



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119173633 A

(43) 申请公布日 2024. 12. 20

(21) 申请号 202380039614.8

(22) 申请日 2023.05.11

(30) 优先权数据

2022-078632 2022.05.12 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.11.11

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2023/017663 2023.05.11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/219121 JA 2023.11.16

(71) 申请人 安斯泰来制药株式会社

地址 日本

(72) 发明人 曾我真司 八木繁典 佐竹佳树

本田贵史 佐藤雅人 茶圆贵志

(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.

C12N 15/13 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 1/15 (2006.01)

C12N 1/19 (2006.01)

C12N 1/21 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C12N 15/63 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

权利要求书5页 说明书64页

序列表 (电子公布) 附图12页

(54) 发明名称

抗TAA-抗CD3多特异性抗体

(57) 摘要

本发明的课题在于,提供能够用于人类的治疗的抗TAA-抗CD3多特异性抗体。本发明人们为了制作以各种肿瘤相关抗原(TAA)为靶点的抗TAA-抗CD3多特异性抗体,利用抗CD3scFv的公知信息和本公司的蛋白质结构信息分析的技术获得了对多样的CD3具有亲和性且稳定性提高的16种抗CD3scFv。进而,制作了与TSPAN8、CD37等多种抗TAA抗体组合而成的多特异性抗体,确认所获得的多特异性抗体维持了对CD3的多样的结合活性和稳定性,因此,所获得的16种抗CD3scFv可以用于制作针对任意的TAA的抗TAA-抗CD3多特异性抗体。

1. 一种多特异性抗体,其含有与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗TAA抗体的重链可变区和轻链可变区以及含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区,其中,抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

- (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (4) 由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (5) 由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (6) 由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (7) 由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (8) 由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (9) 由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (10) 由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (11) 由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (12) 由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (13) 由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (14) 由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (15) 由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;或
- (16) 由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区。

2. 根据权利要求1所述的多特异性抗体,其中,多特异性抗体为由以下的(a)~(c)的结构构成的双特异性抗体:

(a) 由含有抗TAA抗体的重链可变区的重链片段和含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链构成的抗TAA抗体的Fab区;

(b) 含有抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区;以及

(c) 由与(a)的Fab区的重链片段连接的第一Fc多肽和与(b)的抗CD3scFv区连接的第二Fc多肽构成的Fc区。

3. 根据权利要求2所述的多特异性抗体,其中,Fc区含有杵臼结构突变或LALA突变(L234A和L235A)(在此,所述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置)。

4. 根据权利要求2所述的多特异性抗体,其中,Fc区含有杵臼结构突变和LALA突变。

5. 根据权利要求2~4中任一项所述的多特异性抗体,其中,Fc区含有P329A突变和/或P331G突变(在此,所述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置)。

6. 根据权利要求2~5中任一项所述的多特异性抗体,其中,抗TAA抗体的Fab区的重链片段与第一Fc多肽借助铰链区而连接,抗CD3scFv区与第二Fc多肽借助铰链区而连接。

7. 根据权利要求6所述的多特异性抗体,其中,连接抗CD3scFv区与第二Fc多肽的铰链区含有C220S突变(在此,所述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置)。

8. 根据权利要求6所述的多特异性抗体,其中,Fc区含有杵臼结构突变、LALA突变以及P329A和/或P331G突变,连接抗CD3scFv区与第二Fc多肽的铰链区含有C220S突变(在此,所述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置)。

9. 一种多特异性抗体,其为抗TAA-抗CD3双特异性抗体,所述抗TAA-抗CD3双特异性抗

体含有在含有与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的抗TAA抗体的重链可变区的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗TAA抗体的重链、含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链和含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽,其中,抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

- (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (4) 由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (5) 由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (6) 由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (7) 由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (8) 由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (9) 由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (10) 由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (11) 由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (12) 由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (13) 由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (14) 由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (15) 由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;或
- (16) 由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区。

10. 一种多特异性抗体,其为在权利要求2~9中任一项所述的多特异性抗体上进一步添加含有与CD137结合的抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137scFv区而成的三特异性抗体,其中,抗CD137scFv区为以下的(a)~(e)中的任一者:

- (a) 由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- (b) 由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- (c) 由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- (d) 由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;或
- (e) 由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区。

11. 根据权利要求10所述的多特异性抗体,其中,抗CD137scFv区连接于第一Fc多肽和第二Fc多肽的羧基末端中的任一者或两者。

12. 一种多特异性抗体,其为抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体,所述抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体含有在含有与肿瘤相关抗原 (TAA) 结合的抗TAA抗体的重链可变区的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗TAA抗体的重链、含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链和含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽,进一步在第一Fc多肽和第二Fc多肽的羧基末端中的任一者或两者上连接有含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137scFv区,其中,

抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

- (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

- (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (4) 由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (5) 由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (6) 由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (7) 由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (8) 由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (9) 由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (10) 由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (11) 由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (12) 由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (13) 由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (14) 由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- (15) 由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;或
- (16) 由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

抗CD137scFv区为以下的(a)~(e)中的任一者:

- (a) 由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- (b) 由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- (c) 由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- (d) 由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;或
- (e) 由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区。

13. 根据权利要求1~12中任一项所述的多特异性抗体,其中,抗TAA抗体为与以下的任一TAA结合的抗TAA抗体:

HER2、HER3、HER4、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD40、CD44、CD70、CD123、CD138、CXCR3、CXCR5、CCR3、CCR4、CCR9、CRTH2、PMCH、CD4、CD25、CD200、内质素、BCMA、CD276、TSPAN8、CLDN4、CLDN6、CLDN18.2、ENPP3、SLC34A2、TROP2、MerTK、结合素-4、ASGR1、间皮素、PSMA、LIV-1、MUC1、MUC2、MUC4、MUC16、CDH6、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7、CEACAM16、CEACAM18、CEACAM19、CEACAM20、CEACAM21、URLC10、NY-ESO-1、GAA、OFA、细胞周期蛋白B1、WT-1、CEF、VEGRR1、VEGFR2、TTK、HPV16、HPV16E7、HPV18、CEA910、KOC1、SL-701、MART-1、gp100、酪氨酸酶、存活蛋白、MAGE-3.1、MAGE-10.A2、OVA BiP、gp209-2M、melan-A、NA17.A2、KOC1、C016、DEPDC1、MPHOSPH1、MAGE12、ONT-10、GD2L、GD3L、URLC10、CDCA1、TF、PSA、TERT、STF-II、G17DT、ICT-107、Dex2、hTERT、PAP、TRP2、LRRC15、c-Met、PD-L1、FAP、EGFR、B3-H3、GPC3、5T4。

14. 根据权利要求1~13中任一项所述的多特异性抗体,其经过了翻译后修饰。

15. 根据权利要求14所述的多特异性抗体,其中,翻译后修饰为重链可变区氨基末端的焦谷氨酰化和/或重链羧基末端赖氨酸缺失。

16. 一种多核苷酸,其用于生产权利要求1~15中任一项所述的多特异性抗体,所述多核苷酸选自由下述(1)~(16)组成的组:

(1) 含有编码由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(2) 含有编码由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(3) 含有编码由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(4) 含有编码由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(5) 含有编码由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(6) 含有编码由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(7) 含有编码由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(8) 含有编码由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(9) 含有编码由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(10) 含有编码由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(11) 含有编码由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(12) 含有编码由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(13) 含有编码由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(14) 含有编码由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(15) 含有编码由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;或

(16) 含有编码由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸。

17. 一种多核苷酸,其用于生产权利要求10~15中任一项所述的多特异性抗体,所述多核苷酸选自下述(a)~(e)组成的组:

(a) 含有编码由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(b) 含有编码由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(c) 含有编码由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸;

(d) 含有编码由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱

基序列的多核苷酸;或

(e) 含有编码由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸。

18. 一种表达载体,其含有权利要求16或17所述的多核苷酸。

19. 一种宿主细胞,其含有权利要求16或17所述的多核苷酸或者权利要求18所述的表达载体。

20. 一种生产方法,其包括培养权利要求19所述的宿主细胞的步骤。

21. 一种药物组合物,其含有权利要求1~15中任一项所述的多特异性抗体和药学上可接受的赋形剂。

22. 根据权利要求1~15中任一项所述的多特异性抗体,其用于治疗癌症。

23. 根据权利要求21所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

24. 一种治疗癌症的方法,其包括将治疗有效量的权利要求1~15中任一项所述的多特异性抗体给药于对象的步骤。

25. 权利要求1~15中任一项所述的多特异性抗体在制造用于治疗癌症的药物组合物中的应用。

抗TAA-抗CD3多特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及作为用于人类的治疗的药物组合物的有效成分有用的抗TAA-抗CD3多特异性抗体。

背景技术

[0002] 分化抗原群3(Cluster of Differentiation 3;CD3)是通过在T细胞表面与T细胞受体形成复合体而向T细胞传递活化信号的蛋白质。CD3是由伽马(γ)、德尔塔(δ)、伊普西龙(ϵ)、捷塔(ζ)和伊塔(η)链这五种亚基构成的复合体,各亚基形成 $\epsilon\gamma$ 、 $\epsilon\delta$ 、 $\zeta\zeta$ 这3种二聚体。CD3的表达是T细胞特异性的,在T细胞的分化的所有阶段都有表达。另外,由于在正常T细胞和肿瘤T细胞中均表达,因此被广泛用作T细胞的标志物(非专利文献1)。

[0003] 分化抗原群137(Cluster of Differentiation 137;CD137、别名4-1BB)是属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的分子,据报道在T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、树突状细胞、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,作为共刺激分子参与T细胞的活化和存活(非专利文献2)。

[0004] 作为利用生物体内的免疫系统的新的癌症治疗方法,正在进行双特异性T细胞募集抗体(bispecific T-cell-recruiting antibodies)的开发。双特异性T细胞募集抗体最常见的形式是通过同时与在癌细胞上表达的肿瘤相关抗原(Tumor Associated Antigen; TAA)和在T细胞上表达的CD3结合,在物理上拉近T细胞与癌细胞的距离,同时向T细胞输入CD3介导的活化信号,由此诱导T细胞对癌细胞的细胞毒作用。以CD3和CD19(Cluster of Differentiation 19)为靶抗原的贝林妥欧单抗(blinatumomab)已经在实际临床中用于治疗复发或难治性的急性淋巴细胞白血病(Acute Lymphoblastic Leukemia;ALL),观察到优良的治疗效果。另外,近年来,还开发了与癌细胞上表达的TAA和T细胞上表达的CD137这两者结合的双特异性T细胞募集抗体(非专利文献3)。已知各种TAA作为双特异性T细胞募集抗体的靶点,例如,正在研究开发以CD33、BCMA、PSMA、EGFRvIII等TAA为靶点的双特异性T细胞募集抗体来作为各种癌症的治疗药(非专利文献4)。

[0005] 已知双特异性T细胞募集抗体的生理活性受抗体形式、作为靶点的TAA的表达量、抗体所识别的TAA上的表位、对TAA和CD3的亲合性、体内动力学等各种因素影响,为了开发兼顾有效性和安全性的双特异性T细胞募集抗体,认为需要适当控制这些因素(非专利文献5)。关于安全性,作为双特异性T细胞募集抗体中共通的课题,通常已知有由于作为靶点的TAA在肿瘤以外的正常组织中也表达而引起的副作用(非肿瘤靶向毒性(on-target/off-tumor toxicities))、基于免疫系统激活的细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome;CRS)。作为避免非肿瘤靶向毒性的手段,例如,研究了使用特异性存在于癌组织中的分子、变体、翻译后修饰等作为靶抗原的方法、通过使抗体具有多个针对TAA的结合位点而利用亲和效应提高对以高密度表达抗原的癌细胞的选择性的方法、通过肿瘤组织中存在的蛋白酶等局部活化的抗体的开发等。作为降低CRS风险的手段,例如,提出了通过调节双特异性T细胞募集抗体对CD3的亲合性来保持细胞毒活性且减少细胞因子产生量的可能

性(非专利文献5),并且存在开发亲和性不同的抗CD3抗体的报道(专利文献2~4)。

[0006] 另外,近年为了进一步提高治疗效果,正在进行与两种不同的TAA和一种T细胞上的抗原结合的三特异性T细胞募集抗体、与一种TAA和两种不同的T细胞上的抗原结合的三特异性T细胞募集抗体、以及分别与一种TAA以及T细胞上的抗原和NK细胞上的抗原结合的三特异性抗体等各种多特异性抗体的相关研究(非专利文献6~8)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:日本专利第5686953号

[0010] 专利文献2:美国专利第9587021号

[0011] 专利文献3:美国专利第9701759号

[0012] 专利文献4:美国专利第10259887号

[0013] 非专利文献

[0014] 非专利文献1:Blood Research、2022;57:p.55-61

[0015] 非专利文献2:Cancer Science、2020;111(5):p.1461-1467

[0016] 非专利文献3:Science Translational Medicine、2019;11(496):eaav5989

[0017] 非专利文献4:Biomarker Research、2021;9(1):p.38

[0018] 非专利文献5:Methods、2019;154:p.102

[0019] 非专利文献6:Biomedicines、2020;8(7):204

[0020] 非专利文献7:Nature、2022;603:p.328-334

[0021] 非专利文献8:Theranostics 2023;13(3):p.1028-1041

发明内容

[0022] 发明所要解决的问题

[0023] 本发明的课题在于,提供能够用于人类的治疗的抗TAA-抗CD3多特异性抗体。

[0024] 用于解决问题的方法

[0025] 本发明人们在研究以各种TAA为靶点的抗TAA-抗CD3双特异性抗体的制作的过程中,认为抗CD3单链可变片段(以下记作“抗CD3scFv”)的最佳亲和性根据所组合的TAA的表达量、抗TAA抗体对TAA的亲和性而不同。因此,利用公知信息和本公司的蛋白质结构信息分析的技术获得了具有多样的亲和性的抗CD3scFv并与抗TSPAN8抗体组合,由此获得了多种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体(实施例1)。进而,导入多个用于提高抗CD3scFv的稳定性的突变,获得兼具多样的亲和性和稳定性这两者的抗CD3scFv,从而成功获得多种具备对多样的CD3的结合活性和稳定性的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体(实施例2)。

[0026] 然后,本发明人们为了确认将所获得的抗CD3scFv与抗TSPAN8以外的任意抗TAA抗体组合时也能够制作兼具多样的亲和性和稳定性这两者的双特异性抗体这一点,制作了将抗CD37抗体和抗CD3scFv组合而成的抗CD37-抗CD3双特异性抗体、抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体、抗CLDN4-抗CD3双特异性抗体和抗PD-L1-抗CD3双特异性抗体,确认这些双特异性抗体维持了多样的亲和性和稳定性这两者(实施例3~7)。进而,本发明人们确认了,通过对这些双特异性抗体进一步组合与CD137结合的抗CD137抗体,能够提供三特异性抗体(实施例7)。

[0027] 即,本发明涉及以下的[1]~[25]。

[0028] [1]一种多特异性抗体,其含有与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗TAA抗体的重链可变区和轻链可变区、以及含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区,其中,抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

[0029] (1)由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0030] (2)由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0031] (3)由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0032] (4)由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0033] (5)由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0034] (6)由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0035] (7)由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0036] (8)由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0037] (9)由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0038] (10)由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0039] (11)由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0040] (12)由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0041] (13)由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0042] (14)由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0043] (15)由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;或

[0044] (16)由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区。

[0045] [2]根据[1]所述的多特异性抗体,其中,多特异性抗体为由以下的(a)~(c)的结构构成的双特异性抗体:

[0046] (a)由含有抗TAA抗体的重链可变区的重链片段和含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链构成的抗TAA抗体的Fab区;

[0047] (b)含有抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区;以及

[0048] (c)由与(a)的Fab区的重链片段连接的第一Fc多肽和与(b)的抗CD3scFv区连接的第二Fc多肽构成的Fc区。

[0049] [3]根据[2]所述的多特异性抗体,其中,Fc区含有杵臼结构(Knobs-into-holes)突变或LALA突变(L234A和L235A)(在此,上述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置)。

[0050] [4]根据[2]所述的多特异性抗体,其中,Fc区含有杵臼结构突变和LALA突变。

[0051] [5]根据[2]~[4]中任一项所述的多特异性抗体,其中,Fc区含有P329A突变和/或P331G突变(在此,上述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置)。

[0052] [6]根据[2]~[5]中任一项所述的多特异性抗体,其中,抗TAA抗体的Fab区的重链片段与第一Fc多肽借助铰链区而连接,抗CD3scFv区与第二Fc多肽借助铰链区而连接。

[0053] [7]根据[6]所述的多特异性抗体,其中,连接抗CD3scFv区与第二Fc多肽的铰链区含有C220S突变(在此,上述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置)。

[0054] [8]根据[6]所述的多特异性抗体,其中,Fc区含有杵臼结构突变、LALA突变以及P329A和/或P331G突变,连接抗CD3scFv区与第二Fc多肽的铰链区含有C220S突变(在此,上

述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置)。

[0055] [9]一种多特异性抗体,其为抗TAA-抗CD3双特异性抗体,所述抗TAA-抗CD3双特异性抗体含有在含有与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗TAA抗体的重链可变区的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗TAA抗体的重链、含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链和含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽,其中,抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

- [0056] (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0057] (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0058] (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0059] (4) 由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0060] (5) 由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0061] (6) 由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0062] (7) 由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0063] (8) 由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0064] (9) 由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0065] (10) 由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0066] (11) 由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0067] (12) 由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0068] (13) 由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0069] (14) 由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;
- [0070] (15) 由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;或
- [0071] (16) 由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区。

[0072] [10]一种多特异性抗体,其为在[2]~[9]中任一项所述的多特异性抗体上进一步添加含有与CD137结合的抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137scFv区而成的三特异性抗体,其中,抗CD137scFv区为以下的(a)~(e)中的任一者:

- [0073] (a) 由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- [0074] (b) 由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- [0075] (c) 由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;
- [0076] (d) 由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;或
- [0077] (e) 由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区。

[0078] [11]根据[10]所述的多特异性抗体,其中,抗CD137scFv区连接于第一Fc多肽和第二Fc多肽的羧基末端中的任一者或两者。

[0079] [12]一种多特异性抗体,其为抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体,所述抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体含有在含有与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗TAA抗体的重链可变区的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗TAA抗体的重链、含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链和含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽,进一步在第一Fc多肽和第二Fc多肽的羧基末端中的任一者或两者上连接有含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137scFv区,其中,

[0080] 抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

- [0081] (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0082] (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0083] (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0084] (4) 由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0085] (5) 由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0086] (6) 由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0087] (7) 由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0088] (8) 由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0089] (9) 由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0090] (10) 由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0091] (11) 由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0092] (12) 由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0093] (13) 由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0094] (14) 由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0095] (15) 由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；或
- [0096] (16) 由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0097] 抗CD137scFv区为以下的(a) ~ (e)中的任一者：
- [0098] (a) 由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区；
- [0099] (b) 由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区；
- [0100] (c) 由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区；
- [0101] (d) 由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区；或
- [0102] (e) 由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区。
- [0103] [13]根据[1] ~ [12]中任一项所述的多特异性抗体，其中，抗TAA抗体为与以下的任一TAA结合的抗TAA抗体：
- [0104] HER2、HER3、HER4、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD40、CD44、CD70、CD123、CD138、CXCR3、CXCR5、CCR3、CCR4、CCR9、CRTH2、PMCH、CD4、CD25、CD200、内质素(endoplasmic)、BCMA、CD276、TSPAN8、CLDN4、CLDN6、CLDN18.2、ENPP3、SLC34A2、TROP2、MerTK、结合素(Nectin)-4、ASGR1、间皮素(mesothelin)、PSMA、LIV-1、MUC1、MUC2、MUC4、MUC16、CDH6、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7、CEACAM16、CEACAM18、CEACAM19、CEACAM20、CEACAM21、URLC10、NY-ESO-1、GAA、OFA、细胞周期蛋白(cyclin)B1、WT-1、CEF、VEGRR1、VEGFR2、TTK、HPV16、HPV16E7、HPV18、CEA19、KOC1、SL-701、MART-1、gp100、酪氨酸酶(tyrosinase)、存活蛋白(survivin)、MAGE-3.1、MAGE-10.A2、OVA BiP、gp209-2M、melan-A、NA17.A2、KOC1、C016、DEPDC1、MPHOSPH1、MAGE12、ONT-10、GD2L、GD3L、URLC10、CDCA1、TF、PSA、TERT、STF-II、G17DT、ICT-107、Dex2、hTERT、PAP、TRP2、LRRC15、c-Met、PD-L1、FAP、EGFR、B3-H3、GPC3、5T4。
- [0105] [14]根据[1] ~ [13]中任一项所述的多特异性抗体，其经过了翻译后修饰。
- [0106] [15]根据[14]所述的多特异性抗体，其中，翻译后修饰为重链可变区氨基末端的焦谷氨酰化和/或重链羧基末端赖氨酸缺失。
- [0107] [16]一种多核苷酸，其用于生产[1] ~ [15]中任一项所述的多特异性抗体，所述多

核苷酸选自下述 (1) ~ (16) 组成的组：

[0108] (1) 含有编码由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0109] (2) 含有编码由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0110] (3) 含有编码由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0111] (4) 含有编码由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0112] (5) 含有编码由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0113] (6) 含有编码由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0114] (7) 含有编码由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0115] (8) 含有编码由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0116] (9) 含有编码由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0117] (10) 含有编码由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0118] (11) 含有编码由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0119] (12) 含有编码由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0120] (13) 含有编码由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0121] (14) 含有编码由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0122] (15) 含有编码由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；或

[0123] (16) 含有编码由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸。

[0124] [17] 一种多核苷酸，其用于生产[10] ~ [15]中任一项所述的多特异性抗体，所述多核苷酸选自下述 (a) ~ (e) 组成的组：

[0125] (a) 含有编码由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0126] (b) 含有编码由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0127] (c) 含有编码由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0128] (d) 含有编码由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸;或

[0129] (e) 含有编码由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸。

[0130] [18] 一种表达载体,其含有[16]或[17]所述的多核苷酸。

[0131] [19] 一种宿主细胞,其含有[16]或[17]所述的多核苷酸或者[18]所述的表达载体。

[0132] [20] 一种生产方法,其包括培养[19]所述的宿主细胞的步骤。

[0133] [21] 一种药物组合物,其含有[1] ~ [15]中任一项所述的多特异性抗体和药学上可接受的赋形剂。

[0134] [22] 根据[1] ~ [15]中任一项所述的多特异性抗体,其用于治疗癌症。

[0135] [23] 根据[21]所述的药物组合物,其用于治疗癌症。

[0136] [24] 一种治疗癌症的方法,其包括将治疗有效量的[1] ~ [15]中任一项所述的多特异性抗体给药于对象的步骤。

[0137] [25] [1] ~ [15]中任一项所述的多特异性抗体在制造用于治疗癌症的药物组合物中的应用。

[0138] 发明效果

[0139] 本发明的抗CD3scFv通过与针对任意TAA的抗体(抗TAA抗体)组合,从而能够提供抗TAA-抗CD3多特异性抗体(包括双特异性抗体、三特异性抗体)。并且,通过与任意TAA和CD3这两者结合、拉近癌细胞与T细胞的物理距离,从而能够增强T细胞所带来的癌细胞毒作用。因此,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体和含有该多特异性抗体的药物组合物能够用于癌症的治疗。

附图说明

[0140] 图1-1示出抗CD37-抗CD3双特异性抗体在CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞和扩增的panT细胞的共培养体系中的细胞毒活性的评价结果。横轴表示抗体浓度,纵轴表示各孔的GFPSpark荧光面积。实验以一式三份方式实施,将各条件的平均值用符号表示并且用折线连接。

[0141] 图1-2示出抗CD37-抗CD3双特异性抗体在CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞和扩增的panT细胞的共培养体系中的细胞毒活性的评价结果。横轴表示抗体浓度,纵轴表示各孔的GFPSpark荧光面积。实验以一式三份方式实施,将各条件的平均值用符号表示并且用折线连接。

[0142] 图2-1示出抗CD37-抗CD3双特异性抗体在CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞和扩增的panT细胞的共培养体系中的IFN- γ 分泌诱导活性的评价结果。横轴表示抗体浓度,纵轴表示培养上清中的IFN- γ 浓度。实验以一式三份方式实施,将各条件的平均值用符号表示并且用折线连接。

[0143] 图2-2示出抗CD37-抗CD3双特异性抗体在CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞和扩增的

panT细胞的共培养体系中的IFN- γ 分泌诱导活性的评价结果。横轴表示抗体浓度,纵轴表示培养上清中的IFN- γ 浓度。实验以一式三份方式实施,将各条件的平均值用符号表示并且用折线连接。

