

(19)日本国特許庁(JP)

(12)特許公報(B2)

(11)特許番号
特許第7684656号
(P7684656)

(45)発行日 令和7年5月28日(2025.5.28)

(24)登録日 令和7年5月20日(2025.5.20)

(51)国際特許分類		F I		
A 6 1 K	39/395 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	N
A 6 1 P	37/06 (2006.01)	A 6 1 K	39/395	U
A 6 1 P	37/08 (2006.01)	A 6 1 P	37/06	
C 0 7 K	16/46 (2006.01)	A 6 1 P	37/08	
C 0 7 K	16/28 (2006.01)	C 0 7 K	16/46	Z N A
請求項の数 14 (全40頁) 最終頁に続く				
(21)出願番号	特願2021-526119(P2021-526119)	(73)特許権者	000185983	
(86)(22)出願日	令和2年6月10日(2020.6.10)		小野薬品工業株式会社	
(86)国際出願番号	PCT/JP2020/022882		大阪府大阪市中央区道修町2丁目1番5号	
(87)国際公開番号	WO2020/250940	(73)特許権者	304020292	
(87)国際公開日	令和2年12月17日(2020.12.17)		国立大学法人徳島大学	
審査請求日	令和5年5月10日(2023.5.10)		徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地	
(31)優先権主張番号	特願2019-108906(P2019-108906)	(74)代理人	100106518	
(32)優先日	令和1年6月11日(2019.6.11)		弁理士 松谷 道子	
(33)優先権主張国・地域又は機関	日本国(JP)	(74)代理人	100138911	
(出願人による申告)平成30年度、国立研究開発法人日本医療研究開発機構、「革新的バイオ医薬品創出基盤技術開発事業」「多機能複合分子標的物質の作製による細胞運命操作技術の開発」委託研究開発、産業技術力強化法第17条の適用を受ける特許出願		(72)発明者	岡崎 拓	
			徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内	
		(72)発明者	杉浦 大祐	最終頁に続く

(54)【発明の名称】 免疫抑制剤

(57)【特許請求の範囲】

【請求項1】

LAG3の細胞外領域に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3の細胞外領域またはCD8の細胞外領域に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子を含む、自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植片対宿主病の治療剤であって、

第1の結合部位は抗LAG3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、

第2の結合部位は抗CD3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域または抗CD8抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含み、

二重特異性分子が、二重特異性抗体、ダイアボディ、タンデムscFv、scダイアボディ、FabFv、Fab'Fv、FabdsFv、Fab-scFv、Fab-dsscFv、Fab-(dsscFv)2、diFab、diFab'、scFv-Fc、タンデムscFv-Fc、scダイアボディ-Fc、scダイアボディ-CH3、Ig-scFvおよびscFv-Igのいずれかの形態である、治療剤。

【請求項2】

二重特異性分子が、LAG3とMHCクラスII分子との結合を許容する、請求項1に記載の治療剤。

【請求項3】

第1の結合部位が、LAG3のD1領域に含まれ、かつ、エキストラループ領域に含まれない部分に結合するものである、請求項1または2に記載の治療剤。

【請求項4】

第1の結合部位が、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラ

ギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリンおよび／または第62位のイソロイシンに相当するアミノ酸を含む領域に結合するものである、請求項1～3のいずれかに記載の治療剤。

【請求項5】

第1の結合部位が、
配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、
配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、
請求項1～4のいずれかに記載の治療剤。

10

【請求項6】

第1の結合部位が、配列番号7のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項1～5のいずれかに記載の治療剤。

【請求項7】

第1の結合部位が、LAG3との結合に対して
(i) 配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または
(ii) 配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
を含む抗LAG3抗体と競合する、請求項1～4のいずれかに記載の治療剤。

20

【請求項8】

第2の結合部位がCD3に特異的に結合するものである、請求項1～7のいずれかに記載の治療剤。

【請求項9】

第2の結合部位が、
配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、
配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、
請求項8に記載の治療剤。

30

【請求項10】

第2の結合部位が、配列番号15のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号16のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項8または9に記載の治療剤。

【請求項11】

第2の結合部位がCD8に特異的に結合するものである、請求項1～7のいずれかに記載の治療剤。

40

【請求項12】

第2の結合部位が、
配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、
配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、
請求項11に記載の治療剤。

【請求項13】

第2の結合部位が、配列番号23のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号24のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有す

50

るアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、請求項11または12に記載の治療剤。

【請求項14】

自己免疫疾患の治療剤である、請求項1～13のいずれかに記載の治療剤。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本特許出願は、日本国特許出願第2019-108906号について優先権を主張するものであり、ここに参照することによって、その全体が本明細書中へ組み込まれるものとする。

本開示は、LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子に関する。

10

【背景技術】

【0002】

免疫系は、生体内で病原体などの非自己物質やがん細胞などの異常な細胞を認識して殺滅することにより、生体を疾患から保護する多数の機構が集積した機構である。免疫系は病原体や異常な細胞を攻撃し、正常な自己物質を攻撃しないように緻密に制御されているが、その制御機構が破綻すると、自己免疫性疾患や慢性炎症性疾患など、種々の難治性疾患を引き起こす。自己免疫疾患の治療に関しては、免疫抑制剤の使用や、サイトカインを標的とする抗体療法が知られている。

【0003】

リンパ球活性化遺伝子3(LAG3)は、細胞傷害性T細胞および制御性T細胞の表面に発現する免疫チェックポイント受容体タンパク質であり、T細胞レセプター(TCR)を抑制することにより、T細胞の応答、活性化、増殖を制御する。LAG3を賦活化する方法はこれまで知られていない。一般に、細胞表面分子の機能の阻害は、リガンドと細胞表面分子の結合を抗体で物理的に阻害することにより達成できるが、細胞表面分子の機能の賦活化は、リガンドなどに誘導される特定の構造変化を要するため、極めて困難である。

20

【0004】

CD3は、主に成熟T細胞に発現し、TCRと結合して複合体を形成する。外来抗原がMHC複合体を介してTCRに提示され、T細胞の活性化が誘導される際に、CD3が細胞内シグナル伝達の機能を担う。CD8はT細胞の表面に発現するTCRの補助受容体であり、MHCクラスI分子の保存された領域に結合する。成熟ナイーブCD8⁺T細胞が樹状細胞により特異的抗原を提示されると、CD8とTCRは集合し、細胞内シグナル伝達を開始され、成熟ナイーブCD8⁺T細胞は細胞傷害性T細胞に分化する。即ち、CD3とCD8は、いずれもT細胞活性化の際にTCRと集合する細胞表面分子である。

30

【0005】

特許文献1は、免疫応答を抑制する機能を有する細胞の表面に発現している分子に結合するドメイン、および、T細胞受容体複合体に結合するドメインを含む抗原結合分子により、制御性T細胞などの免疫応答を抑制する機能を有する細胞の免疫応答抑制活性を阻害することを開示している。

【先行技術文献】

【特許文献】

40

【0006】

【文献】国際公開2015/174439号公報

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0007】

本開示は、新たな免疫抑制剤を提供することを目的とする。

【課題を解決するための手段】

【0008】

ある態様において、本開示は、LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子を提供する。

50

ある態様において、本開示は、上記の二重特異性分子を含む免疫抑制剤を提供する。

ある態様において、本開示は、上記の二重特異性分子を含む、自己免疫疾患、アレルギー疾患もしくは移植片対宿主病の予防および/または治療剤を提供する。

【発明の効果】

【0009】

本開示により、免疫抑制剤、または自己免疫疾患、アレルギー疾患もしくは移植片対宿主病の予防および/または治療剤、または、これらに利用可能な二重特異性分子が提供される。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】LAG3およびCD3に結合する二重特異性分子2C11xTKB58およびTKB58x2C11の、BW5147細胞、DO11.10細胞およびDO11.10-mLAG3細胞に対する結合を示す。

【図2】抗マウスLAG3抗体TKB58、2C11xTKB58またはTKB58x2C11の存在下における、LAG3による抑制を強く誘導する条件での抗原刺激によるDO11.10細胞およびDO11.10-mLAG3細胞のIL-2産生を示す。

【図3】TKB58、2C11xTKB58またはTKB58x2C11の存在下における、LAG3による抑制をあまり強く誘導しない条件での抗原刺激によるDO11.10細胞およびDO11.10-mLAG3細胞のIL-2産生を示す。

【図4】TKB58、2C11xTKB58またはTKB58x2C11の存在下における、MHCクラスI拘束性B3Z細胞およびB3Z-mLAG3細胞の抗原刺激によるIL-2産生を示す。

【図5】TKB58、2C11xTKB58またはTKB58x2C11の存在下における、抗原刺激によるDO11.10細胞およびDO11.10-mLAG3-P111A細胞のIL-2産生を示す。

【図6】実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)モデルにおける、2C11xTKB58の神経症状に対する効果を示す。

【図7】TKB58、2C11xTKB58またはTKB58x2C11で処理したIIA1.6細胞に対するLAG3可溶性タンパク質の結合を示す。

【図8】二重特異性分子TKB58xYTS169の、DO11.10細胞、DO11.10-mLAG3細胞、B3Z細胞およびB3Z-mLAG3細胞に対する結合を示す。

【図9】TKB58xYTS169の存在下における、B3Z細胞およびB3Z-mLAG3細胞の抗原刺激によるIL-2産生を示す。

【図10】キメラLAG3分子を発現するDO11.10細胞に対するTKB58の結合を示す。

【図11】野生型LAG3、N54A/F55A変異体またはV61A/I62A変異体を発現させたDO11.10細胞に対するTKB58の結合を示す。

【図12】野生型LAG3、N54A/F55A変異体またはV61A/I62A変異体を発現させたDO11.10細胞における、抗原刺激によるIL-2産生を示す。

【図13】マウスLAG3可溶性タンパク質に対する抗マウスLAG3抗体TKB58およびC9B7Wの結合親和性を示す。

【図14】抗マウスLAG3抗体TKB58の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。各CDRを四角で囲んで示す。

【図15】抗マウスCD3ε抗体2C11の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。各CDRを四角で囲んで示す。

【図16】抗マウスCD8抗体YTS169の重鎖可変領域および軽鎖可変領域のアミノ酸配列を示す。各CDRを四角で囲んで示す。

【発明を実施するための形態】

【0011】

本開示では、数値が「約」の用語を伴う場合、その値の±10%の範囲を含むことを意図する。例えば、「約20」は、「18~22」を含むものとする。数値の範囲は、両端点の間の全ての数値および両端点の数値を含む。範囲に関する「約」は、その範囲の両端点に適用される。従って、例えば、「約20~30」は、「18~33」を含むものとする。

【0012】

10

20

30

40

50

本開示において、アミノ酸残基は以下の略号で表される。

AlaまたはA：アラニン
ArgまたはR：アルギニン
AsnまたはN：アスパラギン
AspまたはD：アスパラギン酸
CysまたはC：システイン
GlnまたはQ：グルタミン
GluまたはE：グルタミン酸
GlyまたはG：グリシン
HisまたはH：ヒスチジン
IleまたはI：イソロイシン
LeuまたはL：ロイシン
LysまたはK：リジン
MetまたはM：メチオニン
PheまたはF：フェニルアラニン
ProまたはP：プロリン
SerまたはS：セリン
ThrまたはT：スレオニン
TrpまたはW：トリプトファン
TyrまたはY：チロシン
ValまたはV：バリン

【0013】

「二重特異性分子」とは、2種類の異なる標的分子または標的部位に特異的に結合できる分子を意味する。二重特異性分子は、第1の標的分子または標的部位に特異的に結合する第1の結合部位と、第2の標的分子または標的部位に特異的に結合する第2の結合部位を含む。ここで、「第1の結合部位」および「第2の結合部位」は、2つの結合部位を区別するために便宜的に使用される用語であり、二重特異性分子における結合部位の位置や機能を特定するものではない。二重特異性分子は、1つの分子(例えばポリペプチド鎖)で構成されても、複数の分子(例えば複数のポリペプチド鎖)で構成されてもよい。二重特異性分子は、少なくとも1つのさらなる結合部位を有する多重特異性分子であってもよく、ここで、さらなる結合部位は、第1または第2の結合部位と同じのものであっても異なるものであってもよく、第1または第2の標的分子または標的部位に特異的に結合するものであってもよく、第1または第2の標的分子または標的部位とは異なる標的分子または標的部位に特異的に結合するものであってもよい。

【0014】

本開示において、LAG3、CD3およびCD8はいかなる種のものであってもよく、典型的には哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル等)、例えばマウスまたはヒト、特にヒトのものである。種々の生物種に由来するLAG3、CD3およびCD8のアミノ酸配列は、公知のデータベースを利用して、容易に入手できる。本開示において、LAG3、CD3およびCD8は、それらの天然に存在する対立遺伝子の産物を含む。

【0015】

LAG3は、安定なペプチドMHCII複合体と選択的に結合し、T細胞レセプター(TCR)を抑制することにより、T細胞の応答、活性化および/または増殖を抑制する。ヒトおよびマウスのLAG3の代表的なアミノ酸配列は、各々、GenBankアクセッション番号NP_002277.4(配列番号1)およびNP_032505.1(配列番号2)として登録されている。

【0016】

第1の結合部位はLAG3の細胞外領域のどこに結合してもよい。ある実施形態では、第1の結合部位は、LAG3のD1領域に結合し、特に、D1領域に含まれ、かつ、エキストラループ(extra loop)領域に含まれない部分に結合する。D1領域およびエキストラループ領域は

10

20

30

40

50

、PNAS, 1997, 94(11):5744-5749、Journal of Immunology, 1996, 157:3727-3736等に記載されている。例えば、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3において、D1領域は、第23位のセリンから第168位のイソロイシンまでの領域であり、エキストラループ領域は、第70位のグリシンから第95位のチロシンまでの領域である。好ましくは、第1の結合部位は、D1領域における、エキストラループ領域よりN末端側の領域（配列番号2の第23位のセリンから第69位のセリンまでの領域）に結合する。一実施形態において、第1の結合部位は、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第23位のセリンから第69位のセリンを含む領域に相当する領域に結合する。例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するヒトLAG3の第23位のロイシンから第69位のセリンを含む領域は、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第23位のセリンから第69位のセリンを含む領域に相当する。ある実施形態では、第1の結合部位は、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリン、および/または、第62位のイソロイシンに相当するアミノ酸を含む領域に結合する。例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するヒトLAG3の第54位のセリン、第55位のロイシン、第61位のバリン、および/または、第62位のスレオニンを含む領域は、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリン、および/または、第62位のイソロイシンを含む領域に相当する。

