

(19) 日本国特許庁(JP)

## (12) 特許公報(B1)

(11) 特許番号

特許第6856183号  
(P6856183)

(45) 発行日 令和3年4月7日(2021.4.7)

(24) 登録日 令和3年3月22日(2021.3.22)

(51) Int.Cl.	F 1
A 6 1 K 39/395 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 U
C 1 2 N 15/13 (2006.01)	A 6 1 K 39/395 N
C 0 7 K 16/18 (2006.01)	C 1 2 N 15/13 Z N A
C 0 7 K 16/28 (2006.01)	C 0 7 K 16/18
C 0 7 K 16/46 (2006.01)	C 0 7 K 16/28

請求項の数 7 (全 43 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2020-570992 (P2020-570992)  
 (86) (22) 出願日 令和2年7月29日 (2020.7.29)  
 (86) 国際出願番号 PCT/JP2020/028972  
 審査請求日 令和2年12月18日 (2020.12.18)  
 (31) 優先権主張番号 特願2019-139751 (P2019-139751)  
 (32) 優先日 令和1年7月30日 (2019.7.30)  
 (33) 優先権主張国・地域又は機関  
 日本国 (JP)

早期審査対象出願

(73) 特許権者 000185983  
 小野薬品工業株式会社  
 大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号  
 (74) 代理人 110000796  
 特許業務法人三枝国際特許事務所  
 (72) 発明者 柴山 史朗  
 茨城県つくば市和台17番地2 小野薬品  
 工業株式会社内  
 (72) 発明者 新坊 拓也  
 茨城県つくば市和台17番地2 小野薬品  
 工業株式会社内  
 (72) 発明者 手塚 智也  
 茨城県つくば市和台17番地2 小野薬品  
 工業株式会社内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】二重特異性抗体

## (57) 【特許請求の範囲】

## 【請求項 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し、PD-1およびCD3に対して特異的に結合する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医薬組成物であって、

(A) PD-1に特異的に結合する第一アームは、配列番号5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を有し、および

(B) CD3に特異的に結合する第二アームは、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25のアミノ酸配列からなるVLを有する、当該医薬組成物。

## 【請求項 2】

IgG<sub>1</sub>抗体である請求項1記載の医薬組成物。

10

## 【請求項 3】

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する、請求項1または2記載の医薬組成物。

## 【請求項 4】

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、請求項1～3の何れか一項記載の医薬組成物。

## 【請求項 5】

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CD3に特異的に結合する第二アームのVLを有する軽鎖が、各々、配列番号29のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域

20

を有する、請求項 1 ~ 4 の何れか一項記載の医薬組成物。

**【請求項 6】**

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し、P D-1およびCD3に対して特異的に結合する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医薬組成物であって、ここで、当該二重特異性抗体は、

- (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、
- (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、
- (C) CD3に特異的に結合する第二アームのVHを有する重鎖、および
- (D) CD3に特異的に結合する第二アームのVLを有する軽鎖からなり、

(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5のアミノ酸配列からなるVHおよび配列番号2 3のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域を有し、

(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2 5のアミノ酸配列からなるVLおよび配列番号2 9のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域を有し、

(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3 6のアミノ酸配列からなるVHならびに配列番号2 4のアミノ酸配列からなる重鎖定常領域を有し、ならびに

(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2 5のアミノ酸配列からなるVLおよび配列番号2 9のアミノ酸配列からなる軽鎖定常領域を有する、当該医薬組成物。

**【請求項 7】**

さらに、薬学的に許容できる担体を含む請求項 1 ~ 6 の何れか一項記載の医薬組成物。

**【発明の詳細な説明】**

**【技術分野】**

**【0 0 0 1】**

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」と略記することがある。）またはその抗体断片（以下、これらをあわせて「PD-1/CD3二重特異性抗体等」と略記することがある。）、これを有効成分として含む医薬組成物およびにそれらの医薬治療用途に関する。

**【背景技術】**

**【0 0 0 2】**

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。

**【0 0 0 3】**

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。

**【0 0 0 4】**

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。

**【0 0 0 5】**

10

20

30

40

50

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等は、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。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】

【0006】

【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

10

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

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】

【0008】

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/CD3二重特異性抗体等に着目し、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。

20

【0009】

さらに、本発明の発明者らは、当該PD-1/CD3二重特異性抗体等が、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/CD3二重特異性抗体等の自己免疫疾患等への予防、症状進展抑制、再発抑制または治療効果の増強ないし持続に寄与していることを見出した。

【0010】

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（以下、これについても前記と同様に、「PD-1/CD3二重特異性抗体」と略記することがある。）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が、

30

(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、

40

(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

50

(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を有し、ここで、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、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。10

[2] PD-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、20

(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、20

(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、20

(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、ならびに20

(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、30

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、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。30

[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、40

(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。40

[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、50

(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 3 8 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および  
 ( c ) 配列番号 3 9 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。
- [ 5 ] ( 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 1 2 のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、  
 ( b ) 配列番号 1 3 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および  
 ( c ) 配列番号 1 4 のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有し、  
 ( i i ) CD3に特異的に結合する第二アームのVHが、  
 ( a ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、  
 ( b ) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および 10  
 ( c ) 配列番号 3 9 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。
- [ 6 ] ( 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 1 5 のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、  
 ( b ) 配列番号 1 6 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および  
 ( c ) 配列番号 1 7 のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有し、  
 ( i i ) CD3に特異的に結合する第二アームのVHが、  
 ( a ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、  
 ( b ) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および  
 ( c ) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有する、前項 [ 1 ] または [ 2 ] 20  
 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。
- [ 7 ] ( 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 1 8 のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、  
 ( b ) 配列番号 1 9 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および  
 ( c ) 配列番号 2 0 のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有し、  
 ( i i ) CD3に特異的に結合する第二アームのVHが、  
 ( a ) 配列番号 3 7 のアミノ酸配列からなるVH-CDR1、  
 ( b ) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および  
 ( c ) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有する、前項 [ 1 ] または [ 2 ] 30  
 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。
- [ 8 ] 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  
 が、  
 ( a ) H Y J <sup>1</sup> L H で表されるアミノ酸配列 [ 配列中、 J <sup>1</sup> は、 G ( グリシン ) または A  
 ( アラニン ) を表わし、 ここで、 J <sup>1</sup> 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 ) W J <sup>2</sup> N T N T U <sup>2</sup> N P T X <sup>2</sup> A Q G F T G で表されるアミノ酸配列 [ 配列中、 J  
<sup>2</sup> は、 L ( ロイシン ) または I ( イソロイシン ) を表わし、 U <sup>2</sup> は、 E ( グルタミン酸 )  
 または G ( グリシン ) を表わし、 X <sup>2</sup> 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 <sup>2</sup> 、 U <sup>2</sup> および X <sup>2</sup> 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 40  
 同じ意味を表わす。 ] からなるVH-CDR2、および  
 ( c ) G D J <sup>3</sup> V V P T T I W N Y Y U <sup>3</sup> X <sup>3</sup> M Z <sup>3</sup> V で表されるアミノ酸配列 [ 配列中、 J  
<sup>3</sup> は、 M ( メチオニン ) または L ( ロイシン ) を表わし、 U <sup>3</sup> は、 H ( ヒスチジン )  
 または Y ( チロシン ) を表わし、 X <sup>3</sup> は、 F ( フェニルアラニン ) または Y ( チロシン )  
 を表わし、 Z <sup>3</sup> 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 <sup>3</sup> 、 U <sup>3</sup> 、 X <sup>3</sup> および Z <sup>3</sup> 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を有し、ならびに  
 CD3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VH-CDR1、  
 ( b ) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および 50

(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) J<sup>1</sup>はG(グリシン)を表わし、J<sup>2</sup>はL(ロイシン)を表わし、U<sup>2</sup>はE(グルタミン酸)を表わし、X<sup>2</sup>はF(フェニルアラニン)を表わし、J<sup>3</sup>はM(メチオニン)を表わし、U<sup>3</sup>はH(ヒスチジン)を表わし、X<sup>3</sup>はF(フェニルアラニン)を表わし、およびZ<sup>3</sup>はD(アスパラギン酸)を表わすか、

(b) J<sup>1</sup>はG(グリシン)を表わし、J<sup>2</sup>はI(イソロイシン)を表わし、U<sup>2</sup>はG(グリシン)を表わし、X<sup>2</sup>はY(チロシン)を表わし、J<sup>3</sup>はL(ロイシン)を表わし、U<sup>3</sup>はH(ヒスチジン)を表わし、X<sup>3</sup>はY(チロシン)を表わし、およびZ<sup>3</sup>はE(グルタミン酸)を表わすか、

(c) J<sup>1</sup>はA(アラニン)を表わし、J<sup>2</sup>はL(ロイシン)を表わし、U<sup>2</sup>はE(グルタミン酸)を表わし、X<sup>2</sup>はY(チロシン)を表わし、J<sup>3</sup>はM(メチオニン)を表わし、U<sup>3</sup>はY(チロシン)を表わし、X<sup>3</sup>はY(チロシン)を表わし、およびZ<sup>3</sup>はD(アスパラギン酸)を表わすか、または

