



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116194481 A

(43) 申请公布日 2023. 05. 30

(21) 申请号 202180058680.0	(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283
(22) 申请日 2021.07.30	专利代理师 水文钰 徐婕超
(30) 优先权数据 2011993.9 2020.07.31 GB	(51) Int.Cl. C07K 16/28 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2023.01.29	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/EP2021/071389 2021.07.30	
(87) PCT国际申请的公布数据 W02022/023522 EN 2022.02.03	
(71) 申请人 ADC治疗有限公司 地址 瑞士埃帕林格斯	
(72) 发明人 帕特丘斯·亨德里克斯·科内利 斯·瓦·贝克尔 弗朗索瓦·贝尔泰利	权利要求书1页 说明书43页 序列表10页 附图2页

(54) 发明名称

抗-IL13R α 2抗体

(57) 摘要

本公开涉及特异性地结合至白介素-13受体亚基 α -2 (IL13R α 2) 蛋白的抗体,以及相关用途和产生方法。

1. 一种结合至白介素-13受体亚基 α -2 (IL13R α 2) 的抗体, 其中所述抗体包含有包含SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的重链可变区。

2. 根据权利要求1所述的抗体, 其中所述抗体还包含有包含SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的轻链可变区。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的抗体, 其中所述抗体以不大于 5×10^{-10} M、诸如不大于 2.5×10^{-10} M或不大于 1.5×10^{-10} M的亲和力(K_D)结合IL13R α 2。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体, 其中所述抗体竞争性地抑制包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体与IL13R α 2的结合。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体, 其中所述抗体以比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体更高的亲和力(K_D)结合IL13R α 2。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体, 其中所述抗体在人类受试者中具有比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体的免疫原性低的免疫原性。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体, 其中所述抗体具有与包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体相比改善的稳定性特性。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的抗体, 其中所述抗体包含同种型IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的恒定区, 或突变IgG恒定区, 和任选的同种型 κ 或 λ 的轻链恒定区。

9. 如权利要求8所述的抗体, 其中所述恒定区是人的。

10. 根据权利要求1-7中任一项所述的抗体, 其中所述抗体是Fab、Fab'、F(ab')₂或scFv。

11. 一种抗体药物缀合物, 其包含缀合至药物部分的根据任何前述权利要求所述的抗体, 任选地其中所述药物部分是细胞毒性药物部分。

12. 如权利要求11所述的抗体药物缀合物, 其中所述药物部分包括吡咯并苯二氮杂草二聚体。

13. 一种药物组合物, 其包含根据任何前述权利要求所述的抗体或抗体药物缀合物和药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。

14. 根据任何前述权利要求所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物, 其用于治疗方法中, 任选地其中所述治疗方法是治疗癌症的方法。

15. 根据权利要求1-13中任一项所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物在制造用于治疗方法的药物中的用途, 任选地其中所述治疗方法是治疗癌症的方法。

16. 一种治疗增殖性疾病的方法, 其包括向有需要的受试者施用根据权利要求1-13中任一项所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物, 任选地其中所述增殖性疾病是癌症。

17. 一种多核苷酸, 其编码根据权利要求1-10中任一项所述的抗体。

18. 一种包含权利要求17所述的多核苷酸的载体, 任选地其中所述载体是表达载体。

19. 一种包含根据权利要求18所述的载体的宿主细胞, 任选地其中所述宿主细胞是原核的、真核的或哺乳动物的。

抗-IL13R α 2抗体

[0001] 较早申请

[0002] 本申请要求保护2020年7月31日提交的英国申请号GB 2011993.9的优先权。

技术领域

[0003] 本公开涉及特异性结合至白介素-13受体亚基 α -2 (IL13R α 2) 蛋白的抗体。还公开了用于产生和使用抗-IL13R α 2抗体的方法。

背景技术

[0004] IL13R α 2

[0005] 白介素-13受体亚基 α -2 (IL-13R α 2; 也称为分化簇213A2, CD213A2) 是一种与IL-13R α 1密切相关的膜结合蛋白, IL-13R α 1是与IL-4R α 一起的白介素-13I型细胞因子受体复合物的亚基。

[0006] IL13R α 1和IL-4R α 一起形成二聚体; IL-13结合至IL-13R α 1链而IL-4R α 稳定了这种相互作用。这种IL-13受体还可以激发IL-4信号传导。在这两种情况下, 这都是经由激活Janus激酶 (JAK) /信号传导子和转录激活子 (Signal Transducer and Activator of Transcription, STAT) 通路从而导致STAT6磷酸化而发生的。经磷酸化的STAT6二聚化并用作激活许多基因的转录因子, 例如嗜酸性粒细胞趋化因子。(Murata T, 等人, Int J Mol Med. 1998年3月; 1(3): 551-7; Chomarat P, 等人, Int Rev Immunol. 1998; 17(1-4): 1-52)。

[0007] IL-13R α 2由IL13RA2基因编码。IL-13R α 2以非常高的亲和力结合IL-13 (并因此可以与它螯合(sequester)) 但不允许IL-4结合。它用作IL-13和IL-4的负调控剂, 但这方面的机制仍未确定(Seyfizadeh N等人, Acta Microbiol Immunol Hung. 2015年12月; 62(4): 341-78)。

[0008] 已发现IL-13R α 2在多种癌症中过表达, 该癌症包括胰腺癌(Fujisawa等人, Cancer Res. 2009年11月15日; 69(22): 8678-85)、卵巢癌(Kioi等人, Cancer. 2006年9月15日; 107(6): 1407-18)、黑色素瘤(Okamoto等人, Sci Rep. 2019年2月4日; 9(1): 1281) 和恶性胶质瘤(Joshi等人, Cancer Res. 2000年3月1日; 60(5): 1168-72)。

[0009] 抗-IL13R α 2抗体

[0010] Balyasnikova等人(J Biol Chem. 2012年8月31日; 287(36): 30215-30227) 中描述了通过用人重组IL13R α 2融合蛋白免疫雌性BALB/c小鼠来生成鼠抗-IL13R α 2单克隆抗体。在该出版物中生成和表征的鼠抗-IL13R α 2抗体中有称为“克隆47”的抗体。

[0011] 抗体-药物缀合物

[0012] 抗体疗法已被确定可用于患有癌症、免疫和血管生成病症的患者的靶向治疗(Carter, Nat Rev Immunol. 2006年5月; 6(5): 343-57)。抗体-药物缀合物(ADC), 即免疫缀合物, 在癌症治疗中被用于局部递送细胞毒性剂或细胞抑制剂, 即用于杀死或抑制肿瘤细胞的药物。这些提供了药物部分向肿瘤的靶向递送以及在其中进行的细胞内累积, 而这些未缀合的药剂的全身施用可导致对正常细胞产生不可接受的水平的毒性(Xie等人(2006)

Expert.Opin.Biol.Ther.6(3):281-291;Kovtun等人(2006)Cancer Res.66(6):3214-3121;Law等人(2006)Cancer Res.66(4):2328-2337;Wu等人(2005)Nature Biotech.23(9):1137-1145;Lambert J.(2005)Current Opin.in Pharmacol.5:543-549;Hamann P.(2005)Expert Opin.Ther.Patents 15(9):1087-1103;Payne,G.(2003)Cancer Cell 3:207-212;Trail等人(2003)Cancer Immunol.Immunother.52:328-337;Syrigos and Epenetos(1999)Anticancer Research 19:605-614)。

