

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202490839 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.07.23

(22) Дата подачи заявки
2021.09.29

(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)
A61K 35/17 (2015.01)
A61K 39/00 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 47/68 (2017.01)
A61K 51/10 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
C12N 15/62 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
C12P 21/00 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(54) ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К EGFRvIII И ИХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ

(86) PCT/IB2021/058954

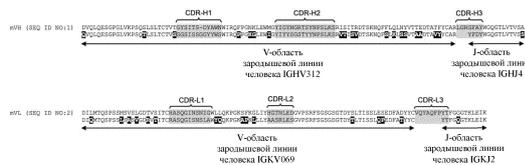
(87) WO 2023/052816 2023.04.06

(71) Заявитель:
НЭШНЛ РИСЕЧ КАУНСИЛ ОФ
КАНАДА (СА)

(72) Изобретатель:
Марсил Энн, Харамильо Мария,
Сулера Траян, Морено Мария, У
Цуньлэ (СА)

(74) Представитель:
Нилова М.И. (RU)

(57) Предложены антигенсвязывающие агенты, такие как гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII). EGFRvIII-специфические гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты могут применяться для лечения рака.



A1

202490839

202490839

A1

ГУМАНИЗИРОВАННЫЕ АНТИТЕЛА К EGFRvIII И ИХ АНТИГЕНСВЯЗЫВАЮЩИЕ ФРАГМЕНТЫ

ОБЛАСТЬ ТЕХНИКИ

Настоящее изобретение относится к гуманизированным антигенсвязывающим агентам, таким как антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII). EGFRvIII-специфические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут применяться, например, для лечения рака, в форме конъюгатов антитела и лекарственного средства, радиоиммуноконъюгатов, химерных антигенных рецепторов (CAR) и биспецифических рекрутеров Т-клеток (BiTE), нацеленных на клетки, экспрессирующие EGFRvIII.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

Вариант III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII) амплифицируется, экспрессируется на высоком уровне и присутствует в 25-64% мультиформной глиобластомы (GBM). Следует отметить, что различные методы детектирования дали противоречивые результаты, но экспрессия мРНК и белка EGFRvIII была обнаружена в подмножестве карцином молочной железы, а также в плоскоклеточной карциноме головы и шеи (HNSCC) с использованием нескольких дополнительных методик (см. обзор в Gan et al 2013). В отличие от рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) дикого типа (wt), который экспрессируется в тканях эпителиального, мезенхимального и нейрального происхождения и играет основную роль в нормальных клеточных процессах, таких как пролиферация, дифференцировка и развитие, EGFRvIII не экспрессируется на нормальных тканях.

Вариант EGFRvIII образуется в результате делеции внутри рамки считывания экзонов 2-7 гена EGFR, что приводит к удалению последовательности, кодирующей 267 аминокислотных остатков внеклеточного домена. Вновь образованная граница сплайсинга кодирует остаток глицина, который не имеет аналога в человеческом EGFR дикого типа и, следовательно, образует неопитоп. Более того, многочисленные исследования показали, что нормальные ткани лишены EGFRvIII. Таким образом, EGFRvIII содержит новый эпитоп клеточной поверхности, специфический для опухоли, который может быть использован для таргетной терапии антителами. Однако неопитоп EGFRvIII не очень иммуногенен по сравнению с остальной человеческой последовательностью, и многие из антител, полученных на сегодняшний день, не продемонстрировали специфического распознавания EGFRvIII (рассмотрено в Gan et al 2013).

В редких случаях были раскрыты моноклональные антитела (mAb), направленные против неопитопа EGFRvIII, включая антитело 13.1.2 (патент США № 7736644), которое также разрабатывается в форме конъюгата антитела и лекарственного средства (ADC) компанией Amgen (AMG 595: Hamblett K.J, et al., Molecular Cancer Therapeutics, Vol. 14(7), pp.1614-24, 2015). В патенте США № 9562102 также раскрыто антитело 806, разработанное Abbvie (ABT-806, ABT-414), которое связывается с EGFRvIII, а также подгруппой амплифицированного EGFR на опухолевых клетках, сверхэкспрессирующих EGFR (Cleary, JM et al., Invest New Drugs, 33(3), pp. 671-8, 2015; Reilly, EB., Molecular Cancer Therapeutics, Vol. 14(5), pp.1141-51, 2015). Хотя было показано, что это антитело предпочтительно связывается с опухолевым EGFR в доклинических моделях, было показано, что связывание этого антитела с EGFR дикого типа, присутствующего в коже человека, отвечает за токсичность в отношении кожи, которую ABT-806 проявляет у некоторых пациентов (Cleary et al 2015).

Гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, специфически нацеленные на эпитоп EGFRvIII, который отсутствует или недоступен в клетках, экспрессирующих EGFR, были бы полезны для улучшенных терапевтических средств (т. е. противораковых терапевтических средств).

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Предложены антигенсвязывающие агенты, такие как гуманизированные антитела или их гуманизированные антигенсвязывающие фрагменты, которые специфически связываются с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII).

Как описано более подробно ниже, некоторые гуманизированные антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты могут связываться с EGFRvIII на поверхности раковых клеток (например, клеток глиобластомы). В некоторых вариантах реализации гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты не связываются существенно с EGFR, экспрессируемым на раковых клетках (например, U87MG-EGFR WT).

Гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут интернализироваться раковыми клетками и, таким образом, могут применяться в одном из аспектов для доставки молекул нагрузки. В частности, предусмотрены гуманизированные антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты, которые конъюгированы с терапевтическими фрагментами. Гуманизированные антитела к EGFRvIII, раскрытые в настоящем документе, могут применяться для ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих EGFRvIII.

В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения гуманизированные антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты могут быть способны связываться с эпитопом, присутствующим как в нативном EGFRvIII (например, нативном рекомбинантном EGFRvIII), так и в денатурированном EGFRvIII (например, в денатурированном рекомбинантном EGFRvIII).

Варианты реализации изобретения включают, в частности, гуманизированные антитела к EGFRvIII или их антигенсвязывающие фрагменты, содержащие определяющую комплементарность область (CDR) антитела 4E11 к EGFRvIII.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий агент, его антигенсвязывающий домен, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), где указанный антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWIRQPPGKGLEWX₁GY
IGYNGRTSYNPSLKSRX₂TISX₃DTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCARLGRGF
AYWGQGTLLTVSS (SEQ ID NO: 3), где X₁ = I или M, X₂ = V или I, и X₃ = V
или R; и,

вариабельную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWX₄QKPKGKAX₅KX₆LIYHG
TNLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKL
EIK (SEQ ID NO: 4), где X₄ = Y или L, X₅ = P или F и X₆ = L или G.

В некоторых вариантах реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

вариабельную последовательность тяжелой цепи, выбранную из любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7; и

вариабельную последовательность легкой цепи, выбранную из любой из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

В одном из вариантов реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерный антигенный рецептор, биспецифический рекрутер Т-клеток, биспецифический рекрутер

клеток-киллеров, триспецифический рекрутер клеток-киллеров или любое иммунотерапевтическое соединение, такое как конъюгат антитела и лекарственного средства (ADC) или соединение, используемое для детектирования, такое как радиоиммуноконъюгат.

5 В одном из вариантов реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, антитело человека, одноцепочечное антитело или мультиспецифическое антитело. В одном из вариантов реализации антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG человека. В одном из вариантов реализации антитело или его
10 антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека.

В одном из вариантов реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека, несущую мутацию S228P.

15 В одном из вариантов реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент специфически связывается с EGFRvIII, где указанный антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи, где:

20 последовательность тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15; и

последовательность легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18.

В одном из вариантов реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

25 В одном из вариантов реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связан с молекулой нагрузки. В одном из вариантов реализации молекула нагрузки включает терапевтический фрагмент. В некоторых вариантах реализации терапевтический фрагмент включает цитотоксический агент, цитостатический агент, противораковый агент или радиотерапевтический агент. В некоторых
30 вариантах реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с детектируемым фрагментом.

В одном из вариантов реализации предложена фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или

антигенсвязывающий фрагмент согласно настоящему изобретению и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент (вспомогательное вещество).

5 В одном из вариантов реализации предложена молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению.

В одном из вариантов реализации предложен набор, содержащий по меньшей мере одно из антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению.

10 В одном из вариантов реализации предложен вектор или набор векторов, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. В одном из вариантов реализации предложена выделенная клетка, содержащая указанный вектор или
15 набор векторов. Согласно некоторым вариантам реализации выделенная клетка способна экспрессировать, собирать и/или секретировать антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Также предложен набор, содержащий первый сосуд, содержащий нуклеотид или вектор, кодирующий легкую цепь антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего
20 домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, и второй сосуд, содержащий нуклеотид или вектор, кодирующий тяжелую цепь антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению.

Также предложен способ лечения рака, включающего клетки, экспрессирующие
25 EGFRvIII, где указанный способ включает введение антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению нуждающемуся субъекту. В одном из вариантов реализации антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент применяют в комбинации с химиотерапевтическим средством. В одном варианте
30 реализации нуждающийся субъект имеет мультиформную глиобластому или у него подозревается присутствие мультиформную глиобластому, имеет карциному, карциному молочной железы или HNSCC или у него подозревается их наличие.

Также предложен способ детектирования EGFRvIII, включающий приведение в контакт образца, содержащего или предположительно содержащего EGFRvIII, с антигенсвязывающим агентом, антигенсвязывающим доменом, антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из аспектов настоящего изобретения.

5 В одном из вариантов реализации способ получения антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента включает культивирование клетки, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие указанный антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, с получением указанного антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента. В одном из вариантов реализации предложенный способ дополнительно включает конъюгирование антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с молекулой нагрузки. В одном из вариантов реализации молекула нагрузки включает терапевтический или детектируемый фрагмент.

15 Также предложен способ лечения субъекта, имеющего рак, ассоциированный с экспрессией EGFRvIII, включающий введение клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, где указанный антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерный антигенный рецептор, биспецифический рекрутер Т-клеток, биспецифический рекрутер клеток-киллеров или триспецифический рекрутер клеток-киллеров или конъюгат антитела и лекарственного средства. В одном из вариантов реализации нуждающийся субъект имеет или у него подозревают присутствие глиомы, мультиформной глиобластомы, карциномы, карциномы молочной железы, карциномы полости рта или HNSCC. В одном из вариантов реализации предложенный способ включает клетки, которые представляют собой Т-клетки, НК-клетки или иммунные клетки, аутологичные субъекту. В одном из вариантов реализации выделенная клеточная популяция сконструирована для экспрессии антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента согласно настоящему изобретению. В одном из вариантов реализации выделенная клеточная популяция имеет человеческое происхождение. В одном из вариантов реализации выделенная клеточная популяция содержит Т-клетки, клетки-естественные киллеры (НК-клетки), цитотоксические Т-клетки, регуляторные Т-клетки и их комбинации. В одном из вариантов реализации Т-клетки включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или их комбинацию.

В одном из вариантов реализации выделенная клеточная популяция сконструирована для экспрессии другого химерного антигенного рецептора, обладающего аффинностью к другому антигену той же мишени или другой мишени. В одном из вариантов реализации выделенная клеточная популяция содержит иммунные клетки хозяина.

5 Предложена фармацевтическая композиция, содержащая выделенную клеточную популяцию и фармацевтически приемлемый буфер или эксципиент.

В соответствии с настоящим изобретением гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может иметь, например, аффинность менее 100 нМ, например, аффинность 50 нМ или менее, 20 нМ или менее, 10 нМ или менее, 5 нМ или менее и т. д.

10 Варианты реализации настоящего изобретения включают гуманизованные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты, которые могут содержать константную область IgG человека. Гуманизованные антитела или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут содержать, например, без ограничения указанным, константную область IgG1 человека, константную область IgG2 человека или константную область IgG4 человека.

15 В соответствии с настоящим изобретением гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой полноразмерное антитело IgG, одноцепочечное антитело или мультиспецифическое антитело (например, биспецифическое антитело).

20 Биспецифические антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению включают те, которые могут включать первое плечо, которое специфически связывается с первым эпитопом EGFRvIII человека, и второе плечо, которое специфически связывается со вторым (не перекрывающимся) эпитопом EGFRvIII человека (например, бипаратопическое антитело).

25 Дополнительные варианты реализации биспецифических антител или их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению включают те, которые могут включать первое плечо, которое специфически связывается с первым эпитопом EGFRvIII человека, и второе плечо, которое специфически связывается с другим антигеном.

30 Биспецифическое антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению включают рекрутеры биспецифических иммунных клеток, такие как те, которые включают первое плечо, которое специфически связывается с EGFRvIII человека, и второе плечо, которое специфически связывается с CD3.

Согласно настоящему изобретению антигенсвязывающий фрагмент содержит, например, scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к гуманизированным антителам к EGFRvIII или их антигенсвязывающим фрагментам, которые могут быть связаны с молекулой нагрузки.

5 Согласно настоящему изобретению молекула нагрузки может включать терапевтический фрагмент, такой как, например, цитотоксический агент, цитостатический агент, противораковый агент или радиотерапевтический агент. В конкретных вариантах реализации изобретения конъюгаты антитела и лекарственного средства могут содержать цитотоксический агент. Другой конкретный вариант реализации изобретения относится к конъюгатам антитела и лекарственного средства, включающим лучевую терапию.

10 В соответствии с настоящим изобретением молекула нагрузки может включать детектируемый фрагмент.

Гуманизированные антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть представлены в форме фармацевтических композиций. Фармацевтическая композиция может содержать, например, фармацевтически приемлемый
15 носитель, разбавитель или эксципиент.

В соответствии с настоящим изобретением дополнительно предложены молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе.

20 В другом аспекте настоящего изобретения предложен набор, содержащий по меньшей мере одно из гуманизованного антитела или его антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к вектору или набору векторов, которые могут включать нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область
25 легкой цепи, и переменную область тяжелой цепи гуманизованного антитела или антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе. Нуклеиновые кислоты, кодирующие переменную область легкой цепи или легкую цепь и переменную область тяжелой цепи или тяжелую цепь, могут быть представлены на одном и том же векторе или на отдельных векторах.

30 Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к выделенным клеткам, содержащим вектор или набор векторов, описанных в настоящем документе. Выделенные клетки могут быть способны экспрессировать, собирать и/или секретировать гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к набору, содержащему первый сосуд, содержащий нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий легкую цепь гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению, и второй сосуд, содержащий нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий
5 тяжелую цепь гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к способу лечения рака, который содержит клетки (например, опухолевые клетки), экспрессирующие EGFRvIII. Способ может включать введение гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего
10 фрагмента, описанных в настоящем документе, нуждающемуся субъекту. В частности, в способах лечения предусмотрены антитело или антигенсвязывающие фрагменты, которые конъюгированы с терапевтическим фрагментом (ADC).

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, при
15 лечении рака.

Настоящее изобретение дополнительно относится к применению гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, описанных в настоящем документе, при
20 изготовлении лекарственного средства для лечения рака.

В соответствии с настоящим изобретением гуманизированное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент можно применять в комбинации с химиотерапевтическим
25 средством.

В соответствии с настоящим изобретением нуждающийся субъект имеет или у него подозревают присутствие мультиформной глиобластомы.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением нуждающийся субъект имеет или у него подозревают присутствие карциномы.

Другие аспекты настоящего изобретения относятся к способу детектирования EGFRvIII. Указанный способ может включать приведение в контакт образца, содержащего или
25 предположительно содержащего EGFRvIII, с гуманизированным антителом или антигенсвязывающим фрагментом, раскрытыми в настоящем документе.

Дополнительные аспекты настоящего изобретения относятся к способу получения
30 гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению путем культивирования клетки, содержащей нуклеиновые кислоты или векторы, кодирующие гуманизированное антитело или антигенсвязывающий фрагмент, с получением гуманизированного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента. Таким образом,

указанное гуманизованное антитело или его антигенсвязывающий фрагмент может быть выделено и/или очищено.

Способ может дополнительно включать конъюгирование гуманизованного антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с молекулой нагрузки, такой как, например, терапевтический фрагмент.

