

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202391486 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2023.07.18(22) Дата подачи заявки
2021.11.15

(51) Int. Cl. C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12P 21/02 (2006.01)

(54) АНТИ-TSPAN8/АНТИ-CD3 БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО И АНТИ-TSPAN8 АНТИТЕЛО

(31) 2020-189988

(32) 2020.11.16

(33) JP

(86) PCT/JP2021/041839

(87) WO 2022/102768 2022.05.19

(71) Заявитель:

АСТЕЛЛАС ФАРМА ИНК.; НЭШНЛ
КЭНСЕР СЕНТЕР (JP)

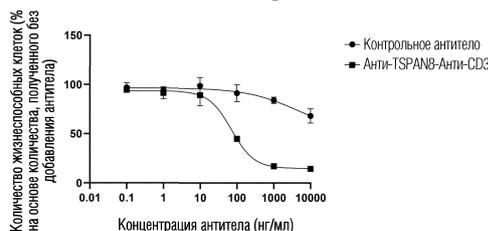
(72) Изобретатель:

Тенда Йосиюки, Юри Масатоси,
Ямадзукэ Дайсуке, Цуцуми Такеси,
Кусузаки Юко, Сасаки Хироки,
Тиваки Фумико, Комацу Масаюки
(JP)

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение обращено к проблеме предложения анти-TSPAN8-анти-CD3 биспецифического антитела и анти-TSPAN8 антитела, каждое из которых можно использовать для лечения или профилактики у человека. Мышь, продуцирующую моноклональные антитела человека, иммунизируют перитонеальной диссеминированной раковой клеткой, выделенной от пациента, с получением антитела 16B11 и антитела 16B12, каждое из которых селективно связывается с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой. Эти антитела представляют собой анти-TSPAN8 антитела, которые способны связываться с областью, лежащей между аминокислотных остатков 126-155 в TSPAN8 и демонстрируют сильную активность связывания с TSPAN8, экспрессируемым в перитонеальной диссеминированной раковой клетке. Кроме того, анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело, полученное на основе последовательности 16B11, демонстрирует цитотоксическую активность в отношении раковых клеток, экспрессирующих TSPAN8, *in vitro*, и демонстрирует противоопухолевое действие на мышь, пораженную раком, несущую раковые клетки, экспрессирующие TSPAN8, и продлевает период выживания мыши, являющейся моделью перитонеальной диссеминации *in vivo*.



A1

202391486

202391486

A1

ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

2420-578060EA/085

АНТИ-TSPAN8/АНТИ-CD3 БИСПЕЦИФИЧЕСКОЕ АНТИТЕЛО И АНТИ-TSPAN8 АНТИТЕЛО

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

[0001] Настоящее изобретение относится к анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическому антителу и анти-TSPAN8 антителу, используемым в качестве активного ингредиента фармацевтической композиции, предназначенной для лечения человека.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

[0002] Метастатический рак желудка относится к состоянию, при котором первичный рак желудка проник глубже за пределы мышечного слоя и разрушил серозную оболочку, покрывающую стенку желудка, с метастазированием в лимфатические узлы или брюшную полость, и затем в различные органы через кровь или лимфу, и более чем у половины пациентов, страдающих метастатическим раком желудка, имеется диссеминация в брюшную полость. Известно, что у терминальных больных отмечаются симптомы вздутия живота за счет скопления асцитической жидкости, вызванной перитонеальной диссеминацией, постоянное вздутие живота, боль, тошнота, одышка, бессонница и утомляемость (World J. Gastroenterol., 2016, Vol.22, p. 6829-6840 и Int. J. Cancer, 2010, Vol.127, p.2209-2221). Однако полностью вылечить больного раком желудка с перитонеальной диссеминацией хирургическим путем сложно, и химиотерапия, то есть стандартная терапия рака желудка с перитонеальной диссеминацией, не обладает достаточной эффективностью. Следовательно, прогноз настолько неблагоприятен, что пятилетняя выживаемость такого пациента составляет всего около 2%, и желательно эффективное лечение рака желудка с перитонеальной диссеминацией. Кроме того, перитонеальная диссеминация встречается у многих онкологических больных с первичным раком яичников, колоректальным раком, раком поджелудочной железы и подобными (Int. J. Adv. Res., 2016, Vol. 4, p. 735-748), и терапевтический способ для этих пациентов еще не установлен.

[0003] При разработке антител для лечения рака были предприняты попытки идентификации опухолеассоциированного (ТАА), селективно экспрессируемого в раковой клетке, различными способами. В качестве одного из этих способов сообщалось о способе, в котором антитело получают путем иммунизации животного раковой клеткой для получения антитела, которое связывается с ТАА, экспрессируемым в раковой клетке (Biochem. Biophys. Res. Commun., 2018, Vol. 505, p. 181e-186, and FEBS Open Bio, 2017, Vol. 7, p. 627-635).

[0004] Тетраспанин-8 (TSPAN8) представляет собой четырехпроходный трансмембранный белок, принадлежащий к семейству тетраспанинов, имеет две области внеклеточной петли малой внеклеточной петли (SEL) и большой внеклеточной петли (LEL) и три цитоплазматических домена, и образует молекулярный кластер, имеющий в качестве каркасных белков множество трансмембранных белков и цитоплазматических белков.

Известно, что TSPAN8 участвует в клеточной адгезии, подвижности клеток, активации и росте клеток и подобных и экспрессируется на высоком уровне при раке желудка, раке поджелудочной железы, колоректальном раке, раке печени и подобном. Сообщалось, что существует связь или подобное между повышенной экспрессией TSPAN8 и прогрессированием или метастазированием рака (НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 1). Проводятся исследования, направленные на диагностику или лечение рака с использованием анти-TSPAN8 антитела (ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 1-2 и НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 1-2).

[0005] Кластер дифференциации 3 (CD3) представляет собой белок, который передает сигнал активации Т-клетке путем образования на поверхности Т-клетки комплекса вместе с Т-клеточным рецептором (TCR). CD3 представляет собой комплекс, состоящий из пяти субъединиц гамма (γ), дельта (δ), эпсилон (ϵ), дзета (ζ) и эта (η) цепей, и субъединицы образуют три димера, $\epsilon\gamma$, $\epsilon\delta$ и $\zeta\zeta$. CD3 экспрессируется как в нормальных Т-клетках, так и в опухолевых Т-клетках и, следовательно, используется в качестве Т-клеточного маркера. Кроме того, были сделаны различные сообщения о применении в качестве фармацевтических средств биспецифических антител, включая различные анти-ТАА антитела и анти-CD3 антитела, для лечения рака (НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 3).

[0006] В качестве инновационного способа, с помощью которого можно получить цитотоксическую активность, селективную к раковым клеткам, при низкой концентрации антител, сообщалось о биспецифических антителах, рекрутирующих Т-клетки, имеющих различные форматы антител, и действие этих антител на иммунотерапию, опосредованную Т-клетками, находится на стадии изучения (НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 4). Биспецифическое антитело, рекрутирующее Т-клетки, представляет собой биспецифическое антитело, включающее антитело к ТАА, экспрессированное на поверхности раковой клетки, и антитело, которое связывается с Т-клеткой. В качестве антитела, которое связывается с Т-клеткой, во многих случаях используются анти-CD3 антитела. Биспецифическое антитело, рекрутирующее Т-клетки, включая анти-ТАА антитела и анти-CD3 антитела, уменьшает физическое расстояние между раковой клеткой-мишенью и цитотоксическим Т-лимфоцитом (CTL), чтобы активировать CTL анти-CD3 антителом для уничтожения раковой клетки цитотоксическим действием CTL (перенаправленная Т-клеточная цитотоксичность; RTCC). Катумаксомаб, то есть, биспецифическое антитело против CD3/против молекулы анти-эпителиальной клеточной адгезии (EPCAM), и блинатумомаб, то есть анти-CD3/анти-CD19 (кластер дифференциации 19) биспецифическое антитело, уже подтвердили свою клиническую эффективность (Int. J. Cancer, 2010, Vol. 127, p. 2209-2221 и N. Engl. J. Med., 2017, Vol. 376, p. 836-847). Также в настоящее время изучаются и разрабатываются различные биспецифические рекрутирующие Т-клетки антитела к ТАА. Однако до настоящего времени анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифические антитела не были известны.

СПИСОК ЦИТАТ

ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА

[0007]

ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 1: Международная публикация № 2012/010696.

ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 2: Международная публикация № 2015/130115.

НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА

[0008]

НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 1: *Biomolecules* (Switzerland), 2020; 10 (3) p.383НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 2: *Cancers* (Switzerland), 2019; 11 (2) p.179НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 3: *Pharmacology and Therapeutics* (Great Britain), 2018; 182: p. 161-175НЕ-ПАТЕНТНАЯ ЛИТЕРАТУРА 4: *mAbs*, 2017: 9(2): p. 182-212

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

ТЕХНИЧЕСКАЯ ПРОБЛЕМА

[0009] Целью настоящего изобретения является создание анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела и анти-TSPAN8 антитела, используемых для лечения человека.

СРЕДСТВА РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ

[0010] В целях создания терапевтического агента, селективно действующего на раковую клетку, авторы настоящего изобретения получили 16B11 и 16B12, которые представляют собой анти-TSPAN8 антитела, используя способ получения антител путем иммунизации мыши, продуцирующей моноклональные антитела человека, с помощью перитонеальной диссемированной раковой клетки, выделенной от пациента (пример 1). Антитела, связанные с TSPAN8, экспрессированным на перитонеальной диссемированной раковой клетке сильнее, чем с TSPAN8, экспрессированным на нормальных клетках (примеры 1-5). В результате анализа эпитопов 16B11 и 16B12 было обнаружено, что антитела распознают область, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 126-155 в TSPAN8 человека, в качестве эпитопа, и треонин в положении 131 в TSPAN8 человека необходим для связывания антител (пример 4). Кроме того, было получено полностью человеческое антитело 16B11.1, образованное путем превращения Fc области 16B11 в последовательность человека (пример 3), и было обнаружено, что полностью человеческое антитело проявляет цитотоксическую активность против клетки 60As6-Luc/GFP (пример 6).

Кроме того, для повышения антиген-селективной противоопухолевой активности T-клетки было получено анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело, содержащее: переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности от аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и анти-CD3-scFv область, содержащую переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела,

состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14 (пример 7). Было подтверждено, что это биспецифическое антитело, связанное с TSPAN8 и CD3 (пример 8), проявляло цитотоксическую активность в отношении раковых клеток, экспрессирующих TSPAN8 на клеточной поверхности (примеры 9, 10, 12-1 и 12-2), и удлиняло продолжительность жизни мышей *in vivo* для оказания противоопухолевого действия (примеры 11 и 12-3).

[0011] В частности, настоящее изобретение относится к следующему [1]-[55]:

[1] Биспецифическое антитело, которое связывается с TSPAN8 и CD3, содержащее:

(a) Fab область анти-TSPAN8 антитела, состоящую из: фрагмента тяжелой цепи, содержащего переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела; и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела;

(b) анти-CD3-scFv область, содержащую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела; и

(c) Fc область, состоящую из первого Fc полипептида, связанного с фрагментом тяжелой цепи Fab области (a), и второго Fc полипептида, связанного с анти-CD3-scFv областью (b).

[2] Биспецифическое антитело по пункту [1], отличающееся тем, что

переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; или

переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[3] Биспецифическое антитело по пункту [1], отличающееся тем, что

переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, и

вариабельная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; или

вариабельная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, и вариабельная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[4] Биспецифическое антитело по пункту [1], отличающееся тем, что

Fab область анти-TSPAN8-антитела состоит из фрагмента тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-219 в SEQ ID NO: 6, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или

Fab область анти-TSPAN8-антитела состоит из фрагмента тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-219 в SEQ ID NO: 10, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[5] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[4],

отличающееся тем, что вариабельная область тяжелой цепи анти-CD3 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и вариабельная область легкой цепи анти-CD3 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14.

[6] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[4],

отличающаяся тем, что вариабельная область тяжелой цепи анти-CD3 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и вариабельная область легкой цепи анти-CD3 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14.

[7] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[4], отличающееся тем, что анти-CD3-scFv область состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-254 в SEQ ID NO: 14.

[8] Биспецифическое антитело по пункту [1], отличающееся тем, что

биспецифическое антитело содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3,

состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом, или

биспецифическое антитело содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO:

14, связана со вторым Fc полипептидом.

[9] Биспецифическое антитело по пункту [1], отличающееся тем, что

биспецифическое антитело содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом, легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8, и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом, или

биспецифическое антитело содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом, легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12, и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[10] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[9], содержащее Fc область, содержащую мутацию LALA (L234A и L235A (где положения мутации представляют собой аминокислотные положения в константной области Igγ1 человека в соответствии с индексом EU)).

[11] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[10], содержащее Fc область, содержащую мутацию N297G (где положение мутации представляет собой аминокислотное положение в константной области Igγ1 человека в соответствии с индексом EU).

[12] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[11], содержащее Fc область, содержащую мутацию «выступы во впадины».

[13] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[12], содержащее Fc область, содержащую мутацию LALA, мутацию N297G и мутацию «выступы во впадины».

[14] Биспецифическое антитело по пункту [12] или [13], отличающееся тем, что мутация «выступы во впадины» представляет собой мутацию T366W в одном Fc полипептиде, включенном в Fc область, и мутацию T366S, L368A и Y407V в другом Fc полипептиде, включенном в Fc область (где положения мутации представляют собой

аминокислотные положения в константной области Ig γ 1 человека в соответствии с индексом EU).

[15] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[14], содержащее Fc область, в которой первый Fc полипептид состоит из аминокислотной последовательности аминокислот 235-451 в SEQ ID NO: 6, и второй Fc полипептид состоит из аминокислотной последовательности аминокислот 270-486 в SEQ ID NO: 14.

[16] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[15], где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела и первый Fc полипептид связаны через шарнирную область, и анти-CD3-scFv область и второй Fc полипептид связаны через шарнирную область.

[17] Биспецифическое антитело по пункту [1], содержащее: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где анти-CD3-scFv область связана со вторым Fc полипептидом.

[18] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [2]-[17] с пост-трансляционной модификацией.

[19] Биспецифическое антитело по пункту [18], отличающееся тем, что пост-трансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце варибельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи.

[20] Полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих (a)-(e):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий варибельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую варибельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий варибельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом;

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую варибельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12;

(е) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[21] Полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих (а)-(с):

(а) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(с) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где анти-CD3-scFv область связана со вторым Fc полипептидом.

[22] Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по пункту [20] или [21].

[23] Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по пункту [22].

[24] Клетка-хозяин, содержащая: полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[25] Клетка-хозяин, содержащая: полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, в которой фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом; полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из

аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где область анти-CD3-scFv связана со вторым Fc полипептидом.

[26] Способ получения биспецифического антитела, которое связывается с TSPAN8 и CD3, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по любому из пунктов [23]-[25].

[27] Фармацевтическая композиция, содержащая биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[19] и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[28] Биспецифическое антитело по любому из пунктов [1]-[19] для применения при лечении рака.

[29] Фармацевтическая композиция по пункту [27] для лечения рака.

[30] Способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела по любому из пунктов [1]-[19].

[31] Применение биспецифического антитела по любому из пунктов [1]-[19] в производстве фармацевтической композиции для лечения рака.

[32] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое селективно связывается с раковой клеткой, экспрессирующей TSPAN8 человека.

[33] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается по меньшей мере с одной аминокислотой, присутствующей в области TSPAN8 человека в аминокислотных положениях 126-155 в SEQ ID NO: 2.

[34] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту [33], которое связывается по меньшей мере с аминокислотой в аминокислотном положении 131 в SEQ ID NO: 2, присутствующей в области TSPAN8 человека.

[35] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 4, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO. 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 10, и переменную область легкой цепи, содержащую

CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[36] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту [35], выбранное из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[37] Анти-TSPAN8 антитело по пункту [35], выбранное из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[38] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с анти-TSPAN8 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пунктов [33]-[37] за связывание с TSPAN8 человека, экспрессирующим раковую клетку.

[39] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов [32]-[38], связанное с антителом к поверхностному антигену Т-клетки или НК-клетки, или его антигенсвязывающим фрагментом.

[40] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту [39], отличающееся тем, что поверхностный антиген Т-клетки представляет собой CD3.

[41] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту [40], отличающееся тем, что антигенсвязывающий фрагмент с поверхностным антигеном Т-клетки представляет собой scFv анти-CD3 антитела.

[42] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов [32]-[41], имеющее пост-трансляционную модификацию.

[43] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по пункту [42], отличающееся тем, что пост-трансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце переменной области тяжелой цепи и/или делецию

лизна в на С-конце тяжелой цепи.

[44] Слияние или комплекс анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пунктов [32]-[43], или клетки, на поверхности которой экспрессируется анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов [32]-[43].

[45] Полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих (a)-(d):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10;

и

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[46] Полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих (a)-(d):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[47] Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по пункту [45] или [46].

[48] Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по пункту [47].

[49] Клетка-хозяин, выбранная из следующих (a) и (b):

(a) клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по пункту [45], и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по пункту [45]; и

(b) клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, содержащий нуклеотидную

последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела по пункту [46], и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела по пункту [46].

[50] Способ получения анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по пункту [48] или [49].

[51] Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов [32]-[43], или гибрид, комплекс или клетка по пункту [44] для применения при лечении рака.

[52] Фармацевтическая композиция, содержащая анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пунктов [32]-[43], или гибрид, комплекс или клетку по пункту [44], и фармацевтически приемлемый эксципиент.

[53] Фармацевтическая композиция по пункту [52] для лечения рака.

[54] Способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пунктов [32]-[43], или стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества слияния, комплекса или клетки по пункту [44].

[55] Применение анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пунктов [32]-[43] или применение слияния, комплекса или клетки по пункту [44] в производстве фармацевтической композиции для лечения рака.

ПРЕИМУЩЕСТВЕННЫЕ ЭФФЕКТЫ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0012] Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению связывается как с TSPAN8, раковым антигеном, так и с CD3, молекулой на поверхности Т-клетки, и усиливает действие Т-клетки, убивающее раковые клетки, уменьшая физическое расстояние между раковой клеткой и Т-клеткой. Кроме того, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению демонстрирует эффект уничтожения раковых клеток за счет связывания с TSPAN8. Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело и анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или фармацевтическая композиция, содержащая антитело, может быть использована для лечения рака.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ЧЕРТЕЖЕЙ

[0013] [Фиг. 1-1] На фиг. 1-1 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 16B12, 9F6 и 18C10) с KM-291-As. На чертеже, 16B11, 16B12, 9F6 и 18C10 обозначают названия антител. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела.

[Фиг. 1-2] На фиг. 1-2 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 9F6 и 18C10) с KM-555-As. На чертеже, 16B11, 9F6 и 18C10 обозначают названия антител. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая

область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела.

[Фиг. 1-3] На фиг. 1-3 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 9F6 и 18C10) с KM-556-As. На чертеже, 16B11, 9F6 и 18C10 обозначают названия антител. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела.

[Фиг. 2-1] На фиг. 2-1 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 16B12, 9F6, 5B7, 12C12, 13A9, 15D1 и TAL69) с культивируемыми мезотелиальными клетками брюшины человека. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела.

[Фиг. 2-2] На фиг. 2-2 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (18C10, 19E4, 21F7 и TAL69) с культивируемыми мезотелиальными клетками брюшины человека. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела.

[Фиг. 3-1] На фиг. 3-1 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 16B12, 9F6, 18C10 и TAL69) с KM-501-As. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела.

[Фиг. 3-2] На фиг. 3-2 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 16B12, 9F6, 18C10 и TAL69) с KM-503-As. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела.

[Фиг. 4] На фиг. 4 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 16B12, 9F6, 5B7, 12C12, 13A9, 15D1, 18C10, 19E4, 21F7 и TAL69) с клеткой эндотелия сосудов пуповины человека, донор 2. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела.

[Фиг. 5-1] На фиг. 5-1 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 16B12 и TAL69) с клеткой CHO-K1

(клеткой CHO-K1, экспрессирующей химерный белок), экспрессирующей химерный белок TSPAN8-GFP человека и мыши или химерный белок TSPAN8-GFP человека и крысы. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, серая область указывает на клетку CHO-K1, экспрессирующую TSPAN8 человека дикого типа, черная область указывает на клетку CHO-K1, экспрессирующую химерный белок, и белая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела с имитацией клетки. Эксперимент проводят в двух повторах.

[Фиг. 5-2] На фиг. 5-2 показана гомология последовательностей, состоящих из аминокислотных положений 126-155 четырех белков TSPAN8 человека, мыши, крысы и яванского макака. Звездочка означает, что их аминокислоты полностью совпадают, и точка означает, что три из четырех белков имеют одинаковые аминокислоты. Пробел означает, что два или несколько из них имеют разные аминокислоты.

[Фиг. 5-3] На фиг. 5-3 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания анти-TSPAN8 антител (16B11, 16B12 и TAL69) с мутантом T131A или мутантом T131N белков TSPAN8 человека. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, серая область указывает на клетку CHO-K1, экспрессирующую TSPAN8 человека дикого типа, черная область указывает на клетку CHO-K1, экспрессирующую мутант, белая область указывает на связывание анти-TSPAN8 антитела с имитацией клетки. Эксперимент проводят в двух повторах.

[Фиг. 6-1] На фиг. 6-1 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии конкурентного действия других анти-TSPAN8 антител (конкуренты (CPTR): 16B11, 9F6, 18C10 и TAL69) на связывание 16B11 с NSC-15CF. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, серая область указывает на связывание флуоресцентно меченного 16B11 в присутствии антитела отрицательного контроля, черная область указывает на связывание флуоресцентно меченного 16B11 в присутствии каждого CPTR, и белая область указывает на гистограмму неокрашенного флуоресцентно меченного 16B11.

[Фиг. 6-2] На фиг. 6-2 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии конкурентного действия 16B12 на связывание флуоресцентно меченных анти-TSPAN8 антител (16B11, 9F6 и 18C10) с NSC-15CF. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, серая область указывает на связывание флуоресцентно меченного анти-TSPAN8 антитела в присутствии антитела отрицательного контроля, черная область указывает на связывание флуоресцентно меченного анти-TSPAN8 антитела в присутствии 16B12, и белая область указывает на гистограмму неокрашенного флуоресцентно меченного антитела.

[Фиг. 6-3] На фиг. 6-3 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии конкурентного действия других анти-TSPAN8 антител (CPTR: 16B12, 16B11, 9F6, 18C10 и TAL69) на связывание 16B12 с NSC-15CF. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже,

серая область указывает на связывание флуоресцентно меченного 16B12 в присутствии антитела отрицательного контроля, черная область указывает на связывание флуоресцентно меченного 16B12 в присутствии другого анти-TSPAN8 антитела (CPTR), и белая область указывает на гистограмму неокрашенного флуоресцентно меченного антитела.

[Фиг. 7] На фиг. 7 показана цитотоксическая активность 16B11.1 в системе совместного культивирования клеток 60As6-Luc/GFP и NK-клеток человека. Абсцисса показывает концентрацию антитела, и ордината показывает цитотоксическую активность, рассчитанную на основе активности люциферазы, продуцируемой клеткой 60As6-Luc/GFP. □ и π, соответственно, показывают средние значения цитотоксической активности при каждой концентрации контрольного антитела и 16B11.1. Планка погрешности показывает стандартное отклонение.

[Фиг. 8] На фиг. 8 показана активность связывания анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела с пептидом области LEL комплексного белка TSPAN8 и CD3εδ. Абсцисса показывает концентрацию антитела, и ордината показывает связывающее количество антитела. На фиг. 8-1 и фиг. 8-2, соответственно, показаны средние значения количеств анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела, связанного с пептидом области LEL комплексного белка TSPAN8 и CD3εδ. Планка погрешности показывает стандартное отклонение.

[Фиг. 9] На фиг. 9 показана цитотоксическая активность анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела в системе совместного культивирования клеток 60As6-Luc/GFP и мононуклеарных клеток периферической крови человека. Абсцисса показывает концентрацию антитела, и ордината показывает рост клеток (%) клеток 60As6-Luc/GFP, полученных через 3 дня после добавления антитела в зону флуоресценции, когда рост без добавления антител составляет 100%. □ показывает среднее значение роста клеток при каждой концентрации анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела. Планка погрешности показывает стандартное отклонение.

[Фиг. 10-1] На фиг. 10-1 показана цитотоксическая активность анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела против клетки рака желудка в асцитной клетке пациента с раком желудка человека. Абсцисса показывает концентрацию антитела, и ордината показывает количество жизнеспособных клеток (%), полученное через 3 дня после добавления антитела, когда количество жизнеспособных клеток без добавления антител составляет 100%. □ и †, соответственно, показывают средние значения количества жизнеспособных клеток (%) при каждой концентрации контрольного антитела и анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела. Планка погрешности показывает стандартное отклонение.

[Фиг. 10-2] На фиг. 10-2 показана диаграмма, иллюстрирующая, при индуцированной экспрессии CD25, активацию CD4-положительных Т-клеток, вызванную анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическим антителом в асцитной клетке человека с раком желудка человека. Абсцисса показывает концентрацию антител. Ордината

показывает кратность изменения уровня экспрессии CD25 через 3 дня после добавления антитела к CD4-положительным Т-клеткам при асците. □ и ′, соответственно, показывают средние значения кратности изменений уровня экспрессии CD25 при каждой концентрации контрольного антитела и анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела. Планка погрешности показывает стандартное отклонение.

[Фиг. 10-3] На фиг. 10-3 показана диаграмма, иллюстрирующая, при индуцированной экспрессии CD25, активацию CD8-положительных Т-клеток, вызванную анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическим антителом, в асцитной клетке человека с раком желудка человека. Абсцисса показывает концентрацию антител. Ордината показывает кратность изменения уровня экспрессии CD25, полученного через 3 дня после добавления антитела к CD8-положительной Т-клетке при асците. □ и ′, соответственно, показывают средние значения кратности изменений уровня экспрессии CD25 при каждой концентрации контрольного антитела и анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела. Планка погрешности показывает стандартное отклонение.

[Фиг. 11-1] На фиг. 11-1 показан противоопухолевый эффект анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела в модели перитонеальной диссеминации рака желудка. Ордината показывает среднее значение количества светового излучения люциферина, вызванного люциферазой, экспрессируемой в клетке 60As6-Luc/GFP в брюшной полости. Планка погрешностей показывает стандартную ошибку. Абсцисса показывает дозу антитела. Вероятность значимости, р-значение, получают путем сравнения количества излучения света в контрольной группе с количеством излучения света в группе введения анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела с помощью критерия множественного сравнения Даннета. На чертеже, ** показывает группу, имеющую р-значение меньше уровня значимости 0,01.

[Фиг. 11-2] На фиг. 11-2 показано влияние анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела на число дней выживания в модели перитонеальной диссеминации рака желудка. Ордината показывает выживаемость. Абсцисса показывает количество дней, прошедших после трансплантации раковых клеток. Анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело и размноженные рап Т-клетки вводят на 7 и 10 день после трансплантации 60As6-Luc/GFP, показанной п.

[Фиг. 12] На фиг. 1-2 показаны результаты измерения с помощью проточной цитометрии связывания 16B11 с различными линиями раковых клеток. Абсцисса чертежа показывает интенсивность флуоресценции, и ордината показывает количество клеток. На чертеже, белая область указывает на связывание антитела отрицательного контроля, и темно-серая область указывает на связывание 16B11.

[Фиг. 13-1] На фиг. 13-1 показана цитотоксическая активность против различных линий раковых клеток в совместной культуре мононуклеарных клеток периферической крови человека с анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическим антителом. Абсцисса показывает концентрацию антитела, и ордината показывает количество жизнеспособных клеток (%), полученное через 3 дня после добавления антитела каждой линии раковых

клеток, когда количество жизнеспособных клеток без добавления антител составляет 100%. Каждый символ показывает среднее значение (четыре повтора) количества жизнеспособных клеток (%) каждой линии раковых клеток при каждой концентрации анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела.

[Фиг. 13-2] На фиг. 13-2 показан чертеж, иллюстрирующий индуцированную экспрессию CD25, которая отражает активацию CD4-положительных Т-клеток, вызванную анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическим антителом, в совместной культуре моноклеарных клеток периферической крови человека и различных линий раковых клеток. Абсцисса показывает концентрацию антител. Ордината показывает кратность изменения уровня экспрессии CD25 в CD4-положительных Т-клетках, полученной через 3 дня после добавления антитела. Каждый символ показывает среднее значение (четыре повтора) кратности изменений уровня экспрессии CD25 при каждой концентрации анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела.

[Фиг. 13-3] На фиг. 13-3 показан чертеж, иллюстрирующий индуцированную экспрессию CD25, которая отражает активацию CD8-положительных Т-клеток, вызванную анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическим антителом, в совместной культуре моноклеарных клеток периферической крови человека и различных линий раковых клеток. Абсцисса показывает концентрацию антител. Ордината показывает кратность изменения уровня экспрессии CD25 в CD8-положительных Т-клетках, полученной через 3 дня после добавления антитела. Каждый символ показывает среднее значение (четыре повтора) кратности изменений уровня экспрессии CD25 при каждой концентрации анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела.

[Фиг. 14] На фиг. 14 показан противоопухолевый эффект анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела в модели подкожной опухоли с РВМС человека - привитыми НТ-29 клетками. На фиг. 14-1 показано среднее значение объема опухоли через каждое количество дней после начала введения антитела, и планка погрешности показывает стандартную ошибку. На фиг. 14-2 показано значение объема опухоли у каждого человека через 11 дней после начала введения, горизонтальная линия показывает среднее значение и стандартную ошибку, и абсцисса показывает дозу антитела. Значимую вероятность, р-значение, получают путем сравнения объема опухоли в группе, получавшей PBS, с объемом опухоли в группе, получавшей анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело, с помощью критерия множественного сравнения Даннетта. На чертеже, ** показывает группу, имеющую р-значение меньше уровня значимости 0,01.

ОПИСАНИЕ ВАРИАНТОВ ОСУЩЕСТВЛЕНИЯ

[0014] Настоящее изобретение будет подробно описано ниже.

[0015] <Определения>

Используемые в настоящем документе термины имеют значение, обычно используемое специалистами в данной области техники, если иное не указано ниже.

