



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0089513
(43) 공개일자 2025년06월18일

<p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/00 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류 C07K 16/28 (2013.01) A61P 35/00 (2018.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2025-7015107</p> <p>(22) 출원일자(국제) 2023년10월18일 심사청구일자 없음</p> <p>(85) 번역문제출일자 2025년05월08일</p> <p>(86) 국제출원번호 PCT/JP2023/037616</p> <p>(87) 국제공개번호 WO 2024/085166 국제공개일자 2024년04월25일</p> <p>(30) 우선권주장 JP-P-2022-167362 2022년10월19일 일본(JP)</p>	<p>(71) 출원인 아스텔라스세이야쿠 가부시카가이샤 일본 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고</p> <p>(72) 발명자 사토 마사히토 일본 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고 아스텔라스세이야쿠 가부시카가이샤 내 히로우치 게이타 일본 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고 아스텔라스세이야쿠 가부시카가이샤 내 기쿠치 아야 일본 도쿄도 주오쿠 니혼바시혼초 2초메 5반 1고 아스텔라스세이야쿠 가부시카가이샤 내</p> <p>(74) 대리인 제일특허법인(유)</p>
---	---

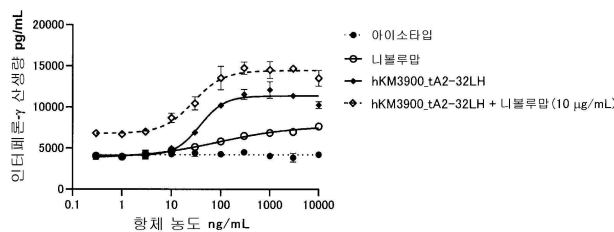
전체 청구항 수 : 총 27 항

(54) 발명의 명칭 암 치료에 있어서의 PD-1 시그널 저해제와의 조합에 의한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용

(57) 요약

본 발명의 과제는, 대상의 암 치료를 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 혹은 당해 이중특이성 항체를 포함하는 의약 조성물의 제공, 또는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 조합하여 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법의 제공이다. CLDN4 발현 암 세포 및 T 세포의 공배양 조건하에서, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제의 병용은 각각의 단독 투여에 비해, T 세포에 의한 인터페론- γ 산생 촉진 작용 및 세포 상해 작용을 나타내고, CLDN4 발현 암 세포 이식 마우스에 있어서 유의한 항종양 작용을 나타내었다. 이 결과로부터, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제의 조합은, CLDN4 발현 암의 치료에 유용한 것이 시사되었다.

대표도



(52) CPC특허분류

C07K 16/2818 (2013.01)

C07K 16/2827 (2013.01)

C07K 16/2878 (2013.01)

A61K 2039/505 (2013.01)

C07K 2317/24 (2013.01)

C07K 2317/31 (2013.01)

C07K 2317/622 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 의약 조성물로서, 해당 이중특이성 항체가 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 51부터 57까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 90부터 98까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, 의약 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서,

항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는, 의약 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서,

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는 IgG 항체(항CLDN4 IgG 항체)를 포함하는, 의약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

항CLDN4 IgG 항체의 Fc 영역에 LALA 변이(L234A 및 L235A) 혹은 P331G 변이(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따른 아미노산 위치이다)의 어느 하나 또는 양쪽을 포함하는, 의약 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 625부터 629까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 644부터 659까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 692부터 701까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 486부터 498까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 514부터 520까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 553부터 563까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, 의약 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는, 의약 조성물

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서,

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 1 본쇄 가변 영역 프래그먼트(항CD137 scFv)를 포함하는, 의약 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

항CD137 scFv가 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는, 의약 조성물.

청구항 10

제8항 또는 제9항에 있어서,

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CLDN4 IgG 항체 및 항CD137 scFv를 포함하고, 항CLDN4 IgG 항체의 중쇄 카복시 말단에 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, 의약 조성물.

청구항 11

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 의약 조성물로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물.

청구항 12

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 의약 조성물로서, 해당 이중특이성 항체가, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 453까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 215까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물.

청구항 13

제10항 내지 제12항 중 어느 한 항에 있어서,

링커가 GS 링커인, 의약 조성물.

청구항 14

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 의약 조성물로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하고, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물.

청구항 15

제1항 내지 제14항 중 어느 한 항에 있어서,

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가 번역 후 수식된 것인, 의약 조성물.

청구항 16

제1항 내지 제15항 중 어느 한 항에 있어서,

PD-1 시그널 저해제와 동시에, 연속적으로 또는 축차적으로 조합하여 사용되는, 의약 조성물.

청구항 17

제1항 내지 제16항 중 어느 한 항에 있어서,

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제가 (i) 동일한 의약 조성물에 포함되어 있어 동시에 투여되거나, 또는 (ii) 별개의 의약 조성물에 포함되어 있고, 동시에, 연속적으로 혹은 축차적으로 조합하여 사용되는, 의약 조성물.

청구항 18

제1항 내지 제17항 중 어느 한 항에 있어서,

암이, 대장암, 방광암 및 폐암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, 의약 조성물.

청구항 19

제1항 내지 제18항 중 어느 한 항에 있어서,

PD-1 시그널 저해제가, PD-1, PD-L1 및 PD-L2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 단백질에 결합하는 항체 또는 이들의 항원 결합 프래그먼트인, 의약 조성물.

청구항 20

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

PD-1 시그널 저해제가, 니볼루맵, 펌브롤리주맵, 피딜리주맵, 스파르탈리주맵 및 세미플리주맵으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-1 항체인, 의약 조성물.

청구항 21

제1항 내지 제19항 중 어느 한 항에 있어서,

PD-1 시그널 저해제가, 아테졸리주맵, 듀르발루맵 및 아벨루맵으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-L1 항체인, 의약 조성물.

청구항 22

대상의 암을 치료하기 위해서 사용되는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체로서, 해당 이중특이성 항체가 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 이중특이성 항체.

청구항 23

대상의 암을 치료하기 위해서 사용되는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄로 이루어지는 이중특이성 항체를 포함하고, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 이중특이성 항체.

청구항 24

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법으로서, 해당 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 치료 방법.

청구항 25

항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 조합하여 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법으로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하는, 치료 방법.

청구항 26

대상의 암을 치료하기 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 의약 조성물의 제조를 위한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용으로서, 해당 이중특이성 항체가 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 사용.

청구항 27

대상의 암을 치료하기 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 의약 조성물의 제조를 위한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용으로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하는, 사용.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은, 암 치료에 있어서의 PD-1 시그널 저해제와의 조합에 의한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] Claudin-4(CLDN4)는 클라우딘 패밀리에 속하는 4회 막관통 단백질이다. 상피 세포나 내피 세포에 발현하고 있으며, 타이트 정션을 구성하는 주요 분자로서 중요한 역할을 하고 있다. CLDN4는 대장암, 방광암, 난소암 등의 암 조직에서도 고발현이 인정되고 있어, 항CLDN4 항체는 암의 치료 또는 진단에 응용할 수 있을 가능성이 시사되어 있다(특허문헌 1, 비특허문헌 1). 나아가, 동물 모델에 있어서, 항CLDN4 항체와 항Epidermal growth factor receptor(EGFR) 항체의 병용에 의한 항종양 효과가 나타나 있다(비특허문헌 2).

[0003] Cluster of Differentiation 137(CD137, 별명 4-1BB)은, Tumor Necrosis Factor Receptor Superfamily(TNFRSF)에 속하는 분자이며, T 세포, B 세포, natural killer(NK) 세포, 수상 세포, 호산구, 마스트 세포 등의 면역 세포 표면에 발현하고 있는 것이 보고되어 있다. 특히, T 세포 상의 CD137은 항원 제시 세포 상의 CD137 리간드와 결합하여, 공자극 분자로서 T 세포의 활성화와 생존에 관여하고 있는 것이 알려져 있다(비특허문헌 3). 항CD137 아고니스트 항체는, 동물 모델에 있어서 종양 미세 환경 내의 면역 세포의 활성화를 통한 항종양 효과를 나타내고 있다(비특허문헌 4). 항CD137 아고니스트 항체인 우렐루맵은 임상 시험에서 치료 효과를 나타내었지만, 간 장애의 부작용을 야기하는 것도 보고되고 있다(비특허문헌 5).

[0004] 낮은 항체 농도에서 암 세포 선택적인 세포 상해 활성을 얻을 수 있는 획기적인 방법으로서, 여러 가지 항체 포맷의 이중특이성 T 세포 리크루트 항체(bispecific T-cell-recruiting antibodies)가 보고되어 있다. 이중특이성 T 세포 리크루트 항체는, 암 세포 표면에 발현하는 종양 관련 항원(Tumor-Associated Antigens; TAA)에 대한 항체와, T 세포에 결합하는 항체를 포함하는 이중특이성 항체이며, T 세포 매개성 면역 요법에 대한 이들 항체의 효과가 검토되고 있다(비특허문헌 6). T 세포에 결합하는 항체로서 항CD3 항체가 많이 이용되고 있으며, 현재도 여러 가지 TAA에 대한 이중특이성 T 세포 리크루트 항체의 연구 개발이 이루어지고 있다.

[0005] 나아가, 근년에는, CD137 및 TAA에 대한 이중특이성 T 세포 리크루트 항체의 연구도 활발히 행해지고 있다. TAA 인 Glypican 3(GPC3), Human Epidermal Growth Factor Receptor Type 2(HER2), Programmed Cell Death-Ligand 1(PD-L1), Fibroblast Activation Protein(FAP)을 인식하는 항GPC3-항CD137 이중특이성 항체, 항HER2-항CD137 이중특이성 항체, 항PD-L1-항CD137 이중특이성 항체, 항FAP-항CD137 이중특이성 항체 등의 연구가 이루어지고 있다(특허문헌 2 및 3, 비특허문헌 7~9).

[0006] Programmed cell death-1(PD-1; PDCD1 또는 CD279라고도 불린다)은 이뮤노글로불린 슈퍼패밀리에 속하는

50~55kDa의 I형 막관통 단백질이다(비특허문헌 10). PD-1은 T 세포에 있어서 활성화 지속에 수반하여 발현 유도 되는데, 리간드인 Programmed death-ligand 1(PD-L1; PDCD1LG1, B7-H1 또는 CD274라고도 불린다) 또는 Programmed death-ligand 2(PD-L2; PDCD1LG2, B7-DC 또는 CD273이라고도 불린다)에 결합하는 것에 의해, T 세포의 활성화를 억제성으로 제어한다(비특허문헌 11). 일반적으로, 이와 같은 T 세포 활성화 제어 기구는, 면역 체크포인트라고 불리고 있으며, 과잉된 면역 응답을 야기하지 않기 위한 네거티브 피드백 기구의 하나로서 알려져 있다.

[0007] 암 발생 초기에 있어서, T 세포 등의 면역 세포는 면역 감시 기구에 의한 항종양 면역 응답에 의해 암을 배제한다. 한편, 암은, 암 미세 환경에 있어서 직접적 또는 간접적으로 면역 세포를 억제하는 것에 의해 면역 도피 기구를 획득하고 있다. 직접적인 활성화 T 세포 억제 기구로서, PD-1/PD-L1 또는 PD-L2(이하 "PD-1 시그널") 경로, CTLA-4/CD80 또는 CD86 경로 등의 면역 체크포인트 기구가 알려져 있다. 암의 종양 미세 환경 내에 있어서, T 세포에서의 PD-1의 발현 및 종양에서의 PD-L1의 발현이 확인되어 있고(비특허문헌 12), 이 PD-1 시그널의 활성화에 의해 암은 면역 도피를 나타낸다고 생각되고 있다. PD-1 시그널의 저해에 의해, 면역 도피 기구 해제에 의해 항종양 활성을 가져오는 것이 복수의 마우스 담암 모델에서 보고되어 있다(비특허문헌 13~15). 나아가, PD-1 시그널 저해제로서, 니볼루맙, 펠브롤리주맙 등의 항PD-1 항체 등의 PD-1 시그널 저해제의 개발이 정력적으로 행해져, 펠라노마, 폐암, 림프종 등에서 큰 성과를 올리고 있다. 또한, PD-1 시그널 저해제로서는, 항체 이외에도 핵산 의약·저분자약 등의 연구도 실시되고 있다(비특허문헌 16).

