

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **047081**

(13) **B1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

(45) Дата публикации и выдачи патента
2024.05.30

(21) Номер заявки
202390205

(22) Дата подачи заявки
2021.07.30

(51) Int. Cl. **C07K 16/28** (2006.01)
C07K 14/715 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(54) **АНТИТЕЛА К IL13R α 2**

(31) **2011993.9**

(32) **2020.07.31**

(33) **GB**

(43) **2023.06.23**

(86) **PCT/EP2021/071389**

(87) **WO 2022/023522 2022.02.03**

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
АДС ТЕРАПЬЮТИКС СА (CH)

(72) Изобретатель:
**Ван Беркель Патриснус Хендрикус
Корнелис, Бертелли Франсуа (CH)**

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(56) **WO-A1-2016123142
WO-A1-2014152361
EP-A1-3480212**

(57) Данное изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с белком альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), а также к соответствующим применениям и способам получения.

047081

B1

047081

B1

Предшествующая заявка

Данная заявка испрашивает приоритет по заявке Великобритании номер GB 2011993.9, поданной 31 июля 2020 года.

Область техники

Изобретение относится к антителам, которые специфически связываются с белком альфа-2-субъединицы рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2). Также описаны способы получения и применения антител к IL13R α 2.

Уровень техники

IL13R α 2.

Альфа-2-субъединица рецептора интерлейкина-13 (IL-13R α 2; также известная как кластер дифференцировки 213A2, CD213A2) представляет собой связанный с мембраной белок, который тесно связан с IL-13R α 1, субъединицей комплекса рецептора цитокинов I типа интерлейкина-13 вместе с IL-4R α .

Вместе, IL13R α 1 и IL-4R α , образуют димер; IL-13 связывается с цепью IL-13R α 1, тогда как IL-4R α стабилизирует это взаимодействие. Этот рецептор IL-13 также может запускать передачу сигналов IL-4. В обоих случаях это происходит посредством активации пути янус-киназы (JAK)/сигнальных трансдукторов и активаторов транскрипции (STAT), что приводит к фосфорилированию STAT6. Фосфорилированный STAT6 димеризуется и действует как фактор транскрипции, активирующий многие гены, такие как эотаксин. (Murata T., et al., *Int J Mol Med.* 1998 Mar;1(3):551-7; Chomarat P., et al., *Int Rev Immunol.* 1998;17(1-4):1-52).

IL-13R α 2 кодируется геном IL13RA2. IL-13R α 2 связывает IL-13 с очень высокой аффинностью (и поэтому может изолировать его), но не позволяет связываться с IL-4. Он действует как негативный регулятор как IL-13, так и IL-4, однако механизм этого явления до сих пор не определен (Seyfzadeh N. et al., *Acta Microbiol Immunol Hung.* 2015 Dec; 62(4):341-78).

Было обнаружено, что IL-13R α 2 сверхэкспрессируется при различных видах рака, включая рак поджелудочной железы (Fujisawa et al., *Cancer Res.* 2009 Nov 15;69(22):8678-85), рак яичников (Kioi et al., *Cancer.* 2006 Sep 15; 107(6): 1407-18), меланому (Okamoto et al., *Sci Rep.* 2019 Feb 4;9(1):1281) и злокачественные глиомы (Joshi et al., *Cancer Res.* 2000 Mar 1;60(5): 1168-72).

Антитела к IL13R α 2.

Получение мышинных моноклональных антител к IL13R α 2 путем иммунизации самок мышей BALB/c слитым белком человеческого рекомбинантного IL13R α 2 описано у Balyasnikova et al. (*J Biol Chem.* 2012 Aug 31; 287(36): 30215-30227). Среди мышинных антител к IL13R α 2, созданных и охарактеризованных в этой публикации, есть антитело, обозначенное как "Клон 47".

Конъюгаты антитело-лекарственное средство.

Терапия на основе антител была разработана для целенаправленного лечения пациентов с раком, иммунологическими и ангиогенными нарушениями (Carter, *Nat Rev Immunol.* 2006 May; 6(5):343-57). Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC), т.е. иммуноконъюгаты используются для местной доставки цитотоксических или цитостатических агентов, т.е. лекарственных средств для уничтожения или ингибирования опухолевых клеток, при лечении рака. Они обеспечивают направленную доставку лекарственного компонента к опухолям и внутриклеточное накопление в них, тогда как системное введение этих неконъюгированных лекарственных агентов может привести к неприемлемым уровням токсичности для нормальных клеток (Xie et al (2006) *Expert. Opin. Biol. Ther.* 6(3):281-291; Kovtun et al (2006) *Cancer Res.* 66(6):3214-3121; Law et al (2006) *Cancer Res.* 66(4):2328-2337; Wu et al (2005) *Nature Biotech.* 23(9): 1137-1145; Lambert J. (2005) *Current Opin. in Pharmacol.* 5:543-549; Hamann P. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* 15(9):1087-1103; Payne, G. (2003) *Cancer Cell* 3:207-212; Trail et al (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:328-337; Syrigos and Epenetos (1999) *Anticancer Research* 19:605-614).

Таким образом достигается максимальная эффективность при минимальной токсичности. Попытки разработки и очистки ADC были сосредоточены на селективности моноклональных антител (мкАт), а также на механизме действия лекарственного средства, свойствах связывания с лекарственным средством, отношении лекарственное средство/антитело (загрузка) и высвобождения лекарственного средства (Junutula, et al., 2008b *Nature Biotech.*, 26(8):925-932; Dornan et al (2009) *Blood* 114(13):2721-2729; US 7521541; US 7723485; WO 2009/052249; McDonagh (2006) *Protein Eng. Design & Sel.* 19(7): 299-307; Dronina et al (2006) *Bioconj. Chem.* 17:114-124; Erickson et al (2006) *Cancer Res.*66(8): 1-8; Sanderson et al. (2005) *Clin. Cancer Res.* 11:843 -852; Jeffrey et al (2005) *J. Med. Chem.* 48:1344-1358; Hamblett et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:7063-7070). Фрагменты лекарственных средств могут оказывать свое цитотоксическое и цитостатическое действие по механизмам, включающим связывание тубулина, связывание ДНК или ингибирование протеасом и/или топоизомеразы. Некоторые цитотоксические лекарственные средства склонны инактивироваться или становиться менее активными при конъюгировании с большими антителами или белковыми рецепторными лигандами.

Учитывая роль IL-13R α 2 в раковых заболеваниях человека, желательным является выявление антитела с преимущественными свойствами, которые специфически связывают IL-13R α 2. Настоящее изобретение относится к таким антителам.

Краткое описание изобретения

В настоящем изобретении предложены гуманизированные антитела к IL13R α 2, полученные в результате гуманизации мышинового антитела к IL13R α 2 "Клон 47", описанного у Balyasnikova et al (J Biol Chem. 2012 Aug 31; 287(36): 30215-30227).

На основе мышинового "Клона 47", авторы настоящего изобретения создали ряд гуманизированных последовательностей тяжелой и легкой цепей с целью создания антител, имеющих более низкую иммуногенность у человека, чем химерные антитела, содержащие последовательности тяжелой и легкой цепей мышинового антитела.

Неожиданно было обнаружено, что в дополнение к более низкой иммуногенности эти гуманизированные варианты могут обладать другими полезными свойствами по сравнению с мышиным Клоном 47 и/или другими гуманизированными антителами к IL13R α 2, например, улучшенной аффинностью к человеческому IL13R α 2, как указано в другом месте данном документе.

Соответственно, в первом аспекте в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело, которое связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; и SEQ ID NO: 8.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированное антитело дополнительно содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит константную область, полученную из одного или более антител человека.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 3, и:

- (i) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (ii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (iii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или
- (iv) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 5, и:

- (i) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (ii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (iii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или
- (iv) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 6, и:

- (i) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (ii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (iii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или
- (iv) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 7, и:

- (i) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
- (ii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;
- (iii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или
- (iv) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 8, и:

- (i) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(iii) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(iv) переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

(iii) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

(iv) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(v) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

(vi) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11; или

(vii) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых более предпочтительных вариантах осуществления антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4; и

(iii) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления антитело содержит переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело связывает IL13R α 2 с аффинностью (K_D) не выше 5×10^{-10} М, например, не выше $2,5 \times 10^{-10}$ М или не выше $1,5 \times 10^{-10}$ М. В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело связывает IL13R α 2 с более высокой аффинностью (K_D), чем антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и необязательно константную область антитела. В некоторых вариантах осуществления аффинность (K_D) определяют по протоколу, описанному в примерах, например, с помощью анализа Вiasore.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованное антитело конкурентно ингибирует связывание с IL13R α 2 антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. и необязательно константную область антитела.

В некоторых вариантах осуществления IL13R α 2 представляет собой IL13R α 2 человека.

Последовательности переменных областей тяжелой цепи и/или переменных областей легкой цепи антитела, описанные в данном документе, могут быть модифицированы, например, путем вставок, замен и/или делеций до такой степени, что гуманизованное антитело сохраняет способность связываться с IL13R α 2. Специалист в данной области техники может убедиться в поддержании этой активности, выполняя функциональные анализы, описанные в данном документе или известные в данной области техники.

Соответственно, в некоторых вариантах осуществления переменная область тяжелой цепи содер-

жит не более 20 вставок, замен и/или делеций, например, не более 15, не более 10, не более 9, не более 8, не более 7, не более 6, не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 вставки, замены и/или делеций. В некоторых вариантах осуществления вариабельная область легкой цепи содержит не более 20 вставок, замен и/или делеций, например, не более 15, не более 10, не более 9, не более 8, не более 7, не более 6, не более 5, не более 4, не более 3, не более 2 или не более 1 вставки, замены и/или делеций.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по настоящему изобретению включают антитела, содержащие домены VH и VL с аминокислотными последовательностями, которые идентичны последовательностям, описанным в данном документе.

Во втором аспекте в настоящем изобретении предложен конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий гуманизированное антитело в соответствии с первым аспектом данного изобретения. Конъюгаты по настоящему изобретению включают антитело, конъюгированное, т.е. ковалентно присоединенное линкером, к лекарственному компоненту.

В третьем аспекте в настоящем изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело в соответствии с первым аспектом или конъюгат антитело-лекарственное средство в соответствии со вторым аспектом и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

В настоящем изобретении также предложены такие антитела, конъюгаты и фармацевтические композиции для применения в способе лечения и применение таких антител, конъюгатов и фармацевтических композиций в производстве лекарственного препарата для применения в способе лечения.

В настоящем изобретении также предложены полинуклеотиды, кодирующие антитела по данному изобретению, векторы, содержащие такие полинуклеотиды, и клетки-хозяева, содержащие такие векторы, а также способы получения антител по данному изобретению, включающие культивирование таких клеток-хозяев в условиях, подходящих для экспрессии антител по данному изобретению.

Краткое описание чертежей

Фиг. 1 - сравнение последовательностей мышинных вариабельных доменов тяжелой (VH) и легкой (VK) цепей "Клон 47" и "HuCL47". CDR подчеркнуты.

Фиг. 2 - сравнение мышинового Клона 47, гуманизированного варианта HuCL47 и антител изотипического контроля B12, которые связываются с клетками NCI-H1299.

Фиг. 3 - сравнение связывания мышинового Clone47, гуманизированного варианта HuCL47 и антител изотипического контроля B12 с помощью ELISA.

Подробное описание изобретения

Аспекты и варианты осуществления настоящего изобретения теперь будут обсуждаться со ссылкой на прилагаемые графические материалы. Дополнительные аспекты и варианты осуществления будут очевидны специалистам в данной области техники. Все документы, упомянутые в этом тексте, включены в данный документ посредством ссылки.

Гуманизированные антитела.

В настоящем изобретении предложены гуманизированные антитела к IL13R α 2.

"Клон 47" представляет собой мышинное антитело к IL13R α 2, описанное Balyasnikova et al (J Biol Chem. 2012 Aug 31; 287(36): 30215-30227). На основе последовательностей тяжелой и легкой цепей мышинового Клона 47 (SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно), авторы настоящего изобретения создали ряд последовательностей гуманизированных тяжелой и легкой цепей с целью создания антител, имеющих более низкую иммуногенность у человека, чем химерные антитела, содержащие последовательности тяжелой и легкой цепей мышинового антитела.

Неожиданно было обнаружено, что некоторые полученные таким образом гуманизированные варианты проявляют улучшенную аффинность к человеческому IL13R α 2 по сравнению с химерным Клоном 47. Гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут также обладать одним или более дополнительными полезными свойствами, такими как улучшенная стабильность и/или активность уничтожения клеток, как указано ниже.

Таким образом, настоящее изобретение относится к антителу, которое связывается с IL13R α 2, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 3 (VHA; VH HuCL47); SEQ ID NO: 5 (VHAback); SEQ ID NO: 6 (VHA1); SEQ ID NO: 7 (VHA2); и SEQ ID NO: 8 (VHA3). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело может содержать вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (VHA; HuCL47 VH).

В некоторых вариантах осуществления антитело может дополнительно содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4 (VKA; VL HuCL47); SEQ ID NO: 9 (VKAback); SEQ ID NO: 10 (VKA1); и SEQ ID NO: 11 (VKA2). В некоторых предпочтительных вариантах осуществления антитело может содержать вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA; VL HuCL47).

В некоторых вариантах осуществления изобретения антитело может содержать вариабельную об-

NO: 9;

xv) варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10;

xvi) варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

xvii) варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

xviii) варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

xix) варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; и

xx) варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

Некоторые предпочтительные конкретно рассматриваемые варианты осуществления данного изобретения включают антитела, которые содержат

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (VHA; VH HuCL47), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA; VL HuCL47);

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (VHA; VH HuCL47), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (VKA1);

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (VHA; VH HuCL47), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (VKA2);

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (VHAback), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA; VL HuCL47); варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (VHAback), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (VKA1); варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (VHAback), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (VKA2); и варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (VHA3), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (VKA2).

Другие предпочтительные варианты осуществления настоящего изобретения включают антитела, которые содержат

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (VHA; VH HuCL47), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA; VL HuCL47);

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (VHAback), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA; VL HuCL47); и

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (VHA3), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (VKA2).

В некоторых особенно предпочтительных вариантах осуществления настоящего изобретения антитело содержит варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4. Такие антитела могут упоминаться в данном документе как "huCL47".

Антитела по данному изобретению являются гуманизированными или полностью человеческими антителами или содержат варибельные домены, которые являются гуманизированными или полностью человеческими. Антитела по данному изобретению могут быть выделенными гуманизированными или полностью человеческими антителами. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут дополнительно содержать константную область антитела, полученную из одного или более антигенов человека.

В одном варианте осуществления настоящее изобретение обеспечивает антитело, которое связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), содержащее тяжелую цепь, содер-

жащую определяющие комплементарность области (CDR), приведенные в SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14. и SEQ ID: NO 15; и/или легкую цепь, содержащую (i) CDR, приведенные в SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17 и SEQ ID: NO 18; и (ii) остаток серина в положении 30 (нумерация со ссылкой на SEQ ID NO: 3), где по меньшей мере переменные области являются полностью человеческими. В одном варианте осуществления антитело является полностью человеческим, включая константные области. В родственном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитела, содержащему указанное антитело и димер пирролобензодиазепина. В одном варианте осуществления легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь человека.

Связывание антител.

