



(10) 申请公布号 CN 119997975 A

(43) 申请公布日 2025.05.13

(21) 申请号 202380073096.1

(22) 申请日 2023.10.18

(30) 优先权数据

2022-167362 2022.10.19 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2025.04.15

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/037616 2023.10.18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02024/085166 JA 2024.04.25

(71) 申请人 安斯泰来制药株式会社

地址 日本

(72) 发明人 佐藤雅人 广内惠多 菊地绫

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 鲁雯雯 金龙河

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 45/00 (2006.01)

A61P 1/00 (2006.01)

A61P 11/00 (2006.01)

A61P 13/10 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书3页 说明书25页
序列表(电子公布) 附图1页

(54) 发明名称

抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体通过与PD-1
信号抑制剂的组合在癌症治疗中的应用

(57) 摘要

本发明的课题在于,提供为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体或含有该双特异性抗体的药物组合物、或者提供包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂组合给药于对象的步骤的癌症治疗方法。在CLDN4表达癌细胞与T细胞的共培养条件下,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与PD-1信号抑制剂的联用与各自的单独给药相比,显示出T细胞所带来的干扰素- γ 产生促进作用和细胞杀伤作用,在表达CLDN4的癌细胞移植小鼠中显示出显著的抗肿瘤作用。该结果表明,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与PD-1信号抑制剂的组合在表达CLDN4的癌症的治疗中

1. 一种药物组合物,其是含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的用于治疗对象的癌症的药物组合物,其中,该双特异性抗体含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区,所述药物组合物与PD-1信号抑制剂组合使用。

2. 根据权利要求1所述的药物组合物,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号99至112的氨基酸序列构成的CDR3,抗CLDN4抗体的轻链可变区含有由序列号4的氨基酸编号24至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的氨基酸编号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号4的氨基酸编号90至98的氨基酸序列构成的CDR3。

3. 根据权利要求1或2所述的药物组合物,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成,抗CLDN4抗体的轻链可变区由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成。

4. 根据权利要求1~3中任一项所述的药物组合物,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含由含有抗CLDN4抗体的重链可变区的重链和含有抗CLDN4抗体的轻链可变区的轻链构成的IgG抗体(抗CLDN4 IgG抗体)。

5. 根据权利要求4所述的药物组合物,其中,抗CLDN4 IgG抗体的Fc区含有LALA突变(L234A和L235A)或P331G突变(在此,所述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的依据EU索引的氨基酸位置)中的任一者或两者。

6. 根据权利要求1~5中任一项所述的药物组合物,其中,抗CD137抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号625至629的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号644至659的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号692至701的氨基酸序列构成的CDR3,抗CD137抗体的轻链可变区含有由序列号2的氨基酸编号486至498的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号514至520的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号553至563的氨基酸序列构成的CDR3。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的药物组合物,其中,抗CD137抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成,抗CD137抗体的轻链可变区由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成。

8. 根据权利要求6或7所述的药物组合物,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137单链可变区片段(抗CD137scFv)。

9. 根据权利要求8所述的药物组合物,其中,抗CD137scFv由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成。

10. 根据权利要求8或9所述的药物组合物,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv,抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于抗CLDN4 IgG抗体的重链羧基末端。

11. 一种药物组合物,其是含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的用于治疗对象的癌症的药物组合物,其中,该双特异性抗体包含含有由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CLDN4抗体的重链和含有由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CLDN4抗体的轻链以及含有由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的轻链可变区和由序列号2的氨基酸编号595至712的

氨基酸序列构成的抗CD137抗体的重链可变区的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端,所述药物组合物与PD-1信号抑制剂组合使用。

12. 一种药物组合物,其是含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的用于治疗对象的癌症的药物组合物,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸编号1至453的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的重链和由序列号4的氨基酸编号1至215的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链以及由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端,所述药物组合物与PD-1信号抑制剂组合使用。

13. 根据权利要求10~12中任一项所述的药物组合物,其中,接头为GS接头。

14. 一种药物组合物,其是含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的用于治疗对象的癌症的药物组合物,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链,所述药物组合物与PD-1信号抑制剂组合使用。

15. 根据权利要求1~14中任一项所述的药物组合物,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体经过了翻译后修饰。

16. 根据权利要求1~15中任一项所述的药物组合物,其与PD-1信号抑制剂同时地、连续地或逐次地组合使用。

17. 根据权利要求1~16中任一项所述的药物组合物,其中,(i)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于同一药物组合物,同时给药;或(ii)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于不同的药物组合物,同时地、连续地或逐次地组合使用。

18. 根据权利要求1~17中任一项所述的药物组合物,其中,癌症选自由大肠癌、膀胱癌和肺癌组成的组。

19. 根据权利要求1~18中任一项所述的药物组合物,其中,PD-1信号抑制剂为与选自由PD-1、PD-L1和PD-L2组成的组中的1种以上蛋白质结合的抗体或其抗原结合片段。

20. 根据权利要求1~19中任一项所述的药物组合物,其中,PD-1信号抑制剂为选自由纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、斯巴达珠单抗和西米普利单抗组成的组中的抗PD-1抗体。

21. 根据权利要求1~19中任一项所述的药物组合物,其中,PD-1信号抑制剂为选自由阿替利珠单抗、度伐利尤单抗和阿维鲁单抗组成的组中的抗PD-L1抗体。

22. 一种双特异性抗体,其是用于治疗对象的癌症的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体,其中,该双特异性抗体含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区,所述双特异性抗体与PD-1信号抑制剂组合使用。

23. 一种双特异性抗体,其是用于治疗对象的癌症的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体,其中,该双特异性抗体包含由由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链构成的双特异性抗体,所述双特异性抗体与PD-1信号抑制剂组合使用。

24. 一种包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂给药于对象的步骤

的癌症治疗方法,其中,该抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区。

25.一种包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂组合给药于对象的步骤的癌症治疗方法,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链。

26.抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体在制造为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的药物组合物中的应用,其中,该双特异性抗体含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区。

27.抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体在制造为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的药物组合物中的应用,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链。

抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体通过与PD-1信号抑制剂的组合在癌症治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体通过与PD-1信号抑制剂的组合在癌症治疗中的应用。

背景技术

[0002] 紧密连接蛋白-4 (Claudin-4, CLDN4) 为属于紧密连接蛋白家族的四次跨膜蛋白。在上皮细胞、内皮细胞中表达,作为构成紧密连接的主要分子发挥着重要的作用。CLDN4在大肠癌、膀胱癌、卵巢癌等的癌组织中也确认到高表达,暗示了抗CLDN4抗体能够用于癌症的治疗或诊断的可能性(专利文献1、非专利文献1)。进而,在动物模型中显示出抗CLDN4抗体与抗表皮生长因子受体(Epidermal growth factor receptor, EGFR)抗体的联用所带来的抗肿瘤效果(非专利文献2)。

[0003] 分化簇137(Cluster of Differentiation 137, CD137, 别名4-1BB)为属于肿瘤坏死因子受体超家族(Tumor Necrosis Factor Receptor Super family, TNFRSF)的分子,据报道在T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞等免疫细胞表面表达。特别地,已知T细胞上的CD137与抗原呈递细胞上的CD137配体结合而作为共刺激分子参与T细胞的活化和生存(非专利文献3)。抗CD137激动抗体在动物模型中显示出肿瘤微环境内的免疫细胞活化介导的抗肿瘤效果(非专利文献4)。作为抗CD137激动抗体的乌瑞芦单抗(Urelumab)在临床试验中显示出治疗效果,但是也被报道了会带来肝障碍这一副作用(非专利文献5)。

[0004] 作为能够以低抗体浓度得到癌细胞选择性的细胞杀伤活性的划时代的方法,报道了各种抗体形式的双特异性T细胞募集抗体(bispecific T-cell-recruiting antibodies)。双特异性T细胞募集抗体为含有针对在癌细胞表面上表达的肿瘤相关抗原(Tumor-Associated Antigens; TAA)的抗体和与T细胞结合的抗体的双特异性抗体,正在研究这些抗体针对T细胞介导的免疫疗法的效果(非专利文献6)。作为与T细胞结合的抗体,大多使用抗CD3抗体,目前也在进行各种针对TAA的双特异性T细胞募集抗体的研究开发。

[0005] 进而,近年正在积极地研究针对CD137和TAA的双特异性T细胞募集抗体。正在研究识别作为TAA的磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(Glypican3, GPC3)、人表皮生长因子受体2型(Human Epidermal Growth Factor Receptor Type2, HER2)、程序性细胞死亡配体1(Programmed Cell Death-Ligand1, PD-L1)、成纤维细胞活化蛋白(Fibroblast Activation Protein, FAP)的抗GPC3-抗CD137双特异性抗体、抗HER2-抗CD137双特异性抗体、抗PD-L1-抗CD137双特异性抗体、抗FAP-抗CD137双特异性抗体等(专利文献2和3、非专利文献7~9)。

[0006] 程序性细胞死亡蛋白1(PD-1;也被称为PDCD1或CD279)为属于免疫球蛋白超家族的50~55kDa的I型跨膜蛋白(非专利文献10)。在T细胞中,随着持续活化而诱导表达PD-1,通过与作为配体的程序性细胞死亡配体1(PD-L1;也被称为PDCD1LG1、B7-H1或CD274)或程序性细胞死亡配体2(PD-L2;也被称为PDCD1LG2、B7-DC或CD273)结合而抑制性地调控T细胞

的活化(非专利文献11)。一般而言,将这样的T细胞活化调控机制称为免疫检查点,已知为用于避免引起过度免疫应答的负反馈机制之一。

[0007] 在癌症发生初期,T细胞等免疫细胞通过基于免疫监视机制的抗肿瘤免疫应答来清除癌。另一方面,癌通过在癌微环境中直接或间接地抑制免疫细胞来获得免疫逃逸机制。作为直接的活化T细胞抑制机制,已知PD-1/PD-L1或PD-L2(以下记作“PD-1信号”)途径、CTLA-4/CD80或CD86途径等免疫检查点机制。在癌的肿瘤微环境中,确认到T细胞中的PD-1表达和肿瘤中的PD-L1表达(非专利文献12),认为癌通过该PD-1信号的活化而显示免疫逃逸。报道了在多种小鼠荷瘤模型中通过抑制PD-1信号而解除免疫逃逸机制,带来抗肿瘤活性(非专利文献13~15)。进而,作为PD-1信号抑制剂,致力于纳武利尤单抗、帕博利珠单抗等抗PD-1抗体等PD-1信号抑制剂的开发,在黑素瘤、肺癌、淋巴瘤等中获得了显著成果。另外,作为PD-1信号抑制剂,除了抗体以外,也在进行核酸药物和低分子药物等的研究(非专利文献16)。

