

明 細 書

発明の名称：

がん治療におけるPD-1シグナル阻害剤との組み合わせによるCLDN4-抗CD137二重特異性抗体の使用

技術分野

[0001] 本発明は、がん治療におけるPD-1シグナル阻害剤との組み合わせによるCLDN4-抗CD137二重特異性抗体の使用に関する。

背景技術

[0002] Claudin-4 (CLDN4) はクローディンファミリーに属する4回膜貫通タンパク質である。上皮細胞や内皮細胞に発現しており、タイトジャンクションを構成する主要分子として重要な役割を果たしている。CLDN4は大腸がん、膀胱がん、卵巣がん等のがん組織でも高発現が認められており、抗CLDN4抗体はがんの治療又は診断に応用できる可能性が示唆されている（特許文献1、非特許文献1）。さらに、動物モデルにおいて、抗CLDN4抗体と抗Epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体の併用による抗腫瘍効果が示されている（非特許文献2）。

[0003] Cluster of Differentiation 137 (CD137、別名4-1BB) は、Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily (TNFRSF) に属する分子であり、T細胞、B細胞、natural killer (NK) 細胞、樹状細胞、好酸球、マスト細胞等の免疫細胞表面に発現していることが報告されている。特に、T細胞上のCD137は抗原提示細胞上のCD137リガンドと結合し、共刺激分子としてT細胞の活性化と生存に関与していることが知られている（非特許文献3）。抗CD137アゴニスト抗体は、動物モデルにおいて腫瘍微小環境内の免疫細胞の活性化を介した抗腫瘍効果を示している（非特許文献4）。抗CD137アゴニスト抗体であるウレルマ

ブは臨床試験で治療効果を示したが、肝障害の副作用を引き起こすことも報告されている（非特許文献5）。

[0004] 低い抗体濃度でがん細胞選択的な細胞傷害活性を得ることができる画期的な方法として、種々の抗体フォーマットの二重特異性T細胞リクルート抗体（bispecific T-cell-recruiting antibodies）が報告されている。二重特異性T細胞リクルート抗体は、がん細胞表面に発現する腫瘍関連抗原（Tumor-Associated Antigens；TAA）に対する抗体と、T細胞に結合する抗体を含む二重特異性抗体であり、T細胞媒介性免疫療法に対するそれらの抗体の効果が検討されつつある（非特許文献6）。T細胞に結合する抗体として抗CD3抗体が多く用いられており、現在も種々のTAAに対する二重特異性T細胞リクルート抗体の研究開発がなされている。

[0005] さらに、近年では、CD137及びTAAに対する二重特異性T細胞リクルート抗体の研究も盛んに行われている。TAAであるGlypican3（GPC3）、Human Epidermal Growth Factor Receptor Type2（HER2）、Programmed Cell Death-Ligand1（PD-L1）、Fibroblast Activation Protein（FAP）を認識する抗GPC3-抗CD137二重特異性抗体、抗HER2-抗CD137二重特異性抗体、抗PD-L1-抗CD137二重特異性抗体、抗FAP-抗CD137二重特異性抗体等の研究がなされている（特許文献2及び3、非特許文献7～9）。

[0006] Programmed cell death-1（PD-1；PDCD1又はCD279とも呼ばれる）はイムノグロブリンスーパーファミリーに属する50～55kDaのI型膜貫通タンパク質である（非特許文献10）。PD-1はT細胞において活性化持続に伴い発現誘導されるが、リガンドであるProgrammed death-ligand 1（PD-L1；PDCD1LG1、B7-H1又はCD274とも呼ばれる）又はPro

grammed death-ligand 2 (PD-L2; PDCD1LG2、B7-DC又はCD273とも呼ばれる)に結合することにより、T細胞の活性化を抑制的に制御する(非特許文献11)。一般的に、このようなT細胞活性化制御機構は、免疫チェックポイントと呼ばれており、過剰な免疫応答を引き起こさないためのネガティブフィードバック機構の一つとして知られている。

[0007] がん発生初期において、T細胞等の免疫細胞は免疫監視機構による抗腫瘍免疫応答によってがんを排除する。一方、がんは、がん微小環境において直接的又は間接的に免疫細胞を抑制することにより免疫逃避機構を獲得している。直接的な活性化T細胞抑制機構として、PD-1/PD-L1又はPD-L2(以下「PD-1シグナル」)経路、CTLA-4/CD80又はCD86経路等の免疫チェックポイント機構が知られている。がんの腫瘍微小環境内において、T細胞でのPD-1の発現及び腫瘍でのPD-L1の発現が確認されており(非特許文献12)、このPD-1シグナルの活性化によりがんは免疫逃避を示すと考えられている。PD-1シグナルの阻害により、免疫逃避機構解除により抗腫瘍活性をもたらすことが複数のマウス担癌モデルで報告されている(非特許文献13~15)。さらに、PD-1シグナル阻害剤として、ニボルマブ、ペンブロリズマブ等の抗PD-1抗体等のPD-1シグナル阻害剤の開発が精力的に行われ、メラノーマ、肺がん、リンパ腫等で大きな成果をあげている。また、PD-1シグナル阻害剤としては、抗体以外にも核酸医薬・低分子薬等の研究も実施されている(非特許文献16)。

[0008] がん患者における治療の有効性を高めるために、複数のがん免疫薬の併用療法や、がん免疫薬と既存抗癌剤との併用試験が精力的に進められている(非特許文献17及び18)。例えば、抗PD-1抗体と他の免疫チェックポイント阻害抗体、抗がん剤、分子標的薬、放射線治療、がんワクチン、腫瘍溶解性ウイルスとの併用試験が実施されている。

しかしながら、現在までに、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体

とPD-1シグナル阻害剤の併用によるがんの治療方法は報告されていない。
。

先行技術文献

特許文献

[0009] 特許文献1：国際公開第2008/114733号

特許文献2：国際公開第2015/156268号

特許文献3：国際公開第2016/177802号

非特許文献

[0010] 非特許文献1：Cancer Science、2009：100（9）：p. 1623-1630

非特許文献2：Oncotarget、2018：9（100）：p. 37367-37378

非特許文献3：Cancer Science、2020：111（5）：p. 1461-1467

非特許文献4：Cancer Immunology Immunotherapy、2012：61（5）：p. 1721-1733

非特許文献5：Clinical Cancer Research、2017：23（8）：p. 1929-1936

非特許文献6：MAbs、2017：9（2）：p. 182-212

非特許文献7：Clinical Cancer Research、2019：25（19）：p. 5878-5889

非特許文献8：Clinical Cancer Research、2020：26（15）：p. 4154-4167

非特許文献9：Journal for Immunotherapy of Cancer、2020：8（2）：e000238

非特許文献10：International Immunology、1996：Vol. 8：p. 765-772

非特許文献11：Annual Review of Immunology

、2008: Vol. 26: p. 677-704

非特許文献12: Nature Medicine、2002: 8: p. 793-800

非特許文献13: Scientific Reports、2021: 11: p. 21087-21099

非特許文献14: Nature Communications、2017: 8: p. 14572-14582

非特許文献15: Journal for Immunotherapy of Cancer、2019: 7: 37: p. 1-16

非特許文献16: Molecules、2019: 24: p. 2071-2100

非特許文献17: Cancer Discovery、2021: 11: p. 1368-1397

非特許文献18: Molecular Medicine Reports、2021: 23: p. 362-377

発明の概要

発明が解決しようとする課題

- [0011] 本発明の課題は、対象のがん治療のためにPD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体若しくは当該二重特異性抗体を含む医薬組成物の提供、又は抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤を対象に投与することを含むがんの治療方法の提供である。

課題を解決するための手段

- [0012] 本発明者らは、CLDN4発現がんの治療に用いる抗体又は医薬組成物の創成を目的とし、公知の抗CLDN4抗体であるKM3900抗体及び抗CD137抗体の配列に基づき、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を作製した（実施例1）。取得した抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体との併用は、抗CLDN4-抗

CD137二重特異性抗体、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体単独の場合と比較して、*in vitro*においてT細胞のインターフェロン γ 産生を促進した（実施例2及び3）。さらに、ヒトCLDN4発現マウスがん細胞を担癌したマウスにおいて、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗PD-1抗体との併用は、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体又は抗PD-1抗体を単独投与した場合に比べて有意な抗腫瘍効果を示した（実施例4）。この結果より、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤の組み合わせは、CLDN4発現がんの治療に有用であることが示唆された。

[0013] すなわち、本発明は、これらに限定されるものではないが、以下の[1]～[84]に関する。

[1] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を含む、対象のがんを治療するための医薬組成物であって、該二重特異性抗体が抗CLDN4抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物。

[2] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から66までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号99から112までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号24から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号51から57までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸番号90から98までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、[1]に記載の医薬組成物。

[3] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなり、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる、[

1] 又は [2] に記載の医薬組成物。

[4] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が、抗CLDN4抗体の重鎖可変領域を含む重鎖及び抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖からなるIgG抗体（抗CLDN4-IgG抗体）を含む、[1]～[3]のいずれかに記載の医薬組成物。

[5] 抗CLDN4-IgG抗体のFc領域にLALA変異（L234A及びL235A）若しくはP331G変異（ここで、前記変異位置はヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）のいずれか又は両方を含む、[4]に記載の医薬組成物。

[6] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号625から629までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号644から659までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号692から701までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CD137抗体の軽鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号486から498までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号514から520までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号553から563までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、[1]～[5]のいずれかに記載の医薬組成物。

[7] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなり、抗CD137抗体の軽鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる、[1]～[6]のいずれかに記載の医薬組成物。

[8] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が、抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗CD137一本鎖可変領域フラグメント（抗CD137scFv）を含む、[6]又は[7]に記載の医薬組成物。

[9] 抗CD137scFvが配列番号2のアミノ酸番号464から712までのアミノ酸配列からなる、[8]に記載の医薬組成物。

[10] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が、抗CLDN4 IgG抗体及び抗CD137 scFvを含み、抗CLDN4 IgG抗体の重鎖カルボキシ末端に抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、[8]又は[9]に記載の医薬組成物。

[11] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を含む、対象のがんを治療するための医薬組成物であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の軽鎖可変領域及び配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の重鎖可変領域を含む抗CD137 scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物。

[12] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を含む、対象のがんを治療するための医薬組成物であって、該二重特異性抗体が、配列番号2のアミノ酸番号1から453までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から215までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137 scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物。

[13] リンカーがGSリンカーである、[10]～[12]のいずれかに記載の医薬組成物。

[14] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を含む、対象のがんを治療するための医薬組成物であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミ

ノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び抗CD137scFvを含むポリペプチド、並びに配列番号4のアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖を含み、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物。

[15] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が翻訳後修飾されたものである、[1]～[14]のいずれかに記載の医薬組成物。

[16] PD-1シグナル阻害剤と同時に、連続的に又は逐次的に組み合わせて使用される、[1]～[15]のいずれかに記載の医薬組成物。

[17] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤が(i)同一の医薬組成物に含まれており同時に投与される、又は(ii)別々の医薬組成物に含まれており、同時に、連続的に若しくは逐次的に組み合わせて使用される、[1]～[16]のいずれかに記載の医薬組成物。

