

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **044968**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2023.10.18

(21) Номер заявки
202291179

(22) Дата подачи заявки
2020.10.16

(51) Int. Cl. *A61K 39/395* (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 16/18 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 49/00 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННОЕ АНТИТЕЛО И СПОСОБ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(31) 2019-191560

(32) 2019.10.18

(33) JP

(43) 2022.08.02

(86) PCT/JP2020/039075

(87) WO 2021/075545 2021.04.22

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
СУМИТОМО ФАРМА КО., ЛТД. (JP)

(72) Изобретатель:
Матоно Мицухиро, Сакаи Дзюн,
Нагаи Тору, Танума Наоки (JP),
Бьюик Ричард (GB)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-2013157102
WO-A1-2013157105
JP-A-2012532846

(57) Изобретение направлено на получение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, обладающего стабильными физическими свойствами, с улучшенной способностью накапливаться в опухоли и способного связываться с муцином подтипа 5AC. Вышеупомянутая проблема решается настоящим изобретением, которое относится к гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, имеющему переменную область тяжелой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1-4, или ее мутантную аминокислотную последовательность и переменную область легкой цепи, состоящую из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5-8, или ее мутантную аминокислотную последовательность, и способному связываться с муцином подтипа 5AC.

B1

044968

044968

B1

Область техники, к которой относится изобретение

Настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, которое специфично связывается с муцином подтипа 5AC (MUC5AC), или его антигенсвязывающему фрагменту и к способу его применения.

Уровень техники

Муцин является основным компонентом слизи, секретируемой эпителиальными клетками и т.п. животных, и представляет собой гликопротеин, содержащий большое количество сахара с молекулярной массой от 1 до 10 миллионов. Муцин включает в себя секреторный муцин, продуцируемый эпителиальной клеткой и т.п., и мембраносвязанный муцин, который имеет гидрофобный трансмембранный участок и существует, будучи связанным с клеточной мембраной. Коровые белки муцина в совокупности называются MUC, и известно, что существует не менее 20 типов генов, кодирующих коровые белки. Один из них, MUC5AC, относится к секреторному муцину.

MUC5AC экспрессируется в желудке и трахее в нормальных тканях, и сообщалось о его сверхэкспрессии при раке поджелудочной железы. О сверхэкспрессии также сообщалось при раке щитовидной железы, раке печени, колоректальном раке, раке желудка, раке уротелия, раке молочной железы, раке шейки матки, раке яичников, раке эндометрия и раке желчных протоков. В качестве антител к MUC5AC применяли антитело мыши, полученное с использованием в качестве антигена фракции муцина рака поджелудочной железы, очищенной из ксенотрансплантата клеточной линии рака поджелудочной железы человека SW1990, и химерные антитела (патентные документы 1, 2, непатентные документы 1, 2), и сообщалось о гуманизированных антителах (патентный документ 3), полученных на их основе.

В последние годы активно разрабатываются комплексы антитело-лекарственное средство, в которых лекарственное средство, обладающее противоопухолевым действием, конъюгировано с антителом, обладающим нацеливающей способностью на раковые клетки. Например, когда предполагается использование антитела в качестве средства доставки для комплекса антитело-лекарственное средство, то, поскольку антитело необходимо дополнительно подвергнуть этапу получения (например, этапу конъюгации), следует опасаться денатурации и агрегации антитела во время этапа получения. Следовательно, антитела, используемые в производстве, должны обладать более стабильными свойствами в качестве антител, чем обычные препараты антител. С другой стороны, когда предполагается использование антитела в качестве средства доставки для комплекса антитело-лекарственное средство, то поскольку распространение лекарственного средства с чрезвычайно сильным эффектом уничтожения клеток в нормальных тканях приводит к значительным побочным эффектам, антитела, используемые для комплекса антитело-лекарственное средство, должны иметь более стабильные физические свойства в качестве антител и более высокое накопление в опухолевых тканях, чем обычные препараты антител.

Было подтверждено, что химерные антитела, раскрытые в непатентных документах 1 и 2, демонстрируют накопление в опухоли *in vivo*, а также у пациентов с раком поджелудочной железы. Поскольку также наблюдалось накопление в печени и почках, применение в фармацевтических препаратах требует дальнейшего улучшения накопления в опухоли. Непатентные документы 1, 2 не раскрывают никакой информации о физических свойствах (денатурация, агрегация) антитела.

Кроме того, были оценены различные физические свойства химерных антител, раскрытых в непатентных документах 1, 2. В результате было выяснено, что антитела легко денатурируют и агрегируют при нагревании (низкая температура средней точки денатурации и низкая температура начала агрегации), а целесообразность их использования в качестве, например, средства доставки для комплекса антитело-лекарственное средство является низкой. Излишне говорить, что когда антитело используется на последующем этапе производства (например, на этапе конъюгации), лучше использовать антитело, обладающее как можно более хорошими физическими свойствами (антитело, которое не вызывает денатурации или агрегации).

В патентном документе 3 раскрыто гуманизированное антитело; однако в нем основное внимание уделяется получению гуманизированного антитела с высокой активностью связывания с MUC5AC и не раскрывается и не предполагается стабильность антитела. Кроме того, оценивали различные физические свойства гуманизированного антитела, раскрытого в патентном документе 3. В результате было выяснено, что антитела легко агрегируют при нагревании (температура начала агрегации низкая), и целесообразность их использования, например, в качестве средства доставки комплекса антитело-лекарственное средство, является низкой. Желательно максимально избегать денатурации и агрегации антител, поскольку ожидается риск, приводящий к снижению эффективности соединения и возникновению побочных эффектов. Известно, что указанные ниже средняя температура денатурации и температура начала агрегации также коррелируют с долговременной стабильностью при охлаждении и тому подобным, и с точки зрения стабильности не только на этапе производства, но и при хранении, желательно разработать антитело с хорошими физическими свойствами, которые не способствуют легкой денатурации или агрегации антитела.

Список документов

Патентные документы.

Патентный документ 1: JP-A-H7-203974.

Патентный документ 2: JP-A-H11-5749.

Патентный документ 3: WO 2013/157102.

Непатентные документы.

Непатентный документ 1: Japanese Journal of Clinical Medicine, vol. 64, extra issue 1, 2006, p. 274-278.

Непатентный документ 2: Japanese Journal of Cancer Research, 90, 1179-1186, 1999.

Сущность изобретения

Техническая проблема.

Соответственно, проблема настоящего изобретения состоит в том, чтобы получить гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, обладающие стабильными физическими свойствами, превосходящие аналоги по способности накапливаться в опухолях и способные связываться с муцином подтипа 5AC. Более конкретно, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, которые не поддаются легко денатурации или агрегации при нагревании и способны связываться с муцином подтипа 5AC, а также гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, демонстрирующие более высокую аккумуляцию в опухолевой ткани, чем в нормальной ткани, и способные связываться с муцином подтипа 5AC.

Решение проблемы.

Авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования в попытке решить вышеуказанные проблемы и обнаружили, что проблема может быть решена следующими способами.

То есть настоящее изобретение относится к следующему:

1. Гуманизированное антитело, способное связываться с муцином подтипа 5AC и содержащее или состоящее из вариабельной области тяжелой цепи, состоящей из:

(1) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 1, или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, в которой удалены, заменены или добавлены не более 10 или не более 5 аминокислот;

(2) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2, или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 2, в которой удалены, заменены или добавлены не более 10 или не более 5 аминокислот;

(3) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 3, в которой удалены, заменены или добавлены не более 10 или не более 5 аминокислот; или

(4) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4, или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, в которой удалены, заменены или добавлены не более 10 или не более 5 аминокислот, и вариабельной области легкой цепи, состоящей из:

(5) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5, или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5, в которой удалены, заменены или добавлены не более 10 или не более 5 аминокислот;

(6) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 6, или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 6, в которой удалены, заменены или добавлены не более 10 или не более 5 аминокислот;

(7) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 7, или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7, в которой удалены, заменены или добавлены не более 10 или не более 5 аминокислот; или

(8) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 8, или аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, в которой удалены, заменены или добавлены не более 10 или не более 5 аминокислот,

или его антигенсвязывающий фрагмент.

2. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1, где вариабельная область тяжелой цепи состоит из:

(1) аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1, аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90% или не менее 95% идентичности по последовательности с аминокислотной

14. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащее или состоящее из вариабельной области тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и вариабельной области легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 7.

15. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по п.1 или 2, содержащее или состоящее из вариабельной области тяжелой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 4, и вариабельной области легкой цепи, состоящей из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8.

16. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-15, где антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой выделенное антитело или выделенный антигенсвязывающий фрагмент.

17. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп.1-16, где антитело представляет собой поликлональное антитело или моноклональное антитело.

18. Гуманизированное антитело по любому из пп.1-17, где антитело имеет наиболее частый размер частиц (диаметр режима Pk1) не более 20 нм, не более 15 нм, не более 12 нм, не более 11 нм или не более 10 нм.

19. Гуманизированное антитело по любому из пп.1-18, где антитело имеет среднюю температуру денатурации (Tm1) не менее 50°C, не менее 55°C, не менее 56°C, не менее 57°C, не менее 58°C, не менее 59°C или не менее 60°C.

20. Гуманизированное антитело по любому из пп.1-19, где антитело имеет температуру начала агрегации (Tagg) не менее 50°C, не менее 55°C, не менее 60°C, не менее 61°C, не менее 62°C, не менее 63°C, не менее 64°C или не менее 65°C.

21. Гуманизированное антитело по любому из пп.1-20, имеющее активность связывания *in vitro* с муцином подтипа 5AC, сравнимую или превышающую активность химерного антитела.

22. Гуманизированное антитело по любому из пп.1-21, где его накопление в опухолевой ткани, экспрессирующей муцин подтипа 5AC, не менее чем в 10 раз, не менее чем в 11 раз, не менее чем в 12 раз, не менее чем в 13 раз, не менее чем в 14 раз, не менее чем в 15 раз, не менее чем в 16 раз, не менее чем в 17 раз, не менее чем в 18 раз, не менее чем в 19 раз или не менее чем в 20 раз превышает накопление в ткани печени через 7 дней после введения антитела.

23. Гуманизированное антитело по любому из пп.1-22, где его накопление в опухолевой ткани, экспрессирующей муцин подтипа 5AC, не менее чем в 10 раз, не менее чем в 11 раз, не менее чем в 12 раз, не менее чем в 13 раз, не менее чем в 14 раз, не менее чем в 15 раз, не менее чем в 16 раз или не менее чем в 17 раз, превышает накопление в ткани почки через 7 дней после введения антитела.

24. Композиция, содержащая гуманизированное антитело по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающий фрагмент.