[0008] 为了提高癌症患者的治疗有效性,正在致力于推进多种癌免疫药的联用疗法、癌免疫药与现有抗癌剂的联用试验(非专利文献17和18)。例如,正在实施抗PD-1抗体与其它免疫检查点抑制抗体、抗癌剂、分子靶向药、放射线治疗、癌疫苗、溶瘤病毒的联用试验。

[0009] 但是,到目前为止,尚未报道过基于抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与PD-1信号抑制剂的联用的癌症治疗方法。

[0010] 现有技术文献

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:国际公开第2008/114733号

[0013] 专利文献2:国际公开第2015/156268号

[0014] 专利文献3:国际公开第2016/177802号

[0015] 非专利文献

[0016] 非专利文献1:Cancer Science、2009:100(9):p.1623-1630

[0017] 非专利文献2:Oncotarget、2018:9(100):p.37367-37378

[0018] 非专利文献3:Cancer Science、2020:111(5):p.1461-1467

[0019] 非专利文献4:Cancer Immunology Immunotherapy、2012:61(5):p.1721-1733

[0020] 非专利文献5:Clinical Cancer Research、2017:23(8):p.1929-1936

[0021] 非专利文献6:MAbs、2017:9(2):p.182-212

[0022] 非专利文献7:Clinical Cancer Research、2019:25(19):p.5878-5889

[0023] 非专利文献8:Clinical Cancer Research、2020:26(15):p.4154-4167

[0024] 非专利文献9:Journal for Immunotherapy of Cancer、2020:8(2):e000238

[0025] 非专利文献10:International Immunology、1996:Vol.8:p.765-772

[0026] 非专利文献11:Annual Review of Immunology、2008:Vol.26:p.677-704

[0027] 非专利文献12:Nature Medicine、2002:8:p.793-800

[0028] 非专利文献13:Scientific Reports、2021:11:p.21087-21099

[0029] 非专利文献14:Nature Communications、2017:8:p.14572-14582

[0030] 非专利文献15:Journal for Immunotherapy of Cancer、2019:7:37:p.1-16

[0031] 非专利文献16:Molecules、2019:24:p.2071-2100

[0032] 非专利文献17:Cancer Discovery、2021:11:p.1368-1397

[0033] 非专利文献18:Molecular Medicine Reports、2021:23:p.362-377

发明内容

[0034] 发明所要解决的问题

[0035] 本发明的课题在于,提供为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体或含有该双特异性抗体的药物组合物、或者包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂给药于对象的步骤的癌症治疗方法。

[0036] 用于解决问题的方法

[0037] 本发明人们为了研发用于治疗表达CLDN4的癌症的抗体或药物组合物,基于公知的作为抗CLDN4抗体的KM3900抗体和抗CD137抗体的序列制作了抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体(实施例1)。所获得的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体的联用与抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体、抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体单独时相比,在体外促进了T细胞的干扰素 γ 产生(实施例2和3)。进而,在携带了表达人CLDN4的小鼠癌细胞的小鼠中,与单独给药抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体或抗PD-1抗体时相比,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗PD-1抗体的联用显示出更显著的抗肿瘤效果(实施例4)。该结果表明,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与PD-1信号抑制剂的组合在表达CLDN4的癌症的治疗中 useful。

[0038] 即,本发明涉及以下的[1]~[84],但是不限于这些。

[0039] [1]一种药物组合物,其是含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的用于治疗对象的癌症的药物组合物,其中,该双特异性抗体含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区,所述药物组合物与PD-1信号抑制剂组合使用。

[0040] [2]根据[1]所述的药物组合物,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号99至112的氨基酸序列构成的CDR3,抗CLDN4抗体的轻链可变区含有由序列号4的氨基酸编号24至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的氨基酸编号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号4的氨基酸编号90至98的氨基酸序列构成的CDR3。

[0041] [3]根据[1]或[2]所述的药物组合物,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成,抗CLDN4抗体的轻链可变区由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成。

[0042] [4]根据[1]~[3]中任一项所述的药物组合物,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含由含有抗CLDN4抗体的重链可变区的重链和含有抗CLDN4抗体的轻链可变区的轻链构成的IgG抗体(抗CLDN4 IgG抗体)。

[0043] [5]根据[4]所述的药物组合物,其中,在抗CLDN4 IgG抗体的Fc区含有LALA突变(L234A和L235A)或P331G突变(在此,上述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的依据EU索引的氨基酸位置)中的任一者或两者。

[0044] [6]根据[1]~[5]中任一项所述的药物组合物,其中,抗CD137抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号625至629的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号644至659的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号692至701的氨基酸序列构成

的CDR3,抗CD137抗体的轻链可变区含有由序列号2的氨基酸编号486至498的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号514至520的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号553至563的氨基酸序列构成的CDR3。

[0045] [7]根据[1]~[6]中任一项所述的药物组合物,其中,抗CD137抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成,抗CD137抗体的轻链可变区由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成。

[0046] [8]根据[6]或[7]所述的药物组合物,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137单链可变区片段(抗CD137scFv)。

[0047] [9]根据[8]所述的药物组合物,其中,抗CD137scFv由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成。

[0048] [10]根据[8]或[9]所述的药物组合物,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv,抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于抗CLDN4 IgG抗体的重链羧基末端。

[0049] [11]一种药物组合物,其是含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的用于治疗对象的癌症的药物组合物,其中,该双特异性抗体包含含有由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CLDN4抗体的重链和含有由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CLDN4抗体的轻链以及含有由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的轻链可变区和由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的重链可变区的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端,所述药物组合物与PD-1信号抑制剂组合使用。

[0050] [12]一种药物组合物,其是含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的用于治疗对象的癌症的药物组合物,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸编号1至453的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的重链和由序列号4的氨基酸编号1至215的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链以及由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端,所述药物组合物与PD-1信号抑制剂组合使用。

[0051] [13]根据[10]~[12]中任一项所述的药物组合物,其中,接头为GS接头。

[0052] [14]一种药物组合物,其是含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的用于治疗对象的癌症的药物组合物,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链,所述药物组合物与PD-1信号抑制剂组合使用。

[0053] [15]根据[1]~[14]中任一项所述的药物组合物,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体经过了翻译后修饰。

[0054] [16]根据[1]~[15]中任一项所述的药物组合物,其与PD-1信号抑制剂同时地、连续地或逐次地组合使用。

[0055] [17]根据[1]~[16]中任一项所述的药物组合物,其中,(i)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于同一药物组合物,同时给药;或(ii)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于不同的药物组合物,同时地、连续地或逐次地组合使

用。

[0056] [18]根据[1]~[17]中任一项所述的药物组合物,其中,癌症选自由大肠癌、膀胱癌和肺癌组成的组。

[0057] [19]根据[1]~[18]中任一项所述的药物组合物,其中,PD-1信号抑制剂为与选自由PD-1、PD-L1和PD-L2组成的组中的1种以上蛋白质结合的抗体或其抗原结合片段。

[0058] [20]根据[1]~[19]中任一项所述的药物组合物,其中,PD-1信号抑制剂为选自由纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、斯巴达珠单抗和西米普利单抗组成的组中的抗PD-1抗体。

[0059] [21]根据[1]~[19]中任一项所述的药物组合物,其中,PD-1信号抑制剂为选自由阿替利珠单抗、度伐利尤单抗和阿维鲁单抗组成的组中的抗PD-L1抗体。

[0060] [22]一种双特异性抗体,其是用于治疗对象的癌症的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体,其中,该双特异性抗体含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区,所述双特异性抗体与PD-1信号抑制剂组合使用。

[0061] [23]根据[22]所述的双特异性抗体,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号99至112的氨基酸序列构成的CDR3,抗CLDN4抗体的轻链可变区含有由序列号4的氨基酸编号24至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的氨基酸编号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号4的氨基酸编号90至98的氨基酸序列构成的CDR3。

[0062] [24]根据[22]或[23]所述的双特异性抗体,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成,抗CLDN4抗体的轻链可变区由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成。

[0063] [25]根据[22]~[24]中任一项所述的双特异性抗体,其包含由含有抗CLDN4抗体的重链可变区的重链和含有抗CLDN4抗体的轻链可变区的轻链构成的IgG抗体(抗CLDN4 IgG抗体)。

[0064] [26]根据[25]所述的双特异性抗体,其中,在抗CLDN4 IgG抗体的Fc区含有LALA突变(L234A和L235A)或P331G突变(在此,上述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的依据EU索引的氨基酸位置)中的任一者或两者。

[0065] [27]根据[22]~[26]中任一项所述的双特异性抗体,其中,抗CD137抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号625至629的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号644至659的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号692至701的氨基酸序列构成的CDR3,抗CD137抗体的轻链可变区含有由序列号2的氨基酸编号486至498的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号514至520的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号553至563的氨基酸序列构成的CDR3。

[0066] [28]根据[22]~[27]中任一项所述的双特异性抗体,其中,抗CD137抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成,抗CD137抗体的轻链可变区由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成。

[0067] [29]根据[27]或[28]所述的双特异性抗体,其包含含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137单链可变区片段(抗CD137scFv)。

[0068] [30]根据[29]所述的双特异性抗体,其中,抗CD137scFv由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成。

[0069] [31]根据[29]或[30]所述的双特异性抗体,其含有抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv,抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于抗CLDN4 IgG抗体的重链羧基末端。

[0070] [32]一种双特异性抗体,其是用于治疗对象的癌症的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体,其中,该双特异性抗体包含含有由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CLDN4抗体的重链和含有由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CLDN4抗体的轻链以及含有由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的轻链可变区和由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的重链可变区的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端,所述双特异性抗体与PD-1信号抑制剂组合使用。

[0071] [33]一种双特异性抗体,其是用于治疗对象的癌症的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体,其中,该双特异性抗体含有由序列号2的氨基酸编号1至453的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的重链和由序列号4的氨基酸编号1至215的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链以及由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端,所述双特异性抗体与PD-1信号抑制剂组合使用。

[0072] [34]根据[31]~[33]中任一项所述的双特异性抗体,其中,接头为GS接头。

[0073] [35]一种双特异性抗体,其是用于治疗对象的癌症的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链,所述双特异性抗体与PD-1信号抑制剂组合使用。

[0074] [36]根据[22]~[35]中任一项所述的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体经过了翻译后修饰。

