

明 細 書

発明の名称：二重特異性抗体

技術分野

[0001] 本発明は、PD-1およびCD3に各々特異的に結合することができる二重特異性抗体（以下、PD-1／CD3二重特異性抗体と略記する。）、これを有効成分として含む医薬組成物ならびにそれらの医薬治療用途に関する。

背景技術

[0002] PD-1は免疫グロブリンファミリーに属する免疫抑制受容体であり、抗原レセプターからの刺激により活性化したT細胞の免疫活性化シグナルを抑制する機能を持つ分子である。PD-1ノックアウトマウスの解析等から、PD-1シグナルは、自己免疫性拡張型心筋症、ループス様症候群、自己免疫性脳脊髄炎、全身性ループスエリテマトーデス、移植片対宿主病、Ⅰ型糖尿病およびリウマチ性関節炎などの自己免疫疾患の抑制に重要な役割を果たすことが知られている。したがって、PD-1シグナルを増強する物質は自己免疫疾患等の予防または治療剤となり得ることが指摘されている。

[0003] これまでにPD-1シグナルを増強する物質として、PD-1を認識する二重特異性抗体が知られている（特許文献1ないし3）。この二重特異性抗体は、T細胞受容体複合体のメンバーであるCD3を認識する抗体の抗原認識部位とPD-1を認識する抗体の抗原認識部位とを遺伝子工学的に連結されたものであり、PD-1をT細胞受容体複合体近傍に位置させる頻度を上げることによって、T細胞受容体複合体に対するPD-1の抑制シグナルを増強する作用をもつ。さらに、同特許文献には、PD-1二重特異性抗体が自己免疫疾患等の予防または治療に使用できることも記載されている。

[0004] ところで、タンパク製剤においては、投与直後のインフュージョン・リアクションあるいはサイトカイン放出症候群と呼ばれる副作用の発現が懸念されており、そのような作用が軽減ないし抑制された製剤が求められている。

[0005] 本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体は、そのような副作用の原因と目される投与後のサイトカイン産生刺激が十分に低減されており、そのため、懸念される副作用の発現が抑制された医薬となることが期待される。

[0006] このような特徴を有する二重特異性抗体は、現在までに全く報告されていない。

先行技術文献

特許文献

[0007] 特許文献1：国際公開第2003/011911号パンフレット

特許文献2：国際公開第2004/072286号パンフレット

特許文献3：国際公開第2013/022091号パンフレット

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0008] 本発明の目的は、自己免疫疾患等に対する予防、症状進展抑制、再発抑制または治療のための新たな薬剤を提供することにある。

課題を解決するための手段

[0009] 本発明の発明者らは鋭意検討した結果、かかる課題を解決し得る物質として、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体に着目し、また、それらがインフュージョン・リアクションあるいはサイトカイン放出症候群と呼ばれる副作用の発現が軽減された薬剤となり得ることを確認し、本発明を完成した。

[0010] さらに、本発明の発明者らは、当該PD-1/CD3二重特異性抗体が、PD-1およびそのリガンドであるPD-L1との相互作用を許容する特徴を有することを確認し、そのような特徴が当該PD-1/CD3二重特異性抗体の作用の増強ないし持続に寄与していることを見出した。

[0011] すなわち、本発明は、以下のとおりである。

[1] PD-1に特異的に結合する第一アームおよびCD3に特異的に結合する第二アームを有する二重特異性抗体またはその抗体断片であって、P

D-1 に特異的に結合する第一アームが、

(A) (a) 配列番号 6 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域の相補性決定領域 1 (以下、「重鎖可変領域の相補性決定領域 1」を、VH-CDR1 と略記することがある。)、

(b) 配列番号 7 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域の相補性決定領域 2 (以下、「重鎖可変領域の相補性決定領域 2」を、VH-CDR2 と略記することがある。) および

(c) 配列番号 8 のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域の相補性決定領域 3 (以下、「重鎖可変領域の相補性決定領域 3」を、VH-CDR3 と略記することがある。) を有する重鎖可変領域 (以下、「重鎖可変領域」を、「VH」と略記することがある。)、

(B) (a) 配列番号 9 のアミノ酸配列からなる VH-CDR1、

(b) 配列番号 10 のアミノ酸配列からなる VH-CDR2 および

(c) 配列番号 11 のアミノ酸配列からなる VH-CDR3 を有する VH、

(C) (a) 配列番号 12 のアミノ酸配列からなる VH-CDR1、

(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列からなる VH-CDR2 および

(c) 配列番号 14 のアミノ酸配列からなる VH-CDR3 を有する VH、

(D) (a) 配列番号 15 のアミノ酸配列からなる VH-CDR1、

(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列からなる VH-CDR2 および

(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列からなる VH-CDR3 を有する VH、
および

(E) (a) 配列番号 18 のアミノ酸配列からなる VH-CDR1、

(b) 配列番号 19 のアミノ酸配列からなる VH-CDR2 および

(c) 配列番号 20 のアミノ酸配列からなる VH-CDR3 を有する VH、
から選択される何れか一つの VH を有し、

CD3 に特異的に結合する第二アームが、

(a) 配列番号 37 のアミノ酸配列からなる VH-CDR1、

(b) 配列番号 38 のアミノ酸配列からなる VH-CDR2 および

(c) 配列番号39のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有するVHを有する、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[2] PD-1に特異的に結合する第一アームにおける、VH-CDR1、VH-CDR2およびVH-CDR3の何れか一つまたは複数のVH-CDRにおいて、各々その任意の1～5個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、その保存的アミノ酸）に置換されていてもよく、および/または、CD3に特異的に結合する第二アームにおける、VH-CDR1、VH-CDR2およびVH-CDR3の何れか一つまたは複数のVH-CDRにおいて、各々その任意の1～5個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、その保存的アミノ酸）に置換されていてもよい、前項[1]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[3] (i) PD-1に特異的に結合する第一アームのVHが、
(a) 配列番号6のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、
(b) 配列番号7のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および
(c) 配列番号8のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有し、
(ii) CD3に特異的に結合する第二アームのVHが、
(a) 配列番号37のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、
(b) 配列番号38のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および
(c) 配列番号39のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有する、前項[1]または[2]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[4] (i) PD-1に特異的に結合する第一アームのVHが、
(a) 配列番号9のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、
(b) 配列番号10のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および
(c) 配列番号11のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有し、
(ii) CD3に特異的に結合する第二アームのVHが、
(a) 配列番号37のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、
(b) 配列番号38のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および

(c) 配列番号 39 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を有する、前項 [1] または [2] 記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[5] (i) P D - 1 に特異的に結合する第一アームの V H が、

(a) 配列番号 12 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、

(b) 配列番号 13 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 および

(c) 配列番号 14 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を有し、

(i i) C D 3 に特異的に結合する第二アームの V H が、

(a) 配列番号 37 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、

(b) 配列番号 38 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 および

(c) 配列番号 39 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を有する、前項 [1] または [2] 記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[6] (i) P D - 1 に特異的に結合する第一アームの V H が、

(a) 配列番号 15 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、

(b) 配列番号 16 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 および

(c) 配列番号 17 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を有し、

(i i) C D 3 に特異的に結合する第二アームの V H が、

(a) 配列番号 37 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、

(b) 配列番号 38 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 および

(c) 配列番号 39 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を有する、前項 [1] または [2] 記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[7] (i) P D - 1 に特異的に結合する第一アームの V H が、

(a) 配列番号 18 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、

(b) 配列番号 19 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 および

(c) 配列番号 20 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を有し、

(i i) C D 3 に特異的に結合する第二アームの V H が、

(a) 配列番号 37 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、
(b) 配列番号 38 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 および
(c) 配列番号 39 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を有する、前項
[1] または [2] 記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体
断片。

[8] P D - 1 に特異的に結合する第一アームおよび C D 3 に特異的に結
合する第二アームを有する二重特異性抗体またはその抗体断片であって、 P
D - 1 に特異的に結合する第一アームが、

(a) H Y J ¹ L H で表されるアミノ酸配列 [配列中、J ¹ は、G (グリシン)
または A (アラニン) を表わし、ここで、J ¹ が表わす、あるいはその他の
アルファベットは、各々アミノ酸の一文字略号を表わす。] からなる V H -
C D R 1、

(b) W J ² N T N T U ² N P T X ² A Q G F T G で表されるアミノ酸配列 [配
列中、J ² は、L (ロイシン) または I (イソロイシン) を表わし、U ² は、
E (グルタミン酸) または G (グリシン) を表わし、X ² は、F (フェニルア
ラニン) または Y (チロシン) を表わし、ここで、J ²、U ² および X ² が各々
表わす、あるいはその他のアルファベットは、各々上記と同じ意味を表わす
。] からなる V H - C D R 2、および

(c) G D J ³ V V P T T I W N Y Y U ³ X ³ M Z ³ V で表されるアミノ酸配列
[配列中、J ³ は、M (メチオニン) または L (ロイシン) を表わし、U ³ は
、H (ヒスチジン) または Y (チロシン) を表わし、X ³ は、F (フェニルア
ラニン) または Y (チロシン) を表わし、Z ³ は、D (アスパラギン酸) また
は E (グルタミン酸) を表わし、ここで、J ³、U ³、X ³ および Z ³ が各々表
わす、あるいはその他のアルファベットは、各々上記と同じ意味を表わす。

] からなる V H - C D R 3 を有する V H を有し、ならびに
C D 3 に特異的に結合する第二アームが、

(a) 配列番号 37 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 1、

(b) 配列番号 38 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 および

(c) 配列番号39のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有するVHを有する、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[9] (a) J¹はG(グリシン)を表わし、J²はL(ロイシン)を表わし、U²はE(グルタミン酸)を表わし、X²はF(フェニルアラニン)を表わし、J³はM(メチオニン)を表わし、U³はH(ヒスチジン)を表わし、X³はF(フェニルアラニン)を表わし、およびZ³はD(アスパラギン酸)を表わすか、

(b) J¹はG(グリシン)を表わし、J²はI(イソロイシン)を表わし、U²はG(グリシン)を表わし、X²はY(チロシン)を表わし、J³はL(ロイシン)を表わし、U³はH(ヒスチジン)を表わし、X³はY(チロシン)を表わし、およびZ³はE(グルタミン酸)を表わすか、

(c) J¹はA(アラニン)を表わし、J²はL(ロイシン)を表わし、U²はE(グルタミン酸)を表わし、X²はY(チロシン)を表わし、J³はM(メチオニン)を表わし、U³はY(チロシン)を表わし、X³はY(チロシン)を表わし、Z³はD(アスパラギン酸)を表わすか、または

(d) J¹はA(アラニン)を表わし、J²はL(ロイシン)を表わし、U²はE(グルタミン酸)を表わし、X²はF(フェニルアラニン)を表わし、J³はM(メチオニン)を表わし、U³はH(ヒスチジン)を表わし、X³はF(フェニルアラニン)を表わし、およびZ³はD(アスパラギン酸)を表わす、前項[8]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[10] PD-1に特異的に結合する第一アームのVHのフレームワーク(以下、「フレームワーク」を、FRと略記することがある。)領域のうち、フレームワーク1(以下、FR1と略記することがある。)、フレームワーク2(以下、FR2と略記することがある。)およびフレームワーク3(以下、FR3と略記することがある。)領域が、生殖細胞系列型V遺伝子IGHV7-4-1あるいはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるアミノ酸配列に各々対応する、前項[1]～[9]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

〔１１〕 ＰＤ－１に特異的に結合する第一アームのＶＨのフレームワーク４（以下、「フレームワーク４」を、ＦＲ４と略記することがある。）領域が、生殖細胞系列型Ｊ遺伝子ＪＨ６ｃあるいはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるアミノ酸配列（但し、ＶＨ－ＣＤＲ３領域に含まれるアミノ酸配列を除く。）からなる、前項〔１０〕記載のＰＤ－１／ＣＤ３二重特異性抗体またはその抗体断片。

〔１２〕 ＰＤ－１に特異的に結合する第一アームのＶＨのＦＲ領域が、生殖細胞系列型Ｖ遺伝子ＩＧＨＶ７－４－１の体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされ、当該体細胞突然変異により、配列番号２１のアミノ酸配列中の位置１３のリシンがグルタミンに、位置１６のアラニンがバリンに、または位置１９のリシンがメチオニンに各々置換されるか、あるいはそれらの任意の複数の組み合わせで置換されたあるいは置換されていてもよいＦＲ１領域からなる、前項〔１０〕または〔１１〕記載のＰＤ－１／ＣＤ３二重特異性抗体またはその抗体断片。

〔１３〕 ＰＤ－１に特異的に結合する第一アームのＶＨのＦＲ領域が、生殖細胞系列型Ｖ遺伝子ＩＧＨＶ７－４－１の体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされ、当該体細胞突然変異により、配列番号２１のアミノ酸配列中の位置３７のバリンがロイシンに置換されたあるいは置換されていてもよいＦＲ２領域からなる、前項〔１０〕～〔１２〕の何れか一項記載のＰＤ－１／ＣＤ３二重特異性抗体またはその抗体断片。

〔１４〕 ＰＤ－１に特異的に結合する第一アームのＶＨのＦＲ領域が、生殖細胞系列型Ｖ遺伝子ＩＧＨＶ７－４－１の体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされ、当該体細胞突然変異により、配列番号２１のアミノ酸配列中の位置７７のセリンがスレオニンに、または位置８４のシステインがセリンもしくはアスパラギンに各々置換されるか、あるいはそれらの任意の複数の組み合わせで置換されたあるいは置換されていてもよいＦＲ３領域からなる、前項〔１０〕～〔１３〕の何れか一項記載のＰＤ－１／ＣＤ３二重特異性抗体またはその抗体断片。

[15] PD-1 に特異的に結合する第一アームのVHのFR4領域が、生殖細胞系列型J遺伝子JH6cの体細胞突然変異を受けた当該遺伝子（但し、VH-CDR3領域をコードする遺伝子領域を除く。）にコードされ、そのFR4領域のアミノ酸配列（Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser）（配列番号41）中のリシン（Lys）がグルタミンもしくはアスパラギンに、および／または*印のスレオニン（Thr）がロイシンに置換されたあるいは置換されていてもよい、前項[10]～[14]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[16] PD-1 に特異的に結合する第一アームのVHが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列、または当該VHのアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%、98%もしくは99%同一なアミノ酸配列からなる、前項[1]～[15]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[17] PD-1 に特異的に結合する第一アームのVHが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなる、前項[1]および[3]～[7]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[18] CD3 に特異的に結合する第二アームのVHが、配列番号36のアミノ酸配列、または当該VHのアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%、98%もしくは99%同一なアミノ酸配列からなる、前項[1]～[17]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[19] CD3 に特異的に結合する第二アームのVHが、配列番号36のアミノ酸配列からなる、前項[1]および[3]～[18]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[20] PD-1 に特異的に結合する第一アームのVHが、配列番号1、

配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなり、CD3に特異的に結合する第二アームのVHが、配列番号36のアミノ酸配列からなる、前項[1]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[21] PD-1に特異的に結合する第一アームおよびCD3に特異的に結合する第二アームを有する二重特異性抗体またはその抗体断片であって、PD-1に特異的に結合する第一アームのVHが、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列、または当該VHのアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%、98%もしくは99%同一なアミノ酸配列からなり、CD3に特異的に結合する第二アームのVHが、配列番号36のアミノ酸配列、または当該VHのアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%、98%もしくは99%同一なアミノ酸配列からなる、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[22] PD-1に特異的に結合する第一アームにおけるVHが、配列番号1のアミノ酸配列からなり、CD3に特異的に結合する第二アームにおけるVHが、配列番号36のアミノ酸配列からなる、前項[1]または[3]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[23] PD-1に特異的に結合する第一アームにおけるVHが、配列番号2のアミノ酸配列からなり、CD3に特異的に結合する第二アームにおけるVHが、配列番号36のアミノ酸配列からなる、前項[1]または[4]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[24] PD-1に特異的に結合する第一アームにおけるVHが、配列番号3のアミノ酸配列からなり、CD3に特異的に結合する第二アームにおけるVHが、配列番号36のアミノ酸配列からなる、前項[1]または[5]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[25] PD-1に特異的に結合する第一アームにおけるVHが、配列番号4のアミノ酸配列からなり、CD3に特異的に結合する第二アームにお

