



(51) МПК
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ,
 ПАТЕНТАМ И ТОВАРНЫМ ЗНАКАМ**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: **2008119689/10, 19.10.2006**

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
19.10.2006

Приоритет(ы):

(30) Конвенционный приоритет:
21.10.2005 GB 0521509.0
22.08.2006 GB 0616666.4

(43) Дата публикации заявки: **27.11.2009** Бюл. № 33

(45) Опубликовано: **20.06.2011** Бюл. № 17

(56) Список документов, цитированных в отчете о
 поиске: **WO 2005/007699 A, 27.01.2005. WO**
2003/086451 A, 23.10.2003. WO 2002/055100 A,
18.07.2002. WO 1994/004680 A, 03.03.1994. RU
2170589 C2, 20.07.2001.

(85) Дата начала рассмотрения заявки РСТ на
 национальной фазе: **21.05.2008**

(86) Заявка РСТ:
EP 2006/010098 (19.10.2006)

(87) Публикация заявки РСТ:
WO 2007/045477 (26.04.2007)

Адрес для переписки:

101000, Москва, М.Златоустинский пер., д.10,
кв.15, "ЕВРОМАРКПАТ", пат.пов.
И.А.Веселицкой, рег.№ 0011

(72) Автор(ы):

БУХЛЕР Джой (US),
КАМПБЕЛЛ Эмма Мишелл (GB),
ПАРВИН София (GB),
ВАЛКИРС Гунарс (US)

(73) Патентообладатель(и):
НОВАРТИС АГ (CH)

(54) ЧЕЛОВЕЧЕСКИЕ АНТИТЕЛА К IL-13 И ИХ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ

(57) Реферат:

Настоящее изобретение относится к иммунологии и биотехнологии. Предложены варианты антител к IL-13, каждое из которых содержит, соответственно, три CDR тяжелой и три CDR легкой цепи. Описана

фармацевтическая композиция на основе антител для лечения астмы. Использование изобретения может найти дальнейшее применение в терапии В-клеточных расстройств, опосредованных IL-13. 2 н. и 9 з.п. ф-лы, 6 табл.

RU
 2 4 2 1 4 6 4
 C 2

RU
 2 4 2 1 4 6 4
 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY,
PATENTS AND TRADEMARKS

(51) Int. Cl.
C07K 16/24 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 11/06 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2008119689/10, 19.10.2006**

(24) Effective date for property rights:
19.10.2006

Priority:

(30) Priority:
21.10.2005 GB 0521509.0
22.08.2006 GB 0616666.4

(43) Application published: **27.11.2009 Bull. 33**

(45) Date of publication: **20.06.2011 Bull. 17**

(85) Commencement of national phase: **21.05.2008**

(86) PCT application:
EP 2006/010098 (19.10.2006)

(87) PCT publication:
WO 2007/045477 (26.04.2007)

Mail address:

101000, Moskva, M.Zlatoustinskij per., d.10,
kv.15, "EVROMARKPAT", pat.pov.
I.A.Veselitskoj, reg.№ 0011

(72) Inventor(s):

BUKHLER Dzhoj (US),
KAMPBELL Ehma Mishell (GB),
PARVIN Sofija (GB),
VALKIRS Gunars (US)

(73) Proprietor(s):

NOVARTIS AG (CH)

(54) **HUMAN IL-13 ANTIBODIES AND THEIR THERAPEUTIC APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.
SUBSTANCE: offered are versions of IL-13 antibodies each of which contains respectively three CDR heavy and three CDR light chains. A pharmaceutical composition of antibodies for asthma

treatment is described.

EFFECT: use of the invention can find further application in therapy of the IL-13 mediated B-cell disorders.

11 cl, 6 tbl, 2 ex

R U 2 4 2 1 4 6 4 C 2

R U 2 4 2 1 4 6 4 C 2

Текст описания приведен в факсимильном виде.

Область техники, к которой относится изобретение

5 Настоящее изобретение относится к специфическим связывающим
субстанциям, прежде всего молекулам человеческих антител к IL-13, которые
нейтрализуют активность IL-13. Изобретение относится также к способам
10 применения молекул антител к IL-13 для диагностики или лечения связанных с
IL-13 заболеваний, таких как астма, atopический дерматит, аллергический
ринит, фиброз, воспалительное заболевание кишечника, ходжкинская лимфома.

Предпосылки создания изобретения

15 Интерлейкин (IL) -13 представляет собой состоящий из 114 аминокислот
цитокин, который в немодифицированном виде имеет молекулярную массу
примерно 12 кДа [McKenzie A. N. и др., J Immunol, 150 (12), 1993, сс. 5436-5444
и Minty A. и др., Nature, 362 (6417), 1993, сс. 248-250.]. IL-13 наиболее близок к
20 IL-4, их сходство на уровне аминокислотных последовательностей составляет

30%. Ген человеческого IL-13 локализован на хромосоме 5q31 по соседству с геном IL-4. Эта область хромосомы 5q содержит генные последовательности других выведенных из Th2-лимфоцитов цитокинов, включая GM-CSF и IL-5, для которых установлено, что их уровни в сочетании с уровнем IL-4, коррелируют с серьезностью заболевания у астматиков и аллергического воспаления, созданного на моделях с использованием грызунов [Nakamura Y. и др., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 15 (5), 1996, сс. 680-687, Robinson D. S. и др., *N Engl J Med*, 326 (5), 1992, сс. 298-304, Walker C. и др., *Am J Respir Crit Care Med*, 150 (4), 1994, сс. 1038-1048, Humbert M. и др., *Am J Respir Crit Care Med*, 154 (5), 1996, сс. 1497-1504, Corrigan C. J. и A. B. Kay, *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 94 (1-4), 1991, сс. 270-271, Bentley A. M. и др., *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1993].

Хотя впервые IL-13 идентифицирован как цитокин, выведенный из Th2-CD4+-лимфоцитов, он продуцируется также Th1-CD4+- Т-клетками, NK-клетками типа CD8+-Т лимфоцитов и популяциями клеток, не относящихся к Т-клеткам, такими как тучные клетки, базофилы, эозинофилы, макрофаги, моноциты и гладкомышечные клетки дыхательных путей.

Известно, что IL-13 проявляет свое действие через систему рецепторов, которая включает цепь (IL-4R α) рецептора IL-4, которая сама по себе может связываться с IL-4, но не с IL-13, и по меньшей мере два других белка клеточной поверхности, IL-13R α_1 и IL-13R α_2 [Murata T. и др., *Int J Hematol*, 69(1), 1999, сс. 13-20, Andrews A.L. и др., *J Biol Chem*, 277(48), 2002, сс. 46073-46078.]. IL-13R α_1 может связываться с IL-13 с низкой аффинностью и, как следствие, вовлекает IL-4R α в формирование обладающего высокой аффинностью функционального рецептора, который участвует в передаче сигналов [Miloux B. и др., *FEBS Lett*, 401 (2-3), 1997, сс. 163-166, Hilton D. J. и др., *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (1), 1996, сс. 497-501]. В базе данных Genbank аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность IL-13R α_1 находятся под номерами NP 001551 и Y10659 соответственно. Исследование, проведенное с использованием мышей с дефицитом STAT6 (signal transducer and activator of transcription 6, трансдуктор сигнала и активатор транскрипции 6), позволило установить, что IL-13, аналогично IL-4 передает сигналы с помощью JAK-STAT6-пути [Kuperman D. и др., *J Exp Med*, 187 (6), 1998, сс. 939-948, Nelms K. и др., *Annu Rev Immunol*, 17, 1999, сс. 701-738.]. Аминокислотная последовательность IL-

13R α_2 идентична на 37% последовательности IL-13R α_1 и связывается с IL-13 с высокой аффинностью [Zhang J. G. и др., J Biol Chem, 272 (14), 1997, сс. р. 9474-9480, Carut D. и др., J Biol Chem, 271 (28), 1996, сс. 16921-16926.]. Однако IL-13R α_2 имеет более короткий цитоплазматический «хвост», лишенный известных участвующих в передаче сигнала мотивов. Клетки, экспрессирующие IL-13R α_2 , не обладают чувствительностью к IL-13 даже в присутствии IL-4R α [Kawakami K. и др., Blood, 97 (9), 2001, сс. 2673-2679]. Таким образом, считается, что IL-13R α_2 действует в качестве рецептора-«ловушки», который регулирует функцию IL-13, но не регулирует функцию IL-4. Это подтверждено исследованиями, проведенными с использованием мышей с дефицитом IL-13R α_2 , фенотип которых отличался повышенной отвечаемостью на IL-13 [Wood N. и др., J Exp Med, 197 (6), 2003, сс. 703-709, Chiaramonte M. G. и др., J Exp Med, 197 (6), 2003, сс. 687-701]. В базе данных Genbank аминокислотная последовательность и нуклеотидная последовательность IL-13R α_2 находятся под номерами NP000631 и Y08768 соответственно.

Краткое изложение сущности изобретения

Одним из вариантов осуществления изобретения является выделенное человеческое или гуманизованное антитело или его функционально активный фрагмент с антигенсвязывающим участком, который обладает специфичностью в отношении белка-мишени, т.е. IL-13, где антитело или его функционально активный фрагмент связывается с IL-13. В родственном варианте осуществления изобретения связывание с IL-13 определяют по меньшей мере по связыванию находящего на клеточной поверхности рецептора IL-13, предупреждающему высвобождение медиатора воспаления.

Следующим объектом настоящего изобретения является выделенная антигенсвязывающий участок антитела или его функционального фрагмента. В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий участок включает H-CDR3-участок, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:9-10 и их консервативных вариантов. Как описано ниже, консервативные варианты включают аминокислотные остатки из любых идентифицированных аминокислотных последовательностей. В родственном варианте осуществления изобретения выделенный антигенсвязывающий участок представляет собой H-CDR2-участок,

имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:8, и ее консервативные варианты. В другом родственном варианте осуществления изобретения выделенный антигенсвязывающий участок представляет собой H-CDR1-участок, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:6-7 и их консервативных вариантов.

В другом варианте осуществления изобретения выделенный антигенсвязывающий участок представляет собой L-CDR3-участок, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:20-22 и их консервативных вариантов. В еще одном родственном варианте осуществления изобретения выделенный антигенсвязывающий участок представляет собой L-CDR1-участок, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID NO:16-18 и их консервативных вариантов. В следующем родственном варианте осуществления изобретения выделенный антигенсвязывающий участок представляет собой L-CDR2-участок, имеющий аминокислотную последовательность, представленную в SEQ ID NO:19, и ее консервативные варианты.

В конкретных вариантах осуществления изобретения антигенсвязывающий участок представляет собой переменную область легкой цепи, имеющую аминокислотную последовательность, выбранную из SEQ ID:16-22 и их консервативных вариантов.

В другом варианте осуществления изобретения выделенный антигенсвязывающий участок представляет собой тяжелую цепь, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из одной-трех последовательностей, представленных в SEQ ID: 6-10, и где последовательность идентична по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% CDR-участкам, где CDR-участки имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO:6-10. В родственном варианте осуществления изобретения выделенный антигенсвязывающий участок представляет собой легкую цепь, аминокислотную последовательность которой выбирают из одной-трех последовательностей, представленных в SEQ ID:16-22, и где последовательность идентична по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% CDR-участкам, где CDR-участки имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO:16-22.

В конкретном варианте осуществления изобретения выделенное антитело представляет собой IgG. В другом варианте осуществления изобретения выделенное антитело представляет собой IgG1 или IgG4.

Следующим вариантом осуществления изобретения является выделенное человеческое или гуманизированное антитело или его функционально активный фрагмент, антигенсвязывающий участок которого является специфическим в отношении эпитопа IL-13, и где антитело или его функционально активный фрагмент связываются с расположенными на поверхности клеток рецепторами IL-13. Родственным вариантом осуществления изобретения является выделенное человеческое или гуманизированное антитело или его функциональный фрагмент, антигенсвязывающий участок которого является специфическим в отношении эпитопа IL-13-мишени, и где эпитоп содержит один или несколько аминокислотных остатков из аминокислотных остатков 1-112 IL-13-мишени. В родственном варианте осуществления изобретения эпитоп представляет собой конформационный эпитоп.

В другом варианте осуществления изобретения антитело или функционально активный фрагмент представляет собой Fab- или scFv-фрагмент антитела. В родственном варианте осуществления изобретения выделенное антитело представляет собой IgG. В другом родственном варианте осуществления изобретения выделенное антитело представляет собой IgG1 или IgG4.

Другим вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция, содержащая по меньшей мере одно из указанных выше антител или их функционально активных фрагментов или консервативных вариантов и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

Следующим вариантом осуществления изобретения является трансгенное животное, которое несет ген, кодирующий любое(ой) из указанных выше антител или их функционально активных фрагментов.

Конкретными вариантами осуществления изобретения является способ лечения нарушения или состояния, ассоциированного с присутствием клетки, которая несет рецептор-мишень для IL-13. Способ заключается в том, что вводят индивидууму, нуждающемуся в этом, в эффективном количестве любую из указанных выше фармацевтических композиций. В родственном варианте

осуществления изобретения подлежащее лечению нарушение или состояние представляет респираторное нарушение.

5 В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой бронхиальную астму, представляющую собой общее персистентное воспалительное заболевание легких, которое характеризуется гиперчувствительностью дыхательных путей (AHR), избыточным производством слизи, фиброзом и повышенными уровнями IgE в сыворотке. Li с соавторами в: реферате постера, представленного на The American Thoracic Society Annual Meeting, 2003, Сиэтл, представили данные о 10 воздействии нейтрализующего антитела к мышиному IL-13, полученные при использовании модели хронической астмы, созданной на мышах. 15

В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, 20 подлежащее лечению, представляет собой хроническое обструктивное заболевание легких (ХОЗЛ). Zheng с соавторами в: J Clin Invest, 106 (9), 2000, сс. 1081-1093, продемонстрировали, что сверхэкспрессия IL-13 в легких мышей вызывала эмфизему, повышенное производство слизи и воспаление, что 25 соответствует признакам человеческого ХОЗЛ. Установлено, что уровни мРНК IL-13 выше в полученных при аутопсии образцах из организма индивидуумов, имеющих в истории болезни ХОЗЛ, по сравнению с образцами легких из 30 организма индивидуумов без признаков заболевания легких (J. Elias, устный доклад на American Thoracic Society Annual Meeting 2002). В другом исследовании повышенные уровни IL-13 продемонстрированы с помощью 35 иммуногистохимического анализа в периферических срезах легкого страдающих ХОЗЛ пациентов [Wardlaw A. J. , Clin Med, 1 (3), 2001, сс. 214-218].

В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, 40 подлежащее лечению, выбирают из других воспалительных или обструктивных заболеваний и состояний дыхательных путей, таких как острое легочное повреждение (ALI), острый/респираторный дистресс-синдром взрослых (РДСВ), одышка, аллергическое воспаление дыхательных путей, заболевание мелких 45 дыхательных путей, карцинома легкого, острый грудной синдром у пациентов с заболеванием серповидных эритроцитов и легочной гипертензией, а также обострение гиперактивности дыхательных путей, связанное с другой 50

лекарственной терапией, прежде всего другой ингаляционной лекарственной терапией.

5 В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой бронхит любого типа и генеза, в том, числе, например, острый, арахидный, катаральный, крупозный, хронический или
10 гнойный туберкулезный бронхит.

10 В следующем варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой пневмокониоз (воспалительное обычно профессиональное заболевание легких, часто
15 сопровождающееся обструкцией дыхательных путей, которое может быть хроническим или острым, и причиной которого является повторяющееся вдыхание пыли) любого типа и генеза, включая, например, алюминоз, антракоз,
20 асбестоз, халикоз, птилоз, синероз, силикоз, табакоз и биссиноз.

В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, выбирают из атопического ринита (сенная лихорадка),
25 аллергического дерматита (экзема) и хронического синусита. Повышенные уровни IL-13 обнаружены у людей, страдающих атопическим ринитом (сенная лихорадка), аллергическим дерматитом (экзема) и хроническим синуситом. Например, у страдающих астмой пациентов более высокие уровни IL-13 по
30 сравнению с контролем обнаружены в клетках, полученных при биопсии легкого, в мокроте и бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) [Humbert M. и др., J Allergy Clin Immunol, 99 (5), 1997, сс. р. 657-665, Kotsimbos T. C. , P. Ernst и Q. A. Hamid, Proc Assoc Am Physicians, 108 (5), 1996, сс. 368-373, Komai-Koma M. , F.Y. Liew и P.C. Wilkinson, J Immunol, 155 (3), 1995, сс. 1110-1116, Naseer T. и др., Am J Respir Crit Care Med, 1997].
35

40 В следующем варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, выбирают из других воспалительных заболеваний кожи, например, псориаза или красной волчанки.

45 В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой воспалительное заболевание кишечника, такое как неспецифический язвенный колит и болезнь Крона. Heller с соавторами, Immunity, 17 (5), 2002, сс. 629-638, опубликовали данные о том,
50 что нейтрализация IL-13 посредством введения растворимого IL-13Ra2

облегчала воспаление ободочной кишки на мышинной модели человеческого
неспецифического язвенного колита. Уровень экспрессии IL-13 оказался
соответственно более высоким в образцах ректальной биопсии, взятых у
5 пациентов с неспецифическим язвенным колитом, по сравнению с контролем.

В следующем варианте осуществления изобретения нарушение или
состояние, подлежащее лечению, выбирают из других фиброзных состояний,
10 таких как системный склероз, фиброз легкого, идиопатический легочный фиброз
или фиброма легкого. Повышенные уровни IL-13 обнаружены в сыворотке
пациентов, страдающих системным склерозом [Hasegawa M. и др., J Rheumatol,
15 24 (2), 1997, сс. 328-332], и в образцах БАЛ пациентов, пораженных другими
формами фиброза легких [Hancock A. и др., Am J Respir Cell Mol Biol, 1998].

В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние,
20 подлежащее лечению, представляет собой фиброз печени. Специфическое
ингибирование IL-13 посредством введения растворимого IL-13Ra2 или
нарушение гена IL-13 при сохранении способности к производству IL-4
предупреждало фиброгенез в печени [Fallon P. G. и др., J Immunol, 164 (5), 2000,
25 сс. 2585-2591, Chiaramonte M.G. и др., J Clin Invest, 104 (6), 1999, сс. 777-785,
Chiaramonte M. G. и др., Hepatology, 34(2), 2001, сс. 273-282.].

В следующем варианте осуществления изобретения нарушение или
30 состояние, подлежащее лечению, представляет собой болезнь Ходжкина.
Болезнь Ходжкина отличается от других злокачественных заболеваний тем, что
на долю неопластических клеток Рида-Штернберга (двухъядерные клетки),
35 которые часто образуются из В-клеток, приходится лишь небольшая часть
клинически выявляемой массы клеток. Линии клеток, выделенные при болезни
Ходжкина, и первичные клетки Рида-Штернберга часто экспрессируют IL-13 и
его рецептор [Skinnider B. F. и др., Blood, 97(1), 2001, сс. 250-255]. Поскольку
40 IL-13 увеличивает выживание и клеточную пролиферацию здоровых В-клеток,
сделано предположение о том, что IL-13 может оказывать действие в качестве
фактора роста клеток Рида-Штернберга. Skinnider с соавторами
45 продемонстрировали, что нейтрализующие антитела к IL-13 могут *in vitro*
ингибировать линии клеток, выделенные при болезни Ходжкина [Karr U. и др., J
Exp Med, 189 (12), 1999, сс. 1939-1946.]. Эти данные позволяют предположить,
50 что у клеток Рида-Штернберга может повышаться их способность к выживанию

с помощью аутокринной и паракринной цитокиновой петли IL-13. В соответствии с указанной гипотезой повышенные уровни IL-13 обнаружены в сыворотке некоторых страдающих болезнью Ходжкина пациентов по сравнению со здоровыми используемыми в качестве контроля людьми [Fiumara P., F. Cabanillas и A. Younes, Blood, 98 (9), 2001, сс. 2877-2878.]. Таким образом, ингибиторы IL-13 могут препятствовать развитию болезни путем ингибирования пролиферации злокачественных клеток Рида-Штернберга.

В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой рецидив или метастазы опухоли. Установлено, что ингибирование IL-13 повышает эффективность противовирусных вакцин на моделях, созданных с использованием животных, и может оказывать благоприятное действие при лечении связанных с ВИЧ и других инфекционных болезней [Ahlers J. D. и др., Proc Natl Acad Sci U S A, 2002]. Целый ряд человеческих раковых клеток экспрессирует иммуногенные специфические для опухоли антигены. Однако хотя для целого ряда опухолей характерен спонтанный регресс, многие опухоли «уклоняются» от действия иммунной системы (иммунологический надзор), подавляя опосредованный Т-клетками иммунитет. Terabe с соавторами в: Nat Immunol, 1 (6), 2001, сс. 515-520, продемонстрировали роль IL-13 в иммуносупрессии на мышинной модели, на которой происходил спонтанный регресс опухолей после начального роста, а затем наблюдался рецидив. Специфическое ингибирование IL-13 с помощью растворимого IL-13Ra2 защищало мышей от рецидива опухолей. Terabe с соавторами продвинулись дальше, доказав, что IL-13 подавляет дифференцировку специфических для опухолей цитотоксических CD8+-лимфоцитов, которые опосредуют противоопухолевые иммунные ответы.

В следующем варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой респираторную вирусную инфекцию, которая обостряет лежащие в их основе хронические состояния, такие как астма, хронический бронхит, ХОЗЛ, воспаление среднего уха и синусит. Подлежащая лечению респираторная вирусная инфекция может быть связана с вторичной бактериальной инфекцией, такой как воспаление среднего уха, синусит или пневмония.

