(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 118742324 A
(43)申请公布日 2024.10.01

(21)申请号 202380023373.8
(22)申请日 2023.02.24
(30)优先权数据
2022-027751 2022.02.25 JP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2024.08.23
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2023/006642 2023.02.24
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2023/163087 JA 2023.08.31
(71)申请人 学校法人顺天堂
地址 日本
申请人 明治制果药业株式会社
(72)发明人 小松则夫 石田阳治 荒木真理人 土屋敏行 近田翼 今井美沙 深泽弘志
(74)专利代理机构 北京尚诚知识产权代理有限公司 11322
专利代理师 龙淳 狄茜
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 31/17(2006.01)
A61K 31/519(2006.01)
A61K 38/21(2006.01)
A61K 45/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
A61P 43/00(2006.01)
C07K 16/46(2006.01)
C07K 16/18(2006.01)

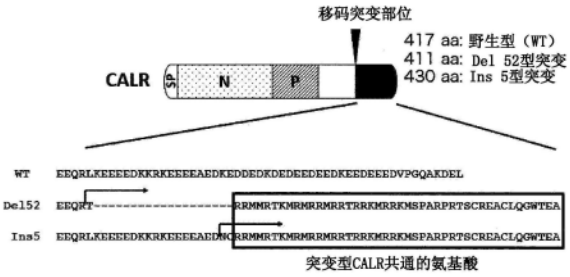
权利要求书2页 说明书21页
序列表（电子公布） 附图12页

(54)发明名称

抗突变CALR抗体与其他药剂组合而成的医药

(57)摘要

本发明提供一种通过将与突变型CALR蛋白结合的抗体与其他抗癌剂联合使用而显示充分的抗癌效果的医药。本发明为组合了下述(A)和(B)而成的癌预防和/或治疗用医药：(A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段；(B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。



CN 118742324 A

1.一种癌预防和/或治疗用医药,其特征在于:

其为组合了下述(A)和(B)而成的癌预防和/或治疗用医药,

(A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段;

(B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bcl2抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

2.如权利要求1所述的医药,其特征在于:

成分(A)为不与野生型钙网蛋白结合,而对于突变型钙网蛋白具有高亲和性的抗体或其功能性片段。

3.如权利要求1或2所述的医药,其特征在于:

成分(A)为与序列编号2或3所表示的突变氨基酸序列或与其序列具有80%以上同源性的序列结合的抗体或其功能性片段。

4.如权利要求1~3中任一项所述的医药,其特征在于:

成分(A)为选自人抗体、人源化抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、动物来源的抗体与人抗体的嵌合抗体、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、单链抗体(scFv)和双链抗体(Diabody)中的一种以上的抗体或其功能性片段。

5.如权利要求1~4中任一项所述的医药,其特征在于:

成分(B)为选自JAK抑制剂、核酸合成抑制剂、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

6.如权利要求1~5中任一项所述的医药,其特征在于:

成分(B)为选自芦可替尼、羟基脲、干扰素α和免疫检查点抑制剂中的一种以上的药剂。

7.如权利要求1~6中任一项所述的医药,其特征在于:

癌为选自淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、消化系统癌(食道癌、胃癌、十二指肠癌等)、肝癌、胆道癌(胆囊癌、胆管癌等)、胰腺癌、小肠癌、大肠癌(结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌等)、胃肠道间质瘤、肺癌(非小细胞肺癌、小细胞肺癌)和肾癌中的癌。

8.下述(A)和(B)的组合用于制造癌预防和/或治疗用医药的应用,

(A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段;

(B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bcl2抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

9.用于对癌进行预防和/或治疗的下述(A)和(B)的组合,

(A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段;

(B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bcl2抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

10.一种癌的预防和/或治疗方法,其特征在于:

将下述(A)和(B)组合给药,

(A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段;

(B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑

异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bc12抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

抗突变CALR抗体与其他药剂组合而成的医药

技术领域

[0001] 本发明涉及一种对突变型CALR蛋白具有特异性的抗体或其功能性片段与其他药剂组合而成的医药。

背景技术

[0002] 一部分费城染色体阴性骨髓增殖性肿瘤(Philadelphia-negative myeloproliferative neoplasms;MPNs)患者中,在钙网蛋白(Calreticulin,CALR)基因的第9外显子处发现碱基缺失或插入(非专利文献1、2)。已明确由该CALR突变基因产生的突变型CALR蛋白会稳定性地激活血小板生成素(Thrombopoietin;TPO)受体,因此具有单独引起骨髓增殖性肿瘤(MPN)的致肿瘤性(非专利文献3～6)。

[0003] 在MPN患者中发现的CALR基因突变必定是在最终外显子的限定位置的移码突变,在突变型CALR蛋白的C末端存在野生型中并不存在的序列,特别是其C末端的44个氨基酸为几乎所有突变型CALR蛋白所共通的。作为实例,图1示出了将MPN患者中所发现的CALR基因突变中频度最高的52碱基缺失型(Del 52)、频度第二高的5碱基插入型(Ins5)的C末端的序列与野生型CALR蛋白的该区域加以比较的情况。

[0004] 由于作为引起MPN的原因的突变型CALR蛋白在肿瘤细胞中表达,所以暗示了因移码突变而产生的突变型CALR蛋白的特异性序列作为新抗原有可能成为诊断时的标志物或治疗靶点(专利文献1～2)。

[0005] 进而,对突变型CALR蛋白进行功能分析的结果表明,除了以Del52、Ins 5为代表的以外,还存在有在突变型CALR蛋白的特异性序列中被切断并失去了据认为是新抗原的序列的大部分的切断型突变型CALR蛋白,并且,制作特异性地识别位于比新抗原中的切断部位更靠N末端侧的极短氨基酸序列的抗体和结合于比新抗原中的切断部位更靠C末端侧的氨基酸序列的抗体,结果明确了可以获得MPN治疗效果。进而为了增强抗肿瘤活性,灵活利用可能分别与2种抗原特异性结合的抗体的特性,获得了作为更有效的治疗药的抗CALR/CD3双特异性抗体。

[0006] 另一方面,关于癌低分子治疗药,报告有烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bcl2抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂、癌免疫治疗药等,但在骨髓抑制作用和血液毒性等安全性方面的问题点和有效性方面,这些治疗药都不能令人满意。

[0007] 现有技术文献

[0008] 专利文献

[0009] 专利文献1:国际公开第2015/036599号

[0010] 专利文献2:国际公开第2016/087514号

[0011] 专利文献3:国际公开第1999/054440号

[0012] 专利文献4:国际公开第2019/178362号

[0013] 专利文献5:国际公开第2020/175689号

[0014] 非专利文献

[0015] 非专利文献1:Klampfl T,Gisslinger H,Harutyunyan AS,et al.Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms.The New England journal of medicine.2013;369:2379-90.

[0016] 非专利文献2:Nangalia J,Massie CE,Baxter EJ,et al.Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2.The New England journal of medicine.2013;369:2391-405.

[0017] 非专利文献3:Araki M,Yang Y,Masubuchi N,et al.Activation of the thrombopoietin receptor by mutant calreticulin in CALR-mutant myeloproliferative neoplasms.Blood.2016;127:1307-16.

[0018] 非专利文献4:Elf S,Abdelfattah NS,Chen E,et al.Mutant Calreticulin Requires Both Its Mutant C-terminus and the Thrombopoietin Receptor for Oncogenic Transformation.Cancer Discov.2016;6:368-81.

[0019] 非专利文献5:Marty C,Pecquet C,Nivarthi H,et al.Calreticulin mutants in mice induce an MPL-dependent thrombocytosis with frequent progression to myelofibrosis.Blood.2016;127:1317-24.

[0020] 非专利文献6:Vainchenker W,Kralovics R.Genetic basis and molecular pathophysiology of classical myeloproliferative neoplasms.Blood.2017;129:667-79.

发明内容

[0021] 发明所要解决的技术问题

[0022] 本发明的课题在于提供一种通过将与突变型CALR蛋白结合的抗体与其他抗癌药联合使用而显现充分抗肿瘤效果的医药。

[0023] 用于解决技术问题的技术方案

[0024] 因此,本发明的发明人为了解决上述课题而进行了研究,结果可知,通过将特异性识别CALR的突变氨基酸序列的抗体与特定的抗癌药联合使用,能够使抗肿瘤效果飞跃性地提升,从而可获得优异的治疗效果,并且发现,将与突变型CALR蛋白特异性结合的抗体与特定抗癌药组合而成的医药可用作更有效的癌预防和/或治疗用医药,从而完成了本发明。

[0025] 即,本发明提供以下的(1)~(10)。

[0026] (1)一种癌预防和/或治疗用医药,其为组合了下述(A)和(B)而成的癌预防和/或治疗用医药,

[0027] (A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段;

[0028] (B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bcl2抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

[0029] (2)如(1)所记载的医药,其中成分(A)为不与野生型钙网蛋白结合,而对突变型钙网蛋白具有高亲和性的抗体或其功能性片段。

[0030] (3)如(1)或(2)所记载的医药,其中成分(A)为与序列编号2或3所表示的突变氨基酸序列或与其序列具有80%以上同源性的序列结合的抗体或其功能性片段。

[0031] (4)如(1)至(3)中任一项所记载的医药,其中成分(A)为选自人抗体、人源化抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、动物来源的抗体与人抗体的嵌合抗体、Fab、Fab'、F(ab')2、单链抗体(scFv)和双链抗体(Diabody)中的一种以上的抗体或其功能性片段。

[0032] (5)如(1)至(4)中任一项所记载的医药,其中成分(B)为选自JAK抑制剂、核酸合成抑制剂、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

[0033] (6)如(1)至(5)中任一项所记载的医药,其中成分(B)为选自芦可替尼、羟基脲、干扰素α和免疫检查点抑制剂中的一种以上的药剂。

[0034] (7)如(1)至(6)中任一项所记载的医药,其中癌为选自淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、消化系统癌(食道癌、胃癌、十二指肠癌等)、肝癌、胆道癌(胆囊癌、胆管癌等)、胰腺癌、小肠癌、大肠癌(结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌等)、胃肠道间质瘤、肺癌(非小细胞肺癌、小细胞肺癌)和肾癌中的癌。

[0035] (8)下述(A)和(B)的组合用于制造癌预防和/或治疗用医药的应用,

[0036] (A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段;

[0037] (B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bc12抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

[0038] (9)用于对癌进行预防和/或治疗的下述(A)和(B)的组合,

[0039] (A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段;

[0040] (B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bc12抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

[0041] (10)一种癌的预防和/或治疗方法,其特征在于:

[0042] 将下述(A)和(B)组合给药,

[0043] (A)与突变钙网蛋白特异性结合的抗体或其功能性片段;

[0044] (B)选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bc12抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂和癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

[0045] 发明的效果

[0046] 本发明所使用的抗体在上述突变型的CALR多肽链中具有抗原识别部位(表位),通过与上述抗癌药联合使用,与各自单独给药的情形相比更有效地杀伤癌细胞,使得抗肿瘤效果飞跃性地提升。因此,使用本发明的医药可以特异性地预防和/或治疗各种癌,特别是表达突变型CALR的疾病。

附图说明

[0047] 图1为表示突变型CALR蛋白的特征的图。作为MPN患者的发病原因的CALR基因突变为+1移码突变,在由此产生的突变型CALR蛋白的C末端发现突变型蛋白所共通的氨基酸序列。SP:信号序列,N:N结构域,P:P结构域。箭头表示与野生型(WT)不同的氨基酸序列起始的