[0144] 图2-3示出抗CD37-抗CD3双特异性抗体在CHO-K1_人CD37/GFPspark细胞和扩增的panT细胞的共培养体系中的TNF- α 分泌诱导活性的评价结果。横轴表示抗体浓度,纵轴表示培养上清中的TNF- α 浓度。实验以一式三份方式实施,将各条件的平均值用符号表示并且用折线连接。

[0145] 图2-4示出抗CD37-抗CD3双特异性抗体在CHO-K1_人CD37/GFPspark细胞和扩增的panT细胞的共培养体系中的TNF- α 分泌诱导活性的评价结果。横轴表示抗体浓度,纵轴表示培养上清中的TNF- α 浓度。实验以一式三份方式实施,将各条件的平均值用符号表示并且用折线连接。

[0146] 图3-1示出人PBMC移入SU-DHL-6细胞皮下荷瘤模型中的BTE-0136的抗肿瘤效果。左图的横轴表示开始给药抗体后的天数,纵轴表示肿瘤体积,误差棒表示标准误差。右图示出给药开始11天后的各个体的肿瘤体积的值。横轴表示BTE-0136的给药量,纵轴表示肿瘤体积。横线表示平均值,误差棒表示标准误差。显著性概率P值通过利用Dunnett多重比较检验对PBS给药组的肿瘤体积和BTE-0136的各用量下的给药组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的组,*表示P值小于显著性水平0.05的组。

[0147] 图3-2示出人PBMC移入SU-DHL-6细胞皮下荷瘤模型中的BTE-0142的抗肿瘤效果。左图的横轴表示开始给药抗体后的天数,纵轴表示肿瘤体积,误差棒表示标准误差。右图示出给药开始11天后的各个体的肿瘤体积的值。横轴表示BTE-0142的给药量,纵轴表示肿瘤体积。横线表示平均值,误差棒表示标准误差。显著性概率P值通过利用Dunnett多重比较检验对PBS给药组的肿瘤体积和BTE-0142的各用量下的给药组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的组,*表示P值小于显著性水平0.05的组。

[0148] 图3-3示出人PBMC移入SU-DHL-6细胞皮下荷瘤模型中的BTE-0148的抗肿瘤效果。左图的横轴表示开始给药抗体后的天数,纵轴表示肿瘤体积,误差棒表示标准误差。右图示出给药开始11天后的各个体的肿瘤体积的值。横轴表示BTE-0148的给药量,纵轴表示肿瘤体积。横线表示平均值,误差棒表示标准误差。显著性概率P值通过利用Dunnett多重比较检验对PBS给药组的肿瘤体积和BTE-0148的各用量下的给药组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的组。

[0149] 图4示出11种抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体对CD3的结合活性。横轴表示抗体浓度,纵轴表示吸光度(抗体的结合量)。

[0150] 图5示出抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体在OVCAR-3_GFPspark细胞和扩增的panT细胞的共培养体系中的细胞毒活性的评价结果。横轴表示抗体浓度,纵轴表示各孔的GFPspark荧光面积。实验以一式三份方式实施,将各条件的平均值用符号表示并且用折线连接。

[0151] 图6-1示出通过SDS-PAGE法对将抗CLDN4-抗CD3双特异性抗体在还原条件下进行处理而得的样本和在非还原条件下进行处理而得的样本进行分析的结果。

[0152] 图6-2示出通过SDS-PAGE法对将抗PD-L1-抗CD3双特异性抗体在还原条件下进行处理而得的样本和在非还原条件下进行处理而得的样本进行分析的结果。

[0153] 图7-1示出通过SDS-PAGE法对将抗CLDN4-抗CD3-抗CD137三特异性抗体在还原条件下进行处理而得的样本和在非还原条件下进行处理而得的样本进行分析的结果。

[0154] 图7-2示出通过SDS-PAGE法对将抗PD-L1-抗CD3-抗CD137三特异性抗体在还原条件下进行处理而得的样本和在非还原条件下进行处理而得的样本进行分析的结果。

[0155] 图8示出利用ELISA法进行测定评价的、被检抗体对CD3的结合活性。图的纵轴表示从450nm的吸光度减去570nm的吸光度而得的值,横轴表示被检抗体的浓度。符号表示添加各被检抗体时的吸光度的平均值。

[0156] 图9示出利用ELISA法进行测定评价的、被检抗体对CD137的结合活性。图的纵轴表示从450nm的吸光度减去570nm的吸光度而得的值,横轴表示被检抗体的浓度。符号表示添加各被检抗体时的吸光度的平均值。

[0157] 图10示出利用基于细胞的ELISA法测定评价的、被检抗体对CLDN4的结合活性。图的纵轴表示从450nm的吸光度减去570nm的吸光度而得的值,横轴表示被检抗体的浓度。符号表示添加各被检抗体时的吸光度的平均值。

具体实施方式

[0158] 以下对本发明进行详细说明。

[0159] <定义>

[0160] 本说明书的术语只要不是以下特别定义的内容,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。

[0161] 抗体(或免疫球蛋白)为以具有由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个类。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。重链通常由含有约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中存在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。轻链通常由含有约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。

[0162] 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。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)。

[0163] 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为在重链和轻链的N末端各自以CDR1、CDR2、CDR3的顺序存在的由大约5~10个氨基酸残基构成的区域,形成抗体结合位点。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。

[0164] 用蛋白水解酶的木瓜蛋白酶处理抗体时, 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结构域和轻链 (VL和CL) 构成的区域, 该Fab区在构成的前端部分的抗原结合位点与抗原进行结合。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。

[0165] 另外, 将C末端侧的片段称为Fc (可结晶化片段; Fragment, crystallizable) 区。本说明书中, “Fc多肽”是指由重链的CH2结构域和CH3结构域构成的多肽, “Fc区”是指由2个Fc多肽构成的复合体。

[0166] 重链片段和Fc多肽通过被称为铰链区的部分而连接。另外, 抗体的两条重链在铰链区形成二硫键。

[0167] 本说明书中, “抗原”以通常的含义来使用, 尤其是用作表示抗体、抗原结合片段等抗原结合蛋白所能特异性结合的分子或分子的一部分的术语。抗原可以为蛋白质、核酸等分子。一个抗原有时也具有能够与不同抗体等相互作用的一个或一个以上的表位。

[0168] 本说明书中, “抗体”是与抗原特异性结合的多肽, 只要能够与抗原特异性结合, 则可以为任意结构。例如, 抗体除了包括IgG等以4条链结构为基本结构的多肽以外, 还包括后述的抗原结合片段、多特异性抗体、双特异性抗体、三特异性抗体等各种形状的多肽。

[0169] 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个多肽链的分子。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是由通过接头连接的VH和VL构成的、一价的抗原结合片段。Fab片段是由轻链和含有重链的VH、CH1结构域的片段构成的、一价的抗原结合片段。Fab' 片段是由轻链和含有重链的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, 在该铰链区的局部含有构成重链间S-S键的半胱氨酸残基。F(ab')₂片段是Fab' 片段通过二硫键连接而成的二价分子。一价是指含有一个抗原结合位点, 二价是指含有2个抗原结合位点。本说明书中, “scFv区”是指含有scFv的区域。

[0170] 本说明书中, “多肽”是指两个以上氨基酸通过肽键连接而成的物质。多肽中使用的氨基酸可以为天然氨基酸或人工氨基酸中的任一者。多肽中所含的氨基酸残基数为2个以上即可, 优选为10个以上。

[0171] 本说明书中, “多特异性抗体”是指能够与2种以上的不同抗原特异性结合的抗体, 根据结合的抗原数而称为例如双特异性抗体、三特异性抗体。多特异性抗体包括能够分别与不同抗原结合的2种以上的抗体和/或抗原结合片段的复合体, 只要上下文中没有特别限制, 则本说明书中使用的“抗体”包括多特异性抗体。

[0172] 本说明书中, “双特异性抗体”是指能够与两种不同抗原特异性结合的抗体, “三特异性抗体”是指能够与3种不同抗原特异性结合的抗体。

[0173] 本说明书中, “人抗体”是指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”是指CDR以外的氨基酸残基的一部分、大部分或全部被来自人免疫球蛋白分子的氨基酸残基置换的抗体。作为人源化的方法, 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。

[0174] 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)。

[0175] 本说明书中,“多核苷酸”是指核苷酸的聚合物,包括RNA或DNA。使用的RNA或DNA可以为天然的,也可以为人工合成的。

[0176] 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、第五版、1991、NIH Publication No.91-3242)而按照这些编号系统规定。

[0177] 本说明书中,“第一”或“第二”的术语是在部分的各种类存在2种以上时为了方便区分而使用的。使用这样的术语时,只要没有明确记载则并非意在赋予特定的顺序、含义。

[0178] 本说明书中,“连接”或“连接有”是指两个以上成分(例如Fab区和Fc多肽)直接或者借助一个或两个以上媒介物(可列举例如肽接头、铰链区,但是不限于此)而结合。本说明书中,“肽接头”是指用于将可变区之间连接的、可通过基因工程而导入的1个以上的任意的氨基酸残基。本发明中使用的肽接头的长度没有特别限定,本领域技术人员可根据目的适当选择。

[0179] 本说明书中,“一致性”是指使用EMBOSS Needle(Nucleic Acids Res.,2015;Vol.43:pW580-W584)利用以默认准备的参数得到的Identity的值。上述参数如下所述。

[0180] Gap Open Penalty=10

[0181] Gap Extend Penalty=0.5

[0182] Matrix=EBLOSUM62

[0183] End Gap Penalty=false

[0184] 本说明书中,“对象”是指需要该预防或治疗的人或其它动物。一个方式中,为需要治疗或预防的人。

[0185] 四跨膜蛋白8(Tetraspanin-8;TSPAN8)为属于四跨膜蛋白家族的四次跨膜蛋白,具有2个细胞外环区域和3个细胞质结构域。已知TSPAN8参与细胞粘附、细胞运动性、细胞的活化和增殖等。在胃癌、胰腺癌、大肠癌、肝癌等中观察到高表达,并被报道了TSPAN8表达亢进与癌症的进展或转移的相关性等(Biomolecules、2020;Vol.10:p.383)。

[0186] 分化抗原群37(CD37)为属于四跨膜蛋白家族的四次跨膜蛋白,具有2个细胞外区域和3个细胞质区域。据使用敲除小鼠的分析显示,CD37也参与抗体产生、T细胞的功能控制等免疫功能(Int.J Mol.Sci.,2020;Vol.21:p.9531)。CD37在正常组织中的表达限定于血细胞,尤其在成熟B细胞中高表达。还已知CD37在源自成熟B细胞的非霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病等血液癌中也高频率地高表达(Blood Adv.,2019;Vol.3:p.1230)。

[0187] 溶质载体家族34成员2(Solute carrier family 34member2(SLC34A2、别名NaPi2b)为pH敏感性且钠依赖性的磷酸转运蛋白。在肺、唾液腺、乳腺、小肠等中表达,参与磷酸从饮食中的吸收。另外,已知SLC34A2基因的异常会导致肺泡微结石症(Pflugers Arch.,2019;Vol.471:p.165)。SLC34A2在肺癌、卵巢癌中观察到高表达,作为针对这些癌症的治疗药的靶分子受到关注(Mol.Cancer Ther.,2021;Vol.20:p.896)。

[0188] 紧密连接蛋白(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而发挥重要作用。CLDN4在大肠

癌、膀胱癌、卵巢癌等癌组织中也观察到高表达,暗示了抗CLDN4抗体能够用于治疗或诊断癌症的可能性(Cancer Science、2009;Vol.100:p.1623-1630)。

[0189] 程序性死亡因子配体1(Programmed death-ligand 1,PD-L1)为细胞程序性死亡因子-1(Programmed cell death-1,PD-1)的配体。PD-1在T细胞中随着活化的持续而被诱导表达,通过与作为配体的PD-L1或程序性死亡因子配体2(Programmed death-ligand 2,PD-L2)结合而抑制性地控制T细胞的活化(Annu.Rev.Immunol.,2008;Vol.26:p.677-704)。通常,这样的T细胞活化控制机制被称为免疫检查点,已知作为用于不引起过度的免疫应答的负反馈机制之一。

[0190] <本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体>

[0191] 本发明提供具有以下的(a)~(c)的结构的双特异性抗体(也称为“抗CD37-抗CD3双特异性抗体”):

[0192] 一种与CD37和CD3结合的双特异性抗体,其含有:

[0193] (a)由含有抗CD37抗体的重链可变区的重链片段和含有抗CD37抗体的轻链可变区的轻链构成的抗CD37抗体的Fab区;

[0194] (b)含有抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区;以及

[0195] (c)由与(a)的Fab区的重链片段连接的第一Fc多肽和与(b)的抗CD3scFv区连接的第二Fc多肽构成的Fc区。

[0196] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体包含含有抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区。本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中,可以使用该领域中公知的抗CD3scFv区或基于该领域中公知的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的序列信息制作的抗CD3scFv区。作为公知的抗CD3抗体,已知有OKT3、UTCH1、L2K、TR66等的克隆,它们的序列被用作双特异性抗体(Pharmacol.Ther.,2018;Vol.182:p.161-175)。

[0197] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区为以下的(1)~(3)中的任一者:

[0198] (1)由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区;

[0199] (2)由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区;或

[0200] (3)由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区。

[0201] 抗CD3scFv区中,连接抗CD3抗体的重链可变区与轻链可变区的肽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,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)。作为这样的接头,可列举例如以下接头。

[0202] Ser

[0203] Gly-Ser

[0204] Gly-Gly-Ser

[0205] Ser-Gly-Gly

[0206] Gly-Gly-Gly-Ser (序列号55)

[0207] Ser-Gly-Gly-Gly (序列号56)

[0208] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (序列号57)

[0209] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (序列号58)

[0210] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (序列号59)

[0211] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (序列号60)

[0212] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (序列号61)

[0213] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (序列号62)

[0214] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n

[0215] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n

[0216] Gly-Lys-Pro-Gly-Ser (序列号63)

[0217] (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n

[0218] 上述的n表示1以上的整数。肽接头的长度、序列可以由本领域技术人员根据目的而适当选择。

[0219] 一个实施方式中,抗CD3scFv区中使用的接头为包含 (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n 的序列的接头。一个实施方式中,抗CD3scFv区中使用的接头优选为包含 (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)₄ 的序列的接头。

[0220] 一个实施方式中,抗CD3scFv区为以下的(1)~(3)中的任一者:

[0221] (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0222] (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;或

[0223] (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区。

[0224] 一个实施方式中,抗CD37抗体的重链可变区含有由序列号10的氨基酸号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号10的氨基酸号50至65的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号10的氨基酸号98至104的氨基酸序列构成的CDR3,抗CD37抗体的轻链可变区含有由序列号12的氨基酸号24至34的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号12的氨基酸号50至56的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号12的氨基酸号89至95的氨基酸序列构成的CDR3。

[0225] 一个实施方式中,抗CD37抗体的重链可变区由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成,抗CD37抗体的轻链可变区由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成。

[0226] 作为抗CD37抗体Fab区的重链片段的CH1结构域所来源的重链恒定区,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 ,例如可以从Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3或Ig γ 4中选择。一个实施方式中,抗CD37抗体Fab区的重链片段含有来自人Ig γ 1恒定区的CH1结构域。

[0227] 作为抗CD37抗体Fab区的轻链的CL,也可以选择Ig λ 或Ig κ 中的任一恒定区。一个实施方式中,抗CD37抗体Fab区含有作为Ig κ 恒定区的CL。一个实施方式中,抗CD37抗体Fab区的轻链含有作为人Ig κ 恒定区的CL。

[0228] 一个实施方式中,抗CD37抗体Fab区由由序列号10的氨基酸号1至213的氨基酸序列构成的重链片段和由序列号12的氨基酸序列构成的轻链构成。

[0229] 本说明书中,也将含有抗CD37抗体的重链可变区的重链片段与第一Fc多肽连接而成的多肽称为“抗CD37抗体的重链”。本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中,含有抗CD37

抗体的重链可变区的重链片段和Fc多肽(第一Fc多肽)可以直接连接,或者,可以借助肽接头或铰链区而连接。另外,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中,抗CD3scFv区和Fc多肽(第二Fc多肽)可以直接连接,或者,可以借助肽接头或铰链区而连接。

[0230] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体为以下的(a)~(c)中任一项记载的抗CD37-抗CD3双特异性抗体:

[0231] (a)一种双特异性抗体,其包含:在包含含有由序列号10的氨基酸号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号10的氨基酸号50至65的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号10的氨基酸号98至104的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链;包含含有由序列号12的氨基酸号24至34的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号12的氨基酸号50至56的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号12的氨基酸号89至95的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链;以及,在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽;

[0232] (b)一种双特异性抗体,其包含:在包含含有由序列号10的氨基酸号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号10的氨基酸号50至65的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号10的氨基酸号98至104的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链;包含含有由序列号12的氨基酸号24至34的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号12的氨基酸号50至56的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号12的氨基酸号89至95的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链;以及,在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽;或

[0233] (c)一种双特异性抗体,其包含:在包含含有由序列号10的氨基酸号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号10的氨基酸号50至65的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号10的氨基酸号98至104的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链;包含含有由序列号12的氨基酸号24至34的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号12的氨基酸号50至56的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号12的氨基酸号89至95的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链;以及,在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽。

[0234] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体为以下的(a)~(c)中任一项记载的抗CD37-抗CD3双特异性抗体:

[0235] (a)一种双特异性抗体,其包含:在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链;含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链;以及,在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗

CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽；

[0236] (b) 一种双特异性抗体,其包含:在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链;含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链;以及,在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽;或

[0237] (c) 一种双特异性抗体,其包含:在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链;含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链;以及,在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽。

[0238] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体为以下的(a)~(c)中任一项记载的抗CD37-抗CD3双特异性抗体:

[0239] (a) 含有在由序列号10的氨基酸号1至213的氨基酸序列构成的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的轻链和在由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的双特异性抗体;

[0240] (b) 含有在由序列号10的氨基酸号1至213的氨基酸序列构成的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的轻链和在由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的双特异性抗体;或

[0241] (c) 含有在由序列号10的氨基酸号1至213的氨基酸序列构成的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的轻链和在由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的双特异性抗体。

[0242] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中,作为构成Fc区的第一Fc多肽和第二Fc多肽所来源的重链恒定区,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,可以从Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3或Ig γ 4中选择。一个实施方式中,第一Fc多肽和第二Fc多肽为来自人Ig γ 1恒定区的Fc多肽。

[0243] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中的Fc区可以含有使抗体依赖性细胞毒性(ADCC)、补体依赖性细胞毒性(CDC)降低的突变。L234A是人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸第234位的亮氨酸向丙氨酸的置换。L235A是人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸第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”。已知该突变可降低抗体的抗体依赖性细胞毒性、补体依赖性细胞毒性(Mol. Immunol.、1992;Vol.29:p.633-639)。

[0244] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中的Fc区可以还含有基于其它公知技术的突变。例如,Fc区可以含有P329A突变(J Biol Chem.、2001;Volume 276:Issue 9:p.6591-

6604)或基于杵臼结构(Knobs-into-holes)技术的突变(以下也称为“杵臼结构突变”)。P329A突变具有通过减弱与Fc γ R和C1q的结合而将ADCC活性和CDC活性抑制得较低的效果。杵臼结构技术为如下技术:将存在于一条重链的CH3区域的氨基酸侧链置换为更大的侧链(knob;突起),将存在于另一条重链的CH3区域的氨基酸侧链置换为更小的侧链(hole;空隙),由此将突起配置在空隙内,促进重链的异二聚体化,可以高效地获得目标异二聚体化抗体分子(Nature、1994;Vol.372:p.379-383)。

[0245] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体包含含有LALA突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体包含含有P329A突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体包含含有杵臼结构突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体包含含有LALA突变、P329A突变和杵臼结构突变中的1种或2种以上突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体包含含有LALA突变、P329A突变和杵臼结构突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中所含的杵臼结构突变为形成该Fc区的1个Fc多肽中的T366W突变以及形成该Fc区的另一个Fc多肽中的T366S、L368A和Y407V突变(参照国际公开第1998/050431号)。

[0246] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有由序列号10的氨基酸号229至445的氨基酸序列构成的第一Fc多肽。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有由序列号14的氨基酸号270至486的氨基酸序列、序列号16的氨基酸号270至486的氨基酸序列、或序列号18的氨基酸号270至486的氨基酸序列构成的第二Fc多肽。

[0247] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有以下的(a)~(c)中任一项记载的多肽:

[0248] (a)由序列号10的氨基酸号229至445的氨基酸序列构成的第一Fc多肽和由序列号14的氨基酸号270至486的氨基酸序列构成的第二Fc多肽所构成的Fc区;

[0249] (b)由序列号10的氨基酸号229至445的氨基酸序列构成的第一Fc多肽和由序列号16的氨基酸号270至486的氨基酸序列构成的第二Fc多肽所构成的Fc区;或

[0250] (c)由序列号10的氨基酸号229至445的氨基酸序列构成的第一Fc多肽和由序列号18的氨基酸号270至486的氨基酸序列构成的第二Fc多肽所构成的Fc区。

[0251] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中,含有抗CD37抗体的重链可变区的重链片段与第一Fc多肽可以借助铰链区进行连接而构成抗CD37抗体的重链。

[0252] 另外,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体中,抗CD3scFv区和第二Fc多肽可以借助铰链区而连接。

[0253] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有抗CD37抗体的Fab区的重链片段与第一Fc多肽借助铰链区连接而成的抗CD37抗体的重链。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有抗CD3scFv区与第二Fc多肽借助铰链区连接而成的多肽。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有抗CD37抗体的Fab区的重链片段与第一Fc多肽借助铰链区连接而成的抗CD37抗体的重链和抗CD3scFv区与第二Fc多肽借助铰链区连接而成的多肽。

[0254] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有抗CD37抗体的Fab区的重链片段与第一Fc多肽借助铰链区连接而成的抗CD37抗体的重链、抗CD37抗体的轻链、

和抗CD3scFv区与第二Fc多肽借助铰链区连接而成的多肽。

[0255] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有铰链区时,可以含有基于公知技术的铰链区中的突变。例如,铰链区可以含有C220S突变(Methods、2019;Vol.154;p.38-50)。C220S突变是目的在于去除由于轻链恒定区中存在的半胱氨酸的缺损而失去进行配对的半胱氨酸、结果游离出的第220位的半胱氨酸的突变。本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有铰链区时,一个实施方式中,连接抗CD3scFv区与第二Fc多肽的铰链区含有C220S突变。

[0256] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的一个实施方式中,Fc区含有LALA突变、P329A突变和杵臼结构突变,连接抗CD3scFv区与第二Fc多肽的铰链区含有C220S突变。

[0257] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体包含含有由序列号10的氨基酸号214至445的氨基酸序列构成的铰链区和第一Fc多肽的多肽。一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体包含含有由序列号14的氨基酸号255至486的氨基酸序列、序列号16的氨基酸号255至486的氨基酸序列、或序列号18的氨基酸号255至486的氨基酸序列构成的铰链区和第二Fc多肽的多肽。

[0258] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体含有以下的(a)~(c)中任一项记载的多肽:

[0259] (a) 含有由序列号10的氨基酸号214至445的氨基酸序列构成的铰链区和第一Fc多肽的多肽以及含有由序列号14的氨基酸号255至486的氨基酸序列构成的铰链区和第二Fc多肽的多肽;

[0260] (b) 由序列号10的氨基酸号214至445的氨基酸序列构成的铰链区和第一Fc多肽所构成的多肽以及含有由序列号16的氨基酸号255至486的氨基酸序列构成的铰链区和第二Fc多肽的多肽;或

[0261] (c) 由序列号10的氨基酸号214至445的氨基酸序列构成的铰链区和第一Fc多肽所构成的多肽以及含有由序列号18的氨基酸号255至486的氨基酸序列构成的铰链区和第二Fc多肽的多肽。

[0262] 需要说明的是,本说明书中,LALA突变、P329A突变、杵臼结构突变和C220S突变等氨基酸突变的记载按照人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置。例如,如上所述,L234A是人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸第234位的亮氨酸向丙氨酸的置换。

[0263] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体为以下的(a)~(c)中的任一者:

[0264] (a) 含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体;

[0265] (b) 含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体;或

[0266] (c) 含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体。

[0267] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体为含有由序列号10的氨基

酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体。

[0268] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体为含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体。

[0269] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体为含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体。

[0270] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3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会对抗体的活性造成影响这一点是本领域已知的 (Analytical Biochemistry, 2006; Vol. 348; p. 24-39)。