В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, выбирают из других заболеваний или состояний, прежде всего заболеваний или состояний, которые имеют воспалительную компоненту, например, болезней костной ткани и суставов, включая ревматоидный артрит, псориатический артрит, и других заболеваний, таких как атеросклероз, рассеянный склероз и острое и хроническое отторжение трансплантата, например, после трансплантации сердца, почки, печени, легкого или костного мозга.

В следующем варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой эндотоксический шок, гломерулонефрит, церебральную и кардиальную ишемию, болезнь Альцгеймера, фиброзно-кистозную дегенерацию, вирусные инфекции и связанные с ними обострения заболеваний, синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД), рассеянный склероз (РС), ассоциированный с *Helicobacter pylori* гастрит и различные формы рака, прежде всего рост рака яичника.

В другом варианте осуществления изобретения нарушение или состояние, подлежащее лечению, представляет собой симптомы, вызываемые вирусной инфекцией у человека, возбудителями которых являются человеческий риновирус, другие энтеровирусы, коронавирус, вирус герпеса простого, вирус гриппа, вирус парагриппа, респираторно-синцитиальный вирус или аденовирус.

Согласно настоящему изобретению лечение может быть симптоматическим или профилактическим.

Эффективность агента, предлагаемого в изобретении, в отношении ингибирования воспалительных состояний, например, воспалительных заболеваний дыхательных путей, можно продемонстрировать на созданных на животных моделях, например, мышшиной, крысиной или кроличьей модели, воспаления дыхательных путей или других воспалительных состояний, которые описаны, например, у Wada и др., J. Exp. Med, 180, 1994, сс. 1135-1140; Sekido и др., Nature, 365, 1993, сс. 654-657; Modelska и др., Am. J. Respir. Crit. Care Med, 160, 1999, сс. 1450-1456; и Laffon и др., Am. J. Respir. Crit. Care Med. 160, 1999, сс. 1443-1449.

Следующим объектом изобретения является способ идентификации клетки, которая несет рецептор IL-13. Указанный способ заключается в том, что

приводят в контакт клетку с любым из вышеописанных антител или фрагментов антител, которые дополнительно имеют выявляемую метку. Метка может представлять собой радиоактивную, флуоресцентную, магнитную, парамагнитную или хемилюминесцентную метку. Способ может заключаться также в том, что осуществляют любую визуализацию или выявление меченой клетки.

В другом варианте осуществления изобретения любые из вышеуказанных человеческих или гуманизированных антител или фрагментов антител являются синтетическими.

Следующим вариантом осуществления изобретения является фармацевтическая композиция и дополнительный терапевтический агент.

Дополнительный терапевтический агент можно выбирать из группы, включающей противовоспалительные, бронходилататорные, противогистаминные или противокашлевые лекарственные субстанции, прежде всего предназначенные для лечения обструктивных или воспалительных заболеваний дыхательных путей, таких как перечисленные выше заболевания, например, в качестве усилителей терапевтической активности таких лекарственных средств или для снижения требуемых доз или возможных побочных действий указанных лекарственных средств. Терапевтический агент, предлагаемый в изобретении, можно смешивать с другой лекарственной субстанцией в фиксированной фармацевтической композиции или его можно вводить отдельно, до, одновременно или после другой лекарственной субстанции. Таким образом, изобретение относится к комбинации агента, предлагаемого в изобретении, как он указан выше, с противовоспалительной, бронходилататорной, противогистаминной или противокашлевой лекарственной субстанцией, причем указанный агент, предлагаемый в изобретении, и указанная лекарственная субстанция могут находиться в одной и той же или различных фармацевтических композициях.

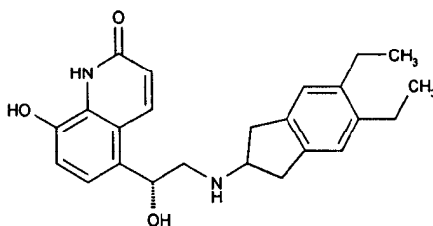
Приемлемыми противовоспалительными лекарственными субстанциями являются стероиды, в частности, глюкокортикостероиды, такие как будесонид, бекламетазона дипропионат, флутиказона пропионат, циклесонид или мометазона фураат, или стероиды, описанные в WO 02/88167, WO 02/12266, WO 02/100879, WO 02/00679 (прежде всего описанные в примерах 3, 11, 14, 17, 19,

26, 34, 37, 39, 51, 60, 67, 72, 73, 90, 99 и 101), WO 03/35668, WO 03/48181, WO 03/62259, WO 03/64445, WO 03/72592, WO 04/39827 и WO 04/66920;

5 нестероидные агонисты глюкокортикоидного рецептора, например, описанные в DE 10261874, WO 00/00531, WO 02/10143, WO 03/82280, WO 03/82787, WO 03/86294, WO 03/104195, WO 03/101932, WO 04/05229, WO 04/18429, WO 04/19935 и WO 04/26248; антагонисты LTB₄ (лейкотриен B₄), такие как BIII 284,
10 CP-195543, DPC11870, LTB₄ этаноламид, LY 293111, LY 255283, CGS025019C, CP-195543, ONO-4057, SB 209247, SC-53228 и описанные в US 5451700; антагонисты LTD₄ (лейкотриен D₄), такие как монтелукаст, пранлукаст,
15 зафирлукаст, акколат, SR2640, Wy-48,252, ICI 198615, МК-571, LY-171883, Ro 24-5913 и L-648051; ингибиторы PDE4 (циклическая нуклеотидная фосфодиэстераза 4), такие как циломиласт (Ariflo® фирма GlaxoSmithKline),
20 рофлумиласт (фирма Byk Gulden), V-11294A (фирма Napp), BAY19-8004 (фирма Bayer), SCH-351591 (фирма Schering-Plough), арофиллин (фирма Almirall Prodesfarma), PD189659 / PD168787 (фирма Parke-Davis), AWD-12-281 (фирма Asta Medica), CDC-801 (фирма Celgene), SelCID(TM) CC-10004 (фирма Celgene),
25 VM554/UM565 (фирма Vernalis), T-440 (фирма Tanabe), KW-4490 (фирма Kyowa Hakko Kogyo) и описанные в WO 92/19594, WO 93/19749, WO 93/19750, WO 93/19751, WO 98/18796, WO 99/16766, WO 01/13953, WO 03/104204, WO 03/104205, WO 03/39544, WO 04/000814, WO 04/000839, WO 04/005258, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/018431, WO 04/018449, WO 04/018450, WO 04/018451, WO 04/018457, WO 04/018465, WO 04/019944, WO 04/019945, WO 04/045607 и WO 04/037805; агонисты A_{2A},
35 например, описанные в EP 1052264, EP 1241176, EP 409595A2, WO 94/17090, WO 96/02543, WO 96/02553, WO 98/28319, WO 99/24449, WO 99/24450, WO 99/24451, WO 99/38877, WO 99/41267, WO 99/67263, WO 99/67264, WO 99/67265, WO 99/67266, WO 00/23457, WO 00/77018, WO 00/78774, WO 01/23399, WO 01/27130, WO 01/27131, WO 01/60835, WO 01/94368, WO 02/00676, WO 02/22630, WO 02/96462 и WO 03/086408; и антагонисты A_{2B},
45 например, описанные в WO 02/42298.

Приемлемыми бронходилататорными лекарственными средствами являются антихолинергические или антимукаринные агенты, в частности, ипратропия
50 бромид, окситропия бромид, соли тиотропия и CHF 4226 (фирма Chiesi), и

гликопирролат, а также описанные в EP 424021, US 3714357, US 5171744, WO 01/04118, WO 02/00652, WO 02/51841, WO 02/53564, WO 03/00840, WO 03/33495, WO 03/53966, WO 03/87094, WO 04/018422 и WO 04/05285; и агонисты бета-2-адренорецептора, такие как албутерол (салбутамол), метапротеренол, тербуталин, салметерол, фенотерол, прокаторол и прежде всего форматерол, кармотерол и его фармацевтически приемлемые соли, и соединения (в свободной форме или в форме соли или сольвата) формулы I, описанные в WO 00/75114, который включен в настоящее описание в качестве ссылки, предпочтительно соединения из приведенных в указанном документе примеров, прежде всего соединения формулы



т.е. (5-[(R)-2-(5,6-диэтилиндан-2-иламино)-1-гидроксиэтил]-8-гидрокси-1H-хинолин-2-он), и его фармацевтически приемлемые соли, а также соединения (в свободной форме или в форме соли или сольвата) формулы I, описанные в WO 04/16601, а также соединения, описанные в EP 1440966, JP 05025045, WO 93/18007, WO 99/64035, US 2002/0055651, WO 01/42193, WO 01/83462, WO 02/66422, WO 02/ 70490, WO 02/76933, WO 03/24439, WO 03/42160, WO 03/42164, WO 03/72539, WO 03/91204, WO 03/99764, WO 04/16578, WO 04/22547, WO 04/32921, WO 04/33412, WO 04/37768, WO 04/37773, WO 04/37807, WO 04/39762, WO 04/39766, WO 04/45618 WO 04/46083 , WO 04/80964, EP1460064, WO 04/087142, WO 04/089892, EP 01477167, US 2004/0242622, US 2004/0229904, WO 04/108675, WO 04/108676, WO 05/033121, WO 05/040103 и WO 05/044787.

Приемлемые противовоспалительные и бронходилататорные лекарственные средства двойного действия включают обладающие двойным действием агонисты бета-2 адренорецептора /мускариновые антагонисты, например, описанные в US 2004/0167167, WO 04/74246 и WO 04/74812.

Приемлемыми антигистаминными лекарственными субстанциями являются цетиризина гидрохлорид, ацетаминофен, клемастина fumarat, прометазин, лоратидин, деслоратидин, дифенгидрамин и фексофенадина гидрохлорид,

активастин, астемизол, азеластин, эбастин, эпинастин, мизоластин и тефенадин, а также описанные в JP 2004107299, WO 03/099807 и WO 04/026841.

5 Можно применять также комбинации терапевтических агентов, предлагаемых в изобретении, и антихолинергических или антиму斯卡ринных агентов, стероидов, агонистов бета-2, ингибиторов PDE4, агонистов рецептора допамина, антагонистов LTD4 или антагонистов LTB4. Другими приемлемыми комбинациями агентов, предлагаемых в изобретении, и противовоспалительных лекарственных средств являются комбинации с другими антагонистами хемокиновых рецепторов, например, CCR-1, CCR-3, CCR-4, CCR-5, CCR-6, 10 CCR-7, CCR-8, CCR-9 и CCR10, CXCR1, CXCR2, CXCR3, CXCR4, CXCR5, в частности антагонисты CCR-5, такие как антагонисты фирмы Schering-Plough SC-351125, SCH-55700 и SCH-D, антагонисты фирмы Takeda, такие как хлорид N-[[4-[[[6,7-дигидро-2-(4-метилфенил)-5H-бензоциклогептен-8-ил]карбонил]амино]фенил]метил]тетрагидро-N,N-диметил-2H-пиран-4-аминия (ТАК-770), антагонисты CCR-5, описанные в US 6166037 (прежде всего в п.п. 18 и 19), WO 0066558 (прежде всего по п. 8), WO 0066559 (прежде всего в п. 9), WO 20 04/018425 и WO 04/026873.

Дополнительный терапевтический агент можно выбирать из группы, включающей молекулы, связывающие другие цитокины, прежде всего антитела 30 к другим цитокинам, в частности, комбинацию с антителом к IL4, описанную в PCT/EP2005/00836, с антителом к IgE, таким как Xolair®, антителом к IL31, антителом к IL31R, антителом к TSLP, антителом к рецептору TSLP, антителом к эндоглину, антителом к IL1b или антителом к IL13, например, описанную в 35 WO 05/007699.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является антитело, 40 имеющее первую аминокислотную последовательность, которая представляет собой последовательность тяжелой цепи, выбранную из 1-3 последовательностей, представленных в SEQ ID NO:6-10, и последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентична 45 последовательности CDR-участков, где CDR-участки имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO:6-10; и вторую аминокислотную последовательность, которая представляет собой 50 последовательность легкой цепи, выбранную из 1-3 последовательностей,

представленных в SEQ ID NO:16-22, и последовательность, которая по меньшей мере на 60, 70, 80, 90 или 95% идентична последовательности CDR-участков, где CDR-участки имеют последовательность, представленную в SEQ ID NO:16-22.

Следующим вариантом осуществления изобретения является иммуноконъюгат, состоящий из первого компонента, который представляет собой антитело или его фрагмент, и второго компонента, имеющего вторую аминокислотную последовательность. Например, иммуноконъюгат представляет собой цитотоксин, или иммуноконъюгат представляет собой связывающий белок или антитело, обладающее способностью к специфическому связыванию с мишенью, отличной от IL-13.

Конкретным вариантом осуществления изобретения является биспецифическое антитело.

Другим вариантом осуществления изобретения является набор, содержащий антитело или фрагмент антитела. В некоторых вариантах осуществления изобретения набор содержит фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент. В других родственных вариантах осуществления изобретения антитело в наборе присутствует в виде стандартной дозы. В другом родственном варианте осуществления изобретения набор включает инструкции по применению для пациента.

Подробное описание изобретения

Настоящее изобретение относится к выделенным антителам, прежде всего человеческим антителам, которые специфически связываются с IL-13 и которые ингибируют функциональную активность IL-13. В некоторых вариантах осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, получают из конкретных последовательностей тяжелой и легкой цепи, и/или они содержат конкретные структурные особенности, такие как CDR-участки, которые содержат конкретные аминокислотные последовательности. В изобретении предложены выделенные антитела, способы получения указанных антител, иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы, содержащие указанные антитела, и фармацевтические композиции, которые содержат антитела, иммуноконъюгаты или биспецифические молекулы, предлагаемые в изобретении. Изобретение относится также к способам применения антител для ингибирования нарушения или состояния, ассоциированного с присутствием

клеточного рецептора IL-13-мишени, например, при лечении воспалительного или аллергического состояния, прежде всего воспалительного или обструктивного заболевания дыхательных путей.

С целью лучшего понимания настоящего изобретения сначала даны определения некоторых понятий. Другие понятия определены в подробном описании изобретения.

Понятие «интерлейкин-13» или «IL-13» обозначает, если в контексте описания не указано иное, человеческий IL-13. В настоящем изобретении предложены антитела к человеческому L-13, прежде всего человеческие антитела, которые дают перекрестную реакцию с полученным из организма кроме человека, а именно из организма приматов IL-13, включая IL-13 яванского макака-крабоеда и макака-резус. Согласно некоторым вариантам осуществления настоящего изобретения антитела распознают вариант IL-13, в котором остаток аргинина в положении 130 аминокислотной последовательности заменен глутамином. Другими объектами и вариантами осуществления настоящего изобретения являются специфические связывающие представители (субстанции), антагонистические в отношении IL-13 мышевидных грызунов, прежде всего мышинового IL-13.

Понятие «иммунный ответ» относится к действию, например, лимфоцитов, антигенпрезентирующих клеток, фагоцитов, гранулоцитов и растворимых макромолекул, продуцируемых указанными выше клетками или печенью (включая антитела, цитокины и комплемент), результатом которого является избирательное повреждение, деструкция или элиминация из организма хозяина внедряющихся патогенов, клеток или тканей, зараженных патогенами, раковыми клетками, или в случае аутоиммунитета или патологического воспаления, здоровых клеток или тканей человека.

Понятие «путь трансдукции сигнала» относится к биохимической взаимосвязи между различными молекулами трансдукции сигнала, которые играют роль в передаче сигнала от одной части клеток к другой части клеток. В контексте настоящего описания фраза «рецептор клеточной поверхности, рецептор, расположенный на поверхности клетки» включает, например, молекулы и комплексы молекул, которые обладают способностью получать сигнал и обладают способностью передавать указанный сигнал через

плазматическую мембрану клетки. Примером «рецептора клеточной поверхности» в контексте настоящего описания является IL-13-рецептор, с которым связывается молекула белка IL-13.

5 Понятие «антитело» в контексте настоящего описания включает полные антитела и любой антигенсвязывающий фрагмент (т.е. «антигенсвязывающий участок») или их одноцепочечные варианты. Встречающееся в естественных
10 условиях «антитело» представляет собой гликопротеин, который содержит по меньшей мере две тяжелые (H) цепи и две легкие (L) цепи, связанные между собой дисульфидными мостиками. Каждая тяжелая цепь состоит из
15 вариабельной области тяжелой цепи (сокращенно обозначена в контексте настоящего описания как V_H) и константной области тяжелой цепи. Константная область тяжелой цепи состоит из трех доменов, т.е. CH1, CH2 и CH3. Каждая
20 легкая цепь состоит из вариабельной области легкой цепи (сокращенно обозначена в контексте настоящего описания как V_L) и константной области легкой цепи. Константная область легкой цепи состоит из одного домена, т.е. C_L .
25 V_H - и V_L -области можно дополнительно подразделять на области гипервариабельности, которые называют гипервариабельными участками (CDR), которые перемежаются с более консервативными участками, которые называют
30 каркасными участками (FR). Каждая V_H и V_L состоит из трех CDR и четырех FR, которые в направлении от аминоконца к карбоксильному концу имеют следующий порядок расположения: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Вариабельные области тяжелых и легких цепей содержат связывающий домен,
35 который взаимодействует с антигеном. Константные области антител могут опосредовать связывание иммуноглобулина с тканями или факторами хозяина, в том числе различными клетками иммунной системы (например, эффекторными
40 клетками) и первым компонентом (C1q) классической системы комплемента.

Понятие «антигенсвязывающий центр» антитела (или короче «антигенный центр») («область детерминанты») в контексте настоящего описания относится к
45 одному или нескольким фрагментам антитела, которые сохраняют способность специфически связываться с антигеном (например, IL-13). Было установлено, что антигенсвязывающую функцию антитела можно осуществлять с помощью
фрагментов полноразмерного антитела. Примерами связывающихся фрагментов,
50 подпадающих под понятие «антигенсвязывающий центр» антитела являются

Fab-фрагмент, одновалентный фрагмент, состоящий из V_L -, V_H -, C_L - и C_H1 -доменов; $F(ab)_2$ -фрагмент, двухвалентный фрагмент, состоящий из двух Fab-фрагментов, связанных дисульфидным мостиком в шарнирной области; Fd-фрагмент, состоящий из V_H - и C_H1 -доменов; Fv-фрагмент, состоящий из V_L - и V_H -доменов одного плеча антитела; dAb-фрагмент (Ward и др., Nature 341, 1989, сс. 544-546), который состоит из V_H -домена; и выделенный гипервариабельный участок (CDR).

Кроме того, несмотря на то, что два домена Fv-фрагмента, т.е. V_L и V_H , кодируются различными генами, их можно соединять с помощью методов рекомбинации синтетическим линкером, который позволяет создавать из них одну белковую цепь, в которой пара V_L - и V_H -областей формирует одновалентные молекулы (известные под названием одноцепочечный Fv-фрагмент (scFv); см., например, Bird и др., Science 242, 1988, сс. 423-426; и Huston и др., Proc. Natl. Acad. Sci. 85, 1988, сс. 5879-5883). Такие одноцепочечные антитела также подпадают под понятие «антигенсвязывающий центр» антитела. Указанные фрагменты антитела получают с помощью общепринятых методов, известных специалистам в данной области, и фрагменты подвергают скринингу в отношении возможности их применения, аналогичного применению интактных антител.

Понятие «выделенное антитело» в контексте настоящего описания относится к антителу, которое практически свободно от других антител с другой антигенной специфичностью (например, выделенное антитело, которое специфически связывается с IL-13, практически свободно от антител, которые специфически связываются с антигенами, отличными от IL-13). Однако выделенное антитело, которое специфически связывается с IL-13, может давать перекрестную реакцию с другими антигенами, такими как молекулы IL-13 из других видов. Кроме того, выделенное антитело может быть практически свободно от другого клеточного материала и/или химических веществ.

Понятие «моноклональное антитело» или «композиция моноклонального антитела» в контексте настоящего описания относится к получению молекул антител одинакового молекулярного состава. Композиция моноклональных антител обладает одинаковой специфичностью связывания и аффинностью в отношении конкретного эпитопа.

Подразумевается, что понятие «человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится к антителам, несущие переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-участки выводятся из последовательностей человеческого происхождения. Кроме того, если антитело содержит константную область, то константную область также выводят из таких человеческих последовательностей, например, последовательностей человеческой зародышевой линии, или мутантных версий последовательностей человеческой зародышевой линии. Человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, могут включать также аминокислотные остатки, которые не кодируются человеческими последовательностями (например, в результате мутаций, интродуцированных путем случайного или сайтнаправленного мутагенеза *in vitro* или соматической мутации *in vivo*). Однако в контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «человеческое антитело» не относится к антителам, в которых последовательности CDR, выведенные из зародышевой линии других млекопитающих, таких как мышь, трансплантированы в человеческие последовательности каркасных участков.

Понятие «человеческое моноклональное антитело» относится к антителам, которые обладают одинаковой специфичностью связывания, имеют переменные области, в которых как каркасные, так и CDR-участки получены из человеческих последовательностей. В одном из вариантов осуществления изобретения человеческие моноклональные антитела получают с помощью гибридомы, которая включает В-клетку, полученную из трансгенного животного кроме человека, например, трансгенной мыши, в геноме которой содержится трансген человеческой тяжелой цепи и трансген легкой цепи, слитый с иммортализованной клеткой.