【0017】

好ましくは、二重特異性分子は、LAG3とMHCクラスII分子との結合を許容する。「結合を許容する」とは、二重特異性分子の存在下で、LAG3とMHCクラスII分子の結合量が実質的に低下しないこと、例えば、二重特異性分子の非存在下の結合量の約70%、約75%、約80%、約85%、約90%、約95%または約100%以上であることを意味する。LAG3とMHCクラスII分子の結合は、MHCクラスIIを発現する細胞に、二重特異性分子の存在下および非存在下でLAG-3の細胞外領域を可溶性タンパク質として結合させる実験により確認し得る。あるいは、LAG3とMHCクラスII分子の結合は、例えば、LAG3がペプチドMHC I複合体との結合によりTCRによるサイトカイン産生を抑制する系、例えば下記の実施例に記載される系において、二重特異性分子の存在下および非存在下でサイトカイン産生量を比較することにより、確認し得る。

【0018】

CD3は、主に成熟T細胞に発現し、TCRと複合体を形成する。CD3は、CD3 ζ 、CD3 ϵ 、CD3 γ 、CD3 δ およびCD3 η のサブユニットを含む。第2の結合部位はどのサブユニットに結合してもよい。ある実施形態では、二重特異性分子の第2の結合部位はCD3 ϵ に結合する。ヒトおよびマウスのCD3 ϵ の代表的なアミノ酸配列は、各々、GenBankアクセッション番号NP_000724.1(配列番号3)およびNP_031674.1(配列番号4)として登録されている。第2の結合部位はCD3の細胞外領域のどこに結合してもよい。ある実施形態では、第2の結合部位は、CD3 ϵ の細胞外領域に結合する。例えば、配列番号3のアミノ酸配列を有するヒトCD3 ϵ において、細胞外領域は、第23位のアスパラギン酸から第126位のアスパラギン酸までの領域であり、配列番号4のアミノ酸配列を有するマウスCD3 ϵ において、細胞外領域は、第22位のアスパラギン酸から第108位のアスパラギン酸までの領域である。ある実施形態では、第2の結合部位は、配列番号4のアミノ酸配列を有するマウスCD3 ϵ の第22位のアスパラギン酸～第26位のアスパラギン、第44位のロイシン～第49位のアスパラギン、第51位のリジン、および/または、第84位のチロシン～第91位のアスパラギンに相当するアミノ酸を含む領域に結合する。

【0019】

CD8はT細胞の表面に発現するTCRの補助受容体であり、成熟ナイーブCD8⁺T細胞が樹状細胞により特異的抗原を提示されると、CD8とTCRは集合する。CD8は、CD8 α およびCD8 β のサブユニットを含む。第2の結合部位はどのサブユニットに結合してもよい。ある実施形態では、二重特異性分子の第2の結合部位はCD8 α に結合する。ヒトおよびマウスのCD8 α の代表的なアミノ酸配列は、各々、GenBankアクセッション番号NP_001139345.1(配列番号5)およびNP_001074579.1(配列番号6)として登録されている。第2の

結合部位はCD8の細胞外領域のどこに結合してもよい。ある実施形態では、第2の結合部位は、CD8 α の細胞外領域に結合する。例えば、配列番号5のアミノ酸配列を有するヒトCD8 α において、細胞外領域は、第22位のセリンから第182位のアスパラギン酸までの領域であり、配列番号6のアミノ酸配列を有するマウスCD8 α において、細胞外領域は、第28位のリジンから第196位のチロシンまでの領域である。

【0020】

「配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギンに相当するアミノ酸」とは、あるLAG3のアミノ酸配列と配列番号2のアミノ酸配列を最適な状態(アミノ酸の一致が最大となる状態)にアラインメントしたときに、配列番号2の第54位のアスパラギンと一致する、当該LAG3におけるアミノ酸を意味する。CD3およびCD8の配列についても、同様に定義される。例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するヒトLAG3の第54位のセリン、第55位のロイシン、第61位のバリンおよび第62位のスレオニンは、それぞれ、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリンおよび第62位のイソロイシンに相当し、配列番号3のアミノ酸配列を有するヒトCD3 ϵ の第23位のアスパラギン酸～第27位のグルタミン酸、第51位のグルタミン～第56位のグルタミン酸、第58位のロイシン、および/または、第99位のチロシン～第109位のアスパラギンは、配列番号4のアミノ酸配列を有するマウスCD3 ϵ の第22位のアスパラギン酸～第26位のアスパラギン、第44位のロイシン～第49位のアスパラギン、第51位のリジン、および/または、第84位のチロシン～第91位のアスパラギンに相当する。

【0021】

第1および第2の結合部位は抗体に由来し得、特に、抗体の抗原結合部位(可変領域)に由来し得る。典型的には、第1の結合部位は抗LAG3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域に由来し、第2の結合部位は抗CD3抗体または抗CD8抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域に由来する。

【0022】

可変領域は、いかなる動物種の抗体に由来してもよい。例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギ、ヒト由来の抗体およびヒト化抗体が挙げられる。可変領域は、いかなるイムノグロブリンクラスの抗体に由来してもよい。イムノグロブリンクラスとしては、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMが、イムノグロブリンクラスのサブクラス(アイソタイプ)としては、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2が挙げられる。ある実施形態では、可変領域は、IgGサブクラス、例えば、IgG1またはIgG4サブクラスのものである。

【0023】

可変領域は、モノクローナル抗体に由来し得る。モノクローナル抗体を分泌するハイブリドーマは、周知の方法、例えば、Kohler et al., Nature 256:495, 1975に記載の方法に準じて作製することができる。まず、免疫原を、抗原性を高めるための適当な物質(例えば、キーホールリンペットヘモシアニンやウシ血清アルブミン等)、および必要に応じて免疫賦活剤(フロイントの完全若しくは不完全アジュバント等)とともに混合し、ラット、マウス、ウサギ、ヤギ、ウマ等の非ヒト哺乳動物に免疫する。通常、免疫動物は3～10日間隔で複数回免疫され、免疫原であるペプチドは1～100 μ gが投与される。次いで、複数回の免疫を経た免疫動物から免疫担当細胞(免疫動物において抗体産生能を有する細胞)を回収し、自己抗体産生能のないミエローマ細胞(例えば、マウス、ラット、モルモット、ハムスター、ウサギまたはヒト等の哺乳動物に由来する細胞)とを、細胞融合させる。細胞融合には、ポリエチレングリコール法、電気融合法などが用いられる。さらに、融合細胞が有する選択マーカーに基づき細胞融合に成功した細胞を選択し、選択された細胞が産生する抗体の免疫原に対する反応性を、ELISA法、ラジオイムノアッセイ、蛍光抗体法などにより確認することにより、目的のモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマが得られる。モノクローナル抗体は、得られたハイブリドーマをインビトロで培養した培養上清から単離することができる。また、マウス、ラット、モルモット、ハムスターまたはウサギ等の腹水中等のインビボで培養し、腹水から単離することもできる。

【0024】

抗LAG3抗体を得るための免疫原として、LAG3の細胞外領域の全部または一部、例えば、LAG3の細胞外領域の約5～50個、約6～40個、約7～35個、約8～30個、約9～25個または約10～20個のアミノ酸配列を含むペプチドを使用し得る。例えば、LAG3のD1領域の一部を含むペプチド、特に、D1領域に含まれ、かつ、エキストラループ領域に含まれない部分を含むペプチドを使用し得る。あるいは、例えば、配列番号1のアミノ酸配列を有するヒトLAG3の第54位のセリン、第55位のロイシン、第61位のバリンおよび/または第62位のスレオニンを含む領域、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリンおよび/または第62位のイソロイシンを含む領域を含むペプチドを使用し得る。

10

【0025】

抗CD3抗体を得るための免疫原として、CD3 ϵ の細胞外領域の全部または一部、例えば、CD3 ϵ の細胞外領域の約5～50個、約6～40個、約7～35個、約8～30個、約9～25個または約10～20個のアミノ酸配列を含むペプチドを使用し得る。例えば、配列番号3のアミノ酸配列を有するヒトCD3 ϵ の第23位のアスパラギン酸～第27位のグルタミン酸、第51位のグルタミン～第56位のグルタミン酸、第58位のロイシン、および/または、第99位のチロシン～第109位のアスパラギンを含む領域を含むペプチド、配列番号4のアミノ酸配列を有するマウスCD3 ϵ の第22位のアスパラギン酸～第26位のアスパラギン、第44位のロイシン～第49位のアスパラギン、第51位のリジン、および/または、第84位のチロシン～第91位のアスパラギンを含む領域を含むペプチドを使用し得る。

20

【0026】

抗CD8抗体を得るための免疫原として、CD8 α の細胞外領域の全部または一部、例えば、CD8 α の細胞外領域の約5～50個、約6～40個、約7～35個、約8～30個、約9～25個または約10～20個のアミノ酸配列を含むペプチドを使用し得る。

【0027】

例えば、 10^{-8} M以下、例えば 10^{-8} M～ 10^{-15} M、 10^{-8} M～ 10^{-13} M、 10^{-9} M～ 10^{-12} M、または 10^{-9} M～ 10^{-11} Mの平衡解離定数(Kd)で抗原に結合するモノクローナル抗体を使用する。抗体の抗原への結合は、ELISA法、蛍光抗体法、ラジオイムノアッセイ(RIA)、BIACORE(登録商標)表面プラズモン共鳴アッセイなどにより確認することができる。抗体の抗原への結合は、競合アッセイにより確認することもできる。例えば、ある抗体が既知の抗体と抗原への結合において競合するか否かを、FACSまたはELISAなどで確認できる。既知の抗LAG3抗体、抗CD3抗体および抗CD8抗体として、例えば、後述する重鎖可変領域、軽鎖可変領域またはCDRの配列を有する抗体を用いることができる。

30

【0028】

所望の抗体を産生するハイブリドーマから周知の方法により抗体遺伝子をクローニングし、可変領域のアミノ酸配列またはそれをコードする核酸配列を決定し得る。公知の抗LAG3抗体、抗CD3抗体または抗CD8抗体のアミノ酸配列またはそれをコードする核酸配列を利用してもよい。可変領域は、通常、4つのフレームワーク領域(framework region)(FRとも記載する)には含まれた3つの相補性決定領域(complementarity determining region)(CDRとも記載する)で構成される。本開示において、抗体の可変領域のCDRとフレームワークに割り当てられるアミノ酸位置はKabatに従って規定される(Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institute of Health, Bethesda, Md., (1987)および(1991)参照)。

40

【0029】

CDRは、実質的に抗体の結合特異性を決定する領域であり、そのアミノ酸配列は多様性に富む。一方、FRを構成するアミノ酸配列は、異なる結合特異性を有する抗体の間でも高い相同性を示す。そのため、CDRの移植によって、ある抗体の結合特異性を他の抗体に移植することができる。例えば、ヒト以外の動物由来の抗体のCDRをヒト抗体に移植することにより、ヒト以外の動物由来の抗体のCDRとヒト抗体由来のFRおよびヒト抗体由来の定常領域とから構成されるヒト化抗体を得ることができる。ヒト化抗体は種々の方法により

50

作製することができるが、一例として、Overlap Extension PCRが挙げられる(Almagro and Fransson, *Front. Biosci.* 13:1619-1633(2008))。ヒト化抗体の作製に好適なFRの選択方法は公知であり、例えば、ベストフィット法(Sims et al. *J. Immunol.* 151:2296(1993))により選択されたFRや、ヒト抗体の軽鎖または重鎖可変領域の特定のサブグループのコンセンサス配列に由来するFR(Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285(1992); Presta et al. *J. Immunol.* 151:2623(1993))を用いることができる。かくして得られたヒト化抗体の可変領域を使用してもよい。

【0030】

ヒト抗体の可変領域を使用してもよい。ヒト抗体は、例えば、ヒトリンパ球をインビトロで所望の抗原で感作し、次いで、感作リンパ球をヒトミエローム細胞と融合させることによって取得することができる(特公平1-59878号公報)。融合パートナーであるヒトミエローム細胞には、例えばU266などを利用することができる。また、ヒト抗体は、ヒト抗体遺伝子の全てのレパートリーを有するトランスジェニック動物を所望の抗原で免疫することによっても取得することができる(Lonberg, *Nat. Biotech.* 23: 1117-1125, 2005)。さらに、ヒト抗体ライブラリーを用いて、パンニングによりヒト抗体を取得する技術も知られている(Antibody Phage Display: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology* 178, 2001)。例えば、ヒト抗体の可変領域を一本鎖抗体(scFv)としてファージディスプレイ法によりファージの表面に発現させ、抗原に結合するファージを選択し、選択されたファージの遺伝子を解析することにより、抗原に結合するヒト抗体の可変領域をコードする核酸配列を決定することができる。

【0031】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、

配列番号7のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域に含まれるCDR1、CDR2およびCDR3と同じアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号8のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域に含まれるCDR1、CDR2およびCDR3と同じアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3を含む軽鎖可変領域；を含む。

【0032】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、

配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域；を含む。

【0033】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、

配列番号9のアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列からなる重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号12のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域；を含む。

【0034】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、

配列番号9の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR1、

配列番号10の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR2、および

配列番号11の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR3、を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号12の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR1、

配列番号13の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR2、および

配列番号14の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR3、を含む軽鎖可変領域；を含む。

10

【0035】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、

配列番号9の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR1、

配列番号10の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR2、および

配列番号11の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR3、を含む重鎖可変領域；および/または、