[0271] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体与人CD37 (基因号: NM_001774.3) 和人CD3 $\epsilon\delta$ 复合蛋白 (CD3 ϵ 基因号: NM_000733.3、CD3 δ 基因号: NM_000732.4或NM_001040651.1) 结合。是否与人CD37和人CD3 $\epsilon\delta$ 复合蛋白结合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测定 (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA) 法、流式细胞术法等方法。使用ELISA法的情况下,例如可以使用实施例1-4中记载的方法。

[0272] 本领域技术人员可以基于本说明书公开的抗CD37抗体和抗CD3scFv区的重链可变区和轻链可变区的序列信息等使用该领域中公知的方法来制作本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体。另外,本领域技术人员可以基于公知的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的序列信息等使用该领域中公知的方法来制作本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的抗CD3scFv区。

[0273] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体为人源化抗体或人抗体。在制作人源化抗体时,可以使用本领域技术人员熟知的方法适当导入回复突变 (Bioinformatics, 2015; Vol. 31; p. 434-435)。本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体没有特别限定,例如,可以按照后述的<生产本发明的双特异性抗体的方法和利用该方法生产的本发明的双特异性抗体>中记载的方法来制造。

[0274] <本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸>

[0275] 本发明另外提供用于生产本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸 (也称为“本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸”)。

[0276] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸选自由以下的 (a) ~ (j) 组成的组:

[0277] (a) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸;

[0278] (b) 含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区

的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸；

[0279] (c) 含有编码由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0280] (d) 含有编码由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0281] (e) 含有编码由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0282] (f) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸；

[0283] (g) 含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸；

[0284] (h) 含有编码由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸；

[0285] (i) 含有编码由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸；或

[0286] (j) 含有编码由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0287] 一个实施方式中，编码抗CD37抗体的Fab区的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸为含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、和含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸。

[0288] 一个实施方式中，本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸选自以下的(k) ~ (p) 组成的组：

[0289] (k) 含有编码含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0290] (l) 含有编码含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0291] (m) 含有编码含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0292] (n) 含有编码在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；

[0293] (o) 含有编码在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；或

[0294] (p) 含有编码在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗

体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0295] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸选自以下的(a)~(c)组成的组:

[0296] (a) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0297] (b) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;或

[0298] (c) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸。

[0299] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸选自以下的(a)~(c)组成的组:

[0300] (a) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸;

[0301] (b) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸;或

[0302] (c) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变

区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0303] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸选自以下的(a)~(c)组成的组:

[0304] (a) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸;

[0305] (b) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸;或

[0306] (c) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0307] 本领域技术人员可以基于本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的碱基序列使用该领域中公知的方法来制作本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸。例如,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸可以利用该领域中公知的基因合成方法来合成。作为这样的基因合成方法,可使用国际公开第90/07861号中记载的抗体基因的合成方法等本领域技术人员公知的各种方法。

[0308] <本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体>

[0309] 本发明另外提供含有以下的(a)~(j)记载的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的表达载体(也称为“本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体”)。这些多核苷酸可以分别包含在不同的载体中,或者,也可以两个以上多核苷酸包含在1个载体中:

[0310] (a) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸;

[0311] (b) 含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸;

[0312] (c) 含有编码由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0313] (d) 含有编码由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0314] (e) 含有编码由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的

碱基序列的多核苷酸；

[0315] (f) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸；

[0316] (g) 含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸；

[0317] (h) 含有编码由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸；

[0318] (i) 含有编码由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸；或

[0319] (j) 含有编码由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0320] 一个实施方式中，本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体包含含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸以及含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸。

[0321] 一个实施方式中，本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体含有以下的(k) ~ (p) 中任一项记载的多核苷酸：

[0322] (k) 含有编码含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0323] (l) 含有编码含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0324] (m) 含有编码含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0325] (n) 含有编码在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；

[0326] (o) 含有编码在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；或

[0327] (p) 含有编码在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0328] 一个实施方式中，本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体含有以下的(a) ~ (c) 中任一项记载的多核苷酸：

[0329] (a) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1

至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0330] (b) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；或

[0331] (c) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸。

[0332] 一个实施方式中，本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体含有以下的(a) ~ (c)中任一项记载的多核苷酸：

[0333] (a) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；

[0334] (b) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；或

[0335] (c) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0336] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体含有以下的(a)~(c)中任一项记载的多核苷酸:

[0337] (a) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸;

[0338] (b) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸;或

[0339] (c) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0340] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体只要能够在真核细胞(例如动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母)和/或原核细胞(例如大肠杆菌)等各种宿主细胞中产生多核苷酸则没有特别限制。作为这样的表达载体,可列举例如质粒载体、病毒载体等。作为质粒载体,可以使用例如pcDNA系列(Thermo Fisher Scientific公司)、pALTER(注册商标)-MAX(普洛麦格)、pHEK293超级表达载体(宝生物公司)、pEE6.4或pEE12.4(Lonza Biologics公司)等。作为病毒载体,可以使用例如慢病毒、腺病毒、逆转录病毒、腺相关病毒。例如,在使用慢病毒以向细胞导入上述多核苷酸时,该慢病毒可以使用pLVSIN-CMV/EF1 α 载体(宝生物公司)、pLenti载体(Thermo Fisher Scientific公司)等。一个实施方式中,本发明的双特异性抗体的表达载体中使用的载体为pcDNATM3.4-TOPO(注册商标)(Thermo Fisher Scientific公司)和pcDNATM3.1(Thermo Fisher Scientific公司)。

[0341] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体可以含有以可操作方式与多核苷酸连接的启动子。作为用于在动物细胞中表达多核苷酸的启动子,可列举例如CMV、RSV、SV40等病毒来源启动子、肌动蛋白启动子、EF(elongation factor,延伸因子)1 α 启动子、热休克启动子等。作为用于在细菌(例如埃希氏菌属菌)中表达该多核苷酸的启动子,可列举例如trp启动子、lac启动子、 λ PL启动子、tac启动子等。作为用于在酵母中表达该多核苷酸的启动子,可列举例如GAL1启动子、GAL10启动子、PH05启动子、PGK启动子、GAP启动子、ADH启动子等。

[0342] 使用动物细胞、昆虫细胞或酵母作为用于制作表达载体的宿主细胞时,本发明的双特异性抗体的表达载体可含有起始密码子和终止密码子。这种情况下,可以含有增强子序列、编码本发明的抗体或其重链或轻链的基因的5'侧和3'侧的非翻译区、分泌信号序列、剪接接合部、聚腺苷酸化位点、或可复制单元等。使用大肠杆菌作为宿主细胞时,本发明的表达载体可以含有起始密码子、终止密码子、终止子区域和可复制单元。本发明的表达载体可以根据目的含有通常使用的药剂选择标记基因(例如四环素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因、卡那霉素抗性基因、新霉素抗性基因、二氢叶酸还原酶基因)。

[0343] <含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞>

[0344] 本发明另外提供利用本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体转化而得的或在细胞内含有抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞(也统称为“含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞”)。宿主细胞不仅包括在体外培养的细胞,也包括在体内构成组织的细胞。

[0345] 一个实施方式中,含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞含有以下的(a)~(j)记载的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸或含有该多核苷酸的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体:

[0346] (a) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸;

[0347] (b) 含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸;

[0348] (c) 含有编码由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0349] (d) 含有编码由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0350] (e) 含有编码由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0351] (f) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸;

[0352] (g) 含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸;

[0353] (h) 含有编码由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸;

[0354] (i) 含有编码由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸;或

[0355] (j) 含有编码由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0356] 一个实施方式中,含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞包含含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸。

[0357] 一个实施方式中,含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞含有以下的(k)~(p)中任一项记载的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸:

[0358] (k) 含有编码含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0359] (l) 含有编码含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸;

[0360] (m) 含有编码含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0361] (n) 含有编码在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；

[0362] (o) 含有编码在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；或

[0363] (p) 含有编码在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0364] 一个实施方式中, 含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞含有以下的(a) ~ (c)中任一项记载的多核苷酸：

[0365] (a) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0366] (b) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；或

[0367] (c) 含有编码含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸。

[0368] 一个实施方式中, 含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞含有以下的(a) ~ (c)中任一项记载的多核苷酸：

[0369] (a) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨

基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；

[0370] (b) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸；或

[0371] (c) 含有编码在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、以及含有编码在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0372] 一个实施方式中,含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞含有以下的(a)~(c)中任一项记载的多核苷酸:

[0373] (a) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸；

[0374] (b) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸；或

[0375] (c) 含有编码由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链的碱基序列的多核苷酸、含有编码由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链的碱基序列的多核苷酸、和含有编码由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的碱基序列的多核苷酸。

[0376] 作为含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞,只要适合于所使用的表达载体或基因导入方法且能够表达该多核苷酸所编码的多肽则没有特别限定。作为上述宿主细胞,可列举例如本发明的技术领域通常使用的现有细胞或人工建立的细胞等各种细胞(例如动物细胞(例如CHO-K1细胞、ExpiCHO-S(注册商标)细胞、CHO-K1SV细胞、CHO-DG44细胞、HEK293细胞、NS0细胞)、昆虫细胞(例如Sf9)、细菌(埃希氏菌属菌等)、酵母(酵母属、毕赤酵母属等)等)。一个实施方式中,本发明的宿主细胞为CHO-K1细胞或ExpiCHO-S(注册商标)细胞。

[0377] 向宿主细胞导入本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸或本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体的方法没有特别限定,可以使用例如磷酸钙法、电穿

孔法或脂质体转染法等本领域技术人员通常使用的方法。作为脂质体转染法,可以使用脂质体、脂质纳米粒子、外泌体等通常已知的多核苷酸的递送系统。

[0378] 含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞的筛选可以利用本领域技术人员通常使用的方法来进行。作为筛选方法,可以使用例如利用药剂选择标记基因和四环素、氨苄青霉素、新霉素或潮霉素等药剂的药剂选择法;有限稀释法、单细胞分选法或菌落挑取法等细胞分离法。

[0379] <本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的生产方法>

[0380] 本发明另外提供生产本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的方法(也称为“本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的生产方法”)。本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的生产方法可包括培养<含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞>中记载的含有抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞并且在该细胞或该培养上清中表达该抗体的步骤、回收、分离、纯化该抗体的方法等,只要可生产本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体,则不限于这些方法。

[0381] 含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞的培养可以利用公知方法来进行。培养条件、例如温度、培养基的pH和培养时间可以由本领域技术人员适当选择。宿主细胞为动物细胞的情况下,作为培养基,可以使用例如含有约5~20%的胎牛血清的MEM培养基(Science、1959;Vol.130:p.432-437)、DMEM培养基(Virol.、1959;Vol.8:p.396)、RPMI-1640培养基(J.Am.Med.Assoc.、1967;Vol.199:p.519)、199培养基(Exp.Biol.Med.、1950;Vol.73:p.1-8)等。培养基的pH例如为约6~8,可根据需要一边进行通气、搅拌一边在通常约30~40℃下进行约15~336小时培养。宿主细胞为昆虫细胞的情况下,作为培养基,可以使用例如含有胎牛血清的Grace's培养基(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.、1985;Vol.82:p.8404)等。培养基的pH例如为约5~8,可根据需要一边进行通气、搅拌一边在通常约20~40℃下进行约15~100小时培养。宿主细胞为大肠杆菌或酵母的情况下,作为培养基,例如含有营养源的液体培养基是适当的。营养培养基含有例如进行了转化的宿主细胞的生长所需的碳源、无机氮源或有机氮源。作为碳源,可以含有例如葡萄糖、葡聚糖、可溶性淀粉、蔗糖等,作为无机氮源或有机氮源,可以含有例如铵盐类、硝酸盐类、氨基酸、玉米浆、蛋白胨、酪蛋白、肉提取物、大豆粕、马铃薯提取液等。可以根据期望含有其它营养素(例如无机盐(例如氯化钙、磷酸二氢钠、氯化镁)、维生素类)、抗生素(例如四环素、新霉素、氨苄青霉素、卡那霉素)等。培养基的pH例如为约5~8。宿主细胞为大肠杆菌的情况下,作为培养基,可以使用例如LB培养基、M9培养基(Molecular Cloning、Cold Spring Harbor Laboratory;Vol.3:A2.2)等。可根据需要一边进行通气、搅拌一边在通常约14~43℃下进行约3~24小时培养。宿主细胞为酵母的情况下,作为培养基,可以使用例如Burkholder最低培养基(Proc.Natl.Acad.Sci.USA.、1980;Vol.77:p.4505)等。可以一边根据需要进行通气、搅拌一边在通常约20~35℃下进行约14~144小时培养。通过上述那样的培养,可以表达本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体。

[0382] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的生产方法除了培养含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞并使其表达抗CD37-抗CD3双特异性抗体的步骤以外,可以还包括从该进行了转化的宿主细胞回收、分离或纯化抗CD37-抗CD3双特异性抗体的步骤。作为分离或纯化方法,可列举例如盐析、溶剂沉淀法等利用溶解度的方法、透析、

超滤、凝胶过滤等利用分子量差异的方法、离子交换层析、羟基磷灰石层析等利用带电的方法、亲和层析等利用特异性亲和性的方法、反相高效液相层析等利用疏水性差异的方法、等电点电泳等利用等电点差异的方法等。一个实施方式中,分泌到培养上清液中的抗体可以通过各种层析、例如使用蛋白A柱或蛋白G柱的柱层析来进行纯化。

[0383] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体也包括利用本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的生产方法生产的抗CD37-抗CD3双特异性抗体。

[0384] <本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物组合物>

[0385] 本发明另外提供抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物组合物(也称为“本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物组合物”)。本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物组合物包括含有本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。本发明的药物组合物可以使用该领域中通常所使用的赋形剂、即药剂用赋形剂、药剂用载体等通过通常所使用的方法来制备。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、腹腔内给药等来给药。在制剂化时,可以在药学上可接受的范围内使用与这些剂型相应的赋形剂、载体、添加剂等。

[0386] 本发明的药物组合物可含有本发明的抗CD37-抗CD3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而成的抗体等的药物组合物也包括在本发明中。

[0387] 一个实施方式中,本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物组合物为含有选自以下(a)~(c)中的任一者的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体和/或该抗体的翻译后修饰体的药物组合物:

[0388] (a) 包含在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链、含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链、以及在含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的双特异性抗体;

[0389] (b) 包含在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链、含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链、以及在含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的双特异性抗体;或

[0390] (c) 包含在含有由序列号10的氨基酸号1至115的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD37抗体的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗CD37抗体的重链、含有由序列号12的氨基酸号1至105的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD37抗体的轻链、以及在含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区上连接有第二Fc多肽的多肽的双特异性抗体。

[0391] 一个实施方式中,本发明的药物组合物为含有选自以下(a)~(c)中的本发明的抗

CD37-抗CD3双特异性抗体和/或该抗体的翻译后修饰体的药物组合物:

[0392] (a) 含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体;

[0393] (b) 含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体;或

[0394] (c) 含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体。

[0395] 一个实施方式中,本发明的药物组合物为包含含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链和由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体和/或该抗体的翻译后修饰体的药物组合物。

[0396] 一个实施方式中,本发明的药物组合物为包含含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体和/或该抗体的翻译后修饰体的药物组合物。

[0397] 一个实施方式中,本发明的药物组合物为包含含有由序列号10的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的重链、由序列号12的氨基酸序列构成的抗CD37抗体的轻链、和由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的双特异性抗体和/或该抗体的翻译后修饰体的药物组合物。

[0398] 制剂化时的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的添加量根据患者的症状程度、年龄、使用的制剂的剂型、或抗体的结合效价等不同,可以使用例如约0.001mg/kg~约100mg/kg。

[0399] <本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物用途>

[0400] 本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体和含有它们的药物组合物可以用于治疗癌症。另外,本发明包括治疗癌症的方法,其包括将治疗有效量的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体给药于对象的步骤。另外,本发明包括用于治疗癌症的本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体。另外,本发明包括本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体在制造用于治疗癌症的药物组合物中的应用。成为本发明的治疗对象的癌症没有特别限定,可列举例如各种癌细胞的腹膜播散、胃癌、肺癌、急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性髓系白血病(AML)、慢性髓系白血病(CML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、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、骨髓异常增生综合征等血液癌、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;以及软骨肉瘤、尤文氏肉瘤、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、胰母细胞瘤、胸膜肺母细胞瘤、视网膜母细胞瘤等母细胞瘤等。

[0401] 一个实施方式中,成为本发明的治疗对象的癌症为非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、CLL、AML、T细胞淋巴瘤。一个实施方式中,成为本发明的治疗对象的癌症优选为非霍奇金淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、CLL。

[0402] <本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体>

[0403] 本发明另外提供含有与肿瘤相关抗原(TAA)结合的抗TAA抗体的重链可变区和轻链可变区、以及含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区的抗TAA-抗CD3多特异性抗体(也称为“本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体”)。

[0404] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

[0405] (1)含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0406] (2)含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0407] (3)含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0408] (4)含有由序列号20的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号20的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0409] (5)含有由序列号22的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号22的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0410] (6)含有由序列号24的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号24的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0411] (7)含有由序列号26的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号26的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0412] (8)含有由序列号28的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号28的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0413] (9)含有由序列号30的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号30的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0414] (10)含有由序列号32的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可

变区和由序列号32的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区；

[0415] (11) 含有由序列号34的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号34的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区；

[0416] (12) 含有由序列号36的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号36的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区；

[0417] (13) 含有由序列号38的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号38的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区；

[0418] (14) 含有由序列号40的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号40的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区；

[0419] (15) 含有由序列号42的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号42的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区；或

[0420] (16) 含有由序列号44的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号44的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv区。

[0421] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

[0422] (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0423] (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0424] (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0425] (4) 由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0426] (5) 由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0427] (6) 由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0428] (7) 由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0429] (8) 由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0430] (9) 由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0431] (10) 由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0432] (11) 由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0433] (12) 由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0434] (13) 由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0435] (14) 由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；

[0436] (15) 由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；或

[0437] (16) 由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区。

[0438] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体提供抗TAA-抗CD3双特异性

抗体。含有scFv区的双特异性抗体的各种形式是该领域中公知的,这些任意形式可用于作为双特异性抗体的本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体(mAbs,2017:Vol.9:p.182-212)。

[0439] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体为由以下的(a)~(c)的结构构成的双特异性抗体(也称为“本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体”):

[0440] (a) 由含有抗TAA抗体的重链可变区的重链片段和含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链构成的抗TAA抗体的Fab区;

[0441] (b) 含有抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区;以及

[0442] (c) 由与(a)的Fab区的重链片段连接的第一Fc多肽和与(b)的抗CD3scFv区连接的第二Fc多肽构成的Fc区。

[0443] 本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体中,作为Fc区,也可选择Ig γ 、Ig μ 、Ig α 、Ig δ 或Ig ϵ 中的任一恒定区。作为Ig γ ,可以从例如Ig γ 1、Ig γ 2、Ig γ 3或Ig γ 4中选择。一个实施方式中,第一Fc多肽和第二Fc多肽为来自人Ig γ 1恒定区的Fc多肽。Fc区例如可以具有杵臼结构突变。作为杵臼结构突变,可使用形成该Fc区的1个Fc多肽中的T366W突变以及形成该Fc区的另一个Fc多肽中的T366S、L368A和Y407V突变(参照国际公开第1998/050431号),但是不限于此。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体中所含的杵臼结构突变为形成该Fc区的1个Fc多肽中的T366W突变以及形成该Fc区的另一个Fc多肽中的T366S、L368A和Y407V突变。

[0444] 本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体中的Fc区可以含有<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体>中记载的使ADCC、CDC降低的突变。作为使ADCC、CDC降低的突变,可列举例如LALA突变,但是不限于此。

[0445] 本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体中的Fc区可以还含有基于其它公知技术的突变。例如,Fc区可以含有P329A突变、P331G突变、P331S突变等突变。P329A突变是人Ig γ 1恒定区的氨基酸第329位的脯氨酸向丙氨酸的置换,P331G突变和P331S突变是人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P329A突变使抗体的ADCC活性降低,已知P329A突变、P331G突变和P331S突变使抗体的CDC降低(J Immunol.,2000;Vol.164(8):p.4049-4184)。在此,上述第329位和第331位为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置。

[0446] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体包含含有杵臼结构突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体包含含有L234A和L235A的氨基酸突变(LALA突变)的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体包含含有杵臼结构突变或LALA突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体包含含有杵臼结构突变和LALA突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体包含含有P329A突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体包含含有P331G突变或P331S突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体包含含有杵臼结构突变、LALA突变、P329A突变、P331G突变和P331S突变中的1种或2种以上突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体包含含有杵臼结构突变和/或LALA突变以及P329A突变和/或P331G突变或P331S突变的Fc区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体包含含有杵臼结构突变和/或LALA突变以及P329A突变和/或P331G突变的Fc区。

[0447] 本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体中,抗TAA抗体的Fab区的重链片段与第一Fc多肽可以借助铰链区而连接。另外,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体中,抗CD3scFv区与第二Fc多肽可以借助铰链区而连接。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体中,抗TAA抗体的Fab区的重链片段与第一Fc多肽借助铰链区而连接,抗CD3scFv区与第二Fc多肽借助铰链区而连接。

[0448] 本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体含有铰链区的情况下,可以含有基于公知技术的铰链区中的突变。例如,铰链区可以含有C220S突变(Methods、2019;Vol.154:p.38-50)。C220S突变是目的在于去除由于轻链恒定区中存在的半胱氨酸的缺损而失去进行配对的半胱氨酸、结果游离出的第220位的半胱氨酸的突变。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体在连接抗CD3scFv区与第二Fc多肽的铰链区中含有C220S突变。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体在Fc区中含有杵臼结构突变、LALA突变以及P329A突变和/或P331G突变,连接抗CD3scFv区与第二Fc多肽的铰链区含有C220S突变。

[0449] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体为包含在含有抗TAA抗体的重链可变区的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗TAA抗体的重链、含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链、和含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区与第二多肽Fc连接而成的多肽的抗TAA-抗CD3双特异性抗体,其中,抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽为以下的(1)~(16)中的任一者:

[0450] (1) 由序列号14的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0451] (2) 由序列号16的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0452] (3) 由序列号18的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0453] (4) 由序列号20的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0454] (5) 由序列号22的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0455] (6) 由序列号24的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0456] (7) 由序列号26的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0457] (8) 由序列号28的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0458] (9) 由序列号30的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0459] (10) 由序列号32的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0460] (11) 由序列号34的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽;

[0461] (12) 由序列号36的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽；

[0462] (13) 由序列号38的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽；

[0463] (14) 由序列号40的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽；

[0464] (15) 由序列号42的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽；或

[0465] (16) 由序列号44的氨基酸序列构成的、抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽。

[0466] 通常,已知与2个抗原分子结合的双特异性抗体在相较于抗原而言以高浓度存在的条件下,会较多地形成双特异性抗体仅与任一抗原分子结合的二聚体,与两种抗原结合的三聚体的形成受到抑制。其结果是,例如与CD3结合的T细胞募集抗体的情况下,在高浓度域中T细胞所带来的细胞毒活性的效果减弱(AAPS J.2019;Vol.21(4):p.66)。双特异性T细胞募集抗体的情况下,高抗体浓度域中的细胞因子(例如IFN- γ 、TNF- α)的产生量减少、细胞毒活性的减弱认为是由于上述的三聚体形成受到抑制的结果。这些结果在分别单独评价抗TAA抗体或抗CD3抗体时检测不到,是制作双特异性T细胞募集抗体时首次明确的特性。另外可以说,上述特性可以说是不仅适用于双特异性抗体、而且也适用于三特异性抗体、其它多特异性抗体的特性。基于这些特性筛选作为药物而开发的抗体时,例如可以使用实施例4记载的重定向T细胞毒性(Redirected T Cell Cytotoxicity,RTCC)试验、细胞因子产生评价结果。

[0467] 本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体可以是在本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体上还连接有含有与CD137结合的抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137scFv区的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体(也称为“本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体”)。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体是在本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体上还添加有与CD137结合的抗CD137scFv区的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体。

[0468] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体含有以下的(a)~(e)中的任一抗CD137scFv区:

[0469] (a) 包含含有由序列号46的氨基酸号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号46的氨基酸号50至66的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号46的氨基酸号99至107的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区、以及含有由序列号46的氨基酸号157至167的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号46的氨基酸号183至189的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号46的氨基酸号222至231的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗CD137scFv区;

[0470] (b) 包含含有由序列号48的氨基酸号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号48的氨基酸号50至65的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号48的氨基酸号98至107的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区、以及含有由序列号48的氨基酸号156至168的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号48的氨基酸号184至190的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号48的氨基酸号223至233的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗CD137scFv区;

[0471] (c) 包含含有由序列号50的氨基酸号23至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号50的氨基酸号51至57的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号50的氨基酸号90至100的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区、以及含有由序列号50的氨基酸号162至166的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号50的氨基酸号181至196的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号50的氨基酸号229至238的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区的抗CD137scFv区；或

[0472] (d) 包含含有由序列号52的氨基酸号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号52的氨基酸号50至65的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号52的氨基酸号98至107的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区、以及含有由序列号52的氨基酸号156至168的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号52的氨基酸号184至190的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号52的氨基酸号223至233的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗CD137scFv区；或

[0473] (e) 包含含有由序列号54的氨基酸号31至35的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号54的氨基酸号50至65的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号54的氨基酸号98至110的氨基酸序列构成的CDR3的重链可变区、以及含有由序列号54的氨基酸号159至171的氨基酸序列构成的CDR1、由序列号54的氨基酸号187至193的氨基酸序列构成的CDR2和由序列号54的氨基酸号226至236的氨基酸序列构成的CDR3的轻链可变区的抗CD137scFv区。

[0474] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体含有以下的(a)~(e)中的任一抗CD137scFv区:

[0475] (a) 含有由序列号46的氨基酸号1至118的氨基酸序列构成的重链可变区和由序列号46的氨基酸号134至242的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD137scFv区;

[0476] (b) 含有由序列号48的氨基酸号1至118的氨基酸序列构成的重链可变区和由序列号48的氨基酸号134至244的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD137scFv区;

[0477] (c) 含有由序列号50的氨基酸号1至111的氨基酸序列构成的轻链可变区和由序列号50的氨基酸号132至249的氨基酸序列构成的重链可变区的抗CD137scFv区;

[0478] (d) 含有由序列号52的氨基酸号1至118的氨基酸序列构成的重链可变区和由序列号52的氨基酸号134至244的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD137scFv区;或

[0479] (e) 含有由序列号54的氨基酸号1至121的氨基酸序列构成的重链可变区和由序列号54的氨基酸号137至247的氨基酸序列构成的轻链可变区的抗CD137scFv区。

[0480] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体含有以下的(a)~(e)中的任一抗CD137scFv区:

[0481] (a) 由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;

[0482] (b) 由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;

[0483] (c) 由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;

[0484] (d) 由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区;或

[0485] (e) 由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区。

[0486] 抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体中,抗CD137scFv区的数量和融合位点没有特别限定,例如,在抗TAA-抗CD3双特异性抗体的第一Fc多肽或第二Fc多肽的羧基末端或者轻链的氨基末端或羧基末端连接有抗CD137scFv区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体在抗TAA-抗CD3双特异性抗体的第一Fc多肽或第二Fc多肽的羧基末端连接有抗CD137scFv区。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体

在抗TAA-抗CD3双特异性抗体的第一Fc多肽和第二Fc多肽的羧基末端连接有抗CD137scFv区。

[0487] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137多特异性抗体为由以下的(a)~(d)的结构构成的三特异性抗体:

[0488] (a) 由含有抗TAA抗体的重链可变区的重链片段和含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链构成的抗TAA抗体的Fab区;

[0489] (b) 含有抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区;

[0490] (c) 由与(a)的Fab区的重链片段连接的第一Fc多肽和与(b)的抗CD3scFv区连接的第二Fc多肽构成的Fc区;以及

[0491] (d) 连接在第一Fc多肽和第二Fc多肽的羧基末端中的任一者或两者上的抗CD137scFv区。

[0492] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体为含有在含有抗TAA抗体的重链可变区的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗TAA抗体的重链、含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链、和含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽、进一步在第一Fc多肽和第二Fc多肽的羧基末端中的任一者或两者上连接有含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137scFv区的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体。

[0493] 一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体为含有在含有抗TAA抗体的重链可变区的重链片段上连接有第一Fc多肽的抗TAA抗体的重链、含有抗TAA抗体的轻链可变区的轻链、和含有与CD3结合的抗CD3抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽、进一步在第一Fc多肽和第二Fc多肽的羧基末端中的任一者或两者上连接有含有抗CD137抗体的重链可变区和轻链可变区的抗CD137scFv区的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体,其中,

[0494] 抗CD3scFv区为以下的(1)~(16)中的任一者:

[0495] (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0496] (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0497] (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0498] (4) 由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0499] (5) 由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0500] (6) 由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0501] (7) 由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0502] (8) 由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0503] (9) 由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0504] (10) 由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0505] (11) 由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0506] (12) 由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0507] (13) 由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0508] (14) 由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;

[0509] (15) 由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区;或

- [0510] (16) 由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区；
- [0511] 抗CD137scFv区为以下的(a) ~ (e)中的任一者：
- [0512] (a) 由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区；
- [0513] (b) 由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区；
- [0514] (c) 由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区；
- [0515] (d) 由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区；或
- [0516] (e) 由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区。
- [0517] 本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体中使用的抗TAA抗体只要含有与在人的癌细胞表面表达的TAA结合的重链可变区和轻链可变区则没有特别限定。TAA期望是仅在癌细胞观察到表达、或在癌细胞中过表达的抗原。
- [0518] 一个实施方式中，本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体中使用的抗TAA抗体为与以下的任一TAA结合的抗TAA抗体：
- [0519] HER2、HER3、HER4、CD19、CD20、CD22、CD33、CD38、CD40、CD44、CD70、CD123、CD138、CXCR3、CXCR5、CCR3、CCR4、CCR9、CRTH2、PMCH、CD4、CD25、CD200、内质素、BCMA、CD276、TSPAN8、CLDN4、CLDN6、CLDN18.2、ENPP3、SLC34A2、TROP2、MerTK、结合素-4、ASGR1、间皮素、PSMA、LIV-1、MUC1、MUC2、MUC4、MUC16、CDH6、CEACAM1、CEACAM3、CEACAM4、CEACAM5、CEACAM6、CEACAM7、CEACAM16、CEACAM18、CEACAM19、CEACAM20、CEACAM21、URLC10、NY-ESO-1、GAA、OFA、细胞周期蛋白B1、WT-1、CEF、VEGRR1、VEGFR2、TTK、HPV16、HPV16E7、HPV18、CEAIMA910、KOC1、SL-701、MART-1、gp100、酪氨酸酶、存活蛋白、MAGE-3.1、MAGE-10.A2、OVA BiP、gp209-2M、melan-A、NA17.A2、KOC1、CO16、DEPDC1、MPHOSPH1、MAGE12、ONT-10、GD2L、GD3L、URLC10、CDCA1、TF、PSA、TERT、STF-II、G17DT、ICT-107、Dex2、hTERT、PAP、TRP2、LRRC15、c-Met、PD-L1、FAP、EGFR、B3-H3、GPC2、GPC3、5T4。
- [0520] 一个实施方式中，本发明的抗TAA-抗CD3多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会对抗体的活性造成影响这一点是本领域已知的(*Analytical Biochemistry*, 2006; Vol. 348: p. 24-39)。
- [0521] <本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸>
- [0522] 本发明提供用于生产本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸(也称为“本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸”)。一个实施方式中，用于生产本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸为选自以下的(1) ~ (16)组成的组中的多核苷酸：
- [0523] (1) 含有编码由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；
- [0524] (2) 含有编码由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；
- [0525] (3) 含有编码由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；
- [0526] (4) 含有编码由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；
- [0527] (5) 含有编码由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的

碱基序列的多核苷酸；

[0528] (6) 含有编码由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0529] (7) 含有编码由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0530] (8) 含有编码由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0531] (9) 含有编码由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0532] (10) 含有编码由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0533] (11) 含有编码由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0534] (12) 含有编码由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0535] (13) 含有编码由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0536] (14) 含有编码由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0537] (15) 含有编码由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸；或

[0538] (16) 含有编码由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv区的碱基序列的多核苷酸。

[0539] 一个实施方式中,用于生产本发明的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体的多核苷酸为选自由下述(a)~(e)组成的组中的编码抗CD137scFv区的多核苷酸：

[0540] (a) 含有编码由序列号46的氨基酸号1至242的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0541] (b) 含有编码由序列号48的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0542] (c) 含有编码由序列号50的氨基酸号1至249的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸；

[0543] (d) 含有编码由序列号52的氨基酸号1至244的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸；或

[0544] (e) 含有编码由序列号54的氨基酸号1至247的氨基酸序列构成的抗CD137scFv区的碱基序列的多核苷酸。

[0545] 本领域技术人员可以参照<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的多核苷酸>容易地生产本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸。

[0546] <本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的表达载体>

[0547] 本发明另外提供含有编码本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸的表达

载体(也称为“本抗TAA-抗CD3多特异性抗体的表达载体”)。本领域技术人员可以参照<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的表达载体>容易地生产该表达载体。本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸可以分别包含在不同的载体中,或者,也可以两个以上多核苷酸包含在1个载体中。

[0548] <本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的宿主细胞>

[0549] 本发明另外提供含有编码本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞(也称为“本抗TAA-抗CD3多特异性抗体的宿主细胞”)。本领域技术人员可以参照<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的宿主细胞>容易地生产含有编码本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的多核苷酸的宿主细胞。

[0550] <本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的生产方法>

[0551] 本发明另外提供本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的生产方法(也称为“本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的生产方法”)。关于本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的生产,本领域技术人员可以参照<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的生产方法>容易地进行生产。

[0552] <本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物组合物>

[0553] 本发明另外提供含有本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体和药学上可接受的赋形剂的药物组合物(也称为“本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物组合物”)。本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物组合物的剂型、赋形剂、载体、添加剂等可列举上述的<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物组合物等>中记载的剂型、赋形剂、载体、添加剂等。另外,制剂化时的本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的添加量根据患者的症状程度、年龄、所使用的制剂的剂型、或抗体的结合效价等而不同,例如可以使用0.001mg/kg~100mg/kg左右。本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物组合物可以用于治疗对象的癌症。一个实施方式中,本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物组合物用于治疗对象的癌症。本领域技术人员可参照<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性>容易地制作本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物组合物。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一者或两者的抗体等的药物组合物也包括在本发明中。

[0554] <本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物用途>

[0555] 本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体、和含有它们的药物组合物可以用于治疗癌症。另外,本发明包括治疗癌症的方法,其包括将治疗有效量的本发明的抗TAA-抗CD3双特异性抗体给药于对象的步骤。另外,本发明包括用于治疗癌症的抗TAA-抗CD3多特异性抗体。另外,本发明包括本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体在制造用于治疗癌症的药物组合物中的应用。本发明还包括:包括将治疗有效量的本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体或本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物组合物给药于对象的步骤的治疗癌症的方法、用于治疗癌症的抗TAA-抗CD3多特异性抗体、本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体在制造用于治疗癌症的药物组合物中的应用(也统称为“本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物用途”)。成为本发明的抗TAA-抗CD37抗体等的药物用途的治疗对象的癌症可列举上述<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物组合物>中记载的癌症。本领域技术人员可以参照<本发明的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的药物用途>容易地实施本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体的药物用途。

[0556] <本发明的抗CD3scFv>

[0557] 本发明另外提供作为以下的(1)~(16)中的任一者的抗CD3scFv:

[0558] (1) 含有由序列号14的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号14的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0559] (2) 含有由序列号16的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号16的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0560] (3) 含有由序列号18的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号18的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0561] (4) 含有由序列号20的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号20的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0562] (5) 含有由序列号22的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号22的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0563] (6) 含有由序列号24的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号24的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0564] (7) 含有由序列号26的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号26的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0565] (8) 含有由序列号28的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号28的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0566] (9) 含有由序列号30的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号30的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0567] (10) 含有由序列号32的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号32的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0568] (11) 含有由序列号34的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号34的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0569] (12) 含有由序列号36的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号36的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0570] (13) 含有由序列号38的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可

变区和由序列号38的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0571] (14) 含有由序列号40的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号40的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;

[0572] (15) 含有由序列号42的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号42的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv;或

[0573] (16) 含有由序列号44的氨基酸号1至125的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的重链可变区和由序列号44的氨基酸号146至254的氨基酸序列构成的抗CD3抗体的轻链可变区的抗CD3scFv。

[0574] 一个实施方式中,本发明的抗CD3scFv为以下的(1)~(16)中的任一者:

[0575] (1) 由序列号14的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0576] (2) 由序列号16的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0577] (3) 由序列号18的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0578] (4) 由序列号20的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0579] (5) 由序列号22的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0580] (6) 由序列号24的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0581] (7) 由序列号26的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0582] (8) 由序列号28的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0583] (9) 由序列号30的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0584] (10) 由序列号32的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0585] (11) 由序列号34的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0586] (12) 由序列号36的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0587] (13) 由序列号38的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0588] (14) 由序列号40的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;

[0589] (15) 由序列号42的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv;或

[0590] (16) 由序列号44的氨基酸号1至254的氨基酸序列构成的抗CD3scFv。

[0591] 本发明另外提供编码上述抗CD3scFv的多核苷酸、以及含有多核苷酸的表达载体和含有多核苷酸或表达载体的宿主细胞。

[0592] 本发明的抗CD3scFv也可以作为含有与TAA结合的抗TAA抗体和本发明的抗CD3scFv区的抗TAA-抗CD3多特异性抗体来使用。进而,本发明的抗CD3scFv提供在细胞表面表达该抗CD3scFv的细胞、病毒载体或质粒载体。这样的细胞、病毒载体或质粒载体可以由本领域技术人员使用本发明的抗CD3scFv或编码该抗CD3scFv的多核苷酸来制作。

[0593] 在此,提供可用于进一步理解本发明而参照的特定实施例,但是这些的目的在于例示,而不是限定本发明。

[0594] 实施例

[0595] 目前,开发了以各种TAA为靶点的双特异性T细胞募集抗体作为癌症的治疗药。本申请人也成功地获得了使用选择性识别在癌细胞中表达的TSPAN8的抗TSPAN8抗体的抗

TSPAN8-抗CD3双特异性抗体(W02022/102768),并进行了面向该抗体的临床应用的研究。进而,本申请人为了制作用于研发与任意的TAA和CD3结合的双特异性抗体即抗TAA-抗CD3双特异性抗体的研发基础,进行了抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的制作研究中获得的抗CD3scFv的改良研究。

[0596] 通常,已知双特异性T细胞募集抗体的生理活性受到抗体形式、作为靶点的TAA的表达量、抗体所识别的表位、对TAA和CD3的亲合性、体内动力学等各种因素影响。本发明人们认为,从有效性和安全性的观点出发,抗CD3scFv对CD3的最佳亲合性根据所组合的TAA的表达量、抗TAA抗体对TAA的亲合性而不同。因此认为,通过准备多个具有多样的亲合性的抗CD3scFv来探索任意的抗TAA抗体与抗CD3scFv的最佳组合,可以获得亲合性的平衡达到最佳的双特异性T细胞募集抗体,实施了以下的研究。

[0597] [实施例1:具有多样的CD3结合亲合性的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的获得]

[0598] 为了基于由序列号2、4和6记载的氨基酸序列构成的多肽所构成的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的信息制作具有对CD3的多样的亲合性的抗CD3scFv组,进行了以下的研究。

[0599] 由序列号2构成的抗TSPAN8抗体的重链和由序列号6构成的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽中含有LALA突变、N297G突变、和杵臼结构(Knobs-into-holes)突变。LALA突变是指人Ig γ 1恒定区L234A和L235A的氨基酸突变。N297G突变是指人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸第297位的天冬酰胺向甘氨酸的置换(Protein cell、2018、Vol.9、p.63-73)。杵臼结构突变是指形成Fc区的1个Fc多肽(相当于序列号6的氨基酸号255至486的氨基酸序列)中的T366W突变、以及形成Fc区的另一个Fc多肽(相当于序列号2氨基酸号220至451的氨基酸序列)中的T366S、L368A和Y407V突变。上述突变位置为人Ig γ 1恒定区中的根据EU索引的氨基酸位置。

[0600] [实施例1-1:具有多样的CD3结合亲合性的抗CD3scFv的序列设计]

[0601] 为了推断序列号6的抗CD3scFv中可能影响到CD3结合亲合性的氨基酸残基,进行了使用(1)公知信息、(2)抗体的结构信息、(3)抗体的各氨基酸残基位置处的氨基酸出现频率信息、和(4)人类种系(Germline)序列信息的分析。以下详细说明方法。结果,设计出表1记载的66种改造体。

[0602] (1)作为公知信息,将专利文献1~4中记载的抗CD3scFv的氨基酸序列的改造例作为参考。专利文献1中记载了来自小鼠的抗CD3scFv。专利文献2~4中,进行了来自专利文献1的抗CD3scFv的人源化和CD3结合亲合性的改造。

[0603] (2)关于抗体的结构信息,将PDB(Protein Data Bank;<https://www.rcsb.org>)中登录的5FCS(DOI:10.2210/pdb5FCS/pdb)的信息作为参考。5FCS中包含与序列号6中所含的抗CD3scFv的氨基酸序列的氨基酸一致性高的双抗体(重链可变区95%一致,轻链可变区93%一致)的立体结构信息,作为用于调节亲合性的信息来利用。结构信息的观察使用Chemical Computing Group公司提供的综合计算化学系统MOE。

[0604] (3)关于各氨基酸残基位置的氨基酸出现频率信息,将abYsis(<http://www.abysis.org/abysis/>)作为参考。获知在抗体可变区的氨基酸序列中根据残基的位置出现的氨基酸存在倾向。例如,获知在人抗体中重链可变区的第一个氨基酸出现谷氨酰胺或谷氨酸的频率极高。换言之,具有偏离该出现频率的倾向的氨基酸的抗体作为抗体的序

列是不自然的,因此预测在物性上也不稳定。因此,判定该信息作为用于设计稳定抗体的信息有用。

[0605] (4) 关于人类种系序列信息,将IMGT(<http://www.IMGT.org/>)作为参考。以往,曾经成功降低了人源化抗体在临床上的抗原性风险。因此,为了将临床上的抗原性风险抑制得较低,以成为尽可能接近人类种系序列的序列的方式进行了改造体的设计。

[0606] 基于上述(1)~(4)的信息,进行了以下的分析和考察。具体而言,例如专利文献4中公开了:通过将重链可变区的Kabat编号的第58位(H58)的氨基酸从酪氨酸(Tyr)置换为丙氨酸(Ala),引起了抗CD3scFv对CD3的结合活性的下降。序列号6的H58的氨基酸也是Tyr,因此想到,如果置换为其它氨基酸则结合活性也会改变。但是,其结合活性下降的机制不明,因此利用PDB中登录的5FCS的结构信息进行了考察。使用MOE观察5FCS的结构信息时,推测H58的Tyr并非直接参与对抗原的结合,而是由于通过疏水性相互作用维持CDR-H2(基于Kabat编号的定义)的结构而发挥了很大作用。通常,已知CDR在对抗原的结合时发挥非常重要的作用,因此认为H58的Tyr通过支持CDR-H2的结构而维持对CD3的结合能力。换言之,推测H58不直接参与抗原结合,因此认为即使置换为其它氨基酸,完全丧失活性的可能性也低。参考H58中的氨基酸出现频率信息而选择出成为置换候补的氨基酸。结果,天冬氨酸(Asp)/异亮氨酸(Ile)/赖氨酸(Lys)/天冬酰胺(Asn)/精氨酸(Arg)/丝氨酸(Ser)/苏氨酸(Thr)等可成为进行置换的氨基酸的候补。因此认为,通过将H58置换为这些氨基酸,能够研发出稳定的改造抗体。最后,确认与序列号6近缘的人类种系序列时,IGHV3-72*01(IMGT登录号:X92206)的H58为谷氨酸(Glu),IGHV3-73*01(IMGT登录号:X70197)的H58为Ala。因此认为,如果H58被置换为Glu或Ala,则可抑制临床上的抗原性变高的风险。综合考虑上述,决定将H58中的置换氨基酸候补设为Asp/Ile/Lys/Asn/Arg/Ser/Thr/Glu/Ala中的任一者。

[0607] 与上述同样地,对于H30~31、H30~32、H31、H35、H52C、H52C&54、H58、H73、H100A、H101、H49、H100E、L89、L89&91、L91、L96和L36的各氨基酸,也决定了进行置换的氨基酸。最终设计了66种改造体的序列(表1)。

[0608] [实施例1-2:具有多样的CD3结合亲和性的抗TSPAN8-抗CD3scFv双特异性抗体组的获得]

[0609] 获得了实施例1-1中设计的66种改造体。

[0610] 按照常规方法合成编码序列号5记载的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的DNA,插入到pcDNA3.4TOPO载体(Thermo Fisher scientific公司、A14697)(以下将抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽称为“抗CD3scFv-Fc”)。将制作的载体称为Apid00000。按照常规方法合成编码66种改造体的氨基酸序列的DNA,插入到pcDNA3.4TOPO载体。将制作的载体称为Apid00001~Apid00066。同样地,基于编码抗TSPAN8抗体的碱基序列(序列号1和序列号3)合成DNA,插入到pcDNA3.4TOPO载体。将制作的载体分别称为Apid00067和Apid00068。

[0611] 为了得到含有改造前的抗CD3scFv的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体,将Apid00067和Apid00068以及编码抗CD3scFv的Apid00000转染于ExpiCHO-S(注册商标)细胞(Thermo Fisher Scientific公司、A29127)。按照常规方法,使用MabSelect SuRe(GE Healthcare公司、17-5438-02)纯化培养上清,得到纯化抗体。将得到的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体称为BTE-0001。另外,为了得到66种含有抗CD3scFv改造体的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体,

将ApiD00067和ApiD00068以及编码抗CD3scFv的ApiD00001~ApiD00066中的任一种转染于ExpiCHO-S(注册商标)细胞。按照常规方法,使用MabSelect SuRe纯化培养上清,得到66种纯化抗体。将得到的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体称为BTE-0002~BTE-0067。将抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体制作中使用的载体名称、抗CD3scFv的改造位点和置换氨基酸的信息示于表1。

[0612] [表1-1]

抗体名	重链 (抗-TSPAN8)	轻链 (抗-TSPAN8)	抗 CD3scFv- Fc (抗-CD3)	抗-CD3可变区的突变 (突变前氨基酸_Kabat编号 _突变后氨基酸)
BTE-0001	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00000	
BTE-0002	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00001	T_H31_I
BTE-0003	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00002	T_H31_G
BTE-0004	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00003	T_H31_S
BTE-0005	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00004	N_H30_S, T_H31_G, Y_H32_S
BTE-0006	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00005	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H
BTE-0007	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00006	N_H30_S, T_H31_S
BTE-0008	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00007	N_H35_S
BTE-0009	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00008	N_H35_H
BTE-0010	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00009	N_H35_D
BTE-0011	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00010	N_H35_A
BTE-0012	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00011	N_H35_G
BTE-0013	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00012	N_H35_W
BTE-0014	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00013	N_H35_Y
BTE-0015	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00014	Y_H52C_A
BTE-0016	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00015	Y_H52C_F
BTE-0017	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00016	Y_H52C_A, N_H54_S
BTE-0018	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00017	Y_H58_A
BTE-0019	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00018	Y_H58_E
BTE-0020	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00019	Y_H58_D
BTE-0021	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00020	Y_H58_I
BTE-0022	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00021	Y_H58_K
BTE-0023	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00022	Y_H58_N
BTE-0024	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00023	Y_H58_R
BTE-0025	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00024	Y_H58_S
BTE-0026	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00025	Y_H58_T
BTE-0027	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00026	D_H73_T
BTE-0028	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00027	D_H73_N
BTE-0029	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00028	D_H73_E
BTE-0030	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00029	D_H73_K
BTE-0031	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00030	S_H100A_E
BTE-0032	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00031	S_H100A_P

[0614] [表1-2]

[0615]

BTE-0033	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00032	S_H100A_A
BTE-0034	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00033	S_H100A_D
BTE-0035	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00034	S_H100A_F
BTE-0036	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00035	S_H100A_G
BTE-0037	ApiD00067	ApiD00068	A_aiD00036	S_H100A_H