[0013] 从而寻求在毒性最小的情况下的最大功效。设计和改进ADC的努力集中在单克隆抗体的选择性以及药物作用机制、药物连接、药物/抗体比(负载)和药物释放特性(Junutula,等人,2008b Nature Biotech.,26(8):925-932;Dornan等人(2009)Blood 114(13):2721-2729;US 7521541;US 7723485;W02009/052249;McDonagh(2006)Protein Eng.Design&Sel.19(7):299-307;Doronina等人(2006)Bioconj.Chem.17:114-124;Erickson等人(2006)Cancer Res.66(8):1-8;Sanderson等人(2005)Clin.Cancer Res.11:843-852;Jeffrey等人(2005)J.Med.Chem.48:1344-1358;Hamblett等人(2004)Clin.Cancer Res.10:7063-7070)。药物部分可通过包括微管蛋白结合、DNA结合、蛋白酶体和/或拓扑异构酶抑制的机制赋予其细胞毒性和细胞抑制作用。当缀合至较大抗体或蛋白质受体配体时,一些细胞毒性药物往往无活性或活性较低。

[0014] ***

[0015] 鉴于IL-13R α 2在人类癌症中的作用,需要鉴定具有特异性结合IL-13R α 2的有利特性的抗体。本公开涉及此类抗体。

发明内容

[0016] 本公开提供了源自Balyasnikova等人(J Biol Chem.2012年8月31日;287(36):30215-30227)中描述的鼠抗-IL13R α 2抗体“克隆47”的人源化的人源化抗-IL13R α 2抗体。

[0017] 从鼠“克隆47”开始,本作者已经制得了许多人源化重链和轻链序列,以期制取在人类个体中具有比包含鼠抗体的重链和轻链序列的嵌合抗体更低的免疫原性的抗体。

[0018] 令人惊讶的是,发现除了较低的免疫原性外,这些人源化变体还可具有与鼠克隆47和/或其他人源化抗-IL13R α 2抗体相比的其他有利特性,例如改善的对人IL13R α 2的亲合力,如本文别处所概述。

[0019] 因此,在第一方面,本公开提供了结合至白介素-13受体亚基 α -2(IL13R α 2)的人源化抗体,其中该抗体包含有包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的重链可变区:SEQ ID NO:3;SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;和SEQ ID NO:8。

[0020] 在一些实施方案中,人源化抗体还包含有包含选自由以下组成的组的氨基酸序列的轻链可变区:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11。在一些实施方案中,该抗体还包含源自一种或多种人抗体的恒定区。

[0021] 在一些实施方案中,该抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和:

[0022] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0023] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0024] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或

- [0025] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0026] 在一些实施方案中,该抗体包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和:
- [0027] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0028] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0029] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或
- [0030] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0031] 在一些实施方案中,该抗体包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和:
- [0032] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0033] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0034] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或
- [0035] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0036] 在一些实施方案中,该抗体包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和:
- [0037] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0038] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0039] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或
- [0040] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0041] 在一些实施方案中,该抗体包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和:
- [0042] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0043] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0044] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或
- [0045] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。
- [0046] 在一些优选的实施方案中,该抗体包含:
- [0047] (i)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0048] (ii)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0049] (iii)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0050] (iv)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变;
- [0051] (v)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;
- [0052] (vi)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;或
- [0053] (vii)具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基

酸序列的轻链可变区。

[0054] 在一些更优选的实施方案中,该抗体包含:

[0055] (i)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0056] (ii)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;和

[0057] (iii)具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0058] 在一些特别优选的实施方案中,该抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

[0059] 在一些实施方案中,该人源化抗体以不大于 5×10^{-10} M、诸如不大于 2.5×10^{-10} M或不大于 1.5×10^{-10} M的亲和力(K_D)结合IL13R α 2。在一些实施方案中,该人源化抗体以比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体高的亲和力(K_D)结合IL13R α 2。在一些实施方案中,亲和力(K_D)是如通过如实施例中所所述的方案、例如通过Biacore分析测定。

[0060] 在一些实施方案中,该人源化抗体竞争性地抑制包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体与IL13R α 2的结合。

[0061] 在一些实施方案中,IL13R α 2是人类IL13R α 2。

[0062] 本文公开的抗体重链可变区和/或轻链可变区的序列可通过例如插入、取代和/或缺失被修饰至该人源化抗体维持结合至IL13R α 2的能力的程度。技术人员可以通过执行本文所述或本领域已知的功能测定来查明该活性的维持。

[0063] 因此,在一些实施方案中,重链可变区包含不大于20个插入、取代和/或缺失,诸如不大于15个、不大于10个、不大于9个、不大于8个、不大于7个、不大于6个、不大于5个、不大于4个、不大于3个、不大于2个或不大于1个插入、取代和/或缺失。在一些实施方案中,轻链可变区包含不大于20个插入、取代和/或缺失,诸如不大于15、不大于10、不大于9、不大于8、不大于7、不大于6、不大于5、不大于4、不大于3、不大于2或不大于1个插入、取代和/或缺失。

[0064] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体包括包含具有与本文所述的序列同一的氨基酸序列的VH和VL结构域的抗体。

[0065] 在第二个方面,本公开提供了包含根据本公开的第一方面的人源化抗体的抗体药物缀合物。本公开的缀合物包括与药物部分缀合,即通过接头共价附接的抗体。

[0066] 在第三方面,本公开提供了药物组合物,其包含根据第一方面的抗体或根据第二方面的抗体药物缀合物,以及药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。

[0067] 本公开还提供了用于治疗方法的此类抗体、缀合物和药物组合物,以及此抗体、缀合物和药物组合物在制造用于治疗方法的药物中的用途。

[0068] 本公开还提供了编码本公开的抗体的多核苷酸、包含此类多核苷酸的载体,和包含此类载体的宿主细胞,以及产生本公开的抗体的方法,该方法包括在适用于本公开的抗体的表达的条件下培养此类宿主细胞。

附图说明

[0069] 图1

[0070] 鼠“克隆47”和“HuCL47”重 (VH) 链和轻 (VK) 链可变结构域的序列比较。CDR加有下划线。

[0071] 图2

[0072] 结合至NCI-H1299细胞的鼠克隆47、人源化变体HuCL47和同种型对照B12抗体的比较。

[0073] 图3

[0074] 鼠克隆47、人源化变体HuCL47和同种型对照B12抗体的ELISA结合比较。

具体实施方式

[0075] 现在将参考附图论述本公开的方面和实施方案。进一步的方面和实施方案对于本领域技术人员来说将显而易见。本文中提及的所有文件均以引用的方式并入本文。

[0076] 人源化抗体

[0077] 本公开提供了人源化抗-IL13R α 2抗体。

[0078] “克隆47”是Balyasnikova等人 (J Biol Chem. 2012年8月31日; 287 (36) : 30215-30227) 中描述的鼠抗-IL13R α 2抗体。从鼠克隆47的重链和轻链序列 (分别是SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2) 开始, 本作者已经制得了许多人源化重链和轻链序列, 以期制取在人类个体中具有比包含鼠抗体的重链和轻链序列的嵌合抗体更低的免疫原性的抗体。

[0079] 令人惊讶的是, 发现如此产生的某些人源化变体表现出与嵌合克隆47相比改善的对人IL13R α 2的亲和力。本公开的人源化抗体还可以具有一种或多种另外的有利的特性-诸如改善的稳定性和/或细胞杀灭活性-如下所概述。

[0080] 因此, 本公开提供了结合至IL13R α 2的抗体, 其中该抗体包含有包含选自以下组成的组的氨基酸序列的重链可变区: SEQ ID NO:3 (VHA; HuCL47 VH); SEQ ID NO:5 (VHA回复); SEQ ID NO:6 (VHA1); SEQ ID NO:7 (VHA2); 和SEQ ID NO:8 (VHA3)。在一些优选的实施方案中, 所述抗体可包含有包含SEQ ID NO:3 (VHA; HuCL47 VH) 的氨基酸序列的重链可变区。