部分。

[0048] 图2-A表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号1)与羟基脲的联合使用效果。在CALR/CD3双特异性抗体及羟基脲的存在下,将表达突变型CALR、荧光素酶(Luciferase)的UT-7/TPO/Ins5-Luc细胞(靶细胞)与人外周血T细胞培养后,以荧光素酶活性作为指标,测定靶细胞的细胞存活率,并评价T细胞介导的细胞毒活性(T cell-dependent cellular cytotoxicity,以下记做TDCC)。将不包含CALR/CD3双特异性抗体及联用药物的组的化学发光值设为100%,算出各孔的细胞存活率。

[0049] 图2-B表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号2)与羟基脲的联合使用效果。

[0050] 图2-C表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号3)与羟基脲的联合使用效果。

[0051] 图2-D表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号4)与羟基脲的联合使用效果。

[0052] 图2-E表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号5)与羟基脲的联合使用效果。

[0053] 图2-F表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号6)与羟基脲的联合使用效果。

[0054] 图2-G表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号7)与羟基脲的联合使用效果。

[0055] 图2-H表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号8)与羟基脲的联合使用效果。

[0056] 图2-I表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号9)与羟基脲的联合使用效果。

[0057] 图3-A表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号1)与芦可替尼在体外(in vitro)有效性上的联合使用效果。在CALR/CD3双特异性抗体及芦可替尼的存在下,将表达突变型CALR、荧光素酶(Luciferase)的UT-7/TPO/Ins5/GFP-Luc细胞(靶细胞)与人外周血T细胞培养后,以荧光素酶活性作为指标,测定靶细胞的细胞存活率,并评价T细胞介导的细胞毒活性(T cell-dependent cellular cytotoxicity,以下记做TDCC)。将不包含CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号1)与联用药物的组的化学发光值设为100%,算出各孔的细胞存活率。

[0058] 图3-B表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号7)与芦可替尼的联合使用效果。

[0059] 图3-C表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号8)与芦可替尼的联合使用效果。

[0060] 图3-D表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号9)与芦可替尼的联合使用效果。

[0061] 图4-A表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号1)与干扰素α的联合使用效果。在CALR/CD3双特异性抗体及干扰素α(IFN-α)的存在下,将表达突变型CALR、荧光素酶(Luciferase)的UT-7/TPO/Ins5-Luc细胞(靶细胞)与人外周血T细胞培养后,以荧光素酶活性作为指标,测定靶细胞的细胞存活率,并评价T细胞介导的细胞毒活性(T cell-dependent cellular cytotoxicity,以下记做TDCC)。将不包含CALR/CD3双特异性抗体与联用药物的组的化学发光值设为100%,算出各孔的细胞存活率。

[0062] 图4-B表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号4)与IFN-α的联合使用效果。

[0063] 图4-C表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号5)与IFN-α的联合使用效果。

[0064] 图4-D表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号6)与IFN-α的联合使用效果。

[0065] 图4-E表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号8)与IFN-α的联合使用效果。

[0066] 图4-F表示抗突变CALR/CD3双特异性抗体(抗体编号9)与IFN-α的联合使用效果。

具体实施方式

[0067] 本发明发现了一种与MPN相关的突变型CALR蛋白的检测及诊断方法,并且发现通过将可用于预防或治疗MPN的识别突变型CALR蛋白的特异性序列中被切断而残存的C末端侧的多肽(图1)中的13个氨基酸(序列编号4)的抗体、识别更靠C末端侧的序列(序列编号5)的抗体与上述抗癌剂联合使用,可有效地治疗和/或预防癌。

[0068] 即,本发明提供一种(A)特异性识别突变型CALR蛋白的抗体、与(B)上述抗癌药组合而成的癌预防和/或治疗用医药、尤其是用于预防和/或治疗MPN的医药。

[0069] 本发明的医药中所使用的成分(A)为特异性识别突变型CALR蛋白的抗体。

[0070] 本说明书中,抗体或其功能性片段是指与突变CALR特异性结合的蛋白、其蛋白片段及包含其蛋白片段的衍生物,包括单克隆抗体及通过基因重组技术所制作的嵌合抗体、人源化抗体、人抗体、双特异性抗体、多特异性抗体、衔接体(engager)、Fab、Fab'、$F(ab')_2$、单链抗体(scFv)、双链抗体(Diabody)、微抗体等。

[0071] 作为单克隆抗体的形态,包含人类及人类以外的动物的IgG、IgM、IgA、IgE、IgD。

[0072] 此外,作为双重特异性及多特异性抗体的形态,并无特别限定,可为该技术领域中公知的任意形态,只要保持对于2种以上的抗原的特异性,则也可为除此以外的形态。

[0073] 双特异性抗体的形态大致分为IgG样型与低分子型。IgG样型为保持Fc区的形态。作为IgG样型抗体的形态,可列举:CrossMab、DAF(two-in-one)、DAF(four-in-one)、DutaMab、DT-IgG、杵臼结构(knobs-into-holes)、杵臼结构共同轻链(knobs-into-holes common LC)、SEEDbody、Triomab、κλ-body、DVD-Ig、IgG-scFv、DuoBody等,但并不限定于这些形态。IgG样型抗体由于保持Fc区,故有望发挥ADCC或CDC等效应功能、容易进行纯化、改善稳定性、延长血中半衰期等。另一方面,低分子型通常为以包含重链可变区和轻链可变区的Fv区作为基本构成要素的形态。作为低分子型抗体的形态,可列举双链抗体(Diabody,Db)、BiTE、DART、TandAb、scDb、triple body、微型抗体(miniantibody)、微抗体(minibody)、scFv、tandem scFv、$F(ab')_2$等,但并不限定于这些。低分子型因其尺寸而有望提升组织透过性或实现高生产性等。此外,还包括如下的改型抗体,譬如在保持与抗原的结合能力的状态下缺失、取代或添加氨基酸序列而成的抗体、缺失或附加糖链的一部分或全部而成的抗体、附加接头等而成的抗体、与其他蛋白融合而成的抗体、将抗体与低分子医药经由接头结合而成的抗体药物复合体(ADC)等。

[0074] 本发明的抗体具有与突变型钙网蛋白特异性结合的结构域。

[0075] 上述结构域与结合在序列编号4或5的突变型钙网蛋白的表位的抗体竞争。此处,突变型钙网蛋白优选为在由序列编号4或5所表示的氨基酸序列构成的多肽链中、或在由序列编号4或5中缺失、取代或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽链中具有抗原识别部位的突变型钙网蛋白。

[0076] 上述结构域不与野生型钙网蛋白结合,而对突变型钙网蛋白具有高亲和性。

[0077] 作为切断型的CALR蛋白,可列举:由序列编号4或5所表示的氨基酸序列构成的多肽(i)和由序列编号4或5中缺失、取代或添加1个或数个氨基酸而成的氨基酸序列构成的多肽(ii)。(ii)中,优选为缺失、取代或添加1～4个氨基酸而成的氨基酸序列,更优选为缺失、取代或添加1～3个氨基酸而成的氨基酸序列。此外,多肽(ii)的氨基酸序列与序列编号1的氨基酸序列的同一性优选为80%以上,更优选为85%以上,进而优选为90%以上。

[0078] 作为抗体的结合结构域,只要为在(i)或(ii)的多肽链中具有抗原识别部位(表位)的抗体即可,可为仅与切断型的突变型CALR蛋白结合者,也可为与切断型的突变型CALR蛋白及全长型的突变型CALR蛋白两者结合者,优选为与切断型的突变型CALR蛋白及全长型的突变型CALR蛋白两者结合的对“突变型CALR蛋白”有特异性的抗体。

[0079] 这样的结合结构域优选为本发明的发明人所发现的抗突变CALR抗体(克隆B3、C6及G1抗体)的重链可变区及轻链可变区,进而优选为重链互补决定区(CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)及轻链互补决定区(CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3)。

[0080] 在双特异性抗体中,第1结构域优选为上述抗突变CALR抗体(克隆B3、C6及G1抗体)的重链可变区及轻链可变区,进而优选为重链互补决定区(CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)及轻链互补决定区(CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3)。

[0081] 双特异性抗体中的第2结构域优选为与CD3抗原特异性结合的结构域,且优选为来自现有的抗CD3抗体的重链可变区及轻链可变区,进而优选为来自现有的抗CD3抗体的重链互补决定区(CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)及轻链互补决定区(CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3)。作为现有的抗CD3抗体,可列举OKT3或UCTH1。

[0082] 本发明的抗体的优选例为抗突变CALR抗体(克隆B3、C6及G1抗体)的重链可变区及轻链可变区,进而为重链互补决定区(CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)及轻链互补决定区(CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3),其氨基酸序列的例子如表1所示。

[0083] 此外,表1中,作为双特异性抗体的第1结构域及第2结构域的优选例,也将抗突变CALR抗体(克隆B3、C6及G1抗体)及抗CD3抗体(OKT3、UCHT1)的重链可变区及轻链可变区、进而重链互补决定区(CDR-H1、CDR-H2及CDR-H3)及轻链互补决定区(CDR-L1、CDR-L2及CDR-L3)的氨基酸序列示于表1。

[0084] [表1]

[0085]

序列编号	名称	氨基酸序列
6	B3 VH	QVQLQQSGAELVKPGSSVK ISCKASGYTFTRNFIHWIK QQPGNGLEWIGWIFPGDGD TEYNQKFNGKATLTADKSS STAYMQLSSLTSEDSAVYF CARGNYNYEYFDYWGQGVM VTVSS
7	B3 VL	DIQMTQSPASLSASLGETV SIECLASEDIYSYLAWYQQ KPGKSPQLLIFAANRLQDG VPSRFSGSGSGTQFSLKIS GMQPEDEGDYFCLQGSKFP YTFGPGTKLELN
8	C6 VH	QVQLQQSGAELVKPGSSVK ISCKASGYTFTSYFVHWIK QQPGDGLEWIGWIYPGDGD TEYNHKFNGKSTLTADRSS STAYMQLSSLTSEDSAVYF CARGNYYDGREVMDAWGQG ASVTVSS

[0086]

9	C6 VL	DVVLTQTPPTLSATIGQSV SISCRSSQSLLDSDGETYL NWLLQRPGQSPQLLIYSVS NLESGVPNRFSGSGSETDF TLKISGMEAEDLGVYYCMQ ATHGPYTFGAGTKLELK
10	G1 VH	QVQLQQSGAELVKPGSSVK ISCKASGYTFTSYFVHWIK QQPGDGLEWIGWIYPGDGD TEYNQKFNGKATLTADRSS STAYMQLSSLTSEDSAVYF CARGNYYDGREVMDAWGQG ASVTVSS
11	G1 VL	DVVLTQTPPTLSATIGQSV SISCRSSQSLLDSDGETYL NWLLQRPGQCPQLLIYSVS NLESGVPNRFSGSGSETDF TLKISGVEAEDLGVYYCMQ GTHGPYTFGAGTKLELK

[0087]

12	OKT3 VH	QVQLVQSGGGVVQPGRSLR LSCKASGYTFTRYTMHWVR QAPGKGLEWIGYINPSRGY TNYNQKVKDRFTISRDNSK NTAFLQMDSLRPEDTGVYF CARYYDDHYSLDYWGQGTP VTVSS
13	OKT3 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCSASSSVSYMNWYQQT PGKAPKRWIYDTSKLASGV PSRFSGSGSGTDYTFTISS LQPEDIATYYCQQWSSNPF TFGQGTKLQITR
14	B3 CDR-H1	GYTFTRNFIH
15	B3 CDR-H2	WIFPGDGDTEYNQKFNG
16	B3 CDR-H3	GNYNYEYFDY
17	B3 CDR-L1	LASEDIYSYLA
18	B3 CDR-L2	AANRLQD
19	B3 CDR-L3	LQGSKFPYT
20	C6 CDR-H1	GYTFTSYFVH
21	C6 CDR-H2	WIYPGDGDTEYNHKFNG
22	C6 CDR-H3	GNYYDGREVMDA
23	C6 CDR-L1	RSSQSLLDSDGETYLN
24	C6 CDR-L2	SVSNLES