Дополнительный объем, возможности применения и преимущества изобретения будут понятны из неограничивающего подробного описания изобретения, приведенного ниже. Однако следует понимать, что это подробное описание, хотя и раскрывает иллюстративные варианты реализации изобретения, приведено только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

На фиг. 1 представлены выравнивания последовательностей отобранных последовательностей V-области и J-области зародышевой линии человека из базы данных VBASE2 (Retter et al, 2005), использованных для гуманизации последовательности мышинной переменной области тяжелой цепи (mVH) 4E11 (SEQ ID NO: 1) и последовательности мышинной переменной области легкой цепи (mVL) 4E11 (SEQ ID NO: 2).

На фиг. 2 представлена трехмерная модель переменной области мышиного антитела 4E11. Тяжелая цепь окрашена в черный цвет, а легкая цепь окрашена в серый цвет. CDR показана сеткой на молекулярной поверхности, и отмечены петли CDR. Стрелки указывают на шаростержневые модели, которые выделяют 6 положений в каркасной области, которые были выбраны для обратных мутаций в некоторых гуманизованных вариантах (то есть, вид аминокислоты, сохраненный как в мышинной последовательности, как помечено).

На фиг. 3 А-В представлены выравнивания последовательностей между гуманизованными переменными областями тяжелой цепи (SEQ ID NO: 5, 6 и 7) антитела 4E11 (Фиг. 3А) и между гуманизованными переменными областями легкой цепи (SEQ ID NO: 8, 9 и 10) антитела 4E11 (Фиг. 3В). Гуманизованные переменные области тяжелой цепи указаны на фиг. 3А и в настоящем описании как hVH1, hVH2 и hVH3. Петли CDR изображены в соответствии с определением по Kabat, за исключением CDR-H1, которая изображена путем объединения определений по Kabat и по Chotia. Гуманизованные переменные области легкой цепи указаны на фиг. 3В и в настоящем описании как hVL1, hVL2 и hVL3. Для некоторых гуманизованных последовательностей обратные мутации родительских аминокислотных остатков, находящихся в этих положениях в мышинном

антитела 4E11, выделены белыми буквами на черном фоне. Положения с обратной мутацией помечены и обозначены стрелками над выравниванием последовательности.

На фиг. 4 показаны наложенные термограммы, определенные с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии для химерного антитела 4E11 (сН-сL) и 9 гуманизированных вариантов по настоящему изобретению. Смотрите Таблицу 1 для соответствующих температур плавления (T_m), полученных путем интегрирования отдельных термограмм для каждого варианта. Гуманизированные варианты легкой цепи обозначены как hL1, hL2 и hL3. Гуманизированные варианты тяжелой цепи обозначены как hH1, hH2 и hH3. Для ясности, hVH1, hVH2, hVH3 относятся к переменным областям тяжелой цепи, а hVL1, hVL2, hVL3 относятся к переменным областям легкой цепи. При этом hH1, hH2 и hH3 относятся к тяжелой цепи, содержащей соответствующую переменную область тяжелой цепи. Например, hH1 = hVH1 и константные области тяжелой цепи, например, hH1 представляет собой hVH1 + CH1 + CH2 + CH3. Аналогично, hVL1, hVL2, hVL3 относятся к переменным областям легкой цепи, тогда как hL1, hL2 и hL3 относятся к легкой цепи, содержащей соответствующую переменную область легкой цепи. Например, hL1 содержит hVL1 и константную область легкой цепи, например, hL1 = hVL1 + константная область легкой цепи.

На фиг. 5 показаны кривые доза-ответ, полученные из данных проточной цитометрии очищенных человеческих и химерных антител 4E11 на клеточных линиях глиобластомы U87MG, сверхэкспрессирующих EGFR vIII (U87MG EGFR vIII).

На фиг. 6 показаны кривые доза-ответ, полученные из данных проточной цитометрии отдельных очищенных человеческих и химерных антител 4E11 на клеточных линиях глиобластомы U87MG, сверхэкспрессирующих EGFR дикого типа (U87MG EGFR wt).

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

В настоящем документе термин "EGFRvIII" относится к варианту III рецептора эпидермального фактора роста. Термины "EGFRvIII" и "vIII" используются взаимозаменяемо.

В настоящем документе термин "EGFR" относится к рецептору эпидермального фактора роста человека. Термины "wt EGFR", "WT EGFR", "EGFR WT" или "EGFR wt" используются взаимозаменяемо и относятся к EGFR дикого типа.

Использование терминов в единственном числе и подобные отсылки в контексте описания изобретения (особенно в контексте формулы изобретения) следует толковать как включающие и единственное, и множественное число, если обратное не указано в настоящем документе и если это не находится в явном противоречии с контекстом.

Если специально не указано или не очевидно из контекста, в настоящем документе термин "или" следует понимать как включающий и охватывающий как "или", так и "и".

В настоящем документе термин "и/или" следует рассматривать как конкретное раскрытие каждого из указанных признаков или компонентов с другим или без него.

5 Термины "содержащий", "имеющий", "включающий" и "включающий в себя" следует толковать как неограничивающие термины (т. е. означающие "включая, без ограничения указанным"), если не указано иное. Термин "состоящий из" следует толковать как ограничивающий.

10 В настоящем документе термин "нативный" в отношении белка, такого как EGFRvIII или EGFR, относится к природной конформации белка и включает белки, которые должным образом свернуты и/или функциональны.

В настоящем документе термин "денатурированный" в отношении белка, такого как EGFRvIII или EGFR, относится к белку, который потерял свою естественную конформацию и может подразумевать, например, потерю третичной и вторичной структуры.

15 В настоящем описании выражение "пептид, содержащий или состоящий из фрагмента EGFRvIII" означает, что пептид может содержать часть, отличную от фрагмента EGFRvIII, или что он состоит из фрагмента EGFRvIII.

20 В настоящем документе термин "связывает" или "связывающий" для нацеливающего фрагмента означает по меньшей мере временное взаимодействие или ассоциацию с молекулой-мишенью, например, с EGFRvIII человека и/или мутантным вариантом EGFRvIII, например, раскрытым в настоящем документе.

В настоящем документе термин "связывается с эпитопом, содержащим аминокислотные остатки" означает, что аминокислотный остаток либо является частью эпитопа, либо что он необходим для связывания антитела.

25 В настоящем документе термин "не связывается с" пептидом или белком означает, что антитело или антигенсвязывающий фрагмент а) не связывается в значимой степени с пептидом или белком при рекомбинантной экспрессии или в клетках, б) не наблюдается детектируемого связывания, с) имеет характеристики связывания, близкие к антителу отрицательного контроля, d) не связывается специфически или e) связывается со значением от 0% до 15%,
30 определенным в экспериментах проточной цитометрии.

В настоящем документе термин "аутологичный" относится к материалу, полученному от одного и того же индивидуума.

В настоящем документе термин "антигенсвязывающий домен" относится к домену антитела или антигенсвязывающего фрагмента, который обеспечивает специфическое связывание с антигеном.

В настоящем документе термин "антитело" охватывает моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизированное антитело, химерное антитело, человеческое антитело, однодоменное антитело (такое как V_{HH}, V_H, V_L, нанотело или любое однодоменное антитело верблюда или ламы), мультиспецифическое антитело (например, биспецифические антитела) и т. д. Термин "антитело" охватывает молекулы, которые имеют формат, аналогичный формату, встречающемуся в природе (например, IgG человека и т. д.). В настоящем документе термин "антитело", также называемый в данной области техники "иммуноглобулином" (Ig), относится к белку, сконструированному из парных тяжелых и легких полипептидных цепей; существуют различные изоформы Ig, включая IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. Когда антитело правильно свернуто, каждая цепь сворачивается в ряд различных глобулярных доменов, соединенных более линейными полипептидными последовательностями. Например, легкая цепь иммуноглобулина сворачивается в переменный (V_L) и константный (C_L) домен, в то время как тяжелая цепь сворачивается в переменный (V_H) и три константных (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) домена. Взаимодействие переменных доменов тяжелой и легкой цепей (V_H и V_L) приводит к образованию антигенсвязывающей области (F_v). Каждый домен имеет хорошо установленную структуру, известную специалистам в данной области техники.

Обычно антитело составлено из спаренных двух легких цепей и двух тяжелых цепей. Существуют различные изоформы антител, включая IgA, IgD, IgE, IgG и IgM. IgG человека дополнительно делятся на четыре отдельные подгруппы, а именно: IgG1, IgG2, IgG3 и IgG4. Терапевтические антитела обычно разрабатывают в форме IgG1, IgG2 или IgG4.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может содержать, например, константную область IgG4 человека или его фрагмент. В иллюстративных вариантах реализации антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению может содержать, например, константную область IgG4 человека, несущую мутацию S228P, или его фрагмент. Также рассматриваются константные области других подтипов антител, включая IgG1 и IgG2 человека, а также другие изоформы.

Каждая из легкой цепи и тяжелой цепи антитела изоформы IgG человека содержит переменную область, имеющую 3 гиперпеременные области, называемые определяющими комплементарность областями (CDR). CDR легкой цепи в настоящем документе обозначаются

как CDRL1, CDRL2 и CDRL3. CDR тяжелой цепи в настоящем документе обозначаются как CDRH1, CDRH2 и CDRH3. Определяющие комплементарность области фланкированы каркасными областями (FR) в порядке: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Вариабельные области легкой и тяжелой цепей отвечают за связывание целевого антигена и, соответственно, могут демонстрировать значительное разнообразие последовательностей между антителами. Константные области демонстрируют меньшее разнообразие последовательностей и отвечают за связывание ряда природных белков для инициации важных биохимических событий. Вариабельная область антитела содержит антигенсвязывающие детерминанты молекулы и, таким образом, определяет специфичность антитела к его антигену-мишени. Большая часть вариабельности последовательностей имеет место в CDR, которые совместно образуют антигенсвязывающий сайт и вносят вклад в связывание и распознавание антигенной детерминанты. Каркасные области могут играть роль в правильном позиционировании и выравнивании в трех измерениях CDR для оптимального связывания антигена. Специфичность и аффинность антитела к его антигену определяется структурой гипервариабельных областей, а также их размером, формой и химическим составом поверхности, которую они презентуют антигену. Существуют различные схемы для идентификации областей гипервариабельности, наиболее распространенными из которых являются схемы Kabat и Chotia и Lesk. Kabat и др. (1991) определяют "определяющие комплементарность области" (CDR) на основе вариабельности последовательностей в антигенсвязывающих областях доменов VH и VL. Chotia и Lesk (1987) определяют "гипервариабельные петли" (H или L) на основе расположения структурных петлевых областей в доменах VH и VL. Эти отдельные схемы определяют области CDR и гипервариабельной петли, которые являются смежными или перекрывающимися, специалисты в области антител часто используют термины "CDR" и "гипервариабельная петля" взаимозаменяемо, и они могут использоваться таким образом в данном документе. CDR/петли идентифицируются в настоящем документе в соответствии со схемой по Kabat, за исключением петель CDRH1, которые описываются путем объединения определений по Kabat и по Chotia.

В настоящем документе "существенная идентичность" или "по существу идентичны" означает полипептидную последовательность, которая имеет ту же полипептидную последовательность, соответственно, что и референсная последовательность, или имеет указанный процент аминокислотных остатков, соответственно, которые одинаковы в соответствующем положении в референсной последовательности, когда две

последовательности оптимально выровнены. Например, аминокислотная последовательность, которая "по существу идентична" референсной последовательности, по меньшей мере на 50%, 60%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентична референсной аминокислотной последовательности. Для полипептидов длина последовательностей сравнения, Обычно составляет по меньшей мере 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 50, 75, 90, 100, 150, 200, 250, 300 или 350 смежных аминокислот (например, полноразмерная последовательность). Идентичность последовательностей может быть измерена с использованием программного обеспечения для анализа последовательностей при настройках по умолчанию (например, пакет программного обеспечения для анализа последовательностей Genetics Computer Group, University of Wisconsin Biotechnology Center, 1710 University Avenue, Madison, WI 53705). Такое программное обеспечение может сопоставлять аналогичные последовательности путем присвоения степеней гомологии различным заменам, делециям и другим модификациям.

Технология рекомбинантной ДНК в настоящее время позволяет разрабатывать различные форматы антител, такие как одноцепочечные антитела (например, однодоменные), диатело, минитело, нанотело и т. п., которые включены в настоящее изобретение.

"Антигенсвязывающий фрагмент" в настоящем описании, может включать любой подходящий антигенсвязывающий фрагмент, известный в данной области техники. Антигенсвязывающий фрагмент может представлять собой природный фрагмент или может быть получен путем манипуляций с природным антителом или с использованием рекомбинантных способов. Например, фрагмент антитела может включать, но не ограничивается перечисленными, Fv, одноцепочечный Fv (scFv; молекула, состоящая из VL и VH, соединенная с пептидным линкером), Fab, F(ab')₂, однодоменное антитело (sdAb; фрагмент, состоящий из одной VL или VH) и мультивалентные формы любого из них. Фрагменты антител, такие как раскрытые здесь, могут требовать линкерных последовательностей, дисульфидных связей или другого типа ковалентной связи для связывания различных частей фрагментов; специалисты в данной области техники будут знакомы с требованиями различных типов фрагментов и различных подходов и различных подходов к их конструированию.

Антигенсвязывающие фрагменты антител по настоящему изобретению охватывают молекулы, имеющие антигенсвязывающий сайт, содержащий аминокислотные остатки, которые обеспечивают специфическое связывание с антигеном (например, одну или более CDR).

Иллюстративные варианты реализации раскрытых антигенсвязывающих фрагментов, таким образом, включают, но не ограничиваются перечисленными, (i) фрагмент Fab, одновалентный фрагмент, состоящий из доменов V_L , V_H , C_L и C_{H1} ; (ii) фрагмент $F(ab')_2$, двухвалентный фрагмент, содержащий два фрагмента Fab, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; (iii) фрагмент Fd, состоящий из доменов V_H и C_{H1} ; (iv) фрагмент Fv, состоящий из доменов V_L и V_H одного плеча антитела, (v) фрагмент dAb (Ward et al., (1989) Nature 341:544-546), который состоит из домена V_H ; и (vi) выделенную определяющую комплементарность область (CDR), например, CDR3 V_H .

Конкретные варианты реализации антигенсвязывающих фрагментов могут включать, например, scFv, Fab, Fab' или $(Fab')_2$.

Термин "гуманизованное антитело" охватывает полностью гуманизованное антитело (т. е. каркасные области на 100% гуманизованы) и частично гуманизованное антитело (например, по меньшей мере одна переменная область содержит одну или более аминокислот из человеческого антитела, в то время как другие аминокислоты представляют собой аминокислоты родительского антитела, не являющегося человеческим). Обычно "гуманизованное антитело" содержит CDR родительского антитела, не являющегося человеческим (например, мыши, крысы, кролика, примата, не являющегося человеком, и т. д.) и каркасные области, которые идентичны каркасным областям природного антитела человека или консенсусного антитела человека. В таком случае указанные "гуманизованные антитела" характеризуются как полностью гуманизованные. "Гуманизованное антитело" также может содержать одну или более аминокислотных замен, которые не соответствуют антителу человека или консенсусному антителу человека. Такие замены включают, например, обратные мутации (например, повторное введение аминокислот, отличных от человеческих), которые могут сохранять характеристики антитела (например, аффинность, специфичность и т. д.). Такие замены обычно находятся в каркасной области. "Гуманизованное антитело" обычно также содержит константную область (Fc), которая обычно является константной областью антитела человека. Обычно константная область "гуманизованного антитела" идентична константной области антитела человека. Гуманизованное антитело может быть получено путем пересадки CDR (Tsurushita et al, 2005; Jones et al, 1986; Tempest et al, 1991; Riechmann et al, 1988; Queen et al, 1989). Такое антитело считается полностью гуманизованным.

Термин "химерное антитело" относится к антителу, константная область которого имеет происхождение, отличное от происхождения родительского антитела. Термин "химерное антитело" охватывает антитела, имеющие человеческую константную область. Обычно

"химерное антитело" состоит из переменных областей, происходящих из мышиного антитела, и человеческой константной области.

5 Термин "гибридное антитело" относится к антителу, содержащему одну из его переменных областей тяжелой или легкой цепи (его тяжелую или легкую цепь) из определенного типа антитела (например, гуманизированного), в то время как другая переменная область тяжелой или легкой цепи (тяжелая или легкая цепь) происходит из другого типа (например, мышиного, химерного).