[18] がんが、大腸がん、膀胱がん及び肺がんからなる群から選択される、[1]～[17]のいずれかに記載の医薬組成物。

[19] PD-1シグナル阻害剤が、PD-1、PD-L1及びPD-L2からなる群から選択される1以上のタンパク質に結合する抗体又はこれらの抗原結合フラグメントである、[1]～[18]のいずれかに記載の医薬組成物。

[20] PD-1シグナル阻害剤が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、スパルタリズマブ及びセミプリマブからなる群から選択される抗PD-1抗体である、[1]～[19]のいずれかに記載の医薬組成物。

[21] PD-1シグナル阻害剤が、アテゾリズマブ、デュルバルマブ及びアベルマブからなる群から選択される抗PD-L1抗体である、[1]～[19]のいずれかに記載の医薬組成物。

[22] 対象のがんを治療するための抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体であって、該二重特異性抗体が抗CLDN4抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を

含み、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、二重特異性抗体。

[23] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から66までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号99から112までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号24から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号51から57までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸番号90から98までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、[22]に記載の二重特異性抗体。

[24] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなり、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる、[22]又は[23]に記載の二重特異性抗体。

[25] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域を含む重鎖及び抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖からなるIgG抗体（抗CLDN4 IgG抗体）を含む、[22]～[24]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[26] 抗CLDN4 IgG抗体のFc領域にLALA変異（L234A及びL235A）若しくはP331G変異（ここで、前記変異位置はヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）のいずれか又は両方を含む、[25]に記載の二重特異性抗体。

[27] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号625から629までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号644から659までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号692から701までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CD137抗体の軽鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号486から498までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号

514から520までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号553から563までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、
[22]～[26]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[28] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなり、抗CD137抗体の軽鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる、[22]～[27]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[29] 抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗CD137一本鎖可変領域フラグメント（抗CD137 scFv）を含む、[27]又は[28]に記載の二重特異性抗体。

[30] 抗CD137 scFvが配列番号2のアミノ酸番号464から712までのアミノ酸配列からなる、[29]に記載の二重特異性抗体。

[31] 抗CLDN4 IgG抗体及び抗CD137 scFvを含み、抗CLDN4 IgG抗体の重鎖カルボキシ末端に抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、[29]又は[30]に記載の二重特異性抗体。

[32] 対象のがんを治療するための抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の軽鎖可変領域及び配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の重鎖可変領域を含む抗CD137 scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、二重特異性抗体。

[33] 対象のがんを治療するための抗CLDN4－抗CD137二重特異

性抗体であって、該二重特異性抗体が、配列番号2のアミノ酸番号1から453までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から215までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、二重特異性抗体。

[34] リンカーがGSリンカーである、[31]～[33]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[35] 対象のがんを治療するために使用される抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び抗CD137scFvを含むポリペプチド、並びに配列番号4のアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖を含み、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、二重特異性抗体。

[36] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が翻訳後修飾されたものである、[22]～[35]のいずれかに記載の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体。

[37] PD-1シグナル阻害剤と同時に、連続的に又は逐次的に組み合わせて使用される、[22]～[36]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[38] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤が(i)同一の医薬組成物に含まれており同時に投与される、又は(ii)別々の医薬組成物であり、同時に、連続的に若しくは逐次的に組み合わせて使用される、[22]～[37]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[39] がんが、大腸がん、膀胱がん及び肺がんからなる群から選択される、[22]～[38]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[40] PD-1シグナル阻害剤が、PD-1、PD-L1及びPD-L2

からなる群から選択される1以上のタンパク質に結合する抗体又はこれらの抗原結合フラグメントである、[22]～[39]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[41] PD-1シグナル阻害剤が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、スパルタリズマブ及びセミプリマブからなる群から選択される抗PD-1抗体である、[22]～[40]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[42] PD-1シグナル阻害剤が、アテゾリズマブ、デュルバルマブ及びアベルマブからなる群から選択される抗PD-L1抗体である、[22]～[40]のいずれかに記載の二重特異性抗体。

[43] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤を組み合わせ対象に投与することを含むがんの治療方法であって、該二重特異性抗体が抗CLDN4抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、治療方法。

[44] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から66までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号99から112までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号24から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号51から57までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸番号90から98までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、[43]に記載の治療方法。

[45] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなり、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる、[43]又は[44]に記載の治療方法。

[46] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が、抗CLDN4抗体

の重鎖可変領域を含む重鎖及び抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖からなるIgG抗体（抗CLDN4 IgG抗体）を含む、[43]～[45]のいずれかに記載の治療方法。

[47] 抗CLDN4 IgG抗体のFc領域にLALA変異（L234A及びL235A）若しくはP331G変異（ここで、前記変異位置はヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）のいずれか又は両方を含む、[46]に記載の治療方法。

[48] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号625から629までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号644から659までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号692から701までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CD137抗体の軽鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号486から498までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号514から520までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号553から563までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、[43]～[47]のいずれかに記載の治療方法。

[49] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなり、抗CD137抗体の軽鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる、[43]～[48]のいずれかに記載の治療方法。

[50] 抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体が、抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗CD137一本鎖可変領域フラグメント（抗CD137 scFv）を含む、[48]又は[49]に記載の治療方法。

[51] 抗CD137 scFvが配列番号2のアミノ酸番号464から712までのアミノ酸配列からなる、[50]に記載の治療方法。

[52] 抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体が、抗CLDN4 IgG抗体及び抗CD137 scFvを含み、抗CLDN4 IgG抗体の重

鎖カルボキシ末端に抗CD137scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、[50]又は[51]に記載の治療方法。

[53] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤を組み合わせ対象に投与することを含むがんの治療方法であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の軽鎖可変領域及び配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の重鎖可変領域を含む抗CD137scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、治療方法。

[54] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤を組み合わせ対象に投与することを含むがんの治療方法であって、該二重特異性抗体が、配列番号2のアミノ酸番号1から453までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から215までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、治療方法。

[55] リンカーがGSリンカーである、[52]～[54]のいずれかに記載の治療方法。

[56] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤を組み合わせ対象に投与することを含むがんの治療方法であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び抗CD137scFvを含むポリペプチド、並びに配列番号4のアミ

ノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖を含む、治療方法。

[57] 抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体が翻訳後修飾されたものである、[43]～[56]のいずれか一項に記載の治療方法。

[58] 抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体とPD－1シグナル阻害剤が同時に、連続的に又は逐次的に組み合わせて使用される、[43]～[57]のいずれかに記載の治療方法。

[59] 抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体とPD－1シグナル阻害剤が（i）同一の医薬組成物に含まれており同時に投与される、又は（ii）別々の医薬組成物であり、同時に、連続的に若しくは逐次的に組み合わせて使用される、[43]～[58]のいずれかに記載の治療方法。

[60] がんが、大腸がん、膀胱がん及び肺がんからなる群から選択される、[43]～[58]のいずれかに記載の治療方法。

[61] PD－1シグナル阻害剤が、PD－1、PD－L1及びPD－L2からなる群から選択される1以上のタンパク質に結合する抗体又はこれらの抗原結合フラグメントである、[43]～[60]のいずれか一項に記載の治療方法。

[62] PD－1シグナル阻害剤が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、スパルタリズマブ及びセミプリマブからなる群から選択される抗PD－1抗体である、[43]～[61]のいずれかに記載の治療方法。

[63] PD－1シグナル阻害剤が、アテゾリズマブ、デュルバルマブ及びアベルマブからなる群から選択される抗PD－L1抗体である、[43]～[61]のいずれかに記載の治療方法。

[64] 対象のがんを治療するためにPD－1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される医薬組成物の製造のための抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体の使用であって、該二重特異性抗体が抗CLDN4抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、使用。

[65] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号31

から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から66までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号99から112までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号24から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号51から57までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸番号90から98までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、[64]に記載の使用。

[66] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなり、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる、[64]又は[65]に記載の使用。

[67] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が、抗CLDN4抗体の重鎖可変領域を含む重鎖及び抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖からなるIgG抗体（抗CLDN4-IgG抗体）を含む、[64]～[66]のいずれかに記載の使用。

[68] 抗CLDN4-IgG抗体のFc領域にLALA変異（L234A及びL235A）若しくはP331G変異（ここで、前記変異位置はヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）のいずれか又は両方を含む、[67]に記載の使用。

[69] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号625から629までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号644から659までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号692から701までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CD137抗体の軽鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号486から498までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号514から520までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号553から563までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、[64]～[68]のいずれかに記載の使用。

[70] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなり、抗CD137抗体の軽鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる、[64]～[69]のいずれかに記載の使用。

[71] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が、抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗CD137一本鎖可変領域フラグメント（抗CD137 scFv）を含む、[69]又は[70]に記載の使用。

[72] 抗CD137 scFvが配列番号2のアミノ酸番号464から712までのアミノ酸配列からなる、[71]に記載の使用。

[73] 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体が、抗CLDN4 IgG抗体及び抗CD137 scFvを含み、抗CLDN4 IgG抗体の重鎖カルボキシ末端に抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、[71]又は[72]に記載の使用。

[74] 対象のがんを治療するためにPD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される医薬組成物の製造のための抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体の使用であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の軽鎖可変領域及び配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の重鎖可変領域を含む抗CD137 scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、使用。

[75] 対象のがんを治療するためにPD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される医薬組成物の製造のための抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体の使用であって、該二重特異性抗体が、配列番号2のアミノ酸番号

1 から 4 5 3 までのアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の重鎖及び配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 2 1 5 までのアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の軽鎖、並びに配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 4 から 7 1 2 までのアミノ酸配列からなる抗 C D 1 3 7 s c F v を含み、該抗 C L D N 4 抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗 C D 1 3 7 s c F v のアミノ末端がリンカーを介して連結されている、使用。

[7 6] リンカーが G S リンカーである、[7 3] ~ [7 5] のいずれかに記載の使用。

[7 7] 対象のがんを治療するために P D - 1 シグナル阻害剤と組み合わせて使用される医薬組成物の製造のための抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体の使用であって、該二重特異性抗体が配列番号 2 のアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の重鎖及び抗 C D 1 3 7 s c F v を含むポリペプチド、並びに配列番号 4 のアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の軽鎖を含む、使用。

[7 8] 抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体が翻訳後修飾されたものである、[6 4] ~ [7 7] のいずれかに記載の使用。

[7 9] 医薬組成物が、P D - 1 シグナル阻害剤と同時に、連続的に又は逐次的に組み合わせて使用される、[6 4] ~ [7 8] のいずれか一項に記載の使用。

[8 0] 抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体と P D - 1 シグナル阻害剤が (i) 同一の医薬組成物に含まれており同時に投与される、又は (i i) 別々の医薬組成物であり、同時に、連続的に若しくは逐次的に組み合わせて使用される、[6 4] ~ [7 9] のいずれかに記載の使用。

[8 1] がんが、大腸がん、膀胱がん及び肺がんからなる群から選択される、[6 4] ~ [8 0] のいずれかに記載の使用。

[8 2] P D - 1 シグナル阻害剤が、P D - 1、P D - L 1 及び P D - L 2 からなる群から選択される 1 以上のタンパク質に結合する抗体又はこれらの抗原結合フラグメントである、[6 4] ~ [8 1] のいずれかに記載の使用

