

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **202392971** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2023.12.29

(22) Дата подачи заявки
2022.04.21

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) **БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИ-CLDN4/АНТИ-CD137 АНТИТЕЛО**

(31) **2021-072429**

(32) **2021.04.22**

(33) **JP**

(86) **PCT/JP2022/018350**

(87) **WO 2022/224997 2022.10.27**

(71) Заявитель:

**АСТЕЛЛАС ФАРМА ИНК.; НЭШНЛ
КЭНСЕР СЕНТЕР (JP)**

(72) Изобретатель:

**Тенда Йосиюки, Юри Масатоси, Яги
Сигенори, Сатаке Йосики, Хираяма
Кадзунори, Сиран Хироки, Сасаки
Хироки, Тиваки Фумико, Комацу
Масаюки (JP)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Целью настоящего изобретения является создание биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела, пригодного для лечения рака. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, полученное с использованием анти-CLDN4 антитела, связывающегося с CLDN4, и анти-CD137 антитела, связывающегося с CD137, обладало агонистической активностью в отношении CD137, стимулировало выработку интерферона- γ Т-клетками и проявляло цитотоксическую активность против опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4 на своей клеточной поверхности. Кроме того, было показано, что биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело можно было безопасно вводить обезьянам. Таким образом, биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело можно использовать в лечении рака человека.

A1

202392971

202392971

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-579394EA/030

БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИ-CLDN4/АНТИ-CD137 АНТИТЕЛО

Область техники

[0001] Настоящее изобретение относится к биспецифическому анти-CLDN4/анти-CD137 антителу, которое, как предполагается, будет пригодным в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции для применения в лечении рака.

Уровень техники

[0002] Клаудин-4 (CLDN4) представляет собой тетраспаниновый мембранный белок, относящийся к семейству клаудинов. Он экспрессируется в эпителиальных клетках и эндотелиальных клетках и играет важную роль в качестве основной молекулы, находящейся в плотном соединении. CLDN4 экспрессируется на высоком уровне в опухолевой ткани при колоректальном раке, раке мочевого пузыря, раке яичников и т.п., и было высказано предположение, что анти-CLDN4 антитело, возможно, применимо для лечения или диагностики рака (патентный документ 1 и непатентный документ 1). Кроме того, было описано, что применение как анти-CLDN4 антитела, так и антитела против рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) оказывает противоопухолевый эффект на животной модели (непатентный документ 2).

[0003] Кластер дифференцировки 137 (CD137, другое название 4-1BB) представляет собой молекулу, относящуюся к суперсемейству рецепторов фактора некроза опухоли (TNFRSF), и, как сообщается, экспрессируется на клеточной поверхности иммунной клетки, такой как Т-клетка, В-клетка, естественная клетка-киллер (NK), дендритная клетка, эозинофил или тучная клетка. В частности, CD137 на Т-клетке связывается с лигандом CD137 на антигенпрезентирующей клетке и, как известно, участвует в активации и выживаемости Т-клетки в качестве костимулирующей молекулы (непатентный документ 3). Агонистическое анти-CD137 антитело оказывает противоопухолевый эффект посредством активации иммунных клеток в микроокружении опухоли на животной модели (непатентный документ 4). Урелумаб, то есть агонистическое анти-CD137 антитело, продемонстрировал терапевтический эффект в клинических испытаниях, но, как сообщается, вызывает побочную реакцию в виде токсического поражения печени (непатентный документ 5).

[0004] В качестве инновационного способа, с помощью которого можно получить селективную цитотоксическую активность в отношении

опухолевых клеток при низкой концентрации антитела, сообщалось о биспецифическом антителе, рекрутирующем Т-клетки, с различными форматами антител. Биспецифическое антитело, рекрутирующее Т-клетки, представляет собой биспецифическое антитело, содержащее антитело против опухолеассоциированного антигена (ТАА), экспрессирующегося на поверхности опухолевых клеток, и антитело, связывающееся с Т-клеткой, и начинаются исследования на предмет эффекта этих антител в Т-клеточной иммунотерапии (непатентный документ 6). В качестве антитела, связывающегося с Т-клеткой, часто используется анти-CD3 антитело, и в настоящее время изучаются и разрабатываются биспецифические антитела, рекрутирующие Т-клетки, к различным ТАА.

[0005] Кроме того, в последние годы серьезно изучаются биспецифические антитела, рекрутирующие Т-клетки, против CD137 и ТАА. Проводятся исследования биспецифического анти-GPC3/анти-CD137 антитела, биспецифического анти-HER2/анти-CD137 антитела, биспецифического анти-PDL1/анти-CD137 антитела, биспецифического анти-FAP/анти-CD137 антитела и подобное, распознающих ТАА глипикан 3 (GPC3), рецептор человеческого эпидермального фактора роста типа 2 (HER2), лиганд запрограммированной клеточной гибели 1 (PD-L1) и белок активации фибробластов (FAP) (патентные документы 2 и 3, и непатентные документы 7-9).

Однако до сих пор не было сообщений о биспецифических анти-CLDN4/анти-CD137 антителах.

Список ссылок

Патентные документы

[0006] Патентный документ 1: WO2008/114733

Патентный документ 2: WO2015/156268

Патентный документ 3: WO2016/177802

Непатентные документы

[0007] Непатентный документ 1: Cancer Science, 2009: 100(9): pp. 1623-1630

Непатентный документ 2: Oncotarget, 2018: 9(100): p.37367-37378

Непатентный документ 3: Cancer Science, 2020: 111(5): p.1461-1467

Непатентный документ 4: Cancer Immunology Immunotherapy, 2012: 61(5): p.1721-1733

Непатентный документ 5: Clinical Cancer Research, 2017: 23(8): p.1929-1936

Непатентный документ L 6: mAbs, 2017: 9(2): p.182-212

Непатентный документ 7: Clinical Cancer Research, 2019: 25(19): p.5878-5889

Непатентный документ 8: Clinical Cancer Research, 2020: 26(15): p.4154-4167

Непатентный документ 9: Journal for Immunotherapy of Cancer, 2020; 8(2): e000238

Сущность изобретения

Техническая задача

[0008] Целью настоящего изобретения является создание биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела, пригодного для лечения рака.

Решение технической задачи

[0009] Авторы настоящего изобретения провели поиск антитела, селективно связывающегося с антигеном, экспрессируемым в перитонеальной метастатической опухолевой клетке, чтобы получить 3D11, которое представляет собой анти-CLDN4 антитело (примеры 1 и 2). Было обнаружено, что биспецифическое антитело, рекрутирующее Т-клетки, с использованием 3D11 и анти-CD3 антитела, непригодно для лечения онкологического пациента (ссылочный пример). Следовательно, 3D11 и антитело KM3900, которое представляет собой известное анти-CLDN4 антитело, использовали для попытки получить биспецифическое антитело, рекрутирующее Т-клетки, с анти-CD137 антителом (примеры 3 и 4). Полученное таким образом биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, связывающееся с CLDN4 и CD137 (пример 5), стимулировало продукцию интерферона- γ Т-клеткой *in vitro* и проявляло цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4 на своей клеточной поверхности (пример 6). Кроме того, было подтверждено, что полученное биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело проявляло противоопухолевую активность на мышинной модели *in vivo* (пример 7-1) и могло безопасно использоваться на яванских макаках (примеры 7-2). Было высказано предположение, что биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению пригодно для лечения рака.

[0010] В частности, настоящее изобретение относится к следующим пунктам [1]-[31].

1. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, и переменную область

тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи анти-CLDN4 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a) или (b):

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 2, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 2, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-114 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 4; или

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-112 SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 8.

2. Биспецифическое антитело по п.1, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи анти-CLDN4 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a) или (b):

(a) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4; или

(b) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, состоящую из

аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

3. Биспецифическое антитело по любому из пп.1 и 2, содержащее IgG антитело (IgG анти-CLDN4 антитело), состоящее из тяжелой цепи, содержащей переменную область тяжелой цепи, и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела.

4. Биспецифическое антитело по п.3, содержащее мутацию LALA (L234A и L235A, где положение мутации представляет собой аминокислотное положение в константной области человеческого Igγ1 в соответствии с системой нумерации EU) в Fc-области IgG анти-CLDN4 антитела.

5. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по п.3, содержащее мутацию P331G в Fc-области IgG анти-CLDN4 антитела (где положение мутации представляет собой аминокислотное положение в константной области человеческого Igγ1 в соответствии с системой нумерации EC).

6. Биспецифическое антитело по п.3, содержащее мутацию LALA и мутацию P331G в Fc-области IgG анти-CLDN4 антитела.

7. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-6, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи анти-CD137 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a)-(d):

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-107 SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-34 SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-56 SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 89-98 SEQ ID NO: 12;

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 14, и переменную

область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 16, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 16, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 16;

(с) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 18, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 18, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 18, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 20, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 20, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 20; или

(d) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 22, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 22, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-110 SEQ ID NO: 22, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 24, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 24, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 24.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-7, где вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи анти-CD137 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a)-(i):

(a) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из

аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(c) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(d) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(e) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(f) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(g) переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(h) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32; или

(i) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

9. Биспецифическое антитело по любому из пп.7 и 8, содержащее

анти-CD137 одноцепочечный переменный фрагмент (анти-CD137 scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела.

10. Биспецифическое антитело по п.9, где анти-CD137 scFv представляет собой любое из следующих пунктов (a)-(e):

(a) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

11. Биспецифическое антитело по любому из пп.9 и 10, содержащее IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи или легкой цепи IgG анти-CLDN4 антитела через линкер.

12. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, описанное в любом из следующих пунктов (a)-(j):

(a) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(b) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-

CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(с) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(d) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(e) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи,

состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(f) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(g) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(h) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных

положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(i) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; или

(j) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер.

13. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по любому из пп.11 и 12, где линкер представляет собой линкер GS.

14. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по п.13, где линкер GS представляет собой линкер, состоящий из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

15. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, описанное в любом из следующих пунктов (a) или (b):

(a) биспецифическое антитело, содержащее полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) биспецифическое антитело, содержащее полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

16. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по любому из пп.1-15, которое является посттрансляционно модифицированным.

17. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по п.16, где посттрансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце вариабельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи.

18. Полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(d):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6; или

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи

анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

19. Полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(r):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18;

(f) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(g) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO:

22;

(h) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(i) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28;

(l) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(m) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30;

(n) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(o) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO:

32;

(p) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32;

(q) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34; или

(r) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

20. Полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a) - (e):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

21. Полинуклеотид для применения в производстве

биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по п.15, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(e):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

22. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.18-21.

23. Клетка-хозяин, трансформированная экспрессионным вектором по п.22.

24. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(dd):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи

анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10;

(f) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(g) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14;

(h) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(i) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную

последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22;

(l) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(m) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26;

(n) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(o) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28;

(p) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(q) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30;

(r) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную

последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(s) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32;

(t) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32;

(u) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34;

(v) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34;

(w) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(x) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(y) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(z) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32;

(aa) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34;

(bb) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(cc) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv; или

(dd) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

25. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из следующих пунктов (a) или (b):

(a) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

26. Способ получения биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по любому из пп.23-25.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое

анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

28. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по любому из пп.1-17 для применения в лечении рака.

29. Фармацевтическая композиция по п.27 для применения в лечении рака.

30. Способ лечения рака, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по любому из пп.1-17 субъекту.

31. Применение биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по любому из пп.1-17 в производстве фармацевтической композиции для применения в лечении рака.

Преимущественные эффекты изобретения

[0011] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению связывается как с CLDN4, который является опухолевым антигеном, так и с CD137, экспрессирующимся на клеточной поверхности иммунной клетки, такой как Т-клетка, для активации иммунных клеток, находящихся вокруг опухолевой клетки и, таким образом, усиливает активность киллинга в отношении опухолевой клетки. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая это антитело, могут быть использованы для лечения различных видов рака.

Краткое описание фигур

[0012] На фиг. 1-1 показана связывающая активность тестируемых антител с CD137, измеренная и оцененная с использованием ELISA. На оси ординат графика указано значение, полученное вычитанием оптической плотности при 570 нм из оптической плотности при 450 нм, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый символ указывает среднее значение поглощения, полученное при добавлении каждого тестируемого антитела, и вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

На фиг. 1-2 показана связывающая активность тестируемых антител с CD137, измеренная и оцененная с использованием ELISA. На оси ординат графиков указано значение, полученное вычитанием оптической плотности при 570 нм из оптической плотности при 450 нм, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее значение оптической плотности, полученное при добавлении каждого из тестируемых

антител.

На фиг. 1-3 показана связывающая активность тестируемых антител с CD137, измеренная и оцененная с использованием ELISA. На оси ординат графиков указано значение, полученное вычитанием оптической плотности при 570 нм из оптической плотности при 450 нм, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее значение оптической плотности, полученное при добавлении каждого из тестируемых антител.

На фиг. 1-4 показана связывающая активность тестируемых антител с CD137, измеренная и оцененная с использованием ELISA. На оси ординат графиков указано значение, полученное вычитанием оптической плотности при 570 нм из оптической плотности при 450 нм, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее значение оптической плотности, полученное при добавлении каждого из тестируемых антител.

На фиг. 2-1 показана агонистическая активность для CD137 тестируемых антител, полученная при сокультивировании опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4 (клетки NCI-H322), и эффекторных клеток 4-1ВВ. На оси ординат графиков указана относительная величина люминесценции, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее значение относительной величины люминесценции, полученной при добавлении каждого из тестируемых антител, и вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

На фиг. 2-2 показана агонистическая активность для CD137 тестируемых антител, полученная при сокультивировании опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4 (клетки NCI-H322), и эффекторных клеток 4-1ВВ. На оси ординат графиков указана относительная величина люминесценции, и по оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее значение относительной величины люминесценции, полученной при добавлении каждого из тестируемых антител.

На фиг. 2-3 показана агонистическая активность для CD137 тестируемых антител, полученная при сокультивировании опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4 (клетки NCI-H322), и эффекторных клеток 4-1ВВ. На оси ординат графиков указана относительная величина люминесценции, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее

значение относительной величины люминесценции, полученной при добавлении каждого из тестируемых антител, и вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

На фиг. 2-4 показана агонистическая активность для CD137 тестируемых антител, полученная на монокультуре эффекторных клеток 4-1ВВ. На оси ординат графиков указана относительная величина люминесценции, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее значение относительной величины люминесценции, полученной при добавлении каждого из тестируемых антител, и вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

На фиг. 2-5 показана агонистическая активность для CD137 тестируемых антител, полученная на монокультуре эффекторных клеток 4-1ВВ. На оси ординат графиков указана относительная величина люминесценции, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее значение относительной величины люминесценции, полученной при добавлении каждого из тестируемых антител.

На фиг. 2-6 показана агонистическая активность для CD137 тестируемых антител, полученная на монокультуре эффекторных клеток 4-1ВВ. На оси ординат графиков указана относительная величина люминесценции, и на оси абсцисс указана концентрация тестируемого антитела. Каждый из символов указывает среднее значение относительной величины люминесценции, полученной при добавлении каждого из тестируемых антител, и вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

На фиг. 3-1 показана стимулирующая функция в отношении продукции интерферона- γ , полученная при добавлении каждого тестируемого антитела в систему сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. На оси ординат указано количество продуцированного интерферона- γ (пг/мл), полученное через 6 суток после добавления антитела, и на оси абсцисс указана концентрация антитела. Каждый из символов указывает среднее количество продуцированного интерферона- γ при каждой концентрации антитела.

На фиг. 3-2 показана стимулирующая функция в отношении продукции интерферона- γ , полученная при добавлении каждого тестируемого антитела в систему сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. На оси ординат графиков указано количество продуцированного интерферона- γ (пг/мл),

полученное через 4 суток после добавления антитела, и на оси абсцисс указана концентрация антитела. Каждый из символов указывает среднее количество продуцированного интерферона- γ при каждой концентрации антитела, и вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

На фиг. 3-3 показано количество продуцированного интерферона- γ , полученное при добавлении каждого тестируемого антитела в систему монокультуры экспандированных пан-Т-клеток. На оси ординат графиков указано количество продуцированного интерферона- γ (пг/мл), полученное через 6 суток после добавления антитела, и на оси абсцисс указана концентрация антитела. Каждый из символов указывает среднее количество продуцированного интерферона- γ при каждой концентрации антитела.

На фиг. 3-4 показано количество продуцированного интерферона- γ , полученное при добавлении каждого тестируемого антитела в систему монокультуры экспандированных пан-Т-клеток. На оси ординат графиков указано количество продуцированного интерферона- γ (пг/мл), полученное через 5 суток после добавления антитела, и на оси абсцисс указана концентрация антитела. Каждый из символов указывает среднее количество продуцированного интерферона- γ при каждой концентрации антитела, вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

На фиг. 4 показана цитотоксическая активность для опухолевых клеток (ингибирующая активность роста опухолевых клеток) каждого тестируемого антитела в системе сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. На оси ординат графиков указан уровень роста клеток, полученный при допущении того, что площадь флуоресценции, возрастающая от 0 ч до 168 ч после начала измерения, в лунке, в которую не добавлялось тестируемое антитело, соответствует 100%. На оси абсцисс указана концентрация антитела. Каждый из символов указывает средний уровень роста опухолевых клеток для каждого антитела.

На фиг. 5 показана цитотоксическая активность для опухолевых клеток, полученная при добавлении каждого тестируемого антитела в систему сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан Т-клеток. На оси ординат графика указан уровень гибели опухолевых клеток (%), полученный при допущении того, что в измеренных значениях хемилюминесценции клеток 60As6-Luc/GFP, анализированных через 6 суток после добавления антитела, среднее значение, полученное без добавления антитела, соответствует уровню

гибели, равному 0%, и среднее значение, полученное с добавлением Тритона-X100, соответствует уровню гибели 100%. На оси абсцисс указана концентрация антитела. Каждый из символов указывает среднее значение смертности раковых клеток при каждой концентрации антитела, и вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

На фиг. 6 показано изменение объема опухолей у мышей, которым трансплантировали РВМС, подкожно несущих опухолевые клетки NCI-H322. На оси абсцисс графика указаны сутки после первого введения, на оси ординат указан средний объем опухолей, и вертикальная линия ошибки указывает стандартное отклонение.

Описание вариантов осуществления

[0013] Далее настоящее изобретение будет описано подробно.

Определения

В рамках настоящего изобретения, термины имеют значения, обычно используемые в данной области техники специалистами в данной области, если специально не указано иное.

[0014] Антитело (или иммуноглобулин) представляет собой гликопротеин, основная структура которого представляет собой четырехцепочечную структуру билатерально симметричной Y-образной формы, включающую две тяжелые цепи, имеющие одну последовательность, и две легкие цепи, имеющие одну последовательность. Существует пять классов антител: IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Основная структура молекулы антитела является общей для этих классов: две тяжелые цепи с молекулярной массой от 50000 до 70000 и две легкие цепи с молекулярной массой от 20000 до 30000 связаны дисульфидной связью и нековалентной связью, образуя молекулу антитела, имеющую Y-образную четырехцепочечную структуру с молекулярной массой от 150000 до 190000. Тяжелая цепь представляет собой полипептидную цепь, обычно содержащую около 440 аминокислот, имеет структуру, специфичную для каждого класса, и обозначается, соответственно, как $Ig\gamma$, $Ig\mu$, $Ig\alpha$, $Ig\delta$ и $Ig\epsilon$ соответственно IgG, IgM, IgA, IgD или IgE. IgG имеет подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и тяжелые цепи, соответствующие этим подклассам, обозначаются как $Ig\gamma_1$, $Ig\gamma_2$, $Ig\gamma_3$ и $Ig\gamma_4$. Легкая цепь представляет собой полипептидную цепь, обычно содержащую примерно 220 аминокислот, и известно, что она имеет два типа: λ тип и κ тип, которые обозначаются, соответственно, как $Ig\lambda$ и $Ig\kappa$. Каждый из двух типов легких цепей может быть соединен с любым типом тяжелой цепи.

[0015] В молекуле антитела тяжелая цепь имеет четыре внутрицепочечные дисульфидные связи (пять в Ig μ и Ig ϵ), легкая цепь имеет две внутрицепочечные дисульфидные связи, и, таким образом, одна петля образуется 100-110 аминокислотными остатками. Трехмерные структуры этих петель одинаковы и обозначаются как структурная единица или домен. Как в тяжелой цепи, так и в легкой цепи домен, расположенный на N-конце, обозначается как переменная область и имеет аминокислотную последовательность, варьирующуюся даже среди антител, полученных из одного и того же класса (или подкласса) одного и того же вида животных и, как известно, участвует в образовании специфической связи антитело-антиген. Домен, расположенный на стороне ниже переменной области на C-конце, имеет аминокислотную последовательность, по существу постоянную в каждом классе или подклассе, и обозначается как константная область. Тяжелая цепь в направлении от N-конца к C-концу имеет переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи (CH). CH дополнительно делится со стороны N-конца на три домена: домен CH1, домен CH2 и домен CH3. Легкая цепь в направлении от N-конца к C-концу имеет переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL).