20

配列番号12の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR1、

配列番号13の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR2、および

配列番号14の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR3、を含む軽鎖可変領域；を含む。

【0036】

「配列同一性」は、比較対象の配列の全領域にわたって、最適な状態にアラインメントされた2つの配列を比較することにより決定される。ここで、比較対象の配列は、2つの配列の最適なアラインメントにおいて、付加または欠失(例えばギャップ等)を有していてもよい。配列同一性は、公共のデータベース(例えば、DDBJ(<http://www.ddbj.nig.ac.jp>))で提供されるFASTA、BLAST、CLUSTAL W等のプログラムを用いて算出することができる。あるいは、市販の配列解析ソフトウェア(例えば、Vector NTI(登録商標)ソフトウェア、GENETYX(登録商標) ver. 12)を用いて求めることもできる。

30

【0037】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、

配列番号9の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR1、

40

配列番号10の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR2、および

配列番号11の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR3、を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号12の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR1、

配列番号13の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR2、および

配列番号14の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された

50

配列を含むCDR3、
を含む軽鎖可変領域；
を含む。

【0038】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、
配列番号9の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された
配列からなるCDR1、

配列番号10の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された
配列からなるCDR2、および

配列番号11の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された
配列からなるCDR3、

を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号12の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された
配列からなるCDR1、

配列番号13の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された
配列からなるCDR2、および

配列番号14の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された
配列からなるCDR3、

を含む軽鎖可変領域；

を含む。

【0039】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、配列番号7のアミノ酸配列
と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%
以上の配列同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、および/または、配列番号8のアミノ
酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましく
は95%以上の配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる実施形態にお
いて、LAG3に結合する第1の結合部位は、配列番号7のアミノ酸配列において0~5個のア
ミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または
、配列番号8のアミノ酸配列において0~5個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された
アミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。これらの実施形態には、重鎖可変領域および/ま
たは軽鎖可変領域のCDRに改変が生じていないLAG3に結合する第1の結合部位、具体的
には、配列番号9のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号10のアミノ酸配列からなるCDR2
、および配列番号11のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、および/または、
配列番号12のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号13のアミノ酸配列からなるCDR2、
および配列番号14のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、LAG3に結
合する第1の結合部位が含まれる。

【0040】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、上記軽鎖可変領域のCDR1
~3を含む重鎖可変領域および/または上記重鎖可変領域のCDR1~3を含む軽鎖可変領域を
含む。

【0041】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、配列番号7のアミノ酸配列
を含む重鎖可変領域および/または配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。
さらなる実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、配列番号7のアミノ酸配
列からなる重鎖可変領域および/または配列番号8のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を
含む。

【0042】

ある実施形態において、LAG3に結合する第1の結合部位は、公知の抗LAG3抗体、例え
ば、BMS-986016、LAG525、MK-4280、11E3、17B4、3DS223H、REA351、REA
776、11C3C65、7H2C65、C9B7Wまたは631501の可変領域に由来し得る。

10

20

30

40

50

【0043】

ある実施形態では、LAG3に結合する第1の結合部位は、上記で特定される第1の結合部位のいずれかとLAG3への結合を競合するものである。例えば、第1の結合部位は、上記で特定される第1の結合部位のいずれかとLAG3への結合を競合する抗体の可変領域に由来する。競合は、例えば、上記の競合アッセイにより確認することができる。

【0044】

ある実施形態では、上記で特定される第1の結合部位のいずれかが結合するLAG3の領域が特定される場合に、他の種のLAG3においてその領域に相当する領域を特定し、それに結合する結合部位、例えば、それに結合する抗体の可変領域を、第1の結合部位とすることができる。

【0045】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、

配列番号15のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域に含まれるCDR1、CDR2、およびCDR3と同じアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号16のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域に含まれるCDR1、CDR2、およびCDR3と同じアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3を含む軽鎖可変領域；を含む。

【0046】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、

配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域；を含む。

【0047】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、

配列番号17のアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列からなる重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号20のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域；を含む。

【0048】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、

配列番号17の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR1、

配列番号18の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR2、および

配列番号19の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR3、を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号20の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR1、

配列番号21の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR2、および

配列番号22の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR3、を含む軽鎖可変領域；

10

20

30

40

50

を含む。

【0049】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、

配列番号17の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR1、

配列番号18の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR2、および

配列番号19の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR3、

を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号20の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR1、

配列番号21の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR2、および

配列番号22の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR3、

を含む軽鎖可変領域；

を含む。

【0050】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、

配列番号17の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR1、

配列番号18の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR2、および

配列番号19の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR3、

を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号20の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR1、

配列番号21の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR2、および

配列番号22の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR3、

を含む軽鎖可変領域；

を含む。

【0051】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、

配列番号17の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR1、

配列番号18の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR2、および

配列番号19の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR3、

を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号20の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR1、

配列番号21の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR2、および

配列番号22の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR3、

10

20

30

40

50

を含む軽鎖可変領域；
を含む。

【0052】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、配列番号15のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、および/または、配列番号16のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、配列番号15のアミノ酸配列において0～5個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または、配列番号16のアミノ酸配列において0～5個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。これらの実施形態には、重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のCDRに改変が生じていないCD3に結合する第2の結合部位、具体的には、配列番号17のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号18のアミノ酸配列からなるCDR2、および配列番号19のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、および/または、配列番号20のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号21のアミノ酸配列からなるCDR2、および配列番号22のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、CD3に結合する第2の結合部位が含まれる。

10

【0053】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、上記軽鎖可変領域のCDR1～3を含む重鎖可変領域および/または上記重鎖可変領域のCDR1～3を含む軽鎖可変領域を含む。

20

【0054】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/または配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、配列番号15のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および/または配列番号16のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む。

【0055】

ある実施形態において、CD3に結合する第2の結合部位は、公知の抗CD3抗体、例えば、2C11、17A2、500A2、KT3、OKT3(ATCC受託番号CRL8001)(米国特許第4658019号)、7D6、12F6、38.1、89b1、131F26、BL-A8、BW239/347、BW264/56、CD3-4B5、CLB-T3/3、CRIS-7、F111-409、G19-4.1、HIT3a、ICO-90、IP30、Leu-4、LY17.2G3、M-T301、M-T302、MEM-57、MEM-92、NU-T3、OKT3D、SMC2、T3、T3(2Ad2)、T3/2Ad2A2、T3/2AD、T3(2ADA)、T3/2T8-2F4、T3/RW2-4B6、T3/RW2-8C8、T10B9、T101-01、UCHT1、VIT3、VIT3b、X35-3、XXIII.46、XXIII.87、XXIII.141、YTH12.5、YTH12.5、CLB-T3.4.2、WT31、WT32、SPv-T3b、11D8、M291、Leu4、500A2、SP34、RIV-9、BH11、T2/30、AG3、BC3、OKT3γ1(ala-ala)(米国特許第6491916号)、ChAglyCD3(国際公開第93/19196号)またはHUM291(国際公開第97/44362号)の可変領域に由来し得る。

30

40

【0056】

ある実施形態では、CD3に結合する第2の結合部位は、上記で特定される第2の結合部位のいずれかとCD3への結合を競合するものである。ある実施形態では、CD3εに結合する第2の結合部位は、上記で特定される第2の結合部位のいずれかとCD3εへの結合を競合するものである。例えば、第2の結合部位は、上記で特定される第2の結合部位のいずれかとCD3への結合を競合する抗体の可変領域に由来する。競合は、例えば、上記の競合アッセイにより確認することができる。

【0057】

ある実施形態では、上記で特定される第2の結合部位のいずれかが結合するCD3の領域が特定される場合に、他の種のCD3においてその領域に相当する領域を特定し、それに結

50

合する結合部位、例えば、それに結合する抗体の可変領域を、第2の結合部位とすることができる。

【0058】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、

配列番号23のアミノ酸配列を有する重鎖可変領域に含まれるCDR1、CDR2、およびCD R3と同じアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号24のアミノ酸配列を有する軽鎖可変領域に含まれるCDR1、CDR2、およびCD R3と同じアミノ酸配列を有するCDR1、CDR2およびCDR3を含む軽鎖可変領域；

を含む。

10

【0059】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、

配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域；

を含む。

【0060】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、

配列番号25のアミノ酸配列からなる重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列からなる重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列からなる重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号28のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列からなる軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域；

を含む。

20

【0061】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、

配列番号25の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR1、

30

配列番号26の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR2、および

配列番号27の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR3、

を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号28の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR1、

配列番号29の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR2、および

配列番号30の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含むCDR3、

40

を含む軽鎖可変領域；

を含む。

【0062】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、

配列番号25の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR1、

配列番号26の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらにより好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR2、および

配列番号27の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さら

50

により好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR3、
を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号28の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR1、

配列番号29の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR2、および

配列番号30の配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列からなるCDR3、

を含む軽鎖可変領域；

を含む。

10

【0063】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、

配列番号25の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR1、

配列番号26の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR2、および

配列番号27の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR3、

を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号28の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR1、

20

配列番号29の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR2、および

配列番号30の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列を含むCDR3、

を含む軽鎖可変領域；

を含む。

【0064】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、

配列番号25の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR1、

30

配列番号26の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR2、および

配列番号27の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR3、

を含む重鎖可変領域；および/または、

配列番号28の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR1、

配列番号29の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR2、および

40

配列番号30の配列において0、1または2個のアミノ酸が欠失、置換、または付加された配列からなるCDR3、

を含む軽鎖可変領域；

を含む。

【0065】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、配列番号23のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含む重鎖可変領域、および/または、配列番号24のアミノ酸配列と80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは95%以上の配列同一性を有する配列を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる実施形態に

50

において、CD8に結合する第2の結合部位は、配列番号23のアミノ酸配列において0～5個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および/または、配列番号24のアミノ酸配列において0～5個のアミノ酸が欠失、置換、または付加されたアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。これらの実施形態には、重鎖可変領域および/または軽鎖可変領域のCDRに改変が生じていないCD8に結合する第2の結合部位、具体的には、配列番号25のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号26のアミノ酸配列からなるCDR2、および配列番号27のアミノ酸配列からなるCDR3を含む重鎖可変領域、および/または、配列番号28のアミノ酸配列からなるCDR1、配列番号29のアミノ酸配列からなるCDR2、および配列番号30のアミノ酸配列からなるCDR3を含む軽鎖可変領域を含む、CD8に結合する第2の結合部位が含まれる。

10

【0066】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、上記軽鎖可変領域のCDR1～3を含む重鎖可変領域および/または上記重鎖可変領域のCDR1～3を含む軽鎖可変領域を含む。

【0067】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域および/または配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む。さらなる実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、配列番号23のアミノ酸配列からなる重鎖可変領域および/または配列番号24のアミノ酸配列からなる軽鎖可変領域を含む。

20

【0068】

ある実施形態において、CD8に結合する第2の結合部位は、公知の抗CD8抗体、例えば、YTS169、cM-T807、T8/Leu2/SK1、RPA-T8、HIT8a、OKT8(特表2011-522835)、53-6.7、53-5.8、5H10、YTS-156、KT15、LT8またはCA-8の可変領域に由来し得る。

【0069】

ある実施形態では、CD8に結合する第2の結合部位は、上記で特定される第2の結合部位のいずれかとCD8への結合を競合するものである。ある実施形態では、CD8αに結合する第2の結合部位は、上記で特定される第2の結合部位のいずれかとCD8αへの結合を競合するものである。例えば、第2の結合部位は、上記で特定される第2の結合部位のいずれかとCD8への結合を競合する抗体の可変領域に由来する。競合は、例えば、上記の競合アッセイにより確認することができる。

30

【0070】

ある実施形態では、上記で特定される第2の結合部位のいずれかが結合するCD8の領域が特定される場合に、他の種のCD8においてその領域に相当する領域を特定し、それに結合する結合部位、例えば、それに結合する抗体の可変領域を、第2の結合部位とすることができる。

【0071】

二重特異性分子は、当技術分野で公知の多重特異性分子のフォーマットに即した構造を有し得る。多重特異性分子の例は、例えば、参照により本明細書に組み込まれる、The coming of Age of Engineered Multivalent Antibodies, Nunez-Prado et al Drug Discovery Today Vol 20 Number 5 Mar 2015, page 588-594、D. Holmes, Nature Rev Drug Disc Nov 2011:10; 798, Chan and Carter, Nature Reviews Immunology vol 10, May 2010, 301および特表2017-522023に開示されている。

40

【0072】

ある実施形態では、二重特異性分子のフォーマットは、ダイアボディ、二重特異性sc(Fv)₂、二重特異性ミニボディ、二重特異性F(ab')₂、二重特異性抗体、共有結合型ダイアボディ(二重特異性DART)(国際公開第2006/113665号または国際公開第2008/157379号)、二重特異性(FvCys)₂(J. Immunol.,1992, Vol.149, No.1, p.120-126)、二重特異性F(ab'-ジッパー)₂(J. Immunol.,1992, Vol.148, No.5, p.1547-1553)、二重特異性(

50

Fv-ジッパー)₂(Biochemistry, 1992, Vol.31, No.6, p.1579-1584)、二重特異性三鎖抗体(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1993, Vol.90, No.14, p.6444-6448)および二重特異性mAb²(www.f-star.com/technology_mab.html)から選択される。ある実施形態では、二重特異性分子のフォーマットは、ダイアボディ、タンデムscFv、scダイアボディ、FabFv、Fab'Fv、FabdsFv、Fab-scFv、Fab-dsscFv、Fab-(dsscFv)₂、diFab、diFab'、scFv-Fc、タンデムscFv-Fc、scダイアボディ-Fc、scダイアボディ-CH₃、Ig-scFvおよびscFv-Ig(特表2017-526616)から選択される。ある実施形態では、二重特異性分子は、ダイアボディ、タンデムscFvおよびscダイアボディから選択される。ある実施形態では、二重特異性分子はscダイアボディである。ある実施形態では、二重特異性分子は二重特異性抗体、好ましくは二重特異性モノクローナル抗体である。ある実施形態では、本明細書に記載の二重特異性分子は定常領域を含む。二重特異性抗体は、いかなるイムノグロブリンクラスの抗体であってもよい。イムノグロブリンクラスとしては、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMが、イムノグロブリンクラスのサブクラス(アイソタイプ)としては、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2が挙げられる。ある実施形態では、二重特異性抗体は、IgGサブクラス、例えば、IgG1またはIgG4サブクラスのものである。