[0075] [37]根据[22]~[36]中任一项所述的双特异性抗体,其与PD-1信号抑制剂同时地、连续地或逐次地组合使用。

[0076] [38]根据[22]~[37]中任一项所述的双特异性抗体,其中,(i)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于同一药物组合物,同时给药;或(ii)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂为不同的药物组合物,同时地、连续地或逐次地组合使用。

[0077] [39]根据[22]~[38]中任一项所述的双特异性抗体,其中,癌症选自由大肠癌、膀胱癌和肺癌组成的组。

[0078] [40]根据[22]~[39]中任一项所述的双特异性抗体,其中,PD-1信号抑制剂为与选自由PD-1、PD-L1和PD-L2组成的组中的1种以上蛋白质结合的抗体或其抗原结合片段。

[0079] [41]根据[22]~[40]中任一项所述的双特异性抗体,其中,PD-1信号抑制剂为选自由纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、斯巴达珠单抗和西米普利单抗组成的组中的抗PD-1抗体。

[0080] [42]根据[22]~[40]中任一项所述的双特异性抗体,其中,PD-1信号抑制剂为选自由阿替利珠单抗、度伐利尤单抗和阿维鲁单抗组成的组中的抗PD-L1抗体。

[0081] [43]一种治疗方法,其是包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂组合给药于对象的步骤的癌症治疗方法,其中,该双特异性抗体含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0082] [44]根据[43]所述的治疗方法,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号99至112的氨基酸序列构成的CDR3,抗CLDN4抗体的轻链可变区含有由序列号4的氨基酸编号24至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的氨基酸编号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号4的氨基酸编号90至98的氨基酸序列构成的CDR3。

[0083] [45]根据[43]或[44]所述的治疗方法,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成,抗CLDN4抗体的轻链可变区由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成。

[0084] [46]根据[43]~[45]中任一项所述的治疗方法,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含由含有抗CLDN4抗体的重链可变区的重链和含有抗CLDN4抗体的轻链可变区的轻链构成的IgG抗体(抗CLDN4 IgG抗体)。

[0085] [47]根据[46]所述的治疗方法,其中,在抗CLDN4 IgG抗体的Fc区含有LALA突变(L234A和L235A)或P331G突变(在此,上述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的依据EU索引的氨基酸位置)中的任一者或两者。

[0086] [48]根据[43]~[47]中任一项所述的治疗方法,其中,抗CD137抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号625至629的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号644至659的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号692至701的氨基酸序列构成的CDR3,抗CD137抗体的轻链可变区含有由序列号2的氨基酸编号486至498的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号514至520的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号553至563的氨基酸序列构成的CDR3。

[0087] [49]根据[43]~[48]中任一项所述的治疗方法,其中,抗CD137抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成,抗CD137抗体的轻链可变区由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成。

[0088] [50]根据[48]或[49]所述的治疗方法,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137单链可变区片段(抗CD137scFv)。

[0089] [51]根据[50]所述的治疗方法,其中,抗CD137scFv由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成。

[0090] [52]根据[50]或[51]所述的治疗方法,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv,抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于抗CLDN4 IgG抗体的重链羧基末端。

[0091] [53]一种治疗方法,其是包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂组合给药于对象的步骤的癌症治疗方法,其中,该双特异性抗体包含含有由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CLDN4抗体的重链和含有由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CLDN4抗体的轻链以及含有由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的轻链可变区和由序列号2

的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的重链可变区的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端。

[0092] [54]一种治疗方法,其是包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂组合给药于对象的步骤的癌症治疗方法,其中,该双特异性抗体含有由序列号2的氨基酸编号1至453的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的重链和由序列号4的氨基酸编号1至215的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链以及由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端。

[0093] [55]根据[52]~[54]中任一项所述的治疗方法,其中,接头为GS接头。

[0094] [56]一种治疗方法,其是包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂组合给药于对象的步骤的癌症治疗方法,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链。

[0095] [57]根据[43]~[56]中任一项所述的治疗方法,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体经过了翻译后修饰。

[0096] [58]根据[43]~[57]中任一项所述的治疗方法,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂同时地、连续地或逐次地组合使用。

[0097] [59]根据[43]~[58]中任一项所述的治疗方法,其中,(i)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于同一药物组合物,同时给药;或(ii)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂为不同的药物组合物,同时地、连续地或逐次地组合使用。

[0098] [60]根据[43]~[58]中任一项所述的治疗方法,其中,癌症选自由大肠癌、膀胱癌和肺癌组成的组。

[0099] [61]根据[43]~[60]中任一项所述的治疗方法,其中,PD-1信号抑制剂为与选自由PD-1、PD-L1和PD-L2组成的组中的1种以上蛋白质结合的抗体或其抗原结合片段。

[0100] [62]根据[43]~[61]中任一项所述的治疗方法,其中,PD-1信号抑制剂为选自由纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、斯巴达珠单抗和西米普利单抗组成的组中的抗PD-1抗体。

[0101] [63]根据[43]~[61]中任一项所述的治疗方法,其中,PD-1信号抑制剂为选自由阿替利珠单抗、度伐利尤单抗和阿维鲁单抗组成的组中的抗PD-L1抗体。

[0102] [64]抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体在制造为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的药物组合物中的应用,其中,该双特异性抗体含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0103] [65]根据[64]所述的应用,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号99至112的氨基酸序列构成的CDR3,抗CLDN4抗体的轻链可变区含有由序列号4的氨基酸编号24至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的氨基酸编号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号4的氨基酸编号90至98的氨基酸序列构成的CDR3。

[0104] [66]根据[64]或[65]所述的应用,其中,抗CLDN4抗体的重链可变区由序列号2的

氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成,抗CLDN4抗体的轻链可变区由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成。

[0105] [67]根据[64]~[66]中任一项所述的应用,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含由含有抗CLDN4抗体的重链可变区的重链和含有抗CLDN4抗体的轻链可变区的轻链构成的IgG抗体(抗CLDN4 IgG抗体)。

[0106] [68]根据[67]所述的应用,其中,在抗CLDN4 IgG抗体的Fc区含有LALA突变(L234A和L235A)或P331G突变(在此,上述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的依据EU索引的氨基酸位置)中的任一者或两者。

[0107] [69]根据[64]~[68]中任一项所述的应用,其中,抗CD137抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号625至629的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号644至659的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号692至701的氨基酸序列构成的CDR3,抗CD137抗体的轻链可变区含有由序列号2的氨基酸编号486至498的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号514至520的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号553至563的氨基酸序列构成的CDR3。

[0108] [70]根据[64]~[69]中任一项所述的应用,其中,抗CD137抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成,抗CD137抗体的轻链可变区由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成。

[0109] [71]根据[69]或[70]所述的应用,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137单链可变区片段(抗CD137scFv)。

[0110] [72]根据[71]所述的应用,其中,抗CD137scFv由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成。

[0111] [73]根据[71]或[72]所述的应用,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv,抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于抗CLDN4 IgG抗体的重链羧基末端。

[0112] [74]抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体在制造为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的药物组合物中的应用,其中,该双特异性抗体包含含有由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CLDN4抗体的重链和含有由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CLDN4抗体的轻链以及含有由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的轻链可变区和由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的重链可变区的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端。

[0113] [75]抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体在制造为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的药物组合物中的应用,其中,该双特异性抗体含有由序列号2的氨基酸编号1至453的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的重链和由序列号4的氨基酸编号1至215的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链以及由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成的抗CD137scFv,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端。

[0114] [76]根据[73]~[75]中任一项所述的应用,其中,接头为GS接头。

[0115] [77]抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体在制造为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑

制剂组合使用的药物组合物中的应用,其中,该双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链。

[0116] [78]根据[64]~[77]中任一项所述的应用,其中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体经过了翻译后修饰。

[0117] [79]根据[64]~[78]中任一项所述的应用,其中,药物组合物与PD-1信号抑制剂同时地、连续地或逐次地组合使用。

[0118] [80]根据[64]~[79]中任一项所述的应用,其中,(i)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于同一药物组合物,同时给药;或(ii)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂为不同的药物组合物,同时地、连续地或逐次地组合使用。

[0119] [81]根据[64]~[80]中任一项所述的应用,其中,癌症选自大肠癌、膀胱癌和肺癌组成的组。

[0120] [82]根据[64]~[81]中任一项所述的应用,其中,PD-1信号抑制剂为与选自由PD-1、PD-L1和PD-L2组成的组中的1种以上蛋白质结合的抗体或其抗原结合片段。

[0121] [83]根据[64]~[82]中任一项所述的应用,其中,PD-1信号抑制剂为选自由纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、斯巴达珠单抗和西米普利单抗组成的组中的抗PD-1抗体。

[0122] [84]根据[64]~[82]中任一项所述的应用,其中,PD-1信号抑制剂为选自由阿替利珠单抗、度伐利尤单抗和阿维鲁单抗组成的组中的抗PD-L1抗体。

[0123] 发明效果

[0124] 本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与在癌中高表达的CLDN4和作为T细胞表面分子的CD137这两者结合,通过活化癌细胞周边的免疫细胞来增强对癌细胞的杀伤作用。本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与PD-1信号抑制剂的组合与抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体或PD-1信号抑制剂的单独给药相比,带来更显著的抗肿瘤效果。因此,本发明提供抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体通过与PD-1信号抑制剂的组合在癌症治疗中的应用。

附图说明

[0125] 图1-1示出人大细胞肺癌细胞株LCLC-0KT3scFv细胞与扩增panT细胞的共培养体系中的、添加受试抗体所引起的干扰素- γ 产生量。图的纵轴表示添加抗体4天后的干扰素- γ 产生量,横轴表示抗体浓度。符号表示各抗体的各浓度下的干扰素- γ 产生量的平均值。误差棒表示标准偏差。

[0126] 图1-2示出人大细胞肺癌细胞株LCLC-0KT3scFv细胞与扩增panT细胞的共培养体系中的、添加受试抗体所引起的干扰素- γ 产生量。图的纵轴表示添加抗体5天后的干扰素- γ 产生量,横轴表示抗体浓度。符号表示抗体的各浓度下的干扰素- γ 产生量的平均值。误差棒表示标准偏差。

[0127] 图2示出B-h4-1BB小鼠所携带的表达人CLDN4的B16-F10细胞的增殖抑制效果。图2示出开始给药抗体后的各天数时的肿瘤体积的平均值($n=10$)。误差棒表示肿瘤体积的标准误差。图的纵轴表示肿瘤体积,横轴表示从首次给药抗体起的天数。显著性概率P值利用非配对学生t(unpaired Student's t)检验将联用组的肿瘤体积与受试抗体单独给药的