。

〔８３〕ＰＤ－１シグナル阻害剤が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、スパルタリズマブ及びセミプリマブからなる群から選択される抗ＰＤ－１抗体である、〔６４〕～〔８２〕のいずれかに記載の使用。

〔８４〕ＰＤ－１シグナル阻害剤が、アテゾリズマブ、デュルバルマブ及びアベルマブからなる群から選択される抗ＰＤ－Ｌ１抗体である、〔６４〕～〔８２〕のいずれかに記載の使用。

発明の効果

〔００１４〕 本発明の抗ＣＬＤＮ４－抗ＣＤ１３７二重特異性抗体は、がんにおいて高発現しているＣＬＤＮ４とＴ細胞表面分子であるＣＤ１３７の両方に結合し、がん細胞周辺の免疫細胞を活性化することによりがん細胞に対する殺傷作用を増強させるものである。本発明の抗ＣＬＤＮ４－抗ＣＤ１３７二重特異性抗体とＰＤ－１シグナル阻害剤の組み合わせは、抗ＣＬＤＮ４－抗ＣＤ１３７二重特異性抗体又はＰＤ－１シグナル阻害剤の単独投与に比べて有意な抗腫瘍効果をもたらす。よって、本発明は、がん治療におけるＰＤ－１シグナル阻害剤との組み合わせによる抗ＣＬＤＮ４－抗ＣＤ１３７二重特異性抗体の使用を提供する。

図面の簡単な説明

〔００１５〕〔図１-１〕図１－１は、ヒト大細胞肺癌細胞株のＬＣＬＣ－ＯＫＴ３ｓｃＦｖ細胞とＥｘｐａｎｄｅｄ ｐａｎＴ細胞の共培養系における被験抗体添加によるインターフェロン－γ産生量を示す。図の縦軸は抗体添加４日後におけるインターフェロン－γ産生量を、横軸は抗体濃度を示す。シンボルは各抗体の各濃度におけるインターフェロン－γ産生量の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

〔図１-２〕図１－２は、ヒト大細胞肺癌細胞株のＬＣＬＣ－ＯＫＴ３ｓｃＦｖ細胞とＥｘｐａｎｄｅｄ ｐａｎＴ細胞の共培養系における被験抗体添加によるインターフェロン－γ産生量を示す。図の縦軸は抗体添加５日後におけるインターフェロン－γ産生量を、横軸は抗体濃度を示す。シンボルは抗体

の各濃度におけるインターフェロン- γ 産生量の平均値を示す。エラーバーは標準偏差を示す。

[図2]図2は、B-h4-1 BBマウスに担癌されたヒトCLDN4発現B16-F10細胞の増殖抑制効果を示す。図2は抗体投与開始後の各日数における腫瘍体積の平均値 ($n=10$) を示す。エラーバーは腫瘍体積の標準誤差を示す。図の縦軸は腫瘍体積を示し、横軸は抗体初回投与日からの日数を示す。有意確率P値は、unpaired Student's t検定により、併用群の腫瘍体積を被験抗体単剤投与群の腫瘍体積と比較することにより求めた。図中の**は、P値が有意水準0.01より小さいことを示す。

発明を実施するための形態

[0016] 以下に、本発明について詳述する。

[0017] 本明細書の用語は、以下で特に定義されない限り、当該技術分野で当業者に一般に使用されている意味にて使用される。

[0018] 抗体（又は免疫グロブリン）とは単一の配列を有する重鎖2本と、単一の配列を有する軽鎖2本からなる左右対称Y字型の構造を有する4本鎖構造を基本構造とする糖タンパク質をいう。抗体にはIgG、IgM、IgA、IgD及びIgEの5つのクラスが存在する。抗体分子の基本構造は各クラス共通であり、分子量5万～7万の重鎖2本と2万～3万の軽鎖2本がジスルフィド結合及び非共有結合によって結合し、分子量15万～19万のY字型の4本鎖構造からなる抗体分子を形成する。重鎖は、通常約440個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、クラスごとに特徴的な構造をもち、IgG、IgM、IgA、IgD、IgEに対応してそれぞれ、Ig γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 、Ig ϵ とよばれる。さらにIgGには、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4のサブクラスが存在し、それぞれに対応する重鎖はIg γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3、Ig γ 4とよばれる。軽鎖は、通常約220個のアミノ酸を含むポリペプチド鎖からなり、 λ 型と κ 型の2種が知られており、それぞれIg λ 、Ig κ という。前記2種の軽鎖は、いずれの

種類の重鎖とも対をなすことができる。

[0019] 抗体分子の鎖内ジスルフィド結合は、重鎖には4つ（ $I\ g\ \mu$ 、 $I\ g\ \epsilon$ には5つ）、軽鎖には2つ存在し、アミノ酸100～110残基ごとに1つのループを成している。それらの立体構造は各ループ間で類似していて、構造単位又はドメインとよばれる。重鎖、軽鎖ともにアミノ末端（本明細書において「N末端」とも称する）に位置するドメインは可変領域とよばれ、同種動物の同一クラス（又はサブクラス）から産生された抗体であっても多様なアミノ酸配列を有し、抗体と抗原との結合特異性結合に関与することが知られている。可変領域よりも下流のC末端側のドメインのアミノ酸配列は、各クラス又はサブクラスごとにほぼ一定であり、定常領域とよばれている。重鎖は、N末端からカルボキシ末端（本明細書において「C末端」とも称する）に向かって重鎖可変領域（VH）及び重鎖定常領域（CH）を有する。CHはさらにN末端側からCH1ドメイン、CH2ドメイン、CH3ドメインの3つのドメインに分けられる。軽鎖は、N末端からC末端に向かって軽鎖可変領域（VL）及び軽鎖定常領域（CL）を有する。

[0020] VH及びVLに存在する3つの相補性決定領域（CDR）のアミノ酸配列は変化が非常に大きく、可変領域の可変性に寄与している。CDRは、重鎖と軽鎖のN末端それぞれにCDR1、CDR2、CDR3の順番で存在するおよそ5～10アミノ酸残基からなる領域であって、抗原結合部位を形成する。一方、可変領域のCDR以外の部分はフレームワーク領域（FR）とよばれ、FR1～4からなり、アミノ酸配列の変化は比較的少ない。

[0021] 抗体をタンパク質分解酵素のパパインで処理すると、3つの抗体断片が得られる。N末端側の2つの断片はFab（抗原結合断片、Fragment, antigen binding）領域と呼ばれている。本明細書において、「Fab領域」とは、重鎖のVHとCH1ドメイン及び軽鎖（VLとCL）からなる領域を指し、当該Fab領域が構成する先端部分の抗原結合部位で抗原と結合する。本明細書において、「重鎖フラグメント」とは、Fab領域を構成する重鎖のVHとCH1ドメインからなるフラグメントを指す

。また、C末端側の断片を「Fc（結晶化可能断片、Fragment, crystallizable）領域」とよぶ。

[0022] 本明細書において、「抗原」とは一般的に用いられている意味で用いられ、特に、抗体や抗原結合フラグメント等の抗原結合タンパク質が特異的に結合し得る分子又は分子の一部を表す用語として用いられる。抗原はタンパク質、核酸等の分子であり得る。1つの抗原は、異なる抗体等と相互作用することができる1つ又はそれ以上のエピトープを有する場合もある。

[0023] 本明細書において「IgG抗体」とは、2つのFab領域とFc領域からなるY字型の構造を有する抗体をいう。1つの実施形態において、IgG抗体の2つのFab領域は、同一のVH及びVL配列を含む。

[0024] 本明細書において、「抗原結合フラグメント」とは抗体に由来する抗原結合活性を有する少なくとも1つのポリペプチド鎖を含む分子である。代表的な抗原結合フラグメントとしては、一本鎖可変領域フラグメント（scFv）、Fabフラグメント、Fab'フラグメント、F(ab')₂フラグメントが挙げられる。scFvは、リンカーで連結されたVHとVLから構成される、一価の抗原結合フラグメントである。Fabフラグメントは、軽鎖と、重鎖のVH、CH1ドメインを含むフラグメントから構成される、一価の抗原結合フラグメントである。Fab'フラグメントは、軽鎖と、重鎖のVH、CH1ドメインとヒンジ領域の一部とを含むフラグメントから構成される、一価の抗原結合フラグメントであり、このヒンジ領域の部分には重鎖間S-S結合を構成していたシステイン残基が含まれる。F(ab')₂フラグメントは、Fab'フラグメントがジスルフィド結合で繋がっている二価の分子である。一価とは、抗原結合部位を1つ含むことを、二価とは、抗原結合部位を2つ含むことを意味する。

[0025] 本明細書において、「二重特異性抗体」とは2つの異なる抗原に特異的に結合することができる抗体をいう。「抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体」とは、CLDN4に対する結合活性及びCD137に対する結合活性を有する二重特異性抗体を意味する。

- [0026] 本明細書において、「抗体」とは文脈上特に限定されない限り、完全長の抗体、抗原結合フラグメント、及びあらゆる構造の二重特異性抗体を含む用語として使用される。
- [0027] 本明細書において「ヒト抗体」とはヒト免疫グロブリンアミノ酸配列を有する抗体を表す。本明細書において「ヒト化抗体」は、CDR以外のアミノ酸残基の一部、大部分、又は全部がヒト免疫グロブリン分子に由来するアミノ酸残基で置換された抗体を表す。ヒト化の方法は特に制限されないが、例えば、米国特許第5225539号、米国特許第6180370号等を参照してヒト化抗体を作製することができる。
- [0028] 本明細書中で使用される抗体のアミノ酸残基番号はKabatナンバリング又はEUインデックス(Kabatら、Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., 1991:NIH Publication:No. 91-3242)を指定することで、それらのナンバリングシステムに従って規定することができる。
- [0029] 本明細書において、「連結」、「連結体」又は「連結された」とは、複数の成分(例えば、IgG抗体及びscFv)が、直接又は仲介物(例えば、ペプチドリンカー)を介して結合していることを意味する。本明細書において「ペプチドリンカー」とは、複数の成分を連結するために用いられる、遺伝子工学的手法により導入され得る1以上の任意のアミノ酸配列を意味する。本発明で使用されるペプチドリンカーの長さは特に限定されず、目的に応じて当業者が適宜選択することが可能である。
- [0030] 本明細書において、「対象」とは疾患の予防又は治療を必要とするヒト又はその他の動物を意味する。1つの実施形態において、対象は疾患の予防又は治療を必要とするヒトである。1つの実施形態において、対象はがんを有するヒトである。
- [0031] 本明細書において、「治療」とは疾患の症状、病状、疾患と関連する生化学的徴候の進行、発症、重篤化又は再発を、回復、緩和、改善、抑制又は遅

延させる目的で対象に対して行われる何らかの治療介入（*i n t e r v e n t i o n*）、処置、又は対象への有効成分の投与を意味する。

[0032] 本明細書において、「有効成分」とは疾患の予防又は治療に用いる医薬組成物、医薬品等に含まれる物質のうち、何らかの生理活性を示すものを意味する。1つの実施形態において、有効成分は抗体、低分子化合物、核酸、融合タンパク質、ペプチドである。1つの実施形態において、有効成分は抗体である。1つの実施形態において、有効成分は二重特異性抗体である。