【0073】

ダイアボディとは、2本のポリペプチド鎖から構成されるダイマーであり、各ポリペプチド鎖において、重鎖可変領域(V_H)と軽鎖可変領域(V_L)が、同じ鎖中で互いに会合できないように、リンカーにより連結されている(Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 1993, Vol.90, No.14, p.6444-6448)。一方のポリペプチド鎖上のV_HおよびV_Lが、他方のポリペプチド鎖上のV_LおよびV_Hとそれぞれ会合するため、ダイアボディは2つの抗原結合部位を有する。リンカーは、V_HおよびV_Lの発現並びにダイアボディの形成を阻害するものでなければ特に限定されず、例えば、Ser、(Gly)_n-Ser、Ser-(Gly)_n、((Gly)₄-Ser)_n、(Ser-(Gly)₄)_n [nは1~6の整数を表す]などであり得る(J. Immunol. Meth., 1999, Vol.231, p.177-189)。典型的には、ペプチドリンカーは、ポリペプチド鎖内のV_HとV_Lが会合できない程度に短く、例えば、約2~12または約3~10、特に約5アミノ酸残基の長さであるか、または、ポリペプチド鎖内のV_HとV_Lが会合できない構造を有する。

【0074】

二重特異性sc(Fv)₂は、異なる抗原を認識する2つの抗体のV_HおよびV_Lが、リンカーを介して一本鎖中に連結されているポリペプチド鎖である(J. Biological Chemistry, 1994, 269: 199-206)。ここで、二重特異性sc(Fv)₂の形態には、2つの異なる抗原aおよび抗原bを認識する抗体のV_HおよびV_Lを各々V_{Ha}およびV_{La}、V_{Hb}およびV_{Lb}と表し、ペプチドリンカーを各々(L₁)、(L₂)および(L₃)と表すと、N末端側から、

- (1) V_{Ha}-(L₁)-V_{La}-(L₂)-V_{Hb}-(L₃)-V_{Lb}、
- (2) V_{Ha}-(L₁)-V_{La}-(L₂)-V_{Lb}-(L₃)-V_{Hb}、
- (3) V_{La}-(L₁)-V_{Ha}-(L₂)-V_{Hb}-(L₃)-V_{Lb}、
- (4) V_{La}-(L₁)-V_{Ha}-(L₂)-V_{Lb}-(L₃)-V_{Hb}、
- (5) V_{Ha}-(L₁)-V_{Hb}-(L₂)-V_{Lb}-(L₃)-V_{La}、
- (6) V_{Ha}-(L₁)-V_{Lb}-(L₂)-V_{Hb}-(L₃)-V_{La}、
- (7) V_{La}-(L₁)-V_{Lb}-(L₂)-V_{Hb}-(L₃)-V_{Ha}、および
- (8) V_{La}-(L₁)-V_{Hb}-(L₂)-V_{Lb}-(L₃)-V_{Ha}、

で配列されているものが含まれる。二重特異性sc(Fv)₂は、V_{Ha}とV_{La}が会合し、V_{Hb}とV_{Lb}が会合することによって形成される。ここで、ペプチドリンカーは、二重特異性sc(Fv)₂の発現並びに形成を阻害するものでなければ特に限定されず、例えば、Ser、(Gly)_n-Ser、Ser-(Gly)_n、((Gly)₄-Ser)_n、(Ser-(Gly)₄)_n [nは1~6の整数を表す]、Ser-Ser-Ala-Asp-Asp-Ala-Lys-Lys-Asp-Ala-Ala-Lys-Lys-(Asp-Asp-Ala-Lys-Lys)₂-Asp-Alaなどであり得る。

【0075】

上記(1)~(4)の形態の二重特異性sc(Fv)₂を、特にタンデムscFvと称する。典型的には、タンデムscFvのペプチドリンカー(L₂)は、それに隣接する2つの可変領域が相互に会合

できない程度に短く、例えば、約2~12または約3~10、特に約5アミノ酸残基の長さであるか、または、それに隣接する2つの可変領域が相互に会合できない構造を有する。タンデムscFvのペプチドリンカー(L₁)および(L₃)は、それに隣接する2つの可変領域が相互に会合できる長さで構造を有し、例えば、約10~25または約13~20、特に約15アミノ酸残基の長さである。(L₁)および(L₃)は同じであっても異なってもよい。

【0076】

上記(5)~(8)の形態の二重特異性sc(Fv)₂を、特にscダイアボディと称する。典型的には、scダイアボディのペプチドリンカー(L₁)および(L₃)は、それに隣接する2つの可変領域が相互に会合できない程度に短く、例えば、約2~12または約3~10、特に約5アミノ酸残基の長さであるか、または、それに隣接する2つの可変領域が相互に会合できない構造を有する。(L₁)および(L₃)は同じであっても異なってもよい。タンデムscFvのペプチドリンカー(L₂)は、それに隣接する2つの可変領域が相互に会合できる長さで構造を有し、例えば、約10~25または約13~20、特に約15アミノ酸残基の長さである。

【0077】

本開示の二重特異性分子が、タンデムscFvまたはscダイアボディである場合、LAG3に結合する第1の結合部位が上記式のV_{Ha}およびV_{La}で構成され、CD3またはCD8に結合する第2の結合部位がV_{Hb}およびV_{Lb}で構成され得る。あるいは、LAG3に結合する第1の結合部位が上記式のV_{Hb}およびV_{Lb}で構成され、CD3またはCD8に結合する第2の結合部位がV_{Ha}およびV_{La}で構成され得る。

【0078】

二重特異性抗体とは、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。二重特異性抗体は、例えば、ハイブリッドハイブリドーマ法(米国特許第4474893号)で作製されたハイブリドーマから産生させることができる。また、異なる抗原を認識する抗体の重鎖および軽鎖を各々コードする計4種類のcDNAを哺乳動物細胞に共発現させ、タンパク質を分泌させて製造することができる。ある実施形態では、二重特異性抗体はIgGサブクラス、例えば、IgG1またはIgG4サブクラスのものである。

【0079】

二重特異性F(ab')₂とは、異なる2つの抗原を認識する抗体のFab'断片が、ジスルフィド結合等により共有結合した低分子化抗体である。ここで、Fab'断片は、インタクトな抗体をペプシンで消化したF(ab')₂の2つの重鎖間のジスルフィド結合の切断により調製される抗体断片である。二重特異性F(ab')₂は、例えば、一方の抗体から調製したFab'断片をo-フェニレンジマレイミドにてマレイミド化し、もう一方の抗体から調製したFab'断片を反応させることにより作製することができる(Cancer Research 1997, 57: 4008-4014)。また、Fab'断片-チオニトロ安息香酸誘導体と一方のFab'-SH等の抗体断片を化学的に結合する方法も知られている(Science 1985, 229: 81-83)。

【0080】

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させた低分子化抗体である(Biochemistry, 1992, Vol.31, No.6, p.1579-1584)。ここで、scFvとは、V_HとV_Lがペプチドリンカー等によって連結された形態を有する一本鎖の改変低分子抗体断片である(J. Immunol. Meth., 1999, Vol.231, p.177-189)。

【0081】

これらのフォーマットの二重特異性分子は、その抗原結合部位を構成するV_HおよびV_Lに相当する部分を各々コードする遺伝子を用いて製造することができる。V_HおよびV_Lに相当する部分を各々コードする遺伝子は、主に抗体遺伝子ライブラリーから、あるいはモノクローナル抗体を産生するハイブリドーマから遺伝子クローニングして取得することができる。

【0082】

10

20

30

40

50

二重特異性分子は、それをコードする単離cDNAを発現ベクターに挿入し、宿主細胞で発現・分泌させて製造することができる。例えば、ダイアボディの場合、ダイアボディを構成する各々の一本鎖ペプチドを発現するベクターは、ペプチドリinkerをコードするDNAを挟むように、異なる抗原を認識する V_H 、 V_L に相当する部分を各々コードするcDNAをインフレームで連結し、これを発現ベクターに挿入して作製することができる。各々の一本鎖ペプチドを発現するDNAは同一の発現ベクターに挿入されてもよく、また、別々の発現ベクターに挿入されてもよい。この発現ベクターを適当な宿主細胞に導入して発現させると、宿主細胞からダイアボディを直接分泌させることができる。また、二重特異性 $sc(Fv)_2$ の場合、例えば、一方の抗原を認識する V_H および V_L をコードするcDNA、他方の抗原を認識する V_H および V_L をコードするcDNA、並びに、ペプチドリinkerをコードするcDNAをインフレームで連結し、これを発現ベクターに挿入して作製することができる。この発現ベクターを適当な宿主細胞に導入して発現させると、宿主細胞から二重特異性 $sc(Fv)_2$ を直接分泌させることができる。ここで、ダイアボディあるいは二重特異性 $sc(Fv)_2$ の発現に使用できる発現ベクターとしては、例えば、pEBMulti-Neo (Wako)、pCANTAB5E (GEヘルスケアバイオサイエンス社製)などが挙げられる。

【0083】

宿主細胞としては、例えば、動物細胞、植物細胞、真菌細胞などの真核細胞を用いることができる。動物細胞としては、哺乳類細胞(例えば、CHO、COS、NIH3T3、ミエローマ、BHK(baby hamster kidney)、HeLa、Vero、293T、platE)、両生類細胞(例えばアフリカツメガエル卵母細胞)、または昆虫細胞(例えば、Sf9、Sf21、Tn5)が挙げられる。真菌細胞としては、酵母(例えば、サッカロミセス(*Saccharomyces*)属、例えば、サッカロミセス・セレビシエ(*Saccharomyces cerevisiae*))、糸状菌(例えば、アスペルギルス(*Aspergillus*)属、例えば、アスペルギルス・ニガー(*Aspergillus niger*))などが挙げられる。また、大腸菌(*E. coli*)(例えば、JM109、DH5 α 、HB101等)、枯草菌などの原核細胞を宿主細胞として用いることもできる。宿主細胞へのベクターの導入は、例えば、リン酸カルシウム法、DEAEデキストラン法、エレクトロポレーション法、リポフェクションなどの方法により行うことができる。

【0084】

本開示はまた、二重特異性分子をコードするポリヌクレオチド、当該ポリヌクレオチドを含む発現ベクター、および当該ポリヌクレオチドまたは当該発現ベクターを含む形質転換細胞を提供する。

【0085】

二重特異性分子は、例えば半減期延長、または安定性の改善等のため、ポリエチレングリコール(PEG)、ポリプロピレングリコール、ポリオキシアルキレンまたはポリエチレングリコールとポリプロピレングリコールとのコポリマーなどのポリマーと結合していてもよい。また、シグナル配列等の付加配列を含んでもよい。

【0086】

二重特異性分子のアミノ酸残基は、公知の方法で修飾されていてもよい。例えば、アミノ酸残基の側鎖中の官能基、N末端アミノ酸のアミノ基、またはC末端アミノ酸のカルボキシル基に、エステル化、アルキル化、ハロゲン化、リン酸化などを施し得る。また、二重特異性分子のN末端および/またはC末端に、種々の物質を結合させることができる。例えば、アミノ酸、ペプチド、それらのアナログ等を結合させてもよい。例えば、ヒスチジンタグ、FLAGタグなどのタグを付加してもよい。二重特異性分子にこれらの物質が結合している場合、これらの物質が例えば、生体内酵素などにより、あるいは細胞内プロセッシングなどの過程により処理され、最終的に二重特異性分子を生じるものであってもよい。これらの物質は、二重特異性分子の溶解性を調節するものであってもよく、耐プロテアーゼ作用等その安定性を向上させるものであってもよく、また例えば、所定の組織・器官に特異的に二重特異性分子をデリバリーするものであってもよい。

【0087】

本明細書に開示される二重特異性分子または免疫抑制剤の毒性は低いものであるため、

10

20

30

40

50

医薬品として安全に使用することができる。

【0088】

〔医薬品への適用〕

実施例により立証される通り、本明細書に開示される二重特異性分子は、免疫を抑制し得る。従って、二重特異性分子を免疫抑制剤として使用し得る。また、免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療に使用し得る。

【0089】

免疫の亢進を特徴とする疾患には、自己免疫疾患、アレルギー疾患および移植片対宿主病が含まれる。自己免疫疾患には、例えば、ベーチェット病、全身性エリテマトーデス、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、ウェゲナー肉芽腫症、混合性結合組織病、シェーグレン症候群、成人スティル病、アレルギー性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、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、原発性胆汁性肝硬変、大動脈炎症候群、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、自己免疫性溶血性貧血、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(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、特発性アジソン病(慢性副腎皮質機能低下症)、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)、慢性円板状エリテマトーデス、限局性強皮症、乾癬、乾癬性関節炎、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、アトピー性皮膚炎、視神経脊髄炎、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、サルコイドーシス、水疱性類天疱瘡、巨細胞性動脈炎、筋委縮性側索硬化症、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、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)およびセリアック病などが含まれる。ある実施形態では、自己免疫疾患は、I型糖尿病、多発性硬化症、全身エリテマトーデスまたは関節リウマチである。ある実施形態では、自己免疫疾患は多発性硬化症である。アレルギー疾患には、例えば、喘息、アトピー性皮膚炎、鼻炎、結膜炎および花粉症などが含まれる。

【0090】

本明細書で使用されるとき、「治療する」または「治療」は、疾患を有する対象において、疾患の原因を軽減または除去すること、その進行を遅延または停止させること、その症状を軽減、緩和、改善または除去すること、および/または、その症状の悪化を抑制することを意味する。

【0091】

本明細書で使用されるとき、「予防する」または「予防」は、対象において、特に、疾患を発症する可能性が高いが、未だ発症していない対象において、疾患の発症を防止すること、または、疾患を発症する可能性を低減することを意味し、再発予防を含む。自己免疫疾患またはアレルギー疾患を発症する可能性があるが、未だ発症していない対象には、例えば、免疫が亢進している対象、自己免疫疾患またはアレルギー疾患の遺伝的素因を有する対象、過去に自己免疫疾患またはアレルギー疾患に罹患し、治療した対象が含まれる。移植片対宿主病を発症する可能性があるが、未だ発症していない対象には、臓器移植を受ける対象が含まれる。