Понятие «рекомбинантное человеческое антитело» в контексте настоящего описания относится ко всем человеческим антителам, которые получают, экспрессируют, создают или выделяют с помощью методов рекомбинации, например, к антителам, выделенным из животного (например, мыши), которое является трансгенным или трансхромосомным благодаря интродукции генов человеческого иммуноглобулина, или которые получены из гибридомы, к антителам, выделенным из клетки-хозяина, трансформированной с целью экспрессии человеческого антитела, например, с использованием трансфектомы,

к антителам, выделенным из рекомбинантной комбинаторной библиотеки
человеческих антител, и к антителам, полученным, экспрессированным,
5 созданным или выделенным любыми другими путями, которые включают
сплайсинг всего гена человеческого иммуноглобулина или его части,
последовательностям к другим последовательностям ДНК. Указанные
10 рекомбинантные человеческие антитела несут вариабельные области, в которых
каркасные и CDR-участки выводятся из последовательностей иммуноглобулина
человеческой зародышевой линии. Однако в некоторых вариантах
осуществления изобретения указанные рекомбинантные человеческие антитела
15 можно подвергать мутагенезу *in vitro* (или, когда для получения человеческих
последовательностей Ig используют трансгенных животных, соматическому
мутагенезу *in vivo*), и в результате аминокислотные последовательности V_H- и
20 V_L-областей рекомбинантных антител представляют собой последовательности,
которые хотя и выведены и являются родственными последовательностям V_H и
V_L человеческой зародышевой линии, могут не встречаться в естественных
25 условиях в популяции антител человеческой зародышевой линии *in vivo*.

В контексте настоящего описания понятие «изотип» относится к классу
антител (например, IgM, IgE, IgG, такой как IgG1 или IgG4), который кодируется
30 генами константной области тяжелой цепи.

Фраза «антитело, распознающее антиген» и «антитело, специфическое в
отношении антигена» в контексте настоящего описания применяют
взаимозаменяемо с понятием «антитело, которое связывается специфически с
35 антигеном».

В контексте настоящего описания подразумевается, что антитело, которое
«специфически связывается с человеческим IL-13» относится к антителу,
40 связывание которого с человеческим IL-13 характеризуется значением K_D,
составляющим 5×10⁻⁹М или менее. Антитело, которое «дает перекрестную
реакцию с антигеном, отличным от человеческого IL-13» означает антитело,
45 связывание которого с антигеном характеризуется значением K_D, составляющим
5 × 10⁻⁹М или менее. Антитело, которое «не дает перекрестную реакцию с
конкретным антигеном» означает антитело, связывание которого с антигеном
характеризуется значением K_D, составляющим 1,5 × 10⁻⁸М или более или
50 значением K_D, составляющим 5-10 × 10⁻⁸М или 1 × 10⁻⁷М или более. В

5 конкретных вариантах осуществления изобретения те антитела, которые не дают перекрестную реакцию с антигеном, характеризуются практически не выявляемым связыванием с этими белками при оценке с помощью стандартных анализов связывания.

10 В контексте настоящего описания антитело, которое «ингибирует связывание IL-13 с рецептором IL-13» означает антитело, способность которого ингибировать связывание IL-13 с рецептором характеризуется значением K_D , составляющим 5нМ или менее.

15 В контексте настоящего описания антитело, которое «ингибирует высвобождение воспалительного медиатора» означает антитело, ингибирование которым индуцированного IL-13 высвобождения эотаксина из фибробластов легких человека характеризуется значением IC_{50} , составляющим менее 10нМ, 5нМ, 2,5нМ, 1,0нМ, 0,5нМ или менее.

20 Понятие « K_{assoc} » или « K_a » в контексте настоящего описания относится к скорости ассоциации взаимодействия конкретного антитела-антигена, а понятие « K_{dis} » или « K_D » в контексте настоящего описания относится к скорости диссоциации взаимодействия конкретного антитела-антигена. В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие « K_D » относится к константе диссоциации, которую получают из соотношения K_d к K_a (т.е. K_d/K_a) и выражают в молярной концентрации (М). Значения K_D для антител можно определять с помощью методов, хорошо известных в данной области. Метод определения значения K_D антитела представляет собой метод, основанный на резонансе 25 поверхностного плазмона, или метод, основанный на применении биосенсорной системы *Viascore*[®].

40 В контексте настоящего описания понятие «высокая аффинность» касательно антитела изотипа IgG относится к антителу, для которого значение K_D в отношении антигена-мишени составляет 10^{-8} М или менее, 10^{-9} М или менее, или 10^{-10} М или менее.

45 В контексте настоящего описания понятие «индивидуум» относится к любому человеку или животному кроме человека.

50 Понятие «животное кроме человека» включает всех позвоночных животных, например, млекопитающих и животных, не относящихся к

млекопитающим, таких как приматы кроме человека, овцы, собаки, кошки, лошади, коровы, куры, амфибии, рептилии и т.д.

5 Различные объекты изобретения описаны более подробно в приведенных ниже подразделах.

Стандартные анализы, предназначенные для оценки способности к связыванию антител с IL-13 различных видов, известны в данной области и включают, например, ELISA, Вестерн-блоттинг и РИА. Приемлемые анализы описаны подробно в примерах. Кинетические характеристики связывания (например, аффинность к связыванию) антител также можно определять с помощью стандартных анализов, известных в данной области, таких как Вiascore-анализ. Анализы, предназначенные для оценки воздействий антител на функциональную активность IL-13, описаны более подробно в примерах.

20 Таким образом, следует понимать, что антитело, которое «ингибирует» одну или несколько из видов активности IL-13 (например, биохимическую, иммунохимическую, клеточную, физиологическую или другие виды биологической активности или т.п.), что определяют на основе методик, известных в данной области и представленных в настоящем описании, означает, что антитело статистически значимо снижает конкретный вид активности по сравнению с вариантом без антитела (или, например, когда присутствует контрольное антитело с несоответствующей специфичностью). Антитело, которое ингибирует активность IL-13, вызывает статистически значимое снижение оцениваемого параметра по меньшей мере на 10%, по меньшей мере на 50%, 80% или 90%, и в конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, может ингибировать более чем на 95%, 98% или 99% функциональную активность IL-13.

40 Моноклональные антитела

Антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой человеческие моноклональные антитела, выделенные и структурно охарактеризованные согласно методам, описанным в примерах 1-5. Аминокислотные последовательности V_H антител представлены в SEQ ID NO: 6-10 соответственно. Аминокислотные последовательности V_L антител представлены в SEQ ID NO: 16-22 соответственно. Другие антитела, предлагаемые в изобретении, содержат измененные в результате мутаций аминокислоты, но

CDR-участки которых еще сохраняют по меньшей мере 60, 70, 80, 90 или 95% идентичности с CDR-участками указанных выше последовательностей.

5 Поскольку каждое из указанных антител может связываться с IL-13, то последовательности V_H и V_L можно «смешивать и совмещать» для создания других предлагаемых в изобретении антагонистических молекул (молекул антител), связывающихся с IL-13. Связывание с IL-13 указанных полученных в 10 результате «смешения и совмещения» антител можно оценивать с помощью описанных выше и в примерах анализов связывания (например, ELISA). Когда цепи V_H и V_L смешивают и совмещают, то последовательность V_H из конкретной 15 пары V_H/V_L следует замещать структурно сходной последовательностью V_H . Аналогично этому, последовательность V_L из конкретной пары V_H/V_L следует замещать структурно сходной последовательностью V_L . Последовательности V_H и V_L антител, предлагаемых в настоящем изобретении, особенно пригодны для 20 смешения и совмещения, поскольку для создания этих антител применяют последовательности V_H и V_L , выведенные из последовательностей одной и той же зародышевой линии, и поэтому они обладают структурным сходством. 25

Другим объектом изобретения являются антитела, которые содержат CDR1, CDR2 и CDR3 тяжелой цепи и легкой цепи антител или их комбинации.

30 Аминокислотные последовательности CDR1 V_H антител представлены в SEQ ID NO: 6-7. Аминокислотная последовательность CDR2 V_H антител представлена в SEQ ID NO: 8. Аминокислотные последовательности CDR3 V_H антител представлены в SEQ ID NO: 9-10. Аминокислотные последовательности CDR1 35 V_L антител представлены в SEQ ID NO: 16-18. Аминокислотная последовательность CDR2 V_L антител представлена в SEQ ID NO: 19. Аминокислотные последовательности CDR3 V_L антител представлены в SEQ ID 40 NO: 20-22. CDR-участки описывают с помощью системы Кэбота (Kabat E. A. и др., 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242).

45 С учетом того, что каждое из указанных антител может связываться с IL-13 и что специфичность связывания с антигеном обеспечивается прежде всего участками CDR1, 2 и 3, последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L можно «смешивать и совмещать» (т.е., CDR 50 из различных антител можно смешивать и совмещать, хотя каждое антитело

должно содержать CDR1, 2 и 3 V_H и CDR1, 2 и 3 V_L для создания других связывающихся с IL-13 молекул антител, предлагаемых в изобретении.

5 Связывание с IL-13 указанных полученных в результате «смещения и совмещения» антител можно оценивать с помощью описанных выше и в примерах анализов связывания (например, ELISA). Когда смешивают и совмещают CDR-последовательности V_H , то последовательность CDR1, CDR2
10 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_H следует заменять структурно сходной(ыми) последовательность(ями). Аналогично этому, когда смешивают и совмещают CDR-последовательности V_L , то последовательность CDR1, CDR2
15 и/или CDR3 из конкретной последовательности V_L следует заменять структурно сходной(ыми) последовательность(ями). Обычному специалисту в данной области должно быть очевидно, что новые последовательности V_H и V_L можно
20 создавать путем замены одной или нескольких последовательностей CDR-участков V_H и/или V_L на структурно сходные последовательности CDR, указанные в настоящем описании для моноклональных антител, предлагаемых в настоящем изобретении.

25 Выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий центр содержит: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ
30 ID NO: 6-7; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 9-10; CDR1 вариабельной
35 области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, SEQ ID NO: 16-18; CDR2 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 20-22; где
40 антитело специфически связывается с IL-13.

45 В конкретном варианте осуществления изобретения антитело состоит из: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 6; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи,
50 который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR3

вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 9; CDR1 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 16; CDR2 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 20.

В другом варианте осуществления изобретения антитело состоит из: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR1 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 17; CDR2 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 21.

В еще одном варианте осуществления изобретения антитело состоит из: CDR1 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 7; CDR2 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8; CDR3 вариабельной области тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 10; CDR1 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 18; CDR2 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19; и CDR3 вариабельной области легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 22.

Согласно настоящему описанию человеческое антитело содержит вариабельные области тяжелой или легкой цепи, которые «являются продуктом» или «выведены из» последовательности конкретной зародышевой линии, если вариабельные области антитела получают из системы, основанной на применении генов иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. Для создания таких систем осуществляют иммунизацию трансгенной мыши, несущей человеческие гены иммуноглобулинов, с использованием представляющего

интерес антигена или осуществляют скрининг презентруемой фагом библиотеки человеческих генов иммуноглобулинов с использованием представляющего интерес антигена. Человеческое антитело, которое «является продуктом» или «выведено из» последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, можно идентифицировать индивидуально путем сравнения аминокислотной последовательности человеческого антитела и аминокислотных последовательностей иммуноглобулинов человеческой зародышевой линии и отбора последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, которая является наиболее близкой по последовательности (т.е. имеет самый высокий % идентичности) с последовательностью человеческого антитела. Человеческое антитело, которое «является продуктом» или «выведено из» конкретной последовательности иммуноглобулина человеческой зародышевой линии, может иметь различия в аминокислотах по сравнению с последовательностью зародышевой линии, например, в результате встречающихся в естественных условиях соматических мутаций или преднамеренной интродукции сайтнаправленной мутации. Однако аминокислотная последовательность отобранного человеческого антитела, как правило, по меньшей мере на 90% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном человеческого иммуноглобулина зародышевой линии, и содержит аминокислотные остатки, которые идентифицируют, что человеческое антитело является человеческим, при сравнении с аминокислотными последовательностями иммуноглобулинов зародышевых линий других видов (например, последовательности мышинной зародышевой линии). В определенных случаях аминокислотная последовательность человеческого антитела может быть по меньшей мере на 60%, 70%, 80%, 90% или по меньшей мере на 95% или даже по меньшей мере на 96%, 97%, 98% или 99% идентична аминокислотной последовательности, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии. Как правило, человеческое антитело, выведенное из конкретной последовательности человеческой зародышевой линии, должно иметь не более 10 аминокислотных различий по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина человеческой зародышевой линии. В определенных случаях человеческое антитело может иметь не более 5 или даже не более 4, 3, 2

или 1 аминокислотное различие по сравнению с аминокислотной последовательностью, кодируемой геном иммуноглобулина зародышевой линии.

Гомологичные антитела

Согласно еще одному варианту осуществления изобретения антитело, предлагаемое в изобретении, имеет переменные области тяжелых и легких цепей, аминокислотные последовательности которых гомологичны аминокислотным последовательностям представленных в настоящем описании антител, и при этом антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антител к IL-13, предлагаемых в изобретении.

Например, в изобретении предложено выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий центр, которые содержат переменную область тяжелой цепи и переменную область легкой цепи, где: переменная область тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 6-10; переменная область легкой цепи содержит аминокислотную последовательность, которая по меньшей мере на 80% гомологична аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 16-22; антитело специфически связывается с IL-13, и антитело обладает по меньшей мере одним из следующих функциональных свойств: антитело ингибирует связывание белка IL-13 с рецептором IL-13 или антитело ингибирует связывание рецептора IL-13, предупреждая или облегчая воспаление или аллергическое состояние, прежде всего воспалительное или обструктивное заболевание дыхательных путей, или антитело ингибирует связывание рецептора IL-13, предупреждая или облегчая астму, или антитело ингибирует связывание рецептора IL-13, предупреждая или облегчая ХОЗЛ.

В различных вариантах осуществления изобретения антитело может обладать одним или несколькими, двумя или несколькими или тремя описанными выше функциональными свойствами. Антитело может представлять собой, например, человеческое антитело, гуманизованное антитело или химерное антитело.

В других вариантах осуществления изобретения аминокислотные последовательности V_H и/или V_L могут быть на 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 96%,

97%, 98% или 99% гомологичны указанным выше последовательностям.

Антитело, у которого V_H - и V_L -области обладают высоким уровнем (т.е. 80% или выше) гомологии с V_H - и V_L -областями, представленными в SEQ ID NO: 6-10 и 16-22 соответственно, можно получать путем мутагенеза (например, сайтнаправленного или опосредуемого ПЦР мутагенеза) молекул нуклеиновых кислот, которые кодируют SEQ ID NO: 6-10 и/или 16-22, с последующим тестированием кодируемого измененного антитела в отношении сохранения функции (т.е. перечисленных выше функций) с помощью приведенных в настоящем описании функциональных анализов.

Согласно настоящему описанию процент гомологии двух аминокислотных последовательностей эквивалентен проценту идентичности двух последовательностей. Процент идентичности двух последовательностей является функцией количества идентичных положений в последовательностях (т.е. % гомологии = количество идентичных положений/общее количество положений \times 100), принимая во внимание количество брешей и длину каждой бреши, которую необходимо интродуцировать для оптимального сравнительного анализа первичной структуры двух последовательностей. Сравнение последовательностей и определение процента идентичности двух последовательностей можно осуществлять с помощью математического алгоритма, описанного ниже в примерах, которые не ограничивают объем изобретения.

Процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с помощью алгоритма E. Meyers и W. Miller (Comput. Appl. Biosci., 4, 988, сс. 11-17), который включен в программу ALIGN (версия 2.0), с использованием таблицы взвешенных остатков PAM120, штрафа за длину бреши 12 и штрафа за брешь 4. Кроме того, процент идентичности двух аминокислотных последовательностей можно определять с помощью алгоритма Needleman и Wunsch (J. Mol. Biol. 48, 1970, сс. 444-453), который включен в программу GAP, входящую в пакет программ GCG (которая доступна на сайте <http://www.gcg.com>), с использованием матрицы Blossom 62 или матрицы PAM250 и веса бреши 16, 14, 12, 10, 8, 6 или 4 и веса длины 1, 2, 3, 4, 5 или 6.

В другом или дополнительном варианте белковые последовательности, предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять также в качестве

«запрашиваемой последовательности» («query sequence») при осуществлении поиска в общественных базах данных, например, в отношении идентичности с родственными последовательностями. Такой поиск можно осуществлять с использованием программы XBLAST (версия 2.0), разработанной Altschul, и др., J.Mol. Biol. 215, 1990, сс. 403-410. BLAST-поиск белков можно осуществлять с помощью программы XBLAST, в которой балл = 50, длина слова = 3, для установления уровня гомологии аминокислотных последовательностей с аминокислотными последовательностями молекул антител, предлагаемых в изобретении. Для создания содержащих брешу линейаризированных последовательностей для целей сравнения можно использовать программу Gapped BLAST, описанную у Altschul и др., Nucleic Acids Res. 25(17), 1997, сс. 3389-3402. При применении программ BLAST и Gapped BLAST можно использовать принимаемые по умолчанию параметры соответствующих программ (например, XBLAST и NBLAST) (см. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

Антитела с консервативными модификациями

В конкретных вариантах осуществления антитело, предлагаемое в изобретении, имеет переменную область тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где одна или нескольких указанных последовательностей CDR представляет собой специфические аминокислотные последовательности, характерные для антител, предлагаемых в настоящем изобретении, или их консервативные модификации и где антитела сохраняют требуемые функциональные свойства антител к IL-13, предлагаемых в изобретении. Таким образом, в изобретении предложено выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающий центр, состоящий из переменной области тяжелой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, и переменную область легкой цепи, которая содержит последовательности CDR1, CDR2 и CDR3, где: последовательности CDR1 переменной области тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 6-7 и их консервативные модификации; последовательность CDR2 переменной области тяжелой цепи содержит аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 8 и ее

консервативные модификации; последовательности CDR3 варибельной области тяжелой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 9-10 и их консервативные модификации; последовательности CDR1 варибельной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 16-18 и их консервативные модификации; последовательность CDR2 варибельной области легкой цепи содержат аминокислотную последовательность SEQ ID NO: 19 и ее консервативные модификации; последовательности CDR3 варибельной области легкой цепи содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей аминокислотные последовательности SEQ ID NO: 20-22 и их консервативные модификации; антитело специфически связывается с IL-13; и антитело ингибирует связывание рецептора IL-13, предупреждая высвобождение воспалительного медиатора.

В различных вариантах осуществления изобретения антитело может обладать одним или несколькими, двумя или большим количеством, тремя или большим количеством указанных выше функциональных свойств. Такие антитела могут, например, представлять собой человеческие антитела, гуманизированные антитела или химерные антитела.

В контексте настоящего описания понятие «консервативные модификации последовательностей» относится к аминокислотным модификациям, которые не оказывают существенного влияния или не существенно изменяют характеристики связывания антитела, которое содержит указанную аминокислотную последовательность. Указанные консервативные модификации включают аминокислотные замены, добавления или делеции. Модификации можно интродуцировать в антитело, предлагаемое в изобретении, с помощью стандартных методов, известных в данной области, таких как сайтнаправленный мутагенез и ПЦР-опосредуемый мутагенез.

Консервативные аминокислотные замены представляют собой замены, при которых аминокислотный остаток замещают аминокислотным остатком, который имеет сходную боковую цепь. Семейства аминокислотных остатков со сходными боковыми цепями известны в данной области. Эти семейства включают аминокислотные остатки с основными боковыми цепями (например,

лизин, аргинин, гистидин), кислотными боковыми цепями (например, аспарагиновая кислота, глутаминовая кислота), незаряженными полярными боковыми цепями (например, глицин, аспарагин, глутамин, серин, треонин, тирозин, цистеин, триптофан), неполярными боковыми цепями (например, аланин, валин, лейцин, изолейцин, пролин, фенилаланин, метионин), бета-разветвленными боковыми цепями (например, треонин, валин, изолейцин) и ароматическими боковыми цепями (например тирозин, фенилаланин, триптофан, гистидин). Таким образом, один или несколько аминокислотных остатков в CDR-участках антитела можно заменять другими аминокислотными остатками из одного и того же семейства боковых цепей, и измененное антитело можно оценивать в отношении сохранения им функции с помощью представленных в настоящем описании функциональных анализов.

Антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и антитела к IL-13, предлагаемые в изобретении

Другим вариантом осуществления изобретения являются антитела, которые связываются с тем же эпитопом, что и различные антитела к IL-13, предлагаемые в изобретении. Такие дополнительные антитела можно идентифицировать по их способности к перекрестной конкуренции (например, к конкурентному ингибированию связывания на статистически значимом уровне) с другими антителами, предлагаемыми в изобретении, в стандартных анализах связывания IL-13. Способность тестируемого антитела ингибировать связывание антител, предлагаемых в настоящем изобретении, с человеческим IL-13 демонстрирует, что тестируемое антитело может конкурировать с антителом за связывание с человеческим IL-13; согласно одной из возможных теорий такое антитело может связываться с тем же или родственным (например, структурно подобным или находящимся в пространственной близости) эпитопом на человеческом IL-13, что и антитело, с которым оно конкурирует. В конкретном варианте осуществления изобретения антитело, которое связывается с тем же эпитопом на человеческом IL-13, что и антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, представляет собой человеческое моноклональное антитело. Указанные человеческие моноклональные антитела можно получать и выделять согласно описанным в примерах методам.

Сконструированные и модифицированные антитела

Антитело, предлагаемое в изобретении, можно получать с использованием антитела, которое имеет одну или несколько последовательностей V_H и/или V_L , в качестве исходного продукта для создания модифицированного антитела, где модифицированное антитело может иметь измененные свойства по сравнению с исходным антителом. Антитело можно создавать путем модификации одного или нескольких остатков в одной или обеих переменных областях (т.е. V_H и/или V_L), например, в одном или нескольких CDR-участках и/или в одном или нескольких каркасных участках. В дополнительном или альтернативном варианте антитело можно создавать путем модификации остатков в константной(ых) области(ях), например, для изменения эффекторной(ых) функции(ий) антитела.

