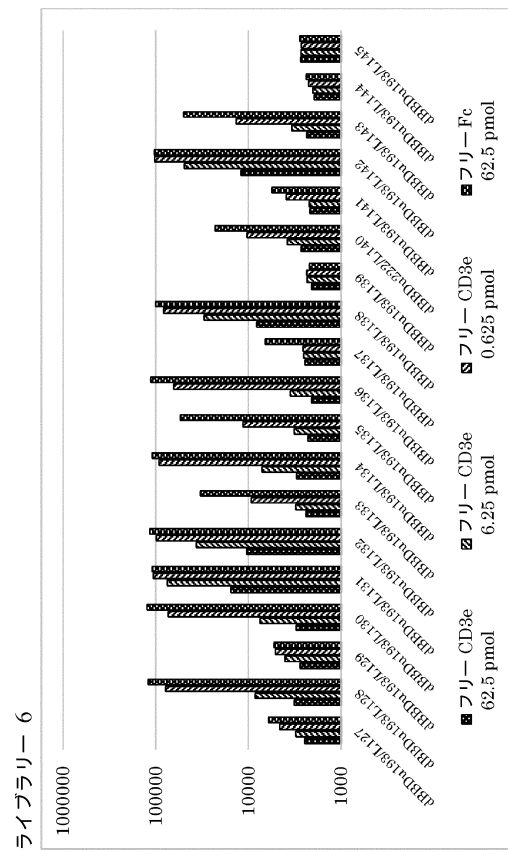
【図 17. 3】



【図 17. 4】



【図 17. 5】



10

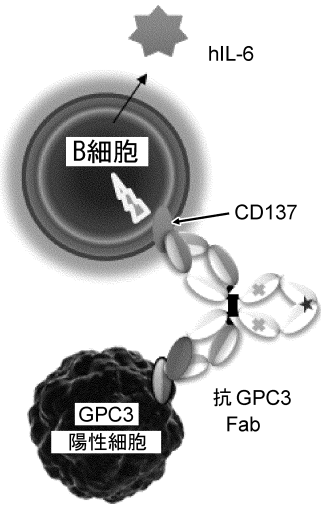
20

30

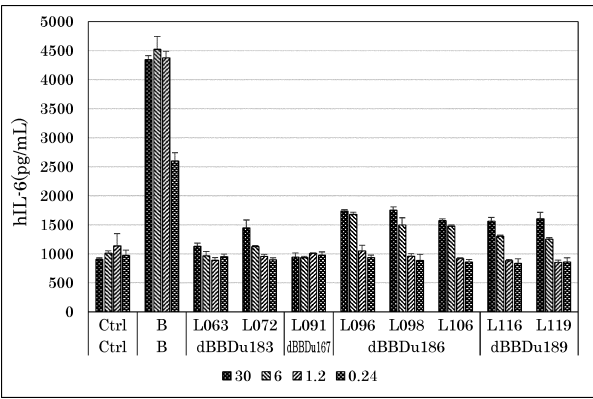
40

50

【図 1 8 A】

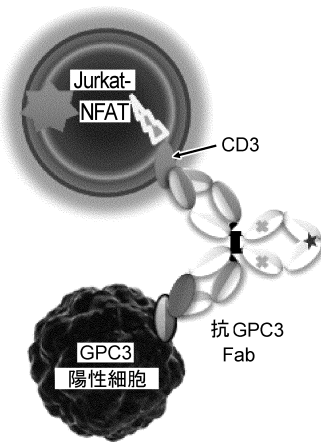


【図 1 8 B】

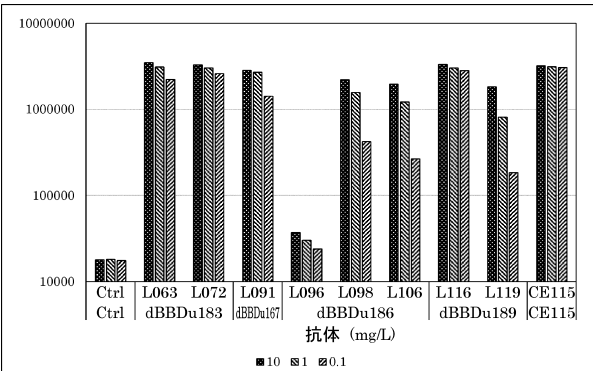


10

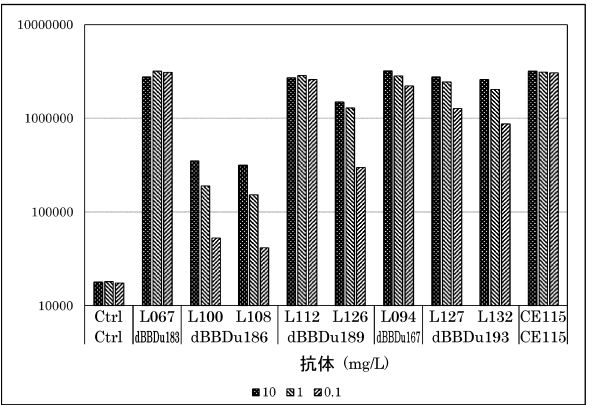
【図 1 9 A】



【図 1 9 B】



20

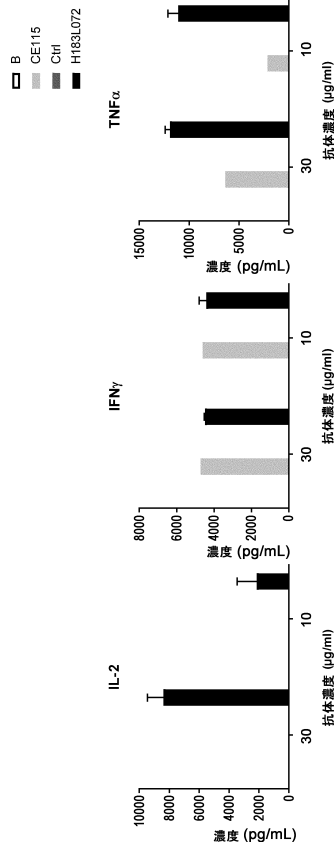


30

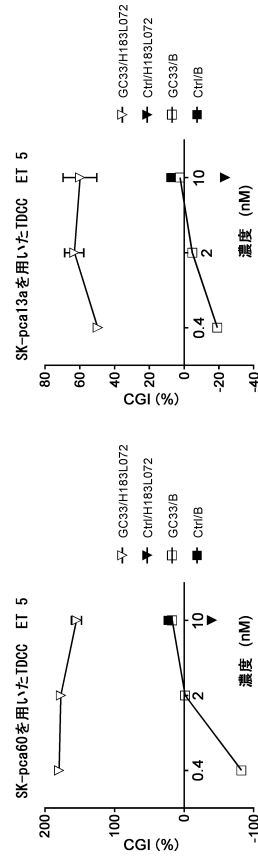
40

50

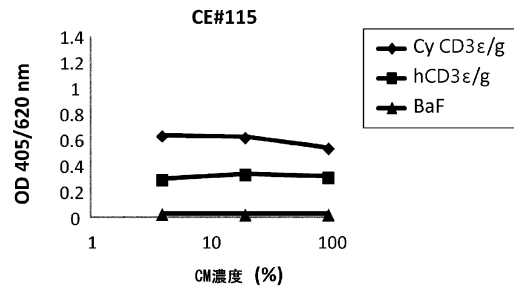
【図 20】



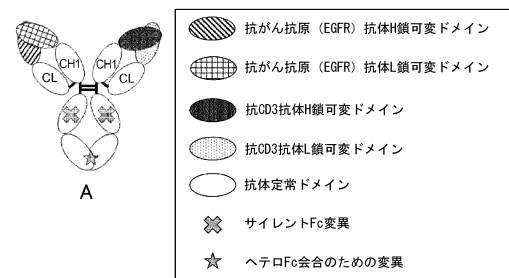
【図 21】