BTE-0038	ApiD00067	ApiD00068	A_oiD00037	S_H100A_I
BTE-0039	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00038	S_H100A_K
BTE-0040	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00039	S_H100A_L
BTE-0041	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00040	S_H100A_M
BTE-0042	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00041	S_H100A_N
BTE-0043	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00042	S_H100A_Q
BTE-0044	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00043	S_H100A_R
BTE-0045	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00044	S_H100A_T
BTE-0046	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00045	S_H100A_V
BTE-0047	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00046	S_H100A_Y
BTE-0048	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00047	A_H101_D
BTE-0049	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00048	A_H49_G
BTE-0050	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00049	A_H49_S
BTE-0051	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00050	W_H100E_Y
BTE-0052	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00051	A_L89_L
BTE-0053	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00052	A_L89_L,W-L91_Y
BTE-0054	ApiD00067	A_oiD00068	ApiD00053	A_L89_L,W—L91_S
BTE-0055	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00054	A_L89_V,W_L91_Y
BTE-0056	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00055	W_L91_Y
BTE-0057	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00056	W_L96_Y
BTE-0058	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00057	W_L96_F
BTE-0059	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00058	W_L96_G
BTE-0060	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00059	W_L96_L
BTE-0061	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00060	W_L96_P
BTE-0062	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00061	W_L96_R
BTE-0063	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00062	W_L96_V
BTE-0064	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00063	V_L36F
BTE-0065	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00064	V_L36_Y
BTE-0066	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00065	V_L36_H
BTE-0067	ApiD00067	ApiD00068	ApiD00066	V_L36_L

[0616] [实施例1-3:CD3 ϵ δ 复合蛋白的制备]

[0617] 为了评价抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体对CD3的结合活性而获得CD3 ϵ δ 复合蛋白。将导入了CD3 ϵ 或CD3 δ 的2个表达载体导入到细胞,获得CD3 ϵ δ 复合蛋白。作为表达载体,使用pcDNA3.4TOPO载体。在第1个表达载体中,插入编码在CD3 ϵ 的信号序列和细胞外结构域(相当于UNIPROT登录号:P07766的氨基酸号1~126)上依次连接有羊驼Fc(相当于Genbank登录号:CA079574.1的氨基酸号102~328)的氨基酸序列的DNA。在第2个载体中插入编码在CD3 δ 的信号序列和细胞外结构域(相当于UNIPROT登录号:P04234的氨基酸号1~105)上依次连接有羊驼Fc(相当于Genbank登录号:CA079574.1的氨基酸号102~327)的氨基酸序列的DNA。DNA按照常规方法来合成。将制作的2个载体转染于ExpiCHO-S(注册商标)细胞。将培养

上清通过使用MabSelect SuRe的亲纯化法和使用HiTrap(注册商标)Q High Performance(GE Healthcare公司、17-1154-01)的阴离子交换法进行纯化,得到CD3 ϵ δ 复合蛋白。

[0618] [实施例1-4:具有多样的CD3结合亲和性的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体组的CD3结合活性评价]

[0619] 利用ELISA法评价作为抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的BTE-0001~BTE-0067对CD3的结合活性。ELISA按照常规方法进行。将实施例1-3中获得的CD3 ϵ δ 复合蛋白固相化于板上。作为被检抗体,使用BTE-0001~BTE-0067。作为二抗,使用山羊抗人IgG Fc,Multi-Species SP ads-HRP(SouthernBiotech公司、2014-05)。检测试剂使用TMB+底物-发色团(Substrate-Chromogen)(Dako公司、S1599)。吸光度的测定使用Infinite M200pro(Tecan公司)。将由测得的吸光度计算出的EC50值示于表2。EC50值是将同一板内的最大值固定为顶部、将同一板内的空白中的最小值固定为底部而使用GraphPad Prism的变斜率模型(四参数)计算而得的。另外,BTE-0001总是作为对照在各板中进行测定,因此仅将BTE-0001的EC50值以多张板的平均值来示出。

[0620] [实施例1-5:具有多样的CD3结合亲和性的抗TSPAN8-抗CD3scFv双特异性抗体组的稳定性评价]

[0621] 为了评价BTE-0001~BTE-0067的稳定性,实施热转移试验(以下记作“TSA”)。在TSA中,测定50%的分子的折叠崩坏变性中点温度(以下记作“T_m”)。通常已知T_m越高则蛋白质的热稳定性越高。TSA中使用蛋白质热转移染料试剂盒(Protein Thermal Shift Dye Kit)(Applied biosystems公司、4461146、以后记作“Kit”)。按照Kit的规程将各抗体和Kit附带的荧光色素混合,分注于96孔PCR板(Applied biosystems公司、4346907),使用StepOnePlus实时PCR系统(Applied biosystems公司)进行测定。TSA的测定通过从25℃升温到99℃来实施。分析中使用蛋白质热转移软件(Applied biosystems公司、4466038)。

[0622] 根据测定中得到的谱图,按照常规方法计算出最低T_m。另外,将与BTE-0001的T_m之差作为dT_m。将结果示于表2。

[0623] 其结果是,通过改造而得到的BTE-0002~BTE-0067大多是T_m与改造前的BTE-0001相比为相同或更低的值。T_m高于BTE-0001的仅为BTE-0006~BTE-0008、BTE-0010、BTE-0034、BTE-0048、BTE0062。虽然期待T_m达到约63℃以上,但是得到的抗体大多在60℃附近具有T_m,表明热稳定性不充分。

[0624] [表2-1]

[0625]

抗体名	ELISA EC50 (ng/mL)	TSA T _m (°C)	TSA dT _m (°C)
BTE-0001	6.52	60.0	0
BTE-0002	10.4	59.7	-0.3
BTE-0003	7.67	58.9	-1.1
BTE-0004	5.37	60.0	0
BTE-0005	38.7	59.3	-0.7
BTE-0006	224	61.1	1.1
BTE-0007	3.79	61.1	1.1
BTE-0008	431	63.3	3.3
BTE-0009	286	60.0	0
BTE-0010	2040	61.9	1.9
BTE-0011	378	59.7	-0.3
BTE-0012	993	60.0	0
BTE-0013	>7500	N.T.	N.T.
BTE-0014	>7500	N.T.	N.T.
BTE-0015	17.6	60.0	0
BTE-0016	4.20	59.3	-0.7
BTE-0017	30.0	59.3	-0.7
BTE-0018	61.3	59.7	-0.3
BTE-0019	577	60.0	0
BTE-0020	1260	60.0	0
BTE-0021	38.7	58.6	-1.4
BTE-0022	46.2	57.1	-2.9
BTE-0023	208	58.9	-1.1
BTE-0024	41.2	57.1	-2.9
BTE-0025	49.4	60.0	0
BTE-0026	45.9	59.3	-0.7
BTE-0027	2950	N.D.	N.D.
BTE-0028	380	N.D.	N.D.
BTE-0029	80.2	N.D.	N.D.
BTE-0030	>7500	N.T.	N.T.
BTE-0031	17.4	60.0	0
BTE-0032	255	58.9	-1.1
BTE-0033	10.4	58.6	-1.4

[0626] [表2-2]

[0627]

BTE-0034	47.1	60.8	0.8
BTE-0035	87.5	57.1	-2.9
BTE-0036	4.31	59.7	-0.3
BTE-0037	31.0	58.6	-1.4
BTE-0038	438	56.7	-3.3
BTE-0039	8.35	58.2	-1.8
BTE-0040	38.9	57.5	-2.5

BTE-0041	40.7	58.2	-1.8
BTE-0042	57.5	59.3	-0.7
BTE-0043	19.8	58.9	-1.1
BTE-0044	8.44	57.8	-2.2
BTE-0045	8.25	58.9	-1.1
BTE-0046	320	57.1	-2.9
BTE-0047	135	56.7	-3.3
BTE-0048	142	61.5	1.5
BTE-0049	4.98	58.9	-1.1
BTE-0050	9.99	56.4	-3.6
BTE-0051	7.35	59.7	-0.3
BTE-0052	1230	54.9	-5.1
BTE-0053	>7500	56.4	-3.6
BTE-0054	>7500	56.4	-3.6
BTE-0055	35.5	58.2	-1.8
BTE-0056	98.9	59.7	-0.3
BTE-0057	1010	58.2	-1.8
BTE-0058	847	58.2	-1.8
BTE-0059	>7500	55.3	.4.7
BTE-0060	>7500	58.2	-1.8
BTE-0061	>7500	58.9	-1.1
BTE-0062	>7500	61.1	1.1
BTE-0063	>7500	58.2	-1.8
BTE-0064	1870	58.6	-1.4
BTE-0065	>7500	57.5	-2.5
BTE-0066	>7500	60.0	0
BTE-0067	3.34	58.6	-1.4

[0628] 表中的N.D.表示不确定,N.T.表示未测定。

[0629] [实施例2:具有多样的CD3结合亲和性且稳定性得到了改善的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的获得]

[0630] 实施例1中,发明人们成功得到了具有多样的CD3结合亲和性的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体组。但是,同时也暗示了这些抗体的热稳定性不充分。因此,从实施例1中得到的抗体,以CD3结合亲和性为指标选择11种抗体,以改善稳定性为目标进行了研究。选择了作为高结合活性抗体的BTE-0015、BTE-0025、BTE-0031、BTE-0034、作为中结合活性抗体的BTE-0006、BTE-0009、BTE-0048、作为低结合活性抗体的BTE-0008、BTE-0011、BTE-0012、BTE-0019。以下,将这些抗体也统称为“11种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体”。

[0631] [实施例2-1:导入了用于改善稳定性的突变的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的序列设计]

[0632] 为了提高11种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的稳定性而设计了改造体。在设计改

造体时,参考了美国专利第9701759号和日本专利第5686953号。具体而言,以美国专利第9701759号的图27记载的 $T_m(^{\circ}\text{C})$ 和产量(Yield)(mg/mL)的物性值为参考进行了序列与物性值的相关分析。例如,在美国专利第9701759号的图27所记载的55种抗体中的53种中,轻链可变区的第75位(L75)的氨基酸为亮氨酸(Leu),但XENP11838和XENP12149为异亮氨酸(Ile)。获知这些抗体与另外的53种抗体相比有 T_m 和Yield高的倾向。因此,在11种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体中,导入将L75的氨基酸从Leu改造为Ile的突变。对于全部氨基酸残基进行同样的相关分析,结果获知,在重链可变区的第100位(H100)为天冬氨酸(Asp)的情况、轻链可变区的第58位(L58)为缬氨酸(Val)的情况、轻链可变区的第85位(L85)为天冬氨酸(Asp)的情况、和轻链可变区的第95位(L95)为组氨酸(His)的情况下,有改造抗体的 T_m 和Yield高的倾向。需要说明的是,上述L75、H100、L58、L85、L95均为Kabat编号中的编号。

[0633] 基于该结果,对于11种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体,设计了向L75导入了Ile突变、向H100导入了Asp突变、向L58导入了Val突变、向L85导入了Asp突变和向L95导入了His突变的55种抗体。

[0634] 进而,在55种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体中,代替实施例1中使用的N297G,导入将EU索引中的第329位的脯氨酸(Pro)置换为Ala的P329A突变。为了确认由N297G变更为P329A对稳定性造成的影响,还设计了将11种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的N297G变更为P329A的双特异性抗体(BTE-0125~BTE-0135)。将实施例2-1中制作的抗体也称为“66种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体”。将66种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的制作中使用的载体名称、抗CD3scFv的改造位点和置换氨基酸的信息示于表3。

[0635] [表3-1]

[0636]

抗体名	重链 (抗-TSPAN8)	轻链 (抗-TSPAN8)	抗 CD3scFv- Fc (抗-CD3)	抗-CD3可变区的突变 (突变前氨基酸_Kabat编号 突变后氨基酸)
BTE-0070	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00078	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, N_H100_D
BTE-0071	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00079	N_H35_S, N_H100_D
BTE-0072	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00080	N_H35_H, N_H100_D
BTE-0073	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00081	N_H35_A, N_H100_D
BTE-0074	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00082	N_H35_G, N_H100_D
BTE-0075	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00083	Y_H52C_A, N_H100_D
BTE-0076	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00084	Y_H58_E, N_H100_D
BTE-0077	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00085	Y_H58_S, N_H100_D
BTE-0078	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00086	N_H100_D, S_H100A_E
BTE-0079	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00087	N_H100_D, S_H100A_D
BTE-0080	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00088	N_H100_D, A_H101_D
BTE-0081	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00136	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, T_L58_V
BTE-0082	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00137	N_H35_S, T_L58_V
BTE-0083	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00138	N_H35_H, T_L58_V
BTE-0084	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00139	N_H35_A, T_L58_V
BTE-0085	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00140	N_H35_G, T_L58_V
BTE-0086	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00141	Y_H52C_A, T_L58_V
BTE-0087	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00142	Y_H58_E, T_L58_V
BTE-0088	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00143	Y_H58_S, T_L58_V
BTE-0089	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00144	S_H100A_E, T_L58_V
BTE-0090	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00145	S_H100A_D, T_L58_V
BTE-0091	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00146	A_H101_D, T_L58_V
BTE-0092	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00100	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, L_L75_I
BTE-0093	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00101	N_H35_S, L_L75_I
BTE-0094	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00102	N_H35_H, L_L75_I
BTE-0095	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00103	N_H35_A, L_L75_I
BTE-0096	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00104	N_H35_G, L_L75_I
BTE-0097	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00105	Y_H52C_A, L_L75_I
BTE-0098	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00106	Y_H58_E, L_L75_I
BTE-0099	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00107	Y_H58_S, L_L75_I
BTE-0100	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00108	S_H100A_E, L_L75_I
BTE-0101	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00109	S_H100A_D, L_L75_I
BTE-0102	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00110	A_H101_D, L_L75_I

[0637]

[表3-2]

[0638]

BTE-0103	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00111	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, E_L85_D
BTE-0104	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00112	N_H35_S, E_L85_D
BTE-0105	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00113	N_H35_H, E_L85_D
BTE-0106	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00114	N_H35_A, E_L85_D
BTE-0107	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00115	N_H35_G, E_L85_D
BTE-0108	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00116	Y_H52C_A, E_L85_D
BTE-0109	ApiD00133	A; iD00068	ApiD00117	Y_H58_E, E_L85_D
BTE-0110	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00118	Y_H58_S, E_L85_D
BTE-0111	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00119	S_H100A_E, E_L85_D
BTE-0112	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00120	S_H100A_D, E_L85_D
BTE_0113	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00121	A_H101_D, E_L85_D
BTE-0114	A; iD00133	ApiD00068	ApiD00122	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, L_L95_H
BTE-0115	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00123	N_H35_S, L_L95_H

BTE-0116	A_3iD00133	ApiD00068	ApiD00124	N_H35_H,L_Lg5_H
BTE-0117	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00125	N_H35_A,L_L95_H
BTE-0118	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00126	N_H35_G,L_L95_H
BTE-0119	A;iD00133	ApiD00068	ApiD00127	Y_H52C_A,L_L95_H
BTE-0120	A;iD00133	ApiD00068	ApiD00128	Y_H58_E,L_L95_H
BTE-0121	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00129	Y_H58_S_L_L95_H
BTE-0122	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00130	S_H100A_E,L_Lg5_H
BTE-0123	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00131	S_H100A_D,L_L95_H
BTE-0124	A;iD00133	ApiD00068	ApiD00132	A_H101_D,L_L95_H
BTE-0125	A;iD00133	ApiD00068	ApiD00147	N_H30_S,T_H31_D,Y_H32_H
BTE-0126	A;iD00133	ApiD00068	ApiD00148	N_H35_S
BTE-0127	A;iD00133	ApiD00068	ApiD00149	N_H35_H
BTE-0128	A;iD00133	ApiD00068	ApiD00150	N_H35_A
BTE-0129	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00151	N_H35_G
BTE-0130	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00152	Y_H52C_A
BTE-0131	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00153	Y_H58_E
BTE-0132	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00154	Y_H58_S
BTE-0133	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00155	S_H100A_E
BTE-0134	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00156	S_H100A_D
BTE-0135	ApiD00133	ApiD00068	ApiD00157	A_H101_D

[0639] [实施例2-2:导入了用于改善稳定性的突变的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的获得]

[0640] 按照常规方法合成了编码66种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的抗CD3scFv-Fc的氨基酸序列的DNA,插入到pcDNA3.4TOPO载体。将制作的载体称为ApiD00078~ApiD00088、ApiD00100~ApiD00132和ApiD00136~ApiD00157(以下也称为“66种抗CD3scFv用载体”) (表3)。随着将这些载体的Fc区中所含的N297G突变变更为P329A突变,合成了将抗TSPAN8抗体的重链氨基酸序列(序列号2)的N297G突变变更为P329A突变的DNA,插入到pcDNA3.4TOPO载体。将制作的载体称为ApiD00133。

[0641] 为了得到改造的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体,将66种抗CD3scFv用载体中的任一种以及ApiD00133和ApiD00068转染于ExpiCHO-S(注册商标)细胞。按照常规方法使用MabSelect SuRe纯化培养上清,得到BTE-0070~BTE-0135这66种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体。将抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体制作中使用的载体名称、抗CD3scFv的改造位点和置换氨基酸的信息示于表3。

[0642] [实施例2-3:导入了用于改善稳定性的突变的抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体组的CD3结合活性评价]

[0643] 利用实施例1-4记载的ELISA法评价了66种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体对CD3的结合活性。其结果是,虽然为了改善稳定性而向抗CD3scFv中加入了各种改造,但是对CD3的多样的结合活性未受到明显损害,大体维持了原来的结合活性。将对CD3的结合的EC50值和对BTE-0001的EC50值的比示于表4。

[0644] [实施例2-4:导入了用于改善稳定性的突变的66种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体

的稳定性评价]

[0645] 利用实施例1-5记载的TSA评价了66种抗TSPAN8-抗CD3双特异性抗体的稳定性。将得到的 T_m 和与BTE-0001的 T_m 之差 dT_m 示于表4。将ELISA EC_{50} 为1250ng/mL以下、TSA中的 T_m 为63°C以上的抗体作为稳定性得到了改善的抗体。进而,选择出相对于蛋白制备时的培养基量的抗体产生量(Yield)为1mg/mL以上的抗体。进而,将选择出的34种抗TSPAN8-抗CD3scFv双特异性在40°C静置1周,评价稳定性。抗体的稳定性通过使用表面等离子共振 (SPR) 法测定静置前后的抗体的CD3结合活性来进行评价。基于SPR法的测定中,使用BiacoreT-200(Cytiva公司)。Biacore测定中使用的芯片如下制作:在S系列传感器芯片CM5 (Cytiva公司、29104988) 上,使用His捕获试剂盒 (Cytiva公司、28995056) 和氨基偶联试剂盒 (Cytiva公司、BR100050) 固定抗His抗体,接着使人CD3 epsilon&CD3 delta异二聚体蛋白,His标签&无标签 (MALS验证) (AcroBiosystems公司、CDD-H52W1) 进行结合,从而制作。计算出将静置前的CD3结合活性设为100%时的静置后的CD3结合活性 (Biacore40C1W) (表4)。Biacore40C1W中的相对值越低,则表示静置所引起的保存稳定性越差。结果发现了 T_m 为63°C以上且残存活性保持78%以上的抗体BTE-0079、0080、0090、0091、0092、0097~0102、0111~0113、0134、0135)。将这16种中使用的抗CD3scFv也称为“16种抗CD3scFv”。

[0646] [表4-1]

[0647]

抗体名	ELISA EC50 (ng/mL)	T _m TSA (°C)	dT _m TSA (°C)	Biacore 40C1W(%)
BTE-0070	632	63.5	3.5	N.T.
BTE-0071	>7500	66.3	6.3	N.T.
BTE-0072	1640	62.4	2.4	N.T.
BTE-0073	1330	63.0	3.0	N.T.
BTE-0074	>7500	64.0	4.0	N.T.
BTE-0075	113	62.4	2.4	N.T.
BTE-0076	438	62.7	2.7	N.T.
BTE-0077	274	62.2	2.2	N.T.
BTE-0078	634	63.7	3.7	N.T.
BTE-0079	220	64.0	4.0	78.9
BTE-0080	1180	64.3	4.3	93.9
BTE-0081	152	63.8	3.8	67.2
BTE-0082	322	66.0	6.0	57.2
BTE-0083	165	62.1	2.1	N.T.
BTE-0084	361	61.2	1.2	N.T.
BTE-0085	729	61.6	1.6	N.T.
BTE-0086	37.9	62.1	2.1	N.T.
BTE-0087	1020	62.2	2.2	N.T.
BTE-0088	55.6	61.9	1.9	N.T.
BTE-0089	97.5	63.0	3.0	N.T.
BTE-0090	120	63.7	3.7	103.4
BTE-0091	623	64.1	4.1	103.3
BTE-0092	187	64.6	4.6	89.3
BTE-0093	90.3	66.9	6.9	N.D.
BTE-0094	297	63.0	3.0	N.T.
BTE-0095	410	63.5	3.5	N.T.
BTE-0096	802	64.1	4.1	59.5
BTE-0097	30.8	63.1	3.1	83.2
BTE-0098	438	63.5	3.5	79.2
BTE-0099	68.2	63.1	3.1	82.8
BTE-0100	247	64.1	4.1	83.6

[0648] [表4-2]

[0649]

BTE-0101	113	64.3	4.3	83.3
BTE-0102	770	64.4	4.4	101.2
BTE-0103	180	64.1	4.1	42.1
BTE-0104	499	66.6	6.6	N.D.
BTE-0105	201	63.0	3.0	N.T.
BTE-0106	327	62.7	2.7	N.T.
BTE-0107	594	63.0	3.0	N.T.
BTE-0108	8.31	62.9	2.9	72.2

BTE-0109	217	63.2	3.2	N.T.
BTE-0110	47,1	62.8	2.8	N.T.
BTE-0111	66,0	63.7	3.7	78.7
BTE-0112	43.3	64.1	4.1	84.8
BTE-0113	363	64.6	4.6	101.4
BTE-0114	86.0	63.5	3.5	N.T.
BTE-0115	358	65.3	5.3	57.5
BTE-0116	187	61.8	1.8	N.T.
BTE-0117	90.0	61.2	1.2	N.T.
BTE-0118	709	61.5	1.5	N.T.
BTE-0119	23.2	62.7	2.7	N.T.
BTE-0120	240	62.7	2.7	N.T.
BTE-0121	45.8	62.2	2.2	N.T.
BTE-0122	242	63.5	3.5	N.T.
BTE-0123	192	64.3	4.3	N.T.
BTE-0124	378	63.7	3.7	69.7
BTE-0125	163	63.1	3.1	51.8
BTE-0126	330	65.4	5.4	60.0
BTE-0127	122	61.5	1.5	41.6
BTE-0128	174	61.3	1.3	64.9
BTE-0129	469	61.9	1.9	52.8
BTE-0130	10.9	61.8	1.8	77.7
BTE-0131	269	62.1	2.1	79.2
BTE-0132	31.5	61.8	1.8	72.9
BTE-0133	69.3	62.6	2.6	69.0
BTE-0134	46.0	63.1	3.1	86.8
BTE-0135	204	63.5	3.5	84.8

[0650] 表中的N.D.表示不确定,N.T.表示未测定。

[0651] [实施例3:抗CD37-抗CD3双特异性抗体的获得]

[0652] 为了确认实施例2-4中获得的16种抗CD3scFv是否也可以用于与任意的抗TAA抗体的双特异性抗体,尝试使用CD37抗体获得抗CD37-抗CD3双特异性抗体。

[0653] 抗CD37抗体使用了来自国际公开第2015017552的序列号10和序列号12所示的抗CD37抗体。基于国际公开第2015017552的序列号9和序列号11记载的编码抗CD37抗体的DNA序列合成了DNA,插入到pcDNA3.4TOP0载体。将制作的载体称为Apid00158和Apid00159。将Apid00158和Apid00159以及编码抗CD3scFv的Apid00087、Apid00088、Apid00145、Apid00146、Apid00100、Apid00105~Apid00110、Apid00119~Apid00121、Apid00156、Apid00157中的任一种转染于ExpiCHO-S(注册商标)细胞。按照常规方法,使用MabSelect SuRe纯化培养上清。将得到的16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体也称为BTE-0136~0149、0151、0152(以下记作“16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体”)。将抗CD37-抗CD3双特异性抗体

制作中使用的载体名称、抗CD3scFv的改造氨基酸号和突变的信息示于表5。

[0654] [表5]

抗体名	重链 (抗-CD37)	轻链 (抗-CD37)	抗CD3scFv-Fc (抗-CD3)	抗-CD3可变区的突变 (突变前氨基酸_Kabat编号 _突变后氨基酸)
BTE-0136	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00087 (序列号 14)	N_H100_D, S_H100A_D
BTE-0137	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00088 (序列号 20)	N_H100_D, A_H101_D
BTE-0138	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00145 (序列号 22)	S_H100A_D, T_L58_V
BTE-0139	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00146 (序列号 24)	A_H101_D, T_L58_V
BTE-0140	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00100 (序列号 26)	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, L_L75_I
BTE-0141	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00105 (序列号 28)	Y_H52C_A, L_L75_I
BTE-0142	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00106 (序列号 16)	Y_H58_E, L_L75_I
[0655] BTE-0143	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00107 (序列号 30)	Y_H58_S, L_L75_I
BTE-0144	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00108 (序列号 32)	S_H100A_E, L_L75_I
BTE-0145	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00109 (序列号 34)	S_H100A_D, L_L75_I
BTE-0146	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00110 (序列号 36)	A_H101_D, L_L75_I
BTE-0147	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00119 (序列号 38)	S_H100A_E, E_L85_D
BTE-0148	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00120 (序列号 18)	S_H100A_D, E_L85_D
BTE-0149	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00121 (序列号 40)	A_H101_D, E_L85_D
BTE-0151	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00156 (序列号 42)	S_H100A_D
BTE-0152	ApiD00158	ApiD00159	ApiD00157 (序列号 44)	A_H101_D