[0088]

25	C6 CDR-L3	MQATHGPYT
26	G1 CDR-H1	GYTFTSYFVH
27	G1 CDR-H2	WIYPGDGDTEYNQKFNG
28	G1 CDR-H3	GNYYDGREVMDA
29	G1 CDR-L1	RSSQSLLDSDGETYLN
30	G1 CDR-L2	SVSNLES
31	G1 CDR-L3	MQGTHGPYT
32	OKT3 CDR-H1	RYTMH
33	OKT3 CDR-H2	YINPSRGYTNYNQKVKD
34	OKT3 CDR-H3	YYDDHYSLDY
35	OKT3 CDR-L1	SASSSVSYMN
36	OKT3 CDR-L2	DTSKLAS
37	OKT3 CDR-L3	QQWSSNPFT
217	UCHT1 VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLR LSCAASGYSFTGYTMNWVR QAPGKGLEWVALINPYKGV STYNQKFKDRFTISVDKSK NTAYLQMNSLRAEDTAVYY CARSGYYGDSDWYFDVWGQ GTLVTVSS

[0089]

218	UCHT1 VL	DIQMTQSPSSLSASVGDRV TITCRASQDIRNYLNWYQQ KPGKAPKLLIYYTSRLESG VPSRFSGSGSGTDYTLTIS SLQPEDFATYYCQQGNTLP WTFGQGTKVEIK
219	UCHT1 CDR-H1	GYTMN
220	UCHT1 CDR-H2	LINPYKGVSTYNQKFKD
221	UCHT1 CDR-H3	SGYYGDSDWYFDV
222	UCHT1 CDR-L1	RASQDIRNYLN
223	UCHT1 CDR-L2	YTSRLES
224	UCHT1 CDR-L3	QQGNTLPWT

[0090] 这些结构域能够基于以下抗体的序列信息通过基因工程方法以重组抗体的形式制作,上述抗体为通过用一部分或全长的切断型的突变型CALR蛋白免疫动物或者在体外(in vitro)使淋巴细胞致敏并与骨髓瘤融合而获得的抗体,或者通过噬菌体展示等抗体库等获得的抗体。关于抗CD3抗体的序列信息,可根据现有的信息获得。即,根据所获得的基因信息合成抗体的重链及轻链的基因,将其插入至载体(例如质粒)后,导入至宿主细胞(例如CHO细胞、HEK细胞等)中,对宿主细胞进行培养,由此能够从培养物中采集重组抗体。合成抗体的重链及轻链的基因时,优选将密码子优化。

[0091] 作为本发明的优选的双特异性抗体,可列举:第1结构域的CDR具有(a)与序列编号14-16(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号17-19(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的双特异性抗体;第1结构域的CDR具有(b)与序列编号20-22(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号23-25(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的双特异性抗体;或第1结构域的CDR具有(c)与序列编号26-28(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号29-31(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的双特异性抗体。

[0092] 进而可列举:第1结构域含有(d)具有与序列编号6所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号7所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区的双特异性抗体;第1结构域含有(e)具有与序列编号8所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号9所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区的双特异性抗体;或第1结构域含有(f)具有与序列编号10所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号11所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区的双特异性抗体。

[0093] 此外,优选第2结构域的CDR具有与序列编号32-34(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号35-37(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的双特异性抗体;或第2结构域的CDR具有与序列编号219-221(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号222-224(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的双特异性抗体。

[0094] 进而优选第2结构域含有具有与序列编号12所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及与序列编号13所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区的双特异性抗体;或第2结构域含有具有与序列编号217所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号218所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区的双特异性抗体。

[0095] 作为本发明的更优选的双特异性抗体,可列举如下的双特异性抗体,即,第1结构域的CDR具有(a)与序列编号14-16(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号17-19(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列,(b)与序列编号20-22(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号23-25(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列,或(c)与序列编号26-28(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号29-31(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列者;且第2结构域的CDR具有与序列编号32-34(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号35-37(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、或与序列编号219-221(VHCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列、及与序列编号222-224(VLCDR)所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的双特异性抗体。

[0096] 作为进一步优选的双特异性抗体,可列举如下的双特异性抗体,即,第1结构域含有(d)具有与序列编号6所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号7所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区,(e)具有与序列编号8所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号9所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区,或(f)具有与序列编号10所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号11所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区者;且第2结构域含有(g)具有与序列编号12所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号13所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区、或(h)具有与序列编号217所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VH区、及具有与序列编号218所表示的氨基酸序列具有80%以上的同源性的氨基酸序列的VL区者。

[0097] 如上所述,作为本发明的抗体的形态,只要保持对于上述2种抗原的特异性,则可为任意形态,可以为IgG样型,也可以为低分子型。具体而言,也可以具有Fc区或异源H链等。

[0098] 作为上述双特异性抗体的具体例,可列举选自以下的(I)~(IX)的抗体。

[0099] (I)由含有序列编号174所表示的氨基酸序列的H链和含有序列编号202所表示的氨基酸序列的L链所构成的双特异性抗体(抗体1)。

[0100] (II)由含有序列编号186所表示的氨基酸序列的H链和含有序列编号201所表示的氨基酸序列的L链所构成的双特异性抗体(抗体2)。

[0101] (III)由含有序列编号174所表示的氨基酸序列的H链和含有序列编号201所表示的氨基酸序列的L链所构成的双特异性抗体(抗体3)。

[0102] (IV)由含有序列编号180所表示的氨基酸序列的H链和含有序列编号202所表示的氨基酸序列的L链所构成的双特异性抗体(抗体4)。

[0103] (V)由含有序列编号181所表示的氨基酸序列的H链和含有序列编号202所表示的氨基酸序列的L链所构成的双特异性抗体(抗体5)。

[0104] (VI)由含有序列编号161所表示的氨基酸序列的H链和含有序列编号171所表示的氨基酸序列的L链所构成的双特异性抗体(抗体6)。

[0105] (VII)由含有序列编号225所表示的氨基酸序列的H链和含有序列编号202所表示的氨基酸序列的L链所构成的双特异性抗体(抗体7)。

[0106] 上述(I)～(VII)的抗体全部具有相同的结构,其为在与CD3特异性结合的单链Fv经由肽接头融合于与突变CALR特异性结合的Fab片段的重链C末端而成的多肽中进一步融合有Fc的双特异性抗体。

[0107] (VIII)由序列编号226所表示的氨基酸序列构成的双特异性抗体(抗体8)。

[0108] (IX)由含有序列编号227所表示的氨基酸序列的H链和含有序列编号228所表示的氨基酸序列的L链构成,且与突变CALR特异性结合的IgG的轻链N末端经由肽接头融合于与CD3抗原特异性结合的单链Fv的C末端的双特异性抗体(抗体9)。

[0109] 本发明的双特异性抗体的优选具体例为具有上述各序列的抗体,这些区域以外的区域的氨基酸序列并无特别限制。此外,本发明的抗体也可以为人源化抗体和人类以外的哺乳动物抗体。更具体而言,也可以为包含人类以外的哺乳动物、例如大鼠抗体的重链、轻链可变区与人抗体的重链、轻链恒定区的嵌合抗体,这样的抗体可通过将编码大鼠抗体的可变区的DNA与编码人抗体的恒定区的DNA连结,将其重组入表达载体并导入宿主中而产生。作为人源化抗体的一例,以下表示VH1～5及VL1～5(表2)。

[0110] [表2]

[0111]

序列编号	名称	氨基酸序列
94	VH1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TRNFIHWVRQAPGQGLEWMGWIFPGDGDT EYNQKFNGRVTMTRDTSISTAYMELSRLR SDDTAVYYCARGNYNYEYFDYWGQGTMVT VSS
95	VH2	QVQLQESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTF TRNFIHWVRQAPGQRLEWMGWIFPGDGDT EYNQKFNGRVTITRDTSASTAYMELSSLR SEDTAVYYCARGNYNYEYFDYWGQGTLVT VSS
96	VH3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKISCKASGYTF TRNFIHWVRQAPGQSLEWVGWIFPGDGDT EYNQKFNGRITITRDTSANTAYMELSSLK SEDTAVYYCARGNYNYEYFDYWGQGTLVT VSS
97	VH4	QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCKASGYTF TRNFIHWVRQAPGQALEWMGWIFPGDGDT EYNQKFNGRVTITRDRSMSTAYMELSSLR SEDTAMYYCARGNYNYEYFDYWGQGTLVT VSS

[0112]

98	VH5	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTF TRNFIHWVRQQPGQGLEWMGWIFPGDGDT EYNQKFNGRVTITADKSTSTAYMQLSSLT SEDTAVYFCARGNYNYEYFDYWGQGVMVT VSS
99	VL1	DIQMTQSPSFVSASVGDRVTITCLASEDI YSYLAWYQQKPGKAPKLLIFAANRLQDGV PSRFSGGGSGTGFTLTISSLQPEDFATYF CLQGSKFPYTFGQGTKLEIN
100	VL2	DIQLTQSPAFLSASLGDRVTITCLASEDI YSYLAWYQQKPGKAPKLLISAANRLQDGV PSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYS CLQGSKFPYTFGQGTKLEIK
101	VL3	DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCLASEDI YSYLAWYQQKPGKGPKLLIYAANRLQDGV PSRFSGSGSGTDFSLTISSLQPEDLATYY CLQGSKFPYTFGGGTKVEIK
102	VL4	DIQMTQSPSSLSASVGDTVTIACLASEDI YSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAANRLQDGV PSRFSGSGSFTDFTLTINSLQPDDSATYY CLQGSKFPYTFGGGTKVDIK
103	VL5	DIQMTQSPSSVSASVGDSVTIECLASEDI YSYLAWYQQKPGKSPKLLIFAANRLQDGV PSRFSGSGSGTQFTLKISSLQPEDFAEYF CLQASKFPYTFGPGTKLELN

[0113] 此外,还已知有另一种人抗体的取得方法。例如,在体外(in vitro)利用所需抗原或表达所需抗原的细胞使人淋巴细胞致敏,使致敏淋巴细胞与人骨髓瘤细胞例如U266融合,也可以获得对抗原具有结合活性的所需人抗体(参照日本专利特公平1-59878)。此外,可以通过用所需抗原来使具有完整人抗体谱的转基因动物产生免疫而取得所需的人抗体(参照WO93/12227、WO92/03918、WO94/02602、WO94/25585、WO96/34096、WO96/33735)。进而,

还已知有使用人抗体库通过筛选而取得人抗体的技术。例如,以人抗体的可变区作为单链抗体(scFv),通过噬菌体展示技术而使其在噬菌体表面展示,就能够选择出与抗原结合的噬菌体。若对所选择的噬菌体的基因进行分析,则能够确定编码与抗原结合的人抗体的可变区的DNA序列。若与抗原结合的scFv的DNA序列明确,则使用该序列制作适当的表达载体就能够取得人抗体。这些方法已众所周知,可参考WO92/01047、WO92/20791、WO93/06213、WO93/11236、WO93/19172、WO95/01438、WO95/15388。

[0114] 双特异性抗体例如可使用编码抗突变CALR抗体和抗CD3抗体的DNA与表达载体而构建双特异性抗体表达载体,将表达载体导入至CHO细胞或HEK293细胞,可获得转染的细胞。通过色谱法可将培养该转染细胞所得的培养液进行纯化。双特异性抗体的制作方法已众所周知,可参考JP2019022497、JP2017137329、JP2015110628。