[0016] Антитело (или иммуноглобулин) относится к гликопротеину, имеющему четырехцепочечную структуру симметричной Y-образной структуры, состоящей из двух

тяжелых цепей, имеющих одну последовательность, и двух легких цепей, имеющих одну последовательность. Антитела делятся на пять классов IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Основная структура молекулы антитела является общей для всех классов, и две тяжелые цепи с молекулярной массой от 50000 до 70000 и две легкие цепи с молекулярной массой от 20000 до 30000 связаны дисульфидной связью или нековалентной связью с образованием молекулы антитела, имеющей Y-образную четырехцепочечную структуру с молекулярной массой от 150000 до 190000. Тяжелая цепь состоит из полипептидной цепи, обычно содержащей примерно 440 аминокислот, имеет структуру, характерную для каждого класса, и обозначаемую как Ig γ , Ig μ , Ig α , Ig δ и Ig ϵ , соответственно, соответствующую IgG, IgM, IgA, IgD и IgE. Кроме того, IgG подразделяется на подклассы IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4, и тяжелые цепи, соответствующие этим подклассам, соответственно обозначаются как Ig γ 1, Ig γ 2, Ig γ 3 и Ig γ 4. Легкая цепь состоит из полипептидной цепи, обычно содержащей примерно 220 аминокислот, и, как известно, делится на легкую цепь L и легкую цепь K, которые, соответственно, обозначаются как Ig λ и Ig κ . Два типа легких цепей могут спариваться с любым типом тяжелых цепей.

[0017] Тяжелая цепь имеет четыре (пять в Ig μ и Ig ϵ) внутрицепочечных дисульфидных связи молекулы антитела, и легкая цепь имеет две внутрицепочечные дисульфидные связи, и одна петля образована с каждым 100-110 аминокислотными остатками. Трехмерная структура петель аналогична, и составляющая единица обозначается как домен. Как в тяжелой цепи, так и в легкой цепи, домен, расположенный на N-конце, обозначен как переменная область, которая, как известно, имеет различные аминокислотные последовательности, даже если антитело получено из одного и того же класса (или подкласса) животных одного и того же вида, и вовлечен в связывание, специфичное для связи антитело-антиген. Аминокислотная последовательность домена на C-концевой стороне ниже переменной области по существу постоянна в каждом классе или подклассе, и этот домен обозначается как константная область. Тяжелая цепь имеет, от N-конца к C-концу, переменную область тяжелой цепи (VH) и константную область тяжелой цепи (CH). CH дополнительно делится на три домена: домен CH1, домен CH2 и домен CH3, расположенные в указанном порядке с N-концевой стороны. Легкая цепь имеет, от N-конца к C-концу, переменную область легкой цепи (VL) и константную область легкой цепи (CL).

[0018] Три определяющие комплементарность области (CDR), присутствующие в каждой из VH и VL, очень сильно различаются по аминокислотной последовательности и вносят вклад в переменность переменных областей. CDR представляют собой области, присутствующие на N-конце каждой из тяжелой цепи и легкой цепи в порядке CDR1, CDR2 и CDR3 и состоящие из примерно 5-10 аминокислотных остатков и образующие антигенсвязывающий сайт. С другой стороны, часть, за исключением CDR в переменной области, обозначена как каркасная область (FR), которая включает FR1-FR4, и изменение аминокислотной последовательности среди них сравнительно невелико.

[0019] Обработка антитела протеолитическим ферментом папаином дает три

фрагмента антитела. Два фрагмента на N-концевой стороне обозначены как Fab (антигенсвязывающие фрагменты; фрагмент, антигенсвязывающий) области. В настоящем документе «Fab область» относится к области, состоящей из VH и CH1 домена тяжелой цепи и легкой цепи (включая VL и CL), которая связывается с антигеном на концевой части в антигенсвязывающем сайте, образованном Fab областью. В настоящем документе, термин «фрагмент тяжелой цепи» относится к фрагменту, состоящему из VH и CH1 домена тяжелой цепи, включенного в Fab область.

Кроме того, фрагмент на C-концевой стороне обозначается как Fc (кристаллизуемый фрагмент; фрагмент, кристаллизуемый) область. В настоящем документе, термин «Fc полипептид» относится к полипептиду, состоящему CH2 из домена и CH3 домена тяжелой цепи, и термин «Fc область» относится к комплексу, состоящему из двух Fc полипептидов.

Фрагмент тяжелой цепи и Fc полипептид связаны друг с другом посредством части, обозначенной как шарнирная область. Кроме того, две тяжелые цепи антитела связаны друг с другом дисульфидом в шарнирной области.

[0020] В настоящем документе термин «антиген» используется в общеупотребительном смысле и, в частности, используется как термин для молекулы или части молекулы, с которой может специфически связываться антигенсвязывающий белок, такой как антитело или антигенсвязывающий фрагмент. Антиген может представлять собой молекулу, такую как белки и нуклеиновые кислоты. Один антиген может иметь один или несколько эпитопов, способных взаимодействовать с разными антителами, и подобное.

[0021] В настоящем документе «эпитоп» или «антигенная детерминанта» означает специфическую структурную единицу антигена, которую распознает и с которой связывается антигенсвязывающий белок, и включает любую детерминанту, которая может быть связана антигенсвязывающим белком, такую как антитела или T-клеточные рецепторы. Эпитопные детерминанты могут включать химически активные поверхностные группы молекул, такие как аминокислоты, боковые цепи сахаров, фосфорильные группы или сульфонильные группы, и могут иметь специфические особенности трехмерной структуры и/или специфические особенности заряда. Когда антиген представляет собой белок, он содержит определенную аминокислоту, которая непосредственно контактирует с антителом или подобным. Как правило, антитела, специфичные к конкретному антигену-мишени, преимущественно распознают эпитопы на антигене-мишени в сложной смеси белков и/или макромолекул. Эпитопы часто состоят из контактирующих с поверхностью остатков аминокислот и/или боковых цепей сахаров, обычно состоящих из последовательности 6-10 аминокислот или 5-8 моносахаридов. Эпитопы могут иметь уникальные трехмерные структурные характеристики и уникальные характеристики заряда. Эпитопы могут включать аминокислотные остатки, которые непосредственно участвуют в связывании, и другие аминокислотные остатки, которые не участвуют непосредственно в связывании. Эпитоп, с которым связывается антигенсвязывающий белок, может быть идентифицирован с использованием способов, хорошо известных специалистам в данной области техники, таких как масс-спектрометрия (например, масс-

спектрометрия с обменом водорода/дейтерия (HDX-MS)), аланин-сканирующий мутагенез, анализ кристаллов и конкуренция пептидов.

[0022] В настоящем документе термин «конкуренция» или «конкурировать» означает, что, когда два или несколько антител добавляют к реакционному раствору одновременно или непрерывно, одно антитело предотвращает связывание другого антитела с антигеном, что приводит к снижению способности связывания другого антитела с антигеном.

[0023] В настоящем документе термин «антигенсвязывающий фрагмент» относится к молекуле, обладающей антигенсвязывающей активностью, полученной из антитела и содержащей по меньшей мере одну полипептидную цепь. Типовые примеры антигенсвязывающего фрагмента включают одноцепочечный фрагмент вариабельной области (scFv), Fab фрагмент, Fab' фрагмент и F(ab')₂ фрагмент. scFv представляет собой одновалентный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH и VL, связанные через линкер. Fab фрагмент представляет собой одновалентный антигенсвязывающий фрагмент, состоящий из фрагмента, содержащего легкую цепь и домены VH и CH1 тяжелой цепи. Fab' фрагмент представляет собой одновалентный антигенсвязывающий фрагмент, состоящий из фрагмента, содержащего легкую цепь, домены VH и CH1 тяжелой цепи и часть шарнирной области, и в этой части шарнирной области, цистеиновый остаток, составляющий S-S связь между тяжелыми цепями. F(ab')₂ фрагмент представляет собой двухвалентную молекулу, в которой Fab' фрагменты связаны друг с другом дисульфидной связью. Одновалентность означает, что включен один антигенсвязывающий сайт, и двухвалентность означает, что включены два антигенсвязывающих сайта.

В настоящем документе, термин «scFv область» относится к области, содержащей одновалентный антигенсвязывающий фрагмент, содержащий VH и VL, связанные друг с другом через линкер.

[0024] Неполное антитело также является разновидностью антигенсвязывающего фрагмента. Неполное антитело включает одну Fab область и одну Fc область и имеет структуру, в которой фрагмент тяжелой цепи Fab области связан с одним из двух Fc полипептидов Fc области. В одном аспекте, одноцепочечное антитело включает одну тяжелую цепь (VH, CH1 домен, шарнирную область и Fc полипептиды (CH2 домен и CH3 домен)), одну легкую цепь (VL и CL домен) и Fc полипептиды.

[0025] В настоящем документе термин «мультиспецифическое антитело» относится к антителу, способному специфически связываться с двумя или несколькими различными антигенами, и называется, например, биспецифическим антителом или триспецифическим антителом, в зависимости от количества связываемых антигенов. Мультиспецифические антитела включают комплекс из двух или нескольких антител и/или антигенсвязывающих фрагментов, каждый из которых способен связываться с другим антигеном. Используемые в настоящем документе «антитела» включают мультиспецифические антитела, если в контексте не указано иное.

[0026] В настоящем документе термин «биспецифическое антитело» относится к

антителу, способному специфически связываться с двумя разными антигенами. Термин «анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело» означает биспецифическое антитело, обладающее активностью связывания с TSPAN8 и активностью связывания с CD3.

[0027] В настоящем документе термин «антитело человека» относится к антителу, имеющему аминокислотную последовательность иммуноглобулина человека. В настоящем документе термин «гуманизированное антитело» относится к антителу, в котором часть, большая часть или все аминокислотные остатки, за исключением CDR, заменены аминокислотными остатками, полученными из молекулы иммуноглобулина человека. Способ гуманизации конкретно не ограничен, и может быть получено гуманизированное антитело, например, в соответствии с патентом США № 5225539, патентом США № 6180370 и подобными.

[0028] Номер аминокислотного остатка антитела, используемого в настоящем документе, может быть указан путем указания нумерации Kabat или индекса EU (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., 1991, NIH Publication No. 91-3242) в соответствии с этими системами нумерации.

[0029] В настоящем документе термин «первый» или «второй» используется для удобного различения двух или нескольких типов частей. Использование такого термина не предназначено для передачи определенного порядка или значения, если не указано иное.

[0030] В настоящем документе термин «связь» или «связанный» означает, что множество компонентов (таких как Fab область и Fc полипептид) связаны друг с другом прямо или через множество посредников (таких как пептидный линкер). В настоящем документе термин «пептидный линкер» означает один или несколько произвольных аминокислотных остатков, которые могут быть введены с помощью генной инженерии для связывания переменных областей друг с другом. Длина пептидного линкера, используемого в настоящем изобретении, конкретно не ограничена и может быть соответствующим образом выбрана специалистами в данной области техники в зависимости от цели.

[0031] В настоящем документе термин «идентичность» означает значение идентичности, полученное с использованием EMBOSS Needle (Nucleic Acids Res., 2015, Vol. 43, p. W580-W584) с параметрами, полученными по умолчанию. Параметры:

Штраф за открытие гэпа=10

Штраф за продолжение гэпа=0,5

Матрица=EBLOSUM62

Штраф за внесение концевого гэпа=ложь.

[0032] В настоящем документе «субъект» означает человека или других животных, нуждающихся в профилактике или лечении. В некоторых вариантах осуществления, речь идет о человеке, нуждающемся в профилактике или лечении.

[0033] <Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по изобретению>

Настоящее изобретение предлагает биспецифическое антитело, которое связывается

с TSPAN8 и CD3 (называемое также «анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело») следующим образом:

Биспецифическое антитело, которое связывается с TSPAN8 и CD3, содержащее:

(a) Fab область анти-TSPAN8 антитела, состоящую из: фрагмента тяжелой цепи, содержащего переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела; и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела;

(b) область анти-CD3-scFv, содержащую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD3- антитела; и

(c) Fc область, состоящую из первого Fc полипептида, связанного с фрагментом тяжелой цепи Fab области (a), и второго Fc полипептида, связанного с анти-CD3-scFv областью (b).

[0034] Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению имеет структуру, содержащую одну Fab область первого антитела, scFv область второго антитела и одну Fc область. Антитело, имеющее такую структуру, обозначено как «антитело открывалка» (Международная публикация № 2014/110601). В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой антитело человека или гуманизированное антитело.

[0035] Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит, в качестве Fab области, Fab область анти-TSPAN8 антитела, содержащую фрагмент тяжелой цепи, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, и легкую цепь, содержащую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела.

[0036] В одном аспекте, переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6. Переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности кислотная последовательность из аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8.

[0037] В одном аспекте, переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10. Переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в

SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0038] В одном аспекте, переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8.

[0039] В одном аспекте, переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0040] В качестве константной области тяжелой цепи, используемой в качестве происхождения CH1 домена фрагмента тяжелой цепи Fab области анти-TSPAN8 антитела, может быть выбрана любая из константных областей I γ , I μ , I α , I δ и I ϵ . I γ может быть выбрана, например, из I γ 1, I γ 2, I γ 3 и I γ 4. В одном аспекте, фрагмент тяжелой цепи Fab области анти-TSPAN8 антитела содержит CH1 домен, полученный из константной области I γ 1 человека.

[0041] В качестве CL легкой цепи Fab области анти-TSPAN8 антитела может быть выбрана любая из константных областей I λ и I κ . В одном аспекте, Fab область анти-TSPAN8 антитела содержит CL, которая представляет собой константную область I κ . В одном аспекте, легкая цепь анти-TSPAN8 антитела содержит CL, которая представляет собой константную область I κ .

[0042] В одном аспекте, Fab область анти-TSPAN8 антитела состоит из фрагмента тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-219 в SEQ ID NO: 6, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В одном аспекте, Fab область анти-TSPAN8 антитела состоит из фрагмента тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-219 в SEQ ID NO: 10, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0043] Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит в качестве scFv области анти-CD3-scFv область, содержащую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела. В анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическом антителе по настоящему изобретению, могут использоваться scFv область анти-CD3 антитела, известного в данной области техники, или scFv область анти-CD3 антитела, полученная на основе информации о последовательности переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи анти-CD3-антитела, известного в данной области техники. В качестве известного анти-CD3 антитела известны клоны OKT3, UTCH1, L2K, TR66 и подобные, и их последовательности используются в качестве биспецифических антител (Pharmacol. Ther., 2018, Vol. 182, p. 161-175).

[0044] В одном аспекте, переменная область тяжелой цепи анти-CD3 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14. Переменная область легкой цепи анти-CD3-антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14.

[0045] В одном аспекте, переменная область тяжелой цепи анти-CD3 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменная область легкой цепи анти-CD3-антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14.

[0046] В анти-CD3-scFv области, тип и длина пептидного линкера, связывающего переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD 3-антитела, специально не ограничены, но могут быть надлежащим образом выбраны специалистами в данной области техники. Длина предпочтительно составляет 5 или более аминокислот (и верхний предел особо не ограничивается, но обычно составляет 30 или менее аминокислот, и предпочтительно, 20 или менее аминокислот), и особенно предпочтительно, 15 аминокислот. В качестве пептидного линкера можно использовать, например, линкер глицин-серин (линкер GS) или линкер глицин-лизин-пролин-глицин-серин (линкер GKPGS). Примеры такого линкера включают следующие:

Ser;
 Gly-Ser;
 Gly-Gly-Ser;
 Ser-Gly-Gly;
 Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 15);
 Ser-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 16);
 Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 17);
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 18);
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 19);
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 20);
 Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO: 21);
 Ser-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly-Gly (SEQ ID NO: 22);
 (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)_n;
 (Ser-Gly-Gly-Gly-Gly)_n;
 Gly-Lys-Pro-Gly-Ser (SEQ ID NO: 23); и

(Gly-Lys-Pro-Gly-Ser)_n.

В приведенном выше, *n* означает целое число, равное 1 или более. Длина и последовательность пептидного линкера могут быть надлежащим образом выбраны специалистами в данной области техники в зависимости от цели.

[0047] В одном аспекте, анти-CD3-scFv область состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-254 в SEQ ID NO: 14.

[0048] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащая CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2 состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связан со вторым Fc полипептидом. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела вариабельной области тяжелой цепи, содержащий CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из

аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12; и полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0049] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связанную с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12; и полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0050] В анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическом антителе по настоящему изобретению, в качестве константной области тяжелой цепи, используемой в качестве происхождения первого Fc полипептида, и второго Fc полипептида, содержащегося в Fc области, может быть выбрана любая из константных областей I γ , I μ , I α , I δ и I ϵ . I γ

может быть выбрана, например, из I γ 1, I γ 2, I γ 3 и I γ 4. В одном аспекте, первый Fc полипептид и второй Fc полипептид представляют собой Fc полипептид, полученный из константной области I γ 1 человека.

[0051] Fc область анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по настоящему изобретению может содержать мутацию, которая ухудшает антителозависимую цитотоксичность (ADCC) или комплементзависимую цитотоксичность (CDC). L234A представляет собой замену лейцина на аланин в аминокислотном положении 234 в константной области I γ 1 человека в соответствии с индексом EU. L235A представляет собой замену лейцина на аланин в аминокислотном положении 235 в константной области I γ 1 человека в соответствии с индексом EU. Аминокислотная мутация L234A и L235A константной области I γ 1 человека обозначена как «мутация LALA». Известно, что эта мутация ухудшает антителозависимую цитотоксичность и комплементзависимую цитотоксичность антитела (Mol. Immunol., 1992, Vol. 29, p. 633-639; и J. Immunol., 2000, Vol. 164, p. 4178-4184).

[0052] Fc область анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по настоящему изобретению может дополнительно содержать мутацию, основанную на другой известной методике. Например, Fc область может содержать мутацию N297G (Protein Cell, 2018, Vol. 9, p. 63-73) или мутацию, основанную на методе «выступы во впадины» (далее также именуемую «мутацией «выступы во впадины»»). В соответствии с методом «выступы во впадины», боковая цепь аминокислоты, присутствующая в области СН3 одной тяжелой цепи, заменяется более крупной боковой цепью (выступом), и боковая цепь аминокислоты, присутствующая в области СН3 другой тяжелой цепи, заменяется боковой цепью меньшего размера (впадиной), и, таким образом, гетеродимеризация тяжелых цепей ускоряется за счет выступа, расположенного внутри впадины, и таким образом может быть эффективно получена представляющая интерес гетеродимеризованная молекула антитела (Nature, 1994, Vol. 372, p. 379-383; Nature Biotech, 1998, Vol. 16, p. 677-681; J. Mol. Biol., 1997, Vol. 270, p. 26-35; и Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2013, Vol. 110, p. E2987-E2996).

[0053] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит Fc область, содержащую аминокислотные мутации L234A и L235A (мутацию LALA). В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит Fc область, содержащую мутацию N297G. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит Fc область, содержащую мутацию «выступы во впадины». В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит Fc область, содержащую одну или несколько мутаций аминокислотной мутации L234A и L235A (мутацию LALA), мутацию N297G и мутацию «выступы во впадины». В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит Fc область, содержащую аминокислотные мутации L234A и L235A (мутацию LALA), мутацию N297G и мутацию «выступы во

впадины». В одном аспекте, мутация «выступы во впадины», содержащаяся в анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическом антителе по настоящему изобретению, представляет собой мутацию T366W в одном Fc полипептиде, включенном в Fc область, и мутации T366S, L368A и Y407V (см. международную публикацию № 1998/050431) в другом Fc полипептиде, включенном в Fc область.

[0054] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит Fc область, состоящую из первого Fc полипептида, состоящего из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 235-451 в SEQ ID NO: 6, и второй Fc полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 270-486 в SEQ ID NO: 14.

[0055] В настоящем документе, аминокислотные мутации, такие как мутация LALA, мутация N297G и мутация «выступ во впадину», описаны на основании аминокислотных положений в константной области I γ 1 человека в соответствии с индексом EU. Например, как описано выше, L234A представляет собой замену лейцина на аланин в аминокислотном положении 234 в константной области I γ 1 человека в соответствии с индексом EU.

[0056] В анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическом антителе по настоящему изобретению, фрагмент тяжелой цепи, содержащий вариабельную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, может быть связан с Fc полипептидом (первым Fc полипептидом) через шарнирную область для образования тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела.

Кроме того, в анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическом антителе по настоящему изобретению, анти-CD3-scFv область может быть связана с Fc полипептидом (вторым Fc полипептидом) через шарнирную область.

[0057] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи, содержащий вариабельную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, связан с первым Fc полипептидом через шарнирную область. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит полипептид, в котором анти-CD3-scFv область связана со вторым Fc полипептидом через шарнирную область. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи, содержащий вариабельную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, связан с первым Fc полипептидом через шарнирную область, и полипептид, в котором анти-CD3-scFv область связан со вторым Fc полипептидом через шарнирную область.

[0058] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в

SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом через шарнирную область; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 3; и полипептид, в котором анти-CD3-scFv-область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом через шарнирную область. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1 состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом через шарнирную область; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и вариабельной области легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащей CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом

через шарнирную область.

[0059] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом через шарнирную область; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом через шарнирную область. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом через шарнирную область; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом через шарнирную область.

[0060] В одном аспекте, тяжелая цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, связанный с первым Fc полипептидом через шарнирную область, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 или 10. В одном аспекте, тяжелая цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, связанный с первым Fc полипептидом через шарнирную область, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6. В одном аспекте, легкая цепь анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 или 12. В одном аспекте, легкая цепь анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8. В одном аспекте, полипептид, где область анти-CD3-scFv связана со вторым Fc полипептидом через шарнирную область, имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 14. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6 или 10, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8

антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела и легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8 или 12, связан с первым полипептидом, и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где область анти-CD3-scFv связана со вторым Fc полипептидом. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению содержит тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи вариабельной области тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом, и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, в котором область анти-CD3-scFv связана со вторым Fc полипептидом.

[0061] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом, легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и полипептид, где анти-CD3-scFv область, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0062] В настоящем документе, термин «пост-трансляционная модификация» относится к тому, что антитело, экспрессируемое в клетке, модифицируется после трансляции. Примеры пост-трансляционной модификации включают модификации, такие как пироглутамилирование, гликозилирование, окисление, дезамидирование или гликирование глутамина или глутаминовой кислоты на N-конце тяжелой цепи и удаление лизина путем разрезания лизина на C-конце тяжелой цепи карбоксипептидазой. Известно, что такая пост-трансляционная модификация вызывается различными антителами (J. Pharm. Sci., 2008, Vol.97, p.2426-2447).

[0063] В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению может быть пост-трансляционно модифицировано. В одном аспекте, пост-трансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце вариабельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи. В этой области техники известно, что пост-трансляционная модификация пироглутамилированием на N-конце или делецией лизина на C-конце не влияет на активность антитела (Analytical Biochemistry, 2006, Vol. 348, p. 24-39).

[0064] Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению связывается с TSPAN8 человека (№ доступа GENBANK NM_004616.2) и комплексным белком CD3εδ человека (CD3ε: № доступа GENBANK NM_000733.3, CD3δ: № доступа GENBANK NM_000732.4 или NM_001040651.1). С помощью известного способа измерения активности связывания можно проверить, связывается ли антитело с TSPAN8 человека и комплексным белком CD3εδ человека. Примеры способа измерения активности связывания включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA) и проточную цитометрию. Например, при использовании ELISA, можно применять способ,

описанный в примере 8, и при использовании проточной цитометрии, например, можно применять способ, описанный в примере 1.

[0065] Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению может быть получено специалистами в данной области техники способом, известным в данной области техники, на основе информации о последовательности и подобной анти-TSPAN8 антитела, и варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи анти-CD3-scFv области, описанных в настоящем документе. Кроме того, анти-CD3-scFv область анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по настоящему изобретению может быть получена специалистами в данной области техники способом, известным в данной области техники, на основе информации о последовательности и подобных, варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи известного анти-CD3-антитела. В одном аспекте, анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению представляет собой гуманизированное антитело или антитело человека. При получении гуманизированного антитела, обратная мутация может быть соответствующим образом введена с использованием способа, хорошо известного специалистам в данной области техники (Bioinformatics, 2015, Vol. 31, p. 434-435). Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению может быть получено, но не ограничиваясь ими, например, способом, описанным ниже в разделе <Способ получения биспецифического антитела по изобретению и биспецифическое антитело по изобретению, полученное способом>.

[0066] <Полинуклеотид биспецифического антитела по изобретению>

Настоящее изобретение также предлагает описанные ниже полинуклеотиды, которые можно использовать для получения анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по настоящему изобретению (также называемого «полинуклеотидом биспецифического антитела по настоящему изобретению»).

(1) Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела и первый Fc полипептид;

(2) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела; и

(3) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, содержащий анти-CD3-scFv область, и полипептид, содержащий второй Fc полипептид.

[0067] В одном аспекте полинуклеотида (1), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из

аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 6, связан с первым Fc полипептидом; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий варибельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 10, связан с первым Fc полипептидом.

[0068] В одном аспекте полинуклеотида (1), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, в которой фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий варибельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий варибельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом.

[0069] В одном аспекте полинуклеотида (1), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом.

[0070] В одном аспекте полинуклеотида (2), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую варибельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0071] В одном аспекте полинуклеотида (2), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0072] В одном аспекте полинуклеотида (2), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

[0073] В одном аспекте полинуклеотида (3), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой следующий полинуклеотид:

полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0074] В одном аспекте полинуклеотида (3), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой следующий

полинуклеотид:

полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0075] В одном аспекте полинуклеотида (3), описанного выше, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где область анти-CD3-scFv, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-4, связана со вторым Fc полипептидом.

[0076] Полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению может быть получен специалистами в данной области техники на основе его нуклеотидной последовательности с использованием способа, известного в данной области техники. Например, полинуклеотид биспецифического антитела по настоящему изобретению может быть синтезирован с использованием способа генного синтеза, известного в данной области техники. В качестве способа синтеза гена можно использовать любой из различных способов, известных специалистам в данной области техники, таких как способ синтеза гена антитела, описанный в международной публикации № 90/07861.

[0077] <Вектор экспрессии для биспецифического антитела по изобретению>

Настоящее изобретение также предлагает вектор экспрессии, содержащий полинуклеотиды, описанные в следующих пунктах (1)-(3) для биспецифического антитела по настоящему изобретению (называемый также «вектор экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению»). Эти полинуклеотиды могут содержаться, соответственно, в разных векторах, или множество полинуклеотидов может содержаться в одном векторе.

(1) Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом;

(2) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела; и

(3) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где область анти-CD3-scFv связана с полипептидом, содержащим второй Fc полипептид.

[0078] В одном аспекте, вектор экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, содержащий полинуклеотид (1), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела,

содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом.

[0079] В одном аспекте вектора экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (1), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом.

[0080] В одном из аспектов вектора экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (1), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом.

[0081] В одном из аспектов вектора экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (2), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в

SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0082] В одном аспекте вектора экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (2), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0083] В одном аспекте вектора экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (2), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

[0084] В одном аспекте вектора экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (3), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, указанный ниже:

полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0085] В одном аспекте вектора экспрессии для биспецифического антитела по

настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (3), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, указанный ниже:

полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0086] В одном из аспектов вектора экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (3), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где область анти-CD3-scFv, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-4, связана со вторым Fc полипептидом.

[0087] В одном аспекте, вектор экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой вектор экспрессии, содержащий один или несколько полинуклеотидов, выбранных из следующих (a)-(e):

(a) полинуклеотид, имеющий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом;

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных

положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12; и

(е) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0088] В одном аспекте, вектор экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой вектор экспрессии, содержащий один или несколько полинуклеотидов, выбранных из следующих (a)-(e):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом;

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12; и

(е) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных

положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0089] В одном аспекте, вектор экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению представляет собой вектор экспрессии, содержащий один или несколько полинуклеотидов, выбранных из следующих (a)-(c):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь антитела к TSPAN8, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где область анти-CD3-scFv связана со вторым Fc полипептидом.

[0090] Вектор экспрессии биспецифического антитела по настоящему изобретению специально 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, клетка растения или дрожжи) и/или прокариотическая клетка (такая как *E.coli*). Примеры вектора экспрессии включают плазмидный вектор и вирусный вектор. В качестве плазмидного вектора можно использовать, например, серию 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 подобные. В качестве вирусного вектора можно использовать, например, лентивирус, аденовирус, ретровирус или аденоассоциированный вирус. Например, когда для введения полинуклеотида по настоящему изобретению в клетку используют лентивирус, в качестве лентивируса можно использовать вектор pLVSI-CMV/EF1 α (Takara Bio Inc.), вектор pLenti (Thermo Fisher Scientific) или подобный. В одном аспекте, вектор, используемый в векторе экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, представляет собой pcDNATM 3.4-TOPO(R) (Thermo Fisher Scientific) или pcDNATM 3.1 (Thermo Fisher Scientific).

[0091] Вектор экспрессии биспецифического антитела по настоящему изобретению может включать промотор, функционально 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, промотор актина, промотор EF (фактора элонгации) 1 α и промотор теплового шока. Примеры промотора для экспрессии полинуклеотида биспецифического антитела по настоящему изобретению в бактерии (например, принадлежащей 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.

[0092] Когда в качестве клетки-хозяина используют клетку животного, клетку насекомого или дрожжи, вектор экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению может включать иницирующий кодон и стоп-кодон. В этом случае, могут быть включены энхансерная последовательность, 5'- и 3'-нетранслируемые области гена, кодирующего антитело по настоящему изобретению, или его тяжелая или легкая цепь, секреторная сигнальная последовательность, место сплайсинга, сайт полиаденилирования, реплицируемая единица и подобные. Когда *E. coli* используют в качестве клетки-хозяина, вектор экспрессии по настоящему изобретению может включать иницирующий кодон, стоп-кодон, терминаторную область и реплицируемую единицу. Вектор экспрессии по настоящему изобретению может включать маркерный ген селекции лекарственного средства, обычно используемый в зависимости от цели (например, ген резистентности к тетрациклину, ген резистентности к ампициллину, ген резистентности к канамицину, ген резистентности к неомицину или ген дигидрофолатредуктазы).

[0093] <Трансформированная клетка-хозяин по изобретению>

Настоящее изобретение также относится к клетке-хозяину, трансформированной вектором экспрессии биспецифического антитела по настоящему изобретению (также называемой «трансформированной клеткой-хозяином по настоящему изобретению»). Трансформированная клетка-хозяин по настоящему изобретению может включать один или несколько полинуклеотидов для биспецифического антитела по настоящему изобретению, описанных в следующих пунктах (1)-(3), посредством трансформации вектором экспрессии для биспецифического антитела по настоящему изобретению, и в одном аспекте, трансформированная клетка-хозяин по настоящему изобретению включает все полинуклеотиды, описанные в следующих пунктах (1)-(3):

(1) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом;

(2) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела; и

(3) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где область анти-CD3-scFv связана с полипептидом, содержащим второй Fc полипептид.