[0016] Аминокислотная последовательность трех участков, определяющих комплементарность (CDR), присутствующих в VH и VL, в значительной степени варьируется и способствует вариативности переменных областей. Каждый CDR представляет собой участок, состоящий из 5-10 аминокислотных остатков, который находится в порядке CDR1, CDR2 и CDR3 на N-конце каждой тяжелой цепи и легкой цепи и вступает в контакт с антигеном с образованием связывающего сайта антитела. Известно, что CDR тяжелой цепи вносят больший вклад в связывание антигена, чем CDR легкой цепи, и что CDR3 вносят наибольший вклад среди CDR1-CDR3. С другой стороны, область, без CDR переменной области, обозначается как каркасная область (FR), состоит из FR1-FR4 и сравнительно мало варьируется по аминокислотной последовательности.

[0017] Когда антитело обрабатывают папаином, то есть протеазой, то получают три фрагмента антитела. Два фрагмента, расположенные на N-концевой стороне, обозначаются как область Fab (антигенсвязывающий фрагмент, фрагмент, связывающий антиген). Область Fab относится к области, состоящей из VH тяжелой цепи, части домена CH1 и шарнирной области, и легкой цепи (VL и CL), и связывается с антигеном по VH и VL (антигенсвязывающий сайт),

включенные в область Fab. Кроме того, фрагмент, расположенный на С-концевой стороне, обозначается как Fc-область (кристаллизуемый фрагмент, кристаллизующийся фрагмент).

[0018] В рамках настоящего изобретения, «IgG антитело» относится к антителу, имеющему Y-образную структуру, включающую две области Fab и область Fc. В одном варианте осуществления две области Fab антитела IgG содержат одинаковые последовательности области Fab. В другом варианте осуществления две области Fab антитела IgG содержат разные последовательности области Fab.

[0019] В рамках настоящего изобретения, термины «антигенсвязывающий фрагмент» и «фрагмент антитела» могут использоваться взаимозаменяемо и относятся к молекуле, которая содержит, по меньшей мере, одну полипептидную цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи молекулы иммуноглобулина и обладающие антигенсвязывающей активностью. Репрезентативные примеры антигенсвязывающего фрагмента включают одноцепочечный переменный фрагмент (scFv), Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент и F(ab')₂-фрагмент. Здесь «scFv» относится к моновалентному антигенсвязывающему фрагменту, содержащему VH и VL, связанные через линкер. Fab-фрагмент представляет собой моновалентный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий фрагмент, состоящий из легкой цепи, VH и домена CH1 тяжелой цепи и части шарнирной области. Fab'-фрагмент представляет собой моновалентный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий фрагмент, состоящий из легкой цепи, VH и домена CH1 тяжелой цепи, и части шарнирной области, и эта часть шарнирной области содержит остаток цистеина, содержащийся в дисульфидной связи между тяжелыми цепями. Фрагмент F(ab')₂ представляет собой двухвалентный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий фрагменты Fab', связанные дисульфидной связью. Термин «моновалентный» означает, что содержится один антигенсвязывающий сайт, и термин «двухвалентный» означает, что содержатся два антигенсвязывающих сайта.

[0020] В рамках настоящего изобретения, «биспецифическое антитело» относится к молекуле антитела, содержащей два антитела или антигенсвязывающих фрагментов, специфически связывающихся с различными антигенами и обладающие связывающей активностью в отношении соответствующих антигенов. В качестве биспецифических антител специалистам в данной области известны биспецифические антитела, имеющие различные структуры (непатентный документ б). В рамках настоящего изобретения, термин «антитело» охватывает

полноразмерные антитела (различные иммуноглобулины, в частности IgG антитело), антигенсвязывающий фрагмент и биспецифические антитела, имеющие любую структуру, если только это конкретно не ограничивается по контексту.

[0021] В рамках настоящего изобретения, анти-CLDN4 антитело типа IgG обозначается как «IgG анти-CLDN4 антитело».

[0022] В рамках настоящего изобретения, «человеческое антитело» относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина. В рамках настоящего изобретения, «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором часть, большая часть или все аминокислотные остатки, за исключением CDR, замещены аминокислотными остатками, полученными из молекулы иммуноглобулина человека. Способ гуманизации особым образом не ограничивается, и для получения гуманизированного антитела можно сослаться, например, на патент США № 5225539, патент США № 6180370 и т.п.

[0023] Число аминокислотных остатков антитела, используемого в настоящем документе, может быть определено указанием по системе нумерации Kabat или по системе нумерации ЕС (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., 1991, NIH Publication No. 91-3242)) в соответствии с системой нумерации.

[0024] В рамках настоящего изобретения, термин «связь» или «связанный» означает, что множество компонентов (таких как Fab-область и Fc-область) соединены напрямую или через посредника (такого как пептидный линкер). Здесь термин «пептидный линкер» означает, по меньшей мере, одну аминокислотную последовательность, которая может быть введена методом генной инженерии, используемым для связывания множества компонентов. Длина пептидного линкера, используемого в настоящем изобретении, особым образом не ограничивается и может быть соответствующим образом выбрана специалистами в данной области в зависимости от цели.

[0025] В рамках настоящего изобретения, термин «идентичность» означает значение идентичности, полученное с использованием EMBL Needle (Nucleic Acids Res., 2015, Vol. 43, p. W580-W584) с параметрами по умолчанию. Параметры представляют следующее:

Штраф за открытие гэпа=10

Штраф за продолжение гэпа=0,5

Матрица=EBLOSUM62

Штраф за конечный гэп=ложный

[0026] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по

настоящему изобретению

Настоящее изобретение относится к биспецифическому антителу, связывающемуся с CLDN4 и CD137 (также называемому здесь как «биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело»). Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, и переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению включает биспецифическое антитело, содержащее IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv (также называемый здесь как «анти-CD137 scFv»). В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело, содержащее IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv.

[0027] В рамках настоящего изобретения, «анти-CLDN4 антитело» представляет собой антитело, способное связываться с человеческим CLDN4, и «анти-CD137 антитело» представляет собой антитело, способное связываться с человеческим CD137. С использованием известного метода оценки связывающей активности можно определить насколько антитело связывается с человеческим CLDN4 или человеческим CD137. Примеры метода измерения связывающей активности включают такой метод, как твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) или проточную цитометрию. ELISA или проточная цитометрия могут быть выполнены методом, обычно используемым специалистами в данной области, и может быть использован метод, описанный, например, в примерах 3 или 5.

[0028] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению может иметь любую структуру, при условии, что оно связывается с CLDN4 и CD137, и его примеры включают биспецифическое антитело, имеющее структуру, описанную в непатентном документе 6. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению может представлять собой конъюгат, в котором Fab-область анти-CLDN4 антитела и Fab-область анти-CD137 антитела связаны друг с другом, конъюгат IgG анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 антитела типа IgG (также называемое здесь как «IgG анти-CD137 антитело»), конъюгат IgG анти-CLDN4 антитела и антигенсвязывающего фрагмента анти-CD137 антитела, конъюгат антигенсвязывающего фрагмента анти-CLDN4 антитела и IgG анти-CD137

антитела, или конъюгат антигенсвязывающего фрагмента анти-CLDN4 антитела и антигенсвязывающего фрагмента анти-CD137 антитела.

[0029] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит полноразмерное анти-CLDN4 антитело и полноразмерное анти-CD137 антитело. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит IgG анти-CLDN4 антитело и IgG анти-CD137 антитело. Два антитела могут быть связаны друг с другом посредством линкера. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит полноразмерное анти-CLDN4 антитело и антигенсвязывающий фрагмент анти-CD137 антитела. Сайт связывания двух антител особым образом не ограничивается, и антитела связаны напрямую или через линкер. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv (называемый здесь как «анти-CD137 scFv»). В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом легкой цепи анти-CLDN4 антитела. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv, где карбоксиконец анти-CD137 scFv связан с аминоконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv, где карбоксиконец анти-CD137 scFv связан с аминоконцом легкой цепи анти-CLDN4 антитела. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит антигенсвязывающий фрагмент анти-CLDN4 антитела и антигенсвязывающий фрагмент анти-CD137 антитела. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему

изобретению содержит анти-CD137 scFv.

[0030] В биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе по настоящему изобретению переменные области тяжелой цепи и переменные области легкой цепи анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 антитела могут быть получены из человеческого антитела или могут быть получены из гуманизированного антитела, или их комбинации. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело, содержащее человеческое антитело, гуманизированное антитело или их комбинацию.

[0031] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, и переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи анти-CLDN4 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a) или (b):

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 2, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 2, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-114 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 4; или

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-112 SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящий из

аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 8.

[0032] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, описанные в следующих пунктах (a) или (b):

(a) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4; или

(b) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

[0033] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению может содержать в качестве анти-CLDN4 антитела полноразмерное антитело, такое как IgG антитело, или может содержать антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или scFv.

[0034] В качестве константной области тяжелой цепи, содержащейся в анти-CLDN4 антителе, содержащемся в биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе по настоящему изобретению, может быть выбрана любая из константных областей Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ и Ig ϵ . Ig γ может быть выбран, например, из Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 и Ig γ 4. В качестве константной области легкой цепи, содержащейся в анти-CLDN4 антителе, содержащемся в биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе по настоящему изобретению, может быть выбрана любая из константных областей Ig λ и Ig κ . Когда анти-CLDN4 антитело, содержащееся в биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе по настоящему изобретению, представляет собой IgG антитело, то тяжелая цепь и легкая цепь анти-CLDN4 антитела представляют собой соответственно человеческие Ig γ 1 и Ig κ в одном варианте осуществления. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит полноразмерное анти-CLDN4 антитело. В одном варианте осуществления анти-CLDN4 антитело, содержащееся в биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе по настоящему изобретению, представляет

собой IgG антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела (IgG анти-CLDN4 антитела).

[0035] Когда биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит Fc-область, то Fc-область биспецифического антитела может содержать мутацию, которая приводит к снижению антителозависимой клеточной цитотоксичности (ADCC) или комплементзависимой цитотоксичности (CDC). L234A представляет собой замещение лейцина на аланин в аминокислотном положении 234 в константной области человеческого Igγ1. L235A представляет собой замещение лейцина на аланин в аминокислотном положении 235 в константной области человеческого Igγ1. Аминокислотные мутации L234A и L235A в константной области человеческого Igγ1 обозначаются как «мутация LALA». В данном случае положения 234 и 235 представляют собой аминокислотные положения в константной области человеческого Igγ1 согласно системе нумерации EU. Известно, что эта мутация приводит к снижению ADCC и CDC антитела (Mol. Immunol., 1992, Vol. 29, p. 633-639; и J. Immunol., 2000, Vol. 164, p. 4178-4184). P331G или P331S представляет собой замещение пролина на глицин или серин в аминокислотном положении 331 в константной области человеческого Igγ1. В данном случае положение 331 представляет собой аминокислотное положение в константной области человеческого Igγ1 согласно системе нумерации EU. Известно, что эта мутация снижает CDC антитела (J. Immunol., 2000, Vol. 164(8), p. 4178-4184).

[0036] В одном варианте осуществления IgG анти-CLDN4 антитело, содержащееся в биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе по настоящему изобретению, содержит Fc-область, содержащую аминокислотные мутации L234A и L235A (мутация LALA). В одном варианте осуществления IgG анти-CLDN4 антитело содержит Fc-область, содержащую мутацию P331G или P331S. В одном варианте осуществления IgG анти-CLDN4 антитело содержит Fc-область, содержащую мутацию LALA и любую из мутаций P331G или P331S.

[0037] Авторы настоящего изобретения создали новое анти-CD137 антитело или его связывающий фрагмент (scFv) в процессе создания биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по настоящему изобретению. Авторы настоящего изобретения идентифицировали биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, которое не трансдуцирует сигнал CD137 при связывании только с CD137, а трансдуцирует сигнал CD137 только при одновременном связывании с

CD137 и CLDN4. Антитело не проявляет агонистической активности, если не связывается с CLDN4. С другой стороны, связывание биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела с CLDN4 и CD137 приводит к трансдукции сигнала CD137 и активации Т-клетки. Полагается, что данная активность ослабляет гепатотоксичность и т.п., наблюдаемую в клинических испытаниях урелумаба, и, следовательно, ожидается, что это будет предпочтительным профилем в качестве анти-CD137 антитела, используемого в биспецифическом антителе.

[0038] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, описанные в любом из следующих пунктов (a) - (d):

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-107 SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-34 SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-56 SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 89-98 SEQ ID NO: 12;

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 16, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 16, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 16;

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных

положениях 31-35 SEQ ID NO: 18, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 18, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 20, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 20, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 20; или

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 22, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 22, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-110 SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 24, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 24, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 24.

[0039] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, описанные в любом из следующих пунктов (a)-(i):

(a) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(b) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(c) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, состоящую

из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(d) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(e) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(f) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(g) переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(h) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32; или

(i) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

[0040] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению может содержать в качестве анти-CD137 антитела полноразмерное антитело, такое как IgG антитело, или может содержать антигенсвязывающий фрагмент, такой как Fab-фрагмент, Fab'-фрагмент, F(ab')₂-фрагмент или scFv. В одном варианте осуществления анти-CD137 антитело, содержащееся в биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе, представляет собой антигенсвязывающий фрагмент анти-CD137 антитела. В одном

варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент анти-CD137 антитела, содержащийся в биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе, представляет собой анти-CD137 scFv.

[0041] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, описанные в следующих пунктах (a) - (m):

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-107 SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-34 SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-56 SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 89-98 SEQ ID NO: 12;

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 16, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 16, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 16;

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 18, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 18, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO:

134-242 SEQ ID NO: 26;

(j) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(k) переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(l) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32; или

(m) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

[0042] Тип и длина линкера, используемого для связывания переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи анти-CD137 антитела в анти-CD137 scFv, особым образом не ограничиваются и могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области. В качестве линкера можно использовать пептидный линкер. Предпочтительная длина составляет 5 или более аминокислот (при этом верхний предел особым образом не ограничивается, но обычно составляет 30 или менее аминокислот, и предпочтительно 20 или менее аминокислот), и особенно предпочтительно составляет 15 аминокислот. В качестве линкера можно использовать, например, глицин-сериновый линкер (линкер GS) или глицин-лизин-пролин-глицин-сериновый линкер (линкер GKPGS). Примеры таких линкеров включают следующее:

Ser

Gly-Ser

Gly-Gly-Ser

Ser-Gly-Gly

Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 46)

Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 47)

Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 48)
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 49)
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 50)
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 51)
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 52)
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 53)
 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 54)
 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n
 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n
 Gly-Lys-Pro-Gly-Ser (SEQ ID NO: 55)
 (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n

В вышеописанных примерах *n* представляет собой целое число, равное 1 или более. В одном аспекте *n* составляет от 1 до 10, от 2 до 8 или от 2 до 6. Длина и последовательность линкера могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области в зависимости от цели. В одном варианте осуществления линкер, используемый в анти-CD137 scFv, представляет собой линкер GS. В одном варианте осуществления линкер, используемый в анти-CD137 scFv, представляет собой линкер GS (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n, и *n* равно либо 3, либо 4.

[0043] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит анти-CD137 scFv, описанный в любом из следующих пунктов (a) - (e):

(a) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) анти-CD137 scFv 7, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

[0044] В биспецифическом анти-CLDN4/анти-CD137 антителе по настоящему изобретению анти-CLDN4 антитело или его

антигенсвязывающий фрагмент могут быть связаны с анти-CD137 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом через линкер. Тип и длина линкера для связывания анти-CLDN4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с анти-CD137 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом особым образом не ограничиваются и могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области. В качестве линкера можно использовать пептидный линкер. Предпочтительная длина составляет 5 или более аминокислот (при этом верхний предел особым образом не ограничивается, но обычно составляет 30 или менее аминокислот, и предпочтительно 20 или менее аминокислот), и особенно предпочтительно составляет 10 аминокислот. В качестве пептидного линкера можно использовать, например, глицин-сериновый линкер (линкер GS) или глицин-лизин-пролин-глицин-сериновый линкер (линкер GKPGS). Примеры таких линкеров включают следующее:

Ser
 Gly-Ser
 Gly-Gly-Ser
 Ser-Gly-Gly
 Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 46)
 Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 47)
 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 48)
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 49)
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 50)
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 51)
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 52)
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 53)
 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 54)
 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n
 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n
 Gly-Lys-Pro-Gly-Ser (SEQ ID NO: 55)
 (Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n

В вышеописанных примерах n представляет собой целое число, равное 1 или более. В одном аспекте n составляет от 1 до 10, от 2 до 8 или от 2 до 6. Длина и последовательность пептидного линкера могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области в зависимости от цели. В одном варианте осуществления линкер, используемый в качестве линкера для связывания анти-CD137 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с анти-CD137 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, представляет

собой линкер GS или линкер GKPGS, и в другом варианте осуществления представляет собой линкер, имеющий аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 54.

[0045] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv и имеет структуру, в которой IgG анти-CLDN4 антитело связано с анти-CD137 антителом через линкер. Сайт связывания между IgG анти-CLDN4 антителом и анти-CD137 scFv особым образом не ограничивается, и, например, биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению может иметь различные структуры, такие как аминоконец тяжелой цепи IgG анти-CLDN4 антитела связан с карбоксиконцом анти-CD137 scFv, аминоконец легкой цепи IgG анти-CLDN4 антитела связан с карбоксиконцом анти-CD137 scFv, аминоконец IgG анти-CLDN4-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи IgG анти-CLDN4 антитела, и аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом легкой цепи IgG анти-CLDN4 антитела. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит аминоконец анти-CD137 scFv, связанный с карбоксиконцом тяжелой цепи IgG анти-CLDN4 антитела, или аминоконец анти-CD137 scFv, связанный с карбоксиконцом легкой цепи IgG анти-CLDN4 антитела. В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит аминоконец анти-CD137 scFv, связанный с карбоксиконцом тяжелой цепи IgG анти-CLDN4 антитела.

[0046] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, содержащее IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи или легкой цепи IgG анти-CLDN4 антитела через линкер, и переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи анти-CD137 scFv описаны в любом из следующих пунктов (a)-(m):

(a) переменная область тяжелой цепи, содержащая CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-107 SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи, содержащая CDR1, состоящий из аминокислотной

134-244 SEQ ID NO: 32; или

(m) переменная область тяжелой цепи, состоящая из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменная область легкой цепи, состоящая из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

[0047] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, содержащее IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи или легкой цепи IgG анти-CLDN4 антитела через линкер, и анти-CD137 scFv описан в любом из следующих пунктов (a)-(e):

(a) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

[0048] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, описанное в любом из следующих пунктов (a)-(h):

(a) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 2, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 2, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-114 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную

область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 4; и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-107 SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-34 SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-56 SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 89-98 SEQ ID NO: 12, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(b) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 2, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 2, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-114 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 4; и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в

аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 16, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 16, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 16, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(с) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 2, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 2, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-114 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 4; и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 18, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 18, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 20, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 20, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 20, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(d) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 2, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 2, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-114 SEQ ID NO:

2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 4; и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 22, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 22, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-110 SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 24, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 24, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 24. NO: 24, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(е) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-112 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 8; и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-107 SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи,

содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-34 SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-56 SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 89-98 SEQ ID NO: 12, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(f) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-112 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 8; и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 16, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 16, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 16, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(g) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящий из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 99-112 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 8; и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 18, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 18, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 20, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 20, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 20, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; или

(h) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-112 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 8; и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 22, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 22, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях

98-110 SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 24, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 24, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 24, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер.

[0049] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело анти-CLDN4/анти-CD137 scFv, описанное в любом из следующих пунктов (a)-(j):

(a) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(b) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(c) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи,

состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(d) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(e) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(f) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных

положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(g) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(h) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(i) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела,

содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(j) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(k) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(l) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из

аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(m) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(n) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(o) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-

109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(p) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(q) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(r) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-

109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(s) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; или

(t) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер.

[0050] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело анти-CLDN4/анти-CD137 scFv, описанное в следующих пунктах (a) или (b):

(a) биспецифическое антитело, содержащее полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4

антитела и анти-CD137 scFv, и полипептид, содержащий легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) биспецифическое антитело, содержащее полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0051] В рамках настоящего изобретения, термин «посттрансляционная модификация» относится к тому, что антитело, экспрессированное в клетке, модифицируется после трансляции. Примеры посттрансляционной модификации включают такие модификации, как пироглутамилирование, гликозилирование, окисление, дезамидирование или гликирование глутамина или глутаминовой кислоты на N-конце тяжелой цепи, и удаление лизина посредством гидролиза лизина на C-конце тяжелой цепи карбоксипептидазой. Известно, что такая посттрансляционная модификация имеет место в различных антителах (J. Pharm. Sci., 2008, Vol. 97, p. 2426-2447).

[0052] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению может быть посттрансляционно модифицированным. В одном варианте осуществления посттрансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце вариабельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи. В данной области известно, что посттрансляционная модификация путем пироглутамилирования на N-конце или делеции лизина на C-конце не влияет на активность антитела (Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, p. 24-39).