10 Антитела и/или антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут происходить, например, от мыши, крысы или любого другого млекопитающего или из других источников, таких как получение по технологии рекомбинантной ДНК. Антитела или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут включать, например, синтетическое антитело, неприродное антитело, антитело, полученное после иммунизации млекопитающего, не являющегося человеком, и т. д.

15 Антитела или их антигенсвязывающие фрагменты по настоящему изобретению могут быть выделенными и/или по существу очищенными.

Вариант антигенсвязывающего агента

20 Настоящее изобретение также охватывает варианты антигенсвязывающих агентов, где указанные антигенсвязывающие агенты могут быть названы антигенсвязывающими соединениями, конструкциями, полипептидами или любыми соединениями, содержащими антитела, антигенсвязывающие агенты или антигенсвязывающие фрагменты, раскрытые в настоящем документе.

25 Более конкретно, настоящее изобретение охватывает варианты антител или антигенсвязывающих фрагментов, CAR и BiTE и дополнительно включает ADC, радиоиммуноконъюгаты или любое соединение, содержащее антигенсвязывающие агенты, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, предложенные в настоящем документе. Варианты (например, антитела или антигенсвязывающие фрагменты, CAR, BiTE и тому подобное) включают варианты, которые имеют изменение в своей аминокислотной последовательности, например, в одной или более CDR, в одной или более каркасных областях и/или в константной области. Варианты (например, антитела или антигенсвязывающие 30 фрагменты, CAR, BiTE и тому подобное), включенные в настоящее изобретение, представляют собой варианты, которые имеют, например, близкую или улучшенную аффинность связывания по сравнению с исходным антителом или антигенсвязывающим фрагментом.

Варианты, охватываемые настоящим изобретением, могут включать вставку, делецию или аминокислотную замену (консервативную или неконсервативную). В аминокислотной последовательности таких вариантов один аминокислотный остаток может быть удален, и на его место может быть введен другой аминокислотный остаток.

5 Более конкретно, варианты, охватываемые настоящим изобретением, имеют переменную область легкой цепи и/или переменную область тяжелой цепи, которые по меньшей мере на 80% идентичны последовательности с переменной областью легкой цепи и/или переменной областью тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего варианта, описанных в настоящем документе. CDR варианта антитела могут быть идентичны CDR антитела или антигенсвязывающих фрагментов, описанных в настоящем документе.

Настоящее изобретение также охватывает варианты, имеющие аминокислотные остатки CDR, которые являются идентичными, и каркасные области, которые по меньшей мере на 80%, по меньшей мере на 90% или по меньшей мере на 95% идентичны последовательностям антитела или антигенсвязывающего фрагмента, раскрытым в настоящем документе.

15 Консервативные замены могут быть сделаны путем замены аминокислотного остатка (CDR, переменной цепи, каркасной области или константной области и т. д.) из одной из групп, перечисленных ниже (группы 1-6), на другую аминокислоту той же группы.

Другие иллюстративные варианты реализации консервативных замен показаны в таблице ниже.

- 20 (группа 1) гидрофобные: норлейцин, метионин (Met), аланин (Ala), валин (Val), лейцин (Leu), изолейцин (Ile)
- (группа 2) нейтральные гидрофильные: цистеин (Cys), серин (Ser), треонин (Thr)
- (группа 3) кислотные: аспарагиновая кислота (Asp), глутаминовая кислота (Glu)
- (группа 4) основные: аспарагин (Asn), глутамин (Gln), гистидин (His), лизин (Lys), аргинин (Arg)
- 25 (группа 5) остатки, которые влияют на ориентацию цепи: глицин (Gly), пролин (Pro); и
- (группа 6) ароматические: триптофан (Trp), тирозин (Tyr), фенилаланин (Phe)

30 Неконсервативные замены приводят к замене представителя одной из этих групп на представителя другой группы.

Исходный остаток	Иллюстративная замена	Консервативная замена
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val

Исходный остаток	Иллюстративная замена	Консервативная замена
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg, Asp	Gln
Asp (D)	Glu, Asn	Glu
Cys (C)	Ser, Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp, Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg,	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, норлейцин	Leu
Leu (L)	Норлейцин, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala, Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr, Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, норлейцин	Leu

Процентная идентичность указывает на аминокислоты, которые идентичны по сравнению с исходным пептидом и которые могут занимать такое же или близкое положение. Процентное сходство будет указывать на аминокислоты, которые идентичны и которые 5 заменены консервативной аминокислотной заменой по сравнению с исходным пептидом в том же или подобном положении.

Обычно степень сходства и идентичности между переменными цепями в настоящем документе определена с использованием программы Blast2 sequence (Tatiana A. Tatusova, Thomas L. Madden (1999), "Blast 2 sequences - a new tool for comparing protein and nucleotide

sequences", FEMS Microbiol Lett. 174:247-250) с использованием настроек по умолчанию, то есть программы blastp, матрицы BLOSUM62 (штраф за открытие гэпа 11 и штраф за удлинение гэпа 1; сокращение gapX 50, ожидание 10,0, размер 3) и активированных фильтров.

5 "По существу идентичная" последовательность может содержать одну или более консервативных аминокислотных мутаций или аминокислотных делеций, которые позволяют поддерживать биологически функциональную активность. В данной области техники известно, что одна или более консервативных аминокислотных мутаций в референсной последовательности могут давать вариант пептида без существенного изменения физиологических, химических, физико-химических или функциональных свойств по сравнению с референсной последовательностью; в этом случае референсная и вариантная последовательности будут считаться "по существу идентичными" полипептидами.

10 Таким образом, варианты настоящего изобретения включают те, которые могут быть по меньшей мере на 70%, 75%, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% или 100% идентичны исходной последовательности или части исходной последовательности.

Нуклеиновые кислоты, векторы и клетки

Антитела обычно получают в клетках, обеспечивающих экспрессию легкой цепи и тяжелой цепи, экспрессируемых из вектора (векторов), содержащего последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую легкую цепь и/или тяжелую цепь.

20 Таким образом, настоящее изобретение охватывает нуклеиновые кислоты, способные кодировать любую из CDR, переменных областей легкой цепи, переменных областей тяжелой цепи, легких цепей, тяжелых цепей, описанных в настоящем документе.

В контексте настоящего документа термин "нуклеиновая кислота" относится к РНК, ДНК, кДНК и тому подобному.

25 Из-за присущей вырожденности генетического кода для экспрессии антитела или его антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению могут быть получены и использованы другие последовательности нуклеиновых кислот, которые кодируют ту же аминокислотную последовательность. Нуклеотидные последовательности могут быть сконструированы с использованием способов, общеизвестных в данной области техники, для изменения нуклеотидных последовательностей для различных целей, включая, но не ограничиваясь указанными, модификацию клонирования, процессинга и/или экспрессии продукта гена. Для конструирования нуклеотидных последовательностей может быть использована перетасовка ДНК путем случайной фрагментации и повторной сборки методом

ПЦР фрагментов генов и синтетических олигонуклеотидов. Например, олигонуклеотид-опосредованный сайт-специфический мутагенез можно использовать для введения мутаций, которые создают новые сайты рестрикции, изменяют паттерны гликозилирования, изменяют предпочтение кодонов, продуцируют варианты сплайсинга и так далее.

5 В еще одном аспекте настоящее изобретение относится к вектору, содержащему нуклеиновые кислоты, раскрытые в настоящем документе.

Согласно настоящему изобретению вектор может представлять собой вектор экспрессии.

10 Вектор экспрессии обычно содержит элементы для транскрипционного и трансляционного контроля встроенной кодирующей последовательности в организме конкретного хозяина. Эти элементы могут включать регуляторные последовательности, такие как энхансеры, конститутивные и индуцибельные промоторы и 5'- и 3'-нетранслируемые области. Методы, которые хорошо известны специалисту в данной области техники, также могут быть использованы для конструирования таких векторов экспрессии. Эти методы
15 включают технологию рекомбинантной ДНК *in vitro*, технологию синтеза и генетическую рекомбинацию *in vivo*.

Вариабельная область легкой цепи и вариабельная область тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента могут кодироваться одной и той же молекулой нуклеиновой кислоты (например, одним и тем же вектором) или отдельными молекулами
20 (например, отдельными векторами).

Таким образом, в настоящем изобретении предложен набор векторов, где один из векторов способен экспрессировать легкую цепь или вариабельную область легкой цепи, а другой вектор способен экспрессировать тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи.

25 Дополнительные аспекты изобретения относятся к наборам, которые содержат первый сосуд, содержащий нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий легкую цепь или вариабельную область легкой цепи антитела или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению, и второй сосуд, содержащий нуклеиновую кислоту или вектор, кодирующий тяжелую цепь или вариабельную область тяжелой цепи антитела или его
30 антигенсвязывающий фрагмент.

В другом аспекте настоящее изобретение относится к выделенной клетке, которая может содержать нуклеиновые кислоты, векторы, антитела или антигенсвязывающий фрагмент, раскрытые в настоящем документе.

Выделенная клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область легкой цепи, и нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область тяжелой цепи, либо на отдельных векторах, либо на одном и том же векторе. Выделенная клетка также может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую легкую цепь, и нуклеиновую кислоту, кодирующую тяжелую цепь, либо на отдельных векторах, либо на одном и том же векторе.

В соответствии с настоящим изобретением клетка может быть способна экспрессировать, собирать и/или секретировать антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.

Кроме того, в соответствии с настоящим изобретением клетка может содержать и/или может экспрессировать антитело, раскрытое в настоящем документе.

Кроме того, в соответствии с изобретением, клетка может содержать нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область легкой цепи, и нуклеиновую кислоту, кодирующую переменную область тяжелой цепи.

15 Получение антител или антигенсвязывающих фрагментов в клетках

Антитела, раскрытые в настоящем документе, могут быть получены различными способами, знакомыми специалистам в данной области техники, включая гибридную технологию или методы рекомбинантной ДНК.

Традиционная гибридная технология включает иммунизацию грызуна антигеном, выделение и слияние клеток селезенки с клетками миеломы, не экспрессирующими HGPRT (гипоксантингуанинфосфорибозилтрансферазу), и отбор гибридных клеток с использованием среды, содержащей гипоксантин, аминоптерин и тимин (HAT). Гибридому подвергают скринингу для выявления тех, которые продуцируют антитела, которые являются специфичными для данного антигена. Гибридому размножают и клонируют.

Последовательность нуклеиновой кислоты переменных областей легкой цепи и тяжелой цепи получают с помощью стандартной методики секвенирования и создают векторы экспрессии, содержащие последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи и тяжелой цепи антитела.

Для рекомбинантной экспрессии антител клетки-хозяева трансформируют вектором или набором векторов, содержащих последовательность нуклеиновой кислоты легкой цепи и тяжелой цепи антитела или его антигенсвязывающего фрагмента (на одном и том же векторе или отдельных векторах).

Для долгосрочной продукции рекомбинантных белков в системах на основе млекопитающих могут быть получены клеточные линии, стабильно экспрессирующие белки.

Например, нуклеотидные последовательности, способные кодировать любую из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, описанных в настоящем документе, могут быть трансформированы в клеточные линии с использованием векторов экспрессии, которые могут содержать вирусные точки начала (ориджины) репликации и/или эндогенные экспрессионные элементы и селектируемый или видимый маркерный ген на том же или на отдельном векторе. Настоящее изобретение не ограничивается применяемым вектором или клеткой-хозяином. В некоторых вариантах реализации настоящего изобретения каждая из нуклеотидных последовательностей, способных кодировать любую из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, описанных в настоящем документе, может быть лигирована в отдельный вектор экспрессии, и каждая цепь экспрессируется отдельно. В другом варианте реализации как легкая, так и тяжелая цепи, способные кодировать любую из легкой и тяжелой цепей иммуноглобулина, описанных в настоящем документе, могут быть лигированы в один вектор экспрессии и экспрессироваться одновременно.

Иммунологические методы детектирования и измерения экспрессии полипептидов известны технике. Примеры таких методик включают твердофазный иммуноферментный анализ (ELISA), радиоиммуноанализ (RIA), сортировку флуоресцентно-активированных клеток (FACS) или проточную цитометрию. Специалисты в данной области техники могут легко адаптировать эти методики к настоящему изобретению.

Различные клетки-хозяева, которые имеют специфический клеточный механизм и характерные механизмы для посттрансляционной активности (например, яичник китайского хомяка (CHO), HeLa, MDCK, HEK293 и WI-38), доступны на рынке и в Американской коллекции типовых культур (ATCC) и могут быть выбраны для обеспечения правильной модификации и процессинга экспрессированного полипептида.

Обычно антитело или его антигенсвязывающие фрагменты получают в клетках CHO, мышечных клетках миеломы NS0, человеческих клетках PER.C6[®].

Настоящее изобретение относится к способу получения антитела или его антигенсвязывающего фрагмента, включающему экспрессию легкой цепи и тяжелой цепи антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению в культивируемых клетках.

Способ может дополнительно включать очистку или выделение антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению. Способ может также включать конъюгирование антитела или антигенсвязывающего фрагмента по настоящему изобретению с молекулой нагрузки, такой как терапевтический или детектируемый фрагмент.

Конъюгаты антител

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут содержаться в терапевтическом или диагностическом соединении, конструкции или композиции или могут быть связаны с молекулой нагрузки. Иллюстративные варианты реализации молекул нагрузки включают, но не ограничиваются перечисленными, терапевтический фрагмент, детектируемый фрагмент, полипептид (например, пептид, фермент, фактор роста), полинуклеотид, липосому, наночастицу, нанопроволоку, нанотрубку, квантовую точку и т. д.

Более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть конъюгированы с терапевтическим фрагментом. Терапевтический фрагмент обычно присоединен к антителу через линкер, который может быть расщепляемым или нерасщепляемым.

В список терапевтических фрагментов включены цитотоксические агенты, цитостатические агенты, противораковые агенты (химиотерапевтические средства) и радиотерапевтические средства (например, радиоизотопы).

Примеры вариантов реализации цитотоксических агентов включают, но не ограничиваются перечисленными, альфа-аманитин, криптофицин, дуокармазин, дуокармицин, халихеамицин, дерукстекан, пирролобенздиазепин (PBD), доластатин, эндотоксин псевдомонад, рицин, ауристатины (например, метил ауристатин Е, метил ауристатин F), майтанзиноиды (например, мертанзин), пирролобенздиазепин (PBD) и аналоги. Иллюстративные варианты реализации радиотерапевтических средств включают, без ограничения перечисленными, иттрий-90, скандий-47, рений-186, йод-131, йод-125 и многие другие, известные специалистам в данной области техники (например, лютеций (например, Lu¹⁷⁷), висмут (например, Bi²¹³), медь (например, Cu⁶⁷), астатин-211 (211At), актиний-225 (Ac-225) и т. д.).

Иллюстративные варианты реализации химиотерапевтических средств включают, но не ограничиваются перечисленными, 5-фторурацил, адриамицин, иринотекан, таксаны, карбоплатин, цисплатин и т. д.

Антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению также могут быть конъюгированы с детектируемым фрагментом (то есть, для целей детектирования или диагностики).

"Детектируемый фрагмент" включает агенты, детектируемые с использованием спектроскопических, фотохимических, биохимических, иммунохимических, химических и/или

других физических средств. Детектируемый фрагмент может быть связан либо напрямую, либо опосредованно (например, посредством связи, такой как, без ограничения перечисленными, связь DOTA или NHS) с антителами и их антигенсвязывающими фрагментами по настоящему изобретению с использованием способов, хорошо известных в данной области техники. Может
5 быть использован широкий спектр детектируемых фрагментов с выбором в зависимости от требуемой чувствительности, простоты конъюгации, требований к стабильности и доступного инструментария. Подходящий детектируемый фрагмент включает, но не ограничивается перечисленными, флуоресцентную метку, радиоактивную метку (например, без ограничения перечисленными, ^{125}I , In^{111} , Tc^{99} , I^{131} и включая позитрон-излучающие изотопы для ПЭТ-
10 томографа (позитронно-эмиссионный томограф) и т. д.), активную метку ядерного магнитного резонанса, люминесцентную метку, хемилюминесцентную метку, хромофорную метку, ферментную метку (например, но не ограничиваются перечисленными, пероксидазу хрена, щелочную фосфатазу и т. д.), квантовые точки и/или наночастицу. Детектируемый фрагмент может вызывать и/или создавать детектируемый сигнал, тем самым позволяя детектировать
15 сигнал от детектируемого фрагмента.