Описанные в данном документе антитела представляют собой антитела, которые специфически связываются с IL13R α 2.

В контексте данного документа термины "связывать с IL13R α 2" и "связывать IL13R α 2" означают, что антитело связывает IL13R α 2 с более высокой аффинностью, чем неспецифический партнер, такой как бычий сывороточный альбумин (BSA, номер доступа в Genbank CAA76847, версия № CAA76847.1 GL3336842, дата обновления записи: 7 января 2011 г., 14:30). В некоторых вариантах осуществления антитело связывает IL13R α 2 с константой ассоциации (K_a) по меньшей мере в 2, 3, 4, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000, 5000, 104, 105 или 106 раз выше, чем константа ассоциации антитела в отношении BSA при измерении в физиологических условиях.

В некоторых вариантах осуществления полипептид IL13R α 2 соответствует аминокислотной последовательности, раскрытой в UniProt, номер доступа: Q14627 (версия записи 190), или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL13R α 2 соответствует аминокислотной последовательности, имеющей по меньшей мере 70, 80, 90, 95, 99 или 100% идентичности последовательности с полноразмерной аминокислотной последовательностью, раскрытой в UniProt, номер доступа: Q14627 (версия записи 190), или ее фрагменту. В некоторых вариантах осуществления полипептид IL13R α 2 имеет последовательность SEQ ID NO: 12.

Аффинность антител.

Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что процесс гуманизации увеличивает аффинность гуманизованных антител к человеческому IL13R α 2 по сравнению с химерным (Химер.) Клоном 47, как определено в анализе связывания Biacore (см. пример 2).

Таким образом, антитела по изобретению могут связывать IL13R α 2 с высокой аффинностью. Например, в некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела по данному изобретению могут связывать IL13R α 2 с константой диссоциации (K_D) не более 10^{-6} М, не более 5×10^{-6} М, не более 10^{-7} М, не более 5×10^{-7} М, не более 10^{-8} М, не более 5×10^{-8} М, не более 10^{-9} М, не более 5×10^{-9} М, не более 10^{-10} М, не более 5×10^{-10} М, не более 10^{-11} М, не более 5×10^{-11} М, не более 10^{-12} М, не более 5×10^{-12} М, не более 10^{-13} М, не более 5×10^{-13} М, не более 10^{-14} М, не более 5×10^{-14} М, не более 10^{-15} М, или не более 5×10^{-15} М.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела по данному изобретению могут связывать IL13R α 2 с константой диссоциации (K_D) не более 0,52, 0,51, 0,50, 0,49, 0,48, 0,47, 0,46, 0,45, 0,44, 0,43, 0,42, 0,41 или 0,40 нМ. В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела по данному изобретению могут связывать IL13R α 2 с константой диссоциации (K_D) не более 0,40, 0,35, 0,30, 0,25, 0,20, 0,15 или не более 0,10 нМ.

В некоторых вариантах осуществления гнстантоуманизованные антитела по настоящему изобретению могут связывать IL13R α 2 с константой диссоциации (K_D) от 10^{-8} М до 10^{-10} М, от 10^{-10} М до 10^{-12} М, от 10^{-12} М до 10^{-14} М, или от 10^{-14} М до 10^{-16} М. В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела согласно настоящему изобретению могут связывать IL13R α 2 с константой диссоциации (K_D) от 5×10^{-10} до 5×10^{-11} М.

Подходящие способы определения аффинности антител должны быть хорошо известны специалистам в данной области техники, например методы твердофазного иммуферментного анализа (ELISA) и поверхностного плазмонного резонанса (ППР). В некоторых вариантах осуществления K_D можно определить и рассчитать способами, описанными в примерах.

В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела могут конкурентно ингибировать связывание *in vivo* и/или *in vitro* мышинового антитела "Клон 47" с человеческим IL13R α 2. В некоторых вариантах осуществления гуманизованные антитела могут конкурентно ингибировать связывание *in vivo* и/или *in vitro* с человеческим IL13R α 2 антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления эквивалентная доза гуманизованных антител по данному изобретению может конкурентно ингибировать по меньшей мере 20% связывания мышинового антитела "Клон 47", например, по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по крайней мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90% связывания. Процент

связывания можно измерить, например, с помощью конкурентного анализа ELISA, где % ингибирования связывания рассчитывают как $[(1 - \text{поглощение тестируемого образца}) / (\text{поглощение отрицательного контроля})]$.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь более высокую аффинность к человеческому антигену IL13R α 2, чем мышинное антитело "Клон 47". В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по настоящему изобретению могут иметь более высокую аффинность к антигену IL13R α 2 человека, чем антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

В некоторых вариантах осуществления K_D гуманизированного антитела с антигеном IL13R α 2 человека будет составлять не более 0,9 от K_D мышинного антитела "Клон 47"/антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. Например, K_D гуманизированного антитела с антигеном IL13R α 2 человека может составлять не более 0,8, 0,7, 0,6, 0,5, 0,4, 0,3, 0,2, 0,1, 0,05, 0,01 или 0,001 от K_D одного или более антител, описанных выше. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления K_D может составлять не более 0,5 или не более 0,2 от K_D одного или более антител, описанных выше.

Изоэлектрическая точка антитела (pI).

Молекула не несет суммарного заряда, когда pH ее окружения равен pI молекулы.

Суммарный заряд молекулы влияет на растворимость молекулы, при этом биологические молекулы, такие как белки, как правило, имеют минимальную растворимость в воде или растворах солей при pH, соответствующем их pI. Таким образом, белки с pI 7,35-7,45 имеют минимальную растворимость в крови человека, pH которой обычно находится в диапазоне 7,35-7,45.

Когда pH окружающей среды ниже pI белка, молекула несет суммарный положительный заряд. Когда pH окружающей среды выше pI белка, молекула несет суммарный отрицательный заряд. В целом, более высокий суммарный положительный заряд антитела приводит к увеличению удержания в тканях и клиренсу с более коротким периодом полувыведения, в то время как более низкий pI/более низкий суммарный положительный заряд приводит к уменьшению удержания в тканях и более длительному периоду полувыведения (Boswell et al, Bioconjug Chem. 2010 Dec 15;21(12):2153-63).

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI меньше, чем мышинное антитело "Клон 47". В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI меньше, чем антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI не более 9,0, например, не более 8,5, не более 8,0 или не более 7,5. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI не более 8,9, 8,8, 8,7, 8,6, 8,5, 8,4, 8,3, 8,2 или 8,1. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI не более 7,9, 7,8 или 7,7.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI больше, чем мышинное антитело "Клон 47". В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI больше, чем антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI по меньшей мере 7,5, например, по меньшей мере 8,0, по меньшей мере 8,5 или по меньшей мере 9,0. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI по меньшей мере 7,5, 7,6, 7,7, 7,8, 7,9 или 8,0. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI по меньшей мере 7,6. В некоторых предпочтительных вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь pI по меньшей мере 7,63.

Стабильность антитела.

Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что процесс гуманизации может повышать стабильность гуманизированных антител, как определено по связыванию с IL13R α 2 после инкубации при 4°C или 45°C в течение 8 дней, согласно оценке ELISA (см. пример 2).

Таким образом, антитела по данному изобретению могут иметь улучшенные свойства стабильности по сравнению с негуманизированным антителом к IL13R α 2 или другими гуманизированными антителами к IL13R α 2. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела могут иметь улучшенные свойства стабильности по сравнению с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Подходящие средства для оценки свойств стабильности хорошо известны специалистам в данной области техники, например анализы теплового сдвига и температурной стабильности белка. В некоторых вариантах осуществления свойства стабильности гуманизированных антител по данному изобретению могут быть определены с помощью одного или более способов, описанных в примерах. В некоторых вариантах осуществления свойства стабильности гуманизированных антител по данному изобретению могут быть определены путем связывания с IL13R α 2 после инкубации при 4 или 45°C в течение 8 дней по оценке с помощью ELISA.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут демонстрировать снижение аффинности связывания с IL13R α 2 менее чем на 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 или 50% после инкубации при 45°C в течение 8 дней. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут демонстрировать менее чем 4-кратное снижение связывания, например, менее чем 3,5-кратное, менее чем 3-кратное, менее чем 2,5-кратное, менее чем 2-кратное или менее чем 1,5-кратное снижение аффинности связывания с L13R α 2 после инкубации при 45°C в течение 8 дней.

Активность уничтожения клеток/цитотоксичность.

В некоторых случаях гуманизированные антитела по данному изобретению и/или конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие гуманизированные антитела по данному изобретению, могут иметь высокую активность уничтожения клеток, например, как определено по значениям EC50.

В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированные антитела и/или конъюгаты антитело-лекарственное средство по данному изобретению могут иметь EC50 ниже, чем у мышинового антитела "Клон 47" или у конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего мышинового антитела "Клон 47". В некоторых вариантах осуществления изобретения гуманизированные антитела и/или конъюгаты антитело-лекарственное средство по данному изобретению могут иметь EC50 ниже, чем у антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1 и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела и/или конъюгаты антитело-лекарственное средство по данному изобретению могут иметь EC50, которая по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% ниже, чем у одного или более антител/конъюгатов, описанных выше. Подходящие средства для определения активности уничтожения клеток/цитотоксичности и значений EC50 хорошо известны специалистам в данной области техники. В некоторых вариантах их можно определить способами, описанными в примерах.

Ингибирование роста опухоли.

В некоторых случаях гуманизированные антитела по данному изобретению и/или конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие гуманизированные антитела по данному изобретению, могут останавливать или снижать скорость роста опухолей, экспрессирующих IL13R α 2.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут ингибировать рост опухоли по меньшей мере на 10% по сравнению с контрольной опухолью. То есть объем обработанной антителом опухоли составляет не более 90% от объема контрольной опухоли. Например, в некоторых вариантах осуществления антитела по данному изобретению могут ингибировать рост опухоли на по меньшей мере 20% по сравнению с контрольной опухолью, например, на по меньшей мере 30%, по меньшей мере 40%, по меньшей мере 50%, по меньшей мере 60%, по меньшей мере 70%, по меньшей мере 80% или по меньшей мере 90%.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующий опухоль эффект гуманизированных антител по данному изобретению может быть больше, чем у мышинового антитела "Клон 47" или конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего мышинового антитела "Клон 47". В некоторых вариантах осуществления ингибирующий опухоль эффект гуманизированных антител по данному изобретению может быть больше, чем у антитела или конъюгата антитело-лекарственное средство, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:2.

В некоторых вариантах осуществления ингибирующий опухоль эффект гуманизированных антител по данному изобретению может быть больше, чем эффект одного или более антител, описанных выше. В некоторых вариантах осуществления ингибирующий опухоль эффект гуманизированных антител по данному изобретению может быть по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% больше, чем у одного или более антител, описанных выше. Подходящие средства для определения влияния гуманизированных антител по данному изобретению на рост опухоли хорошо известны специалистам в данной области техники.

Иммуногенность антител.

Гуманизированные антитела по данному изобретению имеют пониженную иммуногенность у человека по сравнению с негуманизированным антителом той же специфичности (например, мышинового антитела-предшественника до гуманизации). В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь иммуногенность у человека ниже, чем имеет идентичное в

остальном антитело или фрагмент антитела, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2.

Низкая или сниженная иммуногенность может характеризоваться способностью лечить пациентов в течение продолжительных периодов с измеримым облегчением симптомов и низкой и/или приемлемой токсичностью. Низкая или приемлемая иммуногенность и/или высокая аффинность, а также другие подходящие свойства могут способствовать достижению терапевтических результатов. "Сниженная иммуногенность" определяется в данном документе как повышение существенного ответа НАНА, НАСА или НАМА на менее чем 90%, например на менее чем 80%, менее чем 70%, менее чем 60%, менее чем 50%, менее чем 40%, менее чем 30%, менее чем 20%, менее чем 10% от доли пациентов, у которых наблюдается существенный ответ НАНА, НАСА или НАМА при лечении антителами, описанными выше.

Получение антитела.

В настоящем изобретении также предложены способы и средства получения гуманизированных антител по данному изобретению.

Соответственно, в другом аспекте в изобретении предложены молекулы нуклеиновой кислоты, кодирующие гуманизированные антитела, наряду с молекулами нуклеиновой кислоты, которые комплементарны молекулам нуклеиновой кислоты, кодирующим гуманизированные антитела.

В еще одном аспекте в изобретении предложена фармацевтическая композиция, содержащая антитело по данному изобретению, необязательно дополнительно содержащая фармацевтически приемлемый носитель или вспомогательное вещество.

В еще одном аспекте в изобретении предложен вектор, например, вектор экспрессии, содержащий нуклеиновую кислоту по данному изобретению.

В еще одном аспекте в изобретении предложены клетки-хозяева, трансфицированные вектором по данному изобретению. Клетки-хозяева могут быть прокариотическими или эукариотическими. Например, клетки могут быть бактериальными, клетками грибов, клетками насекомых или клетками млекопитающих (например, мыши, примата или человека).

В еще одном аспекте в изобретении предложен способ получения антител путем культивирования клеток-хозяев по данному изобретению.

В некоторых случаях при экспрессии в клетке-хозяине по данному изобретению гуманизированные антитела по данному изобретению могут экспрессироваться на более высоком уровне или с более высокой продуктивностью или выходом по сравнению с негуманизированным антителом к IL13R α 2 или другим гуманизированными антителами к IL13R α 2.

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут экспрессироваться на более высоком уровне или с более высокой продуктивностью или выходом, чем антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут экспрессироваться на более высоком уровне или с более высокой продуктивностью или выходом, чем антитело, содержащее

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (VHA), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (VKAback);

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (VHAback), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (VKAback);

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (VHA1), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA);

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (VHA1), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (VKAback);

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (VHA1), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (VKA1);

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6 (VHA1), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (VKA2);

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (VHA2), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA);

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO:

7 (VHA2), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (VKAback);

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (VHA2), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (VKA1);

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7 (VHA2), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (VKA2);

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (VHA3), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA);

варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (VHA3), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9 (VKAback); и варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (VHA3), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (VKA1).

последовательность SEQ ID NO: 8 (VHA3), и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10 (VKA1).

В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут экспрессироваться на более высоком уровне или с более высокой продуктивностью или выходом, чем одно или более антител, описанных выше, при экспрессии в клетках-хозяевах того же типа и культивировании в тех же условиях. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии или продуктивности или выхода может быть по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% выше, чем у одного или более антител, описанных выше, при экспрессии в клетках-хозяевах того же типа и культивировании в тех же условиях. В некоторых вариантах осуществления уровень экспрессии или продуктивности или выхода может быть по меньшей мере на 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200% выше, чем у одного или более антител, описанных выше, при экспрессии в клетках-хозяевах того же типа и культивировании в тех же условиях. Подходящие средства для определения уровня экспрессии рекомбинантных белков хорошо известны специалисту в данной области техники, например, методики ELISA и вестерн-блоттинг. В некоторых вариантах уровень экспрессии/продуктивности/выхода можно определить способами, описанными в примерах.