(d) J<sup>1</sup>はA(アラニン)を表わし、J<sup>2</sup>はL(ロイシン)を表わし、U<sup>2</sup>はE(グルタミン酸)を表わし、X<sup>2</sup>はF(フェニルアラニン)を表わし、J<sup>3</sup>はM(メチオニン)を表わし、U<sup>3</sup>はH(ヒスチジン)を表わし、X<sup>3</sup>はF(フェニルアラニン)を表わし、およびZ<sup>3</sup>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ていてもよい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領域を含む、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ていてもよい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領域を含む、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ていてもよい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領域を含む、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

10

20

30

40

50

J H 6 c の体細胞突然変異を受けていてもよい当該遺伝子（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。  
10

[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

[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  
30  
、

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。  
40

[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。  
40

[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。  
40

[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〔6〕記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片  
50

。

[ 2 6 ] 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 3 6 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。

[ 2 7 ] 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 2 6 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 2 7 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 2 8 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 ] ~ [ 2 6 ] 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。

[ 2 8 ] 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 2 5 のアミノ酸配列からなるVLを有する、前項 [ 1 ] ~ [ 2 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。

[ 2 9 ] 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、

20

( A ) PD-1に特異的に結合する第一アームが、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 2 5 のアミノ酸配列からなるVLを有し、ならびに

( B ) CD3に特異的に結合する第二アームが、配列番号 3 6 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VLを有する、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 3 0 ] 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一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VL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、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

30

[ 3 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、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一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VL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。

40

[ 3 2 ] 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 3 6 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VL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、前項 [ 3 0 ] または [ 3 1 ] 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 3 3 ] CD3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VH-CDR1、

( b ) 配列番号 3 8 のアミノ酸配列からなるVH-CDR2および

( c ) 配列番号 3 9 のアミノ酸配列からなるVH-CDR3を有するVHを有する、前項 [ 3 0 ] または [ 3 1 ] 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

50

[ 3 4 ] CD3に特異的に結合する第二アームのVHが、配列番号 3 6 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 [ 3 0 ]、[ 3 1 ] および [ 3 3 ] 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。

[ 3 5 ] CD3に特異的に結合する第二アームのVH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PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 3 6 ] CD3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VL-CDR1、

( b ) 配列番号 2 7 のアミノ酸配列からなるVL-CDR2および

( c ) 配列番号 2 8 のアミノ酸配列からなるVL-CDR3を有するVLを有する、前項 [ 3 0 ] 10 、[ 3 1 ] および [ 3 3 ] ~ [ 3 5 ] 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。

[ 3 7 ] CD3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VL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PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 3 8 ] PD-1/CD3二重特異性抗体が、IgG抗体である、前項 [ 1 ] ~ [ 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。

[ 3 9 ] 前項 [ 3 8 ] 記載のIgG抗体が、IgG<sub>1</sub>抗体またはIgG<sub>4</sub>抗体である、前項 [ 3 8 ] 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 4 0 ] 前項 [ 3 8 ] 記載のIgG抗体が、IgG<sub>1</sub>抗体である、前項 [ 3 8 ] 記載のPD-1/CD 20 3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 4 1 ] 前項 [ 3 8 ] 記載のIgG抗体が、IgG<sub>4</sub>抗体である、前項 [ 3 8 ] 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 4 2 ] 当該IgG<sub>1</sub>抗体のFc受容体への結合が消失あるいは減弱された前項 [ 4 0 ] 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 4 3 ] 前項 [ 4 0 ] 記載のIgG<sub>1</sub>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 [ 4 0 ] または [ 4 2 ] 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[ 4 4 ] 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 [ 4 0 ]、[ 4 2 ] または [ 4 3 ] 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。 30

[ 4 5 ] 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 [ 4 0 ]、[ 4 2 ] または [ 4 3 ] 記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。 40

[ 4 6 ] 前項 [ 4 0 ] および [ 4 2 ] ~ [ 4 5 ] の何れか一項記載のIgG<sub>1</sub>抗体の2個の重鎖定常領域中のEU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 [ 4 0 ] および [ 4 2 ] ~ [ 4 5 ] 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。

[ 4 7 ] 胎児性Fc受容体（以下、「FcRn」と略記することがある。）への結合が消失あるいは減弱した前項 [ 3 8 ] ~ [ 4 6 ] 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。

[ 4 8 ] 当該IgG<sub>1</sub>抗体における2個の重鎖定常領域中の(1) EUナンバリングシステムにおける252番目のメチオニンがグルタミン酸、プロリン、アルギニンもしくはアスパラ

ギン酸に、(2) EUナンバリングシステムによる434番目のアスパラギンがロイシンに、および/または(3) EUナンバリングシステムによる438番目のグルタミンがグルタミン酸に各々置換された前項[40]、[42]～[47]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。

[49] 当該IgG<sub>1</sub>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252番目のメチオニンがアスパラギン酸に置換された前項[40]、[42]～[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] 前項[48]または[49]記載のIgG<sub>1</sub>抗体の血液中での半減期が、当該アミノ酸置換されていないもとの抗体に比べ短縮された特徴を有する、前項[48]または[49]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。 10

[51] 前項[48]または[49]記載のIgG<sub>1</sub>抗体の血液中での半減期が、当該アミノ酸置換されていないもとの抗体に比べ、少なくとも50%、少なくとも60%、少なくとも70%、少なくとも80%または少なくとも90%短縮された特徴を有する、前項[48]または[49]記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[52] 前項[41]記載のIgG<sub>4</sub>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。

[53] 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、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46および配列番号47から選択される何れか一つ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]、[43]および[45]～[51]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。 20

[54] 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、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52および配列番号53から選択される何れか一つ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]、[43]、[45]～[51]および[53]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。

[55] 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重鎖定常領域を含む、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。 30

[56] 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、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46および配列番号47から選択される何れか一つ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重鎖定常領域を含み、 40

(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、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52および配列番号53から選択される何れか一つ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重鎖定常領域を含む、PD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。

[57] 標的細胞に発現するPD-1およびCD3に各々特異的に結合する、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 50

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。

〔59〕 投与中あるいは投与してから24時間以内におけるサイトカイン産生が十分に低減された、前項〔1〕～〔58〕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。

〔60〕 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〕～〔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。

〔61〕 サイトカインが、少なくともIL-2、IFN- $\gamma$  またはTNF- $\alpha$  である、前項〔59〕または〔60〕記載のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片。 10

〔62〕 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〕～〔61〕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。

〔63〕 CD3が、CD3 $\epsilon$ である、前項〔1〕～〔62〕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。

〔64〕 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〕～〔63〕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。

〔65〕 PD-1/CD3二重特異性抗体が、単離抗体である、前項〔1〕～〔64〕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〕～〔65〕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医薬組成物。 20

〔1-2〕 さらに、薬学的に許容できる担体を含む前項〔1-1〕記載の医薬組成物。

〔2-1〕 前項〔1〕～〔65〕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、キャッスルマン病、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症候群、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、自己免疫性胰炎など）、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、ループス腎炎、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、慢性炎症性脱髓性多発神経炎、多巣性運動ニューロパシー、サルコイドーシス、巨細胞性動脈炎、筋萎縮性側索硬化症、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。 30

〔2-3〕 前項〔1〕～〔65〕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。 40

50

[ 2 - 4 ] インスリン製剤（例えば、ヒトインスリン、インスリングラルギン、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）、- 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statt、メキシレチン、イミダブリル等）、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、I型糖尿病の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療剤。10

[ 2 - 5 ] ステロイド薬（例えば、コルチゾン、コルチゾン酢酸エステル、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンリン酸エステルナトリウム、ヒドロコルチゾンコハク酸エステルナトリウム、フルドロコルチゾン酢酸エステル、プレドニゾロン、プレドニゾロン酢酸エステル、プレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、ブチル酢酸プレドニゾロン、プレドニゾロンリン酸エステルナトリウム、ハロプレドン酢酸エステル、メチルプレドニゾロン、メチルプレドニゾロン酢酸エステル、メチルプレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、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、デキサメタゾン酢酸エステル、デキサメタゾン吉草酸エステル、デキサメタゾンシペシル酸エステル、デキサメタゾンバルミチン酸エステル、デキサメタゾンプロピオン酸エステル、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム、デキサメタゾンメタスルホ安息香酸エステルナトリウム、パラメタゾン、パラメタゾン酢酸エステル、ベタメタゾン、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル、ベタメタゾン吉草酸エステル、ベタメタゾン酢酸エステル、ベタメタゾン酪酸エステルプロピオン酸エステルおよびベタメタゾンリン酸エステルナトリウム等）、インターフェロン -1a、インターフェロン -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、シクロスボリン、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 ] ~ [ 6 5 ] 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。30