Химерные антигенные рецепторы и другие иммунотерапевтические средства

Последовательность антител и их антигенсвязывающих фрагментов по настоящему изобретению может быть использована для получения химерных антигенных рецепторов
20 (CAR), биспецифических рекрутеров Т-клеток (BiTE) или других иммунотерапевтических средств, таких как, например, и без ограничений, биспецифические рекрутеры клеток-киллеров (BiKE), триспецифические рекрутеры клеток-киллеров (TriKE) или любые иммунотерапевтические соединения.

CAR по настоящему изобретению могут содержать, например, а) антигенсвязывающий
25 домен антитела, который специфически связывается с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFRvIII), b) необязательно спейсер, c) трансмембранный домен, d) необязательно по меньшей мере один костимулирующий домен и e) по меньшей мере один внутриклеточный сигнальный домен.

Химерные антигенные рецепторы также могут содержать шарнирную область или
30 спейсер, который соединяет антигенсвязывающий домен и трансмембранный домен. Спейсер может обеспечить лучшую презентацию антигенсвязывающего домена на поверхности клетки.

Согласно настоящему изобретению спейсер может быть необязательным. В альтернативном варианте спейсер может содержать, например, от 1 до 200 аминокислотных

остатков, обычно от 10 до 100 аминокислотных остатков и более типично от 25 до 50 аминокислотных остатков. Спейсер может происходить из человеческого белка.

В соответствии с настоящим изобретением спейсерная или шарнирная область может представлять собой, например, без ограничения перечисленными, шарнир CD8 (например, мышь, CD8 человека) или шарнир IgG (шарнир иммуноглобулина человека) или их комбинацию.

Иллюстративные варианты реализации трансмембранных доменов включают, в качестве примера и без ограничения перечисленными, альфа, бета или CD3-зета-цепь комплекса рецепторов Т-клеток, CD28, CD27, CD3-эпсилон, CD45, CD4, CD5, CD8, CD9, CD16, CD22, CD33, CD37, CD64, CD80, CD86, CD134, CD137, CD154.

В некоторых вариантах реализации изобретения трансмембранный домен может содержать по меньшей мере трансмембранную область (области), например, KIRDS2, OX40, CD2, CD27, LFA-1 (CD 11a, CD18), ICOS (CD278), 4-1BB (CD137), GITR, CD40, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), NKp44, NKp30, NKp46, CD 160, CD 19, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R а, ITGA1, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB 1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (сенсорный), CEACAM1, CRT AM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM (SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, PAG/Cbp, NKG2D, NKG2C.

Конкретный вариант реализации трансмембранного домена представляет собой трансмембранный домен CD28.

Костимулирующий домен может представлять собой, в качестве примера и без ограничения перечисленными, CD28, CD27, 4-1BB, OX40, CD7, B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), CD30, CD40, PD-1, ICOS, функционально-связанный антиген лимфоцитов-1 (LFA-1), CD2, LIGHT, NKG2C, B7-H3, лиганд, который специфически связывается с CD83, CDS, ICAM-1, GITR, BAFFR, HVEM (LIGHTR), SLAMF7, NKp80 (KLRF1), CD160, CD19, CD4, CD8альфа, CD8бета, IL2R бета, IL2R гамма, IL7R альфа, ITGA4, VLA1, CD49a, ITGA4, IA4, CD49D, ITGA6, VLA-6, CD49f, ITGAD, CD1d, ITGAE, CD103, ITGAL, CD11a, LFA-1, ITGAM, CD11b, ITGAX, CD11c, ITGB1, CD29, ITGB2, CD18, LFA-1, ITGB7, TNFR2, TRANCE/RANKL, DNAM1 (CD226), SLAMF4 (CD244, 2B4), CD84, CD96 (сенсорный), CEACAM1, CRTAM, Ly9 (CD229), CD160 (BY55), PSGL1, CD100 (SEMA4D), CD69, SLAMF6 (NTB-A, Lyl08), SLAM

(SLAMF1, CD150, IPO-3), BLAME (SLAMF8), SELPLG (CD162), LTBR, LAT, GADS, SLP-76, PAG/Cbp, NKp44, NKp30, NKp46, и NKG2D или их комбинацию.

Внутриклеточный сигнальный домен может представлять собой, в качестве примера и без ограничения перечисленными, CD3 дзета, CD3 гамма, CD3 дельта, CD3 эpsilon, общий FcR гамма (FCERIG), FcR бета (Fc эpsilon Rib), CD79a, CD79b, Fcгамма RIIa, DAP10 или DAP12.

Для нацеливания на секреторный путь химерный антигенный рецептор может также содержать сигнальный пептид, такой как, например, сигнальный пептид CD28 или любой другой сигнальный пептид, подходящий для иммунных клеток. Сигнальный пептид расщеплен (расщепляемый).

Молекулы BiTE, BiKE и TriKE могут содержать антигенсвязывающий домен (например, scFv), который специфически связывается с EGFRvIII, и другой домен (scFv), который связывается со специфическими иммунными клетками, включая, но не ограничиваясь, молекулу, специфичную для Т-клеток (например, CD3), и поверхностные молекулы NK-клеток (например, CD16). Они обычно содержат несколько scFv, соединенных в тандем гибкими линкерами.

Фармацевтические композиции

Настоящее изобретение также относится к соединениям, композициям, конструкциям и фармацевтическим композициям, содержащим антитела или антигенсвязывающие фрагменты (конъюгированные или нет), раскрытые в настоящем документе.

В дополнение к активным ингредиентам фармацевтическая композиция может содержать фармацевтически приемлемые носители, включая, без ограничения перечисленными, воду, PBS (фосфатно-солевой буфер), солевые растворы, желатины, масла, спирты и другие эксципиенты и вспомогательные вещества, которые облегчают переработку активных соединений в препараты, подходящие для фармацевтического применения. В других случаях такие препараты могут быть стерилизованы.

В настоящем документе "фармацевтическая композиция" означает терапевтически эффективное количество агента вместе с фармацевтически приемлемыми разбавителями, консервантами, солюбилизаторами, эмульгаторами, адъювантами и/или носителями. В настоящем документе термин "терапевтически эффективное количество" относится к такому количеству, которое обеспечивает терапевтический эффект для данного состояния и схемы введения. Такие композиции представляют собой жидкости, или лиофилизированные или иным образом высушенные составы и включают разбавители с различным содержанием

буфера (например, трис-НСI, ацетат, фосфат), рН и ионной силой, добавки, такие как альбумин или желатин, для предотвращения абсорбции на поверхностях, детергенты (например, твин 20, твин 80, плуроник F68, соли желчных кислот). Солубилизирующие агенты (например, глицерин, полиэтиленглицерин), антиоксиданты (например, аскорбиновая кислота, метабисульфит натрия), консерванты (например, тимеросал, бензиловый спирт, парабены), наполнители или модификаторы тоничности (например, лактоза, маннит), ковалентное присоединение полимеров, таких как полиэтиленгликоль, к белку, комплексообразование с ионами металлов или включение материала в или на препараты частиц полимерных соединений, таких как полимолочная кислота, полигликолевая кислота, гидрогели и т. д., или на липосомы, микроэмульсии, мицеллы, однослойные или многослойные везикулы, тени эритроцитов или сферопласты. Такие композиции будут влиять на физическое состояние, растворимость, стабильность, скорость высвобождения *in vivo* и скорость клиренса *in vivo*.
Композиции с контролируемым или замедленным высвобождением включают состав в липофильных депо (например, жирные кислоты, воски, масла). Также в настоящем описании раскрыты композиции в виде частиц, покрытые полимерами (например, поллоксамерами или поллоксаминами). Другие варианты реализации композиций по настоящему изобретению включают защитные покрытия в виде частиц, ингибиторы протеазы или усилители проникновения для различных путей введения, включая парентеральный, легочный, назальный, пероральный, вагинальный, ректальный пути. В одном варианте реализации фармацевтическую композицию вводят парентерально, параканцерально, трансмукозально, трансдермально, внутримышечно, внутривенно, внутрикожно, подкожно, внутрибрюшинно, внутрижелудочно, внутричерепно и интратуморально.

Кроме того, в настоящем документе термины "фармацевтически приемлемый носитель" или "фармацевтический носитель" известны в данной области техники и включают, но не ограничиваются перечисленными, 0,01-0,1 М или 0,05 М фосфатный буфер или 0,8% солевой (физиологический) раствор. Кроме того, такие фармацевтически приемлемые носители могут представлять собой водные или неводные растворы, суспензии и эмульсии. Примерами неводных растворителей являются пропиленгликоль, полиэтиленгликоль, растительные масла, такие как оливковое масло, и инъеклируемые органические сложные эфиры, такие как этилолеат. Водные носители включают воду, спиртовые/водные растворы, эмульсии или суспензии, в том числе солевой раствор и буферизованные среды. Парентеральные носители включают растворы хлорида натрия, раствор Рингера с декстрозой, декстрозы и хлорида натрия, раствор Рингера с лактатом, или нелетучие масла. Внутривенные основы включают

восполнители жидкостей и питательных веществ, восполнители электролитов, например, на основе раствора Рингера с декстрозой, и т. п. Могут также присутствовать консерванты и другие добавки, такие как, например, противомикробные средства, антиоксиданты, хелатирующие агенты и инертные газы и т. п.

5 Для любого соединения терапевтически эффективная доза может быть первоначально оценена либо в анализах клеточной культуры, либо на животных моделях, таких как мыши, крысы, кролики, собаки или свиньи. Животная модель также может быть использована для определения диапазона концентраций и пути введения. Затем такая информация может быть использована для определения подходящих доз и путей введения людям. Эти методики хорошо известны специалистам в данной области техники и терапевтически эффективная доза 10 относится к тому количеству активного ингредиента, которое облегчает симптомы или состояние. Терапевтическая эффективность и токсичность могут быть определены стандартными фармацевтическими процедурами на культурах клеток или на экспериментальных животных, такими как расчет и сравнение статистики ED₅₀ (доза, 15 терапевтически эффективная у 50% популяции) и LD₅₀ (доза, смертельная для 50% популяции). Любая из терапевтических композиций, раскрытых выше, может быть применена к любому субъекту, нуждающемуся в такой терапии, включая, но не ограничиваясь ими, млекопитающих, таких как собаки, кошки, коровы, лошади, кролики, обезьяны и люди.

Фармацевтические композиции, используемые в настоящем изобретении, можно 20 вводить любым количеством путей, включая, без ограничения перечисленными, пероральный, внутривенный, внутримышечный, внутриартериальный, интрамедуллярный, интратекальный, внутрижелудочковый, трансдермальный, подкожный, внутрибрюшинный, интраназальный, энтеральный, местный, сублингвальный или ректальный.

Дополнительные аспекты изобретения относятся к наборам, которые могут включать 25 сосуд (сосуды), содержащий одно или более антител, или антигенсвязывающих фрагментов, или конъюгатов антитела и лекарственного средства, описанных в настоящем документе.

Способы применения

Аспекты изобретения включают введение антител или их антигенсвязывающих фрагментов, молекул CAR, ViTE, ViKE или TriKE нуждающемуся субъекту.

30 Другие аспекты изобретения включают введение иммунных клеток, сконструированных для экспрессии молекул CAR, ViTE, ViKE или TriKE, нуждающемуся субъекту.

Конструкции CAR, BiTE, BiKE или TriKE по настоящему изобретению могут быть использованы для повторного нацеливания сконструированных иммунных клеток на EGFRvIII-положительные опухоли.

Сконструированные иммунные клетки можно вводить нуждающемуся субъекту.

5 В соответствии с одним из аспектов настоящего изобретения иммунные клетки выделяют из субъекта, модифицируют для экспрессии конструкции CAR, BiTE, BiKE или TriKE и повторно вводят тому же субъекту.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно применять в неконъюгированной форме или конъюгировать с терапевтическим фрагментом при лечении рака.

10 Более конкретно, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению могут быть использованы для ингибирования роста опухолевых клеток, экспрессирующих EGFRvIII. Конъюгаты антитела и лекарственного средства и радиоиммуноконъюгаты особенно предусмотрены для таких целей.

15 Настоящее изобретение более конкретно относится к способу лечения субъекта, имеющего рак или у которого подозревают присутствие рака, путем введения антитела, или его антигенсвязывающего фрагмента, или конъюгата антитела и лекарственного средства, раскрытого в настоящем документе.

Антитело, или его антигенсвязывающий фрагмент, или конъюгат антитела и лекарственного средства можно вводить в виде фармацевтической композиции отдельно или в комбинации с другими противораковыми лекарственными средствами.

В настоящей заявке термин "субъект" охватывает людей и животных, таких как приматы, не являющиеся людьми, крупный рогатый скот, кролики, мыши, крысы, овцы, козы, лошади, птицы и т. д. Термин "субъект" предпочтительно охватывает людей.

25 Нуждающиеся субъекты, который получили бы пользу от лечения, включают людей, имеющих опухолевые клетки, экспрессирующие EGFRvIII. Более конкретно, антитело или его антигенсвязывающие фрагменты или конъюгат антитела и лекарственного средства можно вводить субъекту, у которого подозревают присутствие мультиформной глиобластомы (GBM). Нуждающиеся субъекты также включают субъектов с карциномами или с подозрением на них, например, с раком молочной железы, раком головы и шеи или раком ротовой полости.

30 Термин "лечение" для целей настоящего изобретения относится как к терапевтическому лечению, так и к профилактическим или превентивным мерам, при которых задачей является замедление (уменьшение) патологического состояния или нарушения, на которое направлены

эти меры. Субъекты, нуждающиеся в лечении, включают уже имеющих нарушение, а также тех, кто склонен к развитию этого нарушения, или тех, у кого нарушение необходимо предотвратить. В частности, нуждающиеся субъекты включают субъектов с повышенным уровнем одного или более маркеров рака.

5 В качестве альтернативы, для реализации способов по настоящему изобретению и как известно в данной области техники, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению (конъюгированный или нет) можно применять в комбинации со второй молекулой (например, вторичным антителом и т. д.), которая способна специфически связываться с антителом или антигенсвязывающим фрагментом по настоящему изобретению и
10 которая может нести желаемый детектируемый, диагностический или терапевтический фрагмент.

Антитело или его антигенсвязывающий фрагмент по настоящему изобретению можно применять в неконъюгированной форме или конъюгировать с детектируемым фрагментом в анализах или способах, включающих детектирование EGFRvIII.

15 В частности, предусмотрены способы лечения субъекта, имеющего рак, ассоциированный с экспрессией EGFRvIII. Такой способ может включать введение антигенсвязывающего агента, раскрытого в настоящем документе, или клеток, экспрессирующих такой антигенсвязывающий агент.

В иллюстративном варианте реализации способ может включать введение конъюгата
20 антитела и лекарственного средства.

В другом иллюстративном варианте реализации способ может включать введение клеток, экспрессирующих химерный антигенный рецептор, биспецифический рекрутер Т-клеток, биспецифический рекрутер клеток-киллеров или триспецифический рекрутер клеток-киллеров.

25 Другой аспект настоящего изобретения относится к способу детектирования EGFRvIII, причем способ может включать приведение в контакт клетки, экспрессирующей EGFRvIII, или образца (биопсии, биологической жидкости, такой как сыворотка, плазма, моча и т. д.), содержащего или в котором подогревают присутствие EGFRvIII, с антителом или антигенсвязывающими фрагментами, раскрытыми в настоящем документе, и измерение
30 связывания. Образец может происходить из организма млекопитающего (например, человека), у которого может быть рак (например, мультиформная глиобластома или карцинома) или может быть подозрение на присутствие такого рака. Образец может представлять собой образец ткани, полученный от млекопитающего, или супернатант клеточной культуры.

В соответствии с изобретением образец может представлять собой образец сыворотки, образец плазмы, образец крови или асцитную жидкость, полученную от млекопитающего.

Дополнительный объем, возможность применения и преимущества изобретения будут очевидны из неограничивающего подробного описания изобретения, приведенного ниже.

- 5 Однако следует понимать, что это подробное описание, хотя и раскрывает иллюстративные варианты реализации изобретения, приведено только в качестве примера со ссылкой на прилагаемые графические материалы.