25. Фармацевтическая композиция, содержащая гуманизированное антитело по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

26. Фармацевтическая композиция для лечения рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, содержащая гуманизированное антитело по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

27. Фармацевтическая композиция по п.26, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак печени, колоректальный рак, рак желудка, рак уретелия, рак молочной железы, рак шейки матки, рак яичников, карциному эндометрия или рак желчных протоков.

28. Фармацевтическая композиция по п.27, где рак представляет собой рак поджелудочной железы.

29. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий гуманизированное антитело по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающий фрагмент, и лекарственное средство, используемое для диагностики и/или лечения, которое конъюгировано с ним.

30. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.29, где лекарственное средство представляет собой токсин, флуоресцентно-метящее вещество, лекарственное средство на основе нуклеиновой кислоты, вирусный вектор, наночастицу, низкомолекулярное лекарственное средство или цитокин.

31. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.29 или 30, где гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и лекарственное средство соединены линкером.

32. Конъюгат антитело-лекарственное средство по п.31, где линкер представляет собой один или несколько линкеров, выбранных из группы, состоящей из ПЭГ-линкера, малеимидного линкера, PAS-илированного линкера, HES-илированного линкера, бис(сульфосукцинимидил)субератного линкера, линкера на основе нуклеиновой кислоты, пептидного линкера, силанового линкера, полисахаридного линкера, линкера, который является термочувствительной или чувствительной к облучению (ИК, ближней ИК, УФ) связью, линкера, который представляет собой pH-чувствительную связь, гидролитического линкера и линкера, полученного путем ковалентного связывания, амидного связывания, присоединения к углерод-углеродной множественной связи, циклоприсоединения Хустена к азидоалкину, реакции Дильса-Альдера, дисульфидного связывания, присоединения Михаэля, силанового связывания, реакции нуклеофильного раскрытия кольца уретана, эпоксида, неальдольного карбонила и

реакции 1,3-диполярного присоединения или реакции циклоприсоединения, такой как тозилрование.

33. Фармацевтическая композиция, содержащая конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.29-32 и фармацевтически приемлемый носитель.

34. Нуклеиновая кислота, кодирующая гуманизованное антитело по любому из пп.1-23.

35. Экспрессионный вектор, содержащий нуклеиновую кислоту по п.34.

36. Клетка-хозяин, содержащая экспрессионный вектор по п.35.

37. Способ получения гуманизованного антитела по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающего фрагмента, включающий в себя:

(1) этап встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизованное антитело, или его антигенсвязывающего фрагмента в экспрессионный вектор,

(2) этап введения вышеупомянутой нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина с помощью экспрессионного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту,

(3) этап культивирования клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор, и

(4) этап выделения гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента из супернатанта культуры клетки-хозяина путем очистки хроматографией.

38. Применение гуманизованного антитела по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающего фрагмента при получении композиции по п.24, фармацевтической композиции по любому из пп.25-28 и 33 или конъюгата антитело-лекарственное средство по любому из пп.29-32.

39. Способ оценки уровня экспрессии муцина подтипа 5AC в клетке или ткани, включающий в себя:

(1) этап получения меченого гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента путем прикрепления метки к гуманизованному антителу по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающему фрагменту, где позволяет обнаруживать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

(2) этап контакта клетки или ткани с меченым гуманизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и

(3) этап измерения количества метки, связанной с клеткой или тканью, и оценки на основе этого уровня экспрессии муцина подтипа 5AC, экспрессируемого в клетке или ткани.

40. Терапевтический агент для лечения рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, содержащий эффективное количество фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из пп.29-32 и фармацевтически приемлемый носитель.

41. Терапевтический агент для лечения рака по п.40, где лекарственное средство снижает количество раковых клеток и/или уменьшает размер опухоли.

42. Способ измерения объема рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, у субъекта, включающий в себя:

(1) этап получения меченого гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента путем прикрепления метки к гуманизованному антителу по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающему фрагменту, где метка позволяет обнаруживать антител или его антигенсвязывающий фрагмент,

(2) этап контакта ткани субъекта и нормальной ткани с меченым гуманизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом,

(3) этап измерения количества метки в ткани субъекта и нормальной ткани и

(4) этап сравнения количества метки, измеренного в ткани субъекта, со стандартным количеством, которое представляет собой количество метки, измеренное в нормальной ткани, и этап измерения объема раковой ткани в части где количество, измеренное в ткани субъекта, превышает стандартное количество.

43. Способ диагностики того, поражен ли субъект раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC, включающий в себя:

(1) этап получения меченого гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента путем прикрепления метки к гуманизованному антителу по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающему фрагменту, где позволяет обнаруживать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

(2) этап контакта клетки или ткани субъекта и нормальной клетки или ткани с меченым гуманизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом,

(3) этап измерения количества метки в клетке или ткани субъекта и нормальной ткани и

(4) этап сравнения количества метки, измеренного в клетке или ткани субъекта, со стандартным количеством, которое представляет собой количество метки, измеренное в нормальной клетке или ткани, и, когда количество метки, измеренное в клетке или ткани, субъекта значительно больше, чем стандартное количество, ставится диагноз, что субъект поражен раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC.

44. Способ по п.42 или 43, где этап контакта проводят *in vitro*.

45. Способ измерения объема рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, у субъекта,

включающий в себя:

(1) этап получения меченого гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента путем прикрепления метки к гуманизированному антителу по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающему фрагменту, где метка позволяет обнаруживать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

(2) этап обнаружения метки в ткани субъекта, которому вводят меченое гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и

(3) этап измерения объема части, в которой на вышеупомянутом этапе (2) было обнаружено накопление меченого гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

46. Способ диагностики того, поражен ли субъект раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC, включающий в себя:

(1) этап получения меченого гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента путем прикрепления метки к гуманизированному антителу по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающему фрагменту, где метка позволяет обнаруживать антител или его антигенсвязывающий фрагмент,

(2) этап обнаружения метки в ткани субъекта, которому вводят меченое гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и

(3) этап диагностики того, что субъект поражен раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC, при обнаружении накопления меченого гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в ткани субъекта на вышеупомянутом этапе (2).

47. Способ по п.45 или 46, отличающийся тем, что этап обнаружения проводят *in vitro*.

48. Способ лечения рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, включающий в себя введение эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное антитело по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель субъекту, пораженному раком.

49.Способ по п.48, который снижает количество раковых клеток и/или уменьшает размер опухоли.

50. Способ диагностики того, поражен ли субъект раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC, включающий в себя:

(1) этап получения меченого гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента путем прикрепления метки к гуманизированному антителу по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающему фрагменту, где метка позволяет обнаруживать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

(2) этап сбора клеток или тканей у субъекта и здорового субъекта,

(3) этап контакта клетки или ткани с меченым гуманизированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом,

(4) этап измерения количества метки в клетке или ткани, и

(5) этап диагностики того, что субъект поражен раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC, когда количество метки, измеренное в клетке или ткани, взятой у субъекта, значительно превышает количество метки, измеренное в клетке или ткани, взятой у здорового человека.

51. Способ диагностики того, поражен ли субъект раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC, включающий в себя:

(1) этап получения меченого гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента путем прикрепления метки к гуманизированному антителу по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающему фрагменту, где метка позволяет обнаруживать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент,

(2) этап введения субъекту меченого гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента,

(3) этап обнаружения метки в ткани субъекта, и

(4) этап диагностики того, что субъект поражен раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC, при обнаружении накопления меченого гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента в ткани субъекта на вышеупомянутом этапе (3).

52. Способ лечения рака у субъекта, у которого диагностирован рак, сверхэкспрессирующий муцин подтипа 5AC, способом по п.50 или 51, включающий в себя этап введения субъекту эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гуманизированное антитело по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающий фрагмент и фармацевтически приемлемый носитель.

53. Набор для лечения и/или диагностики рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, содержащий гуманизированное антитело по любому из пп.1-23 или его антигенсвязывающий фрагмент с меткой, которая позволяет обнаруживать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент антитела.

Полезный эффект изобретения.

Авторы настоящего изобретения провели интенсивные исследования в попытке решить проблемы и успешно нашли гуманизированное антитело, которое обладает способностью связываться с муцином подтипа 5AC и не подвергается легкой денатурации или агрегации даже при нагревании, то есть

гуманизированное антитело, которое обладает вышеупомянутой связывающей активностью, а также имеет высокую среднюю температуру денатурации и высокую температуру начала агрегации и показывает очень высокую аккумуляцию в опухолевых тканях, выше, чем в нормальных тканях, что привело к завершению настоящего изобретения.

Краткое описание чертежей

На фиг. 1 показаны аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи 1-4 (H01-H04) гуманизированного антитела настоящего изобретения.

На фиг. 2 показаны аминокислотные последовательности переменных областей легкой цепи 1-4 (L01-L04) гуманизированного антитела настоящего изобретения.

На фиг. 3 показаны аминокислотные последовательности переменных областей тяжелой цепи 5-6 (H05-H06) и переменных областей легкой цепи 5-7 (L05-L07) гуманизированного антитела из патентного документа 3.

На фиг. 4 показаны аминокислотные последовательности переменной области тяжелой цепи 7 (H07) и переменной области легкой цепи 8 (L08) химерного антитела из патентного документа 1.

Фиг. 5 представляет собой фотографию, показывающую накопление в опухоли *in vivo* соединения примера 3-1 (антитела 3) с течением времени. Верхний ряд изображений фиг. 5 представляет собой фотографию первой мыши, а нижний ряд изображений представляет собой фотографию второй мыши. Фотографии мышей до введения, через 1 день после введения, через 2 дня после введения, через 3 дня после введения и через 7 дней после введения показаны в таком порядке слева направо.

Описание вариантов осуществления изобретения

(1) Гуманизированное антитело настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу, имеющему специфичную переменную область тяжелой цепи и специфичную переменную область легкой цепи и способное связываться с муцином подтипа 5AC, и к его антигенсвязывающему фрагменту. Гуманизированное антитело настоящего изобретения отличается тем, что оно обладает стабильными физическими свойствами и лучше накапливается в опухоли. Гуманизированное антитело настоящего изобретения может дополнительно иметь подходящую константную область тяжелой цепи и подходящую константную область легкой цепи в дополнение к специфичной переменной области тяжелой цепи и специфичной переменной области легкой цепи.