【図 22】



【図 23】



10

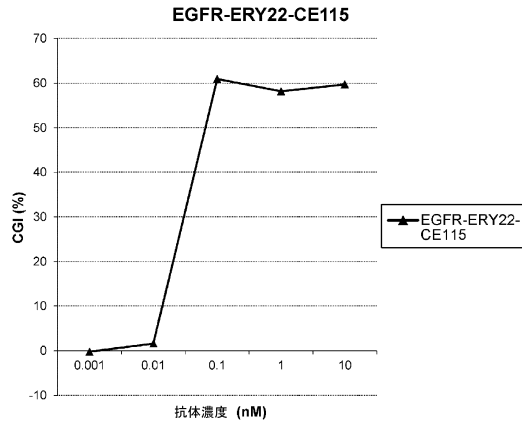
20

30

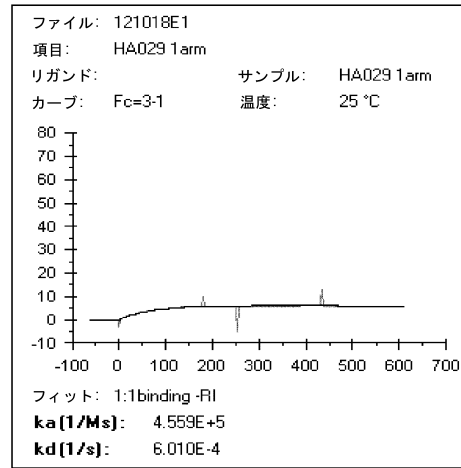
40

50

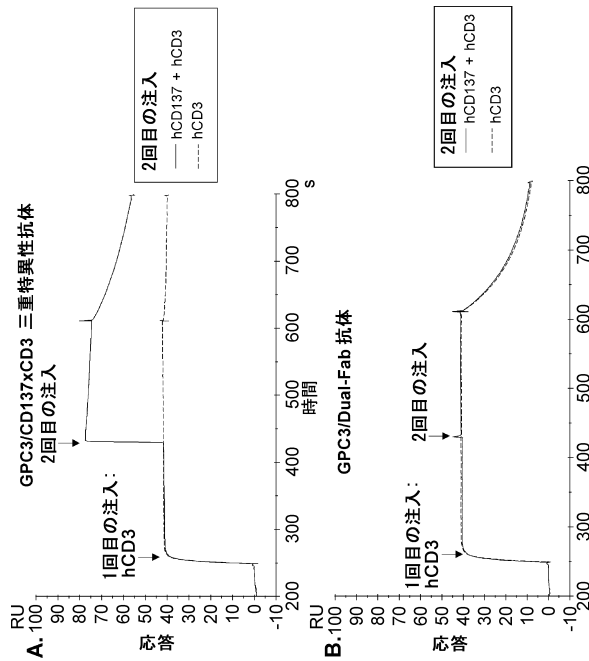
【図 2 4】



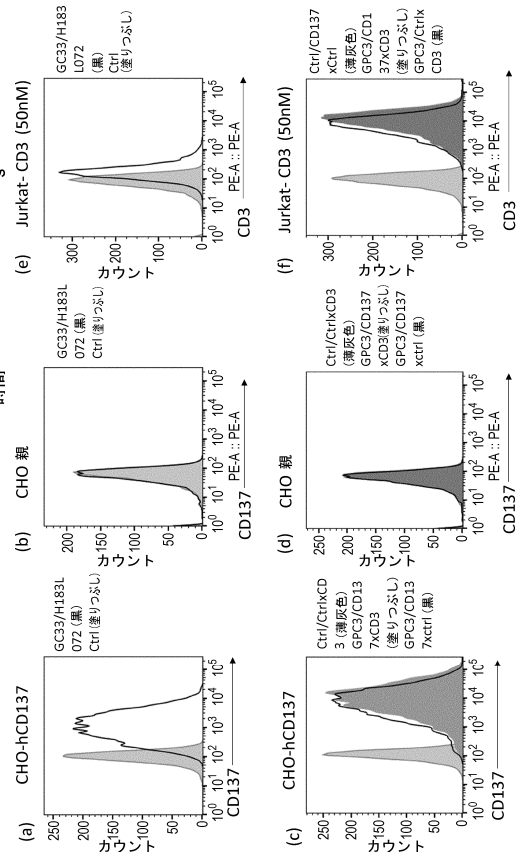
【図 2 5】



【図 2 6】



【図 2 7】



10

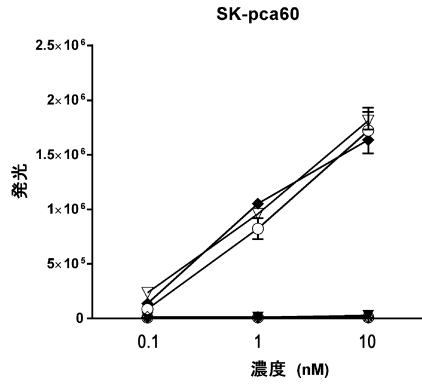
20

30

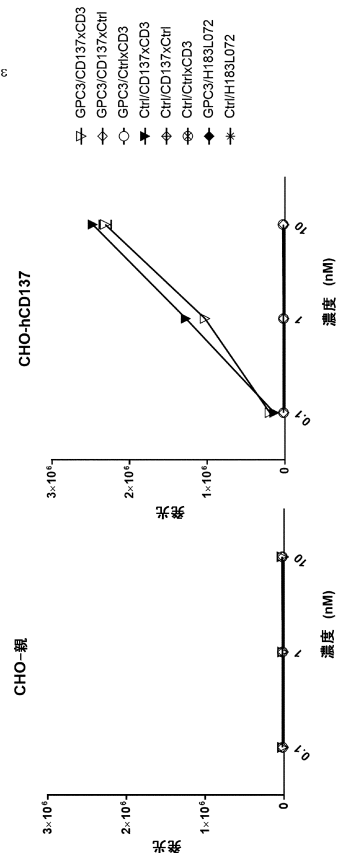
40

50

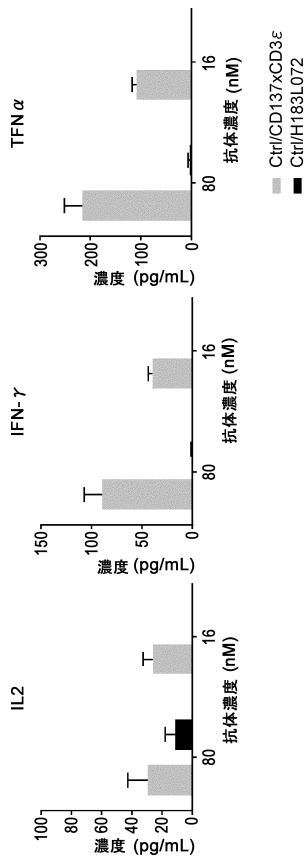
【図 28】



【図 29】



【図 30】



【配列表】
0007519990000001.app

10

20

30

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

C 1 2 P 21/08 (2006.01)
C 1 2 N 15/13 (2006.01)