[0656] [实施例4:抗CD37-抗CD3双特异性抗体的体外活性评价]

[0657] 为了从实施例3中制作的16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体中筛选稳定性和活性优良的抗体,如下进行对人CD3的结合活性、稳定性、在CD37表达细胞与人T细胞的共培养体系中的细胞毒作用(Redirected T Cell Cytotoxicity:RTCC)、细胞因子产生的评价。

[0658] [实施例4-1:16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体的结合活性评价]

[0659] 利用实施例1-4中记载的ELISA法评价16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体对CD3的结合活性。其结果是,可以确认与抗CD37抗体的双特异性抗体中,16种抗CD3双特异性抗体大体上也维持了对CD3的多样的结合活性。将16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体对CD3的结合活性的EC50值示于表6。

[0660] [实施例4-2:16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体的稳定性评价]

[0661] 利用实施例1-5中记载的TSA对16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体的稳定性进行评

价。将 T_m 和与BTE-0001的 T_m 之差 dT_m 示于表6。进而,测定在40℃静置1周后的抗CD3结合活性的残存率(表6)。16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体在Biacore40C1W中均显示出约70%以上的稳定性。特别是BTE-0136、0138、0141、0142、0144、0145、0148、0151,显示出80%以上的残存率,表明为稳定性高的抗体。

[0662] [表6]

抗体名	ELISA EC50 (ng/mL)	T_m TSA (℃)	dT_m TSA (℃)	Biacore 40C1W(%)
BTE-0136	66.9	64.3	4.3	98.4
BTE-0137	1600	64.6	4.6	79.7
BTE-0138	71.0	63.7	3.7	98.9
BTE-0139	444	64.3	4.3	71.4
BTE-0140	205	64.6	4.6	69.6
BTE-0141	29.0	63.4	3.4	111.7
BTE-0142	292	63.7	3.7	84.0
BTE-0143	64.4	63.3	3.3	77.7
BTE-0144	138	64.1	4.1	85.2
BTE-0145	85.4	64.4	4.4	101.2
BTE-0146	488	65.3	5.3	70.1
BTE-0147	31.7	63.8	3.8	73.9
BTE-0148	36.4	64.4	4.4	88.8
BTE-0149	209	64.9	4.9	72.2
BTE-0151	74.7	63.1	3.1	90.2
BTE-0152	360	63.7	3.7	70.2

[0664] [实施例4-3:16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体的RTCC活性评价]

[0665] 对通过使抗CD37-抗CD3双特异性抗体作用于表达人CD37和GFPSpark(注册商标)的CHO-K1细胞(CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞)与从人PBMC分离出的T细胞的共培养体系而诱导的体外RTCC活性进行评价。

[0666] 1:CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞的制作

[0667] 利用以下方法制作CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞。人CD37表达载体通过将编码人CD37(NCBI登录号:NP_001765.1)的DNA按照常规方法插入到pcDNA3.4TOPO载体而构建。GFPSpark表达载体通过从PD-L1-GFPSpark表达载体(SinoBiological公司、HG10084-ACG)中按照常规方法除去PD-L1序列而构建。将这两种质粒载体使用Lipofectamine3000转染试剂(Thermo Fisher Scientific公司、L3000015)转染于CHO-K1细胞(American Type Culture Collection、CCL-61),用含有遗传霉素(Geneticin)(Thermo Fisher Scientific公司、10131-027)和潮霉素B(Hygromycin B)Gold(InvivoGen公司、ant-hg-5)的培养基进行培养,筛选基因导入细胞。分离出单个克隆细胞后,将利用流式细胞术确认到人CD37和GFPSpark这两者的表达的细胞作为CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞,用于以下的实验。

[0668] 2: 扩增的panT细胞的制作

[0669] 使用人PanT细胞分离试剂盒 (Miltenyi Biotec公司、130-096-535), 基于所附的规程从人PBMC (ALLCELLS公司、PB003F) 中分离出panT细胞 (包含CD4T细胞和CD8T细胞这两者)。将分离出的panT细胞稀释至 1×10^6 个/mL, 添加与panT细胞数量相等的用于T细胞扩增和活化的Dynabeads人T-活化剂CD3/CD28 (Dynabeads Human T-Activator CD3/CD28 for T Cell Expansion and Activation) (Thermo Fisher Scientific公司、11131D) 和终浓度30U/mL的人IL-2 (PeproTech公司、200-02), 在37°C、5% CO₂培养箱中培养。在培养开始4天后、6天后、8天后, 以 5×10^5 个/mL的浓度传代。在培养开始4天后和6天后的传代时, 以终浓度30U/mL添加人IL-2。在培养开始11天后回收细胞, 利用磁铁除去用于T细胞扩增和活化的Dynabeads人T-活化剂CD3/CD28后悬浮于CELLBANKER1 (日本全药工业株式会社、CB011), 冷冻保存。将制备的细胞称为扩增的panT细胞。

[0670] 3: RTCC试验

[0671] 将利用培养用培养基制备为 5×10^4 个/mL的CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞悬浮液以各20 μ L (1×10^3 个) 接种于384孔平底板 (Greiner公司、781182), 在37°C、5% CO₂培养箱中培养3小时。对于BTE-0136、0138、0141 ~ 0145、0147、0148、0151, 将3.0 μ g/mL设为最高浓度以4倍公比稀释至2.9pg/mL (换算成终浓度为0.95pg/mL ~ 1.0 μ g/mL)。对于BTE-0137、0139、0140、0146、0149、0152, 将30 μ g/mL设为最高浓度, 以4倍公比稀释至29pg/mL (换算成终浓度为9.5pg/mL ~ 10 μ g/mL)。将稀释后的抗体向培养中的384孔板中各添加20 μ L。向其中添加各20 μ L利用培养用培养基制备为 5×10^5 个/mL的扩增的panT细胞, 在37°C、5% CO₂培养箱中培养3天后, 利用IncuCyte (注册商标) ZOOM (ザルトリウス公司) 测定各孔的GFPSpark荧光面积, 作为活细胞数的指标。将各种抗CD37-抗CD3双特异性抗体浓度与GFPSpark荧光面积的关系示于图1-1和1-2。结果, 除BTE-0137以外的15种抗CD37-抗CD3双特异性抗体使CHO-K1_人CD37/GFPSpark细胞的活细胞数减少。

[0672] 4: 16种抗CD37-抗CD3双特异性抗体的T细胞活化作用的评价

[0673] 通过利用ELISA法测定实施例4-3-3的RTCC试验的培养上清中所含的IFN- γ 和TNF- α 来评价抗CD37-抗CD3双特异性抗体的T细胞活化作用。测定中, 使用BD OptEIA人IFN- γ ELISA (BD Biosciences公司、555142)、和人TNF-alpha DuoSet ELISA (R&D Systems公司、DY210-5)。将检测到的IFN- γ 和TNF- α 的量相对于所添加的抗CD37-抗CD3双特异性抗体的浓度作图而成的图示于图2-1 ~ 2-4。结果, 除BTE-0137以外的15种抗CD37-抗CD3双特异性抗体诱导了IFN- γ 和TNF- α 的产生, 但是对于大部分抗体而言, 在一定浓度以上的抗体存在下, IFN- γ 和TNF- α 的产生量反而下降。通常已知对于以通过识别两个抗原分子而在细胞间形成交联的方式设计的抗体而言, 在高浓度条件下, 抗原被仅与一个抗原分子进行了结合的抗体占有, 由此细胞间的交联形成受到抑制 (AAPS J. 2019、Vol. 21 (4)、p. 66)。高抗体浓度域中的IFN- γ 和TNF- α 的产生量减少是这样的细胞间交联形成抑制的结果, 具有这样的特征的抗体被认为是容易引起T细胞所带来的细胞毒作用减弱的抗体, 因此作为用于人类的癌症治疗的抗体来说不优选。考虑到这一点, 综合地筛选具有多样的CD3结合亲和性、稳定且RTCC试验中即使在高浓度域中IFN- γ 和TNF- α 的产生量的下降率也小的抗体, 结果, 选择出BTE-0136、0142、0148作为用于人类的治疗的抗体候补。该结果表明, 通过与具有与CD3的多样的结合亲和性的16种抗CD3scFv组合来制作抗TAA-抗CD3scFv双特异性抗体, 能

够得到具有用于人类的治疗的优选特性的抗TAA-抗CD3scFv双特异性抗体。

[0674] [实施例5:抗CD37-抗CD3双特异性抗体的体内抗肿瘤评价]

[0675] 从6周龄NOD/Shi-scid、IL-2R γ KO (NOG) 雌小鼠(インビボサイエンス株式会社)的尾静脉移植悬浮于PBS的 2.5×10^6 个/100 μ L的人PBMC(Precision for Medicine公司、33000-10M)。接着,在人PBMC的移植起13天后,将悬浮于无酚红Corning基质胶基底膜基质(Corning Matrigel Basement Membrane Matrix, Phenol Red-Free)(Corning公司、356237)的 2×10^6 个/100 μ L的SU-DHL-6细胞(American Type Culture Collection、CRL-2959)移植于小鼠皮下。在SU-DHL-6细胞的移植起8天后测定肿瘤体积和体重,按照各组的肿瘤体积均等的方式进行分组。在分组当天和7天后,将稀释于PBS中的BTE-0136、0142、0148以5、1、0.1、0.01、0.001mg/kg的用量从尾静脉给药。对于对照组,给药PBS。在分组当天、4天后、7天后和11天后测定肿瘤体积。试验以每组8例来实施。但是,在抗体给药开始后11天之前死亡的BTE-0136的0.001mg/kg给药组和BTE-0148的0.001mg/kg给药组的各1例从分析中排除。将结果示于图3-1~图3-3。利用下式计算肿瘤体积[mm³]。

[0676] (肿瘤长轴的长度[mm]) $\times$ (肿瘤短轴的长度[mm])² $\times$ 0.5

[0677] 对对照组和各抗体给药组的抗体给药开始11天后的肿瘤体积进行比较,根据Dunnett多重比较检验,对 $p < 0.05$ 的组标记*,对 $p < 0.01$ 的组标记**。结果,BTE-0136和BTE-0142在0.001mg/kg以上的给药量时、BTE-0148在0.01mg/kg以上的给药量时显示出显著的抗肿瘤作用。

[0678] [实施例6:抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体的获得]

[0679] 为了确认任意的抗TAA抗体与实施例2-4中获得的16种抗CD3scFv的双特异性抗体是否具有多样的对CD3的结合活性和良好的稳定性,尝试使用抗SLC34A2抗体获得抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体。

[0680] [实施例6-1:SLC34A2抗体的获得]

[0681] 本发明人们制作搭载有编码人SLC34A2或猴SLC34A2的多核苷酸的表达载体,使用该表达载体制作人SLC34A2或猴SLC34A2表达细胞。用上述表达载体或表达细胞分别免疫AlivaMab小鼠(Ablexis公司、美国专利9346873号),利用常规方法制作杂交瘤。以对SLC34A2表达细胞的结合为指标,对由杂交瘤产生的抗体进行筛选,获得多个SLC34A2抗体。

[0682] [实施例6-2:抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体的制作]

[0683] 使用通过实施例6-1中记载的方法获得的由序列号65和序列号67的氨基酸序列构成的抗SLC34A2抗体制作抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体。

[0684] 基于序列号64和序列号66的DNA序列合成DNA,插入到pcDNA3.4TOPO载体。将制作的载体称为SLC_32014A_HC和SLC_32014A_LC。将SLC_32014A_HC和SLC_32014A_LC和编码抗CD3scFv的Apid00087、Apid00145、Apid00100、Apid00105~Apid00109、Apid00119~Apid00121中的任一种转染于ExpiCHO-S(注册商标)细胞。按照常规方法,使用蛋白A试剂盒(Protein Acartridges)(Agilent公司、G5496-60018)对培养上清进行纯化。将得到的11种抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体称为BTE-0271~0281(以下也有时称为“11种抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体”)。将抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体制作中使用的载体名称、抗CD3scFv的改造氨基酸号和突变的信息示于表7。

[0685] [表7]

[0686]

抗体名	重链 (抗- SLC34A2)	轻链 (抗- SLC34A2)	重链 (抗- CD3)	抗-CD3可变区的突变 (突变前氨基酸_Kabat编号_突变后氨基酸)
BTE-0271	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00087	N_H100_D, S_H100A_D
BTE-0272	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00145	S_H100A_D, T_L58_V
BTE-0273	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00100	N_H30_S, T_H31_D, Y_H32_H, L_L75_I
BTE-0274	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00105	Y_H52C_A, L_L75_I
BTE-0275	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00106	Y_H58_E, L_L75_I
BTE-0276	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00107	Y_H58_S, L_L75_I
BTE-0277	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00108	S_H100A_E, L_L75_I
BTE-0278	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00109	S_H100A_D, L_L75_I
BTE-0279	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00119	S_H100A_E, E_L85_D
BTE-0280	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00120	S_H100A_D, E_L85_D
BTE-0281	SLC_32O14A_HC	SLC_32O14A_LC	ApiD00121	A_H101_D, E_L85_D

[0687] [实施例6-3:抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体的CD3结合活性评价]

[0688] 利用实施例1-4中记载的ELISA法评价了11种抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体对CD3的结合活性(图4)。其结果是,可以确认11种抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体大体上维持了对CD3的多样的结合活性。

[0689] [实施例6-4:抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体的稳定性评价]

[0690] 利用实施例1-5中记载的TSA评价了11种抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体的稳定性。将T_m和与BTE-0001的T_m之差dT_m示于表8。全部11种抗体与BTE-0001相比均显示出高的稳定性。

[0691] [表8]

[0692]

抗体名	T _m TSA (°C)	dT _m TSA (°C)
BTE-0271	64.1	4.1
BTE-0272	63.4	3.4
BTE-0273	64.3	4.3
BTE-0274	63.4	3.4
BTE-0275	64.0	4.0
BTE-0276	63.5	3.5
BTE-0277	63.8	3.8
BTE-0278	64.3	4.3
BTE-0279	64.0	4.0
BTE-0280	64.0	4.0
BTE-0281	64.4	4.4

[0693] [实施例6-5:抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体的体外活性评价]

[0694] 对通过使抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体作用于SLC34A2表达细胞与从人PBMC分

离出的T细胞的共培养体系而诱导的体外RTCC活性进行评价。

[0695] 1:OVCAR-3_GFPSpark细胞的制作

[0696] 将实施例4-3中制作的GFPSpark表达载体使用Lipofectamine LTX试剂及PLUS试剂(Lipofectamine LTX Reagent with PLUS Reagent)(Thermo Fisher Scientific公司、15338100)转染于内源性表达SLC34A2的OVCAR-3细胞。分离单个克隆细胞后,将利用流式细胞术确认到GFPSpark的表达的细胞称为“OVCAR-3_GFPSpark细胞”。

[0697] 2:RTCC试验

[0698] 使用11种抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体中的BTE-0272~0280作为被检抗体。将OVCAR-3_GFPSpark细胞利用培养用培养基以达到 5×10^4 个/mL的方式悬浮。将该悬浮液向384孔平底板(Greiner公司、781182)中接种各20 μ L(1×10^3 个),在37°C、5% CO₂培养箱中培养3小时。接着,以30 μ g/mL为最高浓度、以4倍公比将被检抗体稀释至29pg/mL(换算成终浓度为10 μ g/mL~9.5pg/mL),向培养中的384孔板中添加各20 μ L。向其中添加各20 μ L利用培养用培养基制备为 5×10^5 个/mL的扩增的panT细胞(实施例4-3中制作),在37°C、5% CO₂培养箱中培养2天后,利用Incucyte(注册商标)S3(ザルトリウス公司)测定各孔的GFPSpark荧光面积,作为活细胞数的指标。结果,所评价的全部9种抗SLC34A2-抗CD3双特异性抗体均使OVCAR-3_GFPSpark细胞的活细胞数减少(图5)。根据实施例3~6的结果表明,在与抗TSPAN8抗体的组合中以对CD3的结合活性的多样性和抗体的稳定性为指标而获得的16种抗CD3scFv在使用抗CD37抗体和抗SLC34A2抗体制作的双特异性抗体中也能够维持对CD3的结合活性的多样性和抗体的稳定性。根据该结果预测,在与其它抗TAA抗体的组合中,16种抗CD3scFv也具有对CD3的结合活性的多样性和抗体的稳定性。

[0699] [实施例7:抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体的获得]

[0700] 本发明人们还设想了将抗CD3scFv抗体用于三特异性抗体中。并且,作为其一个实施方式,研究了抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体的获得。作为抗TAA抗体,使用抗CLDN4抗体和抗PD-L1抗体。之后将这些抗体分别称为“抗CLDN4-抗CD3-抗CD137三特异性抗体”、“抗PD-L1-抗CD3-抗CD137三特异性抗体”。另外,也有时将这些统称为“抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体”。

[0701] [实施例7-1:抗CLDN4-抗CD3双特异性抗体和抗PD-L1-抗CD3双特异性抗体的获得]

[0702] 为了制作抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体,首先制作抗TAA-抗CD3双特异性抗体。基于国际公开号2022/224997的序列号6和8记载的抗CLDN4抗体的氨基酸序列,与实施例3同样地设计抗CLDN4-抗CD3双特异性抗体。另外,基于国际公开号2012/155019的序列号22和23记载的抗PD-L1抗体的氨基酸序列,与实施例3同样地设计抗PD-L1-抗CD3双特异性抗体。

[0703] 按照常规方法合成编码抗CLDN4-抗CD3双特异性抗体和抗PD-L1-抗CD3双特异性抗体的DNA,插入到pcDNA3.4TOPO载体。将插入了编码抗CLDN4抗体的重链的DNA的载体称为hKM3900(-),将插入了编码抗CLDN4抗体的轻链的DNA的载体称为hKM3900_k、将插入了编码阿替利珠单抗(atezolizumab)的重链的DNA的载体称为atezolizumab_HC(-),将插入了编码atezolizumab的轻链的DNA的载体称为atezolizumab_LC。

[0704] 将hKM3900(-)和hKM3900_k以及编码抗CD3scFv的Apid00087、Apid00088、

ApiD00100、ApiD00146中的任一种转染于ExpiCHO-S (注册商标) 细胞。按照常规方法,使用MabSelect SuRe纯化培养上清,得到4种抗CLDN4-抗CD3双特异性抗体。

[0705] 将atezolizumab_HC(-)和atezolizumab_LC以及编码抗CD3scFv的ApiD00087、ApiD00088、ApiD00100、ApiD00146中的任一种转染于ExpiCHO-S (注册商标) 细胞。按照常规方法,使用MabSelect SuRe纯化培养上清,得到4种抗PD-L1-抗CD3双特异性抗体。

[0706] 以后,将抗CLDN4-抗CD3双特异性抗体和抗PD-L1-抗CD3双特异性抗体也统称为“抗TAA-抗CD3双特异性抗体”。将抗TAA-抗CD3双特异性抗体制作中使用的载体的组合示于表9。

[0707] [表9]

抗体名	重链 (抗 TAA-Fc)	轻链 (抗 TAA)	抗 CD3scFv-Fc (抗 CD3)
CD3_hKM3900_87	hKM3900(-)	hKM3900_k	ApiD00087 (序列号 14)
CD3_hKM3900_88	hKM3900(-)	hKM3900_k	ApiD00088 (序列号 20)
CD3_hKM3900_100	hKM3900(-)	hKM3900_k	ApiD00100 (序列号 26)
CD3_hKM3900_146	hKM3900(-)	hKM3900_k	ApiD00146 (序列号 24)
CD3_atezolizumab_87	atezolizumab_HC(-)	atezolizumab_LC	ApiD00087 (序列号 14)
CD3_atezolizumab_88	atezolizumab_HC(-)	atezolizumab_LC	ApiD00088 (序列号 20)
CD3_atezolizumab_100	atezolizumab_HC(-)	atezolizumab_LC	ApiD00100 (序列号 26)
CD3_atezolizumab_146	atezolizumab_HC(-)	atezolizumab_LC	ApiD00146 (序列号 24)

[0709] 利用SDS-PAGE法分析抗TAA-抗CD3双特异性抗体。使用NuPAGE 4~12%, Bis-Tris, 1.0-1.5mm, 小型蛋白凝胶 (Thermo Fisher Scientific公司、NP0322BOX或NP0329BOX)。在添加或不添加NuPAGE样品还原剂(10X) (Thermo Fisher Scientific公司、NP0009)的条件下对实施例7-1中获得的抗TAA-抗CD3双特异性抗体进行处理。以200V进行适当时间的电泳。用Simply Blue Safe stain(Thermo Fisher Scientific公司、LC6065)染色,用Gel Doc EZ Imager(BioRad公司)或ChemiDoc Imager(BioRad公司)拍摄。作为分子量标志,使用Precision Plus Protein未染标准品(BIO-RAD公司、161-0363)。任一抗TAA-抗CD3双特异性抗体的情况下均观察到具有与目标分子量相当的迁移率的条带(图6-1和6-2)。

[0710] [实施例7-2:抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体的形式研究]

[0711] 设计了在实施例7-1中记载的抗TAA-抗CD3双特异性抗体的抗TAA抗体的重链羧基末端串联连接有GS接头和国际公开号2022/224997的序列号26记载的抗CD137scFv抗体的抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体。按照常规方法合成编码所设计的多肽的DNA,插入到pcDNA3.4TOPO载体。将制作的载体称为hKM3900(-)_3-34-j6和atezolizumab(-)_3-34-j6。按照表10所示的组合将载体转染于ExpiCHO-S (注册商标) 细胞。按照常规方法,使用

MabSelect SuRe纯化培养上清。

[0712] 将抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体制作中使用的载体名称示于表10。

[0713] [表10]

[0714]

抗体名	重链 (抗 TAA-Fc-抗 CD137scFv)	轻链 (抗 TAA)	抗 CD3scFv-Fc (抗 CD3)
CD3x137_1_hKM3900_87	hKM3900(-)_3-34-j6	hKM3900_k	ApiD00087 (序列号 14)
CD3x137_1_hKM3900_88	hKM3900(-)_3-34-j6	hKM3900_k	ApiD00088 (序列号 20)
CD3x137_1_hKM3900_100	hKM3900(-)_3-34-j6	hKM3900_k	ApiD00100 (序列号 26)
CD3x137_1_hKM3900_146	hKM3900(-)_3-34-j6	hKM3900_k	ApiD00146 (序列号 24)
CD3x137_1_atezolizumab_87	atezolizumab(-)_3-34-j6	atezolizumab_LC	ApiD00087 (序列号 14)
CD3x137_1_atezolizumab_88	atezolizumab(-)_3-34-j6	atezolizumab_LC	ApiD00088 (序列号 20)
CD3x137_1_atezolizumab_100	atezolizumab(-)_3-34-j6	atezolizumab_LC	ApiD00100 (序列号 26)
CD3x137_1_atezolizumab_146	atezolizumab(-)_3-34-j6	atezolizumab_LC	ApiD00146 (序列号 24)

[0715] 按照实施例7-1中记载的方法利用SDS-PAGE法对抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体进行分析。任一抗TAA-抗CD3-抗CD137三特异性抗体均观察到具有与目标分子量相当的迁移率的条带(图7-1和7-2)。

[0716] [实施例7-3:抗CLDN4-抗CD3-抗CD137三特异性抗体的体外活性]

[0717] 利用实施例1-4中记载的ELISA法评价抗CLDN4-抗CD3-抗CD137三特异性抗体对人CD3的结合活性。其结果是,即使对抗CLDN4-抗CD3双特异性加以改造,对CD3的多样的结合活性也没有受到明显损害,大体上维持了原来的结合活性(图8)。

[0718] 与国际公开号2022/224997的实施例5-2中记载的ELISA法同样地评价了抗CLDN4-抗CD3-抗CD137三特异性抗体对人CD137的结合活性。任一抗CLDN4-抗CD3-抗CD137三特异性抗体均维持了对CD137的结合活性(图9)。