るVHが、配列番号36のアミノ酸配列からなる、前項[1]または[6]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[26] PD-1に特異的に結合する第一アームにおけるVHが、配列番号5のアミノ酸配列からなり、CD3に特異的に結合する第二アームにおけるVHが、配列番号36のアミノ酸配列からなる、前項[1]または[7]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[27] PD-1に特異的に結合する第一アームおよび/またはCD3に特異的に結合する第二アームが、各々、

(a) 配列番号26のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域の相補性決定領域1(以下、「軽鎖可変領域の相補性決定領域1」を、VL-CDR1と略記することがある。)、

(b) 配列番号27のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域の相補性決定領域2(以下、「軽鎖可変領域の相補性決定領域2」を、VL-CDR2と略記することがある。)、および

(c) 配列番号28のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域の相補性決定領域3(以下、「軽鎖可変領域の相補性決定領域3」を、VL-CDR3と略記することがある。)を有する軽鎖可変領域(以下、「軽鎖可変領域」を、「VL」と略記することがある。)を有する、前項[1]～[26]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[28] PD-1に特異的に結合する第一アームおよび/またはCD3に特異的に結合する第二アームが、各々、配列番号25のアミノ酸配列からなるVLを有する、前項[1]～[27]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[29] PD-1に特異的に結合する第一アームおよびCD3に特異的に結合する第二アームを有する、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片であって、

(A) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなるVHならびに配列番号2

5のアミノ酸配列からなるV_Lを有する、PD-1に特異的に結合する第一アーム、ならびに

(B) 配列番号36のアミノ酸配列からなるV_Hならびに配列番号25のアミノ酸配列からなるV_Lを有する、CD3に特異的に結合する第二アームを含む、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[30] PD-1に特異的に結合する第一アームおよびCD3に特異的に結合する第二アームを有する二重特異性抗体またはその抗体断片であって、当該PD-1に特異的に結合する第一アームが、(1) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れかの一のアミノ酸配列からなるV_Hならびに配列番号25のアミノ酸配列からなるV_Lを有する、PD-1に特異的に結合する第一アームのPD-1への結合もしくは(2) 当該V_HおよびV_LからなるPD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体の可変領域のPD-1への結合に交差競合する、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[31] PD-1に特異的に結合する第一アームおよびCD3に特異的に結合する第二アームを有する二重特異性抗体またはその抗体断片であって、当該PD-1に特異的に結合する第一アームによるPD-1への結合が、(1) 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れかの一のアミノ酸配列からなるV_Hならびに配列番号25のアミノ酸配列からなるV_Lを有する、PD-1に特異的に結合する第一アームもしくは(2) 当該V_HおよびV_LからなるPD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体の可変領域によって交差競合される、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[32] さらに、当該CD3に特異的に結合する第二アームが、(1) 配列番号36のアミノ酸配列からなるV_Hならびに配列番号25のアミノ酸配列からなるV_Lを有する、CD3に特異的に結合する第二アームのCD3への結合または(2) 当該V_HおよびV_LからなるCD3に特異的に結合するモノクローナル抗体の可変領域のCD3への結合に交差競合する、前項[30]

] または [3 1] 記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[3 3] C D 3 に特異的に結合する第二アームが、

(a) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 1 、

(b) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 2 および

(c) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列からなる V H - C D R 3 を有する V H を有する、前項 [3 0] または [3 1] 記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[3 4] C D 3 に特異的に結合する第二アームの V H が、配列番号 3 6 のアミノ酸配列、または当該 V H のアミノ酸配列と少なくとも 8 0 % 、 9 0 % 、 9 5 % 、 9 8 % もしくは 9 9 % 同一なアミノ酸配列からなる、前項 [3 0] 、 [3 1] および [3 3] の何れか一項記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[3 5] C D 3 に特異的に結合する第二アームの V H が、配列番号 3 6 のアミノ酸配列からなる、前項 [3 0] または [3 1] 記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[3 6] C D 3 に特異的に結合する第二アームが、

(a) 配列番号 2 6 のアミノ酸配列からなる V L - C D R 1 、

(b) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列からなる V L - C D R 2 および

(c) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列からなる V L - C D R 3 を有する V L を有する、前項 [3 0] 、 [3 1] および [3 3] ~ [3 5] の何れか一項記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[3 7] C D 3 に特異的に結合する第二アームが、配列番号 2 5 のアミノ酸配列からなる V L を有する、前項 [3 0] 、 [3 1] および [3 3] ~ [3 5] の何れか一項記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはその抗体断片。

[3 8] P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体が、 I g G 抗体である前項 [1] ~ [3 7] の何れか一項記載の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体またはそ

の抗体断片。

[39] 前項[38]記載のIgG抗体が、IgG₁抗体またはIgG₄抗体である前項[38]記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[40] 前項[38]記載のIgG抗体が、IgG₁抗体である前項[38]記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[41] 前項[38]記載のIgG抗体が、IgG₄抗体である前項[38]記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[42] 前項[40]記載のIgG₁抗体における2個の重鎖定常領域中のEUナンバリングシステムにおける235番目のロイシンが各々グリシンに置換され、および／または236番目のグリシンが各々アルギニンに置換された前項[40]記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[43] PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖における定常領域中のEUナンバリングシステムによる351番目のロイシンおよび366番目のスレオニンがともにリシンに置換され、CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖における定常領域中の351番目のロイシンがアスパラギン酸に置換され、かつ368番目のロイシンがグルタミン酸に置換された前項[40]または[42]記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[44] PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖における定常領域中のEUナンバリングシステムによる351番目のロイシンがアスパラギン酸に置換され、かつ368番目のロイシンがグルタミン酸に置換され、CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖における定常領域中の351番目のロイシンおよび366番目のスレオニンがともにリシンに置換された前項[40]または[42]記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[45] 前項[40] および[42]～[44]の何れか一項記載のIg

G₁抗体の2個の重鎖定常領域中のE Uナンバリングシステムによる447番目のリシンが各々欠如している前項[40]および[42]～[44]の何れか一項記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[46] 前項[41]記載のIg G₄抗体における2個の重鎖定常領域中のE Uナンバリングシステムによる228番目のセリンが各々プロリンに置換された前項[41]記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[47] PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖が、配列番号23のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域を含む、前項[1]～[38]、[40]、[42]および[44]の何れか一項に記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[48] CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖が、配列番号24のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域を含む、前項[1]～[38]、[40]、[42]、[44]および[47]の何れか一項に記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[49] PD-1に特異的に結合する第一アームのVLを有する軽鎖および／またはCD3に特異的に結合する第二アームのVLを有する軽鎖が、配列番号29のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域を含む、前項[1]～[48]の何れか一項記載のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[50] PD-1に特異的に結合する第一アームおよびCD3に特異的に結合する第二アームを有する二重特異性抗体またはその抗体断片であって、

(A) PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなるVHならびに配列番号23のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域を含み、

(B) PD-1に特異的に結合する第一アームのVLを有する軽鎖が、配列番号25のアミノ酸配列からなるVLおよび配列番号29のアミノ酸配列か

らなる軽鎖定常領域を含み、

(C) CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖が、配列番号36のアミノ酸配列からなるVHならびに配列番号24のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域を含み、および

(D) CD3に特異的に結合する第二アームのVLを有する軽鎖が、配列番号25のアミノ酸配列からなるVLおよび配列番号29のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域を含む、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[51] PD-1に特異的に結合する第一アームがPD-1およびPD-L1間の相互作用を許容する、前項[1]～[50]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[52] サイトカイン産生が十分に低減された、前項[1]～[51]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[53] PD-1に特異的に結合する第一アームがPD-1およびPD-L1間の相互作用を許容し、かつ、サイトカイン産生が十分に低減された、前項[1]～[50]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[54] サイトカインが、少なくともIL-2、IFN- γ またはTNF- α である、前項[52]または[53]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[55] PD-1およびCD3が、各々ヒトPD-1およびヒトCD3である、前項[1]～[54]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[56] CD3が、CD3 ϵ である前項[1]～[55]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[57] PD-1/CD3二重特異性抗体が、モノクローナル抗体である前項[1]～[56]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[58] PD-1/CD3二重特異性抗体が、単離抗体である、前項[1]～[57]の何れか一項記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[1-1] 前項[1]～[58]の何れか一項から選択されるPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片および薬学的に許容できる担体を含む医薬組成物。

[2-1] 前項[1]～[58]の何れか一項から選択されるPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および/または治療剤。

[2-2] 自己免疫疾患が、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス、慢性円板状エリテマトーデス、多発性硬化症（全身性強皮症、進行性全身性硬化症）、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性動脈周囲炎（結節性多発動脈炎、顕微鏡的多発血管炎）、大動脈炎症候群（高安動脈炎）、悪性関節リウマチ、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、脊椎関節炎、混合性結合組織病、シェーグレン症候群、成人スティル病、血管炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、リウマトイド血管炎、大型血管炎、ANCA関連血管炎（例えば、多発血管炎性肉芽腫症および好酸球性多発血管炎性肉芽腫症）、コーガン症候群、RS3PE、側頭動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、線維筋痛症、抗リン脂質抗体症候群、好酸球性筋膜炎、IgG4関連疾患（例えば、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性膵炎など）、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、慢性萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、原発性胆汁性肝硬変、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、自己免疫性溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫性好中球減少症、特発性血小板減少性紫斑病、バセドウ病（グレーブス病（甲状腺機能亢進症））、橋本病、自己免疫性副腎機能不全、原発性甲状腺機能低下症、アジソン病（慢性副腎皮質機能低下症）、特発性アジソン病、Ⅰ型糖尿病、緩徐進行性Ⅰ型糖尿病（成人潜在性自己免疫性糖尿病）、限局性強皮症、乾癬、乾癬性関節炎、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、類天疱瘡、妊娠性疱疹、線

状 IgA 水疱性皮膚症、後天性表皮水疱症、円形脱毛症、白斑、尋常性白斑、視神経脊髄炎、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、多巣性運動ニューロパチー、サルコイドーシス、巨細胞性動脈炎、筋委縮性側索硬化症、原田病、自己免疫性視神経症、特発性無精子症、習慣性流産、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）、セリアック病、強直性脊椎炎、重症喘息、慢性蕁麻疹、移植免疫、家族性地中海熱、好酸球性副鼻腔炎、拡張型心筋症、全身性肥満細胞症または封入体筋炎である前項〔2-1〕記載の剤。

〔2-3〕 前項〔1〕～〔58〕の何れか一項から選択される PD-1 / CD3 二重特異性抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、移植片対宿主病（GVHD）の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

〔2-4〕 インスリン製剤（例えば、ヒトインスリン、インスリングルリン、インスリンリスプロ、インスリンデテミル、インスリンアスパルト等）、スルホニルウレア剤（例えば、グリベンクラミド、グリクラジド、グリメピリド等）、速攻型インスリン分泌促進薬（例えば、ナテグリニド等）、ビグアナイド製剤（例えば、メトホルミン等）、インスリン抵抗性改善薬（例えば、ピオグリタゾン等）、 α -グルコシダーゼ阻害薬（例えば、アカルボース、ボグリボース等）、糖尿病性神経症治療薬（例えば、エパルレスタット、メキシレチン、イミダプリル等）、GLP-1 アナログ製剤（例えば、リラグルチド、エクセナチド、リキシセナチド等）および DPP-4 阻害剤（例えば、シタグリプチン、ビルダグリプチン、アログリプチン等）から選択される何れか一以上の薬剤とともに投与されることを特徴とし、前項〔1〕～〔58〕の何れか一項から選択される PD-1 / CD3 二重特異性抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、1 型糖尿病の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

〔2-5〕 ステロイド薬（例えば、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、酢酸フルドロコルチゾン、プレドニゾロン、酢酸プレドニゾロン、コハク

酸プレドニゾロンナトリウム、ブチル酢酸プレドニゾロン、リン酸プレドニゾロンナトリウム、酢酸ハロプレドン、メチルプレドニゾロン、酢酸メチルプレドニゾロン、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、トリアムシノロン、酢酸トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、パルミチン酸デキサメタゾン、酢酸パラメタゾン、ベタメタゾン等)、インターフェロン $\beta-1a$ 、インターフェロン $\beta-1b$ 、酢酸グラチラマー、ミトキサントロン、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、クラドリビン、副腎皮質刺激ホルモン (ACTH)、コルチコトロピン、ミゾリビン、タクロリムス、フィンゴリモードおよびアレムツズマブから選択される何れか一以上の薬剤とともに投与されることを特徴とし、前項 [1] ~ [58] の何れか一項から選択される PD-1 / CD3 二重特異性抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、多発性硬化症の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

[2-6] ステロイド薬 (例えば、前項 [2-5] 記載のステロイド薬)、免疫抑制剤 (例えば、シクロスポリン、タクロリムス、フィンゴリモード等) およびベリムマブから選択される何れか一以上の薬剤とともに投与されることを特徴とし、前項 [1] ~ [58] の何れか一項から選択される PD-1 / CD3 二重特異性抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、全身性エリテマトーデスの予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

[2-7] ステロイド薬 (例えば、前項 [2-5] 記載のステロイド薬)、抗リウマチ薬 (例えば、メトトレキサート、スルファサラジン、ブシラミン、レフルノミド、ミゾリビン、タクロリムス等)、抗サイトカイン薬 (例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、トシリズマブ、エタネルセプト、ゴリムマブ、セルトリズマブ) およびアバタセプトから選択される何れか一以上の薬剤とともに投与されることを特徴とし、前項 [1] ~ [58] の何れか一項から選択される PD-1 / CD3 二重特異性抗体またはその抗体断片

片を有効成分として含む、関節リウマチの予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

〔2-8〕 前項〔2-4〕～〔2-7〕において挙げられる何れか一以上の薬剤とともに投与されることを特徴とし、前項〔1〕～〔58〕の何れか一項から選択されるPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片を有効成分として含む、自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

〔2-9〕 前項〔2-4〕～〔2-7〕において挙げられる何れか一以上の薬剤を投与される患者に投与されることを特徴とする、前項〔2-4〕～〔2-8〕記載の各疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

〔2-10〕 前項〔2-4〕～〔2-7〕において挙げられる何れか一以上の薬剤の投与後に投与されることを特徴とする、前項〔2-4〕～〔2-8〕記載の各疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

〔2-11〕 前項〔2-4〕～〔2-7〕において挙げられる何れか一以上の薬剤の投与前に投与されることを特徴とする、前項〔2-4〕～〔2-8〕記載の各疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。

〔3-1〕 前項〔1〕～〔58〕の何れか一項から選択されるPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片および薬学的に許容できる担体を含む、静脈内注射用製剤。

〔3-2〕 自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療のための前項〔3-1〕記載の静脈内注射用製剤。

〔3-3〕 点滴用である、前項〔3-1〕または〔3-2〕記載の静脈内注射用製剤。

〔4-1〕 前項〔1〕～〔58〕の何れか一項から選択されるPD-1／CD3二重特異性抗体を構成する、PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖をコードする単離ポリヌクレオチドまたはその断片。

〔4-2〕 前項〔1〕～〔58〕の何れか一項から選択されるPD-1／

CD3二重特異性抗体を構成する、PD-1に特異的に結合する第一アームのVHをコードする単離ポリヌクレオチドまたはその断片。

[4-3] PD-1に特異的に結合する第一アームのVHが、配列番号30～34から選択される配列からなるポリヌクレオチドによってコードされる、前項[4-1]または[4-2]記載の単離ポリヌクレオチドまたはその断片。