[0008] 암 환자에 있어서의 치료의 유효성을 높이기 위해서, 복수의 암 면역억제의 병용 요법이나, 암 면역억제와 기존 항암제의 병용 시험이 정력적으로 진행되고 있다(비특허문헌 17 및 18). 예를 들면, 항PD-1 항체와 다른 면역 체크포인트 저해 항체, 항암제, 분자 표적약, 방사선 치료, 암 백신, 종양 용해성 바이러스의 병용 시험이 실시되고 있다.

[0009] 그러나, 현재까지, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제의 병용에 의한 암의 치료 방법은 보고되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0010] (특허문헌 0001) 국제 공개 제2008/114733호
- (특허문헌 0002) 국제 공개 제2015/156268호
- (특허문헌 0003) 국제 공개 제2016/177802호

비특허문헌

- [0011] (비특허문헌 0001) Cancer Science, 2009: 100(9): p. 1623-1630
- (비특허문헌 0002) Oncotarget, 2018: 9(100): p. 37367-37378
- (비특허문헌 0003) Cancer Science, 2020: 111(5): p. 1461-1467
- (비특허문헌 0004) Cancer Immunology Immunotherapy, 2012: 61(5): p. 1721-1733
- (비특허문헌 0005) Clinical Cancer Research, 2017: 23(8): p. 1929-1936
- (비특허문헌 0006) MAbs, 2017: 9(2): p. 182-212
- (비특허문헌 0007) Clinical Cancer Research, 2019: 25(19): p. 5878-5889
- (비특허문헌 0008) Clinical Cancer Research, 2020: 26(15): p. 4154-4167
- (비특허문헌 0009) Journal for Immunotherapy of Cancer, 2020: 8(2): e000238
- (비특허문헌 0010) International Immunology, 1996: Vol. 8: p. 765-772
- (비특허문헌 0011) Annual Review of Immunology, 2008: Vol. 26: p. 677-704

- (비특허문헌 0012) Nature Medicine, 2002: 8: p. 793-800
- (비특허문헌 0013) Scientific Reports, 2021: 11: p. 21087-21099
- (비특허문헌 0014) Nature Communications, 2017: 8: p. 14572-14582
- (비특허문헌 0015) Journal for Immunotherapy of Cancer, 2019: 7: 37: p. 1-16
- (비특허문헌 0016) Molecules, 2019: 24: p. 2071-2100
- (비특허문헌 0017) Cancer Discovery, 2021: 11: p. 1368-1397
- (비특허문헌 0018) Molecular Medicine Reports, 2021: 23: p. 362-377

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 과제는, 대상의 암 치료를 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 혹은 당해 이중특이성 항체를 포함하는 의약 조성물의 제공, 또는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법의 제공이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명자들은, CLDN4 발현 암의 치료에 이용하는 항체 또는 의약 조성물의 창성(創成)을 목적으로 하여, 공지된 항CLDN4 항체인 KM3900 항체 및 항CD137 항체의 서열에 기초해서, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 제작하였다(실시예 1). 취득한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항PD-1 항체 또는 항PD-L1 항체의 병용은, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체, 항PD-1 항체 또는 항PD-L1 항체 단독의 경우와 비교하여, *in vitro*에 있어서 T 세포의 인터페론 γ 산생을 촉진하였다(실시예 2 및 3). 나아가, 인간 CLDN4 발현 마우스 암 세포를 담당한 마우스에 있어서, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항PD-1 항체의 병용은, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 또는 항PD-1 항체를 단독 투여한 경우에 비해 유의한 항종양 효과를 나타내었다(실시예 4). 이 결과로부터, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제의 조합은, CLDN4 발현 암의 치료에 유용한 것이 시사되었다.

[0014] 즉, 본 발명은, 이들에 한정되는 것은 아니지만, 이하의 [1]~[84]에 관한 것이다.

[0015] [1] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 의약 조성물로서, 해당 이중특이성 항체가 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물.

[0016] [2] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 51부터 57까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 90부터 98까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [1]에 기재된 의약 조성물.

[0017] [3] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [1] 또는 [2]에 기재된 의약 조성물.

[0018] [4] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는 IgG 항체(항CLDN4 IgG 항체)를 포함하는, [1]~[3] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

[0019] [5] 항CLDN4 IgG 항체의 Fc 영역에 LALA 변이(L234A 및 L235A) 혹은 P331G 변이(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따른 아미노산 위치이다)의 어느 하나 또는 양쪽을 포함하는, [4]에 기재된 의약 조성물.

- [0020] [6] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 625부터 629까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 644부터 659까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 692부터 701까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 486부터 498까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 514부터 520까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 553부터 563까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [1]~[5] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0021] [7] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [1]~[6] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0022] [8] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 1본쇄 가변 영역 프래그먼트(항CD137 scFv)를 포함하는, [6] 또는 [7]에 기재된 의약 조성물.
- [0023] [9] 항CD137 scFv가 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [8]에 기재된 의약 조성물.
- [0024] [10] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CLDN4 IgG 항체 및 항CD137 scFv를 포함하고, 항CLDN4 IgG 항체의 중쇄 카복시 말단에 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, [8] 또는 [9]에 기재된 의약 조성물.
- [0025] [11] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 의약 조성물로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물.
- [0026] [12] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 의약 조성물로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 453까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 215까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물.
- [0027] [13] 링커가 GS 링커인, [10]~[12] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0028] [14] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, 대상의 암을 치료하기 위한 의약 조성물로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하고, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물.
- [0029] [15] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가 번역 후 수식된 것인, [1]~[14] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0030] [16] PD-1 시그널 저해제와 동시에, 연속적으로 또는 축차적으로 조합하여 사용되는, [1]~[15] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0031] [17] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제가 (i) 동일한 의약 조성물에 포함되어 있어 동시에 투여되거나, 또는 (ii) 별개의 의약 조성물에 포함되어 있고, 동시에, 연속적으로 혹은 축차적으로 조합하여 사용되는, [1]~[16] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0032] [18] 암이, 대장암, 방광암 및 폐암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, [1]~[17] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0033] [19] PD-1 시그널 저해제가, PD-1, PD-L1 및 PD-L2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 단백질에 결합하는 항체 또는 이들의 항원 결합 프래그먼트인, [1]~[18] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.

- [0034] [20] PD-1 시그널 저해제가, 니볼루맙, 펠브롤리주맙, 피딜리주맙, 스파르탈리주맙 및 세미폴리맙으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-1 항체인, [1]~[19] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0035] [21] PD-1 시그널 저해제가, 아테졸리주맙, 듀르발루맙 및 아벨루맙으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-L1 항체인, [1]~[19] 중 어느 하나에 기재된 의약 조성물.
- [0036] [22] 대상의 암을 치료하기 위한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체로서, 해당 이중특이성 항체가 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하고, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 이중특이성 항체.
- [0037] [23] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 51부터 57까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 90부터 98까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [22]에 기재된 이중특이성 항체.
- [0038] [24] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [22] 또는 [23]에 기재된 이중특이성 항체.
- [0039] [25] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는 IgG 항체(항CLDN4 IgG 항체)를 포함하는, [22]~[24] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0040] [26] 항CLDN4 IgG 항체의 Fc 영역에 LALA 변이(L234A 및 L235A) 혹은 P331G 변이(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따른 아미노산 위치이다)의 어느 하나 또는 양쪽을 포함하는, [25]에 기재된 이중특이성 항체.
- [0041] [27] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 625부터 629까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 644부터 659까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 692부터 701까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 486부터 498까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 514부터 520까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 553부터 563까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [22]~[26] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0042] [28] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [22]~[27] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0043] [29] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 1본쇄 가변 영역 프래그먼트(항CD137 scFv)를 포함하는, [27] 또는 [28]에 기재된 이중특이성 항체.
- [0044] [30] 항CD137 scFv가 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [29]에 기재된 이중특이성 항체.
- [0045] [31] 항CLDN4 IgG 항체 및 항CD137 scFv를 포함하고, 항CLDN4 IgG 항체의 중쇄 카복시 말단에 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, [29] 또는 [30]에 기재된 이중특이성 항체.
- [0046] [32] 대상의 암을 치료하기 위한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 이중특이성 항체.
- [0047] [33] 대상의 암을 치료하기 위한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체로서, 해당 이중특이성 항체가, 서열 번호 2

의 아미노산 번호 1부터 453까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 215까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 이중특이성 항체.

- [0048] [34] 링커가 GS 링커인, [31]~[33] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0049] [35] 대상의 암을 치료하기 위해서 사용되는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하고, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 이중특이성 항체.
- [0050] [36] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가 번역 후 수식된 것인, [22]~[35] 중 어느 하나에 기재된 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체.
- [0051] [37] PD-1 시그널 저해제와 동시에, 연속적으로 또는 축차적으로 조합하여 사용되는, [22]~[36] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0052] [38] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제가 (i) 동일한 의약 조성물에 포함되어 있어 동시에 투여되거나, 또는 (ii) 별개의 의약 조성물이고, 동시에, 연속적으로 혹은 축차적으로 조합하여 사용되는, [22]~[37] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0053] [39] 암이, 대장암, 방광암 및 폐암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, [22]~[38] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0054] [40] PD-1 시그널 저해제가, PD-1, PD-L1 및 PD-L2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 단백질에 결합하는 항체 또는 이들의 항원 결합 프래그먼트인, [22]~[39] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0055] [41] PD-1 시그널 저해제가, 니볼루맙, 펨브롤리주맙, 피딜리주맙, 스파르탈리주맙 및 세미폴리맙으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-1 항체인, [22]~[40] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0056] [42] PD-1 시그널 저해제가, 아테졸리주맙, 듀르발루맙 및 아벨루맙으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-L1 항체인, [22]~[40] 중 어느 하나에 기재된 이중특이성 항체.
- [0057] [43] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 조합하여 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법으로서, 해당 이중특이성 항체가 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 치료 방법.
- [0058] [44] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 51부터 57까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 90부터 98까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [43]에 기재된 치료 방법.
- [0059] [45] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [43] 또는 [44]에 기재된 치료 방법.
- [0060] [46] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는 IgG 항체(항CLDN4 IgG 항체)를 포함하는, [43]~[45] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0061] [47] 항CLDN4 IgG 항체의 Fc 영역에 LALA 변이(L234A 및 L235A) 혹은 P331G 변이(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따른 아미노산 위치이다)의 어느 하나 또는 양쪽을 포함하는, [46]에 기재된 치료 방법.
- [0062] [48] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 625부터 629까지의 아미노산 서열로 이루어

어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 644부터 659까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 692부터 701까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 486부터 498까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 514부터 520까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 553부터 563까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [43]~[47] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.

- [0063] [49] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [43]~[48] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0064] [50] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 1본쇄 가변 영역 프래그먼트(항CD137 scFv)를 포함하는, [48] 또는 [49]에 기재된 치료 방법.
- [0065] [51] 항CD137 scFv가 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [50]에 기재된 치료 방법.
- [0066] [52] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CLDN4 IgG 항체 및 항CD137 scFv를 포함하고, 항CLDN4 IgG 항체의 중쇄 카복시 말단에 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, [50] 또는 [51]에 기재된 치료 방법.
- [0067] [53] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 조합하여 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법으로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, 치료 방법.
- [0068] [54] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 조합하여 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법으로서, 해당 이중특이성 항체가, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 453까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 215까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, 치료 방법.
- [0069] [55] 링커가 GS 링커인, [52]~[54] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0070] [56] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 조합하여 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법으로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하는, 치료 방법.
- [0071] [57] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가 번역 후 수식된 것인, [43]~[56] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0072] [58] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제가 동시에, 연속적으로 또는 축차적으로 조합하여 사용되는, [43]~[57] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0073] [59] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제가 (i) 동일한 의약 조성물에 포함되어 있어 동시에 투여되거나, 또는 (ii) 별개의 의약 조성물이고, 동시에, 연속적으로 혹은 축차적으로 조합하여 사용되는, [43]~[58] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0074] [60] 암이, 대장암, 방광암 및 폐암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, [43]~[58] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0075] [61] PD-1 시그널 저해제가, PD-1, PD-L1 및 PD-L2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 단백질에 결합하는 항체 또는 이들의 항원 결합 프래그먼트인, [43]~[60] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0076] [62] PD-1 시그널 저해제가, 니볼루맙, 켈브롤리주맙, 피딜리주맙, 스파르탈리주맙 및 세미플리맙으로 이루어지

는 군으로부터 선택되는 항PD-1 항체인, [43]~[61] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.