肿瘤体积进行比较而求出。图中的**表示P值小于显著性水平0.01。

具体实施方式

[0128] 以下对本发明进行详细说明。

[0129] 本说明书中的术语如果在下文中没有特别定义,则以该技术领域中本领域技术人员通常使用的含义来使用。

[0130] 抗体(或免疫球蛋白)是指以具有由2条具有单一序列的重链和2条具有单一序列的轻链构成的左右对称Y字型结构的4条链结构为基本结构的糖蛋白。抗体存在IgG、IgM、IgA、IgD和IgE这5类。抗体分子的基本结构在各类中是共通的,2条分子量5万~7万的重链和2条分子量2万~3万的轻链通过二硫键和非共价键而结合,形成分子量15万~19万的由Y字型的4条链结构构成的抗体分子。重链通常由包含约440个氨基酸的多肽链构成,在各类中具有特征性结构,与IgG、IgM、IgA、IgD、IgE对应地分别被称为Ig γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 、Ig ϵ 。另外,IgG存在IgG1、IgG2、IgG3、IgG4的亚类,各自对应的重链被称为Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3、Ig γ 4。轻链通常由包含约220个氨基酸的多肽链构成,已知有 λ 型和 κ 型这2种,分别称为Ig λ 、Ig κ 。上述2种轻链可以与任意种类的重链配对。

[0131] 关于抗体分子的链内二硫键,在重链中存在4个(Ig μ 、Ig ϵ 中存在5个),在轻链中存在2个,每100~110个氨基酸残基形成1个环。这些立体结构在各环之间是相似的,被称为结构单元或结构域。重链、轻链均是位于氨基末端(本说明书中也称为“N末端”)的结构域被称为可变区,已知即使是由同种动物的同一类(或亚类)产生的抗体也具有多样的氨基酸序列,参与抗体与抗原的结合特异性结合。位于可变区下游的C末端侧的结构域的氨基酸序列在各类或亚类中大致恒定,被称为恒定区。重链中,从N末端向羧基末端(本说明书中也称为“C末端”)具有重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)。CH中,进一步从N末端侧起分为CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域这3个结构域。轻链中,从N末端向C末端具有轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)。

[0132] VH和VL中存在的3个互补决定区(CDR)的氨基酸序列的变化非常大,有助于可变区的可变性。CDR是在重链和轻链的N末端分别以CDR1、CDR2、CDR3的顺序存在的约5~10个氨基酸残基构成的区域,形成抗原结合部位。另一方面,可变区的CDR以外的部分被称为框架区(FR),由FR1~4构成,氨基酸序列的变化比较少。

[0133] 将抗体用蛋白水解酶的木瓜蛋白酶处理时,得到3个抗体片段。N末端侧的2个片段被称为Fab(抗原结合片段,Fragment,antigen binding)区。本说明书中,“Fab区”是指由重链的VH和CH1结构域以及轻链(VL和CL)构成的区域,通过该Fab区所构成的前端部分的抗原结合部位与抗原结合。本说明书中,“重链片段”是指由构成Fab区的重链的VH和CH1结构域构成的片段。另外,将C末端侧的片段称为“Fc(可结晶化片段,Fragment,crystallizable)区”。

[0134] 本说明书中,“抗原”以通常使用的意思来使用,特别地,作为表示抗体、抗原结合片段等抗原结合蛋白可特异性结合的分子或分子的一部分的术语来使用。抗原可以为蛋白质、核酸等分子。有时,1个抗原具有能够与不同的抗体等进行相互作用的1个或1个以上的表位。

[0135] 本说明书中,“IgG抗体”是指由2个Fab区和Fc区构成的具有Y字型的结构的抗体。

一个实施方式中, IgG抗体的2个Fab区含有相同的VH和VL序列。

[0136] 本说明书中, “抗原结合片段”是指来自抗体的具有抗原结合活性的含有至少1条多肽链的分子。作为代表性的抗原结合片段, 可列举单链可变区片段(scFv)、Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段。scFv为由以接头连接的VH和VL构成的一价的抗原结合片段。Fab片段为由包含轻链和重链的VH、CH1结构域的片段构成的一价的抗原结合片段。Fab'片段为由包含轻链和重链的VH、CH1结构域和铰链区的一部分的片段构成的一价的抗原结合片段, 该铰链区的部分包含构成重链间S-S键的半胱氨酸残基。F(ab')₂片段为以二硫键连接Fab'片段而成的二价的分子。一价是指含有1个抗原结合部位, 二价是指含有2个抗原结合部位。

[0137] 本说明书中, “双特异性抗体”是指能够与2个不同的抗原特异性结合的抗体。“抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体”是指具有对CLDN4的结合活性和对CD137的结合活性的双特异性抗体。

[0138] 本说明书中, “抗体”在上下文中没有特别限定时作为包括全长抗体、抗原结合片段和所有结构的双特异性抗体的术语来使用。

[0139] 本说明书中, “人抗体”表示具有人免疫球蛋白氨基酸序列的抗体。本说明书中, “人源化抗体”表示CDR以外的氨基酸残基的一部分、大部分或全部被来自于人免疫球蛋白分子的氨基酸残基置换的抗体。人源化的方法没有特别限制, 例如可以参照美国专利第5225539号、美国专利第6180370号等来制作人源化抗体。

[0140] 本说明书中使用的抗体的氨基酸残基编号可以通过指定Kabat编号或EU索引(Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., 1991: NIH Publication: No. 91-3242) 而按照这些编号系统进行规定。

[0141] 本说明书中, “连接”、“连接体”或“连接的”是指多个成分(例如IgG抗体和scFv)直接结合或经由中介物(例如肽接头)结合。本说明书中, “肽接头”是指用于连接多个成分的、可以通过基因工程方法导入的1个以上的任意氨基酸序列。本发明中使用的肽接头的长度没有特别限制, 本领域技术人员可以根据目的适宜选择。

[0142] 本说明书中, “对象”是指需要预防或治疗疾病的人或其它动物。一个实施方式中, 对象为需要预防或治疗疾病的人。一个实施方式中, 对象为患有癌症的人。

[0143] 本说明书中, “治疗”是指为了使与疾病的症状、病情、疾病相关的生物化学征兆的进展、发病、重度化或复发恢复、缓解、改善、抑制或延迟而对对象进行的某些治疗介入(intervention)、处置或有效成分向对象的给药。

[0144] 本说明书中, “有效成分”是指用于预防或治疗疾病的药物组合物、药品等中含有的物质中显示某种生理活性的物质。一个实施方式中, 有效成分为抗体、低分子化合物、核酸、融合蛋白、肽。一个实施方式中, 有效成分为抗体。一个实施方式中, 有效成分为双特异性抗体。

[0145] 本说明书中, “药物组合物”是指含有有效成分和药学上可接受的赋形剂(包括例如药剂用赋形剂、药剂用载体等, 但是不限于此)、以治疗对象为目的而开具的药剂。

[0146] 本说明书中, “联用”、“组合”或“组合使用”是指为了预防或治疗疾病将两种以上有效成分同时地、连续地或逐次地给药于同一对象。该两种以上有效成分可以包含于同一药物组合物, 也可以分别包含于不同的药物组合物。本说明书中, “同时”是指将两种以上有效成分在一者的给药期间并行地进行给药, “连续地”是指在一种有效成分的给药结束后,

时间上不间断地进行另一有效成分的给药,“逐次地”是指将两种以上有效成分按照给药日程依次进行给药。

[0147] 本说明书中,药剂的“有效量”是指使给药药剂的细胞或组织产生生理学变化所必需的药剂量。

[0148] 本说明书中,“PD-1信号抑制剂”是指可解除由PD-1引起的免疫细胞活化抑制的药剂。PD-1信号抑制剂可通过与PD-1或作为其配体的PD-L1或PD-L2结合并抑制免疫抑制信号而抑制PD-1的免疫检查点功能。作为PD-1信号抑制剂,只要具有阻断PD-1信号的效果则可以任意物质,例如,可以为抗体、低分子化合物、核酸(可以包括DNA或RNA、或者天然或人工的核酸)、融合蛋白、肽等。例如,抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体或抗PD-L2抗体可以通过抑制PD-1与PD-L1或PD-L2的结合而抑制PD-1信号(Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2016:Vol.26:p.555-564)。

[0149] 本发明涉及以下的(1)~(4):

[0150] (1)含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的与PD-1信号抑制剂组合使用的药物组合物(本说明书中也称为“本发明的药物组合物”);

[0151] (2)为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体;

[0152] (3)包括将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂给药于对象的步骤的癌症治疗方法(本说明书中也称为“本发明的治疗方法”);或

[0153] (4)抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体在制造为了治疗对象的癌症而与PD-1信号抑制剂组合使用的药物组合物中的应用。

[0154] <本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体>

[0155] 本发明中使用的与CLDN4和CD137结合的双特异性抗体(也称为“本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体”)含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区以及抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区。

[0156] 本说明书中,“抗CLDN4抗体”为可以与人CLDN4结合的抗体,“抗CD137抗体”为可以与人CD137结合的抗体。是否与人CLDN4或人CD137结合可以通过使用公知的结合活性测定方法来确认。作为测定结合活性的方法,可列举酶联免疫吸附测定(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay,ELISA)法、流式细胞术法等方法。ELISA法或流式细胞术法可以利用本领域技术人员通常使用的方法来实施。

[0157] 本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体只要与CLDN4和CD137结合,则可以为任意的结构,可列举例如具有非专利文献6中记载的结构的双特异性抗体。一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体可以为抗CLDN4抗体的Fab区与抗CD137抗体的Fab区连接而成的连接体、IgG抗体型的抗CLDN4抗体(也称为“抗CLDN4 IgG抗体”)与IgG抗体型的抗CD137抗体(也称为“抗CD137 IgG抗体”)的连接体、抗CLDN4 IgG抗体与抗CD137抗体的抗原结合片段的连接体、抗CLDN4抗体的抗原结合片段与抗CD137 IgG抗体的连接体、或抗CLDN4抗体的抗原结合片段与抗CD137抗体的抗原结合片段的连接体。

[0158] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含含有由序列号2的氨基酸编号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号99至112的氨基酸序列构成的CDR3的抗CLDN4抗体

的重链可变区以及含有由序列号4的氨基酸编号24至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的氨基酸编号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号4的氨基酸编号90至98的氨基酸序列构成的CDR3的抗CLDN4抗体的轻链可变区。