[4-4] 配列番号30～34から選択される配列からなるポリヌクレオチドを含む単離ポリヌクレオチドまたはその断片。

[5-1] 前項[4-1]～[4-4]の何れかに記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[6-1] 前項[5-1]記載の発現ベクターが導入され、あるいは同ベクターの導入によって形質転換された動物細胞。

[7-1] 前項[1]～[58]の何れか一項から選択されるPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片の有効量を患者に投与することからなる、自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および/または治療方法。

[8-1] 自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および/または治療に使用される、前項[1]～[58]の何れか一項から選択されるPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[9-1] 自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および/または治療のための医薬の製造における、前項[1]～[58]の何れか一項から選択されるPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片の使用。

[10-1] 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなるVH、ならびに配列番号25のアミノ酸配列からなるVLを有する、PD-1に特異的に結合する抗体のPD-1への結合に交差競合する、単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

[10-2] 単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片であ

って、当該抗体またはその抗体断片のPD-1への結合が、配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなるVHならびに配列番号25のアミノ酸配列からなるVLを有する、PD-1に特異的に結合する抗体によって交差競合される、当該抗体またはその抗体断片。

[10-3] (A) (a) 配列番号6のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、

(b) 配列番号7のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および

(c) 配列番号8のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有するVH、

(B) (a) 配列番号9のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、

(b) 配列番号10のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および

(c) 配列番号11のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有するVH、

(C) (a) 配列番号12のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、

(b) 配列番号13のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および

(c) 配列番号14のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有するVH、

(D) (a) 配列番号15のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、

(b) 配列番号16のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および

(c) 配列番号17のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有するVH、
および

(E) (a) 配列番号18のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、

(b) 配列番号19のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および

(c) 配列番号20のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有するVH、
から選択される何れか一つのVHを有し、

(a) 配列番号26のアミノ酸配列からなるVL-CDR1、

(b) 配列番号27のアミノ酸配列からなるVL-CDR2および

(c) 配列番号28のアミノ酸配列からなるVL-CDR3を有するVLを
有する、単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

[10-4] VH-CDR1、VH-CDR2およびVH-CDR3の何

れか一つまたは複数のCDRにおいて、その任意の1～5個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、保存的アミノ酸）に置換されていてもよい、前項[10-3]記載の単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

[10-5] 配列番号1、配列番号2、配列番号3、配列番号4および配列番号5から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなるVH、または当該VHのアミノ酸配列と少なくとも80%、90%、95%、98%もしくは99%同一なアミノ酸配列からなるVHならびに配列番号25のアミノ酸配列からなるVLを有する、前項[10-3]または[10-4]記載の単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

[10-6] PD-1が、ヒトPD-1である、前項[10-1]～[10-5]の何れか一項記載の単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

[10-7] 抗PD-1抗体が、IgG抗体である前項[10-1]～[10-6]の何れか一項記載の単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

[10-8] 前項[10-7]記載のIgG抗体が、IgG₁抗体またはIgG₄抗体である前項[10-7]記載の単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

[10-9] 前項[10-7]記載のIgG抗体が、IgG₁抗体である前項[10-7]記載の単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

[10-10] 前項[10-7]記載のIgG抗体が、IgG₄抗体である前項[10-7]記載の単離抗PD-1モノクローナル抗体またはその抗体断片。

発明の効果

[0012] 本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体は、サイトカインの産生誘導が低減されているため、投与後のインフュージョン・リアクションあるいはサ

イトカイン放出症候群の発現が抑制され、また、PD-1 およびPD-L1 間の相互作用を許容し、自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療の効果の増強あるいは持続が期待できる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]共通軽鎖のVLおよび定常領域のアミノ酸配列を示す。

[図2]共通軽鎖のVLの各CDRのアミノ酸配列を示す。

[図3]生殖細胞系列型V遺伝子IGHV7-4-1およびIGHV3-33によって各々コードされるアミノ酸配列を示す。

[図4]PD-1に特異的に結合する抗体（以下、抗PD-1抗体と略記することがある。）各クローンのVHと、生殖細胞系列型遺伝子IGHV7-4-1およびJH6cとの配列アラインメントを示す。図中、各クローンのアミノ酸配列中の“-”は、対応する生殖細胞系列型遺伝子IGHV7-4-1あるいはJH6cのアミノ酸配列と同一であるアミノ酸を表わし、アミノ酸の略字が記載されている部分は、同生殖細胞系列型遺伝子のアミノ酸配列と相違するアミノ酸を表わす。

[図5]抗PD-1抗体各クローンのVHのアミノ酸配列を示す。

[図6]抗PD-1抗体各クローンのVH中の各CDRのアミノ酸配列を示す。

[図7]CD3に特異的に結合する抗体（以下、抗CD3抗体と略記することがある。）クローンCD3-2のVHのアミノ酸配列を示す。

[図8]抗CD3抗体クローンCD3-2のVH中の各CDRのアミノ酸配列を示す。

[図9]PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体の各重鎖定常領域のアミノ酸配列を示す。

[図10]W02005/118635に記載された抗CD3抗体クローン15C3のVHのアミノ酸配列を示す。なお、下線で示したアミノ酸は、クローンCD3-1の作製においてアラニンに変換される55番目のグリシンを表わす。

[図11]PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローンのPD-1およびCD3に対する結合活性を各々確認したBiacore測定結果を

示す。

[図12]PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローンのPD-1およびCD3への同時結合性を確認したフローサイトメトリーを示す。

[図13]PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローンのPD-1／PD-L1相互作用への影響を確認したフローサイトメトリーを示す。

[図14]活性化ヒトT細胞からのIFN- γ 産生に対するPD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローンの作用結果を示す。なお、図中の「Ctrl」はコントロール群を表わす。

[図15]実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスモデル（EAEモデル）におけるPD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローン（PD1-1（Bi）、PD1-2（Bi））の治療効果を示す。

[図16]実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスモデルにおけるPD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローン（PD1-3（Bi）、PD1-4（Bi））の治療効果を示す。

[図17]実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスモデルにおけるPD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローン（PD1-5（Bi）、PD1-6（Bi））の治療効果を示す。

[図18]ヒト末梢血単核細胞からのサイトカイン産生に対するPD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローンの作用結果を示す。

[図19]PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローンのPD-1への結合に対するPD1-5（Bi）の交差競合性を示す。

発明を実施するための形態

[0014] PD-1 (Programmed Cell Death-1) は、ヒトにおいては、GenBank登録番号NP_005009で示されるアミノ酸配列から成る膜型タンパク質である。本明細書において「PD-1」と記載される場合、特に限定しない限り、そのすべてのアイソフォーム、および本発明にかかる「PD-1に特異的に結合する第一アーム」のエピトープが保存された、それら改変体をも含むものとして使用される場合がある。本発明において

、PD-1として好ましくは、ヒトPD-1である。

[0015] CD3は、T細胞受容体と会合してT細胞受容体複合体を形成する膜型タンパク質である。本明細書において「CD3」と記載される場合、特に限定しない限り、そのサブタイプ(ϵ 、 δ 、 γ および ζ サブタイプ)、および本発明にかかる「CD3に特異的に結合する第二アーム」のエピトープが保存された、それら改変体をも含むものとして使用される場合がある。本発明において、CD3として好ましくはCD3 ϵ であり、また、ヒトCD3であり、より好ましくはヒトCD3 ϵ である。

[0016] 本明細書において「単離」とは、宿主細胞から抽出された、複数ないし無数の成分が含まれる夾雑物の中から同定、分離および／または精製されることにより、実質的に単一の純粋な成分となることを意味する。

[0017] 本明細書において「モノクローナル抗体」とは、同一の特定の抗原に対して結合する、実質的に均一である抗体集団から得られた抗体を意味する。

[0018] 本明細書において「二重特異性抗体」とは、二つの異なる抗原分子あるいはエピトープに対する結合特異性を一分子に備え持つ抗体を意味し、「二重特異性モノクローナル抗体」とは、さらに、実質的に均一である抗体集団から得られた二重特異性抗体を意味する。

[0019] 本発明は、PD-1およびCD3に各々特異的に結合することができる二重特異性抗体（本明細書において、PD-1／CD3二重特異性抗体と略記することがある。）に関する。本発明において、PD-1／CD3二重特異性抗体として好ましくは、PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体であり、より好ましくは、単離PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体であり、さらに好ましくは、単離ヒトPD-1／ヒトCD3二重特異性モノクローナル抗体である。ここで、「単離ヒトPD-1／ヒトCD3二重特異性モノクローナル抗体」とは、ヒトPD-1とヒトCD3に対する、単離された二重特異性モノクローナル抗体を意味する。

[0020] ここで、二重特異性抗体の形態には、例えば、ダイアボディ、二重特異性sc(Fv)₂、二重特異性ミニボディ、二重特異性F(ab')₂、二重特

異性ハイブリッド抗体、共有結合型ダイアボディ（二重特異性DART）、二重特異性（FvCys）₂、二重特異性F（ab'ージッパー）₂、二重特異性（Fvージッパー）₂、二重特異性三鎖抗体および二重特異性mAb²等がある。

- [0021] ダイアボディとは、異なる抗原を認識するVH、VL同士がペプチドリンカーで連結された一本鎖ペプチドの二量体である（Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1993), Vol. 90, No.14: p.6444-6448参照）。
- [0022] 二重特異性sc（Fv）₂とは、異なる抗原を認識する2つの抗体の2組のVH/VLがペプチドリンカーを介して連続する一本鎖の形態で産生されるよう改変された低分子化抗体である（J. Biological Chemistry (1994), Vol. 269: p.199-206参照）。
- [0023] 二重特異性F（ab'）₂とは、異なる2つの抗原を認識する抗体のFab'断片が、ジスルフィド結合等により共有結合した低分子化抗体である。
- [0024] 二重特異性ミニボディとは、各々異なる抗原を認識するscFvに抗体の定常領域CH3ドメインが連結されるよう改変された低分子抗体断片を、そのCH3ドメイン上のジスルフィド結合等によって共有結合した低分子化抗体である（Biochemistry (1992), Vol.31, No.6, p.1579-1584参照）。
- [0025] 二重特異性ハイブリッド抗体とは、異なる2つの抗原を認識する抗体の重鎖／軽鎖複合体がジスルフィド結合等によって共有結合したインタクトな抗体である。
- [0026] 本発明において、好ましい二重特異性抗体の形態としては、二重特異性ハイブリッド抗体である。
- [0027] 二重特異性ハイブリッド抗体は、例えば、ハイブリッドハイブリドーマ法（US4474893参照）で作製されたハイブリドーマから産生させることができる。また、異なる抗原を認識する抗体の重鎖および軽鎖を各々コードする計4種類のcDNAを哺乳動物細胞に共発現ならびに分泌させて製造することができる。
- [0028] 本発明において使用されるモノクローナル抗体は、ハイブリドーマ法（例

えば、KohlerおよびMilsteinら、Natur (1975), Vol. 256, p.495-97、Hon goら、Hybridoma (1995), Vol. 14, No. 3, p.253-260、Harlowら、Antibodi es: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), Vol. 2)およびHammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridom as, p.563-681(Elsevier, N.Y., 1981)参照)、組換えDNA法(例えば、US 4816567参照)、ファージディスプレイ方法(例えば、LadnerらのUS5223409 、US5403484およびUS5571698、DowerらのUS5427908およびUS5580717、McCaff ertyらのUS5969108およびUS6172197およびGriffithsらのUS5885793、US65214 04、US6544731、US6555313、US6582915およびUS6593081参照)で作製するこ とができる。

[0029] 抗体あるいはモノクローナル抗体は、ヒトに投与される場合には、その抗 原性を低減あるいは消失させるために、キメラ抗体、ヒト化抗体あるいは完 全ヒト型抗体の形態で作製することができる。

[0030] 「キメラ抗体」は、可変領域配列と定常領域配列が別々の哺乳動物に由来 する抗体を意味し、例えば、可変領域配列がマウス抗体に由来し、定常領域 配列がヒト抗体に由来するものがある。キメラ抗体は、上記のハイブリド ーマ法、組換えDNA法あるいはファージディスプレイ方法で単離された抗体 産生ハイブリドーマから、公知の手法により単離された抗体可変領域をコー ドする遺伝子を、公知の方法を用いて、ヒト由来の抗体定常領域をコードす る遺伝子に連結させ、作製することができる(例えば、CabillyらのUS481656 7参照)。

[0031] 「ヒト化抗体」とは、マウスのような別の哺乳動物の生殖細胞型に由来す る相補性決定領域(CDR)配列をヒトフレームワーク配列上に移植した抗 体を意味する。ヒト化抗体の場合も、上記方法で単離された抗体産生ハイブ リドーマから、公知の手法により単離された抗体CDR領域をコードする遺 伝子を、公知の方法を用いて、ヒト由来の抗体フレームワーク領域をコード する遺伝子に連結させ、作製することができる(例えば、WinterのUS5225539 およびUS5530101、QueenらのUS5585089号およびUS6180370参照)。

[0032] 「ヒト抗体」または「完全ヒト型抗体」とは、フレームワーク領域およびCDR領域からなる可変領域ならびに定常領域の両方ともにヒト生殖細胞型免疫グロブリン配列に由来する抗体を意味する。本発明において使用されるヒト抗体は、ヒト抗体を産生するように形質転換されたマウス、例えば、H u m a b マウス（例えば、LonbergとKayらによるUS5545806、US5569825、US5625126、US5633425、US5789650、US5877397、US5661016、US5814318、US5874299およびUS5770429参照）、K M マウス（例えば、IshidaらのW02002/43478参照）、X e n o マウス（例えば、US5939598、US6075181、US6114598、US6150584およびUS6162963参照）またはT c マウス（例えば、Tomizukaら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (2000), p.722-727参照）を用いた方法で作製することができる。また、免疫によりヒト抗体応答が起こるように、ヒト免疫細胞を再構築したS C I D マウス（例えば、WilsonらのUS5476996およびUS5698767参照）を用いても調製できる。さらに、本発明において使用されるヒト抗体は、上記したファージディスプレイ方法でも作製することができる。

[0033] 本明細書において、P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体の「抗体断片」とは、全長抗体の一部であって、P D - 1 に対する抗原結合部分およびC D 3 に対する抗原結合部分を有する抗体であり、例えば、F (a b ')₂などが挙げられる。ここで、抗原結合部分とは、抗体がその抗原に結合することができる最少単位を意味し、例えば、V H およびV L にある各々3つずつのC D R とそれらC D R の組合せにより目的の抗原が認識できるようC D R を配置するフレームワーク領域から構成される。

[0034] 本明細書において、「共通軽鎖」とは、異なる2種以上の重鎖と会合し、各々の抗原に対して結合能を示し得る軽鎖を意味する(De Wildt RMら、J. Mol. Biol. (1999), Vol. 285, p.895-901、De Kruifら、J. Mol. Biol. (2009), Vol. 387, p.548-58、W02004/009618、W02009/157771およびW02014/051433)。そのような共通軽鎖として好ましくは、例えば、ヒトκ軽鎖I g V κ 1 - 3 9 * 0 1 / I G J κ 1 * 0 1 (I M G T データベースによる命名法) 生殖細胞系列型遺伝子によりコードされる軽鎖（以下、I G V K 1 - 3 9 / J