[0033] 本明細書において、「医薬組成物」とは、有効成分及び薬学的に許容される賦形剤（例えば薬剤用賦形剤や薬剤用担体等が含まれるがこれに限らない）を含み、対象の治療を目的として処方される薬剤である。

[0034] 本明細書において、「併用」、「組み合わせ」又は「組み合わせて使用」とは疾患の予防又は治療のために、同一の対象に、複数種の有効成分を同時に、連続的に又は逐次的に投与することを意味する。当該複数種の有効成分は、同一の医薬組成物中に含まれていてもよく、異なる医薬組成物中に別々に含まれていてもよい。本明細書において、「同時」とは複数種の有効成分を一方の投与期間内に並行して投与することを意味し、「連続的」とは一方の有効成分の投与が終了した後に期間を置かずして他方の有効成分の投与を行うことを意味し、「逐次的」とは複数種の有効成分を投与スケジュールに準じて順に投与することを意味する。

[0035] 本明細書において、薬剤の「有効量」とはそれが投与される細胞又は組織に生理学的変化をもたらすために必要な薬剤の量を指す。

[0036] 本明細書において、「PD-1シグナル阻害剤」とはPD-1による免疫細胞活性化抑制を解除する薬剤を意味する。PD-1シグナル阻害剤は、PD-1又はそのリガンドであるPD-L1又はPD-L2に結合して免疫抑制シグナルを阻害することにより、PD-1による免疫チェックポイントの機能を阻害し得る。PD-1シグナル阻害剤としては、PD-1シグナルを遮断する効果を有する限り、どのような物質であっても良く、例えば、抗体、低分子化合物、核酸（DNA若しくはRNA、又は、天然若しくは人工の

核酸を含んでいてもよい)、融合タンパク質、ペプチド等であってよい。例えば、抗PD-1抗体又は抗PD-L1抗体若しくは抗PD-L2抗体は、PD-1とPD-L1又はPD-L2との結合を阻害することにより、PD-1シグナルを阻害することができる(Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2016: Vol. 26: p. 555-564)。

[0037] 本発明は、以下の(1)～(4)に関する：

(1) 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を含む、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物(本明細書中、「本発明の医薬組成物」とも称する)；

(2) 対象のがんを治療するために、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体；

(3) 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤を対象に投与することを含むがんの治療方法(本明細書中、「本発明の治療方法」とも称する)；又は

(4) 対象のがんを治療するためにPD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される医薬組成物の製造のための、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体の使用。

[0038] <本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体>

本発明で使用されるCLDN4及びCD137に結合する二重特異性抗体(「本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体」とも称する)は、抗CLDN4抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む。

[0039] 本明細書において、「抗CLDN4抗体」はヒトCLDN4に結合可能な抗体であり、「抗CD137抗体」はヒトCD137に結合可能な抗体である。ヒトCLDN4又はヒトCD137に結合するか否かは、公知の結合活性測定方法を用いて確認することができる。結合活性を測定する方法としては、例えば、Enzyme-Linked ImmunoSorbent

Assay (ELISA) 法、フローサイトメトリー法等の方法が挙げられる。ELISA 法又はフローサイトメトリー法は、当業者が通常用いる方法にて実施することができる。

[0040] 本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、CLDN4及びCD137に結合する限りにおいてどのような構造であってもよく、例えば、非特許文献6に記載されている構造を有する二重特異性抗体が挙げられる。1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、抗CLDN4抗体のFab領域と抗CD137抗体のFab領域が連結された連結体、IgG抗体型の抗CLDN4抗体（「抗CLDN4 IgG抗体」とも称する）及びIgG抗体型の抗CD137抗体（「抗CD137 IgG抗体」とも称する）の連結体、抗CLDN4 IgG抗体及び抗CD137抗体の抗原結合フラグメントの連結体、抗CLDN4抗体の抗原結合フラグメント及び抗CD137 IgG抗体の連結体、又は抗CLDN4抗体の抗原結合フラグメント及び抗CD137抗体の抗原結合フラグメントの連結体であってよい。

[0041] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から66までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号99から112までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む抗CLDN4抗体の重鎖可変領域、並びに、配列番号4のアミノ酸番号24から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号51から57までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸番号90から98までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域を含む。

[0042] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖可変領域及び配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域を含む。

。

[0043] 本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体に含まれる抗CLDN4抗体はIgG抗体であってよい。抗CLDN4抗体に含まれる重鎖定常領域としては、Ig γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 又はIg ϵ のいずれの定常領域も選択可能である。Ig γ としては、例えば、Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3又はIg γ 4から選択することが可能である。本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体に含まれる抗CLDN4抗体に含まれる軽鎖定常領域としては、Ig λ 又はIg κ のいずれの定常領域も選択可能である。1つの実施形態において、該抗CLDN4抗体の重鎖及び軽鎖は、それぞれ、ヒトIg γ 1及びIg κ である。1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は完全長の抗CLDN4抗体を含む。1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体に含まれる抗CLDN4抗体は、抗CLDN4抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含むIgG抗体（抗CLDN4-IgG抗体）である。

[0044] 本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体がFc領域を含む場合、該二重特異性抗体におけるFc領域は、抗体依存性細胞傷害活性（ADCC）や補体依存性傷害活性（CDC）を低下させる変異を含んでもよい。L234Aとは、ヒトIg γ 1定常領域のアミノ酸234位のロイシンのアラニンへの置換である。L235Aとは、ヒトIg γ 1定常領域のアミノ酸235位のロイシンのアラニンへの置換である。ヒトIg γ 1定常領域L234A及びL235Aのアミノ酸変異を「LALA変異」という。当該変異は、抗体のADCCやCDCを低下させることが知られている（Mol. Immunol.、1992: Vol. 29: p. 633-639、J. Immunol.、2000: Vol. 164 (8): p. 4178-4184）。P331G又はP331Sとは、ヒトIg γ 1定常領域のアミノ酸331位のプロリンのグリシン又はセリンへの置換である。当該変異は、抗体のCDCを低下させることが知られている（J. Immunol.、2000: Vol. 164 (8): p. 4178-4184）。

- [0045] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体に含まれる抗CLDN4 IgG抗体は、L234A及びL235Aのアミノ酸変異（LALA変異）を含むFc領域を含む。1つの実施形態において、抗CLDN4 IgG抗体はP331G又はP331S変異のいずれかを含むFc領域を含む。1つの実施形態において、抗CLDN4 IgG抗体は、LALA変異及びP331G又はP331S変異のいずれかの変異を含むFc領域を含む。1つの実施形態において、抗CLDN4 IgG抗体は、LALA変異及びP331G変異のいずれか又は両方の変異を含むFc領域を含む。
- [0046] なお、本明細書において、LALA変異、P331G又はP331S変異等のアミノ酸変異の記載は、ヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置に基づくものである。例えば、前述の通り、L234Aとは、ヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸234位のロイシンのアラニンへの置換である。
- [0047] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、配列番号2のアミノ酸番号1から453までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から215までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖からなるIgG抗体である。
- [0048] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体に含まれる抗CD137抗体の重鎖可変領域は配列番号2のアミノ酸番号625から629までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号644から659までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号692から701までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CD137抗体の軽鎖可変領域は配列番号2のアミノ酸番号486から498までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号514から520までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号553から563までのアミノ酸配列からなるCDR3

を含む。

[0049] 1つの実施形態において、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体に含まれる抗CD137抗体の重鎖可変領域は配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなり、抗CD137抗体の軽鎖可変領域は配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる。

[0050] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、抗CD137抗体のscFv（本明細書中、「抗CD137scFv」とも称する）を含む。

[0051] 抗CD137scFvにおいて、抗CD137抗体の重鎖可変領域と軽鎖可変領域を連結するリンカーの種類及び長さは特に限定されず、当業者が適宜選択することが可能である。リンカーとしては、ペプチドリンカーを用いてもよい。好ましい長さは5アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは15アミノ酸である。リンカーとして、例えば、グリシン-セリンリンカー（GSリンカー）や、グリシン-リジン-プロリン-グリシン-セリンリンカー（GKPGSリンカー）を使用することができる。本発明におけるリンカーとしては、例えば、以下が挙げられる。

Ser

Gly-Ser

Gly-Gly-Ser

Ser-Gly-Gly

Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号5）

Ser-Gly-Gly-Gly（配列番号6）

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号7）

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号8）

Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser（配列番号9）

Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly（配列番号10）

G l y - G l y - G l y - G l y - G l y - G l y - S e r (配列番号 1
1)

S e r - G l y - G l y - G l y - G l y - G l y - G l y (配列番号 1
2)

G l y - G l y - G l y - G l y - S e r - G l y - G l y - G l y - G l
y - S e r (配列番号 1 3)

(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r) n

(S e r - G l y - G l y - G l y - G l y) n

G l y - L y s - P r o - G l y - S e r (配列番号 1 4)

(G l y - L y s - P r o - G l y - S e r) n

上記の n は 1 以上の整数を示す。また、ある態様では、上記の n は 1 ~ 1
0、2 ~ 8、又は 2 ~ 6 である。リンカーの長さや配列は目的に応じて当業
者が適宜選択することができる。

[0052] 1 つの実施形態において、抗 C D 1 3 7 s c F v において使用されるリン
カーは、(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r) n の G S リンカーで
ある。

[0053] 1 つの実施形態において、抗 C D 1 3 7 s c F v において使用されるリン
カーは、(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r) 4 の G S リンカーで
ある。

[0054] 1 つの実施形態において、本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異
性抗体は、配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 4 から 5 7 3 までのアミノ酸配列
からなる軽鎖可変領域と配列番号 2 のアミノ酸番号 5 9 5 から 7 1 2 までの
アミノ酸配列からなる重鎖可変領域が G S リンカーを介して連結された抗 C
D 1 3 7 s c F v を含む。

[0055] 1 つの実施形態において、本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異
性抗体は配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 4 から 7 1 2 までのアミノ酸配列か
らなる抗 C D 1 3 7 s c F v を含む。

[0056] 1 つの実施形態において、本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異

性抗体は、抗CLDN4 IgG抗体と抗CD137scFvを含む。

[0057] 本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体において、抗CLDN4抗体又はその抗原結合フラグメントと抗CD137抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、抗CD137scFv）はリンカーで連結されていてもよい。1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、抗CLDN4 IgG抗体及び抗CD137scFvを含み、抗CLDN4 IgG抗体と抗CD137scFvがリンカーを介して連結されている。1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、抗CLDN4 IgG抗体及び抗CD137scFvを含み、抗CLDN4 IgG抗体の重鎖カルボキシ末端に抗CD137scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている。抗CLDN4抗体又はその抗原結合フラグメントと抗CD137抗体又はその抗原結合フラグメントを連結するリンカーの種類及び長さは特に限定されず、当業者が適宜選択することが可能である。リンカーとしては、ペプチドリンカーを用いてもよい。好ましい長さは5アミノ酸以上（上限は特に限定されないが、通常、30アミノ酸以下、好ましくは20アミノ酸以下）であり、特に好ましくは10アミノ酸である。ペプチドリンカーとして、例えば、グリシン-セリンリンカー（GSリンカー）や、グリシン-リジン-プロリン-グリシン-セリンリンカー（GKPGSリンカー）を使用することができる。本発明におけるリンカーとしては、例えば、以下が挙げられる。