[0053] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению связывается с человеческим CLDN4 и человеческим CD137. С использованием известного метода оценки связывающей активности можно тестировать, насколько антитело связывается или не связывается с человеческим CLDN4 и человеческим CD137. Примеры метода оценки связывающей активности включают в себя такой метод, как ELISA и проточную цитометрию. ELISA или проточная цитометрия могут быть выполнены методом, обычно используемым специалистами в данной области, и может быть использован метод, например, описанный в примерах 3 или 5.

[0054] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению может быть легко получено специалистами в данной области с использованием человеческого CLDN4 и человеческого CD137, используемых в качестве антигенов, с использованием способа получения антител, известного в данной области, или может быть легко получено специалистами в данной области на основе информации о последовательностях и т.п. переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 антитела, описанных в настоящем документе, с использованием способа, известного в данной области.

[0055] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению можно получить, например, в соответствии со способом, описанным в разделе «Способ получения биспецифического антитела по изобретению», описанный ниже, хотя способ получения не ограничивается конкретно этим способом.

[0056] Полинуклеотид биспецифического антитела по изобретению

Настоящее изобретение также относится к полинуклеотиду, пригодному для получения биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по настоящему изобретению (также называемому «полинуклеотидом биспецифического антитела по настоящему изобретению»).

[0057] В одном варианте осуществления полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(d):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6;

или

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

[0058] В одном варианте осуществления полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, который выбран из следующих пунктов (a) или (b):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4; или

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

[0059] В одном варианте осуществления полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(r):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи

анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18;

(f) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(g) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22;

(h) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(i) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи

анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28;

(l) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(m) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30;

(n) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(o) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32;

(p) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32;

(q) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34; или

(r) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи

анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

[0060] В одном варианте осуществления полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(i):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных

положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

[0061] В одном варианте осуществления полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a) - (e):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

[0062] В одном варианте осуществления полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов (a) - (e):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(с) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0063] Полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению может быть легко получен специалистами в данной области на основе нуклеотидной последовательности с использованием способа, известного в данной области. Например, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению можно синтезировать, используя способ синтеза генов, известный в данной области. В качестве такого способа синтеза гена можно использовать различные способы, известные специалистам в данной области, такие как способ синтеза гена антитела, описанный в WO90/07861.

[0064] Экспрессионный вектор биспецифического антитела по изобретению

Настоящее изобретение также относится к экспрессионному вектору, содержащему полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению (также называемый «экспрессионным вектором биспецифического антитела по настоящему изобретению»). Данные полинуклеотиды могут содержаться соответственно в разных векторах, или ряд полинуклеотидов может содержаться в одном векторе.

[0065] В одном варианте осуществления экспрессионный вектор биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов

(a) – (aa) :

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10;

(f) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(g) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14;

(h) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(i) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22;

(l) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(m) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26;

(n) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(o) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28;

(p) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(q) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30;

(r) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(s) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32;

(t) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32;

(u) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34;

(v) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34;

(w) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(x) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(y) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(z) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную

последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(aa) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

[0066] В одном варианте осуществления экспрессионный вектор биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов (a) - (k):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность,

кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32; или

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

[0067] В одном варианте осуществления экспрессионный вектор биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов (a) - (c):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv; или

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0068] В одном варианте осуществления экспрессионный вектор биспецифического антитела по настоящему изобретению содержит полинуклеотид, выбранный из следующих пунктов (a) или (b):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0069] Экспрессионный вектор биспецифического антитела по настоящему изобретению особым образом не ограничивается при условии, что он может продуцировать полинуклеотид по настоящему изобретению в различных клетках-хозяевах, таких как эукариотическая клетка (например, клетка животного, клетка насекомого, растительная клетка или дрожжи), и/или прокариотическая клетка (такая как *E. coli*). Примеры такого экспрессионного вектора включают плазмидный вектор и вирусный вектор. В качестве плазмидного вектора, можно использовать, например, серии векторов pcDNA (Thermo Fisher Scientific), pALTER (R)-MAX (Promega Corporation), pHEK293 Ultra Expression Vector (Takara Bio Inc.), pEE 6.4 или pEE 12.4 (Lonza Biologics) или тому подобное. В качестве вирусного вектора можно использовать, например, вектор на основе лентивируса, аденовируса, ретровируса или аденоассоциированного вируса. Например, когда для введения полинуклеотида по настоящему изобретению в клетку используют лентивирус, то в качестве лентивируса можно использовать вектор pLVSIN-CMV/EF1 α (Takara Bio Inc.), вектор pLenti (Thermo Fisher Scientific) или тому подобное. В одном варианте осуществления вектор, используемый в качестве экспрессионного вектора биспецифического антитела по настоящему изобретению, представляет собой pcDNA 3.4-TOPO (R) (Thermo Fisher Scientific) или pcDNA 3.1 (Thermo Fisher Scientific).

[0070] Экспрессионный вектор биспецифического антитела по

настоящему изобретению может содержать промотор, операбельно связанный с полинуклеотидом биспецифического антитела по настоящему изобретению. Примеры промотора для экспрессии полинуклеотида биспецифического антитела по настоящему изобретению в клетке животного включают промоторы вирусного происхождения, такие как CMV, RSV и SV40, актиновый промотор, промотор EF (фактора элонгации) 1 α и промотор белка теплового шока. Примеры промотора для экспрессии полинуклеотида биспецифического антитела по настоящему изобретению в бактерии (например, относящейся к роду *Escherichia*) включают промотор trp, промотор lac, промотор λ PL и промотор tac. Примеры промотора для экспрессии полинуклеотида биспецифического антитела по настоящему изобретению в дрожжах включают промотор GAL1, промотор GAL10, промотор PH05, промотор PGK, промотор GAP и промотор ADH.

[0071] Когда в качестве клетки-хозяина используют клетку животного, клетку насекомого или дрожжи, то экспрессионный вектор для биспецифического антитела по настоящему изобретению может содержать старт-кодон и стоп-кодон. В этом случае может содержаться энхансерная последовательность, нетранслируемые 5'- и 3'-области гена, кодирующего антитело по настоящему изобретению, или его тяжелую или легкую цепь, секреторная сигнальная последовательность, соединение сплайсинга, сайт полиаденилирования, единица репликации (репликон) и т.п. Когда *E. coli* используется в качестве клетки-хозяина, то экспрессионный вектор по настоящему изобретению может содержать старт-кодон, стоп-кодон, терминаторную область и единицу репликации (репликон). Экспрессионный вектор по настоящему изобретению может содержать маркерный ген селекции по устойчивости к лекарственному препарату, обычно используемый в зависимости от цели (например, ген устойчивости к тетрациклину, ген устойчивости к ампициллину, ген устойчивости к канамицину, ген устойчивости к неомицину или ген дигидрофолатредуктазы).

[0072] Клетка-хозяин по изобретению

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, трансформированной полинуклеотидом биспецифического антитела по настоящему изобретению или экспрессионным вектором биспецифического антитела по настоящему изобретению (также называемым «полинуклеотидом или тому подобное по настоящему изобретению») также называемой «клеткой-хозяином по настоящему изобретению»). Клетка-хозяин по настоящему изобретению содержит в

клетке полинуклеотид или тому подобное по настоящему изобретению. Введенный полинуклеотид или тому подобное по настоящему изобретению может интегрироваться или не интегрироваться в геномную ДНК клетки-хозяина. Клетка, используемая в качестве клетки-хозяина, может представлять собой либо клетку, которую можно культивировать *in vitro*, либо клетку *in vivo*. Когда клетка-хозяин представляет собой клетку, которую можно культивировать *in vitro*, то клетку-хозяина по настоящему изобретению можно получить введением полинуклеотида или тому подобное по настоящему изобретению в клетку *in vitro*. Способ трансформации клетки-хозяина особым образом не ограничивается, и, например, может быть использован способ, обычно используемый специалистами в данной области, такой как способ с фосфатом кальция, способ на основе электропорации или способ на основе липофекции. Когда клетка-хозяин представляет собой клетку *in vivo*, то способ введения полинуклеотида или тому подобное по настоящему изобретению в клетку-хозяина особым образом не ограничивается, и можно использовать носитель для доставки нуклеиновой кислоты (катионный носитель или некатионный носитель (например, включая, не ограничиваясь ими, липосому и липидную наночастицу (LNP)) и т.п.).

[0073] Клетка, которую можно культивировать *in vitro*, особым образом не ограничивается, при условии, что она может быть трансформирована используемым экспрессионным вектором или таким способом, как электропорация, для экспрессии антитела или полипептида. Примеры клеток, которые можно культивировать *in vitro*, включают различные клетки, включая обычные клетки, обычно используемые в данной области техники, и искусственно созданные клетки (например, клетки животных (такие как клетка CHO-K1, клетка ExpiCHO-S (R) и клетка CHO-K1SV, клетка CHO-DG44, клетка HEK293, клетка Expi293F и клетка NS0), клетки насекомых (такие как Sf9), бактерии (например, относящиеся к роду *Escherichia*) и дрожжи (например, клетки относящиеся к роду *Saccharomyces* и роду *Pichia*)). В одном варианте осуществления клетка-хозяин по настоящему изобретению представляет собой клетку Expi293F, клетку CHO-K1 или клетку ExpiCHO-S.

[0074] Селекцию трансформированной клетки-хозяина *in vitro* можно осуществлять методом, обычно используемым специалистами в данной области. В качестве метода селекции можно использовать, например, метод селекции по устойчивости к лекарственному препарату с использованием маркерного гена селекции по

устойчивости к лекарственному препарату, такому как тетрациклин, ампициллин, неомицин или гигромицин, или метод выделения клеток, такой как метод лимитирующих разведений, метод сортировки отдельных клеток или можно использовать метод сбора колоний.

[0075] В одном варианте осуществления клетки-хозяина по настоящему изобретению, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов (a)–(aa):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1–125 SEQ ID NO: 2;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1–109 SEQ ID NO: 4;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1–123 SEQ ID NO: 6;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1–109 SEQ ID NO: 8;

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1–118 SEQ ID NO: 10;

(f) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1–109 SEQ ID NO: 12;

(g) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1–118 SEQ ID NO: 14;

(h) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи

анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(i) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22;

(l) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(m) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26;

(n) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(o) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28;

(p) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи

анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(q) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30;

(r) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(s) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32;

(t) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32;

(u) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34;

(v) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34;

(w) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(x) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-

244 SEQ ID NO: 28;

(y) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(z) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(aa) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

[0076] В одном варианте осуществления клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов (a) - (k):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(i) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32; или

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

[0077] В одном варианте осуществления клетки-хозяина по настоящему изобретению, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов (a) - (c):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv; или

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных

положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0078] В одном варианте осуществления клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих пунктов (a) или (b):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0079] В одном варианте осуществления клетки-хозяина по настоящему изобретению, клетка-хозяин содержит полинуклеотиды, описанные в следующих пунктах (a)-(j):

(a) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(b) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4

антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(с) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(d) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец

анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(e) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(f) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(g) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4

антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(h) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(i) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец

анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8; или

(j) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

[0080] В одном варианте осуществления клетки-хозяина по настоящему изобретению, клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, описанную в следующих пунктах (a) или (b):

(a) клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных

положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0081] В одном варианте осуществления клетки-хозяина по настоящему изобретению, клетка-хозяин представляет собой клетку-хозяина, содержащую полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0082] Способ получения биспецифического антитела по изобретению

Настоящее изобретение также относится к способу получения биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по настоящему изобретению (также называемому «способом получения по настоящему изобретению»). Способ получения по настоящему изобретению может включать в себя способ получения полинуклеотида биспецифического антитела по настоящему изобретению, способ получения экспрессионного вектора для биспецифического антитела по настоящему изобретению и способ получения клетки-хозяина по настоящему изобретению, как описано выше. Кроме того, способ получения по настоящему изобретению может включать стадию культивирования клетки-хозяина, описанной выше в разделе «Клетка-хозяин по изобретению», для экспрессии антитела в клетке или культуральном супернатанте, способ сбора, выделения и очистки антитела, и тому подобное. Однако способ получения по настоящему изобретению не ограничивается указанными способами при условии, что продуцируется биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению.

[0083] В одном варианте осуществления способ получения по настоящему изобретению включает стадию культивирования клетки-хозяина, описанной в следующих пунктах (a)-(j):

(a) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(b) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(c) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(d) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(e) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(f) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(g) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(h) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(i) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8; или

(j) клетки-хозяина, содержащей: полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, который содержит тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

[0084] В одном варианте осуществления способ получения по настоящему изобретению включает стадию культивирования клетки-хозяина, описанной в следующих пунктах (a) или (b):

(a) клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях

1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) клетки-хозяина, содержащей полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0085] Клетка-хозяин по настоящему изобретению может быть культивирована известным способом. Условия культивирования, такие как температура, pH среды и время культивирования, могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области. Когда клеткой-хозяином является, например, клетка животного, то можно использовать среду MEM (Science, 1959, Vol. 130, p. 432-437), содержащую примерно от 5% до 20% фетальной бычьей сыворотки, среду D-MEM (Virology, 1959, Vol. 8, p. 396), среду RPMI-1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, Vol. 199, p. 519), среду 199 (Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, p. 1-8) или тому подобное. pH среды составляет, например, примерно от 6 до 8, и культивирование обычно проводят при температуре примерно от 30°C до 40°C в течение примерно от 15 до 336 ч с аэрацией или перемешиванием, если необходимо. Когда клетка-хозяин представляет собой клетку насекомого, то в качестве среды можно использовать, например, среду Грейса (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1985, Vol. 82, p. 8404), содержащую фетальную бычью сыворотку или тому подобное. pH среды составляет, например, примерно от 5 до 8, и культивирование обычно проводят при температуре примерно от 20°C до 40°C в течение примерно 15-100 ч с аэрацией или перемешиванием, если необходимо. Когда клеткой-хозяином является, например, *E. coli* или дрожжи, то в качестве среды подходящим образом используется жидкая среда, содержащая источник питания. Питательная среда содержит, например, источник углерода, источник неорганического азота или источник органического азота, необходимые для роста трансформированной клетки-хозяина. Примеры источника углерода включают глюкозу, декстран, растворимый крахмал и сахарозу, примеры источника

неорганического азота или источника органического азота включают соли аммония, соли азотной кислоты, аминокислоты, кукурузный экстракт, пептон, казеин, мясной экстракт, соевый жмых и картофельный экстракт. При необходимости могут содержаться другие питательные вещества (например, неорганические соли (такие как хлорид кальция, дигидрофосфат натрия и хлорид магния) или витамины), антибиотик (такой как тетрациклин, неомицин, ампициллин или канамицин) или тому подобное. рН среды составляет, например, примерно от 5 до 8. Когда клеткой-хозяином является *E. coli*, то в качестве среды можно использовать, например, среду LB, среду M9 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Vol. 3, A2.2) или подобные. Культивирование обычно проводят при температуре от 14°C до 43°C в течение примерно 3-24 ч с аэрацией или перемешиванием, если необходимо. Когда клетка-хозяин представляет собой дрожжи, то в качестве среды можно использовать, например, минимальную среду Беркхолдера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1980, Vol. 77, p. 4505) или тому подобное. Культивирование обычно проводят при температуре от 20°C до 35°C в течение примерно 14-144 ч с аэрацией или перемешиванием, если необходимо. Посредством такого культивирования можно экспрессировать биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению.

[0086] Способ получения по настоящему изобретению может включать, в дополнение к стадии культивирования клетки-хозяина по настоящему изобретению для экспрессии биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела, стадию сбора, выделения или очистки анти-CLDN4/анти-CD137 антитела из клетки-хозяина. Примеры способа выделения или очистки включают способ, основанный на растворимости, такой как высаливание или способ осаждения растворителем, способ, основанный на разнице в молекулярной массе, такой как диализ, ультрафильтрация и гель-фильтрация, способ, основанный на заряде, такой как ионообменная хроматография или хроматография на гидроксипатите, способ, основанный на специфической аффинности, такой как аффинная хроматография, способ, основанный на разнице в гидрофобности, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография на обращенной фазе, и способ, основанный на разнице в изоэлектрической точке, такой как изоэлектрофокусирование. В одном варианте осуществления антитело, секретированное в культуральный супернатант, можно очистить с помощью различных хроматографий, таких как колоночная хроматография с использованием колонки с белком А или колонки с

белком G.

[0087] Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению включает биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и биспецифический анти-CLDN4/анти-CD137 scFv, полученные способом получения по настоящему изобретению.

[0088] Фармацевтическая композиция или подобное по изобретению

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции или тому подобному, содержащей биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению (также называемой «фармацевтической композицией по настоящему изобретению»). Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению включает фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению, и фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена обычно используемым способом с эксципиентом, обычно используемым в данной области, а именно фармацевтическим эксципиентом, фармацевтическим носителем и т.п. Примеры лекарственной формы такой фармацевтической композиции включают составы для парентерального введения, такие как инъекции и капли, и введение можно осуществлять подходящим способом, таким как внутривенное введение, подкожное введение, внутрибрюшинное введение или интратуморальное введение. В составе можно использовать эксципиент, носитель, добавку и т.п., подходящие для лекарственной формы, в фармацевтически приемлемом диапазоне.

[0089] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать посттрансляционно модифицированный продукт биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по настоящему изобретению. Например, настоящее изобретение может охватывать фармацевтическую композицию, содержащую антитело или тому подобное, содержащее либо делецию лизина на С-конце, либо пироглутамилирования на N-конце.

[0090] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, описанные в любом из следующих пунктов (a)-(j):

(a) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или

посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(b) биспецифическое анти-CLDN4 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(c) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с

карбоксихонцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(d) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксихонцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(e) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксихонцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(f) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из

аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(g) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(h) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(i) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; или

(j) биспецифические анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антител, содержащие тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер.

[0091] В одном варианте осуществления фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, описанные в следующих пунктах (a) или (b):

(a) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело и/или посттрансляционно модифицированный продукт антитела, содержащие полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

[0092] Количество биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137

антитела по настоящему изобретению и/или посттрансляционно модифицированного продукта антитела, добавленного в состав, варьируются в зависимости от степени выраженности симптомов заболевания и возраста пациента, лекарственной формы используемого состава, титра связывания антитела и т.п., и их можно использовать в количестве, например, примерно от 0,001 мг/кг до 100 мг/кг.

[0093] Фармацевтическое применение биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по изобретению

Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению и содержащую его фармацевтическую композицию можно использовать для лечения рака у субъекта. Кроме того, настоящее изобретение включает способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение охватывает биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению для применения в лечении рака. Кроме того, настоящее изобретение включает применение биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по настоящему изобретению в производстве фармацевтической композиции для лечения рака. Рак, подлежащий лечению с помощью настоящего изобретения, особым образом не ограничивается, и его примеры включают различные метастатические раковые заболевания брюшины, рак желудка, рак легких, рак крови, такой как острый лимфобластный лейкоз, острый миелогенный лейкоз, лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, В-клеточную лимфому, множественную миелому и Т-клеточную лимфому, солидные виды рака, такие как миелодиспластический синдром, аденокарцинома, плоскоклеточная карцинома, аденоплоскоклеточная карцинома, недифференцированная карцинома, крупноклеточная карцинома, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, мезотелиома, рак кожи, Т-клеточная лимфома кожи, рак молочной железы, рак предстательной железы, рак мочевого пузыря, рак влагалища, рак шейки матки, рак головы и шеи, рак матки, рак шейки матки, рак печени, рак желчного пузыря, рак желчных протоков, рак почки, рак поджелудочной железы, рак толстого кишечника, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак тонкого кишечника, рак желудка, рак пищевода, рак яичка, рак яичников и опухоль головного мозга, рак костной ткани, хрящевой ткани, жировой ткани, мышечной ткани, сосудистой ткани и кроветворных тканей, саркомы, такие как хондросаркома саркома Юинга, злокачественная гемангиоэндотелиома,

злокачественная шваннома, остеосаркома и саркома мягких тканей, и бластомы, такие как глиобластома, мультиформная глиобластома, гепатобластома, медуллобластома, нефробластома, нейробластома, панкреатобластома, плевропульмональная бластома и ретинобластома. В одном варианте рак, который лечат по настоящему изобретению, представляет собой колоректальный рак, немелкоклеточный рак легкого, мелкоклеточный рак легкого, рак мочевого пузыря, рак яичников, рак молочной железы или рак предстательной железы. В одном варианте осуществления рак, подлежащий лечению по настоящему изобретению, представляет собой рак, при котором CLDN4 экспрессируется на высоком уровне по сравнению с нормальной тканью. Рак, подлежащий лечению по настоящему изобретению, предпочтительно представляет собой рак, при котором CLDN4 экспрессируется на высоком уровне по сравнению с нормальной тканью, или рак, выбранный из группы, состоящей из колоректального рака, рака прямой кишки, рака легких, немелкоклеточного рака легких, мелкоклеточного рака легких, рака мочевого пузыря, рака яичников, рака молочной железы и рака предстательной железы.