K 1 共通軽鎖と略記することがある。) であり、より好ましくは、例えば、配列番号 26 のアミノ酸配列からなる VL-CDR 1、配列番号 27 のアミノ酸配列からなる VL-CDR 2 および配列番号 28 のアミノ酸配列からなる VL-CDR 3 を含む VL を有する当該軽鎖、さらに好ましくは、例えば、配列番号 25 のアミノ酸配列からなる VL を有する当該軽鎖である。また、共通軽鎖の定常領域として好ましくは、配列番号 29 のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域が挙げられる。本発明において使用される共通軽鎖の VL および定常領域の各々アミノ酸配列を図 1 に示し、その可変領域の各 CDR のアミノ酸配列を図 2 に示す。

[0035] 本明細書において「アイソタイプ」とは、重鎖定常領域遺伝子によってコードされる抗体クラス（例えば、IgM または IgG）を称するものとして使用される。本発明の PD-1/CD3 二重特異性抗体として好ましいアイソタイプは、IgG であり、より好ましくは IgG₁ または IgG₄ である。ここで、IgG₁ としては、Fc 受容体への結合が消失あるいは減弱したものが好ましい。具体的には、その重鎖定常領域の任意のアミノ酸を置換、欠損あるいは挿入することによって、Fc 受容体への結合が消失あるいは減弱された IgG₁ 抗体を得ることができる。例えば、二重特異性抗体の各々二つの重鎖定常領域あるいはヒンジ領域上において、EU ナンバリングシステムによる 235 番目のロイシンがグリシンに置換され、および/または 236 番目のグリシンがアルギニンに置換された抗体が挙げられる。また、抗体の不均一性を低減させるために、C 末端のアミノ酸、例えば、EU ナンバリングシステムによる 447 番目のリシンを欠損した抗体が好ましい。さらに、二重特異性抗体が IgG₄ である場合、抗体分子内におけるスワッピングを抑制するように、その重鎖定常領域の任意のアミノ酸が置換、欠損あるいは挿入した改変体がより好ましい。例えば、ヒンジ領域に位置する、EU ナンバリングシステムによる 228 番目のセリンをプロリンに置換した抗体が好ましい。なお、本明細書において、抗体の可変領域の CDR とフレームワークに割り当てられるアミノ酸位置は K a b a t にしたがって規定される (Sequenc

es of Proteins of Immunological Interest (National Institute of Health, Bethesda, Md., (1987)および(1991)参照)。また、定常領域のアミノ酸はKabatのアミノ酸位置に準じたEUNANBARINGシステム (Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242参照) に従って表わされる。

[0036] 本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体のFc領域は、二つの異なる重鎖が会合し易いように、その領域の任意のアミノ酸が置換されていてもよい。好ましい態様としては、例えば、PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖上の定常領域のEUNANBARINGシステムによる351番目のロイシンがリシンに置換され、かつ366番目のスレオニンがリシンに置換され、CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖における定常領域中の351番目のロイシンがアスパラギン酸に置換され、かつ368番目のロイシンがグルタミン酸に置換されたPD-1/CD3二重特異性抗体が挙げられる。また、PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖における定常領域中のEUNANBARINGシステムによる351番目のロイシンがアスパラギン酸に置換され、かつ368番目のロイシンがグルタミン酸に置換され、CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖における定常領域中の351番目のロイシンがリシンに置換され、かつ366番目のスレオニンがリシンに置換されたPD-1/CD3二重特異性抗体も挙げられる。

[0037] PD-1に特異的に結合する第一アーム

本明細書において、「PD-1に特異的に結合する第一アーム」（以下、「第一アーム」と略記することがある。）は、抗体あるいは抗体断片の一部に含まれるか、あるいは一部ではなく、それ自体単体として存在するか否かにかかわらず、少なくとも、PD-1に特異的に結合する抗体（以下、抗PD-1抗体と略記することがある。）のVHを含み、PD-1に特異的に結合することができる抗体部分を意味し、例えば、このような第一アームは、抗PD-1抗体のVHおよび当該抗PD-1抗体を構成する共通軽鎖のVL

からなり、さらに、第一アームには、当該VHおよびVLを含む抗体のFab部も含まれる。ここで、「PD-1に特異的に結合する」とは、少なくとも、 1×10^{-5} M、好ましくは 1×10^{-7} M、より好ましくは 1×10^{-9} Mより高い親和性（解離定数（Kd値））を有する結合活性でPD-1に対して直接結合することができ、少なくとも、CD28、CTLA-4およびICOSなどの、所謂、CD28ファミリー受容体に属するほかの受容体メンバーには実質的に結合しない特徴として使用される。また、「PD-1に特異的に結合する抗体」あるいは「抗PD-1抗体」における「抗体」とは、全長抗体、すなわち、ジスルフィド結合で連結された2つの重鎖および2つの軽鎖からなる完全長の抗体を意味するが、好ましくは、そのモノクローナル抗体である。

- [0038] ここで、「PD-1に特異的に結合する第一アーム」としては、例えば、
- (a) HYJ¹LHで表されるアミノ酸配列〔配列中、J¹は、G（グリシン）またはA（アラニン）を表わし、ここで、J¹が表わす、あるいはその他のアルファベットは、各々アミノ酸の一文字略号を表わす。〕からなるVH-CDR1、
 - (b) WJ²NTNTU²NPTX²AQGFTGで表されるアミノ酸配列〔配列中、J²は、L（ロイシン）またはI（イソロイシン）を表わし、U²は、E（グルタミン酸）またはG（グリシン）を表わし、X²は、F（フェニルアラニン）またはY（チロシン）を表わし、ここで、J²、U²およびX²が各々表わす、あるいはその他のアルファベットは、各々上記と同じ意味を表わす。〕からなるVH-CDR2、ならびに
 - (c) GDJ³VVP T T I W N Y Y U³X³MZ³Vで表されるアミノ酸配列〔配列中、J³は、M（メチオニン）またはL（ロイシン）を表わし、U³は、H（ヒスチジン）またはY（チロシン）を表わし、X³は、F（フェニルアラニン）またはY（チロシン）を表わし、Z³は、D（アスパラギン酸）またはE（グルタミン酸）を表わし、ここで、J³、U³、X³およびZ³が各々表わす、あるいはその他のアルファベットは、各々上記と同じ意味を表わす。

] からなるVH-CDR3を有するVHを有するものが挙げられる。

[0039] ここで、好ましい「PD-1に特異的に結合する第一アーム」の態様としては、例えば、

(1a) そのVH-CDR1であるHYJ¹LH配列中のJ¹がG(グリシン)を表わし、そのVH-CDR2であるWJ²NTNTU²NPTX²AQGF TG配列中のJ²がL(ロイシン)を、U²がE(グルタミン酸)を、X²がF(フェニルアラニン)を各々表わし、そのVH-CDR3であるGDJ³VVP TTTIWNYYU³X³MZ³V配列中のJ³がM(メチオニン)を、U³がH(ヒスチジン)を、X³がF(フェニルアラニン)を、Z³がD(アスパラギン酸)を各々表わす、各々VH-CDRを有するVH、

(2a) そのVH-CDR1であるHYJ¹LH配列中のJ¹がG(グリシン)を表わし、そのVH-CDR2であるWJ²NTNTU²NPTX²AQGF TG配列中のJ²がI(イソロイシン)を、U²がG(グリシン)を、X²がY(チロシン)を各々表わし、そのVH-CDR3であるGDJ³VVP TTTIWNYYU³X³MZ³V配列中のJ³がL(ロイシン)を、U³がH(ヒスチジン)を、X³がY(チロシン)を、Z³がE(グルタミン酸)を各々表わす、各々VH-CDRを有するVH、

(3a) そのVH-CDR1であるHYJ¹LH配列中のJ¹がA(アラニン)を表わし、そのVH-CDR2であるWJ²NTNTU²NPTX²AQGF TG配列中のJ²がL(ロイシン)を、U²がE(グルタミン酸)を、X²がY(チロシン)を各々表わし、そのVH-CDR3であるGDJ³VVP TTTIWNYYU³X³MZ³V配列中のJ³がM(メチオニン)を、U³がY(チロシン)を、X³がY(チロシン)を、Z³はD(アスパラギン酸)を各々表わす、各々VH-CDRを有するVH、または

(4a) そのVH-CDR1であるHYJ¹LH配列中のJ¹がA(アラニン)を表わし、そのVH-CDR2であるWJ²NTNTU²NPTX²AQGF TG配列中のJ²がL(ロイシン)を、U²がE(グルタミン酸)を、X²がF(フェニルアラニン)を各々表わし、そのVH-CDR3であるGDJ³VV

P T T I W N Y Y U³ X³ M Z³ V配列中のJ³がM（メチオニン）を、U³がH（ヒスチジン）を、X³がF（フェニルアラニン）を、Z³がD（アスパラギン酸）を各々表わす、各々VH-CDRを有するVHを有するものが挙げられる。

[0040] また、「PD-1に特異的に結合する第一アーム」の別の態様として好ましくは、例えば、（1b）配列番号6のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、配列番号7のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および配列番号8のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を含むVH、

（2b）配列番号9のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、配列番号10のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および配列番号11のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を含むVH、

（3b）配列番号12のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、配列番号13のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および配列番号14のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を含むVH、

（4b）配列番号15のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、配列番号16のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および配列番号17のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を含むVH、ならびに

（5b）配列番号18のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、配列番号19のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および配列番号20のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を含むVHから選択される何れか一つのVHを有するものが挙げられる。

[0041] さらに、本発明における、「PD-1に特異的に結合する第一アーム」には、上記（1a）～（4a）または（1b）～（5b）から選択される何れか一つのVHにおける各々のVH-CDRにおいて、その任意の1～5個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、その保存的アミノ酸）に置換され、かつ、当該アミノ酸に置換されていない元の第一アームによるPD-1への結合活性と実質的に同等の結合活性を有するものも含まれる。例えば、VH-CDR1の場合には、1個のアミノ酸残基がその保存的アミノ酸に置

換され、VH-CDR2またはVH-CDR3の場合には、1また2個のアミノ酸残基がその保存的アミノ酸に置換されたものが挙げられる。ここで、保存的アミノ酸による置換は、類似する側鎖を有する残基の可換性を意味し、例えば、脂肪族側鎖を有するアミノ酸の群においては、グリシン、アラニン、バリン、ロイシンおよびイソロイシンであり、脂肪族ヒドロキシル側鎖を有するアミノ酸の群においては、セリンおよびトレオニンであり、アミド含有側鎖を有するアミノ酸の群においては、アスパラギンおよびグルタミンであり、芳香族側鎖を有するアミノ酸の群においては、フェニルアラニン、チロシンおよびトリプトファンであり、塩基性側鎖を有するアミノ酸の群においては、リシン、アルギニンおよびヒスチジンであり、硫黄含有側鎖を有するアミノ酸の群においては、システインおよびメチオニンである。好ましい保存的アミノ酸による置換の例としては、バリン、ロイシンおよびイソロイシン間での置換、フェニルアラニンおよびチロシン間での置換、リシンおよびアルギニン間での置換、アラニンおよびバリン間での置換ならびにアスパラギンおよびグルタミン間での置換が挙げられる。また、ここで、上記の「当該アミノ酸に置換されていない元の第一アームによるPD-1への結合活性と実質的に同等の結合活性を有する」とは、当該アミノ酸に置換された第一アームのPD-1への結合活性が、当該アミノ酸に置換されていない元の第一アームの結合活性の95%以上であり、好ましくは98%以上であり、より好ましくは99%以上であることを意味する。

[0042] さらに、本発明における「PD-1に特異的に結合する第一アーム」には、そのVHにおいて、上述の特定のアミノ酸配列を有する各VH-CDRを含み、そのVHのフレームワークのアミノ酸配列が、特定の生殖細胞系列型遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるVHを有するものも含まれる。例えば、上記(1a)～(4a)または(1b)～(5b)から選択される何れかで示されるVHは、生殖細胞系列型V遺伝子がIGHV7-4-1であって、生殖細胞系列型J遺伝子がJH6cであるVDJ組換遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコー

ドされ得る。ここで、生殖細胞系列型のV遺伝子IGHV7-4-1によって各々コードされるアミノ酸配列は、配列番号21のアミノ酸配列に対応する(図3)。

[0043] 本発明のPD-1に特異的に結合する第一アームのVHのフレームワークは、生殖細胞系列型のVDJ組換え遺伝子が体細胞突然変異を受けた当該遺伝子によってコードされる場合がある。例えば、生殖細胞系列型V遺伝子がIGHV7-4-1である、上記(1a)～(4a)または(1b)～(5b)から選択される何れかで示されるVHのFR1、FR2、FR3は、図4に示すアミノ酸位置において、IGHV7-4-1遺伝子がコードするアミノ酸配列と相違するため、当該各位置において体細胞突然変異を受けている。例えば、FR1領域については、配列番号21のアミノ酸配列中の位置13のリシンがグルタミンに、位置16のアラニンがバリンに、または位置19のリシンがメチオニンに各々置換されるか、あるいはそれらの任意の複数の組み合わせで置換されていてもよい。FR2領域については、配列番号21のアミノ酸配列中の位置37のバリンをロイシンに置換されてもよい。FR3領域については、配列番号21のアミノ酸配列中の位置77のセリンがスレオニンに、位置84のシステインがセリンもしくはアスパラギンに各々置換されるか、あるいは任意の複数の組み合わせで置換されてもよい。また、上記(1a)～(4a)または(1b)～(5b)から選択される何れかで示されるVHのFR4領域については、J遺伝子JH6cに由来するFR4領域アミノ酸配列(Trp-Gly-Lys-Gly-Thr-Thr*-Val-Thr-Val-Ser-Ser)(配列番号41)中のリシン(Lys)がグルタミンもしくはアスパラギンに、および/または*印のスレオニン(Thr)がロイシンに置換されていてもよい。上記何れかのアミノ酸置換の組み合わせを有する各々FR1、FR2、FR3およびFR4も、PD-1に特異的に結合する第一アームの機能に実質的な影響を与えず、フレームワークとして使用することができる。

[0044] さらに、本発明における「PD-1に特異的に結合する第一アーム」には

、上述の特定のアミノ酸配列を有する各CDRを含み、かつ、そのVHのFRのアミノ酸配列が、特定の生殖細胞系列型遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるものも含まれる。例えば、そのような第一アームとして、配列番号1～5から選択されるアミノ酸配列からなるVHを有するものが挙げられる。

[0045] さらに、そのような「PD-1に特異的に結合する第一アーム」には、例えば、配列番号1～5から選択される何れか一つのアミノ酸配列と少なくとも80%同一であり、好ましくは少なくとも90%同一であり、より好ましくは少なくとも95%同一であり、さらに好ましくは少なくとも98%同一であり、さらにより好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列からなるVHを有し、かつ、元の第一アームのVHのアミノ酸配列との相違がPD-1への結合活性に実質的に影響しないもの（以下、相同第一アームと略記することがある。）も含まれる。ここで、アミノ酸配列に関する同一性の比較において使用される「%同一」とは、2つの配列を整列させ、参照するアミノ酸配列（ここで、最大のパーセントの同一性を達成するために必要な場合には、ギャップを導入した後の参照するアミノ酸配列）と同一であるアミノ酸配列の百分率と定義される。また、ここで、「元の第一アームのVHのアミノ酸配列との相違がPD-1への結合活性に実質的に影響しない」とは、相同第一アームのPD-1への結合活性が元の第一アームの当該結合活性の95%以上であり、好ましくは98%以上であり、より好ましくは99%以上であることを意味する。

[0046] さらに別の態様において、本発明における「PD-1に特異的に結合する第一アーム」には、（1）上記（1a）～（4a）または（1b）～（5b）から選択される何れかで示されるVHあるいは配列番号1～5から選択されるアミノ酸配列からなるVHおよび共通軽鎖のVLを有する第一アームのPD-1への結合または（2）当該VHおよびVLからなるPD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体の可変領域のPD-1への結合に交差競合する抗PD-1抗体の可変領域（ここで、当該可変領域は、それを構成する