S e r

G l y - S e r

G l y - G l y - S e r

S e r - G l y - G l y

G l y - G l y - G l y - S e r （配列番号5）

S e r - G l y - G l y - G l y （配列番号6）

G l y - G l y - G l y - G l y - S e r （配列番号7）

S e r - G l y - G l y - G l y - G l y （配列番号8）

G l y - G l y - G l y - G l y - G l y - S e r (配列番号 9)
S e r - G l y - G l y - G l y - G l y - G l y (配列番号 10)
G l y - G l y - G l y - G l y - G l y - G l y - S e r (配列番号 11)
S e r - G l y - G l y - G l y - G l y - G l y - G l y (配列番号 12)
G l y - G l y - G l y - G l y - S e r - G l y - G l y - G l y - G l y - S e r (配列番号 13)
(G l y - G l y - G l y - G l y - S e r) n
(S e r - G l y - G l y - G l y - G l y) n
G l y - L y s - P r o - G l y - S e r (配列番号 14)
(G l y - L y s - P r o - G l y - S e r) n

上記の n は 1 以上の整数を示す。また、ある態様では、上記の n は 1 ～ 10、2 ～ 8、又は 2 ～ 6 である。ペプチドリンカーの長さや配列は目的に応じて当業者が適宜選択することができる。

[0058] 1 つの実施形態において、抗 C L D N 4 抗体又その抗原結合フラグメントと抗 C D 1 3 7 抗体又はその抗原結合フラグメント（例えば、抗 C D 1 3 7 s c F v）を連結するペプチドリンカーとして使用されるリンカーは、配列番号 1 3 のアミノ酸配列からなるリンカーである。

[0059] 1 つの実施形態において、本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体は、配列番号 2 のアミノ酸番号 3 1 から 3 5 までのアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 2 のアミノ酸番号 5 0 から 6 6 までのアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 2 のアミノ酸番号 9 9 から 1 1 2 までのアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む重鎖可変領域を含む抗 C L D N 4 抗体の重鎖、並びに配列番号 4 のアミノ酸番号 2 4 から 3 5 までのアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 4 のアミノ酸番号 5 1 から 5 7 までのアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 4 のアミノ酸番号 9 0 から 9 8 までのアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む軽鎖可変領域を含む抗 C L D N 4 抗体の軽鎖

、並びに、配列番号2のアミノ酸番号625から629までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号644から659までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号692から701までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む抗CD137抗体の重鎖可変領域、並びに配列番号2のアミノ酸番号486から498までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号514から520までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号553から563までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む抗CD137抗体の軽鎖可変領域を含む抗CD137 scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、二重特異性抗体である。

[0060] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体は、配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の軽鎖可変領域及び配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の重鎖可変領域を含む抗CD137 scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、二重特異性抗体である。

[0061] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体は、配列番号2のアミノ酸番号1から453までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から215までのアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137 scFvを含み、該抗CLDN4抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗CD137 scFvのアミノ末端がリンカーを介して連結されている、二重特異性抗体で

ある。

- [0062] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、配列番号2のアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び抗CD137 scFvを含むポリペプチド、並びに配列番号4のアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖を含む、二重特異性抗体である。
- [0063] 本明細書において「翻訳後修飾」とは、抗体を細胞内で発現させた場合に抗体が翻訳後に修飾を受けることをいう。翻訳後修飾の例として、重鎖N末端のグルタミン又はグルタミン酸のピログルタミル化、グリコシル化、酸化、脱アミド化、糖化等の修飾や、重鎖C末端のリジンのカルボキシペプチダーゼによる切断によるリジン欠失が挙げられる。種々の抗体において、このような翻訳後修飾が生じることが知られている（J. Pharm. Sci., 2008: Vol. 97: p. 2426-2447）。
- [0064] 1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、翻訳後修飾されていてもよい。1つの実施形態において、翻訳後修飾は重鎖可変領域N末端のピログルタミル化及び／又は重鎖C末端リジン欠失である。N末端のピログルタミル化又はC末端リジン欠失による翻訳後修飾が抗体の活性に影響を及ぼすものではないことは当該分野で知られている（Analytical Biochemistry, 2006: Vol. 348: p. 24-39）。
- [0065] 本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、ヒトCLDN4及びヒトCD137に結合する。ヒトCLDN4又はヒトCD137に結合するか否かは、公知の結合活性測定方法を用いて確認することができる。結合活性を測定する方法としては、例えば、Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA) 法、フローサイトメトリー法等の方法が挙げられる。
- [0066] 本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、当業者であれば、本明細書に開示される抗CLDN4抗体及び抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列情報等に基づき、当該分野で公知の方法にて作

製することができる。本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体において、抗CLDN4抗体及び抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域は、ヒト抗体由来、ヒト化抗体由来、又はそれらの組み合わせであってよい。ヒト化抗体の作製にあたっては、当業者に周知の方法を用いて、適宜バックミューテーションを導入してもよい（Bioinformatics、2015：Vol. 31：p. 434－435）。本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体は、特に限定されるものではないが、例えば、PCT/JP2022/18350に記載の方法に従い製造することができる。PCT/JP2022/18350に記載の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体の作製方法（＜本発明の二重特異性抗体のポリヌクレオチド＞、＜本発明の二重特異性抗体の発現ベクター＞、＜本発明の宿主細胞＞、＜本発明の二重特異性抗体を生産する方法＞及び実施例を含むがこれに限らない）は、本明細書において参照により援用される（Incorporation by Reference）。

[0067] ＜本発明の医薬組成物＞

本発明の医薬組成物は、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体を使用して製造され、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含む。本発明の医薬組成物は、当該分野において通常用いられている賦形剤、即ち、薬剤用賦形剤や薬剤用担体等を用いて、通常使用される方法によって調製することができる。これら医薬組成物の剤型の例としては、例えば、注射剤、点滴用剤等の非経口剤が挙げられ、静脈内投与、皮下投与、腹腔内投与等により投与することができる。製剤化にあたっては、薬学的に許容される範囲で、これら剤型に応じた賦形剤、担体、添加剤等を使用することができる。また、本発明の医薬組成物は、前述の通り、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体及び薬学的に許容される賦形剤を含むが、1つの実施形態において、PD-1シグナル阻害剤をさらに含み得る。

[0068] 本発明の医薬組成物には、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異

性抗体の翻訳後修飾体を含み得る。例えば、C末端リジンの欠失やN末端のピログルタミル化の両方又は一方を受けた抗体等を含有する医薬組成物も本発明に含まれる。

[0069] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から66までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号99から112までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む抗CLDN4抗体の重鎖可変領域、配列番号4のアミノ酸番号24から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号51から57までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸番号90から98までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域、並びに、配列番号2のアミノ酸番号625から629までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号644から659までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号692から701までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む抗CD137抗体の重鎖可変領域及び配列番号2のアミノ酸番号486から498までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号514から520までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号553から563までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む抗CD137抗体の軽鎖可変領域を含む抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体及び／又は当該二重特異性抗体の翻訳後修飾体を含む医薬組成物である。

[0070] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の重鎖及び配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗CLDN4抗体の軽鎖、並びに配列番号2のアミノ酸番号464から573までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の軽鎖可変領域及び配列番号2のアミノ酸番号595から712までのアミノ酸配列からなる抗CD137抗体の重鎖可変領域を含む抗CD137

7 s c F v を含み、該抗 C L D N 4 抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗 C D 1 3 7 s c F v のアミノ末端がリンカーを介して連結されている抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体及び／又は当該二重特異性抗体の翻訳後修飾体を含有する医薬組成物である。

[0071] 1つの実施形態において、本発明の医薬組成物は、配列番号2のアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の重鎖及び抗 C D 1 3 7 s c F v を含むポリペプチド、並びに配列番号4のアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の軽鎖を含む抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体及び／又は当該二重特異性抗体の翻訳後修飾体を含有する医薬組成物である。

[0072] 製剤化における本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体の添加量は、患者の症状の程度や年齢、使用する製剤の剤型、あるいは抗体の結合力価等により異なるが、例えば、ヒトへの投与量換算で 0.0001 mg / kg ~ 1000 mg / kg 程度の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体を製剤に用いることができる。1つの実施形態において、製剤化における本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体の添加量は、ヒトへの投与量換算で 0.0001 mg / kg ~ 1000 mg / kg の範囲である。1つの実施形態において、製剤化における本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体の添加量は、ヒトへの投与量換算で 0.001 mg / kg ~ 100 mg / kg の範囲である。1つの実施形態において、製剤化における本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体の添加量は、ヒトへの投与量換算で 0.01 mg / kg ~ 10 mg / kg の範囲である。1つの実施形態において、製剤化における本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体の添加量は、好ましくは、ヒトへの投与量換算で 0.01 mg / kg ~ 10 mg / kg の範囲である。

[0073] <PD-1 シグナル阻害剤>

本発明において、PD-1 シグナル阻害剤は、対象のがんの治療のために、本発明の抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体又は本発明の医薬組成物と組み合わせて使用される。

当該PD-1シグナル阻害剤の作用機序及び治療モダリティは、PD-1シグナルを遮断する限りにおいて特に限定されない。作用機序としては、例えば、PD-1シグナルに関与する分子間の結合阻害、PD-1シグナル分子の発現量低下（例えば、タンパク質の生成阻害又は分解誘導等）等の作用機序であってよい。治療モダリティとしては、例えば、抗体、低分子化合物、核酸（DNA又はRNA、天然又は人工の核酸を含んでいてもよい）、融合タンパク質、ペプチド、その他の治療モダリティであってよい。

[0074] PD-1シグナル阻害剤は、PD-1及びPD-L1又はPD-L2からなる群から選択される1以上のタンパク質の結合阻害作用、PD-1シグナル分子の発現量を指標にした発現低下作用等を測定する方法により取得することができる。例えば、PD-1とPD-L1又はPD-L2との結合阻害剤は、PD-1及びPD-L1又はPD-L2に結合する阻害剤を得た後に、得られた阻害剤をPD-1とPD-L1又はPD-L2との結合を阻害する能力で選別することができる。阻害剤のタンパク質への結合は、例えば、フローサイトメトリー法（FCM）、ELISA法、表面プラズモン共鳴法（SPR）、サーマルシフトアッセイ法（TSA）、等温滴定カロリーメトリー法（ITC）等の当業者に周知の方法を用いて評価することができる。また、例えば、PD-1、PD-L1又はPD-L2等のPD-1シグナル分子の発現量を低下させる阻害剤は、細胞におけるPD-1、PD-L1又はPD-L2等のタンパク質量を指標にして取得できる。PD-1シグナルの阻害作用は、T細胞増殖IFN- γ 放出又はレポーターアッセイ等の作用により確認することができる。あるタンパク質の発現量を低下させる阻害剤の作用は、例えば、ELISA法、定量PCR法、*in situ hybridization*法、生細胞イメージング法等の当業者に周知の方法を用いて確認することができる。

[0075] PD-1シグナル阻害剤として、例えば、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体等のPD-1シグナルを阻害する抗体が挙げられる。そのような抗体は、ヒト化抗体、キメラ抗体、マウス抗体、ヒト抗体、並