[0719] 利用基于细胞的ELISA法评价抗CLDN4-抗CD3-抗CD137三特异性抗体对人CLDN4的结合活性。将国际公开号2022/224997的实施例5-1中记载的表达人CLDN4的CHO-K1用含有10%FBS和1.5mg/mL遗传霉素(Thermo Fisher Scientific公司、10131027)的MEM α (Thermo Fisher Scientific公司、32571036)悬浮,以 2×10^4 个细胞/100 μ L/孔接种于384孔板(Corning公司、356662),培养一整夜。除去培养上清,添加用含有1%BSA(西格玛奥德里奇公司、A3803-50G)和10mM HEPES(ナカライテスク公司、17557-94)的HBSS(Thermo Fisher Scientific公司、14065056)进行了连续稀释的被检抗体溶液,在室温下温育1小时。清洗液使用含有0.1%BSA和10mM HEPES的HBSS,二抗使用山羊抗人IgG Fc,多物种SP ads-HRP,底物使用TMB(Dako、S1601),使用1mol/L硫酸(富士胶片和光纯药公司、198-0959)使反应停止。使用Infinite M200PRO(TECAN公司)测定450nm和570nm的吸光度。任一抗CLDN4-抗CD3-抗CD137三特异性抗体均维持了对CLDN4的结合活性(图10)。

[0720] 产业上的可利用性

[0721] 本发明的抗TAA-抗CD3多特异性抗体被期待用于癌症的治疗。另外,本发明的多核苷酸、表达载体、含有表达载体的宿主细胞和生产抗体的方法对于生产上述抗TAA-抗CD3多特异性抗体是有用的。

[0722] 序列表自由文本

[0723] 序列号2和8表示抗TSPAN8抗体的重链氨基酸序列,序列号1和7所示的碱基序列为编码序列号2和8所示的抗TSPAN8抗体的重链氨基酸序列的碱基序列。序列号4表示抗TSPAN8抗体的轻链氨基酸序列,序列号3所示的碱基序列为编码序列号4所示的抗TSPAN8抗体的轻链氨基酸序列的碱基序列。序列号10表示抗CD37抗体的重链氨基酸序列,序列号9所示的碱基序列为编码序列号10所示的抗CD37抗体的重链氨基酸序列的碱基序列。序列号12表示抗CD37抗体的轻链氨基酸序列,序列号11所示的碱基序列为编码序列号12所示的抗CD37抗体的轻链氨基酸序列的碱基序列。序列号6、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42或44为抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的氨基酸序列,序列号5、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41或43所示的碱基序列为编码序列号6、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42或44所示的抗CD3scFv区与第二Fc多肽连接而成的多肽的氨基酸序列的碱基序列。序列号46、48、50、52或54为抗CD137scFv区的氨基酸序列,序列号45、47、49、51或53所示的碱基序列为编码序列号46、48、50、52或54所示的抗CD137scFv区的氨基酸序列的碱基序列。序列号55~63为发明的详细说明中记载的各种接头的氨基酸序列。序列号65或67为抗SLC34A2抗体的氨基酸序列,序列号64或66所示的碱基序列为编码序列号65或67所示的抗SLC34A2抗体的氨基酸序列的碱基序列。