[0081] 在一些实施方案中, 所述抗体还可包含有包含选自以下组成的组的氨基酸序列的轻链可变区: SEQ ID NO:4 (VKA; HuCL47 VL); SEQ ID NO:9 (VKA回复); SEQ ID NO:10 (VKA1); 和SEQ ID NO:11 (VKA2)。在一些优选的实施方案中, 所述抗体可包含有包含SEQ ID NO:4 (VKA; HuCL47 VL) 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0082] 在本公开的一些实施方案中, 所述抗体可包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区, 和具有以下的氨基酸序列的轻链可变区: SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; 或SEQ ID NO:11。

[0083] 在本公开的一些实施方案中, 所述抗体可包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区, 和具有以下的氨基酸序列的轻链可变区: SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:9; SEQ ID NO:10; 或SEQ ID NO:11。

[0084] 在本公开的一些实施方案中, 所述抗体可包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区, 和具有以下的氨基酸序列的轻链可变区: SEQ ID NO:4; SEQ ID NO:9; SEQ ID

NO:10;或SEQ ID NO:11。

[0085] 在本公开的一些实施方案中,所述抗体可包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有以下的氨基酸序列的轻链可变区:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;或SEQ ID NO:11。

[0086] 在本公开的一些实施方案中,所述抗体可包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有以下的氨基酸序列的轻链可变区:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;或SEQ ID NO:11。

[0087] 因此,本公开的具体考虑的实施方案包括抗体,该抗体可包含:

[0088] i) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0089] ii) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0090] iii) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0091] iv) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;

[0092] v) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0093] vi) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0094] vii) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0095] viii) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;

[0096] ix) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0097] x) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0098] xi) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0099] xii) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;

[0100] xiii) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0101] xiv) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0102] xv) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0103] xvi) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基

酸序列的轻链可变区；

[0104] xvii) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区；

[0105] xviii) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区；

[0106] xix) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区；和

[0107] xx) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0108] 本公开的一些优选特别考虑的实施方案包括抗体,该抗体包含：

[0109] -具有SEQ ID NO:3 (VHA;HuCL47 VH) 的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4 (VKA;HuCL47 VL) 的氨基酸序列的轻链可变区；

[0110] -具有SEQ ID NO:3 (VHA;HuCL47 VH) 的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10 (VKA1) 的氨基酸序列的轻链可变区；

[0111] -具有SEQ ID NO:3 (VHA;HuCL47 VH) 的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:11 (VKA2) 的氨基酸序列的轻链可变区；

[0112] -具有SEQ ID NO:5 (VHA回复) 的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4 (VKA;HuCL47 VL) 的氨基酸序列的轻链可变区；

[0113] -具有SEQ ID NO:5 (VHA回复) 的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10 (VKA1) 的氨基酸序列的轻链可变区；

[0114] -具有SEQ ID NO:5 (VHA回复) 的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11 (VKA2) 的氨基酸序列的轻链可变区；和

[0115] -具有SEQ ID NO:8 (VHA3) 的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11 (VKA2) 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0116] 本公开的其他优选实施方案包括抗体,该抗体包含：

[0117] -具有SEQ ID NO:3 (VHA;HuCL47 VH) 的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4 (VKA;HuCL47 VL) 的氨基酸序列的轻链可变区；

[0118] -具有SEQ ID NO:5 (VHA回复) 的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4 (VKA;HuCL47 VL) 的氨基酸序列的轻链可变区；和

[0119] -具有SEQ ID NO:8 (VHA3) 的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11 (VKA2) 的氨基酸序列的轻链可变区。

[0120] 在本公开的一些特别优选的实施方案中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。此类抗体可在本文中称为“huCL47”。

[0121] 本公开的抗体是人源化或全长人抗体,或包含经人源化或完全人的可变结构域。本公开的抗体可为分离的人源化或完全人抗体。在一些实施方案中,本公开的抗体还可包含源自一种或多种人抗体的抗体恒定区。

[0122] 在一个实施方案中,本发明提供了结合至白介素-13受体亚基 α -2 (IL13R α 2) 的抗体,该抗体包含有包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID: NO 15中所示的互补决定区

(CDR)的重链;和/或包含以下的轻链:(i) SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示的CDR;和(ii)位于位置30(参考SEQ ID NO:3编号)处的丝氨酸残基,其中至少可变区是完全人的。在一个实施方案中,所述抗体是完全人的,包括恒定区。在一个相关的实施方案中,本发明提供了包含所述抗体和吡咯并苯二氮杂草二聚体的抗体缀合物。在一个实施方案中,所述轻链是人 κ 轻链。

[0123] 抗原结合

[0124] 本文所述的抗体是特异性结合至IL13R α 2的抗体。

[0125] 如本文所用,“结合至IL13R α 2”和“结合IL13R α 2”用于意指所述抗体以比非特异性伴侣诸如牛血清白蛋白(BSA,Genbank登录号CAA76847,版本号CAA76847.1GI:3336842,记录更新日期:2011年1月7日02:30PM)更高的亲和力结合IL13R α 2。在一些实施方案中,当在生理条件下测量时,所述抗体以比所述抗体对BSA的缔合常数(K_a)高至少2、3、4、5、10、20、50、100、200、500、1000、2000、5000、104、105或106-倍的缔合常数结合IL13R α 2。

[0126] 在一些实施方案中,IL13R α 2多肽对应于以UniProt登录号:Q14627(条目版本190)公开的氨基酸序列或其片段。在一些实施方案中,IL13R α 2多肽对应于与以UniProt登录号:Q14627(条目版本190)公开的氨基酸序列的全长具有至少70%、80%、90%、95%、99%或100%序列同一性的氨基酸序列或其片段。在一些实施方案中,IL13R α 2多肽具有SEQ ID NO:12的序列。

[0127] 抗体亲和力

[0128] 令人惊讶的是,本作者已发现与嵌合(Ch)克隆47相比,人源化过程增加了人源化抗体对人IL13R α 2的亲和力,如在Biacore结合测定中所确定的(参见实施例2)。

[0129] 因此,本发明的抗体可以以高亲和力结合IL13R α 2。例如,在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可以不大于 10^{-6} M、不大于 5×10^{-6} M、不大于 10^{-7} M、不大于 5×10^{-7} M、不大于 10^{-8} M、不大于 5×10^{-8} M、不大于 10^{-9} M、不大于 5×10^{-9} M、不大于 10^{-10} M、不大于 5×10^{-10} M、不大于 10^{-11} M、不大于 5×10^{-11} M、不大于 10^{-12} M、不大于 5×10^{-12} M、不大于 10^{-13} M、不大于 5×10^{-13} M、不大于 10^{-14} M、不大于 5×10^{-14} M、不大于 10^{-15} M或不大于 5×10^{-15} M的缔合常数(K_D)结合IL13R α 2。

[0130] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可以不大于0.52、0.51、0.50、0.49、0.48、0.47、0.46、0.45、0.44、0.43、0.42、0.41或0.40nM的缔合常数(K_D)结合IL13R α 2。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可以不大于0.40、0.35、0.30、0.25、0.20、0.15或不大于0.10nM的缔合常数(K_D)结合IL13R α 2。

[0131] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可以 10^{-8} M至 10^{-10} M、 10^{-10} M至 10^{-12} M、 10^{-12} M至 10^{-14} M、或 10^{-14} M至 10^{-16} M的缔合常数(K_D)结合IL13R α 2。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可以 5×10^{-10} 至 5×10^{-11} M的缔合常数(K_D)结合IL13R α 2。