В настоящем описании термин "гуманизированное антитело" относится к антителу, имеющему определяющую комплементарность область (CDR), полученную от не являющегося человеком животного, в которой, по меньшей мере, часть переменной области тяжелой цепи и/или переменной области легкой цепи область, отличная от CDR, была модифицирована, чтобы стать более "человеческой", а именно более похожей на переменную последовательность зародышевой линии человека. Определяющие комплементарность области существуют в каждой переменной области тяжелой цепи и легкой цепи антитела, и они называются определяющей комплементарностью 1 (CDR1), определяющей комплементарностью 2 (CDR2) и определяющей комплементарностью 3 (CDR3) с N-концевой стороны. Каркасная область представляет собой область, примыкающую к определяющей комплементарности области в переменной области, и они называются каркасной областью 1 (FR1), каркасной областью 2 (FR2), каркасной областью 3 (FR3) и каркасной областью 4 (FR4) с N-концевой стороны.

В настоящем описании термин "антигенсвязывающий фрагмент" означает фрагмент антитела, состоящий из части гуманизированного антитела настоящего изобретения и обладающий способностью связываться с муцином подтипа 5AC. Количество аминокислот, содержащихся в полипептиде, составляющем антигенсвязывающий фрагмент, специально не ограничивается при условии, что он обладает способностью связываться с муцином подтипа 5AC.

На фиг. 1 показана аминокислотная последовательность переменной области тяжелой цепи настоящего изобретения. Переменная область 1 тяжелой цепи (H01), переменная область 2 тяжелой цепи (H02), переменная область 3 тяжелой цепи (H03) и переменная область 4 тяжелой цепи (H04) на фиг. 1 соответственно соответствуют SEQ ID NO: 1-4 в списке последовательностей, приложенном к настоящему описанию. Подчеркнутая часть на фиг. 1 представляет собой сайт CDR.

На фиг. 2 показана аминокислотная последовательность переменной области легкой цепи настоящего изобретения. Переменная область 1 легкой цепи (L01), переменная область 2 легкой цепи (L02), переменная область 3 легкой цепи (L03) и переменная область 4 легкой цепи (L04) на фиг. 2 соответственно соответствуют SEQ ID NO: 5-8 в списке последовательностей, приложенном к настоящему описанию. Подчеркнутая часть на фиг. 2 представляет собой сайт CDR.

Другими словами, переменная область тяжелой цепи гуманизированного антитела настоящего изобретения состоит из аминокислотной последовательности любой из последовательностей от SEQ ID NO: 1 до SEQ ID NO: 4, а переменная область легкой цепи состоит из аминокислотной последовательности любой из последовательностей от SEQ ID NO: 5 до SEQ ID NO: 8. То есть гуманизированное антитело настоящего изобретения состоит из комбинации вышеупомянутых четырех переменных областей тяжелой цепи (H01-H04) и четырех переменных областей легкой

цепи (L01-L04).

Четыре переменные области тяжелой цепи (H01-H04) и четыре переменные области легкой цепи (L01-L04) настоящего изобретения получают путем гуманизации переменной области специфичного к мужчине подтипа 5АС антитела на основе химерного антитела и конструирования антитела для улучшения термостабильности, свойств агрегации и накопления в опухоли. Сайт CDR, необходимый для связывания с антигеном, остается неизменным. Термин "химерное антитело" в настоящем описании означает химерное антитело, раскрытое в патентном документе 1, если не указано иное.

Предпочтительное гуманизованное антитело настоящего изобретения имеет переменную область тяжелой цепи H01, H03 или H04 и любую из L01-L04 в качестве переменной области легкой цепи.

Наиболее предпочтительное гуманизованное антитело настоящего изобретения имеет переменную область тяжелой цепи H01 и переменную область легкой цепи L03.

Однако переменная область тяжелой цепи гуманизованного антитела настоящего изобретения не ограничивается участками, определяемыми аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, и также включает в себя варианты, сохраняющие функции. То есть мутантный переменный участок тяжелой цепи, состоящий из аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90%, предпочтительно не менее 95%, еще более предпочтительно не менее 98%, наиболее предпочтительно не менее 99% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, также охватывается переменной областью тяжелой цепи настоящего изобретения, если она может связываться с мужчином подтипа 5АС в комбинации с переменной областью легкой цепи настоящего изобретения.

В настоящем описании термин "идентичность аминокислотной последовательности относится" к идентичности аминокислотных последовательностей между двумя анализируемыми белками и выражается процентом (%) аминокислотных остатков, которые совпадают при оптимальном выравнивании аминокислотных последовательностей, полученном с использованием математических алгоритмов, известных в соответствующей области техники. Идентичность аминокислотной последовательности можно определить путем визуального осмотра и математических вычислений, а также можно рассчитать с помощью программы поиска гомологии (например, BLAST, FASTA) или программы выравнивания последовательностей (например, ClustalW), известных специалистам в данной области техники или программного обеспечения для обработки генетической информации (например, GENETYX [зарегистрированный товарный знак]) и т.п. В частности, идентичность аминокислотной последовательности в настоящем описании можно определить с помощью программы систематического анализа ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/index.php?lang=ja>), опубликованной на веб-сайте DDBJ (Банк данных ДНК Японии) с начальными условиями настройки (Версия 2.1, Тип выравнивания: медленное, Матрица весов ДНК: Gonnet, GAP OPEN: 10, GAP EXTENSION: 0,1).

Кроме того, в качестве переменной области тяжелой цепи гуманизованного антитела настоящего изобретения мутированная переменная область тяжелой цепи, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 4, где не более 10, предпочтительно не более 8, еще более предпочтительно не более 5, наиболее предпочтительно не более 3 аминокислот удалены, заменены или добавлены, также охватывается переменной областью тяжелой цепи настоящего изобретения, если она может связываться с мужчином подтипа 5АС в комбинации с переменной областью легкой цепи настоящего изобретения.

Переменная область легкой цепи гуманизованного антитела настоящего изобретения не ограничивается аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, и также включает в себя варианты, сохраняющие функции. То есть мутантная переменная область легкой цепи, состоящая из аминокислотной последовательности, имеющей не менее 90%, предпочтительно не менее 95%, еще более предпочтительно не менее 98%, наиболее предпочтительно не менее 99% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, также охватывается переменной областью легкой цепи настоящего изобретения, если она может связываться с мужчином подтипа 5АС в комбинации с переменной областью тяжелой цепи настоящего изобретения.

Кроме того, в качестве переменной области легкой цепи гуманизованного антитела настоящего изобретения мутированная переменная область легкой цепи, состоящая из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 5 - SEQ ID NO: 8, где не более 10, предпочтительно не более 8, еще более предпочтительно не более 5, наиболее предпочтительно не более 3 аминокислот удалены, заменены или добавлены, также охватывается переменной областью легкой цепи настоящего изобретения, если она может связываться с мужчином подтипа 5АС в комбинации с переменной областью тяжелой цепи настоящего изобретения.

Гуманизованное антитело или антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения может представлять собой выделенное антитело или выделенный антигенсвязывающий фрагмент. То есть гуманизованное антитело настоящего изобретения выделяют, например, из супернатанта культуры клетки-хозяина, в которую введена нуклеиновая кислота, кодирующая гуманизованное антитело или антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения. Такие нуклеиновая кислота и клетка-хозяин

подробно описаны ниже.

Кроме того, гуманизированное антитело настоящего изобретения может быть поликлональным антителом или моноклональным антителом.

Кроме того, гуманизированное антитело настоящего изобретения обладает стабильными физическими свойствами и не легко поддается агрегации. Частицы гуманизированного антитела настоящего изобретения чаще всего имеют небольшой размер, который конкретно составляет не более 20 нм, не более 15 нм, не более 12 нм, не более 11 нм или не более 10 нм. Когда происходит агрегация антител, обнаруживается много антител, имеющих размер частиц более 100 нм. В настоящем описании термин "наиболее частый размер частиц" относится к размеру частиц, наиболее часто выявляемому при измерении распределения частиц гуманизированного антитела настоящего изобретения по размеру.

Одной из характеристик гуманизированного антитела настоящего изобретения является то, что оно не денатурирует легко при нагревании. Конкретно, температура средней точки денатурации гуманизированного антитела настоящего изобретения составляет не менее 50°C, не менее 55°C, не менее 56°C, не менее 57°C, не менее 58°C, не менее 59°C или не менее 60°C. Когда гуманизированное антитело настоящего изобретения нагревают и антитело денатурируют, центр тяжести пика спектра флуоресценции аминокислот, изначально присутствующих в антителе, смещается. Термин "температура средней точки денатурации" в настоящем описании относится к температуре в средней точке смещения центра тяжести пика (температура, при которой нормальное состояние и дегенерированное состояние достигают соотношения 1:1).

Одной из характеристик гуманизированного антитела настоящему изобретению является то, что оно не легко агрегирует при нагревании. Конкретно, температура начала агрегации (Tagg) гуманизированного антитела настоящего изобретения составляет не менее 50°C, не менее 55°C, не менее 60°C, не менее 61°C, не менее не менее 62°C, не менее 63°C, не менее 64°C или не менее 65°C. Когда гуманизированное антитело настоящего изобретения нагревают и антитело агрегирует, интенсивность рассеяния при измерении статического светорассеяния становится высокой. В настоящем описании термин "температура начала агрегации" относится к температуре, при которой начинает усиливаться рассеянный свет. В следующем примере рассеянный свет измеряли при длине волны 266 нм.

Кроме того, гуманизированное антитело настоящего изобретения характеризуется высокой активностью связывания *in vitro* с муцином подтипа 5AC. Конкретно, активность связывания *in vitro* гуманизированного антитела настоящего изобретения с муцином подтипа 5AC сравнима или не ниже активности химерного антитела, раскрытого в патентном документе 1. Используемый здесь термин "сравнима с" может означать одинаковую активность, а также может означать разницу примерно не более чем в 2,0 раза, не более чем в 1,9 раза, не более чем в 1,8 раза, не более чем в 1,7 раза, не более чем в 1,6 раза, не более чем в 1,5 раза, не более чем в 1,4 раза, не более чем в 1,3 раза, не более чем в 1,2 раза или не более чем в 1,1 раза, или не менее чем в 1,0 раз, не менее чем в 0,9 раз, не менее чем в 0,8 раз, не менее чем в 0,7 раз, не менее чем в 0,6 раз или не менее чем в 0,5 раз.

Кроме того, поскольку гуманизированное антитело настоящего изобретения обладает высокой связывающей активностью в отношении муцина подтипа 5AC, оно демонстрирует высокое накопление в опухолевых тканях, экспрессирующих муцин подтипа 5AC, *in vivo* при введении в живой организм. В настоящем описании термин "накопление в опухолевых тканях, экспрессирующих муцин подтипа 5AC" относится к тому, во сколько раз больше гуманизированное антитело настоящего изобретения накапливается в опухолевых тканях, экспрессирующих муцин подтипа 5AC, по сравнению с нормальной тканью.