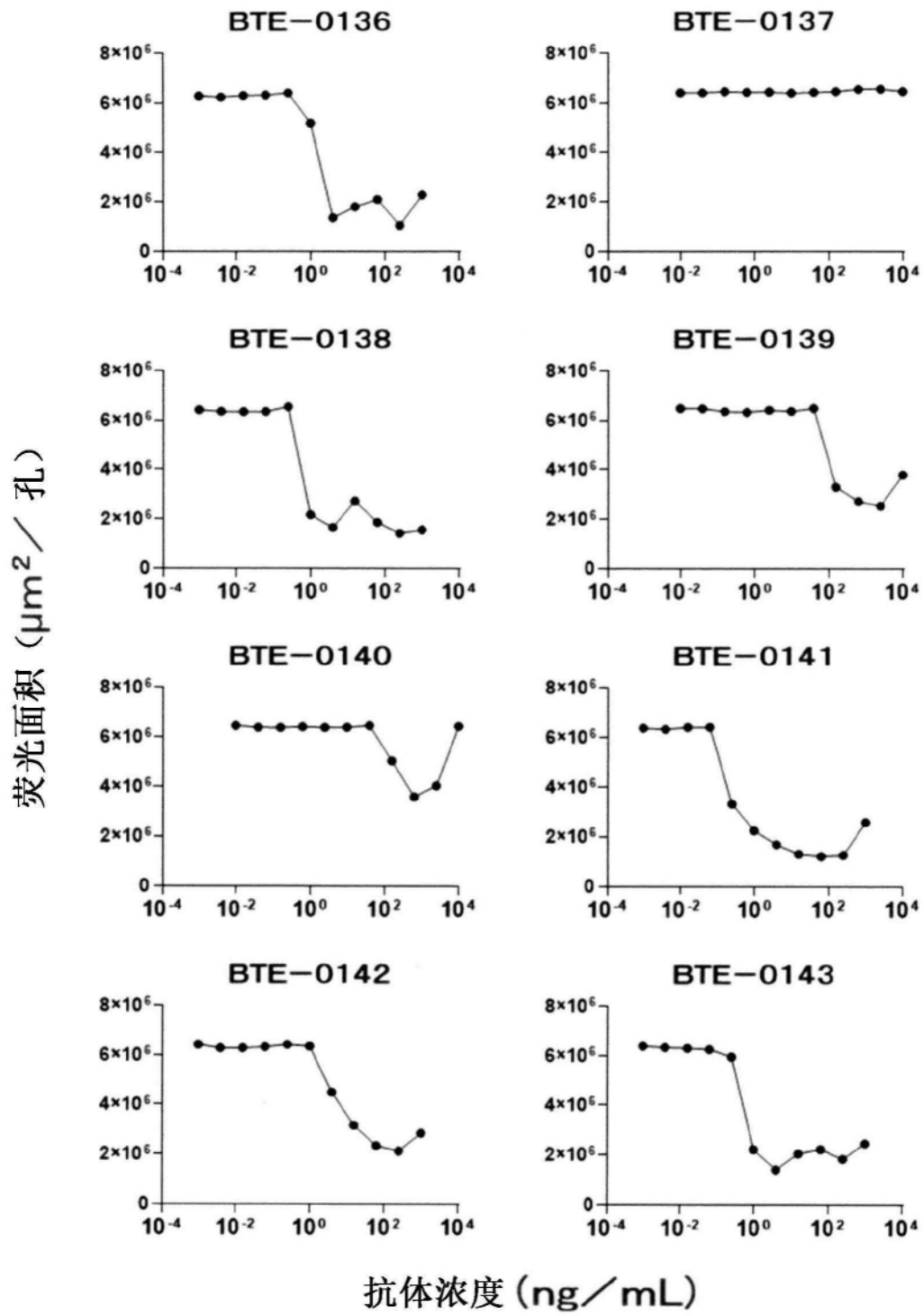


图1-1

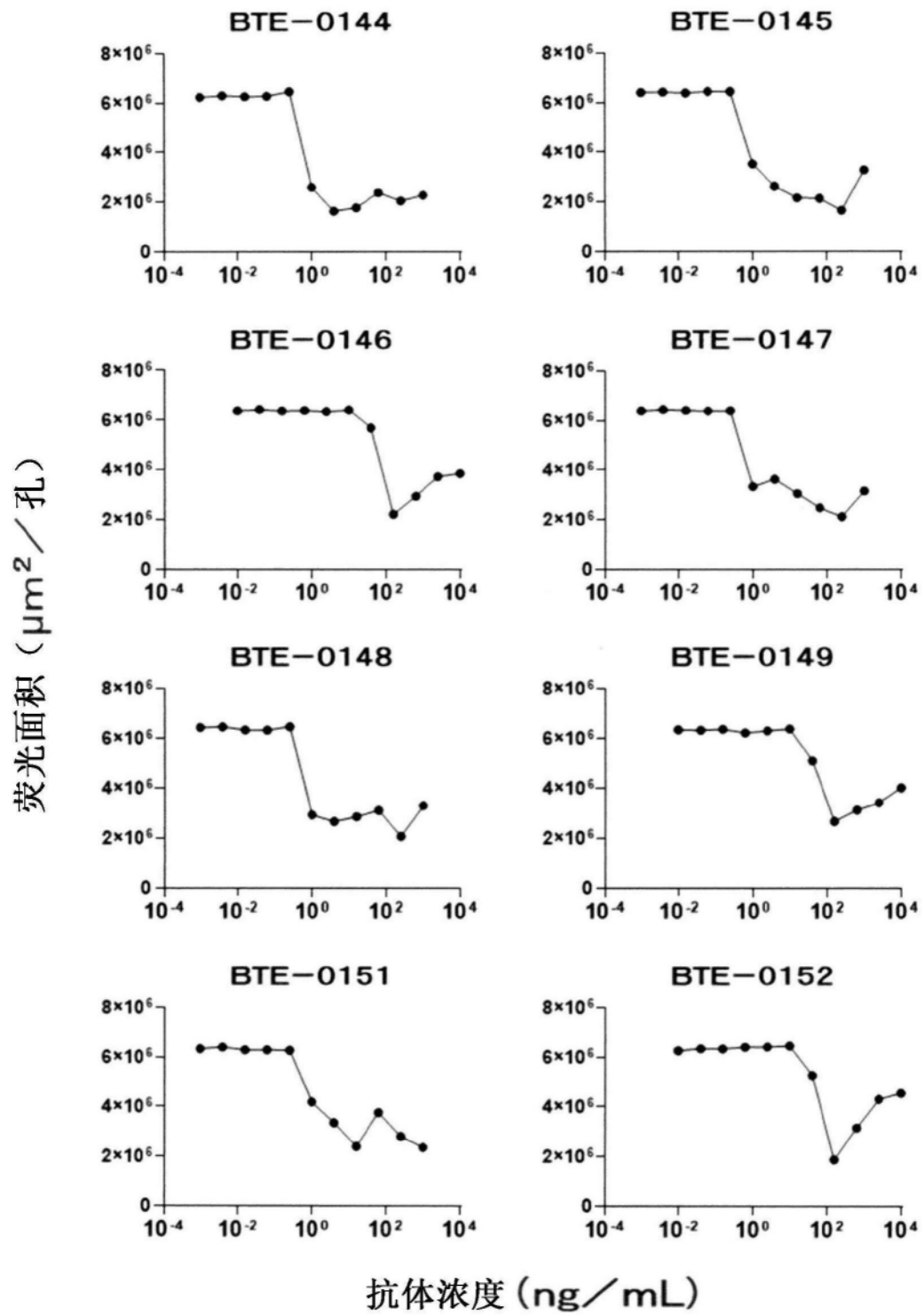


图1-2

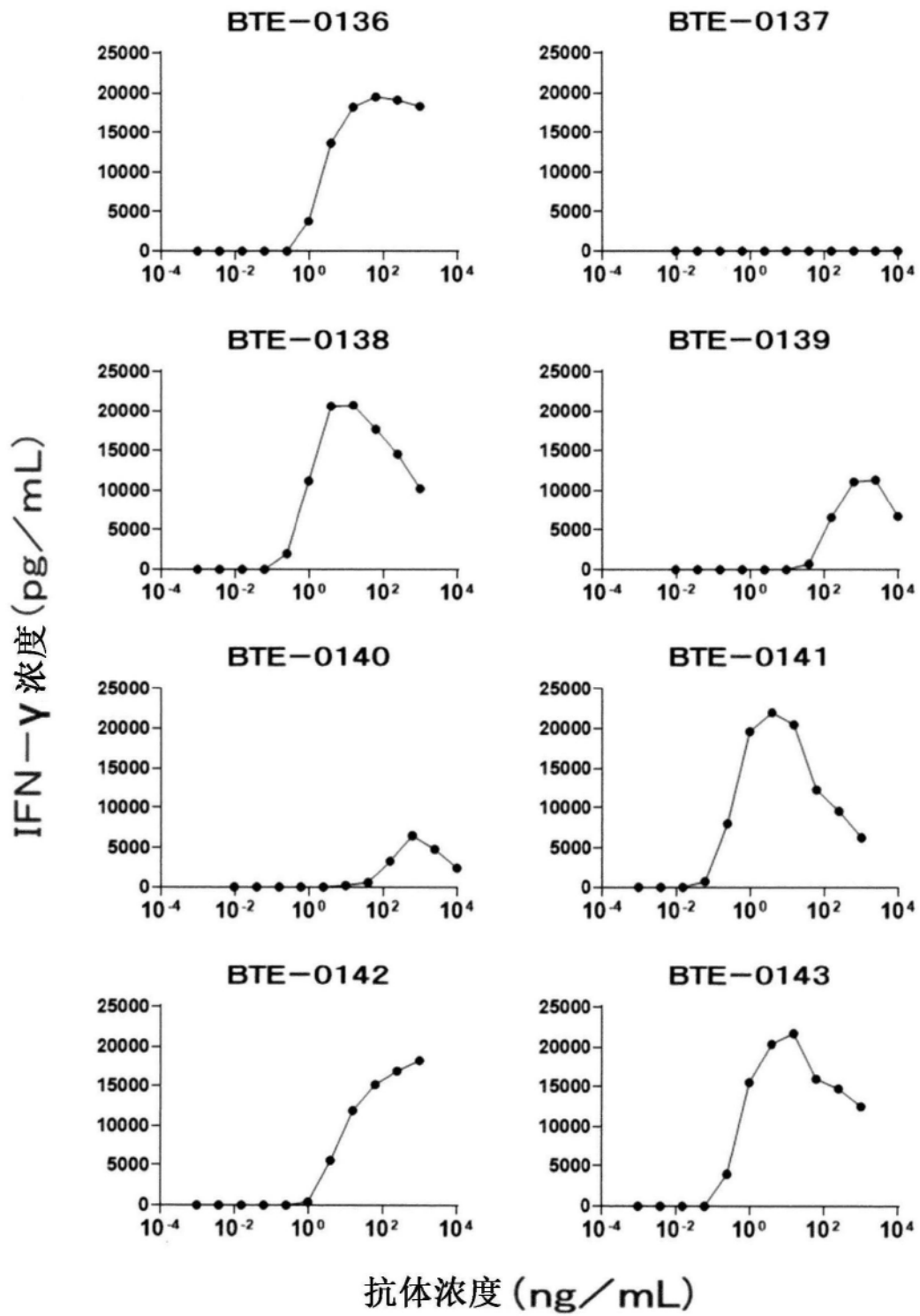


图2-1

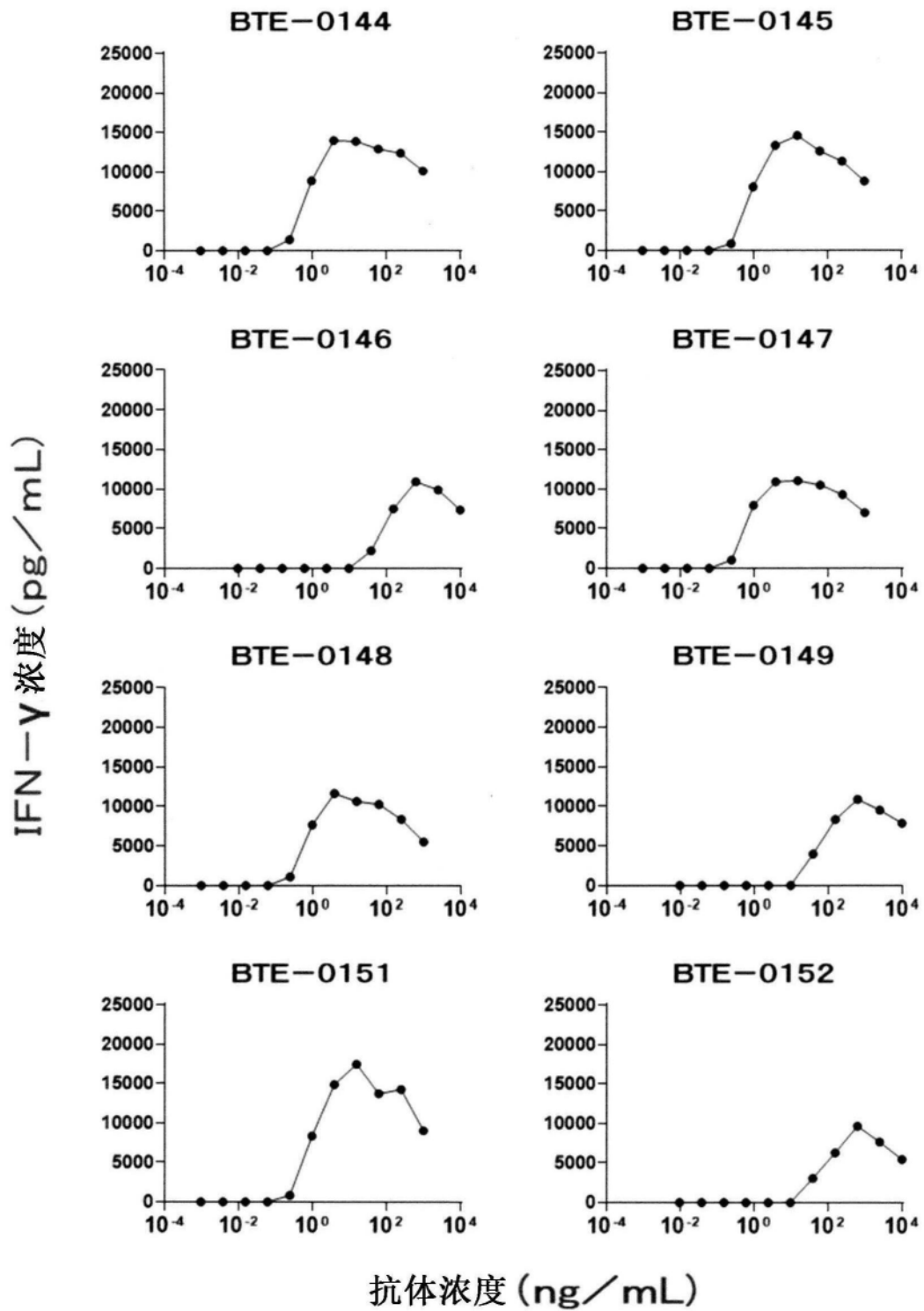


图2-2

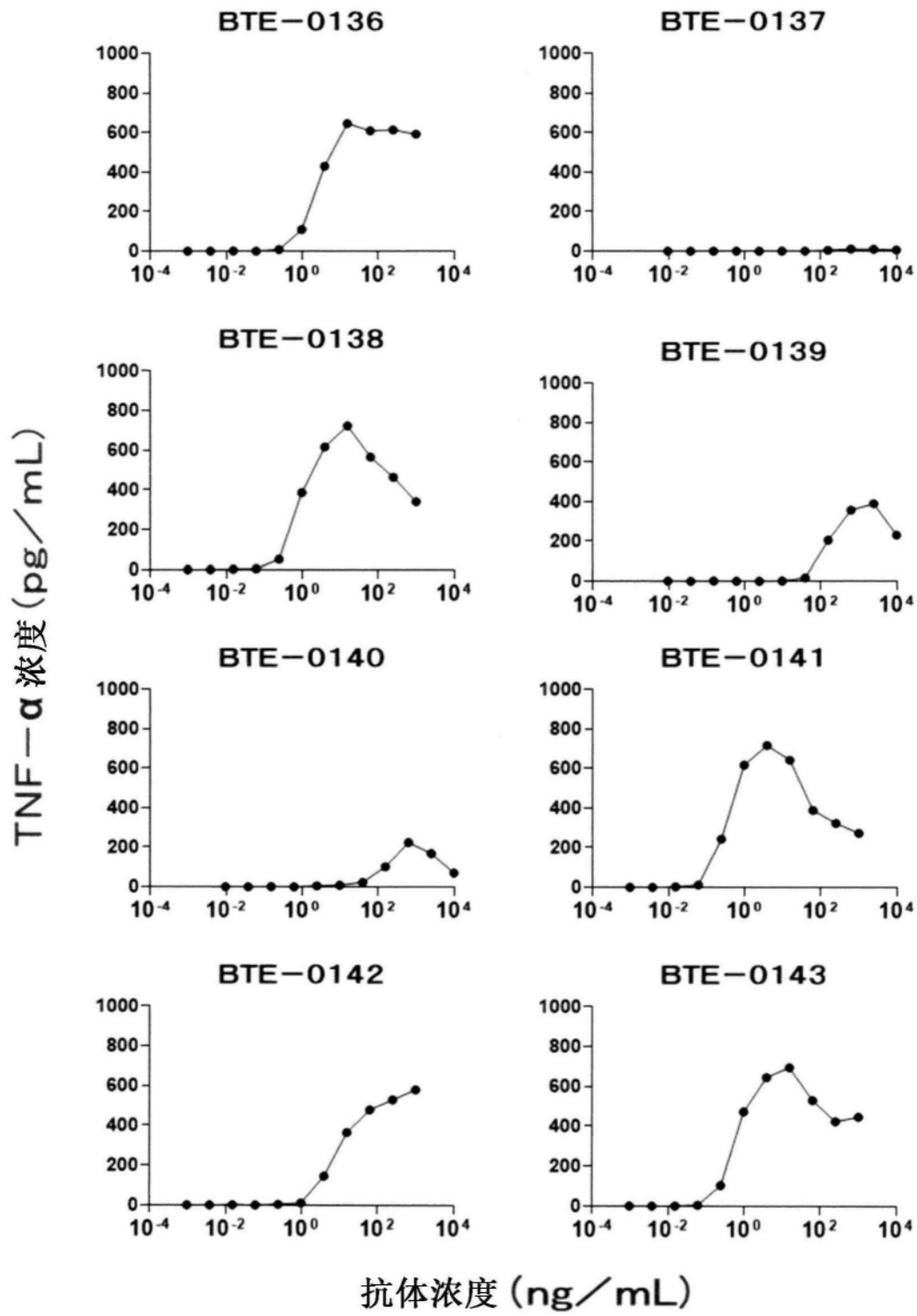


图2-3

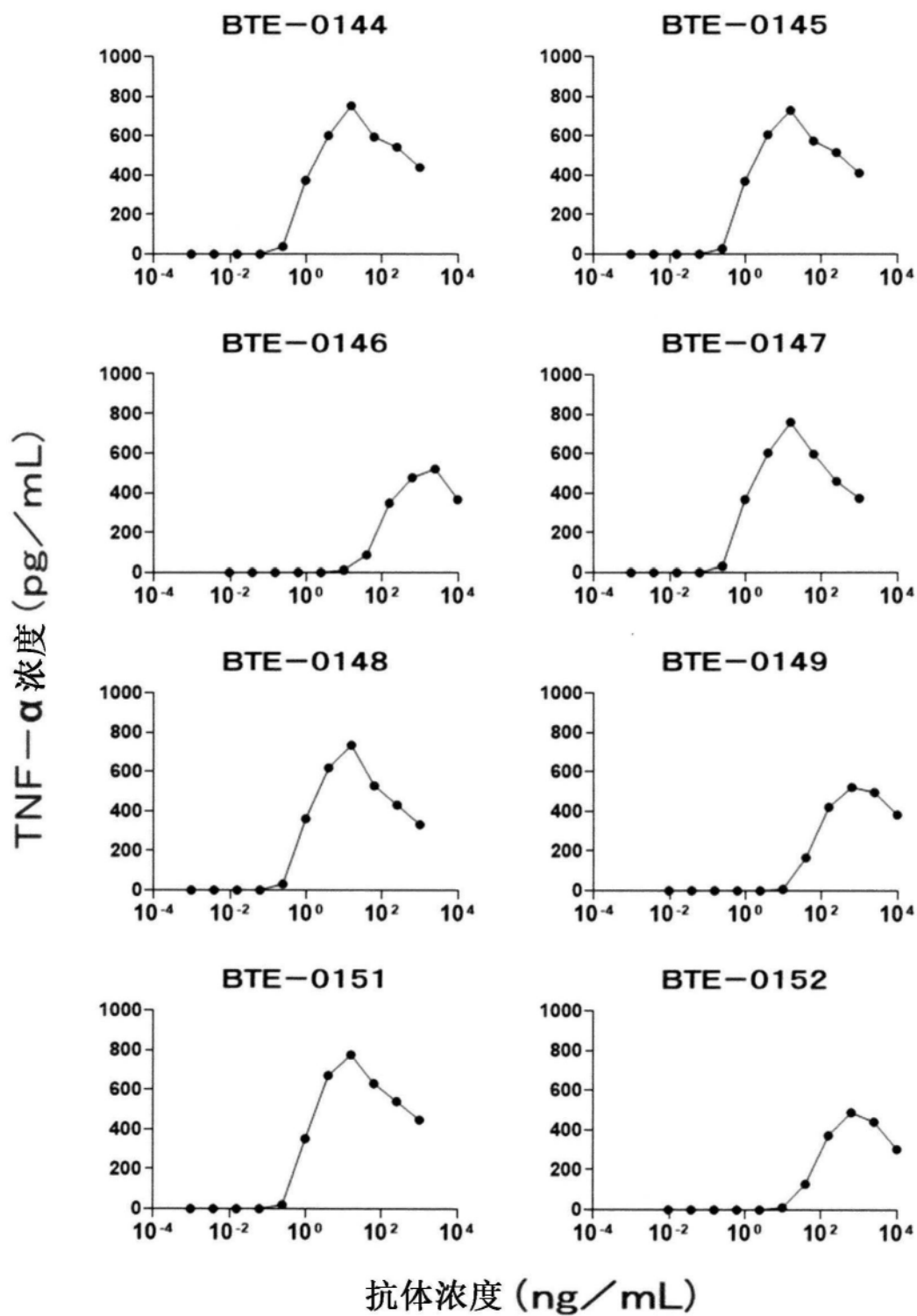


图2-4

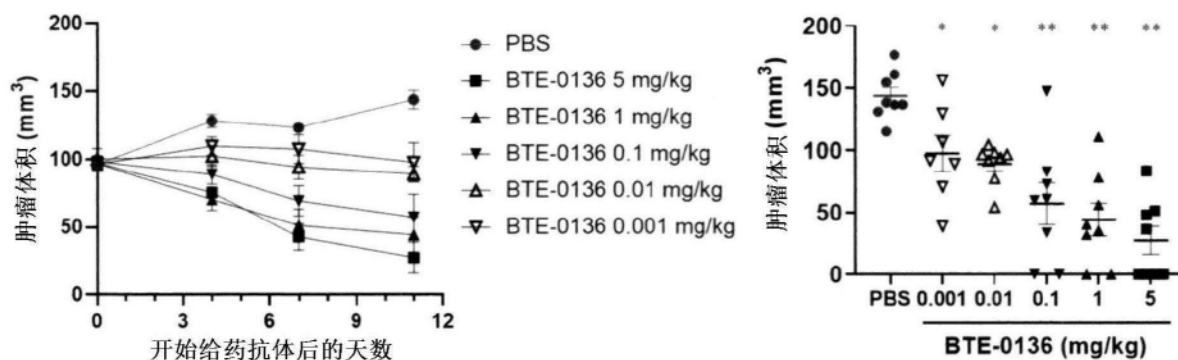


图3-1

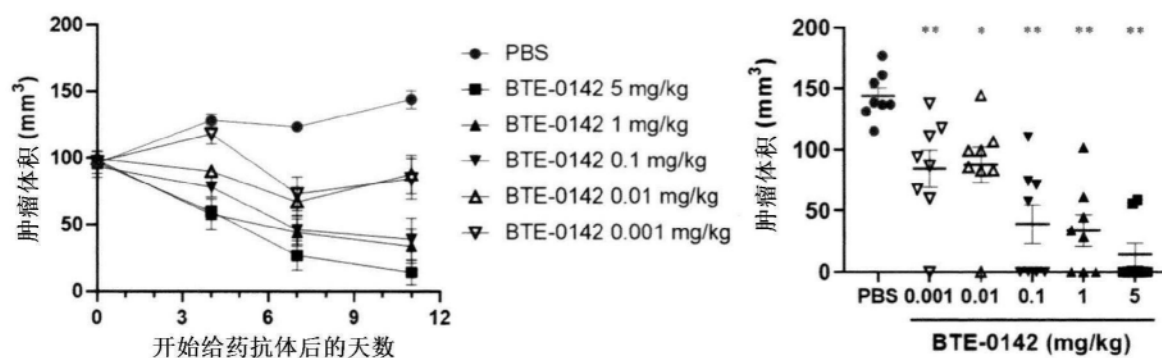


图3-2

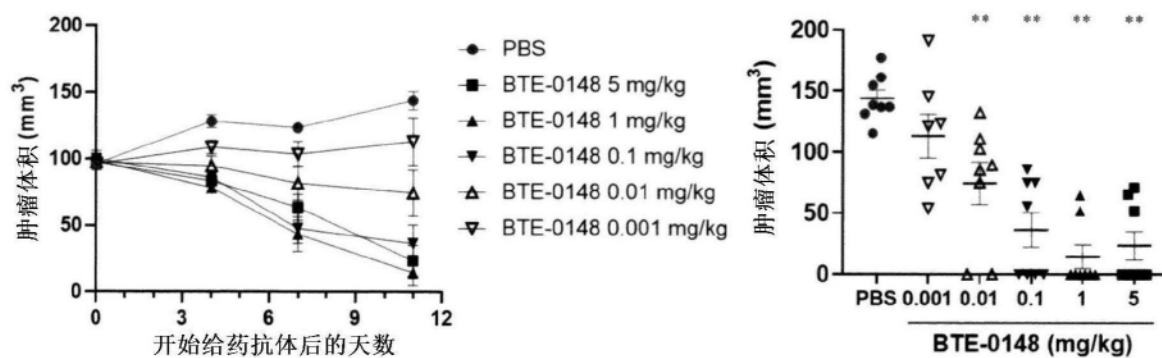


图3-3

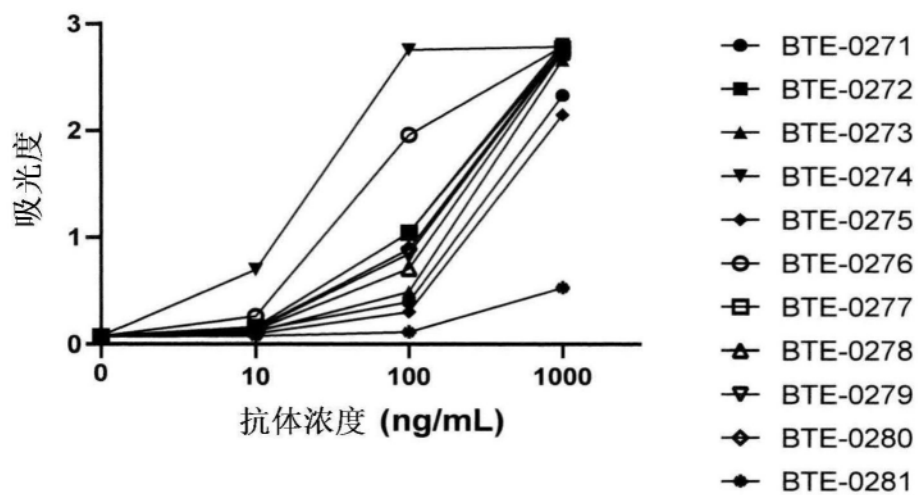


图4

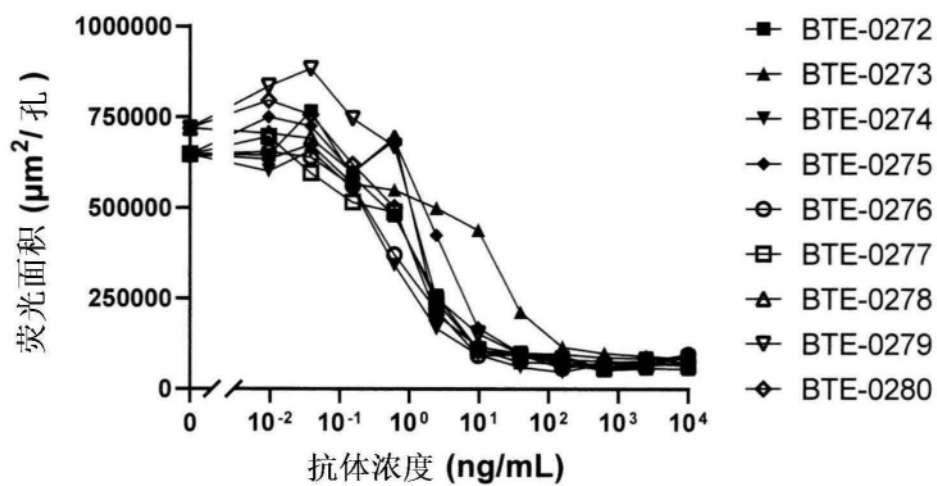
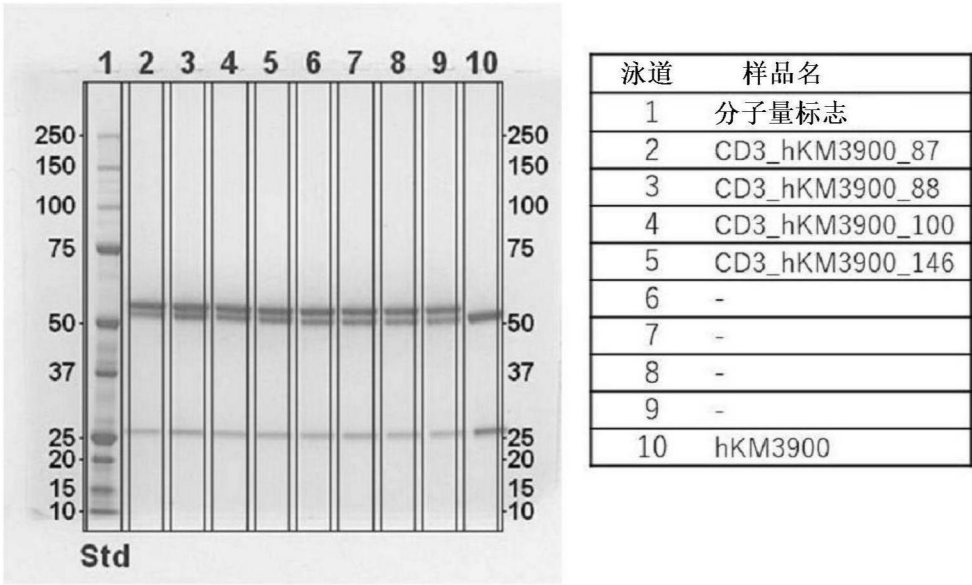


图5

还原



非还原

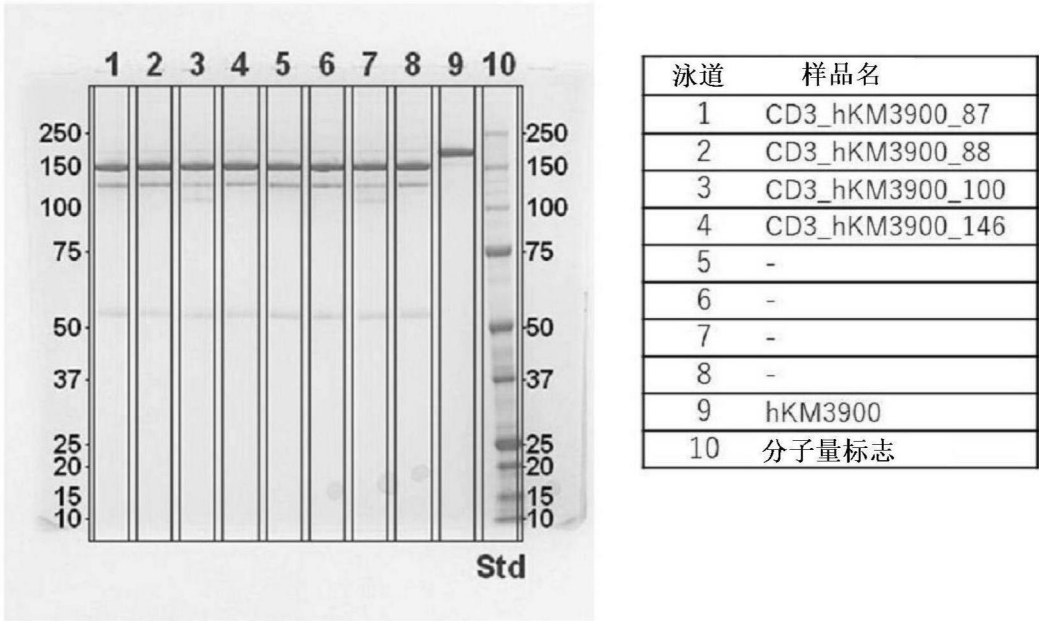


图6-1

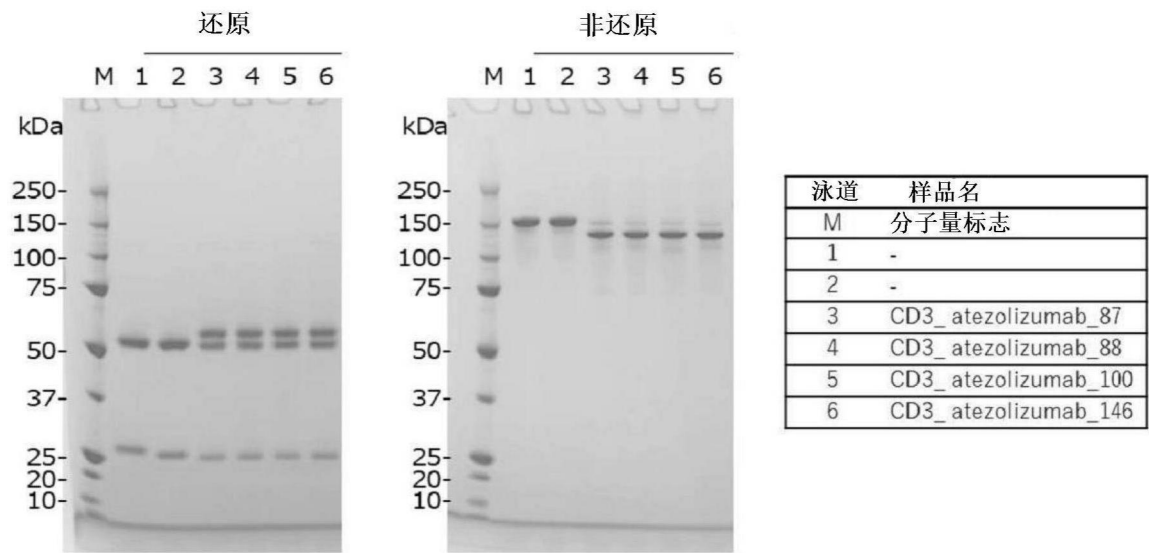


图6-2

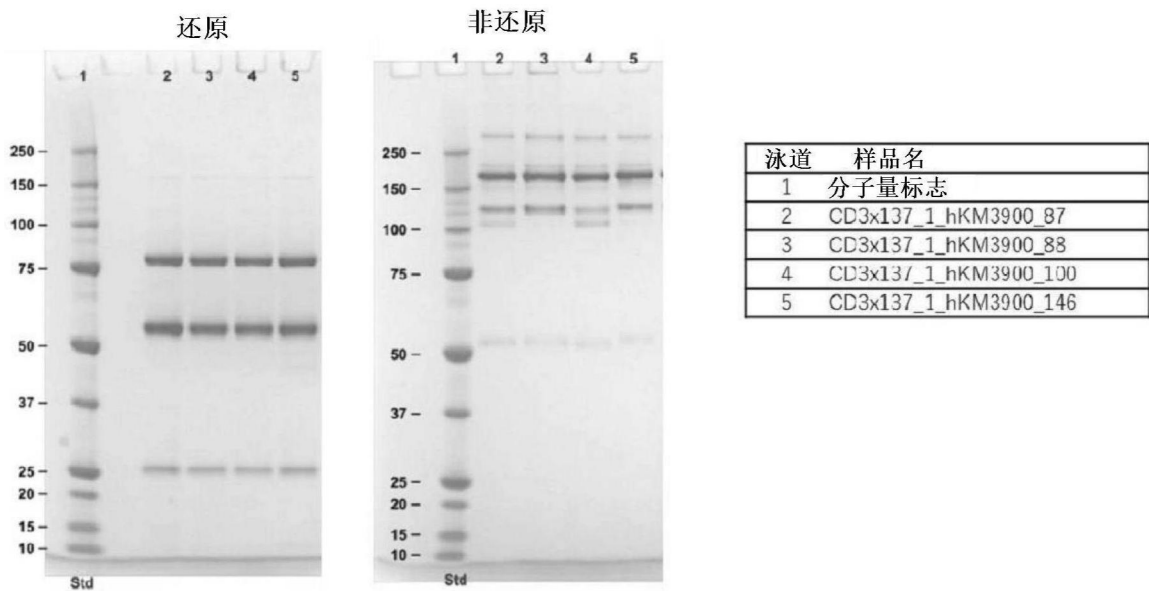


图7-1

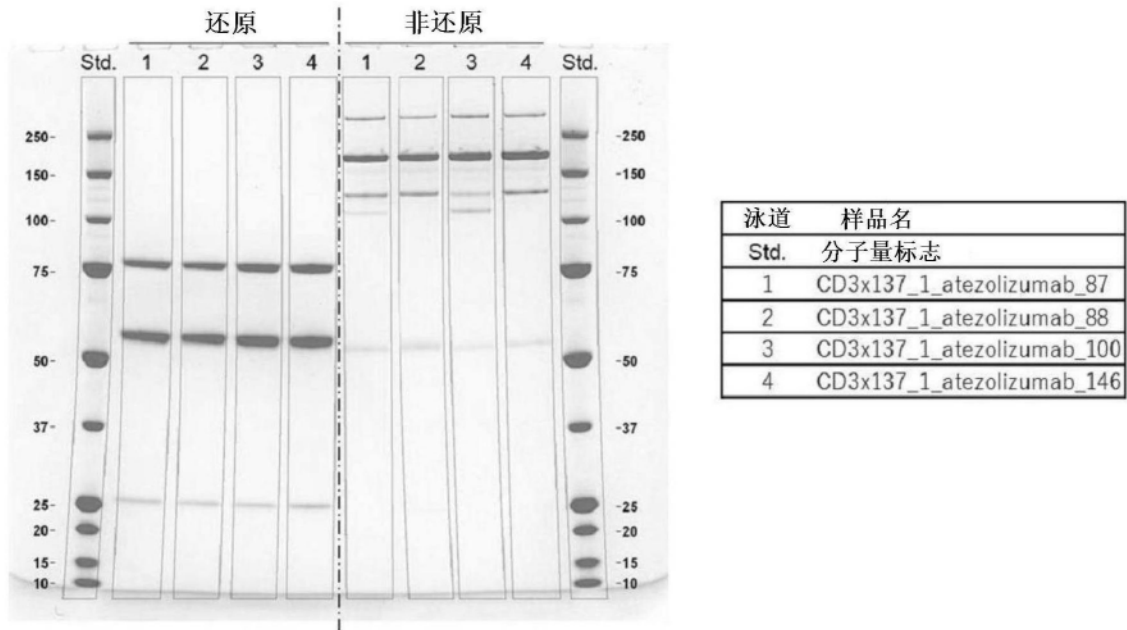


图7-2

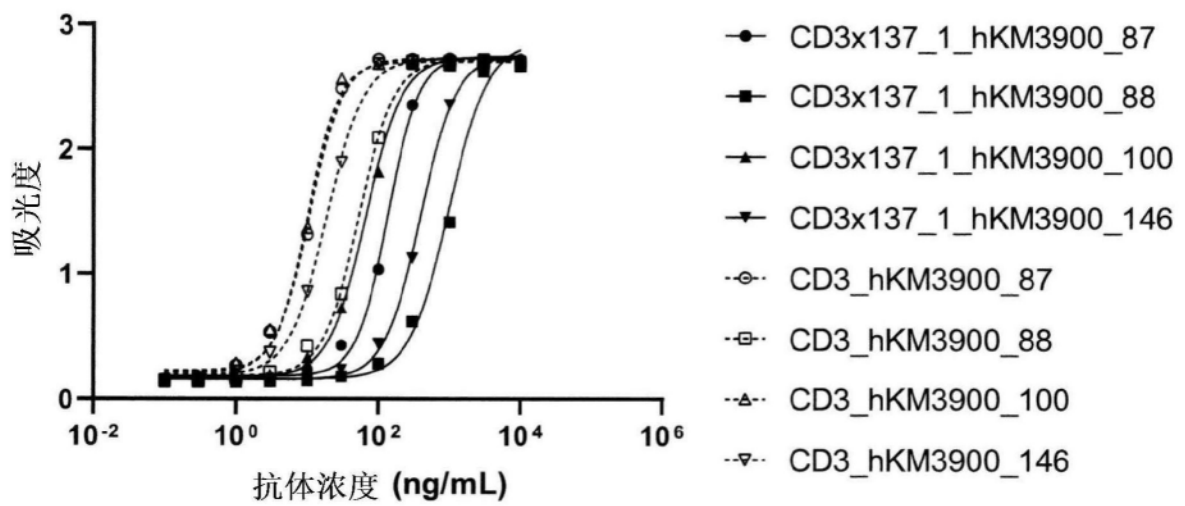


图8

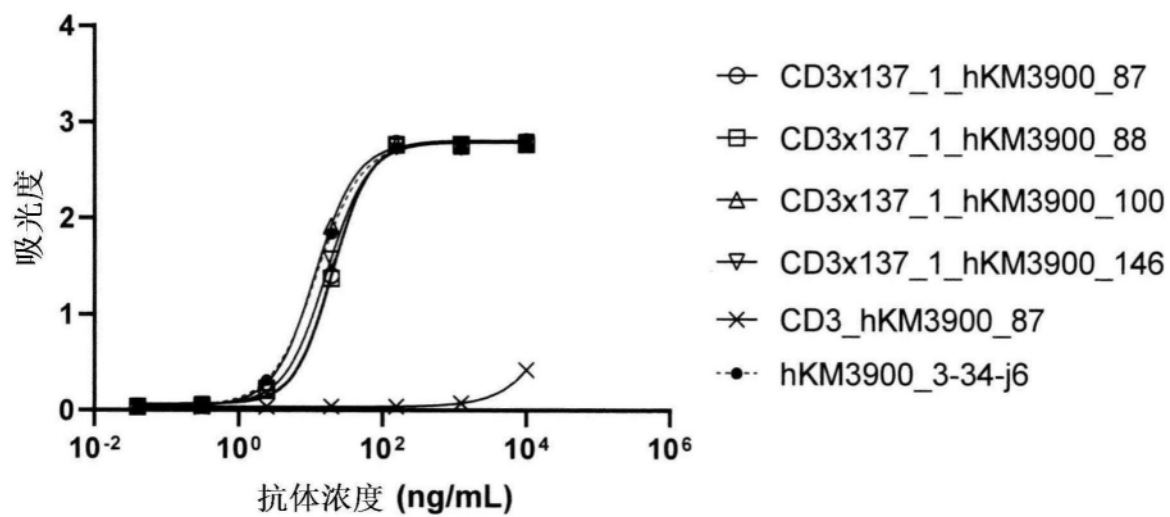


图9

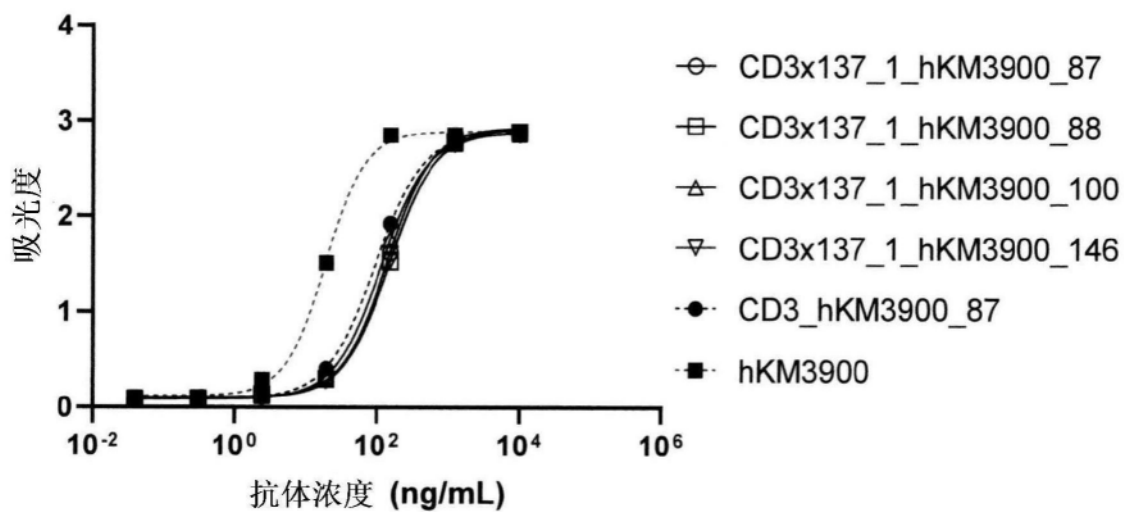


图10