[0115] 抗体的类别并无特别限定,包含IgG、IgM、IgA、IgD或IgE等具有任一种同型的抗体。考虑到纯化的容易性等,优选为IgG。

[0116] 作为结构域结构,可列举:抗体片段(fragment)等低分子化抗体或抗体的修饰物。作为抗体片段的具体例,例如可列举:Fab、Fab'、$F(ab')_2$、Fv、scFv、双链抗体(Diabody)等,但并不限定于这些。在下述的实施例中示出了具有被认为会抑制与Fc受体的结合亲和性的228、233-238、265、268、309、318、328-331的氨基酸突变的人类IgG的H链恒定区或用于异源H链的349、354、366、368、407氨基酸突变,但并不限定于这些。

[0117] 此外,本发明的抗体中,与上述(i)或(ii)的多肽结合的抗体只要与这些多肽结合即可。另一方面,用于MPN的预防和/或治疗的抗体优选为与上述(i)或(ii)的多肽结合并具有细胞毒活性的抗体。

[0118] 作为与切断型的突变型CALR蛋白结合的抗体,只要为与具有序列编号2或3所表示的序列的多肽链结合的抗体即可,优选为在与突变型CALR蛋白中的序列编号2或3所表示的氨基酸序列部分的结合中,至少与上述抗体或其功能性片段的任一者竞争的抗体。

[0119] 作为成分(B),可列举:选自烷化剂、铂制剂、代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物、拓扑异构酶抑制剂、微管聚合抑制剂、Bcl2抑制剂、抗肿瘤性抗生素、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药、核酸合成抑制剂、JAK抑制剂及癌免疫治疗药中的一种以上的药剂,其中,优选为选自JAK抑制剂、代谢拮抗剂(包含核糖核苷酸还原酶抑制剂)、核酸合成抑制剂、干扰素、细胞因子制剂、分子靶向药及癌免疫治疗药中的一种以上的药剂。

[0120] 作为烷化剂,可列举:环磷酰胺、异环磷酰胺、达卡巴嗪、替莫唑胺、尼莫司汀、白消安、雷莫司汀等。作为铂制剂,可列举顺铂、卡铂、奥沙利铂等。作为代谢拮抗剂、核糖核苷酸还原酶抑制剂、核苷酸类似物,可列举:羟基脲、甲胺喋呤、5-FU、替加氟、6-巯基嘌呤、卡培他滨、喷司他汀等。作为拓朴异构酶抑制剂,可列举多柔比星、柔红霉素、表柔比星、伊达比星、米托蒽醌、吡柔比星、氨柔比星、依托泊苷、伊立替康等。作为Bcl2抑制剂,可列举维奈托克等。作为抗肿瘤性抗生素,可列举:丝裂霉素C、放射菌素D、博来霉素、培洛霉素、净司他丁斯酯等。作为微管聚合抑制剂,可列举紫杉醇、多西紫杉醇等。作为JAK抑制剂,可列举托法替尼、巴瑞克替尼、培菲替尼、乌帕替尼、非洛替尼、阿布昔替尼、芦可替尼等。作为干扰素,可列举干扰素-α、干扰素-β、干扰素-γ等。作为细胞因子制剂,可列举介白素2等。作为核酸合成抑制剂,可列举硫唑嘌呤、咪唑立宾、环磷酰胺等。作为分子靶向药及癌免疫治疗药,可列举:抗EGFR抗体、抗HER2抗体、抗VEGF抗体、抗VEGFR抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗

CTLA-4抗体等抗体医药、吉非替尼、埃罗替尼、阿法替尼、奥希替尼、达克替尼等EGFR作用药、拉帕替尼等HER2作用药、依维莫司、替西罗莫司、西罗莫司等mTOR作用药、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CTLA-4抗体、CTLA-4-Ig等癌免疫检查点抑制剂等(癌免疫检查点抑制剂亦被分类为分子靶向药)。

[0121] 此处,作为抗PD-1抗体,可列举纳武单抗、帕博利珠单抗等。作为抗PD-L1抗体,可列举阿特珠单抗、度伐鲁单抗、阿维鲁单抗等。作为抗CTLA-4抗体,可列举伊匹单抗、曲美木单抗等。作为CTLA-4-Ig,可列举阿巴西普。

[0122] 这些成分(B)中,特别优选为选自芦可替尼、羟基脲、干扰素α及癌免疫检查点抑制剂中的一种以上的药剂。

[0123] 如下述实施例所示,若联合使用成分(A)与成分(B)(即组合使用),则对于各种癌的抗肿瘤效果就得到增强,能够用作癌的预防和/或治疗用医药。

[0124] 此外,成分(A)可用作成分(B)的抗肿瘤效果增强剂。进而,成分(B)可用作成分(A)的抗肿瘤效果增强剂。

[0125] 本发明的组合医药的形式并无特别限定,具体而言,例如可列举以下的(i)、(ii)的形式。

[0126] (i)同时含有成分(A)和成分(B)这两种成分的单一制剂(配合剂)的形式。

[0127] (ii)用于将含有成分(A)的制剂与含有成分(B)的制剂分开投予的形式。

[0128] 再者,在该形式(ii)的情况下,可以将各制剂同时投予,或者也可以间隔适当时间间隔而分开进行投予,能够采用适当的投予计划以达成所需的癌预防和/或治疗效果。在用于将具有成分(A)的制剂和含有成分(B)的制剂分开投予的形式中,也能够以在单一包装中包含两个制剂的药盒制剂的形式提供。

[0129] 作为本发明的对象癌,具体而言,可列举:淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、头颈癌、消化系统癌(食道癌、胃癌、十二指肠癌等)、肝癌、胆道癌(胆囊癌、胆管癌等)、胰腺癌、小肠癌、大肠癌(结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌等)、胃肠道间质瘤、肺癌(非小细胞肺癌、小细胞肺癌)、乳腺癌、卵巢癌、子宫癌(子宫颈癌、子宫体癌等)、肾癌、膀胱癌、前列腺癌、皮肤癌等。其中,这里的癌不仅包括原发病灶,还包括转移至其他器官(肝脏等)的癌。

[0130] 本发明的医药对于淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增殖性肿瘤(MPN)、消化系统癌(食道癌、胃癌、十二指肠癌等)、肝癌、胆道癌(胆囊癌、胆管癌等)、胰腺癌、小肠癌、大肠癌(结肠直肠癌、结肠癌、直肠癌等)、胃肠道间质瘤、肺癌(非小细胞肺癌、小细胞肺癌等)、肾癌等更为有用,进而对于淋巴瘤、白血病、多发性骨髓瘤、骨髓增殖性肿瘤(MPN)等有用,对于进一步检测到突变CALR的癌、尤其是MPN更为有用。

[0131] 本发明的医药只要如上所述制成含有成分(A)的组合物、含有成分(B)的组合物、或含有成分(A)及成分(B)的组合物的形式即可,这些组合物可将成分(A)和/或(B)与药学上可接受的载体一起通过混合、溶解、乳化、胶囊封入或冷冻干燥等进行制剂化来制造。

[0132] 口服投予用的适宜制剂为使有效量的成分(A)和/或成分(B)溶解于水或生理盐水这样的稀释剂中而成的液剂;以固体或颗粒的形式包含有效量的成分(A)和/或成分(B)的胶囊剂、颗粒剂、散剂或片剂;使有效量的成分(A)和/或成分(B)悬浮于适当的分散介质中而成的悬浮液剂;使溶解有有效量的成分(A)和/或成分(B)的溶液分散于适当的分散介质

中并进行乳化而成的乳剂等。

[0133] 在非口服投予用时,可将成分(A)和/或成分(B)与药学上可接受的溶剂、赋形剂、粘结剂、稳定剂、分散剂等一起制剂化成注射用溶液、悬浮液、乳剂、霜剂、软膏剂、吸入剂、栓剂等剂型。在注射用配方中,可使成分(A)和/或成分(B)溶解于水性溶液、优选为汉克斯液、林格氏液或生理盐水缓冲液等有生理学兼容性的缓冲液中。进而,本发明的医药可在油性或水性的媒剂中呈悬浮液、溶液或乳浊液等形状。或者,也可以用粉体的形式制造成分(A)和/或成分(B),在使用前使用灭菌水等而制备水溶液或悬浮液。在用于以吸入方式投予时,可将成分(A)和/或成分(B)粉末化,与乳糖或淀粉等适当的基剂一起制成粉末混合物。栓剂配方可通过将成分(A)和/或成分(B)与可可脂等惯用的栓剂基剂进行混合而制造。进而,本发明的医药可封入至聚合物基质等中而配制成持续释放用制剂。

[0134] 在成分(B)使用已市售的药物的情况下,可依据其用法用量来进行投予。关于成分(A),优选为1次投予0.3mg以上,更优选为投予0.3mg～300mg,进而优选为投予3mg～300mg。

[0135] 实施例

[0136] 下面列举实施例对本发明进行进一步详细的说明,但本发明并不受这些实施例的任何限定。

[0137] [试验例1]识别包含切断型的突变型CALR蛋白的抗体的制作

[0138] Dianova公司制造的小鼠单克隆抗体克隆CAL2(Cat#DIA-CAL)或者合成序列编号2-5所包含的氨基酸序列的C末端或N末端上附加了半胱氨酸的肽,与作为载体蛋白的匙孔血蓝蛋白(Keyhole Limpet Hemocyanin;KLH)结合后,使8周龄雌性WKY/Izm大鼠产生免疫,追加免疫后回收淋巴细胞。通过PEG法使淋巴细胞与小鼠骨髓瘤SP2细胞进行细胞融合后,利用选择培养基进行培养而获得融合瘤。通过使用经免疫的肽或纯化蛋白质的ELISA法,对培养上清液中的抗体的特异性进行筛选,藉此取得产生与包含切断型的突变型CALR蛋白结合的抗体的融合瘤(克隆B3、C6及G1)。对由这些融合瘤产生的抗体进行纯化,用于试验(克隆B3抗体、C6抗体及G1抗体)。

[0139] [试验例2]突变型CALR表达细胞的制作

[0140] 将通过使Del 52或Ins 5型的突变型CALR蛋白在人巨核细胞白血病细胞株UT-7/TPO细胞中表达而肿瘤性地增殖的UT-7/TPO CALR Del52细胞及UT-7/TPO CALR Ins 5细胞、与作为对照组的仅导入有用于基因导入的载体的UT-7/TPO血管内皮细胞以6.0×10^5个/mL的密度接种至OptiMEM培养基(Thermo Fisher),在5%CO_2存在下以37℃培养32小时。此时,UT-7/TPO血管内皮细胞利用包含10ng/mL TPO的培养基加以培养。

[0141] [试验例3]识别突变型CALR蛋白的确认

[0142] 将表达在N末端的信号序列的下游插入有FLAG标签的Del 52型或Ins 5型的突变型CALR的UT-7/TPO细胞进行培养,将包含分泌出的突变型CALR蛋白的培养上清液通过离心分离(1,600g×5分钟、4℃)进行制备。将所获得的培养上清液在SDS及还原剂的存在下进行加热处理后,通过SDS聚丙烯酰胺电泳法在凝胶上展开后,电转印至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,在室温下与包含5%脱脂乳的TBS-T溶液反应1小时后,在4℃下与包含大鼠克隆B3、C6、G1抗体、或小鼠抗DYKDDDDK标签抗体(富士胶片和光纯药)的5%BSA/TBS-T溶液反应一夜。利用TBS-T溶液洗净后,分别在室温下与包含由过氧化物酶标记的山羊抗大鼠IgG抗体(Jackson Immuno Research Inc.)或由过氧化物酶标记的山羊抗小鼠IgG抗体(Jackson Immuno

Research Inc.)的5％脱脂乳/TBS-T溶液进行1小时反应。将PVDF膜利用TBS-T溶液洗净后，使用FUSION摄像装置检测与过氧化物酶发光试剂反应而获得的信号。

[0143] 其结果确认到克隆B3、C6及G1抗体均识别全长型及切断型的突变型CALR蛋白，CAL2识别全长型及较B3、C6及G1抗体的识别序列更靠C末端侧的序列。