Накопление в опухолевой ткани, экспрессирующей муцин подтипа 5AC, составляет не менее чем в 10 раз, не менее чем в 11 раз, не менее чем в 12 раз, не менее чем в 13 раз, не менее чем в 14 раз, не менее чем в 15 раз, не менее чем в 16 раз, не менее чем в 17 раз, не менее чем в 18 раз, не менее чем в 19 раз или не менее чем в 20 раз больше, чем в ткани печени через 7 дней после введения гуманизированного антитела настоящего изобретения. Накопление в опухолевой ткани, экспрессирующей муцин подтипа 5AC, составляет не менее чем в 10 раз, не менее чем в 11 раз, не менее чем в 12 раз, не менее чем в 13 раз, не менее чем в 14 раз, не менее чем в 15 раз, не менее чем в 16 раз или не менее чем в 17 раз больше, чем в ткани почки через 7 дней после введения гуманизированного антитела настоящего изобретения.

(2) Композиция, содержащая гуманизированное антитело настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к композиции, содержащей гуманизированное антитело настоящего изобретения, описанное в (1), или его антигенсвязывающий фрагмент. Композиция, содержащая гуманизированное антитело настоящего изобретения, применима для лечения и/или диагностики рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC.

То есть настоящее изобретение представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую гуманизированное антитело настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель. Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения специфично связывается с муцином подтипа 5AC и подавляет пролиферацию раковых клеток, экспрессирующих его. Таким образом, фармацевтическая композиция настоящего изобретения

применима для лечения рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC.

Примеры рака, подлежащего лечению в соответствии с настоящим изобретением, включают рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак печени, колоректальный рак, рак желудка, рак уротелия, рак молочной железы, рак шейки матки, рак яичников и карциному эндометрия и, в частности, можно эффективно лечить рак поджелудочной железы.

Примеры рака, подлежащего лечению в соответствии с настоящим изобретением, также включают в себя рак желчных протоков.

Имеются множественные сообщения о том, что муцин подтипа 5AC является носителем антигена для CA19-9 (PLoS ONE (декабрь 2011 г., том 6, выпуск 12, e29180, p. 1-10)). Следовательно, примеры рака, подлежащего лечению в соответствии с настоящим изобретением, также включают в себя рак желчевыводящих путей, рак матки, рак легких и рак пищевода со сверхэкспрессией CA19-9, и эти виды рака можно эффективно лечить.

Лекарственная форма фармацевтической композиции настоящего изобретения специально не ограничена и, например, она может быть получена в виде пероральных препаратов, таких как таблетка, порошок, гранула, суспензия, эмульсия, капсула и т.п., или парентеральных средства, таких как инъекция, суппозиторий, внешняя жидкость и тому подобное. Фармацевтически приемлемый носитель, используемый в настоящем изобретении, может представлять собой носитель, обычно используемый в соответствующей области техники, и он может быть надлежащим образом выбран специалистами в данной области техники с учетом лекарственной формы и пути введения.

В качестве фармацевтически приемлемого носителя, используемого в настоящем изобретении, для пероральных препаратов, таких как таблетка и т.п., можно использовать, например, вспомогательное вещество, связующее вещество, смазывающее вещество, поверхностно-активное вещество, разбавитель, консервант, стабилизатор, корректирующее вещество, увлажняющий агент, консервант, антиоксидант и тому подобное, и фармацевтический препарат может быть составлен обычным способом. В то же время специалисты в данной области техники могут выбрать, например, подходящее поверхностно-активное вещество, разбавитель, консервант, стабилизатор, корректирующее вещество, увлажняющий агент, консервант и антиоксидант на основе общих технических знаний в соответствующей области техники.

В случае парентерального введения типичными препаратами являются инъекции. Фармацевтически приемлемый носитель, используемый в настоящем изобретении для инъекций, может представлять собой, например, водорастворимый растворитель, такой как физиологический раствор, раствор Рингера и тому подобное, или нерастворимый в воде растворитель, такой как растительное масло или сложный эфир жирной кислоты и тому подобное, и препарат может быть приготовлен путем растворения в нем. В это время, например, для приготовления препарата могут быть необязательно добавлены изотонический агент, солюбилизирующий агент, стабилизатор, консервант, суспендирующий агент, эмульгатор и т.п.

(3) Конъюгат антитело-лекарственное средство, в котором лекарственное средство соединено с гуманизированным антителом настоящего изобретения.

Настоящее изобретение относится к конъюгату антитело-лекарственное средство, в котором лекарственное средство, используемое для диагностики и/или лечения, связано с гуманизированным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом, описанным в (1). Конкретные примеры лекарственного средства включают в себя токсин, флуоресцентно-метящее вещество, лекарственное средство на основе нуклеиновой кислоты, вирусный вектор, наночастицу, низкомолекулярное лекарственное средство и цитокин. Поскольку гуманизированное антитело и его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения связываются с муцином подтипа 5AC, они могут способствовать диагностике или лечению рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, путем образования связанного с антителом лекарственного средства.

Когда вышеупомянутое лекарственное средство представляет собой метку, способную обнаруживать антитело настоящего изобретения, например, вещество для флуоресцентного мечения, соединенное тело антитела настоящего изобретения и метка могут быть использованы в качестве средства для обнаружения муцина подтипа 5AC. Например, антитело настоящего изобретения, связанное с веществом для флуоресцентного мечения, вводят в живой организм, и затем на основе метки можно обнаружить орган, сверхэкспрессирующий муцин подтипа 5AC, что способствует диагностике рака. Даже когда его не вводят в живой организм, экспрессию муцина подтипа 5AC в ткани или клетке, взятых из живого организма, можно обнаружить путем контакта ткани или клетки *in vitro* с антителом настоящего изобретения, связанным с веществом для флуоресцентного мечения. Способ диагностики рака с использованием антитела настоящего изобретения подробно описан ниже.

Вещество для флуоресцентного мечения, которое должно быть связано с антителом настоящего изобретения, включает в себя без ограничений, например, флуоресцентный белок, флуоресцентный краситель и т.п. Конкретные примеры флуоресцентного белка включают в себя, без ограничений, зеленый флуоресцентный белок, красный флуоресцентный белок и желтый флуоресцентный белок. Конкретные примеры флуоресцентного красителя включают в себя, без ограничений, флуоресцеин, родамин, краситель Су, Alexa Fluor (зарегистрированный товарный знак), HiLyte Fluor™, фикоэритрин (PE) и аллофикоцианин (APC).

Когда вышеупомянутое лекарственное средство представляет собой терапевтический агент, лекарственное средство, обладающее эффектами как терапевтического агента, так и гуманизированного антитела настоящего изобретения, может быть получено путем формирования связанного тела. Синергическое повышение эффективности лекарственного средства может быть достигнуто за счет соединения гуманизированного антитела настоящего изобретения, например, с токсином, обладающим противораковым действием, лекарственным средством на основе нуклеиновой кислоты, вирусным вектором, наночастицами, низкомолекулярным лекарственным средством или цитокином.

Термин "токсин", используемый в настоящем описании, представляет собой понятие, которое включает в себя "цитотоксин" или "цитотоксический агент" и относится к любому лекарственному средству, которое вредно для роста и пролиферации клеток и может действовать, уменьшая, ингибируя или разрушая клетки или злокачественные опухоли. Конкретные примеры включают в себя, без ограничений, рицин, сапорин, дифтерийный токсин, токсин *Pseudomonas* и тому подобное.

Термин "лекарственное средство на основе нуклеиновой кислоты", используемый в настоящем описании, относится к лекарственному средству, имеющему природный нуклеотид или химически модифицированный нуклеотид в качестве основного скелета, и относится к любому лекарственному средству, которое может воздействовать непосредственно на живой организм без экспрессии генов. Конкретные примеры включают в себя, без ограничений, миРНК, микроРНК, антисмысловую нуклеиновую кислоту, нуклеиновую кислоту-приманку, аптамер и олигонуклеотид CpG.

Термин "вирусный вектор", используемый в настоящем описании, относится к любому вектору, обладающему способностью эффективно вводить и экспрессировать целевой ген путем включения чужеродного гена в вирус, в котором способность к репликации и пролиферации была удалена с помощью генной инженерии, или вирус, сохраняющий часть способности к репликации и пролиферации. Конкретные примеры включают в себя, без ограничений, аденовирус, аденоассоциированный вирус, ретровирус, лентивирус, вирус Сендай и вирус простого герпеса.

Термин "наночастица", используемая в настоящем описании, относится к любому носителю доставки нанометрового размера, способному транспортировать лекарственное средство к заданной клетке или ткани. Конкретные примеры включают в себя, без ограничений, липосомы, наномицеллы и наночастицы PLGA.

Термин "низкомолекулярное лекарственное средство", используемый в настоящем описании, представляет собой понятие, включающее в себя "цитотоксический агент", "химиотерапевтический агент", "таргетный противораковый агент" и "иммунотерапевтический агент", и относится к любому лекарственному средству, которое может быть использовано для лечения нарушений клеточной пролиферации, таких как рак и т.п. Конкретные примеры включают в себя, без ограничений, ММАЕ, ММАF, DM-1, DM-4, 5-фторурацил, доксорубин, иринотекан, калихеамицин и т.п.

Термин "цитокин", используемый в настоящем описании, относится к любому физиологически активному веществу, которое представляет собой низкомолекулярный белок, секретируемый клетками, участвующий в межклеточных взаимодействиях и воздействующий на окружающие клетки. Конкретные примеры включают в себя, без ограничений, ФНО- α , интерферон- α , интерферон- β , интерферон- γ , интерлейкин-2 и т.п.

Кроме того, путем смешивания конъюгата антитело-лекарственное средство и фармацевтически приемлемого носителя можно получить фармацевтическую композицию для лечения рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, или терапевтический агент для лечения рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC. Вариант осуществления такой фармацевтической композиции и терапевтического агента описан для фармацевтической композиции в (2). Такая фармацевтическая композиция или терапевтический агент может уменьшать количество раковых клеток и/или уменьшать размер опухоли.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент и лекарственное средство соединены линкером. Используемый здесь линкер предпочтительно представляет собой линкер, способный эффективно связывать антитело настоящего изобретения с лекарственным средством в мягких условиях. Конкретные примеры линкера, который можно использовать в настоящем изобретении, включают в себя без ограничений, линкер; PEG-линкер, малеимидный линкер, PAS-илированный линкер, HES-илированный линкер, бис-(сульфосукцинимидил)субератный линкер, линкер на основе нуклеиновой кислоты, пептидный линкер, силановый линкер, полисахаридный линкер, линкер, который является термочувствительной или чувствительной к облучению (ИК, ближний ИК, УФ) связью, линкер, который является pH-чувствительной связью, гидролитический линкер и линкер, полученный путем ковалентного связывания, амидного связывания, присоединения к множественной связи углерод-углерод, циклоприсоединения Хусгена к азидоалкину, реакции Дильса-Альдера, дисульфидного связывания, присоединения Михаэля, взаимодействия силана, нуклеофильной реакции раскрытия кольца уретана, эпоксида, неальдольного карбонила и реакции 1,3-диполярного присоединения или реакции циклоприсоединения, такой как тозилирование.