- [0077] [63] PD-1 시그널 저해제가, 아테졸리주맙, 듀르발루맙 및 아벨루맙으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-L1 항체인, [43]~[61] 중 어느 하나에 기재된 치료 방법.
- [0078] [64] 대상의 암을 치료하기 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 의약 조성물의 제조를 위한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용으로서, 해당 이중특이성 항체가 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는, 사용.
- [0079] [65] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 51부터 57까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 90부터 98까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [64]에 기재된 사용.
- [0080] [66] 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [64] 또는 [65]에 기재된 사용.
- [0081] [67] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 중쇄 및 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 경쇄로 이루어지는 IgG 항체(항CLDN4 IgG 항체)를 포함하는, [64]~[66] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0082] [68] 항CLDN4 IgG 항체의 Fc 영역에 LALA 변이(L234A 및 L235A) 혹은 P331G 변이(여기에서, 상기 변이 위치는 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따른 아미노산 위치이다)의 어느 하나 또는 양쪽을 포함하는, [67]에 기재된 사용.
- [0083] [69] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 625부터 629까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 644부터 659까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 692부터 701까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 486부터 498까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 514부터 520까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 553부터 563까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는, [64]~[68] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0084] [70] 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역이 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [64]~[69] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0085] [71] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 1본쇄 가변 영역 프래그먼트(항CD137 scFv)를 포함하는, [69] 또는 [70]에 기재된 사용.
- [0086] [72] 항CD137 scFv가 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는, [71]에 기재된 사용.
- [0087] [73] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가, 항CLDN4 IgG 항체 및 항CD137 scFv를 포함하고, 항CLDN4 IgG 항체의 중쇄 카복시 말단에 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, [71] 또는 [72]에 기재된 사용.
- [0088] [74] 대상의 암을 치료하기 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 의약 조성물의 제조를 위한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용으로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, 사용.

- [0089] [75] 대상의 암을 치료하기 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 의약 조성물의 제조를 위한 항 CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용으로서, 해당 이중특이성 항체가, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 453까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 215까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, 사용.
- [0090] [76] 링커가 GS 링커인, [73]~[75] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0091] [77] 대상의 암을 치료하기 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 의약 조성물의 제조를 위한 항 CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용으로서, 해당 이중특이성 항체가 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하는, 사용.
- [0092] [78] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가 번역 후 수식된 것인, [64]~[77] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0093] [79] 의약 조성물이, PD-1 시그널 저해제와 동시에, 연속적으로 또는 축차적으로 조합하여 사용되는, [64]~[78]의 어느쪽이든 일항에 기재된 사용.
- [0094] [80] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제가 (i) 동일한 의약 조성물에 포함되어 있어 동시에 투여되거나, 또는 (ii) 별개의 의약 조성물이고, 동시에, 연속적으로 혹은 축차적으로 조합하여 사용되는, [64]~[79] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0095] [81] 암이, 대장암, 방광암 및 폐암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는, [64]~[80] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0096] [82] PD-1 시그널 저해제가, PD-1, PD-L1 및 PD-L2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 단백질에 결합하는 항체 또는 이들의 항원 결합 프래그먼트인, [64]~[81] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0097] [83] PD-1 시그널 저해제가, 니볼루맵, 펌브롤리주맵, 피딜리주맵, 스파르탈리주맵 및 세미플리맵으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-1 항체인, [64]~[82] 중 어느 하나에 기재된 사용.
- [0098] [84] PD-1 시그널 저해제가, 아테졸리주맵, 듀르발루맵 및 아벨루맵으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 항PD-L1 항체인, [64]~[82] 중 어느 하나에 기재된 사용.

발명의 효과

- [0099] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 암에 있어서 고발현하고 있는 CLDN4와 T 세포 표면 분자인 CD137의 양쪽에 결합하여, 암 세포 주변의 면역 세포를 활성화하는 것에 의해 암 세포에 대한 살상 작용을 증강시키는 것이다. 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제의 조합은, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 또는 PD-1 시그널 저해제의 단독 투여에 비해 유의한 항종양 효과를 가져온다. 따라서, 본 발명은, 암 치료에 있어서의 PD-1 시그널 저해제와의 조합에 의한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0100] 도 1a는 인간 대세포 폐암 세포주의 LCLC-OKT3 scFv 세포와 Expanded pan T 세포의 공배양계에 있어서의 피험 항체 첨가에 의한 인터페론- γ 산생량을 나타낸다. 도면의 세로축은 항체 첨가 4일 후에 있어서의 인터페론- γ 산생량을, 가로축은 항체 농도를 나타낸다. 심볼은 각 항체의 각 농도에 있어서의 인터페론- γ 산생량의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.
- 도 1b는 인간 대세포 폐암 세포주의 LCLC-OKT3 scFv 세포와 Expanded pan T 세포의 공배양계에 있어서의 피험 항체 첨가에 의한 인터페론- γ 산생량을 나타낸다. 도면의 세로축은 항체 첨가 5일 후에 있어서의 인터페론- γ 산생량을, 가로축은 항체 농도를 나타낸다. 심볼은 항체의 각 농도에 있어서의 인터페론- γ 산생량의 평균치를 나타낸다. 에러 바는 표준 편차를 나타낸다.
- 도 2는 B-h4-1BB 마우스에 담압된 인간 CLDN4 발현 B16-F10 세포의 증식 억제 효과를 나타낸다. 도 2는 항체 투여 개시 후의 각 일수에 있어서의 종양 체적의 평균치(n=10)를 나타낸다. 에러 바는 종양 체적의 표준 오차를 나타낸다. 도면의 세로축은 종양 체적을 나타내고, 가로축은 항체 초회 투여일로부터의 일수를 나타낸다. 유의

확률 P값은, unpaired Student's t 검정에 의해, 병용군의 중앙 체적을 피험 항체 단일체 투여군의 중앙 체적과 비교하는 것에 의해 구하였다. 도면 중의 **는, P값이 유의 수준 0.01보다 작은 것을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0101] 이하에, 본 발명에 대해 상술한다.
- [0102] 본 명세서의 용어는, 이하에서 특별히 정의되지 않는 한, 당해 기술 분야에서 당업자에게 일반적으로 사용되고 있는 의미로 사용된다.
- [0103] 항체(또는 번역글로불린)란 단일의 서열을 갖는 중쇄 2본과, 단일의 서열을 갖는 경쇄 2본으로 이루어지는 좌우 대칭 Y자형의 구조를 갖는 4본쇄 구조를 기본 구조로 하는 당단백질을 말한다. 항체에는 IgG, IgM, IgA, IgD 및 IgE의 5개의 클래스가 존재한다. 항체 분자의 기본 구조는 각 클래스 공통이며, 분자량 5만~7만의 중쇄 2본과 2만~3만의 경쇄 2본이 다이설파이드 결합 및 비공유 결합에 의해 결합하여, 분자량 15만~19만의 Y자형의 4본쇄 구조로 이루어지는 항체 분자를 형성한다. 중쇄는, 통상 약 440개의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드쇄로 이루어지고, 클래스마다 특징적인 구조를 가지며, IgG, IgM, IgA, IgD, IgE에 대응하여 각각, Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ , Ig ϵ 이라고 불린다. 나아가 IgG에는, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4의 서브클래스가 존재하고, 각각에 대응하는 중쇄는 Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3, Ig γ 4라고 불린다. 경쇄는, 통상 약 220개의 아미노산을 포함하는 폴리펩타이드쇄로 이루어지고, λ 형과 κ 형의 2종이 알려져 있으며, 각각 Ig λ , Ig κ 라고 한다. 상기 2종의 경쇄는, 어느 종류의 중쇄와도 쌍을 이룰 수 있다.
- [0104] 항체 분자의 쇠내 다이설파이드 결합은, 중쇄에는 4개(Ig μ , Ig ϵ 에는 5개), 경쇄에는 2개 존재하여, 아미노산 100~110 잔기마다 1개의 루프를 이루고 있다. 그들의 입체 구조는 각 루프 사이에서 유사하며, 구조 단위 또는 도메인이라고 불린다. 중쇄, 경쇄 모두 아미노 말단(본 명세서에 있어서 "N 말단"이라고도 칭한다)에 위치하는 도메인은 가변 영역이라고 불리며, 동종 동물의 동일 클래스(또는 서브클래스)로부터 산생된 항체이더라도 다양한 아미노산 서열을 갖고, 항체와 항원의 결합 특이성 결합에 관여하는 것이 알려져 있다. 가변 영역보다도 하류의 C 말단 측의 도메인의 아미노산 서열은, 각 클래스 또는 서브클래스마다 거의 일정하며, 정상 영역이라고 불리고 있다. 중쇄는, N 말단으로부터 카복시 말단(본 명세서에 있어서 "C 말단"이라고도 칭한다)을 향하여 중쇄 가변 영역(VH) 및 중쇄 정상 영역(CH)을 갖는다. CH는 N 말단 측으로부터 CH1 도메인, CH2 도메인, CH3 도메인의 3개의 도메인으로 더 나뉜다. 경쇄는, N 말단으로부터 C 말단을 향하여 경쇄 가변 영역(VL) 및 경쇄 정상 영역(CL)을 갖는다.
- [0105] VH 및 VL에 존재하는 3개의 상보성 결정 영역(CDR)의 아미노산 서열은 변화가 매우 커, 가변 영역의 가변성에 기여하고 있다. CDR은, 중쇄와 경쇄의 N 말단 각각에 CDR1, CDR2, CDR3의 순번으로 존재하는 대략 5~10 아미노산 잔기로 이루어지는 영역으로서, 항원 결합 부위를 형성한다. 한편, 가변 영역의 CDR 이외의 부분은 프레임워크 영역(FR)이라고 불리며, FR1~4로 이루어지고, 아미노산 서열의 변화는 비교적 적다.
- [0106] 항체를 단백질 분해 효소인 파파인으로 처리하면, 3개의 항체 단편이 얻어진다. N 말단 측의 2개의 단편은 Fab(항원 결합 단편, Fragment, antigen binding) 영역이라고 불리고 있다. 본 명세서에 있어서, "Fab 영역"이란, 중쇄의 VH와 CH1 도메인 및 경쇄(VL과 CL)로 이루어지는 영역을 가리키고, 당해 Fab 영역이 구성하는 선단 부분의 항원 결합 부위에서 항원과 결합한다. 본 명세서에 있어서, "중쇄 프래그먼트"란, Fab 영역을 구성하는 중쇄의 VH와 CH1 도메인으로 이루어지는 프래그먼트를 가리킨다. 또한, C 말단 측의 단편을 "Fc(결정화 가능 단편, Fragment, crystallizable) 영역"이라고 부른다.
- [0107] 본 명세서에 있어서, "항원"이란 일반적으로 이용되고 있는 의미로 이용되며, 특히, 항체나 항원 결합 프래그먼트 등의 항원 결합 단백질이 특이적으로 결합할 수 있는 분자 또는 분자의 일부를 나타내는 용어로서 이용된다. 항원은 단백질, 핵산 등의 분자일 수 있다. 1개의 항원은, 상이한 항체 등과 상호작용할 수 있는 1개 또는 그 이상의 에피토프를 갖는 경우도 있다.
- [0108] 본 명세서에 있어서 "IgG 항체"란, 2개의 Fab 영역과 Fc 영역으로 이루어지는 Y자형의 구조를 갖는 항체를 말한다. 하나의 실시형태에 있어서, IgG 항체의 2개의 Fab 영역은, 동일한 VH 및 VL 서열을 포함한다.
- [0109] 본 명세서에 있어서, "항원 결합 프래그먼트"란 항체에서 유래하는 항원 결합 활성을 갖는 적어도 1개의 폴리펩타이드쇄를 포함하는 분자이다. 대표적인 항원 결합 프래그먼트로서는, 1본쇄 가변 영역 프래그먼트(scFv), Fab 프래그먼트, Fab' 프래그먼트, F(ab')₂ 프래그먼트를 들 수 있다. scFv는, 링커로 연결된 VH와 VL로 구성되는, 1가의 항원 결합 프래그먼트이다. Fab 프래그먼트는, 경쇄와 중쇄의 VH, CH1 도메인을 포함하는 프래그먼트로