【0092】

免疫抑制剤または免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療剤の投与対象としては、動物、典型的には哺乳動物(例えば、ヒト、マウス、ラット、ハムスター、ウサギ、ネコ、イヌ、ウシ、ヒツジ、サル等)が挙げられるが、ヒトが特に好ましい。また好ましい対象は、免疫の抑制または上記予防および/または治療を必要とする対象、特に上記治療を必要とする対象(例えば患者)である。

【0093】

有効成分の投与量は、投与方法、投与対象の年齢、体重、健康状態等によって適宜選択される。例えば、成人1日当たり、 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}\sim 300\text{mg}/\text{kg}$ を、1日30分から24時間の範囲の期間の持続投与で、または、1日1回から数回、または1日もしくは数日または1週間もしくは数週間に1回から数回、例えば1～3週間に1回投与することができるが、これに限定されない。投与方法も、投与対象の年齢、体重、健康状態等によって適宜選択される。投与方法は、経口投与であっても非経口投与であってもよいが、非経口投与が好ましい。非経口投与としては、皮下投与、皮内投与、腹腔内投与、筋肉内投与、静脈内投与などが挙げられるが、静脈内投与が好ましい。

【0094】

免疫抑制剤または免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療剤は、常法により製剤化することができる。製剤は、製剤上の必要に応じて、医薬的に許容し得る各種の製剤用物質を含んでもよい。製剤用物質は製剤の剤形により適宜選択することができるが、例えば、緩衝化剤、界面活性剤、安定化剤、防腐剤、賦形剤、希釈剤、添加剤、崩壊剤、結合剤、被覆剤、潤滑剤、滑沢剤、可溶化剤等が挙げられる。例えば、免疫抑制剤は、注射液または輸液として製剤化され得る。注射剤または輸液は、滅菌水溶液、懸濁液または乳濁液等の形態であり得、あるいは、滅菌された液体に溶解、懸濁または乳濁して使用するための固形剤または凍結乾燥剤の形態であり得る。滅菌された液体は、例えば、注射用水、生理食塩水、ブドウ糖溶液または等張液等であり得る。また、免疫抑制剤は、有効成分が持続放出または制御放出されるように製剤化され得る。これらの製剤の製造方法は、当分野で周知である。

【0095】

製剤は、薬学的に許容できる担体を含み得る。本開示において、「薬学的に許容できる担体」は、有効成分と組み合わせられた場合にその成分の生物学的活性を保持し得る、対象の免疫系と非反応性である任意の物質が含まれる。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、pH調整剤および抗酸化剤などが挙げられる。安定剤としては、例えば、各種アミノ酸、アルブミン、グロブリン、ゼラチン、マンニトール、グルコース、デキストラン、エチレングリコール、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、アスコルビン酸、亜硫酸水素ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、クエン酸ナトリウム、ジブチルヒドロキシトルエン等を用いることができる。溶解補助剤としては、例えば、アルコール(例えば、エタノール等)、ポリアルコール(例えば、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール等)、非イオン性界面活性剤(例えば、ポリソルベート20^(登録商標)、ポリソルベート80^(登録商標)、HCO-50等)等を用いることができる。懸濁化剤としては、例えば、モノステアリン酸グリセリン、モノステアリン酸アルミニウム、メチルセルロース、カルボキシメチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ラウリル硫酸ナトリウム等を用いることができる。乳化剤としては、例えば、アラビアゴム、アルギン酸ナトリウム、トラガント等を用いることができる。無痛化剤としては、例えば、ベンジルアルコール、クロロブタノール、ソルビトール等を用いることができる。緩衝剤としては、例えば、リン酸緩衝液、酢酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、炭酸緩衝液、クエン酸緩衝液、トリス緩衝液、グルタミン酸緩衝液、イプシロンアミノカプロン酸緩衝液等を用いることができる。保存剤としては、例えば、パラオキシ安息香酸メチル、パラオキシ安息香酸エチル、パラオキシ安息香酸プロピル、パラオキシ安息香酸ブチル、クロロブタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンザルコニウム、デヒドロ酢酸ナトリウム、エデト酸ナトリウム、ホウ酸、ホウ砂等を用いることができる。防腐剤としては、例えば、塩化ベンザルコニウム、パラオキシ安息香酸、クロロブタノール等を用いることができる。pH調整剤としては、例えば、塩酸、水酸化ナトリウム、リン酸、酢酸等を用いることができる。抗酸化剤として、例えば、(1)アスコルビン酸、システイン、ヒドロクロライド、重硫酸ナトリウム、メタ重亜硫酸ナトリウム、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、ブチル化ヒドロキシアニソール、ブチル化ヒドロキシトルエン、レシチン、プロピルガレート、 α -トコフェロール等のよ

10

20

30

40

50

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

【0096】

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

【0097】

免疫抑制剤または免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療剤は、単独で使用してもよく、または、1種またはそれ以上のさらなる有効成分、特に、免疫を抑制するための有効成分と併用してもよい。成分を「併用する」ことは、全成分を含有する投与剤形の使用および各成分を別個に含有する投与剤形の組合せの使用のみならず、それらが免疫の抑制または免疫の亢進を特徴とする疾患の治療および/または予防のために使用される限り、各成分を同時に、または、いずれかの成分を遅延して投与することも意味する。いずれかの成分を遅延して投与する場合に、各成分を同時投与する期間があってもよい。2種またはそれ以上のさらなる有効成分を併用することも可能である。その併用により、例えば、その他の有効成分の予防および/または治療の効果の補完、投与量あるいは投与回数の維持および/または低減が可能になる。併用に適する有効成分には、例えば、抗炎症剤、抗菌剤、抗真菌剤、抗ウイルス剤、免疫抑制剤、分子標的薬等が含まれる。

【0098】

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

【0099】

また、例えば、本開示の免疫抑制剤または免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療剤を多発性硬化症の予防および/または治療に適用する場合、ステロイド薬(例えば、酢酸コルチゾン、ヒドロコルチゾン、リン酸ヒドロコルチゾンナトリウム、コハク酸ヒドロコルチゾンナトリウム、酢酸フルドコルチゾン、プレドニゾン、酢酸プレドニゾン、コハク酸プレドニゾンナトリウム、ブチル酢酸プレドニゾン、リン酸プレドニゾンナトリウム、酢酸ハロプレドン、メチルプレドニゾン、酢酸メチルプレドニゾン、コハク酸メチルプレドニゾンナトリウム、トリアムシノロン、酢酸トリアムシノロン、トリアムシノロンアセトニド、デキサメタゾン、酢酸デキサメタゾン、リン酸デキサメタゾンナトリウム、パルミチン酸デキサメタゾン、酢酸パラメタゾン、ベタメタゾン等)、インターフェロン β -1a、インターフェロン β -1b、酢酸グラチラマー、ミトキサントロン、アザチオプリン、シクロホスファミド、シクロスポリン、メトトレキサート、クラドリピン、副腎皮質刺激ホルモン(ACTH)、コルチコトロピン、ミゾリピン、タクロリムス、フィンゴリモードおよびアレムツズマブ等から選択される何れか一以上の薬剤と組み合わせて使用してもよい。

【0100】

また、例えば、本開示の免疫抑制剤または免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療剤を全身エリテマトーデスの予防および/または治療に適用する場合、ステロイド

薬(例えば、上記記載のステロイド薬)、免疫抑制剤(例えば、シクロスポリン、タクロリムス、フィンゴリモド等)およびベリムマブから選択される何れか一以上の薬剤と組み合わせて使用してもよい。

【0101】

また、例えば、本開示の免疫抑制剤または免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療剤を関節リウマチの予防および/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。

10

【0102】

その他の自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植片対宿主病の予防および/または治療に適用する場合、本開示の免疫抑制剤または免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療剤と上記に記載した他の薬剤の何れか一以上と組み合わせて使用してもよい。

【0103】

ある態様では、免疫の抑制を必要としている対象に、LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子を有効量で投与することを含む、免疫の抑制方法が提供される。本明細書における「有効量」とは、対象において免疫を抑制する効果を発揮し得る量を意味する。

20

ある態様では、免疫の抑制において使用するための、LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子が提供される。

ある態様では、免疫を抑制するための医薬組成物の製造における、LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子の使用が提供される。

【0104】

ある態様では、免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療方法であって、それを必要としている対象に、LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子を有効量で投与することを含む方法が提供される。

30

ある態様では、免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療において使用するための、LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子が提供される。

ある態様では、免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および/または治療剤の製造における、LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子の使用が提供される。

【0105】

また別の態様では、抗LAG3抗体またはその断片が提供される。抗LAG3抗体は、LAG3の機能を抑制し、それにより免疫を活性化し得る。抗LAG3抗体は、二重特異性分子の結合部位の取得に関して上記で説明した抗体、例えばモノクローナル抗体であり得る。

40

【0106】

ある実施形態では、抗LAG3抗体は、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリンおよび/または第62位のイソロイシンに相当するアミノ酸を含む領域に結合するものである。ある実施形態では、抗LAG3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域は、二重特異性分子のLAG3に結合する第1の結合部位に関して説明した重鎖可変領域および軽鎖可変領域から選択されるものである。別の実施形態では、これらの抗体と、LAG3への結合に対して競合する抗LAG3抗体が提供される。

【0107】

50

抗LAG3抗体は、例えば、マウス、ラット、ウサギ、ヤギなどのいかなる動物種に由来してもよく、ヒト由来の抗体またはヒト化抗体であってもよい。抗LAG3抗体は、いかなるイムノグロブリンクラスの抗体であってもよい。イムノグロブリンクラスとしては、IgA、IgD、IgE、IgGおよびIgMが、イムノグロブリンクラスのサブクラス(アイソタイプ)としては、例えば、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1およびIgA2が挙げられる。ある実施形態では、抗LAG3抗体は、IgGサブクラス、例えば、IgG1またはIgG4サブクラスのものである。

【0108】

抗LAG3抗体の断片には、抗LAG3抗体の一部を構成要素として含み、LAG3への結合性を保持する分子、例えば、LAG3抗体の重鎖および軽鎖可変領域(V_HおよびV_L)、F(a b')₂、Fab'、Fab、Fv、disulphide-linked FV(sdFv)、Single-Chain FV(scFv)、Fab3、ダイアボディ、トリアボディ、テトラボディ、ミニボディ、Bis-scFv、(scFv)₂-Fc、intact-IgG、sc(Fv)₂、共有結合型ダイアボディ、(FvCys)₂、F(ab'-ジッパー)₂、(Fv-ジッパー)₂、三鎖抗体、mAb²、タンデムscFv、scダイアボディ、FabFv、Fab'Fv、FabdsFv、Fab-scFv、Fab-dsscFv、Fab-(dsscFv)₂、diFab、diFab'、scFv-Fc、タンデムscFv-Fc、scダイアボディ-Fc、scダイアボディ-CH₃、Ig-scFvおよびscFv-Igが含まれる。

【0109】

本開示は、例えば、下記の実施形態を提供する。

[1] LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合する第2の結合部位を含む二重特異性分子を含む、免疫抑制剤。

[2] 二重特異性分子が、LAG3とMHCクラスII分子との結合を許容する、前記[1]に記載の免疫抑制剤。

[3] 第1の結合部位が、LAG3のD1領域に含まれ、かつ、エキストラループ領域に含まれない部分に結合するものである、前記[1]または[2]に記載の免疫抑制剤。

[4] 第1の結合部位が、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第23位のセリンから第69位のセリンまでに相当する領域に結合するものである、前記[1]～[3]のいずれかに記載の免疫抑制剤。

[5] 第1の結合部位が、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリンおよび／または第62位のイソロイシンに相当するアミノ酸を含む領域に結合するものである、前記[1]～[4]のいずれかに記載の免疫抑制剤。

[6] 第1の結合部位が抗LAG3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、前記[1]～[5]のいずれかに記載の免疫抑制剤。

[7] 第1の結合部位が、配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、

前記[6]に記載の免疫抑制剤。

[8] 第1の結合部位が、配列番号7のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記[6]または[7]に記載の免疫抑制剤。

[9] 第1の結合部位が、LAG3との結合に対して

(i) 配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

(ii) 配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗LAG3抗体と競合する、前記 [1] ~ [6] のいずれかに記載の免疫抑制剤。

[10] 第1の結合部位によるLAG3への結合が、

(i) 配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

(ii) 配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗LAG3抗体によって競合される、前記 [1] ~ [6] のいずれかに記載の免疫抑制剤。

10

【0110】

[11] 第2の結合部位がCD3に特異的に結合するものである、前記 [1] ~ [10] のいずれかに記載の免疫抑制剤。

[12] 第2の結合部位がCD3εに特異的に結合するものである、前記 [11] に記載の免疫抑制剤。

[13] 第2の結合部位が抗CD3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、前記 [11] または [12] に記載の免疫抑制剤。

[14] 第2の結合部位が、

配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、

20

前記 [13] に記載の免疫抑制剤。

[15] 第2の結合部位が、配列番号15のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号16のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記 [13] または [14] に記載の免疫抑制剤。

[16] 第2の結合部位が、CD3との結合に対して

(i) 配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

30

(ii) 配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗CD3抗体と競合する、前記 [11] ~ [13] のいずれかに記載の免疫抑制剤。

[17] 第2の結合部位によるCD3への結合が、

(i) 配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

40

(ii) 配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗CD3抗体によって競合される、前記 [11] ~ [13] のいずれかに記載の免疫抑制剤。

【0111】

[18] 第2の結合部位がCD8に特異的に結合するものである、前記 [1] ~ [10] のいずれかに記載の免疫抑制剤。

[19] 第2の結合部位がCD8αに特異的に結合するものである、前記 [18] に記載の免疫抑制剤。

[20] 第2の結合部位が抗CD8抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、前記 [18]

50

〕または〔19〕に記載の免疫抑制剤。

〔21〕第2の結合部位が、配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、

前記〔20〕に記載の免疫抑制剤。

〔22〕第2の結合部位が、配列番号23のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号24のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記〔20〕または〔21〕に記載の免疫抑制剤。