VHおよびVLを含む。)を有するものも含まれ、また、PD-1への結合が、(3)上記(1a)～(4a)または(1b)～(5b)から選択される何れかで示されるVHあるいは配列番号1～5から選択されるアミノ酸配列からなるVHおよび共通軽鎖のVLを有する第一アームまたは(4)当該VHおよびVLからなるPD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体の可変領域により交差競合される抗PD-1抗体の可変領域を有するものも含まれる。ここで、「PD-1への結合に交差競合する」とは、本明細書において例示された第一アームと同一のあるいは一部重複するエピトープに結合することによって、当該第一アームのPD-1への結合をその程度に関わらず阻害する、あるいは当該例示された第一アームと同一のあるいは一部重複するエピトープに結合する抗体によるPD-1への結合が、当該例示された第一アームによってその程度に関わらず阻害されることを意味し、交差競合するかどうかは競合結合アッセイによって評価することができる。例えば、ピアコア分析、ELISAアッセイ、フローサイトメトリー、酵素結合免疫吸着検定法(ELISA)、蛍光エネルギー転移測定法(FRET)や蛍光微量測定技術(FMAT(登録商標))を用いて判断することができる。

[0047] 例えば、上記(5b)に示されるVHおよび共通軽鎖のVLを有する第一アームによるPD-1への結合に交差競合するものとして、例えば、上記(1b)～(4b)から選択される何れかで示されるVHおよび共通軽鎖のVL(好ましくは、配列番号26のアミノ酸配列からなるVL-CDR1、配列番号27のアミノ酸配列からなるVL-CDR2および配列番号28のアミノ酸配列からなるVL-CDR3を有するVL)を有する第一アーム、さらには、配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列からなるVHおよび共通軽鎖のVL(好ましくは、配列番号25のアミノ酸配列からなるVL)を有する第一アームが挙げられる。

[0048] また、例えば、上記(1b)～(4b)から選択される何れかで示されるVHあるいは配列番号1～4から選択されるアミノ酸配列からなるVHおよび共通軽鎖のVLを有する第一アームによるPD-1への結合に交差競合す

るものとして、例えば、上記（５ｂ）に示されるＶＨおよび共通軽鎖のＶＬ（好ましくは、配列番号２６のアミノ酸配列からなるＶＬ－ＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列からなるＶＬ－ＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列からなるＶＬ－ＣＤＲ３を有するＶＬ）を有する第一アーム、さらには、配列番号５のアミノ酸配列からなるＶＨおよび共通軽鎖のＶＬ（好ましくは、配列番号２５のアミノ酸配列からなるＶＬ）を有する第一アームが挙げられる。

[0049] ここで、本発明における「ＰＤ－１に特異的に結合する第一アーム」として好ましくは、上記（１ｂ）～（５ｂ）から選択される何れかで示されるＶＨを有する第一アームが挙げられ、さらに、この好ましい第一アームには、上述したように、そのＶＨの各ＣＤＲにおいて、その任意の１～５個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、その保存的アミノ酸）に置換され、かつ、そのアミノ酸置換がＰＤ－１への結合活性に実質的に影響しないものも含まれ、また、さらに、上述したように、ＶＨのフレームワークのアミノ酸配列が、生殖細胞系列型Ｖ遺伝子ＩＧＨＶ７－４－１もしくは同Ｊ遺伝子ＪＨ６ｃまたはそれらの体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるＶＨを有するものも含まれる。そして、当該第一アームとしてより好ましくは、配列番号１～５から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなるＶＨを有するものが挙げられる。

[0050] さらに、本発明における「ＰＤ－１に特異的に結合する第一アーム」は、共通軽鎖のＶＬを含むものが好ましく、そのような共通軽鎖として好ましくは、例えば、ＩＧＶＫ１－３９／ＪＫ１共通軽鎖であり、より好ましくは、例えば、配列番号２６のアミノ酸配列からなるＶＬ－ＣＤＲ１、配列番号２７のアミノ酸配列からなるＶＬ－ＣＤＲ２および配列番号２８のアミノ酸配列からなるＶＬ－ＣＤＲ３を含むＶＬを有する軽鎖であり、さらに好ましくは、例えば、配列番号２５のアミノ酸配列からなるＶＬを有する軽鎖である。また、共通軽鎖の定常領域として好ましくは、配列番号２９のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域が挙げられる。

[0051] また、「PD-1 に特異的に結合する第一アーム」は、PD-1 およびPD-L1 との相互作用、PD-1 およびPD-L2 との相互作用、またはそれら両相互作用を許容するものがより好ましい。ここで、「PD-1 およびPD-L1 との相互作用、PD-1 およびPD-L2 との相互作用、またはそれら両相互作用を許容する」とは、本発明のPD-1 /CD3 二重特異性抗体が可溶性PD-L1 またはPD-L2 の濃度の20倍過剰に存在する状況下においても、当該PD-L1 とPD-1 との相互作用、当該PD-L2 とPD-1 との相互作用、またはそれら両相互作用が、本発明のPD-1 /CD3 二重特異性抗体が存在しない時の当該相互作用に比べて50%以上維持され、好ましくは70%以上維持され、より好ましくは80%以上維持されることを意味する。また、「PD-1 およびPD-L1 との相互作用、PD-1 およびPD-L2 との相互作用、またはそれら両相互作用を許容する」という定義は、「PD-1 およびPD-L1 との相互作用、PD-1 およびPD-L2 との相互作用、またはそれら両相互作用を実質的に阻害しない」という意味と同義で使用されることがある。

[0052] 本発明のPD-1 /CD3 二重特異性抗体を構築するために取得された抗PD-1 モノクローナル抗体の各クローンと、それらのVHのアミノ酸配列およびその配列番号との対応関係を図5に、ならびに当該抗PD-1 モノクローナル抗体の各クローンのVH中の各CDRのアミノ酸配列とその配列番号との対応関係を図6に示す。

[0053] CD3 に特異的に結合する第二アーム

本明細書において、「CD3 に特異的に結合する第二アーム」（以下、「第二アーム」と略記することがある。）とは、抗体あるいは抗体断片の一部に含まれるか、あるいは一部ではなく、それ自体単体として存在するか否かにかかわらず、少なくとも、CD3 に特異的に結合する抗体（以下、抗CD3 抗体と略記することがある。）のVHを含み、CD3 に特異的に結合することができる抗体部分を意味し、例えば、そのような第二アームは、抗CD3 抗体のVHおよび当該抗CD3 抗体を構成する共通軽鎖のVLからなり、

さらに、第二アームには、当該VHおよびVLを含む抗体のFab部も含まれる。ここで、「CD3に特異的に結合する」とは、少なくとも、 1×10^{-5} M、好ましくは 1×10^{-7} M、より好ましくは 1×10^{-9} Mより高い親和性（解離定数（Kd値））を有する結合活性でCD3に対して直接結合することができ、他のタンパク質には実質的に結合しない特徴として使用される。また、「CD3に特異的に結合する抗体」あるいは「抗CD3抗体」における「抗体」とは、全長抗体、すなわち、ジスルフィド結合で連結された2つの重鎖および2つの軽鎖からなる完全長の抗体を意味するが、好ましくは、そのモノクローナル抗体である。

[0054] ここで、そのような「CD3に特異的に結合する第二アーム」としては、例えば、

（1c）配列番号37のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、配列番号38のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および配列番号39のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を含むVHを有するものが挙げられる。

[0055] さらに、本発明における、「CD3に特異的に結合する第二アーム」には、上記（1c）のVHにおける各々のCDRにおいて、その任意の1～5個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、その保存的アミノ酸）に置換され、かつ、当該アミノ酸に置換されていない元の第二アームによるCD3への結合活性と実質的に同等の結合活性を有するものも含まれる。例えば、CDR1の場合には、1個のアミノ酸残基がその保存的アミノ酸に置換され、CDR2またはCDR3の場合には、1または2個のアミノ酸残基がその保存的アミノ酸に置換されたものが挙げられる。ここで、「当該アミノ酸に置換されていない元の第二アームによるCD3への結合活性と実質的に同等の結合活性を有する」とは、当該アミノ酸置換された第二アームのCD3への結合活性が、当該アミノ酸に置換されていない元の第二アームの結合活性の95%以上であり、好ましくは98%以上であり、より好ましくは99%以上であることを意味する。なお、第二アームの各VH-CDRにおける「保存的アミノ酸による置換」には、例えば、上述の第一アームにおけるアミ

ノ酸置換の例が挙げられる。

[0056] さらに、本発明における、「CD3に特異的に結合する第二アーム」には、そのVHにおいて、上述の特定のアミノ酸配列を有する各CDRを含み、そのVHのFRのアミノ酸配列が、特定の生殖細胞系列型遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるVHを有するものも含まれる。例えば、上記(1c)のVHは、生殖細胞系列型V遺伝子がIGHV3-33であるVDJ組換え遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされる。ここで、生殖細胞系列型のV遺伝子IGHV3-33によってコードされるアミノ酸配列(配列番号22)を図3に示す。

[0057] さらに、本発明における「CD3に特異的に結合する第二アーム」には、上述の特定のアミノ酸配列を有する各CDRを含み、かつ、そのVHのFRのアミノ酸配列が、特定の生殖細胞系列型遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるVHを有するものも含まれる。例えば、そのような第二アームとして、配列番号36のアミノ酸配列からなるVHを有するものが挙げられる。

[0058] さらに、そのような「CD3に特異的に結合する第二アーム」には、例えば、配列番号36のアミノ酸配列と少なくとも80%同一であり、好ましくは少なくとも90%同一であり、より好ましくは少なくとも95%同一であり、さらに好ましくは少なくとも98%同一であり、さらにより好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列からなるVHを有し、かつ、元の第二アームのVHのアミノ酸配列との相違がCD3への結合活性に実質的に影響しないもの(以下、相同第二アームと略記することがある。)も含まれる。ここで、「元の第二アームのVHのアミノ酸配列との相違がCD3への結合活性に実質的に影響しない」とは、相同第二アームのCD3への結合活性が元の第二アームの当該結合活性の95%以上であり、好ましくは98%以上であり、より好ましくは99%以上であることを意味する。

[0059] さらに別の態様において、本発明における「CD3に特異的に結合する第二アーム」には、(1)上記(1c)で示されるVHまたは配列番号36の

アミノ酸配列からなるVHおよび共有軽鎖のVLを有する第二アームのCD3への結合または(2)当該VHおよびVLからなるCD3に特異的に結合するモノクローナル抗体の可変領域のCD3への結合に交差競合する抗CD3抗体の可変領域(ここで、当該可変領域は、それを構成するVHおよびVLを含む。)を有するものも含まれる。ここで、「CD3への結合において交差競合する」とは、本明細書において例示された第二アームと同一のあるいは一部重複するエピトープに結合することによって、当該第二アームのCD3への結合を、その程度に関わらず阻害することを意味する。ここで、交差競合するかどうかは、「PD-1に特異的に結合する第一アーム」に関する説明において記載された方法に準じて、同様に測定することができる。

[0060] ここで、本発明における「CD3に特異的に結合する第二アーム」として好ましくは、上記(1c)で示されるVHを有する第二アームが挙げられ、さらに、この好ましい第二アームには、上述したように、そのVHの各CDRにおいて、その任意の1～5個のアミノ酸残基が他のアミノ酸(好ましくは、その保存的アミノ酸)に置換され、かつ、そのアミノ酸置換がCD3への結合活性に実質的に影響しないものも含まれ、また、さらに、上述したように、VHのフレームワークのアミノ酸配列が、生殖細胞系列型遺伝子IGHV3-33もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるVHを有するものも含まれる。そして、当該第二アームとしてより好ましくは、配列番号36のアミノ酸配列からなるVHを有するものが挙げられる。

[0061] 以下に、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体を構築するための抗CD3抗体の各クローンと、それらのVHのアミノ酸配列およびその配列番号との対応関係を図7に、ならびに当該抗CD3抗体の各クローンのVH中の各CDRのアミノ酸配列とその配列番号との対応関係を図8に示す。

[0062] 本発明における「CD3に特異的に結合する第二アーム」は、共通軽鎖のVLを含むものが好ましく、そのような共通軽鎖として好ましくは、例えば、IGVK1-39/JK1共通軽鎖であり、より好ましくは、例えば、配

列番号 26 のアミノ酸配列からなる VL-CDR1、配列番号 27 のアミノ酸配列からなる VL-CDR2 および配列番号 28 のアミノ酸配列からなる VL-CDR3 を含む VL を有する軽鎖であり、さらに好ましくは、例えば、配列番号 25 のアミノ酸配列からなる VL を有する軽鎖である。また、共通軽鎖の定常領域として好ましくは、配列番号 29 のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域が挙げられる。

[0063] 本発明における「CD3 に特異的に結合する第二アーム」として好ましくは、CD3 ϵ に特異的に結合するものが挙げられる。

[0064] 本発明の PD-1/CD3 二重特異性抗体として好ましいアイソタイプとしては IgG 抗体であり、さらに好ましくは、IgG₁ もしくは IgG₄ 抗体であり、さらに好ましくは IgG₁ 抗体である。

[0065] 本発明の PD-1/CD3 二重特異性抗体として好ましい態様としては、例えば、PD-1 に特異的に結合する第一アームが、

(A) 上記 (1a) ~ (4a) または (1b) ~ (5b) から選択される何れかで示される VH における、VH-CDR1、VH-CDR2 および VH-CDR3 から選択される何れか一つまたは複数の CDR において、各々その任意の 1 ~ 5 個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、その保存的アミノ酸）に置換されていてもよい VH、および

(B) 配列番号 26 のアミノ酸配列からなる VL-CDR1、配列番号 27 のアミノ酸配列からなる VL-CDR2 および配列番号 28 のアミノ酸配列からなる VL-CDR3 を含む共通軽鎖の VL を有し、ならびに CD3 に特異的に結合する第二アームが、

(C) 上記 (1c) で示される VH における、VH-CDR1、VH-CDR2 および VH-CDR3 から選択される何れか一つまたは複数の CDR において、各々その任意の 1 ~ 5 個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、保存的アミノ酸）に置換されていてもよい VH、および

(D) 配列番号 26 のアミノ酸配列からなる VL-CDR1、配列番号 27 のアミノ酸配列からなる VL-CDR2 および配列番号 28 のアミノ酸配列

からなるVL-CDR3を含む共通軽鎖のVLを有することを特徴とする、PD-1/CD3二重特異性抗体が挙げられる。

- [0066] より好ましくは、例えば、PD-1に特異的に結合する第一アームが、
- (A) 上記(1a)～(4a)または(1b)～(5b)から選択される何れか一つのVH、および
 - (B) 配列番号26のアミノ酸配列からなるVL-CDR1、配列番号27のアミノ酸配列からなるVL-CDR2および配列番号28のアミノ酸配列からなるVL-CDR3を含む共通軽鎖のVLを有し、ならびにCD3に特異的に結合する第二アームが、
 - (C) 上記(1c)で示されるVH、および
 - (D) 配列番号26のアミノ酸配列からなるVL-CDR1、配列番号27のアミノ酸配列からなるVL-CDR2および配列番号28のアミノ酸配列からなるVL-CDR3を含む共通軽鎖のVLを有することを特徴とする、PD-1/CD3二重特異性抗体が挙げられる。

- [0067] また、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体として好ましい別の態様としては、例えば、PD-1に特異的に結合する第一アームが、
- (A) 配列番号1～5から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなるVH、または当該VHのアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列からなるVH、および
 - (B) 配列番号25のアミノ酸配列からなる共通軽鎖のVLを有し、ならびに、
 - CD3に特異的に結合する第二アームが、
 - (C) 配列番号36のアミノ酸配列からなるVH、または当該VHのアミノ酸配列と少なくとも80%同一であるアミノ酸配列からなるVH、および
 - (D) 配列番号25のアミノ酸配列からなる共通軽鎖のVLを有することを特徴とする、PD-1/CD3二重特異性抗体が挙げられる。