구성되는, 1가의 항원 결합 프래그먼트이다. Fab' 프래그먼트는, 경쇄와 중쇄의 VH, CH1 도메인과 힌지 영역의 일부를 포함하는 프래그먼트로 구성되는, 1가의 항원 결합 프래그먼트이며, 이 힌지 영역의 부분에는 중쇄간 S-S 결합을 구성하고 있던 시스템인 잔기가 포함된다. F(ab')₂ 프래그먼트는, Fab' 프래그먼트가 다이설파이드 결합으로 이어져 있는 2가의 분자이다. 1가란, 항원 결합 부위를 1개 포함하는 것을, 2가란, 항원 결합 부위를 2개 포함하는 것을 의미한다.

- [0110] 본 명세서에 있어서, "이중특이성 항체"란 2개의 상이한 항원에 특이적으로 결합할 수 있는 항체를 말한다. "항 CLDN4-항CD137 이중특이성 항체"란, CLDN4에 대한 결합 활성 및 CD137에 대한 결합 활성을 갖는 이중특이성 항체를 의미한다.
- [0111] 본 명세서에 있어서, "항체"란 문맥상 특별히 한정되지 않는 한, 완전 길이의 항체, 항원 결합 프래그먼트, 및 모든 구조의 이중특이성 항체를 포함하는 용어로서 사용된다.
- [0112] 본 명세서에 있어서 "인간 항체"란 인간 면역글로불린 아미노산 서열을 갖는 항체를 나타낸다. 본 명세서에 있어서 "인간화 항체"는, CDR 이외의 아미노산 잔기의 일부, 대부분, 또는 전부가 인간 면역글로불린 분자에서 유래하는 아미노산 잔기로 치환된 항체를 나타낸다. 인간화의 방법은 특별히 제한되지 않지만, 예를 들면, 미국 특허 제5225539호, 미국 특허 제6180370호 등을 참조하여 인간화 항체를 제작할 수 있다.
- [0113] 본 명세서 중에서 사용되는 항체의 아미노산 잔기 번호는 Kabat 넘버링 또는 EU 인덱스(Kabat 등, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., 1991: NIH Publication: No. 91-3242)를 지칭함으로써, 그들의 넘버링 시스템에 따라 규정할 수 있다.
- [0114] 본 명세서에 있어서, "연결", "연결체" 또는 "연결된"이란, 복수의 성분(예를 들면, IgG 항체 및 scFv)이, 직접 또는 중개물(예를 들면, 펩타이드 링커)을 개재시켜 결합하고 있는 것을 의미한다. 본 명세서에 있어서 "펩타이드 링커"란, 복수의 성분을 연결하기 위해서 이용되는, 유전자 공학적 수법에 의해 도입될 수 있는 1 이상의 임의의 아미노산 서열을 의미한다. 본 발명에서 사용되는 펩타이드 링커의 길이는 특별히 한정되지 않고, 목적에 따라 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하다.
- [0115] 본 명세서에 있어서, "대상"이란 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 인간 또는 그 밖의 동물을 의미한다. 하나의 실시형태에 있어서, 대상은 질환의 예방 또는 치료를 필요로 하는 인간이다. 하나의 실시형태에 있어서, 대상은 암을 갖는 인간이다.
- [0116] 본 명세서에 있어서, "치료"란 질환의 증상, 병상(病狀), 질환과 관련된 생화학적 징후의 진행, 발증, 중독화(重篤化) 또는 재발을, 회복, 완화, 개선, 억제 또는 지연시킬 목적으로 대상에 대해서 행해지는 어떠한 치료 개입(intervention), 처치, 또는 대상에의 유효 성분의 투여를 의미한다.
- [0117] 본 명세서에 있어서, "유효 성분"이란 질환의 예방 또는 치료에 이용하는 의약 조성물, 의약품 등에 포함되는 물질 중, 어떠한 생리 활성을 나타내는 것을 의미한다. 하나의 실시형태에 있어서, 유효 성분은 항체, 저분자 화합물, 핵산, 융합 단백질, 펩타이드이다. 하나의 실시형태에 있어서, 유효 성분은 항체이다. 하나의 실시형태에 있어서, 유효 성분은 이중특이성 항체이다.
- [0118] 본 명세서에 있어서, "의약 조성물"이란, 유효 성분 및 약학적으로 허용되는 부형제(예를 들면 약제용 부형제나 약제용 담체 등이 포함되지만 이에 한정되지 않는다)를 포함하고, 대상의 치료를 목적으로 하여 처방되는 약제이다.
- [0119] 본 명세서에 있어서, "병용", "조합" 또는 "조합하여 사용"이란 질환의 예방 또는 치료를 위해서, 동일한 대상에, 복수종의 유효 성분을 동시에, 연속적으로 또는 축차적으로 투여하는 것을 의미한다. 당해 복수종의 유효 성분은, 동일한 의약 조성물 중에 포함되어 있어도 되고, 상이한 의약 조성물 중에 따로따로 포함되어 있어도 된다. 본 명세서에 있어서, "동시"란 복수종의 유효 성분을 한쪽의 투여 기간 내에 병행하여 투여하는 것을 의미하고, "연속적"이란 한쪽의 유효 성분의 투여가 종료한 후에 기간을 두지 않고 다른 쪽의 유효 성분의 투여를 행하는 것을 의미하며, "축차적"이란 복수종의 유효 성분을 투여 스케줄에 준하여 순서대로 투여하는 것을 의미한다.
- [0120] 본 명세서에 있어서, 약제의 "유효량"이란 그것이 투여되는 세포 또는 조직에 생리학적 변화를 가져오기 위해서 필요한 약제의 양을 가리킨다.
- [0121] 본 명세서에 있어서, "PD-1 시그널 저해제"란 PD-1에 의한 면역 세포 활성화 억제를 해제하는 약제를 의미한다.

PD-1 시그널 저해제는, PD-1 또는 그 리간드인 PD-L1 또는 PD-L2에 결합하여 면역 억제 시그널을 저해하는 것에 의해, PD-1에 의한 면역 체크포인트의 기능을 저해할 수 있다. PD-1 시그널 저해제로서는, PD-1 시그널을 차단하는 효과를 갖는 한, 어떠한 물질이어도 되고, 예를 들면, 항체, 저분자 화합물, 핵산(DNA 혹은 RNA, 또는, 천연 혹은 인공의 핵산을 포함하고 있어도 된다), 융합 단백질, 펩타이드 등이어도 된다. 예를 들면, 항PD-1 항체 또는 항PD-L1 항체 혹은 항PD-L2 항체는, PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2의 결합을 저해하는 것에 의해, PD-1 시그널을 저해할 수 있다(Expert Opinion on Therapeutic Patents, 2016: Vol. 26: p. 555-564).

[0122] 본 발명은, 이하의 (1)~(4)에 관한 것이다:

[0123] (1) 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 포함하는, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는, 의약 조성물(본 명세서 중, "본 발명의 의약 조성물"이라고도 칭한다);

[0124] (2) 대상의 암을 치료하기 위해서, PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체;

[0125] (3) 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 대상에 투여하는 것을 포함하는 암의 치료 방법(본 명세서 중, "본 발명의 치료 방법"이라고도 칭한다); 또는

[0126] (4) 대상의 암을 치료하기 위해서 PD-1 시그널 저해제와 조합하여 사용되는 의약 조성물의 제조를 위한, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 사용.

[0127] <본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체>

[0128] 본 발명에서 사용되는 CLDN4 및 CD137에 결합하는 이중특이성 항체("본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체"라고도 칭한다)는, 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역, 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0129] 본 명세서에 있어서, "항CLDN4 항체"는 인간 CLDN4에 결합 가능한 항체이며, "항CD137 항체"는 인간 CD137에 결합 가능한 항체이다. 인간 CLDN4 또는 인간 CD137에 결합하는지 여부는, 공지된 결합 활성 측정 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 결합 활성을 측정하는 방법으로서, 예를 들면, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)법, 플로 사이토메트리법 등의 방법을 들 수 있다. ELISA법 또는 플로 사이토메트리법은, 당업자가 통상 이용하는 방법으로 실시할 수 있다.

[0130] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, CLDN4 및 CD137에 결합하는 한에 있어서 어떠한 구조여도 되고, 예를 들면, 비특허문헌 6에 기재되어 있는 구조를 갖는 이중특이성 항체를 들 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 항CLDN4 항체의 Fab 영역과 항CD137 항체의 Fab 영역이 연결된 연결체, IgG 항체형의 항CLDN4 항체("항CLDN4 IgG 항체"라고도 칭한다) 및 IgG 항체형의 항CD137 항체("항CD137 IgG 항체"라고도 칭한다)의 연결체, 항CLDN4 IgG 항체 및 항CD137 항체의 항원 결합 프래그먼트의 연결체, 항CLDN4 항체의 항원 결합 프래그먼트 및 항CD137 IgG 항체의 연결체, 또는 항CLDN4 항체의 항원 결합 프래그먼트 및 항CD137 항체의 항원 결합 프래그먼트의 연결체여도 된다.

[0131] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 51부터 57까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 90부터 98까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0132] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역을 포함한다.

[0133] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체에 포함되는 항CLDN4 항체는 IgG 항체여도 된다. 항CLDN4 항체에 포함되는 중쇄 정상 영역으로서, Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ 또는 Ig ϵ 의 어느 정상 영역도 선택 가능하다. Ig γ 로서는, 예를 들면, Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 또는 Ig γ 4로부터 선택하는 것이 가능하다. 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체에 포함되는 항CLDN4 항체에 포함되는 경쇄 정상 영역으로서, Ig λ 또는 Ig κ 의 어느 정상 영역도 선택 가능하다. 하나의 실시형태에 있어서, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 및 경쇄는, 각각, 인간 Ig γ 1 및 Ig κ 이다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는 완전 길이의 항CLDN4 항체를

포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체에 포함되는 항CLDN4 항체는, 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역을 포함하는 IgG 항체(항CLDN4 IgG 항체)이다.