びにそれらの抗原結合フラグメントであってよい。公知の抗PD-1抗体としては、限定されるものではないが、例えば、米国特許第8008449号、米国特許第6808710号、米国特許第7488802号、米国特許第8168757号及び米国特許第8354509号、並びに国際公開第2006/121168号及び国際公開第2012/145493号に記載されている抗体がある。公知の抗PD-L1抗体としては、限定されるものではないが、例えば、国際公開第2007/005874号、国際公開第2010/077634号、国際公開第2011/066389号、国際公開第2013/079174号及び米国特許第8217149号に記載されている抗体がある。1つの実施形態において、本発明において使用されるPD-1シグナル阻害剤は抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体若しくは抗PD-L2抗体、又はこれらの抗原結合フラグメントである。1つの実施形態において、本発明において使用されるPD-1シグナル阻害剤は抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体又は抗PD-L2抗体である。1つの実施形態において、抗PD-1抗体は、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、スパルタリズマブ、センプリマブ等の抗PD-1抗体であってよい。1つの実施形態において、抗PD-L1抗体は、アテゾリズマブ、デュルバルマブ、アベルマブ等の抗PD-L1抗体であってよい。

[0076] PD-1シグナル阻害剤として、例えば、AMP-224（国際公開第2010/027827号及び国際公開第2011/066342号）、BMS-1166（Oncotarget、2017: Vol. 8: p. 72167-72181）等の、PD-1のPD-L1への結合を阻害する融合タンパク質や低分子化合物も挙げられる。様々なPD-1シグナル阻害剤が当該技術分野で公知である（非特許文献8）。

[0077] <本発明の治療方法>

本発明の治療方法は、本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤を対象に投与することを含む、がんの治療方法（「本発明の治療方法」と称する）である。

- [0078] 1つの実施形態において、本発明の治療方法は、対象に本発明の抗CD4-N4-抗CD137二重特異性抗体をPD-1シグナル阻害剤と同時に、連続的に又は逐次的に組み合わせて使用（投与）されることを特徴とする。
- [0079] 1つの実施形態において、本発明の治療方法は、対象に本発明の抗CD4-N4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤が（i）同一の医薬組成物に含まれており同時に投与される、又は（ii）別々の医薬組成物であり、同時に、連続的に若しくは逐次的に組み合わせて使用されることを特徴とする。
- [0080] 1つの実施形態において、本発明の治療方法は、対象に本発明の抗CD4-N4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤が（i）同一の医薬組成物に含まれており同時に投与される、又は（ii）別々の医薬組成物であり同日に投与されることを特徴とする。
- [0081] 1つの実施形態において、本発明の治療方法は、（a）対象に本発明の抗CD4-N4-抗CD137二重特異性抗体の投与完了後にPD-1シグナル阻害剤の投与を開始する、又は（b）対象にPD-1シグナル阻害剤の投与完了後に本発明の抗CD4-N4-抗CD137二重特異性抗体の投与を開始する連続的な使用であることを特徴とする。
- [0082] 1つの実施形態において、本発明の治療方法は、対象に対して投与サイクルを含む投与計画に従って本発明の抗CD4-N4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤の投与が行われる逐次的な使用であることを特徴とする。1つの実施形態において、本発明の治療方法は、少なくとも1つの投与サイクル又は全ての投与サイクルにおいて、対象への抗CD4-N4-抗CD137二重特異性抗体又は本発明の医薬組成物の投与を開始し、その後PD-1シグナル阻害剤の投与を開始することができることを特徴とする。1つの実施形態において、本発明の治療方法は、少なくとも1つの投与サイクル又は全ての投与サイクルにおいて、対象へPD-1シグナル阻害剤の投与を開始し、その後抗CD4-N4-抗CD137二重特異性抗体又は本発明の医薬組成物の投与を開始することができることを特徴とする。

[0083] <治療用途>

本発明の医薬組成物及び治療方法等により治療されるがんは、固形がん又は血液がんのいずれでもよい。本発明により治療されるがんは、原発性又は転移性のいずれかでも良い。本発明により治療されるがんは、特に限定されないが、例えば、種々の腹膜播種がん、胃がん、肺がん、急性リンパ芽球性白血病、急性骨髄性白血病、ホジキンリンパ腫、非ホジキンリンパ腫、B細胞リンパ腫、多発性骨髄腫、T細胞リンパ腫等の血液がん、骨髄異形成症候群、腺がん、扁平上皮がん、腺扁平上皮がん、未分化がん、大細胞がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、中皮腫、皮膚がん、皮膚T細胞リンパ腫、乳がん、前立腺がん、膀胱がん、膣がん、頸部がん、頭頸部がん、子宮がん、子宮頸がん、肝臓がん、胆のうがん、胆管がん、腎臓がん、膵臓がん、結腸がん、大腸がん、直腸がん、小腸がん、胃がん、食道がん、精巣がん、卵巣がん、脳腫瘍等の固形がん、並びに骨組織、軟骨組織、脂肪組織、筋組織、血管組織及び造血組織のがんの他、軟骨肉腫、ユーイング肉腫、悪性血管内皮腫、悪性シュワン腫、骨肉腫、軟部組織肉腫等の肉腫や、膠芽腫、多形性膠芽腫、肝芽腫、髄芽腫、腎芽腫、神経芽腫、膵芽腫、胸膜肺芽腫、網膜芽腫などの芽腫等が挙げられる。

[0084] 1つの実施形態において、本発明による治療の対象となるがんは、大腸がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、膀胱がん、卵巣がん、乳がん、前立腺がんである。1つの実施形態において、本発明による治療の対象となるがんは、正常組織と比較してCLDN4が高発現しているがんである。本発明による治療の対象となるがんは、好ましくは、正常組織と比較してCLDN4が高発現しているがん、又は大腸がん、直腸がん、肺がん、非小細胞肺がん、小細胞肺がん、膀胱がん、卵巣がん、乳がん、前立腺がんからなる群から選択されるがんである。

[0085] 本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体又はPD-1シグナル阻害剤の対象への投与量は、対象の症状の程度や年齢、使用する抗体、医薬組成物、阻害剤等の剤型、あるいは有効成分の活性強度等により異なるが

、例えば、 $0.0001\text{ mg/kg} \sim 1000\text{ mg/kg}$ 程度を用いることができる。1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体の対象への投与量は $0.0001\text{ mg/kg} \sim 1000\text{ mg/kg}$ である。1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体の対象への投与量は $0.001\text{ mg/kg} \sim 100\text{ mg/kg}$ である。1つの実施形態において、本発明の抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体の対象への投与量は $0.01\text{ mg/kg} \sim 10\text{ mg/kg}$ である。

[0086] 本発明についてさらに理解を得るために参照する特定の実施例をここに提供するが、これらは例示目的とするものであって、本発明を限定するものではない。

実施例

[0087] [実施例1：抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体の作製]

[実施例1－1：抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体をコードするベクターの作製]

抗CLDN4抗体であるKM3900は他のクローディングファミリー分子であるCLDN6等に比べてCLDN4に選択的に結合することが報告されている（特許文献1）。そこで、報告に基づきKM3900のヒト化抗体の作製を行った。

具体的には、KM3900の可変領域のヒト化アミノ酸配列に基づき、ヒトIg γ 1の定常領域及びヒトIg κ の定常領域の配列からヒト化抗体の設計を行なった。ヒトIg γ 1定常領域には、L234A、L235A、及びP331Gのアミノ酸変異を導入し抗CLDN4抗体配列を設計した。設計したヒト化抗CLDN4抗体を「hKM3900」と称する。

AlivaMabマウス（Ablexis社、米国特許9346873号）に、PCT/JP2022/18350の実施例3に記載のヒトCD137－ヒトFc融合タンパク質と免疫アジュバントを数回投与して免疫を行った。常法に従い、免疫したマウスのリンパ節からリンパ球を回収し、マウス

ミエローマ細胞SP2/Oと細胞融合することでハイブリドーマを作製した。自動ピッキング装置にてハイブリドーマの単コロニーを単離し、モノクローン化ハイブリドーマ細胞（以下「クローン」と称する）を取得した。ヒトCD137に結合する抗体を産生するクローンのスクリーニングを行い、抗CD137抗体（以下「A2-32」と称する）を産生するクローンを取得した。さらにこのクローンの細胞溶解液からcDNAを合成し、抗体塩基配列を同定した。取得したA2-32の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域の配列に基づき抗CD137 scFvを設計した。

抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を、hKM3900のアミノ酸配列及び設計した抗CD137 scFvのアミノ酸配列に基づき設計した。抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、IgG1型のhKM3900の重鎖C末端にGSリンカーが連結されており、GSリンカーのC末端に抗CD137 scFvのN末端が結合している。設計した抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体は、配列番号2のアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の重鎖及び抗CD137 scFvを含むポリペプチド及び配列番号4のアミノ酸配列からなる抗CLDN4抗体の軽鎖からなる。設計した抗CLDN4抗体の重鎖及び抗CD137 scFvを含むポリペプチドをコードするポリヌクレオチド及び抗CLDN4抗体の軽鎖をコードするポリヌクレオチドを作製し、それぞれ常法に従いpcDNA3.4 TOPOベクター（Thermo Fisher Scientific社）へ挿入した。作製した2つのベクターを「抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体発現ベクター」と称する。

[0088] [実施例1-2：抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体の作製]

抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体発現ベクターを用いて、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を作製した。具体的には、ExpiFectamine CHO Transfection Kit（Thermo Fisher Scientific社、A29129）を用いてExpiCHO-S細胞（Thermo Fisher Scientific

i c 社、A 2 9 1 2 7) に抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体発現ベクターを導入し、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体を培養上清中に分泌させた。得られた培養上清からMabSelect SuRe (Cytiva社、17-5438-02) を用いたアフィニティ精製法、更に、HiLoad 26/600 superdex 200 pg (GEヘルスケア社、28-9893-36) を用いたサイズ排除クロマトグラフィー精製法により、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体であるhKM3900__tA2-32LHを精製した。

実施例1にて作製した抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体であるhKM3900__tA2-32LHを「抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体」と称することもある。

[0089] [実施例2: 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗PD-1抗体の*in vitro*併用効果]

ヒトOKT3scFv発現LCLC-103H細胞とExpanded panT細胞を用いた共培養系において、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗PD-1抗体の*in vitro*併用効果の検討を行った。

[0090] [実施例2-1: Expanded PanT細胞の調製]

RPMI-1640 (Sigma社、R8758) に終濃度10%のFBS (Cytiva社、SH30084.03) と、終濃度1%のペニシリンストレプトマイシン (Thermo Fisher Scientific社、15070-063) を加えたものを「培養培地」と称する。終濃度1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ となるように抗CD3抗体 (BioLegend社、317325) を150mm/Tissue Culture Dish (IWAKI社、3030-150) (以下「ディッシュ」と称する) に添加し、抗CD3抗体を固相化した。PanT Cell Isolation Kit, human (Miltenyi Biotec社、130-096-535) を用い、メーカー推奨プロトコルに従ってヒト末梢血単核細胞 (human peripheral blood mononuclear cel