Для осуществления одного из типов конструирования переменной области можно применять трансплантацию CDR. Антитела взаимодействуют с антигенами-мишенями в основном посредством аминокислотных остатков, локализованных в шести гиперпеременных участках (CDR) тяжелой и легкой цепи. По этой причине аминокислотные остатки в CDR наиболее значительно различаются между индивидуальными антителами, чем последовательности вне CDR. Поскольку последовательности CDR ответственны за большую часть взаимодействий антитело-антиген, можно экспрессировать рекомбинантные антитела, которые имитируют свойства конкретных встречающихся в естественных условиях антител, путем конструирования экспрессионных векторов, которые содержат последовательности CDR из конкретного встречающегося в естественных условиях антитела, полученные путем трансплантации в последовательности каркасных участков из других антител с другими свойствами (см., например Riechmann L. и др., Nature 332, 1998, сс. 323-327; Jones P. и др., Nature, 321, 1986, сс. 522-525; Queen C. и др., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 86, 1989, сс. 10029-10033; U.S. 5225539 на имя Winter и U.S. 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen с соавторами).

Таким образом, следующим объектом изобретения является выделенное моноклональное антитело или его антигенсвязывающая область, содержащая последовательности CDR1 переменной области тяжелой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы,

включающей SEQ ID NO: 6-7; последовательность CDR2, которая содержит аминокислотную последовательность ID NO: 8; последовательности CDR3, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 9-10 соответственно; и последовательности CDR1

5
10
15
20

вариабельной области легкой цепи, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 16-18; последовательность CDR2, которая содержит аминокислотную последовательность ID NO: 8; и последовательности CDR3, которые содержат аминокислотные последовательности, выбранные из группы, включающей SEQ ID NO: 20-22 соответственно. Таким образом, указанные антитела содержат последовательности CDR V_H и V_L моноклональных антител, кроме того, они могут содержать различные последовательности каркасных участков указанных антител.

Указанные последовательности каркасных участков, которые содержат последовательности генов антител зародышевой линии можно получать из публичных баз данных ДНК или опубликованных ссылок. Например, последовательности ДНК зародышевой линии генов вариабельных областей

25
30
35

человеческих тяжелых и легких цепей можно найти в базе данных последовательностей человеческой зародышевой линии «Vbase» (доступной в Интернете на сайте www.mrc-sre.cam.ac.uk/vbase), а также у Kabat E. A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 1991, 15-ое изд. U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242; Tomlinson I. M. и др., J. Mol. Biol. 227, 1992, сс. 776-798; и Cox J. P. L. и др., Eur. J Immunol. 24, 1994, сс. 827-836; содержание каждой из которых специально включено в настоящее описание в качестве ссылки.

Примером последовательностей каркасных участков, предназначенных для применения в антителах, предлагаемых в изобретении, являются последовательности, структурно подобные последовательностям каркасных

40
45
50

участков, которые входят в отобранные антитела, предлагаемые в изобретении, например, консенсусные последовательности и/или последовательности каркасных участков, которые входят в моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении. Последовательности CDR1, 2 и 3 V_H и последовательности CDR1, 2 и 3 V_L можно трансплантировать в каркасные участки, которые имеют

последовательность, идентичную с последовательностью гена иммуноглобулина зародышей линии, из которого выведена последовательность каркасного участка, или последовательности CDR можно трансплантировать в каркасные участки, которые содержат одну или несколько мутаций по сравнению с последовательностями зародышевой линии. Например, было установлено, что в определенных случаях целесообразно изменять посредством мутации остатки в каркасных областях для поддержания или повышения способности антитела связываться с антигеном (см., например, U.S. 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen с соавторами).

Другим типом модификации вариабельной области является мутация аминокислотных остатков в CDR1, CDR2 и/или CDR3 V_H- и/или V_L-областей, которая повышает тем самым одну или несколько способностей к связыванию (например, аффинность) представляющего интерес антитела, что называют «созреванием аффинности». Для интродукции мутации(й) и воздействия на связывание антитела или на другое представляющее интерес функциональное свойство можно применять сайтнаправленный мутагенез или ПЦР-опосредуемый мутагенез, что можно оценивать с помощью анализов *in vitro* или *in vivo*, описанных ниже в примерах. Можно интродуцировать консервативные модификации (указанные выше). Мутации могут представлять собой аминокислотные замены, добавления или делеции. Кроме того, как правило, изменяют не более 1, 2, 3, 4 или 5 остатков в CDR-участке.

Таким образом, другим вариантом осуществления изобретения являются выделенные моноклональные антитела к IL-13 или их антигенсвязывающие центры, состоящие из вариабельной области тяжелой цепи, которая содержит: CDR1 V_H-области, который состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 6-7, или аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 6-7; CDR2 V_H-области, который состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 8, или аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 8; CDR3 V_H-области, который состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 9-10, или аминокислотной

последовательности с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 9-10; CDR1 V_L-области, который состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 16-18, или аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 16-18; CDR2 V_L-области, который состоит из аминокислотной последовательности SEQ ID NO: 19, или аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 19; CDR3 V_L-области, который состоит из аминокислотной последовательности, выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 20-22, или аминокислотной последовательности с 1, 2, 3, 4 или 5 аминокислотными заменами, делециями или добавлениями по сравнению с SEQ ID NO: 20-22.

К созданным антителам, предлагаемым в изобретении, относятся также антитела, в которых сделаны модификации в остатках каркасных участков в V_H и/или V_L, например, с целью улучшения свойств антитела. Как правило, такие модификации каркасных участков осуществляют для снижения иммуногенности антитела. Например, один из подходов представляет собой «обратное мутирование» одного или нескольких остатков каркасного участка с получением соответствующей последовательности зародышевой линии. Более конкретно антитело, которое было подвергнуто соматической мутации, может содержать остатки каркасного участка, отличающиеся от последовательности зародышевой линии, из которой выведено антитело. Такие остатки можно идентифицировать путем сравнения последовательностей каркасных участков антитела с последовательностями зародышевой линии, из которой выведено антитело. Для возвращения последовательностей каркасного участка к исходной конфигурации зародышей линии соматические мутации можно подвергать «обратному мутированию» с получением последовательности зародышевой линии, например, с помощью сайтнаправленного мутагенеза или ПЦР-опосредуемого мутагенеза. Такие антитела с «обратными мутациями» подпадают также под объем настоящего изобретения.

Другой тип модификации каркасного участка включает изменение путем мутации одного или нескольких остатков в каркасном участке или даже в одном

или нескольких CDR-участках для удаления Т-клеточных эпитопов с целью снижения потенциальной иммуногенности антитела. Этот подход обозначают также как «деиммунизация», и он описан более подробно в опубликованном U.S. № 20030153043 на имя Carr с соавторами.

В дополнительном или альтернативном варианте помимо модификаций в каркасных участках или CDR, антитела, предлагаемые в изобретении, могут включать модификации в Fc-фрагменте, как правило, для изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела, таких как время полужизни в сыворотке, фиксация комплемента, связывание Fc-рецептора и/или антитело-обусловленная клеточнозависимая цитотоксичность. Кроме того, антитело, предлагаемое в изобретении, можно модифицировать химически (например, к антителу можно присоединять один или несколько химических фрагментов) или можно модифицировать для изменения его гликозилирования, и в этом случае с целью изменения одного или нескольких функциональных свойств антитела. Каждый из указанных вариантов осуществления изобретения будет дополнительно описан ниже. Нумерация остатков в Fc-фрагменте соответствует EU-индексу или нумерации Кэбота.

В одном из вариантов осуществления изобретения модифицируют шарнирную область СН1 так, чтобы изменять, например, увеличивать или снижать, количество цистеиновых остатков в шарнирной области. Этот подход описан также в U.S. 5677425 на имя Vodmer с соавторами. Количество цистеиновых остатков в шарнирной области СН1 изменяют, например, для облегчения сборки легких и тяжелых цепей или для повышения или снижения стабильности антитела.

В другом варианте осуществления изобретения шарнирную область Fc-фрагмента антитела можно изменять с помощью мутации для снижения биологического времени полужизни антитела. Более конкретно интродуцируют один или несколько аминокислотных остатков в область контакта СН2-СН3-доменов шарнирной области Fc-фрагмента для ухудшения связывания антитела с протеином А золотистого стафилококка *Staphylococcyll* (SpA) по сравнению со связыванием нативной шарнирной области Fc-фрагмента с SpA. Этот подход описан более подробно в U.S. 6165745 на имя Ward с соавторами.

В другом варианте осуществления изобретения антитело модифицируют для удлинения биологического времени полужизни. При этом возможно применение различных подходов. Например, можно интродуцировать одну или несколько из следующих мутаций: T252L, T254S, T256F, описанных в U.S. 6277375 на имя Ward. В другом варианте для удлинения биологического времени полужизни антитело можно изменять в CH1- или CL-области для интродукции связывающегося с рецептором-«спасателем» эпитопа, полученного из двух петель CH2-домена Fc-фрагмента IgG, как описано в U.S. No. 5869046 и 6121022 на имя Presta с соавторами.

В других вариантах осуществления изобретения Fc-фрагмент изменяют путем замены по меньшей мере одного аминокислотного остатка на другой аминокислотный остаток для изменения эффекторных функций антитела. Например, один или несколько аминокислотных остатков можно заменять другим аминокислотным остатком так, чтобы у такого антитела изменялась аффинность к эффекторному лиганду, но сохранялась антигенсвязывающая способность родительского антитела. Эффекторный лиганд, аффинность к которому изменяют, может представлять собой, например, Fc-рецептор или C1-компонент комплемента. Этот подход описан более подробно в U.S. 5624821 и 5648260, оба на имя Winter с соавторами.

В другом варианте осуществления изобретения одну или несколько аминокислот, выбранных из аминокислотных остатков, можно заменять другим аминокислотным остатком так, чтобы антитело имело измененную способность к C1q-связыванию и/или пониженную комплементзависимую цитотоксичность (CDC) или ее отсутствие. Этот подход описан более подробно в U.S. 6194551 на имя Idusogie с соавторами.

В другом варианте осуществления изобретения один или несколько аминокислотных остатков изменяют, изменяя тем самым способность антитела к фиксации комплемента. Этот подход описан также в опубликованной заявке РСТ WO 94/29351 на имя Bodmer с соавторами.

В еще одном варианте осуществления изобретения Fc-фрагмент модифицируют для повышения способности антитела вызывать антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC) и/или для повышения аффинности антитела к Fcγ-рецептору посредством модификации

одной или нескольких аминокислот. Этот подход описан более подробно в опубликованной заявке PCT WO 00/42072 на имя Presta. Кроме того, сайты связывания человеческого IgG1 с FcγRI, FcγRII, FcγRIII и FcRn были
5 кэпированы и описаны варианты с улучшенной способностью к связыванию (см. Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 276, 2001, сс. 6591-6604).

В следующем варианте осуществления изобретения модифицируют гликозилирование антитела. Например, можно создавать агликозилированное антитело (т.е. антитело, в котором отсутствует гликозилирование). Гликозилирование можно изменять, например, для повышения аффинности антитела к «антигену». Такие модификации углеводов можно осуществлять
15 путем, например, изменения одного или нескольких сайтов гликозилирования в последовательности антитела. Например, можно осуществлять одну или несколько аминокислотных замен, которые приводят к элиминации одного или нескольких сайтов гликозилирования каркасного участка варибельной области, элиминируя тем самым гликозилирование в этом сайте. Указанное агликозилирование может повышать аффинность антитела к антигену. Этот
20 подход описан более подробно в U.S. No. 5714350 и 6350861 на имя Со с соавторами.

В дополнительном или альтернативном варианте можно создавать антитело с измененным типом гликозилирования, например, гипофукозилированное антитело, которое имеет пониженное количество фукозильных остатков, или антитело с повышенным содержанием разделяющих пополам GlcNac-структур.
30 Было продемонстрировано, что такие измененные схемы гликозилирования повышают ADCC-активность антител. Указанные модификации углеводов можно осуществлять, например, путем экспрессии антитела в клетке-хозяине с измененным механизмом гликозилирования. Клетки с измененным механизмом гликозилирования известны в данной области, и их можно применять в качестве клеток-хозяев, в которых экспрессируют рекомбинантные антитела,
40 предлагаемые в изобретении, для получения тем самым антител с измененным гликозилированием. Например, в EP 1176195 на имя Hang с соавторами описана линия клеток с функционально нарушенным геном FUT8, который кодирует фукозилтрансферазу, в результате чего экспрессируемые в такой клеточной
45 линии антитела характеризуются гипофукозилированием. В опубликованной

заявке РСТ WO 03/035835 на имя Presta описан вариант линии СНО-клеток, Lec13-клетки, с пониженной способностью присоединять фукозу к связанным с Asn(297) углеводам, что приводит также к гипофукозилированию антител, экспрессируемых в этой клетке-хозяине (см. также Shields R.L. и др., J. Biol. Chem. 277, 2002, сс. 26733-26740). В опубликованной заявке РСТ WO 99/54342 на имя Umana с соавторами, описаны линии клеток, сконструированные для экспрессии модифицирующих гликопротеин гликозилтрансфераз (например, бета(1,4)-N-ацетилглюкозаминилтрансферазы III (GnTIII)), в результате чего антитела, которые экспрессируются в сконструированных линиях клеток характеризуются повышенным содержанием разделяющих пополам GlcNac-структур, что приводит к повышенной ADCC-активности антител (см. также Umana и др., Nat. Biotech. 17, 1999, сс. 176-180).

Другой модификацией антител, подпадающей под объем изобретения, является пэгилирование. Антитело можно пэгилировать, например, для удлинения биологического (например, в сыворотке) времени полужизни антитела. Для пэгилирования антитела, как правило, антитело или его фрагмент подвергают взаимодействию с полиэтиленгликолем (ПЭГ), таким как реакционноспособный сложный эфир или альдегидное производное ПЭГ, в условиях, при которых одна или несколько ПЭГ-групп присоединяется к антителу или фрагменту антитела. Пэгилирование можно осуществлять с помощью реакции ацилирования или реакции алкилирования с реакционноспособной молекулой ПЭГ (или аналогичным реакционноспособным водорастворимым полимером). В контексте настоящего описания подразумевается, что понятие «полиэтиленгликоль» относится к любым формам ПЭГ, которые используют для дериватизации других белков, таким как моно(C₁-C₁₀)алкокси- или арилоксиполиэтиленгликоль или полиэтиленгликольмалеимид. В конкретных вариантах осуществления изобретения антитело, подлежащее пэгилированию, представляет собой агликолизированное антитело. Методы пэгилирования белков известны в данной области, и их можно применять к антителам, предлагаемым в изобретении (см., например, EP 0154316 на имя Nishimura с соавторами и EP 0401384 на имя Ishikawa с соавторами).

Методы создания антител

Как указано выше, антитела к IL-13, которые имеют вышеуказанные последовательности V_H и V_L , можно применять для создания новых антител к IL-13 путем модификации последовательностей V_H и/или V_L или соединенной(ых) с ними константной(ых) области(ей). Таким образом, согласно следующему объекту изобретения структурные особенности антитела к IL-13, предлагаемого в изобретении, используют для создания структурно родственных антител к IL-13, которые сохраняют по меньшей мере одно из функциональных свойств антител, предлагаемых в изобретении, таких как связывание с человеческим IL-13, а также ингибирование одного или нескольких функциональных свойств IL-13 (например, связывание с рецептором, ингибирование высвобождения медиатора).

Например, один или несколько CDR-участков антител, предлагаемых в настоящем изобретении, или их мутантов можно объединять рекомбинантно с известными каркасными участками и/или другими CDR для создания дополнительных, созданных с помощью рекомбинантной ДНК антител к IL-13, предлагаемых в изобретении, с помощью указанных выше методов. Другие типы модификаций включают модификации, описанные в предыдущем разделе. Исходным продуктом для метода конструирования является одна или несколько последовательностей V_H и/или V_L , представленных в настоящем описании, или один или несколько из них CDR-участков. Для создания сконструированного антитела не является необходимым фактическое получение (т.е. экспрессия в виде белка) антитела, которое имеет одну или несколько из последовательностей V_H и/или V_L , представленных в настоящем описании, или одного или нескольких их CDR-участков. Предпочтительно информацию, содержащуюся в последовательности(ях), используют в качестве исходного продукта для создания последовательности(ей) «второго поколения», выведенной(ых) из исходной(ых) последовательности(ей), и затем получают последовательность(и) второго поколения и экспрессируют в виде белка.

Таким образом, еще одним вариантом осуществления изобретения является способ получения антитела к IL-13, состоящего из: последовательности переменчивой области тяжелой цепи антитела, которая содержит последовательность CDR1, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 6-7, последовательность CDR2 SEQ ID NO: 8 и/или последовательность CDR3,

выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 9-10; и последовательности
вариабельной области легкой цепи антитела, которая содержит
последовательность CDR1, выбранную из группы, включающей SEQ ID NO: 16-
18, последовательности CDR2 SEQ ID NO: 19 и/или последовательности CDR3,
выбранной из группы, включающей SEQ ID NO: 20-22; заключающийся в том,
что изменяют по меньшей мере один аминокислотный остаток в
последовательности вариабельной области тяжелой цепи антитела и/или
вариабельной области легкой цепи антитела для создания по меньшей мере
одной измененной последовательности антитела; и экспрессируют измененную
последовательность антитела в виде белка.

Для получения и экспрессии измененной последовательности антитела
можно применять стандартные методы молекулярной биологии. Антитело,
кодируемое измененной(ыми) последовательностью(ями), представляет собой
антитело, которое сохраняет одну, несколько или все функциональные свойства
антител к IL-13, представленных в настоящем описании, где функциональные
свойства представляют собой (но не ограничиваясь ими) специфическое
связывание с человеческим IL-13; и антитело обладает по меньшей мере одним
из следующих функциональных свойств: антитело ингибирует связывание белка
IL-13 с IL-13-рецептором, или антитело ингибирует связывание IL-13-рецептора,
предупреждая или облегчая воспалительное, фиброзное или аллергическое
состояние, прежде всего воспалительное или обструктивное заболевание
дыхательных путей, или антитело ингибирует связывание IL-13-рецептора, тем
самым предупреждая или облегчая астму.

Измененное антитело может обладать одним или несколькими, двумя или
несколькими или тремя или несколькими из указанных выше функциональных
свойств.

Функциональные свойства измененных антител можно оценивать с
помощью стандартных анализов, известных в данной области и/или
представленных в настоящем описании, таких как описанные в примерах
(например, ELISA).

В конкретных вариантах способов создания антител, предлагаемых в
изобретении, мутации можно интродуцировать произвольно или избирательно
во всю или в часть кодирующей последовательности антитела к IL-13 и

полученные в результате модифицированные антитела к IL-13 можно подвергать скринингу в отношении связывающей активности и/или других описанных выше функциональных свойств. Методы интродукции мутаций известны в данной области. Например, в опубликованной заявке РСТ WO 02/092780 на имя Short описаны методы создания и скрининга мутаций антител с помощью насыщающего мутагенеза, синтетической сборки лигированием или их комбинаций. В опубликованной заявке РСТ WO 03/074679 на имя Lazar с соавторами описаны альтернативные методы, основанные на вычислительном скрининге для оптимизации физико-химических свойств антител.

Молекулы нуклеиновых кислот, кодирующие антитела, предлагаемые в изобретении

Следующим объектом изобретения являются молекулы нуклеиновых кислот, которые кодируют антитела, предлагаемые в изобретении. Нуклеиновые кислоты могут присутствовать в целых клетках, в клеточных лизатах или могут представлять собой нуклеиновые кислоты в частично очищенной или практически чистой форме. Нуклеиновую кислоту «выделяют» или «получают ее в практически очищенном виде», когда ее очищают от других клеточных компонентов или других загрязнителей, например, других присутствующих в клетке нуклеиновых кислот или белков, с помощью стандартных методов, включая обработку щелочью/ДСН, CsCl-бэндинг, хроматографию на колонках, электрофорез в агарозном геле и других методов, хорошо известных в данной области (см. Current Protocols in Molecular Biology, под ред. F. Ausubel и др., изд-во Greene Publishing and Wiley Interscience, New York, 1987). Нуклеиновая кислота, предлагаемая в изобретении, может представлять собой, например, ДНК или РНК, и может содержать интронные последовательности или не содержать их. В одном из вариантов осуществления изобретения нуклеиновая кислота представляет собой молекулу кДНК. Нуклеиновая кислота может присутствовать в векторе, таком как фаговый дисплейный вектор или рекомбинантный плазмидный вектор.

Нуклеиновые кислоты, предлагаемые в изобретении, можно получать с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Для антител, экспрессируемых гибридами (например, гибридами, полученными из трансгенных мышей, которые несут гены человеческих иммуноглобулинов, что

будет описано ниже), кДНК, которые кодируют легкие и тяжелые цепи антитела, созданные с использованием гибридомы, можно получать с помощью стандартных методов ПЦР-амплификации или клонирования кДНК. Для антител, которые получают из библиотеки генов иммуноглобулинов (например, с помощью метода фаговой презентации), нуклеиновую кислоту, кодирующую антитело, можно выделять из различных фаговых клонов, которые являются компонентами библиотеки.