- [0068] この別の態様としてより好ましくは、例えば、PD-1に特異的に結合する第一アームが、

(A) 配列番号 1 ～ 5 から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなる V_H、および

(B) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列からなる共通軽鎖の V_L を有し、ならびに、

C D 3 に特異的に結合する第二アームが、

(C) 配列番号 3 6 のアミノ酸配列からなる V_H、および

(D) 配列番号 2 5 のアミノ酸配列からなる共通軽鎖の V_L を有することを特徴とする、P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体が挙げられる。

[0069] 本発明の P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体のうち、同抗体が I g G₁ 抗体である場合には、各々二つの重鎖定常領域あるいはヒンジ領域上において、E U ナンバリングシステムによる 2 3 5 番目のロイシンがグリシンに置換され、および／または 2 3 6 番目のグリシンがアルギニンに置換された I g G₁ 抗体が好ましい。さらに、それら二重特異性抗体の重鎖 C 末端のアミノ酸、例えば、E U ナンバリングシステムによる 4 4 7 番目のリシンを欠損した抗体がより好ましい。また、P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体が I g G₄ 抗体である場合には、そのヒンジ領域に位置する、E U ナンバリングシステムによる 2 2 8 番目のセリンをプロリンに置換した抗体が好ましい。

[0070] さらに、これら P D - 1 / C D 3 二重特異性抗体が I g G₁ 抗体である場合に好ましい態様としては、P D - 1 に特異的に結合する第一アームの V_H を有する重鎖における定常領域中の E U ナンバリングシステムによる 3 5 1 番目のロイシンがリシンに置換され、かつ 3 6 6 番目のスレオニンがリシンに置換され、C D 3 に特異的に結合する第二アームの V_H を有する重鎖における定常領域中の 3 5 1 番目のロイシンがアスパラギン酸に置換され、かつ 3 6 8 番目のロイシンがグルタミン酸に置換された I g G₁ 抗体が挙げられる。また、P D - 1 に特異的に結合する第一アームの V_H を有する重鎖における定常領域中の E U ナンバリングシステムによる 3 5 1 番目のロイシンがアスパラギン酸に置換され、かつ 3 6 8 番目のロイシンがグルタミン酸に置換され、C D 3 に特異的に結合する第二アームの V_H を有する重鎖における定常

領域中の351番目のロイシンがリシンに置換され、かつ366番目のスレオニンがリシンに置換されたIgG₁抗体も同様に好ましい。

[0071] 重鎖定常領域における上記したすべてのアミノ酸置換を取り入れたPD-1/CD3二重特異性IgG₁抗体の好ましい態様としては、例えば、PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖が、配列番号23のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域を有し、CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖が、配列番号24のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域を有する抗体が挙げられる。それらのアミノ酸配列を図9に示す。

[0072] 本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体の態様として最も好ましくは、本明細書実施例8において作製された、クローンPD1-1(Bi)、クローンPD1-2(Bi)、クローンPD1-3(Bi)、クローンPD1-4(Bi)およびクローンPD1-5(Bi)である。

[0073] 本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体として好ましい特徴としては、(1)PD-1およびPD-L1との相互作用、PD-1およびPD-L2との相互作用、またはそれら両相互作用を許容する、および/または(2)サイトカイン産生が十分に低減されたものが挙げられる。ここで、「PD-1およびPD-L1との相互作用、PD-1およびPD-L2との相互作用、またはそれら両相互作用を許容する」とは、「PD-1に特異的に結合する第一アーム」に関する説明において記載された定義と同じ意味を表わす。一方、「サイトカイン産生が十分に低減された」とは、例えば、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体を点滴等により静脈内投与中、あるいは投与してから24時間以内において、例えば、血中あるいは組織中のIL-2、IFN- γ および/またはTNF- α を含むサイトカインの濃度が増加しないか、増加しても、ステロイド投与により抑制可能な程度であることを意味する。

[0074] PD-1/CD3二重特異性抗体の製造および精製方法

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体およびその抗体断片は、W02014/051433、W02013/157953あるいはW02013/157954に開示された方法でも製造す

ることができる。

[0075] 具体的には、(1) PD-1 に特異的に結合する第一アームの VH を有する重鎖をコードするポリヌクレオチド、(2) CD3 に特異的に結合する第二アームの VH を有する重鎖をコードするポリヌクレオチド、および(3) 共通軽鎖をコードするポリヌクレオチドが各々挿入された発現ベクターを、哺乳動物細胞に遺伝子導入して形質転換させ、両重鎖および共有軽鎖を共に発現ならびに分泌させて製造することができる。

[0076] ここで、本発明の PD-1 / CD3 二重特異性抗体を発現する宿主細胞は、発現ベクターを遺伝子導入でき、導入された発現ベクターを発現することができるいかなる宿主細胞でもよい。好ましくは、SF-9 および SF-21 細胞のような昆虫細胞、より好ましくは、CHO 細胞、BHK 細胞、SP2/O 細胞および NS-0 ミエローマ細胞を含むマウス細胞、COS および Vero 細胞のような霊長類細胞、MDCK 細胞、BRL 3A 細胞、ハイブリドーマ、腫瘍細胞、不死化した初代細胞、W138、HepG2、Hela、HEK293、HT1080 または PER.C6 のような胚性の網膜細胞等の哺乳類細胞が挙げられる。なお、発現システムの選択においては、抗体が適切にグリコシル化されるように、哺乳類の細胞の発現ベクターおよび宿主を用いることがある。ヒト細胞株、好ましくは PER.C6 は、ヒトにおけるグリコシル化パターンと一致する抗体を得るために有利に用いられる。

[0077] 発現ベクターの遺伝子導入によって形質転換された宿主細胞における蛋白質の産生は、例えば、Current Protocols in Protein Science (1995), Coligan JE, Dunn BM, Ploegh HL, Speicher DW, Wingfield PT, ISBN 0-471-11184-8, Bendig, 1988 を参考に実施することができ、さらに、宿主細胞の培養の生産性を最大にするための一般的な指針、手順および実用的な方法は、Mammalian Cell Biotechnology: a Practical Approach (M. Butler, ed., IRL Press, 1991) を参考に実施できる。宿主細胞での抗体の発現は、例えば、EP0120694、EP0314161、EP0481790、EP0523949、US4816567 および W02000/63403

などの公開公報に記述されている。

[0078] ここで、宿主細胞の培養条件は、公知の方法により最適化でき、蛋白質の生産量を最適化することができる。培養は、例えば、培養シャーレ、ローラーボトルもしくは反応槽の中で、バッチ培養、流加培養、連続培養、中空糸による培養で実施できる。細胞培養により、大規模かつ連続的な組み換えタンパク質の生産をするためには、細胞に懸濁液の中で増殖させることが好ましい。また、動物もしくはヒト由来血清または動物もしくはヒト由来の血清の構成要素がない条件下で細胞の培養をさせることが好ましい。

[0079] 宿主細胞で発現され、その細胞または細胞培地から公知の方法により回収された抗体は、公知の方法を用いて精製することができる。精製方法には、免疫沈降法、遠心分離法、ろ過、サイズ排除クロマトグラフィー、親和性クロマトグラフィー、陽イオンおよび／または陰イオン交換クロマトグラフィー、疎水性相互作用クロマトグラフィー等が含まれる。さらに、プロテイン A または プロテイン G 親和性クロマトグラフィーが好適に用いられる場合がある（例えば、US4801687 および US5151504 参照）。

[0080] 抗PD-1モノクローナル抗体

本発明は、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体を構築するための「PD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体」（以下、「抗PD-1モノクローナル抗体」と略記することがある。）およびそれらの抗体断片を含む。

[0081] 本発明の抗PD-1モノクローナル抗体の一態様としては、VHおよび本発明における共通軽鎖のVLが会合することによって、PD-1に特異的に結合することができるモノクローナル抗体である。ここで、「PD-1に特異的に結合する」とは、少なくとも、 1×10^{-5} M、好ましくは 1×10^{-7} M、より好ましくは 1×10^{-9} Mより高い親和性（解離定数（Kd値））を有する結合活性でPD-1に対して直接結合することができ、CD28、CTLA-4およびICOSなどの、所謂、CD28ファミリー受容体に属するほかの受容体メンバーには実質的に結合しない特徴として使用される。こ

ここで、「PD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体」における「抗体」とは、全長抗体、すなわち、ジスルフィド結合で連結された2つの重鎖および2つの軽鎖からなる完全長の抗体を意味する。また、「PD-1に特異的に結合するモノクローナル抗体の断片」とは、全長抗体の一部であって、少なくとも抗原結合部分を含む抗体であり、例えば、Fab、Fab'、Fv、scFvおよびF(ab')₂などが挙げられる。

[0082] 本発明の抗PD-1モノクローナル抗体としては、例えば、「PD-1に特異的に結合する第一アーム」のVHを構成する上記(1a)～(4a)もしくは(1b)～(5b)から選択される何れか一つのVHまたは配列番号1～5から選択されるアミノ酸配列からなるVHおよび本明細書における共通軽鎖のVLを有するものが挙げられる。

[0083] さらに、本発明の抗PD-1モノクローナル抗体には、上記(1a)～(4a)または(1b)～(5b)から選択される何れか一つのVHにおける各々のCDRにおいて、その任意の1～5個のアミノ酸残基が他のアミノ酸（好ましくは、保存的アミノ酸）に置換され、かつ、当該アミノ酸に置換されていない元のVHを有する抗PD-1モノクローナル抗体によるPD-1への結合活性と実質的に同等の結合活性を有するVHをもつものも含まれる。例えば、そのCDR1の場合には、1個のアミノ酸残基が保存的アミノ酸に置換され、CDR2またはCDR3の場合には、1また2個のアミノ酸残基が保存的アミノ酸に置換されたものが挙げられる。ここで、「当該アミノ酸に置換されていない元のVHを有する抗PD-1モノクローナル抗体によるPD-1への結合活性と実質的に同等の結合活性を有する」とは、当該アミノ酸に置換された抗PD-1モノクローナル抗体のPD-1への結合活性が、当該アミノ酸に置換されていない元のVHを有する抗PD-1モノクローナル抗体の結合活性の95%以上であり、好ましくは98%以上であり、より好ましくは99%以上であることを意味する。

[0084] さらに、本発明の抗PD-1モノクローナル抗体には、そのVHにおいて、上述の特定のアミノ酸配列を有する各CDRを含み、そのVHのフレーム

ワークのアミノ酸配列が、特定の生殖細胞系列型遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるVHを有するものも含まれ、例えば、上記の「PD-1に特異的に結合する第一アーム」に関する説明において挙げられた、特定の生殖細胞系列型遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされる特定のVHなどである。

[0085] さらに、本発明の抗PD-1モノクローナル抗体のうち、上記(1a)～(4a)または(1b)～(5b)から選択される何れか一つのVHにおける各々のCDRを含み、そのVHのFRのアミノ酸配列が、特定の生殖細胞系列型遺伝子もしくはその体細胞突然変異を受けた当該遺伝子にコードされるVHを有するものとしては、例えば、配列番号1～5から選択されるアミノ酸配列からなるVHを有するものが挙げられる。さらに、そのような抗PD-1モノクローナル抗体には、例えば、配列番号1～5から選択される何れか一つのアミノ酸配列と少なくとも80%同一であり、好ましくは少なくとも90%同一であり、より好ましくは少なくとも95%同一であり、さらに好ましくは少なくとも98%同一であり、さらにより好ましくは少なくとも99%同一であるアミノ酸配列からなるVHを有し、かつ、元のVHを有する抗PD-1モノクローナル抗体によるPD-1への結合活性と実質的に同等の結合活性を有するものも含まれる。ここで、「元のVHを有する抗PD-1モノクローナル抗体によるPD-1への結合活性と実質的に同等の結合活性を有する」とは、当該何れか一つのアミノ酸配列からなるVHを有する抗PD-1モノクローナル抗体のPD-1への結合活性の95%以上であり、好ましくは98%以上であり、より好ましくは99%以上であることを意味する。

[0086] さらに別の態様において、本発明の抗PD-1モノクローナル抗体には、上記(1a)～(4a)もしくは(1b)～(5b)から選択される何れか一つのVHまたは配列番号1～5から選択されるアミノ酸配列からなるVHを有する抗PD-1モノクローナル抗体のPD-1への結合に交差競合する抗PD-1モノクローナル抗体、ならびにPD-1への結合が上記(1a)

～（４a）もしくは（１b）～（５b）から選択される何れか一つのVHまたは配列番号１～５から選択される何れか一つのアミノ酸配列からなるVHを有する抗PD-1モノクローナル抗体により交差競合される抗PD-1モノクローナル抗体も含まれる。

[0087] 本発明の抗PD-1モノクローナル抗体の好ましい特徴としては、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体と同様に、PD-1およびPD-L1との相互作用、PD-1およびPD-L2との相互作用、またはそれら両相互作用を許容するものが挙げられる。

[0088] PD-1／CD3二重特異性抗体をコードするポリヌクレオチド

PD-1／CD3二重特異性抗体をコードするポリヌクレオチドは、（１）PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖をコードするポリヌクレオチド、（２）CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖をコードするポリヌクレオチド、および（３）共通軽鎖をコードするポリヌクレオチドから構成される。ここで、PD-1に特異的に結合する第一アームのVHを有する重鎖をコードするポリヌクレオチドは、PD-1に特異的に結合する第一アームのVHをコードするポリヌクレオチドおよび当該VHを有する重鎖の定常領域をコードするポリヌクレオチドから構成され、同様に、CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖をコードするポリヌクレオチドは、CD3に特異的に結合する第二アームのVHをコードするポリヌクレオチドおよび当該VHを有する重鎖の定常領域をコードするポリヌクレオチドから構成される。

[0089] PD-1／CD3二重特異性抗体をコードするポリヌクレオチドとは、これらPD-1／CD3二重特異性抗体を構成する部分を各々コードするポリヌクレオチドを有するものであればいかなるものであってもよく、ゲノムDNA、cDNA、合成DNA、RNA、DNA-RNAハイブリッドのいずれでもよい。一つのアミノ酸をコードするコドンは１～６種類知られており、例えば、PheにはTTTまたはTTC、LeuにはTTA、TTG、CTT、CTC、CTAまたはCTG、IleにはATT、ATCまたはAT

A、MetにはATG、ValにはGTT、GTC、GTAまたはGTG、SerにはTCT、TCC、TCAまたはTCG、ProにはCCT、CCC、CCAまたはCCG、ThrにはACT、ACC、ACAまたはACG、AlaにはGCT、GCC、GCAまたはGCG、TyrにはTATまたはTAC、HisにはCATまたはCAC、GlnにはCAAまたはCAG、AsnにはAATまたはAAC、LysにはAAAまたはAAG、AspにはGATまたはGAC、GluにはGAAまたはGAG、CysにはTGTまたはTGC、TrpにはTGG、ArgにはCGT、CGC、CGAまたはCGG、SerにはAGTまたはAGC、ArgにはAGAまたはAGG、およびGlyにはGGT、GGC、GGAまたはGGGが各々対応しているので、PD-1/CD3二重特異性抗体をコードするポリヌクレオチドには、各アミノ酸に対応する各コドンが任意に組み合わせられたポリヌクレオチドが含まれる。PD-1に特異的に結合する第一アームのVHをコードするポリヌクレオチドとして好ましくは、例えば、クローンPD1-1~PD1-5のVHを各々コードする配列番号30~34から選択される何れか一つの塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられ、CD3に特異的に結合する第二アームのVHをコードするポリヌクレオチドとして好ましくは、例えば、クローンCD3-2のVHをコードする配列番号40の塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。また、共通軽鎖の可変領域をコードするポリヌクレオチドとして好ましくは、配列番号35の塩基配列からなるポリヌクレオチドが挙げられる。