[0094] Анти-CLDN4 антитело по изобретению

Настоящее изобретение также относится к анти-CLDN4 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, описанному в любом из следующих пунктов (a) - (c):

(a) анти-CLDN4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 2, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 2, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-114 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 4;

(b) анти-CLDN4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-

109 SEQ ID NO: 4; или

(с) анти-CLDN4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

[0095] В одном варианте осуществления анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-CLDN4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, или анти-CLDN4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8. В одном варианте осуществления анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2. В одном варианте осуществления анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент представляют собой анти-CLDN4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащие переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

[0096] В качестве константной области тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела можно выбрать любую из константных областей I γ ₁, I γ ₂, I γ ₃ и I γ ₄. I γ ₁ может быть выбран, например, из I γ ₁, I γ ₂, I γ ₃ и I γ ₄. В одном варианте осуществления константная область тяжелой цепи представляет собой константную область I γ ₁ и, например, константную область человеческого I γ ₁. Константная область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела по настоящему изобретению может содержать аминокислотную мутацию, такую как мутация LALA или

мутация P331G или P331S, для снижения ADCC и CDC. В качестве константной области легкой цепи анти-CLDN4 антитела по настоящему изобретению может быть выбрана любая из константных областей IgL и Igk. В одном варианте осуществления константная область легкой цепи представляет собой константную область Igk и, например, константную область Igk человека.

[0097] В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент анти-CLDN4 антитела по настоящему изобретению представляет собой scFv, Fab, Fab' или F(ab')₂.

[0098] В одном варианте осуществления анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению представляет собой анти-CLDN4 антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, или анти-CLDN4 антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В одном варианте осуществления анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению представляет собой анти-CLDN4 антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4. В одном варианте осуществления анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению представляет собой анти-CLDN4 антитело, содержащее тяжелую цепь, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

[0099] Настоящее изобретение также относится к анти-CLDN4 антителу по настоящему изобретению или его антигенсвязывающему фрагменту, с которыми связаны углевод, липид, металл (включая радиоизотоп), органическое соединение (включая токсин, флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона и хелатирующий агент) или тому подобное (также называемое «модификатором») (также называемые «комплексом по настоящему изобретению»). В рамках настоящего изобретения, термин

«модификатор» относится к непептидному веществу, связанному с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом напрямую или через линкер и т.п. Модификатор для использования в комплексе по настоящему изобретению особым образом не ограничивается, и его примеры включают полиэтиленгликоль, сахарные цепи, фосфолипиды, радиоактивные изотопы (например, цирконий-89 (^{89}Zr), иттрий-90 (^{90}Y), индий-111 (^{111}In), астат-211 (^{211}At) и актиний-225 (^{225}Ac)), органические соединения, токсины, флуоресцентные красители ближнего инфракрасного диапазона (например, IRDye (R)), хелатирующие агенты. Модификатор для использования в комплексе может быть непосредственно связан с анти-CLDN4 антителом по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом или может быть связан с ним через любой линкер. В одном варианте осуществления комплекс по настоящему изобретению представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) анти-CLDN4 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Химическое лекарственное средство и линкер для использования в ADC могут быть выбраны из лекарственных средств и линкеров, обычно используемых специалистами в данной области.

[0100] Настоящее изобретение также относится к клетке, экспрессирующей анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент на своей клеточной поверхности (например, Т-клетке с химерным антигенным рецептором; CAR-Т-клетке). Такие клетки могут быть получены специалистами в данной области с использованием полинуклеотида, кодирующего анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент. В качестве клетки, экспрессирующей анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, можно использовать различные иммунные клетки (такие как Т-клетка, НК-клетка и NKT-клетка).

[0101] В одном варианте осуществления анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, комплекс по настоящему изобретению и часть антитела или антигенсвязывающего фрагмента в клетке, экспрессирующей анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент на клеточной поверхности может быть посттрансляционно модифицированным. В одном варианте осуществления посттрансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце варибельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи.

[0102] Анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, комплекс по настоящему изобретению и клетка, экспрессирующая анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент на своей клеточной поверхности, могут быть получены специалистами в данной области на основе информации о последовательностях VH и VL анти-CLDN4 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, и информации о модификаторе для применения в комплексе по настоящему изобретению, раскрытом в настоящем документе, с использованием способ, известного в данной области. Анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить, например, в соответствии со способом, описанным в разделе «Способ получения биспецифического антитела по настоящему изобретению», хотя он и не ограничивается конкретно им.

[0103] Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции, содержащей анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, комплекс по настоящему изобретению и клетку, экспрессирующую анти-CLDN4 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент на ее клеточной поверхности (далее в данном разделе в совокупности называемое «анти-CLDN4 антителом и т.п. по настоящему изобретению»), и фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтическую композицию можно использовать для лечения рака. Настоящее изобретение дополнительно относится к способу лечения рака, включающему стадию введения терапевтически эффективного количества анти-CLDN4 антитела и т.п. по настоящему изобретению субъекту, анти-CLDN4 антитела и т.п. по настоящему изобретению для применения в лечении рака и для применения в производстве фармацевтической композиции для лечения рака анти-CLDN4 антитела и т.п. по настоящему изобретению. Фармацевтическое применение анти-CLDN4 антитела и т.п. по настоящему изобретению может осуществляться специалистами в данной области техники, как описано в разделе «Фармацевтическая композиция или тому подобное по изобретению», как описано выше. Примеры рака, подлежащего лечению фармацевтическим применением анти-CLDN4 антитела и т.п. по настоящему изобретению, включают рак, описанный выше в разделе «Фармацевтическая композиция или тому подобное по изобретению».

[0104] Анти-CD137 антитело по изобретению

Настоящее изобретение также относится к анти-CD137 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, содержащим переменную

область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, описанного в любом из следующих пунктов (a)-(d):

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-107 SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-34 SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-56 SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 89-98 SEQ ID NO: 12;

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 16, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 16, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 16;

(c) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 18, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 18, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 20, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 20, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 20; или

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных

положениях 31-35 SEQ ID NO: 22, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 22, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-110 SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 24, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 24, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 24.

[0105] В одном варианте осуществления анти-CD137 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, описанные в любом из следующих пунктов от (a) до (i):

(a) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(b) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(c) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(d) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(e) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(f) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(g) переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(h) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32; или

(i) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

[0106] В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент анти-CD137 антитела по настоящему изобретению представляет собой scFv. В одном варианте осуществления антигенсвязывающий фрагмент анти-CD137 антитела по настоящему изобретению представляет собой любой из следующих пунктов (a)-(e):

(a) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

[0107] Анти-CD137 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены специалистами в данной области со ссылкой на раздел «Биспецифическое анти-CD137/анти-CD137 антитело по изобретению» и т.п., как описано в настоящем документе. Анти-CD137 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать в составе биспецифического антитела с антителом к любому ТАА (антителом против ТАА), например, используемом в лечении рака. Другими словами, настоящее изобретение также относится к биспецифическому антителу, содержащему анти-CD137 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающему фрагменту, и анти-ТАА антитело или его антигенсвязывающий фрагмент (также называемое «биспецифическое анти-ТАА/анти-CD137- антитело по настоящему изобретению»). ТАА особым образом не ограничивается, если он экспрессируется на клеточной поверхности опухоли, и можно использовать, например, HER2, EGFR, EpCAM, CEA, BCMA, PSMA, CD19, CD20, CD22, CD33, CD37, CD38, CD123, CD276 (B7-H3), GPC2, GPC3, GPRC5D, WT-1, NY-ESO-1, CLDN4, CLDN6, CLDN18.2 и TSPAN8. В одном варианте биспецифическое анти-ТАА/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит scFv анти-CD137 антитела, и в другом варианте осуществления биспецифическое анти-ТАА/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит scFv анти-CD137 антитела, описанный в любом из следующих пунктов (a)-(e):

(a) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

[0108] В одном варианте осуществления биспецифическое анти-ТАА/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит анти-

CLDN4 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и в другом варианте осуществления биспецифическое анти-ТАА/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению содержит анти-CLDN4 антитело типа IgG.

[0109] Далее будут предоставлены конкретные примеры, на которые следует ссылаться для дальнейшего понимания настоящего изобретения, и следует отметить, что эти примеры являются просто иллюстративными и не ограничивают настоящее изобретение.

Примеры

[0110] Примеры 1: получение антитела, селективно связывающегося с антигеном, экспрессированным в перитонеальной метастатической опухолевой клетке

1-1. Получение перитонеальных метастатических опухолевых клеток, происходящих от пациента

Перитонеальные метастатические опухолевые клетки от пациента получали по методу, описанному в литературе Фумико Чиваки и Хироки Сасаки «Fukumaku Teni Gan (I Sui, Ranso Gan Nado) Saibo Kabu No Juritsu (на японском языке) (Establishment of Peritoneal Metastasis Cancer (such as Gastric, Pancreatic and Ovarian Cancer) Cell Lines» (Practical Guide for Cancer Research using Patient-Derived Experimental Model, edited by Hiroki Sasaki, Yodosha Company, Ltd., 2019, p. 28-37).

Асцитную жидкость, отобранную у пациента, центрифугировали при комнатной температуре и 430× g в течение 3 мин, супернатант удаляли и к осадку добавляли гемолизирующего буфера для индукции гемолиза. После центрифугирования супернатант удаляли, добавляли PBS(-) Дульбекко (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., 05913; далее называемый «PBS(-)») в количестве 50 мл для промывки клеток. После этого полученные клетки собирали центрифугированием при комнатной температуре и 430× g в течение 3 мин. Цельные клетки в собранной асцитной жидкости снова суспендировали в среде RPMI-1640 (содержащей L-глутамин) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 189-02025), содержащей 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, 10270-106) и ×1 смеси антибиотика-антимикотика (Thermo Fisher Scientific, 15240062) (где среда после добавления FBS и т.п. в примере 1 далее называется «средой RPMI-1640»). Суспензию разбавляли и клетки высевали в количестве от 5×10^6 до 1×10^7 клеток/10 мл в каждом случае на чашку диаметром 100 мм, покрытую коллагеном (далее именуемую «чашкой») (IWAKI, 4020-010) для культивирования при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂.

В асцитной жидкости имеются адгезивные клетки и плавающие клетки, где адгезивные клетки включают не только опухолевые, но и неопухолевые клетки (такие как фибробласты и мезотелиальные клетки брюшины). Неопухолевые клетки обладают способностью отделяться за более короткое время, чем опухолевые клетки, и, следовательно, эти клетки удаляли путем отделения их от цельных клеток в асцитной жидкости. После удаления неопухолевых клеток опухолевые клетки культивировали примерно до 80% слияния на площади чашки, и затем повторяли процесс пассирования 1/2 цельных клеток на новую чашку, и клетки, которые пассировали 5 раз или более принимали за адгезивные опухолевые клетки. Для плавающих клеток 5 мл культурального супернатанта и 5 мл среды RPMI-1640 высевали на новую чашку размером 100 мм из культуральной чашки, используемой для пассирования клеток, и клетки, пассированные 5 или более раз, принимали за плавающие опухолевые клетки. Когда перитонеальные метастатические опухолевые клетки, полученные от одного пациента, росли как с адгезивными опухолевыми клетками, так и с плавающими опухолевыми клетками, то их принимали за смешанные опухолевые клетки.

В рамках настоящего изобретения, адгезивные опухолевые клетки, плавающие опухолевые клетки или смешанные опухолевые клетки, выделенные вышеуказанным способом, в общем, относятся к «перитонеальным метастатическим опухолевым клеткам». Полученные шесть клеток (NSC-9C, NSC-15CF, NSC-16C, NSC-20C, NSC-22C и NSC-32C (далее также называемые «шестью типами перитонеальных метастатических опухолевых клеток»)) использовали в последующем исследовании.

[0111] 1-2: получение гибридомы, продуцирующей антитело против антигена рака желудка

Перитонеальными метастатическими опухолевыми клетками иммунизировали мышей VelocImmune, полученных с использованием технологии разработки человеческих моноклональных антител (технология антител VelocImmune®; Regeneron (патент США № 6596541)) для получения антител против опухолевого антигена, экспрессированного на анти-перитонеальных метастатических клетках.

Из перитонеальных метастатических опухолевых клеток, полученных в примере 1-1, смешивали три типа клеток NSC-9C, NSC-15CF и NSC-16C или три типа клеток NSC-20C, NSC-22C и NSC-32C, и полученные клетки суспендировали в адьюванте Титермакс (R) золотой

адъювант (Merck, T2684) или PBS(-) для приготовления суспензии перитонеальных метастатических опухолевых клеток. Мышей VelocImmune иммунизировали введением этой суспензии несколько раз. Лимфоциты собирали из лимфатических узлов иммунизированных мышей и подвергали клеточному слиянию с клетками мышшиной миеломы SP2/0 (ATCC, CRL-1581) для получения гибридом обычным способом. Отдельные колонии гибридом выделяли с помощью автоматического устройства для сбора гибридомных клеток, продуцирующих моноклональные антитела (далее называемые «клоном»). Выделенный клон культивировали при 37°C в инкубаторе с 8% CO₂, и примерно через 14 суток собирали супернатант в 96-луночный планшет для проведения следующего эксперимента.

[0112] 1-3: селекция антитела, селективно связывающегося с перитонеальной метастатической опухолевой клеткой

(1) Тестирование связывания с перитонеальной метастатической опухолевой клеткой и клеткой, экспрессирующей EpCAM

Клеточный супернатант клона, полученный в примере 1-2, содержит антитело (далее называемое «антителом, содержащимся в супернатанте клона»).

Сначала с использованием проточной цитометрии оценивали связывание антитела, содержащегося в супернатанте клона, с шестью типами перитонеальных метастатических опухолевых клеток, полученных в примере 1-1, для селекции клона, продуцирующего антитело, сильно связывающееся с перитонеальными метастатическими опухолевыми клетками. Козий антимишинный Ig BV421 (Becton, Dickinson and Company, 563846) использовали для проточной цитометрии.

Кроме того, оценивали связывание антитела, содержащегося в супернатанте клона, с клетками CHO-K1, экспрессирующими человеческий EpCAM-Мус-DDK, для исключения клонов, обеспечивающих связывание антитела с EpCAM, который является опухолевым антигеном. Клетки CHO-K1, экспрессирующие человеческий EpCAM-Мус-DDK, получали трансфекцией клеток CHO-K1 (ATCC, CCL-61) EpCAM (Мус-DDK-меченной) -молекулой адгезии эпителиальных клеток человека (EpCAM) (ORIGENE, RC201989). Связывание антитела, содержащегося в супернатанте клона, с клетками оценивали методом проточной цитометрии. Козий антимишинный Ig BV421 использовали для проточной цитометрии. Клоны, связывающиеся с клетками, экспрессирующими EpCAM, исключали из отбора клонов, тем самым обеспечивая супернатант, который не проявлял связывающей

активности с клеткой. В качестве положительного контроля использовали моноклональное антитело CD326 (EрСАМ) (1В7) (eBioscience, 14-9326).

Кроме того, клоны, связывающиеся с культивированными перитонеальными мезотелиальными клетками человека, исключали из отбора клонов, для получения селективно связывающихся с перитонеальными метастатическими опухолевыми клетками. В качестве культивированных перитонеальных мезотелиальных клеток человека использовали мезотелиальные клетки человека (Zenbio, MES-F, партия MESM050311A) (далее также называемые «культивированными перитонеальными мезотелиальными клетками человека») и связывание между культивированными перитонеальными мезотелиальными клетками в среде для роста мезотелиальных клеток (Zenbio, MSO-1) и их клоном оценивали с помощью проточной цитометрии. Козий антимишиный Ig BV421 использовали для проточной цитометрии. Были отобраны только клоны, которые не связывались с культивированными перитонеальными мезотелиальными клетками человека.

Посредством вышеуказанного эксперимента получали клон 3D11 в качестве клона, обеспечивающего связывание антитела с 5 или более из 6 перитонеальных метастатических опухолевых клеток, но не с человеческим EрСАМ и культивированными перитонеальными мезотелиальными клетками.

[0113] (2) Выделение антитела из супернатанта гибридомы

Клон 3D11 культивировали в гибридной среде CD (Thermo Fisher Scientific, 11279023). Из полученных таким образом культуральных супернатантов антитело 3D11 (далее называемое «3D11») очищали с использованием MabSelect SuRe (GE Healthcare, 17-5438-02). Антитело очищали обычным способом.

[0114] 1-4: идентификация молекулы антигена, распознаваемой 3D11

(1) Идентификация молекулы-кандидата антигена путем анализа ЖХ-МС/МС

Идентифицировали молекулу-кандидат антигена для 3D11. В качестве контрольного антитела в данном эксперименте использовали 1D10 и 10B5. Эти антитела показали иной паттерн связывания с перитонеальными метастатическими опухолевыми клетками, чем 3D11, в процессе получения 3D11.

Был приготовлен клеточный гомогенат NSC-15CF. К клеточному гомогенату добавляли 3D11 и одно из двух контрольных антител (1D10, 10B5), и затем добавляли магнитные частицы Dynabeads Protein G

(Life Technologies, 10003D) с последующим перемешиванием и промыванием. Белок, связанный с магнитными частицами Dynabeads Protein G, отщепляли с использованием трипсина/LysC (Promega Corporation, V5072) с получением смеси пептидов. Раствор, содержащий смесь пептидов, подвергали анализу ЖХ-МС/МС с использованием UltiMate 3000 RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) и Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific). Полученные таким образом данные ЖХ-МС/МС подвергали сравнительному количественному анализу и идентификации пептидов/белков с помощью программного обеспечения Progenic QI for Proteomics (Waters) и Mascot (Matrix Science) для идентификации связывающихся белков. Связывающиеся с 3D11 белки и контрольные антитела сравнивали, и CLDN4 был идентифицирован в качестве молекулы-кандидата антигена для 3D11.

[0115] (2) Определение антигена 3D11

Эксперимент по связыванию с клетками CHO-K1, экспрессирующими CLDN4-Мус-DDK человека, проводили для определения того, насколько CLDN4, идентифицированный таким образом в (1), является антигеном для 3D11. Клетки CHO-K1, экспрессирующие CLDN4-Мус-DDK человека, получали трансфекцией клеток CHO-K1 CLDN4 (Мус-DDK-меченный) - человеческим клаудином 4 (CLDN4) (ORIGENE, RC200490). В результате было подтверждено, что 3D11 связывается с клетками CHO-K1 человека, экспрессирующими CLDN4-Мус-DDK, и, таким образом, распознает CLDN4 в качестве антигена.

[0116] **Примеры 2: определение последовательности 3D11 и продукция человеческого антитела**

[0116] Ген, кодирующий тяжелую цепь и легкую цепь 3D11, клонировали обычным методом для определения нуклеотидной последовательности и аминокислотной последовательности 3D11. Аминокислотная последовательность варибельной области тяжелой цепи 3D11 показана в SEQ ID NO: 2, и аминокислотная последовательность варибельной области легкой цепи показана в SEQ ID NO: 4. Антитело, продуцированное мышами VelocImmune, представляет собой антитело, в котором эндогенные варибельные области тяжелой цепи и легкой цепи иммуноглобулина замещены соответствующими варибельными областями человека. Другими словами, антитело, полученное с использованием метода VelocImmune, представляет собой антитело, имеющее варибельную область человеческого антитела и константную область мышиного антитела (также называемое «химерным антителом»).

[0117] Ссылочный пример: биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD3

антитело для применения в лечении перитонеальных метастазов рака

Различные типы лекарственных препаратов, такие как антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) и терапия Т-клетками с химерным антигенным рецептором (CAR-T), известны как терапевтические средства для ТАА, избирательно экспрессирующихся на опухолевых клетках. Среди них биспецифическое антитело, рекрутирующее Т-клетки (антитело, рекрутирующее Т-клетки), известно как инновационный способ, с помощью которого можно получить селективную цитотоксическую активность в отношении опухолевых клеток при низкой концентрации антитела. Следовательно, было исследовано биспецифическое антитело, рекрутирующее Т-клетки, с использованием 3D11.

[0118] (1) Получение гуманизированного анти-CLDN4 антитела

Биспецифическое антитело анти-CLDN4/анти-CD3 scFv человека получали следующим способом.

Часть человеческого анти-CLDN4 антитела получали связыванием константной области тяжелой цепи IgG1 человека с переменной областью тяжелой цепи 3D11 и константной областью легкой цепи человека с переменной областью легкой цепи обычным способом. Кроме того, мутация LALA (L234 и L235A), при которой каждая из аминокислот в аминокислотных положениях 238 и 239 (система нумерации ЕС: 234 и 235) тяжелой цепи обеспечивает замещение лейцина (L) на аланин (A), мутация типа «выступы во впадине», в результате которой аминокислоты в аминокислотных положениях 370, 372 и 411 (система нумерации ЕС: 366, 368 и 407) соответственно замещаются с треонина (T) на серин (S), L на A и тирозина (Y) на валин (V), и мутация, при которой аминокислота в аминокислотном положении 301 (система нумерации ЕС: 297) замещается с аспарагина (N) на A. Полученное таким образом гуманизированное анти-CLDN4 антитело обозначается как 3D11.1. Полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность 3D11.1, синтезировали обычным методом и встраивали в вектор pcDNA3.4 TOPO (Thermo Fisher Scientific).