[0094] Трансформируемая клетка-хозяин особо не ограничена, если она подходит для используемого вектора экспрессии и может экспрессировать антитело или слияние путем трансформации с вектором экспрессии. Примеры клеток-хозяев, подлежащих трансформации, включают различные клетки, в том числе обычные клетки, обычно используемые в данной области техники, и искусственно созданные клетки (например,

клетки животных (такие как клетка CHO-K1, клетка ExpiCHO-S(R), клетка CHO-K1SV, клетка CHO-DG44, клетка HEK293 и клетка NS0), клетки насекомых (такие как Sf9), бактерии (например, принадлежащие к роду *Escherichia*) и дрожжи (например, принадлежащие к роду *Saccharomyces* и роду *Pichia*). В одном аспекте, клетка-хозяин по настоящему изобретению представляет собой клетку CHO-K1 или клетку ExpiCHO-S.

[0095] Способ трансформации клетки-хозяина особо не ограничен, и, например, можно использовать способ, обычно применяемый специалистами в данной области техники, такой как способ с фосфатом кальция, способ электропорации или способ липофекции.

[0096] Отбор трансформированной клетки-хозяина может быть осуществлен способом, обычно применяемым специалистами в данной области техники. В качестве способа селекции можно использовать, например, способ селекции лекарственного средства с использованием маркерного гена селекции лекарственного средства и такого лекарственного средства, как тетрациклин, ампициллин, неомицин или гигромицин, или способ выделения клеток, такой как способ предельного разведения, способ сортировки отдельных клеток или способ сбора колоний.

[0097] В одном аспекте трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (1), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом.

[0098] В одном аспекте трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (1), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc

полипептидом; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом.

[0099] В одном аспекте трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (1), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом.

[0100] В одном аспекте трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (2), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0101] В одном аспекте трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (2), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0102] В одном аспекте трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (2), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислоты последовательность SEQ ID NO: 8.

[0103] В одном аспекте трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (3), описанный выше, клетка-хозяин содержит следующий полинуклеотид:

полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0104] В одном аспекте трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (3), описанный выше, клетка-хозяин содержит следующий полинуклеотид:

полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0105] В одном из аспектов трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (3), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-4, связана со вторым Fc полипептидом.

[0106] В одном аспекте, трансформированная клетка-хозяин по настоящему изобретению представляет собой клетку-хозяина, содержащую один или несколько полинуклеотидов, выбранных из следующих (a)-(e):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из

аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом;

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12; и

(e) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменная область легкой цепи анти-CD3-антитела, содержащая CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0107] В одном аспекте, трансформированная клетка-хозяин по настоящему изобретению представляет собой клетку-хозяин, содержащую один или несколько полинуклеотидов, выбранных из следующих (a)-(e):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом;

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12; и

(e) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0108] В одном аспекте, трансформированная клетка-хозяин по настоящему изобретению представляет собой клетку-хозяина, содержащую полинуклеотиды, выбранные из следующих (a)-(c):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-4, связана со вторым Fc полипептидом.

[0109] В одном аспекте, трансформированная клетка-хозяин по настоящему изобретению содержит полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной

последовательности SEQ ID NO: 6, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14.

[0110] <Способ получения биспецифического антитела по изобретению>

Настоящее изобретение также предлагает способ получения анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по настоящему изобретению (называемый также «способом получения по настоящему изобретению»). Способ получения по настоящему изобретению может включать стадию культивирования трансформированной клетки-хозяина, описанную в разделе «Трансформированная клетка-хозяин по изобретению», для экспрессии антитела в клетке или культуральном супернатанте, способ сбора, выделения и очистки антитела и подобное, но не ограничивается таким способом, при условии, что может быть получено анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению.

[0111] Трансформированную клетку-хозяина по настоящему изобретению можно культивировать известным способом. Условия культивирования, такие как температура, pH среды и время культивирования, могут быть соответствующим образом выбраны специалистами в данной области техники. Когда клеткой-хозяином является клетка животного, например, среда MEM (Science, 1959, Vol. 130, p. 432-437), содержащая примерно от 5 до 20% фетальной бычьей сыворотки, среда DMEM (Virol., 1959, Vol. 8, p. 396), среда RPMI-1640 (J. Am. Med. Assoc., 1967, Vol. 199, p. 519), среда 199 (Exp. Biol. Med., 1950, Vol. 73, p. 1-8) или подобные можно использовать в качестве среды. pH среды составляет, например, примерно от 6 до 8, и культивирование обычно проводят при температуре примерно от 30 до 40°C в течение примерно от 15 до 336 часов с аэрацией или перемешиванием, если это необходимо. Когда клеткой-хозяином является клетка насекомого, в качестве среды можно использовать, например, среду Грейса (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1985, Vol. 82, p. 8404), содержащую фетальную бычью сыворотку, или подобную. pH среды составляет, например, примерно от 5 до 8, и культивирование обычно проводят при температуре примерно от 20 до 40°C в течение примерно от 15 до 100 часов с аэрацией или перемешиванием, если это необходимо. Когда клеткой-хозяином является, например, *E. coli* или дрожжи, в качестве среды подходящим образом используется жидкая среда, содержащая источник питательных веществ. Питательная среда содержит, например, источник углерода, источник неорганического азота или источник органического азота, необходимый 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 желании, 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 подобные. pH среды составляет, например, примерно от 5 до 8. Когда клеткой-хозяином является *E. coli*, например, среда LB, среда M9 (Molecular Cloning, Cold Spring Harbour Laboratory, Vol. 3, A2.2) или подобная может быть использована в качестве среды. Культивирование обычно проводят при температуре примерно от 14 до 43°C в течение примерно от 3 до 24 часов с аэрацией или перемешиванием, если это необходимо. Когда клеткой-хозяином являются дрожжи, в качестве среды можно использовать, например, минимальную среду Буркхолдера (Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1980, Vol. 77, p. 4505) или подобная. Культивирование обычно проводят при температуре примерно от 20 до 35°C в течение примерно от 14 до 144 часов с аэрацией или перемешиванием, если это необходимо. Через такую культуру можно экспрессировать анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению.

[0112] Способ получения по настоящему изобретению может включать, в дополнение к стадии культивирования трансформированной клетки-хозяина по настоящему изобретению для экспрессии анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела, стадию сбора, выделения или очистки анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела из трансформированной клетки-хозяина. Примеры способа выделения или очистки включают способ, использующий растворимость, такой как высаливание или способ осаждения растворителем, способ, использующий разницу в молекулярной массе, такой как диализ, ультрафильтрация и гель-фильтрация, способ, использующий заряд, такой как ионообменная хроматография или хроматография на гидроксипатите, способ, использующий специфическую аффинность, такой как аффинная хроматография, способ, использующий разницу в гидрофобности, такой как высокоэффективная жидкостная хроматография с обращенной фазой, и способ, использующий разницу в изоэлектрической точке, такой как изоэлектрическое фокусирование. В одном аспекте, антитело, секретируемое в культуральном супернатанте, может быть очищено с помощью различных хроматографий, таких как колоночная хроматография с использованием колонки с белком А или колонки с белком G.

[0113] Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению включает анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело, полученное способом получения по настоящему изобретению.

[0114] <Фармацевтическая композиция или подобная биспецифического антитела по изобретению>

Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению включает фармацевтическую композицию, содержащую анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может быть приготовлена обычно применяемым способом с эксципиентом, обычно используемым в данной области техники, а именно с фармацевтическим эксципиентом, фармацевтическим носителем и

подобным. Примеры дозированной формы такой фармацевтической композиции включают парентеральные агенты, такие как инъекция и капля, и введение можно осуществлять путем внутривенного введения, подкожного введения, внутрибрюшинного введения и подобного. В составе, эксципиент, носитель, добавка или подобное, подходящие для дозированной формы, могут использоваться в фармацевтически приемлемом диапазоне.

[0115] Фармацевтическая композиция по настоящему изобретению может содержать пост-трансляционно модифицированный продукт анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по настоящему изобретению. Например, в настоящее изобретение может быть включена фармацевтическая композиция, содержащая антитело или подобное, содержащее обе или одну делецию лизина на С-конце и пироглутамилирование на N-конце.

[0116] В одном аспекте, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению, выбранное из следующих (a) и (b), и/или пост-трансляционно модифицированный продукт антитела:

(a) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащая CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи область анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом; и

(b) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область

тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12; и полипептид, где анти-CD3-scFv-область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную области легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0117] В одном аспекте, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению, выбранное из следующих (a) и (b), и/или пост-трансляционно модифицированный продукт антитела:

(a) биспецифическое антитело, содержащее: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом; и

(b) биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-

TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

[0118] В одном аспекте, фармацевтическая композиция по настоящему изобретению представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело, содержащее тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом, легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где анти-CD3-scFv область связана со вторым Fc полипептидом, и/или пост-трансляционно модифицированный продукт антитела.

[0119] Количества анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела и анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, добавляемые в состав, варьируются в зависимости от степени выраженности симптомов и возраста пациента, используемой дозированной формы состава, титра связывания антитела или подобного, и, например, может составлять примерно от 0,001 мг/кг до 100 мг/кг.

[0120] <Фармацевтическое применение анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по изобретению>

Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению и содержащая его фармацевтическая композиция могут быть использованы для лечения рака. Кроме того, настоящее изобретение охватывает способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по настоящему изобретению. Кроме того, настоящее изобретение охватывает анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по настоящему изобретению для применения при лечении рака. Кроме того, настоящее изобретение охватывает применение анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела по настоящему изобретению в производстве фармацевтической композиции для лечения рака. Рак, подлежащий лечению в соответствии с настоящим изобретением, специально не ограничен, и его примеры включают перитонеальную диссеминацию различных раковых клеток, рак желудка, рак легких, рак крови, такой как острый лимфоцитарный лейкоз (ALL), острый миелогенный лейкоз (AML), лимфому Ходжкина, неходжкинскую лимфому, В-клеточную лимфому, множественную миелому и Т-клеточную лимфому, солидный рак, такой как миелодиспластические синдромы, аденокарцинома, плоскоклеточный рак, аденоплоскоклеточный рак, недифференцированный рак, крупноклеточный рак, 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 толстой кишки, колоректальный рак, рак прямой кишки, рак тонкой кишки, рак желудка, рак пищевода, рак яичек, рак яичников и опухоль головного мозга, рак костной ткани, хрящевой ткани, жировой ткани, мышечной ткани, сосудистой ткани и кровеносных тканей, саркому, такую 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, плевроролечная бластома и ретинобластома.

[0121] <Анти-TSPAN8 антитело по изобретению>

В настоящем изобретении также предложено новое анти-TSPAN8 антитело против TSPAN8 человека, описанное ниже, или его связывающий фрагмент. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, предлагаемые в настоящем изобретении, могут совместно именоваться «анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению».

[0122] Настоящее изобретение предлагает анти-TSPAN8 антитело, которое селективно связывается с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, или его связывающий фрагмент.

[0123] В настоящем документе фраза «селективное связывание с раковой клеткой, экспрессирующей TSPAN8 человека» означает, что при сравнении активности связывания анти-TSPAN8 антитела с коммерчески доступным анти-TSPAN8 антителом (таким как TAL69 и REA443) или анти-TSPAN8 антителом, демонстрирующим тот же профиль связывания, что и коммерчески доступное анти-TSPAN8 антитело (такое как 9F6 и 18C10), интенсивность связывания с TSPAN8, экспрессируемым в раковой клетке человека, экспрессирующей TSPAN8, 3 раза или более, предпочтительно, 5 раз или более, более предпочтительно, 10 раз или более, и интенсивность связывания с TSPAN8, экспрессируемым в нормальной клетке, составляет 1/3 или менее, предпочтительно, 1/5 или менее, еще более предпочтительно, 1/10 или менее, по сравнению с имеющимися в продаже антителами или подобными. Интенсивность связывания антитела с клеткой можно рассчитать, например, с использованием значения MFI (средней интенсивности флуоресценции), полученного с помощью проточной цитометрии, описанной в примере 1, или значения Δ MFI, полученного путем вычитания MFI каждого изотипа из MFI каждого антитела. Альтернативно, интенсивность связывания антитела с клеткой может быть измерена и рассчитана также с помощью способа, обычно используемого специалистами в данной области техники, такого как ELISA, с использованием раковой клетки и нормальной клетки.

В настоящем документе термин раковая клетка, экспрессирующая TSPAN8 человека, относится к клетке, экспрессирующей TSPAN8 человека, выделенной от

онкологического больного, и может использоваться не только клетка перитонеального диссеминированного рака, полученная от пациента, описанная в примере 1-1, но также и линии раковых клеток, доступные в банке клеток, таком как Американская коллекция типовых культур (ATCC). В качестве линии раковых клеток можно использовать, например, не только линию клеток, полученную из асцитной жидкости пациента способом, описанным в примере 1-1, но также линии клеток, экспрессирующие TSPAN8, такие как AGS, KATOIII, SNU5, SNU16, SNU520, ANU719, NCI-N87, HT-29, LoVo, GP2d, AsPC-1, OE19, Li-7Hs746, NUGC-4, OCUM1 и MNK45. Кроме того, нормальная клетка относится к клетке, полученной из нормальной ткани, и может использоваться не только перитонеальная мезотелиальная клетка, полученная от пациента, используемая в примере 1-5, но также коммерчески доступные первичные культивируемые клетки или клеточные линии, такие как мононуклеарные клетки периферической крови человека, используемые в примере 1-3, и культивированные перитонеальные мезотелиальные клетки, использованные в примере 1-3. В одном аспекте, нормальная клетка экспрессирует TSPAN8. В другом аспекте, нормальная клетка, экспрессирующая TSPAN8, представляет собой перитонеальную мезотелиальную клетку, полученную от пациента, или культивированную перитонеальную мезотелиальную клетку, используемую в примере 1-3. В одном аспекте, нормальная клетка представляет собой клетку, не экспрессирующую TSPAN8. В другом аспекте, нормальная клетка, не экспрессирующая TSPAN8, представляет собой мононуклеарную клетку периферической крови человека, используемую в примере 1-3.

[0124] Настоящее изобретение также предлагает анти-TSPAN8 антитело, которое распознает часть белка TSPAN8 в качестве эпитопа, или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном аспекте, эпитоп представляет собой структурную единицу, состоящую из аминокислотной последовательности, содержащейся в области LEL TSPAN8. В другом аспекте, эпитоп представляет собой структурную единицу, состоящую из части области белка TSPAN8, представленной аминокислотной последовательностью 126-155 SEQ ID NO: 2. В одном аспекте, эпитоп представляет собой структурную единицу, состоящую из одной или нескольких аминокислотных последовательностей, содержащихся в части области белка TSPAN8, представленной аминокислотной последовательностью 126-155 SEQ ID NO: 2. В другом аспекте, эпитоп представляет собой структурную единицу, по меньшей мере содержащую аминокислоту в положении 131 SEQ ID NO: 2.

[0125] В одном аспекте, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одной аминокислотой, присутствующей в области TSPAN8 человека, в аминокислотных положениях 126-155 SEQ ID NO: 2. В другом аспекте, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент связывается по меньшей мере с одной аминокислотой, присутствующей в области TSPAN8 человека в аминокислотных положениях 126-155 SEQ ID NO: 2, и селективно связывается с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8.

[0126] В одном аспекте, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, по меньшей мере, связывается с аминокислотой в аминокислотном положении 131 в SEQ ID NO: 2, присутствующей в области TSPAN8 человека в аминокислотных положениях 126-155 в SEQ ID NO: 2. В одном аспекте, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, по меньшей мере, связывается с аминокислотой в аминокислотном положении 131 в SEQ ID NO: 2, присутствующей в области TSPAN8 человека в аминокислотных положениях 126-155 в SEQ ID NO: 2, и селективно связывается с раковой клеткой, экспрессирующей TSPAN8 человека.

[0127] Связывается ли анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент с аминокислотой, присутствующей в области TSPAN8 человека в аминокислотных положениях 126-155 в SEQ ID NO: 2 (например, аминокислотой в аминокислотном положении 131 в SEQ ID NO: 2), или нет, можно проверить с помощью способа идентификации эпитопа, описанного в примерах 4-1 и 4-2 настоящей заявки.

[0128] Настоящее изобретение дополнительно предлагает анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, показанное в (a) и (b) ниже:

(a) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотную последовательность из аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 4 и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 4, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO. 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотную последовательность из аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO. 12.

[0129] В одном аспекте, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее

вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0130] В качестве константной области тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению может быть выбрана любая из константных областей Igy, Igm, Igα, Igδ и Ige. Igy может быть выбрана, например, из Igy1, Igy2, Igy3 и Igy4. В одном аспекте, константная область тяжелой цепи представляет собой константную область Igy1, и представляет собой, например, константную область Igy1 человека. Кроме того, константная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению может содержать аминокислотную мутацию, такую как мутация LALA, приводящая к ухудшению ADCC или CDC. В качестве константной области легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, может быть выбрана любая из константных областей Igl и Igk. В одном аспекте, константная область легкой цепи представляет собой константную область Igk, и представляет собой, например, константную область Igk человека.

[0131] В одном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению представляет собой scFv, Fab, Fab', F(ab')₂ или одноцепочечное антитело.

[0132] В одном аспекте, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению представляет собой анти-TSPAN8 антитело, выбранное из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0133] Настоящее изобретение относится к анти-TSPAN8 антителу или его антигенсвязывающему фрагменту (в частности, в дальнейшем они совместно именуется «анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению»), описанному ниже в (a) - (d):

(a) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, с анти-TSPAN8 антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности

аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8;

(b) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, с анти-TSPAN8 антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений с 1-107 в SEQ ID NO: 12;

(c) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, с анти-TSPAN8 антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36; и

(d) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, с анти-TSPAN8 антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37.

[0134] Конкурентное анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению может быть получено, например, путем получения анти-TSPAN8 антитела человека с использованием клетки, экспрессирующей TSPAN8 человека, в качестве антигена, с использованием известной методики получения антител и проведения конкурентного теста на антитело, полученное для связывания конкурирующего анти-TSPAN8 антитела с клеткой, экспрессирующей TSPAN8 человека. Для конкурентного теста можно использовать способы, известные специалистам в данной области техники, такие как проточная цитометрия. Например, может быть использован конкурентный тест с использованием раковой клетки человека, экспрессирующей TSPAN8, описанный в примере 4-3. В качестве раковой клетки человека, экспрессирующей TSPAN8, используемой в конкурентном тесте, можно использовать различные клетки, описанные выше.

[0135] В одном аспекте, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, с анти-TSPAN8 антителом, содержащим тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4 и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, с анти-TSPAN8 антителом, содержащим тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности

SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0136] В одном аспекте, анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранный из следующих (c) и (d):

(c) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, с анти-TSPAN8 антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 34, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 36; и

(d) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, конкурирующее за связывание с раковой клеткой человека, экспрессирующей TSPAN8, с анти-TSPAN8 антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 35, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 37.

[0137] <Альтернативное биспецифическое антитело по изобретению>

Настоящее изобретение предлагает биспецифическое антитело, содержащее анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, связанный с антителом к поверхностному антигену Т-клетки или естественной клетки-киллера (NK), или его антигенсвязывающим фрагментом. Форма биспецифического антитела специально не ограничена, и оно может быть в любой форме, обычно используемой специалистами в данной области техники, например, антитела в различных формах, описанных в НЕ-ПАТЕНТНОЙ ЛИТЕРАТУРЕ 3 или 4.

[0138] Настоящее изобретение также предлагает следующее биспецифическое антитело:

биспецифическое антитело, которое связывается с TSPAN8 и поверхностным антигеном Т-клетки или NK-клетки, содержащее:

(a) Fab область анти-TSPAN8 антитела, состоящую из фрагмента тяжелой цепи, содержащего переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению;

(b) scFv область антитела к поверхностному антигену Т-клетки или NK-клетки, содержащую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антитела к поверхностному антигену Т-клетки или NK-клетки; и

(c) Fc область, состоящую из первого Fc полипептида, связанного с фрагментом тяжелой цепи Fab области (a), и второго Fc полипептида, связанного с scFv областью (b).

[0139] Альтернативные биспецифические антитела по настоящему изобретению могут быть легко получены специалистами в данной области техники с использованием способа, описанного в НЕ-ПАТЕНТНОЙ ЛИТЕРАТУРЕ 4, или общего способа, полученного со ссылкой на описание в разделе «Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое

антитело по изобретению». В качестве антитела к поверхностному антигену Т-клетки или НК-клетки, к настоящему времени известно множество антител (Current Opinion in Biotechnology, 2020, Vol. 65, p. 9-16), и можно использовать информацию о последовательности этих антител. Другие аспекты альтернативных биспецифических антител по настоящему изобретению такие же, как те, что описаны в разделе «Анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифическое антитело по изобретению», за исключением того, что используется scFv область анти-CD3 антитела. Альтернативные биспецифические антитела по настоящему изобретению также можно использовать для лечения рака.

[0140] В одном аспекте, антитело к поверхностному антигену Т-клетки или НК-клетки, или его антигенсвязывающий фрагмент альтернативных биспецифических антител по настоящему изобретению представляет собой антитело к поверхностному антигену Т-клетки или НК-клетка или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном аспекте, антитело к поверхностному антигену Т-клетки или НК-клетки или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-CD3 антитело, анти-CD137 антитело, анти-PD-1 (запрограммированная гибель клеток-1) антитело, анти-PD-L1 (лиганд 1 программируемой гибели клеток 1) антитело, анти-TIGIT (иммунорецептор Т-клетки с доменами Ig и ITIM) антитело, анти-CD16 антитело, анти-NKG2D (группа 2 естественных киллеров, член D) антитело или их антигенсвязывающий фрагмент. В одном аспекте, антитело к Т-клетке или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. В одном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент анти-CD3 антитела представляет собой scFv анти-CD3 антитела.

[0141] <Слияние и комплекс по изобретению и клетка, на поверхности которой экспрессируется анти-TSPAN8 по изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент>

Настоящее изобретение также относится к анти-TSPAN8 антителу по настоящему изобретению или его антигенсвязывающему фрагменту, связанному с другим белком (включая антитело), за исключением TSPAN8, или с полипептидом (также называемому «слитым соединением по настоящему изобретению»). Белок или полипептид, используемые в слиянии по настоящему изобретению, особенно не ограничены, и могут быть использованы различные антитела, цитокин, хемокин, сывороточный альбумин человека, различные пептиды-метки, пептид с искусственным мотивом спирали, белок, связывающий мальтозу, глутатион-S-трансферазу и другие пептиды или белки, способные ускорять мультимеризацию. В одном аспекте слияния по настоящему изобретению, белок или полипептид связан с анти-TSPAN8 антителом по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом. В одном аспекте, белок или полипептид, используемые в гибриде по настоящему изобретению, могут представлять собой антитело к поверхностному антигену иммунной клетки, такой как гранулоцит или натуральная Т-клетка-киллер (НКТ), клетки крови, такой как дендритная клетка или макрофаг, или его антигенсвязывающий фрагмент, или полипептид, активирующий иммунную клетку, такой как различные интерлейкины (такие как IL-2, IL-7, IL-12 и IL-15). В этом случае, белок или полипептид, используемые в слиянии по настоящему изобретению, могут быть

непосредственно связаны с анти-TSPAN8 антителом по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом, или могут быть связаны через произвольный линкер (такой как пептидный линкер).

[0142] Настоящее изобретение также предлагает анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент (называемый также «комплексом по настоящему изобретению»), связанный с сахаром, липидом, металлом (включая радиоизотоп), органическим соединением (включая токсин, флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона и хелатирующий агент) (называемым также «модификатором»). В настоящем документе, термин «модификатор» относится к не пептидному веществу, которое связывается с антителом или его антигенсвязывающим фрагментом непосредственно или через линкер и подобный. Модификатор, используемый для комплекса по настоящему изобретению, конкретно не ограничен, и его примеры включают полиэтиленгликоль, сахарную цепь, фосфолипид, радиоизотоп (такой как цирконий-89 (^{89}Zr), иттрий 90 (^{90}Y), индий-111 (^{111}In), астатин-211 (^{211}At), актиний-225 (^{225}Ac)), органическое соединение, токсин, флуоресцентный краситель ближнего инфракрасного диапазона (такой как IRDye(R)) и хелатирующий агент. Модификатор, используемый в комплексе, может быть связан с анти-TSPAN8 антителом по настоящему изобретению или его антигенсвязывающим фрагментом непосредственно или через произвольный линкер. В одном аспекте, комплекс по настоящему изобретению представляет собой конъюгат антитело-лекарственное средство (ADC) анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Лекарственное средство и линкер, пригодные для использования в ADC, могут быть выбраны из лекарственных средств и линкеров, обычно используемых специалистами в данной области техники. В одном аспекте, комплекс по настоящему изобретению представляет собой антитело, меченное радиоизотопом, где радиоизотоп связан с анти-TSPAN8 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом.

[0143] Настоящее изобретение также предлагает клетку (такую как химерный антигенный рецептор-T-клетку; CAR-T-клетку), на поверхности которой экспрессируется анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент. Такую клетку могут получить специалисты в данной области техники с использованием полинуклеотида, кодирующего анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент. В качестве клетки, в которой экспрессируется анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть использованы различные иммунные клетки (такие как T-клетка, NK-клетка и NKT-клетка).

[0144] Анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, слияние по настоящему изобретению, комплекс по настоящему изобретению и клетка, на поверхности которой экспрессируется анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению изобретения или его антигенсвязывающий фрагмент, связывается с TSPAN8 человека (№ доступа GENBANK NM_004616.2). Связывание с

TSPAN8 человека можно проверить с помощью известного способа измерения активности связывания. Примеры способа измерения активности связывания включают ELIA и проточную цитометрию. Например, при использовании ELISA можно применять способ, описанный в примере 8, и при использовании проточной цитометрии, например, можно применять способ, описанный в примере 1.

[0145] В одном аспекте, часть антитела или антигенсвязывающий фрагмент в анти-TSPAN8 антителе по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, слияние и комплекс по настоящему изобретению, и клетка на поверхности которой экспрессируется анти-TSPAN8 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть пост-трансляционно модифицированы. В одном аспекте, пост-трансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце варибельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи.

[0146] Анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, слияние по настоящему изобретению, комплекс по настоящему изобретению и клетка, на поверхности которой экспрессируется анти-TSPAN8 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, могут быть получены специалистами в данной области техники с применением способа, известного в данной области техники, на основе информации о последовательности VH и VL анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, описанного в настоящем документе, и информации о других пептидах или белках (таких как антитело), используемых в слиянии по настоящему изобретению, и модификаторах, используемых в комплексе по настоящему изобретению. Анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно получить, например, способом, особенно не ограниченным, но способом, описанным в разделе «Способ получения биспецифического антитела по изобретению».

[0147] <Полинуклеотид, вектор экспрессии, клетка-хозяин и способ получения анти-TSPAN8 антитела по изобретению>

Настоящее изобретение также предлагает полинуклеотиды, описанные в следующих пунктах (1)-(4):

(1) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую варибельную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента;

(2) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую варибельную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента;

(3) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению; и

(4) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению.

[0148] В одном аспекте полинуклеотида (1), описанного выше, полинуклеотид,

содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 4 и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 4; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10.

[0149] В одном аспекте полинуклеотида (1), описанного выше, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10.

[0150] В одном аспекте полинуклеотида (2), описанного выше, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8 и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую

из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12 и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0151] В одном аспекте полинуклеотида (2), описанного выше, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента, представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0152] В одном аспекте полинуклеотида (3), описанного выше, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[0153] В одном аспекте полинуклеотида (4), описанного выше, полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, представляет собой полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0154] Полинуклеотиды, описанные в настоящем документе, могут быть получены специалистами в данной области техники с использованием способа, известного в данной области техники, на основе их нуклеотидных последовательностей.

[0155] Настоящее изобретение также предлагает вектор экспрессии, содержащий один или несколько полинуклеотидов, описанных в следующих пунктах (1)-(4) (также

называемый «вектором экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению»). Каждый вектор экспрессии может содержать каждый из или множество полинуклеотидов.

(1) Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента;

(2) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента;

(3) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению; и

(4) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению.

[0156] В одном аспекте вектора экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (1), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 4; и

(b) полинуклеотид переменной области тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащей CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 10.

[0157] В одном аспекте вектора экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (1), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10.

[0158] В одном аспекте вектора экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (2), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящая из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящая из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0159] В одном аспекте вектора экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (2), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0160] В одном аспекте вектора экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (3), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[0161] В одном аспекте вектора экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащего полинуклеотид (4), описанный выше, вектор экспрессии содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0162] В одном аспекте, вектор экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по

настоящему изобретению представляет собой вектор экспрессии, содержащий полинуклеотиды, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 4, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 10, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0163] В одном аспекте, вектор экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению представляет собой вектор экспрессии, содержащий полинуклеотиды, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений с 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую

вариабельная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0164] В одном аспекте вектор экспрессии для антитела к TSPAN8 по настоящему изобретению представляет собой вектор экспрессии, содержащий полинуклеотиды, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0165] Вектор экспрессии, описанный в настоящем документе, может быть получен специалистами в данной области техники в соответствии со способом, описанным выше в разделе «Вектор экспрессии для биспецифического антитела по изобретению».

[0166] Настоящее изобретение также предлагает клетку-хозяина, трансформированную вектором экспрессии, содержащим полинуклеотиды, описанные в следующих пунктах (1)-(4) (называемую также «клеткой-хозяином для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению»). Клетка-хозяин для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению может содержать один или несколько полинуклеотидов, описанных в следующих пунктах (1)-(4), через трансформацию вектором экспрессии для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению.

(1) Полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента;

(2) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению или его антигенсвязывающего фрагмента;

(3) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению; и

(4) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению.

[0167] В одном аспекте клетки-хозяина для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (1), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую вариабельную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1,

состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 4; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10.

[0168] В одном аспекте клетки-хозяина для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (1), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10.

[0169] В одном аспекте клетки-хозяина для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (2), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0170] В одном аспекте клетки-хозяина для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (2), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0171] В одном аспекте клетки-хозяина для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (3), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10.

[0172] В одном аспекте клетки-хозяина для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению, содержащей полинуклеотид (4), описанный выше, клетка-хозяин содержит полинуклеотид, выбранный из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0173] В одном аспекте, клетка-хозяин для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению содержит полинуклеотиды, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 4, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из

аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 10, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12.

[0174] В одном аспекте, клетка-хозяин для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению представляет собой клетку-хозяина, содержащую полинуклеотиды, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящая из аминокислотной последовательности аминокислотных положений с 1-107 в SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

[0175] В одном аспекте, клетка-хозяин для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению представляет собой клетку-хозяина, содержащую полинуклеотиды, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

[0176] Описанная в настоящем документе клетка-хозяин может быть получена специалистами в данной области техники в соответствии со способом, описанным выше в разделе «Трансформированная клетка-хозяин по изобретению».