10

〔23〕第2の結合部位が、CD8との結合に対して
(i)配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または
(ii)配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
を含む抗CD8抗体と競合する、前記〔18〕～〔20〕のいずれかに記載の免疫抑制剤。

〔24〕第2の結合部位によるCD8への結合が、

20

(i)配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または
(ii)配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、
を含む抗CD8抗体によって競合される、前記〔18〕～〔20〕のいずれかに記載の免疫抑制剤。

〔0112〕

〔25〕二重特異性分子が、二重特異性抗体、ダイアボディ、タンデムscFv、scダイアボディ、FabFv、Fab'Fv、FabdsFv、Fab-scFv、Fab-dsscFv、Fab-(dsscFv)2、diFab、diFab'、scFv-Fc、タンデムscFv-Fc、scダイアボディ-Fc、scダイアボディ-CH3、Ig-scFvおよびscFv-Igのいずれかの形態である、前記〔1〕～〔24〕のいずれかに記載の免疫抑制剤。

30

〔26〕二重特異性分子が、ダイアボディ、タンデムscFvおよびscダイアボディのいずれかの形態（好ましくは、scダイアボディの形態）である、前記〔1〕～〔25〕のいずれかに記載の免疫抑制剤。

〔27〕二重特異性分子が、二重特異性抗体（好ましくは、二重特異性モノクローナル抗体の形態）の形態である、前記〔1〕～〔25〕のいずれかに記載の免疫抑制剤。

〔28〕自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植片対宿主病の予防および／または治療のための、前記〔1〕～〔27〕のいずれか一項に記載の免疫抑制剤。

40

〔29〕自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植片対宿主病の予防および／または治療方法であって、前記〔1〕～〔27〕のいずれか一項に記載の免疫抑制剤の有効量を、それを必要としている対象に投与することを含む、方法。

〔30〕自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植片対宿主病の予防および／または治療における使用のための、前記〔1〕～〔27〕のいずれか一項に記載の免疫抑制剤。

〔31〕自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植片対宿主病の予防および／または治療剤の製造のための、前記〔1〕～〔27〕のいずれか一項に記載の免疫抑制剤の使用。

〔0113〕

〔32〕LAG3に特異的に結合する第1の結合部位およびCD3またはCD8に特異的に結合す

50

る第2の結合部位を含む二重特異性分子。

[33] LAG3とMHCクラスII分子との結合を許容する、前記[32]に記載の二重特異性分子。

[34] 第1の結合部位が、LAG3のD1領域に含まれ、かつ、エキストラループ領域に含まれない部分に結合するものである、前記[32]または[33]に記載の二重特異性分子。

[35] 第1の結合部位が、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第23位のセリンから第69位のセリンまでに相当する領域に結合するものである、前記[32]～[34]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[36] 第1の結合部位が、配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリンおよび／または第62位のイソロイシンに相当するアミノ酸を含む領域に結合するものである、前記[32]～[35]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[37] 第1の結合部位が抗LAG3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、前記[32]～[36]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[38] 第1の結合部位が、
配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、
配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、

前記[37]に記載の二重特異性分子。

[39] 第1の結合部位が、配列番号7のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記[37]または[38]に記載の二重特異性分子。

[40] 第1の結合部位が、LAG3との結合に対して

(i) 配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、
配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

(ii) 配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗LAG3抗体と競合する、前記[32]～[37]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[41] 第1の結合部位によるLAG3への結合が、

(i) 配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、
配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

(ii) 配列番号7のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗LAG3抗体によって競合される、前記[32]～[37]のいずれかに記載の二重特異性分子。

【0114】

[42] 第2の結合部位がCD3に特異的に結合するものである、前記[32]～[41]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[43] 第2の結合部位がCD3εに特異的に結合するものである、前記[42]に記載の二重特異性分子。

[44] 第2の結合部位が抗CD3抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、前記[42]または[43]に記載の二重特異性分子。

[45] 第2の結合部位が、

配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、

前記[44]に記載の二重特異性分子。

[46] 第2の結合部位が、配列番号15のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号16のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記[44]または[45]に記載の二重特異性分子。

[47] 第2の結合部位が、CD3との結合に対して

(i) 配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

(ii) 配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗CD3抗体と競合する、前記[42]～[44]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[48] 第2の結合部位によるCD3への結合が、

(i) 配列番号17のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号18のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号19のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号20のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号21のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号22のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

(ii) 配列番号15のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号16のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗CD3抗体によって競合される、前記[42]～[44]のいずれかに記載の二重特異性分子。

【0115】

[49] 第2の結合部位がCD8に特異的に結合するものである、前記[32]～[41]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[50] 第2の結合部位がCD8 α に特異的に結合するものである、前記[49]に記載の二重特異性分子。

[51] 第2の結合部位が抗CD8抗体の重鎖可変領域および軽鎖可変領域を含む、前記[49]または[50]に記載の二重特異性分子。

[52] 第2の結合部位が、

配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、

前記[51]に記載の二重特異性分子。

[53] 第2の結合部位が、配列番号23のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号24のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記[51]または[52]に記載の二重特異性分子。

[54] 第2の結合部位が、CD8との結合に対して

(i) 配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

(ii) 配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗CD8抗体と競合する、前記[49]～[51]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[55] 第2の結合部位によるCD8への結合が、

(i)配列番号25のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号26のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号27のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号28のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号29のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号30のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域、または

(ii)配列番号23のアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号24のアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域、

を含む抗CD8抗体によって競合される、前記[49]～[51]のいずれかに記載の二重特異性分子。

【0116】

[56] 二重特異性抗体、ダイアボディ、タンデムscFv、scダイアボディ、FabFv、Fab'Fv、FabdsFv、Fab-scFv、Fab-dsscFv、Fab-(dsscFv)2、diFab、diFab'、scFv-Fc、タンデムscFv-Fc、scダイアボディ-Fc、scダイアボディ-CH3、Ig-scFvおよびscFv-Igのいずれかの形態である、前記[32]～[55]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[57] ダイアボディ、タンデムscFvおよびscダイアボディのいずれかの形態（好ましくは、scダイアボディの形態）である、前記[32]～[56]のいずれかに記載の二重特異性分子。

[58] 二重特異性抗体（好ましくは、二重特異性モノクローナル抗体の形態）の形態である、前記[32]～[56]のいずれかに記載の二重特異性分子。

【0117】

[59] 前記[32]～[58]のいずれか一項に記載の二重特異性分子を有効成分として含む免疫抑制剤。

[60] 薬学的に許容できる担体をさらに含む、前記[59]に記載の免疫抑制剤。

[61] 免疫の抑制方法であって、前記[32]～[58]のいずれか一項に記載の二重特異性分子の有効量をそれを必要としている対象に投与することを含む、方法。

[62] 免疫の抑制において使用するための、前記[32]～[58]のいずれか一項に記載の二重特異性分子。

[63] 免疫抑制剤の製造のための、前記[32]～[58]のいずれか一項に記載の二重特異性分子の使用。

【0118】

[64] 前記[32]～[58]のいずれか一項に記載の二重特異性分子を有効成分として含む、免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および／または治療剤。

[65] 薬学的に許容できる担体をさらに含む、前記[64]に記載の予防および／または治療剤。

[66] 免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および／または治療方法であって、前記[32]～[58]のいずれか一項に記載の二重特異性分子の有効量を、それを必要としている対象に投与することを含む、方法。

[67] 免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および／または治療において使用するための、前記[32]～[58]のいずれか一項に記載の二重特異性分子。

[68] 免疫の亢進を特徴とする疾患の予防および／または治療剤の製造のための、前記[32]～[58]のいずれか一項に記載の二重特異性分子の使用。

[69] 免疫の亢進を特徴とする疾患が、自己免疫疾患、アレルギー疾患または移植片対宿主病である、前記[64]または[65]に記載の予防および／または治療剤、前記[66]に記載の方法、前記[67]に記載の二重特異性分子、または、前記[68]に記載の使用。

[70] 免疫の亢進を特徴とする疾患が自己免疫疾患である、前記[69]に記載の予防および／または治療剤、方法、二重特異性分子または使用。

[71] 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、多発性硬化症、強皮症、多発性筋炎、皮膚筋炎、結節性動脈周囲炎、大動脈炎症候群、悪性関節リウマチ、関節リウマチ、若年性特発性関節炎、ウェゲナー肉芽腫症、混合性結合組織病、シェーグレ

10

20

30

40

50

ン症候群、成人スティル病、アレルギー性肉芽腫性血管炎、過敏性血管炎、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、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、原発性胆汁性肝硬変、大動脈炎症候群、グッドパスチャー症候群、急速進行性糸球体腎炎、巨赤芽球性貧血、自己免疫性溶血性貧血、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、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、特発性アジソン病、I型糖尿病、緩徐進行性I型糖尿病、慢性円板状エリテマトーデス、限局性強皮症、乾癬、乾癬性関節炎、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、アトピー性皮膚炎、視神経脊髄炎、慢性炎症性脱髄性多発神経炎、サルコイドーシス、水疱性類天疱瘡、巨細胞性動脈炎、筋委縮性側索硬化症、好酸球性多発血管炎性肉芽腫症、原田病、自己免疫性視神経症、特発性無精子症、習慣性流産、炎症性腸疾患およびセリアック病からなる群から選択される、前記 [70] に記載の予防および／または治療剤、方法、二重特異性分子または使用。

10

[72] 自己免疫疾患が、I型糖尿病、多発性硬化症、全身エリテマトーデスまたは関節リウマチである、前記 [70] または [71] に記載の予防および／または治療剤、方法、二重特異性分子または使用。

[73] 自己免疫疾患が多発性硬化症である、前記 [70] ～ [72] のいずれか一項に記載の予防および／または治療剤、方法、二重特異性分子または使用。

[74] 多発性硬化症が全身性強皮症または進行性全身性硬化症である、前記 [73] に記載の予防および／または治療剤、方法、二重特異性分子または使用。

20

【0119】

[75] 前記 [32] ～ [58] のいずれか一項に記載の二重特異性分子をコードするポリヌクレオチド。

[76] 前記 [75] に記載のポリヌクレオチドを含む発現ベクター。

[77] 前記 [75] に記載のポリヌクレオチドまたは前記 [76] に記載の発現ベクターを含む宿主細胞。

[78] 配列番号2のアミノ酸配列を有するマウスLAG3の第54位のアスパラギン、第55位のフェニルアラニン、第61位のバリンおよび／または第62位のイソロイシンに相当するアミノ酸を含む領域に結合する、抗LAG3抗体またはその断片。

30

[79] 配列番号9のアミノ酸配列を含む重鎖CDR1、配列番号10のアミノ酸配列を含む重鎖CDR2および配列番号11のアミノ酸配列を含む重鎖CDR3を含む重鎖可変領域；および、配列番号12のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR1、配列番号13のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR2および配列番号14のアミノ酸配列を含む軽鎖CDR3を含む軽鎖可変領域を含む、抗LAG3抗体またはその断片。

[80] 該抗LAG3抗体が、配列番号7のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む重鎖可変領域、および、配列番号8のアミノ酸配列と90%以上の同一性を有するアミノ酸配列を含む軽鎖可変領域を含む、前記 [79] に記載の抗LAG3抗体またはその断片。

[81] LAG3への結合に対して、前記 [79] または [80] に記載の抗体と競合する抗LAG3抗体またはその断片。

40

【0120】

本明細書で引用するすべての文献は、出典明示により本明細書の一部とする。

上記の説明は、すべて非限定的なものであり、添付の特許請求の範囲において定義される本発明の範囲から逸脱せずに、変更することができる。さらに、下記の実施例は、すべて非限定的な実施例であり、本発明を説明するためだけに供されるものである。

【実施例】

【0121】

実施例1: LAG3およびCD3εに結合する二重特異性分子2C11xTKB58およびTKB58x2C11の作製

50

抗マウスLAG3抗体(TKB58)および抗マウスCD3 ϵ 抗体(2C11)の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする核酸を合成した後、PCRにて増幅し、pEBMulti-Neo(Wako)またはpSecTag2/Hygro(Thermo Fisher Scientific)を改変して作製した発現プラスミドベクターにクローニングして、マウスLAG3およびマウスCD3 ϵ を認識する二重特異性分子2C11xTKB58(配列番号31)およびTKB58x2C11(配列番号32)の発現プラスミドを作製した。発現プラスミドをAvalanche-Omni Transfection Reagent(EZ Biosystems)を用いてplatE細胞に導入し、48時間後に培養上清を回収した。培養上清を用いて、BW5147、DO11.10、DO11.10-mLAG3細胞を染色した。

【0122】

結果を図1に示す。マウスCD3 ϵ を発現しマウスLAG3を発現しないDO11.10細胞への結合が確認されたことから、二重特異性分子がマウスCD3 ϵ に対する結合能を有していることが確認された。また、DO11.10細胞と比較して、マウスLAG3を強制発現させたDO11.10-mLAG3細胞に強く結合したことから、二重特異性分子がマウスLAG3に対する結合能を有していることも確認できた。一方、マウスCD3 ϵ およびマウスLAG3を発現しないBW5147細胞には結合が認められなかったことから、結合が両分子に特異的であることが確認された。TKB58x2C11と比較して、2C11xTKB58を用いた場合にはより強い結合が観察された。

【0123】

実施例2: 二重特異性分子2C11xTKB58およびTKB58x2C11はT細胞の抗原特異的活性化をLAG3依存的に抑制する

実施例2-1: LAG3による抑制を強く誘導する抗原提示細胞を用いた実験

DO11.10細胞は、マウスMHCクラスII分子I-A^dに提示されるOVA由来ペプチド(pOVA323-339, ISQAVHAAHAEINEAGR)を認識し、抗原ペプチドの量に応じてIL-2を産生することが知られている。I-A^dを発現するIIA1.6細胞にpOVA323-339をパルスしてDO11.10細胞(mock)を刺激するとIL-2の産生が見られたが、TKB58x2C11および2C11xTKB58は、いずれもIL-2産生に影響を与えなかった(図2)。このことから、LAG3を発現しないT細胞の抗原特異的活性化に、これらの二重特異性分子が影響を与えないことが確認された。