- [0134] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가 Fc 영역을 포함하는 경우, 해당 이중특이성 항체에 있어서의 Fc 영역은, 항체 의존성 세포 상해 활성(ADCC)이나 보체 의존성 상해 활성(CDC)을 저하시키는 변이를 포함해도 된다. L234A란, 인간 Ig γ 1 정상 영역의 아미노산 234위의 류신의 알라닌으로의 치환이다. L235A란, 인간 Ig γ 1 정상 영역의 아미노산 235위의 류신의 알라닌으로의 치환이다. 인간 Ig γ 1 정상 영역 L234A 및 L235A의 아미노산 변이를 "LALA 변이"라고 한다. 당해 변이는, 항체의 ADCC나 CDC를 저하시키는 것이 알려져 있다(Mol. Immunol., 1992: Vol. 29: p. 633-639, J. Immunol., 2000: Vol. 164(8): p. 4178-4184). P331G 또는 P331S란, 인간 Ig γ 1 정상 영역의 아미노산 331위의 프롤린의 글리신 또는 세린으로의 치환이다. 당해 변이는, 항체의 CDC를 저하시키는 것이 알려져 있다(J. Immunol., 2000: Vol. 164(8): p. 4178-4184).
- [0135] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체에 포함되는 항CLDN4 IgG 항체는, L234A 및 L235A의 아미노산 변이(LALA 변이)를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 항CLDN4 IgG 항체는 P331G 또는 P331S 변이의 어느 하나를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 항CLDN4 IgG 항체는, LALA 변이 및 P331G 또는 P331S 변이의 어느 하나의 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함한다. 하나의 실시형태에 있어서, 항CLDN4 IgG 항체는, LALA 변이 및 P331G 변이 중 어느 하나 또는 양쪽의 변이를 포함하는 Fc 영역을 포함한다.
- [0136] 한편, 본 명세서에 있어서, LALA 변이, P331G 또는 P331S 변이 등의 아미노산 변이의 기재는, 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따른 아미노산 위치에 기초하는 것이다. 예를 들면, 전술한 바와 같이, L234A란, 인간 Ig γ 1 정상 영역에 있어서의 EU 인덱스에 따른 아미노산 234위의 류신의 알라닌으로의 치환이다.
- [0137] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 453까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 215까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄로 이루어지는 IgG 항체이다.
- [0138] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체에 포함되는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 2의 아미노산 번호 625부터 629까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 644부터 659까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 692부터 701까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 2의 아미노산 번호 486부터 498까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 514부터 520까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 553부터 563까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함한다.
- [0139] 하나의 실시형태에 있어서, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체에 포함되는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역은 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지고, 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역은 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어진다.
- [0140] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 항CD137 항체의 scFv(본 명세서 중, "항CD137 scFv"라고도 칭한다)를 포함한다.
- [0141] 항CD137 scFv에 있어서, 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역과 경쇄 가변 영역을 연결하는 링커의 종류 및 길이는 특별히 한정되지 않고, 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하다. 링커로서는, 펩타이드 링커를 이용해도 된다. 바람직한 길이는 5 아미노산 이상(상한은 특별히 한정되지 않지만, 통상, 30 아미노산 이하, 바람직하게는 20 아미노산 이하)이며, 특히 바람직하게는 15 아미노산이다. 링커로서, 예를 들면, 글리신-세린 링커(GS 링커)나, 글리신-리신-프롤린-글리신-세린 링커(GKPGS 링커)를 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서의 링커로서는, 예를 들면, 이하를 들 수 있다.
- [0142] Ser
- [0143] Gly-Ser
- [0144] Gly-Gly-Ser
- [0145] Ser-Gly-Gly
- [0146] Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 5)

- [0147] Ser-Gly-Gly-Gly (서열 번호 6)
- [0148] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 7)
- [0149] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (서열 번호 8)
- [0150] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 9)
- [0151] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (서열 번호 10)
- [0152] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 11)
- [0153] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (서열 번호 12)
- [0154] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 13)
- [0155] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n
- [0156] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n
- [0157] Gly-Lys-Pro-Gly-Ser (서열 번호 14)
- [0158] (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n
- [0159] 상기의 n 은 1 이상의 정수를 나타낸다. 또한, 어떤 태양에서는, 상기의 n 은 1~10, 2~8, 또는 2~6이다. 링커의 길이나 서열은 목적에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.
- [0160] 하나의 실시형태에 있어서, 항CD137 scFv에 있어서 사용되는 링커는, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n의 GS 링커이다.
- [0161] 하나의 실시형태에 있어서, 항CD137 scFv에 있어서 사용되는 링커는, (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₄의 GS 링커이다.
- [0162] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역과 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역이 GS 링커를 개재시켜 연결된 항CD137 scFv를 포함한다.
- [0163] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 scFv를 포함한다.
- [0164] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 항CLDN4 IgG 항체와 항CD137 scFv를 포함한다.
- [0165] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체에 있어서, 항CLDN4 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트와 항CD137 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트(예를 들면, 항CD137 scFv)는 링커로 연결되어 있어도 된다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 항CLDN4 IgG 항체 및 항CD137 scFv를 포함하고, 항CLDN4 IgG 항체와 항CD137 scFv가 링커를 개재시켜 연결되어 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 항CLDN4 IgG 항체 및 항CD137 scFv를 포함하고, 항CLDN4 IgG 항체의 중쇄 카복시 말단에 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있다. 항CLDN4 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트와 항CD137 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트를 연결하는 링커의 종류 및 길이는 특별히 한정되지 않고, 당업자가 적절히 선택하는 것이 가능하다. 링커로서는, 펩타이드 링커를 이용해도 된다. 바람직한 길이는 5 아미노산 이상(상한은 특별히 한정되지 않지만, 통상, 30 아미노산 이하, 바람직하게는 20 아미노산 이하)이며, 특히 바람직하게는 10 아미노산이다. 펩타이드 링커로서, 예를 들면, 글리신-세린 링커(GS 링커)나, 글리신-리신-프롤린-글리신-세린 링커(GKPGS 링커)를 사용할 수 있다. 본 발명에 있어서의 링커로서는, 예를 들면, 이하를 들 수 있다.
- [0166] Ser
- [0167] Gly-Ser
- [0168] Gly-Gly-Ser
- [0169] Ser-Gly-Gly
- [0170] Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 5)

- [0171] Ser-Gly-Gly-Gly (서열 번호 6)
- [0172] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 7)
- [0173] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (서열 번호 8)
- [0174] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 9)
- [0175] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (서열 번호 10)
- [0176] Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 11)
- [0177] Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (서열 번호 12)
- [0178] Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (서열 번호 13)
- [0179] (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n
- [0180] (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n
- [0181] Gly-Lys-Pro-Gly-Ser (서열 번호 14)
- [0182] (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n
- [0183] 상기의 _n은 1 이상의 정수를 나타낸다. 또한, 어떤 태양에서는, 상기의 _n은 1~10, 2~8, 또는 2~6이다. 펩타이드 링커의 길이나 서열은 목적에 따라 당업자가 적절히 선택할 수 있다.
- [0184] 하나의 실시형태에 있어서, 항CLDN4 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트와 항CD137 항체 또는 그 항원 결합 프래그먼트(예를 들면, 항CD137 scFv)를 연결하는 펩타이드 링커로서 사용되는 링커는, 서열 번호 13의 아미노산 서열로 이루어지는 링커이다.
- [0185] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 51부터 57까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 90부터 98까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및, 서열 번호 2의 아미노산 번호 625부터 629까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 644부터 659까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 692부터 701까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 486부터 498까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 514부터 520까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 553부터 563까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, 이중특이성 항체이다.
- [0186] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, 이중특이성 항체이다.
- [0187] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 453까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 215까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는, 이중특이성 항체이다.

- [0188] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하는, 이중특이성 항체이다.
- [0189] 본 명세서에 있어서 "번역 후 수식"이란, 항체를 세포 내에서 발현시킨 경우에 항체가 번역 후에 수식을 받는 것을 말한다. 번역 후 수식의 예로서, 중쇄 N 말단의 글루타민 또는 글루탐산의 피로글루타미화, 글리코실화, 산화, 탈아미드화, 당화 등의 수식이나, 중쇄 C 말단의 리신의 카복시펩티다아제에 의한 절단에 의한 리신 결실을 들 수 있다. 여러 가지 항체에 있어서, 이와 같은 번역 후 수식이 생기는 것이 알려져 있다(J. Pharm. Sci., 2008: Vol. 97: p. 2426-2447).
- [0190] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 번역 후 수식되어 있어도 된다. 하나의 실시형태에 있어서, 번역 후 수식은 중쇄 가변 영역 N 말단의 피로글루타미화 및/또는 중쇄 C 말단 리신 결실이다. N 말단의 피로글루타미화 또는 C 말단 리신 결실에 의한 번역 후 수식이 항체의 활성에 영향을 미치는 것은 아님은 당해 분야에서 알려져 있다(Analytical Biochemistry, 2006: Vol. 348: p. 24-39).
- [0191] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 인간 CLDN4 및 인간 CD137에 결합한다. 인간 CLDN4 또는 인간 CD137에 결합하는지 여부는, 공지된 결합 활성 측정 방법을 이용하여 확인할 수 있다. 결합 활성을 측정하는 방법으로서, 예를 들면, Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay(ELISA)법, 플로 사이토메트리법 등의 방법을 들 수 있다.
- [0192] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 당업자라면, 본 명세서에 개시되는 항CLDN4 항체 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열 정보 등에 기초하여, 당해 분야에서 공지된 방법으로 제작할 수 있다. 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체에 있어서, 항CLDN4 항체 및 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역은, 인간 항체 유래, 인간화 항체 유래, 또는 그들의 조합이어도 된다. 인간화 항체의 제작에 있어서는, 당업자에게 주지된 방법을 이용하여, 적절히 백 뮤테이션을 도입해도 된다(Bioinformatics, 2015: Vol. 31: p. 434-435). 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, PCT/JP2022/18350에 기재된 방법에 따라 제조할 수 있다. PCT/JP2022/18350에 기재된 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 제작 방법(<본 발명의 이중특이성 항체의 폴리뉴클레오타이드>, <본 발명의 이중특이성 항체의 발현 벡터>, <본 발명의 숙주 세포>, <본 발명의 이중특이성 항체를 생산하는 방법> 및 실시예를 포함하지만 이에 한정되지 않는다)은, 본 명세서에 있어서 참조에 의해 인용된다(Incorporation by Reference).
- [0193] <본 발명의 의약 조성물>
- [0194] 본 발명의 의약 조성물은, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 사용하여 제조되고, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함한다. 본 발명의 의약 조성물은, 당해 분야에 있어서 통상 이용되고 있는 부형제, 즉, 약제용 부형제나 약제용 담체 등을 이용하여, 통상 사용되는 방법에 의해 조제할 수 있다. 이들 의약 조성물의 제형의 예로서는, 예를 들면, 주사제, 점적용제 등의 비경구제를 들 수 있고, 정맥내 투여, 피하 투여, 복강내 투여 등에 의해 투여할 수 있다. 체제화에 있어서는, 약학적으로 허용되는 범위에서, 이들 제형에 따른 부형제, 담체, 첨가제 등을 사용할 수 있다. 또한, 본 발명의 의약 조성물은, 전술한 바와 같이, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 및 약학적으로 허용되는 부형제를 포함하지만, 하나의 실시형태에 있어서, PD-1 시그널 저해제를 추가로 포함할 수 있다.
- [0195] 본 발명의 의약 조성물에는, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 번역 후 수식체를 포함할 수 있다. 예를 들면, C 말단 리신의 결실이나 N 말단의 피로글루타미화의 양쪽 또는 한쪽을 받은 항체 등을 함유하는 의약 조성물도 본 발명에 포함된다.
- [0196] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, 서열 번호 2의 아미노산 번호 31부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 50부터 66까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 99부터 112까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 24부터 35까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 4의 아미노산 번호 51부터 57까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 90부터 98까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄 가변 영역, 및, 서열 번호 2의 아미노산 번호 625부터 629까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 644부터 659까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 692부터 701까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 486부터 498까지

의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR1, 서열 번호 2의 아미노산 번호 514부터 520까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR2 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 553부터 563까지의 아미노산 서열로 이루어지는 CDR3을 포함하는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 및/또는 당해 이중특이성 항체의 번역 후 수식체를 함유하는 의약 조성물이다.

[0197] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, 서열 번호 2의 아미노산 번호 1부터 123까지의 아미노산 서열로 이루어지는 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 서열 번호 4의 아미노산 번호 1부터 109까지의 아미노산 서열로 이루어지는 경쇄 가변 영역을 포함하는 항CLDN4 항체의 경쇄, 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 464부터 573까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 경쇄 가변 영역 및 서열 번호 2의 아미노산 번호 595부터 712까지의 아미노산 서열로 이루어지는 항CD137 항체의 중쇄 가변 영역을 포함하는 항CD137 scFv를 포함하고, 해당 항CLDN4 항체의 중쇄 카복시 말단에 해당 항CD137 scFv의 아미노 말단이 링커를 개재시켜 연결되어 있는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 및/또는 당해 이중특이성 항체의 번역 후 수식체를 함유하는 의약 조성물이다.