ПРИМЕРЫ

- 10 Пример 1: Конструирование гуманизированных последовательностей V-области

Гуманизировали вариабельную область мышинового антитела 4E11, специфического к EGFR vIII. Соответствующие мышинные аминокислотные последовательности VH и VL приведены в таблице перечня последовательностей под SEQ ID NO: 1 и SEQ ID NO: 2, соответственно, и обозначены mVH и mVL, соответственно. Петли CDR, встроенные в эти последовательности V-области, изображены на фиг. 1 в соответствии с определением по Kabat, за исключением петли CDR-H1, которая описана в соответствии с объединенными определениями по Kabat и Chotia (Wu and Kabat, 1970; Kabat and Wu, 1991; Chothia and Lesk, 1987; Al-Lazikani et al., 1997). Это определение послужило основой для гуманизации каркасных областей (FR) mVH и mVL с помощью метода пересадки CDR (Riechmann и др., 1988).

- 20 Пересадку CDR проводили путем сшивания трех сегментов CDR исходной последовательности mVH с четырьмя сегментами FR последовательности матрицы VH человека в соответствующем порядке; и трех сегментов CDR исходной последовательности mVL с четырьмя сегментами FR матрицы VL человека в соответствующем порядке. Авторы впервые определили, что ближайшие семейства VH и VL зародышевой линии человека для последовательностей mVH и mVL антитела 4E11 представляют собой семейство VH-4 человека и семейство Vk-1 человека, соответственно. Затем использовали базу данных зародышевой линии человека VBASE2 (Retter et al, 2005), чтобы идентифицировать несколько последовательностей V-гена человека и J-гена человека, которые высоко оценивались с точки зрения гомологии последовательностей с FR родительских последовательностей мыши.
- 25 Конечная последовательность матрицы зародышевой линии человека, выбранная для гуманизации, показана на фиг. 1, с выравниванием с соответствующими последовательностями мыши, и она представляет собой: IGHV312 человека (V-сегмент) и IGHIJ4 человека (J-сегмент) для последовательности mVH и IGKV069 человека (V-сегмент) и

IGKJ2 человека (J-сегмент) для последовательности mVL. На основании этих матриц существует 20 аминокислотных мутаций мыши-человека, необходимых для полной гуманизации FR mVH, и 16 аминокислотных мутаций мыши-человека, необходимых для полной гуманизации FR mVL (см. выделенные аминокислоты на фиг. 1). Мутация всех этих 36 аминокислот приведет к 100% гуманизированной V-области, которая представлена вариантом hVH1 (также содержащимся в hH1) с SEQ ID NO: 5 и вариантом hVL1 (также содержащимся в hL1) с SEQ ID NO: 8.

Во многих случаях было замечено, что 100% гуманизированные варианты обладают несколько сниженным связыванием с антигеном по сравнению с родительским мышинным вариантом. Для снижения риска потери аффинности связывания антигена были разработаны "обратные мутации" исходных родительских мышиных аминокислотных остатков. В исходном каркасе антитела присутствуют аминокислотные остатки, которые могут прямо или косвенно влиять на связывание антигена. Чтобы облегчить идентификацию обратных мутаций, строили трехмерную модель варибельной области мышинового 4E11 с помощью гомологического моделирования с использованием подходящей кристаллической структуры в качестве матрицы (код Protein Data Bank: 3G5V). Визуализация этой молекулярной модели показана на фиг. 2. На основе тщательного визуального осмотра и подробного структурного анализа этой структурной модели были выбраны следующие обратные мутации: M49, I67 и R71 в тяжелой цепи; и L36, F44 и G46 в легкой цепи (везде использована нумерация по Kabat); эти аминокислоты с обратной мутацией выделены на фиг. 2.

В VH обратная мутация в положении 71, где боковая цепь аминокислоты аргинина непосредственно поддерживает конформацию CDR-H1, а также CDR-H2, вероятно, участвует в связывании антигена. Неконсервативная мутация R71V, необходимая для гуманизации в этом положении, может вносить значительные структурные изменения в CDR. Следовательно, осуществление этой мутации (R71) дало гуманизированный вариант hVH2 с SEQ ID NO: 6. Гидрофобные остатки в более заглубленных положениях 49 и 67 имеют меньшее значение, но все же важны для поддержания правильной упаковки, которая непосредственно поддерживает конформацию петли CDR-H2. Хотя гуманизация в этих двух положениях потребует консервативных мутаций M49I и I67V, правильная упаковка будет нарушена. Таким образом, осуществление этих обратных мутаций (M49, I67) в дополнение к обратной мутации R71, раскрытой ранее, дало гуманизированный вариант hVH3 с SEQ ID NO: 7.

В VL обратные мутации проявляются в форме тандема двух аминокислот, которые находятся в непосредственной пространственной близости, L36 и G46, которые

непосредственно поддерживают конформацию гипервариабельной петли CDR-H3 из спариваемой цепи, а также CDR-L2 из той же цепи; которые, весьма вероятно, непосредственно участвуют в связывании антигена. Поразительной структурной особенностью является то, что гуманизация, требуемая в этих двух положениях, L36Y и G46L, не может быть размещена стерически из-за значительного увеличения размера в относительно заглубленном положении, что, вероятно, приведет к значительным структурным изменениям. Соответственно, выполнение этих обратных мутаций (L36, G46) дало гуманизованный вариант hVL2 с SEQ ID NO: 9. Дополнительная обратная мутация определена в мышьиной аминокислоте F44, которая также сгруппирована вокруг вышеупомянутых tandemных аминокислот с обратной мутацией, и в этом положении гуманизация требует мутации в более конформационно ограниченную и меньшую аминокислоту пролин. Соответственно, выполнение этой обратной мутации (F44) в дополнение к tandemной обратной мутации, раскрытой ранее (L36, G46), дало гуманизованный вариант hVL3 с SEQ ID NO: 10.

Сконструированные гуманизованные последовательности V-области для антитела 4E11 выровнены на фиг. 3. Кроме того, анализ *in silico* показал отсутствие прогнозируемых T-клеточных эпитопов для всех этих гуманизованных последовательностей (Dhanda et al., 2018).

Пример 2: Рекомбинантное получение и очистка полноразмерных антител

Химерные и гуманизованные области VH и VL, раскрытые в Примере 1, клонировали в виде слияний с константными областями IgG4 человека (тяжелой цепью IgG4 человека и легкой цепью каппа человека, соответственно) в вектор pTT5TM, с получением, таким образом, химерных антител. Последовательность тяжелой цепи IgG4 человека мутировали в положении 228 с аминокислотного остатка серина на остаток пролина (то есть мутацию S228P) для повышения стабильности гомодимера IgG4. С-концевой аминокислотный остаток лизина тяжелой цепи удаляли для снижения гетерогенности из-за частичного отсечения этого С-концевого лизина в качестве посттрансляционной модификации. Полученные химерные последовательности полноразмерной тяжелой цепи и легкой цепи, cH и cL, соответственно, приведены в таблице последовательностей с SEQ ID NO: 11 и SEQ ID NO: 12, соответственно. Полученные гуманизованные варианты последовательностей полноразмерной тяжелой цепи, hH1, hH2 и hH3, приведены в таблице последовательностей с SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 и SEQ ID NO: 15, соответственно. Полученные гуманизованные варианты последовательности полноразмерной легкой цепи hL1, hL2 и hL3 приведены в таблице последовательностей с SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 и SEQ ID NO: 18, соответственно. Все

последовательности легкой цепи содержат необязательный сигнальный пептид MVLQTQVFISLLLWISGAYG (SEQ ID NO: 20) на N-конце, в то время как последовательности тяжелой цепи содержат сигнальный пептид MDWTWRILFLVAAATGTHA (SEQ ID NO: 19) на N-конце. Они представляют собой неограничивающие иллюстративные последовательности сигнальных пептидов, и специалист в данной области техники может выбрать другие подходящие сигнальные пептиды для рекомбинантного получения этих вариантов антител.

сH-сL химерного антитела и 9 гуманизированных антител, охватывающих все возможные комбинации между 3 гуманизированными тяжелыми цепями и 3 гуманизированными легкими цепями (hH1-hL1, hH1-hL2, hH1-hL3, hH2-hL1, hH2-hL2, hH2-hL3, hH3-hL1, hH3-hL2, hH3-hL3), получали рекомбинантно в клетках CHO. В этом примере получение осуществляли в масштабе 25 мл с использованием клеток CHO55E1 при 32 °C. Вкратце, клетки CHO временно трансфицировали конструкциями тяжелой цепи и легкой цепи (соотношение 1:1). Кондиционированную среду собирали на 8-й день после трансфекции, когда плотность жизнеспособных клеток составляла $1-3 \times 10^7$ клеток/мл, и жизнеспособность клеток составляла 84-93%, что определяли путем прямого подсчета образцов клеток с помощью автоматизированной системы подсчета клеток Cedex (Roche Innovatis). Все варианты антител хорошо экспрессировались временно трансфицированными клетками CHO.

Очистку от супернатантов клеточной культуры проводили с помощью аффинной хроматографии на белке А с использованием 1 мл колонок HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare) параллельно на системе Protein Maker. Уравновешивали колонки и проводили промывку в DPBS (фосфатно-солевой буфер Дюльбекко) (GE Healthcare Life Sciences). Линейную скорость потока для связывания устанавливали на уровне около 45 см/ч (0,3 мл/мин), чтобы получить время пребывания около 3,3 мин. Элюирование проводили с использованием цитратного буфера 0,1 М, pH 3,0, и нейтрализацию проводили в 10% (об./об.) 1 М HEPES (4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазин этансульфоновой кислоты). Фракции, содержащие антитела, объединяли и заменяли цитратный буфер на DPBS, делали колонки ZebaSpin TK MWC0 (ThermoFisher Scientific). Очищенные антитела стерилизовали путем фильтрации через фильтры с диаметром пор 0,2 мкм. Для оценки чистоты всех элюатов использовали эксклюзионную хроматографию - сверхвысокоэффективную жидкостной хроматографии (UPLC-SEC). Чистота была выше 95% для 5 гуманизированных вариантов и между 89-95% для химерного варианта и оставшихся 3 гуманизированных вариантов. Выделенные фракции пиков концентрировали методом ультрафильтрации с использованием

центробежного концентратора Vivaspin® Turbo с мембраной, отсекающей молекулярную массу 30 кДа (GE Healthcare Life Sciences), при комнатной температуре в соответствии с инструкциями производителя. Во время процесса концентрацию белка контролировали на спектрофотометре NanoDrop™ 2000 (ThermoFisher Scientific) с использованием оптической плотности при 280 нм и рассчитанного конкретного коэффициента экстинкции каждого варианта. Варианты с чистотой ниже 95% дополнительно очищали с помощью препаративной SEC (эксклюзионная хроматография) на колонках Superdex 200 10/30 (GE Healthcare Life Sciences). Конечные продукты анализировали с помощью SDS-PAGE (электрофорез в полиакриламидном геле с додецилсульфатом натрия) и UPLC-SEC и имели конечную чистоту 99-100%.

Пример 3: Измерения термической стабильности с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии

Дифференциальную сканирующую калориметрию (ДСК) использовали для определения средних точек термического перехода (T_m) вариантов гуманизированных и химерных антител 4E11 с использованием системы ДСК Malvern MicroCal (Malvern Instruments). Образцы в буфере DPBS разбавляли в буфере DPBS до конечной концентрации 0,4 мг/мл. Термическую денатурацию проводили путем повышения температуры от 20 °C до 100 °C со скоростью 60 °C/ч, с режимом обратной связи/коэффициентом усиления, установленным на "низкий", периодом фильтрации 8 с, временем предварительного сканирования 3 мин и давлением азота менее 70 фунтов на квадратный дюйм (482,6 кПа). Все данные анализировали с помощью программного обеспечения Origin 7.0 (OriginLab) с ручным назначением исходного уровня и определением T_m с использованием подгонки к трем переходам.

Результаты приведены на фиг. 4 в виде термограмм и в Таблице 1 в виде температур плавления, полученных из интегрированных термограмм. Все гуманизированные варианты преимущественно демонстрировали улучшенную термическую стабильность по сравнению с химерным вариантом (фиг. 4). Из термограммы видно, что химерное антитело имеет совершенно другую форму, состоящую из одного пика с несколькими плечами, тогда как гуманизированные варианты имеют два хорошо разделенных пика, причем второй пик имеет плечо и смещен в сторону более высокой температуры.

Поскольку различие в последовательностях между этими вариантами встречается в V-области, которая является частью фрагмента Fab, особый интерес представляет наблюдаемая

преимущественная повышенная стабильность Fab-доменов для всех гуманизированных вариантов по сравнению с химерным вариантом, что отражено более высокими значениями T_{m2} (Таблица 1). Эти улучшения стабильности фрагмента Fab при гуманизации находятся в диапазоне от 1,1 °С до 6,2 °С. Специалисту в данной области техники будет понятно, что гуманизация антитела обычно приводит к потере термической стабильности и/или не приводит к улучшению стабильности. Таким образом, выгодным и неожиданным является то, что предлагаемые в настоящем изобретении гуманизированные варианты демонстрируют улучшения в термической стабильности.

Стабильность домена СНЗ, отраженная значениями T_{m2} (Таблица 1), также была улучшена для всех гуманизированных вариантов по сравнению с химерными вариантами, при этом увеличение T_{m3} находилось в диапазоне от 1,0 °С до 6,6 °С. Это открытие очень интересно и удивительно, поскольку последовательность домена СНЗ идентична у всех этих вариантов. Это неожиданно обнаруженное обстоятельство указывает на косвенный аллостерический эффект мутаций гуманизации, разработанных в настоящем изобретении, на общую стабильность антитела 4E11, даже в сайтах, которые удалены от введенных мутаций гуманизации.

Дополнительный анализ взаимосвязи структура-свойство показывает, что гуманизированные варианты, имеющие вариант легкой цепи hL1, демонстрируют минимальные улучшения стабильности по сравнению с химерным вариантом, тогда как те, которые имеют вариант легкой цепи hL2, демонстрируют наибольшие улучшения стабильности по сравнению с химерным вариантом. Это относится как к T_{m2} (плавление Fab), так и к T_{m3} (плавление СНЗ). Не обнаружено значимой зависимости стабильности свертывания от последовательности гуманизированного варианта тяжелой цепи.

Таблица 1. Термическая стабильность, определенная с помощью дифференциальной сканирующей калориметрии.

Вариант 4E11	SEQ ID NO	T_{m1} (°C)	T_{m2} (°C)	T_{m3} (°C)
cH-cL	11;12	69,3	73,7	76,0
hH1-hL1	13;16	68,7	76,0	78,2
hH1-hL2	13;17	68,2	79,6	82,1
hH1-hL3	13;18	68,9	78,2	80,6

hH2-hL1	14;16	68,7	75,6	77,8
hH2-hL2	14;17	68,8	79,9	82,6
hH2-hL3	14;18	67,9	78,5	80,8
hH3-hL1	15;16	68,7	74,8	77,0
hH3-hL2	15;17	68,0	79,5	82,0
hH3-hL3	15;18	68,3	78,0	80,3

Пример 4: Оценка наблюдаемой аффинности с помощью проточной цитометрии

Характеристики связывания рекомбинантных очищенных химерных и 9 гуманизированных вариантов моноклональных антител 4E11 к EGFRvIII оценивали по их аффинности и специфичности связывания с использованием проточной цитометрии в 5 дозозависимой кривой связывания на клеточных линиях глиобластомы человека U87MG, сверхэкспрессирующих EGFR дикого типа (U87MG-EGFR wt или U87 WT), и мутации U87MG, сверхэкспрессирующей EGFRvIII ($\Delta 2-7$ делеционная мутация EGFR; U87MG-EGFRvIII или U87vIII). Клетки, сверхэкспрессирующие полноразмерный EGFR или EGFRvIII, 10 были получены в лаборатории W. Cavanee (Ludwig Institute for Cancer Research, Университет Калифорнии в Сан-Диего). Клетки выращивали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы, содержащей 10% FBS и 400 мкг/мл G418.