[ 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、シクロスボリン、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ともに投与されることを特徴とし、前項 [ 1 ] ~ [ 6 5 ] 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、トリシリズマブ、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 ] ~ [ 6 5 ] 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、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。40

[ 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 ] ~ [ 6 5 ] 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50

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 ] ~ [ 6 5 ] 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。 10

[ 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 ] ~ [ 6 5 ] の何れか一項から選択される当該二重特異性抗体もしく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。

[ 4 - 2 ] 自己免疫疾患の予防、症状進展抑制、再発抑制および／または治療に使用される、前項 [ 1 ] ~ [ 6 5 ] の何れか一項から選択される当該二重特異性抗体もしくはその抗体断片。

[ 4 - 3 ] 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 ] ~ [ 6 5 ] の何れか一項から選択される当該二重特異性抗体もしくはその抗体断片の使用。 20

#### 【発明の効果】

#### 【0011】

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体は、サイトカインの產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ることが期待できる。また、PD-1およびPD-L1間の相互作用を許容する特徴が、その予防、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に寄与することが期待できる。

#### 【図面の簡単な説明】

#### 【0012】

【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。）各クローニングの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、各クローニング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。 40

【図5】抗PD-1抗体各クローニングのVHのアミノ酸配列を示す。

【図6】抗PD-1抗体各クローニングの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。）クローニングCD3-2のVHのアミノ酸配列を示す。

【図8】抗CD3抗体クローニング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】WO2005/118635に記載された抗CD3抗体クローニング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、クローニングCD3-1の作製においてアラニンに変換される5 50

5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(登録商標)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- $\gamma$ 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。  
10

【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PD-1-5(Bi)の交差競合性を示す。  
20

【図20】末梢血単核球細胞移植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の作用結果を示す。図中、「\*」、「\*\*」および「\*\*\*」は、比較対象とのt検定により、各々p<0.05、p<0.01およびp<0.001で有意であることを表す。

【図21】マウス抗体産生モデルにおけるPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体の作用結果を示す。図中、「\*」および「\*\*」は、各評価日におけるControlとのt検定により、各々p<0.05およびp<0.01で有意であることを表す。

【図22】自然発症糖尿病モデルマウスにおけるPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体の治療効果を示す。

【図23】PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローンPD1-5(Bi)およびMut1~Mut3のヒトFcRn結合性を、Biacore(登録商標)にて評価した結果を示す。  
30

【図24】PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローンMut4~Mut6のヒトFcRn結合性を、Biacore(登録商標)にて評価した結果を示す。

【図25】PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローンPD1-5(Bi)、Mut1およびMut4のマウスFcRn結合性を、Biacore(登録商標)にて評価した結果を示す。

【図26】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クローンMut4の治療効果を示す。図中、「\*\*」は、Wilcoxon順位和検定(正確法)により、p<0.01で有意であることを表す。

#### 【発明を実施するための形態】

##### 【0013】

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。  
40

##### 【0014】

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(、  
、  
および  
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  
50

ある。本発明において、CD3として好ましくはCD3であり、また、ヒトCD3であり、より好ましくはヒトCD3である。

【0015】

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雜物の中から同定、分離および/または精製されることにより、実質的に单一の純粹な成分となることを意味する。

【0016】

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。

【0017】

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。

【0018】

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。

【0019】

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)<sub>2</sub>、二重特異性ミニボディ、二重特異性F(ab<sub>1,2</sub>)<sub>2</sub>、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)<sub>2</sub>、二重特異性F(ab<sub>1,2</sub>-ジッパー)<sub>2</sub>、二重特異性(Fv-ジッパー)<sub>2</sub>、二重特異性三鎖抗体、二重特異性mAb<sup>2</sup>、Addbody（登録商標）およびMirabody（登録商標）等がある。

【0020】

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）。

【0021】

二重特異性sc(Fv)<sub>2</sub>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結する一本鎖の形態で產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）。

【0022】

二重特異性F(ab<sub>1,2</sub>)<sub>2</sub>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。

【0023】

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), Vo.31, No.6, p.1579-1584参照）。

【0024】

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。

【0025】

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。

【0026】

10

20

30

40

50

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產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。

【0027】

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、Hongoら、Hybridoma (1995), Vol. 14, No. 3, p.253-260、Harlowら、Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988), Vol. 2)およびHammerlingら、Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas, p.563-681(Elsevier, N.Y., 1981)参照）、組換えDNA法（例えば、US4816567参照）、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、McCaffertyらのUS5969108およびUS6172197およびGriffithsらのUS5885793、US6521404、US6544731、US6555313、US6582915およびUS6593081参照）で作製することができる。  
10

【0028】

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。

【0029】

「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US4816567参照）。

  
20

【0030】

「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）。

  
30

【0031】

「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、ヒト抗体を產生するように形質転換されたマウス、例えば、Humab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）、KMマウス（例えば、IshidaらのWO2002/43478参照）、Xenomouse（例えば、US5939598、US6075181、US6114598、US6150584およびUS6162963参照）またはTc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、ヒト免疫細胞を再構築したSCID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。  
40

【0032】

本明細書において、PD-1/CD3二重特異性抗体の「抗体断片」とは、全長抗体の一部であって、PD-1に対する抗原結合部分およびCD3に対する抗原結合部分を有する抗体であり、例えば、 $F(ab')_2$ 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  
50

することができる最少単位を意味し、例えば、VHおよびVLにある各々3つずつのCDRとそれらCDRの組合せにより目的の抗原が認識できるようCDRを配置するフレームワーク領域から構成される。

### 【0033】

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、各々の抗原に對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、WO2004/009618、WO2009/157771およびWO2014/051433)。そのような共通軽鎖として好ましくは、例えば、ヒト 軽鎖IgV 1-39\*01/IGJ 1\*01 (IMGT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、IGVK1-39/JK1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-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。10

### 【0034】

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IgG<sub>1</sub>またはIgG<sub>4</sub>である。ここで、IgG<sub>1</sub>としては、Fc受容体(例えば、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IgG<sub>1</sub>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するために、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、血液中での半減期を短縮させるためには、特に、FcRnへの結合が消失あるいは減弱したものも好ましい。具体的には、重鎖定常領域におけるFcRn結合部位に属するアミノ酸の置換または欠損により同受容体への結合を消失あるいは減弱させることができるが、IgG<sub>1</sub>抗体である場合、そのような抗体としては、例えば、(1) EUナンバリングシステムによる252番目のメチオニンがグルタミン酸、プロリン、アルギニンもしくはアスパラギン酸に、(2) EUナンバリングシステムによる434番目のアスパラギンがロイシンに、および/または(3) EUナンバリングシステムによる438番目のグルタミンがグルタミン酸に各々置換されたものが挙げられる。一方、二重特異性抗体がIgG<sub>4</sub>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变体がより好ましい。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たるアミノ酸位置はKabatにしたがって規定される場合がある(Sequences 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EUナンバリングシステム(Sequences of proteins of immunological interest, NIH Publication No. 91-3242参照)に従って表わされる。203040

### 【0035】

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EUナンバリングシステムによる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50

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E U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。

### 【0036】

#### PD-1に特異的に結合する第一アーム

10

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、 $1 \times 10^{-5}$ M、好ましくは $1 \times 10^{-7}$ M、より好ましくは $1 \times 10^{-9}$ 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。

20

### 【0037】

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) H Y J<sup>1</sup> L Hで表されるアミノ酸配列[配列中、J<sup>1</sup>は、G(グリシン)またはA(アラニン)を表わし、ここで、J<sup>1</sup>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) W J<sup>2</sup> N T N T U<sup>2</sup> N P T X<sup>2</sup> A Q G F T Gで表されるアミノ酸配列[配列中、J<sup>2</sup>は、L(ロイシン)またはI(イソロイシン)を表わし、U<sup>2</sup>は、E(グルタミン酸)またはG(グリシン)を表わし、X<sup>2</sup>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<sup>2</sup>、U<sup>2</sup>およびX<sup>2</sup>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) G D J<sup>3</sup> V V P T T I W N Y Y U<sup>3</sup> X<sup>3</sup> M Z<sup>3</sup> Vで表されるアミノ酸配列[配列中、J<sup>3</sup>は、M(メチオニン)またはL(ロイシン)を表わし、U<sup>3</sup>は、H(ヒスチジン)またはY(チロシン)を表わし、X<sup>3</sup>は、F(フェニルアラニン)またはY(チロシン)を表わし、Z<sup>3</sup>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<sup>3</sup>、U<sup>3</sup>、X<sup>3</sup>およびZ<sup>3</sup>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。