[0159] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的重链可变区和由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链可变区。

[0160] 本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中含有的抗CLDN4抗体可以为IgG抗体。作为抗CLDN4抗体中含有的重链恒定区,也可以选择Ig γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 或Ig ϵ 中的任一恒定区。作为Ig γ ,例如可以选自Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3或Ig γ 4。作为本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中含有的抗CLDN4抗体中含有的轻链恒定区,也可以选择Ig λ 或Ig κ 中的任一恒定区。一个实施方式中,该抗CLDN4抗体的重链和轻链分别为人Ig γ 1和Ig κ 。一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有全长抗CLDN4抗体。一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中含有的抗CLDN4抗体为含有抗CLDN4抗体的重链可变区和轻链可变区的IgG抗体(抗CLDN4 IgG抗体)。

[0161] 本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有Fc区时,该双特异性抗体中的Fc区可以含有使抗体依赖性细胞毒活性(ADCC)、补体依赖性细胞毒活性(CDC)下降的突变。L234A是指人Ig γ 1恒定区的氨基酸第234位的亮氨酸向丙氨酸的置换。L235A是指人Ig γ 1恒定区的氨基酸第235位的亮氨酸向丙氨酸的置换。将人Ig γ 1恒定区L234A和L235A的氨基酸突变称为“LALA突变”。已知该突变使抗体的ADCC、CDC下降(Mol. Immunol., 1992: Vol. 29: p. 633-639、J. Immunol., 2000: Vol. 164(8): p. 4178-4184)。P331G或P331S是指人Ig γ 1恒定区的氨基酸第331位的脯氨酸向甘氨酸或丝氨酸的置换。已知该突变使抗体的CDC下降(J. Immunol., 2000: Vol. 164(8): p. 4178-4184)。

[0162] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中含有的抗CLDN4 IgG抗体包含含有L234A和L235A的氨基酸突变(LALA突变)的Fc区。一个实施方式中,抗CLDN4 IgG抗体包含含有P331G或P331S突变中的任一者的Fc区。一个实施方式中,抗CLDN4 IgG抗体包含含有LALA突变和P331G或P331S突变中的任一突变的Fc区。一个实施方式中,抗CLDN4 IgG抗体包含含有LALA突变和P331G突变中的任一种或两种突变的Fc区。

[0163] 需要说明的是,本说明书中,LALA突变、P331G或P331S突变等氨基酸突变的记载基于人Ig γ 1恒定区中的依据EU索引的氨基酸位置。例如,如上所述,L234A是人Ig γ 1恒定区中的依据EU索引的氨基酸第234位的亮氨酸向丙氨酸的置换。

[0164] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体是由由序列号2的氨基酸编号1至453的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的重链和由序列号4的氨基酸编号1至215的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链构成的IgG抗体。

[0165] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中含有的抗CD137抗体的重链可变区含有由序列号2的氨基酸编号625至629的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号644至659的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号692至701的氨基酸序列构成的CDR3,抗CD137抗体的轻链可变区含有由序列号2的氨基酸编号486至498的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号514至520的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号553至563的氨基酸序列构成的CDR3。

[0166] 一个实施方式中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中含有的抗CD137抗体的重链可变区由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成,抗CD137抗体的轻链可变区由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成。

[0167] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CD137抗体的scFv(本说明书中也称为“抗CD137scFv”)。

[0168] 抗CD137scFv中,将抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区连接的接头的种类和长度没有特别限定,本领域技术人员可以适当选择。作为接头,可以使用肽接头。优选的长度为5个氨基酸以上(上限没有特别限定,通常为30个氨基酸以下、优选为20个氨基酸以下),特别优选为15个氨基酸。作为接头,可以使用例如甘氨酸-丝氨酸接头(GS接头)、甘氨酸-赖氨酸-脯氨酸-甘氨酸-丝氨酸接头(GKPGS接头)。作为本发明中的接头,可列举例如以下接头。

[0169] Ser

[0170] Gly-Ser

[0171] Gly-Gly-Ser

[0172] Ser-Gly-Gly

[0173] Gly-Gly-Gly-Ser(序列号5)

[0174] Ser-Gly-Gly-Gly(序列号6)

[0175] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(序列号7)

[0176] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly(序列号8)

[0177] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(序列号9)

[0178] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly(序列号10)

[0179] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(序列号11)

[0180] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly(序列号12)

[0181] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(序列号13)

[0182] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) n

[0183] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly) n

[0184] Gly-Lys-Pro-Gly-Ser(序列号14)

[0185] (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser) n

[0186] 上述的 n 表示1以上的整数。另外,一个方式中,上述的 n 为1~10、2~8、或2~6。接头的长度、序列可由本领域技术人员根据目的适当选择。

[0187] 一个实施方式中,抗CD137scFv中使用的接头为(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) n 的GS接头。

[0188] 一个实施方式中,抗CD137scFv中使用的接头为(Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) 4 的GS接头。

[0189] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成的轻链可变区和由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成的重链可变区借助GS接头而连接的抗CD137scFv。

[0190] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成的抗CD137scFv。

[0191] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv。

[0192] 本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中,抗CLDN4抗体或其抗原结合片段与抗CD137抗体或其抗原结合片段(例如抗CD137scFv)可以用接头连接。一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv,抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv借助接头而连接。一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体含有抗CLDN4 IgG抗体和抗CD137scFv,抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于抗CLDN4 IgG抗体的重链羧基末端。将抗CLDN4抗体或其抗原结合片段与抗CD137抗体或其抗原结合片段连接的接头的种类和长度没有特别限定,本领域技术人员可以适当选择。作为接头,可以使用肽接头。优选的长度为5个氨基酸以上(上限没有特别限定,通常为30个氨基酸以下、优选为20个氨基酸以下),特别优选为10个氨基酸。作为肽接头,可以使用例如甘氨酸-丝氨酸接头(GS接头)、甘氨酸-赖氨酸-脯氨酸-甘氨酸-丝氨酸接头(GKPGS接头)。作为本发明中的接头,可列举例如以下接头。

[0193] Ser

[0194] Gly-Ser

[0195] Gly-Gly-Ser

[0196] Ser-Gly-Gly

[0197] Gly-Gly-Gly-Ser(序列号5)

[0198] Ser-Gly-Gly-Gly(序列号6)

[0199] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(序列号7)

[0200] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly(序列号8)

[0201] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(序列号9)

[0202] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly(序列号10)

[0203] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(序列号11)

[0204] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly(序列号12)

[0205] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser(序列号13)

[0206] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser) n

[0207] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly) n

[0208] Gly-Lys-Pro-Gly-Ser(序列号14)

[0209] (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser) n

[0210] 上述的 n 表示1以上的整数。另外,一个方式中,上述的 n 为1~10、2~8、或2~6。肽接头的长度、序列可由本领域技术人员根据目的适当选择。

[0211] 一个实施方式中,作为将抗CLDN4抗体又其抗原结合片段与抗CD137抗体或其抗原结合片段(例如抗CD137scFv)连接的肽接头使用的接头为由序列号13的氨基酸序列构成的接头。

[0212] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体为如下双特异性抗体:含有包含含有由序列号2的氨基酸编号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号99至112的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区的抗CLDN4抗体的重链、以及包含含有由序列号4的氨基酸编号24

至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的氨基酸编号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号4的氨基酸编号90至98的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗CLDN4抗体的轻链、以及抗CD137scFv,所述抗CD137scFv包含含有由序列号2的氨基酸编号625至629的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号644至659的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号692至701的氨基酸序列构成的CDR3的抗CD137抗体的重链可变区以及含有由序列号2的氨基酸编号486至498的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号514至520的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号553至563的氨基酸序列构成的CDR3的抗CD137抗体的轻链可变区,该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端。

[0213] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体为包含含有由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CLDN4抗体的重链和含有由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链可变区的抗CLDN4抗体的轻链以及含有由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的轻链可变区和由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的重链可变区的抗CD137scFv、并且该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端的双特异性抗体。

[0214] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体为含有由序列号2的氨基酸编号1至453的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的重链和由序列号4的氨基酸编号1至215的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链以及由序列号2的氨基酸编号464至712的氨基酸序列构成的抗CD137scFv、并且该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端的双特异性抗体。

[0215] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体为包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链的双特异性抗体。

[0216] 本说明书中,“翻译后修饰”是指在细胞内表达抗体时抗体在翻译后接受修饰。作为翻译后修饰的例子,可列举重链N末端的谷氨酰胺或谷氨酸的焦谷氨酰化、糖基化、氧化、脱酰胺化、糖化等修饰、重链C末端的赖氨酸被羧肽酶切断而导致的赖氨酸缺失。已知在各种抗体中发生这样的翻译后修饰(J.Pharm.Sci.,2008;Vol.97;p.2426-2447)。

[0217] 一个实施方式中,本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体可以经过了翻译后修饰。一个实施方式中,翻译后修饰为重链可变区N末端的焦谷氨酰化和/或重链C末端赖氨酸缺失。基于N末端的焦谷氨酰化或C末端赖氨酸缺失的翻译后修饰不影响抗体的活性,这是本领域中已知的(*Analytical Biochemistry*,2006;Vol.348;p.24-39)。

[0218] 本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与人CLDN4和人CD137结合。是否与人CLDN4和人CD137结合这一点可以使用公知的结合活性测定方法来确认。作为测定结合活性的方法,可列举例如酶联免疫吸附(ELISA)法、流式细胞术等方法。

[0219] 本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体可以由本领域技术人员使用本说明书中公开的抗CLDN4抗体和抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的序列信息等并使用本领域中公知的方法来制作。本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中,抗CLDN4抗体和抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区可以为人抗体来源、人源化抗体来源、或它们的组

合。在制作人源化抗体时,可以使用本领域技术人员公知的方法适当导入回复突变(Bioinformatics,2015:Vol.31:p.434-435)。本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体没有特别限定,例如可以按照PCT/JP2022/18350中记载的方法来制造。PCT/JP2022/18350中记载的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的制作方法(包括<本发明的双特异性抗体的多核苷酸>、<本发明的双特异性抗体的表达载体>、<本发明的宿主细胞>、<生产本发明的双特异性抗体的方法>和实施例,但是不限于此)通过参照而援引到本说明书中(Incorporation by Reference)。