В некоторых случаях при экспрессии в клетке-хозяине по данному изобретению гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь более низкий уровень агрегации или фрагментации по сравнению с негуманизированным антителом к IL13R α 2 или другими гуманизированными антителами к IL13R α 2. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь более низкий уровень агрегации или фрагментации, чем антитело, содержащее варибельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и варибельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2. В некоторых вариантах осуществления гуманизированные антитела по данному изобретению могут иметь более низкий уровень агрегации или фрагментации, чем негуманизированное антитело к IL13R α 2 или другие гуманизированные антитела к IL13R α 2, при экспрессии в клетках-хозяевах того же типа и культивировании в тех же условиях. В некоторых вариантах осуществления уровень агрегации или фрагментации может быть по меньшей мере на 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 или 100% ниже при экспрессии в клетках-хозяевах того же типа и культивировании в тех же условиях. В некоторых вариантах осуществления уровень агрегации или фрагментации может быть по меньшей мере на 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190 или 200% ниже при экспрессии в клетках-хозяевах того же типа и культивировании в тех же условиях. Подходящие средства для определения агрегации или фрагментации рекомбинантных белков хорошо известны специалистам в данной области техники, например, эксклюзионная хроматография (ЭХ). В некоторых вариантах осуществления уровень агрегации или фрагментации можно определить с помощью способов, описанных в примерах.

Определения.

Антитело.

Термин "антитело" используется в данном документе в самом широком смысле и, в частности, охватывает моноклональные антитела, поликлональные антитела, димеры, мультимеры, полиспецифические антитела (например, биспецифические антитела), интактные антитела и фрагменты антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность, например, способность связывать IL13R α 2. Антитела могут быть мышиными, человеческими, гуманизированными, гибридными или произошедшими из других видов. Антитело представляет собой белок, продуцируемый клетками иммунной системы, способный распознавать и связываться со специфическим антигеном. (Janeway, C., Travers, P., Walport, M., Shlomchik (2001) *Immuno Biology*, 5th Ed., Garland Publishing, New York). Антиген-мишень в целом имеет многочисленные сайты связывания, также называемые эпитопами, которые распознают участки CDR множества антител. Каждое антитело, которое специфически связывается с отдельным эпитопом, имеет отличную структуру. Таким образом, один антиген может иметь более одного соответст-

вующего ему антитела. Антитело включает полноразмерную молекулу иммуноглобулина или иммунологически активную часть полноразмерной молекулы иммуноглобулина, т.е., молекулу, которая содержит антиген-связывающий сайт, иммуноспецифически связывающийся с антигеном интересующей мишени или его частью, при этом указанные мишени включают, но не ограничиваются ими, раковые клетки или клетки, которые продуцируют аутоиммунные антитела, ассоциированные с аутоиммунным заболеванием.

Иммуноглобулин может относиться к любому типу (например, IgG, IgE, IgM, IgD и IgA), классу (например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 и IgA2) или подклассу или аллотипу (например, человеческим G1m1, G1m2, G1m3, non-G1m1 [то есть любой аллотип, отличный от G1m1], G1m17, G2m23, G3m21, G3m28, G3m11, G3m5, G3m13, G3m14, G3m10, G3m15, G3m16, G3m6, G3m24, G3m26, G3m27, A2m1, A2m2, Km1, Km2 и Km3) молекул иммуноглобулинов. Иммуноглобулины могут происходить от любого вида, включая человеческое, мышинное или кроличье происхождение.

"Фрагменты антител" включают часть полноразмерного антитела, обычно его антигенсвязывающую или вариабельную область. Примеры фрагментов антител включают фрагменты Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv; диатела; линейные антитела; фрагменты, полученные из Fab-экспрессионной библиотеки, антиидиотипические (анти-Id) антитела, CDR (определяющая комплементарность область) и связывающиеся с эпитопом фрагменты любого из указанных выше фрагментов, которые иммуноспецифично связываются с антигенами раковых клеток, вирусными антигенами или микробными антигенами, молекулы одноцепочечных антител; и мультиспецифические антитела, образованные из фрагментов антител.

Используемый в данном документе термин "моноклональное антитело" относится к антителу, полученному из популяции по существу гомогенных антител, т.е. отдельные антитела, составляющие популяцию, являются идентичными, за исключением возможных встречающихся в природе мутаций, которые могут присутствовать в незначительных количествах. Моноклональные антитела являются высокоспецифичными, при этом они направлены против одного антигенного сайта. Более того, в отличие от составов поликлональных антител, которые содержат различные антитела, направленные против различных детерминант (эпитопов), каждое моноклональное антитело направлено против одной детерминанты на антигене. Помимо их специфичности преимуществом моноклональных антител является также в возможности их синтеза без загрязнения другими антителами. Определение "моноклональное" указывает на характер антитела, полученного из, по существу, однородной популяции антител, и не должно быть истолковано как требующее получения антитела каким-либо конкретным способом. Например, моноклональные антитела для применения в соответствии с данным изобретением могут быть получены с помощью гибридомных способов, впервые описанных в источнике Kohler et al (1975) Nature 256:495, или могут быть получены с помощью способов рекомбинации ДНК (см., US 4816567). Моноклональные антитела также могут быть выделены из библиотек фаговых антител с использованием способов, описанных в Clackson et al. (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al. (1991) J. Mol. Biol., 222:581-597, или от трансгенных мышей, несущих полностью человеческую иммуноглобулиновую систему (Lonberg (2008) Curr. Opinion 20(4):450-459).

Моноклональные антитела включают "химерные" антитела, в которых часть тяжелой и/или легкой цепи идентична или гомологична соответствующим последовательностям в антителах, полученных из определенных видов или принадлежащих определенному классу или подклассу антител, тогда как остальная часть цепи (цепей) является идентичной или гомологичной соответствующим последовательностям антител, произошедших из другого вида или принадлежащих другому классу или подклассу антител, а также фрагментам таких антител, при условии, что они проявляют желаемую биологическую активность (US 4816567; и Morrison et al (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855). Химерные антитела включают "приматизированные" антитела, содержащие вариабельные доменные антигенсвязывающие последовательности, произошедшие из последовательностей константной области примата, не представляющего собой человека (например, мартышковых или человекообразных обезьян), и человека.

"Интактное антитело" в данном документе представляет собой антитело, содержащее домены VL и VH, а также константный домен легкой цепи (CL) и константные домены тяжелой цепи, CH1, CH2 и CH3. Константные домены могут представлять собой константные домены нативных последовательностей (например, константные домены нативной последовательности человека) или вариантных аминокислотных последовательностей. Интактное антитело может иметь одну или более "эффекторных функций", которые относятся к биологическим активностям, свойственным Fc-области (нативной последовательности Fc-области или вариантной аминокислотной последовательностью Fc области) антитела. Примеры эффекторных функций антител включают C1q-связывание; зависимость от компонента цитотоксичность; Fc-рецепторное связывание; антитело-зависимая опосредованная клетками цитотоксичность (ADCC); фагоцитоз и отрицательная регуляция рецепторов клеточной поверхности, таких как B-клеточный рецептор и BCR.

В зависимости от аминокислотной последовательности константного домена их тяжелых цепей интактные антитела можно отнести к разным "классам". Существует пять основных классов интактных антител: IgA, IgD, IgE, IgG и IgM, и некоторые из указанных классов могут быть дополнительно разделе-

ны на "подклассы" (изотипы), например, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA и IgA2. Константные домены тяжелой цепи, которые соответствуют различным классам антител, называются α , δ , ϵ , γ и μ , соответственно. Субъединичная структура и трехмерные конфигурации различных классов иммуноглобулинов хорошо известны.

Гуманизированный.

В контексте данного документа термин "гуманизированные" антитела включает любую комбинацию описанных в данном документе антител к IL13R α 2. В этих антителах остатки каркасных областей химерных антител MSAb-1 и X09.2 были в значительной степени заменены соответствующими остатками иммуноглобулинов человека. Максимально возможное количество человеческих аминокислотных остатков сохраняется, но критические человеческие остатки могут быть модифицированы по мере необходимости для поддержания антигенсвязывающего сайта, образованного CDR, и воспроизведения антигенсвязывающей активности химерных антител. Такие изменения или вариации необязательно и предпочтительно сохраняют или снижают иммуногенность у людей или других видов приматов по сравнению с немодифицированными антителами.

"Гуманизированное антитело" относится к полипептиду, содержащему по меньшей мере часть модифицированной варибельной области антитела человека, при этом часть варибельной области, предпочтительно часть, существенно меньшая, чем интактный варибельный домен человека, заменена соответствующей последовательностью от не относящихся к человеку видов, и при этом модифицированная варибельная область связана по меньшей мере с другой частью другого белка, предпочтительно с константной областью антитела человека. Выражение "гуманизированные антитела" включает человеческие антитела, в которых один или более аминокислотных остатков определяющей комплементарности области ("CDR") и/или один или более аминокислотных остатков каркасной области ("FW" или "FR") заменены остатками аминокислот из аналогичных сайтов в антителах грызунов или других нечеловеческих антител. Выражение "гуманизированное антитело" также включает вариантную аминокислотную последовательность иммуноглобулина или его фрагмент, который включает FR, имеющий по существу аминокислотную последовательность человеческого иммуноглобулина, и CDR, имеющий по существу аминокислотную последовательность нечеловеческого иммуноглобулина.

"Гуманизированные" формы нечеловеческих (например, мышинных) антител представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческого иммуноглобулина. Или, если посмотреть с другой стороны, гуманизированное антитело представляет собой человеческое антитело, которое также содержит выбранные последовательности нечеловеческих (например, мышинных) антител вместо человеческих последовательностей. Гуманизированное антитело может включать консервативные аминокислотные замены или неприродные остатки одного и того же или разных видов, которые существенно не изменяют его связывание и/или биологическую активность. Такие антитела представляют собой химерные антитела, которые содержат минимальную последовательность, полученную из нечеловеческих иммуноглобулинов.

Существует ряд методов гуманизации, в том числе "прививка CDR", "управляемый отбор", "деиммунизация", "восстановление поверхности" (также известное как "венирование"), "составные антитела", "оптимизация содержания участков последовательности человека" и перетасовка каркаса.

Прививка CDR.

В этом способе гуманизированные антитела представляют собой иммуноглобулины человека (реципиентные антитела), в которых остатки из определяющей комплементарности области (CDR) реципиентного антитела заменены остатками из CDR нечеловеческого вида (донорское антитело), такого как мышь, крыса, верблюд, бык, коза или кролик, обладающие желаемыми свойствами (фактически, нечеловеческие CDR "прививаются" к человеческому каркасу). В некоторых случаях остатки каркасной области (FR) иммуноглобулина человека заменяются соответствующими остатками нечеловеческого происхождения (это может произойти, когда, например, конкретный остаток FR оказывает значительное влияние на связывание антигена).

Кроме того, гуманизированные антитела могут содержать остатки, которых нет ни в антителе-реципиенте, ни в импортированных последовательностях CDR или каркасной области. Эти модификации выполнены для дальнейшего уточнения и максимального повышения эффективности антител. Таким образом, в общем, гуманизированное антитело будет включать все по меньшей мере один и в одном аспекте два варибельных домена, в которых все или все гиперварибельные петли соответствуют петлям иммуноглобулина, не относящегося к человеку, и все или практически все FR области представляют собой участки последовательности иммуноглобулина человека. Гуманизированное антитело необязательно также может содержать по меньшей мере часть константной области иммуноглобулина (Fc) или иммуноглобулина человека.

Управляемый отбор.

Способ состоит из комбинирования домена V_H или V_L данного нечеловеческого антитела, специфичного к конкретному эпитопу, с библиотекой V_H или V_L человека, и специфические V-домены человека отбираются против интересующего антигена. Затем эту выбранную V_H человека объединяют с биб-

лиотекой V_L для создания комбинации полностью $VHxVL$ человека. Способ описан в Nature Biotechnology (N.Y.) 12, (1994) 899-903.

Составные антитела.

В этом способе два или более сегментов аминокислотной последовательности антитела человека объединяются в конечной молекуле антитела. Их конструируют путем комбинирования нескольких сегментов последовательности VH и VL человека в комбинациях, которые ограничивают или избегают эпителиев Т-клеток человека в V -областях конечного составного антитела. При необходимости, Т-клеточные эпитопы ограничиваются или избегаются путем замены сегментов V -области, вносящих вклад в Т-клеточный эпитоп или кодирующих их, на альтернативные сегменты, которые избегают Т-клеточных эпитопов. Этот метод описан в US 2008/0206239 A1.

Деимунизация.

Этот способ включает удаление эпитопов Т-клеток человека (или другого второго вида) из V -областей терапевтического антитела (или другой молекулы). Последовательность V -области терапевтических антител анализируется на наличие мотивов связывания МНС класса II, например, путем сравнения с базами данных мотивов связывания МНС (такими как база данных "фрагментов", размещенная на сайте www.who.edu.au). В качестве альтернативы мотивы связывания МНС класса II могут быть идентифицированы с использованием вычислительных потоковых методов, таких как методы, разработанные Altuvia et al. (J. Mol. Biol. 249 244-250 (1995)); в этих методах последовательные перекрывающиеся пептиды из последовательностей V -области проверяют на их энергию связывания с белками МНС класса II. Затем эти данные могут быть объединены с информацией о других характеристиках последовательностей, которые относятся к успешно представленным пептидам, таким как амфипатичность, мотивы Ротбарда и сайты расщепления для катепсина В и других процессинговых ферментов.

Как только потенциальные эпитопы Т-клеток второго вида (например, человека) идентифицированы, они удаляются путем изменения одной или более аминокислот. Модифицированные аминокислоты обычно находятся внутри самого Т-клеточного эпитопа, но также могут примыкать к эпитопу с точки зрения первичной или вторичной структуры белка (и, следовательно, могут не быть смежными в первичной структуре). Чаще всего изменение происходит путем замены, но в некоторых случаях более подходящим будет добавление или удаление аминокислот.

Все изменения могут быть выполнены с помощью технологии рекомбинантной ДНК, так что конечная молекула может быть получена путем экспрессии из рекомбинантного хозяина с использованием хорошо известных методов, таких как сайт-направленный мутагенез. Однако также возможно использование химии белков или любых других средств молекулярного изменения.

Восстановление поверхности.

Этот способ включает:

(а) определение конформационной структуры варибельной области нечеловеческого антитела (например, грызуна) (или его фрагмента) путем конструирования трехмерной модели варибельной области нечеловеческого антитела;

(b) генерацию выравнивания последовательностей с использованием распределений относительной доступности из рентгеноструктурных кристаллографических структур достаточного количества тяжелых и легких цепей варибельных областей нечеловеческих и антител человека, чтобы получить набор положений каркаса тяжелой и легкой цепей, в которых положения выравнивания идентичны в 98% достаточного количества тяжелых и легких цепей нечеловеческих антител;

(c) определение для гуманизованного нечеловеческого антитела набора аминокислотных остатков, экспонируемых на поверхности тяжелой и легкой цепей, с использованием набора положений каркаса, созданного на стадии (b);

(d) идентификацию из аминокислотных последовательностей антитела человека набора аминокислотных остатков, экспонируемых на поверхности тяжелой и легкой цепей, который наиболее близко идентичен набору экспонированных на поверхности аминокислотных остатков, определенных на этапе (c), где тяжелая и легкая цепи из человеческие антитела являются или не спарены естественным образом;

(e) замену в аминокислотной последовательности нечеловеческого антитела, подлежащего гуманизации, набора аминокислотных остатков, экспонируемых на поверхности тяжелой и легкой цепей, определенных на этапе (c), на набор остатков аминокислот, экспонируемых на поверхности тяжелой и легкой цепи, идентифицированные на стадии (d);

(f) построение трехмерной модели варибельной области нечеловеческого антитела, полученной в результате замены, указанной на этапе (e);

(g) идентификацию путем сравнения трехмерных моделей, построенных на этапах (a) и (f), любых аминокислотных остатков из наборов, идентифицированных на этапах (c) или (d), которые находятся в пределах 5 ангстрем от любого атома любой остаток определяющих комплементарность областей нечеловеческого антитела, подлежащего гуманизации; и

(h) замену любых остатков, идентифицированных на стадии (g), с человеческих остатков на исходные нечеловеческие аминокислотные остатки, чтобы таким образом определить нечеловеческий антител гуманизирующий набор экспонированных на поверхности аминокислотных остатков; при условии, что

этап (а) не обязательно должен выполняться первым, а должен выполняться до этапа (g).