30

40

### 【0038】

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H Y J<sup>1</sup> L H配列中のJ<sup>1</sup>がG(グリシン)を表わし、そのVH-CDR2であるW J<sup>2</sup> N T N T U<sup>2</sup> N P T X<sup>2</sup> A Q G F T G配列中のJ<sup>2</sup>がL(ロイシン)を、U<sup>2</sup>がE(グルタミン酸)を、X<sup>2</sup>がF(フェニルアラニン)を各々表わし、そのVH-CDR3であるG D J<sup>3</sup> V V P T T I W N Y Y U<sup>3</sup> X<sup>3</sup> M Z<sup>3</sup> V配列中のJ<sup>3</sup>がM(メチオニン)を、U<sup>3</sup>がH(ヒスチジン)を、X<sup>3</sup>がF(フェニルアラニン)を、Z<sup>3</sup>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H Y J<sup>1</sup> L H配列中のJ<sup>1</sup>がG(グリシン)を表わし、そのVH-CDR2であるW J<sup>2</sup> N T N T U<sup>2</sup> N P T X<sup>2</sup> A Q G F T G配列中のJ<sup>2</sup>がI(イソロイシン)

50

)を、U<sup>2</sup>がG(グリシン)を、X<sup>2</sup>がY(チロシン)を各々表わし、そのVH-CDR3であるGDJ<sup>3</sup>VVP<sup>1</sup>TTIW<sup>2</sup>NYYU<sup>3</sup>X<sup>3</sup>MZ<sup>3</sup>V配列中のJ<sup>3</sup>がL(ロイシン)を、U<sup>3</sup>がH(ヒスチジン)を、X<sup>3</sup>がY(チロシン)を、Z<sup>3</sup>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HYJ<sup>1</sup>LH配列中のJ<sup>1</sup>がA(アラニン)を表わし、そのVH-CDR2であるWJ<sup>2</sup>NTNTU<sup>2</sup>NPTX<sup>2</sup>AQGFTG配列中のJ<sup>2</sup>がL(ロイシン)を、U<sup>2</sup>がE(グルタミン酸)を、X<sup>2</sup>がY(チロシン)を各々表わし、そのVH-CDR3であるGDJ<sup>3</sup>VVPOTTIWNYYYU<sup>3</sup>X<sup>3</sup>MZ<sup>3</sup>V配列中のJ<sup>3</sup>がM(メチオニン)を、U<sup>3</sup>がY(チロシン)を、X<sup>3</sup>がY(チロシン)を、Z<sup>3</sup>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HYJ<sup>1</sup>LH配列中のJ<sup>1</sup>がA(アラニン)を表わし、そのVH-CDR2であるWJ<sup>2</sup>NTNTU<sup>2</sup>NPTX<sup>2</sup>AQGFTG配列中のJ<sup>2</sup>がL(ロイシン)を、U<sup>2</sup>がE(グルタミン酸)を、X<sup>2</sup>がF(フェニルアラニン)を各々表わし、そのVH-CDR3であるGDJ<sup>3</sup>VVPPTIWNYYU<sup>3</sup>X<sup>3</sup>MZ<sup>3</sup>V配列中のJ<sup>3</sup>がM(メチオニン)を、U<sup>3</sup>がH(ヒスチジン)を、X<sup>3</sup>がF(フェニルアラニン)を、Z<sup>3</sup>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。

【 0 0 3 9 】

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。

【 0 0 4 0 】

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、VH-CDR2またはVH-CDR3の場合には、各々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）に置換されたものが挙げられる。また、図4に示されるように、PD-1に特異的に結合する第一アームに各々対応する抗PD-1抗体クローニングの各CDRにおいて、各クローニング間で相違する各アミノ酸またはそれらの任意の複数の組み合わせは当該クローニング間において相互に置換可能である。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、リシンおよびアラニン間での置換などである。

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。

#### 【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、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)。

10

#### 【0042】

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。

20

#### 【0043】

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。

30

#### 【0044】

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

40

50

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。

#### 【0045】

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。10

20

#### 【0046】

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。30

#### 【0047】

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。40

#### 【0048】

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50

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。

#### 【0049】

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。10

#### 【0050】

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型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。20

#### 【0051】

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ニンと、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ニンの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。

#### 【0052】

##### CD3に特異的に結合する第二アーム

30

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、 $1 \times 10^{-5} M$ 、好ましくは $1 \times 10^{-7} M$ 、より好ましくは $1 \times 10^{-9} M$ 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。40

#### 【0053】

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。

#### 【0054】

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V

50

H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、CDR2またはCDR3の場合には、各々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。

#### 【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、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。さらに、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。また、そのような第二アームには、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。

#### 【0056】

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。

#### 【0057】

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

10

20

30

40

50

が挙げられる。

**【 0 0 5 8 】**

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。

**【 0 0 5 9 】**

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。

**【 0 0 6 0 】**

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に特異的に結合するものが挙げられる。

**【 0 0 6 1 】**

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、IgG<sub>1</sub>もしくはIgG<sub>4</sub>抗体であり、さらにより好ましくはIgG<sub>1</sub>抗体である。

**【 0 0 6 2 】**

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等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。

**【 0 0 6 3 】**

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。

**【 0 0 6 4 】**

10

20

30

40

50

また、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等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。

10

#### 【0065】

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、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。

#### 【0066】

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体のうち、同抗体がIgG<sub>1</sub>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、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IgG<sub>1</sub>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、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より好ましい。また、PD-1/CD3二重特異性抗体がIgG<sub>4</sub>抗体である場合には、その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。

20

#### 【0067】

さらに、これらPD-1/CD3二重特異性抗体がIgG<sub>1</sub>抗体である場合に好ましい態様としては、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IgG<sub>1</sub>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IgG<sub>1</sub>抗体も同様に好ましい。

30

#### 【0068】

さらに、これらPD-1/CD3二重特異性抗体がIgG<sub>1</sub>抗体である場合に好ましい態様としては、各々二つの重鎖における定常領域中の(1) EUナンバリングシステムによる252番目のメチオニンがグルタミン酸、プロリン、アルギニンもしくはアスパラギン酸に、(2) EUナンバリングシステムによる434番目のアスパラギンがロイシンに、および／または(3) EUナンバリングシステムによる438番目のグルタミンがグルタミン酸に各々置換されたIgG<sub>1</sub>抗体が挙げられる。これらアミノ酸置換により、当該PD-1/CD3二重特異性抗体の血液中での半減期が、同アミノ酸置換がされていない同抗体に比べ、少なくとも50%、好ましくは少なくとも60%、より好ましくは少なくとも70%、さらに好ましくは少なくとも80%、最も好ましくは少なくとも90%短縮されることが期待できる。

40

#### 【0069】

50

重鎖定常領域における上記したアミノ酸置換を取り入れたPD-1/CD3二重特異性IgG<sub>1</sub>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、配列番号42、配列番号43、配列番号44、配列番号45、配列番号46および配列番号47から選択される何れか一つ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、配列番号48、配列番号49、配列番号50、配列番号51、配列番号52および配列番号53から選択される何れか一つ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のいくつかを図9に示す。

#### 【0070】

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等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)ならびに実施例19において作製されたクローンMut1、クローンMut2、クローンMut3、クローンMut4、クローンMut5およびクローンMut6である。

#### 【0071】

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等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/CD3二重特異性抗体等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-α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。

#### 【0072】

#### PD-1/CD3二重特異性抗体等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、WO2014/051433、WO2013/157953あるいはWO2013/157954に開示された方法でも製造することができる。

#### 【0073】

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。

#### 【0074】

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、SP2/0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細胞のような靈長類細胞、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。

#### 【0075】

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產生は、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

10

20

30

40

50

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、EP 0120694、EP0314161、EP0481790、EP0523949、US4816567およびWO2000/63403などの公開公報に記述されている。

#### 【0076】

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することが好ましい。10

#### 【0077】

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）。

#### 【0078】

##### [医薬的用途]

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等は、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。

#### 【0079】

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等が予防、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、キャッスルマン病、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症候群、側頭動脈炎、リウマチ性多発筋痛症、線維筋痛症、抗リソーム質抗体症候群、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、ループス腎炎、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、慢性炎症性脱髓性多発神経炎、多巣性運動ニューロパシー、サルコイドーシス、巨細胞性動脈炎、筋萎縮性側索硬化症、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。30

#### 【0080】

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40

50

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。

#### 【0081】

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等は、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30分から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。

#### 【0082】

##### 製剤

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等は、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。

#### 【0083】

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、

10

20

30

40

50

システィンハイドロクロライド、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、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、ブチル化ハイドロキシアニソール、ブチル化ハイドロキシトルエン、レシチン、プロピルガレート、-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。

#### 【0084】

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。

10

#### 【0085】

##### 併用または配合剤

さらに、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等は、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/CD3二重特異性抗体等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/CD3二重特異性抗体等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/CD3二重特異性抗体等を先に投与し、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/CD3二重特異性抗体等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いてもよい。本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等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。

20

#### 【0086】

30

例えば、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等を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、インスリングラルギン、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)、-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statt、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、シタグリブチン、ビルダグリブチン、アログリブチン等)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。