[0220] <本发明的药物组合物>

[0221] 本发明的药物组合物使用本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体而制造,含有本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和药学上可接受的赋形剂。本发明的药物组合物可以使用本领域通常使用的赋形剂、即药剂用赋形剂、药剂用载体等利用通常使用的方法来进行制备。作为这些药物组合物的剂型的例子,可列举例如注射剂、点滴用剂等非经口剂,可以通过静脉内给药、皮下给药、腹腔内给药等进行给药。在制剂化时,可以以药学上可接受的范围使用与这些剂型对应的赋形剂、载体、添加剂等。另外,如上所述,本发明的药物组合物含有本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和药学上可接受的赋形剂,但是在一个实施方式中可以还含有PD-1信号抑制剂。

[0222] 本发明的药物组合物中可含有本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的翻译后修饰体。例如,含有接受了C末端赖氨酸缺失、N末端的焦谷氨酰化中的两者或一者的抗体等的药物组合物也包括在本发明中。

[0223] 一个实施方式中,本发明的药物组合物为含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和/或该双特异性抗体的翻译后修饰体的药物组合物,所述抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含含有由序列号2的氨基酸编号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号99至112的氨基酸序列构成的CDR3的抗CLDN4抗体的重链可变区、含有由序列号4的氨基酸编号24至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号4的氨基酸编号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号4的氨基酸编号90至98的氨基酸序列构成的CDR3的抗CLDN4抗体的轻链可变区、以及含有由序列号2的氨基酸编号625至629的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号644至659的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号692至701的氨基酸序列构成的CDR3的抗CD137抗体的重链可变区和含有由序列号2的氨基酸编号486至498的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号2的氨基酸编号514至520的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号2的氨基酸编号553至563的氨基酸序列构成的CDR3的抗CD137抗体的轻链可变区。

[0224] 一个实施方式中,本发明的药物组合物为含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和/或该双特异性抗体的翻译后修饰体的药物组合物,所述抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含含有由序列号2的氨基酸编号1至123的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CLDN4抗体的重链和含有由序列号4的氨基酸编号1至109的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CLDN4抗体的轻链以及含有由序列号2的氨基酸编号464至573的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的轻链可变区和由序列号2的氨基酸编号595至712的氨基酸序列构成的抗CD137抗体的重链可变区的抗CD137scFv,并且该抗CD137scFv的氨基末端借助接头连接于该抗CLDN4抗体的重链羧基末端。

[0225] 一个实施方式中,本发明的药物组合物为含有抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和/或该双特异性抗体的翻译后修饰体的药物组合物,所述抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体包含由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链。

[0226] 制剂化中的本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的添加量根据患者的症状的程度、年龄、所使用的制剂的剂型、或抗体的结合效价等而不同,例如以对人的给药量换算计可以在制剂中使用约0.0001mg/kg~约1000mg/kg的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体。一个实施方式中,制剂化中的本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的添加量以对人的给药量换算计为0.0001mg/kg~1000mg/kg的范围。一个实施方式中,制剂化中的本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的添加量以对人的给药量换算计为0.001mg/kg~100mg/kg的范围。一个实施方式中,制剂化中的本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的添加量以对人的给药量换算计为0.01mg/kg~10mg/kg的范围。一个实施方式中,制剂化中的本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的添加量以对人的给药量换算计优选为0.01mg/kg~10mg/kg的范围。

[0227] <PD-1信号抑制剂>

[0228] 本发明中,PD-1信号抑制剂为了治疗对象的癌症而与本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体或本发明的药物组合物组合使用。

[0229] 只要可阻断PD-1信号,则该PD-1信号抑制剂的作用机制和治疗方式没有特别限定。作为作用机制,例如可以是抑制与PD-1信号相关的分子间的结合、降低PD-1信号分子的表达量(例如抑制蛋白质的生成或诱导蛋白质的分解等)等作用机制。作为治疗方式,例如可以为抗体、低分子化合物、核酸(可以包括DNA或RNA、天然或人工的核酸)、融合蛋白、肽、其它治疗方式。

[0230] PD-1信号抑制剂可以利用测定PD-1与选自由PD-L1或PD-L2组成的组中的1种以上蛋白质的结合抑制作用、以PD-1信号分子的表达量等为指标的表达下降作用等的方法来获得。例如,就PD-1与PD-L1或PD-L2的结合抑制剂而言,可以在得到与PD-1和PD-L1或PD-L2结合的抑制剂后,通过抑制PD-1与PD-L1或PD-L2的结合的能力对得到的抑制剂进行筛选。抑制剂与蛋白质的结合例如可以使用流式细胞术法(FCM)、ELISA法、表面等离子共振法(SPR)、热迁移分析法(TSA)、等温滴定量热法(ITC)等本领域技术人员公知的方法来评价。另外,使例如PD-1、PD-L1或PD-L2等PD-1信号分子的表达量下降的抑制剂可以以细胞中的PD-1、PD-L1或PD-L2等蛋白质量为指标来获得。PD-1信号的抑制作用可以通过T细胞增殖IFN- γ 释放或报告基因分析等作用来确认。使某种蛋白质的表达量下降的抑制剂的作用例如可以使用ELISA法、定量PCR法、原位杂交法、活细胞成像法等本领域技术人员公知的方法来确认。

[0231] 作为PD-1信号抑制剂,可列举例如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体等抑制PD-1信号的抗体。这样的抗体可以为入源化抗体、嵌合抗体、小鼠抗体、人抗体以及这些的抗原结合片段。作为公知的抗PD-1抗体,没有限定,例如有美国专利第8008449号、美国专利第6808710号、美国专利第7488802号、美国专利第8168757号和美国专利第8354509号以及国际公开第2006/121168号和国际公开第2012/145493号中记载的抗体。作为公知的抗PD-L1抗体,没有限定,例如有国际公开第2007/005874号、国际公开第2010/077634号、国际公

开第2011/066389号、国际公开第2013/079174号和美国专利第8217149号中记载的抗体。一个实施方式中,本发明中使用的PD-1信号抑制剂的抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或抗PD-L2抗体、或者这些的抗原结合片段。一个实施方式中,本发明中使用的PD-1信号抑制剂的抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或抗PD-L2抗体。一个实施方式中,抗PD-1抗体可以为纳武利尤单抗、帕博利珠单抗、匹地利珠单抗、斯巴达珠单抗、西米普利单抗等抗PD-1抗体。一个实施方式中,抗PD-L1抗体可以为阿替利珠单抗、度伐利尤单抗、阿维鲁单抗等抗PD-L1抗体。

[0232] 作为PD-1信号抑制剂,还可列举例如AMP-224 (国际公开第2010/027827号和国际公开第2011/066342号)、BMS-1166 (Oncotarget、2017:Vol.8:p.72167-72181) 等抑制PD-1与PD-L1的结合的融合蛋白、低分子化合物。各种PD-1信号抑制剂是本技术领域中公知的(非专利文献8)。

[0233] <本发明的治疗方法>

[0234] 本发明的治疗方法是包括将本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂给药于对象的步骤的癌症治疗方法(称为“本发明的治疗方法”)。

[0235] 一个实施方式中,本发明的治疗方法的特征在于,将本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与PD-1信号抑制剂同时地、连续地或逐次地组合使用(给药)于对象。

[0236] 一个实施方式中,本发明的治疗方法的特征在于,(i)本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于同一药物组合物,同时给药于对象;或(ii)本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂为不同的药物组合物,同时地、连续地或逐次地组合使用于对象。

[0237] 一个实施方式中,本发明的治疗方法的特征在于,(i)本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂包含于同一药物组合物,同时给药于对象;或(ii)本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂为不同的药物组合物,同一天给药于对象。

[0238] 一个实施方式中,本发明的治疗方法的特征在于,为(a)在本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的给药结束后对对象开始PD-1信号抑制剂的给药、或(b)在PD-1信号抑制剂的给药结束后对对象开始本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的给药的连续使用。

[0239] 一个实施方式中,本发明的治疗方法的特征在于,为按照包括给药周期在内的给药计划对对象进行本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和PD-1信号抑制剂的给药的逐次使用。一个实施方式中,本发明的治疗方法的特征在于,在至少1个给药周期或全部给药周期内,对对象开始抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体或本发明的药物组合物的给药,之后开始PD-1信号抑制剂的给药。一个实施方式中,本发明的治疗方法的特征在于,在至少1个给药周期或全部给药周期内,对对象开始PD-1信号抑制剂的给药,之后开始抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体或本发明的药物组合物的给药。

[0240] <治疗用途>

[0241] 利用本发明的药物组合物和治疗方法等治疗的癌症可以为实体癌或血液癌中的任一种。利用本发明治疗的癌症可以为原发性或转移性中的任一种。利用本发明治疗的癌症没有特别限定,可列举例如各种腹膜播散癌、胃癌、肺癌、急性淋巴瘤细胞系白血病、急性髓系白血病、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、T细胞淋巴瘤等

血液癌；骨髓异常增生综合征、腺癌、鳞状上皮癌、腺鳞癌、未分化癌、大细胞癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、间皮瘤、皮肤癌、皮肤T细胞淋巴瘤、乳腺癌、前列腺癌、膀胱癌、阴道癌、颈癌、头颈癌、子宫癌、宫颈癌、肝癌、胆囊癌、胆管癌、肾癌、胰腺癌、结肠癌、大肠癌、直肠癌、小肠癌、胃癌、食道癌、睾丸癌、卵巢癌、脑瘤等实体癌；以及，骨组织、软骨组织、脂肪组织、肌肉组织、血管组织和造血组织的癌症和软骨肉瘤、尤因肉瘤、恶性血管内皮瘤、恶性施万瘤、骨肉瘤、软组织肉瘤等肉瘤；胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、肝母细胞瘤、髓母细胞瘤、肾母细胞瘤、神经母细胞瘤、胰腺母细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、视网膜母细胞瘤等母细胞瘤等。

[0242] 一个实施方式中，成为本发明的治疗对象的癌症为大肠癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌。一个实施方式中，成为本发明的治疗对象的癌症为与正常组织相比高表达CLDN4的癌症。成为本发明的治疗对象的癌症优选为与正常组织相比高表达CLDN4的癌症或选自大肠癌、直肠癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、乳腺癌、前列腺癌组成的组中的癌症。

[0243] 本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体或PD-1信号抑制剂对对象的给药量根据对象的症状的程度、年龄、所使用的抗体、药物组合物、抑制剂等的剂型或有效成分的活性强度等而不同，例如，可以使用约0.0001mg/kg～约1000mg/kg。一个实施方式中，本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体对对象的给药量为0.0001mg/kg～1000mg/kg。一个实施方式中，本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体对对象的给药量为0.001mg/kg～100mg/kg。一个实施方式中，本发明的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体对对象的给药量为0.01mg/kg～10mg/kg。