Супергуманизация.

В методе сравнивают нечеловеческую последовательность с функциональным спектром генов зародышевой линии человека. Выбирают гены человека, кодирующие канонические структуры, идентичные или тесно связанные с последовательностями, не относящимися к человеку. Те отобранные гены человека с наивысшей гомологией в пределах CDR выбирают в качестве доноров FR. Наконец, нечеловеческие CDR прививаются к этим FR человека. Этот метод описан в патенте WO 2005/079479 A2.

Оптимизация содержания участков последовательности человека.

Этот метод сравнивает нечеловеческую (например, мышиную) последовательность со спектром генов зародышевой линии человека, и различия оцениваются как содержание участков последовательности человека (HSC), которое количественно определяет последовательность на уровне потенциальных эпителиальных МНС/Т-клеток. Затем последовательность-мишень гуманизируется путем максимизации ее HSC вместо использования общей меры идентичности для создания множества разнообразных гуманизованных вариантов (описано в Molecular Immunology, 44, (2007) 1986-1998).

Перетасовка каркаса.

CDR нечеловеческого антитела сливаются в рамке считывания с пулами кДНК, охватывающими все известные каркасные области тяжелых и легких цепей генов зародышевой линии человека. Затем гуманизованные антитела отбирают, например, панорамирование отображаемой фагом библиотеки антител. Это описано в Methods 36, 43-60 (2005).

Модификации последовательности.

Последовательности переменных областей тяжелой цепи и/или переменной области легкой цепи антитела, описанные в данном документе, могут быть модифицированы путем замены, вставки или делеции. Аминокислотные последовательности, которые по существу совпадают с последовательностями, описанными в данном документе, включают в себя последовательности, содержащие консервативные аминокислотные замены, а также аминокислотные делеции и/или вставки. Консервативная аминокислотная замена относится к замене первой аминокислоты второй аминокислотой, которая имеет химические и/или физические свойства (например, заряд, структуру, полярность, гидрофобность/гидрофильность), которые аналогичны таковым у первой аминокислоты. Предпочтительными консервативными заменами являются те, в которых одна аминокислота заменена на другую в группах аминокислот, указанных в данном документе ниже.

Аминокислоты с полярными боковыми цепями (Asp, Glu, Lys, Arg, His, Asn, Gln, Ser, Thr, Tyr и Cys)

Аминокислоты с неполярными боковыми цепями (Gly, Ala, Val, Leu, Ile, Phe, Trp, Pro и Met).

Аминокислоты с алифатическими боковыми цепями (Gly, Ala, Val, Leu, Ile).

Аминокислоты с циклическими боковыми цепями (Phe, Tyr, Trp, His, Pro).

Аминокислоты с ароматическими боковыми цепями (Phe, Tyr, Trp).

Аминокислоты с кислыми боковыми цепями (Asp, Glu).

Аминокислоты с основными боковыми цепями (Lys, Arg, His).

Аминокислоты с амидными боковыми цепями (Asn, Gln).

Аминокислоты с гидроксильными боковыми цепями (Ser, Thr).

Аминокислоты с серосодержащими боковыми цепями (Cys, Met).

Нейтральные, слабо гидрофобные аминокислоты (Pro, Ala, Gly, Ser, Thr).

Гидрофильные, кислые аминокислоты (Gln, Asn, Glu, Asp).

Гидрофобные аминокислоты (Leu, Ile, Val).

Особенно предпочтительными группы консервативных аминокислотных замен являются: Val-Leu-Ile, Phe-Tyr, Lys-Arg, Ala-Val и Asn-Gln.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность с 80% или более идентичности аминокислотной последовательности (например, примерно 85% или более, 86% или более, 87% или более, 88% или более, 89% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более идентичности последовательности) с тяжелой цепью, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность с 80% или более идентичности аминокислотной последовательности (например, примерно 85% или более, 86% или более, 87% или более, 88% или более, 89% или более, 90% или более, 91% или более, 92% или более, 93% или более, 94% или более, 95% или более, 96% или более, 97% или более, 98% или более, 99% или более идентичности последовательности) с легкой цепью, описанной в данном документе.

В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать тяжелую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности тяжелой цепи, описанной в данном документе, за исключением того, что она включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот (например, замены, вставки и/или делеции) относительно

но аминокислотной последовательности тяжелой цепи, описанной в данном документе. В некоторых вариантах осуществления антитела по настоящему изобретению могут содержать легкую цепь, имеющую аминокислотную последовательность, идентичную аминокислотной последовательности легкой цепи, описанной в данном документе, за исключением того, что она включает 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 или 10 модификаций аминокислот (например, замены, вставки и/или делеции) относительно аминокислотной последовательности легкой цепи, описанной в данном документе.

Получение антитела.

Гуманизированные антитела, фрагменты и области могут быть получены путем клонирования сегментов ДНК, кодирующих антигенсвязывающие области Н- и L-цепей антитела к $\text{IL13R}\alpha 2$, и присоединения этих сегментов ДНК к сегментам ДНК, включая области СН и СL, соответственно, для получения генов, кодирующие полноразмерные иммуноглобулины.

Для молекул полноразмерных антител к ДНК иммуноглобулина можно получить из мРНК линий клеток гибридомы. Тяжелые и легкие цепи антитела клонируют в систему вектора экспрессии млекопитающего. Сборка регистрируется с помощью анализа последовательности ДНК. Конструкция антитела может быть экспрессирована в линиях клеток-хозяев человека или других млекопитающих. Конструкция может быть проверена анализами транскрипционной трансфекции и иммуноанализом экспрессированного антитела. Стабильные линии клеток с наивысшей продуктивностью могут быть выделены и подвергнуты скринингу с использованием экспресс-методов анализа.

Способы лечения.

Антитела и конъюгаты по настоящему изобретению могут быть использованы в способе терапии. Также предложен способ лечения, включающий введение субъекту, нуждающемуся в лечении, терапевтически эффективного количества антитела или соединения-конъюгата по изобретению. Термин "терапевтически эффективное количество" означает количество, достаточное для того, чтобы продемонстрировать пользу у пациента. Такая польза может заключаться по меньшей мере в облегчении по меньшей мере одного симптома. Фактическое вводимое количество, а также скорость и продолжительность введения будут зависеть от природы и тяжести того, что подвергают лечению. Назначение лечения, например, принятие решения о дозировке, входит в компетенцию терапевтов и других врачей.

Антитела и конъюгаты по данному изобретению можно вводить отдельно или в комбинации с другими видами лечения одновременно или последовательно в зависимости от патологического состояния, подлежащего лечению. Примеры лечения и терапии включают, но не ограничиваются ими, химиотерапию (введение активных агентов, включая, например, лекарственные средства, такие как химиотерапевтические средства); операцию; и лучевую терапию.

"Химиотерапевтический агент" представляет собой химическое соединение, используемое при лечении рака, независимо от механизма действия. Классы химиотерапевтических агентов включают, но не ограничиваются ими: алкилирующие агенты, антиметаболиты, растительные алкалоиды веретенового яда, цитотоксические/противоопухолевые антибиотики, ингибиторы топоизомеразы, антитела, фотосенсибилизаторы и ингибиторы киназ. Химиотерапевтические агенты включают соединения, используемые в "целевой терапии" и обычной химиотерапии.

Примеры химиотерапевтических агентов включают: эрлотиниб (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), доцетаксел (TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (фторурацил, 5-фторурацил, CAS № 51-21-8), гемцитабин (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS № 391210-10-9, Pfizer), цисплатин (цис-диамин, дихлороплатина(II), CAS № 15663-27-1), карбоплатин (CAS № 41575-94-4), паклитаксел (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Принстон, Нью-Джерси), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), темозоломид (4-метил-5-оксо-2,3,4,6,8-пентазабицикло[4.3.0]нона-2,7,9-триен-9-карбоксамида, № CAS 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), тамоксифен ((Z)-2-[4-(1,2-дифенилбут-1-енил)фенокси]-N,N-диметилэтанамин, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®) и доксорубин (ADRIAMYCIN®), Акти-1/2, HPPD и рапамицин.

Другие примеры химиотерапевтических агентов включают: оксалиплатин (ELOXATIN®, Sanofi), бортезомиб (VELCADE®, Millennium Pharm.), Sunitinib (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), летрозол (FEMARA®, Novartis), мезилат иматиниба (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (ингибитор Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (ингибитор Mek, AZD6244, Array BioPharma, AstraZeneca), SF-1126 (ингибитор PI3K, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (ингибитор PI3K, Novartis), XL-147 (ингибитор PI3K, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), фулвестрант (FASLODEX®, AstraZeneca), лейковорин (фолиновая кислота), рапамицин (сиролимус, RAPAMUNE®, Wyeth), лапатиниб® (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), лонафарниб (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), сорафениб (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), гефитиниб (IRESSA®, AstraZeneca), иринотекан (CAMPTOSAR®, CPT-11 Pfizer), типифарниб (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (без кремофора), составы паклитаксела в виде наночастиц, созданных на основе альбумина (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, IL), вандетаниб (tINN, ZD6474, ZACTEVIA®, AstraZeneca), хлоранмбуцил, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), тем-сиролимус (TORISEL®, Wyeth), пазопаниб (GlaxoSmithKline), канфосфамид (TELCYTA®, Telik), тиоте-

па и циклофосфамид (CYTOXAN®, NEOSAR®); алкилсульфонаты, такие как бусульфан, импросульфан и пипосульфан; азиридины, такие как бензодопа, карбохон, метуредопа и уредопа; этиленимины и метиламеламины, включая альтретамин, триэтиленмеламин, триэтиленфосфорамида, триэтилентиофосфорамида и триметилмеламин; ацетогенины (особенно буллатацин и буллатацинон); камптотецин (включая синтетический аналог топотекан); бриостатин; каллистатин; CC-1065 (включая его синтетические аналоги адозелезин, карзелезин и бизелезин); криптофицины (особенно криптофицин 1 и криптофицин 8); доластатин; дуокармицин (включая синтетические аналоги KW-2189 и CB1-TM1); элеутеробин; панкреатистатин; саркодиктин; спонгистатин; азотистые иприты, такие как хлорамбуцил, хлорнафазин, хлорфосфамид, эстрамустин, ифосфамид, мехлорэтамин, гидрохлорид оксида мехлорэтамина, мелфалан, новембихин, фенестерин, преднимустин, трофосфамид, урациловый иприт; нитрозомочевины, такие как кармустин, хлорозотоцин, фотемустин, ломустин, нимустин и ранимнустин; антибиотики, такие как эндиновые антибиотики (например, калихеамицин, калихеамицин гамма II, калихеамицин омега I (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); динемидин, динемидин А; бисфосфонаты, такие как клодронат; эсперамицин; а также хромофор неокарзиностатина и родственные хромопротеиновые эндиновые антибиотические хромофоры), аклациномицины, актиномицин, аутрамицин, азасерин, блеомицины, кантиномицин, карабицин, карминомицин, карзинофилин, хромомицины, дактиномицин, даунорубицин, деторубицин, 6-диазо-5-оксо-L-норлейцин, морфолинодоксорубицин, цианоморфолинодоксорубицин, 2-пирролинодоксорубицин и дезоксидоксорубицин), эпирубицин, эсорубицин, идарубицин, неморубицин, марцелломицин, митомицины, такие как митомицин С, микофеноловая кислота, ногаламицин, оливомицины, пепломицин, порфирамицин, пуромицин, келамицин, родорубицин, стрептонигрин, стрептозоцин, туберцидин, убенимекс, зиностатин, зорубицин; антиметаболиты, такие как метотрексат и 5-фторурацил (5-FU); аналоги фолиевой кислоты, такие как деноптерин, метотрексат, птероптерин, триметотрексат; аналоги пурина, такие как флударабин, 6-меркаптопурин, тиамиприн, тиогуанин; аналоги пиримидина, такие как анцитабин, азациитидин, 6-азауридин, кармофур, цитарабин, дидезоксиуридин, доксифлуридин, эноцитабин, флоксуридин; андрогены, такие как калустерон, дромостанолон пропионат, эпитиостанол, мепитиостан, тестолактон; средства, угнетающие функции надпочечников, такие как аминоклутетимид, митотан, трилостан; наполнитель фолиевой кислоты, такой как фролиновая кислота; ацеглатон; гликозид альдофосфамида; аминоклевулиновая кислота; энилурацил; амсакрин; бестрабуцил; бисантрен; эдтраксат; дефофамин; демеколцин; диазиквон; эльфортин; эллиптиния ацетат; эпотилон; этоглуцид; нитрат галлия; гидроксимочевина; лентинан; лонидаинин; майтанзиноиды, такие как майтанзин и ансамитоцины; митогуазон; митоксантрон; мопиданмол; нитраерин; пентостатин; фенамет; пирарубицин; лозоксантрон; подофиллиновая кислота; 2-этилгидразид; прокарбазин; PSK® полисахаридный комплекс (JHS Natural Products, Юджин, Орегон); азоксан; ризоксин; сизофиран; спирогерманий; тенуазоновая кислота; триазиквон; 2,2',2"-трихлортриэтиламин; трихотечены (особенно токсин Т-2, верракурин А, роридин А и ангидин); уретан; виндезин; дакарбазин; манномустин; митобронитол; митолактол; пипоброман; гацитозин; арабинозид ("Ага-С"); циклофосфамид; тиотепа; 6-тиогуанин; меркаптопурин; метотрексат; аналоги на основе платины, такие как цисплатин и карбоплатин; винбластин; этопозид (VP-16); ифосфамид; митоксантрон; винкристин; винорелбин (NAVELBINE®); новантрон; тенипозид; эдтраксат; дауномицин; аминоклутетимид; капецитабин (XELODA®, Roche); ибандронат; CPT-11; ингибитор топоизомеразы RFS 2000; дифторметилорнитин (DMFO); ретиноиды, такие как ретиноевая кислота; и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеперечисленных.