[0198] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 의약 조성물은, 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄를 포함하는 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 및/또는 당해 이중특이성 항체의 번역 후 수식체를 함유하는 의약 조성물이다.

[0199] 제제화에 있어서의 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 첨가량은, 환자의 증상의 정도나 연령, 사용하는 제제의 제형, 혹은 항체의 결합 역가 등에 따라 상이하지만, 예를 들면, 인간에의 투여량 환산으로 0.0001mg/kg~1000mg/kg 정도의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 제제에 이용할 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 제제화에 있어서의 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 첨가량은, 인간에의 투여량 환산으로 0.0001mg/kg~1000mg/kg의 범위이다. 하나의 실시형태에 있어서, 제제화에 있어서의 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 첨가량은, 인간에의 투여량 환산으로 0.001mg/kg~100mg/kg의 범위이다. 하나의 실시형태에 있어서, 제제화에 있어서의 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 첨가량은, 인간에의 투여량 환산으로 0.01mg/kg~10mg/kg의 범위이다. 하나의 실시형태에 있어서, 제제화에 있어서의 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 첨가량은, 바람직하게는, 인간에의 투여량 환산으로 0.01mg/kg~10mg/kg의 범위이다.

[0200] <PD-1 시그널 저해제>

[0201] 본 발명에 있어서, PD-1 시그널 저해제는, 대상의 암의 치료를 위해서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 또는 본 발명의 의약 조성물과 조합하여 사용된다.

[0202] 당해 PD-1 시그널 저해제의 작용 기서 및 치료 모달리티는, PD-1 시그널을 차단하는 한에 있어서 특별히 한정되지 않는다. 작용 기서로서는, 예를 들면, PD-1 시그널에 관여하는 분자간의 결합 저해, PD-1 시그널 분자의 발현량 저하(예를 들면, 단백질의 생성 저해 또는 분해 유도 등) 등의 작용 기서여도 된다. 치료 모달리티로서는, 예를 들면, 항체, 저분자 화합물, 핵산(DNA 또는 RNA, 천연 또는 인공의 핵산을 포함하고 있어도 된다), 융합 단백질, 펩타이드, 그 밖의 치료 모달리티여도 된다.

[0203] PD-1 시그널 저해제는, PD-1 및 PD-L1 또는 PD-L2로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 이상의 단백질의 결합 저해 작용, PD-1 시그널 분자의 발현량 등을 지표로 한 발현 저하 작용 등을 측정하는 방법에 의해 취득할 수 있다. 예를 들면, PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2의 결합 저해제는, PD-1 및 PD-L1 또는 PD-L2에 결합하는 저해제를 얻은 후에, 얻어진 저해제를 PD-1과 PD-L1 또는 PD-L2의 결합을 저해하는 능력으로 선별할 수 있다. 저해제의 단백질에의 결합은, 예를 들면, 플로 사이토메트리법(FCM), ELISA법, 표면 플라즈몬 공명법(SPR), 서멀 시프트 어세이법(TSA), 등은 적정 칼로리메트리법(ITC) 등의 당업자에게 주지된 방법을 이용하여 평가할 수 있다. 또한, 예를 들면, PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 등의 PD-1 시그널 분자의 발현량을 저하시키는 저해제는, 세포에 있어서의 PD-1, PD-L1 또는 PD-L2 등의 단백질량을 지표로 하여 취득할 수 있다. PD-1 시그널의 저해 작용은, T 세포 증식 IFN- γ 방출 또는 리포터 어세이 등의 작용에 의해 확인할 수 있다. 어떤 단백질의 발현량을 저하시키는 저해제의 작용은, 예를 들면, ELISA법, 정량 PCR법, in situ hybridization법, 생세포 이미징법 등의 당업자에게 주지된 방법을 이용하여 확인할 수 있다.

[0204] PD-1 시그널 저해제로서, 예를 들면, 항PD-1 항체, 항PD-L1 항체, 항PD-L2 항체 등의 PD-1 시그널을 저해하는 항체를 들 수 있다. 그와 같은 항체는, 인간화 항체, 키메라 항체, 마우스 항체, 인간 항체, 및 그들의 항원 결합 프래그먼트여도 된다. 공지된 항PD-1 항체로서는, 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 미국 특허 제8008449

호, 미국 특허 제6808710호, 미국 특허 제7488802호, 미국 특허 제8168757호 및 미국 특허 제8354509호, 및 국제 공개 제2006/121168호 및 국제 공개 제2012/145493호에 기재되어 있는 항체가 있다. 공지된 항PD-L1 항체로서는, 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면, 국제 공개 제2007/005874호, 국제 공개 제2010/077634호, 국제 공개 제2011/066389호, 국제 공개 제2013/079174호 및 미국 특허 제8217149호에 기재되어 있는 항체가 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명에 있어서 사용되는 PD-1 시그널 저해제는 항PD-1 항체, 항PD-L1 항체 혹은 항PD-L2 항체, 또는 이들의 항원 결합 프래그먼트이다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명에 있어서 사용되는 PD-1 시그널 저해제는 항PD-1 항체, 항PD-L1 항체 또는 항PD-L2 항체이다. 하나의 실시형태에 있어서, 항PD-1 항체는, 니볼루맵, 펌브롤리주맵, 피딜리주맵, 스파르탈리주맵, 세미플리맵 등의 항PD-1 항체여도 된다. 하나의 실시형태에 있어서, 항PD-L1 항체는, 아테졸리주맵, 듀르발루맵, 아벨루맵 등의 항PD-L1 항체여도 된다.

[0205] PD-1 시그널 저해제로서, 예를 들면, AMP-224(국제 공개 제2010/027827호 및 국제 공개 제2011/066342호), BMS-1166(Oncotarget, 2017: Vol. 8: p. 72167-72181) 등의, PD-1의 PD-L1에의 결합을 저해하는 융합 단백질이나 저분자 화합물도 들 수 있다. 다양한 PD-1 시그널 저해제가 당해 기술 분야에서 공지이다(비특허문헌 8).

[0206] <본 발명의 치료 방법>

[0207] 본 발명의 치료 방법은, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제를 대상에 투여하는 것을 포함하는, 암의 치료 방법("본 발명의 치료 방법"이라고 칭한다)이다.

[0208] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 치료 방법은, 대상에 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체가 PD-1 시그널 저해제와 동시에, 연속적으로 또는 축차적으로 조합하여 사용(투여)되는 것을 특징으로 한다.

[0209] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 치료 방법은, 대상에 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제가 (i) 동일한 의약 조성물에 포함되어 있어 동시에 투여되거나, 또는 (ii) 별개의 의약 조성물이고, 동시에, 연속적으로 혹은 축차적으로 조합하여 사용되는 것을 특징으로 한다.

[0210] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 치료 방법은, 대상에 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제가 (i) 동일한 의약 조성물에 포함되어 있어 동시에 투여되거나, 또는 (ii) 별개의 의약 조성물이고 동일(同日)에 투여되는 것을 특징으로 한다.

[0211] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 치료 방법은, (a) 대상에 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 투여 완료 후에 PD-1 시그널 저해제의 투여를 개시하거나, 또는 (b) 대상에 PD-1 시그널 저해제의 투여 완료 후에 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 투여를 개시하는 연속적인 사용인 것을 특징으로 한다.

[0212] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 치료 방법은, 대상에 대해서 투여 사이클을 포함하는 투여 계획에 따라 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제의 투여가 행해지는 축차적인 사용인 것을 특징으로 한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 치료 방법은, 적어도 1개의 투여 사이클 또는 모든 투여 사이클에 있어서, 대상에 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 또는 본 발명의 의약 조성물의 투여를 개시하고, 그 후에 PD-1 시그널 저해제의 투여를 개시할 수 있는 것을 특징으로 한다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 치료 방법은, 적어도 1개의 투여 사이클 또는 모든 투여 사이클에 있어서, 대상에 PD-1 시그널 저해제의 투여를 개시하고, 그 후에 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 또는 본 발명의 의약 조성물의 투여를 개시할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0213] <치료 용도>

[0214] 본 발명의 의약 조성물 및 치료 방법 등에 의해 치료되는 암은, 고형암 또는 혈액암의 어느 것이어도 된다. 본 발명에 의해 치료되는 암은, 원발성 또는 전이성의 어느 것이어도 된다. 본 발명에 의해 치료되는 암은, 특별히 한정되지 않지만, 예를 들면, 여러 가지 복막 파종암, 위암, 폐암, 급성 림프아구성 백혈병, 급성 골수성 백혈병, 호지킨 림프종, 비호지킨 림프종, B 세포 림프종, 다발성 골수종, T 세포 림프종 등의 혈액암, 골수 이형성 증후군, 선암, 편평상피암, 선편평상피암, 미분화암, 대세포암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 중피종, 피부암, 피부 T 세포 림프종, 유방암, 전립선암, 방광암, 질암, 경부암, 두경부암, 자궁암, 자궁경암, 간장암, 담낭암, 담관암, 신장암, 췌장암, 결장암, 대장암, 직장암, 소장암, 위암, 식도암, 정소암, 난소암, 뇌종양 등의 고형암, 및 골 조직, 연골 조직, 지방 조직, 근 조직, 혈관 조직 및 조혈 조직의 암 외에, 연골 육종, 유잉 육종, 악성 혈관 내피종, 악성 수반종, 골육종, 연부 조직 육종 등의 육종이나, 교아종, 다형성 교아종, 간아종, 수아종, 신아종, 신경아종, 췌아종, 흉막폐아종, 망막아종 등의 아종 등을 들 수 있다.

[0215] 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명에 의한 치료의 대상이 되는 암은, 대장암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 방

광암, 난소암, 유방암, 전립선암이다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명에 의한 치료의 대상이 되는 암은, 정상 조직과 비교하여 CLDN4가 고발현하고 있는 암이다. 본 발명에 의한 치료의 대상이 되는 암은, 바람직하게는, 정상 조직과 비교하여 CLDN4가 고발현하고 있는 암, 또는 대장암, 직장암, 폐암, 비소세포 폐암, 소세포 폐암, 방광암, 난소암, 유방암, 전립선암으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 암이다.

[0216] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 또는 PD-1 시그널 저해제의 대상에의 투여량은, 대상의 증상의 정도나 연령, 사용하는 항체, 의약 조성물, 저해제 등의 제형, 혹은 유효 성분의 활성 강도 등에 따라 상이하지만, 예를 들면, 0.0001mg/kg~1000mg/kg 정도를 이용할 수 있다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 대상에의 투여량은 0.0001mg/kg~1000mg/kg이다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 대상에의 투여량은 0.001mg/kg~100mg/kg이다. 하나의 실시형태에 있어서, 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 대상에의 투여량은 0.01mg/kg~10mg/kg이다.

[0217] 본 발명에 대해 더 이해를 얻기 위해서 참조하는 특정 실시예를 여기에 제공하지만, 이들은 예시 목적으로 하는 것이며, 본 발명을 한정하는 것은 아니다.

[0218] **실시예**

[0219] [실시예 1: 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 제작]

[0220] [실시예 1-1: 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 코딩하는 벡터의 제작]

[0221] 항CLDN4 항체인 KM3900은 다른 클라우딘 패밀리 분자인 CLDN6 등에 비해 CLDN4에 선택적으로 결합하는 것이 보고되어 있다(특허문헌 1). 그래서, 보고에 기초하여 KM3900의 인간화 항체의 제작을 행하였다.