После получения ДНК-фрагментов, кодирующих V_H - и V_L - области, эти ДНК-фрагменты можно подвергать дополнительной обработке с помощью стандартных методов рекомбинантной ДНК, например, для превращения генов варибельной области в гены полноразмерной цепи антитела, в гены Fab-фрагмента или в ген scFv-фрагмента. При осуществлении этого процесса ДНК-фрагмент, кодирующий V_L или V_H , функционально связывают с другой молекулой ДНК или фрагментом, кодирующим другой белок, такой как константная область антитела или гибкий линкер. Понятие «функционально связанный» в контексте настоящего описания означает, что два ДНК-фрагмента соединяют функциональным образом, в результате чего аминокислотные последовательности, кодируемые двумя ДНК-фрагментами, сохраняются в рамке считывания, или в результате чего белок экспрессируется под контролем требуемого промотора.

Выделенную ДНК, кодирующую V_H -область, можно превращать в ген полноразмерной тяжелой цепи путем функционального связывания ДНК, которая кодирует V_H , с другой молекулой ДНК, которая кодирует константные области тяжелой цепи (СН1, СН2 и СН3). Последовательности генов константной области тяжелой цепи известны в данной области (см., например, Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 15-ое изд., изд-во U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991), и ДНК-фрагменты, включающие эти области, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область может представлять собой константную область IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgE, IgM или IgD. Для гена тяжелой цепи Fab-фрагмента ДНК, кодирующую V_H , можно функционально связывать с другой молекулой ДНК, которая кодирует только константную область СН1 тяжелой цепи.

Выделенную ДНК, кодирующую V_L -область, можно превращать в ген полноразмерной легкой цепи (а также в ген легкой цепи Fab-фрагмента) путем функционального связывания ДНК, кодирующей V_L , с другой молекулой ДНК, которая кодирует константную область легкой цепи, CL . Последовательности человеческих генов константной области легкой цепи известны в данной области (см., например, Kabat E.A. и др., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 15-ое изд., изд-во U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No. 91-3242, 1991), и ДНК-фрагменты, включающие эти области, можно получать с помощью стандартной ПЦР-амплификации. Константная область легкой цепи может представлять собой константную каппа- или лямбда-область.

Для создания гена scFv ДНК-фрагменты, которые кодируют V_H и V_L , функционально связывают с другим фрагментом, который кодирует гибкий линкер, например, который кодирует аминокислотную последовательность $(Gly_4-Ser)_3$, в результате чего последовательности V_H и V_L можно экспрессировать в виде смежного одноцепочечного белка, в котором V_L - и V_H -области соединены гибким линкером (см., например, Bird и др., Science 242, 1988, сс. 423-426; Huston и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 1988, сс. 5879-5883; McCafferty и др., Nature 348, 1990, сс. 552-554).

Производство моноклональных антител, предлагаемых в изобретении

Моноклональные антитела (mAb) можно получать с помощью различных методов, включая общепринятые методы получения моноклональных антител, например, с помощью стандартного метода гибридизации соматических клеток, описанного у Kohler и Milstein, Nature 256, 1975, с. 495. Для получения моноклональных антител можно применять многочисленные методики, например, трансформацию В-лимфоцитов вирусами или онкогенами.

Применяемая для получения гибридом система животного происхождения представляет собой систему, основанную на использовании мышей. Создание гибридомы в мыши является хорошо известной процедурой. Протоколы иммунизации и методы выделения сенсibilизированных спленоцитов, предназначенных для слияния, хорошо известны в данной области. Компоненты, участвующие в слиянии (например, клетки мышинной миеломы), и процедуры слияния также хорошо известны.

Химерные или гуманизированные антитела, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получать последовательности мышинового моноклонального антитела, полученного согласно описанному выше методу. ДНК, кодирующую тяжелую и легкую цепь иммуноглобулинов, можно получать из представляющей интерес мышинной гибридомы и создавать так, чтобы она содержала немышинные (например, человеческие) последовательности иммуноглобулинов, с помощью стандартных методов молекулярной биологии. Например, для создания химерного антитела мышинные переменные области можно связывать с человеческими константными областями с использованием известных в данной области методов (см., например, U.S. 4816567 на имя Cabilly с соавторами). Для создания гуманизированного антитела мышинные CDR-участки можно встраивать в человеческий каркасный участок с помощью известных в данной области методов (см., например, U.S. 5225539 на имя Winter и U.S. 5530101; 5585089; 5693762 и 6180370 на имя Queen с соавторами).

В конкретном варианте осуществления изобретения антитела, предлагаемые в изобретении, представляют собой человеческие моноклональные антитела. Такие человеческие моноклональные антитела к IL-13 можно создавать с использованием трансгенных или трансхромосомных мышей, несущих в большей степени фрагменты человеческой иммунной системы, чем мышинной системы. К этим трансгенным и трансхромосомным мышам относятся мыши, обозначенные в контексте настоящего описания как NuMAb-мыши и KM-мыши соответственно, и мышей обеих указанных линий обозначают в контексте настоящего описания как «мыши, несущие человеческий Ig».

Мыши линии NuMAb mouse[®] (фирма Medarex, Inc.) содержат минилокусы гена человеческого иммуноглобулина, который кодирует неперегруппированные последовательности человеческой тяжелой (μ и γ) и легкой κ -цепи иммуноглобулина, в сочетании с целевые мутации, которые инактивируют эндогенные локусы μ - и κ -цепи (см., например, Lonberg и др., Nature 368(6474), 1994, сс. 856-859). Таким образом, у мыши снижена способность экспрессировать мышинный IgM или κ -цепь, и в ответ на иммунизацию интродуцированная человеческая тяжелая и легкая цепи трансгена подвергается переключению класса и соматической мутации с образованием обладающего высокой аффинностью человеческого моноклонального IgG κ (Lonberg N. и др.,

1994, выше; обзорная статья Lonberg N., Handbook of Experimental Pharmacology 113, 1994, сс. 49-101; Lonberg N. и Huszar D., Intern. Rev. Immunol. 13, 1995, сс. 65-93 и Harding F. и Lonberg N., Ann. N. Y. Acad. Sci. 764, 1995, сс. 536-546).

5 Получение и применение мышей линии HuMAb и геномные модификации, которые несут такие мыши, описаны также у Taylor L. и др., Nucleic Acids Research 20, 1992, сс. 6287-6295; Chen J. И др., International Immunology 5, 1993, 10 сс. 647-656; Tuailon и др., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94, 1993, сс. 3720-3724; Choi и др., Nature Genetics 4, 1993, сс. 117-123; Chen J. и др., EMBO J. 12, 1993, сс. 821-830; Tuailon и др., J. Immunol. 152, 1994, сс. 2912-2920; Taylor L. и др., 15 International Immunology, 1994, сс. 579-591; и Fishwild D. и др., Nature Biotechnology 14, 1996, сс. 845-851, содержание всех публикаций специально полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки (см. также U.S. 20 5545806; 5569825; 5625126; 5633425; 5789650; 5877397; 5661016; 5814318; 5874299 и 5770429; все на имя Lonberg и Kay; U.S. 5545807 на имя Surani с соавторами; опубликованные заявки PCT WO 92103918, WO 93/12227, WO 25 94/25585, WO 97113852, WO 98/24884 и WO 99/45962, все на имя Lonberg и Kay; и опубликованную заявку PCT WO 01/14424 на имя Kogman с соавторами).

В другом варианте осуществления изобретения человеческие антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать с использованием мыши, которая 30 несет последовательности человеческого иммуноглобулина в виде трансгенов и трансхромосом, например мыши, которая несет трансген человеческой тяжелой цепи и трансхромосому человеческой легкой цепи. Такие мыши, обозначенные в 35 контексте настоящего описания как «KM-мыши», описаны подробно в публикации PCT WO 02/43478 на имя Ishida с соавторами.

В данной области известны также другие системы на основе трансгенных 40 животных, экспрессирующих гены человеческого иммуноглобулина, и их можно применять для получения антител к IL-13, предлагаемых в изобретении. Например, можно использовать другую трансгенную систему, обозначенную как Xenomouse (фирма Abgenix, Inc.); такие мыши описаны, например, в U.S. 45 5939598; 6075181; 6114598; 6150584 и 6162963 на имя Kucherlapati с соавторами.

Кроме того, в данной области известны также другие системы на основе 50 транхромосомных животных, экспрессирующих гены человеческого иммуноглобулина, и их можно применять для получения антител к IL-13,

предлагаемых в изобретении. Например, можно использовать мышей, несущих как трансхромосому человеческой тяжелой цепи, так и трансхромосому человеческой легкой цепи, обозначенных как «ТС-мыши»; такие мыши описаны, например, у Tomizuka и др. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97, 2000, сс. 722-727. Кроме того, в данной области известны коровы, несущие трансхромосомы человеческой тяжелой и легкой цепи (Kuroiwa и др., Nature Biotechnology 20, 2002, сс. 889-894) и их можно применять для получения антител к IL-13, предлагаемых в изобретении.

Человеческие моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать также с использованием методов фаговой презентации для скрининга библиотек генов человеческих иммуноглобулинов. В данной области разработаны такие методы фаговой презентации для выделения человеческих антител (см., например: U.S. 5223409; 5403484 и 5571698 на имя Ladner с соавторами; U.S. 5427908 и 5580717 на имя Dower с соавторами; U.S. 5969108 и 6172197 на имя McCafferty с соавторами и U.S. 5885793; 6521404; 6544731; 6555313; 6582915 и 6593081 на имя Griffiths с соавторами).

Человеческие моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать также с использованием SCID (тяжелый комбинированный иммунодефицит) -мышей, в которых восстанавливали человеческие иммунциты с тем, чтобы при иммунизации можно было получать человеческий гуморальный иммунный ответ. Такие мыши описаны, например, в U.S. 5476996 и 5698767 на имя Wilson с соавторами.

Получение человеческих моноклональных антител к IL-13

В качестве антигена использовали очищенный рекомбинантный человеческий (hr) IL-13, конъюгированный с Pan DR-T-хелперными эпитопами (Pan DR T helper Epitopes (PADRE)). Полностью человеческие моноклональные антитела к IL-13 получали с использованием линий HCo7 трансгенных HuMab-мышей, которые экспрессируют гены человеческих антител. В этой линии мышей эндогенный ген легкой каппа-цепи можно разрушать в гомозиготе с помощью метода, описанного у Chen и др., EMBO J.12, 1993, сс. 811-820, а эндогенный мышинный ген тяжелой цепи можно разрушать в гомозиготе согласно методу, описанному в примере 1 опубликованной заявки PCT WO 01109187. Эта линия мышей несет трансген человеческой легкой каппа-цепи, т.е.

КСо5, описанный у Fishwild и др., Nature Biotechnology 14, 1996, сс. 845-851, и трансен НСо7 человеческой тяжелой цепи, описанный в U.S. 5545806; 5625825 и 5545807.

Для получения полностью человеческих моноклональных антител к IL-13, предлагаемых в изобретении, HuMab-мышей иммунизировали смесью очищенного рекомбинантного IL-13 из конъюгата НЕК-ЕВНА/PADRE (42 мкг/мышь) и Quil A (15 мкг/мышь, фирма Accurate Chemical). Общие схемы иммунизации HuMab-мышей описаны у Lonberg N. и др., Nature 368(6474), 1994, сс. 856-859; Fishwild D. и др., Nature Biotechnology 14, 1996, сс. 845-851 и в опубликованной заявке РСТ WO 98/24884. Трансгенных мышей иммунизировали либо внутривенно (IV), либо подкожно (SC) в период между 1-71 днем. Мышей подвергали бустер-инъекции путем внутривенного введения антигена (без адьюванта) за 2 дня для умерщвления и выделения селезенки. РНК выделяли из селезенки с помощью набора для выделения типа Nucleospin RNA II (фирма BD Biosciences/Clontech). РНК применяли для создания фаговой дисплейной библиотеки произвольно сгруппированных переменных областей H- и L-цепей в фаговой дисплейной библиотеке Fab-фрагментов согласно методу, описанному в US 6794132. Фаговую дисплейную библиотеку подвергали пяти циклам селекции с использованием биотинилированного hrIL-13 согласно описанному в патенте протоколу равновесного связывания в жидкой фазе (в фазе раствора). В четырех первых циклах селекции использовали hrIL-13 в концентрации 10^{-8} М, а в последнем цикле селекции применяли hrIL-13 в концентрации 10^{-9} М. При использовании этой библиотеки конечное отношение сигнала к шуму, которое определяли по количеству бляшкообразующих единиц (БОЕ), образовавшихся в присутствии антигена, деленное на количество БОЕ, образовавшихся без антигена, составляло 37, что свидетельствует о том, что более 90% отобранных фагов экспрессировали антитела, которые связывались с hrIL-13. Затем фаговую дисплейную библиотеку субклонировали в плазмидном векторе для экспрессии растворимого Fab-фрагмента согласно методу, описанному в US 6794132.

Создание трансфектом, продуцирующих моноклональные антитела

Антитела, предлагаемые в изобретении, можно получать также в трансфектоне клетки-хозяина с использованием, например, комбинации методов

рекомбинантной ДНК и методов генной трансфекции, которые хорошо известны в данной области (см., например, Morrison S., Science 229, 1985, с. 1202).

5 Например, для экспрессии антител или фрагментов антител ДНК, которые кодируют частичные или полноразмерные легкие и тяжелые цепи, можно получать с помощью стандартных методов молекулярной биологии (например, с помощью ПЦР-амплификации или клонирования кДНК с использованием
10 гибридом, которые экспрессируют представляющее интерес антитело) и ДНК можно встраивать в экспрессионные векторы таким образом, чтобы гены были функционально связаны с контролирующими транскрипцию и трансляцию
15 последовательностями. В этом контексте подразумевается, что понятие «функционально связанный» означает, что ген антитела встраивают путем лигирования в вектор таким образом, чтобы присутствующие в векторе контролирующие транскрипцию и трансляцию последовательности выполняли
20 собственные им функции регуляции транскрипции и трансляции гена антитела. Выбранный экспрессионный вектор и контролирующая экспрессию последовательности должны быть совместимы с применяемой для экспрессии
25 клеткой-хозяином. Ген легкой цепи антитела и ген тяжелой цепи антитела можно встраивать в различные векторы или, как правило, оба гена встраивают в один и тот же экспрессионный вектор. Гены антитела встраивают в
30 экспрессионный вектор стандартными методами (например, встраивают путем лигирования комплементарных сайтов рестрикции во фрагмент гена антитела или в вектор, или путем лигирования «затупленных» концов, если отсутствуют
35 какие-либо сайты рестрикции). Вариабельные области легких и тяжелых цепей антител, предлагаемых в изобретении, можно использовать для создания полноразмерных генов антител любых изотипов путем встраивания их в
40 экспрессионные векторы, которые уже кодируют константные области тяжелой цепи и константные области легкой цепи требуемого изотипа, таким образом, чтобы V_H -область была функционально связана с CH -областью(ями) в векторе, а V_L -область функционально связана с CL -областью в векторе. В другом или
45 дополнительном варианте рекомбинантный экспрессионный вектор может кодировать сигнальный пептид, который облегчает секрецию антитела из клетки-хозяина. Ген цепи антитела можно клонировать в векторе так, чтобы
50 сигнальный пептид был связан в рамке считывания с N-концом гена цепи

антитела. Сигнальный пептид может представлять собой сигнальный пептид иммуноглобулина или гетерологичный сигнальный пептид (т.е. сигнальный пептид из белка, не относящегося к иммуноглобулинам).

Помимо генов цепи антитела рекомбинантные экспрессионные векторы, предлагаемые в изобретении, несут регуляторные последовательности, которые контролируют экспрессию генов цепи антитела в клетке-хозяине.

Подразумевается, что понятие «регуляторная последовательность» относится к промоторам, энхансерам и другим контролирующим экспрессию элементам (например, сигналы полиаденилирования), которые контролируют транскрипцию или трансляцию генов цепи антитела. Указанные регуляторные последовательности описаны, например, у Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, изд-во Academic Press, San Diego, CA 1990).

Специалистам в данной области должно быть очевидно, что создание экспрессионного вектора, включая выбор регуляторных последовательностей, может зависеть от таких факторов, как выбор клетки-хозяина для трансформации, требуемого уровня экспрессии белка и т.д. Регуляторные последовательности для экспрессии в клетках млекопитающих включают вирусные элементы, которые обеспечивают высокие уровни экспрессии белка в клетках млекопитающих, такие как промоторы и/или энхансеры, выведенные из цитомегаловируса (CMV), обезьяньего вируса 40 (OB-40), аденовируса (например, главный поздний промотор аденовируса (AdMLP)) и вируса полиомы. В альтернативном варианте можно использовать невирусные регуляторные последовательности, такие как промотор убикитина или промотор Р-глобина. Кроме того, можно применять регуляторные элементы, состоящие из полученных из разных источников последовательностей, такие как промоторная система Sga, которая содержит последовательности раннего промотора OB-40 и длинный кольцевой повтор вируса типа 1 человеческого Т-клеточного лейкоза (Takebe Y. и др., Mol. Cell. Biol. 8, 1988, сс. 466-472).

Помимо генов цепи антитела и регуляторных последовательностей рекомбинантные экспрессионные векторы, предлагаемые в изобретении, могут нести дополнительные последовательности, например, последовательности, которые регулируют репликацию вектора в клетках-хозяевах (например, сайты инициации репликации) и гены селективируемых маркеров. Гены селективируемых

маркеров облегчают отбор клеток-хозяев, в которые интродуцирован вектор (см., например, U.S. 4399216, 4634665 и 5179017, все на имя Axel с соавторами).
5 Например, как правило, ген селективируемого маркера обуславливает устойчивость клетки-хозяина, в которую интродуцирован вектор, к лекарственным средствам, таким как G418, гигромицин или метотрексат. К генам селективируемых маркеров относятся ген дигидрофолатредуктазы (DHFR)
10 (для применения в dhfr- клетках-хозяевах при селекции/амплификации в присутствии метотрексата) и ген neo (для отбора в присутствии G418).

Для экспрессии легких и тяжелых цепей экспрессионным(ыми) вектором(ами), кодирующим(ими) тяжелые и легкие цепи, трансфектируют клетку-хозяина стандартными методами. Под различные формы понятия «трансфекция» подпадает широкое разнообразие методов, обычно применяемых
15 для интродукции экзогенной ДНК в прокариотическую или эукариотическую клетку-хозяина, например, электропорация, осаждение фосфатом кальция, трансфекция с использованием ДЭАЭ ((диэтиламино)этилцеллюлоза)-декстрана и т.п. Теоретически можно экспрессировать антитела, предлагаемые в изобретении, либо в прокариотических, либо в эукариотических клетках-
20 хозяевах. Прежде всего в контексте настоящего описания обсуждается экспрессия в эукариотических клетках, прежде всего в клетках-хозяевах млекопитающих, поскольку указанные эукариотические и прежде всего клетки млекопитающих, с большей вероятностью, чем прокариотические клетки, могут обеспечивать сборку и секрецию имеющего правильную складчатость
25 иммунологически активного антитела. Установлено, что экспрессия генов антител в прокариотических хозяевах не может эффективно обеспечивать высокие уровни производства активного антитела (Boss M. A. и Wood C. R.,
30 Immunology Today 6, 1985, сс. 12-13).

Клетки-хозяева из млекопитающих, предназначенные для экспрессии рекомбинантных антител, предлагаемых в изобретении, представляют собой клетки яичника китайского хомячка (CHO-клетки) (включая CHO-клетки с
45 дефицитом dhfr (dhfr-), которые описаны у Urlaub и Chasin, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 1980, сс. 4216-4220, которые применяют в сочетании с селективируемым маркером DHFR, например, как описано у R.J. Kaufman и P.A. Sharp, Mol. Biol. 159, 1982, сс. 601-621, клетки миеломы линии NSO, COS-клетки и SP2-клетки.

Когда рекомбинантные экспрессионные векторы, кодирующие гены антитела, интродуцируют в клетки-хозяева из млекопитающих, то антитела получают путем культивирования клеток-хозяев в течение периода времени, достаточного для осуществления экспрессии антитела в клетке-хозяине или секрети антитела в культуральную среду, в которой выращивают клетки-хозяева. Антитела можно выделять из культуральной среды с помощью стандартных методов очистки белков.

Иммуноконъюгаты

Следующим объектом настоящего изобретения является антитело к IL-13 или его фрагмент, конъюгированный с обладающим терапевтическим действием фрагментом, таким как цитотоксин, лекарственное средство (например, иммунодепрессант) или радиотоксин. Такие конъюгаты обозначены в контексте настоящего описания как «иммуноконъюгаты». Иммуноконъюгаты, которые содержат один или несколько цитотоксинов обозначают как «иммунотоксины». К цитотоксинам или цитотоксическим агентам относится любой агент, который повреждает (например, уничтожает) клетки. Их примерами являются таксон, цитохаласин В, грамицидин D, этидия бромид, эметин, митомицин, этопосид, тенопосид, винкристин, винбластин, t. колхицин, доксорубицин, даунорубицин, дигидроксиантрациндион, митоксантрон, митрамицин, актиномицин D, 1-дегидрокситестостерон, глюкокортикоиды, прокаин, тетракаин, лидокаин, пропранолол и пурамицин и их аналоги или гомологи. Терапевтические агенты представляют собой, например, антимераболиты (например, метотрексат, 6-меркаптопурин, 6-тиогуанин, цитарабин, 5-фторурацил, декарбазин), деструктурирующие агенты (например, мехлорэтамин, тиотепа, хлорамбуцил, миефалан, кармустин (BSNU) и ломустин (CCNU), циклотосфамид, бусульфид, дибромманит, стрептозотоцин, митомицин С и *цис*-дихлордиамин платины(II) (DDP), цисплатин, антрациклины (например, даунорубицин (прежнее название дауномицин) и доксорубицин), антибиотики (например, дактиномицин (прежнее название актиномицин), блеомицин, митрамицин и антрамицин (АМС)) и антимиотические агенты (например, винкристин и винбластин).