[0132] 用于确定抗体亲和力的合适方法对于技术人员来说是众所周知的——例如酶联免疫吸附测定(ELISA)和表面等离子共振(SPR)技术。在一些实施方案中, K_D 可以通过实施例中描述的方法确定和计算。

[0133] 在一些实施方案中,人源化抗体可以竞争性地抑制鼠“克隆47”抗体在体内和/或体外与人IL13R α 2的结合。在一些实施方案中,人源化抗体可以竞争性地抑制包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗

体在体内和/或体外与人IL13R α 2的结合。

[0134] 在一些实施方案中,等摩尔剂量的本公开的人源化抗体可以竞争性抑制鼠“克隆47”抗体的结合的至少20%,诸如该结合的至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%,或至少90%。结合百分比可以通过例如竞争性ELISA测定来测量,其中结合抑制%计算为 $[(1 - \text{测试样品的吸光度}) / (\text{阴性对照的吸光度})]$ 。

[0135] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体对人IL13R α 2抗原的亲和力可高于鼠“克隆47”抗体。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体对人IL13R α 2抗原的亲和力可高于包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。

[0136] 在一些实施方案中,所述人源化抗体与人IL13R α 2抗原的 K_D 将不超过鼠“克隆47”抗体/包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体的 K_D 的0.9。例如,所述人源化抗体与人IL13R α 2抗原的人源化抗体的 K_D 可以不超过上述抗体中的一种或多种抗体的 K_D 的0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1、0.05、0.01或0.001。在一些优选的实施方案中,所述 K_D 可以不超过上述抗体中的一种或多种抗体的 K_D 的0.5,或者不超过上述抗体中的一种或多种抗体的 K_D 的0.2。

[0137] 抗体等电点(pI)

[0138] 当分子周围的pH等于分子pI时,分子不带净电荷。分子的净电荷影响分子的溶解度,生物分子诸如蛋白质通常在与pI对应的pH下在水或盐溶液中具有最小的溶解度。因此,pI为7.35-7.45的蛋白在pH通常在7.35-7.45范围内的人体血液中的溶解度最低。

[0139] 当蛋白质的周围环境的pH低于该蛋白质的pI时,则该分子带有净正电荷。当蛋白质的周围环境的pH高于该蛋白质的pI时,则该分子带有净负电荷。一般来说,较高的抗体净正电荷导致组织滞留和血液清除率增高且半衰期更短,而较低的pI/较低的净正电荷导致组织滞留减少和半衰期更长(Boswell等人,Bioconjug Chem.2010年12月15日;21(12):2153-63)。

[0140] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有小于鼠“克隆47”抗体的pI。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体小的pI。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有不大于9.0、诸如不大于8.5、不大于8.0或不大于7.5的pI。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有不大于8.9、8.8、8.7、8.6、8.5、8.4、8.3、8.2或8.1的pI。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有不大于7.9、7.8或7.7的pI。

[0141] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有大于鼠“克隆47”抗体的pI。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体大的pI。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有至少7.5、诸如至少8.0、至少8.5或至少9.0的pI。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可具有至少7.5、7.6、7.7、7.8、7.9或8.0的pI。在一些优选的实施方案中,本公开的人源化抗体可具有至少7.6的pI。在一些优选的实施方案中,本公开的人源化抗体可具有至少7.63的pI。

[0142] 抗体稳定性

[0143] 令人惊讶的是,本作者已发现人源化过程可增加人源化抗体的稳定性,如通过如

通过ELISA评估的在4℃或45℃下孵育8天后与IL13R α 2的结合所确定的(参见实施例2)。

[0144] 因此,本公开的抗体可具有如与非-人源化抗-IL13R α 2抗体或其他人源化抗-IL13R α 2抗体相比改善的稳定性特性。在一些实施方案中,人源化抗体可具有与包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体相比改善的稳定性特性。

[0145] 用于评估稳定性特性的合适手段是技术人员熟知的——例如,蛋白质热迁移和温度稳定性测定。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体的稳定性特性可以通过实施例中描述的方法中的一种或多种方法来确定。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体的稳定性特性可通过如通过ELISA评估的在4℃或45℃下孵育8天后与IL13R α 2的结合来确定。

[0146] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可表现出在45℃下孵育8天之后与IL13R α 2的结合亲和力降低小于5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%或50%。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可表现出在45℃下孵育8天之后与L13R α 2的结合亲和力降低小于4倍减少,例如小于3.5倍、小于3倍、小于2.5倍、小于2倍或小于1.5倍。

[0147] 细胞杀伤活性/细胞毒性

[0148] 在一些情况下,本公开的人源化抗体和/或包含本公开的人源化抗体的抗体-药物缀合物可具有高细胞杀伤活性-例如,如通过EC50值所确定的。

[0149] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体和/或抗体-药物缀合物可具有低于鼠“克隆47”抗体或包含鼠“克隆47”抗体的抗体-药物缀合物的EC50。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体和/或抗体-药物缀合物可具有低于包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体或抗体-药物缀合物的EC50。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体和/或抗体-药物缀合物可具有比上述抗体/缀合物中的一种或多种抗体/缀合物低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%的EC50。用于确定细胞杀伤活性/细胞毒性和EC50值的合适手段是技术人员熟知的。在一些实施方案中,这些可以通过实施例中描述的方法确定。

[0150] 肿瘤生长的抑制

[0151] 在一些情况下,本公开的人源化抗体和/或包含本公开的人源化抗体的抗体-药物缀合物可阻止或降低IL13R α 2-表达肿瘤的生长速率。

[0152] 在一些实施方案中,与对照肿瘤相比,本公开的人源化抗体可抑制肿瘤生长至少10%。即,经所述抗体治疗的肿瘤的体积不超过对照肿瘤的体积的90%。例如,在一些实施方案中,与对照肿瘤相比,本公开的抗体可抑制肿瘤生长至少20%,诸如至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0153] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体的肿瘤抑制作用可大于鼠“克隆47”抗体或包含鼠“克隆47”抗体的抗体-药物缀合物的肿瘤抑制作用。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体的肿瘤抑制作用可大于包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体或抗体-药物缀合物的肿瘤抑制作用。

[0154] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体的肿瘤抑制作用可大于上述抗体中的一种或多种抗体的肿瘤抑制作用。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体的肿瘤抑制作用可比上述抗体中的一种或多种抗体的肿瘤抑制作用高至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%。用于确定本公开的人源化抗体对肿瘤生长的影响的合适手段是技术人员熟知的。

[0155] 抗体免疫原性

[0156] 本公开的人源化抗体在人受试者中具有与具有相同特异性的非人源化抗体(例如,人源化之前的小鼠抗体前体)相比降低的免疫原性。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可在人受试者中具有比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的其他方面同一的抗体或抗体片段更低的免疫原性。

[0157] 低或降低的免疫原性的特点可以是能够长时间治疗患者并且症状得到可测量的缓和并且毒性是低和/或可接受的。低或可接受的免疫原性和/或高亲和力以及其他合适的特性可有助于获得治疗性结果。“降低的免疫原性”在本文中被定义为在当用上述抗体治疗时表现出显著HAHA、HACA或HAMA响应的患者的比例的小于90%(诸如小于80%、小于70%、小于60%、小于50%、小于40%、小于30%、小于20%、小于10%)中引起显著HAHA、HACA或HAMA响应。

[0158] 抗体产生

[0159] 本公开还提供了产生本公开的人源化抗体的方法和手段。

[0160] 因此,在另一方面,本公开提供了编码人源化抗体的核酸分子,以及与编码人源化抗体的核酸分子互补的核酸分子。

[0161] 在另一方面,本公开提供了药物组合物,该药物组合物包含本公开的抗体,任选地还包含药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0162] 在另一方面,本公开提供了载体(诸如表达载体),该载体包含本公开的核酸。