(4) Нуклеиновая кислота, кодирующая гуманизированное антитело настоящего изобретения,

вектор, содержащий нуклеиновую кислоту, клетка-хозяин, содержащая вектор.

Настоящее изобретение относится к нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в (1). Поскольку аминокислотные последовательности варибельной области тяжелой цепи и варибельной области легкой цепи гуманизированного антитела настоящего изобретения раскрыты в SEQ ID NO: 1 - SEQ ID NO: 8, специалисты в данной области техники могут получить нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированное антитело, имеющее эти аминокислотные последовательности. Когда предполагается экспрессия гуманизированного антитела настоящего изобретения с использованием клетки-хозяина, как описано ниже, в качестве кодона нуклеиновой кислоты, кодирующего его, предпочтительно выбирают кодон, оптимизированный для экспрессии в этом хозяине.

Мутированный варибельный участок тяжелой цепи, описанный в (1), можно получить, подвергая нуклеиновую кислоту, кодирующую варибельный участок тяжелой цепи, показанный в SEQ ID NO: 1-4, например, сайт-специфичному мутагенезу (например, Nucleic Acid Research, Vol. 10, No. 20, p. 6487-6500, 1982, содержание которого полностью включено в настоящее изобретение путем ссылки), что является хорошо известным методом. Мутированную варибельную область легкой цепи также можно получить, подвергая нуклеиновую кислоту, кодирующую варибельную область легкой цепи, показанную в SEQ ID NO: 5-8, например, сайт-специфичному мутагенезу.

Можно получить экспрессионный вектор, содержащий такую нуклеиновую кислоту. Вектор может необязательно содержать в дополнение к нуклеиновой кислоте, кодирующей гуманизированное антитело настоящего изобретения, последовательность Козака для повышения эффективности трансляции, сигнальную последовательность, которая способствует секреции гуманизированного антитела настоящего изобретения в среду при введении в хозяина, промоторную последовательность и тому подобное. Вектор, который можно использовать в настоящем изобретении, может быть выбран из тех, которые обычно используются в соответствующей области техники, и плазмидные векторы, особенно pCDNA3.4, используемые в следующем примере, являются предпочтительными.

Кроме того, настоящее изобретение относится к клетке-хозяину, содержащей вышеупомянутый экспрессионный вектор. Поскольку полученная таким образом клетка-хозяин содержит нуклеиновую кислоту, кодирующую гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в (1), ее можно использовать в способе получения гуманизированного антитела, который будет описан далее в (5). В качестве способа введения гена в клетку можно использовать способ, обычно используемый в соответствующей области техники, например, способ, известный специалистам в данной области техники, такой как способ с фосфатом кальция, способ электропорации, способ липофекции и способ с DEAE-декстраном. Способ введения с использованием способа липофекции является особенно предпочтительным, как показано в следующем примере.

В качестве клетки-хозяина, используемой для этой цели, могут быть использованы те клетки, которые обычно используются в соответствующей области техники. Примеры таких клеток-хозяев включают в себя клетки CHO, клетки 293, Escherichia coli, дрожжи Pichia, клетки Sf9 и тому подобное. В настоящее время также коммерчески доступен набор экспрессионной системы для экспрессии целевого белка. Система ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific), используемая в следующем примере, особенно предпочтительна для быстрой и надежной экспрессии целевого белка.

(5) Способ получения гуманизированного антитела настоящего изобретения.

Настоящее изобретение также относится к способу получения гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанным в (1). Способ получения включает в себя встраивание описанной выше в пункте (4) нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированное антитело настоящего изобретения, или его антигенсвязывающий фрагмент, в экспрессионный вектор, введение этой нуклеиновой кислоты в клетку-хозяин при помощи экспрессионного вектора, содержащего нуклеиновую кислоту, культивирование клетки-хозяина после введения нуклеиновой кислоты и получение гуманизированного антитела настоящего изобретения из супернатанта культуры клетки-хозяина с помощью способов очистки, таких как хроматография и т.п.

Удобно и предпочтительно секретируют гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения в культуральный супернатант путем культивирования клетки-хозяина. Поэтому, как описано в (4), желательно сконструировать вектор и выбрать клетку-хозяина так, чтобы клетка-хозяин эффективно секретировала антитело настоящего изобретения в культуральный супернатант.

Гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения можно получить из культурального супернатанта с использованием способов очистки, таких как хроматография и тому подобное. В качестве средств для хроматографии могут быть использованы различные средства, известные в соответствующей области техники, такие как аффинная хроматография, ионообменная хроматография, эксклюзионная хроматография и тому подобное. Особенно предпочтительной является аффинная хроматография с использованием колонки с белком А, используемая в следующем примере.

(6) Способ лечения рака.

Настоящее изобретение относится к способу лечения рака с применением гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в (1), или конъюгата антитело-лекарственное средство. То есть рак можно лечить путем введения эффективного количества фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения и фармацевтически приемлемый носитель, субъекту, пораженному раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC. Поскольку гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитело-лекарственное средство настоящего изобретения связывается с муцином подтипа 5AC и подавляет пролиферацию раковых клеток, сверхэкспрессирующих муцин подтипа 5AC, можно ожидать лечения рака. Лекарственная форма и способ введения фармацевтической композиции в данном случае такие же, как описано для фармацевтической композиции в (2).

Примеры рака, подлежащего лечению в соответствии с настоящим изобретением, включают в себя рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак печени, колоректальный рак, рак желудка, рак уротелия, рак молочной железы, рак шейки матки, рак яичников и карциному эндометрия и, в частности, рак поджелудочной железы можно эффективно лечить.

Примеры рака, подлежащего лечению в соответствии с настоящим изобретением, также включают в себя рак желчных протоков.

Имеется множество сообщений, в которых утверждается, что муцин подтипа 5AC является носителем антигена для CA19-9 (PLOS ONE (декабрь 2011 г., том 6, выпуск 12, e29180, p. 1-10)). Следовательно, примеры рака, подлежащего лечению в соответствии с настоящим изобретением, также включают в себя рак желчевыводящих путей, рак матки, рак легких и рак пищевода со сверхэкспрессией CA19-9, и их можно эффективно лечить.

Используемый здесь термин "субъект" относится к человеку или животному, такому как мышь, крыса, обезьяна, морская свинка, шимпанзе, овца, коза, собака, кошка, свинья, крупный рогатый скот, лошадь или тому подобное, предпочтительно человека, но специально не ограничивается.

Используемый здесь термин "эффективное количество" представляет собой количество, которое может обеспечить полезные эффекты лечения рака у субъекта. Эффективное количество, вводимое субъекту, варьируется в зависимости от типа субъекта, массы тела субъекта, лекарственной формы (таблетка, инъекция и т.д.) и пути введения (пероральное введение, парентеральное введение и т.д.), тяжести ракового заболевания и тому подобного. Врачи и ветеринары могут учитывать эти факторы и определять подходящее эффективное количество.

При лечении рака введением гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента или конъюгата антитело-лекарственное средство настоящего изобретения количество раковых клеток уменьшается и/или уменьшается размер опухоли.

(7) Способ диагностики рака.

Настоящее изобретение относится к способу диагностики рака с применением гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в (1), или конъюгата антитело-лекарственное средство.

В одном варианте осуществления изобретения к гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту или к конъюгату антитело-лекарственное средство настоящего изобретения прикреплена метка, позволяющая его обнаружить, клетки или ткани берут у субъекта и здорового субъекта, собранные клетки или ткани контактируют с меченым гуманизованным антителом настоящего изобретения, измеряют количество метки в собранных клетках или тканях и сравнивают количество меченого антитела, связанного с клетками или тканями, взятыми у субъекта с количеством меченого антитела, связанного с клетками или тканями, взятыми у здорового субъекта, посредством чего может быть выполнена диагностика рака. Когда количество метки, обнаруженной в клетке или ткани, взятой у субъекта, больше, чем количество метки, обнаруженной в клетке или ткани, взятой у здорового субъекта, у субъекта может быть диагностировано раковое заболевание со сверхэкспрессией муцина подтипа 5AC.

Используемый здесь термин "здоровый субъект" относится к здоровому человеку, который явно не страдает раком, в отличие от субъекта, у которого диагностирован рак в настоящем изобретении. У таких здоровых субъектов сверхэкспрессия муцина подтипа 5AC не наблюдается, и субъекта можно использовать в качестве контроля.

Используемый здесь термин "метка" означает любую метку, которая связывается с гуманизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом настоящего изобретения и делает возможным его обнаружение. Конкретные примеры метки включают в себя вещества для флуоресцентного мечения.

В другом варианте осуществления изобретения к гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту настоящего изобретения прикреплена метка, позволяющая его обнаружить, клетка или ткань субъекта и клетка или ткань здорового субъекта контактирует с меченым гуманизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом настоящего изобретения,

измеряют количество метки в клетке или ткани субъекта и клетке или ткани здорового субъекта, и количество метки, измеренное в клетке или ткани субъекта, сравнивают со стандартным количеством, которое представляет собой количество метки, измеренное в клетке или ткани здорового субъекта. Когда количество, измеренное в ткани или клетке субъекта, значительно превышает стандартное количество, у субъекта может быть диагностировано раковое заболевание со сверхэкспрессией муцина подтипа 5AC.

Используемый здесь термин "стандартное количество" относится к количеству метки, измеренному у здорового субъекта, и показывает общий уровень экспрессии муцина подтипа 5AC у незлокачественных индивидуумов и количество метки, которое не специфично связываются с клетками или накапливаются в тканях. Следовательно, когда количество метки, измеренное у субъекта, у которого диагностирован рак, превышает стандартное количество, предполагается сверхэкспрессия муцина подтипа 5AC. В этом случае у субъекта может быть диагностировано раковое заболевание. В этом способе контакт между клеткой или тканью субъекта и меченым антителом настоящего изобретения может быть осуществлен с использованием клетки или ткани, полученных от субъекта, и в варианте осуществления *in vitro*. Также возможно осуществлять контакт между клеткой или тканью субъекта и меченым антителом настоящего изобретения в варианте осуществления *in vivo* без извлечения клетки или ткани у субъекта.