В определение "химиотерапевтического агента" также включены: (i) антигормональные агенты, которые регулируют или ингибируют действие гормонов на опухоли, такие как антиэстрогены и селективные модуляторы рецепторов эстрогена (SERM), включая, например, тамоксифен (включая NOLVADEX®; цитрат тамоксифена), ралоксифен, дролоксифен, 4-гидрокситамоксифен, триоксифен, кеоксифен, LY117018, онапристон и FARESTON® (цитрат торемифина); (ii) ингибиторы ароматазы, которые ингибируют фермент ароматазу, который регулирует выработку эстрогена в надпочечниках, такие как, например, 4(5)-имидазолы, аминоклутетимид, MEGASE® (мегестрола ацетат), AROMASIN® (экземестан; Pfizer), форместание, фадрозол, RIVISOR® (ворозол), FEMARA® (летрозол; Novart представляет собой) и ARIMIDEX® (анастрозол; AstraZeneca); (iii) антиандрогены, такие как флутамид, нилутамид, бикалутамид, лейпролид и гозерелин; и троксацитабин (1,3-диоксолановый нуклеозидный цитозинный аналог); (iv) ингибиторы протеинкиназы, такие как ингибиторы MEK (WO 2007/044515); (v) ингибиторы липидкиназы; (vi) антисмысловые олигонуклеотиды, особенно те, которые ингибируют экспрессию генов в сигнальных путях, участвующих в aberrантной пролиферации клеток, например PKC-альфа, Raf и H-Ras, такие как облимержен (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) рибозимы, такие как ингибиторы экспрессии VEGF (например, ANGIOZYME®) и ингибиторы экспрессии HER2; (viii) вакцины, такие как вакцины для генной терапии, например ALLOVECTIN®, LEUVECTIN® и VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; ингибиторы топоизомеразы 1, такие как LURTOTECAN®; ABARELIX® gmRH; (ix) антиангиогенные средства, такие как бевацизумаб (AVASTEST®, Genentech); и фармацевтически приемлемые соли, кислоты и производные любого из вышеперечисленных.

Также в определение "химиотерапевтического агента" входят терапевтические антитела, такие как

алемтузумаб (Campath), бевацизумаб (AVASTEST®, Genentech); цетуксимаб (ERBITUX®, Imclone); панитумумаб (VECTIBK®, Amgen), ритуксимаб (RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), офатумумаб (ARZERRA®, GSK), пертузумаб (PERJETA™, OMNITARG™, 2C4, Genentech), трастузумаб (HERCEPTIN®, Genentech), тозитумомаб (Bexxar, Corixia) и конъюгат антитела с лекарственным средством, гемтузумаб озогамидин (MYLOTARG®, Wyeth).

Гуманизированные моноклональные антитела с терапевтическим потенциалом включают: алемтузумаб, аполизумаб, азелизумаб, атлизумаб, бапинеузумаб, бевацизумаб, биватузумаб мертанзин, кантузумаб мертанзин, седелизумаб, цертолизумаб пегол, цидфузитузумаб, цидтузумаб, даклизумаб, экулизумаб, эфализумаб, эпратузумаб, эрлизумаб, фельвизумаб, фонтолизумаб, гемтузумаб озогамидин, ипотимузумаб озогамидин, ипилимумаб, лабетузумаб, линтузумаб, матузумаб, меполизумаб, мотавизумаб, мотовизумаб, натализумаб, нимотузумаб, ноловизумаб, нумавизумаб, окрелизумаб, омализумаб, паливизумаб, пасколизумаб, пекфузитузумаб, пектузумаб, пертузумаб, пекселизумаб, раливизумаб, ранибизумаб, ресливизумаб, реслизумаб, резивизумаб, ровелизумаб, руплизумаб, сибротузумаб, сиплизумаб, сонтузумаб, такатузумаб, тетракетан, тадоцизумаб, тализумаб, тефибазумаб, тоцилизумаб, торализумаб, трастузумаб, тукотузумаб, целмолейкин, тукуситузумаб, умавизумаб, уртоксазумаб и визилизумаб.

Фармацевтические композиции в соответствии с настоящим изобретением и для применения в соответствии с настоящим изобретением могут содержать в дополнение к активному ингредиенту, т.е. антителу или соединению-конъюгату по данному изобретению, фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество, носитель, буфер, стабилизатор или другие материалы, хорошо известные специалистам в данной области техники. Такие материалы должны быть нетоксичными и не должны влиять на эффективность активного ингредиента. Точная природа носителя или другого материала будет зависеть от пути введения, который может быть пероральным или инъекционным, например, кожным, подкожным или внутривенным.

Фармацевтические композиции для перорального введения могут быть в форме таблеток, капсул, порошка или жидкости. Таблетка может содержать твердый носитель или адъювант. Жидкие фармацевтические композиции обычно содержат жидкий носитель, такой как вода, нефтепродукт, животные или растительные масла, минеральное масло или синтетическое масло. Могут быть включены физиологический солевой раствор, раствор декстрозы или другого сахара или гликоли, такие как этиленгликоль, пропиленгликоль или полиэтиленгликоль. Капсула может содержать твердый носитель, такой как желатин.

Для внутривенной, кожной или подкожной инъекции или инъекции в место поражения активный ингредиент будет в форме парентерально приемлемого водного раствора, не содержащего пирогенов и имеющего подходящие рН, изотоничность и стабильность. Специалисты в данной области техники хорошо способны приготовить подходящие растворы с использованием, например, изотонических носителей, таких как раствор хлорида натрия для инъекций, раствор Рингера для инъекций, раствор лактата Рингера для инъекций. При необходимости могут быть включены консерванты, стабилизаторы, буферы, антиоксиданты и/или другие добавки.

Термин "лечение", используемый в данном документе в контексте лечения патологического состояния, обычно относится к лечению и терапии, будь то человека или животного (например, в ветеринарии), при которых достигается некоторый желаемый терапевтический эффект, например торможение прогрессирования патологического состояния и включает снижение скорости прогрессирования, остановку скорости прогрессирования, регресс патологического состояния, улучшение патологического состояния и излечение патологического состояния. Также включено лечение в качестве профилактической меры (например, профилактика, предотвращение).

Термин "терапевтически эффективное количество", как он, как он используется в данном документе, относится к тому количеству активного соединения или материала, композиции или дозировки, включающей активное соединение, которое эффективно для получения некоторого желаемого терапевтического эффекта, соизмеримого с разумным соотношением польза/риск при введении в соответствии с желаемой схемой введения.

Аналогично, термин "профилактически эффективное количество" относится к тому количеству активного соединения или материала, композиции или дозы, включающей активное соединение, которое эффективно для получения некоторого желаемого профилактического эффекта, соразмерного с разумным соотношением польза/риск при введении в соответствии с желаемой схемой лечения.

Применение.

Антитела по данному изобретению могут быть использованы для нацеливания на целевую область. Целевой областью предпочтительно может быть популяция пролиферативных клеток.

Антитела по данному изобретению представляют собой антитела к антигену, присутствующему в популяции пролиферативных клеток. В некоторых вариантах осуществления антиген отсутствует или присутствует на пониженном уровне в популяции непролиферативных клеток по сравнению с количеством антигена, присутствующим в популяции пролиферативных клеток, например, в популяции опухолевых клеток.

Целевое место может быть *in vitro*, *in vivo* или *ex vivo*.

Антитела по данному изобретению включают антитела, имеющие противораковую активность. Таким образом, в настоящем изобретении предложено гуманизированное антитело, как описано в данном документе, для применения в терапии. В настоящем изобретении также предложено гуманизированное антитело, как описано в данном документе, для применения при лечении пролиферативного заболевания. Аналогично, в настоящем изобретении предложено применение гуманизированного антитела, как описано в данном документе, в производстве лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания.

В изобретении также представлены конъюгаты антитело-лекарственное средство, содержащие гуманизированное антитело, как описано в данном документе, конъюгированное с лекарственным компонентом. Такие конъюгаты включают конъюгаты, имеющие противораковую активность. В частности, конъюгаты по данному изобретению включают антитело, конъюгированное, т.е. ковалентно присоединенное с помощью линкера, к лекарственному компоненту, который может представлять собой токсин. Когда лекарственное средство не конъюгировано с антителом, лекарственное средство оказывает цитотоксический эффект. Таким образом, биологическая активность лекарственного компонента модулируется путем конъюгации с антителом. Конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) по данному описанию могут избирательно доставлять эффективную дозу цитотоксического агента в опухолевую ткань, за счет чего может быть достигнута более высокая селективность, т.е. более низкая эффективная доза.

Таким образом, в настоящем изобретении предложено соединение-конъюгат, как описано в данном документе, для применения в терапии. В настоящем описании также предложено соединение-конъюгат, как описано в данном документе, для применения при лечении пролиферативного заболевания, и применение соединения-конъюгата, как описано в данном документе, в производстве лекарственного препарата для лечения пролиферативного заболевания.

Специалист в данной области техники легко сможет определить, лечит ли конъюгат-кандидат пролиферативное состояние для любого конкретного типа клеток.

Термин "пролиферативное заболевание" относится к нежелательной или неконтролируемой клеточной пролиферации избыточных или аномальных клеток, которая является нежелательной, такой как неопластический или гиперпластический рост, как *in vitro*, так и *in vivo*. Примеры пролиферативных состояний включают, но не ограничиваются ими, доброкачественную, предзлокачественную и злокачественную клеточную пролиферацию, включая, но не ограничиваясь, новообразования и опухоли (например, гистiocитому, глиому, астроцитому, остеому), различные виды рака (например, рак легких, мелкоклеточный рак легких, рак желудочно-кишечного тракта, рак кишечника, рак толстой кишки, рак молочной железы, рак яичников, рак предстательной железы, рак яичек, рак печени, рак почки, рак мочевого пузыря, рак поджелудочной железы, рак головного мозга, саркому, остеосаркому, саркому Капоши, меланому), лимфомы, лейкозы, псориаз, заболевания костей, фибропролиферативные заболевания (например, соединительной ткани) и атеросклероз.

Можно лечить любой тип клеток, включая, помимо прочего, легких, желудочно-кишечного тракта (включая, например, кишечник, толстую кишку), молочных желез, яичников, предстательной железы, печени (гепатоциты), почек (почечные), мочевого пузыря, поджелудочной железы, головного мозга и кожи.

Нарушения, представляющие особый интерес, включают, но не ограничиваются ими, различные виды рака, включая метастатическое онкологическое заболевание и метастатические клетки онкологического заболевания, такие как циркулирующие опухолевые клетки, которые могут быть обнаружены циркулирующими в жидкостях организма, таких как кровь или лимфа. Представляющие особый интерес виды рака включают рак легкого, рак молочной железы, рак поджелудочной железы, рак яичников, рак почки, рак головы и шеи, мезотелиому, глиобластому, меланому и опухоли головного мозга, такие как, но не ограничиваясь ими, глиомы, медуллобластома, астроцитомы и эпендимомы.

Другие представляющие интерес нарушения включают любое патологическое состояние, при котором IL13R α 2 сверхэкспрессируется или при котором антагонизм IL-13R α 2 обеспечивает клиническую пользу, например, при воспалительных состояниях, таких как, помимо прочего, воспалительное заболевание кишечника и фиброз.

Предполагается, что антитела и конъюгаты антитело-лекарственное средство (ADC) по настоящему изобретению могут быть использованы для лечения различных заболеваний или нарушений, например, характеризуется сверхэкспрессией опухолевого антигена. Типичные состояния или гиперпролиферативные нарушения включают доброкачественные или злокачественные опухоли; лейкоз, гематологические и лимфоидные злокачественные новообразования. Другие включают нейрональные, глиальные, астроцитарные, гипоталамические, железистые, макрофагальные, эпителиальные, стромальные, бластоцельные, воспалительные, ангиогенные и иммунологические, включая аутоиммунные нарушения.

Обычно заболевание или нарушение, подлежащее лечению, представляет собой гиперпролиферативное заболевание, такое как рак. Примеры видов рака, подлежащих лечению в данном документе, включают, но не ограничиваются ими, карциному, лимфому, бластому, саркому и лейкоз или лимфоидные злокачественные новообразования. Более конкретные примеры таких видов рака включают плоско-

клеточный рак (например, плоскоклеточный эпителиальный рак), рак легких, включая мелкоклеточный рак легкого, немелкоклеточный рак легкого, аденокарциному легкого и плоскоклеточный рак легкого, перитонеальный рак, гепатоцеллюлярный рак, рак желудка, включая рак желудочно-кишечного тракта, рак поджелудочной железы, глиобластому, рак шейки матки, рак яичников, рак печени, рак мочевого пузыря, гепатому, рак молочной железы, рак толстой кишки, рак прямой кишки, рак толстой кишки, рак эндометрия или матки, рак слюнной железы, рак почки, рак предстательной железы, рак вульвы, рак щитовидной железы, гепатокарциному, карциному анального канала, карциному полового члена, а также рак головы и шеи.

Аутоиммунные заболевания, для лечения которых можно использовать соединения ADC, включают ревматологические расстройства (такие как, например, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, склеродермия, волчанка, такая как SLE и волчаночный нефрит, полимиозит/дерматомиозит, криоглобулинемия, синдром антител к фосфолипидам, и псориазический артрит), остеоартрит, аутоиммунные заболевания желудочно-кишечного тракта и печени (такие как, например, воспалительные заболевания кишечника (например, язвенный колит и болезнь Крона), аутоиммунный гастрит и пернициозная анемия, аутоиммунный гепатит, первичный билиарный цирроз, первичный склерозирующий холангит и глютеиновая болезнь), васкулиты (такие как, например, ANCA-ассоциированный васкулит, включая васкулит Чарджа-Стросса, гранулематоз Вегенера и полиартериит), аутоиммунные неврологические расстройства (такие как, например, рассеянный склероз, синдром опсоклонуса миоклонуса, миастения гравис, оптиконевромиелит, болезнь Паркинсона, болезнь Альцгеймера и аутоиммунные полинейропатии), почечные заболевания (такие как, например, гломерулонефрит, синдром Гудпастчера и болезнь Бергера), аутоиммунные дерматологические заболевания (такие как, например, псориаз, крапивница, крапивница, вульгарная пузырчатка, буллезный пемфигоид и кожная красная волчанка), гематологические нарушения (такие как, например, тромбоцитопеническая пурпура, тромботическая тромбоцитопеническая пурпура, посттрансфузионная пурпура и аутоиммунная гемолитическая анемия), атеросклероз, увеит, аутоиммунные заболевания слуха (такие как, например, болезнь внутреннего уха и потеря слуха), болезнь Бехчета, синдром Рейно, трансплантация органов и аутоиммунные эндокринные нарушения (такие как, например, связанные с диабетом аутоиммунные заболевания, такие как инсулинозависимый сахарный диабет (IDDM), болезнь Аддисона и аутоиммунное заболевание щитовидной железы (например, болезнь Грейвса и тиреоидит)). Более предпочтительные такие заболевания включают, например, ревматоидный артрит, язвенный колит, ANCA-ассоциированный васкулит, волчанку, рассеянный склероз, синдром Шегрена, болезнь Грейвса, IDDM, пернициозную анемию, тиреоидит и гломерулонефрит.

Составы.

Хотя антитела и соединения-конъюгаты по данному изобретению можно использовать (например, вводить) по отдельности, часто предпочтительнее представлять их в виде композиции или состава.

В некоторых вариантах осуществления композиция представляет собой фармацевтическую композицию (например, состав, препарат, лекарственный препарат), содержащую антитело или соединение-конъюгат, как описано в данном документе, и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или вспомогательное вещество.

В некоторых вариантах реализации композиция представляет собой фармацевтическую композицию, содержащую по меньшей мере одно антитело или соединение-конъюгат, как описано в данном документе, вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, включая, но не ограничиваясь ими, фармацевтически приемлемые носители, разбавители, наполнители, адъюванты, наполнители, буферы, консерванты, антиоксиданты, смазывающие вещества, стабилизаторы, солюбилизаторы, поверхностно-активные вещества (например, смачивающие агенты), маскирующие агенты, красители, ароматизаторы и подслащающие агенты.