[0163] 在另一方面,本公开提供了用本公开的载体转染的宿主细胞。宿主细胞可以是原核的或真核的。例如,该细胞可以是细菌、真菌、昆虫或哺乳动物(诸如小鼠、灵长类动物或人)的。

[0164] 在另一方面,本公开提供了通过培养本公开的宿主细胞来制备抗体的方法。

[0165] 在一些情况下,当在本公开的宿主细胞中表达时,本公开的人源化抗体可以以与非人源化抗IL13R α 2抗体或其他人源化抗IL13R α 2抗体相比更高的水平或更高的生产力或产量表达。

[0166] 在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可以以比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体更高的水平或更高的生产力或产量表达。在一些实施方案中,本公开的人源化抗体可以以比包含以下的抗体更高的水平或更高的生产力或产量表达:

[0167] -具有SEQ ID NO:3(VHA)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:9(VKA回复)的氨基酸序列的轻链可变区;

[0168] -具有SEQ ID NO:5(VHA回复)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:9(VKA回复)的氨基酸序列的轻链可变区;

[0169] -具有SEQ ID NO:6(VHA1)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4(VKA)的氨基酸序列的轻链可变区;

[0170] -具有SEQ ID NO:6(VHA1)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:9(VKA回复)的氨基酸序列的轻链可变区;

[0171] -具有SEQ ID NO:6(VHA1)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10

(VKA1)的氨基酸序列的轻链可变区；

[0172] -具有SEQ ID NO:6 (VHA1)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:11 (VKA2)的氨基酸序列的轻链可变区；

[0173] -具有SEQ ID NO:7 (VHA2)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4 (VKA)的氨基酸序列的轻链可变区；

[0174] -具有SEQ ID NO:7 (VHA2)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:9 (VKA回复)的氨基酸序列的轻链可变区；

[0175] -具有SEQ ID NO:7 (VHA2)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10 (VKA1)的氨基酸序列的轻链可变区；

[0176] -具有SEQ ID NO:7 (VHA2)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:11 (VKA2)的氨基酸序列的轻链可变区；

[0177] -具有SEQ ID NO:8 (VHA3)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4 (VKA)的氨基酸序列的轻链可变区；

[0178] -具有SEQ ID NO:8 (VHA3)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:9 (VKA回复)的氨基酸序列的轻链可变区；和

[0179] -具有SEQ ID NO:8 (VHA3)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:10 (VKA1)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0180] 在一些实施方案中，当在相同宿主细胞类型中表达并在相同条件下培养时，本公开的人源化抗体可以以比上述抗体中的一种或多种抗体更高的水平或更高的生产力或产量表达。在一些实施方案中，当在相同宿主细胞类型中表达并在相同条件下培养时，表达水平或生产力或产量可以比上述抗体中的一种或多种抗体高至少10、20、30、40、50、60、70、80、90或100%。在一些实施方案中，当在相同宿主细胞类型中表达并在相同条件下培养时，表达水平或生产力或产量可以比上述抗体中的一种或多种抗体高至少110、120、130、140、150、160、170、180、190或200%。用于确定重组蛋白表达水平的合适手段是技术人员熟知的，例如ELISA和蛋白质印迹技术。在一些实施方案中，表达水平/生产力/产量可以通过实施例中描述的方法确定。

[0181] 在一些情况下，当在本公开的宿主细胞中表达时，本公开的人源化抗体与非人源化抗IL13R α 2抗体或其他人源化抗IL13R α 2抗体相比，可具有更低水平的聚集或片段化。在一些实施方案中，本公开的人源化抗体可具有比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区的抗体更低水平的聚集或片段化。在一些实施方案中，当在相同宿主细胞类型中表达并在相同条件下培养时，本公开的人源化抗体可具有比非人源化抗IL13R α 2抗体或其他人源化抗IL13R α 2抗体更低水平的聚集或片段化。在一些实施方案中，当在相同宿主细胞类型中表达并在相同条件下培养时，聚集或片段化的水平可低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或100%。在一些实施方案中，当在相同宿主细胞类型中表达并在相同条件下培养时，聚集或片段化的水平可低至少110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%或200%。用于确定重组蛋白质的聚集或片段化的合适手段是技术人员熟知的，例如尺寸排阻色谱(SEC)。在一些实施方案中，聚集或片段化的水平可以通过实施例中描述的方法来确定。

[0182] 定义

[0183] 抗体

[0184] 本文的术语“抗体”以最广义使用,并且明确覆盖单克隆抗体、多克隆抗体、二聚体、多聚体、多特异性抗体(如双特异性抗体)、完整抗体和抗体片段,只要它们表现出期望的生物学活性,例如结合IL13R α 2的能力即可。抗体可以为鼠的、人的、人源化的、嵌合的,或源于其他物种的。抗体是由能够识别和结合至特异性抗原的免疫系统所产生的蛋白质。(Janeway,C.,Travers,P.,Walport,M.,Shlomchik(2001) *Immuno Biology*,第5版,Garland Publishing,New York)。靶抗原通常具有由多种抗体上的CDR识别的许多结合位点,也称为表位。每种特异性结合至不同表位的抗体均具有不同的结构。因此,一种抗原可具有多于一种的相应抗体。抗体包含全长免疫球蛋白分子或全长免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有免疫特异性地结合目标靶点的抗原或其部分的抗原结合位点的分子,此类靶点包括但不限于癌细胞或产生与自身免疫病相关的自身免疫抗体的细胞。免疫球蛋白可以属于免疫球蛋白分子的任何类型(如IgG,IgE,IgM,IgD和IgA)、类别(如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类,或同种异型(如人G1m1、G1m2、G1m3、非-G1m1[即除了G1m1之外的任何同种异型]、G1m17、G2m23、G3m21、G3m28、G3m11、G3m5、G3m13、G3m14、G3m10、G3m15、G3m16、G3m6、G3m24、G3m26、G3m27、A2m1、A2m2、Km1、Km2和Km3)。免疫球蛋白可以来源于任何物种,包括人、鼠或兔起源。

[0185] “抗体片段”包括全长抗体的一部分,一般是它的抗原结合区或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和scFv片段;双体抗体;线性抗体;由Fab表达文库产生的片段、抗独特型(抗-Id)抗体、CDR(互补决定区)和任何上述免疫特异性结合至癌细胞抗原、病毒抗原或微生物抗原的抗体的表位结合片段,单链抗体分子;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0186] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体的群体获得的抗体,即,包含该群体的各个抗体是同一的,除了可以微量存在的可能的天然存在的突变。单克隆抗体针对单一抗原位点是高度特异的。另外,与包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制品相反,每种单克隆抗体均是针对抗原上的单个决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体的优点在于它们可以在不受其他抗体污染的情况下合成。修饰语“单克隆”指示该抗体的特性是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应被解读为需要通过任何特定方法产生该抗体。例如,待根据本发明使用的单克隆抗体可以通过由Kohler等人(1975) *Nature* 256:495首次描述的杂交瘤方法制备,或者可以通过重组DNA方法(参见,US 4816567)制备。单克隆抗体还可使用Clackson等人(1991) *Nature*,352:624-628;Marks等人(1991) *J.Mol.Biol.*,222:581-597中所述的技术从噬菌体抗体文库中分离或从携带完全人免疫球蛋白系统的转基因小鼠(Lonberg(2008) *Curr.Opinion* 20(4):450-459)中分离。