Is) (LONZA社、CC-2702) からPanT細胞 (CD4陽性T細胞及びCD8陽性T細胞の両方を含む、以下「PanT細胞」と称する) を単離した。単離したPanT細胞を遠心分離し、上清を取り除いた後に培養培地に懸濁した。前述の抗CD3抗体を固相化したディッシュに、培養培地に懸濁したPanT細胞を全量播種した。更に終濃度200U/mLのヒトIL-2 (PeproTech社、200-2) 及び終濃度4 µg/mLの抗CD28抗体 (BioLegend社、302934) を添加し、37℃、5% CO₂インキュベーターにて培養を行った。培養開始から3日後にPanT細胞を回収し、回収したPanT細胞を培養培地に懸濁してディッシュに播種した。更に終濃度200U/mLのヒトIL-2を添加し、37℃、5% CO₂インキュベーターにて培養を行った。その4日後、PanT細胞を全量回収して遠心分離し、上清を取り除いた後にセルバンカー (Takara社、CB011) に再懸濁し、チューブに分取して-80℃で凍結保存した。ここで凍結保存したPanT細胞を、本明細書において「Expanded PanT細胞」と称する。

[0091] [実施例2-2: ヒトCD3抗体単鎖可変領域フラグメント (OKT3 scFv) 発現LCLC-103H細胞の取得]

ヒトCLDN4を発現するヒト大細胞肺癌細胞株のLCLC-103H細胞は、Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ、ACC384) から入手した。ヒト大細胞肺癌細胞株のLCLC-103H細胞を培養培地にて37℃、5%CO₂の条件下で培養した。常法に従い遺伝子合成により作製したヒトOKT3 scFv (Journal of Immunological Methods, 2010: 362: p. 131-141) をコードするポリヌクレオチドをpcDNA3.4-TOPOベクターにサブクローニングした。作製したヒトOKT3 scFv発現ベクターをLipofectamineLTX (Invitrogen、15338-100) を用いてメーカー推奨のプロトコルに従いLCLC-103H細胞に

リポフェクションした。終濃度 $600 \mu\text{g}/\text{mL}$ の Geneticin Selective Antibiotic (Thermo Fisher Scientific 社、10131-027) を添加した培養培地での選択培養及び限界希釈法によりヒト OKT3 scFv を安定発現する LCLC-103H 細胞クローン（以下「LCLC-OKT3 scFv 細胞」と称する）を取得した。

[0092] [実施例 2-3：がん細胞と T 細胞の共培養系での抗 CLDN4-抗 CD137 二重特異性抗体と抗 PD-1 抗体の *in vitro* インターフェロン- γ 産生促進作用における併用効果]

抗 CLDN4-抗 CD137 二重特異性抗体と抗 PD-1 抗体の T 細胞活性増強作用を LCLC-OKT3 scFv 細胞と Expanded Pan T 細胞の共培養系にてインターフェロン γ 産生促進機能を指標に評価した。LCLC-OKT3 scFv 細胞を培養培地にて 2×10^5 個/ mL に調製し、平底 96 ウェルプレート (IWAKI 社、4020-010) に $50 \mu\text{L}$ ずつ播種し、 37°C 、5% CO_2 インキュベーターにて培養した。翌日、培養培地にて 1.32×10^6 個/ mL に調製した Expanded Pan T 細胞を、培養中の平底 96 ウェルプレートに $30 \mu\text{L}$ ずつ播種した。被験抗体として実施例 1 で取得した hKM3900__tA2-32LH 及び抗ヒト PD-1 抗体であるニボルマブを用いた。ニボルマブのアミノ酸配列設計は、国際公開第 2014/055648 号に記載のニボルマブの重鎖及び軽鎖のアミノ酸配列をもとに行った。設計したアミノ酸配列から国際公開第 2021/241616 号の実施例 11 に記載の方法に準じてニボルマブを取得した。アイソタイプコントロール（図 1-1 中では「アイソタイプ」と称する）として抗リゾチーム抗体を調製して使用した。単剤条件として、培養培地で最高濃度 $50000 \text{ ng}/\text{mL}$ から約 3 倍公比で段階希釈した hKM3900__tA2-32LH、又は培養培地で最高濃度 $50000 \text{ ng}/\text{mL}$ から約 3 倍公比で段階希釈したニボルマブを添加した。また併用条件として、濃度 $50000 \text{ ng}/\text{mL}$ のニボルマブを含む培養培地で最高濃度 500

00 ng/mLから約3倍公比で段階希釈したhKM3900__tA2-32LHを20 μ Lずつ添加した。添加後のニボルマブの最終濃度は10 μ g/mLである。添加後、37℃、5% CO₂インキュベーター培養で培養した。4日後、AlphaLISA インターフェロン- γ 測定キット（Perkin Elmer社、AL217C）を用いてメーカー推奨のプロトコルに従って培養上清中のインターフェロン- γ 産生量を測定した。図1-1にインターフェロン- γ 産生量を示す。各条件について平均値及び標準偏差を算出した。hKM3900__tA2-32LH及びニボルマブはヒトCLDN4発現がん細胞株とExpanded PanT細胞の共培養系においてインターフェロン- γ 産生促進作用を示した。hKM3900__tA2-32LHとニボルマブの併用によるインターフェロン- γ 産生促進作用は、hKM3900__tA2-32LH又はニボルマブ単剤より強かった。

[0093] [実施例3：抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗PD-L1抗体の*in vitro*併用効果]

国際公開第2012/155019号（配列番号22及び23）に記載の抗PD-L1抗体であるアテゾリズマブ抗体の配列に基づき、Fc領域に変異が入ったヒトIg γ 1定常領域の配列を用いた抗PD-L1抗体であるアテゾリズマブアナログ（以下、「アテゾリズマブアナログ」と称する）を設計し、PCT/JP2022/18350の実施例4-2に記載の方法に準じて抗体を取得した。実施例2で取得したLCLC-OKT3scFv細胞とExpanded panT細胞を用いた共培養系において、hKM3900__tA2-32LHとアテゾリズマブアナログの*in vitro*併用効果の検討を行った。具体的にはhKM3900__tA2-32LHとアテゾリズマブアナログのT細胞活性増強作用をLCLC-OKT3scFv細胞とExpanded PanT細胞の共培養系にてインターフェロン γ 産生量を指標に評価した。LCLC-OKT3scFv細胞を培養培地にて2 $\times$ 10⁵個/mLに調製し、平底96ウェルプレートに50 μ Lずつ播種し、37℃、5% CO₂インキュベーターにて培養した。翌日、培養培地にて1

、 3.3×10^6 個/mLに調製したExpanded PanT細胞を、培養中の平底96ウェルプレートに30 μ Lずつ播種した。被験抗体として実施例1で取得したhKM3900__tA2-32LH及びアテゾリズマブアナログを用いた。アイソタイプコントロール（図1-2中では「アイソタイプ」と称する）として抗リゾチーム抗体を調製して使用した。単剤条件として、培養培地に最高濃度50000 ng/mLから約3倍公比で段階希釈したhKM3900__tA2-32LH、又は培養培地に最高濃度50000 ng/mLから約3倍公比で段階希釈したアテゾリズマブアナログを添加した。また併用条件として、濃度50000 ng/mLのアテゾリズマブアナログを含む培養培地に最高濃度50000 ng/mLから約3倍公比で段階希釈したhKM3900__tA2-32LHを20 μ Lずつ添加した。添加後のアテゾリズマブアナログの最終濃度は10 μ g/mLである。添加後、37℃、5% CO₂インキュベーター培養で培養した。5日後、AlphaLISA インターフェロン- γ 測定キット（Perkin Elmer社、AL217C）を用いてメーカー推奨のプロトコルに従って培養上清中のインターフェロン- γ 産生量を測定した。図1-2にインターフェロン- γ 産生量を示す。各条件について平均値及び標準偏差を算出した。hKM3900__tA2-32LH及びアテゾリズマブアナログはヒトCLDN4発現がん細胞株とExpanded PanT細胞の共培養系においてインターフェロン- γ 産生促進作用を示した。hKM3900__tA2-32LHとアテゾリズマブアナログの併用によるインターフェロン- γ 産生促進作用は、hKM3900__tA2-32LH又はアテゾリズマブアナログの単剤より強かった。

[0094] [実施例4：抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗マウスPD-1抗体のin vivo併用効果]

ヒトCLDN4発現B16-F10細胞を移植したB-h4-1BBマウス（ヒトCD137ノックインマウス）を用いて抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗ヒトPD-1抗体のin vivo抗腫瘍効果の検討

を行った。

[0095] [実施例4-1: ヒトCLDN4発現B16-F10細胞の構築]

マウスメラノーマ細胞株のB16-F10細胞は、American Type Culture Collection (ATCC、CRL-6475) から入手した。終濃度10%非働化ウシ胎児血清 (FBS) (Cytiva社、SH30084.03) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (SIGMA社、D6429) (調製後の培地を以下、「イーグル培養培地」と称する) にて37℃、5%CO₂の条件下で培養した。CLDN4 (Myc-DDK-tagged)-Human claudin 4 (CLDN4) (ORIGENE社、RC200490) をjetPRIME (Polyplus-transfection、114-15) を用いてB16-F10細胞に導入した。終濃度1mg/mLのG418 (ナカライテスク社、09380-44) を添加したイーグル培養培地での選択によりヒトCLDN4を安定発現するB16-F10細胞クローン (以下「ヒトCLDN4発現B16-F10細胞」と称する) を取得した。

[0096] [実施例4-2: 抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗マウスPD-1抗体のin vivo抗腫瘍作用における併用効果]

B-h4-1BB雄性マウス (C57BL/6-Tnfrsf9^{tm1} (Tnfrsf9) /Bcgen; Biocytogen社、110004) (以下「マウス」と称する) を入手して繁殖させた。ヒトCLDN4発現B16-F10細胞をPBS (-) (WAKO社、045-29795) に懸濁し、4×10⁶個/mLの細胞懸濁液を調製した。6週齢のマウスの背部の皮下に細胞懸濁液を2×10⁵細胞/50μLずつ接種した。細胞接種3日後にノギス (ミットヨ社、CD-15AXR) を用いて腫瘍径を測定した。腫瘍体積 [mm³] の計算には次式を用いた。

$$[\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)}] = [\text{腫瘍の長径 (mm)}] \times [\text{腫瘍の短径 (mm)}]^2 \times 0.5$$

[0097] 腫瘍体積が各群均等になるように細胞接種したマウスを群分けし (n=1

0)、被験抗体の投与を開始した。投与の初日を0日目と定義した。被験抗体として実施例1で取得した抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体であるhKM3900__tA2-32LH、抗PD-1抗体として抗マウスPD-1抗体(Bio X Cell、BE0146)を用いた。hKM3900__tA2-32LHのアイソタイプコントロール抗体として抗リゾチーム抗体を、抗マウスPD-1抗体のアイソタイプコントロール抗体としてラットIgG2aアイソタイプコントロール抗体(Bio X Cell、BE0089)(図2では「コントロール」と称する)を用いた。試験を行った4グループに投与した被験抗体、投与量、投与スケジュール等の詳細を以下に示す。

(1) グループ1: コントロール群

0日目と7日目に抗リゾチーム抗体を0.3mg/kgで腹腔内投与し、0、4、7、11日目にラットIgG2aアイソタイプコントロール抗体を100μg/headで腹腔内投与した。