[0119] (2) Получение анти-CD3 scFv

Часть анти-CD3 scFv получали на основе последовательностей переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи мышиного анти-CD3 антитела, описанных в японском патенте № 5686953. Гуманизацию анти-CD3 scFv проводили согласно способу, описанному в литературе (Front Biosci., 2008, Vol.13, стр.1619-1633). В этом способе была введена обратная мутация. Информацию о

трехмерной структуре (код PDB: 5FCS) анализировали с использованием интегрированной системы вычислительной химии MOE, предоставленной MOLSIS Inc., для определения положений для введения обратной мутации в каркасную область. Аминокислотная последовательность гуманизированного анти-CD3 scFv показана в SEQ ID NO: 41. Полинуклеотид, кодирующий аминокислотную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 41, синтезировали обычным способом и вставляли в вектор pcDNA3.1 (+) (Thermo Fisher Scientific, V79020).

[0120] (3) Получение биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv

Вектор, кодирующий 3D11.1 и анти-CD3 scFv, использовали для получения биспецифического антитела, состоящего из Fab-области анти-CLDN4 антитела, и области scFv и Fc-области анти-CD3 антитела, согласно способу, описанному в примере 7 PCT/JP2021/41839. Полученное таким образом биспецифическое антитело получило название «биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv».

[0121] (4) Оценка лечебного эффекта биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv

Активность перенаправленной Т-клеточной цитотоксичности (RTCC) *in vitro* биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv оценивали в соответствии со способом, описанным в примере 9 PCT/JP2021/41839. Было подтверждено, что биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv обладает RTCC-активностью. Кроме того, противоопухолевую активность *in vivo* биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv оценивали в соответствии со способом, описанным в примере 11 PCT/JP2021/41839. Биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv проявляло противоопухолевый эффект на мышинной модели *in vivo* с перитонеальными метастазами рака желудка. На основе этих данных было высказано предположение, что биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv эффективно для лечения рака.

Кроме того, для исследования безопасности биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv, биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv вводили яванским макакам внутривенно в однократной дозе. В результате имели случаи гибели и агонального состояния у обезьян, которым вводили биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv. Уровни IL-6 в крови заметно повышались у павших обезьян через 1 ч и 6 ч после введения,

а также у обезьян, находившихся в агональном состоянии через 1 ч, 6 ч и 24 ч после введения. С учетом этих результатов, несмотря на то, что биспецифическое антитело анти-CLDN4(3D11)/анти-CD3 scFv оказывает лечебное действие *in vitro* и *in vivo*, возникла обеспокоенность по поводу серьезной нежелательной реакции, предположительно в результате повышения уровня цитокинов. Таким образом, был сделан вывод, что биспецифическое антитело анти-CLDN4(3D11)/анти-CD3 scFv не рассматривается в качестве антитела для лечения рака человека.

[0122] **Примеры 3: получение биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD3 scFv**

Биспецифическое антитело с анти-CD137 scFv (далее называемое «биспецифическим антителом анти-CLDN4(3D11)/анти-CD137 scFv») было получено с использованием 3D11 для исследования.

[0123] 3-1. Получение анти-CD137 антитела

(1) Получение слитого белка CD137-Fc

Полинуклеотиды, кодирующие внеклеточную область CD137 человека, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-186 SEQ ID NO: 42, или внеклеточную область CD137 обезьяны, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-186 SEQ ID NO: 43 соответственно вставляли в векторы pFUSE-hIgG1-Fc1 (InvivoGen, pfuse-hg1fc1) с получением экспрессионных векторов, кодирующих слитые белки внеклеточных областей CD137 и человеческой Fc (далее соответственно называемые «слитым белком CD137 человека-Fc человека» и «слитым белком CD137 обезьяны-Fc человека»). Каждый из полученных таким образом векторов вводили в клетки Expi293F (Thermo Fisher Scientific, A14527) или клетки ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific, A29133) с использованием набора для экспрессии Expi293 (Thermo Fisher Scientific, A14635) или набора для экспрессии ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific, A29133) для последующего культивирования. Белки, секретированные в культуральные супернатанты, очищали с помощью MabSelect SuRe или HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare, 11-0034-94) с получением слитого белка CD137 человека-Fc человека и слитого белка CD137 обезьяны-Fc человека.

[0124] (2) Получение слитого белка CD137 обезьяны-His-метка-3xFLAG-метка

Полинуклеотиды, кодирующие внеклеточную область CD137 обезьяны, состоящую из аминокислотной последовательности в

аминокислотных положениях 1-183 SEQ ID NO: 43, His-метки SEQ ID NO: 44 и 3×FLAG-метки SEQ ID NO: 45 вставляли последовательно в вектор pсDNA3.4 ТОРО для получения вектора. Полученный таким образом вектор вводили в клетки ExpiCHO-S с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine CHO (Thermo Fisher Scientific, A29129) для культивирования. Белок, секретированный в культуральный супернатант, очищали с помощью HisTrap excel (GE Healthcare Bioscience, 17-3712-06). Полученный таким образом слитый белок относится к «слитому белку CD137 обезьяны-His-метка-3×FLAG-метка».

[0125] (3) Получение и скрининг гибридного клона, продуцирующего анти-CD137 антитело

Мышей VelocImmune или мышей AlivaMab (Ablexis, патент США № 9346873) иммунизировали введением слитого белка CD137 человека-Fc человека или белка CD137 человека-His-метка (R&D Systems, 9220-4B) и иммуноадъювантов несколько раз. Лимфоциты собирали из лимфатических узлов иммунизированных мышей обычным методом и подвергали слиянию клеток с мышинными миеломными клетками SP2/0 для получения гибридом. Одиночные колонии гибридом выделяли с помощью автоматического устройства для сбора гибридомных клеток, продуцирующих моноклональные антитела (далее называемые «клоном»). Каждый клон культивировали в течение нескольких суток для получения культурального супернатанта. Связывание антител с CD137, содержащихся в культуральном супернатанте, анализировали следующим методом.

Связывание с CD137 оценивали с использованием ELISA. При анализе использовали планшет, покрытый любым из белка CD137 человека-His-метка, слитого белка CD137 человека-Fc человека, слитого белка CD137 обезьяны-Fc человека и белка Fc человека, и козьего антимышиного IgG. В качестве вторичного антитела использовали Human ads-HRP (SouthernBiotech, 1030-05). С помощью этого метода был получен ряд клонов, связывающихся как с CD137 человека, так и с CD137 обезьяны.

[0126] (4) Получение анти-CD137 антитела и тестирование агонистической активности

Клоны, полученные в примере (3), культивировали в среде Hybridoma-SFM (Thermo Fisher Scientific, 12045-076) и из полученного таким образом культурального супернатанта выделяли анти-CD137 антитело с помощью MabSelect SuRe. Очищенные анти-CD137 антитела тестировали на связывание с CD137 и агонистическую

активность для CD137.

Связывание анти-CD137 антител с CD137 тестировали с использованием ELISA, описанного в примере (3). Оценку агонистической активности для CD137 анти-CD137 антител проводили с помощью набора для постановки биопробы Bioassay 4-1BB (Promega Corporation, JA2351) следующим образом. Клетки FcγRIIb CHO-K1 (Promega Corporation, JA2251) высевали в 384-луночный планшет (Greiner Bio-One, 781080) для культивирования при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. Культуральный супернатант удаляли, к нему добавляли очищенные антитела из каждого клона, описанные выше, и эффекторные клетки 4-1BB (Promega Corporation, JA2351), и полученную смесь выдерживали при 37°C и 5% CO₂ в течение 6 ч. К полученной смеси добавляли реагент Bio-Glo (Promega Corporation, JA2351) для измерения хемилюминесценции индукцией экспрессии люциферазы в ответ на агонистическую активность CD137. Аналогичный эксперимент, который описан выше, проводили в условиях отсутствия клеток FcγRIIb CHO-K1 для оценки агонистической активности для CD137 в отсутствие клеток FcγRIIb CHO-K1.

Среди оцененных таким образом анти-CD137 антител, антитело 3-34, полученное от мышей VelocImmune, и антитела A2-32, A2-48 и A2-73, полученные от мышей AlivaMab, обладали высокой связывающей активностью с CD137 человека и обезьяны и проявляли агонистическую активность для CD137, зависящую от наличия клеток FcγRIIb CHO-K1.

[0127] (5) Идентификация последовательности гена анти-CD137 антитела

Из каждого из клонов, обеспечивающих анти-CD137 антитела (3-34, A2-32, A2-48 и A2-73), обычным методом получали клеточный лизат, синтезировали кДНК и определяли нуклеотидную последовательность антитела. SEQ ID NO идентифицированной таким образом нуклеотидной последовательности показана в таблице 1.

Таблица 1

	Нуклеотидная последовательность вариабельной области тяжелой цепи	Нуклеотидная последовательность вариабельной области легкой цепи
3-34	SEQ ID NO: 9	SEQ ID NO: 11
A2-32	SEQ ID NO: 13	SEQ ID NO: 15
A2-48	SEQ ID NO: 17	SEQ ID NO: 19

A2-73	SEQ ID NO: 21	SEQ ID NO: 23
-------	---------------	---------------

[0128] 3-2. Получение биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD137 scFv (3-34)

Биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD137 scFv (3-34) (далее также называемое «3D11_3-34-j6_S») было разработано на основе последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи 3D11 и 3-34. В полученном таким образом антителе 3D11_3-34-j6_S, линкер GS связан с карбоксиконцом тяжелой цепи (также называемым «С-концом») анти-CLDN4 антитела (3D11) человеческого типа IgG1к, и аминоконец анти-CD137 scFv (3-34) (SEQ ID NO: 26), содержащий вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-CD137 антитела, связан с С-концом линкера GS. Кроме того, в константную область человеческого IgG1 3D11 были введены аминокислотные мутации L234A, L235A и P331S. Получали полинуклеотиды, кодирующие сконструированное антитело, вставляли в векторы pcDNA3.4 TOPO обычным способом. Экспрессионные векторы генетически вводили в клетки ExpiCHO-S, и 3D11_3-34-j6_S выделяли из культурального супернатанта. Было подтверждено, что полученное таким образом антитело 3D11_3-34-j6_S обладает анти-CD137-связывающей активностью и агонистической активностью для CD137 *in vitro*, что дает основание предположить, что можно ожидать, что оно будет эффективно в качестве противоопухолевого лекарственного средства.

[0129] **Примеры 4: получение биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv**

[4-1]. Получение гуманизированного анти-CLDN4 антитела (hKM3900)

Сообщалось, что KM3900, которое представляет собой анти-CLDN4 антитело, избирательно связывается с CLDN4 по сравнению с другими молекулами семейства клаудинов, такими как CLDN6 (PTL 1). Таким образом, на основе этого сообщения было получено гуманизированное антитело KM3900. В частности, на основе гуманизированной аминокислотной последовательности вариабельной области KM3900 было создано гуманизированное антитело из последовательностей константной области человеческого Igγ1 и константной области человеческого Igκ. В константную область Igγ1 человека были введены аминокислотные мутации L234A, L235A и P331G или аминокислотные мутации L234A, L235A и P331S. Гуманизированное анти-CLDN4 антитело (hKM3900) получали обычным способом для использования в следующем исследовании. Антитело, содержащее

аминокислотные мутации L234A, L235A и P331G, обозначается как «hKM3900», и антитело, имеющее аминокислотные мутации L234A, L235A и P331S, обозначается как «hKM3900_S». Аминокислотная последовательность вариабельной области тяжелой цепи hKM3900 показана в SEQ ID NO: 6, и аминокислотная последовательность вариабельной области легкой цепи показана в SEQ ID NO: 8.

[0130] 4-2. Получение биспецифического антитела анти-CLDN4 /анти-CD137 scFv

Анти-CD137 scFv конструировали на основе анти-CD137 антител, полученных в примере 3 (3-34, A2-32, A2-48 и A2-73), для получения биспецифических антител hKM3900 и анти-CD137 scFv (таблица 2). Полученное таким образом антитело далее называется «анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv».

[0131] (1) Получение вектора, кодирующего биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv

Биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv было создано на основе последовательности hKM3900 и последовательностей вариабельной области тяжелой цепи и вариабельной области легкой цепи анти-CD137 антитела. В биспецифическом антителе анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv линкер GS связан с С-концом тяжелой цепи или легкой цепи анти-CLDN4 (hKM3900) типа IgG1, и аминоконец анти-CD137 scFv, содержащего вариабельную область тяжелой цепи и вариабельную область легкой цепи анти-CD137 антитела, связан с С-концом линкера GS. Кроме того, в константную область человеческого IgG1 hKM3900 были введены аминокислотные мутации L234A, L235A и P331G или P331S. Информация о сконструированных антителах представлена в таблице 2. Получали каждый из полинуклеотидов, кодирующих сконструированные антитела, и вставляли в вектор pсDNA3.4 ТОРО обычным способом. Полученный таким образом вектор далее называется «экспрессирующим вектором биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv».

[0132]

Таблица 2

Биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv

Название антитела	Анти-CLDN4 антитело	Анти-CD137 антитело	Анти-CD137 scFv	scFv-связанное положение	Мутация в Fc
hKM3900_3-34-j6	hKM3900	3-34	SEQ ID	Тяжелая	P331G

			NO: 26 3-34-j6	цепь С- конец (*)	
hKM3900_3-34- j6_S		3-34	SEQ ID NO: 26 3-34-j6	Тяжелая цепь С- конец	P331S
hKM3900_L-3-34- j6		3-34	SEQ ID NO: 26 3-34-j6	Легкая цепь С- конец	P331G
hKM3900_tA2-32		A2-32	SEQ ID NO: 28 tA2-32	Тяжелая цепь С- конец	P331G
hKM3900_tA2-32LH		A2-32	SEQ ID NO: 30 tA2-32LH	Тяжелая цепь С- конец	P331G
hKM3900_tA2-48		A2-48	SEQ ID NO: 32 tA2-48	Тяжелая цепь С- конец	P331G
hKM3900_tA2-73		A2-73	SEQ ID NO: 34 tA2-73	Тяжелая цепь С- конец	P331G
hKM3900_tA2-32_S		A2-32	SEQ ID NO: 28 tA2-32	Тяжелая цепь С- конец	P331S
hKM3900_tA2- 32LH_S		A2-32	SEQ ID NO: 30 tA2-32LH	Тяжелая цепь С- конец	P331S
hKM3900_tA2-48_S		A2-48	SEQ ID NO: 32 tA2-48	Тяжелая цепь С- конец	P331S
hKM3900_tA2-73_S		A2-73	SEQ ID NO: 34 tA2-73	Тяжелая цепь С- конец	P331S

(*) С-конец в таблице означает карбоксиконец

[0133] (2) Получение биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv

Экспрессионные векторы биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv использовали для получения одиннадцати биспецифических антител анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv, приведенных в таблице 2. В частности, экспрессионные векторы биспецифических антител анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv вводили в клетки ExpiCHO-S с использованием набора для трансфекции ExpiFectamine CHO, для индукции секреции биспецифических антител анти-CLDN4/анти-CD137 scFv в культуральный супернатант. Из полученного таким образом культурального супернатанта биспецифические антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv очищали аффинной очисткой с использованием MabSelect SuRe. Кроме того, некоторые из биспецифических антител анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv были дополнительно очищены эксклюзионной хроматографией с использованием HiLoad 26/600 superdex 200 pg (GE Healthcare, 28-9893-36) или Superdex 200 Enhance 10/300 GL (GE Healthcare, 28-9909-44).

В дальнейшем по тексту биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD137 scFv (3-34) и биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv, полученные в примерах 3 и 4, в совокупности относятся в некоторых случаях к «биспецифическому антителу анти-CLDN4/анти-CD137 scFv».

[0134] Примеры 5: оценка связывающей активности и агонистической активности биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv

Биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv оценивали на связывающую активность с CLDN4 и CD137, и на агонистическую активность для CD137.

[0135] 5-1. Оценка связывающей активности биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv с использованием проточной цитометрии

Связывающую активность с CLDN4 биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv оценивали методом проточной цитометрии. Ген CLDN4, полученный из CLDN4 (Мус-DDK-меченный)-человеческого клаудина 4, встраивали в экспрессионный вектор млекопитающих pCMV6-AC-GFP (ORIGENE, PS100010) для получения экспрессионного вектора человеческого CLDN4. Экспрессионные векторы человеческого CLDN4 вводили в клетки CHO-K1 для получения CHO-K1, экспрессирующих человеческий CLDN4.

В качестве тестируемого антитела использовали hKM3900 и два биспецифических антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv

(hKM3900_tA2-32LN и hKM3900_3-34-j6). Для каждого тестируемого антитела готовили серийные разведения с использованием буфера для окрашивания (FBS) (BD Bioscience, 554656) от максимальной концентрации 100 мкг/мл до 5,08 нг/мл с обычным соотношением 3, и СНО-K1, экспрессирующие человеческий CLDN4, окрашивали разбавленным раствором каждого тестируемого антитела. В качестве вторичного антитела использовали аллофикоцианин (APC)-фрагмент F(ab')₂ козьего античеловеческого IgG AffiniPure, специфичный к фрагменту Fcγ (Jackson ImmunoResearch, 109-136-170). Интенсивность флуоресценции измеряли с использованием FACS Canto II (BD Bioscience). Результаты измерений анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism для расчета кажущейся константы диссоциации (KD) между человеческим CLDN4 и биспецифическим антителом анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv. Полученные таким образом значения кажущейся KD приведены в таблице 3.

Два биспецифических антитела анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv проявляли такую же связывающую активность с человеческим CLDN4, что и гуманизированное анти-CLDN4 антитело (hKM3900). Полагается, что и другие биспецифические антитела анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv будут проявлять эквивалентную им связывающую активность с CLDN4.

[0136]

Таблица 3

	hKM3900	hKM3900_tA2-32LN	hKM3900_3-34-j6
KD (нМ)	10,8	10,8	11,2

[0137] 5-2. Оценка связывающей активности с CD137 биспецифического антитела анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv с использованием ELISA

Связывающую активность с CD137 биспецифического антитела анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv определяли с использованием ELISA. ELISA проводили обычным методом. 20 нг/20 мкл/лунку белка CD137 человека-His-метка (R&D Systems, 9220-4B) иммобилизовали в 384-луночном планшете (Thermo Fisher Scientific, 464718). В качестве тестируемого антитела использовали 11 биспецифических антител анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv и антитело ctrl IgG_L-3-34-j6, представленных в таблице 2. Антитело ctrl IgG_L-3-34-j6 представляет собой антитело, в котором анти-CD137 scFv (3-34-j6) связан с карбоксиконцом легкой цепи контрольного

изотипического антитела. Тестируемые антитела серийно разводили TBS-T (Nippon Gene Co., Ltd., 310-07375), содержащим 5% блокирующего реагента (Nacalai Tesque, Inc., 03953-95), и добавляли в количестве 20 мкл/лунку. Антитело имеет конечную концентрацию, как показано фиг. 1-1-1-4. В качестве вторичного антитела использовали козий античеловеческий IgG Fc, Multi-Species SPads-HRP (SouthernBiotech, 2014-05). В качестве контрольного антитела использовали hKM3900. Ридер Infinite M200 PRO (TECAN) использовали для измерения оптической плотности при 450 нм и 570 нм. Результаты приведены на фиг. 1-1-1-4. Все биспецифические антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv связывались с белком CD137 человека-His-метка в зависимости от концентрации. На основе полученных данных было установлено, что связанное положение анти-CD137 scFv не влияет на связывающую активность для CD137 человека.

[0138] 5-3. Оценка связывающей активности с CD137 биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv методом поверхностного плазмонного резонанса

Связывающую активность с CD137 биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Для анализа SPR использовали Biacore T200 (GE Healthcare Japan). В качестве лиганда использовали полученный фиксацией двух биспецифических антител анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv (hKM3900-3-34-j6, hKM3900_tA2-32LN) с белком А сенсорного чипа серии S (GE Healthcare, 29-1275-56). В качестве аналита использовали серийные разведения слитого белка CD137 человека-His-метка или слитого белка CD137 обезьяны-His-метка-3×FLAG-метка, полученных в примере 3-1 (2) с использованием HBS-EP+, от максимальной концентрации 200 нМ до 0,0977 нМ с обычным соотношением 2. Аналиты добавляли в канал, имеющий связанный с ним лиганд, со скоростью 50 мкл/мин в течение 2 мин, затем к ним добавляли HBS-EP+ со скоростью 50 мкл/мин в течение 10 мин, и, таким образом, имело место связывание и диссоциация биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv с CD137 и от CD137. Результаты, полученные в данном эксперименте, использовали для расчета с помощью программного обеспечения для анализа данных (BIA Evaluation) константы скорости ассоциации (k_a), константы скорости диссоциации (k_d) и константы диссоциации (KD) между человеческим CD137 и биспецифическим антителом анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv. Значения k_a , k_d и KD приведены в таблице 4.