【0124】

さらに、DO11.10細胞にマウスLAG3を強制発現させたDO11.10-mLAG3細胞(mLAG3 WT)を同様に抗原刺激した(図2)。IL-2の産生は、LAG3依存的に強く抑制された。抗マウスLAG3抗体TKB58を添加するとマウスLAG3の機能が阻害され、IL-2の産生が回復した。一方、TKB58x2C11または2C11xTKB58を添加してもLAG3によるIL-2産生抑制は阻害されなかった。

【0125】

実施例2-2: LAG3による抑制をあまり強く誘導しない抗原提示細胞を用いた実験

LAG3は安定なペプチドMHCII複合体と選択的に結合し、不安定なペプチドMHCII複合体には結合しない。BW5147-mCD86細胞にI-A^dを強制発現させたBW5147-mCD86/I-A^d細胞にpOVA323-339をパルスすると、pOVA323-339は不安定な構造でI-A^dに提示されるため、マウスLAG3に結合できず、マウスLAG3を介した抑制はほとんど機能しない。

【0126】

この刺激条件において、TKB58x2C11または2C11xTKB58を添加したところ、LAG3を発現させたDO11.10細胞(mLAG3 WT)を用いた場合にのみ、IL-2の産生が強く抑制された(図3)。細胞への結合実験(図1)において、2C11xTKB58がTKB58x2C11よりも強く標的細胞に結合した結果と同様に、2C11xTKB58がTKB58x2C11よりも強い抑制効果を示した。

【0127】

実施例2-3: LAG3が殆ど抑制効果を示さないMHCクラスI拘束性細胞を用いた実験

B3Z細胞はマウスMHCクラスI分子H-2K^bに提示されるOVA由来ペプチド(pOVA257-264, SIINFEKL)を認識し、抗原ペプチドの量に応じてIL-2を産生することが知られている

10

20

30

40

50

。H-2Kbを発現するIIA1.6細胞にOVAペプチドをパルスしてB3Z細胞 (mock) を刺激するとIL-2の産生が見られたが、マウスLAG3を発現 (mLAG3 WT) させてもIL-2の産生を阻害しなかった(図4)。これは、MHCIIクラスI拘束性のB3Z細胞では、LAG3が抑制機能を発揮できないためである。TKB58x2C11または2C11xTKB58を添加すると、B3Z細胞がマウスLAG3を発現する場合にのみ、IL-2の産生が強く抑制された。これらの結果は、TKB58x2C11および2C11xTKB58が、MHCIIクラスI拘束性CD8陽性細胞であっても、LAG3発現細胞の抗原特異的な活性化を抑制することを示す。

【0128】

実施例2-4: リガンド結合能力が無いLAG3変異体を用いた実験

LAG3のアミノ酸変異体LAG3-P111Aは、pMHCIIとの結合能を欠くため、抗原刺激を受けてもT細胞抑制機能を発揮しない。この変異体を用いて、実施例2-1と同様の実験を行った。結果を図5に示す。この刺激条件において、TKB58x2C11または2C11xTKB58を添加したところ、LAG3-P111A依存的にIL-2の産生が強く抑制された。従って、TKB58x2C11および2C11xTKB58は、LAG3とリガンドであるpMHCIIとの結合が無い条件でも、LAG3発現細胞の抗原特異的な活性化を抑制することが明らかとなった。これらの結果は、TKB58x2C11および2C11xTKB58が、LAG3がMHCIIに結合できない状況であっても、LAG3を賦活化し、TCRを抑制することを示す。

【0129】

実施例3: 実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)を用いた二重特異性分子の評価

C57BL/6マウスを用いたEAEモデルにおいて、2C11xTKB58のインビボ作用を評価した。結核死菌H37Ra(BD Biosciences、型番231141)と不完全フロイントアジュバント(BD Biosciences、型番263910)を混合して、4mg/mLの結核死菌H37Raを含む完全フロイントアジュバント(CFA)を調製した。1mg/mLのMOGペプチド(ANASPEC、型番AS-60130)と等量のCFAを混合してエマルジョンを調製し、EAEモデルの惹起剤とした。200μLの当該惹起剤を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200μLの1μg/mL百日咳毒素(SIGMA-ALDRICH、型番P7208)を尾静脈内投与した。次に、C57BL/6マウスに、2C11xTKB58を、免疫処置6日目から10日目に、各々0.3mg/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(Onuki M, et al., Microsc Res Tech 2001;52:731-9.)に準じて評価し、神経症状スコアを記録した(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;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。評価結果(平均値+標準誤差)を図6に示す。二重特異性分子である2C11xTKB58は実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の症状を緩和した。

【0130】

実施例4: 二重特異性分子存在下でのマウスLAG3可溶性タンパク質のIIA1.6細胞への結合実験

以下の通りにマウスLAG3可溶性タンパク質を得た。マウスLAG3のD1からD4(LAG3-EC)をコードするcDNA断片を、PCRにより増幅した。DYKDDDDK-タグ、TEV切断部位およびPA-タグを有する軟骨オリゴマー基質タンパク質(COMP)の五本鎖コイルドコイルドメインを、LAG3-ECのC末端に付加した。キメラcDNAを、pEBMulti-Neo (Wako)から改変した発現ベクターにクローニングした。Avalanche-Omni Transfection Reagent (EZ Biosystems)を使用してプラスミドをPlat-E細胞に導入し、培養上清を48時間後に回収した。

【0131】

マウスLAG3のリガンドであるpMHCIIを発現するIIA1.6細胞を、TKB58x2C11、2C11xTKB58、または完全体の抗マウスLAG3抗体であるTKB58抗体で処理した後、マウスLAG3可溶性タンパク質で染色した。結果を図7に示す。完全体のTKB58抗体はマウスLAG3可溶性タンパク質のIIA1.6細胞への結合を完全に阻害したが、TKB58x2C11および2C11xTKB58は阻害しなかった。

【0132】

10

20

30

40

50

実施例5: LAG3およびCD8に結合する二重特異性分子TKB58xYTS169の作製

抗マウスLAG3抗体(TKB58)および抗マウスCD8抗体(YTS169)の重鎖可変領域および軽鎖可変領域をコードする核酸を合成した後、PCRにて増幅し、pEBMulti-Neo (Wako)を改変して作製した発現プラスミドベクターにクローニングして、マウスLAG3およびマウスCD8を認識する二重特異性分子TKB58xYTS169(配列番号33)の発現プラスミドを作製した。発現プラスミドをAvalanche-Omni Transfection Reagent (EZ Biosystems)を用いてplatE細胞に導入し、48時間後に培養上清を回収した。培養上清を用いて、DO11.10、DO11.10-mLAG3、B3Z、およびB3Z-mLAG3細胞を染色した。

【0133】

結果を図8に示す。DO11.10細胞(マウスLAG3を発現しマウスCD8を発現しない)およびB3Z細胞(マウスCD8を発現しマウスLAG3を発現しない)への結合が確認されたことから、TKB58xYTS169がマウスCD8およびマウスLAG3に対する結合能を有していることが確認された。また、マウスCD8およびマウスLAG3を発現するB3Z-mLAG3細胞にはより強力に結合したことから、同一細胞上のマウスCD8とマウスLAG3に二重特異性分子TKB58xYTS169が結合していることが示唆された。一方、両分子を発現しないDO11.10細胞には結合が認められなかったことから、結合が両分子に特異的であることが確認された。

【0134】**実施例6: 二重特異性分子TKB58xYTS169のT細胞の抗原特異的活性化に対する評価**

B3Z細胞はマウスMHCクラスI分子H-2K^bに提示されるOVA由来ペプチド(pOVA257-264, SIINFEKL)を認識し、抗原ペプチドの量に応じてIL-2を産生することが知られている。H-2K^bを発現するIIA1.6細胞にpOVA257-264をパルスしてB3Z細胞を刺激するとIL-2の産生が見られたが、マウスLAG3を発現させてもIL-2の産生を阻害しなかった(図9)。これは、IIA1.6細胞がLAG3のリガンドを発現していても、MHCクラスI拘束性のB3Z細胞では、LAG3が抑制機能を発揮できないためである。TKB58xYTS169を添加すると、B3Z細胞がマウスLAG3を発現する場合にのみ、IL-2の産生が強く抑制された。これにより、TKB58xYTS169がLAG3発現細胞の抗原特異的な活性化を抑制することが明らかとなった。

【0135】**実施例7: 抗マウスLAG3抗体TKB58のLAG3変異体への結合****実施例7-1: 抗マウスLAG3抗体TKB58のマウスLAG3認識領域**

マウスLAG3は細胞外領域に4個のIg様ドメイン(D1、D2、D3、D4)を有する。各Ig様ドメインをヒトの対応するIg様ドメインに置換したキメラ分子を作製し、DO11.10細胞に強制発現させた。簡単に述べると、各cDNAの断片をPCRにより増幅し、pFB-ires-Neo (Agilent)を改変したレトロウィルス発現プラスミドベクターにクローニングした。マウスおよびヒトLAG3のキメラcDNAをオーバーラップエクステンションPCRにより作製した。FuGENE HD (Promega)を用いてプラスミドをPlat-E細胞(DMEM、高グルコース(Gibco)添加、20% (v/v) FBS、100 U/mlペニシリンおよび100 µg/mlストレプトマイシン含有)に導入した。ウィルスを含む上清を使用して標的細胞に遺伝子を導入した。感染細胞を、G418(Wako)、ピューロマイシン(Sigma-Aldrich)またはセルソーティングにより選択した。抗マウスLAG3抗体(TKB58)を用いて各細胞を染色し、フローサイトメトリーにて解析した。結果を図10に示す。TKB58は、マウスD1をヒトD1と置換したキメラ分子に結合しなかったことから、マウスLAG3のD1を認識することが明らかとなった。

【0136】**実施例7-2: 抗マウスLAG3抗体TKB58の各種LAG3変異体に対する結合**

DO11.10 T細胞に野生型マウスLAG3、N54A/F55A変異体またはV61A/I62A変異体を強制発現させ、抗マウスLAG3抗体(TKB58)との結合をフローサイトメトリーにて評価した。結果を図11に示す。N54A/F55A変異体とV61A/I62A変異体は、TKB58との結合が減弱していた。

【0137】**実施例7-3: LAG3変異体によるT細胞機能の抑制**

DO11.10 T細胞に野生型マウスLAG3、N54A/F55A変異体またはV61A/I62A変異体を強制発現させた。OVAペプチドをパルスしたIIA1.6細胞を用いて、DO11.10 T細胞を刺激し、培養上清中に分泌されたIL-2の濃度をELISAにて測定した。結果を図12に示す。マウスLAG3を発現させていないDO11.10-mock細胞と比較して、野生型マウスLAG3、N54A/F55A変異体またはV61A/I62A変異体を強制発現させたDO11.10 T細胞では、抗原刺激によるIL-2の産生が著しく減少しており、両変異体がLAG3の活性を保持していることが確認された。従って、TKB58のエピトープは、LAG3のTCR抑制機能に必須ではない領域を含むことが確認された。

【0138】

実施例8: 抗マウスLAG3抗体TKB58のLAG3への結合親和性

マウスLAG3可溶性タンパク質に対する抗マウスLAG3抗体(TKB58およびC9B7W)の結合親和性を、バイオレイヤー干渉法にて測定した。簡潔に述べると、マウスLAG3のD1からD4(LAG3-EC)をコードするcDNA断片を、PCRにより増幅した。strepタグをLAG3-ECのC末端に付加した。キメラcDNAを、pEBMulti-Neo (Wako)から改変した発現ベクターにクローニングした。Avalanche-Omni Transfection Reagent (EZ Biosystems)を使用してプラスミドをPlat-E細胞に導入し、培養上清を48時間後に回収した。単量体のマウスLAG3-EC(strepタグ付き)を、ストレプトアビジン被覆バイオセンサーチップ (Pall ForteBio) に固定し、様々な濃度の抗マウスLAG3 抗体の結合をBLItz (Pall ForteBio)でモニターした。チップをPBSで洗浄し、解離速度を分析した。結合速度定数(k_a)、解離速度定数(k_d)および解離定数(K_D)をBLItz Proソフトウェアで算出した。結果を図13に示す。TKB58は、C9B7Wと比較して、 k_a が約26倍早く、 k_d が3.6倍遅かった。その結果、TKB58の K_D はC9B7Wより94倍低く、4,395nMであった。