Перед анализом клетки высевали таким образом, чтобы они были не более чем на 80% конфлюэнтными в день анализа. Если не указано иное, все среды поддерживали при 15 температуре 4 °C, и все инкубации проводили на влажном льду. Клетки промывали в PBS, собирали путем добавления буфера для диссоциации клеток (Sigma), центрифугировали и ресуспендировали в полной среде при плотности клеток 2×10^6 клеток/мл. 50 мкл/лунку клеток распределяли в полипропиленовом 96-луночном планшете с v-образным дном, и добавляли серийные 1/3 разведения очищенных mAb (моноклональное антитело), начиная со 100 нМ, и 20 инкубировали в течение 2 часов. Клетки дважды промывали центрифугированием и дополнительно инкубировали с FITC-меченным F(ab')₂ козым антителом к антителам мыши (Fc-специфическое, #115-096-071, Jackson ImmunoResearch, Cedarlane) в течение часа. Клетки промывали и ресуспендировали в среде, содержащей йодид пропидия, чтобы исключить мертвые клетки из анализа. Образцы фильтровали через нейлоновую сетчатую фильтрующую 25 пластину 60 мкм (Millipore) для удаления клеточных агрегатов. Анализы проточной цитометрии проводили на 2000 жизнеспособных одноклеточных событиях с синхронизацией

по прямому рассеянию, параметрам бокового рассеяния и исключению красителя йодида пропидия с использованием проточного цитометра BD-LSRFortessa (Becton-Dickinson Biosciences) и стандартного набора фильтров с использованием программного обеспечения для сбора данных BD FACSDiva™ в соответствии с инструкциями производителя.

5 Специфическое обнаружение связывания с антителом рассчитывали как среднюю интенсивность флуоресценции связывания с каждым первичным антителом после вычитания фонового уровня средней интенсивности флуоресценции связывания человеческого IgG ChromPure (Jackson Immuno #009-000-003, используемый в качестве отрицательного контроля). Данные анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism v
10 8.4.3 с использованием односайтового специфического связывания с моделью соответствия нелинейной регрессионной кривой наклона Хилла для определения V_{max} (максимальное специфическое связывание) и K_{D-app} (концентрация, необходимая для достижения полумаксимального связывания при равновесии) для каждого тестируемого варианта антитела. Используемая модель соответствовала формуле:

15 $Y = V_{max} \times X^h / (K_D^h + X^h)$, где:

V_{max} представляет собой максимальное удельное связывание в той же единице, что и Y ;

K_D представляет собой концентрацию лиганда, необходимую для достижения полумаксимального связывания при равновесии, выраженную в той же единице, что и X ; и

20 h представляет собой переменную "h", представляющую собой наклон Хилла.

На фиг. 5 показаны иллюстративные результаты экспериментов проточной цитометрии по определению характеристик связывания моноклональных антител к EGFRvIII с экспрессируемым на поверхности клетки EGFRvIII. Соответствующие значения K_{D-app} , усредненные по нескольким экспериментам, приведены в Таблице 2. Все гуманизированные
25 антитела к EGFRvIII продемонстрировали сильное и сравнимое связывание с клетками, сверхэкспрессирующими вариант EGFRvIII. Несмотря на то, что гуманизация антитела обычно приводит к потере антигенсвязывающей аффинности, в этом случае из 9 гуманизированных вариантов 3 гуманизированных варианта имели статистически значимо улучшенное
30 связывание в пределах статистических ошибок (hH2-hL1, hH2-hL3 и hH3-hL1), 4 гуманизированных варианта имели одинаковое связывание в пределах статистических ошибок (hH1-hL1, hH2-hL2, hH3-hL2 и hH3-hL3), и 2 гуманизированных варианта имели лишь незначительное снижение связывания в 2-3-кратном диапазоне (hH1-hL2 и hH1-hL3) по сравнению с химерным вариантом (сH-cL). Следовательно, эти данные отражают необычные и неожиданные успехи гуманизации с точки зрения

сохранения и даже улучшения родительской аффинности связывания для большинства разработанных гуманизированных вариантов. Гуманизированные варианты по изобретению демонстрируют неожиданную и дающую преимущества повышенную термическую стабильность и в большинстве случаев неожиданную и дающую преимущества улучшенную аффинность связывания по сравнению с исходным антителом. Это впечатляет, учитывая большое количество мутаций, введенных в каждое из двух плеч Fab этих полноразмерных гуманизированных вариантов (в диапазоне от 30 до 36 мутаций на плечо Fab по сравнению с химерным вариантом). Беглое соотношение структура-активность указывает на то, что для каждой гуманизированной тяжелой цепи вариант легкой цепи hL1 имеет самое сильное связывание, а вариант легкой цепи hL2 имеет самое слабое связывание; и что для каждой гуманизированной легкой цепи вариант тяжелой цепи hH3 имеет самое сильное связывание, а тяжелая цепь hH1 имеет самое слабое связывание.

Таблица 2. Кажущаяся аффинность связывания (K_{D-app}) гуманизированных и химерных антител 4E11 к EGFR vIII к клеточной линии U87-MG-EGFR-vIII, определенная методом проточной цитометрии.

Вариант 4E11	SEQ ID NO	K_{D-app} (нМ)	
		Среднее	SD
cH-cL	11;12	8,8	1,3
hH1-hL1	13;16	9,7	1,5
hH1-hL2	13;17	23,0	2,6
hH1-hL3	13;18	15,7	3,0
hH2-hL1	14;16	5,8	1,1
hH2-hL2	14;17	10,5	1,4
hH2-hL3	14;18	7,2	0,3
hH3-hL1	15;16	4,9	0,7
hH3-hL2	15;17	7,9	0,3
hH3-hL3	15;18	7,1	0,6

Чтобы подтвердить специфичность гуманизированных вариантов по отношению к клеткам, экспрессирующим EGFR дикого типа, пять гуманизированных вариантов с лучшим

связыванием с клетками, экспрессирующими EGFR vIII (hH2-hL1, hH2-hL3, hH3-hL1, hH3-hL2 и hH3-hL3), тестировали методом проточной цитометрии клеток U87MG EGFR wt. Результаты, показанные на фиг. 6 и в Таблице 3, показывают, что превосходная специфичность связывания химерного варианта была сохранена в протестированных гуманизированных вариантах и еще больше улучшена в случае гуманизированных антител hH2-hL1, hH3-hL1 и hH3-hL3. Эта выгодная специфичность может привести к еще более низкой токсичности этих вариантов гуманизированных антител 4E11 по настоящему изобретению за счет незначительного связывания с нормальными клетками и тканями, где экспрессируется EGFR дикого типа.

Таблица 3. Специфичность связывания гуманизированных и химерных антител 4E11 к EGFR дикого типа, определенная с помощью проточной цитометрии с использованием клеточной линии U87-MG-EGFR-wt.

Вариант 4E11	SEQ ID NO	K_{D-app}^{EGFR} (нМ)	B_{max} при 300 нМ (средняя интенсивность флуоресценции)
cH-cL	11;12	> 300	525
hH2-hL1	13;16	> 300	319
hH2-hL3	13;17	> 300	1418
hH3-hL1	13;18	> 300	164
hH3-hL2	14;16	> 300	160
hH3-hL3	14;17	> 300	1367

В настоящем описании раскрыто, что гуманизированные антитела по настоящему изобретению демонстрируют превосходные характеристики с точки зрения термической стабильности, связывания с антигеном и специфичности, которые являются неожиданными и удивительными, учитывая наблюдаемые улучшения этих свойств по сравнению с химерным антителом, имеющим мышиную V-область родительского антитела 4E11 к EGFRvIII.

Варианты реализации и примеры, раскрытые в данном документе, являются иллюстративными и не предназначены для ограничения объема заявленного изобретения. Изменения вышеприведенных вариантов реализации изобретения, включая альтернативы,

модификации и эквиваленты, по замыслу изобретателей, должны быть охвачены формулой изобретения. Цитаты, перечисленные в настоящей заявке, включены в настоящий документ посредством ссылки.

ССЫЛКИ

Все патенты, заявки на патенты и публикации, упомянутые в настоящей заявке, включены в настоящий документ посредством ссылки.

- 5 - Abhinandan, KR and Martin, ACR. Analysis and improvements to Kabat and structurally correct numbering of antibody variable domains. 2008; *Mol Immunol*, 45, 3832-3839.
- Cleary, JM et al., *Invest New Drugs*, 33(3), pp. 671-8, 2015.;
- Chothia C, Lesk AM. Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins. *J Mol Biol*. 1987 Aug 20;196(4):901-17.
- Elvin A. Kabat, Tai Te Wu, Carl Foeller, Harold M. Perry, Kay S. Gottesman, *Sequences of*
10 *Proteins of Immunological Interest*, Vol. 1 DIANE Publishing, 1992 -- 2719.
- Feldhaus MJ et al., 2003 *Nat Biotechnol*. 2003 Feb; 21(2):163-70.
- Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG. The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J*. 2013 280):5350-70.
- Hamblett K.J, et al., *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 14(7), pp.1614-24, 2015.
- 15 - Johnson G, Wu TT. The Kabat database and a bioinformatics example. *Methods Mol Biol*. 2004; 248:11-25.
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) *Nature* 321, 522-525.
- Kabat EA, Wu TT. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and
20 complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *J Immunol*. 1991;147:1709-19.
- Mendelsohn J, et al., *Clin Cancer Res*. 2015 Jan 15;21(2):227-9.
- Reilly, EB., *Molecular Cancer Therapeutics*, Vol. 14(5), pp.1141-51, 2015.201
- Jones PT, Dear PH, Foote J, Neuberger MS, Winter G (1986) *Nature* 321 , 522-525
- 25 - Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G (1988) *Nature* 332, 323-327.
- Sato JD, et al., *Mol. Biol. Med*. 1: 511-529, 1983.
- Tempest PR, Bremmer P, Lambert M, Taylor G, Furze JM, Carr FJ, Harris WJ (1991) *Biotechnology* 9, 266-271.
- Tsurushita N, Hinton, RP, Kumar S (2005) Design of humanized antibodies: From anti-Tac to
30 Zenapax. *Methods* 36, 69-83.
- Queen C, Schneider WP, Selick HE, Payne PW, Landolfi NF, Duncan JF, Avdalovic NM, Levitt M, Junghans RP, Waldmann TA (1989) *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 10029-10033.

- Tempest PR, Bremmer P, Lambert M, Taylor G, Furze JM, Carr FJ, Harris WJ (1991) *Biotechnology* 9, 266-271.
- Патент США № 7,736,644.
- Патент США № 4,943,533 от 24.06.1990.
- 5 - Yano S, Kondo K, Yamaguchi M, Richmond G, Hutchison M, Wakeling A, Averbuch S, Wadsworth P. Distribution and function of EGFR in human tissue and the effect of EGFR tyrosine kinase inhibition. *Anticancer Res.* 2003 Sep-Oct;23(5A):3639-50.
- Cleary JM, Reardon DA, Azad N, Gandhi L, Shapiro GI, Chaves J, Pedersen M, Ansell P, Ames W, Xiong H, Munasinghe W, Dudley M, Reilly EB, Holen K, Humerickhouse R. A phase 1 study of ABT-806 in subjects with advanced solid tumors. *Invest New Drugs.* 2015 Jun;33(3):671-8 2015
- 10 - Panousis C, Rayzman VM, Johns TG, Renner C, Liu Z, Cartwright G, Lee FT, Wang D, Gan H, Cao D, Kypridis A, Smyth FE, Brechbiel MW, Burgess AW, Old LJ, Scott AM. Engineering and characterisation of chimeric monoclonal antibody 806 (ch806) for targeted immunotherapy of tumours expressing de2-7 EGFR or amplified EGFR. *Br J Cancer.* 2005 Mar 28;92(6):1069-77.
- 15 - Wu TT, Kabat EA. An analysis of the sequences of the variable regions of Bence Jones proteins and myeloma light chains and their implications for antibody complementarity. *J Exp Med* 1970; 132 (2):211-250.
- Al-Lazikani B, Lesk AM, Chothia C. Standard conformations for the canonical structures of immunoglobulins. *J Mol Biol* 1997; 273 (4):927-948.
- 20 - Retter I, Althaus HH, Munch R, Muller W. VBASE2, an integrative V gene database. *Nucl Acids Res* 2005; 33 (suppl_1):D671-D674
- Dhanda SK, Grifoni A, Pham J, Vaughan K, Sidney J, Peters B, Sette A. Development of a strategy and computational application to select candidate protein analogues with reduced HLA binding and immunogenicity. *Immunology* 2018; 153 (1):118-132.

25

ТАБЛИЦА ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТЕЙ

SEQ ID NO	Название	Описание	Последовательность
1	mVH	VH-область	DVQLQESGPGGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIWIRQFPG NKLEWMGYIGYNGRTSYNPSLKSRSISITRDTSKNQFFLQLNYV TTEDTATFYCARLGRGFAYWGQGLVTVSA

		мышинного 4E11	
2	mVL	VL-область мышинного 4E11	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSI TCHASQGINSNIGWLLQKPGKSF KGLIYHGTNLEDGVPSRFSGS SGSGTDYSLTISSESEDFADYYC VQYAQFPYTFGGGKLEIK
3	hVHx	Консенсус ная гуманизи рованная VH- область 4E11	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGYSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWX ₁ GYIGYNGRTS YNPSLKSXR ₂ TISX ₃ DTSKNQFSLKLS SVTAADTAVYYCARLGRGFAYWGQ GTLVTVSS где X ₁ = I или M, X ₂ = V или I, и X ₃ = V или R
4	hVLx	Консенсус ная гуманизи рованная VL- область 4E11	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT CHASQGINSNIGWX ₄ QKPGK AX ₅ KX ₆ LIYHGTNLEDGVPSRFS SGSGTDYTLTISSLQPEDFAT YYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIK где X ₄ = Y или L, X ₅ = P или F, и X ₆ = L или G
5	hVH1	Гуманизи рованная VH- область 4E11, вариант 1	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGYSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYIGYNGRTS YNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLGRGFAYWGQ GTLVTVSS
6	hVH2	Гуманизи рованная VH- область 4E11, вариант 2	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGYSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWIGYIGYNGRTS YNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLGRGFAYWGQ GTLVTVSS
7	hVH3	Гуманизи рованная VH-	QVQLQESGPGLVKPSQTL SLTCTVSGYSITSDYAWN WIRQPPGKGLEWMGYIGYNGRTS YNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARLGRGFAYWGQ GTLVTVSS

		область 4E11, вариант 3	
8	hVL1	Гуманизир ованная VL-область 4E11, вариант 1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWYQQKPGKA PKLLIYHGNTLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CVQYAQFPYTFGQGTKLEIK
9	hVL2	Гуманизир ованная VL-область 4E11, вариант 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWLQQKPGKA PKGLIYHGNTLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CVQYAQFPYTFGQGTKLEIK
10	hVL3	Гуманизир ованная VL-область 4E11, вариант 3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWLQQKPGKA FKGLIYHGNTLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYY CVQYAQFPYTFGQGTKLEIK
11	cH	Химерная тяжелая цепь 4E11 на фоне человеческ ого IgG4 (S228P)	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIWIRQFPG NKLEWMGYIGYNGRTSYNPSLKSRSITRDTSKNQFFLQLNYV TTEDTATFYCARLGRGFAYWGQGLVTVSAASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLG
12	cL	Химерная легкая цепь 4E11 на	DILMTQSPSSMSVSLGDTVSITCHASQGINSNIGWLLQKPGKSF KGLIYHGNTLEDGVPSRFSGSGSGTDYSLTISSLESEDFADYYC VQYAQFPYTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS

		фоне человеческ ого каппа	VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
13	hH1	Гуманизир ованная тяжелая цепь 4E11, вариант 1, на фоне человеческ ого IgG4 (S228P)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWIROPPG KGLEWIGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISVDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLGRGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLG
14	hH2	Гуманизир ованная тяжелая цепь 4E11, вариант 2, на фоне человеческ ого IgG4 (S228P)	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWIROPPG KGLEWIGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVT AADTAVYYCARLGRGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPR EPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSLG
15	hH3	Тяжелая цепь гуманизиро ванного 4E11, вариант 3, на фоне	QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWIROPPG KGLEWMGYIGYNGRTSYNPSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSV TAADTAVYYCARLGRGFAYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPL APCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYR

		человеческого IgG4 (S228P)	VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG
16	hL1	Гуманизованная легкая цепь 4E11, вариант 1, на фоне человеческого каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWYQQKPGKAPKLLIYHGNTLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	hL2	Гуманизованная легкая цепь 4E11, вариант 2, на фоне человеческого каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWLQQKPGKAPKGLIYHGNTLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
18	hL3	Гуманизованная легкая цепь 4E11, вариант 3, на фоне человеческого каппа	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWLQQKPGKAPFKGLIYHGNTLEDGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSSITLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
19	HSP	Сигнальный пептид на тяжелой цепи	MDWTWRILFLVAAATGTHA