[0187] 单克隆抗体包括其中重链和/或轻链的一部分与源于特定物种或属于特定抗体类或亚类的抗体中相应序列同一或同源而该链的其余部分与源于另一物种或属于另一抗体类或亚类的抗体中的相应序列同一或同源的“嵌合”抗体;以及此类抗体的片段,只要它们表现出所需的生物学活性即可(US 4816567;和Morrison等人(1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,81:6851-6855)。嵌合抗体包括“灵长类化(primatized)”抗体,该灵长类化抗体包含源于非人灵长类(如,旧世纪猴(old world Monkey)或猿)的可变结构域抗原结合序列和人恒定区序列。

[0188] 本文中的“完整抗体”为包含VL和VH结构域,以及轻链恒定结构域(CL)和重链恒定结构域CH1、CH2和CH3的抗体。恒定结构域可为天然序列恒定结构域(如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。完整抗体可以具有一种或多种“效应子功能”,该效应子功能是指可归因于抗体的Fc区(天然序列Fc区或氨基酸序列变体Fc区)的那些生物学活性。抗体效应子功能的实例包括C1q结合;补体依赖性细胞毒性;Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;和细胞表面受体(诸如B细胞受体和BCR)的下调。

[0189] 依据它们的重链的恒定结构域的氨基酸序列,可以将完整抗体指定为不同的“类别”。有五种主要类别的完整抗体:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些中的几种可以被进一步划分成“亚类”(同种型),如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同类别的抗体的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是熟知的。

[0190] 人源化

[0191] 如本文所用,“人源化”抗体包括本文所述的抗-IL13R α 2抗体的任何组合。在这些抗体中,来自嵌合MSAb-1和X09.2抗体的框架残基已在很大程度上被来自人免疫球蛋白的相应残基替代。保留尽可能多的人氨基酸残基,但可以根据需要修饰关键人残基以支持由CDR形成的抗原结合位点并重现(recapitulate)嵌合抗体的抗原结合效力。相对于未修饰的抗体,此类变化或变型任选地且优选地保留了或降低了人或其他灵长类动物物种的免疫原性。

[0192] “人源化抗体”是指包含人抗体的经修饰可变区的至少一部分的多肽,其中该可变区的一部分,优选基本上小于完整人可变结构域的部分,已被来自非人物种的相应序列取代并且其中该经修饰的可变区连接至另一种蛋白质的至少另一部分,优选人抗体的恒定区。表述“人源化抗体”包括其中一个或多个互补决定区(“CDR”)氨基酸残基和/或一个或多个框架区(“FW”或“FR”)氨基酸残基被啮齿类动物或其他非人抗体中类似位点的氨基酸残基取代的人抗体。表述“人源化抗体”还包括免疫球蛋白氨基酸序列变体或其片段,其包含基本上具有人免疫球蛋白氨基酸序列的FR和基本上具有非人免疫球蛋白氨基酸序列的CDR。

[0193] 非人(如,鼠)抗体的“人源化”形式为含有源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。或者,以另一种方式来看,人源化抗体是还含有来自非人(如鼠)抗体的选定的序列来代替人序列的人抗体。人源化抗体可以包括不显著改变其结合和/或生物活性的来自相同或不同物种的保守氨基酸取代或非天然残基。此类抗体是含有源自非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。

[0194] 有一系列人源化技术,包括“CDR移植”、“导向选择”、“去免疫”、“表面重修(resurfacing)”(也称为“贴面(veneering)”)、“复合抗体”、“人字串内容优化(Human String Content Optimisation)”和框架改组。

[0195] CDR移植

[0196] 在该技术中,人源化抗体是人免疫球蛋白(接受者抗体),其中来自接受者抗体的互补决定区(CDR)的残基被来自具有所需特性的非人物种(供体抗体)(诸如小鼠、大鼠、骆驼、牛、山羊或兔子)的CDR的残基替代(实际上,非人CDR被“移植”到人框架上)。在一些情况下,人免疫球蛋白的框架区(FR)残基被相应的非人残基替代(这可能发生在例如当特定FR

残基对抗原结合具有显著影响时)。

[0197] 另外,人源化抗体可包含在接受者抗体中或在导入的CDR或框架序列中不存在的残基。进行这些修饰以进一步细化和最大化抗体性能。因此,一般来说,人源化抗体将包含至少一个和在一方面两个可变结构域的全部,其中全部的或全部高变环对应于非人免疫球蛋白的那些高变环,并且全部的或基本上全部的FR区为人免疫球蛋白序列的那些FR区。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,或人免疫球蛋白的至少一部分。

[0198] 引导选择

[0199] 该方法由组合对特定表位有特异性的给定非人抗体的 V_H 或 V_L 结构域与人 V_H 或 V_L 文库组成,并且针对目标抗原选择特定人V结构域。然后将该选定的人 V_H 与 V_L 文库组合以生成完全人 $V_H \times V_L$ 组合。该方法描述于Nature Biotechnology(N.Y.) 12, (1994) 899-903中。

[0200] 复合抗体

[0201] 在该方法中,来自人抗体的氨基酸序列的两个或多个区段被组合在最终抗体分子中。它们是通过将处于组合中的多个人 V_H 和 V_L 序列区段组合起来来构建的,该组合限制或避开了最终复合抗体V区中的人T细胞表位。在需要时,通过将有助于或编码T细胞表位的V区区段与避开T细胞表位的替代区段交换来限制或避开T细胞表位。这种方法描述于US 2008/0206239 A1中。

[0202] 去免疫

[0203] 该方法涉及从治疗性抗体(或其他分子)的V区去除人(或其他第二物种)T细胞表位。分析治疗性抗体V-区序列是否存在MHC II类-结合基序,例如通过与MHC-结合基序的数据库(诸如存储在www.wehi.edu.au的“基序”数据库)比较来进行分析。可替代地,可以使用计算线程方法,诸如由Altuvia等人.(J.Mol.Biol.249244-250(1995))设计的那些来鉴定MHC II类结合基序;在这些方法中,测试了来自V区序列的连续重叠肽与MHC II类蛋白的结合能。然后可以将该数据与关于与成功呈递的肽有关的其他序列特征的信息,诸如两亲性、罗斯巴德基序(Rothbard motif)和组织蛋白酶B和其他加工酶的切割位点相组合。

[0204] 一旦确定了潜在的第二物种(如人)T细胞表位,就可以通过改变一个或多个氨基酸来消除它们。经修饰的氨基酸通常在T-细胞表位本身内,但就蛋白质的一级或二级结构而言也可能与该表位相邻(并因此,在一级结构中可能不相邻)。最典型地,改变是通过取代的方式,但在某些情况下氨基酸添加或缺失将更合适。

[0205] 所有的改变都可以通过重组DNA技术完成,因此最终的分子可以通过使用已经确定的方法诸如定点诱变从重组宿主中表达来制备。然而,使用蛋白质化学或任何其他分子改变手段也是可能的。

[0206] 表面重修

[0207] 该方法涉及:

[0208] (a) 通过构建非人抗体可变区的三维模型,确定非人(如啮齿动物)抗体(或其片段)的可变区的构象结构;

[0209] (b) 使用来自足够数量的非人和人抗体可变区重链和轻链的x-射线晶体结构的相对可及性分布产生序列比对,以给出重链和轻链框架位置的集合,其中比对位置在98%的足够数量的非人抗体重链和轻链中是同一的;

[0210] (c) 使用步骤(b)中产生的框架位置的集合,为待人源化的非人抗体定义重链和轻链表面暴露的氨基酸残基的集合;

[0211] (d) 从人抗体氨基酸序列中鉴定重链和轻链表面暴露的氨基酸残基的集合,该集合与步骤(c)中定义的表面暴露的氨基酸残基的集合是最接近同一的,其中来自人抗体的重链和轻链是或不是天然成对的;