В некоторых вариантах осуществления композиция может дополнительно содержать другие активные агенты, например, другие терапевтические или профилактические агенты. Подходящие носители, разбавители, вспомогательные вещества и т.д. можно найти в стандартных фармацевтических публикациях. См., например, Handbook of Pharmaceutical Additives, 2nd Edition (eds. M. Ash and I. Ash), 2001 (Synapse Information Resources, Inc., Endicott, New York, USA), Remington's Pharmaceutical Sciences, 20th edition, pub. Lippincott, Williams & Wilkins, 2000; и Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2nd edition, 1994.

Также описаны способы изготовления фармацевтической композиции, включающие смешивание по меньшей мере одного [11С]-радиомеченного конъюгата или конъюгат-подобного соединения, как определено в данном документе, вместе с одним или более другими фармацевтически приемлемыми ингредиентами, хорошо известными специалистам в данной области техники, например, носителями, разбавителями, наполнителями и т.д. Если они составлены в виде дискретных единиц (например, таблеток и т.д.), каждая единица содержит заранее определенное количество (дозу) активного соединения.

Используемый в данном документе термин "фармацевтически приемлемый" относится к соединениям, ингредиентам, материалам, композициям, лекарственным формам и т.д., которые в рамках здорового медицинского заключения подходят для использования в контакте с тканями субъекта (например, че-

ловека) без чрезмерной токсичности, раздражения, аллергической реакции или других проблем или осложнений, и имеют соизмеримое с разумным соотношение польза/риск. Каждый носитель, разбавитель, наполнитель и т.д. также должен быть "приемлемым" в смысле совместимости с другими ингредиентами состава.

Составы по настоящему изобретению могут быть приготовлены любыми способами, хорошо известными в области фармации. Такие способы включают стадию объединения активного соединения с носителем, который представляет собой один и более дополнительных ингредиентов. Как правило, составы готовят путем равномерного и тщательного объединения активного соединения с носителями (например, жидкими носителями, тонкоизмельченным твердым носителем и т.д.), а затем, при необходимости, придания продукту формы.

Состав может быть приготовлен для обеспечения быстрого или медленного высвобождения; немедленного, отсроченного, замедленного или постоянного высвобождения; или их комбинации.

Составы, подходящие для парентерального введения (например, путем инъекции), включают водные или неводные, изотонические, апиrogenные, стерильные жидкости (например, растворы, суспензии), в которых активный ингредиент растворен, суспендирован или иным образом составлен (например, в липосомах или других микрочастицах). Такие жидкости могут дополнительно содержать другие фармацевтически приемлемые ингредиенты, такие как антиоксиданты, буферы, консерванты, стабилизаторы, бактериостатические агенты, суспендирующие агенты, загустители и растворенные вещества, которые делают состав изотоничным с кровью (или другими соответствующими жидкостями организма) предполагаемого получателя. Примеры наполнителей включают, например, воду, спирты, полиолы, глицерин, растительные масла и тому подобное. Примеры подходящих изотонических носителей для использования в таких составах включают раствор хлорида натрия для инъекции, раствор Рингера для инъекции или раствор Рингера с лактатом для инъекции. Обычно концентрация активного ингредиента в жидкости составляет от около 1 нг/мл до около 10 мкг/мл, например от около 10 нг/мл до около 1 мкг/мл. Составы могут быть представлены в герметичных контейнерах для единичных или множественных доз, например, в ампулах и флаконах, и могут храниться в лиофилизированных (лиофилизированных) условиях, требующих добавления только стерильного жидкого носителя, например, воды для инъекции, непосредственно перед использованием. Растворы и суспензии для немедленной инъекции могут быть приготовлены из стерильных порошков, гранул и таблеток.

Доза.

Специалисту в данной области техники должно быть понятно, что подходящие дозы антител, соединений-конъюгатов и композиций по данному изобретению могут варьироваться от пациента к пациенту. Определение оптимальной дозировки обычно включает балансирование уровня терапевтического эффекта с любым риском или вредными побочными эффектами. Выбранный уровень дозировки будет зависеть от множества факторов, включая, помимо прочего, активность конкретного соединения, способ введения, время введения, скорость выведения соединения, продолжительность лечения и применение других лекарственных средств, соединений и/или материалов, используемых в комбинации, тяжесть состояния и вид, пол, возраст, масса тела, патологическое состояние, общее состояние здоровья и предыдущая история болезни пациента. Количество соединения и способ введения в конечном итоге будут определяться врачом, ветеринаром или клиницистом, хотя обычно дозировка будет выбрана для достижения локальных концентраций в месте действия, которые достигают желаемого эффекта, не вызывая существенных вредных или отрицательных побочных явлений.

Введение можно осуществлять одной дозой, непрерывно или периодически (например, разделенными дозами с соответствующими интервалами) на протяжении всего курса лечения. Способы определения наиболее эффективных средств и дозировки хорошо известны специалистам в данной области техники и будут варьироваться в зависимости от состава, используемого для терапии, цели терапии, целевой клетки (клеток), подвергаемой лечению, и субъекта подвергаемого лечению. Однократное или многократное введение может быть выполнено с выбором уровня дозы и схемы лечением врачом, ветеринаром или клиницистом.

Как правило, подходящая доза активного соединения находится в диапазоне от около 100 нг до около 25 мг (более типично от около 1 мкг до около 10 мг) на килограмм массы тела субъекта в день. Когда активное соединение представляет собой соль, сложный эфир, амид, пролекарство или подобное, вводимое количество рассчитывается на основе исходного соединения, и поэтому фактическая масса, которую нужно использовать, увеличивается пропорционально.

В одном из вариантов реализации активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой введения: около 100 мг 3 раза в день.

В одном варианте осуществления активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующим режимом дозирования: около 150 мг 2 раза в день.

В одном варианте осуществления активное соединение вводят пациенту-человеку в соответствии со следующим режимом дозирования: около 200 мг 2 раза в день.

Однако в одном варианте реализации соединение-конъюгат вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой введения: около 50 или около 75 мг, 3 или 4 раза в день.

В одном варианте реализации соединение-конъюгат вводят пациенту-человеку в соответствии со следующей схемой введения: около 100 или около 125 мг 2 раза в день.

Дозы, описанные выше, могут применяться к антителу, конъюгату (включая молекулу лекарственного компонента и линкер к антителу) или к эффективному количеству предоставленного лекарственного соединения, например количеству соединения, которое высвобождается после расщепления линкера.

Для профилактики или лечения заболевания подходящая доза будет зависеть от типа заболевания, подлежащего лечению, как определено выше, степени тяжести и течения заболевания, от того, вводят ли молекулу в профилактических или терапевтических целях, от предшествующей терапии, состояния пациента, истории болезни и реакции на антитело, а также на усмотрение лечащего врача. Молекулу подходящим образом вводят пациенту за один раз или в течение ряда курсов лечения. В зависимости от типа и степени тяжести заболевания примерно от 1 дг/кг до 15 мг/кг (например, 0,1-20 мг/кг) молекулы является начальной дозой-кандидатом для введения пациенту, например, путем одного или более отдельных введений или путем непрерывной инфузии. Типичная суточная доза может варьироваться примерно от 1 дг/кг до 100 мг/кг или более в зависимости от упомянутых выше факторов. Примерная доза ADC, вводимая пациенту, находится в диапазоне от около 0,1 до около 10 мг/кг массы тела пациента. При повторных введениях в течение нескольких дней или дольше, в зависимости от состояния, лечение продолжают до тех пор, пока не произойдет желаемое подавление симптомов заболевания. Типичный режим дозирования включает курс введения начальной насыщающей дозы около 4 мг/кг с последующими дополнительными дозами ADC каждую неделю, две или три недели. Могут быть полезны другие схемы введения. Прогресс этой терапии легко контролировать с помощью обычных способов и анализов.

Субъект/Пациент.

Субъект/пациент может быть животным, млекопитающим, плацентарным млекопитающим, сумчатым животным (например, кенгуру, вомбат), монотремой (например, утконосом), грызуном (например, морской свинкой, хомяком, крысой, мышью), мышью (например, мышью), зайцеобразным (например, кроликом), птичим (например, птицей), собачим (например, собакой), кошачим (например, кошкой), лошадиным (например, лошастью), свиной (например, свиньей), овцой (например, овцой), бычьим (например, коровой), приматом, обезьяньим (например, обезьяной или крупной обезьяной), обезьяньим (например, маргышкой, бабуином), обезьяньим (например, гориллой, шимпанзе, орангутангом, гиббоном) или человек.

Кроме того, субъект/пациент может быть любой из форм своего развития, например плодом. В одном предпочтительном варианте реализации субъект/пациент является человеком.

Варианты осуществления.

Настоящее изобретение относится к антителам к IL13R α 2. Конкретно предполагаемые варианты осуществления антител по данному изобретению включают

антитело, которое связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), содержащее тяжелую цепь, содержащую определяющие комплементарность области (CDR), приведенные в SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID: NO 15; и/или легкую цепь, содержащую (i) CDR, приведенные в SEQ ID NO:16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID: NO 18; и (ii) остаток серина в положении 30 (нумерация со ссылкой на SEQ ID NO: 3), где переменные области являются полностью человеческими. В одном варианте осуществления антитело является полностью человеческим, включая константные области. В родственном варианте осуществления настоящее изобретение относится к конъюгату антитела, содержащему указанное антитело и димер пирролобензодиазепина. В одном варианте осуществления легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь человека;

антитело, которое связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), где антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; и SEQ ID NO: 8. В некоторых таких вариантах осуществления антитело дополнительно содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и/или CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления антитело дополнительно содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18. В некоторых вариантах осуществления переменные области являются полностью человеческими. В некоторых вариантах осуществления антитело является полностью человеческим. Например, любые константные области, содержащиеся в антителе, также могут быть полностью человеческими антителами.

Таким образом, в некоторых вариантах осуществления антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18, необязательно где переменные домены

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 3 (VHA; VH HuCL47), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4 (VKA; VLHuCL47);

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 5 (VHAback), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ IDNO: 4 (VKA; VLHuCL47); и

вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 (VHA3), и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11 (VKA2).

Особенно предпочтительные антитела по данному изобретению включают те, которые содержат вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

Признаки, раскрытые в предшествующем описании, или в следующей формуле изобретения, или на прилагаемых графических материалах, выраженные в их конкретных формах или в терминах средств для выполнения раскрытой функции, или способа или процесса для получения описанных результатов, в зависимости от ситуации, могут по отдельности или в любой комбинации таких признаков использоваться для реализации изобретения в различных его формах.

Несмотря на то что изобретение было описано в связи с описанными выше иллюстративными вариантами осуществления, многие эквивалентные модификации и изменения будут очевидны специалистам в данной области техники при ознакомлении с этим описанием. Соответственно, иллюстративные варианты осуществления изобретения, изложенные выше, считаются иллюстративными, а не ограничивающими. В описанные варианты осуществления могут быть внесены различные изменения без отклонения от сущности и объема изобретения.

Во избежание каких-либо сомнений, любые теоретические объяснения, приведенные в настоящем документе, даны для улучшения понимания читателя. Изобретатели не желают быть связанными каким-либо из этих теоретических объяснений.

Любые заголовки разделов, используемые в данном описании, предназначены только для организационных целей и не должны толковаться как ограничивающие описанный предмет.

Во всем этом описании, включая следующую формулу изобретения, если контекст не требует иного, слова "содержать" и "включать", а также такие варианты, как "содержит", "содержащий" и "включающий", будут пониматься как подразумевающие включение указанного целого числа, или стадии, или группы целых чисел, или стадий, но не исключение любого другого целого числа, стадии или группы целых чисел или стадий.

Следует отметить, что, как они используются в описании и прилагаемой формуле изобретения, формы единственного числа включают ссылки на множественное число, если контекст явно не диктует иное. В настоящем документе диапазоны могут быть выражены как от "около" одного конкретного значения и/или до "около" другого конкретного значения. При выражении такого диапазона другой вариант осуществления включает в себя от одного конкретного значения и/или до другого конкретного значения. Точно так же, когда значения выражаются как приближения, с использованием условия "около", следует понимать, что конкретное значение образует другой вариант осуществления. Термин "около" по отношению к числовому значению является необязательным и означает, например, +/-10%.

Последовательности

SEQ ID NO: 1 [VH CL47 мышцы, CDR подчеркнута]

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFSNYLMNWVKQRPEQDLDWIGRIDPYDGDIDYNQNFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARGYGTAYGVVDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 2 [VL CL47 мышцы, CDR подчеркнута]

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQPPKLLIYAASRQGS
GVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 3 [VH HuCL47 (VHA Клона 47), CDR подчеркнута]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDG
DIDYNQNFKDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGTAYGVVDYWGQGTS
VTVSS

SEQ ID NO: 4 [VL HuCL47 (VKA Клона 47), CDR подчеркнута]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQAPRLLIY AASRQGS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 5 [VHAback Клона 47, CDR подчеркнута]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQGLEWIGRIDPYDGD
IDYNQNFKDRATLTVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGTAYGVVDYWGQGTS
VTVSS

SEQ ID NO: 6 [VHA1 Клона 47, CDR подчеркнута]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQGLEWIGRIDPYDGD
IDYNQNFKDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGTAYGVVDYWGQGTSV
TVSS

SEQ ID NO: 7 [VHA2 Клона 47, CDR подчеркнута]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDG
DIDYNQNFKDRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGTAYGVVDYWGQGTS
VTVSS

SEQ ID NO: 8 [VHA3 Клона 47, CDR подчеркнута]

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDG
DIDYNQNFKDRVTITRDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGYGTAYGVVDYWGQGTS
VTVSS

SEQ ID NO: 9 [VKAback Клона 47, CDR подчеркнута]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQAPRLLIY AASRQGS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 10 [VKA1 Клона 47, CDR подчеркнута]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQKPGQAPRLLIY AASRQGS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 11 [VKA2 Клона 47, CDR подчеркнута]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWYQQKPGQAPRLLIY AASRQGS
GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO: 12 [внеклеточный домен (27-343) IL13RA2 человека (Uniprot Q14627)]

DTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYLYLQWQPPLSLDHFKECTVEYELKYRNIGSETWKTIIT
KNLHYKDGFDLNGGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSWAETTYWISPQGIPETKVDMD
CVYYNWQYLLCSWKPVGIGVLLDTNYNLFYWYEGLDHALQCVDYIKADGQNIICRFPY
LEASDYKDFYICVNGSSENKPIRSSYFTFQLQNIVKPLPPVYLTFRESSCEIKLKWSIPLG
PIPARCFDYEIEIREDDTTLVTATVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSE
WSDKQCWEGEDLSKKTLLRhhhhhh

Hhhhhh = C-концевая His-метка

SEQ ID NO: 13 [CDRH1 HuCL47]

NYLMN

SEQ ID NO: 14 [CDRH2 HuCL47]

RIDPYDGDIDYNQNFKD

SEQ ID NO: 15 [CDRH3 HuCL47]

GYGTAYGVDY

SEQ ID NO: 16 [CDRL1 HuCL47]

RASESVDNYGISFMN

SEQ ID NO: 17 [CDRL2 HuCL47]

AASRQGS

SEQ ID NO: 18 [CDRL3 HuCL47]

QQSKEVPWT

Варианты осуществления изобретения

Следующие пронумерованные утверждения, очерчивающие аспекты настоящего изобретения, являются частью описания.

101. Антитело, которое связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), причем антитело содержит

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; и SEQ ID NO: 8; и

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11.