[0177] Настоящее изобретение также предлагает способ получения анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий стадию культивирования

клетки-хозяина для анти-TSPAN8 антитела по настоящему изобретению. Этот способ может быть осуществлен специалистами в данной области техники в соответствии с разделом «Способ получения биспецифического антитела по изобретению», описанным выше.

[0178] <Фармацевтическое применение анти-TSPAN8 антитела или подобного по изобретению>

Настоящее изобретение также предлагает фармацевтическую композицию, содержащую анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент, слияние по настоящему изобретению, комплекс по настоящему изобретению и клетку, на поверхности которой экспрессируется анти-TSPAN8 по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент (в дальнейшем все они вместе будут называться «анти-TSPAN8 антитело и подобные по настоящему изобретению») и фармацевтически приемлемый эксципиент. Фармацевтическая композиция может быть использована для лечения рака. Настоящее изобретение также относится к способу лечения рака, включающему стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества анти-TSPAN8 антитела и подобных по настоящему изобретению, и применению анти-TSPAN8 антитела и подобных по настоящему изобретению в производстве фармацевтической композиции для лечения рака, такого как анти-TSPAN8 антитело и подобные по настоящему изобретению, для применения для лечения рака. Фармацевтическое применение анти-TSPAN8 антитела и подобных по настоящему изобретению может осуществляться специалистами в данной области техники в соответствии с описанием, приведенным выше в разделе «Фармацевтическая композиция или подобные биспецифического антитела по изобретению». Примеры рака, подлежащего лечению при фармацевтическом применении анти-TSPAN8 антитела и подобных по настоящему изобретению, включают рак, описанный выше в разделе «Фармацевтическая композиция или подобные биспецифического антитела по изобретению».

[0179] <Анти-CD 3 антитело по изобретению>

Настоящее изобретение также предлагает анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, как указано ниже:

Анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO:

14.

[0180] В одном аспекте, анти-CD3 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой анти-CD3 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14.

[0181] В одном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент анти-CD3 антитела по настоящему изобретению представляет собой scFv. В одном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент анти-CD3-антитела по настоящему изобретению представляет собой scFv анти-CD3 антитела, содержащее переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14. В одном аспекте, антигенсвязывающий фрагмент анти-CD3 антитела по настоящему изобретению представляет собой scFv анти-CD3 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-254 в SEQ ID NO: 14.

[0182] Анти-CD3 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент могут быть получены специалистами в данной области техники со ссылкой на описание, приведенное в настоящем документе, и подобные. Анти-CD3 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно проверить с помощью известного способа измерения активности связывания. Анти-CD3 антитело по настоящему изобретению или его антигенсвязывающий фрагмент можно использовать в биспецифическом антителе с антителом к опухолевому антигену для применения при лечении рака.

[0183] Теперь в настоящем документе будут приведены конкретные примеры, на которые следует сослаться для дальнейшего понимания настоящего изобретения, и следует отметить, что эти примеры являются только иллюстративными, но не ограничивают настоящее изобретение.

ПРИМЕРЫ

[0184] [Пример 1: Получение антитела, которое селективно связывается с антигеном, экспрессируемым в перитонеальной диссеминированной раковой клетке]

[Пример 1-1: Получение перитонеальной диссеминированной раковой клетки, полученной от пациента]

Перитонеальные диссеминированные раковые клетки получают от пациентов следующим образом. Перитонеальные диссеминированные раковые клетки получают от пациента в соответствии с способом, описанным в литературе Fumiko Chiwaki and Hiroki Sasaki, "Establishment of Cell Lines of Peritoneal Disseminated Cancer (such as gastric, pancreatic or ovarian cancer) (Fukumaku Tenni Gan (I, Sui, Ranso Gan nado) Saiboukabu no Juritsu) (edited by Hiroki Sasaki, "Practical Guide for Cancer Research using Patient-derived

Experimental Model", Yodosha Co., Ltd., 2019, p. 28-37). Асцитную жидкость, собранную у пациента, распределяют в 50 мл центрифужную пробирку PROTEOSAVE(R) SS (Sumitomo Bakelite Co., Ltd., MS-52550, далее именуемую «50 мл центрифужная пробирка») для центрифугирования 430g в течение 3 минут при комнатной температуре. Супернатант удаляют, к осадку добавляют гемолитический буфер, и полученную смесь подвергают гемолизу в течение 10-20 минут при комнатной температуре. Гемолитический буфер готовят фильтрованием 17 мМ Tris-HCL (pH 7,65), содержащего 0,75% хлорида аммония, через фильтр с размером пор 0,22 мкм. После центрифугирования, супернатант удаляют и туда добавляют 50 мл PBS(-) по Дульбекко (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd., 05913, далее называемый «PBS(-)») для промывания клеток. После этого полученную смесь центрифугируют при 430g в течение 3 минут при комнатной температуре для сбора клеток. Все клетки, содержащиеся в собранной таким образом асцитной жидкости, снова суспендируют в среде RPMI-1640 (содержащей L-глутамин) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 189-02025), содержащей 10% FBS (Thermo Fisher Scientific, 10270-106) и x1 антибиотик-противогрибковый агент (Thermo Fisher Scientific, 15240062) (далее, среда с добавлением FBS или подобного будет называться «средой RPMI-1640»). Клетки высевают в 100-мм чашку с коллагеновым покрытием (далее именуемую «чашкой») (IWAKI & CO., LTD., 4020-010) в концентрации от 5×10^6 до $1 \times 10^7/10$ мл и культивируют в 5% CO₂ инкубаторе при 37°C.

Асцитные клетки включают адгезивные клетки и плавающие клетки. Адгезивные клетки включают не только раковые клетки, но также клетки, отличные от раковых клеток (фибробласты, перитонеальные мезотелиальные клетки и подобные). Используя особенность, заключающуюся в том, что клетки, отличные от раковых, отслаиваются за более короткое время, чем раковые клетки, эти клетки отделяют от всех клеток в асцитной жидкости. В частности, чашку, в которой культивируют все клетки, содержащиеся в асцитной жидкости, промывают PBS(-), и полученную смесь обрабатывают 2 мл 0,05% трипсина-ЭДТК (Thermo Fisher Scientific, 15400054) в течение нескольких минут для отделения клеток от раковых клеток. Клетки, за исключением раковых клеток, включенные в очищенные таким образом клетки, непрерывно культивируют в новой чашке для использования в примере 1-5.

После удаления клеток, за исключением раковых клеток, повторяют операцию, при которой половину всех клеток пассируют в новую чашку после того, как раковые клетки вырастают примерно до 80% конфлюэнтности в области чашки, и клетки, полученные через пять или больше пассажей, определяют как адгерентные раковые клетки. Что касается плавающих клеток, 5 мл культурального супернатанта из чашки для культивирования и 5 мл среды RPMI-1640 высевают и пассируют в новую чашку диаметром 100 мм, и клетки, полученные после пяти или более пассажей, определяют как плавающие раковые клетки. Когда перитонеальные диссеминированные раковые клетки, полученные от одного пациента, выращивают как с адгерентными раковыми клетками, так и с включенными в них плавающими раковыми клетками, эти клетки определяют как смешанные раковые клетки.

В настоящем документе, адгерентные раковые клетки, плавающие раковые клетки или смешанные раковые клетки, выделенные из асцитной жидкости, собранной у пациента, как описано выше, вместе обозначены как «перитонеальные диссеминированные раковые клетки». Полученные таким образом двенадцать клеток (NSC-7C, NSC-9C, NCS-10C, NSC-14C, NSC-15CF, NSC-16C, NSC-20C, NSC-22C, NSC-24C, NSC-32C, NSC-34C и NSC-35C-1 (далее также называемые «двенадцатью перитонеальными диссеминированными раковыми клетками») используют в последующих исследованиях.

[0185] [Пример 1-2: Получение гибридом, продуцирующих антитело против антигена рака желудка]

Мышь, полученная с помощью «VelocImmune» (технология антитела VelocImmune (R); Regeneron (патент США № 6596541), технологии разработки моноклональных антител человека, используют для получения антитела против антигена рака желудка, которое связывается с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой. Среди перитонеальных диссеминированных раковых клеток, полученных в примере 1-1, каждые три клетки из клеток NSC-10C, NSC-35C-1, NSC-24C, NSC-7C, NSC-14C и NSC-34C смешивают и суспендируют в TiterMax (R) Gold ADJUVANT (MERCCK, T2684) или PBS(-) для приготовления суспензии перитонеально диссеминированных раковых клеток. Суспензию используют для иммунизации мыши VelocImmune, и гибридомы получают обычным способом. Единственную колонию гибридом выделяют с помощью автоматического устройства для сбора и, таким образом, получают моноклональные клетки гибридомы (далее именуемые «клонами»). Выделенные таким образом клоны культивируют в инкубаторе с 8% CO₂ при 37°C, и супернатант собирают в 96-луночный планшет после культивирования в течение 4 дней и используют в следующих экспериментах.

[0186] [Пример 1-3: Выбор антитела против антигена рака желудка, которое селективно связывается с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой]

1. Проверка связывания антитела против антигена рака желудка с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой и клеткой, экспрессирующей EpCAM.

Клеточный супернатант клонов, полученных в примере 1-2, содержит антитела (далее называемые «антитела, содержащиеся в супернатанте клона»).

Сначала, связывание антител, содержащихся в супернатанте клона, с каждой из двенадцати перитонеальных диссеминированных раковых клеток, полученных в примере 1-1, измеряют проточной цитометрией и выбирают клон, продуцирующий антитело, которое сильно связывается с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой. Для проточной цитометрии используют BV421 антитело козы против Ig мыши (Becton, Dickinson and Company, 563846). Затем, чтобы исключить клоны, продуцирующие антитела, которые связываются с EpCAM, то есть с раковым антигеном, измеряют связывание антител, содержащихся в супернатанте клона, с клетками CHO-K1, экспрессирующими EpCAM-Мус-DDK человека. Клетку CHO-K1, экспрессирующая EpCAM-Мус-DDK человека, получают путем трансфекции EPCAM (с меткой Мус-DDK)

молекулы адгезии эпителиальных клеток человека (EPCAM) (Origene, RC201989) в клетку СНО-К1 (ATCC, CCL-61). Связывание антител, содержащихся в супернатанте клона, с клеткой измеряют с помощью проточной цитометрии. Для проточной цитометрии используют BV421 антитело козы против Ig мыши. Чтобы выбрать клоны, которые дают супернатант, который не проявляет активности связывания с клетками, экспрессирующими EPCAM, клоны, которые связываются с клетками, исключают. В качестве положительного контроля используют CD326 (EPCAM) моноклональное антитело (1B7) (eBioscience, 14-9326).

В ходе этого эксперимента выбирают клоны, дающие антитела, которые связываются с десятью из двенадцати перитонеальных диссеминированных раковых клеток, но не связываются с EPCAM человека.

[0187] 2. Проверка связывания антитела с мононуклеарными клетками периферической крови человека.

Кроме того, для выбора клонов, обеспечивающих селективное связывание антител с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой, исключают клоны, дающие антитела, которые связываются с периферической мононуклеарной клеткой человека.

Проточную цитометрию используют для измерения связывания между мононуклеарной клеткой периферической крови человека и антителом, предоставленным каждым клоном. В качестве мононуклеарных клеток, полученных из периферической крови человека, используют объединенные сверхчистые мононуклеарные клетки периферической крови человека (hMNC-PB) (PromoCell, C-12908). Для проточной цитометрии, используют PE антитело козы против Ig мыши (множественная адсорбция) (Becton, Dickinson and Company, 550589, или меньше, «PE антитело козы против Ig мыши»), BV421 антитело мыши против CD3 человека (Becton, Dickinson and Company, 562426), APC антитело мыши против CD14 человека (Becton, Dickinson and Company, 555399) и BB515 антитело мыши против CD19 человека (Becton, Dickinson and Company, 564456).

[0188] 3. Очистка антитела из супернатанта гибридомы.

Клон, выбранный на стадиях 1 и 2 примера 1-3, культивируют в гибридной среде CD (Thermo Fisher Scientific, 11279023). С помощью MabSelectSuRe (GE Healthcare, 17-5438-02) антитело очищают из культурального супернатанта (далее названное «очищенное антитело»). Антитело очищают обычным способом.

[0189] 4. Связывание очищенного антитела с культивируемой перитонеальной мезотелиальной клеткой человека.

Для того чтобы выбрать антитела, которые селективно связываются с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой, антитела, которые связываются с культивируемой перитонеальной мезотелиальной клеткой человека, исключают из очищенного антитела, полученного на стадии 3 примера 1-3. Мезотелиальные клетки человека (Zenbio, MES-F, партия MESM012916B) (далее именуемые «культивируемые перитонеальные мезотелиальные клетки человека») используют в качестве культивируемых перитонеальных мезотелиальных клеток человека и культивируют в среде

для роста мезотелиальных клеток (Zenbio, MSO-1). Проточную цитометрию используют для измерения связывания между очищенным антителом и культивируемой перитонеальной мезотелиальной клеткой человека. Для проточной цитометрии используют PE антитело козы против Ig мыши. Антитела, которые не связываются или слабо связываются с культивируемыми перитонеальными мезотелиальными клетками человека, отбирают для получения четырнадцати очищенных антител (далее называемых «четырнадцать очищенных антител»).

[0190] [Пример 1-4: Идентификация молекулы антигена-кандидата, распознаваемой полученным антителом]

В отношении четырнадцати очищенных антител, идентифицируют молекулы антигена-кандидаты. В качестве примера способа идентификации, подробно описан способ идентификации молекулы антигена-кандидата 16B11, 16B12 и 21F7.

В качестве контрольных антител в этом эксперименте используют 5D3, 9A1 и 21A3, имеющие разные модели связывания с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой из 16B11.

Готовят клеточный лизат клеток NSC-15CF. К клеточному лизату добавляют любое одно антитело из 16B11, 16B12, 21F7 и три контрольных антитела (5D3, 9A1 и 21A3). Затем добавляют Dynabeads Protein G (Life Technologies Corp., 10003D) с последующим перемешиванием и промывкой. Белок, связанный с Dynabeads Protein G, переваривают трипсином/LysC (Promega, V5072) с получением смеси пептидов. Раствор, содержащий смесь пептидов, подвергают измерениям ЖХ-МС/МС с использованием Ultimate 3000 RS nano (Thermo Fisher Scientific) и Orbitrap Fusion (Thermo Fisher Scientific). Полученные таким образом данные ЖХ-МС/МС подвергают сравнительному количественному анализу и идентификации пептидов/белков с использованием программного обеспечения Progenesis Q1 для Proteomics (Waters) и Mascot (Matrix Science Corporation) для идентификации связывающего белка. Данные, полученные от 16B11, 16B12 или 21F7, сравнивают с данными, полученными от контрольных антител, и TSPAN8 идентифицируют как молекулу антигена-кандидат 16B11 и 21F7. В этом эксперименте не удается идентифицировать молекулу антигена-кандидат 16B12.

Подобный эксперимент проводят аналогичным способом на 5B7, 9F6, 12C12, 13A9, 15D1, 18C10 и 19E4, и TSPAN8 идентифицируют как молекулу антигена-кандидат. В качестве контрольных антител используют 24C7 в дополнение к 5D3, 9A1 и 21A3. Хотя молекулу антигена-кандидат 16B12 не удается идентифицировать, это антитело демонстрирует профиль связывания, сходный с 16B11 в примере 1-3, и, следовательно, последующее исследование проводят, предполагая, что TSPAN8 является антигеном-кандидатом.

Для дальнейшей спецификации антигена проводят эксперимент по связыванию с клетками CHO-K1, экспрессирующими TSPAN8-Мус-DDK человека. Клетку CHO-K1, экспрессирующую TSPAN8-Мус-DDK человека, продуцируют путем трансфекции TSPAN8 (меченного Мус-DDK)-тетраспанина человека 8 (TSPAN8) (ORIGENE, RC202694)

(SEQ ID NO: 2) в клетку CHO-K1. В результате подтверждают, что десять антител 16B11, 16B12, 5B7, 9F6, 12C12, 13A9, 15D1, 18C10, 19E4 и 21F7 (называемых также «десятью анти-TSPAN8 антителами») связываются с клеткой CHO-K1, экспрессирующей TSPAN8-Мус-DDK человека, и распознают TSPAN8 в качестве антигена.

[0191] [Пример 1-5: Проверка активности связывания анти-TSPAN8 антитела с различными клетками]

1. Проверка и количественная оценка активности связывания с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой

Связывание четырех анти-TSPAN8 антител с семью перитонеальными диссеминированными раковыми клетками (KM-291-As, KM-555-As, KM-556-As, P-249-As, KM-568-As, KM-570-As и KM-577-As), выделенные из асцитной жидкости больных раком желудка, измеряют с помощью проточной цитометрии.

KM-291-As получают из асцитной жидкости пациента с использованием того же способа, что и в примере 1-1. Поскольку полученные KM-291-As содержат много клеток крови, экспрессирующих CD45, клетки, экспрессирующие CD45, удаляют с помощью колонки для концентрирования раковых клеток. В частности, клеточную суспензию, содержащую 5×10^7 клеток, пропускают через колонки для предварительного разделения (30 мкм) (Miltenyi Biotec, 130-041-407) и колонки для разделения (Miltenyi Biotec, 130-042-401) (далее именуемые «Колонки») с использованием CD45 MicroBeads человека (Miltenyi Biotec, 130-045-801) обычным способом. Элюат колонки собирают в 50 мл центрифужную пробирку с последующим центрифугированием. К осадку добавляют 10 мл буфера, чтобы снова суспендировать клетку. Из этой клеточной суспензии 5×10^6 клеток помещают в 1,5 мл микропробирку (WATSON, 131-7155C) для получения осадка центрифугированием. К полученному осадку добавляют 950 мкл PBS (буфер FCM), содержащего 2% FBS и 100 мкг/мл пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, 15140-122), для приготовления клеточной суспензии. Туда добавляют 50 мкл реагента, блокирующего FcR, для проведения реакции во льду в течение 10 минут. Полученный таким образом реакционный раствор распределяют на семь 1,5 мл микропробирок по 100 мкл в каждую и клетки окрашивают следующим способом. В каждые три микропробирки из семи добавляют 5 мкл IgG1-PE антитела мыши (Miltenyi Biotec, 130-092-212), и 2,5 мкл контрольного антитела, меченного Alexa Fluor647, добавляют в каждую из микропробирок для получения контрольного изотипа. В качестве контрольного антитела используют любой контрольный изотип IgG2a мыши (Becton, Dickinson and Company, 558053), контрольный изотип IgG2b мыши (Becton, Dickinson and Company, 558713) и контрольный изотип IgG3 мыши (Becton, Dickinson and Company, 560803). В каждую из остальных четырех микропробирок добавляют по 5 мкл CD326 (EPCAM)-PE (Miltenyi Biotec, 130-091-253), 2,5 мкл (0,25 г/пробирку) 16B11, 16B12, 9F6 или 18C10 добавляют в каждую из микропробирок, и клетки окрашивают, чтобы получить четыре оценочных образца антител. В каждой из микропробирок проводят реакцию во льду в течение 30 минут после добавления антитела. К полученному осадку добавляют 1 мл буфера FCM с последующим

центрифугированием, и 500 мкл буфера FCM добавляют к полученному осадку, чтобы снова суспендировать клетку. К полученному раствору добавляют 5 мкл 7-AAD (Becton, Dickinson and Company, 559925), все количество переносят в 5 мл круглодонную полистироловую пробирку, оборудованную крышкой с клеточным ситом (CORNING, 352235), и проводят измерения с использованием проточного цитометра FACSVersе (Becton, Dickinson and Company). Для сбора данных используют программное обеспечение BD FACSuite (Becton, Dickinson and Company).

KM-555-As, KM-556-As, P-249-As, KM-568-As, KM-570-As и KM-577-As получают так же, как и при приготовлении KM-291-As. При измерении связывания с KM-555-As и KM-556-As, в качестве оценочных образцов антител используют 16B11, 9F6 и 18C10. При измерении связывания с P-249-As, в качестве оценочных образцов антител используют 16B11 и коммерчески доступное анти-TSPAN8 антитело TSPAN8 антитело, анти-человеческое, REAfinity (130-106-855, Miltenyi, далее называемое «REA443»). При измерении связывания с KM-568-As, KM-570-As, KM-577-As, в качестве оценочных образцов антител используют 16B11, 9F6, 18C10 и REA443. Во всех экспериментах в качестве изотипического контроля используют IgG1 мыши (130-113-196, Miltenyi). Кроме того, для окрашивания клеток используют антитело IgG2a-VioBlue (Miltenyi Biotec, 130-113-277) и антитело CD326(EpCAM)-VioBlue (Miltenyi Biotec, 131-113-266).

Анализ результатов измерения способом проточной цитометрии каждой перитонеальной диссеминированной раковой клетки проводят с использованием программного обеспечения BD FACSuite. В частности, данные наносят на график в FSC-A (lin)/SSC-A (log), полученную клеточную популяцию гейтируют, полученный результат снова размножают в FSC-W (lin)/FSC-A (lin), и только синглетную популяцию гейтируют для создания подмножества для анализа. При анализе результатов измерений, полученных для клетки KM-291-As, подмножество размножают PE (log)/Alexa Fluor 647 (log). При анализе результатов измерений, полученных для KM-555-As, KM-556-As, P-249-As, KM-568-As, KM-570-As и KM-577-As, данные размножают в VioBlue (log)/Alexa Fluor 647 (log). Для каждого образца данные получают с использованием подмножества из 1×10^4 клеток. Полученный таким образом файл fcs анализируют с помощью FlowJo (Becton, Dickinson and Company) для создания гистограммы с помощью Alexa Fluor 647. MFI Alexa Fluor 647 для групп, положительных в отношении оцениваемых антител соответственно рассчитывают, и Δ MFI рассчитывают путем вычитания изотипа MFI из MFI каждого антитела (таблица 1).

В качестве примеров полученных гистограмм, на фиг. 1-1 - фиг. 1-3 соответственно показаны гистограммы, показывающие связывание 16B11, 9F6, 18C10 при измерении связывания 16B11 с KM-291-As и измерении связывания 16B12 с KM-555-As и KM-556-As.

[0192]

2. Проверка и количественная оценка активности связывания с культивируемыми перитонеальными мезотелиальными клетками человека

Измеряют активности связывания десяти анти-TSPAN8 антител, идентифицированных в примере 1-4, с культивируемыми перитонеальными

мезотелиальными клетками человека. Культивируемые перитонеальные мезотелиальные клетки человека представляют собой нормальные клетки.

Связывание десяти анти-TSPAN8 антител, полученных в примере 1-3, и коммерчески доступного анти-TSPAN8 антитела, очищенного анти-человеческого TSPAN8 антитела (BioLegend, 362702, клон TAL69, называемого в настоящем документе «TAL69») с культивируемыми перитонеальными мезотелиальными клетками человека измеряют с помощью проточной цитометрии. В качестве вторичного антитела используют PE антитело козы против Ig мыши. На фиг. 2-1 и фиг. 2-2 показаны полученные гистограммы. Далее, результаты проточной цитометрии анализируют с помощью FlowJo для расчета MFI для PE каждой клеточной популяции. В качестве антител отрицательного контроля, три антитела Ultra-LEAF очищенного IgG1 мыши, к изотипа Ctrl антитела (BioLegend, 401408), очищенного IgG2a мыши NA/LE, к изотипического контроля (Becton, Dickinson and Company, 554645) и очищенного IgG2b мыши NA/LE, к изотипического контроля (Becton, Dickinson and Company, 559530) используют для анализа. В таблице 1 показаны значения Δ MFI для 16B11, 16B12, 9F6, 18C10 и TAL69. Значение Δ MFI каждого антитела рассчитывают путем вычитания значения MFI каждого антитела отрицательного контроля из значения MFI антитела.

[0193]

3. Проверка и количественная оценка активности связывания с раком желудка с перитонеальной диссеминированной мезотелиальной клеткой, полученной от пациента.

KM-501-As и KM-503-As, которые представляют собой перитонеальные мезотелиальные клетки, выделенные из асцитной жидкости больного раком желудка человека с перитонеальной диссеминацией (в настоящем документе именуемые «перитонеальные мезотелиальные клетки, полученные от пациента»), получают следующим образом.

В процессе получения клеток в примере 1-1 обнаружено, что мезотелиальные клетки растут из чашки в виде булжника. Эти мезотелиальные клетки собирают, используя 0,05% трипсин-ЭДТК, и полученную клетку снова суспендируют в 10 мл D-MEM (с высоким содержанием глюкозы) (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, 044-29765), содержащей 10% FBS и x1 антибиотик-противогрибковый агент. 4×10^5 клеток помещают в 1,5 мл микропробирку с последующим центрифугированием, затем удаляют супернатант и туда добавляют 96 мкл буфера FCM для суспендирования клеток. Туда добавляют 4 мкл FcR блокирующего реагента, для проведения реакции во льду в течение 10 минут. 50 мкл полученного реакционного раствора распределяют в другую 1,5 мл микропробирку, и таким образом получают две микропробирки, каждая из которых содержит 2×10^5 клеток/50 мкл. В одну из микропробирок добавляют 2 мкл CD45-APC антитела (Miltenyi Biotec, 130-091-230) и 0,5 л CD326 (EpcAM)-PE (Miltenyi Biotec, 130-113-264). В другую микропробирку добавляют 2 мкл IgG2a-APC антитела мыши (Miltenyi Biotec, 130-091-386) и 0,5 мкл IgG1-PE антитела мыши. В этих микропробирках проводят реакцию во льду в течение 30 минут. В каждую из микропробирок добавляют по 1 мл буфера FCM с

последующим центрифугированием и удалением супернатанта. К осадку добавляют 500 мкл буфера FCM, чтобы снова суспендировать клетки, и проводят анализ с помощью FACSVerse. Популяцию клеток гейтируют в FSC-A (lin) и SSC-A (log), и полученное подмножество снова размножают PE (log) и APC (log) для получения данных. Полученные файлы fcs анализируют с помощью FlowJo. В результате подтверждают, что эта клеточная популяция представляет собой CD45-отрицательные и EpCAM-отрицательные нормальные клетки. Считается, что перитонеальная мезотелиальная клетка, полученная от пациента, представляет собой нормальную клетку, полученную из сапожка или брыжейки, работающую в качестве каркаса для приживания и роста перитонеальной диссеминированной раковой клетки. KM-501-As и KM-503-As, то есть выделенные перитонеальные мезотелиальные клетки, полученные от пациентов, используют в последующем эксперименте.

Десять анти-TSPAN8 антител и TAL69 связывают с KM-501-As и KM-503-As таким же образом, как и при измерении связывания с культивируемыми перитонеальными мезотелиальными клетками человека на стадии 2 примера 1-5. На фиг. 3-1 и фиг. 3-2 показаны гистограммы 16B11, 16B12, 9F6, 18C10 и TAL69 для KM-501-As и KM-503-As, и в таблице 1 приведены значения Δ MFI.

[0194]

4. Проверка и количественная оценка активности связывания с культивируемыми клетками эндотелия сосудов пуповины человека

Связывание десяти анти-TSPAN8 антител и TAL69 с культивируемыми клетками эндотелия сосудов пуповины человека измеряют с помощью проточной цитометрии. Культивированные клетки эндотелия сосудов пуповины человека (PromoCell, C-12200) культивируют с использованием набора Endothelial Cell Growth Medium 2 Kit (PromoCell, C-22111). В качестве отрицательных контрольных антител используют Ultra-LEAF очищенный IgG1 мыши, к изотипическое Ctrl антитело, очищенные NA/LE IgG2a мыши, к изотипический контроль, очищенные Ultra-LEAF IgG2b мыши, к изотипическое Ctrl антитело (BioLegend, 400348), очищенные LEAF IgG3 мыши и к изотипическое Ctrl антитело (BioLegend, 401310). В качестве вторичного антитела использую PE антитело козы против Ig мыши.

На фиг. 4 показаны гистограммы связывания десяти анти-TSPAN8 антител и TAL69. В таблице 1 показаны значения Δ MFI для 16B11, 16B12, 9F6, 18C10 и TAL69. Значение Δ MFI рассчитывают путем вычитания значения MFI каждого антитела отрицательного контроля из значения MFI каждого антитела.

Из результатов гистограмм на фиг. 1-4 и результатов в таблице 1 видно, что 16B11 и 16B12 демонстрируют высокую степень связывания с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой, но демонстрируют низкую степень связывания с нормальной клеткой (культивируемой перитонеальной мезотелиальной клеткой человека, перитонеальной мезотелиальной клеткой, полученной от пациента или культивированной клеткой эндотелия сосудов пуповины человека). Между тем, другие анти-TSPAN8 антитела 9F6 и

18C10 и коммерчески доступные анти-TSPAN8 антитела (TAL69 или REA443) демонстрируют более низкое связывание с перитонеальной диссеминированной раковой клеткой, чем 16B11 и 16B12, и более высокое связывание с нормальной клеткой, чем 16B11 и 16B12. Из этих результатов видно, что характеристики 16B11 и 16B12 значительно отличаются от характеристик других анти-TSPAN8 антител (9F6, 18C10, TAL69 и подобных).

[Таблица 1]

Наименование образца		16B11	16B12	9F6	18C10	Коммерчески доступное антитело (TAL69)	Коммерчески доступное антитело REA443
Перитонеальная диссеминированная раковая клетка	KM-291-As	64032	37165	12096	11727	н.т. (не тестировали)	н.т.
	KM-555-As	10388	н.т.	920	447	н.т.	н.т.
	KM-556-As	6604	н.т.	820	846	н.т.	н.т.
	P-249-As	6735	н.т.	н.т.	н.т.	н.т.	87
	KM-568-As	29051	н.т.	2216	2634	н.т.	2796
	KM-570-As	13875	н.т.	274	326	н.т.	606
Культивируемая перитонеальная мезотелиальная клетка человека		61	4	566	н.т.	616	н.т.
	Zenbio	н.т.	н.т.	н.т.	370	583	
Перитонеальная мезотелиальная клетка, полученная от пациента	KM-501-As	23	5	206	230	181	н.т.
	KM-503-As	76	7	424	544	286	н.т.
Культивируемая	Донор 1	0	2	11	3	3	н.т.

ая клетка	Донор 2	45	18	722	1117	633	н.т.
эндотелия	Донор 3	-4	-1	32	82	109	н.т.
сосудов	Донор 4	-5	3	19	58	92	н.т.
пуповины	Донор 5	-3	-5	14	35	59	н.т.
человека							

[0195] [Пример 2: Определение последовательности 16B11 и 16B12]

Обычный способ используют для клонирования генов, кодирующих тяжелые цепи и легкие цепи 16B11 и 16B12 для определения последовательности этих антител. Технология Velocimmune представляет собой способ получения антител с использованием трансгенных мышей, в которых переменные области тяжелой и легкой цепей эндогенного иммуноглобулина заменены соответствующими переменными областями человека. Следовательно, антитела, полученные с использованием метода Velocimmune, представляют собой антитела, имеющие переменные области антитела человека и константные области антитела мыши (называемые также химерными антителами). Аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи полученного таким образом 16B11 показана в SEQ ID NO: 34, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 36. Аминокислотная последовательность полученной таким образом переменной области тяжелой цепи 16B12 показана в SEQ ID NO: 35, и аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 37.