[0222] 구체적으로는, KM3900의 가변 영역의 인간화 아미노산 서열에 기초하여, 인간 Ig γ 1의 정상 영역 및 인간 Ig κ 의 정상 영역의 서열로부터 인간화 항체의 설계를 행하였다. 인간 Ig γ 1 정상 영역에는, L234A, L235A, 및 P331G의 아미노산 변이를 도입하여 항CLDN4 항체 서열을 설계하였다. 설계한 인간화 항CLDN4 항체를 "hKM3900"이라고 칭한다.

[0223] AlivaMab 마우스(Ablexis사, 미국 특허 9346873호)에, PCT/JP2022/18350의 실시예 3에 기재된 인간 CD137-인간 Fc 융합 단백질과 면역 에주번트를 수회 투여하여 면역을 행하였다. 통상적 방법에 따라, 면역한 마우스의 림프절로부터 림프구를 회수하여, 마우스 미엘로마 세포 SP2/0과 세포 융합함으로써 하이브리도마를 제작하였다. 자동 피킹 장치로 하이브리도마의 단일 콜로니를 단리하여, 모노클론화 하이브리도마 세포(이하 "클론"이라고 칭한다)를 취득하였다. 인간 CD137에 결합하는 항체를 산생하는 클론의 스크리닝을 행하여, 항CD137 항체(이하 "A2-32"라고 칭한다)를 산생하는 클론을 취득하였다. 추가로 이 클론의 세포 용해액으로부터 cDNA를 합성하여, 항체 염기 서열을 동정하였다. 취득한 A2-32의 중쇄 가변 영역 및 경쇄 가변 영역의 서열에 기초하여 항CD137 scFv를 설계하였다.

[0224] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를, hKM3900의 아미노산 서열 및 설계한 항CD137 scFv의 아미노산 서열에 기초하여 설계하였다. 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, IgG1형의 hKM3900의 중쇄 C 말단에 GS 링커가 연결되어 있고, GS 링커의 C 말단에 항CD137 scFv의 N 말단이 결합되어 있다. 설계한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체는, 서열 번호 2의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드, 및 서열 번호 4의 아미노산 서열로 이루어지는 항CLDN4 항체의 경쇄로 이루어진다. 설계한 항CLDN4 항체의 중쇄 및 항CD137 scFv를 포함하는 폴리펩타이드를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드, 및 항CLDN4 항체의 경쇄를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 제작하여, 각각 통상적 방법에 따라 pcDNA3.4 TOPO 벡터(Thermo Fisher Scientific사)에 삽입하였다. 제작한 2개의 벡터를 "항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 발현 벡터"라고 칭한다.

[0225] [실시예 1-2: 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체의 제작]

[0226] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 발현 벡터를 이용하여, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 제작하였다. 구체적으로는, ExpiFectamine CHO Transfection Kit(Thermo Fisher Scientific사, A29129)를 이용하여 ExpiCHO-S 세포(Thermo Fisher Scientific사, A29127)에 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체 발현 벡터를 도입하여, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체를 배양 상청 중에 분비시켰다. 얻어진 배양 상청으로부터 MabSelect SuRe(Cytiva사, 17-5438-02)를 이용한 어피니티 정제법, 추가로, HiLoad 26/600 superdex 200 pg(GE 헬스케어사, 28-9893-36)을 이용한 사이즈 배제 크로마토그래피 정제법에 의해, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체인 hKM3900_tA2-32LH를 정제하였다.

[0227] 실시예 1에서 제작한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체인 hKM3900_tA2-32LH를 "항CLDN4-항CD137 이중특이성 항

체"라고 칭하는 경우도 있다.

- [0228] [실시예 2: 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항PD-1 항체의 in vitro 병용 효과]
- [0229] 인간 OKT3 scFv 발현 LCLC-103H 세포와 Expanded pan T 세포를 이용한 공배양계에 있어서, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항PD-1 항체의 in vitro 병용 효과의 검토를 행하였다.
- [0230] [실시예 2-1: Expanded Pan T 세포의 조제]
- [0231] RPMI-1640(Sigma사, R8758)에 종농도 10%의 FBS(Cytiva사, SH30084.03)와, 종농도 1%의 페니실린 스트렙토마이신(Thermo Fisher Scientific사, 15070-063)을 가한 것을 "배양 배지"라고 칭한다. 종농도 1 μ g/mL가 되도록 항CD3 항체(BioLegend사, 317325)를 150mm/Tissue Culture Dish(IWAKI사, 3030-150)(이하 "디시"라고 칭한다)에 첨가하여, 항CD3 항체를 고상화하였다. Pan T Cell Isolation Kit, human(Miltenyi Biotec사, 130-096-535)을 이용하여, 메이커 주장 프로토콜에 따라 인간 말초혈 단핵 세포(human peripheral blood mononuclear cells)(LONZA사, CC-2702)로부터 Pan T 세포(CD4 양성 T 세포 및 CD8 양성 T 세포의 양쪽을 포함한다, 이하 "Pan T 세포"라고 칭한다)를 분리하였다. 분리한 Pan T 세포를 원심 분리하고, 상청을 제거한 후에 배양 배지에 현탁하였다. 진술한 항CD3 항체를 고상화한 디시에, 배양 배지에 현탁한 Pan T 세포를 전량 파종하였다. 추가로 종농도 200U/mL의 인간 IL-2(PeproTech사, 200-2) 및 종농도 4 μ g/mL의 항CD28 항체(BioLegend사, 302934)를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양을 행하였다. 배양 개시로부터 3일 후에 Pan T 세포를 회수하고, 회수한 Pan T 세포를 배양 배지에 현탁하여 디시에 파종하였다. 추가로 종농도 200U/mL의 인간 IL-2를 첨가하고, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양을 행하였다. 그 4일 후, Pan T 세포를 전량 회수하여 원심 분리하고, 상청을 제거한 후에 셀 뱅커(Takara사, CB011)에 재현탁하고, 튜브에 분취하여 -80 $^{\circ}$ C에서 동결 보존하였다. 여기에서 동결 보존한 Pan T 세포를, 본 명세서에 있어서 "Expanded Pan T 세포"라고 칭한다.
- [0232] [실시예 2-2: 인간 CD3 항체 단쇄 가변 영역 프래그먼트(OKT3 scFv) 발현 LCLC-103H 세포의 취득]
- [0233] 인간 CLDN4를 발현하는 인간 대세포 폐암 세포주의 LCLC-103H 세포는, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen(DSMZ, ACC384)으로부터 입수하였다. 인간 대세포 폐암 세포주의 LCLC-103H 세포를 배양 배지에서 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂의 조건하에서 배양하였다. 통상적 방법에 따라 유전자 합성에 의해 제작한 인간 OKT3 scFv(Journal of Immunological Methods, 2010: 362: p. 131-141)를 코딩하는 폴리뉴클레오타이드를 pcDNA3.4-TOPO 벡터에 서브클로닝하였다. 제작한 인간 OKT3 scFv 발현 벡터를 LipofectamineLTX(Invitrogen, 15338-100)를 이용하여 메이커 주장 프로토콜에 따라 LCLC-103H 세포에 리포펙션하였다. 종농도 600 μ g/mL의 Geneticin Selective Antibiotic(Thermo Fisher Scientific사, 10131-027)을 첨가한 배양 배지에서의 선택 배양 및 한계 희석법에 의해 인간 OKT3 scFv를 안정 발현하는 LCLC-103H 세포 클론(이하 "LCLC-OKT3 scFv 세포"라고 칭한다)을 취득하였다.
- [0234] [실시예 2-3: 암 세포와 T 세포의 공배양계에서의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항PD-1 항체의 in vitro 인터페론- γ 산생 촉진 작용에 있어서의 병용 효과]
- [0235] 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항PD-1 항체의 T 세포 활성 증강 작용을 LCLC-OKT3 scFv 세포와 Expanded Pan T 세포의 공배양계에서 인터페론 γ 산생 촉진 기능을 지표로 평가하였다. LCLC-OKT3 scFv 세포를 배양 배지에서 2×10^5 개/mL로 조제하고, 평저 96웰 플레이트(IWAKI사, 4020-010)에 50 μ L씩 파종하여, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 익일, 배양 배지에서 1.32×10^6 개/mL로 조제한 Expanded Pan T 세포를, 배양 중의 평저 96웰 플레이트에 30 μ L씩 파종하였다. 피험 항체로서 실시예 1에서 취득한 hKM3900_tA2-32LH 및 항인간 PD-1 항체인 니블루맵을 이용하였다. 니블루맵의 아미노산 서열 설계는, 국제 공개 제2014/055648호에 기재된 니블루맵의 중쇄 및 경쇄의 아미노산 서열을 토대로 행하였다. 설계한 아미노산 서열로부터 국제 공개 제2021/241616호의 실시예 11에 기재된 방법에 준하여 니블루맵을 취득하였다. 아이소타입 컨트롤(도 1a 중에서는 "아이소타입"이라고 칭한다)로서 항리소자임 항체를 조제하여 사용하였다. 단일제 조건으로서, 배양 배지에서 최고 농도 50000ng/mL부터 약 3배 공비로 단계 희석한 hKM3900_tA2-32LH, 또는 배양 배지에서 최고 농도 50000ng/mL부터 약 3배 공비로 단계 희석한 니블루맵을 첨가하였다. 또한 병용 조건으로서, 농도 50000ng/mL의 니블루맵을 포함하는 배양 배지에서 최고 농도 50000ng/mL부터 약 3배 공비로 단계 희석한 hKM3900_tA2-32LH를 20 μ L씩 첨가하였다. 첨가 후의 니블루맵의 최종 농도는 10 μ g/mL이다. 첨가 후, 37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 인큐베이터 배양으로 배양하였다. 4일 후, AlphaLISA 인터페론- γ 측정 키트(Perkin Elmer사, AL217C)를 이용하여 메이커 주장 프로토콜에

따라 배양 상청 중의 인터페론- γ 산생량을 측정하였다. 도 1a에 인터페론- γ 산생량을 나타낸다. 각 조건에 대해 평균치 및 표준 편차를 산출하였다. hKM3900_tA2-32LH 및 니볼루맵은 인간 CLDN4 발현 암 세포주와 Expanded Pan T 세포의 공배양계에 있어서 인터페론- γ 산생 촉진 작용을 나타내었다. hKM3900_tA2-32LH와 니볼루맵의 병용에 의한 인터페론- γ 산생 촉진 작용은, hKM3900_tA2-32LH 또는 니볼루맵 단일제보다 강하였다.