В другом варианте осуществления изобретения к гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту настоящего изобретения прикреплена метка, позволяющая его обнаружить, клетки или ткани берут у субъекта, собранные клетки или ткани контактируют с меченым гуманизованным антителом настоящего изобретения, измеряют количество метки в собранных клетках или тканях и сравнивают количество меченого антитела, связанного с клетками или тканями, взятыми у субъекта, с количеством меченого антитела, связанного с нормальными клетками или тканями, с помощью чего можно диагностировать рак. Когда количество метки, обнаруженной в клетке или ткани, взятой у субъекта, больше, чем количество метки, обнаруженной в нормальной клетке или ткани, можно диагностировать, что клетка или ткань поражены раком, сверхэкспрессирующим муцин подтипа 5AC.

Используемый здесь термин "нормальная клетка или ткань" относится к клетке или ткани, взятым у субъекта, у которого должен быть диагностирован рак в соответствии с настоящим изобретением, или у здорового субъекта, и заранее диагностированным как нормальная клетка или ткань. В таких нормальных клетках или тканях муцин подтипа 5AC не сверхэкспрессируется, и их можно использовать в качестве контроля.

В другом варианте осуществления изобретения к гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту настоящего изобретения прикреплена метка, позволяющая его обнаружить, меченое гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент вводят субъекту, метку обнаруживают в ткани субъекта, и обнаруживают накопление меченого антитела, посредством чего может быть диагностирован рак. Когда в ткани субъекта обнаруживается накопление меченого гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, у субъекта диагностируется рак, сверхэкспрессирующий муцин подтипа 5AC. В этом способе обнаружение метки в ткани можно проводить с использованием ткани, полученной от субъекта, и в варианте осуществления *in vitro*. Также возможно проводить обнаружение метки в ткани субъекта в варианте осуществления *in vivo* без извлечения ткани у субъекта.

В другом варианте осуществления изобретения к гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту настоящего изобретения прикреплена метка, позволяющая его обнаружить, и метку обнаруживают в ткани субъекта, которому вводят меченое гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент. Когда в ткани субъекта обнаруживается накопление меченого гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, у субъекта может быть диагностировано раковое заболевание.

Когда у субъекта диагностирован раковое заболевание со сверхэкспрессией муцина подтипа 5AC с помощью описанного выше способа, это раковое заболевание можно лечить путем введения этому субъекту фармацевтической композиции, содержащей гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, описанные в (1), и фармацевтически приемлемый носитель.

Конкретные примеры описанной здесь метки включают в себя мечение веществом для флуоресцентного мечения, но специально не ограничиваются, при условии, что с их помощью можно обнаружить гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения. Связывание между антителом и меткой может осуществляться через линкер, описанный в (3) конъюгате антитело-лекарственное средство.

(8) Способ измерения объема рака.

Настоящее изобретение относится к способу измерения объема рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, у субъекта с использованием гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в (1). В настоящем описании термин "объем рака" относится к объему части ткани субъекта, состоящей из раковых клеток, и исключает объем части, состоящей из нормальных, нераковых клеток.

В одном варианте осуществления изобретения к гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту настоящего изобретения прикреплена метка, позволяющая его обнаружить, ткань субъекта и ткань здорового субъекта приводят в контакт с меченым гуманизованным антителом или его антигенсвязывающим фрагментом и измеряют количество метки в ткани субъекта и в ткани здорового субъекта. Количество метки, измеренное в ткани субъекта, сравнивают со стандартным количеством, которое представляет собой количество метки, измеренное в ткани здорового субъекта, и та часть, в которой количество, измеренное у субъекта, превышает стандартное количество, представляет собой раковую ткань, ее объем измеряют, посредством чего можно измерить объем рака.

Используемый здесь термин "стандартное количество" относится к количеству метки, измеренному у здорового субъекта, и показывает общий уровень экспрессии муцина подтипа 5AC у незлокачественных индивидуумов и количество метки, которое не специфично связываются с клетками или накапливаются в тканях. Таким образом, часть, в которой количество метки превышает стандартное количество в ткани субъекта, можно рассматривать как раковую ткань, и объем рака можно определить путем измерения объема этой части.

В еще одном варианте осуществления изобретения к гуманизованному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту настоящего изобретения прикреплена метка, позволяющая его обнаружить, метку обнаруживают в ткани субъекта, которому вводят меченое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, и измеряют объем части, где обнаружено накопление меченого гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, посредством чего можно измерить объем рака.

Для измерения объема рака метку, такую как вещество для флуоресцентного мечения и тому подобное, обнаруживают в виде изображения у субъекта с помощью устройства, которое может обнаруживать метку, и объем можно рассчитать из размера раковой ткани, в которой обнаружена метка на изображении, используя при необходимости соответствующую расчетную формулу. Объем также можно определить, удалив ткань из образца, вырезанного из субъекта, и непосредственно измерив объем части, где обнаружена метка.

Измерение объема рака у субъекта полезно для диагностики тяжести рака и т.п. у субъекта. Кроме того, когда субъект находится на лечении, измерение объема рака у субъекта полезно для определения эффекта лечения.

Хотя настоящее изобретение более подробно описано ниже со ссылкой на примеры, настоящее изобретение не ограничивается этими примерами.

Примеры

Несмотря на то, что настоящее изобретение более подробно описано ниже со ссылками на примеры и сравнительные примеры, настоящее изобретение ими не ограничивается. Экспериментальные методы и методы испытаний в примерах и сравнительных примерах являются следующими.

Экспериментальный пример 1. Получение различных антител.

Аминокислотные последовательности различных переменных областей с добавленной к ним сигнальной последовательностью и аминокислотные последовательности различных константных областей были преобразованы в последовательности оснований с учетом использования кодонов, подходящих для экспрессии в клетках CHO. Последовательность Козака была добавлена к сайту иницирующего кодона сигнальной последовательности, а стоп-кодон был добавлен к С-концевой стороне константной области. Кроме того, сайты ферментов рестрикции были добавлены перед последовательностью Козака и после стоп-кодона, чтобы их можно было ввести в сайт переноса экспрессионного гена экспрессионной плазмиды клеток млекопитающих (pcDNA3.4). Каждый фрагмент ДНК, сконструированный таким образом, был получен путем химического синтеза. Фрагмент ДНК, содержащий переменную область, и фрагмент ДНК, содержащий константную область, лигировали с помощью ПЦР слияния с образованием желаемой Н-цепи и желаемой L-цепи.

Продуцированные гены различных антител подвергали рестрикционной обработке и затем очищали. Точно так же плазмиду для транзientной экспрессии в клетках млекопитающих (pcDNA3.4) также обрабатывали тем же ферментом рестрикции и затем очищали. Оба фрагмента смешивали в соответствующем соотношении и лигировали. Раствор реакции лигирования смешивали с компетентными клетками *Escherichia coli* DH5 α и трансформировали. ПЦР колоний, выделение одной колонии, экстракцию плазмиды из небольшого объема культуральной среды и определение последовательности оснований вставки проводили из полученного трансформанта и плазмиды (клона *Escherichia coli*), в которой сконструированный полноразмерный ген антитела был правильно вставлен в намеченном направлении с выбранной последовательностью. На выбранном клоне *Escherichia coli* проводили крупномасштабное культивирование и проводили экстракцию и очистку плазмиды, включая стадию удаления эндотоксина. Измеряли поглощение очищенной плазмиды при длине волны 260 нм и рассчитывали концентрацию.

Используя систему ExpiCHO (Thermo Fisher Scientific), осуществляли транзientную экспрессию клетками CHO. Из полученных каждой экспрессионной плазмиды Н-цепи и каждой экспрессионной

плазмиды L-цепи отбирали одну H-цепь и одну L-цепь для получения желаемой комбинации, трансфицировали методом липофекции, культивировали и подпитывали. Культуральную среду собирали через 7-13 дней после трансфекции. Отцентрифугированный и отфильтрованный культуральный супернатант добавляли в колонку с белком А, и антитело очищали с помощью обычной аффинной хроматографии на колонке (промывание после адсорбции, элюирование кислым буфером, нейтрализация элюата). Измеряли поглощение очищенного антитела при длине волны 280 нм и рассчитывали концентрацию.

Антитела с 1 по 20 получали с использованием способа, описанного выше. Номера антител, присвоенные комбинации переменной области тяжелой цепи и переменной области легкой цепи, показаны ниже:

антитело 1: H01L01,
антитело 2: H01L02,
антитело 3: H01L03,
антитело 4: H01L04,
антитело 5: H02L01,
антитело 6: H02L02,
антитело 7: H02L03,
антитело 8: H02L04,
антитело 9: H03L01,
антитело 10: H03L02,
антитело 11: H03L03,
антитело 12: H03L04,
антитело 13: H04L01,
антитело 14: H04L02,
антитело 15: H04L03,
антитело 16: H04L04,
антитело 17: H05L05,
антитело 18: H06L06,
антитело 19: H05L07,
антитело 20: H07L08.

Используемые здесь обозначения H01, H02, H03 и H04 представляют собой переменные области тяжелой цепи, соответственно показанные в SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 3 и SEQ ID NO: 4, и обозначения L01, L02, L03 и L04 представляют собой переменные области легкой цепи, представленные соответственно в SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 7 и SEQ ID NO: 8. Антитела настоящего изобретения, использованные в примерах с 1-1 по 1-16, состоят из комбинаций константной области 1 тяжелой цепи и константной области 1 легкой цепи, а также переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи вышеупомянутого антитела с 1 по 16.

С другой стороны, H05 и H06 представляют собой переменные области тяжелой цепи гуманизированного антитела, раскрытого в патентном документе 3, а L05, L06 и L07 представляют собой переменные области легкой цепи гуманизированного антитела, раскрытого в патентном документе 3. Гуманизированные антитела патентного документа 3, используемые в сравнительных примерах с 1-1 по 1-3, представляют собой гуманизированные антитела из уровня техники, которые состоят из комбинаций константной области 1 тяжелой цепи и константной области 1 легкой цепи, а также переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи, вышеупомянутых антител 17-19. Аминокислотные последовательности H05 и H06 показаны в SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10, а аминокислотные последовательности L05, L06 и L07 показаны в SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12 и SEQ ID NO: 13. Аминокислотные последовательности H05 и H06 и аминокислотные последовательности L05-L07 показаны на фиг. 3.

Кроме того, H07 представляет собой переменную область тяжелой цепи химерного антитела, раскрытого в патентном документе 1, L08 представляет собой переменную область легкой цепи химерного антитела, раскрытого в патентном документе 1. Химерные антитела, используемые в сравнительных примерах 1-4, представляют собой гуманизированные антитела, известные в данной области техники, которые состоят из комбинаций константной области 1 тяжелой цепи и константной области 1 легкой цепи, а также переменных областей тяжелой цепи и переменных областей легкой цепи вышеупомянутого антитела 20. Аминокислотная последовательность H07 показана на SEQ ID NO: 14, а аминокислотная последовательность L08 показана в SEQ ID NO: 15. Кроме того, аминокислотные последовательности H07 и L08 показаны на фиг. 4.