40

#### 【0087】

また、例えば、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等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、コルチゾン、コルチゾン酢酸エステル、ヒドロコルチゾン、ヒドロコルチゾンリン酸エステルナトリウム、ヒドロコルチゾンコハク酸エステルナトリウム、フルドロコルチゾン酢酸エステル、プレドニゾロン、プレドニゾロン酢酸エステル、プレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、ブチル酢酸プレドニゾロン、プレドニゾロンリン酸エステルナトリウム、ハロプレドン酢酸エステル、メチルプレドニゾロン、メチルプレドニゾロン酢酸エステル、メチルプレドニゾロンコハク酸エステルナトリウム、トリアムシノロン、酢酸トリアムシノロン

50

、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、デキサメタゾン酢酸エステル、デキサメタゾン吉草酸エステル、デキサメタゾンシペシル酸エステル、デキサメタゾンパルミチン酸エステル、デキサメタゾンプロピオン酸エステル、デキサメタゾンリン酸エステルナトリウム、デキサメタゾンメタスルホ安息香酸エステルナトリウム、パラメタゾン、パラメタゾン酢酸エステル、ベタメタゾン、ベタメタゾンジプロピオン酸エステル、ベタメタゾン吉草酸エステル、ベタメタゾン酢酸エステル、ベタメタゾン酪酸エステルプロピオン酸エステルおよびベタメタゾンリン酸エステルナトリウム等)、インターフェロン -1a 10  
、インターフェロン -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、シクロスボリン、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。

#### 【0088】

また、例えば、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等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、シクロスボリン、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。

#### 【0089】

例えば、本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体等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。

#### 【0090】

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/CD3二重特異性抗体等と、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。

#### 【0091】

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】

#### 【0092】

##### 実施例1：組換えヒトPD-1-Fc融合タンパクを用いたMeMo(登録商標)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(登録商標)マウス(WO2009/157771参照)に組換ヒトPD-1タンパク質を免疫する方法を選択した。MeMo(登録商標)マウスは、非組換ヒト重鎖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ヒト 軽鎖IgV 1-39\*01/IGJ 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に軽鎖からなる抗体を產生させることができる。

#### 【0093】

12~16週齢の12匹のMeMo(登録商標)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

10

20

30

40

50

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MF<sub>I</sub>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、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。

## 【0094】

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）

10

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Sfi IとXho I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 軽鎖IgV 1-39\*01/IGJ 1\*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。

## 【0095】

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反応性クローンを吸収した。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。

20

## 【0096】

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（OD<sub>450</sub>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。

30

## 【0097】

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シークエンス

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シークエンスを実施した。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。

40

## 【0098】

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。

## 【0099】

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

50

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。

【0100】

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。

【0101】

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

WO2005/118635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。

【0102】

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。

【0103】

さらに、共通軽鎖（IgV 1-39\*01/IGJ 1\*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、HBP-ALL細胞または組換ヒトCD3-Fcタンパク質を用いて、スクリーニングを行った。組換ヒトCD3-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。

【0104】

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。

【0105】

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DNAを、IgG<sub>1</sub>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、IgG<sub>1</sub>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

10

20

30

40

50

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改変されており、さらに、翻訳後のプロセ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。  
10

#### 【0106】

##### 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(登録商標)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CD3/CD3細胞外領域組換タンパク質を用いたBiacore(登録商標)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CD3/CD3への結合親和性を図11に示す。  
20

#### 【0107】

##### 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。

#### 【0108】

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。  
30

#### 【0109】

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。

#### 【0110】

##### 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。  
40  
50

**【 0 1 1 1 】**

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。

**【 0 1 1 2 】****実施例 1 2 : 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 抑制作作用**

健常人末梢血由来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- $\gamma$ 産生に対する抑制作作用を評価した。抗ヒトTCRV 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100Units/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TCRV 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- $\gamma$ 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- $\gamma$ 産生抑制作作用が確認された。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。

**【 0 1 1 3 】****実施例 1 3 : 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 およびPD-1の各遺伝子を、ヒトCD3 およびヒトPD-1遺伝子に各々置換したヒトCD3 / 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、4 mg/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。1 mg/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  $\mu$ 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  $\mu$ Lの1  $\mu$ 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2 mg/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 : スコア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CD3 / 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CD3 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。

**【 0 1 1 4 】**

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。

**【 0 1 1 5 】****実施例 1 4 : ヒト末梢血単核細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目的

10

20

30

40

50

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ニングまたは特許文献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ニングおよびJ110×UCHT1を各々30 μg/mL および10 μg/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。

【0116】

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ニングによるIL-2産生は低いものであった。

10

【0117】

実施例15：PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体各クローニングの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ニング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。

【0118】

まず、ヒトPD-1発現CHO-S細胞株に対してクローニング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、添加されたクローニングPD1-5(Bi)に対して1/100量のビオチン標識したクローニング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ニング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。

20

【0119】

PD1-5(Bi)は、クローニングPD1-1(Bi)～PD1-4(Bi)のPD-1への結合を阻害し、同クローニングが、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。

【0120】

実施例16：ヒト末梢血単核球細胞移植超免疫不全マウスにおけるPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体のin vivo作用

30

ヒト末梢血単核球細胞 (PBMC) を移植した超免疫不全マウス (NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>Il2rg<sup>t<sub>m1Wj1</sub></sup>/SzJ、以下、NSGマウス) に、本発明のPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体を投与し、in vivoでのT細胞増殖に対する作用を評価した。

【0121】

マウス1匹あたり1×10<sup>7</sup>個のヒトPBMC (LONZA、型番CC-2702) をDPBSに懸濁し、NSGマウスの腹腔内に移植した。当該NSGマウス各4例に、コントロール抗体またはPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローニングPD1-5(Bi)を、移植後3、7、10、14および17日に、各々1日1回腹腔内投与した。移植後14または21日に当該NSGマウスにイソフルランを吸入させて麻酔し、脾臓を摘出した。脾臓を70 μmのセルストレイナー (BD Falcon) を用いて細胞を単離した。調製した細胞懸濁液に、APC-Cy7で蛍光標識した抗CD4抗体 (Biolegend、型番300518) またはFITCで蛍光標識した抗CD8抗体 (Biolegend、型番301006) を添加し、フローサイトメーター (BD Biosciences、機種BD LSR Fortessa X-20) および解析ソフトウェアFlowJo (Biolegend、型番300518社) を用いて、ヒトCD4陽性細胞数およびヒトCD8陽性細胞数を測定した。図20にその評価結果を示す。

40

【0122】

ヒトPBMC移植後14および21日のいずれにおいても、コントロール抗体投与群と比較してPD1-5(Bi)投与群は、脾臓中のヒトCD4陽性細胞数およびヒトCD8陽性細胞数が有意に少なく、これらの細胞数増加に対してクローニングPD1-5(Bi)は抑制作用を示した。

【0123】

実施例17：マウス抗体産生モデルにおけるPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体のi

50

n vivo作用

実施例13において作製したヒトCD3 /ヒトPD-1ノックインC57BL/6マウスに、本発明のPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体を投与し、抗体産生に対するin vivo作用を評価した。

## 【0124】

Keyhole limpet hemocyanin (Thermo Scienctific、型番77600、以下KLH) をDPBSで溶解して200 μg/mLのKLH溶液を調製し、さらに等量のALUM (コスモバイオ、型番LG-6000) と室温で30分間混合して惹起剤とした。当該マウスに、この惹起剤200 μLを腹腔内投与して免疫処置を行った。コントロール抗体またはPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローンPD1-5 (Bi) を、免疫後7および8日に1日1回、腹腔内投与した。免疫後7～374日まで、マウス尾静脈から血液50～80 μLを採取し、血清を調製した。血清中の抗KLH抗体 (IgG<sub>1</sub>) 値をELISA法にて測定した。すなわち、KLHを固相化し、KLHに結合した抗KLH抗体を、HRP標識抗マウスIgG<sub>1</sub>抗体 (Bethyl Laboratories、型番A90-105P-38) を用いて検出した。図21にその評価結果を示す。

10

## 【0125】

当該マウスの抗KLH抗体産生に対して、PD1-5 (Bi) は抑制効果を示した。また、免疫後360日まで有意な抑制効果が持続した。

## 【0126】

実施例18：自然発症糖尿病モデルマウスにおけるPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体のin vivo作用

20

糖尿病を自然発症するヒトCD3 /ヒトPD-1ノックインNODマウスに、本発明のPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体を投与し、血糖値の変化に対するin vivo作用を評価した。

## 【0127】

当該NODマウスを、16週齢から週1回、尾静脈を剃刀で傷つけて血液を5～10 μL採血し、血液中のグルコース濃度をアキュチェックアビバ（登録商標）(Roche) を用いて測定した。血中グルコース濃度が2回連続して200mg/dL以上（高血糖域）示したマウスを糖尿病発症とし、発症が認められた個体各7例にコントロール抗体またはPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローンPD1-5 (Bi) を2日間腹腔内投与した。投与開始後、週1回の頻度で採血を行い、血中グルコース濃度を測定した。血中グルコース濃度200 mg/dL未満を正常血糖域とした。図22にその評価結果を示す。なお、当該NODマウスは、実施例13にて各々作製したヒトCD3 ノックインマウスおよびヒトPD-1ノックインマウスならびにNOD/ShiJcl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。