[0144] [试验例4]本发明抗体的序列信息的确定

[0145] 基于本发明的抗体的重链及轻链的序列信息，使用PureLinc RNA Mini试剂盒(Thermo Fisher)由产生抗体的细胞制备mRNA。以所获得的mRNA为模板，使用重链或轻链特异性逆转录引物，通过法cDNA末端快速扩增(Rapid-amplification of cDNA ends)法合成cDNA后，克隆入质粒中。对所获得的质粒进行桑格法测序，藉此确定重链与轻链的cDNA的全长序列。

[0146] [实施例1]双特异性抗体的制备

[0147] 材料及试验方法

[0148] 使用编码基于克隆B3、C6、G1抗体及抗CD3抗体的序列信息(表1)的双特异性抗体的DNA与表达载体(pcDNA3.4、Thermo Fisher)构建双特异性抗体表达载体。将上述表达载体通过ExpiFectamine CHO转染试剂盒(Thermo Fisher)或ExpiFectamine 293转染试剂盒(Thermo Fisher)导入CHO细胞或HEK293细胞，将转染的细胞培养后，通过离心分离及过滤将细胞去除，回收培养液。抗体的纯化通过使用镍螯合琼脂糖的亲和层析法与凝胶过滤层析法的组合、蛋白A亲和层析法与凝胶过滤层析法的组合、或使用CaptureSelect kappa XL树脂(Thermo Fisher)的亲和层析法与凝胶过滤层析法的组合来实施。此外，通过与上述相同的方法而制备基于专利文献4及专利文献2中记载的序列信息的双特异性抗体(抗体32：序列编号114及序列编号115、抗体33:序列编号116及序列编号117、抗体34:序列编号118及序列编号119)及B3嵌合抗体(序列编号52及序列编号64)。

[0149] [实施例2]通过流式细胞分析来确认对细胞表面的突变型CALR蛋白的识别

[0150] 材料及试验方法

[0151] 使用包含10％灭活胎牛血清(FBS)的IMDM培养基，在5％CO_2存在下以37℃培养作为对照组的仅导入了用于基因导入的载体的UT-7/TPO血管内皮细胞、表达突变型CALR的UT-7/TPO CALR Ins 5细胞及UT-7/TPO CALR Del 52细胞。将增生期的细胞5×10^4个进行离心分离(400g×5分钟、4℃)后，在FBS/PBS溶液中将各种抗体制备成5μg/mL的浓度，在冰上反应30分钟。反应后，使用MACS缓冲液将细胞洗净2次后，将作为二次抗体的抗人Fc抗体在FBS/PBS溶液中制备成2.5μg/mL的浓度，在冰上反应30分钟。

[0152] 反应结束后，加入MACS缓冲液，进行离心分离(400g×5分钟、4℃)将上清液废弃，藉此将细胞洗净2次，使用BD LSRFortessa X-20(BD Biosciences)通过流式细胞分析而定量信号。

[0153] 使用序列编号6的VH链、序列编号3的VL链、序列编号8的VH链及序列编号9的VL链而制作具代表性的抗切断型突变CALR-CD3双特异性抗体，使用该抗体对〔a〕UT-7/TPO血管内皮细胞、〔b〕UT-7/TPO CALR Ins 5细胞及〔c〕UT-7/TPO CALR Del 52细胞进行流式细胞分析。[实施例3]通过流式细胞分析来确认对细胞表面的CD3抗原的识别

[0154] 材料及试验方法

[0155] 将从健康人类供体分离出的外周血单核细胞(PBMC)在经抗CD3抗体(Takara Bio)

包被4～24小时后的培养皿中培养2天后,利用包含IL-2及10％FBS的RPMI-1640培养基(Sigma-Aldrich)进一步培养10～21天,诱导出T-LAK细胞。将T-LAK细胞5×10^5个进行离心分离(400g×5分钟、4℃)后,将在FBS/PBS溶液中使用序列编号2的VH链、序列编号3的VL链、序列编号8的VH链及序列编号9的VL链所制作的抗切断型突变CALR-CD3双特异性抗体制备成5μg/mL的浓度,在冰上反应30分钟。

[0156] 反应后,使用MACS缓冲液将细胞洗净2次后,将作为二次抗体的抗人Fc抗体在FBS/PBS溶液中制备成5μg/mL的浓度,在冰上反应30分钟。反应结束后,加入MACS缓冲液,进行离心分离(400g×5分钟、4℃),将上清液废弃,藉此将细胞洗净2次,使用BD LSRFortessa X-20(BD Biosciences)通过流式细胞分析而定量信号。

[0157] 其结果,确认到双特异性抗体特异性地识别在T-LAK细胞表面表达的CD3抗原。

[0158] [实施例4]体外(in vitro)细胞毒活性评价

[0159] (材料及试验方法)

[0160] 将作为靶细胞的UT-7/TPO/Ins5-Luc细胞在双特异性抗体与羟基脲、芦可替尼或干扰素α的存在下与T细胞培养后,以荧光素酶活性作为指标来测定靶细胞的细胞存活率,评价T细胞介导的细胞毒活性(Tcell-dependent cellular cytotoxicity:以下记做TDCC)。

[0161] T细胞为使用RosetteSep人类T细胞富集混合液(STEMCELL technologies公司)从健康正常人血液中进行分离、浓缩的,或者使用Pan T细胞分离试剂盒(Pan T cell isolation kit)(Miltenyi biotech公司)从健康正常人外周血单核细胞(PBMC)中进行分离、浓缩的。

[0162] 在384孔培养皿中,向各孔中加入T细胞悬浮液20μL、靶细胞20μL、抗双特异性抗体稀释液5μL、联合使用的药物稀释液5μL(最终容量50μL/well、T细胞5×10^4cells/well、靶细胞5×10^3cells/well、E/T＝10),在37℃、5％CO_2下培养48小时后,向各孔中加入25μL的Steady-Glo荧光素酶检定试剂,测定各孔的化学发光。

[0163] 将不包含双特异性抗体及联用药物的对照组孔的化学发光值作为100％而算出各孔的细胞存活率。

[0164] 联合使用效果使用联用指数(CI:combination index)来评价。CI的算出基于中效原理(Chou-Talalay)法(Chou T.C.&Talalay,P.:Adv.Enz.Regul.22:27-55,1984)、CompuSyn软件(Combosyn,Inc.)来进行。在CI低于0.7的情况下,判定为有协同效应,在低于0.3的情况下,判定为有强协同效应。CI为1左右时,判定为累加效应。表3中汇总了细胞毒活性高于85％且确认到联合使用效果的最小浓度的组合时的CI值以作为CI的代表值。

[0165] 如图2-A～图4及表3所示,本发明的抗体与上述药剂的组合对于表达突变型CALR的UT-7/TPO CALR Ins 5细胞显示出细胞毒活性。

[0166] [表3]

[0167] 抗体与药剂的联合使用效果

[0168]

联用药剂	抗体	CI（毒杀活性85%等级）
羟基脲	抗体1	0.21
	抗体2	0.17
	抗体3	0.13
	抗体4	0.35
	抗体5	0.29
	抗体6	0.16
	抗体7	0.42
	抗体8	0.38
	抗体9	0.50
芦可替尼	抗体1	0.50
	抗体7	0.50
	抗体8	0.33
	抗体9	0.55
干扰素α	抗体1	0.05
	抗体4	0.01
	抗体5	0.11
	抗体6	0.01
	抗体8	0.21
	抗体9	0.18

[0169] CI＜0.7协同效应CI≒1累加效应

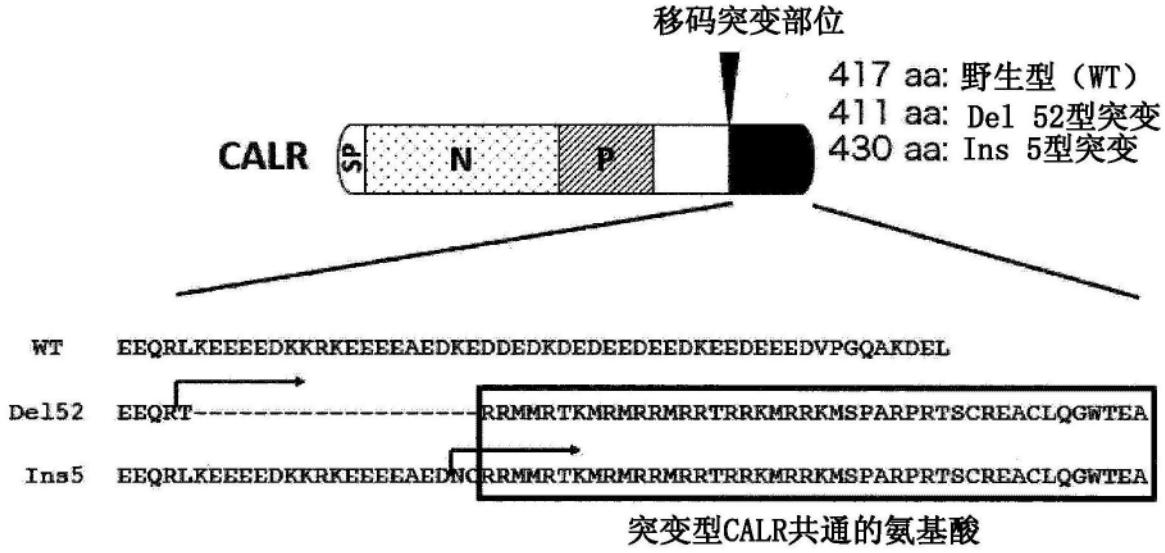

移码突变部位
417 aa: 野生型（WT）
411 aa: Del 52型突变
430 aa: Ins 5型突变
CALR
SP
N
P
WT EEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDKEDDEDKDEDEEDEEDKEEDEEEDVPGQAKDEL
Del52 EEQRT----------RRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
Ins5 EEQRLKEEEEDKKRKEEEEAEDNCRRMMRTKMRMRRMRRTRRKMRRKMSPARPRTSCREACLQGWTEA
突变型CALR共通的氨基酸