В результате было обнаружено, что биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv проявляло связывающую активность, эквивалентную антителам к CD137 человека и к CD137 обезьяны.

[0139]

Таблица 4

Аналит	Лиганд (только приведенное ниже антитело)	ka (1/Мс)	kd (1/с)	KD (M)
Белок CD137 человека-His-метка	hKM3900_3-34-j6	2.32E+05	1.35E-03	5.81E-09
	hKM3900_tA2-32LH	3.74E+05	2.19E-03	5.84E-09
Белок CD137 обезьяны-His-3×FLAG-метка	hKM3900_3-34-j6	1.79E+05	1.91E-03	1.07E-08
	hKM3900_tA2-32LH	2.88E+05	1.92E-03	6.68E-09

[0140] 5-4. Оценка агонистической активности для CD137 биспецифического антитела анти-CLDN4/анти-CD137 scFv при совместном существовании с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN4

Специфическую агонистическую активность для CD137 для опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4, биспецифического антитела анти-CLDN4/анти-CD137 scFv оценивали с использованием набора для постановки биопробы Bioassay 4-1BB.

Клетки NCI-H322 (ECACC, 95111734) суспендировали в среде RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, 11875-093), содержащей 10% FBS (Cytiva, SH30070.03), для приготовления суспензии. CLDN4 экспрессировали в NCI-H322. Суспензию NCI-H322 добавляли в 384-луночный планшет (Greiner Bio-One, 781080) с плотностью 1×10^4 клеток/лунку и полученные клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в течение ночи. На следующие сутки среду удаляли. Тестируемое антитело, разведенное средой RPMI-1640, содержащей 1% FBS, добавляли в количестве 12,5 мкл/каждую лунку. Антитело имеет конечную концентрацию, как показано на фиг. 2-1 - фиг. 2-3. В качестве тестируемого антитела использовали 3D11_3-34-j6_S и биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv, приведенное в таблице 2. В качестве контрольного антитела использовали hKM3900, контрольное антитело IgG_L-3-34-j6 и

урелумаб (BMS, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 6, описанные в публикации международной заявки WO2005/035584).

Эффекторные клетки 4-1ВВ, поставляемые в наборах для постановки биопробы Bioassy 4-1ВВ, суспендировали в 7 мл RPMI-1640, содержащей 1% FBS, на флакон, полученную суспензию вносили в количестве 12,5 мкл в каждую лунку, и полученную в результате суспензию добавляли в количестве 12,5 мкл в каждую лунку, и выдерживали при 37°C и 5% CO₂ в течение 6 ч. Реагент Bio-Glo добавляли в планшет из расчета 25 мкл/лунку и измеряли хемилюминесценцию с использованием EnVision 2103 (Perkin Elmer). Результаты приведены на фиг. 2-1-2-3. Биспецифическое антитело анти-CLDN4/анти-CD137 scFv проявляло высокую агонистическую активность для CD137 в отношении эффекторных клеток 4-1ВВ при совместном существовании с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN4.

Аналогичный эксперимент, который описан выше, проводили в условиях без NCI-H322 для оценки агонистической активности для CD137 в отсутствие опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4. В результате антитело не проявляло агонистической активности к CD137 в отсутствие опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4 (фиг. 2-4 - фиг. 2-6). На основе этого результата было показано, что биспецифическое антитело анти-CLDN4/анти-CD137 scFv проявляет агонистическую активность для CD137 только при совместном существовании с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN4.

С другой стороны, урелумаб проявлял агонистическую активность для CD137 при совместном существовании с опухолевыми клетками, экспрессирующими CLDN4, но его действие было слабым по сравнению с действием биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела. Кроме того, урелумаб проявлял агонистическую активность для CD137 даже в отсутствие опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4.

На основе полученных результатов можно ожидать, что биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело будет проявлять меньшую токсичность, чем урелумаб, и проявит специфическую и высокую агонистическую активность к CD137 в опухолевой ткани, в которой CLDN4 экспрессируется на высоком уровне.

[0141] **Пример 6: оценка in vitro эффекта биспецифического антитела анти-CLDN4/анти-CD137 scFv**

Проводили оценку стимулирующей функции для продукции интерферона-γ, и цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток биспецифического антитела анти-CLDN4/анти-CD137 scFv.

[0142] 6-1. Получение и криоконсервация экспандированных пан Т-клеток

(1) Получение экспандированной пан-Т-клетки

В примере 6 смесь, полученная при добавлении FBS (Cytiva, SH30084.03) в конечной концентрации 10% и смеси пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, 15070-063) в конечной концентрации 1% к RPMI-1640 (Sigma, R8758)) относится к «культурной среде». Каждое соединение, выбранное из незаменимых аминокислот MEM (Merck, M7145), пирувата натрия (Merck, S8636), GlutaMAX I (Thermo Fisher Scientific, 35050-061) и HEPES (Thermo Fisher Scientific, 15630-080), можно добавить в питательную среду в конечной концентрации 1%. Анти-CD3 антитело (BioLegend, 317325), разведенное до конечной концентрации от 1 до 3 мкг/мл, добавляли на чашку и анти-CD3 антитело иммобилизовали. Набор для выделения пан-Т-клеток человека (MilteNY Biotec, 130-096-535) использовали для выделения пан-Т-клеток (включая как клетки CD4Т, так и клетки CD8Т; в дальнейшем относится к «пан-Т-клеткам») из моноклеарных клеток периферической крови человека (LONZA, CC-2702) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. Выделенные пан-Т-клетки центрифугировали, супернатант удаляли и полученный материал суспендировали в культуральной среде. Цельные пан-Т-клетки, суспендированные в культуральной среде, высевали на чашку, на которой было иммобилизовано анти-CD3 антитело. Кроме того, добавляли человеческий IL-2 (PeproTech, 200-2) в конечной концентрации от 100 до 200 Е/мл и анти-CD28 (BioLegend, 302923) в конечной концентрации от 1 до 4 мкг/мл, и полученную смесь культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Через 3 суток полученные клетки собирали, собранные клетки суспендировали в культуральной среде и высевали на чашки. Также на чашки добавляли человеческий IL-2 в конечной концентрации от 100 до 200 Е/мл и полученную смесь культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Через 4 суток цельные клетки собирали для центрифугирования, супернатант удаляли, полученные клетки снова суспендировали в Cell Banker (Takara, CB011) или VamBanker (GC LYMPHOTEC Inc., CS-02-001), и полученные клетки разделяли на флаконы для последующей криоконсервации при температуре -80°C. Криоконсервированные таким образом клетки относятся здесь к «экспандированным пан-Т-клеткам».

[0143] 6-2. Получение клеток, экспрессирующих 60As6-Luc/GFP

Приготовление раствора лентивируса, содержащего Luc/GFP, проводили с использованием клеток L293T (Thermo Fisher Scientific,

K4975-00) с использованием обычного протокола. Для вставки вектора pCDH-CMV-GL3-EF1a-GFP-T2A-puro (любезно предоставлен доцентом Реу Такахаша из Университета Хиросимы, Высшая школа биомедицинских и медицинских наук, кафедра клеточной и молекулярной биологии (PLoS One, 2015, Vol. 10, e0123407)) в клетки L293T, использовали среду Opti-MEM с восстановленной сывороткой, добавку GlutaMAX (Thermo Fisher Scientific, 51985-034), смесь MISSION (R) для упаковки лентивируса (SIGMA, SHP001) и липофектамин LTX (Thermo Fisher Scientific, 15338100). Для сбора лентивируса, экспрессирующего GFP, культивированного в клетках L293T, использовали фильтр Millex (R)-HV с размером пор 45 мкм (Merck Millipore, SLHV033RS). Раствор вируса помещали в криофлаконы (Nalgene, 5000-0020) по 1 мл для криоконсервации при -80°C .

Линию опухолевых клеток, экспрессирующую CLDN4, клетки 60As6 (полученную от доктора Казуеси Янагихара из Института биоматериалов) инфицировали лентивирусом, экспрессирующим 60As6-Luc/GFP, с использованием обычного метода для получения клеток, экспрессирующих 60As6-Luc/GFP. Полибрен (SantaCruz, sc-134220) использовали для повышения эффективности инфицирования. В качестве среды использовали RPMI-1640, содержащую 10% FBS и 2 мкг/мл пуромицина (Thermo Fisher Scientific, A-11138-02). Полученные таким образом клетки здесь относятся к «клеткам 60As6-Luc/GFP». С помощью проточной цитометрии было подтверждено, что CLDN4 изначально обладает высокой экспрессией в клетках 60As6-Luc/GFP. Сконструированные таким образом клетки использовали в последующих экспериментах.

[0144] 6-3. Оценка стимулирующей функции для продукции интерферона- γ биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD137 scFv в системе сокультивирования опухолевых клеток и Т-клеток

Оценивали стимулирующую функцию в отношении продукции интерферона- γ под действием биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD137 scFv в системе сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. Анти-CD3 антитело в концентрации 0,1 мкг/100 мкл/лунку добавляли в плоскодонный 96-луночный планшет (IWAKI, 3860-096) для иммобилизации анти-CD3 антитела в планшете. Клетки 60As6-Luc/GFP высевали в планшет из расчета 5×10^4 клеток/50 мкл/лунку для культивирования при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2 . На следующий сутки экспандированные пан-Т-клетки высевали в планшет в количестве 2×10^5 клеток/30 мкл/лунку.

Тестируемые антитела и изотипический контроль серийно разводили культуральной средой от максимальной концентрации 50000 нг/мл с общим соотношением 5 и добавляли в количестве 20 мкл каждое. В качестве тестируемого антитела использовали урелумаб и биспецифическое антитело анти-CLDN4(3D11)/анти-CD137 scFv (3D11_3-34-j6_S), и в качестве изотипического контроля использовали IgG (лизоцим)-scFv (CD137) (полученный авторами изобретения). Через 6 суток количество продуцированного интерферона- γ в супернатанте измеряли с помощью набора для определения интерферона- γ AlphaLISA (Perkin Elmer, AL217C) в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем. На фиг. 3-1 приведена реакционная кривая количества продуцированного интерферона- γ в зависимости от концентрации антитела. Биспецифическое антитело анти-CLDN4(3D11)/анти-CD137 scFv проявляло стимулирующую активность в отношении продукции интерферона- γ в системе сокультивирования линии опухолевых клеток, экспрессирующих CLDN4, клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. Стимулирующая функция биспецифических антител анти-CLDN4(3D11)/анти-CD137 scFv в отношении продукции интерферона- γ , была значительно сильнее, чем у урелумаба.

[0145] 6-4. Оценка стимулирующей функции для продукции интерферона- γ биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv в системе сокультивирования опухолевых клеток и Т-клеток

Стимулирующую функцию в отношении продукции интерферона- γ биспецифического антитела анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv в системе сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток оценивали аналогичным методом, который описан в примере 6-3. Анти-CD3 антитело иммобилизовали в 96-луночном планшете в концентрации 0,03 мкг/100 мкл/лунку. Клетки 60As6-Luc/GFP высевали из расчета 2×10^4 клеток/50 мкл/лунку. Экспандированные пан-Т-клетки высевали из расчета 8×10^4 клеток/30 мкл/лунку. В качестве тестируемого антитела использовали серийно разведенный урелумаб от максимальной концентрации 5000 нг/мл с обычным соотношением 2 или биспецифическое антитело анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv (hKM3900_3-34-j6 или hKM3900_tA2-32LN). Каждое из тестируемых антител и контрольный изотип (антитело к лизоциму) добавляли в количестве 20 мкл каждое. Через 4 суток измеряли количество продуцированного интерферона- γ в супернатанте. На фиг. 3-2 приведена реакционная кривая количества

продуцированного интерферона- γ в зависимости от концентрации антитела. Биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900) /анти-CD137 scFv проявляло стимулирующую функцию в отношении продукции интерферона- γ в системе сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. Стимулирующая функция данных биспецифических антител, в отношении продукции интерферона- γ , была значительно сильнее, чем у урелумаба.

[0146] 6-5. Оценка стимулирующей функции для продукции интерферона- γ биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11) /анти-CD137 scFv в системе монокультуры Т-клеток

Оценивали стимулирующую функцию в отношении продукции интерферона- γ биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11) /анти-CD137 scFv в системе монокультуры экспандированных пан-Т-клеток. Анти-CD3 антитело добавляли в плоскодонный 96-луночный планшет в количестве 0,1 мкг/100 мкл/лунку для иммобилизации анти-CD3 антитела в планшете. Экспандированные пан-Т-клетки высевали в иммобилизованный планшет в количестве 2×10^5 клеток/80 мкл/лунку. В качестве тестируемого антитела использовали урелумаб и биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11) /анти-CD3 scFv (3D11_3-34-j6_S), и в качестве изотипического контроля использовали - IgG (лизоцим) -scFv (CD137) (полученный авторами изобретения). Тестируемые антитела и изотипический контроль серийно разводили культуральной средой от максимальной концентрации 50000 нг/мл с обычным соотношением 5 и добавляли в количестве 20 мкл каждое. Через 6 суток количество продуцированного интерферона- γ в супернатанте измеряли с помощью набора для определения интерферона- γ AlphaLISA аналогичным методом, который описан в примере 6-3. На фиг. 3-3 приведена реакционная кривая количества продуцированного интерферона- γ в зависимости от концентрации антитела. Биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11) /анти-CD137 scFv не проявляло стимулирующей функции в отношении продукции интерферона- γ в системе монокультуры Т-клеток, но урелумаб проявлял стимулирующую активность на продукцию интерферона- γ . Полученный результат означает, что биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11) /анти-CD137 scFv не проявляет активности, повышающей активность Т-клеток в среде, где отсутствует линия опухолевых клеток, экспрессирующая CLDN4.

[0147] 6-6. Оценка стимулирующей функции для продукции интерферона- γ биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900) /анти-CD137 scFv в системе монокультуры Т-клеток

Стимулирующую функцию биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv в отношении продукции интерферона- γ в системе монокультуры экспандированных пан-Т-клеток оценивали методом, аналогичным методу, использованному в примере 6-5. Анти-CD3 антитело иммобилизовали в 96-луночной планшете в концентрации 0,03 мкг/100 мкл/лунку. Экспандированные пан Т-клетки высевали из расчета 8×10^4 клеток/80 мкл/лунку. В качестве тестируемого антитела использовали урелумаб и биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv (hKM3900_3-34-j6 или hKM3900_tA2-32LN). Тестируемые антитела и изотипический контроль (антитело к лизоциму) серийно разводили от максимальной концентрации 5000 нг/мл с обычным соотношением 2 и добавляли в количестве 20 мкл каждое. На фиг. 3-4 приведена реакционная кривая продукции интерферона- γ в зависимости от концентрации антитела. Биспецифическое антитело анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv не проявляло стимулирующей функции на продукцию интерферона- γ в системе монокультуры Т-клеток, но урелумаб проявлял стимулирующую функцию в отношении продукции интерферона- γ .

Результаты, описанные в примерах 6-5 и 6-6, означают, что биспецифическое антитело анти-CLDN4/анти-CD137 scFv не проявляет активности, повышающей активность Т-клеток в среде, где отсутствуют опухолевые клетки, экспрессирующие CLDN4, и дают основание предположить о снижении системной иммуностимулирующей активности, о которой сообщалось в качестве побочной реакции, анти-CD137 антитела.

[0148] 6-7. Оценка цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD137 scFv в системе сокультивирования опухолевых клеток и Т-клеток

Противоопухолевую цитотоксическую активность (ингибирующую рост опухолевых клеток активность) биспецифического антитела анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD137 scFv оценивали в системе сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. Клетки 60As6-Luc/GFP высевали в плоскодонный 96-луночный планшет из расчета 1×10^4 клеток/50 мкл/каждую лунку для культивирования при 37°C в инкубаторе с 5% CO_2 . Через 2 ч экспандированные пан-Т-клетки высевали в полученный 96-луночный планшет из расчета 1×10^5 клеток/50 мкл/каждую лунку. В качестве тестируемого антитела использовали урелумаб и биспецифическое антитело анти-CLDN4 (3D11)/анти-CD137 scFv. Эти антитела серийно разводили

культуральной средой от максимальной концентрации 40000 нг/мл с обычным соотношением 10 и добавляли в количестве 50 мкл каждое. Кроме того, к ним добавляли 40 нг/мл анти-CD3 антитела в количестве 50 мкл каждое и начинали измерение площади флуоресценции (GFP) в каждой лунке с использованием IncuCyte (R) ZOOM (Sartorius) при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. Площадь флуоресценции, возрастающая с 0 ч после начала измерения, использовали в качестве показателя роста клеток. На фиг.4 показана цитотоксическая активность для опухолевых клеток (уровень роста опухолевых клеток) тестируемого антитела. На оси ординат на фиг. 4 указано относительное значение, полученное при допущении того, что при увеличении площади флуоресценции от 0 ч до 168 ч лунка, в которую не добавляли тестируемое антитело, соответствует 100%. Как показано на фиг. 4, биспецифическое антитело анти-CLDN4(3D11)/анти-CD137 scFv проявляло цитотоксическую активность в системе сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. Цитотоксическая активность данного биспецифического антитела была значительно выше, чем у урелумаба.

[0149] 6-8. Оценка цитотоксической активности в отношении опухолевых клеток биспецифического антитела анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv в системе сокультивирования опухолевых клеток и Т-клеток

Активность киллинга в отношении опухолевых клеток биспецифического антитела анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv оценивали в системе сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток. Анти-CD3 антитело добавляли в плоскодонный 96-луночный планшет (Perkin Elmer, 6005680) в концентрации 1 нг/100 мкл/каждую лунку для иммобилизации в планшете. Планшет дважды промывали PBS (-), в него высевали клетки 60As6-Luc/GFP в количестве 2×10⁴ клеток/50 мкл/лунку и полученные клетки культивировали при 37°C в инкубаторе с 5% CO₂. На следующие сутки экспандированные пан-Т-клетки высевали в 96-луночный планшет из расчета 4,0×10⁴ клеток/30 мкл/лунку. Кроме того, добавляли тестируемое антитело и изотипический контроль в концентрации от 5000 нг/мл до 0,844 нг/мл в количестве 20 мкл каждое. В качестве тестируемого антитела использовали урелумаб и биспецифическое антитело анти-CLDN4(hKM3900)/анти-CD137 scFv (hKM3900_3-34-j6 или hKM3900_tA2-32LN). Через 6 суток проводили измерение. В некоторые лунки добавляли 1% Тритон-X100 (Sigma-Aldrich, T-9284) в количестве 11 мкл в каждую лунку для киллинга клеток за 30 мин до

измерения. Набор для измерения люциферазы ONE-Glo (Promega Corporation, E6120) использовали в соответствии с протоколом, рекомендованным производителем, для измерения люциферазной активности клеток 60As6-Luc/GFP в каждой лунке с использованием ARVO X-3 (Perkin Elmer). Уровень гибели опухолевых клеток указан как относительное значение, при допущении того, что среднее значение хемилюминесценции люциферазы в лунке, куда не добавляли антитело, соответствует 0%, и среднее значение, полученное в лунке, куда был добавлен Тритон-X100, соответствует 100%. В качестве изотипического контроля использовали антитело против лизоцима (приготовленное авторами изобретения). На фиг. 5 приведена кривая гибели клеток 60As6-Luc/GFP. В системе сокультивирования клеток 60As6-Luc/GFP и экспандированных пан-Т-клеток добавление биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv заметно увеличивало уровень гибели клеток 60As6-Luc/GFP. С другой стороны, урелумаб, специфическое анти-CD137 антитело, не повышало уровень гибели клеток клеточной линии 60As6-Luc/GFP.

[0150] **Пример 7: оценка in vivo биспецифического антитела анти-CLDN4/анти-CD137 scFv**

7-1. Противоопухолевый эффект in vivo биспецифического антитела анти-CLDN4/анти-CD137 scFv

Клетки NCI-H322 суспендировали в PBS (-) (WAKO, 045-29795) и суспензию клеток $5,0 \times 10^6$ клеток/100 мкл подкожно инокулировали 7-недельным самкам мышей (NOG, In-Vivo Science Inc.). Через 6 суток после инокуляции в хвостовую вену вводили $3,4 \times 10^6$ клеток/200 мкл мононуклеарных клеток периферической крови человека (Lonza, CC-2702). Через 15 суток после трансплантации мононуклеарных клеток периферической крови человека мышей разделяли на группы для начала введения тестируемого антитела. Каждая группа состояла из 10 мышей, и мышей распределяли таким образом, чтобы объемы опухолей между группами были почти эквивалентны друг другу (сутки 0). В качестве тестируемого антитела использовали hKM3900_tA2-32LN. Тестируемое антитело и контрольный изотип (антитело против лизоцима) смешивали в PBS и вводили внутривенно. Введение осуществляли на сутки 0, 4 и 8, и на время введения измеряли диаметр опухолей и массу тела. Для расчета объема опухолей использовали следующую формулу.