[0236] [실시예 3: 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항PD-L1 항체의 in vitro 병용 효과]

[0237] 국제 공개 제2012/155019호(서열 번호 22 및 23)에 기재된 항PD-L1 항체인 아테졸리주맵 항체의 서열에 기초하여, Fc 영역에 변이가 들어간 인간 Ig γ 1 정상 영역의 서열을 이용한 항PD-L1 항체인 아테졸리주맵 아날로그(이하, "아테졸리주맵 아날로그"라고 칭한다)를 설계하여, PCT/JP2022/18350의 실시예 4-2에 기재된 방법에 준하여 항체를 취득하였다. 실시예 2에서 취득한 LCLC-OKT3 scFv 세포와 Expanded pan T 세포를 이용한 공배양계에 있어서, hKM3900_tA2-32LH와 아테졸리주맵 아날로그의 in vitro 병용 효과의 검토를 행하였다. 구체적으로는 hKM3900_tA2-32LH와 아테졸리주맵 아날로그의 T 세포 활성 증강 작용을 LCLC-OKT3 scFv 세포와 Expanded Pan T 세포의 공배양계에서 인터페론 γ 산생량을 지표로 평가하였다. LCLC-OKT3 scFv 세포를 배양 배지에서 2×10^5 개/mL로 조제하고, 평저 96웰 플레이트에 $50 \mu\text{L}$ 씩 파종하여, 37°C , 5% CO_2 인큐베이터에서 배양하였다. 익일, 배양 배지에서 1.33×10^6 개/mL로 조제한 Expanded Pan T 세포를, 배양 중의 평저 96웰 플레이트에 $30 \mu\text{L}$ 씩 파종하였다. 피험 항체로서 실시예 1에서 취득한 hKM3900_tA2-32LH 및 아테졸리주맵 아날로그를 이용하였다. 아이소타입 컨트롤(도 1b 중에서는 "아이소타입"이라고 칭한다)로서 항리소자임 항체를 조제하여 사용하였다. 단일제 조건으로서, 배양 배지에 최고 농도 50000ng/mL부터 약 3배 공비로 단계 희석한 hKM3900_tA2-32LH, 또는 배양 배지에 최고 농도 50000ng/mL부터 약 3배 공비로 단계 희석한 아테졸리주맵 아날로그를 첨가하였다. 또한 병용 조건으로서, 농도 50000ng/mL의 아테졸리주맵 아날로그를 포함하는 배양 배지에 최고 농도 50000ng/mL부터 약 3배 공비로 단계 희석한 hKM3900_tA2-32LH를 $20 \mu\text{L}$ 씩 첨가하였다. 첨가 후의 아테졸리주맵 아날로그의 최종 농도는 $10 \mu\text{g/mL}$ 이다. 첨가 후, 37°C , 5% CO_2 인큐베이터 배양으로 배양하였다. 5일 후, AlphaLISA 인터페론- γ 측정 키트(Perkin Elmer사, AL217C)를 이용하여 메이커 주장 프로토콜에 따라 배양 상청 중의 인터페론- γ 산생량을 측정하였다. 도 1b에 인터페론- γ 산생량을 나타낸다. 각 조건에 대해 평균치 및 표준 편차를 산출하였다. hKM3900_tA2-32LH 및 아테졸리주맵 아날로그는 인간 CLDN4 발현 암 세포주와 Expanded Pan T 세포의 공배양계에 있어서 인터페론- γ 산생 촉진 작용을 나타내었다. hKM3900_tA2-32LH와 아테졸리주맵 아날로그의 병용에 의한 인터페론- γ 산생 촉진 작용은, hKM3900_tA2-32LH 또는 아테졸리주맵 아날로그의 단일제보다 강하였다.

[0238] [실시예 4: 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항마우스 PD-1 항체의 in vivo 병용 효과]

[0239] 인간 CLDN4 발현 B16-F10 세포를 이식한 B-h4-1BB 마우스(인간 CD137 녹인 마우스)를 이용하여 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항인간 PD-1 항체의 in vivo 항종양 효과의 검토를 행하였다.

[0240] [실시예 4-1: 인간 CLDN4 발현 B16-F10 세포의 구축]

[0241] 마우스 멜라노마 세포주의 B16-F10 세포는, American Type Culture Collection(ATCC, CRL-6475)으로부터 입수하였다. 종농도 10% 비동화(inactivated) 소 태아 혈청(FBS)(Cytiva사, SH30084.03)을 첨가한 돌베코 개변 이글 배지(SIGMA사, D6429)(조제 후의 배지를 이하, "이글 배양 배지"라고 칭한다)에서 37°C , 5% CO_2 의 조건하에서 배양하였다. CLDN4(Myc-DDK-tagged)-Human claudin 4(CLDN4)(ORIGENE사, RC200490)를 jetPRIME(Polyplus-transfection, 114-15)을 이용하여 B16-F10 세포에 도입하였다. 종농도 1mg/mL의 G418(나칼라이 테스크사, 09380-44)을 첨가한 이글 배양 배지에서의 선택에 의해 인간 CLDN4를 안정 발현하는 B16-F10 세포 클론(이하 "인간 CLDN4 발현 B16-F10 세포"라고 칭한다)를 취득하였다.

[0242] [실시예 4-2: 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항마우스 PD-1 항체의 in vivo 항종양 작용에 있어서의 병용 효과]

[0243] B-h4-1BB 음성 마우스(C57BL/6-Tnfrsf9^{tm1(Tnfrsf9)}/Bcgen; Biocytogen사, 110004)(이하 "마우스"라고 칭한다)를 입수하여 번식시켰다. 인간 CLDN4 발현 B16-F10 세포를 PBS(-)(WAKO사, 045-29795)에 현탁하여, 4×10^6 개/mL의 세포 현탁액을 조제하였다. 6주령의 마우스의 배부(背部)의 피하에 세포 현탁액을 2×10^5 세포/ $50 \mu\text{L}$ 씩 접종하였다. 세포 접종 3일 후에 노기스(미쓰토타사, CD-15AXR)를 이용하여 종양 직경을 측정하였다. 종양 체적[mm^3]의 계산에는 다음 식을 이용하였다.

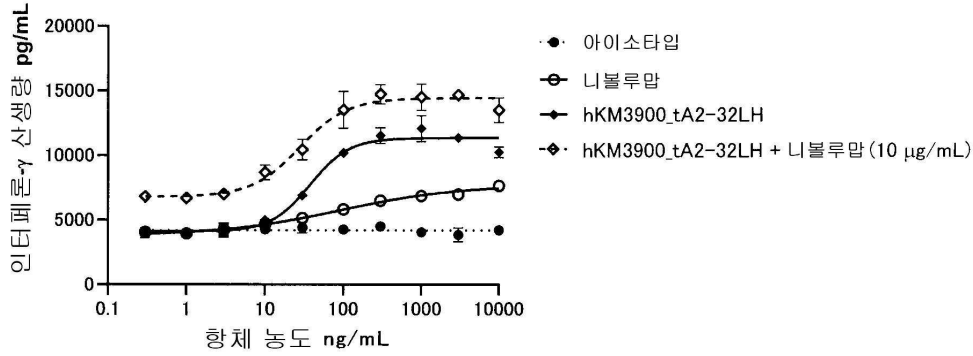
- [0244] $[종양\ 체적(mm^3)] = [종양의\ 장경(mm)] \times [종양의\ 단경(mm)]^2 \times 0.5$
- [0245] 종양 체적이 각 군 균등해지도록 세포 접종한 마우스를 군 나누기하고(n=10), 피험 항체의 투여를 개시하였다. 투여의 초일을 0일째라고 정의하였다. 피험 항체로서 실시예 1에서 취득한 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체인 hKM3900_tA2-32LH, 항PD-1 항체로서 항마우스 PD-1 항체(Bio X Cell, BE0146)를 이용하였다. hKM3900_tA2-32LH의 아이소타입 컨트롤 항체로서 항리소자임 항체를, 항마우스 PD-1 항체의 아이소타입 컨트롤 항체로서 래트 IgG2a 아이소타입 컨트롤 항체(Bio X Cell, BE0089)(도 2에서는 "컨트롤"이라고 칭한다)를 이용하였다. 시험을 행한 4그룹에 투여한 피험 항체, 투여량, 투여 스케줄 등의 상세를 이하에 나타낸다.
- [0246] (1) 그룹 1: 컨트롤군
- [0247] 0일째와 7일째에 항리소자임 항체를 0.3mg/kg으로 복강내 투여하고, 0, 4, 7, 11일째에 래트 IgG2a 아이소타입 컨트롤 항체를 100 μg/head로 복강내 투여하였다.
- [0248] (2) 그룹 2: hKM3900_tA2-32LH 투여군
- [0249] 0일째와 7일째에 hKM3900_tA2-32LH를 0.3mg/kg으로 복강내 투여하고, 0, 4, 7, 11일째에 래트 IgG2a 아이소타입 컨트롤 항체를 100 μg/head로 복강내 투여하였다.
- [0250] (3) 그룹 3: 항마우스 PD-1 항체 투여군
- [0251] 0일째와 7일째에 항리소자임 항체를 0.3mg/kg으로 복강내 투여하고, 0, 4, 7, 11일째에 항마우스 PD-1 항체를 100 μg/head로 복강내 투여하였다.
- [0252] (4) 그룹 4: hKM3900_tA2-32LH 및 항마우스 PD-1 항체의 병용 투여군
- [0253] 0일째와 7일째에 hKM3900_tA2-32LH를 0.3mg/kg으로 복강내 투여하고, 0, 4, 7, 11일째에 항마우스 PD-1 항체를 100 μg/head로 복강내 투여하였다.
- [0254] 각 그룹의 4, 7, 11, 14일째에 종양 체적을 평가하였다. 그룹 2 및 그룹 3의 14일째의 종양 체적을 그룹 4의 그것과 unpaired Student's t 검정에 의해 비교하였다(도 2).
- [0255] 도 2에 나타내는 바와 같이, hKM3900_tA2-32LH와 항마우스 PD-1 항체의 병용군의 종양 체적은, hKM3900_tA2-32LH 단독 투여군 및 항마우스 PD-1 항체 단독 투여군의 그것보다도 유의하게 작았다. 이 결과는, 인간의 암의 치료에 있어서, 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 항PD-1 항체의 병용은, 각각의 단독 투여보다도 높은 항종양 효과가 얻어질 가능성이 있는 것을 시사하고 있다.

산업상 이용가능성

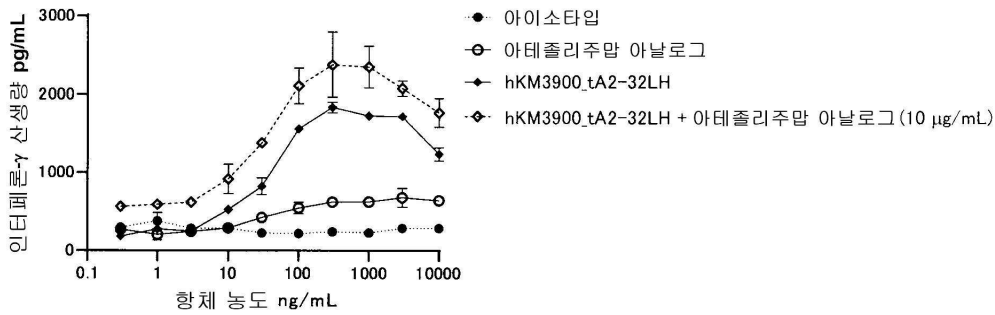
- [0256] 본 발명의 항CLDN4-항CD137 이중특이성 항체와 PD-1 시그널 저해제의 병용에 의한 암의 치료 방법은, 암의 치료에 유용하다고 기대된다.
- [0257] [서열목록 프리 텍스트]
- [0258] 서열 번호 2는 hKM3900_tA2-32LH HC의 아미노산 서열이고, 서열 번호 1에 나타나는 염기 서열은, 서열 번호 2에 나타나는 hKM3900_tA2-32LH 중쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이다. 서열 번호 4는 hKM3900 LC의 아미노산 서열이고, 서열 번호 3에 나타나는 염기 서열은, 서열 번호 4에 나타나는 hKM3900 경쇄의 아미노산 서열을 코딩하는 염기 서열이다. 서열 번호 5~14는 발명의 상세한 설명에서 기재한 각종 링커의 아미노산 서열이다.

도면

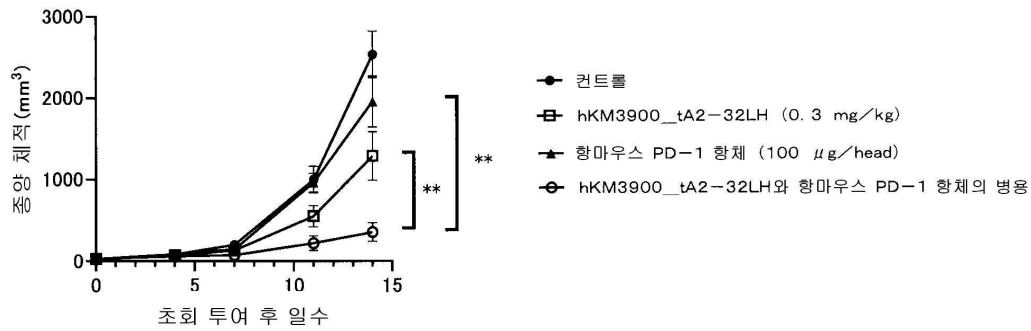
도면1a



도면1b



도면2



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.