[0196] [Пример 3: Получение полностью человеческого анти-TSPAN8 антитела]

[Пример 3-1: Получение вектора экспрессии, используемого для получения полностью человеческого анти-TSPAN8 антитела]

Полностью человеческие антитела 16B11 и 16B12 получают путем связывания аминокислотной последовательности переменной области человека с аминокислотной последовательностью константной области человека, идентифицированной в примере 2.

Конструируют полипептид, в котором аминокислотная последовательность, кодирующая сигнальную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 38, связана с N-концом переменной области тяжелой цепи каждого из 16B11 и 16B12, и аминокислотная последовательность константной области IgG1 человека (последовательность аминокислотных положений 122-451 SEQ ID NO: 4 или 10) связана с C-концом. Кроме того, вводят мутацию для замены аргинина (R) в положении 16 последовательности расщепления фурином, состоящей из аминокислотной последовательности, соответствующей положениям 16-19 переменной области тяжелой цепи полипептида (J. Biol. Chem., 1992, Vol. 267, p. 16396-16402) глицином (G). Полинуклеотид, кодирующий сконструированный таким образом полипептид, вводят в вектор pcDNA 3.4 TOPO(R) (Thermo Fisher Scientific). Полученные таким образом векторы тяжелой цепи обозначают, соответственно, как pcDNA3.4-16B11.1_НС и pcDNA3.4-16B12.1_НС.

Кроме того, конструируют полипептид, в котором аминокислотная

последовательность, кодирующая сигнальную последовательность, показанную в SEQ ID NO: 3-9, связана с N-концом варибельной области легкой цепи 16B11, аминокислотная последовательность, кодирующая сигнальную последовательность, показанную в SEQ ID NO: NO: 40 связана с N-концом варибельной области легкой цепи 16B12, и аминокислотная последовательность константной области к цепь человека (последовательность аминокислотных положений 108-213 SEQ ID NO: 8 или 12) связана с C-концом каждого из обоих антител. Полинуклеотид, кодирующий сконструированный таким образом полипептид, вводят в вектор pcDNA 3.4 TOPO(R). Полученные таким образом векторы легкой цепи обозначают, соответственно, как pcDNA3.4-16B11_LC и pcDNA3.4-16B12_LC.

[0197] [Пример 3-2: Получение полностью человеческого анти-TSPAN8 антитела]

Векторы pcDNA3.4-16B11.1_HC и pcDNA3.4-16B11_LC используют для получения антитела 16B11.1.

В частности, в клетки ExpiCHO-S (Thermo Fisher Scientific, A29127), культивированные до концентрации примерно $6,0 \times 10^6$ клеток/мл в среде ExpiCHOExpression (Thermo Fisher Scientific, A2910001), трансфицируют векторы pcDNA3.4-16B11.1_HC и pcDNA3.4-16B11_LC с использованием реагента для трансфекции, набора ExpiFectamineCHO Transfection Kit (Thermo Fisher Scientific, A29129), и полученный результат культивируют в течение 12 дней. Супернатант очищают с помощью MabSelectSuRe для получения очищенного полностью человеческого антитела. Полученное таким образом антитело обозначают как 16B11.1. Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 16B11.1 показана в SEQ ID NO: 3, кодируемая ей аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 4, нуклеотидная последовательность легкой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 7, и кодируемая ей аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 8.

16B12. 1 можно получить аналогичным способом с использованием векторов pcDNA3.4-16B12.1_HC и pcDNA3.4-16B12_LC. Нуклеотидная последовательность тяжелой цепи 16B12.1 показана в SEQ ID NO: 9, кодируемая ей аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 10, нуклеотидная последовательность легкой цепи антитела показана в SEQ ID NO: 11, и кодируемая ей аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 12.

[0198] [Пример 4: Идентификация сайта эпитопа на стороне антигена, с которым связывается антитело]

[Пример 4-1: Картирование эпитопов с помощью масс-спектрометрии с обменом водорода/дейтерия]

Для идентификации эпитопа 16B11.1 проводят масс-спектрометрию с обменом водорода/дейтерия (HDX-MS). В результате, область TSPAN8 человека, соответствующую аминокислотным положениям 126-155 SEQ ID NO: 2, обнаруживают как область, в которой степень обмена дейтерия снижается в присутствии 16B11.1. На основании этого результата устанавливают, что область TSPAN8 человека, соответствующая аминокислотным

положениям 126-155 SEQ ID NO: 2, является эпитопом 16B11.1.

[0199] [Пример 4-2: Сужение важных эпитопов путем введения мутации TSPAN8 человека]

Чтобы проверить, является ли область, оцененная в примере 4-1, эпитопом 16B11.1, получают химерный белок, в котором область заменена гомологичной областью TSPAN8 мыши или крысы, и оценивают связывание. SEQ ID NO: 41 показывает аминокислотные положения 126-155 TSPAN8 мыши, соответствующие аминокислотным положениям 126-155 TSPAN8 человека, и SEQ ID NO: 42 показывает аминокислотные положения 126-155 TSPAN8 крысы, соответствующие им.

Чтобы получить клетку, экспрессирующую слитый белок TSPAN8 и GFP, последовательность TSPAN8 человека вырезают из TSPAN8 (меченного Мус-DDK) - тетраспанина человека 8 (TSPAN8) (ORIGENE, RC202694), использованного в примере 1-4, с помощью фермента рестрикции. Субклонирование проводят на вырезанной последовательности TSPAN8 человека в вектор pCMV6-AC-GFP (ORIGENE, PS100010) (далее именуемый «вектор, экспрессирующий TSPAN8-GFP человека»). Далее, вектор, в котором последовательность, соответствующая аминокислотным положениям 126-155 вектора, экспрессирующего TSPAN8-GFP человека, показанная в SEQ ID NO: 2, заменена положениями аминокислот 126-155 последовательности TSPAN8 мыши или крысы, получают с использованием набора In-Fusion(R) HD Cloning Kit (Takara Bio Inc., 639633). Каждый полученный вектор вводят в клетку CHO-K1 для получения клетки, временно экспрессирующей белок TSPAN8-GFP человека, химерный белок TSPAN8-GFP человека и мыши или химерный белок TSPAN8-GFP человека и крысы. Полученную клетку обозначают как клетка CHO-K1, экспрессирующая TSPAN8 человека дикого типа, клетка CHO-K1, экспрессирующая химерный белок TSPAN8 человека и мыши, или клетка CHO-K1, экспрессирующая химерный белок TSPAN8 человека и крысы. Далее, получают клетку, в которой вектор pCMV6-AC-GFP введен в клетку CHO-K1 (называемую имитацией клетки). Связывание 16B11, 16B12 и TAL69 с GFP-положительными клетками в этих клетках измеряют проточной цитометрией. Никакого уменьшения связывания TAL69 с клеткой CHO-K1, экспрессирующей химерный белок TSPAN8 человека и крысы или человека и мыши, не наблюдают. 16B11 и 16B12 демонстрируют одинаковое связывание с клеткой CHO-K1, экспрессирующей химерный белок TSPAN8 человека и крысы, и с клеткой CHO-K1, экспрессирующей TSPAN8 человека дикого типа. Между тем, связывание с клеткой CHO-K1, экспрессирующей химерный белок TSPAN8 человека и мыши, ослаблено по сравнению со связыванием с клеткой CHO-K1, экспрессирующей TSPAN8 человека дикого типа (фиг. 5-1).

Для определения аминокислотной последовательности, способствующей ослаблению активности связывания с клеткой CHO-K1, экспрессирующей химерный белок TSPAN8 человека и мыши, сравнивают последовательности белков TSPAN8 человека, мыши, крысы и яванского макака, соответствующие положениям 126-155 аминокислотной последовательности TSPAN8 человека (фиг. 5-2). SEQ ID NO: 41, 42 и 43, соответственно,

показывают последовательности, соответствующие положениям 126-155 аминокислотных последовательностей TSPAN8 мыши, крысы и яванского макака. В результате только аминокислота в положении 131 имеет другую аминокислотную последовательность в белке TSPAN8 мыши. Из этой информации делают вывод, что треонин (Т) в положении 131 белка TSPAN8 человека, показанного в SEQ ID NO: 2, важен для связывания 16B11 или 16B12.

Далее, чтобы проверить, способствует ли аминокислота в положении 131 TSPAN8 человека связыванию 16B11 или 16B12, получают заменитель этой аминокислоты. В частности, получают вектор, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую слитый белок TSPAN8-GFP человека, в котором треонин (Т) в положении 131 аминокислотной последовательности TSPAN8 человека в TSPAN8-GFP человека SEQ ID NO: 2 заменен аланином (А) или аспарагином (N) (обозначаемый соответственно как «TSPAN8(T131A)-GFP человека» или «TSPAN8(T131N)-GFP человека»), и такой вектор трансфицируют в клетку CHO-K1 для конструирования клетки, временно экспрессирующей TSPAN8(T131A)-GFP человека или TSPAN8(T131N)-GFP человека. Сконструированную клетку обозначают как клетку CHO-K1, экспрессирующую TSPAN8(T131A) человека, или клетку CHO-K1, экспрессирующую TSPAN8(T131N) человека. Связывание 16B11, 16B12 и TAL69 с GFP-положительными клетками в этих клетках измеряют с помощью проточной цитометрии (фиг. 5-3). В результате, связывание 16B11 и 16B12 с клеткой CHO-K1, экспрессирующей TSPAN8(T131A) человека, и клеткой CHO-K1, экспрессирующей TSPAN8(T131N) человека, ослаблено по сравнению со связыванием клеткой CHO-K1, экспрессирующей TSPAN8 человека дикого типа. Между тем, TAL69 демонстрирует эквивалентную активность связывания с любой из клеток. В результате оказалось, что треонин в положении 131 является незаменимой аминокислотой для связывания 16B11 и 16B12 в области TSPAN8 человека, которая была идентифицирована как эпитоп, соответствующий аминокислотным положениям 126-155 SEQ ID NO: 2.

В таблице 2-1 показано значение ΔMFI , рассчитанное путем вычитания MFI связывания с имитацией клетки из MFI связывания с каждой клеткой, экспрессирующей TSPAN8. Кроме того, в таблице 2-2 показаны относительные значения ΔMFI связывания с клеткой CHO-K1, экспрессирующей химерный белок TSPAN8 человека и мыши, клеткой CHO-K1, экспрессирующей химерный белок TSPAN8 человека и крысы и клеткой CHO-K1, экспрессирующей TSPAN8 (T131A или T131N) человека, когда ΔMFI связывания с клетками CHO-K1, экспрессирующими TSPAN8 человека дикого типа, показанная в таблице 2-1, принимается за 100.

[Таблица 2-1]

	16B11	16B12	TAL69
TSPAN8 человека (дикий тип)	172723	26673	132771
Химерный TSPAN8 человека и крысы	160579	22352	96180
Химерный TSPAN8 человека и мыши	5274	102	304830

TSPAN8 (T131A) человека	23373	12189	184065
TSPAN8 (T131N) человека	3457	2629	143332

[Таблица 2-2]

	16B11	16B12	TAL69
TSPAN8 человека (дикий тип)	100	100	100
Химерный TSPAN8 человека и крысы	93	84	72
Химерный TSPAN8 человека и мыши	3	0	230
TSPAN8 (T131A) человека	14	46	139
TSPAN8 (T131N) человека	2	10	108

[0200] [Пример 4-3: Эксперимент с конкурентным связыванием]

Исследуют, конкурируют ли 16B11 или 16B12 с другими анти-TSPAN8 антителами (9F6, 18C10 или TAL69) за связывание с TSPAN8.

Чтобы исследовать конкуренцию 16B11 с другими анти-TSPAN8 антителами (9F6, 18C10 или TAL69), изменения количества 16B11, связанного с клеткой NSC-15CF, измеряют с помощью проточной цитометрии (эксперимент 1; фиг. 6-1). В частности, меченный Alexa Fluor647 16B11 в конечной концентрации 1 мкг/мл и другое анти-TSPAN8 антитело (одно антитело из 16B11, 9F6, 18C10 и TAL69) в конечной концентрации 100 мкг/мл добавляют к 2×10^5 NSC-15CF, чтобы получить конечную концентрацию 100 мкг/мл, и количество 16B11, связанного с NSC-15CF, измеряют с помощью проточного цитометра. В качестве антител отрицательного контроля используют Ultra-LEAF очищенный IgG1 мыши, к изотипическое Ctrl антитело, Ultra-LEAF очищенный IgG2a мыши, к изотипическое Ctrl антитело (BioLegend, 400264), Ultra-LEAF очищенный IgG2b мыши и к изотипическое Ctrl антитело. В результате, связывание 16B11 ослабляется только при добавлении самого 16B11.

Чтобы изучить конкуренцию 16B12 с другими анти-TSPAN8 антителами (16B11, 9F6, 18C10 или TAL69), изменения количества 16B11, 9F6 или 18C10, связанных с NSC-15CF из-за 16B12, измеряют с помощью проточной цитометрии (эксперимент 2; фиг. 6-2). В частности, меченные Alexa Fluor647 16B11, 9F6 или 18C10 в конечной концентрации 0,25 мкг/мл и 16B12 в конечной концентрации 100 мкг/мл добавляют к 1×10^5 NSC-15CF, и количество 16B11, 9F6 или 18C10, связанных с NSC-15CF измеряют с помощью проточного цитометра. В качестве антител отрицательного контроля используют LEAF очищенный IgG3 мыши и к изотипическое Ctrl антитело. В результате, связывание 16B11 ослабляется за счет 16B12. Нет никакого влияния на связывание других антител. Аналогичным образом проводят конкурентные эксперименты с использованием антител 16B12, меченных Alexa Fluor647, и других анти-TSPAN8 антител (16B11, 16B12, 9F6, 18C10 или TAL69) (эксперимент 3; фиг. 6-3). В качестве отрицательных контрольных антител используют LEAF очищенный IgG3 мыши, к изотипическое Ctrl антитело, Ultra-LEAF очищенный IgG2a мыши, к изотипическое Ctrl антитело, Ultra-LEAF очищенный IgG2b мыши, к

изотипическое Ctrl антитело и Ultra-LEAF очищенный IgG1 мыши и к изотипическое Ctrl антитело. В результате, связывание 16B12 ослабляется только при добавлении 16B11 и самого 16B12. Поскольку связывания 16B11 и 16B12 конкурируют друг с другом, сделан вывод, что 16B11 и 16B12 распознают сходные эпитопы. В таблице 3 показаны относительные значения при добавлении конкурентных антител по отношению к значению, рассчитанному путем вычитания MFI неокрашенных клеток из MFI связывания каждого меченого антитела при добавлении изотипического контроля в качестве конкурентного антитела, принятого за 100.

[Таблица 3]

Эксперимент 1

Конкурентное антитело	% по отношению к конкуренции по изотипическому контролю
16B11	12
9F6	98
18C10	119
TAL69	180

Эксперимент 2

Флуоресцентно меченое антитело	% по отношению к конкуренции по изотипическому контролю
16B11	0
9F6	100
18C10	109

Эксперимент 3

Конкурентное антитело	% по отношению к конкуренции по изотипическому контролю
16B12	1
16B11	2
9F6	94
18C10	133
TAL69	112

[0201] [Пример 5: Получение клетки 60As6-Luc/GFP]

Клетки 60As6-Luc/GFP, в которых белок люциферазы и зеленый флуоресцентный белок (GFP) экспрессируется в клетке 60As6, в качестве клеточной линии, полученной из асцитной жидкости пациентов с раком желудка, получают следующим способом.

[Пример 5-1: Получение раствора вируса, содержащего Luc/GFP]

Лентивирус получают с использованием Т-клеток L293 (Thermo Fisher Scientific, K4975-00) в соответствии с обычным способом.

Для получения лентивируса используют MISSION(R) Lentiviral Packaging Mix (SIGMA, SHP001) и модифицированный вектор pCDH-CMV-GL3-EFla-GFP-T2A-puro (предоставленный Ryou-u Takahashi, Associate Professor, the Laboratory of Cellular and Molecular Biology, Graduate School of Biomedical and Health Sciences, Hiroshima University (PLoS One, 2015, Vol. 10, e0123407, и Front Biosci., 2008, Vol. 13, p. 1619-1633)). Вирус отфильтровывают из супернатанта культуры клеток, содержащих вирус, с использованием 45 мкм фильтра Millex(R)-HV (Merck KGaA EMD Millipore Corporation, SLHV033RS) для приготовления раствора вируса, и его криоконсервируют при -80°C .

[Пример 5-2: Заражение клетки 60As6 вирусом]

60As6 (предоставленную Dr. Kazuyoshi Yanagihara, National Cancer Center Hospital) инфицируют вирусом общепринятым способом. В качестве среды используют RPMI-1640, содержащую 10% FBS. Культуральную жидкость удаляют из планшета для клеток 60As6 через 3 дня после инфицирования и заменяют RPMI-1640 (средой для селекции), содержащей 10% FBS и 2 мкг/мл пурамицина (Thermo Fisher Scientific, A-11138-02), и культивирование продолжают. Затем культивирование и пассирование в среде для селекции повторяют для удаления не инфицированных клеток и проверяют, полностью ли удален вирус. Созданную таким образом клетку обозначают как клетку 60As6-Luc/GFP. Эта клетка экспрессирует люциферазу и GFP. Кроме того, с помощью проточной цитометрии подтверждают, что клетка 60As6-Luc/GFP эндогенно экспрессирует TSPAN8 на высоком уровне.

[0202] [Пример 6: Оценка активности ADCC полностью человеческого антитела 16B11.1]

Измеряют активность ADCC, индуцированную полностью человеческим антителом анти-TSPAN8 антителом 16B11.1. Активность ADCC можно измерить через оценку действия эффекторной клетки по повреждению клетки-мишени. В этом примере, цитотоксическую активность измеряют с использованием люциферазы в качестве показателя, при котором НК-клетка активируется 16B11.1 в совместной культуре НК-клетки в качестве эффекторной клетки и клетки 60As6-Luc/GFP в качестве мишени, в результате чего клетка 60As6-Luc/GFP повреждается активностью ADCC.

В качестве НК-клетки используют клетку, выделенную из криоконсервированных РВМС человека (eРВМС(R), охарактеризованных криоконсервированными РВМС человека, Cellular Technology Limited, CTL-CP1) с помощью набора NK Cell Isolation Kit для человека (Miltenyi Biotec, 130-092-657) и культивируют в среде НК-клеток (среда NK MACS, Miltenyi Biotec, 130-114-429).

Клетки 60As6-Luc/GFP и клетки НК, суспендированные в среде RPMI-1640 (SIGMA, R8758-500 мл), содержащей 5% FBS (Hyclone, SH30084.03), высевают в круглодонный 96-луночный планшет (Sumitomo Bakelite, MS-9096U), соответственно, в количествах 5×10^3 клеток/25 мкл/лунку и 5×10^4 клеток/50 мкл/лунку. Затем раствор, полученный путем разведения 16B11.1 или собственного анти-KLH антитела (3G6) в качестве отрицательного контрольного антитела, с получением конечной концентрации 1, 10, 100, 1000 или 10000

нг/мл, добавляют в количестве 25 мкл/лунку, и количество люминесценции люциферазы через 24 часа измеряют с использованием набора для количественного определения люциферазы (система анализа ONE-GloLuciferase, Promega Corp., E6120). Поскольку количество люминесценции люциферазы показывает на жизнеспособность клетки 60As6-Luc/GFP, цитотоксическую активность по активности ADCC можно измерить по уменьшению количества люминесценции люциферазы.

На ординате на фиг. 7 указаны относительные значения количества люминесценции люциферазы каждого образца, когда количество люминесценции люциферазы только в среде принято за 100%, и количество люминесценции люциферазы в клетке 60As6-Luc/GFP без добавления антител принято за 0%. Абсцисса показывает концентрацию антитела, добавленного в каждую лунку. Как показано на фиг. 7, клетка-мишень повреждена активностью ADCC только при добавлении 16B11.1.

[0203] [Пример 7: Получение анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела]

[Пример 7-1: Получение вектора биспецифического антитела анти-TSPAN8 антитела]

Вводят мутацию LALA (L234A и L235A), при которой аминокислоты, соответствующие аминокислотным положениям 238 и 239 (индекс EU: 234 и 235) тяжелой цепи 16B11.1, соответственно заменены с лейцина (L) на аланин (A), мутацию «выступы во впадины», при которой аминокислоты, соответствующие аминокислотным положениям 370, 372 и 411 (индекс EU: 366, 368 и 407), соответственно заменены с треонина (T) на серин (S), с L на A и с тирозина (Y) на валин (V), и мутацию, при которой аминокислота, соответствующая аминокислотному положению 301 (индекс EU: 297), заменена с аспарагина (N) на глицин (G). Сконструированная таким образом аминокислотная последовательность тяжелой цепи 16B11.1 показана в SEQ ID NO: 6. Полученный таким образом вектор обозначен как pcDNA3.4-16B11.1_НС_Н.

[0204] [Пример 7-2: Получение вектора биспецифического антитела анти-человеческого CD3 антитела]

Конструирование последовательности гуманизованного анти-CD3- антитела осуществляют на основе последовательностей варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи анти-CD3-антитела мыши, описанных в патенте Японии № 5686953 в соответствии со способом, описанным в литературе (Front Biosci., 2008, Vol. 13, p. 1619-1633). Здесь вводят обратную мутацию. Информацию о трехмерной структуре (код PDB: 5FCS) анализируют с помощью Molecular Operating Environment MOE, предоставленного MOLSIS Inc., для определения положения для введения обратной мутации в каркасную область. Гуманизованное анти-CD3 антитело конструируют таким образом, что варибельная область тяжелой цепи (соответствующая аминокислотным положениям 1-125 в SEQ ID NO: 14), линкер (соответствующий аминокислотным положениям 126-145 в SEQ ID NO: 14), варибельная область легкой цепи (соответствующая аминокислотным положениям 146-254 SEQ ID NO: 14), шарнир (соответствующий аминокислотным положениям 255-269 SEQ ID NO: 14), домен CH2

(соответствующий аминокислотным положениям 270-379 в SEQ ID NO: 14), и домен CH3 (соответствующий аминокислотным положениям 380-486 в SEQ ID NO: 14) расположены в указанном порядке. Далее, мутацию LALA, при которой (1) аминокислоты в аминокислотном положении 44 и аминокислотном положении 247 заменены на цистеин (C), (2) аминокислота в аминокислотном положении 259 (индекс EU: 220) заменена с C на S, и (3) аминокислоты в аминокислотных положениях 273 и 274 (индекс EU: 234 и 235) заменены с L на A, мутацию «выступы во впадины», при которой (4) аминокислота в аминокислотном положении 405 (индекс EU: 366) заменена с T на триптофан (W), и мутацию, в которой (5) аминокислота в аминокислотном положении 336 (индекс EU: 297) заменена с N на G, вводят в SEQ ID NO: 14. Для введения этих мутаций, полинуклеотиды, соответственно кодирующие аминокислотные последовательности, включая соответствующие сайты мутаций, синтезируют для вставки в вектор pcDNA 3.1(+) (Thermo Fisher Scientific, V79020). Полученный таким образом вектор обозначают как pcDNA3.1-m7_scFV_K. Нуклеотидная последовательность полученного таким образом гуманизированного анти-CD3-антитела показана в SEQ ID NO: 13, и его аминокислотная последовательность показана в SEQ ID NO: 14.

[0205] [Пример 7-3: Получение анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела]

Для получения биспецифического антитела, содержащего Fab область анти-TSPAN8 антитела, scFv область анти-CD3 антитела и Fc область, векторы pcDNA3.4-16B11.1_HC_H, pcDNA3.4-16B11_LC и pcDNA3.1-m7_scFV_K трансфицируют в клетки ExpiCHO-S(R) так же, как в примере 3. Полученный таким образом культуральный супернатант очищают с помощью MabSelect SuRe, и затем с помощью колонки для гель-фильтрации HiLoad 26/600 Superdex(R) 200 пг (GE Healthcare, 28-9893-36), и таким образом получают очищенное антитело, имеющее чистоту 95% или более. Полученное таким образом антитело обозначают как анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело.

[0206] [Пример 8: Оценка активности связывания анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела]

Активность связывания анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела с TSPAN8 и CD3 оценивают с помощью ELISA с использованием белка LEL TSPAN8 или комплексного белка CD3.

В частности, 1 мкг/мл рекомбинантного белка TSPAN8 человека (SinoBiological, 15683-H07H) или рекомбинантного гетеродимера CellExp CD3-эпсилон и CD3-дельта для человека (BioVision, P1183-10), разведенного PBS, добавляют в 384-луночный белый планшет, MaxiSorp (Nunc, 460372) по 30 мкл/луноку. После выстаивания при 4°C в течение ночи, супернатант удаляют и к нему добавляют Blocking One (Nacalai Tesque, 03953-95) в количестве 120 мкл/луноку. После выстаивания при комнатной температуре в течение 1 часа, супернатант удаляют, и полученную смесь дважды промывают буфером TBST (Thermo Fisher Scientific, 28360). Туда добавляют анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело, разведенное TBST, содержащим 10% Blocking One, в количестве 30 мкл/луноку с

последующим выстаиванием при комнатной температуре в течение 1 часа. Полученный раствор антител удаляют, дважды промывают буфером TBST, туда добавляют Goat Anti-Human Kappa, Mouse ads-HRP (Southern Biotech, 2061-05), разведенное в 5000 раз TBST, содержащим 10% Blocking One, в количестве 30 мкл/лунку, и полученную смесь выстаивают при комнатной температуре в течение 30 минут. Полученный раствор антител удаляют, промывают буфером TBST четыре раза и туда добавляют субстрат BM Chemiluminescence ELISA Substrate (POD) (Roche, 11582950001) в количестве 30 мкл/лунку. Реакцию проводят при комнатной температуре в течение 15 минут, и затем измеряют хемилюминесценцию с помощью ARVO X3 (Perkin Elmer). В результате, значения EC50 для TSPAN8 и CD3 рассчитывают, соответственно, как 1,0 мкг/мл (8,1 нМ) и 4,6 мкг/мл (36 нМ) (фиг. 8).

[0207] [Пример 9: Оценка активности RTCC анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела]

Среду, полученную путем добавления, к 500 мл RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific, 11875-119), 50 мл FBS, 5 мл заменимой аминокислоты MEM (Merck, M7145), 5 мл пирувата натрия (Merck, S8636), 5 мл GlutaMAX I (Thermo Fisher Scientific, 35050-061), 5 мл пенициллина-стрептомицина (Thermo Fisher Scientific, 15070-063) и 5 мл HEPES (Thermo Fisher Scientific, 15630-080), используют в качестве культуральной среды (далее в настоящем документе называемой «культуральной средой»). Суспензию клеток, приготовленную путем культивирования клеток 60As6-Luc/GFP, полученных в примере 4, в культуральной среде с получением 2×10^5 клеток/мл, высевают в 96-луночный планшет с плоским дном (IWAKI, 3860-096) в количестве 50 мкл в каждую, и культивируют в 5% CO₂ инкубаторе с при 37°C. Через 3 часа, криоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови человека (LP. CR. MNC 10M; All Cells LCC, 4W-270), полученные в культуральной среде с получением 1×10^6 клеток/мл, высевают в 96-луночный планшет при культивировании в количестве 100 мкл. Туда добавляют анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело, полученное с конечной концентрацией 0, 3, 30, 100, 300, 1000, 3000 или 10000 нг/мл, каждое в количестве 50 мкл, и через 3 дня измеряют площадь флуоресценции (GFP) в каждой лунке с помощью IncuCyte(R) ZOOM (Sartorius) при культивировании при 37°C в 5% CO₂. На фиг. 9 показана кривая роста клеток с использованием площади флуоресценции в качестве показателя роста клеток. Ордината фиг. 9 показывает относительные значения площади флуоресценции клетки 60As6-Luc/GFP, когда площадь флуоресценции лунки с одной средой принята за 0%, и площадь флуоресценции лунки без добавления растворов антител принята за 100%. В результате, анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело демонстрирует эффект ингибирования роста клеток *in vitro* в отношении клетки 60As6-Luc/GFP, которая представляет собой клетку рака желудка, экспрессирующую TSPAN8.

[0208] [Пример 10: Оценка лекарственного действия анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела с использованием асцитной клетки пациента]

Когда анти-TSPAN8-анти-CD 3 биспецифическое антитело связывается с раковой

клеткой и иммунной клеткой, содержащейся в асцитной клетке пациента, иммунная клетка активируется, и раковая клетка повреждается. Цитотоксическую активность против раковой клетки и активирующее иммунную клетку действие анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела оценивают следующим способом.

В качестве асцитной клетки пациента используют клетку, полученную путем обработки асцитной жидкости пациента так же, как в примере 1-1, до гемолиза и криоконсервации полученной клетки. Размороженные клетки получают в той же культуральной среде, что и в примере 9, с получением 2×10^6 клеток/мл, и клеточный раствор высевают в плоскодонный 96-луночный планшет в количестве 100 мкл/лунку. В качестве тестируемых антител используют анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело и контрольные антитела (анти-KLH антитело с заменой Fab 16B11.1 на Fab анти-KLH антитела (гемоцианина лимфы улитки) и биспецифическое антитело анти-CD3 антитела). Каждое тестируемое антитело разводят от 10 мкг/мл до 0,1 нг/мл в 10-кратном обычном отношении. Тестируемое антитело добавляют в 96-луночный планшет с засеянными клетками с последующим культивированием при 37°C в 5% CO₂ инкубаторе. Для культивирования используют питательную среду. Клетки собирают через 3 дня и высевают в микропланшет с V-образным дном. При сборе, клетки, прилипшие к планшету, диссоциируют с помощью Accutase (Innovative Cell Technologies, AT-104) и добавляют в микропланшет с V-образным дном. После центрифугирования при 720xg в течение 2 минут, надосадочную жидкость удаляют и раствор, полученный путем добавления 40/1 количества Human BD Fc Block (Beckton, Dickinson and Company, 564220) к окрашивающему буферу (10% FBS, содержащему PBS, 0,09% NaN₃, 2 mM ЭДТК) добавляют по 20 мкл/лунку. В каждую лунку добавляют FITC антитело мыши против CD4 человека (Beckton, Dickinson and Company, 550628), разведенный окрашивающим буфером, APC-H7 антитело мыши против CD8 человека (Beckton, Dickinson and Company, 560179), APC антитело мыши против CD45 человека (Beckton, Dickinson and Company, 555485), PE антитело мыши против CD25 человека (Beckton, Dickinson and Company, 555432) и Brilliant Violet 421 антитело против CD326 человека (EpcAM) (BioLegend, 324200) в количестве 10 мкл/лунку, и полученную смесь выстаивают при 4°C в течение 50 минут. После однократной промывки клеток окрашивающим буфером клетки снова суспендируют в окрашивающем буфере, содержащем 1/200 количества раствора 7-AAD, и связывание различных антител с асцитной клеткой измеряют с помощью проточной цитометрии с использованием CytoFLEX S (Beckman Coulter). Данные анализируют с помощью FlowJo. Фракцию 7-AAD-отрицательных клеток в качестве показателя живых клеток размножают с CD45 в качестве показателя иммунной клетки и EpcAM в качестве показателя раковой клетки. CD45-отрицательную EpcAM-положительную раковую клетку размножают в Fsc (lin) и Ssc (lin), и количество клеток, исключая фрагментированную фракцию, определяют как количество жизнеспособных раковых клеток. Кроме того, измеряют экспрессию маркера активации CD25 на CD4- или CD8-положительных клетках в CD45-положительной фракции и рассчитывают MFI интенсивности флуоресценции анти-CD25-PE. На фиг. 10-1

показаны изменения количества жизнеспособных раковых клеток. Ордината показывает относительные значения количества раковых клеток, когда количество раковых клеток без добавления растворов антител принимается за 100%. На фиг. 10-2 и 10-3 показаны изменения уровня экспрессии CD25 на CD4-положительных Т-клетках и CD8-положительных Т-клетках из-за тестируемых антител. Ордината показывает рассчитанные относительные значения MFI интенсивности флуоресценции анти-CD25-PE.