Другими примерами терапевтических цитотоксинов, которые можно конъюгировать с антителом, предлагаемым в изобретении, являются дуокармицины, калихеамицины, майтансины и ауриститины и их производные.

Например, в продаже имеется конъюгат антитела с калихеамицином (Mylotarg™; фирма Wyeth-Ayerst).

5 Цитотоксины можно конъюгировать с антителами, предлагаемыми в изобретении, с использованием известной в данной области технологии, предусматривающий применение линкеров. Примерами типов линкеров, которые можно использовать для конъюгации цитотоксина с антителом, являются (но не 10 ограничиваясь ими) гидразоны, сложные тиоэфиры, сложные эфиры, дисульфиды и пептидсодержащие линкеры. Можно выбирать линкер, который, например, чувствителен к расщеплению при низком значении pH в 15 компартменте лизосомы или чувствителен к расщеплению протеазами, например, протеазами, которые преимущественно экспрессируются в опухолевых тканях, такими как катепсины (например, катепсины B, C, D).

20 Дополнительные данные о типах цитотоксинов, линкерах и методах конъюгации терапевтических агентов и антител приведены также у Saito G. и др., Adv. Drug Deliv. Rev. 55, 2003, сс. 199-215; Trai, P.A. и др., Cancer Immunol. Immunother. 52 2003, сс. 328-337; Payne G., Cancer Cell 3, 2003, сс. 207-212; Allen 25 T.M., Nat. Rev. Cancer 2, 2002, сс. 750-763; Pastan I. и Kreitman R. J., Curr. Opin. Investig. Drugs 3, 2002, сс. 1089-1091; Senter P.D. и Springer C.J., Adv. Drug Deliv. Rev. 53, 2001, сс. 247-264.

30 Антитела, предлагаемые в изобретении, можно конъюгировать также с радиоактивными изотопами с получением цитотоксических радиоактивных фармацевтических агентов, которые называют также радиоиммуноконъюгатами. 35 Примерами радиоактивных изотопов, которые можно конъюгировать с антителами для применения в диагностических или терапевтических целях, являются (но не ограничиваясь ими) йод¹³¹, индий¹¹¹, иттрий⁹⁰ и лютеций¹⁷⁷. В 40 данной области разработаны методы получения радио иммуноконъюгатов. Примерами поступающих в продажу радиоиммуноконъюгатов являются Zevalin™ (фирма DEC Pharmaceuticals) и Веххар™ (фирма Corixa 45 Pharmaceuticals), и аналогичные методы можно применять для получения радиоиммуноконъюгатов антител, предлагаемых в изобретении.

50 Конъюгаты антител, предлагаемые в изобретении, можно применять для модификации конкретного биологического ответа, и в контексте настоящего описания не считается, что компонент, представляющий собой лекарственное

средство, ограничен классическими химиотерапевтическими агентами.

Например, компонент, представляющий собой лекарственное средство, может представлять собой белок или полипептид, процессированный с целью придания ему требуемой биологической активности. Такие белки могут представлять собой, например, обладающий ферментативной активностью токсин или его активный фрагмент, такой как абрин, рицин А, экзотоксин *Pseudomonas* или дифтерийный токсин; такой белок, как фактор некроза опухоли или интерферон - γ ; или модификаторы биологического ответа, такие, например, как лимфокины, интерлейкин-1 («IL-1»), интерлейкин-2 («IL-2»), интерлейкин-6 («IL-6»), колониесимулирующий фактор гранулоцитов и макрофагов («GM-CSF»), колониестимулирующий фактор гранулоцитов («G-CSF») или другие факторы роста.

Методики конъюгирования обладающего терапевтической активностью фрагмента с антителами хорошо известны (см., например, Amon и др., «Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy», в: Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, под ред. Reisfeld и др., изд-во Alan R. Liss, Inc., сс. 243-56, 1985; Hellstrom и др., «Antibodies For Drug Delivery», в: Controlled Drug Delivery (2-ое изд.), под ред. Robinson и др., под ред. Marcel Dekker, Inc., сс. 623-53, 1987; Thorpe, «Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review», в: Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, под ред. Pinchera и др., 1985, сс. 475-506; «Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy», в: Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy, под ред. Baldwin и др., изд-во Academic Press, 1985, сс. 303-316 и Thorpe и др., «The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates», Immunol. Rev., 62, 1982, сс.119-158).

Биспецифические молекулы

Следующим объектом настоящего изобретения являются биспецифические молекулы, содержащие предлагаемое в изобретении антитело к IL-13 или его фрагмент. Антитело, предлагаемое в изобретение, или его антигенсвязывающие участки, можно дериватизировать или связывать с другой функционально активной молекулой, например, другим пептидом или белком (например, другим антителом или лигандом рецептора), с получением биспецифической молекулы,

которая связывается по меньшей мере с двумя различными сайтами связывания или молекулами-мишенями. Антитело, предлагаемое в изобретении, фактически может быть дериватизировано или связано более чем с одной другой функционально активной молекулой с образованием мультиспецифических молекул, которые связываются более чем с двумя различными сайтами связывания и/или молекулами-мишенями; подразумевается, что в контексте настоящего описания указанные мультиспецифические молекулы также подпадают под понятие «биспецифическая молекула». Для создания биспецифической молекулы, предлагаемой в изобретении, антитело, предлагаемое в изобретении, можно функционально связывать (например, путем химического сочетания, генетического слияния, нековалентной ассоциации или иным образом) с одной или несколькими другими связывающими молекулами, такими как другое антитело, фрагмент антитела, пептид или миметик связывания, с получением биспецифической молекулы.

Таким образом, настоящее изобретение относится к биспецифическим молекулам, которые имеют по меньшей одну первую специфичность, обладающую способностью к связыванию с IL-13, и вторую специфичность, обладающую способностью к связыванию со вторым эпитопом-мишенью. Например, второй эпитоп-мишень представляет собой Fc-рецептор, например, человеческий Fc γ R1 (CD64) или человеческий Fc α -рецептор (CD89). Таким образом, изобретение относится к биспецифическим молекулам, которые обладают способностью связываться как с экспрессирующими Fc γ R, Fc α R или Fc ϵ R эффекторными клетками (например, моноцитами, макрофагами или полиморфонуклеарными клетками (PMN)), так и с клетками-мишенями, которые экспрессируют IL-13. Указанные биспецифические молекулы направляют экспрессирующие IL-13 клетки к эффекторной клетке и запускают опосредуемые Fc-рецептором виды активности эффекторной клетки, такие как фагоцитоз экспрессирующих IL-13 клеток, антитело-обусловленную клеточнозависимую цитотоксичность (ADCC), высвобождение цитокинов или образование аниона супероксида.

Кроме того, в том случае, когда биспецифическая молекула представляет собой мультиспецифическую молекулу, предлагаемую в изобретении, молекула может иметь также третью специфичность к связыванию в дополнение к анти-

5 Fc-специфичности к связыванию и анти-IL-13-специфичности к связыванию. Например, третья специфичность к связыванию может представлять собой фрагмент антистимулирующего фактора (EF), например, молекулу, которая
10 связывается с поверхностным белком, участвующим в цитотоксической активности, и тем самым повышает иммунный ответ против клетки-мишени. «Фрагмент антистимулирующего фактора» может представлять собой антитело, функционально активный фрагмент антитела или лиганд, который связывается с
15 требуемой молекулой, например, антигеном или рецептором, и тем самым приводит к стимуляции эффекта связывания детерминант Fc-рецептора или антигена клетки-мишени.

«Фрагмент антистимулирующего фактора» может связываться с Fc-рецептором или антигеном клетки-мишени. В альтернативном варианте
20 фрагмент антистимулирующего фактора, может связываться с субстанцией, которая отличается от субстанции, с которой связываются первая и вторая специфичность к связыванию. Например, фрагмент антистимулирующего
25 фактора, может связываться с цитотоксической Т-клеткой (например, посредством CD2, CD3, CD8, CD28, CD4, CD44, ICAM-1 или другой иммунной клетки, что приводит к повышению иммунного ответа против клетки-мишени).

30 В одном из вариантов осуществления изобретения биспецифические молекулы, предлагаемые в изобретении, содержат в качестве специфичности, обладающей способностью к связыванию, по меньшей мере одно антитело или
фрагмент антитела, например, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv или одноцепочечный Fv. Антитело может представлять собой также димер легких цепей или тяжелых
35 цепей или любой его минимальный фрагмент, такой как Fv или одноцепочечную конструкцию, описанную у Ladner и др., U.S. 4946778, содержание которого
40 специально включено в настоящее описание в качестве ссылки.

В одном из вариантов осуществления изобретения специфичность, обладающую способностью к связыванию с Fcγ-рецептором, представляет собой
45 моноклональное антитело, связывание которого не блокируется человеческим иммуноглобулином G (IgG). В контексте настоящего описания понятие «IgG-рецептор» относится к любому из восьми генов γ-цепи, локализованных на
хромосоме 1. Эти гены кодируют в общей сложности двенадцать
50 трансмембранных или растворимых изоформ рецепторов, которые объединены в

три класса F γ -рецепторов: F γ RI (CD64), F γ RII(CD32) и F γ RIII (CD16). В другом варианте осуществления изобретения F γ -рецептор представляет собой человеческий обладающий высокой аффинностью F γ RI. Человеческий F γ RI представляет собой молекулу с молекулярной массой 72 кДа, которая обладает высокой аффинностью к мономерному IgG (10^8 - 10^9 M $^{-1}$).

Получение и характеристики конкретных моноклональных антител к F γ описаны у Fanger с соавторами в опубликованной заявке PCT WO 88/00052 и в U.S. 4954617, содержание которых полностью включено в настоящее описание в качестве ссылки. Эти антитела связываются с эпитопом F γ RI, F γ RII или F γ RIII в сайте, который отличается от связывающего F γ сайта рецептора, и в результате их связывание не блокируется в заметной степени физиологическими уровнями IgG. Специфические антитела к F γ RI, которые применяют в настоящем изобретении, представляют собой МАт 22, МАт 32, МАт 44, МАт 62 и МАт 197. Гибридому, продуцирующую МАт 32, можно получать из Американской коллекции типовых культур (АТСС), регистрационный номер НВ9469. В других вариантах осуществления изобретения антитело к F γ -рецептору представляет собой гуманизированную форму моноклонального антитела 22 (Н22). Получение и характеристики антитела Н22 описаны у Graziano R.F. и др., J. Immunol 155 (10), 1995, сс. 4996-5002 и в опубликованной заявке PCT WO 94/10332. Линия клеток, продуцирующая антитело 1122, депонирована в Американской коллекции тканевых культур под обозначением НА022CL1 и регистрационным номером CRL 11177.

В следующих вариантах осуществления изобретения специфичность к связыванию с F α -рецептором опосредуется антителом, которое связывается с человеческим IgA-рецептором, например, F α -альфа-рецептором (F α RI (CD89)), связывание которого не может блокироваться человеческим иммуноглобулином А (IgA). Подразумевается, что понятие «IgA-рецептор» относится к генному продукту одного из генов (F α RI), локализованному на хромосоме 19. Известно, что этот ген кодирует несколько полученных в результате альтернативного сплайсинга трансмембранных изоформ массой от 55 до 110 кДа. F α RI (CD89) конститутивно экспрессируется на моноцитах/монофагах, эозинофильных и нейтрофильных гранулоцитах, но не экспрессируется на популяции неэффекторных клеток. F α RI обладает средним уровнем аффинности (5×10^7 M $^{-1}$)

1) как к IgA1, так и к IgA2, которая повышается при обработке цитокинами, такими как G-CSF или GM-CSF (Morton H.C. и др., *Critical Reviews in Immunology* 116, 1996, сс. 423-440). Описаны четыре FcαRI-специфических моноклональных антител, обозначенных как A3, A59, A62 и A77, которые связываются с FcαRI вне сайта связывания лиганда IgA (Monteiro R.C. и др., *J. Immunol.* 148, 1992, с. 1764).

FcαRI и FcγRI представляют собой стимулирующие (запускающие) рецепторы, предназначенные для применения в биспецифических молекулах, предлагаемых в изобретении, поскольку они экспрессируются в основном на иммунных эффекторных клетках, например, моноцитах, PMN, макрофагах и дендритных клетках; характеризуются высоким уровнем экспрессии (например, 5000-100000 на клетку); являются медиаторами цитотоксической активности (например, ADCC, фагоцитоз); опосредуют повышенную презентацию антигенов, включая аутоантигены, обеспечивая направленный перенос к ним.

Другие антитела, которые можно применять в биспецифических молекулах, предлагаемых в изобретении, представляют собой мышинные, химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Биспецифические молекулы, предлагаемые в настоящем изобретении, можно получать путем конъюгации компонентов обладающих способностью к связыванию специфичностей, например, обладающих способностью к связыванию специфичностей антител к FcR и антител к IL-13, с помощью методов, известных в данной области. Например, каждую обладающую способностью к связыванию специфичность биспецифической молекулы можно создавать по отдельности и затем конъюгировать друг с другом. Когда обладающие способностью к связыванию специфичности представляют собой белки или пептиды, для ковалентной конъюгации можно использовать целый ряд агентов для связывания или перекрестного сшивания. Примерами перекрестносшивающих агентов являются протеин А, карбодиимид, N-сукцинимидил-S-ацетилтиоацетат (SATA), 5,5'-дитиобис(2-натробензойная кислота) (DTNB), о-фенилендималеимид (oPDM), N-сукцинимидил-3-(2-пиридилдитио)пропионат (SPDP) и сульфосукцинимидил-4-(N-малеимидометил)циклогексан-1-карбоксилат (сульфо-SMCC) (см., например, Karpovsky и др., *J. Exp. Med.* 160, 1984, с. 1686; Liu M.A. и др., *Proc. Natl. Acad.*

Sci. USA 82, 1985, с. 8648). Другие методы представляют собой методы, описанные у Paulus, Behring Ins. Mitt. No. 78, 1985, сс. 118-132; Brennan и др., Science 229, 1985, сс. 81-83) и Glennie и др., J. Immunol. 139, 1987, сс. 2367-2375). Такие предназначенные для конъюгации агенты, как SATA и сульфосмеч, оба поступают в продажу от фирмы Pierce Chemical Co. (Рокфорд, шт. Иллинойс).

Когда обладающие способностью к связыванию специфичности представляют собой антитела, то их можно конъюгировать с помощью сульфгидрильной связи С-концевых шарнирных областей двух тяжелых цепей. В конкретном варианте осуществления изобретения шарнирную область модифицируют так, чтобы она перед конъюгацией содержала нечетное количество сульфгидрильных остатков, например, один.

В альтернативном варианте обе обладающие способностью к связыванию специфичности можно кодировать в одном и том же векторе и экспрессировать и собирать в одной и той же клетке-хозяине. Этот метод является наиболее целесообразным, когда биспецифическая молекула представляет собой слитый белок, такой как МАт × МАт, МАт × Fab, Fab × F(ab')₂ или лиганд × Fab. Биспецифическая молекула, предлагаемая в изобретении, может представлять собой одноцепочечную молекулу, которая содержит одноцепочечное антитело и связывающую детерминанту, или одноцепочечную биспецифическую молекулу, которая содержит две связывающиеся детерминанты. Биспецифические молекулы могут содержать по меньшей мере две одноцепочечные молекулы. Методы получения биспецифических молекул описаны, например, в U.S. 5260203; U.S. 5455030; U.S. 4881175; U.S. 5132405; U.S. 5091513; U.S. 5476786; U.S. 5013653; U.S. 5258498; и U.S. 5482858.

Связывание биспецифических молекул с их специфическими мишенями можно подтверждать, например, твердофазным иммуноферментным анализом (ELISA), радиоиммуноанализом (РИА), FACS-анализом, биологическим анализом (например, ингибирование роста) или анализом методом Вестерн-блоттинга. Каждый из указанных анализов позволяет выявлять присутствие конкретных представляющих интерес комплексов белок-антитело при использовании меченого реагента (например, антитела), специфического в отношении представляющего интерес комплекса. Например, комплексы FcR-

антитело можно выявлять с помощью, например, связанного с ферментом антитела или фрагмента антитела, который распознает и специфически связывается с комплексами антитело-FcR. В альтернативном варианте комплексы можно выявлять с помощью целого ряда других иммуноанализов. Например, антитело может иметь 4 радиоактивных метки и его можно применять в радиоиммуноанализе (РИА) (см., например, Weintraub B., Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques, The Endocrine Society, март, 1986, публикация включена в настоящее описание в качестве ссылки). Радиоактивный изотоп можно выявлять с помощью таких устройств, как γ -счетчик или сцинтилляционный счетчик или с помощью автордиографии.

Фармацевтические композиции

Следующим объектом настоящего изобретения является композиция, например, фармацевтическая композиция, содержащая одно или комбинацию моноклональных антител или его(их) антигенсвязывающую(ие) центр(ы), предлагаемые в настоящем изобретении, в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем. Такие композиции могут включать одно или комбинацию (например, два или большее количество различных) антител, или иммуноконъюгатов или биспецифических молекул, предлагаемых в изобретении. Например, фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, может содержать комбинацию антител (или иммуноконъюгатов или биспецифических антител), которые связываются с различными эпитопами на антигене-мишени, или которые обладают комплементарным видом активности.

Фармацевтические композиции, предлагаемые в изобретении, можно применять также в совместной терапии, т.е. в сочетании с другими агентами. Например, в совместной терапии можно применять антитело к IL-13, предлагаемое в настоящем изобретении, в сочетании по меньшей мере с одним другим противовоспалительным агентом. Примеры терапевтических агентов, которые можно применять в совместной терапии, более подробно описаны ниже в разделе, посвященном применению антител, предлагаемых в изобретении.

В контексте настоящего описания понятие «фармацевтически приемлемый носитель» включает каждый и все растворители, дисперсионные среды,

материалы для нанесения покрытия, противобактериальные и противогрибковые агенты, агенты, придающие изотоничность, и замедляющие абсорбцию агенты и т.п., которые являются физиологически совместимыми. Носитель должен быть пригодным для внутривенного, внутримышечного, подкожного, парентерального, спинального или эпидермального введения (например, путем инъекции или инфузии). В зависимости от пути введения на действующее вещество, т.е. антитело, иммуноконъюгат или биспецифическую молекулу, можно наносить покрытие из материала, защищающего соединение от воздействия кислот и других факторов окружающей среды, которые могут инактивировать соединение.

Фармацевтические соединения, предлагаемые в изобретении, могут включать одну или несколько фармацевтически приемлемых солей. Понятие «фармацевтически приемлемая соль» относится к соли, которая сохраняет биологическую активность родительского соединения и не вызывает никаких нежелательных побочных действий (см., например, Berge S.M., и др., J. Pharm. Sci. 66, 1977, сс. 1-19). Примерами таких солей являются кислотно-аддитивные соли и соли присоединения оснований. К кислотно-аддитивным солям относятся соли, образованные из нетоксичных неорганических кислот, таких как соляная, азотная, фосфорная, серная, бромисто-водородная, йодисто-водородная, фосфористая и т.п., а также из нетоксичных органических кислот, таких как алифатические моно- и дикарбоновые кислоты, замещенные фенилом алкановые кислоты, оксиалкановые кислоты, ароматические кислоты, алифатические и ароматические сульфоновые кислоты и т.п. Соли присоединения оснований включают соли, образованные с щелочно-земельными металлами, такими как натрий, калий, магний, кальций и т.п., а также с нетоксичными органическими аминами, такими как N,N'-дибензилэтилендиамин, N-метилглюкамин, хлорпрокаин, холин, диэтаноламин, этилендиамин, прокаин и т.п.

Фармацевтическая композиция, предлагаемая в изобретении, может содержать также фармацевтически приемлемый антиоксидант. Примерами фармацевтически приемлемых антиоксидантов являются: водорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбиновая кислота, гидрохлорид цистеина, бисульфат натрия, метабисульфит натрия и т.п.; жирорастворимые антиоксиданты, такие как аскорбилпальмитат, бутилированный гидроксианизол

(ВГА), бутилированный гидрокситолуол (БГТ), лецитин, пропилгаллат, альфа-токоферол и т.п.; металлхелатирующие агенты, такие как лимонная кислота, этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТК), сорбит, винная кислота, фосфорная кислота и т.п.

Примерами приемлемых водных и неводных носителей, которые можно применять в фармацевтических композициях, предлагаемых в изобретении, являются вода, этанол, полиолы (такие как глицерин, пропиленгликоль, полиэтиленгликоль и т.п.) и их приемлемые смеси, растительные масла, такие как оливковое масло, и пригодные для инъекций сложные органические эфиры, такие как этилолеат. Требуемую текучесть можно поддерживать, например, с помощью применяемых для нанесения покрытий материалов, таких как лецитин, сохраняя требуемый размер частиц в случае дисперсий, и с помощью поверхностно-активных веществ.

Указанные композиции могут содержать также адъюванты, такие как консерванты, смачивающие агенты, эмульгаторы и диспергирующие вещества. Отсутствие микроорганизмов можно гарантировать как с помощью описанных выше процессов стерилизации, так и включением различных антибактериальных и противогрибковых агентов, таких, например, как парабен, хлорбутанол, фенол, сорбиновая кислота и т.п. Может оказаться желательным включать в композиции придающие изотоничность агенты, такие как сахара, хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно получать инъекруемую фармацевтическую форму с пролонгированной абсорбцией, например, путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Фармацевтически приемлемые носители представляют собой стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для приготовления при необходимости стерильных инъекруемых растворов или дисперсии. Применение таких сред и агентов для фармацевтических действующих веществ известно в данной области. За исключением случая, когда любые из общепринятых сред или агентов не совместимы с действующим веществом, предусматривается их применение в фармацевтических композициях, предлагаемых в изобретении. В композиции можно включать также дополнительные действующие вещества.