Тестовый пример 1. Оценка физических свойств антитела.

Полученные различные антитела разводили 150 мМ ацетатным буфером (pH 4,7) до концентрации антител примерно 1 мг/мл. Поскольку концентрация антител в сравнительном примере 1-2 составляла примерно 0,5 мг/мл, их использовали без разбавления. В этих различных растворах антител определяли температуру средней точки денатурации, температуру начала агрегации и распределение частиц по

размерам с использованием прибора UNcle (производства UNchained Labs Co., Ltd.), который представляет собой прибор для оценки физических свойств белка. В частности, для измерения средней температуры денатурации и температуры начала агрегации различные антитела нагревали примерно от комнатной температуры до 75°C со скоростью 1°C/мин и выдерживали в течение 30 с, а измерение спектра флуоресценции и измерение статического светорассеяния выполняли одновременно во времени. По результатам измерения спектра флуоресценции определяли температуру средней точки смещения центра тяжести пика, т.е. температуру средней точки денатурации, с использованием явления, состоящего в том, что центр тяжести пика спектра флуоресценции аминокислоты, присущей антителу смещается, когда антитело денатурируется. Кроме того, по результатам измерения статического светорассеяния была получена температура, при которой начинает усиливаться рассеянный свет с длиной волны 266 нм, т.е. температура начала агрегации, с использованием того факта, что интенсивность рассеяния становится сильнее при агрегации. Распределение частиц по размерам определяли измерением динамического светорассеяния различных антител при температуре, близкой к комнатной.

Для антител 1-20 оценку физических свойств различных антител проводили в соответствии с тестовым примером 1. Результаты представлены в табл. 1. Как упоминалось выше, примеры с 1-1 по 1-16 представляют собой гуманизированные антитела настоящего изобретения, сравнительные примеры с 1-1 по 1-3 представляют собой гуманизированные антитела из патентного документа 3, а сравнительные примеры 1-4 представляют собой химерные антитела из патентного документа 1.

Таблица 1

			Температура средней точки денатурации (°C)	Температура начала агрегации (°C)	Наиболее частый размер частиц (нм)
Гуманизованное антитело (настоящее изобретение)	пример 1-1	антитело 1	59,7	66,4	10,6
	пример 1-2	антитело 2	60,2	70,0	9,9
	пример 1-3	антитело 3	59,4	67,8	9,9
	пример 1-4	антитело 4	58,8	64,8	9,9
	пример 1-5	антитело 5	59,6	68,1	10,7
	пример 1-6	антитело 6	59,6	66,6	9,8
	пример 1-7	антитело 7	59,5	69,6	9,8
	пример 1-8	антитело 8	59,3	68,5	9,9
	пример 1-9	антитело 9	59,1	65,8	9,9
	пример 1-10	антитело 10	59,6	68,7	10,6
	пример 1-11	антитело 11	59,1	68,2	10,7
	пример 1-12	антитело 12	59,3	65,5	11,5
	пример 1-13	антитело 13	58,5	69,8	9,9
	пример 1-14	антитело 14	63,5	64,3	10,6
	пример 1-15	антитело 15	59,8	67,3	10,6
	пример 1-16	антитело 16	59,5	70,4	9,9
Гуманизованное антитело (патентный документ 3)	Сравнительный пример 1-1	антитело 17	59,1	61,0	12,22
	Сравнительный пример 1-2	антитело 18	55,5	55,9	11,76
	Сравнительный пример 1-3	антитело 19	60,5	61,1	10,86
Химерное антитело (патентный документ 1)	Сравнительный пример 1-4	антитело 20	49,5	45,4	203,15

Средняя температура денатурации была низкой и составляла 49,5°C для химерного антитела и высокой для гуманизованного антитела настоящего изобретения и составляла 58,5-63,5°C. Было выяснено, что гуманизованное антитело настоящего изобретения обладает стабильными физическими свойствами по сравнению с химерным антителом.

Температура начала агрегации была самой низкой для химерного антитела и составляла 45,4°C, умеренной для гуманизованного антитела из патентного документа 3 и составляла примерно 55,9-61,1°C и самой высокой для гуманизованного антитела настоящего изобретения и составляла 64,3°C-

70,4°C. Было выяснено, что гуманизованное антитело настоящего изобретения обладает стабильными физическими свойствами по сравнению с химерным антителом и гуманизированным антителом из патентного документа 3.

Размер частиц химерного антитела составлял примерно 203 нм, и была обнаружена отчетливая агрегация. В гуманизованном антителе настоящего изобретения размер частиц составлял примерно 10 нм, и было выяснено, что гуманизованное антитело является стабильным и присутствует в виде монодисперсных частиц.

На основе приведенных выше результатов было установлено, что гуманизованное антитело настоящего изобретения имеет более стабильные физические свойства, чем химерное антитело из патентного документа 1 и гуманизованное антитело из патентного документа 3. То есть ожидается, что антитело настоящего изобретения позволит стабильно получать представляющее интерес соединение без агрегации и т.п., даже если оно подвергается дополнительному этапу получения (например, этапу связывания конъюгата с веществом для флуоресцентного мечения).

Тестовый пример 2. Оценка связывающей активности *in vitro*.

Различные антитела добавляли в 96-луночный планшет, покрытый различными антигенами, и планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Планшет промывали, добавляли блокирующий раствор и смесь оставляли на 30 мин при комнатной температуре. Планшет промывали, добавляли HRP-конъюгированный античеловеческий IgG и смесь инкубировали в течение 1 ч или дольше при комнатной температуре. Планшет промывали, добавляли реагент для проявления окраски (Bethyl Laboratories, Inc.) и измеряли степень проявления окраски с помощью устройства для считывания микропланшетов (VersaMax, Molecular Devices, LLC).

Результаты оценки активности связывания между антителом и антигеном показаны в табл. 2-4. В табл. 2 и 3 опухолевую массу, полученную от имеющей рак мышинной модели, которой трансплантировали клеточную линию рака поджелудочной железы человека SW1990, гомогенизировали, а супернатант (неочищенный раствор экстракта антигена) после центрифугирования использовали в качестве антигена. В табл. 4 в качестве антигена использовали фракцию муцина, полученную изопикническим центрифугированием с использованием хлорида цезия из раствора неочищенного экстракта антигена.

Для антител 1-20 активность связывания *in vitro* различных антител оценивали в соответствии с Тестовым примером 2. Результаты представлены в табл. 2-4.

В табл. 2 показано отношение активности связывания *in vitro* антител 2-8 к антителу 1 (пример 2-1), в табл. 3 показано отношение активности связывания *in vitro* антител 10-16 к антителу 9 (пример 2-9), и в табл. 4 показано отношение активности связывания *in vitro* антител 3, 4, 8, 16-19 к антителу 20 (сравнительный пример 2-4).

Как видно из этих результатов, было выяснено, что гуманизованное антитело настоящего изобретения обладает активностью связывания *in vitro*, сравнимой с активностью связывания антитела Сравнительных примеров 2-4, которое представляет собой химерное антитело из патентного документа 1. В целом, гуманизация химерного антитела часто снижает активность связывания с антигеном. Неожиданно оказалось, что гуманизованное антитело настоящего изобретения сохраняло тот же уровень связывающей активности, что и химерное антитело. Кроме того, было выяснено, что гуманизованное антитело настоящего изобретения имеет активность связывания *in vitro*, сравнимую или превышающую активность гуманизованного антитела из патентного документа 3.

Таблица 2

Гуманизованное антитело (настоящее изобретение)	пример 2-1	антитело 1	1,00
	пример 2-2	антитело 2	1,03
	пример 2-3	антитело 3	0,99
	пример 2-4	антитело 4	0,99
	пример 2-5	антитело 5	0,60
	пример 2-6	антитело 6	0,71
	пример 2-7	антитело 7	0,65
	пример 2-8	антитело 8	0,72

Таблица 3

Гуманизованное антитело (настоящее изобретение)	пример 2-9	антитело 9	1,00
	пример 2-10	антитело 10	0,96
	пример 2-11	антитело 11	1,25

	пример 2-12	антитело 12	0,91
	пример 2-13	антитело 13	0,90
	пример 2-14	антитело 14	1,04
	пример 2-15	антитело 15	1,36
	пример 2-16	антитело 16	0,88

Таблица 4

Гуманизированное антитело (настоящее изобретение)	пример 2-3	антитело 3	1,56
	пример 2-4	антитело 4	0,97
	пример 2-8	антитело 8	0,70
	пример 2-16	антитело 16	1,09
Гуманизированное антитело (патентный документ 3)	Сравнительный пример 2-1	антитело 17	0,75
	Сравнительный пример 2-2	антитело 18	0,13
	Сравнительный пример 2-3	антитело 19	0,49
Химерное антитело (патентный документ 1)	Сравнительный пример 2-4	антитело 20	1,00

Тестовый пример 3. Оценка накопления опухоли *in vivo*.

Линию клеток рака поджелудочной железы человека SW1990 (1×10^7 клеток) вводили подкожно голым мышам линии Balb/c от бока к спине. Когда размер опухоли достигал примерно 100-200 мм² через 13-16 дней после трансплантации SW1990, мышам через хвостовую вену вводили 2 мг/кг различных флуоресцентно-меченых антител (n=2). Антитело было флуоресцентно помечено с использованием наборов для мечения белков Dye SE CF (торговая марка) (производство Biotium). Объем опухоли рассчитывали по следующей расчетной формуле:

$$\text{объем опухоли} = (\text{малая ось опухоли}^2 \times \text{большая ось опухоли}) / 2.$$

Оценка накопления опухоли во времени.

В качестве оценки накопления опухоли во времени *in vivo* флуоресценцию, испускаемую мышью, которой вводили антитело, фотографировали с помощью IVIS LuminaIII (Perkin Elmer Inc.) до введения, через день после, через 2 дня, через 3 дня и через 7 дней после введения различных антител с флуоресцентной меткой.

Оценка накопления опухоли в конечный момент времени.

Кроме того, через 7 дней после введения различных антител с флуоресцентной меткой опухоль, печень и почку удаляли и фотографировали с помощью IVIS Lumina III (Perkin Elmer Inc.). Данные сфотографированного изображения были проанализированы с использованием аналитического компьютера (программное обеспечение Living Image) и были получены числовые данные. Числовое значение рассчитывалось как средняя яркость ($[\text{ф/с/см}^2/\text{ср}]/[\text{мкВт/см}^2]$) в области, указанной на изображении.