[0090] [医薬的用途]

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体は、自己免疫疾患または移植片対宿主病（GVHD）の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に有用である。

[0091] 本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体が予防、症状進展抑制および／または治療可能な自己免疫疾患としては、例えば、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス、慢性円板状エリテマトーデス、多発性硬化症（全身性強

皮症、進行性全身性硬化症）、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性動脈周囲炎（結節性多発動脈炎、顕微鏡的多発血管炎）、大動脈炎症候群（高安動脈炎）、悪性関節リウマチ、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、脊椎関節炎、混合性結合組織病、シェーグレン症候群、成人スティル病、血管炎、アレルギー性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、リウマトイド血管炎、大型血管炎、ANCA関連血管炎（例えば、多発血管炎性肉芽腫症および好酸球性多発血管炎性肉芽腫症）、コーガン症候群、RS3PE、側頭動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、線維筋痛症、抗リン脂質抗体症候群、好酸球性筋膜炎、IgG4関連疾患（例えば、原発性硬化性胆管炎、自己免疫性膵炎など）、ギラン・バレー症候群、重症筋無力症、慢性萎縮性胃炎、自己免疫性肝炎、非アルコール性脂肪肝炎、原発性胆汁性肝硬変、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、自己免疫性溶血性貧血、悪性貧血、自己免疫性好中球減少症、特発性血小板減少性紫斑病、バセドウ病（グレース病（甲状腺機能亢進症））、橋本病、自己免疫性副腎機能不全、原発性甲状腺機能低下症、アジソン病（慢性副腎皮質機能低下症）、特発性アジソン病、Ⅰ型糖尿病、緩徐進行性Ⅰ型糖尿病（成人潜在性自己免疫性糖尿病）、限局性強皮症、乾癬、乾癬性関節炎、水疱性類天疱瘡、天疱瘡、類天疱瘡、妊娠性疱疹、線状IgA水疱性皮膚症、後天性表皮水疱症、円形脱毛症、白斑、尋常性白斑、視神経脊髄炎、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、多巣性運動ニューロパチー、サルコイドーシス、巨細胞性動脈炎、筋委縮性側索硬化症、原田病、自己免疫性視神経症、特発性無精子症、習慣性流産、炎症性腸疾患（例えば、潰瘍性大腸炎、クローン病）、セリアック病、強直性脊椎炎、重症喘息、慢性蕁麻疹、移植免疫、家族性地中海熱、好酸球性副鼻腔炎、拡張型心筋症、全身性肥満細胞症および封入体筋炎などが挙げられる。

[0092] 本発明において「治療」とは、例えば、ある疾患もしくはその症状を治癒させることまたは改善させることを意味し、「予防」とは、ある疾患もしくはその症状の発現を未然に防止するあるいは一定期間遅延させることを意味し、「症状進展抑制」とは症状の進展または悪化を抑制して病態の進行を止める

ことを意味する。なお、「予防」の意味には再発抑制も含まれる。「再発抑制」とは、ある疾患もしくは症状の再発を防止または再発の可能性を低減させることを意味する。

[0093] 本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体は、通常、全身的または局所的に、非経口の形で投与される。かかる投与方法として、具体的には、注射投与、経鼻投与、経肺投与、経皮投与などが挙げられる。注射投与としては、例えば、静脈内注射、筋肉内注射、腹腔内注射などが挙げられ、静脈内注射の場合には、点滴による投与が好ましい。その投与量は、年齢、体重、症状、治療効果、投与方法、処理時間等により異なるが、通常、成人一人当たり、一回につき、 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ から $300 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲で、特に好ましくは、 $0.1 \text{mg}/\text{kg}$ から $10 \text{mg}/\text{kg}$ の範囲で、一日一回から数回非経口投与されるか、または一日1時間から24時間の範囲で静脈内に持続投与される。もちろん前記したように、投与量は種々の条件により変動するので、上記投与量より少ない量で十分な場合もあるし、また範囲を越えて投与の必要な場合もある。

[0094] 製剤

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体は、注射剤または点滴のための輸液として製剤化されて用いられる場合、当該注射剤または輸液は、水溶液、懸濁液または乳濁液のいずれの形態であってもよく、また、用時に溶剤を加えることにより、溶解、懸濁または乳濁して使用されるように、薬学的に許容できる担体とともに、固形剤として製剤化されていてもよい。注射剤または点滴のための輸液に使用される溶剤として、例えば、注射用蒸留水、生理食塩水、ブドウ糖溶液および等張液（例えば、塩化ナトリウム、塩化カリウム、グリセリン、マンニトール、ソルビトール、ホウ酸、ホウ砂、プロピレングリコール等の溶液）等を用いることができる。

[0095] ここで、薬学的に許容できる担体としては、例えば、安定剤、溶解補助剤、懸濁化剤、乳化剤、無痛化剤、緩衝剤、保存剤、防腐剤、pH調整剤および抗酸化剤等が挙げられる。安定剤としては、例えば、各種アミノ酸、アル

ブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、アスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ジブチルヒドロキシトルエン等を用いることができる。溶解補助剤としては、例えば、アルコール（例えば、エタノール等）、ポリアルコール（例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等）、非イオン性界面活性剤（例えば、ポリソルベート20（登録商標）、ポリソルベート80（登録商標）、HCO-50等）等を用いることができる。懸濁化剤としては、例えば、モノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。乳化剤としては、例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液等を用いることができる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等を用いることができる。防腐剤としては、例えば、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。pH調整剤としては、例えば、塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等を用いることができる。抗酸化剤として、例えば、（１）アスコルビン酸、システインヒドロクロライド、重硫酸ナトリウム、メタ重硫酸ナトリウム、亜硫酸ナトリウム等のような水溶性抗酸化剤、（２）アスコルビルパルミテート、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、レシチン、プロピルガレート、 α -トコフェロール等

のような油溶性抗酸化剤および（３）クエン酸、エチレンジアミン四酢酸、ソルビトール、酒石酸、リン酸等のような金属キレート剤等を用いることができる。

[0096] 注射剤または点滴のための輸液は、その最終工程において滅菌するかあるいは無菌操作法、例えば、フィルター等で濾過して滅菌し、次いで無菌的な容器に充填することによって製造することができる。また、注射剤または点滴のための輸液は、真空乾燥および凍結乾燥による無菌粉末（薬学的に許容できる担体の粉末を含んでいてもよい。）を、適切な溶剤に用時溶解して使用することもできる。

[0097] 併用または配合剤

さらに、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体は、自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に使用される他の薬剤とともに組み合わせて使用してもよい。本発明において、他の薬剤とともに組み合わせて使用する場合（併用）の投与形態には、１つの製剤中に両成分を配合した配合剤の形態であっても、また別々の製剤としての投与形態であってもよい。その併用により、その他の薬剤の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療効果を補完したり、投与量あるいは投与回数を維持ないし低減することができる。本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体と他の薬剤を別々に投与する場合には、一定期間同時投与し、その後、PD-1／CD3二重特異性抗体のみあるいは他の薬剤のみを投与してもよい。また、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体を先に投与し、その投与終了後に他の薬剤を投与してもよいし、他の薬剤を先に投与し、その投与終了後に本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体を後に投与してもよく、各々の投与方法は同じでも異なってもよい。本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体を含む製剤と他の薬剤を含む製剤のキットとして提供することもできる。ここで、他の薬剤の投与量は、臨床上用いられている用量を基準として適宜選択することができる。また、他の薬剤は任意の２種以上を適宜の割合で組み合わせて投与してもよい。また、前記他の薬剤には、現在までに見出され

ているものだけでなく今後見出されるものも含まれる。

[0098] 例えば、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体をI型糖尿病の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に適用する場合、インスリン製剤（例えば、ヒトインスリン、インスリングルルギン、インスリンリスプロ、インスリンデテミル、インスリンアスパルト等）、スルホニルウレア剤（例えば、グリベンクラミド、グリクラジド、グリメピリド等）、速攻型インスリン分泌促進薬（例えば、ナテグリニド等）、ビッグアニド製剤（例えば、メトホルミン等）、インスリン抵抗性改善薬（例えば、ピオグリタゾン等）、 α -グルコシダーゼ阻害薬（例えば、アカルボース、ボグリボース等）、糖尿病性神経症治療薬（例えば、エパルレスタット、メキシレチン、イミダプリル等）、GLP-1アナログ製剤（例えば、リラグルチド、エクセナチド、リキシセナチド等）およびDPP-4阻害剤（例えば、シタグリプチン、ビルダグリプチン、アログリプチン等）等から選択される何れか一以上の薬剤と組み合わせて使用してもよい。

[0099] また、例えば、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体を多発性硬化症の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に適用する場合、ステロイド薬（例えば、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、酢酸フルドロコルチゾン、プレドニゾロン、酢酸プレドニゾロン、コハク酸プレドニゾロンナトリウム、ブチル酢酸プレドニゾロン、リン酸プレドニゾロンナトリウム、酢酸ハロプレドン、メチルプレドニゾロン、酢酸メチルプレドニゾロン、コハク酸メチルプレドニゾロンナトリウム、トリアムシノロン、酢酸トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、パルミチン酸デキサメタゾン、酢酸パラメタゾン、ベタメタゾン等）、インターフェロン β -1a、インターフェロン β -1b、酢酸グラチラマー、ミトキサントロン、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、クラドリビン、副腎皮質刺激ホルモン（ACTH）、コルチコトロピン、ミゾリビン、

タクロリムス、フィンゴリモドおよびアレムツズマブ等から選択される何れか一以上の薬剤と組み合わせて使用してもよい。

[0100] また、例えば、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体を全身エリテマトーデスの予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に適用する場合、ステロイド薬（例えば、上記記載のステロイド薬）、免疫抑制剤（例えば、シクロスポリン、タクロリムス、フィンゴリモド等）およびベリムマブから選択される何れか一以上の薬剤と組み合わせて使用してもよい。

[0101] 例えば、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体を関節リウマチの予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に適用する場合、ステロイド薬（例えば、上記記載のステロイド薬）、抗リウマチ薬（例えば、メトトレキサート、スルファサラジン、ブシラミン、レフルノミド、ミゾリビン、タクロリムス等）あるいは抗サイトカイン薬（例えば、インフリキシマブ、アダリムマブ、トシリズマブ、エタネルセプト、ゴリムマブおよびセルトリズマブ等）およびアバタセプト等から選択される何れか一以上の薬剤と組み合わせて使用してもよい。

[0102] その他の自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に適用する場合、本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体と、上記に記載した他の薬剤の何れか一以上と組み合わせて使用してもよい。

[0103] 本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

実施例

[0104] 実施例1：組換えヒトPD-1－Fc融合タンパクを用いたMeMoマウスへの免疫

本発明のPD-1に特異的に結合する第一アームを取得する方法として、MeMoマウス（W02009/157771参照）に組換えヒトPD-1タンパク質を免疫する方法を選択した。MeMoマウスは、非組換えヒト重鎖V遺伝子領域、D遺伝子領域およびJ遺伝子領域ならびに組換えヒトκ軽鎖IgVκ1-39*

01 / I G J κ 1 * 01 生殖細胞系列型遺伝子を含む遺伝子断片が、マウス定常領域遺伝子に連結されるように遺伝子改変されたマウスであり、抗体の標的タンパクを直接免疫することによって、多様性を有する重鎖と共通軽鎖からなる抗体を産生させることができる。

[0105] 12～16週齢の12匹のMeMo MS5B/MS9マウスに、Gerbu adjuvant MM (Gerbu Biotechnik、型番#3001) を用いてエマルジョン化した、組換ヒトPD-1-Fc融合タンパク質 (R&D Systems、型番1086-PD) を14日間隔で各々免疫した。免疫0日目、14日目および28日目に同組換ヒトPD-1-Fc融合タンパク質を皮下投与し、以降のタイミングでは、PBSに溶解した同組換組換ヒトPD-1-Fc融合タンパク質を皮下投与した。免疫21日目、35日目、56日目、77日目および98日目にヒトPD-1強制発現HEK293T細胞株を用いたフローサイトメトリーにより、血清中抗体価を評価した。1000倍希釈した血清においてヒトPD-1強制発現HEK293T細胞株を染色した場合、コントロールとなるヒトPD-1非発現HEK293T細胞株と比較してMFI値が3倍以上増加したマウスのリンパ組織を、ファージディスプレイ・ライブラリーの構築に用いた。ライブラリー構築に進む基準を満たしたマウスは、抗体価の評価日から3日間、組換PD-1-Fc融合タンパク質で追加免疫し、脾臓およびそ径リンパ節を回収した。ヒトPD-1およびカニクイザルPD-1に対する血清中抗体価が1/100以上、かつ追加免疫によって抗体価が上昇しないマウスも同様の処置をしたのち、脾臓およびそ径リンパ節を回収した。それらのリンパ組織からRNAを抽出したのち、cDNA合成を行った。

[0106] 実施例2：PD-1に特異的に結合する第一アームを有する抗PD-1抗体取得のためのファージディスプレイ・ライブラリーの構築（タンパク免疫）

実施例1にて調製したDNAを使用して、イムノグロブリン重鎖可変領域ファミリーに特異的なプライマーを用いてPCR反応を行った。同PCR産物を制限酵素SfiIとXhoIで切断した後、同制限酵素を用いて切断

したMV1473ファージミドベクター〔共通軽鎖をコードする遺伝子（ヒトκ軽鎖IgVκ1-39*01/IgJκ1*01生殖細胞系列型遺伝子）を含む〕に挿入し、同ライブラリーを構築した。

[0107] 実施例3：PD-1に特異的に結合する第一アームを有する抗PD-1抗体のスクリーニング

ヒトPD-1-Fc融合タンパク質、ヒトPD-1-Hisタグ融合タンパク質、カニクイザルPD-1-Hisタグ融合タンパク質またはマウスPD-1-Hisタグ融合タンパク質をコートさせたプレートを用いて、PD-1への結合性に基づいたファージセレクションを実施した。ヒトPD-1-Fc融合タンパク質を用いた場合、ファージとインキュベーションする間、ヒトIgG（SIGMA、型番I4506）を添加することによって、Fc反応性クロンを吸収した。ヒトPD-1、カニクイザルPD-1およびマウスPD-1に結合する結合ファージが濃縮された。カニクイザルPD-1発現HEK293T細胞株でのセレクションにより、カニクイザルPD-1に結合するファージが濃縮された。セレクションによって得られたファージで形質転換させた大腸菌株TG1のクローンを取得し、マスタープレートを作製した。

[0108] さらに、ヒトPD-1-Fc融合タンパク質を吸着させたプレート上のPD-1への結合性に基づいて、上記セレクションから得られたクローンのペリプラズム抽出物から、ファージセレクションを実施した。なお、選択する基準として、陰性対照ウェル（PBS）で得られたシグナル（OD₄₅₀値）に対して、3倍以上のシグナルが得られたものを陽性クローンとした。

[0109] 実施例4：PD-1に特異的に結合する第一アームを有する抗PD-1抗体の候補クローンのDNAシーケンス

実施例3のスクリーニングによって取得された陽性クローンの重鎖可変領域遺伝子のDNAシーケンスを実施した。解析されたDNA配列はスーパークラスター（CDR3が同一の長さであって、CDR3のアミノ酸配列が70%以上相同である一群）とクラスター（重鎖CDR3のアミノ酸配列が

同一である一群)に分類した。924個のクローンが取得され、それらは146種のスーパークラスターおよび194種のクラスターに分類された。

[0110] 実施例5：PD-1発現細胞に対する結合性評価によるスクリーニング

分類された各々スーパークラスターから、以下の条件を満たす抗PD-1モノクローナル抗体クローンを選別し、単離した。

- (1) CDR領域に高頻度に体細胞突然変異が導入され、
- (2) 使用頻度の高いVHの生殖細胞系列型遺伝子を有し、および
- (3) ヒトPD-1-Fc融合タンパク質に対する結合性スクリーニングにおいて高いシグナルが得られた。