30

## 【0128】

投与開始後7および8週間の時点で、PD1-5 (Bi) 投与群はコントロール抗体投与群と比較して有意に正常血糖域の例数が多く、PD1-5 (Bi) は糖尿病発症後の投与で治療的効果を示した。

## 【0129】

実施例19：ヒトFcRn結合部位のアミノ酸に変異を導入したPD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体の作製とFcRn結合性評価

40

PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローンPD1-5 (Bi) の重鎖定常領域中のEUナンバリングシステムにおける252番目のメチオニンを、各々グルタミン酸、プロリン、アルギニンおよびアスパラギン酸に置換した抗体クローンMut1、Mut2、Mut3およびMut4を、各々、アミノ酸置換に関する公知の技術に準じた方法にて作製した。さらに、同クローンPD1-5 (Bi) の重鎖定常領域中のEUナンバリングシステムにおける434番目のアスパラギンをロイシンに置換した抗体クローンMut5、438番目のグルタミンをグルタミン酸に置換した抗体クローンMut6を、同様の方法にて各々作製した。

## 【0130】

次に、それら抗体クローン各々について、ヒトFcRnまたはマウスFcRnに対する結合親和性を、表面プラズモン共鳴を用いて評価した。Biacore T200 (GEヘルスケア) にBiotin C

50

APture Kit (GEヘルスケア、型番28-9202-34) のSeries S Sensor Chip CAPをセットし、Human FcRn-human B2M (Immunittrack、型番ITF01) およびMurine FcRn-murine B2M (Immunittrack、型番ITF07) を各々固定化した。pH6.0の条件でPD1-5 (Bi) およびMut1～Mut6の結合性を各々評価した。ヒトFcRnへの結合性実験結果を図23および24に、マウスFcRnへの結合性実験結果を図25に各々示す。

#### 【0131】

Mut1～Mut6のヒトFcRnへの各親和性は、PD1-5 (Bi) (解離定数 ( $K_D$ 値) :  $2.75 \times 10^{-8} M$ ) に比較して低下し、特に、Mut4およびMut2が顕著に低下した。Mut1およびMut4のマウスFcRnへの各親和性はPD1-5 (Bi) ( $K_D$ 値:  $1.61 \times 10^{-8} M$ ) より低下し (Mut1の $K_D$ 値:  $4.67 \times 10^{-8} M$ )、特に、Mut4が顕著に低下した。10

#### 【0132】

##### 実施例20：PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローニングMut4の血中動態

実施例13にて作製したヒトCD3 /ヒトPD-1ノックインC57BL/6マウスを用いて、クローニングMut4のin vivo血中動態を評価した。

#### 【0133】

同クローニングを当該C57BL/6マウスの尾部静脈内に投与後30分ならびに1、2、4、8、24および288時間の時点において、マウスの尾静脈を剪刃で一部傷つけて、約40 μLの血液をヘパリン処理済みのチューブに採取した。採血液を遠心分離して血漿を調製し、電気化学発光 (ECL) 法を用いて同クローニングの血漿中濃度を測定した。血漿中濃度の推移から、その血中半減期を算出した。20

#### 【0134】

測定の結果、同クローニングの血中半減期は8.0時間であり、もとのPD1-5 (Bi) の血中半減期約160時間よりも短縮された。

#### 【0135】

##### 実施例21：PD-1/CD3二重特異性モノクローナル抗体クローニングMut4のEAEモデルにおけるin vivo作用

実施例13記載の方法に準じて作されたEAEモデルにおいて、クローニングMut4のin vivo作用を評価した。

#### 【0136】

当該EAEモデルマウス各8例に、免疫後6～10日までの5日間、コントロール抗体またはクローニングMut4を1日1回腹腔内投与した。免疫処置日以降の当該マウスの神経症状を、大貫らの方法 (Onuki M, et al., Microsc Res Tech 2001;52:731-9.) に準じた実施例13記載の方法にて評価し、免疫処置日から免疫後30日までの観察期間の累積神経症状スコアを集計した。図26にその評価結果を示す。30

#### 【0137】

クローニングMut4は、EAEモデルにおいて神経症状を有意に抑制した。

#### 【産業上の利用可能性】

#### 【0138】

本発明のPD-1/CD3二重特異性抗体またはその抗体断片は、自己免疫疾患等の予防、症状進展抑制、再発抑制および/または治療に有用である。40

#### 【要約】

本発明の課題は、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。

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PD-1/CD3二重特異性抗体に着目し、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を軽減する製剤となり得ることを確認した。また、当該二重特異性抗体が、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、そのような特徴が自己免疫疾患に対する予防、症状進展抑制、再発抑制または治療効果の増強ないし持続に寄与していることを見出した。

【図1】

共通鎖 Common Light Chain	配列番号 SEQ ID No.	アミノ酸配列 Amino Acid Sequence
可変領域 Variable Region	25	DIQMTQSPSSLSASVGRDVTITCRQSQISSYLNWYQQPGKPKAPKLLI YAASSLQSGVSPRSFGSGSGTDFITLTISSLQPEFDATTYCQQSYSTPPT FGGGTCKEIK
定常領域 Constant Region	29	RTVAAPSVFIPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFYPREAKVQWQKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKSDTYSLSSTLTLSKADYEHKHKVYACEVTHQ GLSSPVTKSFRNRC

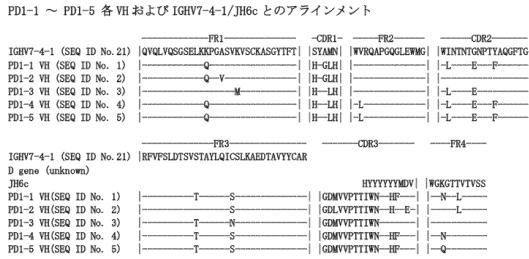
【図2】

共通鎖 Common Light Chain	配列番号 SEQ ID No.	CDR1	配列番号 SEQ ID No.	CDR2	配列番号 SEQ ID No.	CDR3
CDRs	26	RASQSISSYLN	27	AASSLQS	28	QQSYSTPPT

【図3】

生産系列 V遺伝子	配列番号 SEQ ID No.	アミノ酸配列 Amino Acid Sequence
IGHV7-4-1	21	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFSTYAMNWVRQAP GQGLEWMGNTINTNGNPTYAAQGFTGRFVFLDTSVTAYLQI CSLKAEDTAVYYCAR
IGHV3-33	22	QVQLVSEGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWRVQAPG KGLEWWAVIYWGDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAR

【図4】



【図9】

配列番号 SEQ ID No.	アミノ酸配列 Amino Acid Sequence
PD1-1を特異的に認識する第一アームの重鎖可変領域を有する重鎖の定常領域	23 ASTKGPSVPLAPSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWS WNSGALTSGVHTFPAVLQSGGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTVKDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELGRG PSVFLFPPKPKDITLDIRTPFVTVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKSAGKQPREPVYTDPPSREE MTKNQVSLTCEVKGFYPSDAIEWEWSNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
CD3を特異的に認識する第二アームの重鎖可変領域を有する重鎖の定常領域	24 ASTKGPSVPLAPSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWS WNSGALTSGVHTFPAVLQSGGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTVKDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELGRG PSVFLFPPKPKDITLDIRTPFVTVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKSAGKQPREPVYTKPPSREE MTKNQVSLTCEVKGFYPSDAIEWEWSNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
PD1-1を特異的に認識する第一アームの重鎖可変領域を有する重鎖の定常領域	45 ASTKGPSVPLAPSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWS WNSGALTSGVHTFPAVLQSGGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTVKDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELGRG PSVFLFPPKPKDITLDIRTPFVTVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKSAGKQPREPVYTKPPSREE MTKNQVSLTCEVKGFYPSDAIEWEWSNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPG
CD3を特異的に認識する第二アームの重鎖可変領域を有する重鎖の定常領域	51 ASTKGPSVPLAPSSKTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVWS WNSGALTSGVHTFPAVLQSGGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHHKPSNTVKDKRVEPKSCDKTHTCPCPAPELGRG PSVFLFPPKPKDITLDIRTPFVTVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIKSAGKQPREPVYTKPPSREE MTKNQVSLTCEVKGFYPSDAIEWEWSNGQPENNYKTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHEALHNH YTQKSLSLSPG

【図10】

クローン1 5 C 3 の VH のアミノ酸配列：  
QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTSSYGMWVRQAPGKGL  
WVAAIWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNSK  
NLYLQMNLSLRAEDTAVYYCYTRGTGYNWFDPWGGQGT  
LVSS