[0212] (e) 在待人源化的非人抗体的氨基酸序列中,将步骤(c)中定义的重链和轻链表面暴露的氨基酸残基的集合取代为步骤(d)中鉴定的重链和轻链表面暴露的氨基酸残基的集合;

[0213] (f) 构建由步骤(e)中指定的取代产生的非人抗体可变区的三维模型;

[0214] (g) 通过比较在步骤(a)和(f)中构建的三维模型,从在步骤(c)或(d)中鉴定的集合鉴定出任何这样的氨基酸残基,该残基在待人源化的非人抗体的互补决定区的任何残基的任何原子的5埃内;以及

[0215] (h) 将来自人的步骤(g)中鉴定的任何残基改变为原始的非人氨基酸残基,以从而定义表面暴露的氨基酸残基的非人抗体人源化集合;条件是步骤(a)不必先进行,但必须在步骤(g)之前进行。

[0216] 超人源化

[0217] 该方法将非人类序列与功能性人类种系基因库进行比较。选择那些编码与非人序列同一或密切同一的规范结构的人基因。选择CDR内具有最高同源性的那些选定人基因作为FR供体。最后,将非人CDR移植到这些人FR上。该方法描述于专利WO 2005/079479 A2中。

[0218] 人字串内容优化

[0219] 该方法将非人(如小鼠)序列与人种系基因库进行比较,并将差异评分为人字串内容(HSC),其在潜在MHC/T-细胞表位水平下定量序列。然后通过最大化靶序列的HSC而非使用全局同一性度量来人源化该靶序列以产生多种不同的人源化变体(描述于Molecular Immunology,44,(2007)1986-1998中)。

[0220] 框架改组

[0221] 将非人抗体的CDR框内融合到涵盖所有已知重链和轻链人种系基因框架的cDNA池中。然后通过例如淘选噬菌体展示的抗体文库来选择人源化抗体。这描述于Methods 36, 43-60(2005)中。

[0222] 序列修饰

[0223] 本文公开的抗体重链可变区和/或轻链可变区的序列可通过取代、插入或缺失修饰。与本文所述序列基本相同的氨基酸序列包括包含保守氨基酸取代以及氨基酸缺失和/或插入的序列。保守氨基酸取代是指第一氨基酸被具有与第一氨基酸的化学和/或物理性质(如,电荷、结构、极性、疏水性/亲水性)类似的化学和/或物理性质的第二氨基酸替代。优选的保守取代是下文所示氨基酸组中的一个氨基酸被另一个氨基酸取代的那些保守取代:

[0224] • 具有极性侧链的氨基酸(Asp、Glu、Lys、Arg、His、Asn、Gln、Ser、Thr、Tyr和Cys)

[0225] • 具有非极性侧链的氨基酸(Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Phe、Trp、Pro和Met)

[0226] • 具有脂肪族侧链的氨基酸(Gly、Ala、Val、Leu、Ile)

[0227] • 具有环状侧链的氨基酸(Phe、Tyr、Trp、His、Pro)

[0228] • 具有芳族侧链的氨基酸(Phe、Tyr、Trp)

- [0229] • 具有酸性侧链的氨基酸(Asp、Glu)
- [0230] • 具有碱性侧链的氨基酸(Lys、Arg、His)
- [0231] • 具有酰胺侧链的氨基酸(Asn、Gln)
- [0232] • 具有羟基侧链的氨基酸(Ser、Thr)
- [0233] • 具有含硫侧链的氨基酸(Cys、Met) ,
- [0234] • 中性、弱疏水性氨基酸(Pro、Ala、Gly、Ser、Thr)
- [0235] • 亲水性、酸性氨基酸(Gln、Asn、Glu、Asp) 和
- [0236] • 疏水性氨基酸(Leu、Ile、Val)
- [0237] 特别优选的保守氨基酸取代组是:Val-Leu-Ile、Phe-Tyr、Lys-Arg、Ala-Val和Asn-Gln。

[0238] 在一些实施方案中,本公开的抗体可包含具有与本文所述的重链具有80%或更大的氨基酸序列同一性(例如,约85%或更大、86%或更大、87%或更大、88%或更大、89%或更大、90%或更大、91%或更大、92%或更大、93%或更大、94%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大的序列同一性)的氨基酸序列的重链。在一些实施方案中,本公开的抗体可包含具有与本文所述的轻链具有80%或更大的氨基酸序列同一性(例如,约85%或更大、86%或更大、87%或更大、88%或更大、89%或更大、90%或更大、91%或更大、92%或更大、93%或更大、94%或更大、95%或更大、96%或更大、97%或更大、98%或更大、99%或更大的序列同一性)的氨基酸序列的轻链。

[0239] 在一些实施方案中,本公开的抗体可包含具有与本文所述的重链的氨基酸序列同一的氨基酸序列的重链,但是它包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个相对于本文所述的重链的氨基酸序列的氨基酸修饰(如取代、插入和/或缺失)。在一些实施方案中,本公开的抗体可包含具有与本文所述的轻链的氨基酸序列同一的氨基酸序列的轻链,但是它包含1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个相对于本文所述的轻链的氨基酸序列的氨基酸修饰(如取代、插入和/或缺失)。

[0240] 抗体产生

[0241] 人源化抗体、片段和区域可通过克隆编码抗-IL13R α 2抗体的H和L链抗原结合区的DNA区段并分别将这些DNA区段连结至包含CH和CL区的DNA区段以产生全长免疫球蛋白-编码基因来产生。

[0242] 对于全长抗体分子,免疫球蛋白cDNA可从杂交瘤细胞系的mRNA获得。将抗体重链和轻链克隆在哺乳动物表达载体系统中。用DNA序列分析记录组装。可以使抗体构建体在人或其他哺乳动物宿主细胞系中表达。可以通过瞬时转染测定和所表达抗体的免疫测定来验证构建体。可以使用快速测定方法分离和筛选具有最高生产力的稳定细胞系。

[0243] 治疗方法

[0244] 本公开的抗体和缀合物可用于治疗方法中。还提供了治疗方法,其包括向需要治疗的受试者施用治疗有效量的本发明的抗体或缀合物化合物。术语“治疗有效量”是足以表现出对患者的益处的量这样的益处可以是至少一种症状的至少改善。实际施用量以及施用速度和时程将取决于所治疗对象的性质和严重程度。治疗处方,如剂量决定,在全科医生和其他医疗医生的责任内。

[0245] 本公开的抗体和缀合物可单独地施用或者与其他治疗组合同时或依序施用,这取

决于待治疗的疾患。治疗和疗法的实例包括但不限于化疗(施用活性剂,包括如药物,诸如化疗剂);手术;以及放射疗法。

[0246] “化疗剂”是可用于治疗癌症的化学化合物,无论作用机制如何。化疗剂的类别包括但不限于:烷化剂、抗代谢物、纺锤毒植物生物碱、细胞毒性/抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、抗体、光敏剂和激酶抑制剂。化疗剂包括用于“靶向疗法”和常规化疗的化合物。

[0247] 化疗剂的实例包括:埃罗替尼(TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.)、多西他赛(TAXOTERE®, Sanofi-Aventis)、5-FU(氟尿嘧啶、5-氟尿嘧啶, CAS No. 51-21-8)、吉西他滨(GEMZAR®, Lilly)、PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer)、顺铂(顺式-二胺二氯铂(II), CAS No. 15663-27-1)、卡铂(CAS No. 41575-94-4)、紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®, Genentech)、替莫唑胺(4-甲基-5-氧代-2,3,4,6,8-五氮杂双环[4.3.0]壬-2,7,9-三烯-9-甲酰胺, CAS No. 85622-93-1、TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough)、他莫昔芬((Z)-2-[4-(1,2-二苯基丁-1-烯基)苯氧基]-N,N-二甲基乙胺、NOLVADEX®、ISTUBAL®、VALODEX®)和多柔比星(ADRIAMYCIN®)、Akti-1/2、HPPD和雷帕霉素。