102. Антитело по варианту осуществления 101, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 3, и:

(i) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(iii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(iv) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

103. Антитело по варианту осуществления 101, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 5, и:

(i) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;
(ii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(iii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(iv) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

104. Антитело по варианту осуществления 101, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 6, и:

(i) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(iii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(iv) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

105. Антитело по варианту осуществления 101, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 7, и:

(i) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(iii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(iv) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

106. Антитело по варианту осуществления 101, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 8, и:

(i) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

(ii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

(iii) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

(iv) вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

107. Антитело по варианту осуществления 101 или 102, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность:

SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

108. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из: Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv.

109. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело дополнительно содержит константную область антитела, полученную из одного или более антител человека.

110. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывает IL13Rα2 с аффинностью (K_D) не выше 5×10⁻¹⁰ М, например, не выше 2,5×10⁻¹⁰ М.

111. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывает IL13Rα2 с аффинностью (K_d) не более 1,5×10⁻¹⁰ М.

112. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело конкурентно ингибирует связывание с IL13Rα2 антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и необязательно константную область антитела.

113. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело связывает IL13Rα2 с более высокой аффинностью (K_D), чем антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и необязательно константную область антитела.

114. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело обладает иммуногенностью у человека ниже, чем иммуногенность антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и необязательно константную область антитела.

115. Антитело по любому из предшествующих вариантов осуществления, причем антитело имеет улучшенные свойства стабильности по сравнению с антителом, содержащим переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и необязательно константную область антитела.

116. Конъюгат антитело-лекарственное средство, включающий антитело в соответствии с любым предшествующим вариантом осуществления, конъюгированное с лекарственным компонентом.

117. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 116, в котором лекарственный компонент представляет собой цитотоксический лекарственный компонент.

118. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 101-117 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

119. Антитело, которое связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), причем антитело содержит

переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 3; SEQ ID NO: 5; SEQ ID NO: 6; SEQ ID NO: 7; и SEQ ID NO: 8; и

переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

120. Антитело по варианту осуществления 119, причем антитело содержит переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

121. Антитело по варианту осуществления 119 или 120, причем антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18;

(ii) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 5, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18;

(iii) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 6, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18;

(iv) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 7, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18; или

(v) переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 8, и переменную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17, и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

122. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-121, причем антитело содержит переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11.

123. Антитело, которое связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), причем антитело содержит

переменную область легкую цепи, содержащую аминокислотную последовательность, выбранную из группы, состоящей из: SEQ ID NO: 4; SEQ ID NO: 9; SEQ ID NO: 10; SEQ ID NO: 11; и

переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15.

124. Антитело по варианту осуществления 123, причем антитело содержит CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15.

125. Антитело по варианту осуществления 123 или 124, причем антитело содержит:

(i) переменную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14, и CDR3

NO: 10;

xvi) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11;

xvii) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4;

xviii) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9;

xix) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; или

xx) вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 11.

128. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-127, причем антитело содержит вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность: SEQ ID NO: 3, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 4.

129. Антитело, содержащее

вариабельную область тяжелой цепи, которая содержит CDR1 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 13, CDR2 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 14 и CDR3 VH с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 15; и/или

вариабельную область легкой цепи, которая содержит CDR1 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 16, CDR2 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 17 и CDR3 VL с аминокислотной последовательностью SEQ ID NO: 18.

130. Антитело по варианту осуществления 129, причем антитело связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2).

131. Антитело по варианту осуществления 129 или 130, причем антитело содержит остаток серина в положении 30 (нумерация со ссылкой на SEQ ID NO: 3).

132. Антитело по любому из вариантов осуществления 129-131, в котором вариабельные области являются полностью человеческими.

133. Антитело по любому из вариантов осуществления 129-132, причем антитело представляет собой полностью человеческое антитело.

134. Антитело по любому из вариантов осуществления 129-133, в котором легкая цепь представляет собой легкую каппа-цепь человека.

135. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-134, причем антитело представляет собой фрагмент антитела, выбранный из группы, состоящей из: Fab, Fab', F(ab')₂ и scFv.

136. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-134, причем антитело дополнительно содержит константную область антитела, полученную из одного или более антител человека.

137. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-136, причем антитело связывает IL13R α 2 с аффинностью (K_D) не более 5×10^{-10} М, например, не более $2,5 \times 10^{-10}$ М.

138. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-137, причем антитело связывает IL13R α 2 с аффинностью (KD) не более $1,5 \times 10^{-10}$ М.

139. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-138, причем антитело конкурентно ингибирует связывание с IL13R α 2 антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и необязательно константную область антитела.

140. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-139, причем антитело связывает IL13R α 2 с более высокой аффинностью (K_D), чем антитело, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и необязательно константную область антитела.

141. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-140, причем антитело имеет иммуногенность у человека ниже, чем иммуногенность антитела, содержащего вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и необязательно константную область антитела.

142. Антитело по любому из вариантов осуществления 119-141, причем антитело обладает улучшенными свойствами стабильности по сравнению с антителом, содержащим вариабельную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и вариабельную область

легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2 и необязательно константную область антитела.

143. Конъюгат антитело-лекарственное средство, содержащий антитело по любому из вариантов осуществления 119-142, конъюгированное с лекарственным компонентом.

144. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 143, в котором лекарственный компонент представляет собой цитотоксический лекарственный компонент.

145. Конъюгат антитело-лекарственное средство по варианту осуществления 144, в котором цитотоксический лекарственный компонент представляет собой димер пирролобензодиазепина.

146. Фармацевтическая композиция, содержащая антитело или конъюгат антитело-лекарственное средство по любому из вариантов осуществления 119-145 и фармацевтически приемлемый разбавитель, носитель или вспомогательное вещество.

201. Антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 101-146 для применения в способе лечения.

202. Антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по любому из вариантов осуществления 101-146 для применения в способе лечения пролиферативного заболевания у субъекта.

203. Антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 202, причем пролиферативное заболевание представляет собой рак.

204. Антитело, конъюгат антитело-лекарственное средство или фармацевтическая композиция по варианту осуществления 203, причем рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: рака легкого, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака почек, рака головы и шеи, мезотелиомы, глиобластомы, меланом и опухолей головного мозга, таких как, но не ограничиваясь ими, глиомы, медуллобластома, астроцитомы и эпендимомы.

205. Применение антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления 101-146 при производстве лекарственного препарата для применения в способе лечения.

206. Применение антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции в соответствии с любым из вариантов осуществления 101-146 при производстве лекарственного препарата для применения в способе лечения пролиферативного заболевания у субъекта.

207. Применение по варианту осуществления 206, причем пролиферативное заболевание представляет собой рак.

208. Применение по варианту осуществления 207, причем рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: рака легкого, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака почек, рака головы и шеи, мезотелиомы, глиобластомы, меланом и опухолей головного мозга, таких как, но не ограничиваясь ими, глиомы, медуллобластома, астроцитомы и эпендимомы.

209. Способ лечения пролиферативного заболевания, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, антитела, конъюгата антитело-лекарственное средство или фармацевтической композиции по любому из вариантов осуществления 101-146.

210. Способ по варианту осуществления 209, в котором субъекту вводят химиотерапевтический агент в комбинации с антителом, конъюгатом антитело-лекарственное средство или фармацевтической композицией.

211. Способ по любому из вариантов осуществления 208-210, в котором рак представляет собой рак, выбранный из группы, состоящей из: рака легкого, рака молочной железы, рака поджелудочной железы, рака яичников, рака почек, рака головы и шеи, мезотелиомы, глиобластомы, меланом и опухолей головного мозга, таких как, но не ограничиваясь ими, глиомы, медуллобластома, астроцитомы и эпендимомы.

301. Полинуклеотид, кодирующий антитело по любому из вариантов осуществления 101-115 или 119-142.

302. Вектор, содержащий полинуклеотид по варианту осуществления 301.

303. Вектор по варианту осуществления 302, причем вектор представляет собой вектор экспрессии.

304. Клетка-хозяин, содержащая вектор по любому из вариантов осуществления 302-303.

305. Клетка-хозяин по варианту осуществления 304, причем клетка-хозяин является прокариотической, эукариотической или клеткой млекопитающего.

Примеры

Материалы и способы.

Экспрессия и очистка антител.

Линии клеток культивировали и размножали в соответствии с инструкциями производителя; клетки Expi293F™ выращивали в среде для экспрессии Expi293™ (ThermoFisher A1435102). Вкратце, клетки культивировали в шейкерных колбах для культивирования емкостью 125 мл (Corning™ 431143) в орбитальном инкубаторе при 37°C, при 125 об/мин и атмосфере 8% CO₂ и поддерживали на уровне 3-5×10⁶ клеток/мл на протяжении всего опыта. Плотность клеток определяли в двух повторностях с помощью

анализа методом вытеснения трипанового синего с использованием автоматического счетчика клеток LUNA-II™ (Logo Biosystems Ltd). Процедуры трансфекции ДНК в объеме 30 мл выполняли для обеих линий клеток, как описано в протоколах Thermo Fisher. В день трансфекции отбирали клетки с жизнеспособностью $\geq 95\%$ (исследованные с помощью микроскопа/счетчика клеток) и разбавляли до $2,5 \times 10^6$ /мл для Expi293F™ в 25,5 мл специфической к клеткам среды экспрессии. Для Expi293F™ 30 мкг плазмидной ДНК (15 мкг тяжелой цепи +15 мкг легкой цепи) разводили в среде Opti-MEM® I с пониженным содержанием сыворотки (ThermoFisher 31985070) до общего объема 1,5 мл, одновременно в отдельном флаконе 81 мкл реагента ExpiFectamine™293 разводили в среде Opti-MEM® I с пониженным содержанием сыворотки до общего объема 1,5 мл. Каждую из смесей осторожно перемешивали и инкубировали при комнатной температуре в течение 5 мин, затем тщательно объединяли, чтобы получить общий объем 3 мл. Смесь инкубировали в течение дополнительных 20 мин при комнатной температуре, чтобы дать возможность образоваться комплексам ДНК-липид, после чего смесь осторожно добавляли в колбу с клетками. Культуры собирали на 5 день, жизнеспособность и плотность клеток измеряли с использованием автоматического счетчика клеток LUNA-II™, как описано ранее. Для сбора клетки центрифугировали (2000 g, 15 мин, 4°C), супернатант удаляли, а затем подвергали стерильной фильтрации через фильтры с размером пор 0,22 мкм перед очисткой. Очистку проводили с помощью стандартной хроматографии на основе белка А.

ELISA.

Рекомбинантный внеклеточный домен человека IL13RA2-6His (27-343) был получен от Sinobiology (кат. № 10350-H08H). 50 мкл 1 мкг/мл человеческого IL13RA2 в PBS наносили на ночь при 4°C на планшеты MaxiSorp ELISA. На следующее утро планшет промывали 0,02% PBS/Tween20. В каждую лунку добавляли 200 мкл блокирующего буфера Superblock и инкубировали при комнатной температуре в течение 1 ч на орбитальном шейкере при 120 об/мин. Готовили серию разведений каждого антитела с разведениями каждого варианта антитела в PBS/Tween20 0,02%. Антитела добавляли в планшеты, покрытые блокированным антигеном, и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при встряхивании со скоростью 120 об/мин на орбитальном шейкере. Планшеты затем промывали 3 раза 200 мкл PBS/Tween20 0,02% и в лунки добавляли 75 мкл вторичных антител (конъюгированного с HRP мышино-го антитела против человеческого иммуноглобулина, разбавленного 1:4000 в PBS/Tween20 0,02%) и инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре при 120 об/мин при встряхивании на орбитальном шейкере. Затем планшеты промывали 3 раза 200 мкл PBS/Tween20 0,02%. Для проявления ELISA в лунки вносили по 75 мкл субстрата TMB-Turbo и инкубировали при комнатной температуре при встряхивании 120 об/мин на орбитальном шейкере до появления синей окраски, затем реакцию останавливали добавлением 75 мкл 0,6н. HCl. Планшеты считывали на Envision при 450 нМ, а кривые анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad prism

Анализ теплового сдвига.

Краситель теплового сдвига белка, 2,5 мкл в разведении 1:1000 ((Life Technologies, кат. 446148) добавляли к образцам белков (17,5 мкл 0,5 мг/мл в PBS) в 96-луночном оптически прозрачном планшете и тщательно перемешивали. Каждый образец был сделан в четырехкратной повторности. Планшет запечатывали оптически прозрачной клейкой пленкой, а пузырьки в лунках удаляли путем центрифугирования в течение 1 мин при 500g, затем помещали на лед. Запечатанный планшет вводили в систему ПЦР в реальном времени 7500, после чего эксперимент ставили следующим образом:

Объем реакционной смеси	20 мкл		
Режим линейного изменения температуры	продолжение		
Шаг	Скорость линейного изменения температуры	Температура, °C	Время (мм:сс)
1	100 %	25,0	2:00
2	1%	99,0	2:00

Данные анализировали с использованием программного обеспечения Protein thermoshift v1.2 (Life Technologies).

Ускоренное испытание стабильности.

Антитела инкубировали при 45°C в стерильном PBS в течение 7-8 дней перед анализом с помощью ELISA, ЭХ, хроматографии с гидрофобным взаимодействием и обратно-фазовой хроматографии.

Анализ Biacore.

Анализ Biacore с использованием сенсора, покрытого IL13RA2-6His человека, использовали для расчета кажущихся констант аффинности для вариантов Клона 47. Серию разведений вариантов антител наносили на поверхность сенсора IL13RA2 на 600 с для расчета константы ассоциации K_a , а затем нанесли буфер (HBS-EP+) на 1800 с для расчета константы диссоциации K_d . Соотношение двух констант обеспечит кажущуюся KD , поскольку бивалентность антитела будет влиять на кинетику связывания.

Эксклюзионная хроматография ВЭЖХ (ЭХ).

Анализ методом ЭХ проводили с использованием системы ВЭЖХ Shimadzu (или эквивалентной системы), используя колонку TSKgel Super SW mAb НТР 4 мкм 4,6 мм × 15 см. Подвижная фаза представляла собой 200 мМ фосфат калия, 250 мМ хлорид калия, 10% об./об. i-пропанол, pH 6,95, со скоростью потока 0,5 мл в минуту и детекцией при 280 нм.

Хроматография с гидрофобным взаимодействием ВЭЖХ (ХГВ).

Анализ методом ХГВ, анализ методом ЭХ проводили с использованием системы ВЭЖХ Shimadzu (или эквивалентной системы), используя колонку Proteomix HIC Butyl-NP5, 5 мкм, непористую, 4,6×35 мм (Serax). Подвижная фаза А представляла собой 1,25 М $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 25 мМ NaOAc (pH 5,50), а подвижная фаза В представляла собой 75% 25 мМ NaOAc (pH 5,50), 25% изопропанола, со скоростью потока 0,8 мл/мин и обнаружением при 214 нм.

Обратно-фазовая хроматография ВЭЖХ.