[0111] それらのペリプラズム抽出物に含まれるFabフラグメントを用いて、ヒトPD-1発現CHO-S細胞株、カニクイザルPD-1発現CHO-S細胞株に対する結合性を抗マウスIgGポリクローナル抗体で検出することにより評価した。評価した117個のクローン(105種のクラスター)のうち、抗PD-1モノクローナル抗体クローンPD1-1、PD1-2、PD1-3およびPD1-4を含む22個のクローンでヒトPD-1発現CHO-S細胞株に対する結合性が認められた。

[0112] 実施例6：PD-1に特異的に結合する第一アームを有する抗PD-1モノクローナル抗体のアミノ酸置換体の作製

クローンPD1-1およびPD1-4は、その重鎖可変領域のフレームワーク4に脱アミド化モチーフ(Asn-Gly)を含む。脱アミド化のリスクを低減した第一アームの取得を目的として、この脱アミド化モチーフを変換した変異体を作製した。クローンPD1-4のEUナンバリングシステムによる119番目のアスパラギン(Asn)が、公知の部位特異的変異法により、グルタミンとなるよう改変されたクローンPD1-5を作製し、単離した。同クローンもヒトPD-1発現CHO-S細胞に対する結合性はクローンPD1-4と同等であった。

[0113] 実施例7：CD3に特異的に結合する第二アームを有する抗CD3モノクローナル抗体のスクリーニング

W02005/118635に記載された抗CD3抗体クローン15C3のVHおよびIGVK1-39/JK1共通軽鎖からなる抗CD3抗体クローンに基づき、さらにより荷電不均一性が低減された安定なCD3結合Fabを取得すべく、下記の方法にて、本発明の「CD3に特異的に結合する第二アーム」を有する抗CD3抗体を取得した。

[0114] 図10に示す15C3のVHのアミノ酸配列中、下線で示される55番目グリシンをアラニンに変換することにより、前記抗CD3抗体クローンと同等のヒトCD3結合性を有し、かつ荷電不均一性が改善された抗CD3抗体クローンCD3-1を取得した。

[0115] さらに、共通軽鎖(IgVκ1-39*01/IGJκ1*01)とのVH/VL相互作用を改善させる複数のCD3結合Fabを得るために、クローンCD3-1のVHに基づいて、そのアミノ酸残基が置換されたクローンCD3-1のVH変異体からなるFabを複数発現するファージディスプレイ・ライブラリーを構築した。このファージライブラリーを、HBPA LL細胞または組換えヒトCD3ε-Fcタンパク質を用いて、スクリーニングを行った。組換えヒトCD3ε-Fcタンパク質に結合するファージを化学的に溶出させ、細菌の再感染に使用した。複数の生き残った細菌コロニーを摘出した後、ファージを抽出し、フローサイトメトリーによって細胞表面発現CD3への結合についてスクリーニングした。CD3結合を示したすべてのファージについて、コロニーPCRを行ってVHをコードするcDNAを増幅させ、そのDNA配列を決定した。

[0116] その結果取得された、配列番号36のアミノ酸配列からなるVHを有する抗CD3抗体クローンCD3-2は、クローンCD3-1と同等のCD3結合性および荷電均一性を示した。

[0117] 実施例8：PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体の調製

PD-1に特異的に結合する第一アームの各々の重鎖を発現する発現ベクターは、実施例5にて選択した抗PD-1モノクローナル抗体クローンPD1-1～PD1-5およびPD1-6の各々の重鎖可変領域をコードするD

NAを、IgG₁重鎖定常領域をコードするDNAに各々連結して作製した。一方、CD3に特異的に結合する第二アームの重鎖を発現する発現ベクターは、実施例7にて選択した抗CD3モノクローナル抗体クローンでCD3-2の重鎖可変領域をコードするDNAを、IgG₁重鎖定常領域をコードするDNAに連結して作製した。ここで、それらの重鎖定常領域を発現する遺伝子には、PD-1に特異的に結合する第一アームの場合には、L351D/L368E変異（DE変異）を有するFc領域を発現するものを使用し、CD3に特異的に結合する第二アームの場合には、L351K/T366K変異（KK変異）を有するFc領域を発現するものを使用した。これら発現ベクターには、IGVK1-39/JK1共通軽鎖もともに発現するように、これをコードする遺伝子を含むように構築された。さらに、これらの重鎖定常領域を発現する遺伝子には、各々、Fcエフェクター活性を消失させるため、重鎖定常領域の235番目ロイシンがグリシンに、236番目グリシンがアルギニンに置換されて発現するように改変されており、さらに、翻訳後のプロセッシングを回避するため、重鎖定常領域C末端447番目のリジンが欠失するよう改変されたものを使用した。これら発現ベクターを、ともに、Free Style 293F細胞に遺伝子導入し、培養上清中に抗体を産生させた。培養上清を回収し、プロテインAアフィニティークロマトグラフィーにて処理することにより、本発明のPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体である、クローンPD1-1（Bi）、クローンPD1-2（Bi）、クローンPD1-3（Bi）、クローンPD1-4（Bi）およびクローンPD1-5（Bi）を各々精製した。また、クローンPD1-6（Bi）についても、同様の方法にて作製された。なお、これらPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローンは、その作製において使用された抗PD-1モノクローナル抗体クローンPD1-1、PD1-2、PD1-3、PD1-4およびPD1-5ならびにPD1-6に由来する、PD-1に特異的に結合する第一アームを有する点において、それら抗PD-1モノクローナル抗体クローンに各々対応している。

[0118] 実施例 9 : PD-1 / CD3 二重特異性モノクローナル抗体の結合性評価

ヒト IgG1-Fc 融合ヒト PD-1 細胞外領域組換タンパク質または 6 × His タグ融合カニクイザル PD-1 細胞外領域組換タンパク質を用いた Biacore 測定にて、実施例 8 において取得した PD-1 / CD3 二重特異性モノクローナル抗体の第一アームの、各 PD-1 組換タンパク質への結合親和性を評価した。なお、当該組換タンパク質の固定化には、Series S Sensor Chip CM5 センサーチップ (GEヘルスケア、型番 29-1049-88) を使用した。同様に、ヒト IgG1-Fc 融合 CD3δ / CD3ε 細胞外領域組換タンパク質を用いた Biacore 測定にて、同抗体の第二アームの CD3 結合親和性を評価した。各クローンの第一アームの PD-1 への結合親和性 (Kd 値) ならびに第二アームの CD3δ / CD3ε への結合親和性を図 11 に示す。

[0119] 実施例 10 : PD-1 / CD3 二重特異性モノクローナル抗体の結合性確認

実施例 8 において取得した PD-1 / CD3 二重特異性モノクローナル抗体が PD-1 および CD3 に同時に各々特異的に結合することを確認した。

[0120] まず、ヒト CD3 を発現しているヒト PD-1 欠損 Jurkat 細胞株 (ヒト T 細胞株) に対して、クローン PD1-1 (Bi) ~ PD1-6 (Bi) を各々添加し、氷上にて 15 分間インキュベートした。細胞を洗浄した後、3 倍量のビオチン標識した可溶性 PD-1 組換タンパク質 (R&D systems、型番 1086-PD-050) を添加し、氷上にて 15 分間インキュベートした。細胞を洗浄した後、Alexa Fluor 488 標識ストレプトアビジン (BioLegend、型番 405235) 1.25 μg/mL を 100 μL 添加して氷上にて 15 分間インキュベートした。細胞を洗浄した後、フローサイトメトリーにて可溶性 PD-1 組換タンパク質の結合量を評価した。当該アッセイの結果を図 12 に示す。

[0121] いずれのクローンも PD-1 および CD3 に同時に結合した。なお、この実験系での非特異的結合は検出されなかった。

[0122] 実施例 11 : PD-1 / CD3 二重特異性モノクローナル抗体の第一アームの結合特性評価

実施例 8 において取得した PD-1 / CD3 二重特異性モノクローナル抗体の第一アームの PD-1 / PD-L1 結合への影響を評価するため、同二重特異性モノクローナル抗体クローンと可溶性 PD-L1 組換タンパク質の PD-1 への結合に関する競合結合アッセイを行った。まず、ヒト PD-1 発現 CHO-S 細胞株に対してクローン PD1-1 (Bi) ~ PD1-6 (Bi) を各々添加し、氷上にて 30 分間インキュベートした。さらに、1 / 20 量のビオチン標識した可溶性 PD-L1 組換タンパク質 (R&D systems, 型番 156-B7-100) を添加し、氷上にて 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄した後、PE 標識ストレプトアビジン (BD Pharmingen, 型番 554061) を添加して氷上にて 30 分間インキュベートした。細胞を洗浄した後、フローサイトメトリーにて可溶性 PD-L1 組換タンパク質の結合量を評価した。その結果を図 13 に示す。

[0123] クローン PD1-1 (Bi) ~ PD1-5 (Bi) は、可溶性 PD-L1 組換タンパク質に対して 20 倍量存在しているにも拘わらず、PD-1 に対する可溶性 PD-L1 組換タンパク質の結合を許容した。一方、PD1-6 (Bi) は、同条件で PD-1 に対する可溶性 PD-L1 組換タンパク質の結合を完全に阻害した。

[0124] 実施例 12 : PD-1 / CD3 二重特異性モノクローナル抗体の活性化 CD4 T 細胞に対する in vitro 抑制作用

健康人末梢血由来 CD4 陽性 T 細胞 (LONZA、型番 2W-200) (ヒト T 細胞) を用いて、活性化 T 細胞からの IFN- γ 産生に対する抑制作用を評価した。抗ヒト TCR V β 8 抗体 (Thermo Scientific, 型番 TCR1750) を固相化した細胞培養プレートにヒト T 細胞を播種し、抗ヒト CD28 抗体 (BioLegend、型番 302923) を添加して、72 時間、活性化処置を行った。次に、この活性化処置を行ったヒト T 細胞を 100 Units/mL ヒト IL-2 (R&D systems、型番 202-IL) を含む新鮮培地で一晩培養した。さらに、回収したヒト T 細胞を、抗ヒト TCR V β 8 抗体を固相化した別の細胞培養プレートに播種して、同様に抗ヒト CD28 抗体を添加し、再度、活性化処置を行っ

た。その際、クローンPD1-1 (Bi) ~ PD1-6 (Bi) を各々添加した後、再活性化処置96時間後の培養上清中に含まれるIFN- γ をELISA法にて定量 (pg/mL) した。その結果を図14に示す。クローンPD1-1 (Bi) ~ PD1-5 (Bi) について、IFN- γ 産生抑制作用が確認された。クローンPD1-6 (Bi) については、その抑制作用が他のクローンに比べ減弱している傾向が認められた。なお、コントロール抗体は、非特異的な抗体として、第一アームの取得法と同様の手法を用いて、破傷風トキソイドを免疫して取得した抗体を用いた。

[0125] 実施例13：PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体の実験的アレルギー性脳脊髄炎マウスモデル (EAEモデル) における *in vivo* 作用

CD3 ϵ およびPD-1の各遺伝子を、ヒトCD3 ϵ およびヒトPD-1遺伝子に各々置換したヒトCD3 ϵ /ヒトPD-1ノックインC57BL/6マウスを用いたEAEモデルにおいて、本発明のPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体の *in vivo* 作用を評価した。結核死菌H37Ra (BD Biosciences、型番231141) と不完全フロイントアジュバント (BD Biosciences、型番263910) を混合して、4mg/mLの結核死菌H37Raを含む完全フロイントアジュバント (CFA) を調製した。1mg/mLのMOGペプチド (ANASPEC、型番AS-60130) と等量のCFAを混合してエマルジョンを調製し、EAEモデルの惹起剤とした。200 μ Lの当該惹起剤を当該C57BL/6マウス尾根部に皮下投与し、その免疫処置当日および2日目に、各々200 μ Lの1 μ g/mL百日咳毒素 (SIGMA-ALDRICH、型番P7208) を尾静脈内投与した。次に、当該C57BL/6マウスに、クローンPD1-1 (Bi) ~ PD1-6 (Bi) を、免疫処置6日目および7日目に、各々2mg/kgの投与量で1日1回腹腔内投与した。免疫処置日以降、神経症状を大貫らの方法に準じて評価した (Onuki M, et al., Microsc Res Tech 2001;52:731-9.)。神経症状の程度をスコア化し (正常：スコア0；尾弛緩：スコア1；後肢部分麻痺：スコア2；後肢麻痺：スコア3；前肢麻痺

：4 および瀕死または死亡：スコア5）、複数の神経症状が認められる場合は高い値を評価日の神経症状スコアとして採用した。なお、死亡例は試験終了まで神経症状スコアを5とした。図15～17にその評価結果を示す。なお、ヒトCD3ε／ヒトPD-1ノックインC57BL／6マウスは、Genesis, 2009 Jun;47(6):414-22に記載された方法に準じて作製されたヒトCD3εノックインマウスおよびヒトPD-1ノックインマウスを、公知の方法により交配させることによって作製した。

[0126] クローンPD1-1 (Bi)～PD1-5 (Bi)は、EAEモデルにおいて神経症状の発症を顕著に抑制したが、クローンPD1-6 (Bi)は顕著な抑制効果を示さなかった。

[0127] 実施例14：ヒト末梢血単核細胞からのサイトカイン放出に対する、PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体のin vitro作用の評価

PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体のサイトカイン放出活性を解析することを目的として、本発明のPD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体クローンまたは特許文献3に開示されたPD-1／CD3二重特異性scDb (J110×UCHT1)のヒト末梢血単核細胞（以下、ヒトPBMC）への添加実験を行った。ヒトPBMC (LONZA、型番CC-2702)に、PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体の各クローンおよびJ110×UCHT1を各々30μg／mLおよび10μg／mLとなるよう添加し、24時間の培養を行った。培養24時間後の培養上清中に含まれるIL-2をマルチプレックスイムノアッセイ (BIO-RAD、型番M50000007A)にて定量した。その結果を図18に示す。なお、図中のIL-2産生量 (pg／mL)は、平均値±標準誤差 (N=3)で示した。

[0128] J110×UCHT1はIL-2産生を顕著に誘導したのに比べ、PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローンによるIL-2産生は低いものであった。

[0129] 実施例15：PD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クロンのPD-1への結合に対するPD1-5 (Bi)の交差競合性の評価

実施例8において取得したPD-1／CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローンPD1-1 (Bi)～PD1-5 (Bi)のPD-1への結合に対するPD1-5 (Bi)の交差競合性を評価するため、競合結合アッセイを行った。

[0130] まず、ヒトPD-1発現CHO-S細胞株に対してクローンPD1-5 (Bi)を添加し、氷上にて20分間インキュベートした。さらに、添加されたクローンPD1-5 (Bi)に対して1／100量のビオチン標識したクローンPD1-1 (Bi)～PD1-5 (Bi)を各々添加し、氷上にて20分間インキュベートした。細胞を洗浄した後、PE標識ストレプトアビジン (BD Pharmingen, 型番554061)を添加して氷上にて20分間インキュベートした。細胞を洗浄した後、フローサイトメトリーにてビオチン標識したクローンPD1-1 (Bi)～PD1-5 (Bi)の結合量を評価した。その結果を図19に示す。

[0131] PD1-5 (Bi)は、クローンPD1-1 (Bi)～PD1-4 (Bi)のPD-1への結合を阻害し、同クローンが、それらのPD-1への結合に対して交差競合することが示された。

産業上の利用可能性

[0132] 本発明のPD-1／CD3二重特異性抗体またはその抗体断片は、自己免疫疾患または移植片対宿主病 (GVHD)の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に有用である。