C 1 2 N 15/63 (2006.01)
A 6 1 K 39/395 (2006.01)
G 0 1 N 33/543 (2006.01)
C 0 7 K 17/00 (2006.01)
A 6 1 P 35/00 (2006.01)

F I

C 1 2 P 21/08
C 1 2 N 15/13
C 1 2 N 15/63 Z
A 6 1 K 39/395 U
A 6 1 K 39/395 T
G 0 1 N 33/543 5 9 5
C 0 7 K 17/00
A 6 1 P 35/00

(33)優先権主張国・地域又は機関
日本国(JP)

前置審査

(74)代理人 100188433
弁理士 梅村 幸輔

(74)代理人 100128048
弁理士 新見 浩一

(74)代理人 100129506
弁理士 小林 智彦

(74)代理人 100114340
弁理士 大関 雅人

(74)代理人 100214396
弁理士 塩田 真紀

(74)代理人 100121072
弁理士 川本 和弥

(72)発明者 ホー シュー ウェン サマンサ

シンガポール共和国 バイオポリス ドライブ 3 シナプス # 0 7 - 1 1 / 1 6 中外ファーマボ
ディ・リサーチ・ピーティーイー・リミテッド内

(72)発明者 フェン シュー

シンガポール共和国 バイオポリス ドライブ 3 シナプス # 0 7 - 1 1 / 1 6 中外ファーマボ
ディ・リサーチ・ピーティーイー・リミテッド内

審査官 松田 芳子

(56)参考文献 国際公開第 2 0 1 5 / 0 6 8 8 4 7 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 6 / 0 7 6 3 4 5 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 5 / 1 5 6 2 6 8 (WO, A 1)
国際公開第 2 0 1 9 / 1 1 1 8 7 1 (WO, A 1)

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

C 1 2 N 1 5 / 0 9

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / R E G I S T R Y / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T
N)

S w i s s P r o t / G e n e S e q