【産業上の利用可能性】

【0139】

本開示の二重特異性分子は、免疫抑制剤として、または、自己免疫疾患、アレルギー疾患もしくは移植片対宿主病の予防および/または治療に、有用である。

10

20

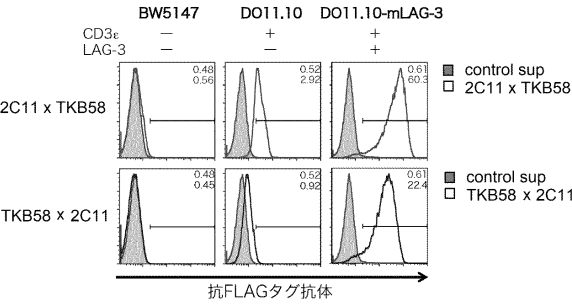
30

40

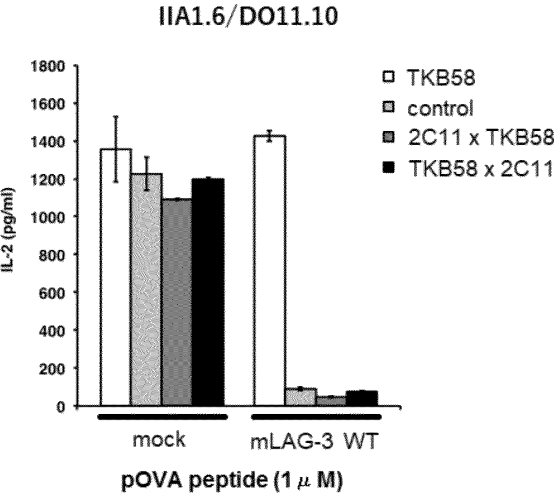
50

【図面】

【図 1】

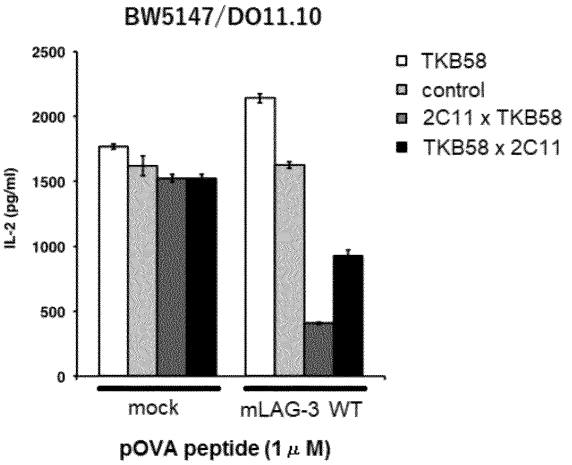


【図 2】

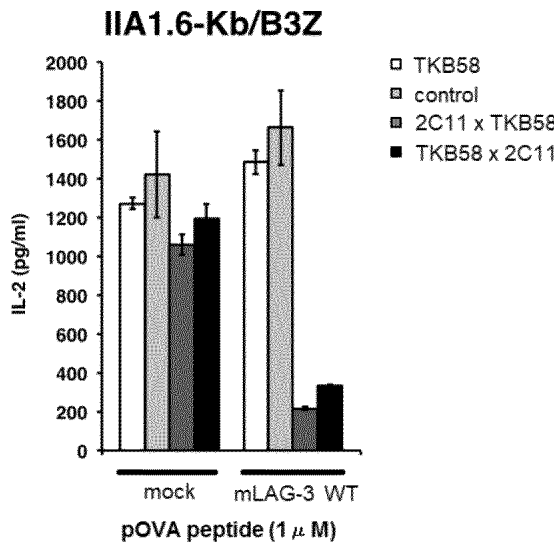


10

【図 3】



【図 4】

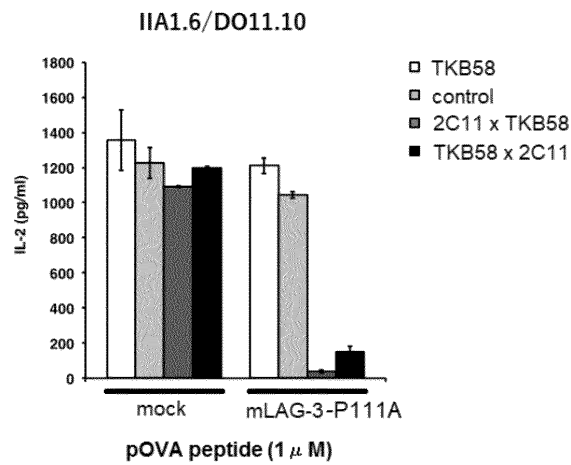


30

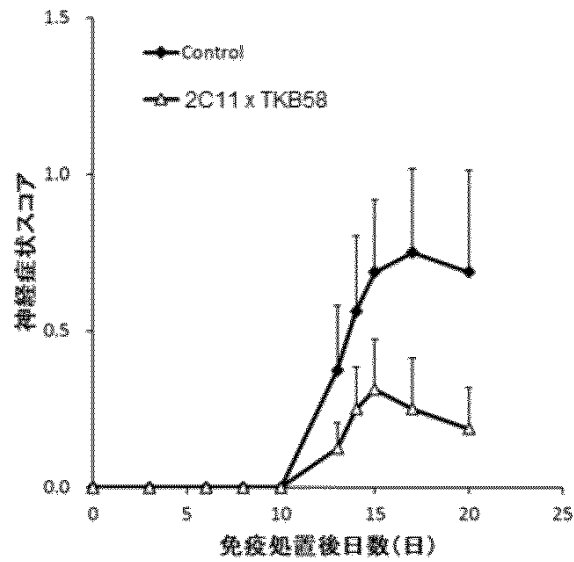
40

50

【図 5】

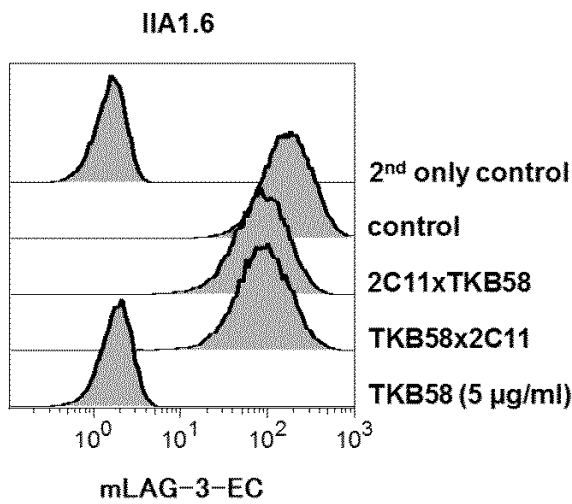


【図 6】

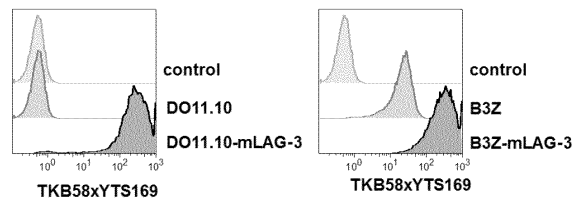


10

【図 7】



【図 8】



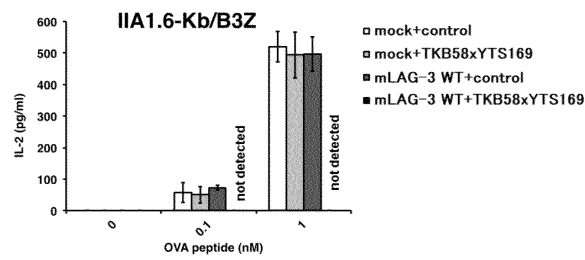
20

30

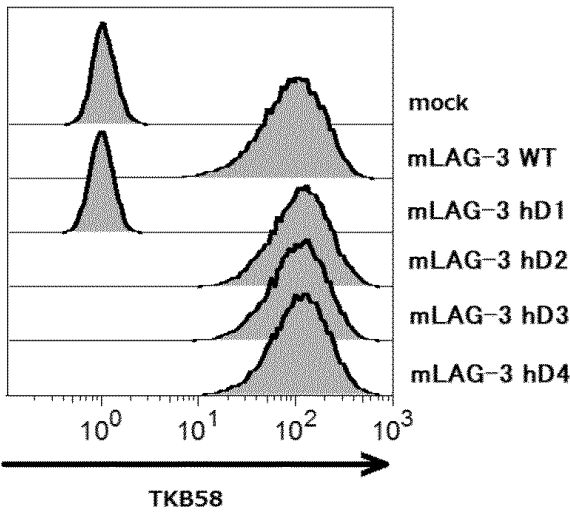
40

50

【図 9】

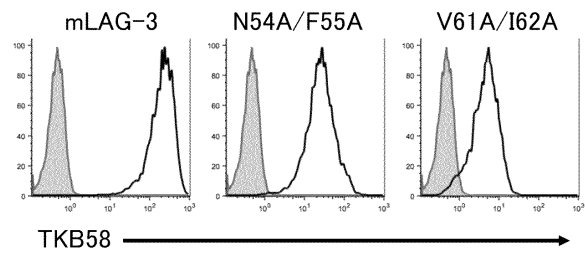


【図 10】

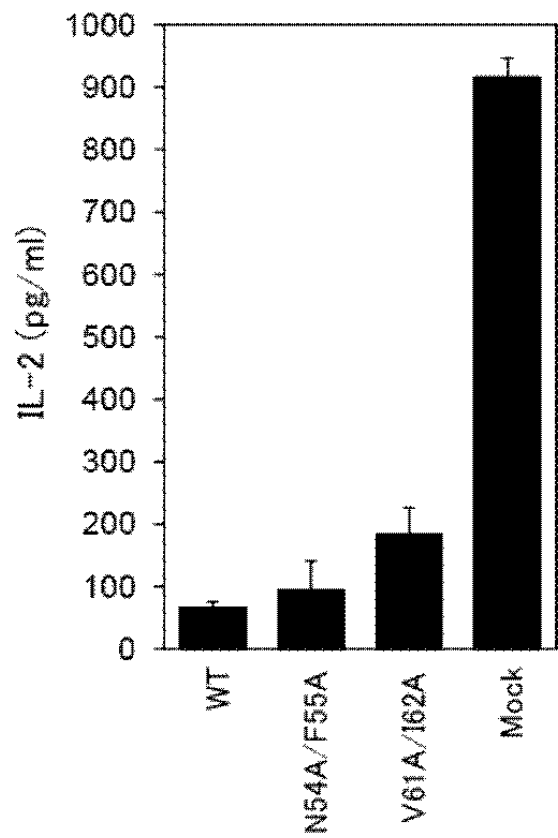


10

【図 11】



【図 12】



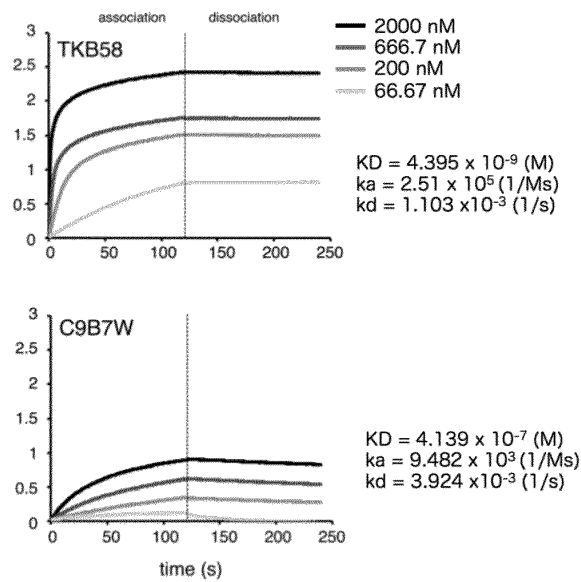
20

30

40

50

【図 1 3】



【図 1 4】

抗マウスLAG3抗体 (TKB58) のアミノ酸配列

重鎖可変領域 (配列番号7)

VQLQQSGAELVRPGALVKLSCKASGFNIKDYIMHWVKRPEQGLEWIGWIDPENGNTIYDPKFQDKASL
CDR1 (配列番号9) CDR2 (配列番号10)

TADTSSNTAYLQLSSLTSEDATVYYCAPERGYDYAMDYWGQGTSTVTVSS
CDR3 (配列番号11)

軽鎖可変領域 (配列番号8)

IVLTQSPATLSVTPGDSVSLSCRASQSIENNHLHWYQKSHESPRLLIKYASQSIISGIPSRFSGSGSGTDF
CDR1 (配列番号12) CDR2 (配列番号13)

TLTINSVETEDFGMYFCQQSNSWPQYTFGGGKLEIK
CDR3 (配列番号14)

10

【図 1 5】

抗マウスCD3ε抗体 (2C11) のアミノ酸配列

重鎖可変領域 (配列番号15)

EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFGYGMHWVRQAPGRGLESVAITSSSINIKYADAVKGRFTV
CDR1 (配列番号17) CDR2 (配列番号18)

SRDNAKNLLFLQMNILKSEDATMYCARFDWDKNYWGQGTMTVTVSS
CDR3 (配列番号19)

軽鎖可変領域 (配列番号16)

DIQMTQSPSSLASLGDRVTINCAQSDISNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYTNKLADGVPSRFSGSGSGRD
CDR1 (配列番号20) CDR2 (配列番号21)

SSFTISSLESDIGSYQCQQYYNPWTFGPGTKLEIK
CDR3 (配列番号22)

【図 1 6】

抗マウスCD8α抗体 (YTS169) のアミノ酸配列

重鎖可変領域 (配列番号23)

EVKLQESGGGLVQPGKSLKLSAASGFNFNDYWMGWVRQAPGKGLEWIGIINKDSSTINYTPSLDKFTI
CDR1 (配列番号25) CDR2 (配列番号26)

SRDNAQNTLYLQMSKLGSEDAIYYCARARGMMVLIIIPHYFDYWGQGVMTVTVSS
CDR3 (配列番号27)

軽鎖可変領域 (配列番号24)

DIVLTQSPAMAMSPGERITISCRASESVSTRMHWYQKPGQPKLLIYGASNLESIGVPARFSGSGSGTDF
CDR1 (配列番号28) CDR2 (配列番号29)

TLTIDPVEANDATATYFCQQSNYDPWTFGGGKLELK
CDR3 (配列番号30)

20

30

【配列表】

0007684656000001.app

40

50

フロントページの続き

(51)国際特許分類

F I

C 1 2 N 15/13 (2006.01)

C 0 7 K 16/28

C 1 2 N 15/62 (2006.01)

C 1 2 N 15/13

C 1 2 N 15/62

Z

徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内

(72)発明者 岡崎 一美

徳島県徳島市新蔵町2丁目24番地 国立大学法人徳島大学内

(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

審査官 六笠 紀子

(56)参考文献

特表2018-537400 (JP, A)

特開2013-005798 (JP, A)

特表2009-539841 (JP, A)

特表平07-505609 (JP, A)

特表2018-501297 (JP, A)

特表2017-507936 (JP, A)

特開2010-115202 (JP, A)

特開2018-007668 (JP, A)

国際公開第2017/004563 (WO, A1)

国際公開第2014/025828 (WO, A1)

米国特許出願公開第2017/0260271 (US, A1)

国際公開第2018/120842 (WO, A1)

特許第6894702 (JP, B2)

ANGIN, M., et al., IMP761, a novel anti-LAG-3 agonist antibody for the treatment of auto-immune diseases., Journal of Crohn's and Colitis, 2019年03月, Vol. 13, Supp. 1, p. S031.

Abstract Number: DOP07

PLoS ONE, 2014年, 9(8), e104484, page 1-10, doi:10.1371/journal.pone.0104484

(58)調査した分野 (Int.Cl., DB名)

A 6 1 K 3 9 / 0 0 - 3 9 / 4 4

J S T P l u s / J M E D P l u s / J S T 7 5 8 0 (J D r e a m I I I)

C A p l u s / M E D L I N E / E M B A S E / B I O S I S (S T N)

U n i P r o t / G e n e S e q