		(иллюстративный)	
20	LSP	Сигнальный пептид на легкой цепи (иллюстративный)	MVLQTQVFISLLLWISGAYG
21	ДНК hH1-SP	Последовательность ДНК гуманизированной тяжелой цепи 4E11, вариант 1, на фоне человеческого IgG4 (S228P) включая иллюстративный сигнальный пептид (подчеркнуто)	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCCGC</u> <u>CACCGGCACCCACGCCAG</u> GTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCCT CCCAGACCCTGTCCCTGACC TGCACCGTGTCCGGCTACTCCATCACCTCCGACTACGCCTG GAACTGGATCAGGCAGCCC CCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCGGCTACA ACGGCAGGACCTCCTACAAC CCCTCCCTGAAGTCCAGGGTGACCATCTCCGTGGACACCTC CAAGAACCAGTTCTCCCTG AAGCTGTCCTCCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTGТАCTA CTGCGCCAGGCTGGGCAGG GGCTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTC CTCCGCCTCCACCAAGGGC CCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTGCTCCAGGTCCACCTCC GAGTCCACCGCCGCCCTG GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAACTCCGGCGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGTC CTCCGGCCTGTACTCCCTG TCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCTCCTCCCTGGGCACCAA GACCTACACCTGCAACGTG GACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGG AGTCCAAGTACGGCCCCCCC

			<p>TGCCCCCCTGCCCCGCCCCGAGTTCCTGGGCGGCCCTC CGTGTTCTGTTCCTGTTCCCCCCC AAGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCAGGACCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTTCAACTCCA CCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAAC AAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGC CAAGGGCCAGCCAGGGAG CCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCAGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGTCCAACGGC CAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGG AGGGCAACGTGTTCTCCTGC TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGTCCCTGTCCCTG GGC</p>
22	ДНК hH2-SP	Последовательность ДНК гуманизированной тяжелой цепи 4E11, вариант 2, на фоне	<p><u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCCGC</u> <u>CACCGGCACCCACGCCAG</u> GTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCCT CCCAGACCCTGTCCCTGACC TGCACCGTGTCCGGCTACTCCATCACCTCCGACTACGCCTG GAACTGGATCAGGCAGCCC CCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCGGCTACA ACGGCAGGACCTCCTACAAC</p>

		<p>человеческого IgG4 (S228P) включая иллюстративный сигнальный пептид (подчеркнуто)</p>	<p>CCCTCCCTGAAGTCCAGGGTGACCATCTCCAGGGACACCTC CAAGAACCAGTTCTCCCTG AAGCTGTCCTCCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTGТАCTA CTGCGCCAGGCTGGGCAGG GGCTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGTC CTCCGCCTCCACCAAGGGC CCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTGCTCCAGGTCCACCTCC GAGTCCACCGCCGCCCTG GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCTGGAАCTCCGGCGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGTC CTCCGGCCTGТАCTCCCTG TCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCTCCTCCCTGGGCACCAA GACCTACACCTGCAACGTG GACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGG AGTCCAAGTACGGCCCCCCC TGCCCCCCTGCCCCGCCCCCGAGTTCTGGGCGGCCCTC CGTGTTCTTGTTCCCCCCC AAGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCAGGACCCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGTCCCAGGAGGACCCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTTCAACTCCA CCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAAC AAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGC CAAGGGCCAGCCCAGGGAG CCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCCTCCAGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGTCCAACGGC</p>
--	--	--	---

			<p>CAGCCCGAGAACAАCTACAAGACCACCCCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGG AGGGCAACGTGTTCTCCTGC TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGTCCCTGTCCCTG GGC</p>
23	ДНК hN3-SP	<p>Последовательность ДНК гуманизированной тяжелой цепи 4E11, вариант 3, на фоне человеческого IgG4 (S228P) включая иллюстративный сигнальный пептид (подчеркнуто)</p>	<p><u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTGTTCTGGTGGCCGCCGC</u> <u>CACCGGCACCCACGCCAG</u> GTGCAGCTGCAGGAGTCCGGCCCCGGCCTGGTGAAGCCCT CCCAGACCCTGTCCCTGACC TGCACCGTGTCCGGCTACTCCATCACCTCCGACTACGCCTG GAACTGGATCAGGCAGCCC CCCGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCTACATCGGCTACA ACGGCAGGACCTCCTACAAC CCCTCCCTGAAGTCCAGGATCACCATCTCCAGGGACACCTC CAAGAACCAGTTCTCCCTG AAGCTGTCCTCCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTGTA CTGCGCCAGGCTGGGCAGG GGCTTCGCCTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGTC CTCCGCCTCCACCAAGGGC CCCTCCGTGTTCCCCCTGGCCCCCTGCTCCAGGTCCACCTCC GAGTCCACCGCCGCCCTG GGCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCCGAGCCCGTGACCGT GTCCCTGGAАCTCCGGCGCC CTGACCTCCGGCGTGCACACCTTCCCCGCCGTGCTGCAGTC CTCCGGCCTGTACTCCCTG TCCTCCGTGGTGACCGTGCCCTCCTCCTCCCTGGGCACCAA GACCTACACCTGCAACGTG GACCACAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGAGGGTGG AGTCCAAGTACGGCCCCCCC</p>

			<p>TGCCCCCCTGCCCGCCCCGAGTTCCTGGGCGGCCCTC CGTGTTCTGTTCCTCCCCC AAGCCAAGGACACCCTGATGATCTCCAGGACCCCGAGG TGACCTGCGTGGTGGTGGAC GTGTCCCAGGAGGACCCGAGGTGCAGTTCAACTGGTACG TGGACGGCGTGGAGGTGCAC AACGCCAAGACCAAGCCCAGGGAGGAGCAGTTCAACTCCA CCTACAGGGTGGTGTCCGTG CTGACCGTGTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGT ACAAGTGCAAGGTGTCCAAC AAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTCCAAGGC CAAGGGCCAGCCAGGGAG CCCCAGGTGTACACCCTGCCCCCTCCAGGAGGAGATGA CCAAGAACCAGGTGTCCCTG ACCTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCCTCCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGTCCAACGGC CAGCCCGAGAACAACACTACAAGACCACCCCCCGTGCTGG ACTCCGACGGCTCCTTCTTC CTGTACTCCAGGCTGACCGTGGACAAGTCCAGGTGGCAGG AGGGCAACGTGTTCTCCTGC TCCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGA AGTCCCTGTCCCTGTCCCTG GGC</p>
24	ДНК hL1-SP	Последовательность ДНК гуманизированной ванной легкой цепи 4E11, вариант 1, на фоне	<p><u>ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTG</u> <u>GATCTCCGGCGCCTACGGC</u> GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTC CGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGCCACGCCTCCAGGGCATCAACTCCAACATCGG CTGGTACCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGCTGCTGATCTACCACGGCACCAACC TGGAGGACGGCGTGCCCTCC</p>

		человеческого каппа включая иллюстративный сигнальный пептид (подчеркнуто)	AGGTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGAC CATCTCCTCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCGTGCAGTACGCCCAGTT CCCCTACACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCCGCCCCCT CCGTGTTTATCTTCCCCCCC TCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTG CCTGCTGAACAАCTTCTAC CCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAAGGTGGACAACGCC TGCAGTCCGGCAACTCCCAG GAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCCACCTACT CCCTGTCTCCACCCTGACC CTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT GCGAGGTGACCCACCAGGGC CTGTCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACAGGGGGCGAGTG C
25	ДНК hL2-SP	Последовательность ДНК гуманизированной легкой цепи 4E11, вариант 2, на фоне человеческого каппа включая иллюстративный сигнальный пептид	<u>ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTTATCTCCTGCTGCTGTG</u> <u>GATCTCCGGCGCCTACGGC</u> GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTC CGTGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGCCACGCCTCCCAGGGCATCAACTCCAACATCGG CTGGCTGCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCCCCAAGGGCCTGATCTACCACGGCACCAACC TGGAGGACGGCGTGCCCTCC AGGTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGAC CATCTCCTCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCGTGCAGTACGCCCAGTT CCCCTACACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCCGCCCCCT CCGTGTTTATCTTCCCCCCC TCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTG CCTGCTGAACAАCTTCTAC

		(подчеркнуто)	<p>CCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC TGCAGTCCGGCAACTCCCAG GAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCCACCTACT CCCTGTCCTCCACCCTGACC CTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT GCGAGGTGACCCACCAGGGC CTGTCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACAGGGGGCGAGTG C</p>
26	ДНК hL3-SP	Последовательность ДНК гуманизированной легкой цепи 4E11, вариант 3, на фоне человеческого каппа включая иллюстративный сигнальный пептид (подчеркнуто)	<p><u>ATGGTGCTGCAGACCCAGGTGTTCATCTCCCTGCTGCTGTG</u> <u>GATCTCCGGCGCCTACGGC</u> GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCTCCCTGTCCGCCTC CGTGGGGCGACAGGGTGACC ATCACCTGCCACGCCTCCCAGGGCATCAACTCCAACATCGG CTGGCTGCAGCAGAAGCCC GGCAAGGCCTTCAAGGGCCTGATCTACCACGGCACCAACC TGGAGGACGGCGTGCCCTCC AGGTTCTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGACTACACCCTGAC CATCTCCTCCCTGCAGCCC GAGGACTTCGCCACCTACTACTGCGTGCAGTACGCCCAGTT CCCCTACACCTTCGGCCAG GGCACCAAGCTGGAGATCAAGAGGACCGTGGCCGCCCCCT CCGTGTTCATCTTCCCCCCC TCCGACGAGCAGCTGAAGTCCGGCACCGCCTCCGTGGTGTG CCTGCTGAACAАCTTCTAC CCCAGGGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCC TGCAGTCCGGCAACTCCCAG GAGTCCGTGACCGAGCAGGACTCCAAGGACTCCACCTACT CCCTGTCCTCCACCCTGACC CTGTCCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCT GCGAGGTGACCCACCAGGGC CTGTCCTCCCCCGTGACCAAGTCCTTCAACAGGGGGCGAGTG C</p>

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент, который специфически связывается с вариантом III рецептора эпидермального фактора роста (EGFR_{vIII}), где указанный антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит:

a. переменную область тяжелой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYSITSDYAWNWRQPPGKGLEWX₁GYIGYNGRTSY
NPSLKSXR₂TISX₃DTSKNQFSLKLSVTAADTAVYYCARLGRGFAYWGQGTLLTVSS (SEQ
ID NO: 3), где X₁ = I или M, X₂ = V или I, и X₃ = V или R; и,

b. переменную область легкой цепи, содержащую аминокислотную последовательность

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCHASQGINSNIGWX₄QQKPGKAX₅KX₆LIYHGNTNLEDGVPS
RFSGSGSGTDYTLTISLQPEDFATYYCVQYAQFPYTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 4), где X₄
= Y или L, X₅ = P или F, and X₆ = L или G.

2. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1, где:

a. переменная последовательность тяжелой цепи, выбрана из любой из SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 и SEQ ID NO: 7; и

b. переменная последовательность легкой цепи, выбрана из любой из SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 10.

3. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 1 или п. 2, где антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерный антигенный рецептор, биспецифический рекрутер Т-клеток, биспецифический рекрутер клеток-киллеров, триспецифический рекрутер клеток-киллеров или любое иммунотерапевтическое соединение.

4. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 3, где антитело представляет собой моноклональное антитело, поликлональное антитело, гуманизованное антитело, химерное антитело, антитело человека, одноцепочечное антитело или мультиспецифическое антитело.

5. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG человека.
6. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 5, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека.
7. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 4, где антитело или его антигенсвязывающий фрагмент содержит константную область IgG4 человека, несущую мутацию S228P.
8. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 7, который специфически связывается с EGFRvIII, где указанный антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент содержит последовательность тяжелой цепи и последовательность легкой цепи, где:
- a. последовательность тяжелой цепи представляет собой SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14 или SEQ ID NO: 15; и
- b. последовательность легкой цепи представляет собой SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17 или SEQ ID NO: 18.
9. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 3-8, где антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент включает scFv, Fab, Fab' или (Fab')₂.
10. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 3-9, где антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент связан с молекулой нагрузки.
11. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 10, где молекула нагрузки содержит терапевтический фрагмент.
12. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, где терапевтический фрагмент включает цитотоксический агент, цитостатический агент, противораковый агент или радиотерапевтический агент.

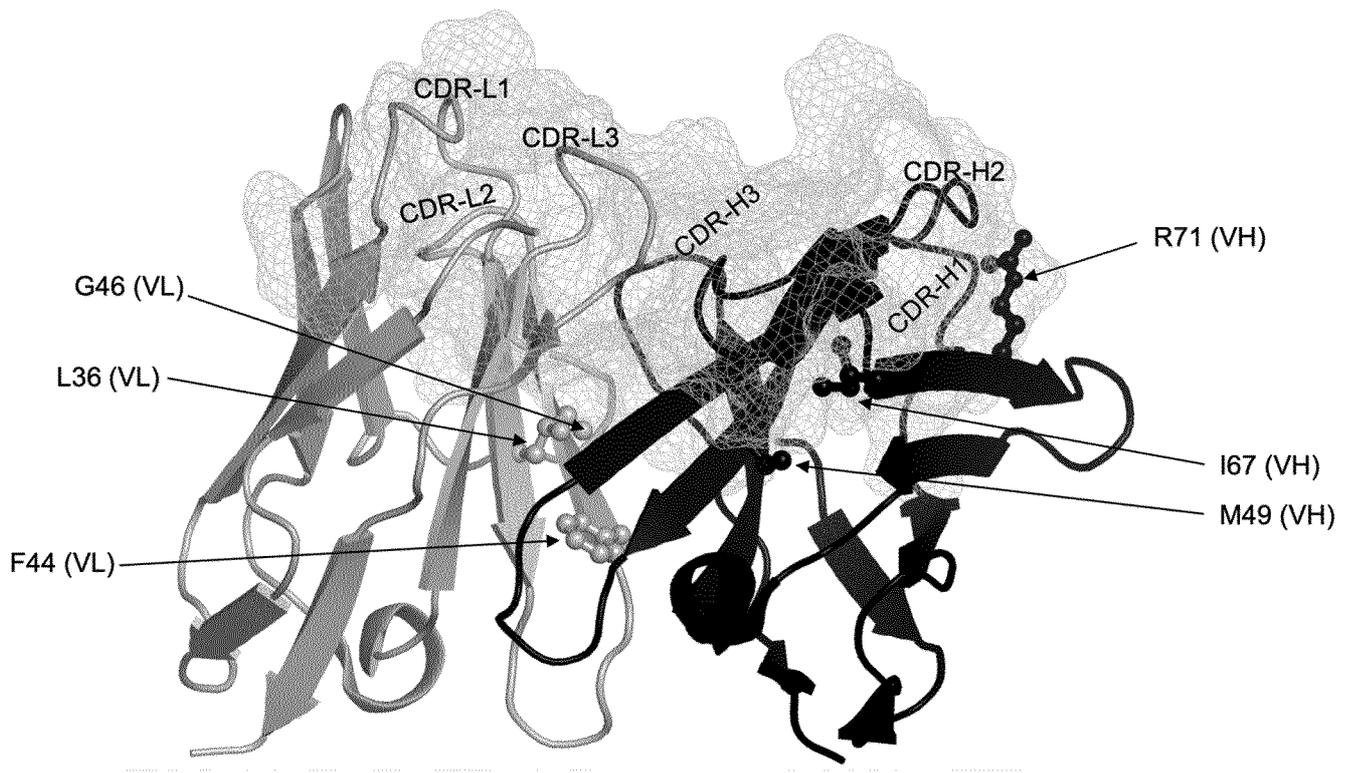
13. Антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по п. 11, где антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент конъюгирован с детектируемым фрагментом.
- 5 14. Фармацевтическая композиция, содержащая антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-13 и фармацевтически приемлемый носитель, разбавитель или эксципиент.
- 10 15. Молекула нуклеиновой кислоты, кодирующая переменную область тяжелой цепи и/или переменную область легкой цепи антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9.
- 15 16. Набор, содержащий по меньшей мере один из антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-15.
17. Вектор или набор векторов, содержащий последовательность нуклеиновой кислоты, кодирующую переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-11.
- 20 18. Выделенная клетка, содержащая вектор или набор векторов по п. 17.
19. Выделенные клетки по п. 18, где указанная клетка способна экспрессировать, собирать и/или секретировать антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или его антигенсвязывающий фрагмент.
- 25 20. Набор, содержащий первый сосуд, содержащий нуклеотид или вектор, кодирующий легкую цепь антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, и второй сосуд, содержащий нуклеотид или вектор, кодирующий тяжелую цепь антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9.
- 30 21. Способ лечения рака, содержащего клетки, экспрессирующие EGFRvIII, где указанный способ включает введение антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-14 нуждающемуся субъекту.