图1

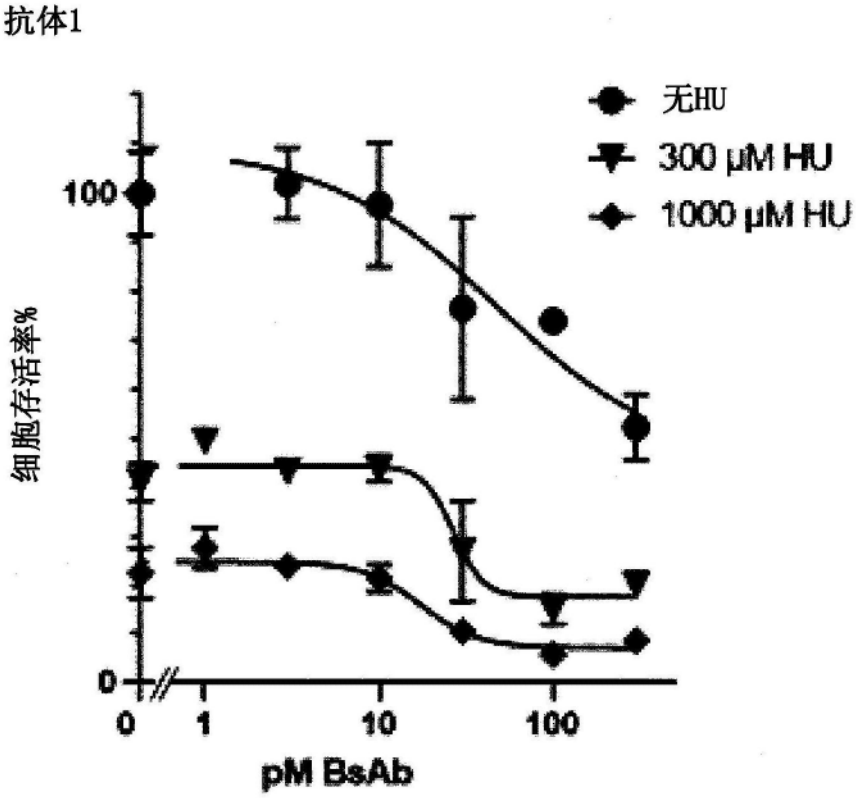

抗体1
无HU
300 μM HU
1000 μM HU
细胞存活率%
100
0
0
1
10
100
pM BsAb

图2-A

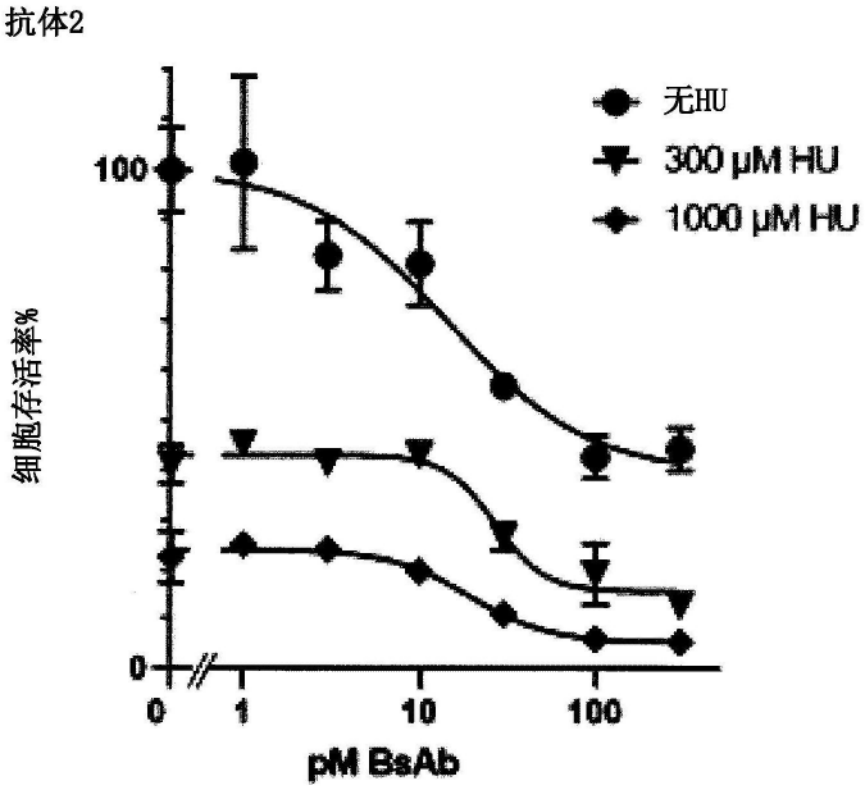

抗体2
无HU
300 μM HU
1000 μM HU
细胞存活率%
100
0
0
1
10
100
pM BsAb

图2-B

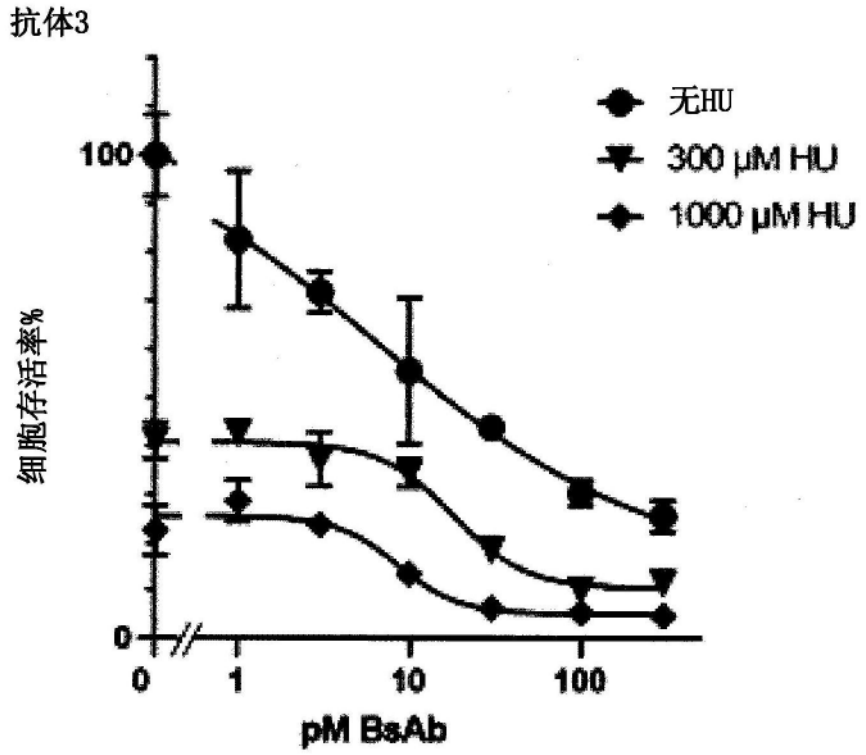

抗体3
无HU
300 μM HU
1000 μM HU
细胞存活率%
100
0
0
1
10
100
pM BsAb

图2-C

抗体4

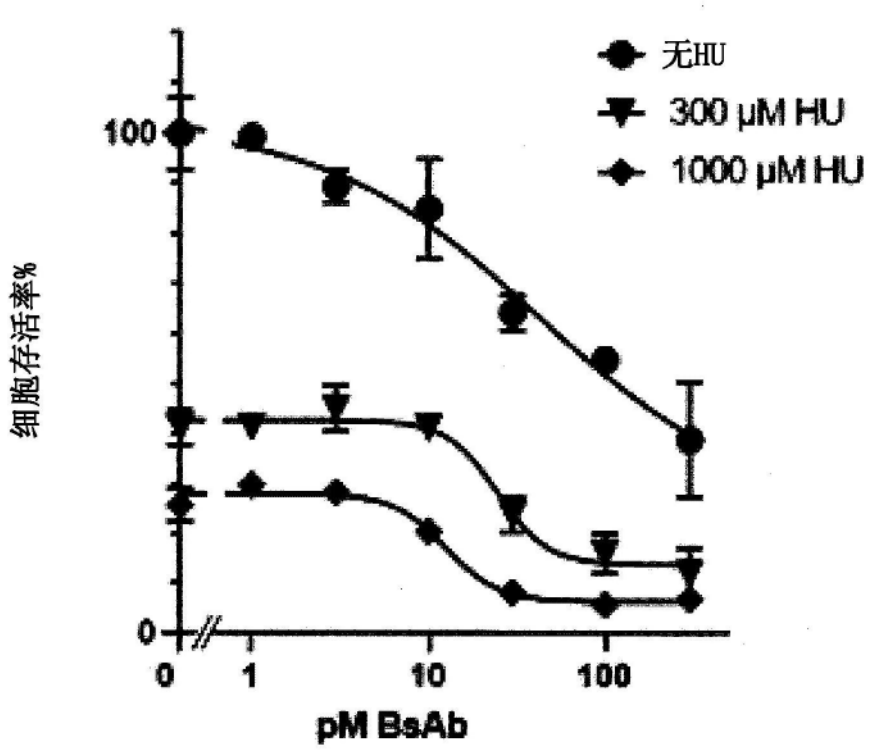


图2-D

抗体5

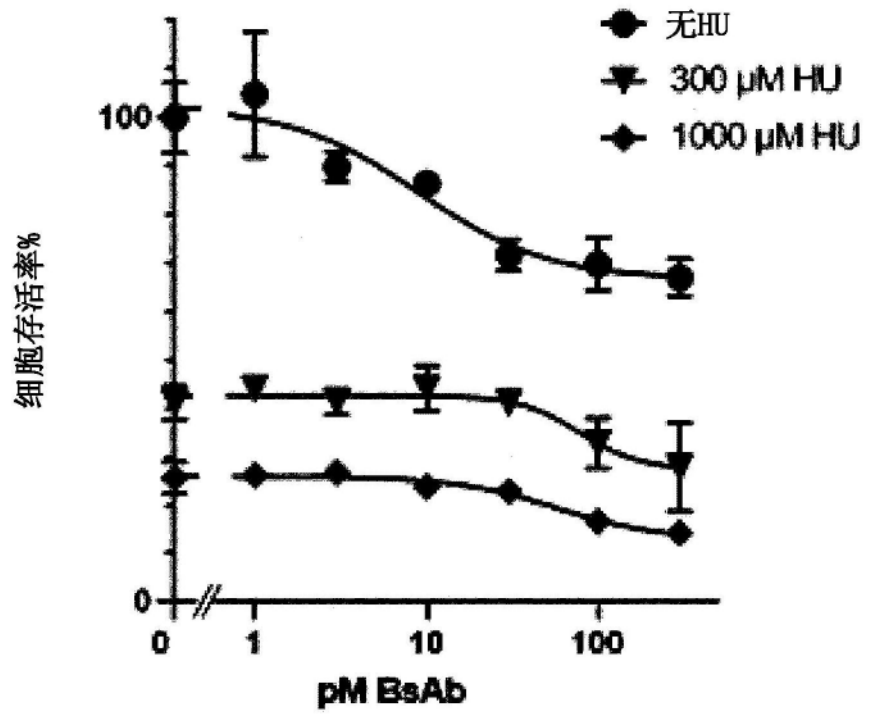