Объем опухолей (мм³) = наибольший диаметр опухоли (мм) × наименьший диаметр опухоли (мм)² × 0,5

Как показано на фиг. 6, достоверный эффект уменьшения объема опухолей наблюдался в группах, которым вводили 0,1; 1 или 10 мг/кг hKM3900_tA2-32LN. На оси ординат указан объем опухолей, на оси абсцисс указаны сутки после первого введения. Сплошные и пунктирные линии указывают на сдвиг среднего объема опухолей в каждой группе, и вертикальная линия ошибки указывает стандартную ошибку среднего значения. Значения значимости P (*: $P < 0,05$ и **: $P < 0,01$) рассчитывали сравнением объема опухолей на сутки 12 в группе введения контрольного изотипа и группе введения hKM3900_tA2-32LN с помощью теста множественного сравнения Даннетта. Число случаев в группе введения 0,1 мг/кг hKM3900_tA2-32LN на сутки 12 составило 9.

[0151] 7-2. Тестирование безопасности биспецифического антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv на яванских макаках

Для тестирования безопасности биспецифических антител анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv (hKM3900_3-34-j6 и hKM3900_tA2-32LN), каждое из биспецифических антител анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv вводили в однократной дозе внутривенно яванским макакам. В результате не наблюдали каких-либо специфических отклонений в уровнях цитокинов, таких как IL-6 и TNF- α , в сыворотке обезьян, которым вводили биспецифические антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv. Таким образом, был сделан вывод, что биспецифические антитела анти-CLDN4 (hKM3900)/анти-CD137 scFv рассматриваются в качестве антител для лечения рака с точки зрения безопасности.

[0152] **Примеры 8: лечение рака с использованием биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела**

8-1. Определение уровня экспрессии CLDN4

Для выяснения того, насколько широко применим CLDN4 в качестве терапевтической мишени при раке, уровень экспрессии РНК CLDN4 в опухолевых тканях исследовали в Атласе генома рака (TCGA). В результате было подтверждено, что экспрессия CLDN4 повышена в опухолевых тканях при колоректальном раке, раке мочевого пузыря, раке легких и т.п., следовательно, было высказано предположение, что CLDN4 является возможной терапевтической мишенью не только для метастатического рака брюшины, но и для других типов рака. Кроме того, уровень экспрессии РНК CLDN4 в нормальных тканях исследовали с помощью экспрессии генотипа в различных тканях (GTEx). В результате было обнаружено, что CLDN4 экспрессируется в нескольких нормальных тканях. Однако уровень экспрессии CLDN4 был ниже в

нормальных тканях, чем в опухолевых тканях. Таким образом, было высказано предположение, что противоопухолевое средство, терапевтически нацеленное на CLDN4, является возможным терапевтическим средством с большим гарантированным запасом безопасности и низкой вероятностью проявления побочных реакций.

Промышленная применимость

[0153] Полагается, что биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по настоящему изобретению будет пригодно для лечения рака. Кроме того, для получения биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела пригодны полинуклеотид, экспрессионный вектор, трансформированная клетка-хозяин и способ получения антитела по настоящему изобретению.

Список последовательностей произвольный текст

[0154] В цифровом заголовке <223> следующего списка последовательностей описана «искусственная последовательность». В частности, SEQ ID NO: 1 в списке последовательностей показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи 3D11, и SEQ ID NO: 2 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи 3D11. SEQ ID NO: 3 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области легкой цепи 3D11, и SEQ ID NO: 4 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи 3D11. SEQ ID NO: 5 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи hKM3900, и SEQ ID NO: 6 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи hKM3900. SEQ ID NO: 7 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области легкой цепи hKM3900, и SEQ ID NO: 8 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи hKM3900. SEQ ID NO: 9 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи 3-34, и SEQ ID NO: 10 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи 3-34. SEQ ID NO: 11 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области легкой цепи 3-34, и SEQ ID NO: 12 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи 3-34. SEQ ID NO: 13 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи A2-32, и SEQ ID NO: 14 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи A2-32. SEQ ID NO: 15 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области легкой цепи A2-32, и SEQ ID NO: 16 показывает аминокислотную

последовательность вариабельной области легкой цепи A2-32. SEQ ID NO: 17 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи A2-48, и SEQ ID NO: 18 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи A2-48. SEQ ID NO: 19 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области легкой цепи A2-48, и SEQ ID NO: 20 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи A2-48. SEQ ID NO: 21 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области тяжелой цепи A2-73, и SEQ ID NO: 22 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области тяжелой цепи A2-73. SEQ ID NO: 23 показывает нуклеотидную последовательность вариабельной области легкой цепи A2-73, и SEQ ID NO: 24 показывает аминокислотную последовательность вариабельной области легкой цепи A2-73. SEQ ID NO: 25 показывает нуклеотидную последовательность 3-34-j6 scFv, и SEQ ID NO: 26 показывает аминокислотную последовательность 3-34-j6 scFv. SEQ ID NO: 27 показывает нуклеотидную последовательность tA2-32 scFv, и SEQ ID NO: 28 показывает аминокислотную последовательность tA2-32 scFv. SEQ ID NO: 29 показывает нуклеотидную последовательность scFv tA2-32LH, и SEQ ID NO: 30 показывает аминокислотную последовательность tA2-32LH scFv. SEQ ID NO: 31 показывает нуклеотидную последовательность tA2-48 scFv, и SEQ ID NO: 32 показывает аминокислотную последовательность tA2-48 scFv. SEQ ID NO: 33 показывает нуклеотидную последовательность tA2-73 scFv, и SEQ ID NO: 34 показывает аминокислотную последовательность tA2-73 scFv. SEQ ID NO: 35 показывает нуклеотидную последовательность тяжелой цепи hKM3900_3-34-j6, и SEQ ID NO: 36 показывает аминокислотную последовательность тяжелой цепи hKM3900_3-34-j6. SEQ ID NO: 37 показывает нуклеотидную последовательность тяжелой цепи hKM3900_tA2-32LH, и SEQ ID NO: 38 показывает аминокислотную последовательность тяжелой цепи hKM3900_tA2-32LH. SEQ ID NO: 39 показывает нуклеотидную последовательность легкой цепи hKM3900, и SEQ ID NO: 40 показывает аминокислотную последовательность легкой цепи hKM3900. SEQ ID NO: 41 показывает аминокислотную последовательность слитого белка анти-CD3 scFv-Fc человека. SEQ ID NO: 42 показывает аминокислотную последовательность CD137 человека. SEQ ID NO: 43 показывает аминокислотную последовательность CD137 обезьяны. SEQ ID NO: 44 показывает аминокислотную последовательность белка His-метки. SEQ ID NO: 45

показывает аминокислотную последовательность метки 3×FLAG-метки. SEQ ID NO: 46-54 представляют аминокислотные последовательности линкеров GS. SEQ ID NO: 55 показывает аминокислотную последовательность линкера GKPGS.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, и переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи анти-CLDN4 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a) или (b):

(a) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 2, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 2, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-114 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 4; или

(b) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-112 SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-35 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-98 SEQ ID NO: 8.

2. Биспецифическое антитело по п.1, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи анти-CLDN4 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a) или (b):

(a) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-

109 SEQ ID NO: 4; или

(b) вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

3. Биспецифическое антитело по любому из пп.1 и 2, содержащее IgG антитело, состоящее из тяжелой цепи, содержащей вариабельную область тяжелой цепи, и легкой цепи, содержащей вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела (Ig анти-CLDN4 антитело).

4. Биспецифическое антитело по п.3, содержащее мутацию LALA (L234A и L235A, где положение мутации представляет собой аминокислотное положение в константной области человеческого Ig γ 1 в соответствии с системой нумерации EU) в Fc-области IgG анти-CLDN4 антитела.

5. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по п.3, содержащее мутацию P331G в Fc-области IgG анти-CLDN4 антитела (где положение мутации представляет собой аминокислотное положение в константной области человеческого Ig γ 1 в соответствии с системой нумерации EC).

6. Биспецифическое антитело по п.3, содержащее мутацию LALA и мутацию P331G в Fc-области IgG анти-CLDN4 антитела.

7. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-6, где вариабельная область тяжелой цепи и вариабельная область легкой цепи анти-CD137 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a)-(d):

(a) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 99-107 SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 24-34 SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-56 SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 89-98 SEQ ID NO: 12;

(b) вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных

положениях 31-35 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 16, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 16, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 16;

(с) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 18, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 18, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-107 SEQ ID NO: 18, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 20, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 20, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 20; или

(d) переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 31-35 SEQ ID NO: 22, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 50-65 SEQ ID NO: 22, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 98-110 SEQ ID NO: 22, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 23-35 SEQ ID NO: 24, CDR2, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 51-57 SEQ ID NO: 24, и CDR3, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 90-100 SEQ ID NO: 24.

8. Биспецифическое антитело по любому из пп.1-7, где переменная область тяжелой цепи и переменная область легкой цепи анти-CD137 антитела представляют собой любое из следующих пунктов (a)-(i):

(a) переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-

121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

9. Биспецифическое антитело по любому из пп.7 и 8, содержащее анти-CD137 одноцепочечный переменный фрагмент (анти-CD137 scFv), содержащий переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела.

10. Биспецифическое антитело по п.9, где анти-CD137 scFv представляет собой любое из следующих пунктов (a)-(e):

(a) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

11. Биспецифическое антитело по любому из пп.9 и 10, содержащее IgG анти-CLDN4 антитело и анти-CD137 scFv, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи или легкой цепи IgG анти-CLDN4 антитела через линкер.

12. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, описанное в любом из следующих пунктов (a)-(j):

(a) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из

аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(b) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(c) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(d) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-

244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(е) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(f) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(g) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с

карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(h) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30, и переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер;

(i) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер; или

(j) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8, и анти-CD137 scFv, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34, где аминоконец анти-CD137 scFv связан с карбоксиконцом тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела через линкер.

13. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по любому из пп.11 и 12, где линкер представляет собой линкер GS.

14. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по п.13, где линкер GS представляет собой линкер, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 54.

15. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело, описанное в любом из следующих пунктов (a) или (b):

(a) биспецифическое антитело, содержащее полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) биспецифическое антитело, содержащее полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

16. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по любому из пп.1-15, которое является посттрансляционно модифицированным.

17. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по п.16, где посттрансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце вариабельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи.

18. Полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи или вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(d):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной

последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6;
или

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8.

19. Полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи или переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(r):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18;

(f) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(g) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22;

(h) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(i) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28;

(l) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(m) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30;

(n) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(o) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32;

(p) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32;

(q) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34; или

(r) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34.

20. Полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a) - (e):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32; или

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную

последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34.

21. Полинуклеотид для применения в производстве биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по п.15, который выбран из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(e):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

22. Экспрессионный вектор, содержащий полинуклеотид по любому из пп.18-21.

23. Клетка-хозяин, трансформированная экспрессионным вектором по п.22.

24. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих пунктов (a)-(dd):

(a) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-125 SEQ ID NO: 2;

(b) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 4;

(c) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-123 SEQ ID NO: 6;

(d) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 8;

(e) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 10;

(f) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-109 SEQ ID NO: 12;

(g) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 14;

(h) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 16;

(i) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи

анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 18;

(j) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 20;

(k) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 22;

(l) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 24;

(m) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 26;

(n) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-242 SEQ ID NO: 26;

(o) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 28;

(p) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 28;

(q) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи

анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-111 SEQ ID NO: 30;

(r) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 132-249 SEQ ID NO: 30;

(s) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-118 SEQ ID NO: 32;

(t) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 134-244 SEQ ID NO: 32;

(u) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-121 SEQ ID NO: 34;

(v) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-CD137 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 137-247 SEQ ID NO: 34;

(w) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-242 SEQ ID NO: 26;

(x) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 28;

(y) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-249 SEQ ID NO: 30;

(z) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-244 SEQ ID NO: 32;

(aa) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую анти-CD137 scFv, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-247 SEQ ID NO: 34;

(bb) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv;

(cc) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv; или

(dd) полинуклеотида, имеющего нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

25. Клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид по любому из следующих пунктов (a) или (b):

(a) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-705 SEQ ID NO: 36, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40; или

(b) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-712 SEQ ID NO: 38, содержащей тяжелую цепь анти-CLDN4 антитела и анти-CD137 scFv, и полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-CLDN4 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности в аминокислотных положениях 1-215 SEQ ID NO: 40.

26. Способ получения биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по любому из пп.23-25.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по любому из пп.1-17 и фармацевтически приемлемый эксципиент.

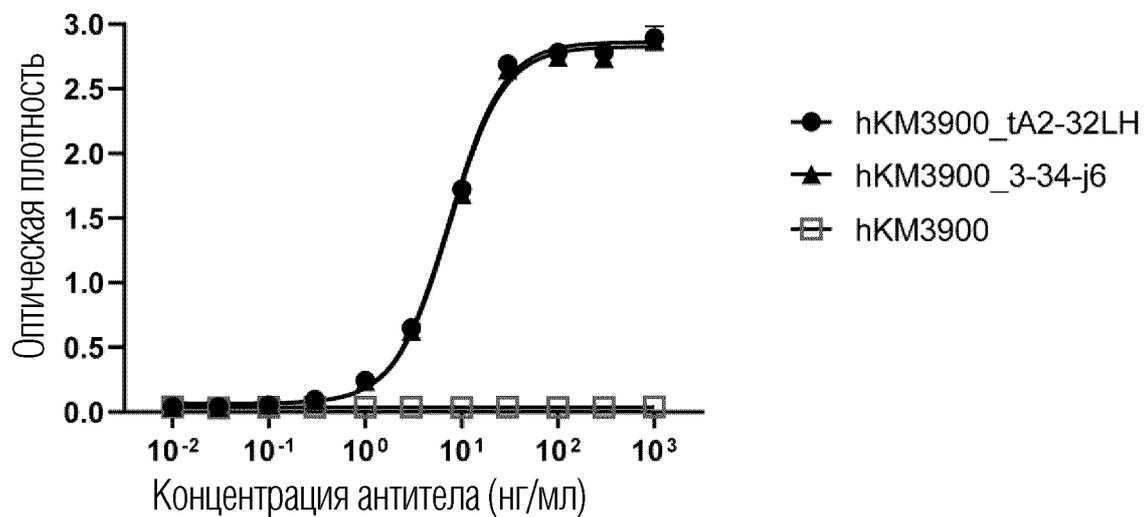
28. Биспецифическое анти-CLDN4/анти-CD137 антитело по любому из пп.1-17 для применения в лечении рака.

29. Фармацевтическая композиция по п.27 для применения в лечении рака.

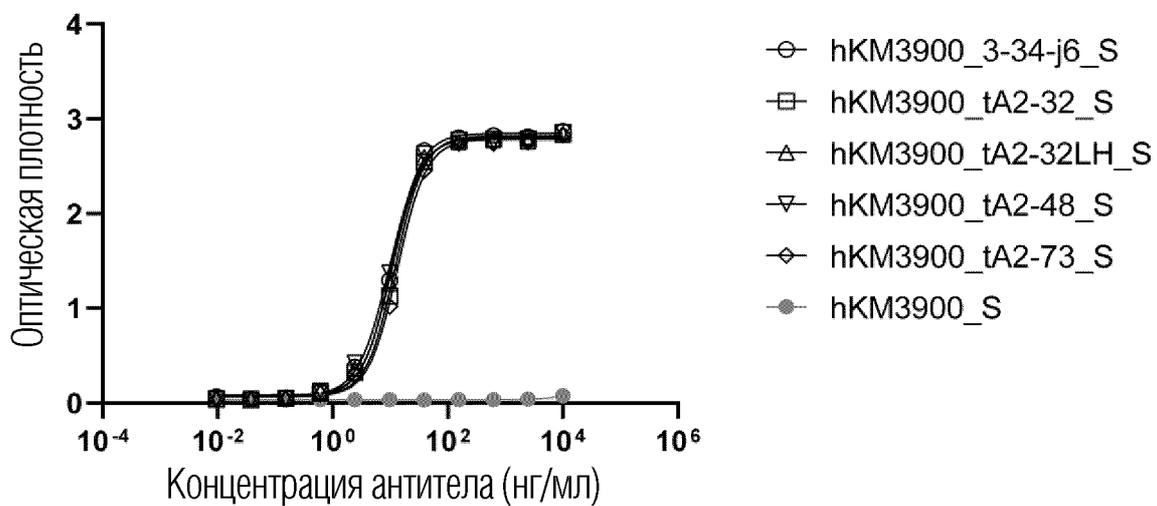
30. Способ лечения рака, включающий стадию введения терапевтически эффективного количества биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по любому из пп.1-17 субъекту.

31. Применение биспецифического анти-CLDN4/анти-CD137 антитела по любому из пп.1-17 в производстве фармацевтической композиции для применения в лечении рака.