В результате, замечено, что количество жизнеспособных раковых клеток, содержащихся в асцитной жидкости, снижено за счет добавления анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела, как показано на фиг. 10-1, и что CD4-положительные Т-клетки и CD8-положительные Т-клетки в асцитной жидкости активированы, как показано на фиг. 10-2 и 10-3. Эти результаты позволяют предположить, что анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело активирует CD4-положительные Т-клетки и CD8-положительные Т-клетки в асцитной жидкости и убивает раковые клетки в асцитной жидкости.

[0209] [Пример 11: Оценка противоопухолевых свойств анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела *in vivo*]

Противоопухолевое действие *in vivo* анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела оценивают с использованием модели перитонеальной диссеминации рака желудка.

[Пример 11-1: получение размноженных pan Т-клеток]

Анти-CD3 антитело (BioLegend, 317315), растворенное в PBS в концентрации 3 мкг/мл, добавляют в 24-луночный планшет (IWAKI, 3820-024) в количестве 250 мкл на каждую, с последующим выстаиванием при 4°C. На следующий день, планшет дважды промывают культуральной средой, добавляют к ней культуральную среду с последующим выстаиванием при комнатной температуре до описанного ниже посева клеток. Из HPBMC выделяют мононуклеарные клетки периферической крови человека, криоконсервированные (LONZA, CC-2702), pan Т-клетки (включая как CD4Т-клетки, так и CD8Т-клетки). Для выделения используют набор PanT Cell Isolation Kit для человека (Miltenyi Biotec, 130-096-535), и эксперимент проводят в соответствии с протоколом, прилагаемым к набору. После удаления культуральной среды из 24-луночного планшета, pan Т-клетки, приготовленные в количестве 3×10^6 клеток/мл, высевают в количестве 500 мкл на каждую. Кроме того, туда добавляют культуральную среду, содержащую 20 нг/мл IL-2 человека (PeproTech, 200-2) и 2 мкг/мл анти-CD28-антитела (BioLegend, 302923) в количестве 500 мкл на каждую, с последующим культивированием в 5% CO₂ инкубаторе при 37°C. Клетки пассируют в новый планшет (IWAKI & CO., LTD., 3810-006) через 3 дня, 5 дней и 7 дней после начала культивирования, и туда добавляют IL-2 с получением конечной концентрации 10 нг/мл. Через 7 и 10 дней после начала культивирования, клетки собирают и используют в примере 10-2. Клетки, выделенные и выращенные в настоящем примере, обозначают как размноженные pan Т-клетки.

[0210] [Пример 11-2: Подтверждение медицинского эффекта в модели

перитонеальной диссеминации рака желудка]

Клетки 60As6-Luc/GFP трансплантируют в количестве 1×10^6 клеток/1 мл/PBS в брюшную полость 7-недельных самок мышей C.B17/Icr-scid/scidJcl (CLEA Japan, Inc.), распределенных на группы по семь мышей в каждой группе. Через 6 дней после трансплантации, мышей объединяют в группы, используя в качестве показателя количество люминесценции субстрата люциферина люциферазой, введенной в клетку 60As6-Luc/GFP, так, чтобы каждая группа была четной. Величину люминесценции люциферина используют в качестве показателя, указывающего на объем опухоли.

В частности, каждой мышце внутрибрюшинно вводят раствор, полученный путем растворения 3 мг люциферина (VivoGlo Luciferin, In Vivo Grade, Promega, P1043) в 0,5 мл PBS, и количество испускаемого света измеряют через 10 минут после введения с помощью IVIS Lumina II (Perkin Elmer). Затем раствор, полученный суспендированием 1×10^7 размноженных рап Т-клеток в 0,5 мл PBS, и раствор, полученный суспендированием 0, 0,3, 1,0 или 3,0 мг/кг анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела в 0,2 мл PBS, вводят внутрибрюшинно через 7 и 10 дней после трансплантации клеток 60As6-Luc/GFP. Количество люминесценции люциферина измеряют через 14 дней после трансплантации клеток рака желудка, чтобы оценить увеличение или уменьшение объема опухоли. Кроме того, выживаемость мышшиной модели перитонеальной диссеминации наблюдается до 34 дней после трансплантации клеток 60As6-Luc/GFP. Как показано на фиг. 11-1, в группе, получавшей анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело, наблюдается значительное уменьшение объема опухоли, и, как показано на фиг. 11-2, значительное влияние на увеличение продолжительности жизни демонстрируется в группах, которым вводят 1,0 или 3,0 мг/кг антитела. В таблице 4 показано среднее время выживания и результаты тестирования. Вероятность значимости, р-значение, показанное в таблице, получают путем сравнения продолжительности жизни контрольной группы (группы, которой вводят растворитель) с продолжительностью жизни группы, которой вводят анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело с помощью лог-рангового критерия. В таблице, ** показывает группу, имеющую р-значение меньше уровня значимости 0,01/3, скорректированного по способу Бонферрони.

[Таблица 4]

Лечение		Средняя выживаемость	Значимое различие	Р-значение
Контрольная группа	PBS	23	-	-
Анти-TSPAN8(16B11)- анти-CD3 биспецифическое антитело	0,3 мг/кг	23	ns	
	1,0 мг/кг	29	**	0,0006
	3,0 мг/кг	33	**	0,0006

Лог-ранговый критерий (Мантела-Кокса) (коррекция по Бонферрони)

[0211] [Пример 12: Действие анти-TSPAN8-анти-CD3 биспецифического антитела на различные линии раковых клеток]

[Пример 12-1: Проверка активности связывания анти-TSPAN8 антитела с различными линиями раковых клеток]

Связывание меченого Alexa Fluor64 7 16B11 с клеточными линиями карциномы желудка (клетка КАТОIII: Japanese Collection of Research Bioresources (JCRB), JCRB0611, клетка NUGC-4: RIKEN BioResource Research Center (BRC), RCB1939 и клетка 60As6-Luc/GFP), клеточными линиями карциномы толстой кишки (клетка HT-29: ATCC, HTB-38, клетка LoVo: ATCC, CCL-229, и клетка GP2d: The European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), 95090714), клеточной линии карциномы поджелудочной железы (клетка AsPC-1: ATCC, CRL-1682), клеточной линии карциномы пищевода (клетка OE19: ECACC, 96071721) и клеточной линии рака печени (клетка Li-7: RIKEN BRC, RCB1941) измеряют с помощью проточной цитометрии. В качестве отрицательного контроля используют анти-KLH антитело собственного производства (173A1), меченное Alexa Fluor647. На фиг.12 показаны гистограммы связывания 16B11 и антитела отрицательного контроля с различными клеточными линиями карциномы.

[0212] [Пример 12-2: Оценка активности RTCC анти-TSPAN8/анти-CD3 биспецифического антитела на различных клеточных линиях карциномы]

Клетку КАТОIII, клетку NUGC- 4, клетку HT-29, клетку LoVo, клетку GP2d, клетку AsPC-1, клетку OE19 и клетку Li-7 готовят в культуральной среде с получением 2×10^5 клеток/мл и высевают в плоскодонный 96-луночный планшет (IWAKI & CO., LTD., 3860-096) в количестве 50 мкл на каждую с последующим культивированием в 5% CO₂ инкубаторе при 37°C. Кримоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови человека (Lonza Group AG, CC-2702), приготовленные в культуральной среде с получением 1×10^6 клеток/мл, высевают в 96-луночный планшет при культивировании в количестве 100 мкл на каждую. Анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело разводят культуральной средой в двойном обычном отношении с максимальной концентрацией 40 мкг/мл или 20 мкг/мл. Добавляют разведенное анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело в количестве 50 мкл (с максимальной конечной концентрацией 10 мкг/мл или 5 мкг/мл). Полученные в 96-луночном планшете с каждой клеточной линией карциномы, добавленные кримоконсервированные мононуклеарные клетки периферической крови человека и антитело культивируют в 5% CO₂ инкубаторе при 37°C. Клетки собирают через 3 дня и высевают в микропланшет с V-образным дном. При сборе, клетки, прилипшие к культуральному планшету, диссоциируют с помощью Accutase (Innovative Cell Technologies, AT-104) и добавляют в микропланшет с V-образным дном. После центрифугирования при 720xg в течение 2 минут, супернатант удаляют и добавляют жидкость, полученную путем добавления 1/40 количества Human BD Fc Block к окрашивающему буферу, в количестве 20 мкл на лунку. APC антитело мыши против CD4 человека (Becton, Dickinson and Company, 555349), APC-H7 антитело мыши против CD8 человека, Brilliant Violet 421 антитело мыши против CD45 человека (Becton, Dickinson and Company, 563879) и PE антитело мыши против CD25 человека, разведенные окрашивающим буфером, каждое добавляют в лунку по 10 мкл/лунку с последующим

выстаиванием при 4°C в течение 1 часа. После однократной промывки окрашивающим буфером, туда добавляют 1/200 раствора 7-AAD. Полученную смесь снова суспендируют в окрашивающем буфере, и связывание различных антител измеряют с помощью проточной цитометрии с использованием CytoFLEX S. Данные анализируют с помощью FlowJo. Количество CD45-отрицательных клеток во фракции 7-AAD-отрицательных клеток в качестве показателя живых клеток принимают за количество жизнеспособных клеток карциномы. Те, в которые не добавляют растворы антител, принимают за 100%. Кроме того, рассчитывают кратность изменения экспрессии маркера активации CD25 в CD4- или CD8-положительных клетках CD45-положительной фракции, когда MFI интенсивности флуоресценции анти-CD25-PE без добавления растворов антител принимают за 1 для каждого. В результате, количество жизнеспособных клеток карциномы, экспрессирующих TSPAN8, снижено из-за добавления анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела, как показано на фиг. 13-1. Кроме того, наблюдают активацию CD4-положительных Т-клеток и CD8-положительных Т-клеток, как показано, соответственно, на фиг. 13-2 и фиг. 13-3.

[0213] [Пример 12-3: Подтверждение медицинского эффекта в модели подкожной опухоли с PBMC человека - привитыми HT-29 клетками]

Нормальные PBMC человека (Precision for Medicine, 33000-10M) суспендируют в PBS с получением $1,25 \times 10^7$ клеток/мл, и клетки инъецируют в хвостовую вену 6-недельных самок мышей NOD/Shi-scid, IL-2RγKO (NOG) (In-Vivo Science Inc.) в количестве $2,5 \times 10^6$ клеток/200 мкл. Через 10 дней после переноса PBMC человека, клетки HT-29 суспендируют в PBS с получением 5×10^7 клеток/мл, и инокулируют подкожно мышам в количестве 5×10^6 клеток/100 мкл. Через 10 дней после инокуляции клеток HT-29, объем опухоли измеряют с помощью штангенциркуля, и мышей распределяют с одинаковыми средними объемами опухолей (n=10). Введение анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела начинают с того же дня. Первый день введения определяют как день 0. PBS или 0,3, 1, 3 или 10 мг/кг анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифического антитела вводят мышам внутривенно в день 0, 4, и 7. Объем опухоли измеряют на 0, 4, 7 и 11 день (фиг. 14-1). Объем опухоли [мм³] рассчитывают по следующей формуле.

$$(\text{Длина большой оси опухоли [мм]}) \times (\text{Длина малой оси опухоли [мм]})^2 \times 0,5$$

Как показано на фиг. 14-2, анти-TSPAN8(16B11)-анти-CD3 биспецифическое антитело значительно подавляет рост опухоли HT-29 в дозах 0,3, 1, 3 и 10 мг/кг.

ПРОМЫШЛЕННАЯ ПРИМЕНИМОСТЬ

[0214] Ожидается, что анти-TSPAN8 антитело по настоящему изобретению и слитое анти-TSPAN8 антитело, такое как анти-TSPAN8-анти-CD3 биспецифическое антитело, будут применимы для лечения рака. Кроме того, полинуклеотид, вектор экспрессии, трансформированная клетка-хозяин и способ получения антитела по настоящему изобретению применимы для получения анти-TSPAN8 антитела и его слияния.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ В СВОБОДНОЙ ФОРМЕ

[0215] В нумерованном заголовке <223> следующего перечня последовательностей

описана «Искусственная последовательность». В частности, SEQ ID NO: 2 представляет собой аминокислотную последовательность TSPAN8-Мус-DDK человека, и нуклеотидная последовательность, представленная SEQ ID NO: 1, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность TSPAN8 человека, представленную SEQ ID NO: 2. SEQ ID NO: 4, 6 или 10 представляет собой аминокислотную последовательность тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, и нуклеотидная последовательность, представленная SEQ ID NO: 3, 5 или 9, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, представленную SEQ ID NO: 4, 6 или 10. Последовательность SEQ ID NO: 8 или 12 представляет собой аминокислотную последовательность легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, и нуклеотидная последовательность, представленная SEQ ID NO: 7 или 11, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, представленную SEQ ID NO: 8 или 12. SEQ ID NO: 14 представляет собой аминокислотную последовательность полипептида, где анти-CD3-scFv область и второй Fc полипептид связаны вместе, и нуклеотидная последовательность, представленная SEQ ID NO: 13, представляет собой нуклеотидную последовательность, кодирующую аминокислотную последовательность полипептида, представленную SEQ ID NO: 14, где анти-CD3-scFv область и второй Fc полипептид связаны друг с другом. SEQ ID NO: 15-23 представляют аминокислотные последовательности различных линкеров, описанных в подробном описании настоящего изобретения. SEQ ID NO: 24-37 представляют аминокислотные последовательности CDR и переменных областей 16B11 и 16B12. SEQ ID NO: 38-40 представляют аминокислотные последовательности сигнальных последовательностей. SEQ ID NO: 41-43 представляют, соответственно, аминокислотные последовательности области в аминокислотных положениях 126-155 TSPAN8 мыши, крысы или яванского макака.

ПЕРЕЧЕНЬ ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Биспецифическое антитело, которое связывается с TSPAN8 и CD3, содержащее:

(a) Fab область анти-TSPAN8 антитела, состоящую из: фрагмента тяжелой цепи, содержащего переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела; и легкой цепи, содержащей переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела;

(b) анти-CD3-scFv область, содержащую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела; и

(c) Fc область, состоящую из первого Fc полипептида, связанного с фрагментом тяжелой цепи Fab области (a), и второго Fc полипептида, связанного с анти-CD3-scFv областью (b).

2. Биспецифическое антитело по п. 1, отличающееся тем, что

переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 SEQ ID NO: 8; или

переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 SEQ ID NO: 12.

3. Биспецифическое антитело по п. 1, отличающееся тем, что

переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 SEQ ID NO: 6, и переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 SEQ ID NO: 8; или

переменная область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 SEQ ID NO: 10, и переменная область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 SEQ ID NO: 12.

4. Биспецифическое антитело по п. 1, отличающееся тем, что

Fab область анти-TSPAN8-антитела состоит из фрагмента тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-219 SEQ ID NO: 6, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или

Fab область анти-TSPAN8-антитела состоит из фрагмента тяжелой цепи, состоящего из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-219 SEQ ID NO: 10, и легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

5. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-4,

отличающееся тем, что переменная область тяжелой цепи анти-CD3 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 SEQ ID NO: 14, и переменная область легкой цепи анти-CD3 антитела содержит CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 SEQ ID NO: 14.

6. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-4,

отличающаяся тем, что переменная область тяжелой цепи анти-CD3 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 SEQ ID NO: 14, и переменная область легкой цепи анти-CD3 антитела состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 SEQ ID NO: 14.

7. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-4, отличающееся тем, что анти-CD3-scFv область состоит из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-254 SEQ ID NO: 14.

8. Биспецифическое антитело по пп. 1, отличающееся тем, что

биспецифическое антитело содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 6, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 6, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 8; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3 антитела, содержащую

CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом, или

биспецифическое антитело содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO: 12; и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-68 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 101-114 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3 антитела, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 168-181 в SEQ ID NO: 14, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 197-203 в SEQ ID NO: 14, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 236-244 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

9. Биспецифическое антитело по п. 1, отличающееся тем, что

биспецифическое антитело содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом, легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8, и

полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом, или

биспецифическое антитело содержит: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом, легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую вариабельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12, и полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая вариабельную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и вариабельную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

10. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-9, содержащее Fc область, содержащую мутацию LALA (L234A и L235A (где положения мутации представляют собой аминокислотные положения в константной области I γ 1 человека в соответствии с индексом EU)).

11. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-10, содержащее Fc область, содержащую мутацию N297G (где положение мутации представляет собой аминокислотное положение в константной области I γ 1 человека в соответствии с индексом EU).

12. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-11, содержащее Fc область, содержащую мутацию «выступы во впадины».

13. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-12, содержащее Fc область, содержащую мутацию LALA, мутацию N297G и мутацию «выступы во впадины».

14. Биспецифическое антитело по п. 12 или 13, отличающееся тем, что мутация «выступы во впадины» представляет собой мутацию T366W в одном Fc полипептиде, включенном в Fc область, и мутацию T366S, L368A и Y407V в другом Fc полипептиде, включенном в Fc область (где положения мутации представляют собой аминокислотные положения в константной области I γ 1 человека в соответствии с индексом EU).

15. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-14, содержащее Fc область, в которой первый Fc полипептид состоит из аминокислотной последовательности аминокислот 235-451 в SEQ ID NO: 6, и второй Fc полипептид состоит из аминокислотной последовательности аминокислот 270-486 в SEQ ID NO: 14.

16. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-15, отличающееся тем, что фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела и первый Fc полипептид связаны через шарнирную область, и анти-CD3-scFv область и второй Fc полипептид связаны через шарнирную область.

17. Биспецифическое антитело по п. 1, содержащее: тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом; легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где анти-CD3-scFv область связана со вторым Fc полипептидом.

18. Биспецифическое антитело по любому из пп. 2-17 с пост-трансляционной модификацией.

19. Биспецифическое антитело по п. 18, отличающееся тем, что пост-трансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце варибельной области тяжелой цепи и/или делецию лизина на C-конце тяжелой цепи.

20. Полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих (a)-(e):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий варибельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую варибельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8;

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий варибельную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, связан с первым Fc полипептидом;

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую варибельную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12;

(e) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая варибельную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и варибельную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

21. Полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих (a)-(c):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc

полипептидом;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(c) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где анти-CD3-scFv область связана со вторым Fc полипептидом.

22. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п. 20 или 21.

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

24. Клетка-хозяин, содержащая: полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, где фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, содержащий переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 6, связан с первым Fc полипептидом; полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, содержащую переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8; и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, где анти-CD3-scFv область, содержащая переменную область тяжелой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-125 в SEQ ID NO: 14, и переменную область легкой цепи анти-CD3-антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 146-254 в SEQ ID NO: 14, связана со вторым Fc полипептидом.

25. Клетка-хозяин, содержащая: полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, в которой фрагмент тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела связан с первым Fc полипептидом; полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую полипептид, состоящий из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 14, где область анти-CD3-scFv связана со вторым Fc полипептидом.

26. Способ получения биспецифического антитела, которое связывается с TSPAN8 и CD3, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по любому из пп. 23-25.

27. Фармацевтическая композиция, содержащая:

биспецифическое антитело по любому из пп. 1-19, и
фармацевтически приемлемый эксципиент.

28. Биспецифическое антитело по любому из пп. 1-19 для применения при лечении рака.

29. Фармацевтическая композиция по п. 27 для лечения рака.

30. Способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества биспецифического антитела по любому из пп. 1-19.

31. Применение биспецифического антитела по любому из пп. 1-19 в производстве фармацевтической композиции для лечения рака.

32. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое селективно связывается с раковой клеткой, экспрессирующей TSPAN8 человека.

33. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое связывается по меньшей мере с одной аминокислотой, присутствующей в области TSPAN8 человека в аминокислотных положениях 126-155 в SEQ ID NO: 2.

34. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 33, которое связывается по меньшей мере с аминокислотой в аминокислотном положении 131 в SEQ ID NO: 2, присутствующей в области TSPAN8 человека.

35. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, выбранные из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 4, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 4, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 4, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 8, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 8, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO. 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 31-35 в SEQ ID NO: 10, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-66 в SEQ ID NO: 10, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 99-110 в SEQ ID NO. 10, и переменную область легкой цепи, содержащую CDR1, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 24-34 в SEQ ID NO: 12, CDR2, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 50-56 в SEQ ID NO: 12, и CDR3, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 89-96 в SEQ ID NO. 12.

36. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 35, выбранное из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в

SEQ ID NO: 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, содержащее переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10, и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

37. Анти-TSPAN8 антитело по п. 35, выбранное из следующих (a) и (b):

(a) анти-TSPAN8 антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8; и

(b) анти-TSPAN8 антитело, содержащее тяжелую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10, и легкую цепь, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

38. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которое конкурирует с анти-TSPAN8 антителом или его антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 33-37 за связывание с TSPAN8 человека, экспрессирующим раковую клетку.

39. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 32-38, связанное с антителом к поверхностному антигену Т-клетки или НК-клетки, или его антигенсвязывающим фрагментом.

40. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 39, отличающееся тем, что поверхностный антиген Т-клетки представляет собой CD3.

41. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 40, отличающееся тем, что антигенсвязывающий фрагмент с поверхностным антигеном Т-клетки представляет собой scFv анти-CD3 антитела.

42. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 32-41, имеющее пост-трансляционную модификацию.

43. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п. 42, отличающееся тем, что пост-трансляционная модификация представляет собой пироглутамилирование на N-конце переменной области тяжелой цепи и/или делецию лизина в на C-конце тяжелой цепи.

44. Слияние или комплекс анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 32-43, или клетки, на поверхности которой экспрессируется анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 32-43.

45. Полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих (a)-(d):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 4;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 8;

(с) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-121 в SEQ ID NO: 10; и

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности аминокислотных положений 1-107 в SEQ ID NO: 12.

46. Полинуклеотид, выбранный из группы, состоящей из следующих (a)-(d):

(a) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4;

(b) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8;

(с) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 10; и

(d) полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 12.

47. Вектор экспрессии, содержащий полинуклеотид по п. 45 или 46.

48. Клетка-хозяин, трансформированная вектором экспрессии по п. 47.

49. Клетка-хозяин, выбранная из следующих (a) и (b):

(a) клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область тяжелой цепи анти-TSPAN8 антитела по п. 45, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую переменную область легкой цепи анти-TSPAN8 антитела по п. 45; и

(b) клетка-хозяин, содержащая полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую тяжелую цепь анти-TSPAN8 антитела по п. 46, и полинуклеотид, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую легкую цепь анти-TSPAN8 антитела по п. 46.

50. Способ получения анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий стадию культивирования клетки-хозяина по п. 48 или 49.

51. Анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 32-43, или гибрид, комплекс или клетка по п. 44 для применения при лечении рака.

52. Фармацевтическая композиция, содержащая:

анти-TSPAN8 антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 32-43, или

гибрид, комплекс или клетку по п. 44, и

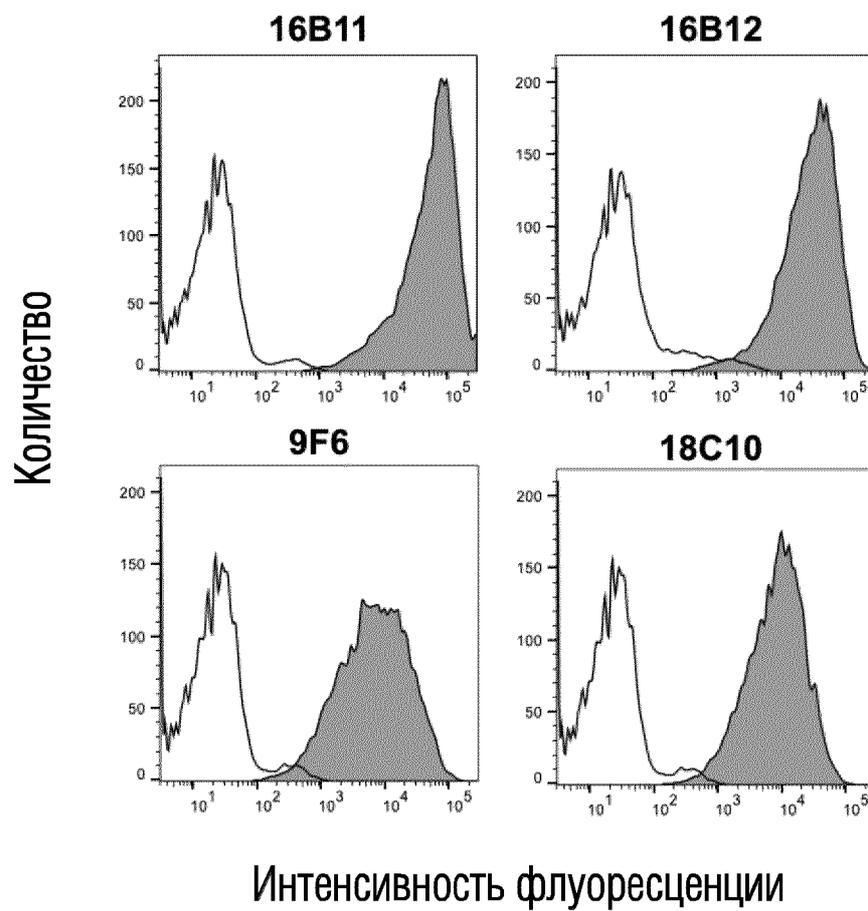
фармацевтически приемлемый эксципиент.

53. Фармацевтическая композиция по п. 52 для лечения рака.

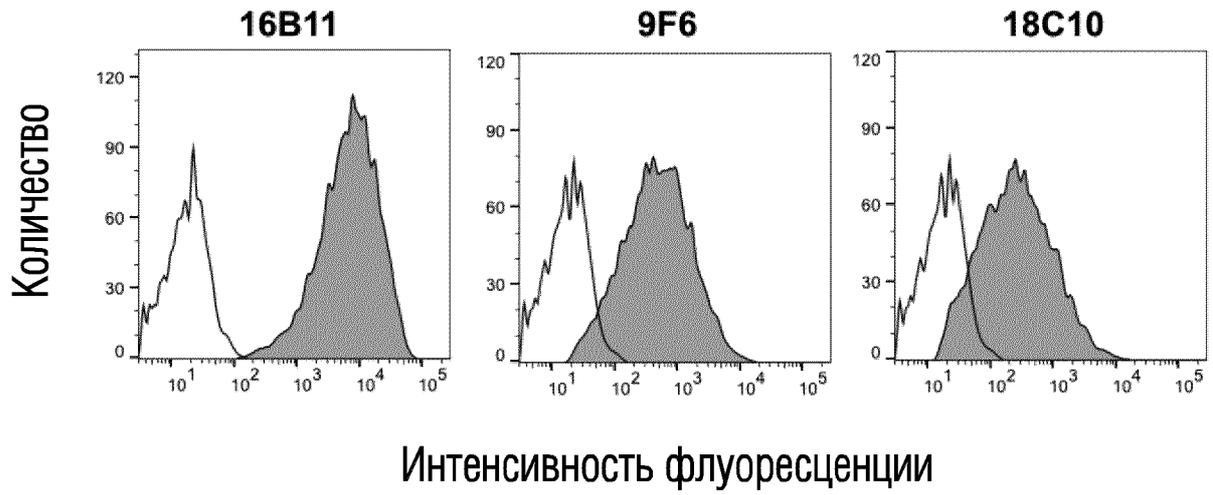
54. Способ лечения рака, включающий стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 32-43, или стадию введения субъекту терапевтически эффективного количества слияния, комплекса или клетки по п. 44.

55. Применение анти-TSPAN8 антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 32-43 или применение слияния, комплекса или клетки по п. 44 в производстве фармацевтической композиции для лечения рака.