Обратно-фазовую хроматографию проводили с использованием системы ВЭЖХ Shimadzu (или эквивалентной системы), используя колонку Aeris Widepore XB-C18, 200Å, 3,6 мкм, 2,1×150 мм (Phenomenex, 00F-4482-AN). Подвижная фаза А представляла собой воду + 0,1% по объему ТФУ, а подвижная фаза В представляла собой ацетонитрил + 0,1% по объему ТФУ. Образец готовили перед загрузкой путем добавления к 40 мкл образца (5 мг/мл), к которому добавляли 30 мкл воды, 20 мкл бората натрия и 10 мкл ДТГ. Затем инкубировали при 37°C в течение 30 мин, добавляли 100 мкл смеси 49:49:2 ацетонитрил/вода/муравьиная кислота. Колонка работала со скоростью 1 мл/мин при температуре 80°C с обнаружением при 214 нм.

Цитотоксичность *in vitro*.

Клетки A375/NCI-H1299 разбавляли до 5×10^4 клеток/мл при полном росте, добавляя по 100 мкл клеток в лунки планшета EDGE. Клетки инкубировали при 37°C/5% CO_2 в течение 2-6 ч, чтобы дать клеткам время прикрепиться. ADC разводили в 11 точках, 1 из 4 последовательных разведений, от 50 мкг/мл до 47,7 пг/мл, оставляя окончательный отрицательный контрольный образец, т.е. без ADC, каждую концентрацию анализировали в двух повторностях. Разведенные ADC добавляли в планшет EDGE, содержащий клетки-мишени, и планшет инкубировали в инкубаторе с увлажнением в течение 5 дней (~120 ч). Для определения цитотоксического эффекта ADC использовали Cell Titre Glow (Promega), в каждую лунку планшета добавляли по 40 мкл раствора для считывания и инкубировали при 37°C/5% CO_2 в течение 1-5 ч. После инкубации планшет считывали на оптическом считывателе (Molecular Devices Spectramax i3X), а данные анализировали с помощью встроенного в аппарат программного обеспечения (Softmax Pro). В целом данные получены в результате анализа каждой линии клеток в трех повторностях.

Анализ FACS.

Клетки NCI-H1299 разводили до 2×10^6 клеток/мл в буфере для анализа (0,1% BSA/0,1% азида натрия в PBS) и добавляли по 50 мкл на лунку в 96-луночный планшет. Антитела HuCL47 и Клон 47 разводили до максимальной концентрации 40 мкг/мл (266 нМ) и разводили 1:4 для 7 разведений, а также только буфером. 50 мкл антитела добавляли к 50 мкл клеток для получения концентрации 20 мкг/мл. Планшет инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре, после чего планшет центрифугировали и трижды промывали. Использовали конъюгированное с Alexa Fluor 488 козье антитело F(ab')₂ к IgG человека (Life Technologies, кат. № H10120) в разведении 1 к 250 для обнаружения в буфере для анализа, 50 мкл добавляли к клеткам и через один час инкубации при комнатной температуре клетки центрифугировали и промывали, как и ранее, фиксировали 7,5% формальдегидом и анализировали на проточном цитометре, при этом анализ данных проводили с помощью FlowJo.

Пример 1. Конструкция и получение гуманизированных антител.

Несколько вариантов гуманизированных антител к альфа-2-субъединице рецептора интерлейкина-13 (IL13Rα2) были созданы на основе мышиного антитела к IL13Rα2 "Клон 47". Последовательности варибельной области тяжелой и легкой цепи мышиного "Клона 47" представляют собой SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно. Их сравнивали с базой данных варибельных фрагментов человека, и для прививания CDR отбирали каркасные области человека с наивысшей гомологией с Клоном 47 по Вернье и каноническим остаткам.

Для гуманизации VH для прививания CDR были выбраны каркасные области IGHV1-3 и IGHJ1-01. Треонин T30 в исходном человеческой каркасной области IGHV1-3 был заменен серином S30, который также очень часто встречается в этом положении в зародышевых линиях человека и который соответствует серину, обнаруженному в этом положении в мышинной последовательности VH. Полученный гуманизированный домен VH (SEQ ID NO: 3) был обозначен как "VHA Клона 47".

Дополнительные гуманизированные версии VH Клона 47 были созданы путем введения обратных мутаций в последовательность "VHA Клона 47" (SEQ ID NO: 3). Эти гуманизированные домены VH были обозначены как "VHAback Клона 47" (SEQ ID NO: 5), "VHA1 Клон 47" (SEQ ID NO: 6), "VHA2 Клон 47" (SEQ ID NO: 7) и "VHA3 Клон 47" (SEQ ID NO: 8). Варианты "VHA1 Клона 47", "VHA2 Клона 47" и "VHA3 Клона 47" были созданы для оценки влияния остатков мышиных VCI M48, V71 и K73, соответственно (нумерация по Kabat).

Для гуманизации VL для прививания CDR были выбраны каркасные области IGKV3 -NL5 и IGHJ2-01. Полученный гуманизированный домен VL (SEQ ID NO: 4) был обозначен как "VKA Клона 47".

Дополнительные гуманизированные версии VL Клона 47 были созданы путем введения обратных мутаций в последовательность "VKA Клона 47" (SEQ ID NO: 4). Эти гуманизированные домены VL были обозначены как "VKAback Клона 47" (SEQ ID NO: 9), "VKA1 Клона 47" (SEQ ID NO: 10) и "VKA2 Клона 47" (SEQ ID NO: 11). Варианты "VKA1 Клона 47" и "VKA2 Клона 47" были созданы для оценки влияния двух мышиных остатков фенилаланина VCI F36 и F87, которые оба являются остатками тирозина в зародышевой линии человека.

Каждый из полученных вариантов легкой и тяжелой цепей клонировали и объединяли в пары, трансфицировали в клетки Expi293, экспрессировали и очищали. В табл. 1 показаны уровни экспрессии и выходы антител при совместной транзистентной трансфекции конструкций тяжелой и легкой цепей в клетках Expi293. Получали 3 мл очищенных антител. Клоны, отмеченные (*), имели уровень экспрессии более 200 мкг/мл и были отобраны для дальнейшего анализа.

Таблица 1. Экспрессия гуманизированных вариантов

Конструкция VH	Конструкция VK	IgG, мкг/мл	Выход (мг)
VHA Клона 47*	VKA Клона 47	281	0,843
VHA Клона 47	VKAback Клона 47	175	0,525
VHA Клона 47*	VKA1 Клона 47	231	0,693
VHA Клона 47*	VKA2 Клона 47	300	0,900
VHAback Клона 47*	VKA Клона 47	312	0,936
VHAback Клона 47	VKAback Клона 47	100	0,300
VHAback Клона 47*	VKA1 Клона 47	243	0,729
VHAback Клона 47*	VKA2 Клона 47	212	0,636
VHA1 Клона 47	VKA Клона 47	175	0,525
VHA1 Клона 47	VKAback Клона 47	112	0,336
VHA1 Клона 47	VKA1 Клона 47	175	0,525
VHA1 Клона 47	VKA2 Клона 47	143	0,429
VHA2 Клона 47	VKA Клона 47	187	0,561
VHA2 Клона 47	VKAback Клона 47	131	0,393
VHA2 Клона 47	VKA1 Клона 47	187	0,561
VHA2 Клона 47	VKA2 Клона 47	168	0,504
VHA3 Клона 47	VKA Клона 47	156	0,468
VHA3 Клона 47	VKAback Клона 47	137	0,411
VHA3 Клона 47	VKA1 Клона 47	81	0,243
VHA3 Клона 47*	VKA2 Клона 47	200	0,600

Связывание каждого гуманизированного Клона с IL13R α 2 оценивали с помощью ELISA. Все протестированные Клоны оказались сходными по своему связыванию с IL13R α 2.

Пример 2. Характеристика гуманизированных антител.

Аффинность связывания химерного (Химер.) Клона 47 и выбранных гуманизированных вариантов с человеческим IL13R α 2 измеряли на Biacore. Результаты приведены в таблице 2 ниже. Кажущаяся аффинность показывает, что гуманизированные варианты демонстрируют улучшенное связывание с человеческим IL13R α 2 по сравнению с химерным (Химер.) Клоном 47.

Таблица 2

Варианты	K_{ass} (1/М*с)	K_{diss} (1/с)	K_D App (нМ)
Химер. Клон 47	$1,25 \times 10^5$	$6,58 \times 10^{-5}$	0,53
VNA/VKA	$1,12 \times 10^5$	$1,12 \times 10^{-5}$	0,10
VNA/VKA1	$1,24 \times 10^5$	$2,65 \times 10^{-5}$	0,21
VNA/VKA2	$1,31 \times 10^5$	$8,20 \times 10^{-6}$	0,06
VNAback/VKA	$1,15 \times 10^5$	$5,30 \times 10^{-6}$	0,05

Стабильность химерного Клона 47 и некоторых гуманизированных вариантов оценивали с помощью анализа теплового сдвига и температурной стабильности белка при 37°C по сравнению с 4°C в течение 8 дней. Результаты приведены в табл. 3 ниже. Отобранные гуманизированные варианты, подвергнутые воздействию стрессовых условий, демонстрируют стабильность, сравнимую с химерным Клоном 47.

Таблица 3

Клоны	PTS, T _m	8-дневная стабильность (PBS)					
		4°C			37°C		
		SEC	ОФ	ХГВ	SEC	ОФ	ХГВ
Химер. Клон 47	71,4	4,86/97,0	3,80/3,48	2,19	4,88/84,9	3,80/3,47	2,19
VNA/VKA	73,1	4,84/96,8	3,79/3,42	2,18	4,85/89,6	3,79/3,41	2,18
VNA/VKA1	70,3	4,84/96,6	3,79/3,45	2,19	4,84/89,2	3,79/3,55	2,18
VNA/VKA2	72,0	4,87/93,0	3,78/3,52	2,19	4,85/92,6	3,78/3,53	2,18
VNAback/VKA	74,1	4,82/97,3	3,78/3,40	2,19	4,83/93,1	3,78/3,39	2,18
VNAback/VKA1	72,3	4,82/97,8	3,79/3,43	2,19	4,83/91,2	3,80/3,54	2,19
VNA3/VKA2	71,9	4,83/97,5	3,76/3,42	2,19	4,84/92,1	3,75/3,52	2,19

Тепловой сдвиг белка (PTS): средняя T_m в °C (четыре повторности) ЭХ: время элюирования (мин)/% мономера ОФ: время удерживания HC/LC (мин) ХГВ: время удерживания (мин).

Связывание вариантов, перечисленных в табл. 3, с IL13Rα2 также оценивали с помощью ELISA после инкубации при 4°C или 45°C в течение 8 дней. Как показано в табл. 4, среди протестированных вариантов только вариант VNA/VKA не показал снижения связывания в условиях стресса (инкубация при 45°C в течение 8 дней), что указывает на то, что он является наиболее стабильным. Эти данные о связывании также указывают на то, что гуманизированные варианты VNAback/VKA и VNA3/VKA2 обладают улучшенными свойствами стабильности по сравнению с химерным Клоном 47.

Таблица 4

Варианты Клона 47	ЕС ₅₀ 45°C (нг/мл)	ЕС ₅₀ 4°C (нг/мл)
Химер. Клон 47	16,8	77,7
VNA/VKA	18,4	17,8
VNA/VKA1	12,3	58,1
VNA/VKA2	20,4	147,9
VNAback/VKA	16,4	45,6
VNAback/VKA1	12,8	1012,0
VNA3/VKA2	12,3	25,8

Основываясь на этих данных, вариант VNA/VKA (полностью человеческий, без введенных обратных мутаций мыши), содержащий VH из SEQ ID NO: 3 и VL из SEQ ID NO: 4, является наиболее эффективным. Это гуманизированное антитело к IL13Rα2 было обозначено как "HuCL47".

Сравнение последовательности мышинового "Клона 47" и "HuCL47" показано на фиг. 1.

Пример 3. Теоретическая pI антител к IL13Rα2.

Теоретические значения pI некоторых антител к IL13Rα2, описанных выше, рассчитывали на основе их последовательностей тяжелой и легкой цепей с использованием инструмента "ProtParam", доступного по адресу <https://web.expasy.org/protparam/>. Результаты представлены в табл. 5.

Таблица 5

Антитело	Последовательности VH/VL	pI
Химер. Клон 47	SEQ ID NO: 1 / SEQ ID NO: 2	6,95
VHA/VKA (HuCL47)	SEQ ID NO: 3 / SEQ ID NO: 4	7,63
VHAback/VKAback	SEQ ID NO: 5 / SEQ ID NO: 9	7,64
VHA1/VKA1	SEQ ID NO: 6 / SEQ ID NO: 10	7,64
VHA2/VKA2	SEQ ID NO: 7 / SEQ ID NO: 11	7,28

Пример 4. Сравнение клона 47 и HuCL47.

Химерный Клон 47 и HuCL47 сравнивали по их связыванию с клетками NCI-H1299 с помощью стандартного анализа методом FACS с использованием клеток NCI-H1299 и немодифицированных очищенных антител. Анализ цитотоксичности *in vitro* проводили на клетках A375 и NCI-1299 с использованием активной нагрузки в виде димера пирролобензодиазепина (PBD), который конъюгирован с химерным Клоном 47 и HuCL47.

Результаты показаны на: фиг. 2 (связывание с клетками NCI-H1299), фиг. 3 (связывание с IL13R α 2), табл. 6 (цитотоксичность по отношению к клеткам NCI-H1299) и табл. 7 (цитотоксичность по отношению к клеткам A-375).

Таблица 6

ADC	EC ₅₀ (нМ)
Химерный Клон 47-PBD	135,3
VHA/VKA (HuCL47)- PBD	113,7
B12-PBD	12400

Таблица 7

ADC	EC ₅₀ (нМ)
Химерный Клон 47-PBD	7,6
VHA/VKA (HuCL47)- PBD	7,8
B12-PBD	6864

Список литературных источников.

Выше цитируется ряд публикаций для более полного описания и раскрытия изобретения и уровня техники, к которому относится данное изобретение. Каждая из этих ссылок включена в данный документ в полном объеме.

Стандартные методы молекулярной биологии см. в Sambrook, J., Russel, D.W. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. 3 ed. 2001, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

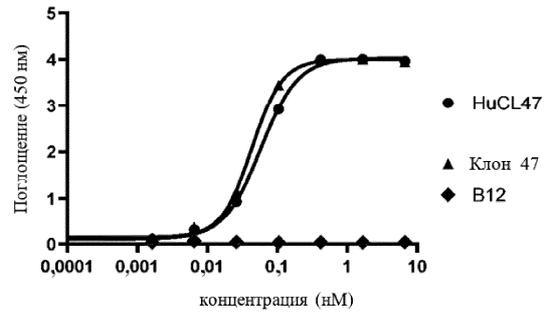
1. Антитело, которое связывается с альфа-2-субъединицей рецептора интерлейкина-13 (IL13R α 2), причем антитело содержит переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 3, и переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность, приведенную в SEQ ID NO: 4.

2. Антитело по п.1, отличающееся тем, что антитело связывает IL13R α 2 с аффинностью (K_D) не выше 5×10^{-10} М, например не выше $2,5 \times 10^{-10}$ М или не выше $1,5 \times 10^{-10}$ М.

3. Антитело по п.1 или 2, отличающееся тем, что антитело конкурентно ингибирует связывание с IL13R α 2 антитела, содержащего переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и необязательно константную область антитела.

4. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что антитело связывает IL13R α 2 с более высокой аффинностью (KD), чем антитело, содержащее переменную область тяжелой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 1, и переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 2, и необязательно константную область антитела.

5. Антитело по любому из предшествующих пунктов, отличающееся тем, что антитело имеет им-



Фиг. 3