22. Способ по п. 21, где антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент применяют в комбинации с химиотерапевтическим средством.
23. Способ по любому из пп. 21 или 22, где нуждающийся субъект имеет или у него подозревают присутствие мультиформной глиобластомы.
24. Способ по любому из пп. 21 или 22, где нуждающийся субъект имеет или у него подозревают присутствие карциномы.
25. Способ по п. 24, где карцинома включает карциному молочной железы или HNSCC - плоскоклеточный рак головы и шеи.
26. Способ детектирования EGFRvIII, включающий приведение в контакт образца, содержащего или предположительно содержащего EGFRvIII, с антигенсвязывающим агентом, антигенсвязывающим доменом, антителом или антигенсвязывающим фрагментом по любому из пп. 1-14.
27. Способ получения антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-9, включающий культивирование клетки, содержащей нуклеиновые кислоты, кодирующие указанный антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент, с получением указанного антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента.
28. Способ по п. 27, дополнительно включающий конъюгирование антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или его антигенсвязывающего фрагмента с молекулой нагрузки.
29. Способ по п. 28, где молекула нагрузки содержит терапевтический фрагмент.
30. Способ по п. 29, где молекула нагрузки содержит детектируемый фрагмент.
31. Способ лечения субъекта, имеющего рак, связанный с экспрессией EGFRvIII, где способ включает введение клеток, экспрессирующих антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент по любому из пп. 1-3, где указанный антигенсвязывающий агент, антигенсвязывающий домен, антитело или антигенсвязывающий фрагмент представляет собой химерный антигенный рецептор, биспецифический рекрутер Т-клеток, биспецифический рекрутер клеток-киллеров или триспецифический рекрутер клеток-киллеров или конъюгат антитела и лекарственного средства.

32. Способ по п. 31, где нуждающийся субъект имеет или у него подозревают присутствие глиомы.
33. Способ по п. 32, где глиома представляет собой мультиформную глиобластому.
34. Способ по п. 31, где нуждающийся субъект имеет или у него подозревают присутствие карциномы.
- 5 35. Способ по п. 34, где карцинома включает карциному молочной железы, карциному полости рта или HNSCC.
36. Способ по любому из пп. 31-35, где клетки представляют собой Т-клетки.
37. Способ по любому из пп. 31-36, где клетки представляют собой НК-клетки.
- 10 38. Способ по любому из пп. 31-47, где клетки представляют собой иммунные клетки, аутологичные субъекту.
39. Выделенная клеточная популяция, сконструированная для экспрессии антигенсвязывающего агента, антигенсвязывающего домена, антитела или антигенсвязывающего фрагмента по любому из пп. 1-3.
- 15 40. Выделенная клеточная популяция по п. 39, которая имеет человеческое происхождение.
41. Выделенная клеточная популяция по п. 39 или 40, которая содержит Т-клетки, естественные киллеры (НК-клетки), цитотоксические Т-клетки, регуляторные Т-клетки и их комбинации.
- 20 42. Выделенная клеточная популяция по п. 41, которая содержит Т-клетки.
43. Выделенная клеточная популяция по п. 42, где Т-клетки включают CD4+ Т-клетки, CD8+ Т-клетки или их комбинацию.
44. Выделенная клеточная популяция по п. 41, которая содержит НК-клетки.
45. Выделенная клеточная популяция по любому из пп. 39-44, которая сконструирована для экспрессии другого химерного антигенного рецептора, обладающего аффинностью к другому антигену той же мишени или другой мишени.
- 25 46. Выделенная клеточная популяция по любому из пп. 39-44, которая содержит иммунные клетки хозяина.
47. Фармацевтическая композиция, содержащая выделенную клеточную популяцию по любому из пп. 39-46 и фармацевтически приемлемый буфер или эксципиент.
- 30

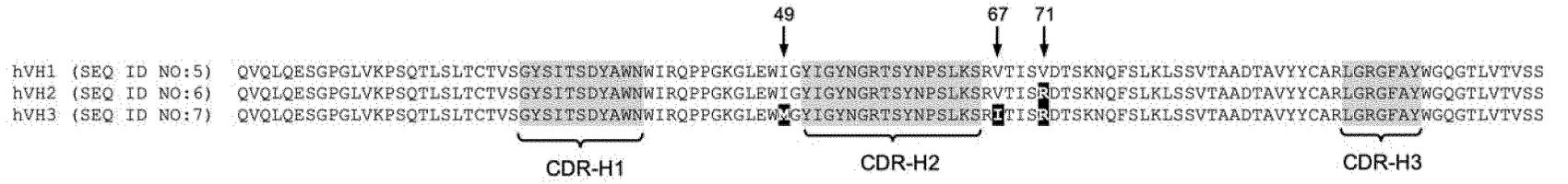
Фиг. 1



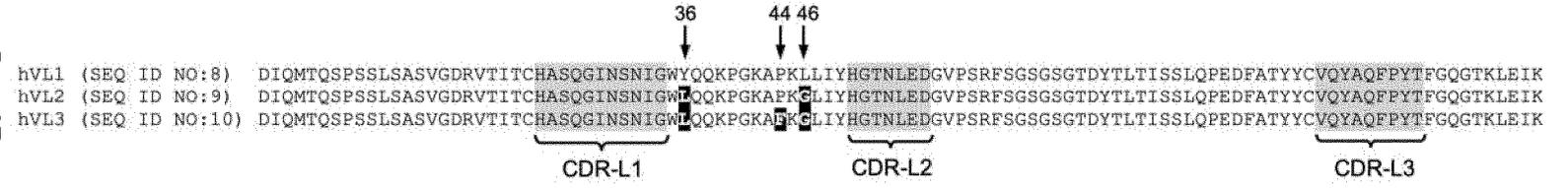


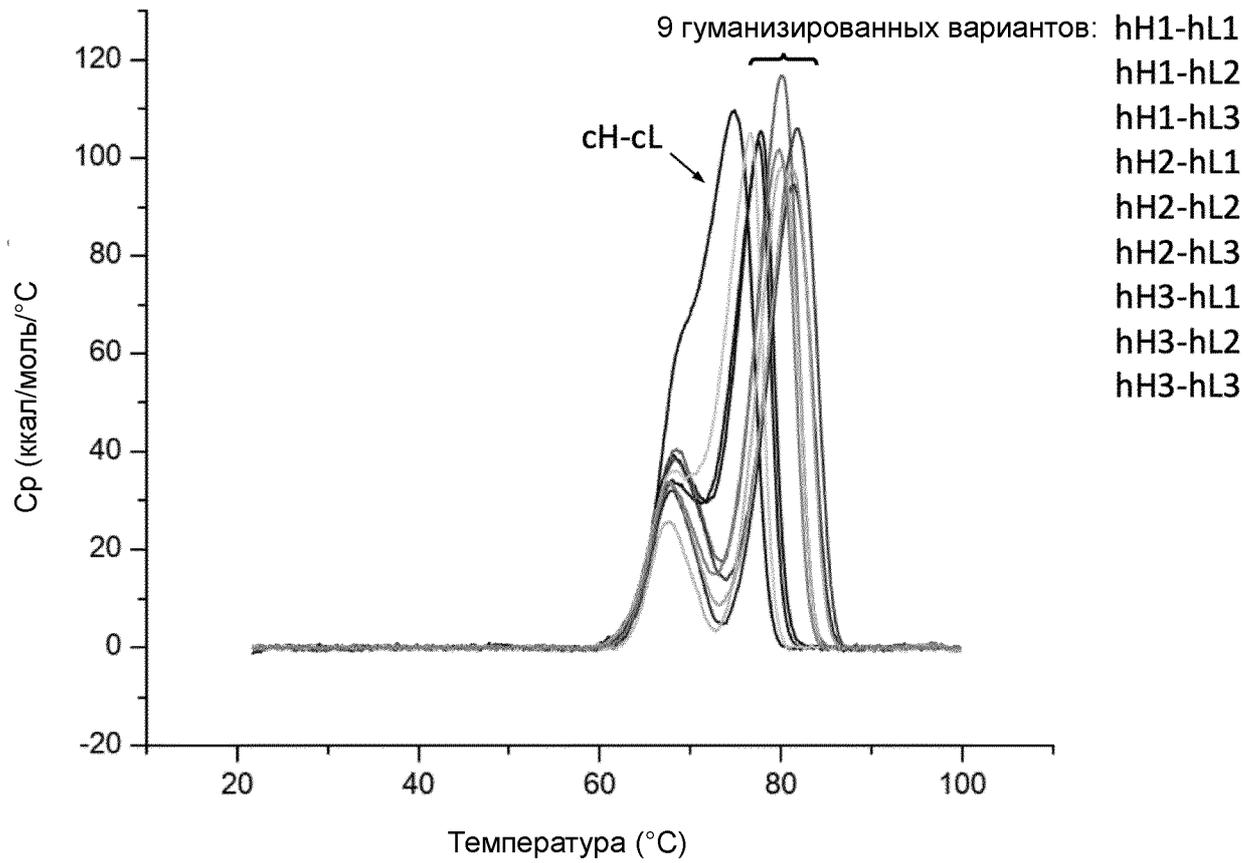
Фиг. 2

Фиг. 3А

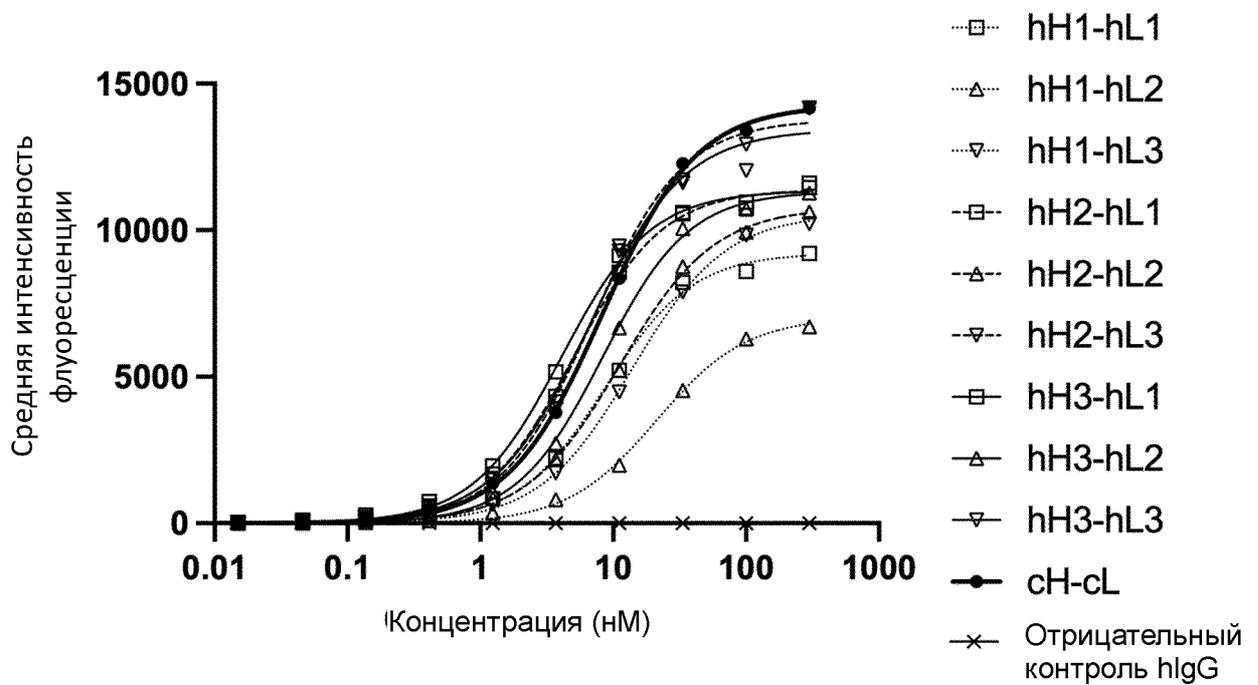


Фиг. 3В

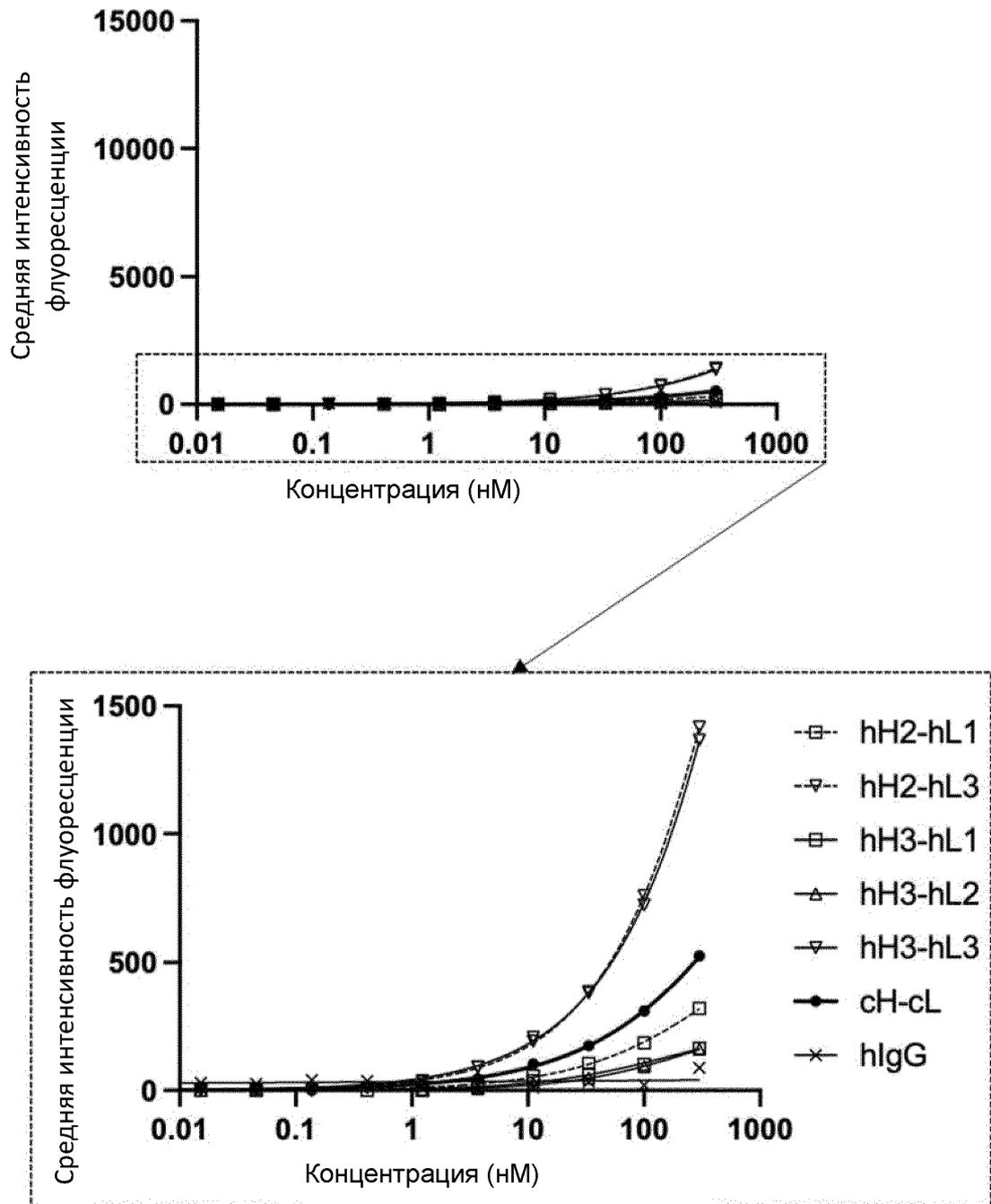




Фиг. 4



Фиг. 5



Фиг. 6