[0244] 在此提供用于参照以进一步理解本发明的特定的实施例，但是这些以例示为目的，并非对本发明进行限定。

[0245] 实施例

[0246] [实施例1:抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的制作]

[0247] [实施例1-1:编码抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的载体的制作]

[0248] 据报道，作为抗CLDN4抗体的KM3900相较于其它作为紧密连接蛋白家族分子的CLDN6等而言选择性地与CLDN4结合(专利文献1)。在此基于报道而制作KM3900的人源化抗体。

[0249] 具体而言，基于KM3900的可变区的人源化氨基酸序列，根据人Ig γ 1的恒定区和人Ig κ 的恒定区的序列设计了人源化抗体。在人Ig γ 1恒定区中导入L234A、L235A和P331G的氨基酸突变，设计抗CLDN4抗体序列。将所设计的人源化抗CLDN4抗体称为“hKM3900”。

[0250] 对AlivaMab小鼠(Ablexis公司、美国专利9346873号)给药多次PCT/JP2022/18350的实施例3中记载的人CD137-人Fc融合蛋白和免疫佐剂而进行了免疫。按照常规方法从免疫后的小鼠的淋巴结回收淋巴细胞，与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0进行细胞融合，由此制作杂交瘤。使用自动挑选装置单离杂交瘤的单个集落，获得单克隆化杂交瘤细胞(以下称为“克隆”)。筛选产生与人CD137结合的抗体的克隆，获得产生抗CD137抗体(以下称为“A2-32”)的克隆。进一步由该克隆的细胞溶解液合成cDNA，鉴定抗体碱基序列。基于获得的A2-32的重链可变区和轻链可变区的序列设计抗CD137scFv。

[0251] 基于hKM3900的氨基酸序列和设计的抗CD137scFv的氨基酸序列，设计抗CLDN4-抗

CD137双特异性抗体。抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体中,在IgG1型的hKM3900的重链C末端连接有GS接头,在GS接头的C末端结合有抗CD137scFv的N末端。设计的抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体由由序列号2的氨基酸序列构成的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽、以及由序列号4的氨基酸序列构成的抗CLDN4抗体的轻链构成。制作编码所设计的含有抗CLDN4抗体的重链和抗CD137scFv的多肽的多核苷酸和编码抗CLDN4抗体的轻链的多核苷酸,分别按照常规方法插入到pcDNA3.4 TOPO载体(Thermo Fisher Scientific公司)中。将制作的2个载体称为“抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体表达载体”。

[0252] [实施例1-2:抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的制作]

[0253] 使用抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体表达载体制作抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体。具体而言,使用ExpiFectamine CHO转染试剂盒(Thermo Fisher Scientific公司、A29129)将抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体表达载体导入到ExpiCHO-S细胞(Thermo Fisher Scientific公司、A29127)中,使抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体分泌到培养上清中。从得到的培养上清中,利用使用MabSelect SuRe(Cytiva公司、17-5438-02)的亲纯化法、以及使用HiLoad 26/600 superdex 200 pg(GE医疗公司、28-9893-36)的尺寸排阻层析纯化法纯化作为抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的hKM3900__tA2-32LH。

[0254] 有时也将实施例1中制作的作为抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体的hKM3900__tA2-32LH称为“抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体”。

[0255] [实施例2:抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗PD-1抗体的体外联用效果]

[0256] 在使用表达人OKT3scFv的LCLC-103H细胞和扩增PanT细胞的共培养体系中,研究抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗PD-1抗体的体外联用效果。

[0257] [实施例2-1:扩增PanT细胞的制备]

[0258] 将在RPMI-1640(Sigma公司、R8758)中添加了终浓度10%的FBS(Cytiva公司、SH30084.03)和终浓度1%的青霉素链霉素(Thermo Fisher Scientific公司、15070-063)的培养基称为“培养用培养基”。以终浓度1 μ g/mL的方式将抗CD3抗体(BioLegend公司、317325)添加于150mm/组织培养皿(Tissue Culture Dish)(IWAKI公司、3030-150)(以下称为“培养皿”)中,将抗CD3抗体固相化。使用人PanT细胞分离试剂盒(PanT Cell Isolation Kit,human)(Miltenyi Biotec公司、130-096-535),按照厂商推荐的规程从人外周血单核细胞(human peripheral blood mononuclear cells)(LONZA公司、CC-2702)中单离PanT细胞(含有CD4阳性T细胞和CD8阳性T细胞这两者,以下称为“PanT细胞”)。对单离出的PanT细胞进行离心分离并除去上清后,悬浮于培养用培养基中。将悬浮于培养用培养基中的PanT细胞全部接种于上述的抗CD3抗体固相化后的培养皿。再添加终浓度200U/mL的人IL-2(PeproTech公司、200-2)和终浓度4 μ g/mL的抗CD28抗体(BioLegend公司、302934),在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中进行培养。在培养开始起3天后回收PanT细胞,将回收的PanT细胞悬浮于培养用培养基中,接种于培养皿。再添加终浓度200U/mL的人IL-2,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中进行培养。4天后回收全部PanT细胞,离心分离,除去上清后重新悬浮于Cell Banker(Takara公司、CB011)中,分取到管中,在-80 $^{\circ}$ C下冷冻保存。本说明书中,将这里冷冻保存的PanT细胞称为“扩增PanT细胞”。

[0259] [实施例2-2:表达人CD3抗体单链可变区片段(OKT3scFv)的LCLC-103H细胞的获得]

[0260] 表达人CLDN4的人大细胞肺癌细胞株LCLC-103H细胞从德国微生物菌种保藏中心(Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, DSMZ, ACC384)获得。将人大细胞肺癌细胞株的LCLC-103H细胞在培养用培养基中在37°C、5%CO₂的条件下进行培养。将按照常规方法通过基因合成而制作的编码人OKT3scFv(Journal of Immunological Methods, 2010; 362: p. 131-141)的多核苷酸亚克隆至pcDNA3.4-TOPO载体。将制作的人OKT3scFv表达载体用LipofectamineLTX(Invitrogen, 15338-100)按照厂商推荐的规程向LCLC-103H细胞中进行脂质体转染。通过利用添加了终浓度600μg/mL的遗传霉素选择性抗生素(Geneticin Selective Antibiotic)(Thermo Fisher Scientific公司, 10131-027)的培养用培养基的选择培养和有限稀释法, 获得稳定表达人OKT3scFv的LCLC-103H细胞克隆(以下称为“LCLC-OKT3scFv细胞”)。

[0261] [实施例2-3: 在癌细胞与T细胞的共培养体系中抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗PD-1抗体的在体外干扰素-γ产生促进作用中的联用效果]

[0262] 利用LCLC-OKT3scFv细胞与扩增PanT细胞的共培养体系, 以干扰素γ产生促进功能为指标评价了抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗PD-1抗体的T细胞活性增强作用。将LCLC-OKT3scFv细胞利用培养用培养基制备成 2×10^5 个/mL, 在平底96孔板(IWAKI公司, 4020-010)中各接种50μL, 在37°C、5% CO₂培养箱中进行培养。次日, 将利用培养用培养基制备成 1.32×10^6 个/mL的扩增PanT细胞在培养中的平底96孔板中各接种30μL。作为受试抗体, 使用实施例1中获得的hKM3900__tA2-32LH和作为抗人PD-1抗体的纳武利尤单抗。纳武利尤单抗的氨基酸序列设计基于国际公开第2014/055648号中记载的纳武利尤单抗的重链和轻链的氨基酸序列而进行。根据所设计的氨基酸序列, 按照国际公开第2021/241616号的实施例11中记载的方法获得纳武利尤单抗。作为同种型对照(图1-1中称为“同种型”), 制备并使用抗溶菌酶抗体。作为单剂条件, 添加用培养用培养基从最高浓度50000ng/mL起以约3倍公比进行了连续稀释的hKM3900__tA2-32LH、或用培养用培养基从最高浓度50000ng/mL起以约3倍公比进行了连续稀释的纳武利尤单抗。另外, 作为联用条件, 添加用含有浓度50000ng/mL的纳武利尤单抗的培养用培养基从最高浓度50000ng/mL起以约3倍公比进行了连续稀释的hKM3900__tA2-32LH各20μL。添加后的纳武利尤单抗的最终浓度为10μg/mL。添加后, 通过37°C、5% CO₂培养箱培养来进行培养。4天后, 使用AlphaLISA 干扰素-γ测定试剂盒(Perkin Elmer公司, AL217C)按照厂商推荐的规程测定培养上清中的干扰素-γ产生量。图1-1示出干扰素-γ产生量。对于各条件, 计算平均值和标准偏差。hKM3900__tA2-32LH和纳武利尤单抗在表达人CLDN4的癌细胞株与扩增PanT细胞的共培养体系中显示出干扰素-γ产生促进作用。hKM3900__tA2-32LH与纳武利尤单抗的联用所带来的干扰素-γ产生促进作用比hKM3900__tA2-32LH或纳武利尤单抗单剂强。

[0263] [实施例3: 抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗PD-L1抗体的体外联用效果]

[0264] 基于国际公开第2012/155019号(序列号22和23)中记载的作为抗PD-L1抗体的阿替利珠单抗抗体的序列, 设计在Fc区中引入了突变的使用人Igγ1恒定区序列的作为抗PD-L1抗体的阿替利珠单抗类似物(以下称为“阿替利珠单抗类似物”), 按照PCT/JP2022/18350的实施例4-2中记载的方法获得抗体。在实施例2中获得的LCLC-OKT3scFv细胞与扩增panT细胞的共培养体系中, 研究hKM3900__tA2-32LH和阿替利珠单抗类似物的体外联用效果。具体而言, 利用LCLC-OKT3scFv细胞与扩增PanT细胞的共培养体系, 以干扰素γ产生量