(2) グループ2: hKM3900__tA2-32LH投与群

0日目と7日目にhKM3900__tA2-32LHを0.3mg/kgで腹腔内投与し、0、4、7、11日目にラットIgG2aアイソタイプコントロール抗体を100μg/headで腹腔内投与した。

(3) グループ3: 抗マウスPD-1抗体投与群

0日目と7日目に抗リゾチーム抗体を0.3mg/kgで腹腔内投与し、0、4、7、11日目に抗マウスPD-1抗体を100μg/headで腹腔内投与した。

(4) グループ4: hKM3900__tA2-32LH及び抗マウスPD-1抗体の併用投与群

0日目と7日目にhKM3900__tA2-32LHを0.3mg/kgで腹腔内投与し、0、4、7、11日目に抗マウスPD-1抗体を100μg/headで腹腔内投与した。

各グループの4、7、11、14日目に腫瘍体積を評価した。グループ2

及びグループ3の14日目の腫瘍体積をグループ4のそれとunpaired Student's t検定によって比較した(図2)。

- [0098] 図2に示すように、hKM3900__tA2-32LHと抗マウスPD-1抗体の併用群の腫瘍体積は、hKM3900__tA2-32LH単独投与群及び抗マウスPD-1抗体単独投与群のそれよりも有意に小さかった。この結果は、ヒトのがんの治療において、抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体と抗PD-1抗体の併用は、それぞれの単独投与よりも高い抗腫瘍効果が得られる可能性があることを示唆している。

産業上の利用可能性

- [0099] 本発明の抗CLDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤の併用によるがんの治療方法は、がんの治療に有用であると期待される。

配列表フリーテキスト

- [0100] 配列番号2はhKM3900__tA2-32LH HCのアミノ酸配列であり、配列番号1に示される塩基配列は、配列番号2に示されるhKM3900__tA2-32LH重鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号4はhKM3900 LCのアミノ酸配列であり、配列番号3に示される塩基配列は、配列番号4に示されるhKM3900軽鎖のアミノ酸配列をコードする塩基配列である。配列番号5～14は発明の詳細な説明にて記載した各種リンカーのアミノ酸配列である。

請求の範囲

- [請求項1] 抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体を含む、対象のがんを治療するための医薬組成物であって、該二重特異性抗体が抗CLDN4抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、PD－1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物。
- [請求項2] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号31から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号2のアミノ酸番号50から66までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号2のアミノ酸番号99から112までのアミノ酸配列からなるCDR3を含み、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号24から35までのアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号4のアミノ酸番号51から57までのアミノ酸配列からなるCDR2及び配列番号4のアミノ酸番号90から98までのアミノ酸配列からなるCDR3を含む、請求項1に記載の医薬組成物。
- [請求項3] 抗CLDN4抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号1から123までのアミノ酸配列からなり、抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域が配列番号4のアミノ酸番号1から109までのアミノ酸配列からなる、請求項1又は2に記載の医薬組成物。
- [請求項4] 抗CLDN4－抗CD137二重特異性抗体が、抗CLDN4抗体の重鎖可変領域を含む重鎖及び抗CLDN4抗体の軽鎖可変領域を含む軽鎖からなるIgG抗体（抗CLDN4 IgG抗体）を含む、請求項1～3のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項5] 抗CLDN4 IgG抗体のFc領域にLALA変異（L234A及びL235A）若しくはP331G変異（ここで、前記変異位置はヒトIgγ1定常領域におけるEUインデックスに従うアミノ酸位置である）のいずれか又は両方を含む、請求項4に記載の医薬組成物。
- [請求項6] 抗CD137抗体の重鎖可変領域が配列番号2のアミノ酸番号62

5 から 6 2 9 までのアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 2 のアミノ酸番号 6 4 4 から 6 5 9 までのアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 2 のアミノ酸番号 6 9 2 から 7 0 1 までのアミノ酸配列からなる C D R 3 を含み、抗 C D 1 3 7 抗体の軽鎖可変領域が配列番号 2 のアミノ酸番号 4 8 6 から 4 9 8 までのアミノ酸配列からなる C D R 1、配列番号 2 のアミノ酸番号 5 1 4 から 5 2 0 までのアミノ酸配列からなる C D R 2 及び配列番号 2 のアミノ酸番号 5 5 3 から 5 6 3 までのアミノ酸配列からなる C D R 3 を含む、請求項 1 ～ 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項7] 抗 C D 1 3 7 抗体の重鎖可変領域が配列番号 2 のアミノ酸番号 5 9 5 から 7 1 2 までのアミノ酸配列からなり、抗 C D 1 3 7 抗体の軽鎖可変領域が配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 4 から 5 7 3 までのアミノ酸配列からなる、請求項 1 ～ 6 のいずれか一項に記載の医薬組成物

[請求項8] 抗 C L D N 4 －抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体が、抗 C D 1 3 7 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む抗 C D 1 3 7 一本鎖可変領域フラグメント（抗 C D 1 3 7 s c F v）を含む、請求項 6 又は 7 に記載の医薬組成物。

[請求項9] 抗 C D 1 3 7 s c F v が配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 4 から 7 1 2 までのアミノ酸配列からなる、請求項 8 に記載の医薬組成物。

[請求項10] 抗 C L D N 4 －抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体が、抗 C L D N 4 I g G 抗体及び抗 C D 1 3 7 s c F v を含み、抗 C L D N 4 I g G 抗体の重鎖カルボキシ末端に抗 C D 1 3 7 s c F v のアミノ末端がリンカーを介して連結されている、請求項 8 又は 9 に記載の医薬組成物。

[請求項11] 抗 C L D N 4 －抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体を含む、対象のがんを治療するための医薬組成物であって、該二重特異性抗体が配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 1 2 3 までのアミノ酸配列からなる重鎖可変領域を含む抗 C L D N 4 抗体の重鎖及び配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 1 0 9 までのアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む抗 C L D N

4 抗体の軽鎖、並びに配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 4 から 5 7 3 までのアミノ酸配列からなる抗 C D 1 3 7 抗体の軽鎖可変領域及び配列番号 2 のアミノ酸番号 5 9 5 から 7 1 2 までのアミノ酸配列からなる抗 C D 1 3 7 抗体の重鎖可変領域を含む抗 C D 1 3 7 s c F v を含み、該抗 C L D N 4 抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗 C D 1 3 7 s c F v のアミノ末端がリンカーを介して連結されている、P D - 1 シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物。

[請求項12] 抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体を含む、対象のがんを治療するための医薬組成物であって、該二重特異性抗体が、配列番号 2 のアミノ酸番号 1 から 4 5 3 までのアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の重鎖及び配列番号 4 のアミノ酸番号 1 から 2 1 5 までのアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の軽鎖、並びに配列番号 2 のアミノ酸番号 4 6 4 から 7 1 2 までのアミノ酸配列からなる抗 C D 1 3 7 s c F v を含み、該抗 C L D N 4 抗体の重鎖カルボキシ末端に該抗 C D 1 3 7 s c F v のアミノ末端がリンカーを介して連結されている、P D - 1 シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物。

[請求項13] リンカーが G S リンカーである、請求項 1 0 ~ 1 2 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項14] 抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体を含む、対象のがんを治療するための医薬組成物であって、該二重特異性抗体が配列番号 2 のアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の重鎖及び抗 C D 1 3 7 s c F v を含むポリペプチド、並びに配列番号 4 のアミノ酸配列からなる抗 C L D N 4 抗体の軽鎖を含み、P D - 1 シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、医薬組成物。

[請求項15] 抗 C L D N 4 - 抗 C D 1 3 7 二重特異性抗体が翻訳後修飾されたものである、請求項 1 ~ 1 4 のいずれか一項に記載の医薬組成物。

[請求項16] P D - 1 シグナル阻害剤と同時に、連続的に又は逐次的に組み合わせて使用される、請求項 1 ~ 1 5 のいずれか一項に記載の医薬組成物

。

- [請求項17] 抗CDN4-抗CD137二重特異性抗体とPD-1シグナル阻害剤が(i)同一の医薬組成物に含まれており同時に投与される、又は(ii)別々の医薬組成物に含まれており、同時に、連続的に若しくは逐次的に組み合わせて使用される、請求項1～16のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項18] がんが、大腸がん、膀胱がん及び肺がんからなる群から選択される、請求項1～17のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項19] PD-1シグナル阻害剤が、PD-1、PD-L1及びPD-L2からなる群から選択される1以上のタンパク質に結合する抗体又はこれらの抗原結合フラグメントである、請求項1～18のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項20] PD-1シグナル阻害剤が、ニボルマブ、ペンブロリズマブ、ピジリズマブ、スパルタリズマブ及びセミプリマブからなる群から選択される抗PD-1抗体である、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項21] PD-1シグナル阻害剤が、アテゾリズマブ、デュルバルマブ及びアベルマブからなる群から選択される抗PD-L1抗体である、請求項1～19のいずれか一項に記載の医薬組成物。
- [請求項22] 対象のがんを治療するために使用される抗CDN4-抗CD137二重特異性抗体であって、該二重特異性抗体が抗CDN4抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗CD137抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含み、PD-1シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、二重特異性抗体。
- [請求項23] 対象のがんを治療するために使用される抗CDN4-抗CD137二重特異性抗体であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸配列からなる抗CDN4抗体の重鎖及び抗CD137 scFvを含むポリペプチド、並びに配列番号4のアミノ酸配列からなる抗CDL

D N 4 抗体の軽鎖からなる二重特異性抗体を含み、P D - 1 シグナル阻害剤と組み合わせて使用される、二重特異性抗体。

[請求項24] 抗C L D N 4 - 抗C D 1 3 7 二重特異性抗体とP D - 1 シグナル阻害剤を対象に投与することを含むがんの治療方法であって、該抗C L D N 4 - 抗C D 1 3 7 二重特異性抗体が抗C L D N 4 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗C D 1 3 7 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、治療方法。

[請求項25] 抗C L D N 4 - 抗C D 1 3 7 二重特異性抗体とP D - 1 シグナル阻害剤を組み合わせて対象に投与することを含むがんの治療方法であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸配列からなる抗C L D N 4 抗体の重鎖及び抗C D 1 3 7 s c F v を含むポリペプチド、並びに配列番号4のアミノ酸配列からなる抗C L D N 4 抗体の軽鎖を含む、治療方法。

[請求項26] 対象のがんを治療するためにP D - 1 シグナル阻害剤と組み合わせて使用される医薬組成物の製造のための抗C L D N 4 - 抗C D 1 3 7 二重特異性抗体の使用であって、該二重特異性抗体が抗C L D N 4 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域、並びに抗C D 1 3 7 抗体の重鎖可変領域及び軽鎖可変領域を含む、使用。

[請求項27] 対象のがんを治療するためにP D - 1 シグナル阻害剤と組み合わせて使用される医薬組成物の製造のための抗C L D N 4 - 抗C D 1 3 7 二重特異性抗体の使用であって、該二重特異性抗体が配列番号2のアミノ酸配列からなる抗C L D N 4 抗体の重鎖及び抗C D 1 3 7 s c F v を含むポリペプチド、並びに配列番号4のアミノ酸配列からなる抗C L D N 4 抗体の軽鎖を含む、使用。