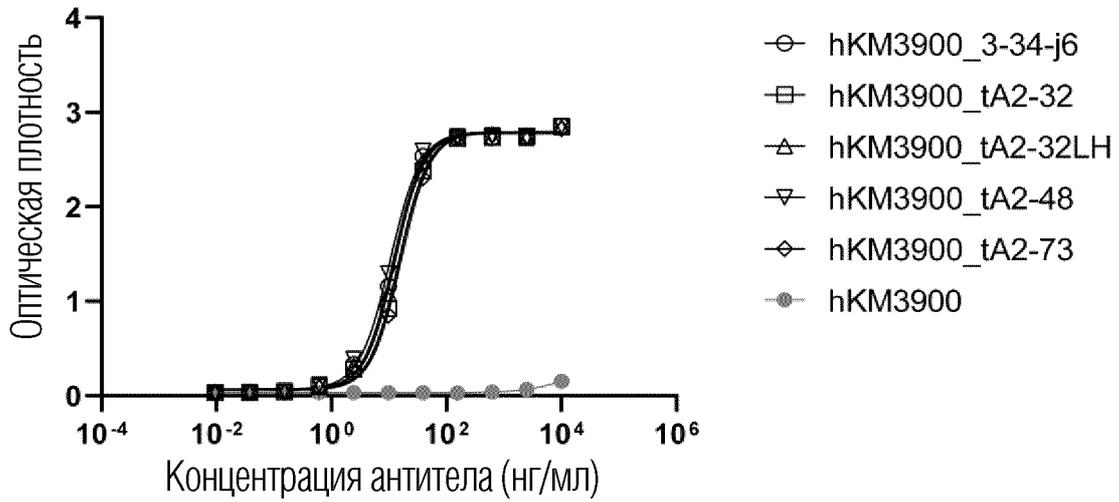
ФИГ. 1-1



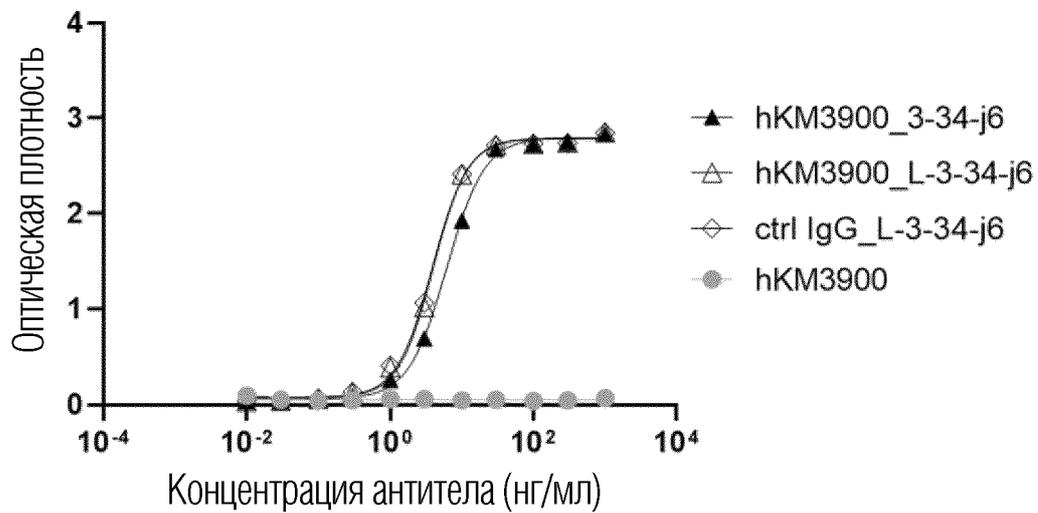
ФИГ. 1-2



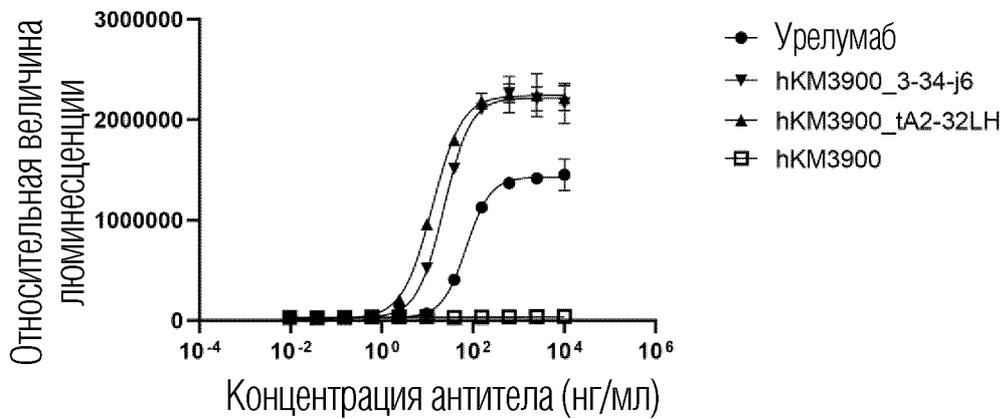
ФИГ. 1-3



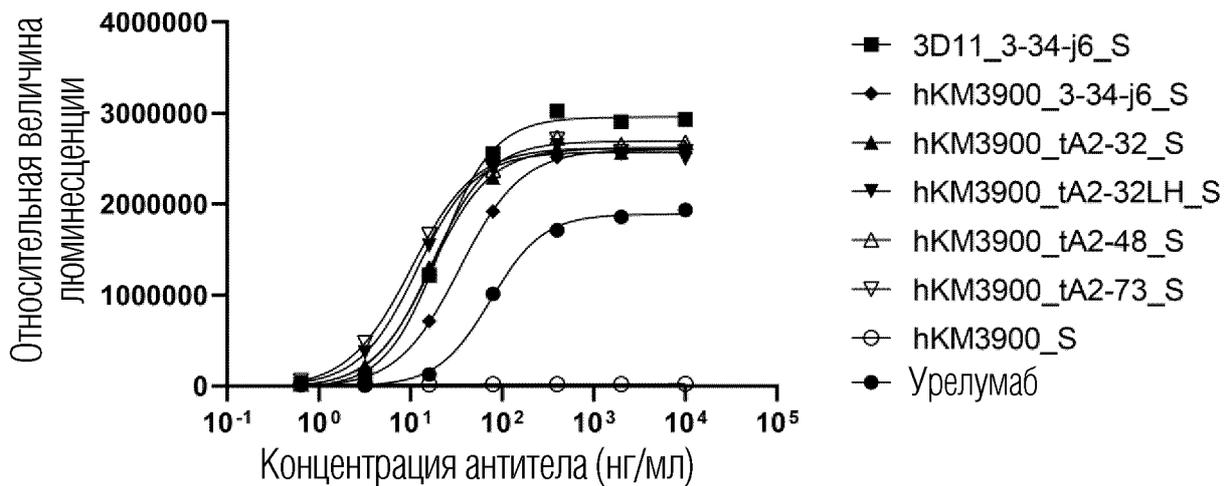
ФИГ. 1-4



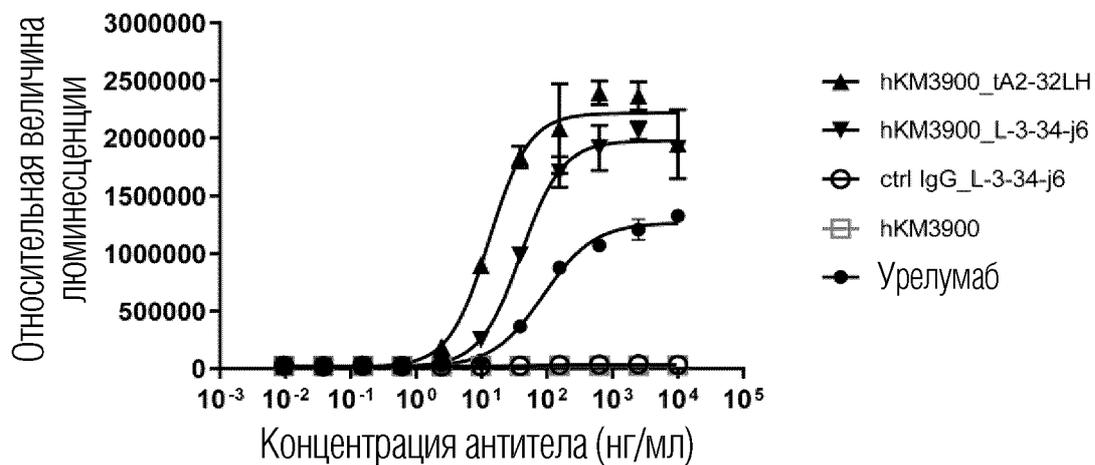
ФИГ. 2-1



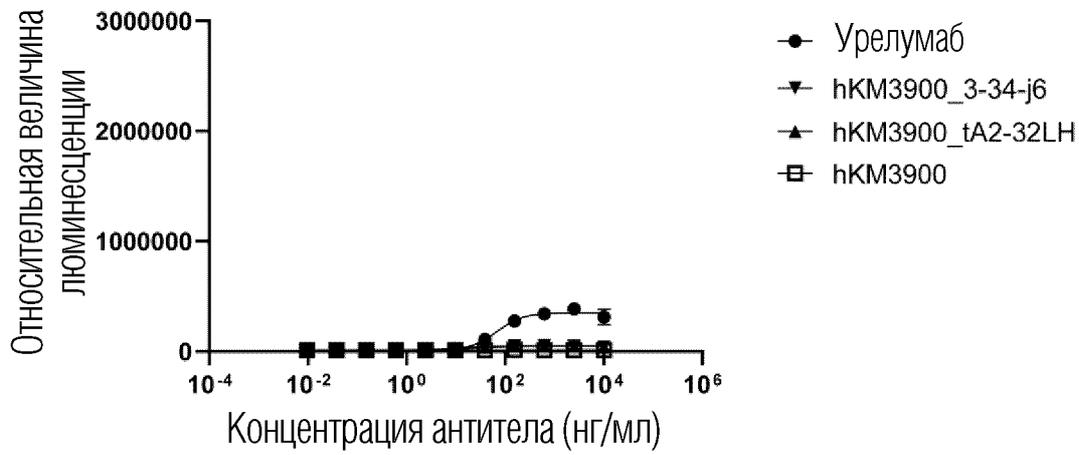
ФИГ. 2-2



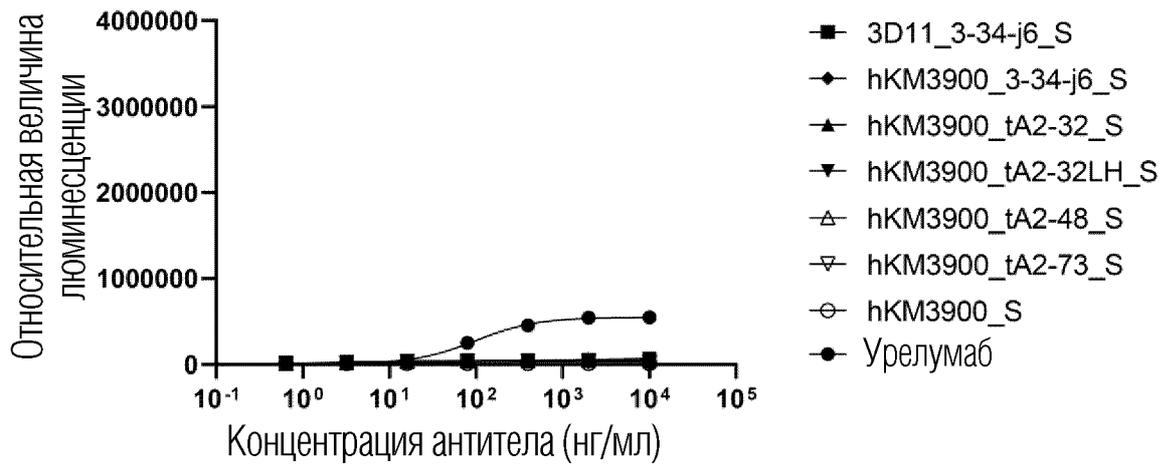
ФИГ. 2-3



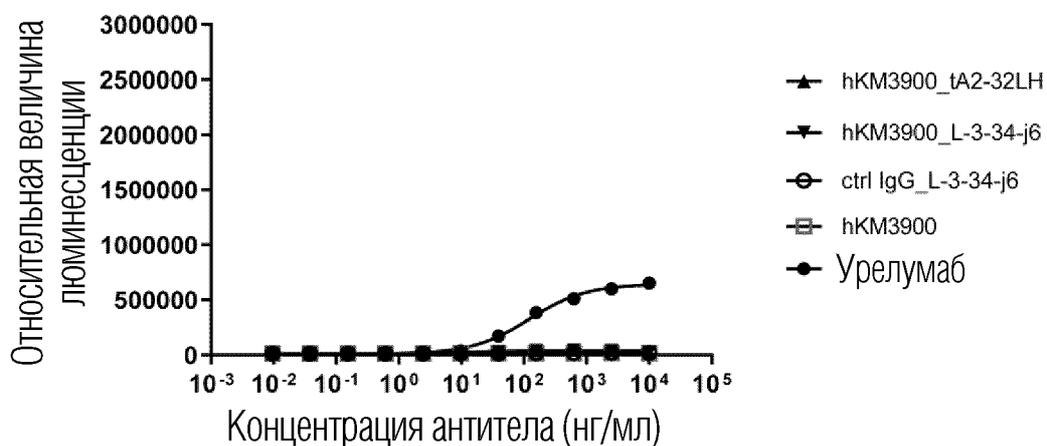
ФИГ. 2-4



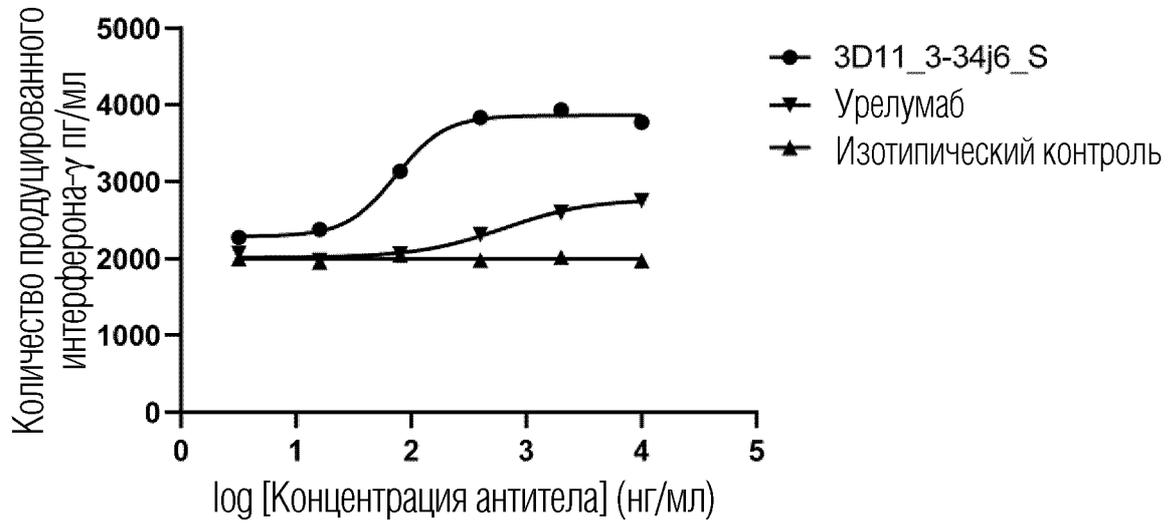
ФИГ. 2-5



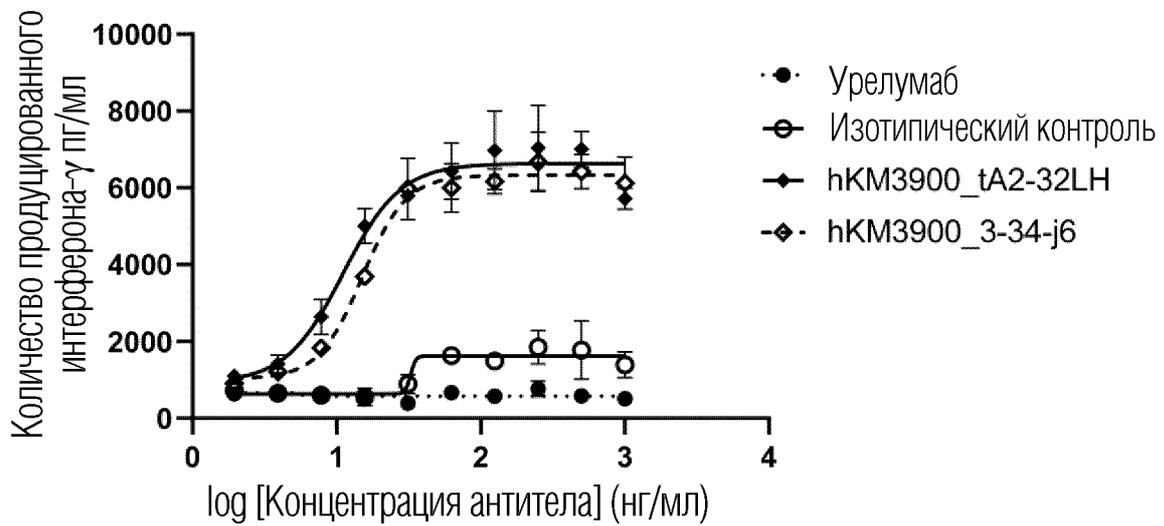
ФИГ. 2-6



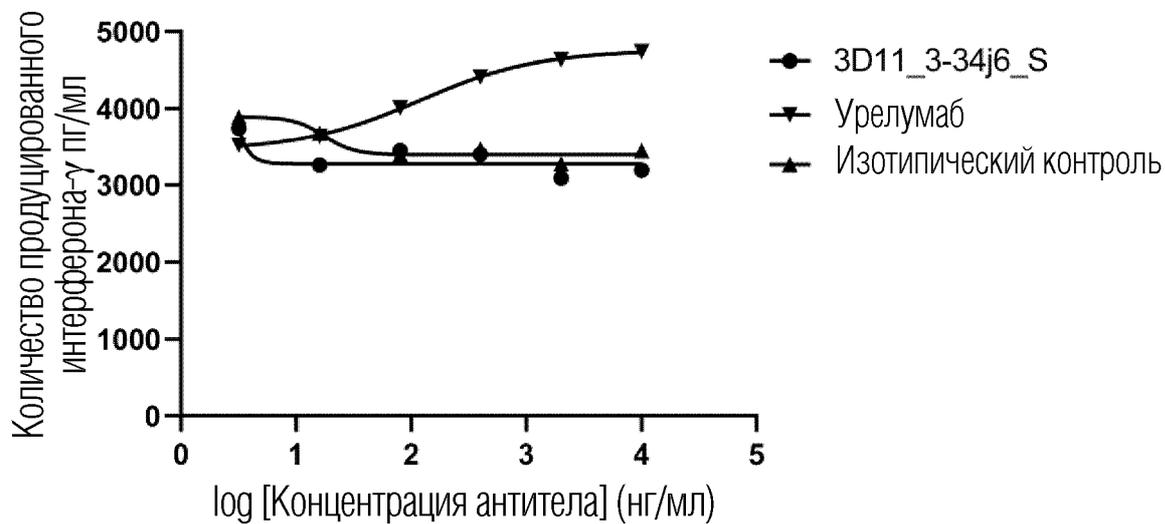
ФИГ. 3-1



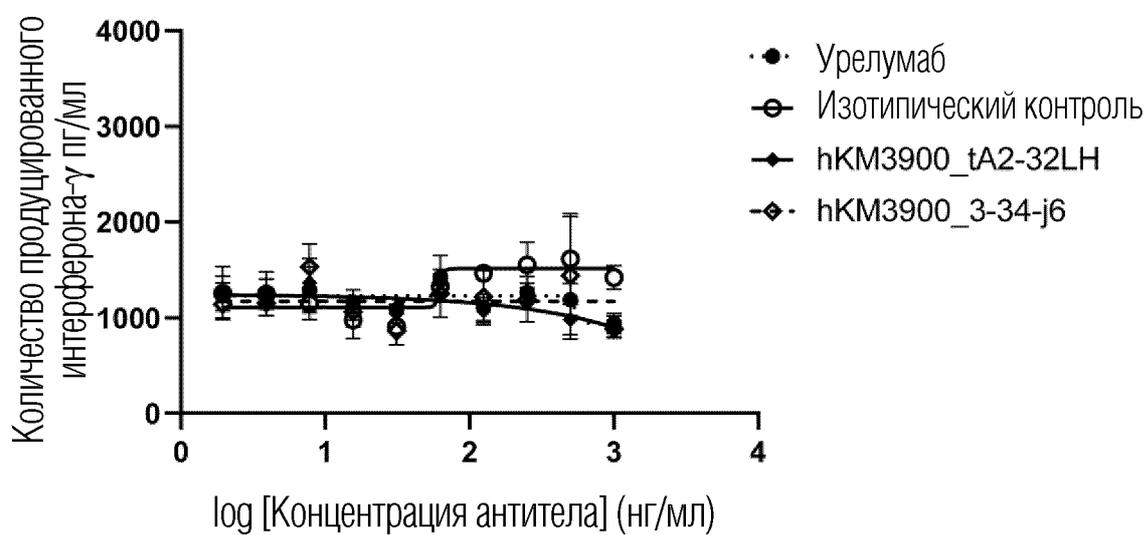
ФИГ. 3-2



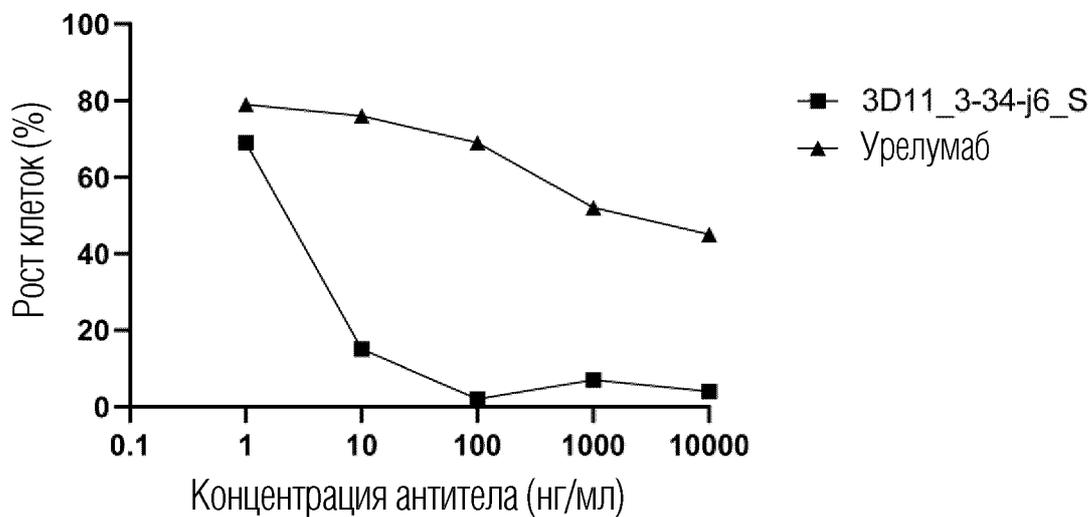
ФИГ. 3-3



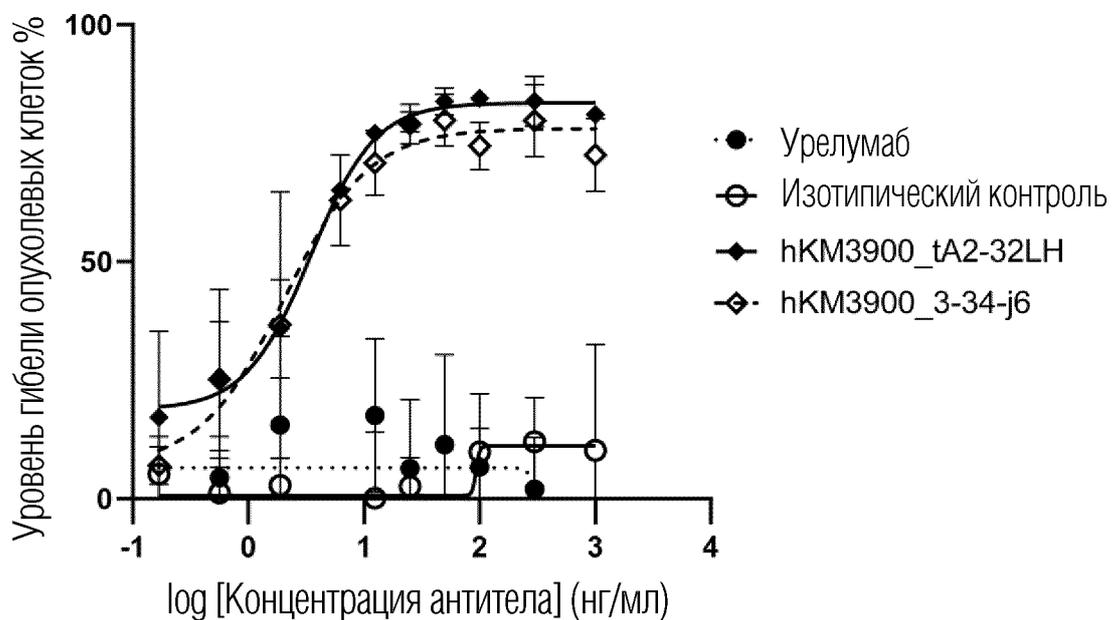
ФИГ. 3-4



ФИГ. 4



ФИГ. 5



ФИГ. 6