【図5】

クローン番号 Clone No.	配列番号 SEQ ID No.	アミノ酸配列 Amino Acid Sequence
PD1-1	1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYGLHWVQRQAPGGLEW MGWLNTNTENPITEAQGFTGRFVFLDTSVTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGD LVMVPTTINW
PD1-2	2	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYGLHWVQRQAPGGLEW MGWLNTNTENPITYAQGFTGRFVFLDTSVTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGD LVMVPTTINW
PD1-3	3	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYGLHWLQRQAPGGLEW MGWLNTNTENPITEAQGFTGRFVFLDTSVTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGD LVMVPTTINW
PD1-4	4	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYGLHWLQRQAPGGLEW MGWLNTNTENPITEAQGFTGRFVFLDTSVTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGD LVMVPTTINW
PD1-5	5	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCKASGYTFTHYGLHWLQRQAPGGLEW MGWLNTNTENPITEAQGFTGRFVFLDTSVTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGD LVMVPTTINW

【図6】

クローン番号 Clone No.	配列番号 SEQ ID No.	CDR1	配列番号 SEQ ID No.	CDR2	配列番号 SEQ ID No.	CDR3
PD1-1	6	HYGLH	7	WLNNTNTENP	8	GDMVNP
PD1-2	9	HYGLH	10	WINTNTENP	11	GDLVNP
PD1-3	12	HYALH	13	WLNNTNTENP	14	GDMVNP
PD1-4	15	HYALH	16	WLNNTNTENP	17	GDMVNP
PD1-5	18	HYALH	19	WLNNTNTENP	20	GDMVNP

【図7】

クローン番号 Clone No.	配列番号 SEQ ID No.	アミノ酸配列 Amino Acid Sequence
CD3-2	36	QVQLVQSGGGVVQPGRSLRLSCVASGFTSSYGMWVRQAPGKGL WVAAIWYNGRKQDYADSVKGRFTISRDNSK NLYLQMNLSLRAEDTAVYYCYTRGTGYNWFDPWGGQGT LVSS

【図8】

クローン番号 Clone No.	配列番号 SEQ ID No.	CDR1	配列番号 SEQ ID No.	CDR2	配列番号 SEQ ID No.	CDR3
CD3-2	37	SYGMH	38	QIWIYARNKQEYSDSVKG	39	GTGYNWFDP

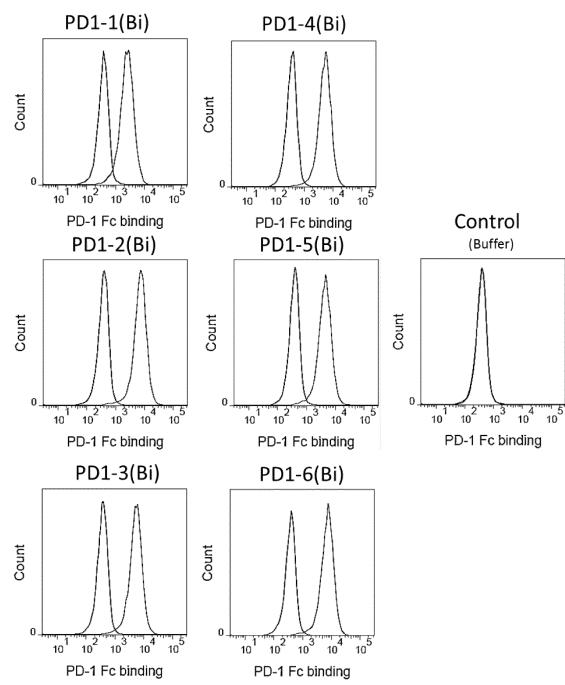
【図11】

第一アームのPD-1結合活性		
クローンNo.	ヒトPD-1	カニクイザルPD-1
	Kd (nmol/L)	Kd (nmol/L)
PD1-1(B1)	0.6	0.3
PD1-2(B1)	0.7	0.4
PD1-3(B1)	3.8	2.0
PD1-4(B1)	0.9	0.7
PD1-5(B1)	0.7	0.4
PD1-6(B1)	0.8	21.8