图2-E

抗体6

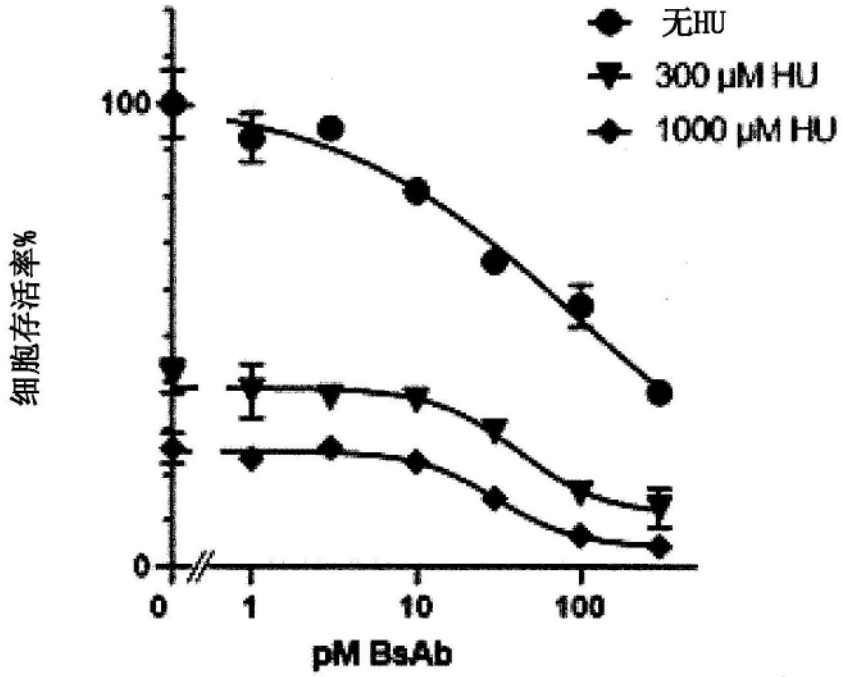


图2-F

抗体7

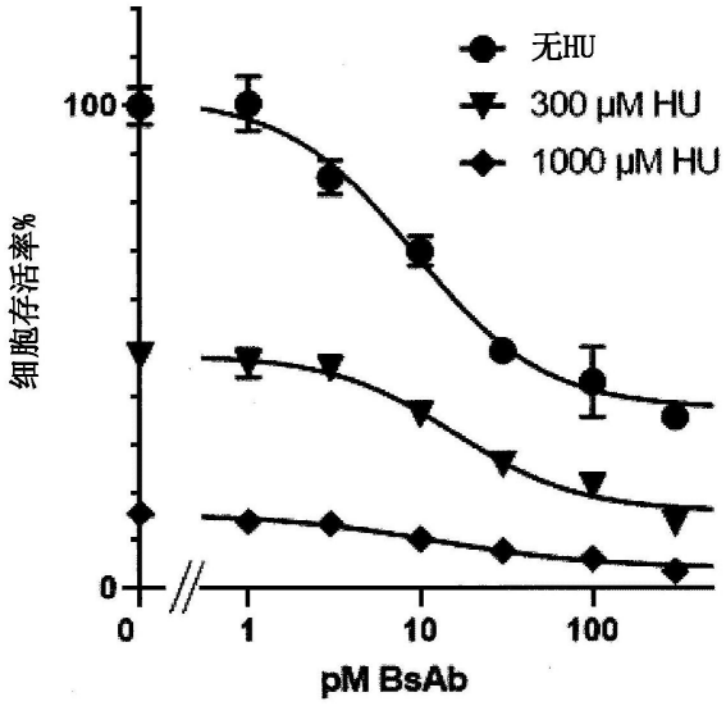


图2-G

抗体8

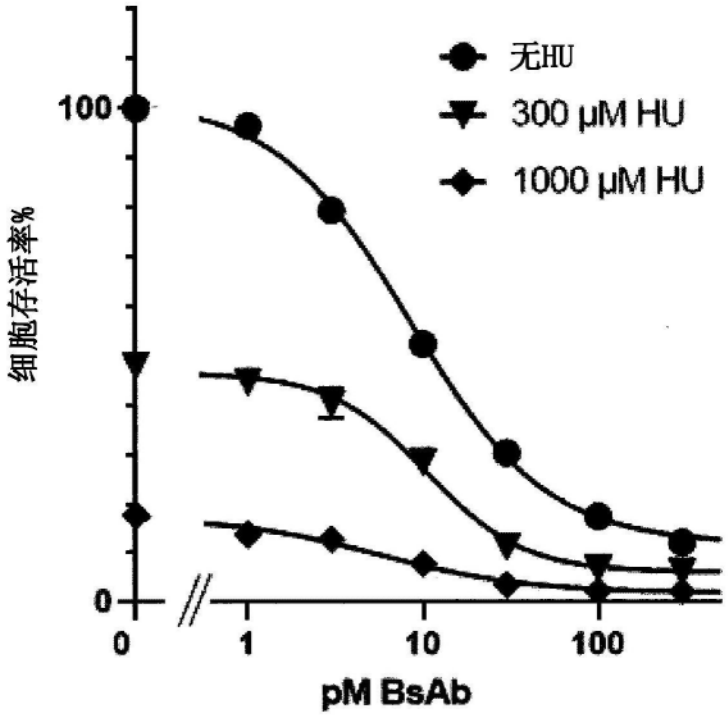


图2-H

抗体9

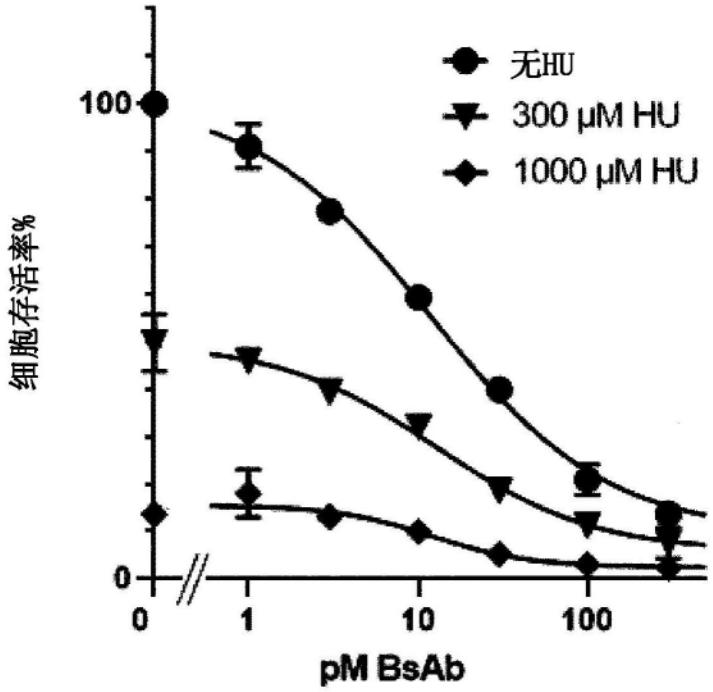


图2-I

抗体1

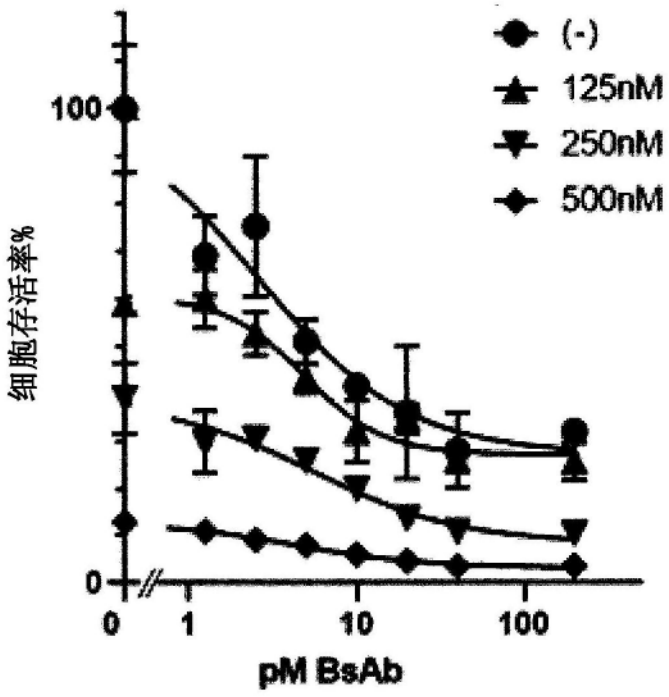


图3-A

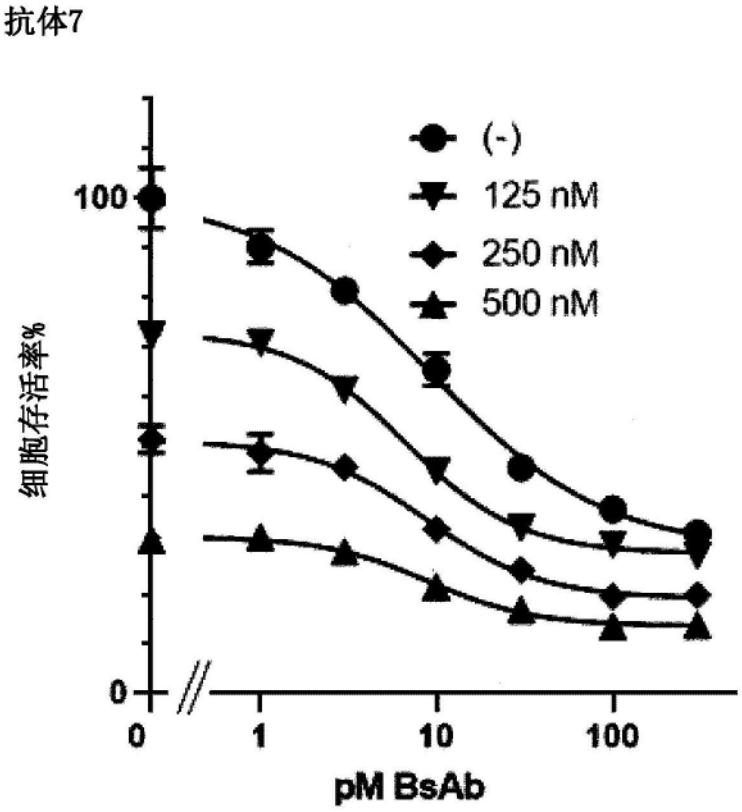

抗体7
(-)
125 nM
250 nM
500 nM
100
0
细胞存活率%
0
1
10
100
pM BsAb

图3-B

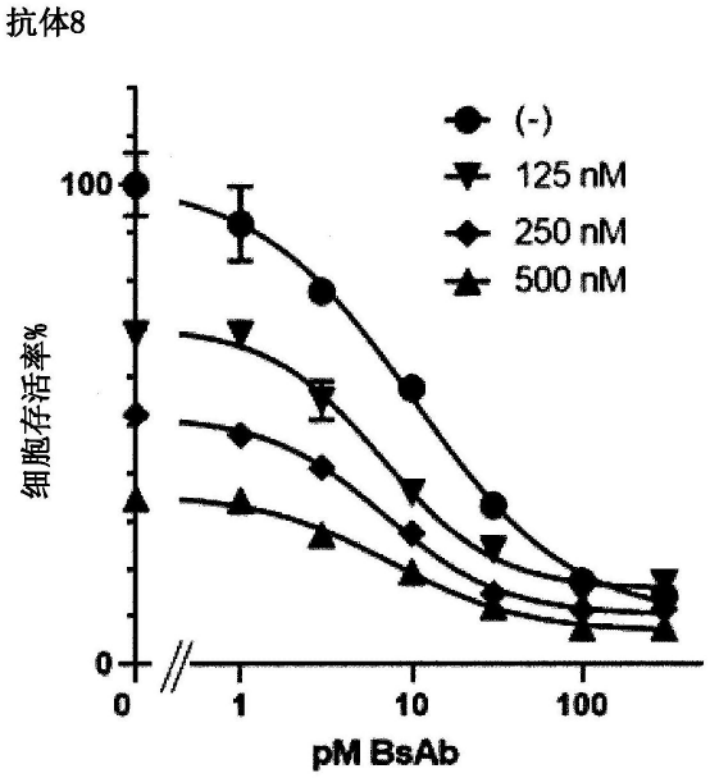