Терапевтические композиции, как правило, должны быть стерильными и стабильными в условиях приготовления и хранения. Композиция может иметь форму раствора, микроэмульсии, липосомы или иметь другую упорядоченную структуру, пригодную для включения высокой концентрации лекарственного средства. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсную среду, содержащую, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль и т.п.) и их приемлемые смеси. Требуемую текучесть можно поддерживать, например, с помощью применяемых для нанесения покрытий материалов, таких как лецитин, сохраняя требуемый размер частиц в случае дисперсий, и с помощью поверхностно-активных веществ. Во многих случаях можно включать придающие изотоничность агенты, такие как сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия и т.п. Кроме того, можно получать инъекруемую фармацевтическую форму с пролонгированной абсорбцией, например, путем включения агентов, которые замедляют абсорбцию, таких как моностеарат алюминия и желатин.

Стерильные предназначенные для инъекций растворы можно получать путем включения действующего вещества в требуемом количестве в соответствующий растворитель либо индивидуально, либо в случае необходимости в сочетании с указанными выше ингредиентами, с последующей стерилизацией фильтрацией. Как правило, дисперсии получают включением действующего вещества в стерильный наполнитель, который содержит основную дисперсионную среду и требуемые другие вышеперечисленные ингредиенты. Методы получения стерильных порошков, предназначенных для приготовления стерильных инъекруемых растворов, представляют собой вакуумную сушку и сушку вымораживанием (лиофилизация), с помощью которых получают порошок действующего вещества в сочетании с любым другим требуемым ингредиентом из предварительно стерилизованного фильтрацией раствора.

Количество действующего вещества, которое можно объединять с носителем для получения формы в виде однократной дозы, должно варьироваться в зависимости от индивидуума, подлежащего обработке, и конкретного пути введения. Количество действующего вещества, которое можно объединять с носителем для получения формы в виде однократной дозы, как правило, представляет собой количество композиции, которое обладает

терапевтическим действием. Как правило, количество за исключением случая, когда оно составляет сто процентов, представляет собой количество, составляющее от примерно 0,01 до примерно 99% действующего вещества, от 0,1 до примерно 70% или от примерно 1 до примерно 30% действующего вещества в сочетании с фармацевтически приемлемым носителем.

Схему приема лекарственного средства регулируют для получением оптимального требуемого ответа (например, терапевтического ответа). Например, можно применять однократную болюсную инъекцию, можно вводить несколько разделенных доз в течение времени или дозу можно пропорционально понижать или повышать в зависимости от конкретной терапевтической ситуации. Наиболее целесообразно приготавливать композиции для парентерального введения в виде стандартных доз лекарственного средства, что облегчает их применение и однородность доз. Под стандартной дозой лекарственного средства в контексте настоящего описания понимают физически дискретные единицы для применения в виде стандартных доз для индивидуума, подлежащего для лечения; каждая единица содержит предварительно определенное количество действующего вещества, которое согласно расчету должно обладать желаемым терапевтическим действием, в сочетании с требуемыми фармацевтическим носителем. Специфические особенности форм в виде стандартных доз, предлагаемых в изобретении, определяются и непосредственно зависят от индивидуальных характеристик действующего вещества и конкретного терапевтического действия, которое необходимо достигать, и ограничениями, известными в области приготовления препаративных форм такого действующего вещества, связанными с лечением чувствительных индивидуумов.

Для введения антитела дозы составляют от примерно 0,0001 до 100 мг/кг и более конкретно от 0,01 до 5 мг/кг веса хозяина. Например, дозы могут составлять 0,3 мг/кг веса тела, 1 мг/кг веса тела, 3 мг/кг веса тела, 5 мг/кг веса тела или 10 мг/кг веса тела, или находятся в диапазоне от 1 до 10 мг/кг. Пример схемы лечения включает введение один раз в неделю, один раз каждые две недели, один раз каждые три недели, один раз каждые четыре недели, один раз в месяц, один раз каждые 3 месяца или один раз каждые 3-6 месяцев. Схемы приема антитела к IL-13, предлагаемого в изобретении, могут включать введение

1 мг/кг веса тела или 3 мг/кг веса тела путем внутривенного или подкожного применения, при этом антитело вводят с использованием следующих режимов применения: например, каждые 4 недели по 6 доз, затем каждые 3 месяца; 5
каждые три недели; 3 мг/кг веса тела, затем 1 мг/кг веса тела каждые 3 недели.

В некоторых вариантах способа можно вводить два или большее количество моноклональных антител с различными специфичностями связывания, в этом случае доза каждого вводимого антитела находится в 10
указанных диапазонах. Антитело, как правило, вводят многократно. Можно использовать, например, следующие интервалы между каждым введением доз: 15
еженедельно, ежемесячно, каждые три месяца или ежегодно. Интервалы могут также быть нерегулярными в зависимости от определенных в крови пациента уровней антитела к антигену-мишени. В некоторых вариантах способа дозу регулируют с целью достижения концентрации антитела в плазме, составляющей 20
примерно 1-1000 мкг/мл, а в некоторых вариантах способа – концентрации, составляющей примерно 25-300 мкг/мл.

В альтернативном варианте антитело можно вводить в виде формы с замедленным высвобождением, в этом случае требуется меньшая частота введения. Доза и частота введения варьируются в зависимости от времени полужизни антитела в организме пациента. В целом, человеческие антитела 30
обладают наиболее длительным временем полужизни, в порядке снижения этого показателя антитела распределяются следующим образом: гуманизированные антитела, химерные антитела и антитела из организмов кроме человека. Доза и частота введения может варьироваться в зависимости от того, является лечение 35
профилактическим или терапевтическим. При применении в профилактических целях вводят относительно более низкие дозы с более редкими интервалами в течение длительного периода времени. Некоторые пациенты продолжают прием лекарственного средства в течение всей оставшейся жизни. При 40
терапевтическом применении иногда требуется применение относительно высокой дозы с введением через относительно короткие интервалы вплоть до снижения скорости развития заболевания или прекращения его развития или до частичного или полного облегчения симптомов заболевания у пациента. После этого пациента можно переводить на профилактический режим применения. 45
50

Фактические уровни доз действующих веществ в фармацевтических композициях, предлагаемых в настоящем изобретении, могут варьироваться таким образом, чтобы получать количество действующего вещества, эффективное для достижения требуемого терапевтического ответа у конкретного пациента, при использовании конкретной композиции и пути введения, не обладая токсичностью для пациента. Выбранный уровень доз должен зависеть от различных фармакокинетических факторов, включая активность применяемых конкретных композиций, предлагаемых в настоящем изобретении, или сложного эфира, соли или амида, пути введения, времени введения, скорости выделения конкретного применяемого соединения, продолжительности лечения, других лекарственных средств, соединений и/или материалов, применяемых в сочетании с конкретными применяемыми композициями, возраста, пола, веса, состояния, общего состояния здоровья и предыдущей истории болезни подлежащего лечению пациента и аналогичных хорошо известных в области медицины факторов.

«Терапевтически эффективная доза» антитела к IL-13, предлагаемого в изобретении, может приводить к уменьшению серьезности симптомов заболевания, повышению частоты и продолжительности бессимптомных периодов заболевания или к предупреждению ухудшения состояния или нетрудоспособности, связанной с поражением болезнью.

Композицию, предлагаемую в настоящем изобретении, можно вводить с помощью одного или нескольких путей введения с использованием одного или нескольких различных методов, известных в данной области. Как должно быть очевидно специалисту в данной области, путь и/или механизм введения должен варьироваться в зависимости от требуемых результатов. Пути введения антител, предлагаемых в изобретении, представляют собой внутривенный, внутримышечный, внутрикожный, внутрибрюшинный, подкожный, спинальный или другие парентеральные пути введения, например, с помощью инъекции или инфузии. Под «парентеральном введением» в контексте настоящего описания понимают пути введения, отличные от энтерального и местного применения, как правило, путем инъекции, и включают (но не ограничиваясь ими) внутривенную, внутримышечную, внутриартериальную, внутриболочечную, внутрикапсульную, внутриглазничную, внутрисердечную, внутрикожную,

внутрибрюшинную, транстрахеальную, подкожную, подкутикулярную, внутрисуставную, подкапсульную, подпаутинную, интраспинальную, эпидуральную и надчревную инъекцию и инфузию.

В альтернативном варианте антитело, предлагаемое в изобретении, можно вводить непарентальным путем, таким как местный, эпидермальный путь применения или нанесение на слизистую оболочку, например, интраназально, орально, вагинально, ректально, подъязычно или местно.

Действующие вещества можно включать в препаративную форму в сочетании с носителями, которые должны защищать соединение от быстрого высвобождения, например, в случае препаративной формы с контролируемым высвобождением, в том числе, такой как имплантаты, трансдермальные пластыри и микрокапсулированные системы введения. Можно применять биоразлагаемые, биосовместимые полимеры, такие как этиленвинилацетат, полиангидриды, полигликолевая кислота, коллаген, сложные полиорторозефиры и полимолочная кислота. Целый ряд методов получения таких препаративных форм запатентован или известен специалистам в данной области (см., например, Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, J.R. Robinson, изд-во Marcel Dekker, Inc., New York, 1978).

Терапевтические композиции можно вводить с помощью известных в данной области медицинских устройств. Например, в одном из вариантов осуществления изобретения терапевтическую композицию, предлагаемую в изобретении, можно вводить с помощью безыгольного устройства для гиподермических инъекций, например, устройств, описанных в U.S. 5399163; 5383851; 5312335; 5064413; 4941880; 4790824 или 4596556. Примерами хорошо известных имплантатов и модулей, которые можно применять в настоящем изобретении, являются: описанный в U.S. 4487603 пригодный для имплантации насос для микроинфузии дозированных медицинских препаратов с контролируемой скоростью; описанное в U.S. 4486194 терапевтическое устройство для введения медицинских препаратов через кожу; описанный в U.S. 4447233 насос для инфузии медицинских препаратов, предназначенный для введения лекарственных средств с точно установленной скоростью инфузии; описанное в U.S. 4447224 пригодное для имплантации устройство для инфузии с изменяющимся потоком, предназначенное для продолжительного введения

лекарственного средства; описанная в U.S. 4439196 система для осмотического введения лекарственных средств, снабженная несколькими компартментами в виде камер; и описанная в U.S. 4475196 система для осмотического введения лекарственных средств. Указанные патенты включены в настоящее описание в качестве ссылки. Целый ряд других устройств, таких как имплантаты, системы для введения и модули, известны специалистам в данной области.

В конкретных вариантах осуществления изобретения человеческие моноклональные антитела, предлагаемые в изобретении, можно приготавливать в формах, гарантирующих соответствующее распределение *in vivo*. Например, гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) не пропускает многие обладающие высокой гидрофильностью соединения. Для гарантии того, что обладающие терапевтической активностью соединения, предлагаемые в изобретении, пересекут ГЭБ (если это требуется) их можно включать, например, в липосомы. Методы приготовления липосом описаны, например, в U.S. 4522811; 5374548 и 5399331. Липосомы могут содержать один или несколько фрагментов, которые избирательно транспортируются в определенные клетки или органы, что повышает направленное введение лекарственного средства (см., например, V.V. Ranade, J. Cline Pharmacol. 29, 1989, с. 685). Примерами обеспечивающих направленный перенос молекул являются фолат или биотин (см., например, U.S. 5416016 на имя Low с соавторами); маннозиды (Umezawa и др., Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 1988, с. 1038); антитела (P.G. Bloeman и др., FEBS Lett. 357, 1995, с. 140; M. Owais и др., Antimicrob. Agents Chemoth. 39, 1995, с. 180); поверхностно-активный рецептор протеина А (Briscoe и др., Am. J. Physiol. 1233, 1995, с. 134); p120 (Schreier и др., J. Biol. Chem. 269, 1994, с. 9090); (см. также K. Keinanen; M.L. Laukkanen, FEBS Lett. 346, 1994, с. 123; J.J. Killion; I.J. Fidler, Immunomethods 4, 1994, с. 273).

Варианты применения и способы, предлагаемые в изобретении

Антитела (и иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы), предлагаемые в настоящем изобретении, можно применять *in vitro* и *in vivo* в диагностических и терапевтических целях. Например, эти молекулы можно вводить в клетки в культуре, например, *in vitro* или *in vivo*, или индивидууму, например, *in vivo*, для лечения, предупреждения или диагностики различных заболеваний. Подразумевается, что понятие «индивидуум» в контексте

настоящего описания относится к человеку и животным кроме человека. К животным кроме человека относятся все позвоночные животные, например, млекопитающие и животные, не относящиеся к млекопитающим, такие как приматы кроме человека, овцы, собаки, кошки, коровы, лошади, куры, амфибии и рептилии. Способы наиболее предпочтительно применять для лечения больных людей, которые страдают нарушением, ассоциированным с аномальной экспрессией IL-13. Когда антитела к IL-13 вводят в сочетании с другим агентом, то их вводят либо в любом порядке, либо одновременно.

В одном из вариантов осуществления изобретения антитела (и иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы), предлагаемые в изобретении, можно применять для выявления уровней IL-13 или уровней клеток, которые содержат IL-13. Для этой цели можно, например, приводить в контакт образец (такой как образец *in vitro*) и контрольный образец с антителом к IL-13 в условиях, которые обеспечивают образование комплекса между антителом и IL-13. Выявляют и сравнивают в образце и контроле любые комплексы, образовавшиеся между антителом и IL-13. Например, стандартные методы обнаружения, хорошо известные в данной области, такие как ELISA и анализ проточной цитометрии, можно осуществлять с использованием композиций, предлагаемых в изобретении.

Таким образом, одним из объектов изобретения являются также способы выявления присутствия IL-13 (например, человеческого антигена IL-13) в образце или измерения количества IL-13, которое содержится в находящемся в контакте с антителом, предлагаемым в изобретении, или его антигенсвязывающим центром, специфично связывающимся с IL-13, образце и в контрольном образце в условиях, которые позволяют образоваться комплексу между антителом или его областью и IL-13. Затем выявляют образование комплекса, при этом различие в образовании комплекса между образцом по сравнению с контролем свидетельствует о присутствии IL-13 в образце.

Под объем изобретения подпадают также наборы, содержащие композиции (например, антитела, человеческие антитела, иммуноконъюгаты и биспецифические молекулы), предлагаемые в изобретении, и инструкции по применению. В состав набора может входить также по меньшей мере один дополнительный реагент или одно или несколько дополнительных антител,

предлагаемых в изобретении (например, антитело, обладающее дополнительным видом активности, которое связывается с эпитопом на антигене-мишени, отличным от первого антитела). В состав набора, как правило, входит этикетка с указанием по применению компонентов набора. Под понятие этикетка подпадает любой письменный или зарегистрированный материал, входящий в набор или иным образом прилагаемый к набору.

Полностью описанное выше изобретение дополнительно проиллюстрировано ниже с помощью примеров, которые даны с целью иллюстрации изобретения и не направлены на его ограничение, и формулы изобретения. Специалистам в данной области должны быть очевидны или они могут получать с помощью не более чем рутинных экспериментов многочисленные эквиваленты конкретных представленных в настоящем описании процедур. Такие эквиваленты подпадают под объем настоящего изобретения и формулу изобретения. Содержание всех ссылок, включая выданные патенты и опубликованные заявки на патент, которые процитированы в настоящем описании, включены в него в качестве ссылки.

Примеры

Пример 1: Получение человеческих IL-13-специфических антител из библиотек иммунизированных спленоцитов

РНК из селезенки использовали для создания фаговой дисплейной библиотеки произвольно сгруппированных переменных областей H- и L-цепей в фаговом дисплейном векторе Fab, который описан в US 6794132. Фаговую дисплейную библиотеку подвергали пяти циклам селекции с использованием биотинилированного hrIL-13 согласно описанному в патенте протоколу равновесного связывания в жидкой фазе (в фазе раствора). В четырех первых циклах селекции использовали hrIL-13 в концентрации 10^{-8} М, а в последнем цикле селекции применяли hrIL-13 в концентрации 10^{-9} М. При использовании этой библиотеки конечное отношение сигнала к шуму, которое определяли по количеству БОЕ, образовавшихся в присутствии антигена, деленное на количество БОЕ, образовавшихся без антигена, составляло 37, что свидетельствует о том, что более 90% отобранных фагов экспрессировали антитела, которые связывались с hrIL-13. Затем фаговую дисплейную библиотеку субклонировали в плазмидном векторе для экспрессии растворимого

Fab-фрагмента согласно методу, описанному в US 6794132. Субклонирование библиотеки осуществляли в плазмидных векторах в *E. coli*, каждая плазида кодировала моноклональный Fab-фрагмент. Субклон библиотеки высевали и колонии, представляющие собой индивидуальные клоны, отбирали для инокуляции 96-луночных планшетов. После выращивания в течение ночи полученные на планшетах культуры применяли для создания заархивированных банков замороженных клеток для клонов, а также для посева с целью создания точных копий в 96-луночных планшетах, в которых индуцировали экспрессию моноклональных антител. На следующий день эти культуры на 96-луночных планшетах подвергали экстракции детергентом и очищали для выделения антител в микрограммовых количествах. Очищенные антитела обрабатывали для удаления эндотоксинов и подвергали окончательной стерилизации фильтрацией. Осуществляли ELISA-анализы с использованием биотинилированного rhIL-13, которым сенсibilizировали авидиновые планшеты, для идентификации лунок, которые являлись функционально позитивными. Сандвич-анализы, предназначенные для оценки константных областей антител, использовали для определения концентраций антител в различных лунках. Для оценки биологической активности применяли результаты, полученные для 96-луночных планшетов с антителами, и данные анализов. Представляющие интерес клоны в банках замороженных в 96-луночных планшетах клеток затем секвенировали для идентификации клонов, экспрессирующих уникальные антитела. Затем замороженные банки клеток этих уникальных клонов применяли для посева с целью получения культур в небольших количествах (маломасштабное производство) во встряхиваемых колбах и выращивали в течение ночи. Колбы для полупромышленного получения засеивали полученными в течение ночи культурами и затем индуцировали для экспрессии антител. На следующий день культуры в колбах механически гомогенизировали и очищали для получением антител в миллиграммовых количествах. Очищенные Fab-фрагменты обрабатывали для удаления эндотоксинов и подвергали окончательной стерилизации фильтрацией. Функциональную активность этих антител демонстрировали с помощью ELISA с использованием биотинилированного rhIL-13, которым сенсibilizировали авидиновые планшеты. Для определения концентрации антител использовали измерение абсорбции при 280 нм. У

очищенных Fab-фрагментов оценивали способность к связыванию *in vitro* и активность в клеточном анализе.

5 Пример 2: Количественный анализ аффинности к связыванию: определение перспективных Fab-фрагментов (Fab-фрагментов-кандидатов) антител к человеческому IL-13

10 Количественную оценку методом резонанса поверхностных плазмонов взаимодействия Fab-фрагментов антител к IL-13 с несколькими hrIL-13 осуществляли с помощью оптического биосенсора VІАscore 2000. Специфическое связывание IL-13 с соответствующим Fab-фрагментом антитела к IL-13, 15 иммобилизованным на чипе VІАscore, можно осуществлять путем оценки последующего накопления лиганда на рецепторе. Значения скоростей ассоциации (k_{on}) и диссоциации (k_{off}) можно оценивать с использованием 20 микроскопа непосредственно по скоростям накопления массы на чипе и выражать в единицах ответа (RU). Fab-фрагмент антитела к IL-13 иммобилизовали на поверхности чипа через вторичное антитело к человеческой 25 Lκ (фирма Jackson Immunochemicals). Это иммобилизованное антитело ковалентно связывали с использованием набора для аминного сочетания («Amine coupling kit» (фирма VІАscore, каталожный № BR-1000-50), рекомендованного в протоколах производителя. Инъецировали 250 мкл 30 различных концентраций hrIL-13 со скоростью потока 20 мкл /мин и оценивали кинетическую траекторию. Поверхность чипа регенерировали путем двух стадий отмывки кислотной с использованием 100мМ HCl и инъецировали 10 мкл со 35 скоростью потока 20 мкл/мин. Такая обработка приводила к диссоциации комплекса Fab-IL-13 из-за обратимой кислотной денатурации. Не обнаружено существенной потери активности к связыванию, когда антитело повторно 40 инъецировали в последующем цикле. Кинетические траектории оценивали с помощью программного обеспечения фирмы VІАscore, применяя лэнгмюровскую модель ассоциации 1:1.

45 Обобщенные данные об аффинности к человеческому IL-13 представлены в таблице 1.

Таблица 1

Fab	K_D [пМ], человеческий IL-13
01471/G6	100 ± 2

Fab	K _D [пМ], человеческий IL-13
03161/H2	197 ± 12
01951/G12	480 ± 68
01771/E10	343 ± 54

Пример 3: Превращение в IgG-формат

Матрицы для секвенирования ДНК антитела очищали из 3 мл культур с помощью устройства QIAprep miniprep (фирма Qiagen Inc.). Матрицы секвенировали с помощью устройства типа Applied Biosystems 3100 Avant Genetic Analyzer согласно спецификациям производителя. Варибельные области тяжелой и легкой каппа-цепи отобранных клонов амплифицировали по отдельности с использованием матриц для секвенирования с помощью ПЦР, очищали электрофорезом в агарозном геле и вырезали из геля и очищали. Плазмиды, кодирующие V_H и V_L, клонировали в кассетах экспрессии для человеческой легкой каппа-цепи и человеческой тяжелой цепи IgG₁. Родительскую линию клеток Sp2/0 трансфектировали двумя векторами, один вектор для легкой цепи и один для тяжелой цепи. Трансфектированные клетки отбирали и амплифицировали в присутствии G418 и метотрексата соответственно, что приводило к получению устойчивых амплифицированных клеточных пулов, продуцирующих антитела, титры которых составляли 5-30 мг/л. Затем применяли клонирование методом серийных разведений, приводящее к выделению 127 жизнеспособных клонов из шести 96-луночных планшетов. Образовавшиеся линии клеток затем тестировали в отношении продуктивности в шейкере в формате с периодической загрузкой. Оценка стабильности подтвердила стабильную интеграцию экспрессионных конструкций, и, кроме того, в течение 90-дневного периода осуществляли также оценку увеличения экспрессии продукта. Анализ методом Нозерн-блоттинга выявил индивидуальные полноразмерные РНК с одинаковой интенсивностью полос, что свидетельствует об аналогичных уровнях экспрессии как тяжелой, так и легкой цепи.