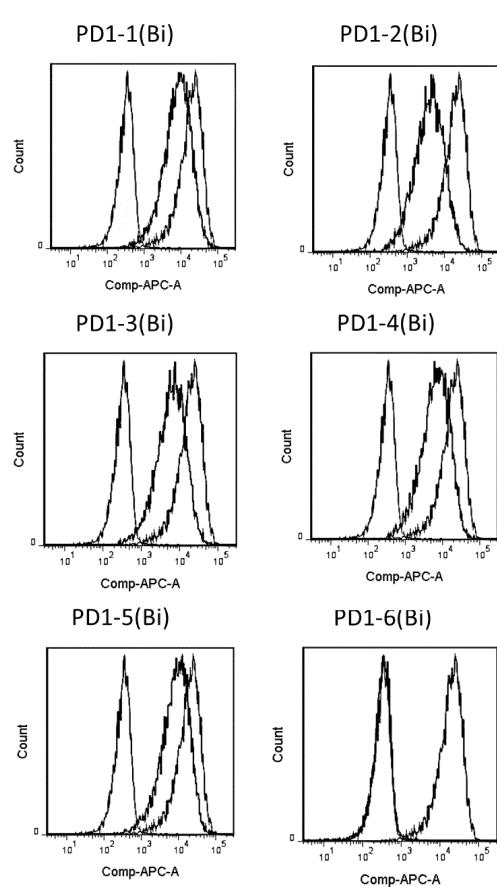
  

第二アームのCD3結合活性		
クローンNo.	ヒトCD3δ/CD3ε	
	Kd (nmol/L)	
CD3-2	19.2	

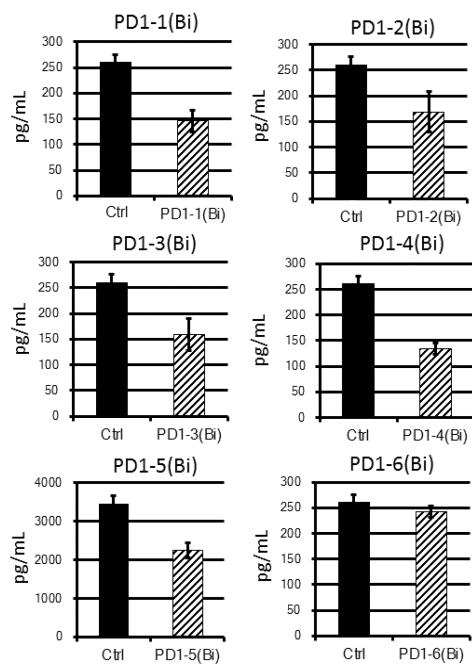
【図12】



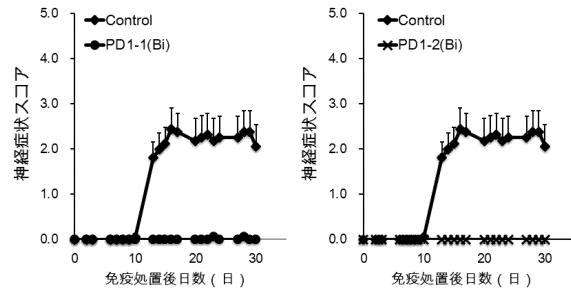
【図13】



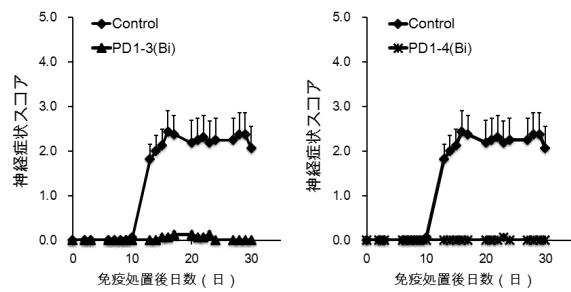
【図14】



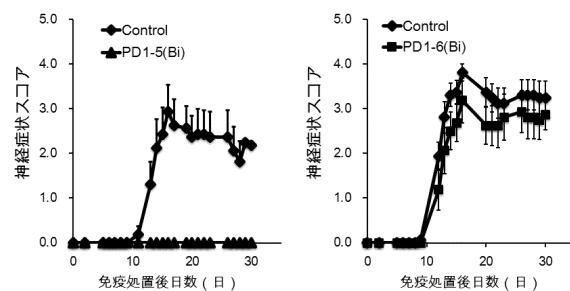
【図15】



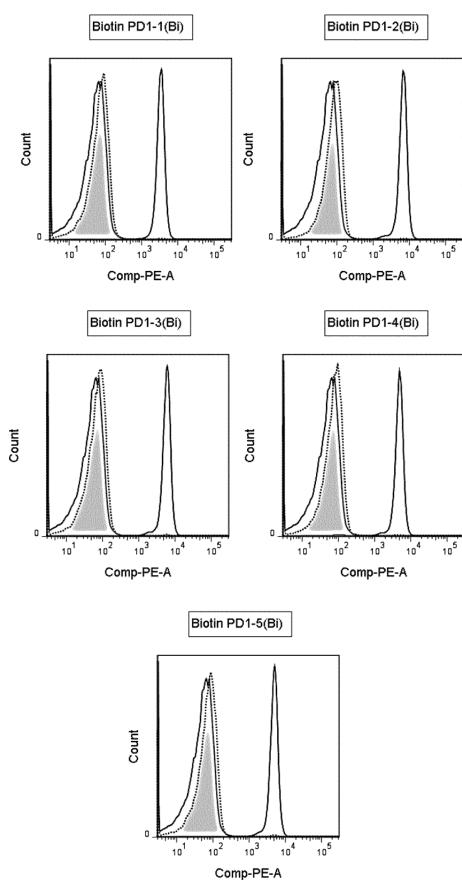
【図16】



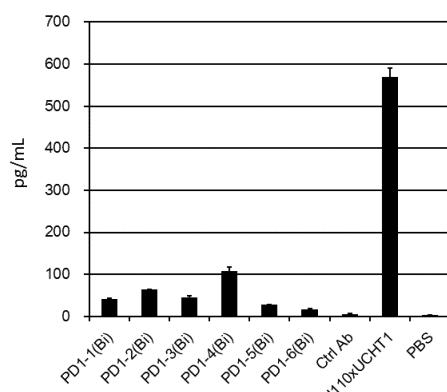
【図 17】



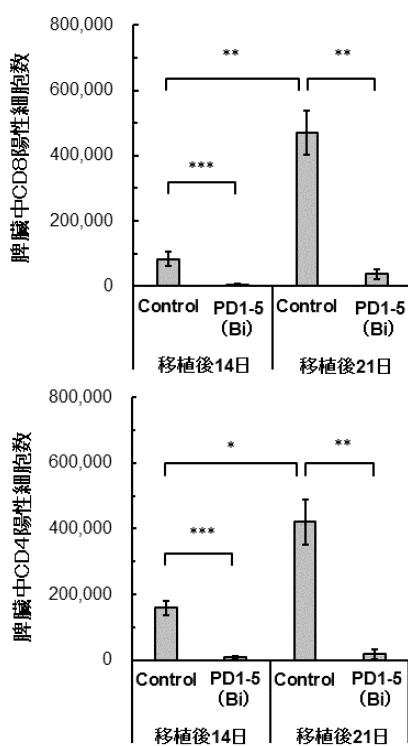
【図 19】



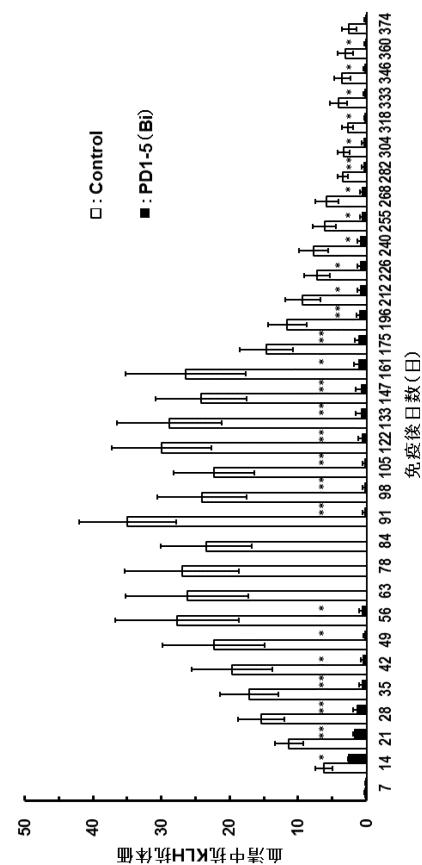
【図 18】



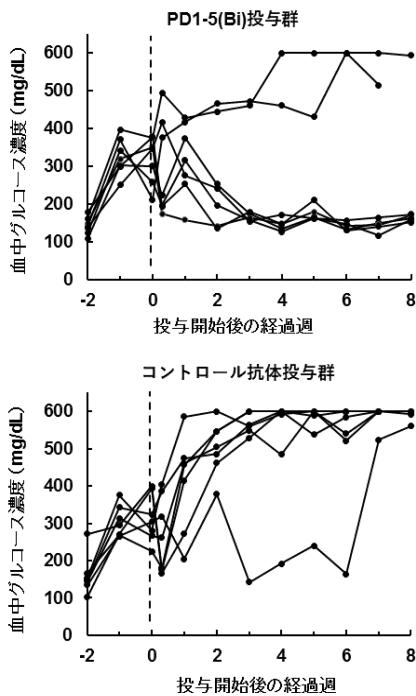
【図 20】



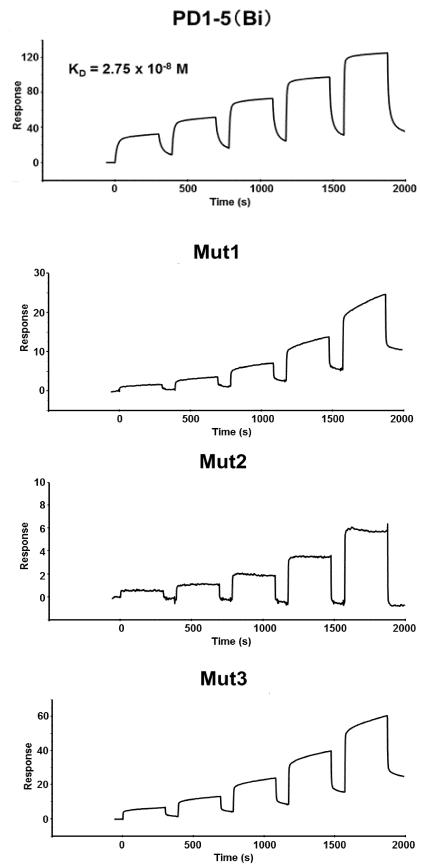
【図 21】



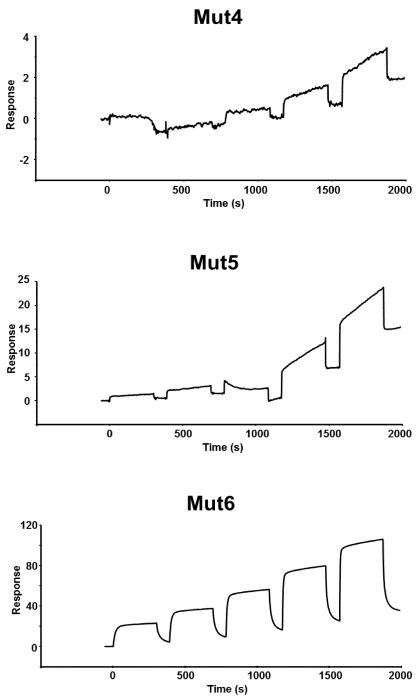
【図22】



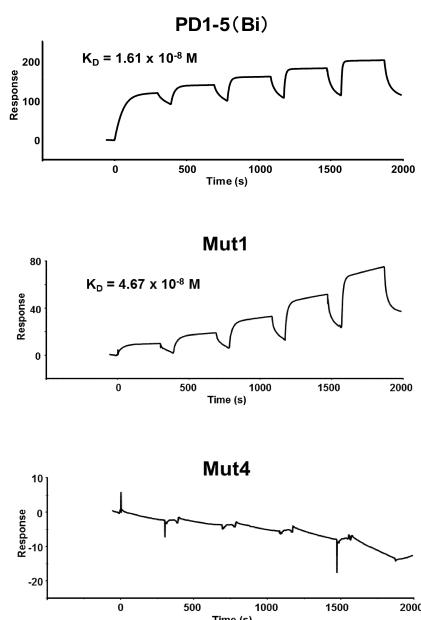
【図23】



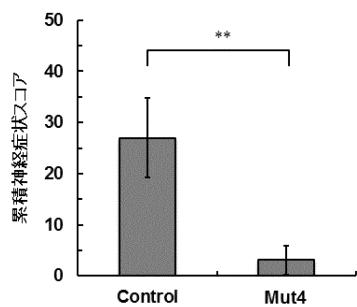
【図24】



【図25】



【図26】



【配列表】

0006856183000001.app

---

フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I  
A 6 1 P 37/06 (2006.01) C 0 7 K 16/46  
A 6 1 P 37/06

(72)発明者 スロスピー マーク  
オランダ王国 3584 セーエム ユトレヒト, ヤレラーン 62  
(72)発明者 デ クルイフ コルネリス アドリアン  
オランダ王国 3584 セーエム ユトレヒト, ヤレラーン 62  
(72)発明者 ヴァン ロー ピーテル フォッコ  
オランダ王国 3584 セーエム ユトレヒト, ヤレラーン 62  
(72)発明者 クロースター リンス  
オランダ王国 3584 セーエム ユトレヒト, ヤレラーン 62

審査官 長谷川 強

(56)参考文献 特開2017-88617 (JP, A)  
国際公開第2013/022091 (WO, A1)  
国際公開第2019/070047 (WO, A1)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
A 6 1 K 39 / 395  
A 6 1 P 37 / 06  
C 0 7 K 16 / 18  
C 0 7 K 16 / 28  
C 0 7 K 16 / 46  
C 1 2 N 15 / 13  
C A p l u s / R E G I S T R Y ( S T N )  
U n i P r o t / G e n e S e q