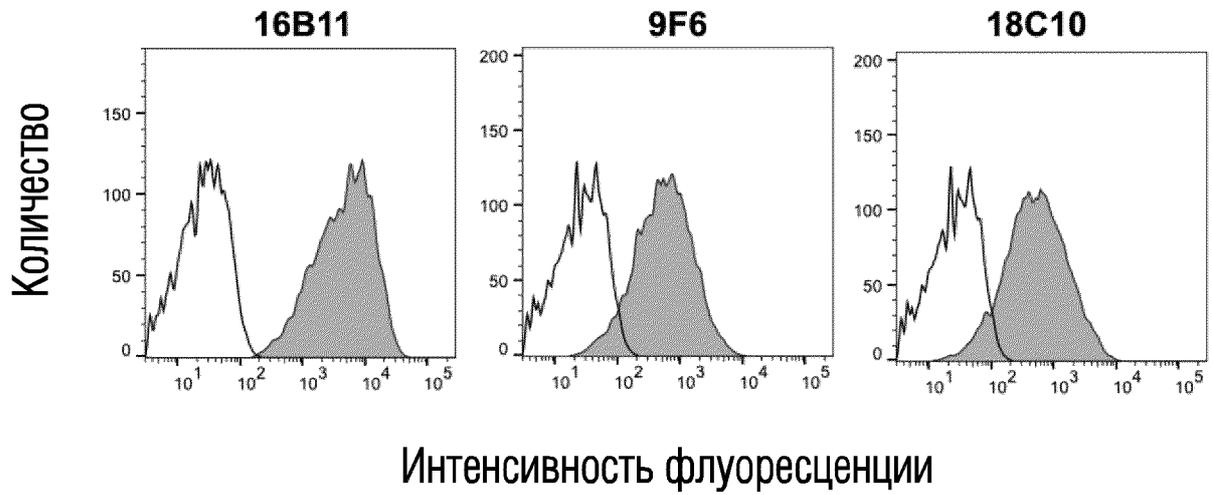
ФИГ. 1-1



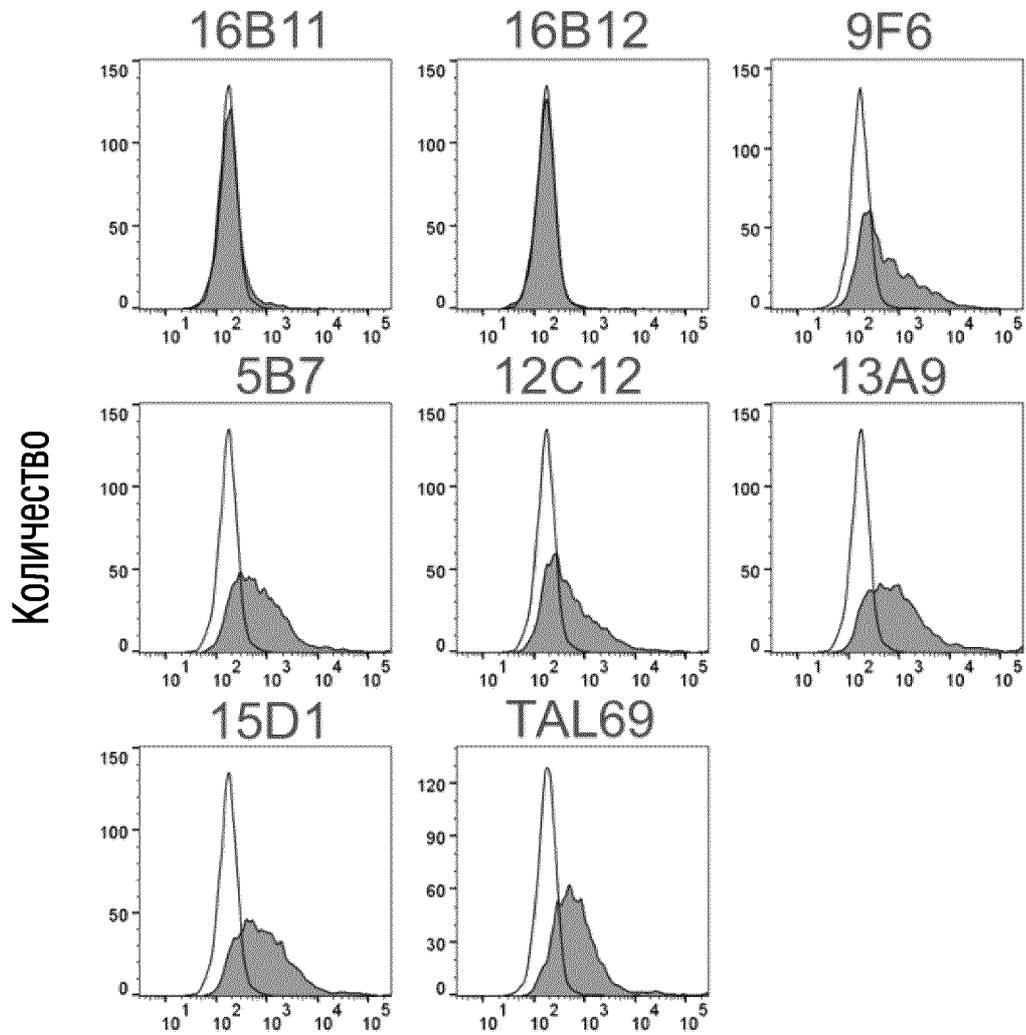
ФИГ. 1-2



ФИГ. 1-3

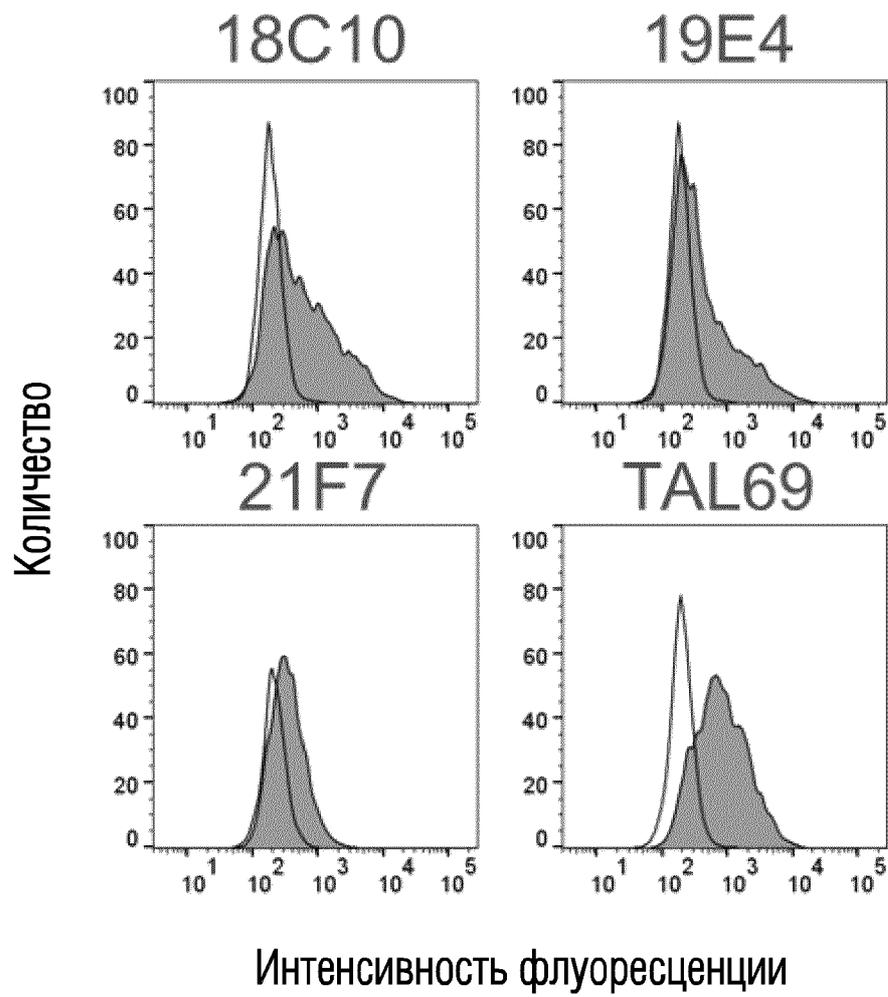


ФИГ. 2-1

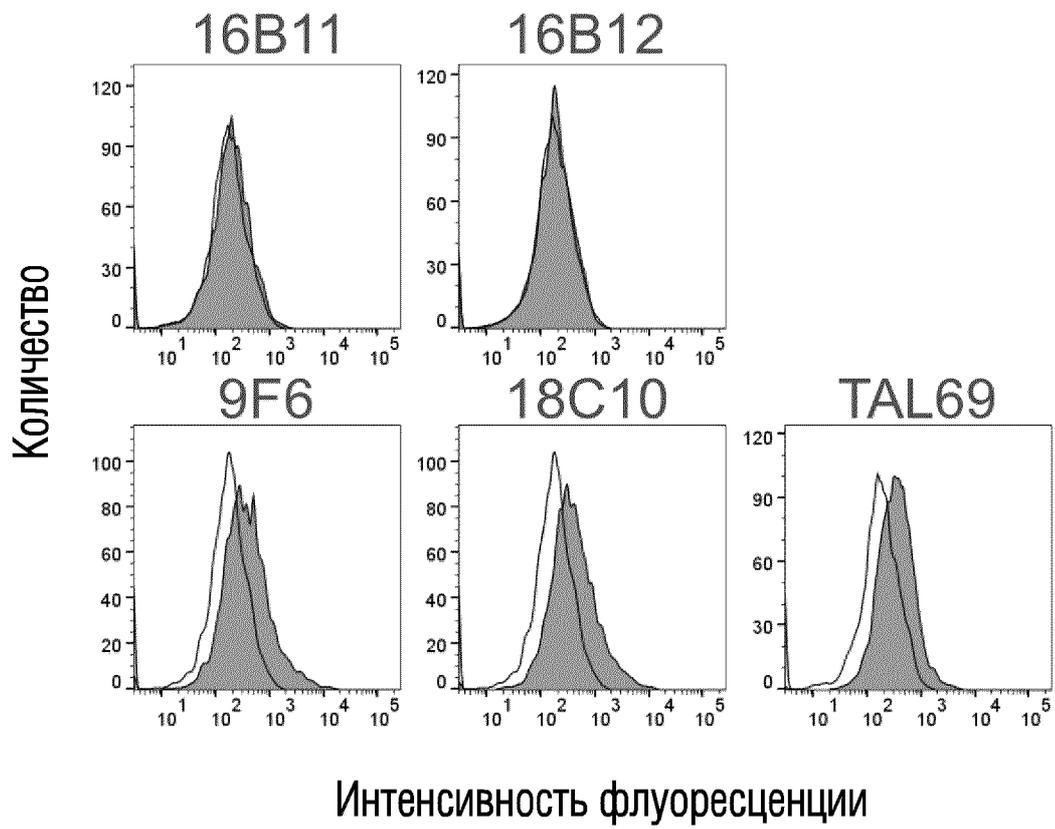


Интенсивность флуоресценции

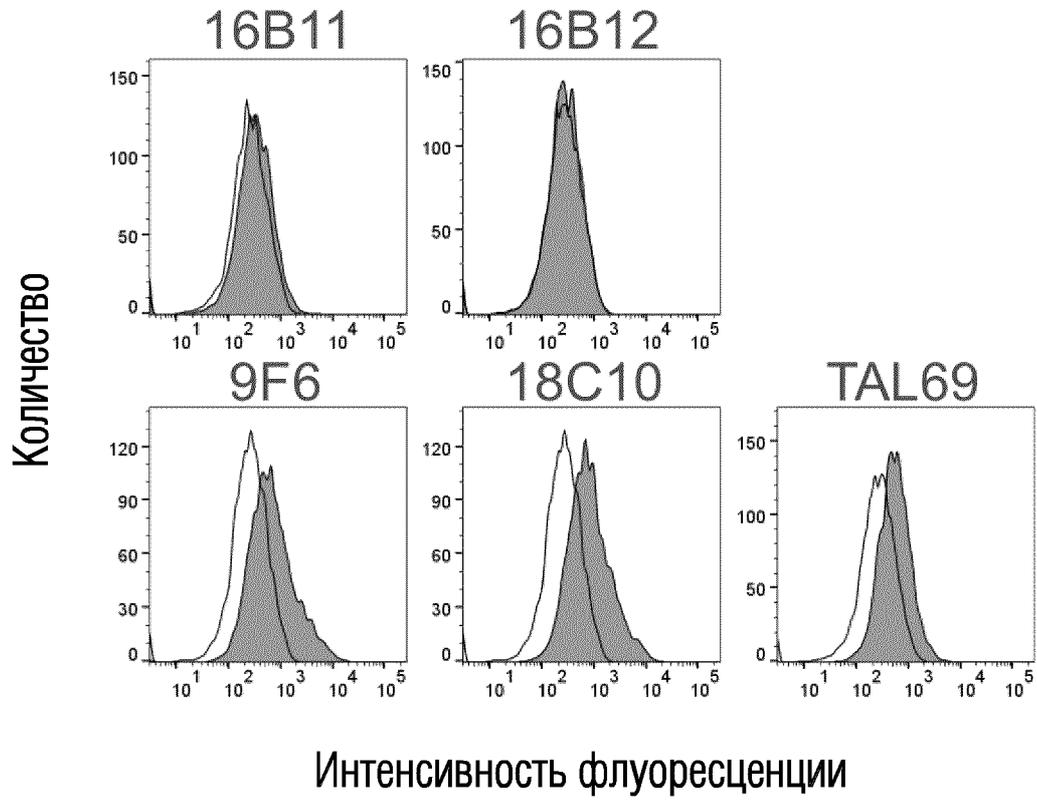
ФИГ. 2-2



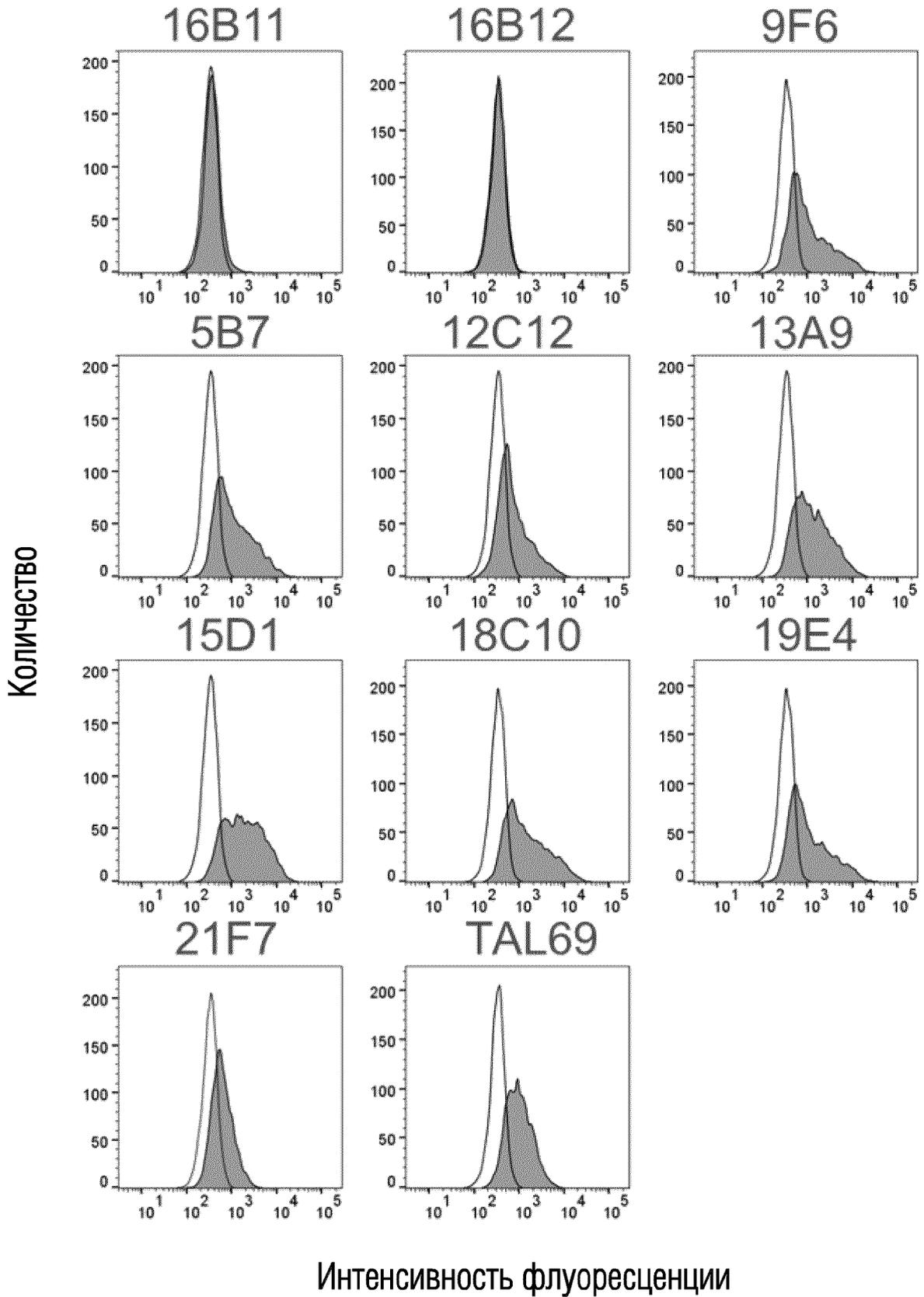
ФИГ. 3-1



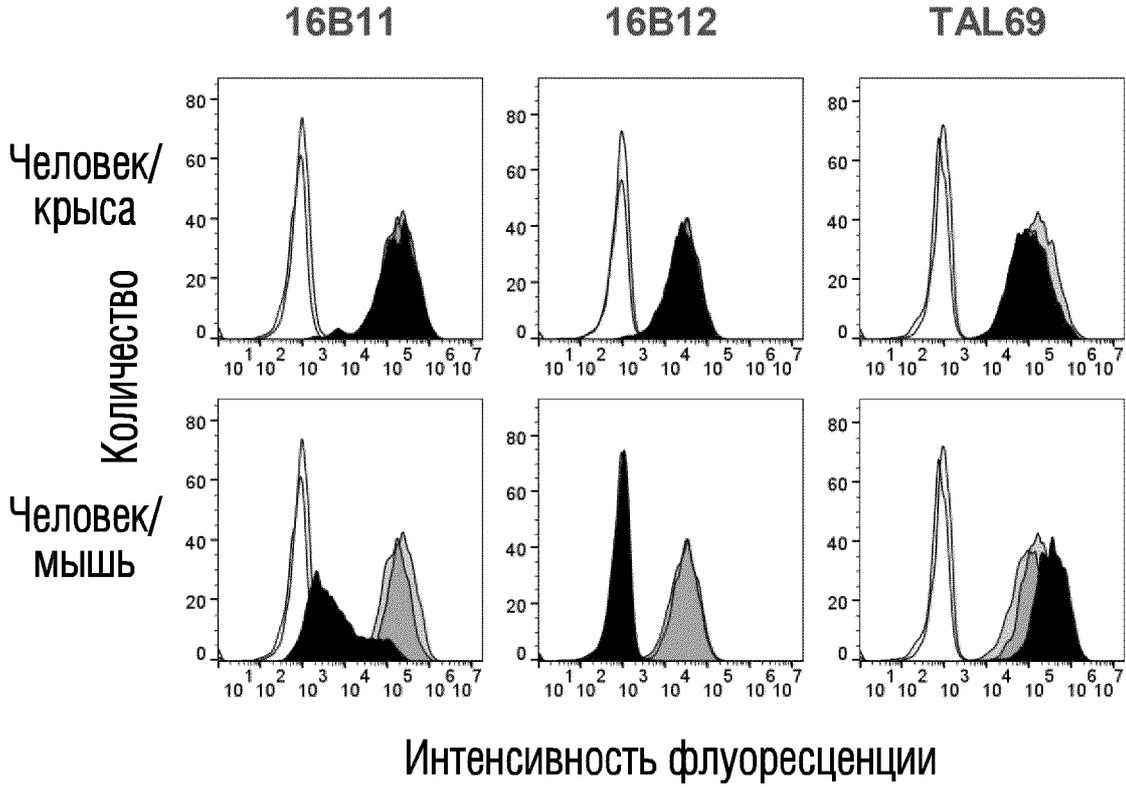
ФИГ. 3-2



ФИГ. 4



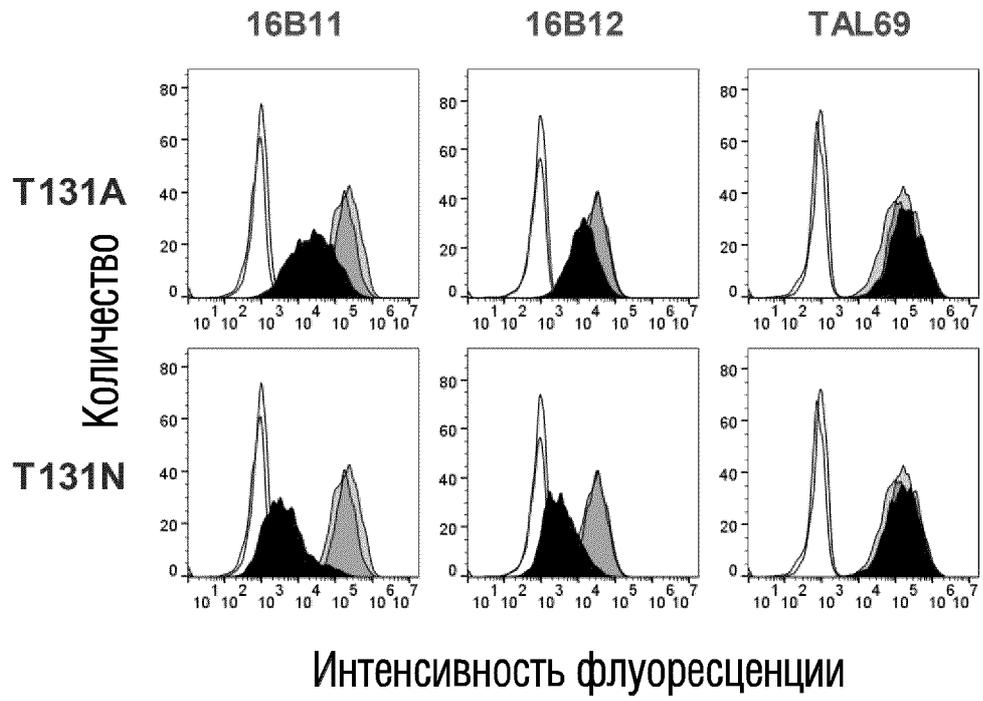
ФИГ. 5-1



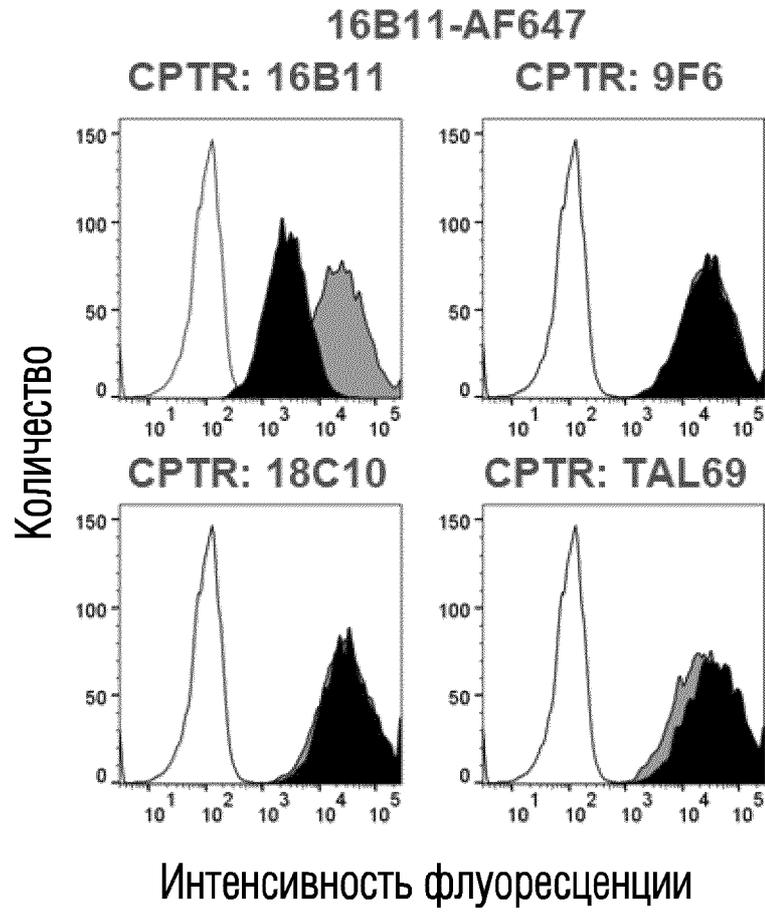
ФИГ. 5-2

Человек	1 2 6 :	K L L S A T G E S E K Q F Q E A I I V F Q E E F K C C G L V	1 5 5
Мышь	1 2 6 :	K L L S D N T D E A K D F Q K A M I V F Q S E F K C C G L E	1 5 5
Крыса	1 2 6 :	K L L S E T S N E A K E V Q K A M I A F Q S E F K C C G L R	1 5 5
Яванский макак	1 2 6 :	K L L S T T G E S A K Q F Q Q A M A E F Q K E F K C C G L V	1 5 5
		**** . . * . * * . . ** *****	