为指标评价hKM3900__tA2-32LH和阿替利珠单抗类似物的T细胞活性增强作用。将LCLC-OKT3scFv细胞用培养用培养基制备成 2×10^5 个/mL,在平底96孔板中各接种50 μ L,在37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱中进行培养。次日,将用培养用培养基制备成 1.33×10^6 个/mL的扩增PanT细胞向培养中的平底96孔板各接种30 μ L。作为受试抗体,使用实施例1中获得的hKM3900__tA2-32LH和阿替利珠单抗类似物。作为同种型对照(图1-2中称为“同种型”),制备并使用抗溶菌酶抗体。作为单剂条件,向培养用培养基中添加从最高浓度50000ng/mL起以约3倍公比进行了连续稀释的hKM3900__tA2-32LH或向培养用培养基中添加从最高浓度50000ng/mL起以约3倍公比进行了连续稀释的阿替利珠单抗类似物。另外,作为联用条件,向含有浓度50000ng/mL的阿替利珠单抗类似物的培养用培养基中,各添加20 μ L从最高浓度50000ng/mL起以约3倍公比进行了连续稀释的hKM3900__tA2-32LH。添加后的阿替利珠单抗类似物的最终浓度为10 μ g/mL。添加后,通过37 $^{\circ}$ C、5% CO₂培养箱培养进行培养。5天后,使用AlphaLISA干扰素- γ 测定试剂盒(Perkin Elmer公司、AL217C),按照厂商推荐的规程测定培养上清中的干扰素- γ 产生量。图1-2示出干扰素- γ 产生量。对于各条件,计算平均值和标准偏差。hKM3900__tA2-32LH和阿替利珠单抗类似物在表达人CLDN4的癌细胞株与扩增PanT细胞的共培养体系中显示出干扰素- γ 产生促进作用。hKM3900__tA2-32LH与阿替利珠单抗类似物的联用所带来的干扰素- γ 产生促进作用比hKM3900__tA2-32LH或阿替利珠单抗类似物的单剂更强。

[0265] [实施例4:抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗小鼠PD-1抗体的体内联用效果]

[0266] 使用移植了表达人CLDN4的B16-F10细胞的B-h4-1BB小鼠(人CD137敲入小鼠),研究抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体和抗人PD-1抗体的体内抗肿瘤效果。

[0267] [实施例4-1:表达人CLDN4的B16-F10细胞的构建]

[0268] 小鼠黑素瘤细胞株B16-F10细胞从美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection、ATCC、CRL-6475)获得。在添加了终浓度10%灭活胎牛血清(FBS)(Cytiva公司、SH30084.03)的杜尔贝科改良伊戈尔培养基(SIGMA公司、D6429)(以下将制备后的培养基称为“伊戈尔培养用培养基”)中在37 $^{\circ}$ C、5%CO₂的条件下进行培养。使用jetPRIME(Polyplus-transfection、114-15),将CLDN4(Myc-DDK-tagged)-Human claudin 4 (CLDN4)(ORIGENE公司、RC200490)导入到B16-F10细胞中。利用添加了终浓度1mg/mL的G418(Nacalai Tesque公司、09380-44)的伊戈尔培养用培养基进行选择,由此获得稳定表达人CLDN4的B16-F10细胞克隆(以下称为“表达人CLDN4的B16-F10细胞”)。

[0269] [实施例4-2:抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗小鼠PD-1抗体的体内抗肿瘤作用中的联用效果]

[0270] 获得B-h4-1BB雄性小鼠(C57BL/6-Tnfrsf9^{tm1(Tnfrsf9)}/Bcgen;Biocytogen公司、110004)(以下称为“小鼠”),使其繁殖。将表达人CLDN4的B16-F10细胞悬浮于PBS(-)(WAKO公司、045-29795)中,制备 4×10^6 个/mL的细胞悬浮液。在6周龄小鼠的背部皮下各接种 2×10^5 个细胞/50 μ L的细胞悬浮液。在细胞接种3天后,使用游标卡尺(三丰公司、CD-15AXR)测定肿瘤直径。使用下式计算肿瘤体积[mm³]。

[0271] [肿瘤体积(mm³)] = [肿瘤的长径(mm)] \times [肿瘤的短径(mm)]² \times 0.5

[0272] 以各组的肿瘤体积大致均等的方式将接种了细胞的小鼠分组(n=10),开始给药受试抗体。将首次给药日定义为第0天。作为受试抗体,使用实施例1中获得的作为抗CLDN4-

抗CD137双特异性抗体的hKM3900__tA2-32LH、作为抗PD-1抗体的抗小鼠PD-1抗体(Bio X Cell、BE0146)。作为hKM3900__tA2-32LH的同种型对照抗体,使用抗溶菌酶抗体,作为抗小鼠PD-1抗体的同种型对照抗体,使用大鼠IgG2a同种型对照抗体(Bio X Cell、BE0089)(图2中称为“对照”)。将对进行试验的4组给药的受试抗体、给药量、给药日程等细节示于以下。

[0273] (1) 组1:对照组

[0274] 在第0天和第7天以0.3mg/kg腹腔内给药抗溶菌酶抗体,在第0、4、7、11天以100 μ g/只腹腔内给药大鼠IgG2a同种型对照抗体。

[0275] (2) 组2:hKM3900__tA2-32LH给药组

[0276] 在第0天和第7天以0.3mg/kg腹腔内给药hKM3900__tA2-32LH,在第0、4、7、11天以100 μ g/只腹腔内给药大鼠IgG2a同种型对照抗体。

[0277] (3) 组3:抗小鼠PD-1抗体给药组

[0278] 在第0天和第7天以0.3mg/kg腹腔内给药抗溶菌酶抗体,在第0、4、7、11天以100 μ g/只腹腔内给药抗小鼠PD-1抗体。

[0279] (4) 组4:hKM3900__tA2-32LH和抗小鼠PD-1抗体的联用给药组

[0280] 在第0天和第7天以0.3mg/kg腹腔内给药hKM3900__tA2-32LH,在第0、4、7、11天以100 μ g/只腹腔内给药抗小鼠PD-1抗体。

[0281] 评价各组的第4、7、11、14天的肿瘤体积。将组2和组3的第14天的肿瘤体积与组4的第14天的肿瘤体积通过非配对学生t检验进行比较(图2)。

[0282] 如图2所示,hKM3900__tA2-32LH与抗小鼠PD-1抗体的联用组的肿瘤体积显著小于hKM3900__tA2-32LH单独给药组和抗小鼠PD-1抗体单独给药组的肿瘤体积。该结果表明,在人类癌症的治疗中,抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与抗PD-1抗体的联用有可能得到比各自的单独给药更高的抗肿瘤效果。

[0283] 产业上的可利用性

[0284] 本发明的基于抗CLDN4-抗CD137双特异性抗体与PD-1信号抑制剂的联用的癌症治疗方法可期待在癌症治疗中 useful。

[0285] 序列表自由文本

[0286] 序列号2为hKM3900__tA2-32LH HC的氨基酸序列,序列号1所示的碱基序列为编码序列号2所示的hKM3900__tA2-32LH重链的氨基酸序列的碱基序列。序列号4为hKM3900 LC的氨基酸序列,序列号3所示的碱基序列为编码序列号4所示的hKM3900轻链的氨基酸序列的碱基序列。序列号5~14为发明的详细说明中记载的各种接头的氨基酸序列。

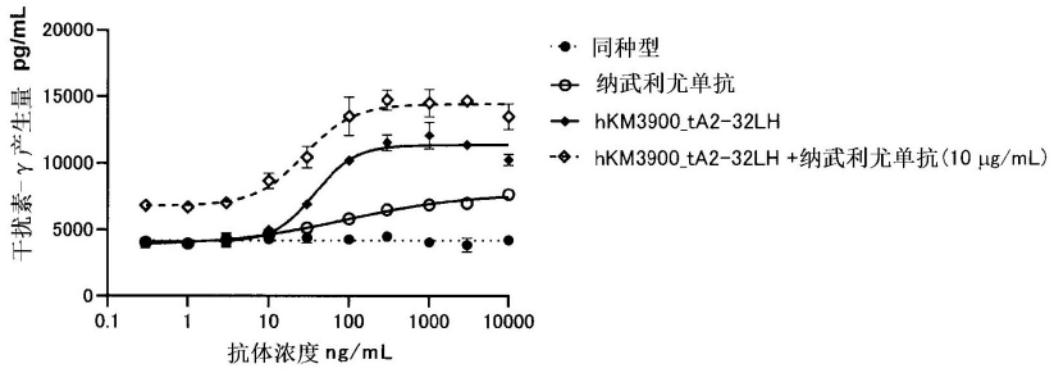


图1-1

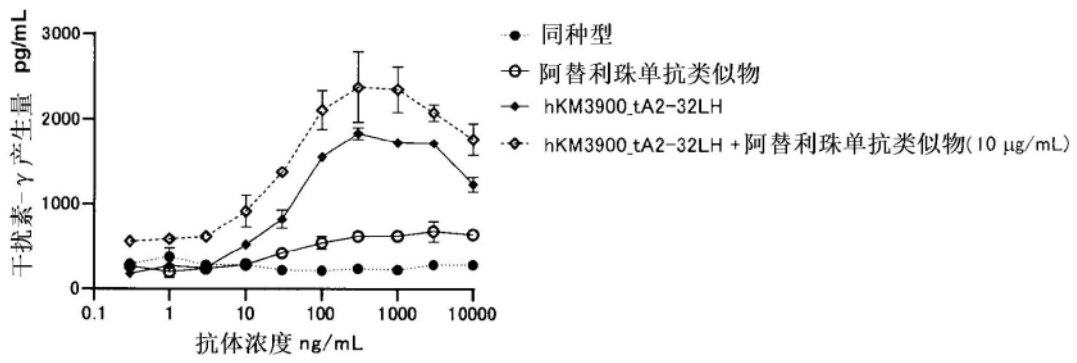


图1-2

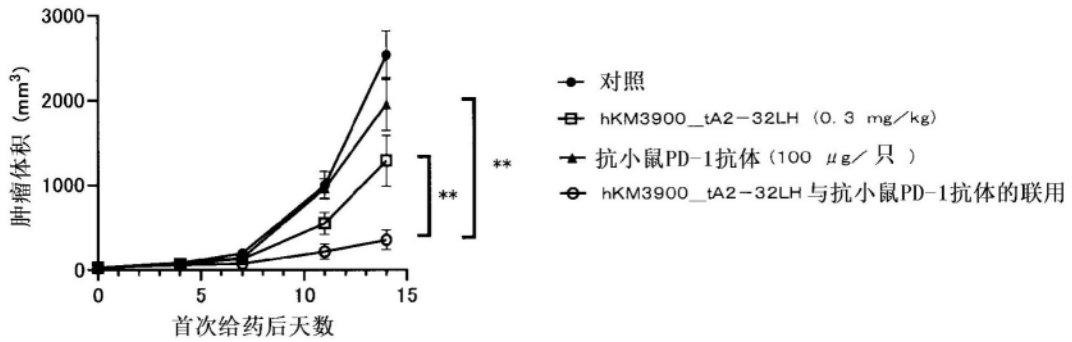


图2