抗体8
(-)
125 nM
250 nM
500 nM
100
0
细胞存活率%
0
1
10
100
pM BsAb

图3-C

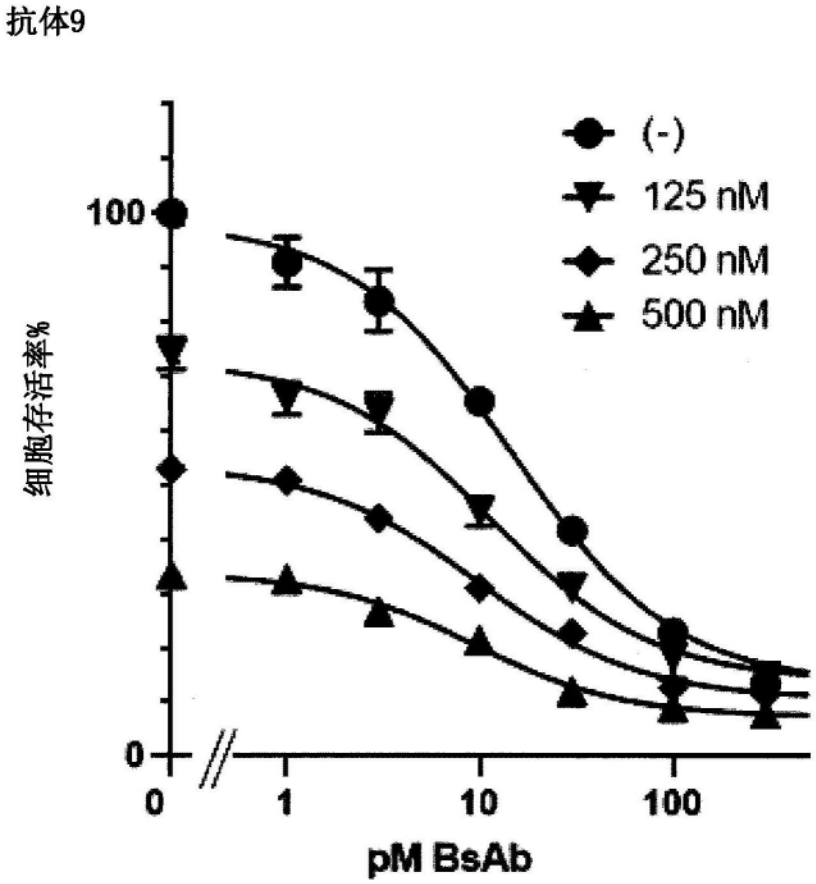


图3-D

抗体1

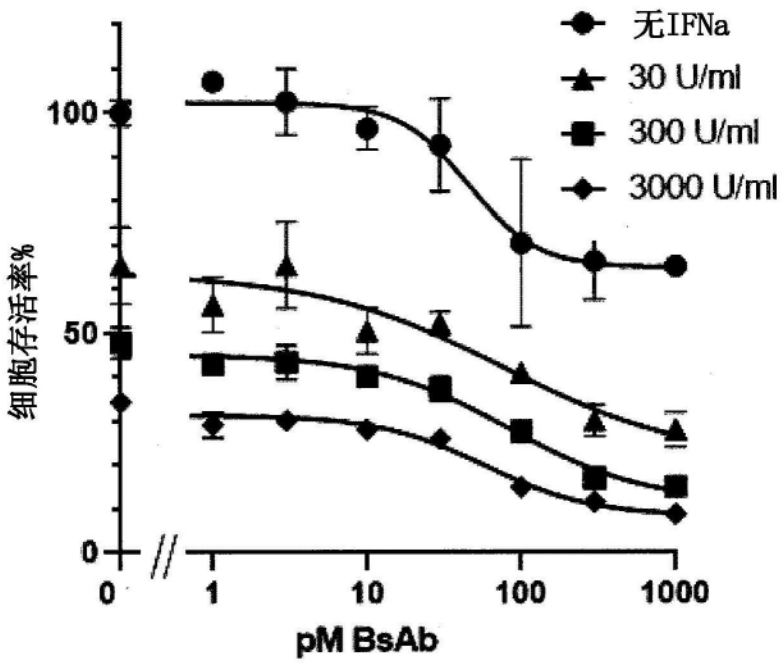


图4-A

抗体4

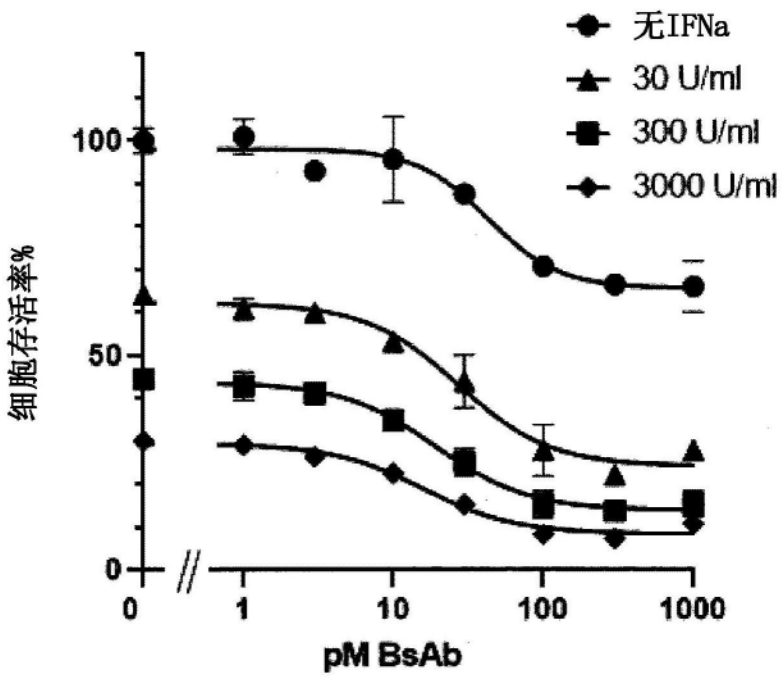


图4-B

抗体5

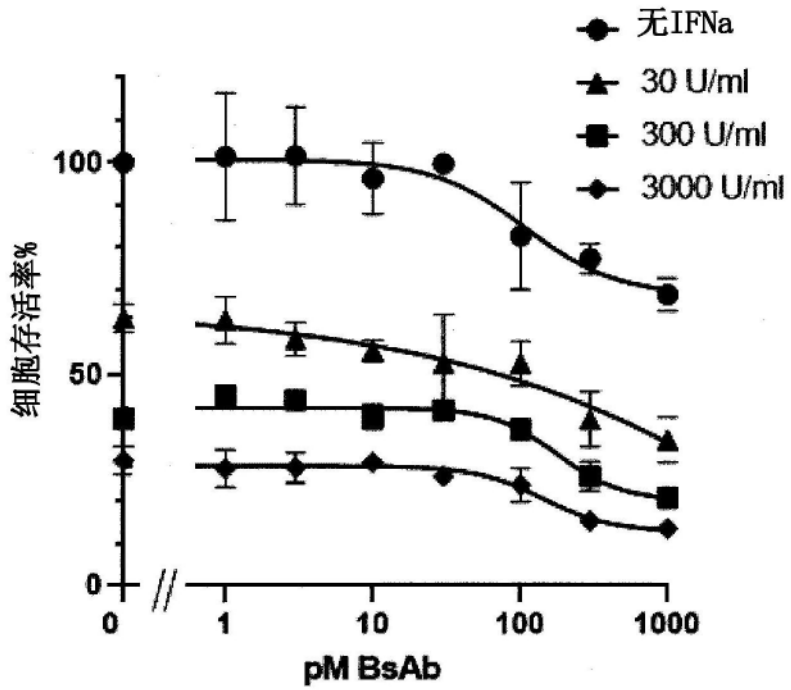


图4-C

抗体6

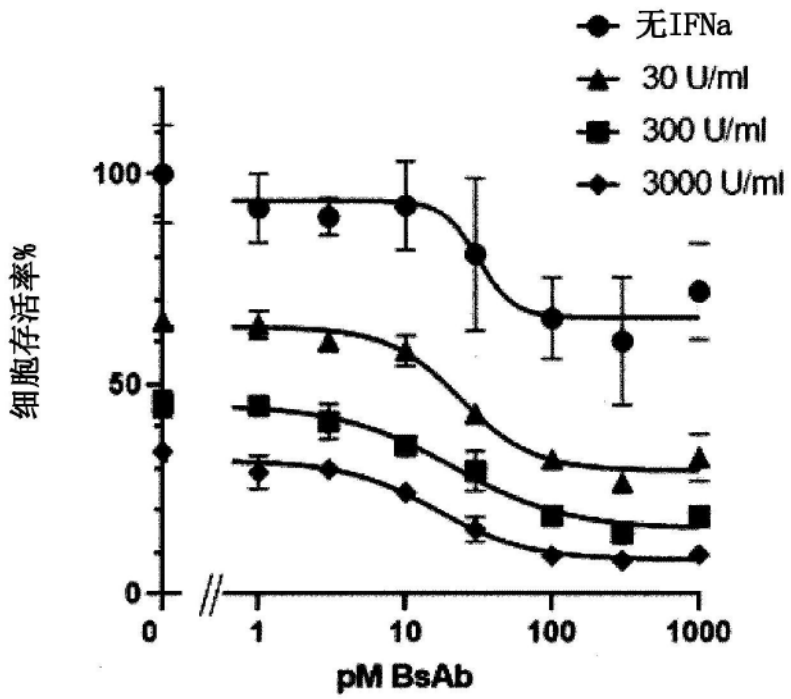


图4-D

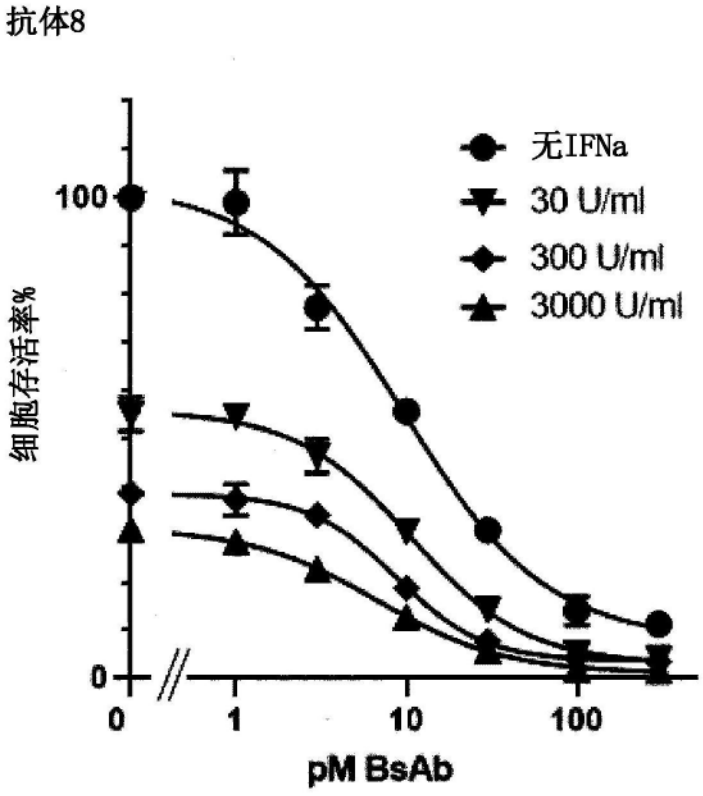


图4-E

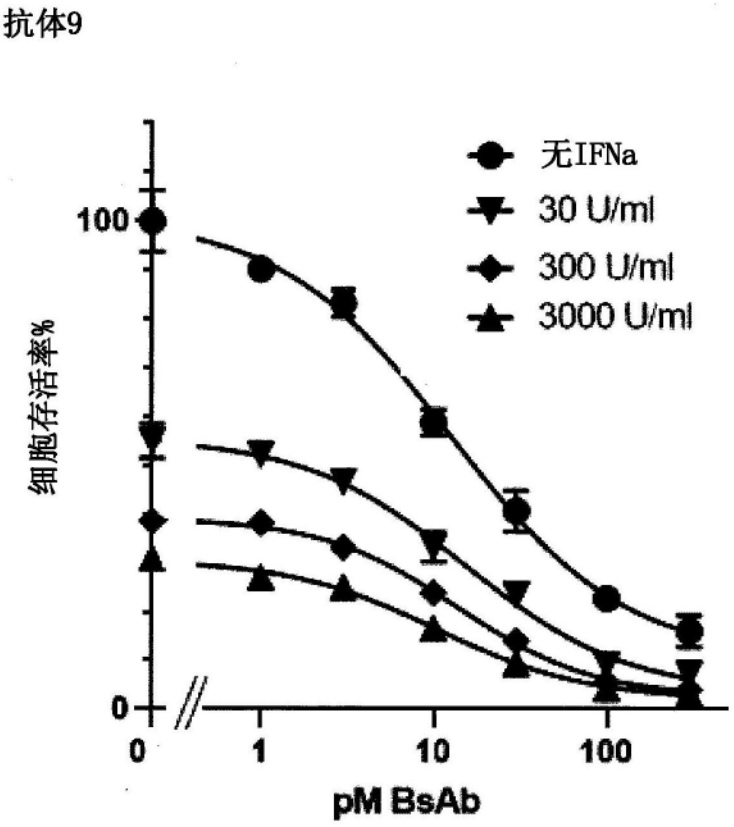


图4-F