Пример 4: Характеристики полноразмерных антител к IL-13 с помощью клеточного анализа *in vitro*

IL-13 является сильным индуктором высвобождения эотоксина из фибробластов легкого человека. Способность антител нейтрализовать биологическую активность IL-13 оценивали с помощью анализа индуцированного IL-13 высвобождения эотоксина с использованием фибробластов легкого человека. В целом, метод состоял в следующем: клетки (2×10^4 клеток на лунку в объеме 100 мкл) высевали в каждую лунку 96-луночного планшета для культуры тканей. Клетки стимулировали концентрацией IL-13, которая обеспечивала 80%-ное относительно максимального высвобождение эотаксина, что определяли заранее для каждой партии клеток с использованием стандартной кривой, построенной для концентрации IL-13 от 0 до 100 нг/мл. В клетки вносили различные концентрации антител. Клетки инкубировали в течение 24 ч при 37°C, 5% CO₂ и культуральные среды собирали и хранили при -20°C до применения. Уровни эотаксина в средах измеряли с помощью специфического ELISA (фирма R&D systems), чувствительность метода составляла 15-1000 пг/мл.

Таким образом получали значения EC₅₀ Fab-фрагментов антитела к IL-13, которые представлены ниже в таблице 2.

Таблица 2

Антитело	EC ₅₀ [нМ], человеческий IL-13
01471/G6	1,23 ± 0,4
03161/H2	0,95 ± 0,2
01951/G12	0,33 ± 0,1
01771/E10	1,71 ± 0,5

Пример 5: Анализ последовательностей антител к IL-13

Определяли нуклеотидные последовательности переменных областей тяжелых и легких цепей (V_H и V_L) всех антител. Аминокислотные последовательности гипервариабельных участков (CDR) представлены ниже в таблице 3 и 4. CDR, которые определяли по системе Кэбота (E. Kabat и др, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5-ое изд., изд-во Public Health Service, National Institute of Health, Bethesda, MD), представлены в таблице 3а и 4а.

Таблица 3

Антитело	HCDR1	SEQ ID No. HCDR1	HCDR2	SEQ ID No. HCDR2	HCDR3	SEQ ID No. HCDR3
01471/G6	GFTFSNYG	1	IWYDGSN	3	VKGSGDIP	4
03161/H2	GFTFSNYG	1	IWYDGSN	3	VKGSGDIP	4
01951/G12	GFTFSSYG	2	IWYDGSN	3	ARLWFGDLD	5
01771/E10	GFTFSSYG	2	IWYDGSN	3	ARLWFGDLD	5

Таблица 3а

Антитело	HCDR1	SEQ ID No. HCDR1	HCDR2	SEQ ID No. HCDR2	HCDR3	SEQ ID No. HCDR3
01471/G6	NYGMH	6	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	GSGDIPFDY	9
03161/H2	NYGMH	6	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	GSGDIPFDY	9
01951/G12	SYGMH	7	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	LWFGDLDAFDI	10
01771/E10	SYGMH	7	IIWYDGSNKYYADSVKG	8	LWFGDLDAFDI	10

Таблица 4

Антитело	LCDR1	SEQ ID No. LCDR1	LCDR2	SEQ ID No. LCDR2	LCDR3	SEQ ID No. LCDR3
01471/G6	QSVSSY	11	DA	12	HQRSHWPPI	13
03161/H2	QSVSSY	11	DA	12	HQRSHWPPI	13
01951/G12	QSVSSY	11	DA	12	QQRSSWPPV	14
01771/E10	QSVSSY	11	DA	12	HQRSSWPPI	15

Таблица 4а

Антитело	LCDR1	SEQ ID No. LCDR1	LCDR2	SEQ ID No. LCDR2	LCDR3	SEQ ID No. LCDR3
01471/G6	RASQSVSSYLA	16	DASNRAT	19	HQRSHWPPIFT	20
03161/H2	RASQSVSSYLA	16	DASNRAT	19	HQRSHWPPIFT	20
01951/G12	RAGQSVSSYLV	17	DASNRAT	19	QQRSSWPPVYT	21
01771/E10	RASQSVSSYLA	18	DASNRAT	19	HQRSSWPPIFT	22

Ниже приведены последовательности антител, представленных в предыдущих таблицах, включая их каркасные участки. Ниже приведены также константные области легкой и тяжелой цепи полноразмерного антитела типа IgG1, включая например, переменные области антитела 01951/G12 (выделены жирным шрифтом).

Последовательность антитела 01471/G6

(I) Варибельная область HC

Аминокислотная последовательность вариабельной области HC 01471/G6
представлена в SEQ ID NO: 23, и она кодируется нуклеотидной
последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 24

5

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L

gaagtgcagctgggtggagtctgggggaggcgtgggtccagcctgggaggctccctgagactc 60

10

S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A

tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtaactatggcatgcactgggtccgccaggct 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y

15

ccaggcaaggggctggagtgggtggcaattatgggtatgatggaagtaataaatactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y

gcagactccgtgaagggccgattcacctctccagagacaattccaagaacacgctgtat 240

20

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V K G S

ctgcaaatgaacagctctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaaggatct 300

G D I P F D Y W G Q G T L V T (SEQ ID NO: 23)

ggggatattccctttgactactggggccagggaaccctggtcacc 345 (SEQ ID NO: 24)

25

(II) Вариабельная область LC

Аминокислотная последовательность вариабельной области LC 01471/G6
представлена в SEQ ID NO:25, и она кодируется нуклеотидной
последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 26

30

E I V L T Q S P A T L S S S P G E R A T

gaaattgtgtgacgcagctctccagccaccctgtctctcaggggaaagagccacc 60

35

L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P

ctctctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctgggtaccaacagaaacct 120

40

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A

ggccaggctcccaggctctcatctatgatgcaccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P

aggttcagtggcagtggtctgggacagactcactctccatcagcagcctagagcct 240

45

E D F A V Y Y C H Q R S H W P P I F T F

gaagattttgagctctattactgtcatcagcgtagccactggcctccatattcactttc 300

50

G P G T (SEQ ID NO:25)

ggccctgggacc 312 (SEQ ID NO:26)

Антитело 03161/H2

(I) Варибельная область HC

5 Аминокислотная последовательность варибельной области HC 03161/H2
представлена в SEQ ID NO: 27, и она кодируется нуклеотидной
последовательностью, представленной в SEQ ID NO: SEQ ID NO: 28

10 E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcagctggtggagtctgggggaggcgtggtccagcctgggaggctccctgagactc 60

15 S C A A S G F T F S N Y G M H W V R Q A
tcctgtgcagcgtctgattcaccttcagtaactatggcatgcaactgggtccgccagget 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtgggtggcaattatggtatgatggaagtaataaatactat 180

20 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
gcagactccgtgaagggccgattcacctctccagagacaattccaagaacacgctgtat 240

25 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C V K G S
ctgcaaatgaacagtctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgtgaaaggatct 300

G D I P F D Y W G Q G T L V T (SEQ ID NO: 27)
gggatattccctttgactactggggccagggaaccctggtcacc 345> (SEQ ID NO: 28)

(II) Варибельная область LC

30 Аминокислотная последовательность варибельной области LC 03161/H2
представлена в SEQ ID NO: 29, и она кодируется нуклеотидной
последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 30

35 E I V L T Q S P A T L S S S P G E R A T
gaaattgtgtgacgcagctcccagccaccctgtcttcgtctccaggggaaagagccacc 60

40 L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
ctctcctgcagggccagtcagagtgttagcagctactagcctggtaccaacagaaacct 120

45 G Q A P R L L I Y D A S N R A T G T P A
ggccaggctcccaggctcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcaccaccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtggcagtggtctgggacagactcactctcaccatcagcagcctagagcct 240

50 E D F A V Y Y C H Q R S H W P P I F T F
gaagatttgcagctctattactgtcatcagcgtagccactggcctcccatattcacttcc 300

G P G T (SEQ ID NO:29)
ggccctgggacc 312 (SEQ ID NO: 30)

Последовательность антитела 01951/G12

5

(I) Варибельная область HC

Аминокислотная последовательность HC 01951/G12 представлена в SEQ ID NO: 31, и она кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 32

10

E V Q L V E S G G G V V Q P G R S L R L
gaagtgcagctgggtggagctctgggggaggcggtggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

15

S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A
tcctgtgcagcgtctggattcaccttcagtagctatggcatgactgggtccgccagct 120

20

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
ccaggcaaggggctggagtggtggcaattatggtatgatggaagtaataaataactat 180

A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
gcgactccgtgaagggccgattcaccatctccagagacaattccaagaacacgctgtat 240

25

L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L W
ctgcaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgcaggctatgg 300

F G D L D A F D I W G Q G T M V T (SEQ ID NO: 31)
ttcggggacttagatgcttttgatctctggggccaagggacaatggtcacc 351 (SEQ ID NO: 32)

30

(II) Варибельная область LC

Аминокислотная последовательность варибельной области LC 01951/G12 представлена в SEQ ID NO:33, и она кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:34

35

E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A I
gaaattgtgtgacgcagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccatc 60

40

L S C R A G Q S V S S Y L V W Y Q Q K P
ctctcctgcagggccggtcagagtgttagcagttacttagtctggtaccaacagaaacct 120

45

G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
ggccaggtcccaggtcctcatctatgatgcatccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P
aggttcagtggtcagtggtctgggacagacttcactctcaccatcagcagccttagagcct 240

50

EDFAVYYCQQRSSWPPVYTF
 gaagattttgcagtttattactgtcagcagcgcagcagctggcctccggtgtacactttt 300

5 G Q G T (SEQ ID NO:33)
 ggccaggggacc 312 (SEQ ID NO:34)

Последовательность антитела 01771/E10

10 (I) Вариабельная область HC

Аминокислотная последовательность вариабельной области HC 01771/E10

представлена в SEQ ID NO: 35, и она кодируется нуклеотидной
 последовательностью, представленной в SEQ ID NO: 36

15 Q V Q L V Q S G G G V V Q P G R S L R L
 caggtgcagctgggtgcagctctgggggaggcgtgggtccagcctgggaggtccctgagactc 60

20 S C A A S G F T F S S Y G M H W V R Q A
 tcctgtgcggcgtctggattcaccttcagtagctatggcatgcactgggtccgccaggct 120

P G K G L E W V A I I W Y D G S N K Y Y
 ccaggcaagggcctggagtggtggcaattatggtatggaagtaataaatactat 180

25 A D S V K G R F T I S R D N S K N T L Y
 gggactccgtgaagggccgattcacctctccagagacaattccaagaacacgctatat 240

30 L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R L W
 ctacaaatgaacagcctgagagccgaggacacggctgtgtattactgtgagaggctatgg 300

F G D L D A F D I W G Q G T M V T (SEQ ID NO:35)
 ttcggggacttagatgctttgatactggggccaagggacaatggtcacc 351 (SEQ ID NO:36)

35 (II) Вариабельная область LC

Аминокислотная последовательность вариабельной области LC 01771/E10

представлена в SEQ ID NO:37 и она кодируется нуклеотидной
 последовательностью, представленной в SEQ ID NO:38

40 E I V L T Q S P A T L S L S P G E R A T
 gaaattgtgtgacgcagctccagccaccctgtctttgtctccaggggaaagagccacc 60

45 L S C R A S Q S V S S Y L A W Y Q Q K P
 ctctctgcagggccagtcagagtgtagcagctacttagcctggtaccaacagaaacct 120

50 G Q A P R L L I Y D A S N R A T G I P A
 ggccaggtcccaggtcctcatctatgatgcaccaacagggccactggcatcccagcc 180

R F S G S G S G T D F T L T I S S L E P

aggttcagtggcagtggtctgggacagacttcactctcacatcagcagcctagagcct 240

E D F A V Y Y C H Q R S S W P P I F T F

gaagattttgcggtttattactgtcatcagcgtagcagctggccccgatattcactttc 300

5

G P G T (SEQ ID NO :37)

ggccctgggacc 312 (SEQ ID NO :38)

10

15

20

25

30

35

40

45

50

Последовательность легкой цепи полноразмерного антитела типа IgG1, включающая вариабельную область антитела 01951/G12 (выделена жирным шрифтом)

Аминокислотная последовательность LC представлена в SEQ ID NO:39 и она кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID NO:40

M S V L T Q V L A L L L L W L T G
 1 ATGAGTGTGC TCACTCAGGT CCTGGCGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGG

 T R C E I V L T Q S P A T L S L S
 51 TACGCGTTGT GAAATTGTGT TGACGCAGTC TCCAGCCACC CTGTCTTTGT

 P G E R A I L S C R A G Q S V S
 101 CTCCAGGGGA AAGAGCCATC CTCTCCTGCA GGGCCGGTCA GAGTGTTAGC

 S Y L V W Y Q Q K P G Q A P R L L
 151 AGTТАCTTAG TCTGGTACCA ACAGAAACCT GGCCAGGCTC CCAGGCTCCT

 I Y D A S N R A T G I P A R F S G
 201 CATCTATGAT GCATCCAACA GGGCCACTGG CATCCCAGCC AGGTTСAGTG

 S G S G T D F T L T I S S L E P
 251 GCAGTGGGTC TGGGACAGAC TTCACTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGCCT

 E D F A V Y Y C Q Q R S S W P P V
 301 GAAGATTTTG CAGTTTATTA CTGTCAGCAG CGCAGCAGCT GGCCTCCGGT

 Y T F G Q G T K L E I K R T V A A
 351 GTACACTTTT GGCCAGGGGA CCAAGCTTGA AATCAAACGA ACTGTGGGCTG

 P S V F I F P P S D E Q L K S G
 401 CACCATCTGT CTTСATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA

 T A S V V C L L N N F Y P R E A K
 451 ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA

 V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S
 501 AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCСAGGAGA

 V T E Q D S K D S T Y S L S S T
 551 GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC

 L T L S K A D Y E K H K V Y A C E
 601 CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA

 V T H Q G L S S P V T K S F N R G
 651 AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG

Е С* (SEQ ID NO:39)
701 GAGAGTGTТА G (SEQ ID NO:40)

5 Последовательность тяжелой цепи полноразмерного антитела типа IgG1,
включающая вариабельную область антитела 1951/G12 (выделена жирным
шрифтом).

10 Аминокислотная последовательность HC представлена в SEQ ID NO:41, и
она кодируется нуклеотидной последовательностью, представленной в SEQ ID
NO:42

15 M A W V W T L P F L M A A A Q S V
1 ATGGCTTGGG TGTGGACCTT GCCATTCTTG ATGGCAGCTG CCCAAAGTGT

Q A E V Q L V E S G G G V V Q P G
51 CCAGGCAGAA GTGCAGCTGG TGGAGTCTGG GGGAGGCGTG GTCCAGCCTG

20 R S L R L S C A A S G F T F S S
101 GGAGGTCCCT GAGACTCTCC TGTGCAGCGT CTGGATTCAC CTTCAGTAGC

Y G M H W V R Q A P G K G L E W V
151 TATGGCATGC ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGCAAGGGGC TGGAGTGGGT

25 A I I W Y D G S N K Y Y A D S V K
201 GGCAATTATA TGGTATGATG GAAGTAATAA ATACTATGCG GACTCCGTGA

G R F T I S R D N S K N T L Y L
251 AGGGCCGATT CACCATCTCC AGAGACAATT CCAAGAACAC GCTGTATCTG

30 Q M N S L R A E D T A V Y Y C A R
301 CAAATGAACA GCCTGAGAGC CGAGGACACG GCTGTGTATT ACTGTGCGAG

L W F G D L D A F D I W G Q G T M
351 GCTATGGTTC GGGGACTTAG ATGCTTTTGA TATCTGGGGC CAAGGGACAA

35 V T V S S A S T K G P S V F P L
401 TGGTCACCGT CTCCTCAGCC TCCACCAAGG GCCCATCGGT CTCCCCCTG

A P S S K S T S G G T A A L G C L
451 GCACCCTCCT CCAAGAGCAC CTCTGGGGGC ACAGCGGCC TGGGCTGCCT

40 V K D Y F P E P V T V S W N S G A
501 GGTCAAGGAC TACTTCCCG AACCAGGTGAC GGTGTCGTGG AACTCAGGCG

L T S G V H T F P A V L Q S S G
551 CCCTGACCAG CGGCGTGCAC ACCTTCCCG CTGTCCTACA GTCCTCAGGA

45 L Y S L S S V V T V P S S S L G T
601 CTCTACTCCC TCAGCAGCGT CGTGACCGTG CCCTCCAGCA GCTTGGGCAC

Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
651 CCAGACCTAC ATCTGCAACG TGAATCACAA GCCCAGCAAC ACCAAGGTGG

50

K R V E P K S C D K T H T C P P
701 ACAAGAGAGT TGAGCCCAAA TCTTGTGACA AAACCTCACAC ATGCCACCG

5 C P A P E L L G G P S V F L F P P
751 TGCCAGCAC CTGAACTCCT GGGGGGACCG TCAGTCTTCC TCTTCCCCC

K P K D T L M I S R T P E V T C V
801 AAAACCCAAG GACACCCTCA TGATCTCCCG GACCCCTGAG GTCACATGCG

10 V V D V S H E D P E V K F N W Y
851 TGGTGGTGGG CGTGAGCCAC GAAGACCCTG AGGTCAAGTT CAACTGGTAC

V D G V E V H N A K T K P R E E Q
901 GTGGACGGCG TGGAGGTGCA TAATGCCAAG ACAAAGCCGC GGGAGGAGCA

15 Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D
951 GTACAACAGC ACGTACCCTG TGGTCAGCGT CCTCACCGTC CTGCACCAGG

W L N G K E Y K C K V S N K A L
1001 ACTGGCTGAA TGGCAAGGAG TACAAGTGCA AGGTCTCCAA CAAAGCCCTC

20 P A P I E K T I S K A K G Q P R E
1051 CCAGCCCCCA TCGAGAAAAC CATCTCCAAA GCCAAAGGGC AGCCCCGAGA

P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q
1101 ACCACAGGTG TACACCCTGC CCCATCCCG GGAGGAGATG ACCAAGAACC

25 V S L T C L V K G F Y P S D I A
1151 AGGTCAGCCT GACCTGCCTG GTCAAAGGCT TCTATCCAG CGACATCGCC

30 V E W E S N G Q P E N N Y K T T P
1201 GTGGAGTGGG AGAGCAATGG GCAGCCGGAG ACAAAC TACA AGACCACGGC

P V L D S D G S F F L Y S K L T V
1251 TCCCGTGCTG GACTCCGACG GCTCCTTCTT CCTCTATAGC AAGCTCACCG

35 D K S R W Q Q G N V F S C S V M
1301 TGGACAAGAG CAGGTGGCAG CAGGGGAACG TCTTCTCATG CTCCGTGATG

H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
1351 CATGAGGCTC TGCACAACCA CTACACGCAG AAGAGCCTCT CCCTGTCCCC

40 G K * (SEQ ID NO:41)
1401 GGGTAAATGA (SEQ ID NO:42)

Формула изобретения

45 1. Выделенный антигенсвязывающий участок антитела к IL-13 или его функционально активный фрагмент, содержащий H-CDR1-, H-CDR2- и H-CDR3- и L-CDR1-, L-CDR2- и L-CDR3-, участки которого имеют аминокислотные последовательности, выбранные вместе из (I) - (III):

(I) SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 и SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20;

(II) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21; и

(III) SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10 и SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19,

SEQ ID NO: 22.

2. Выделенное человеческое или гуманизированное антитело к IL13, содержащее выделенный антигенсвязывающий участок по п.1.

5 3. Антитело по п.2, которое содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, включающий домен тяжелой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из любой SEQ ID NO: 23, 27, 31 и 35.

10 4. Антитело по п.3, которое содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, включающий домен легкой цепи, который имеет аминокислотную последовательность, выбранную из любой SEQ ID NO: 25, 29, 33 и 37.

15 5. Антитело к IL13 по п.3, которое содержит по меньшей мере один антигенсвязывающий центр, включающий домен легкой цепи, имеющий аминокислотную последовательность, выбранную из любой SEQ ID NO: 25, 29, 33 и 37.

20 6. Антитело к IL13 по п.4, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 23, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 25.

7. Антитело к IL13 по п.4, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 27, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 29.

25 8. Антитело к IL13 по п.4, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 31, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 33.

30 9. Антитело к IL13 по п.4, содержащее вариабельную область тяжелой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 35, и вариабельную область легкой цепи, которая имеет последовательность SEQ ID NO: 37.

10. Антитело к IL13 по одному из пп.2-9, представляющее IgG1 или IgG4.

35 11. Фармацевтическая композиция, предназначенная для лечения нарушения или состояния, которое ассоциировано с присутствием клеточного рецептора IL-13-мишени, такого как астма, содержащая антитело или его функционально активный фрагмент по одному из пп.2-10 и фармацевтически приемлемый носитель или эксципиент.

40

45

50