Накопление опухоли рассчитывали следующим образом. Величина накопления в опухоли здесь представляет собой среднюю яркость в области опухоли, рассчитанную по приведенной выше формуле, а накопление в печени или почке представляет собой среднюю яркость в области печени или почки, рассчитанную по приведенной выше формуле.

Отношение опухоль-печень=накопление в опухоли через 7 дней после введения флуоресцентно-меченого антитела/накопление в печени через 7 дней после введения флуоресцентно-меченого антитела.

Отношение опухоль-почка=накопление в опухоли через 7 дней после введения флуоресцентно-меченого антитела/накопление в почке через 7 дней после введения флуоресцентно-меченого антитела.

Для антител 3, 4, 8, 9, 10, 16-20 накопление различных антител в опухоли *in vivo* оценивали в соответствии с тестовым примером 3. Результаты показаны в табл. 5 и на фиг. 5. В табл. 5 показано накопление в опухоли различных антител *in vivo* (в среднем n=2).

Таблица 5

			Отношение опухоль-печень	Отношение опухоль-почка
Гуманизированное	пример 3-1	антитело 3	23,5	16,8

антитело (настоящее изобретение)	пример 3-2	антитело 4	11,7	12,7
	пример 3-3	антитело 8	14,8	17,7
	пример 3-4	антитело 9	20,5	15,4
	пример 3-5	антитело 10	17,5	14,9
	пример 3-6	антитело 16	18,1	14,0
Гуманизированное антитело (патентный документ 3)	Сравнительный пример 3-1	антитело 17	14,1	9,4
	Сравнительный пример 3-2	антитело 18	17,7	18,2
	Сравнительный пример 3-3	антитело 19	15,3	14,3
Химерное антитело (патентный документ 1)	Сравнительный пример 3-4	антитело 20	6,0	7,0

На основе результатов табл. 5 было установлено, что гуманизированное антитело настоящего изобретения (антитела 3, 4, 8, 9, 10, 16) имеет более высокое отношение опухоль-печень и более высокое отношение опухоль-почка, чем химерное антитело (антитело 20) патентного документа 1; т.е. было получено гуманизированное антитело с высокой аккумуляцией в опухоли. На фиг. 5 показано накопление во времени антитела примера 3-1 (антитела 3), имеющего самое высокое отношение опухоль-печень в табл. 5. Было выяснено, что антитело накапливается в опухоли в нижней правой части спины мыши.

Как описано выше, в целом, поскольку гуманизация химерного антитела часто снижает активность связывания с антигеном, накопление опухоли *in vivo* также часто снижается. Неожиданным оказалось, что гуманизированное антитело настоящего изобретения, как выяснилось, демонстрирует гораздо более высокое накопление в опухоли, чем химерное антитело.

Когда предполагается получение конъюгата антитело-лекарственное средство, конъюгированного с лекарственным средством, обладающим очень сильным эффектом уничтожения клеток, высокая аккумуляция в опухоли антитела в качестве средства его доставки (т.е. гуманизированного антитела настоящего изобретения) является очень полезной, так как она не только усиливает противоопухолевый эффект, но и может уменьшить побочные эффекты в отношении нормальных тканей.

Промышленная применимость

Настоящее изобретение относится к гуманизированному антителу или его антигенсвязывающему фрагменту, способному связываться с муцином подтипа 5AC. Гуманизированное антитело настоящего изобретения обладает стабильными физическими свойствами, а также способностью связываться с муцином подтипа 5AC и лучше накапливается в опухоли. Таким образом, гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент настоящего изобретения чрезвычайно полезны для лечения и/или диагностики рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, и, кроме того, для получения конъюгата антитело-лекарственное средство для лечения и/или диагностики рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC.

Эта заявка основана на патентной заявке No. 2019-191560, поданной в Японии (дата подачи: 18 октября 2019 г.), содержание которой полностью включено в настоящую заявку.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Гуманизированное антитело, способное связываться с муцином подтипа 5AC, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, состоящую из:
 - (1) аминокислотной последовательности, имеющей не менее 98% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 1,
 - (2) аминокислотной последовательности, имеющей не менее 98% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 2,
 - (3) аминокислотной последовательности, имеющей не менее 98% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 3, или
 - (4) аминокислотной последовательности, имеющей не менее 98% идентичности по последовательности с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 4; и
 вариабельную область легкой цепи, состоящую из:
 - (5) аминокислотной последовательности, имеющей не менее 98% идентичности по последователь-

зированное антитело по любому из пп.1-4.

8. Фармацевтическая композиция для лечения рака, сверхэкспрессирующего муцин подтипа 5AC, содержащая гуманизированное антитело по любому из пп.1-6 и фармацевтически приемлемый носитель.

9. Фармацевтическая композиция по п.8, где рак представляет собой рак поджелудочной железы, рак щитовидной железы, рак печени, колоректальный рак, рак желудка, рак уротелия, рак молочной железы, рак шейки матки, рак яичников, карциному эндометрия или рак желчных протоков.

10. Нуклеиновая кислота, кодирующая гуманизированное антитело по любому из пп.1-6.

11. Способ получения гуманизированного антитела, включающий:

(1) этап встраивания нуклеиновой кислоты, кодирующей гуманизированное антитело по любому из пп.1-6 в экспрессионный вектор,

(2) этап введения вышеупомянутой нуклеиновой кислоты в клетку-хозяина с помощью экспрессионного вектора, содержащего эту нуклеиновую кислоту,

(3) этап культивирования клетки-хозяина, содержащей экспрессионный вектор, и

(4) этап выделения гуманизированного антитела из супернатанта культуры клетки-хозяина путем очистки хроматографией.

12. Способ оценки уровня экспрессии муцина подтипа 5AC в клетке или ткани, включающий в себя:

(1) этап получения меченого гуманизированного антитела путем прикрепления метки к гуманизированному антителу по любому из пп.1-6, где метка позволяет обнаруживать антитело,

(2) этап контакта клетки или ткани с меченым гуманизированным антителом,

(3) этап измерения количества метки, связанной с клеткой или тканью, и оценки на его основе уровня экспрессии муцина подтипа 5AC, экспрессируемого в клетке или ткани.

[вариабельная область тяжелой цепи 1 (H01)]

EVQLLESGGGVLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVSTISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDN
NTLYLQMNSLRAEDTALYYCTRHLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[вариабельная область тяжелой цепи 2 (H02)]

LVQLVESGGGVVVRPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWIR
QAPGKGLEWVSTISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDN
NSLYLQMNSLRAEDTALYYCTRHLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[вариабельная область тяжелой цепи 3 (H03)]

LVQLVESGGGVVQVGRSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVATISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDN
NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRHLDYANYDAMDYWGQG
TLVTVSS

[вариабельная область тяжелой цепи 4 (H04)]

EVQLLESGGGVLVQPGGSLRLSCAVSGFTFSNYGMSWVR
QAPGKGLEWVSTISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDN
NTLYLQMNTRLRAEDTAVYYCTRHLDYANYDAMDYWGQG
TPVTVSS

Фиг. 1

[вариабельная область легкой цепи 1 (L01)]

DIVMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVTTSDFSYMH
WYQQKPKGAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK

[вариабельная область легкой цепи 2 (L02)]

DVVMTQSPSTLSASVGDRTITCRASKSVTTSDFSYMH
WYQQKPGQAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFT
LTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK

[вариабельная область легкой цепи 3 (L03)]

DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASKSVTTSDFSYMH
WYQQKPKGKSPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSGTDFS
LTISLQPEDFATYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK

[вариабельная область легкой цепи 4 (L04)]

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASKSVTTSDFSYLH
WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSGTDFT
LTISLQAEADVAVYYCQHSREFPWTFGGGTKVEIK

Фиг. 2

[вариабельная область тяжелой цепи 5 (H05)]

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVR
 QAPGKGLEWVSTISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDNK
 NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKHLDYANYDAMDYWGQG
 TLVTVSS

[вариабельная область тяжелой цепи 6 (H06)]

EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSNYGMSWVR
 QAPGKGLEWVSTISNSGRYTYFPDSVKGRFTISRDNK
 NSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHLDYANYDAMDYWGQG
 TLVTVSS

[вариабельная область легкой цепи 5 (L05)]

DIQMTQSPSSSLAVSLGDRVITCRASKSVTTSDFSYMH
 WYQQKPGAPKLLIYLASNLESGVPSRFSGSGSDTDF
 FTISLQPEDIAATYYCQHSREFPWTFGQGTKEVEK

[вариабельная область легкой цепи 6 (L06)]

DIVMTQTPSSPVTLGQPASISCRASKSVTTSDFSYMH
 WLQQKPGQPPRLLIYLASNLESGVPDRFSGSGAGTDF
 LKISRVEAEDVGVYYCQHSREFPWTFGQGTKEIK

[вариабельная область легкой цепи 7 (L07)]

DIVMTQTPLSLVTTPGQPASISCRASKSVTTSDFSYMH
 WYLQKPGQPPQLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSDTDF
 LKISRVEAEDVGVYYCQHSREFPWTFGQGTKEIK

Фиг. 3

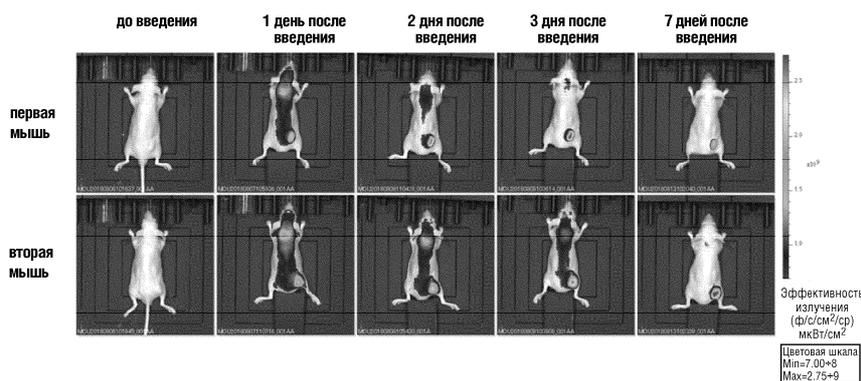
[вариабельная область тяжелой цепи 7 (H07)]

EVKLVESGGVVLKSGGSLKLSCAVSGFTFSNYGMSWVR
 QTPKRLLEWVATISNSGRYTYFPDSVKGPFAISRDNK
 NNLYLQMSSSLRSADTALYYCTRHLDYANYDAMDYWGQG
 TSVTVSS

[вариабельная область легкой цепи 8 (L08)]

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASKSVTTSDFSYMH
 WYQQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPDRFSGSGSDYDFY
 LNIHPVEEDAATYYCQHSREFPWTFGGGTKLEIK

Фиг. 4



Фиг. 5