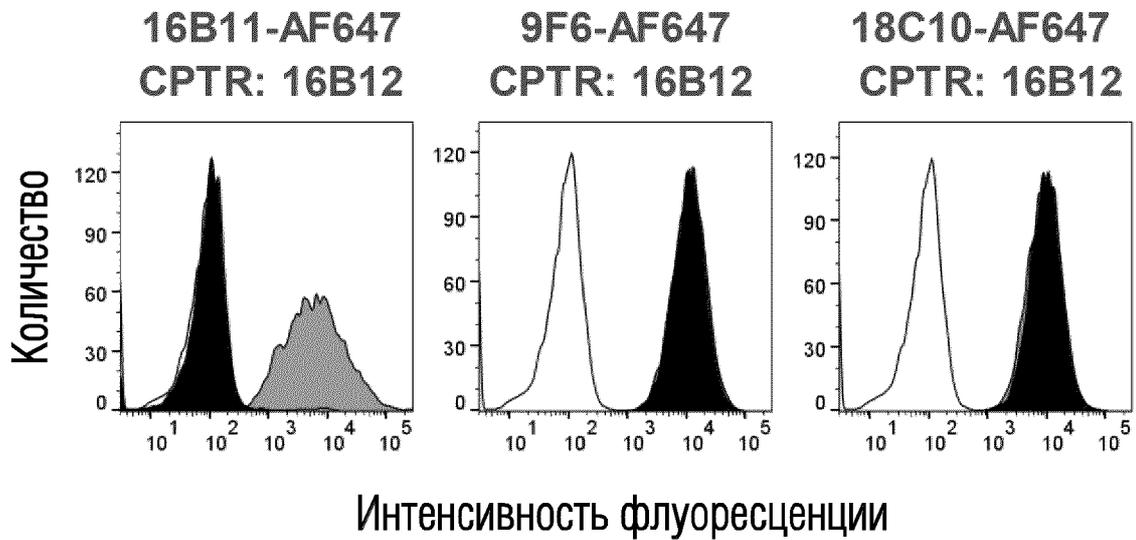
ФИГ. 5-3



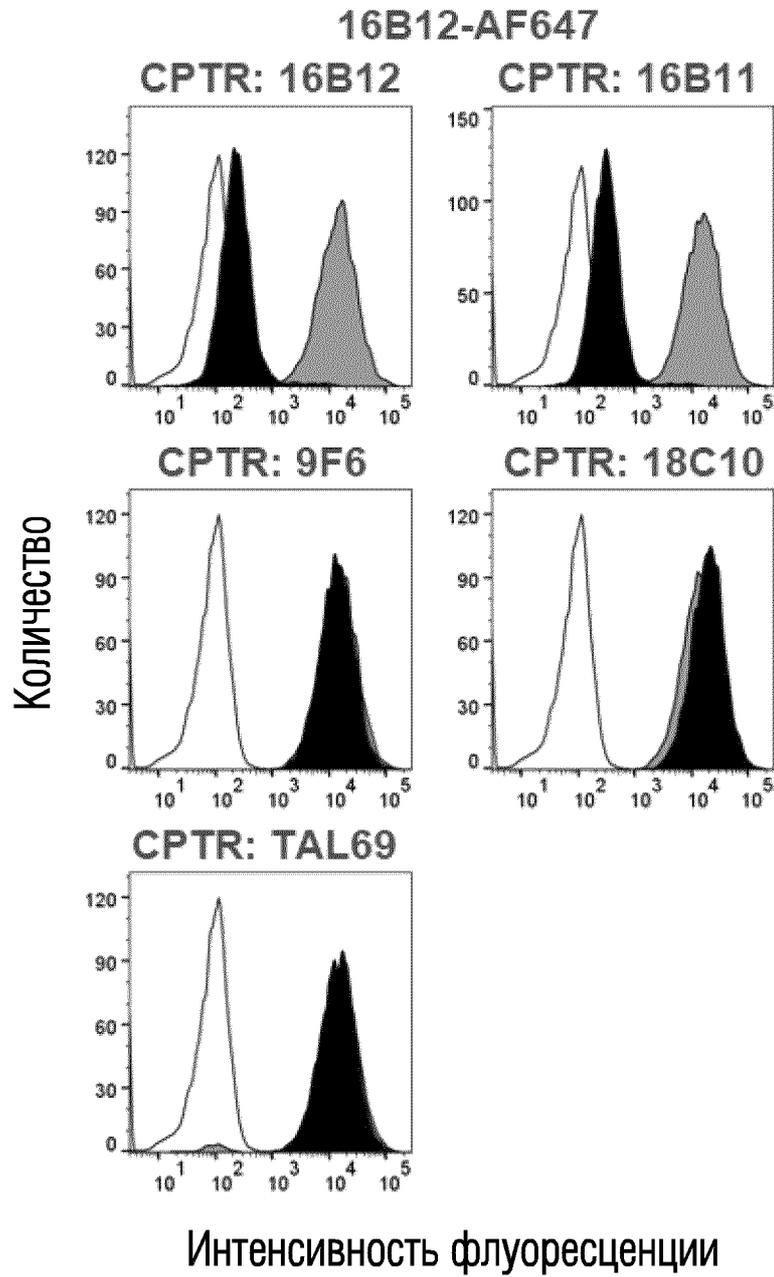
ФИГ. 6-1



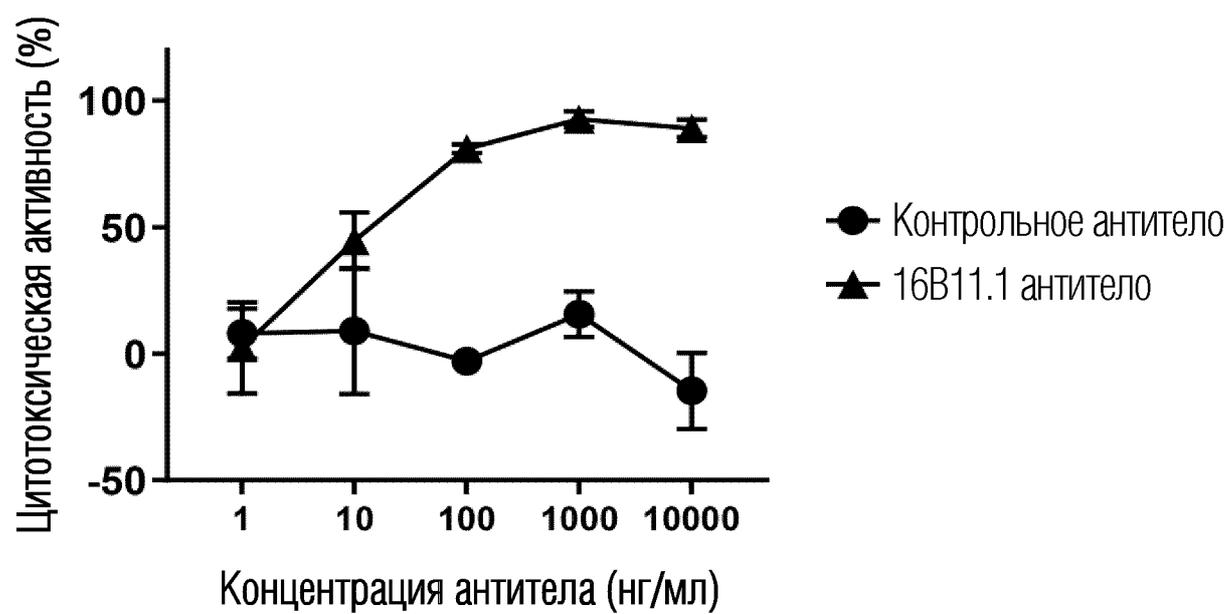
ФИГ. 6-2



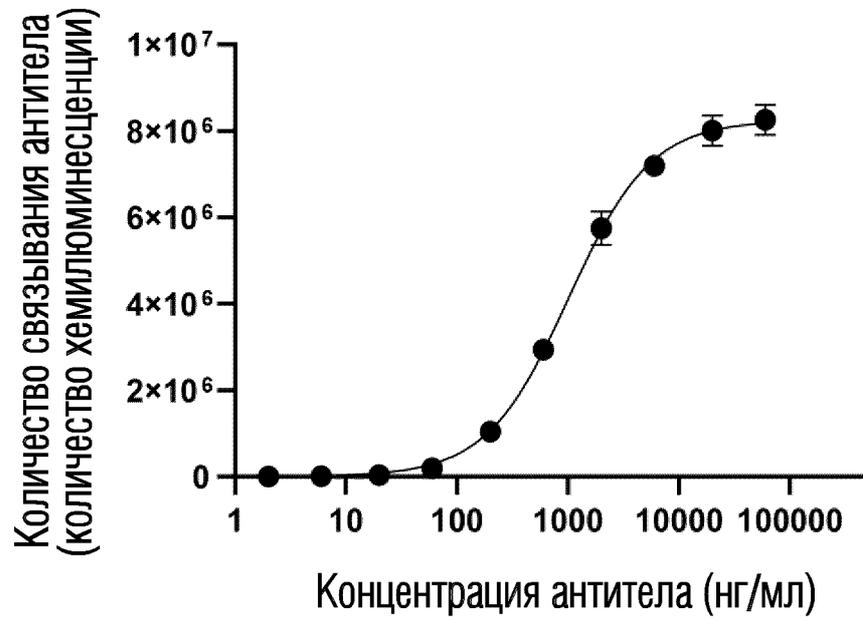
ФИГ. 6-3



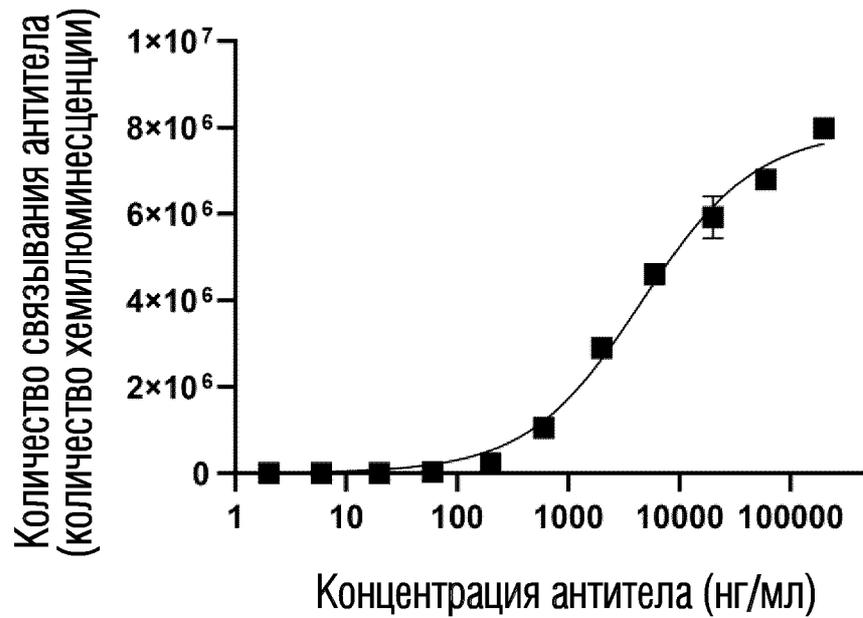
ФИГ. 7



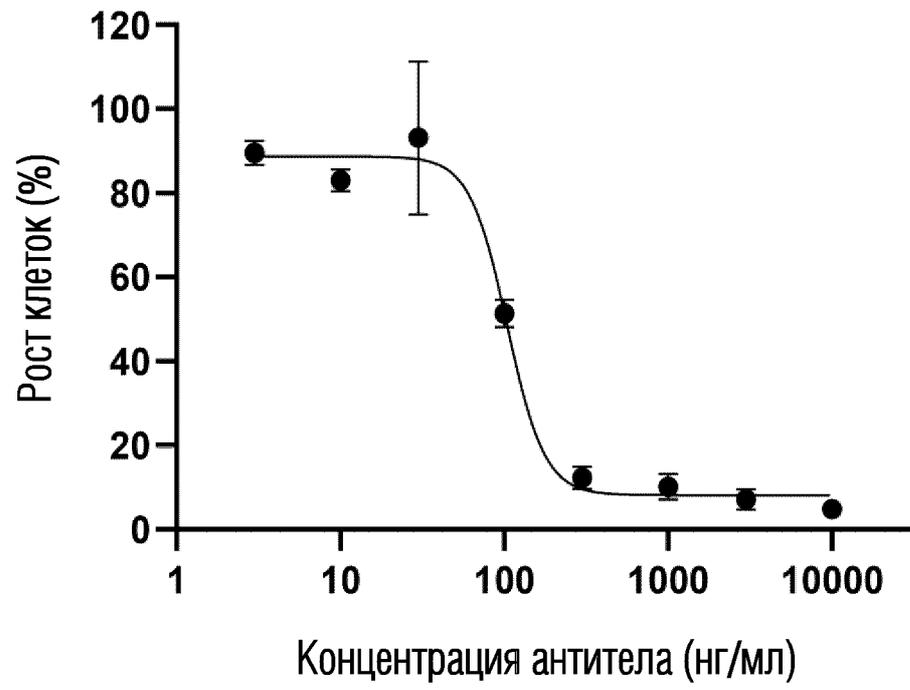
ФИГ. 8-1



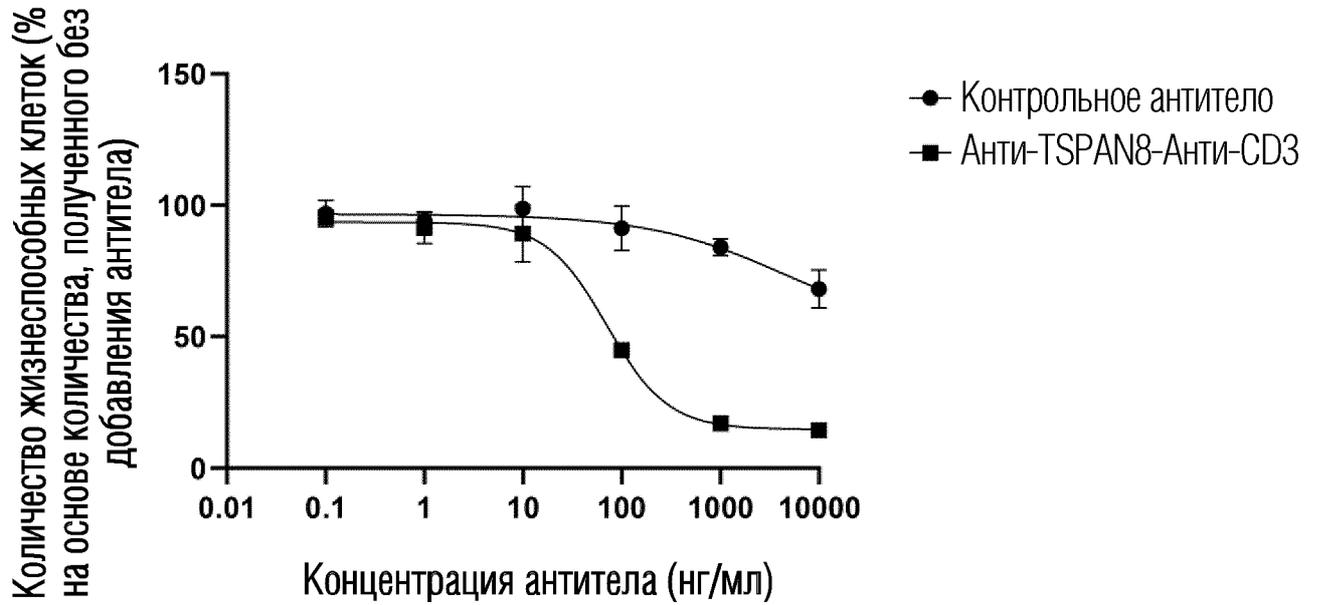
ФИГ. 8-2



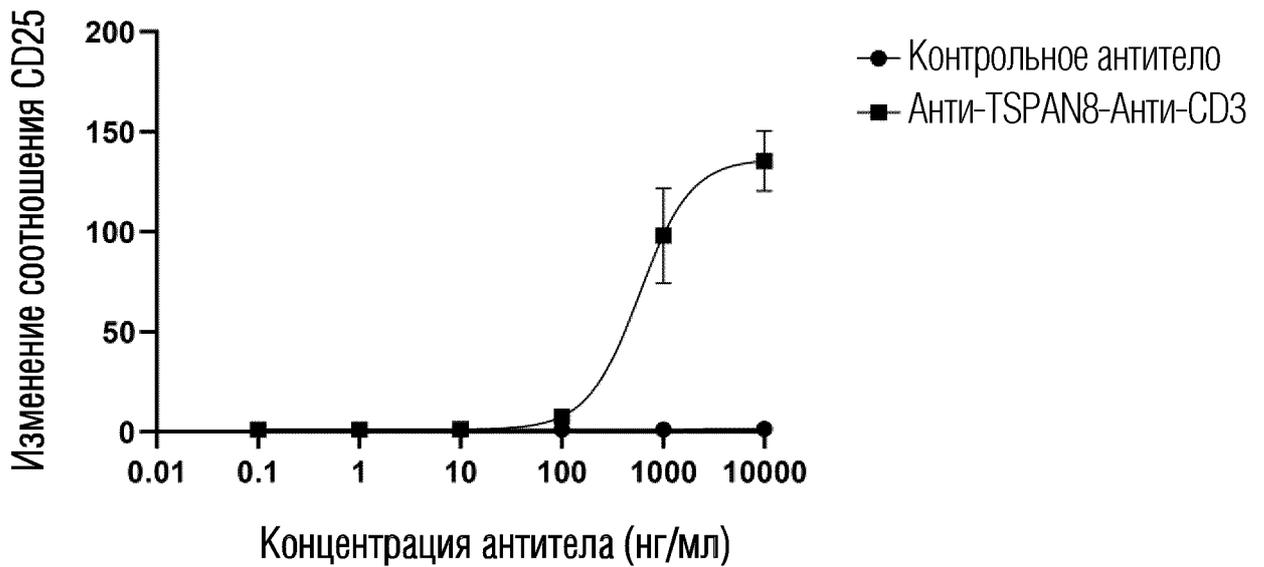
ФИГ. 9



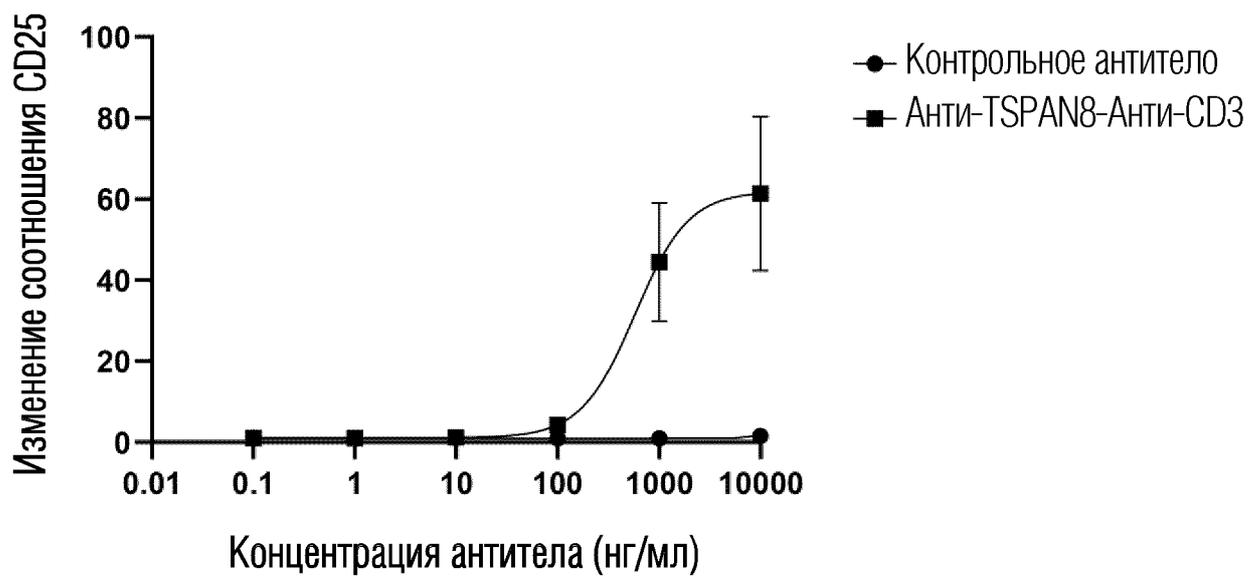
ФИГ. 10-1



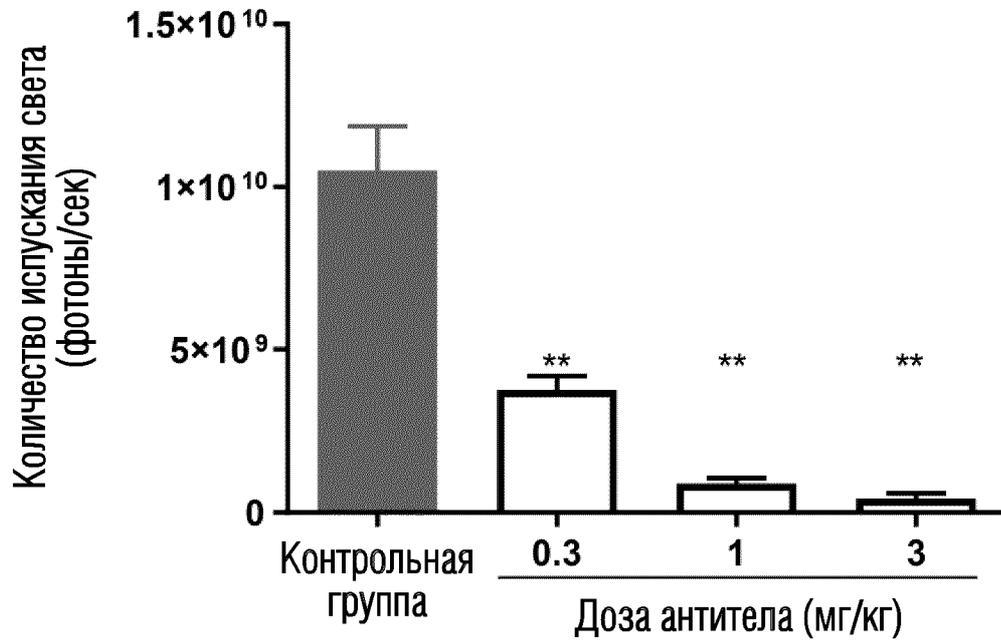
ФИГ. 10-2



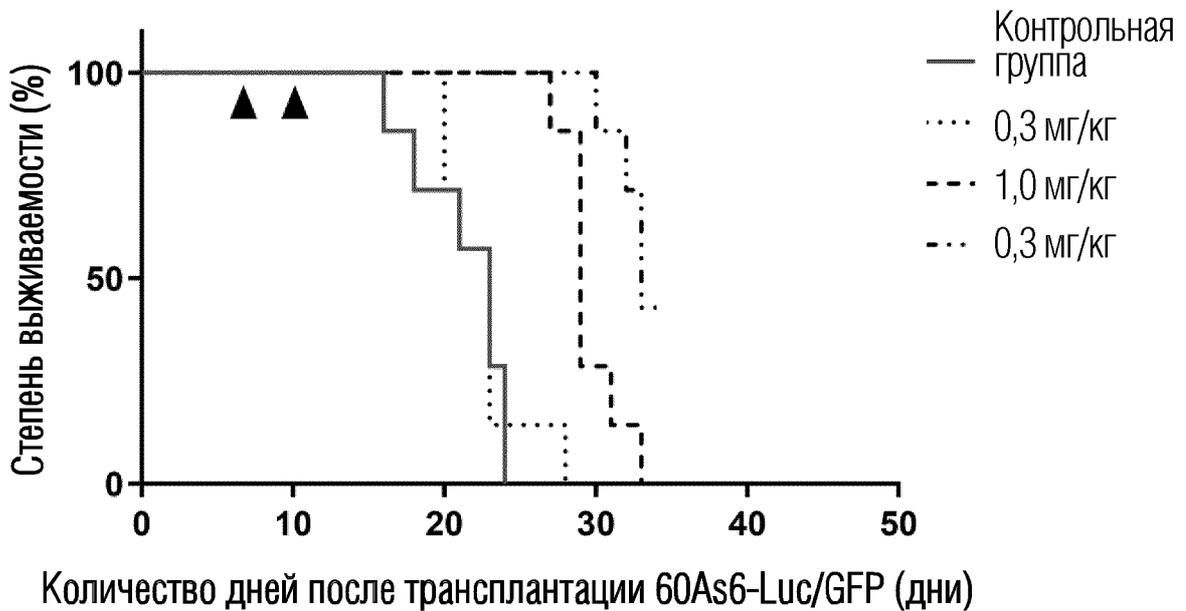
ФИГ. 10-3



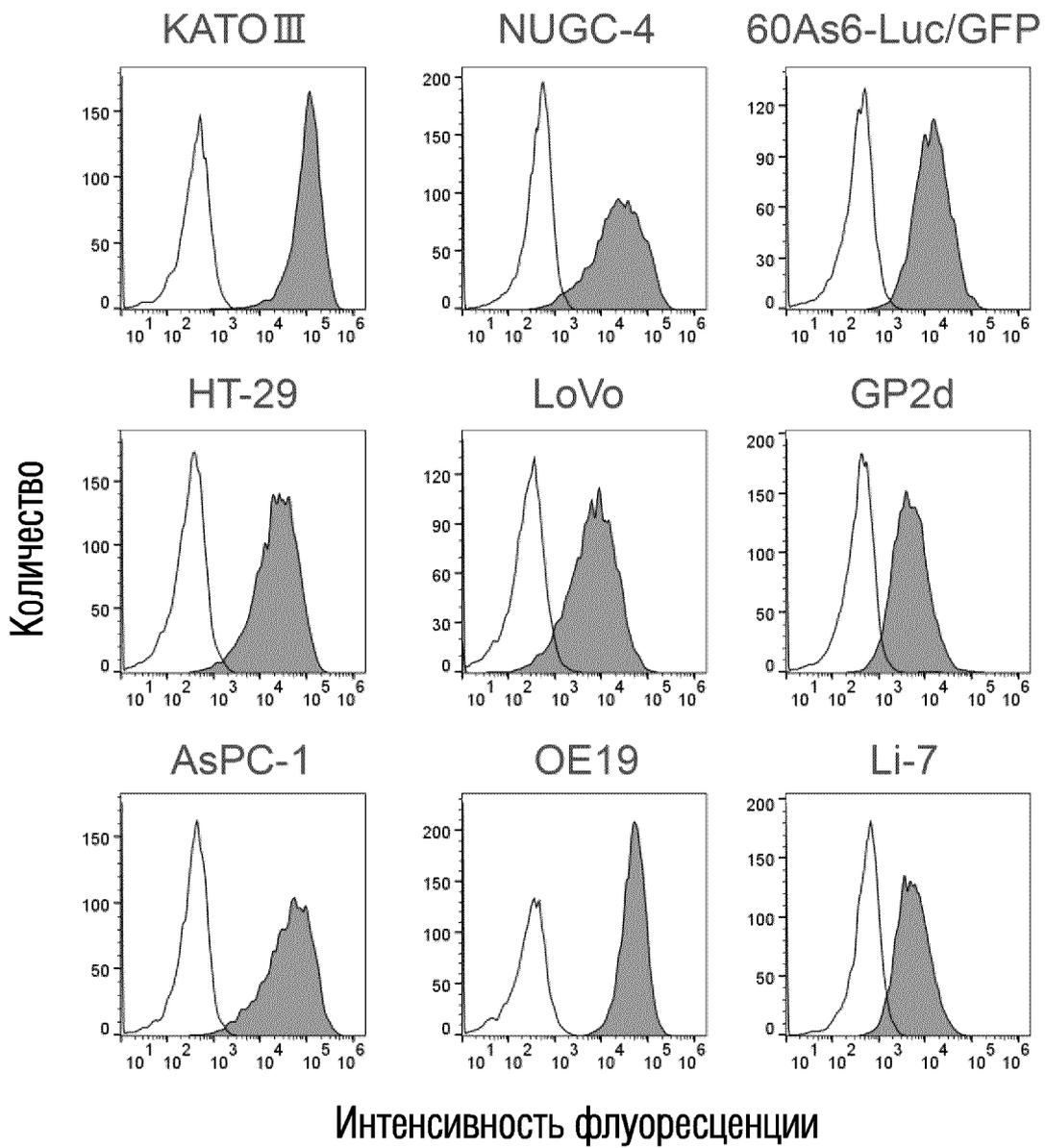
ФИГ. 11-1



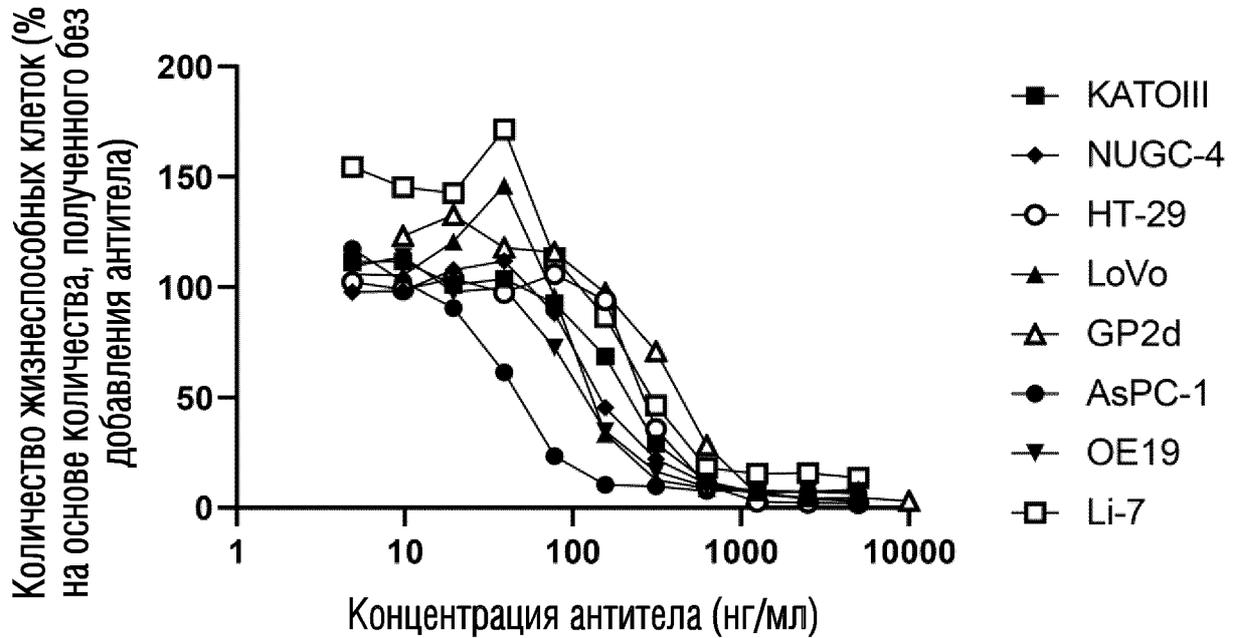
ФИГ. 11-2



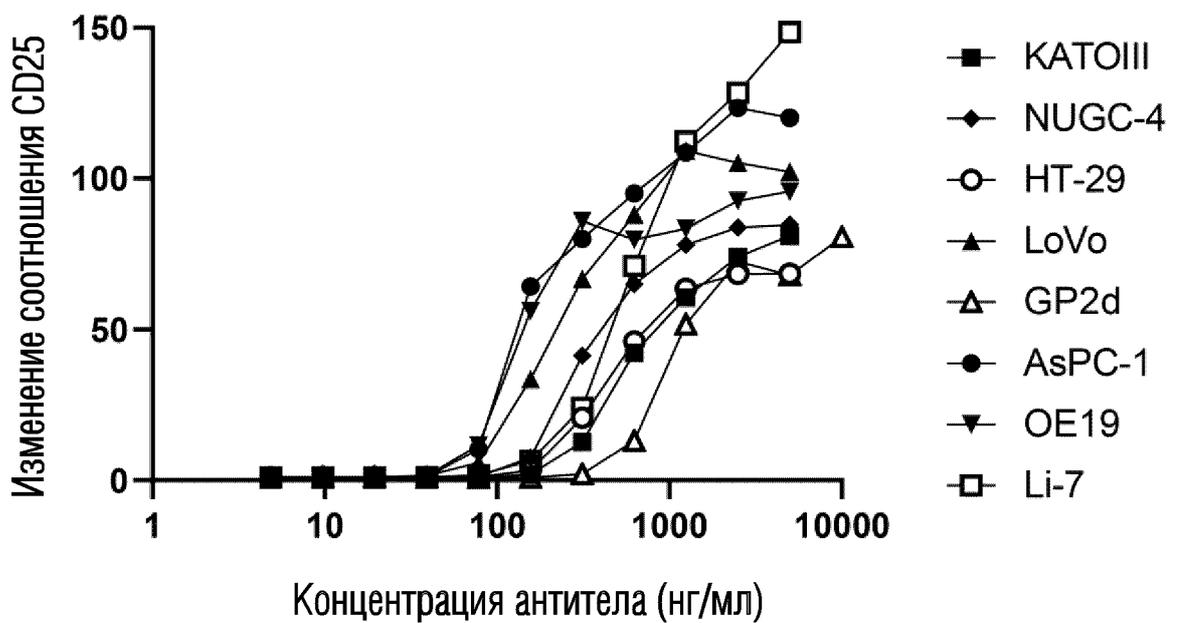
ФИГ. 12



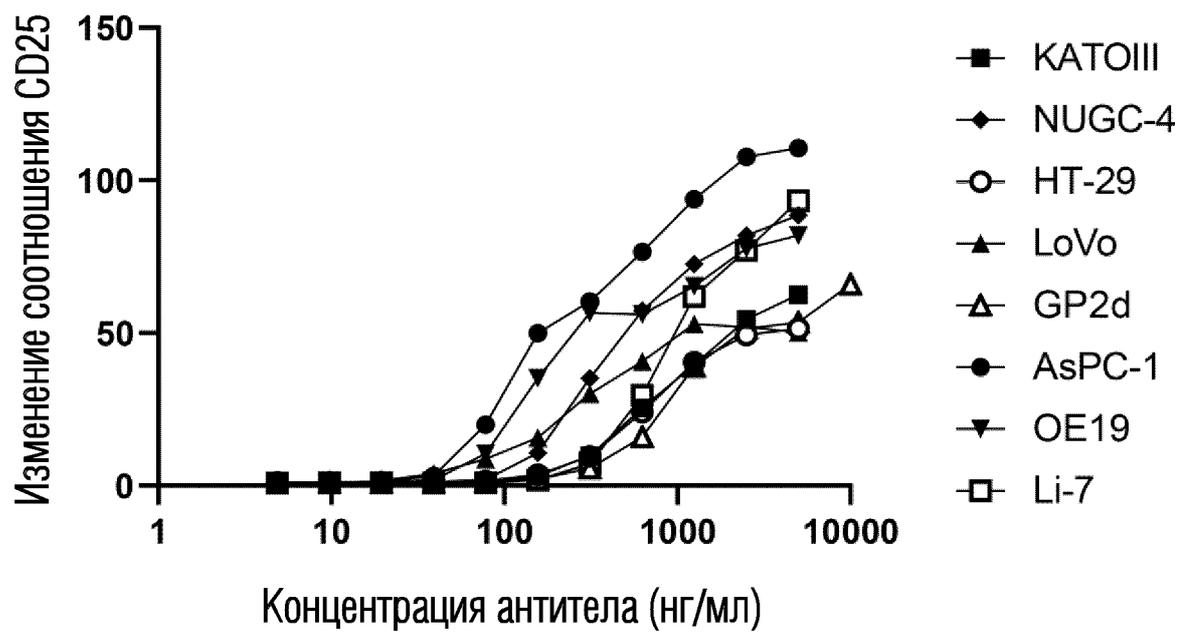
ФИГ. 13-1



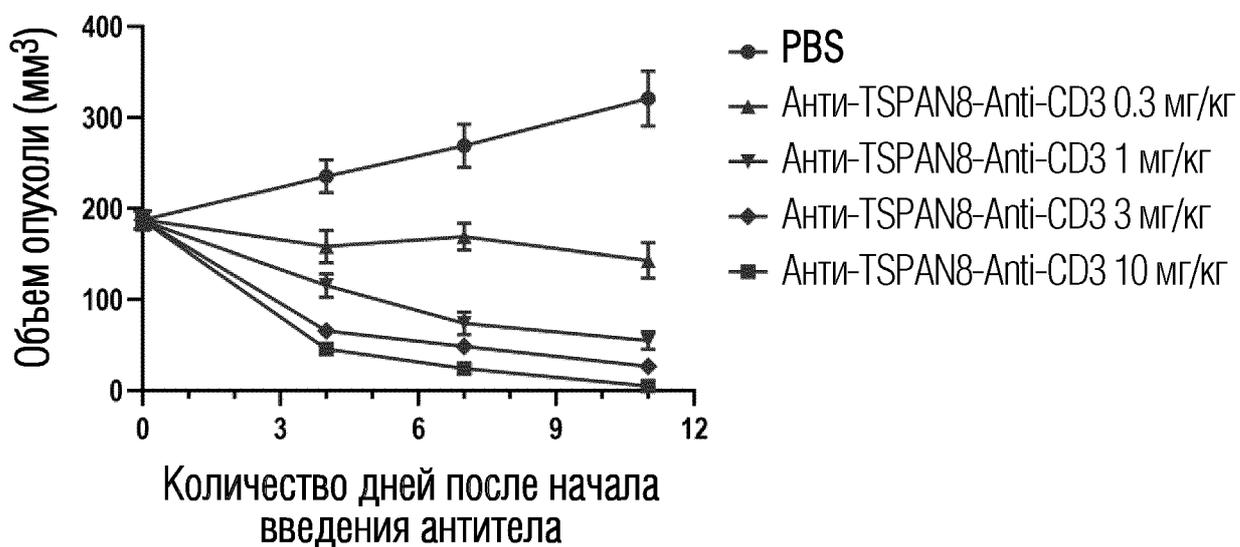
ФИГ. 13-2



ФИГ. 13-3



ФИГ. 14-1



ФИГ. 14-2