[0248] 化疗剂的更多实例包括:奥沙利铂(ELOXATIN®, Sanofi)、硼替佐米(VELCADE®, Millennium Pharm.)、索坦(sutent)(SUNITINIB®, SU11248, Pfizer)、来曲唑(FEMARA®, Novartis)、甲磺酸伊马替尼(GLEEVEC®, Novartis)、XL-518(Mek抑制剂, Exelixis, WO 2007/044515)、ARRY-886(Mek抑制剂, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca)、SF-1126(PI3K抑制剂, Semafore Pharmaceuticals)、BEZ-235(PI3K抑制剂, Novartis)、XL-147(PI3K抑制剂, Exelixis)、PTK787/ZK 222584(Novartis)、氟维司群(FASLODEX®, AstraZeneca)、甲酰四氢叶酸(leucovorin)(亚叶酸)、雷帕霉素(西罗莫司, RAPAMUNE®, Wyeth)、拉帕替尼(TYKERB®, GSK572016, Glaxo SmithKline)、洛那法尼(SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough)、索拉非尼(NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs)、吉非替尼(IRESSA®, AstraZeneca)、伊立替康(CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer)、替吡法尼(ZARNESTRA™, Johnson&Johnson)、ABRAXANE™(无Cremophor)、白蛋白工程化紫杉醇纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, IL)、凡德他尼(rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca)、苯丁酸氮芥、AG1478、AG1571(SU 5271; Sugen)、西罗莫司(TORISEL®, Wyeth)、帕唑帕尼(GlaxoSmithKline)、坎磷酰胺(canfosfamide)(TELCYTA®, Telik)、噻替帕和环磷酰胺(CYTOXAN®, NEOSAR®);烷基磺酸酯,诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,诸如苯多巴、卡波醌、美妥多巴和乌多巴(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺,包括六甲蜜胺、三乙烯蜜胺、三乙烯磷酰胺、三乙烯硫代磷酰胺和三甲基蜜胺;多聚乙酰(尤其是布拉它辛

(bullatacin) 和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素;卡利斯汀;CC-1065(包括其阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻素(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);尾海兔素;倍癌霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);五加素;水鬼蕉碱;匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素;氮芥诸如苯丁酸氮芥、氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、二氯甲基二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑、新恩比兴、苯芥胆甾醇、泼尼莫司汀、曲洛磷胺、乌拉莫司汀;硝基脲,诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷诺司汀;抗生素,诸如烯二炔抗生素(如加利车霉素、加利车霉素 γ 1I、加利车霉素 ω 1I (Angew Chem.Intl.Ed.Engl. (1994) 33:183-186);达内霉素、达内霉素A;二膦酸盐,诸如氯膦酸盐;埃斯佩拉霉;以及新制癌菌发色团素和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团)、阿克拉霉素、放线菌素、氨苄霉素(authramycin)、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素(chromomycinis)、更生霉素、道诺霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯并-多柔比星和脱氧多柔比星)、表柔比星、依索比星、伊达比星、奈莫柔比星、麻西罗霉素、丝裂霉素诸如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗-代谢物诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤、曲美沙特;嘌呤类似物,诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤、硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,诸如安西他滨、氮杂胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、去氧氟尿苷、依诺他滨、氟尿苷;雄激素诸如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗-雄激素,诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛司坦;叶酸补充剂,诸如亚叶酸;乙酰葡萄糖;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;贝曲布辛(bestrabucil);比生群;依达曲沙;地磷酰胺;地美可辛;亚胺醌;依洛尼塞;依利醋铵;埃博霉素;依托格鲁;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱类,诸如美登素和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫派达醇;二胺硝吡啶(nitraerine);喷司他丁;苯来美特;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙酰肼;丙卡巴肼;PSK® 多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生;利索新;西佐喃;锗螺胺;细交链孢菌酮酸;三亚胺醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯(尤其是T-2毒素、疣孢菌素A、杆孢菌素A和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;6-硫鸟嘌呤;巯基嘌呤;甲氨蝶呤;铂类似物诸如顺铂和卡铂;长春碱;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨(NAVELBINE®);二羟基蒽醌(novantrone);替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;卡培他滨(XELODA®, Roche);伊班膦酸盐;CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视色素诸如视黄酸;及上述中任一种的药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0249] “化疗剂”的定义中还包括:(i)用于调控或抑制激素对肿瘤的作用的抗-激素剂,诸如抗-雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(包括NOLVADEX®;柠檬酸他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、克罗米芬、LY117018、奥那斯酮和FARESTON®(柠檬酸托瑞米芬);(ii)抑制调控肾上腺中

的雌激素产生的酶芳香酶的芳香酶抑制剂,诸如例如4(5)-咪唑、氨鲁米特、MEGASE®(醋酸甲地孕酮)、AROMASIN®(依西美坦;Pfizer)、福美司坦(formestane)、法倔唑、RIVISOR®(伏氯唑)、FEMARA®(来曲唑;Novartis)和ARIMIDEX®(阿那曲唑;AstraZeneca);(iii)抗-雄激素,诸如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;以及曲沙他滨(1,3-二噁烷核苷胞嘧啶类似物);(iv)蛋白激酶抑制剂,诸如MEK抑制剂(WO 2007/044515);(v)脂质激酶抑制剂;(vi)反义寡核苷酸,特别是抑制参与异常细胞增殖的信号传导通路中的基因的表达式的那些,例如PKC- α 、Raf和H-Ras,诸如奥利默森(GENASENSE®,Genta Inc.);(vii)核糖酶,诸如VEGF表达抑制剂(如ANGIOZYME®)和HER2表达抑制剂;(viii)疫苗,诸如基因疗法疫苗,例如ALLOVECTIN®、LEUVECTIN®和VAXID®;PROLEUKIN®rIL-2;拓扑异构酶1抑制剂,诸如LURTOTECAN®;ABARELIX®rmRH;(ix)抗-血管生成剂诸如贝伐单抗(AVASTIN®,Genentech);以及上述任一种的药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0250] 还包括在“化疗剂”的定义中的是治疗性抗体,诸如阿仑单抗(CamPATH)、贝伐单抗(AVASTIN®,Genentech);西妥昔单抗(ERBITUX®,Imclone);帕尼单抗(VECTIBIX®,Amgen)、利妥昔单抗(RITUXAN®,Genentech/Biogen Idec)、奥法木单抗(ARZERRA®,GSK)、帕妥珠单抗(PERJETA™,OMNITARG™,2C4,Genentech)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®,Genentech)、托西莫单抗(Bexxar,Corixa)和抗体药物缀合物、吉妥珠单抗奥加米星(MYLOTARG®,Wyeth)。

[0251] 具有作为化疗剂的治疗潜能的人源化单克隆抗体包括:阿仑单抗、阿泊珠单抗、阿塞珠单抗、他利珠单抗、巴匹组单抗、贝伐单抗、美坦新比伐珠单抗、美坦新莫坎妥珠单抗、西利珠单抗、聚乙二醇赛妥珠单抗、cidfusituzumab、cidtuzumab、达利珠单抗、依库珠单抗、依法珠单抗、依帕珠单抗、厄利珠单抗、泛维珠单抗、芳妥珠单抗、奥唑米星吉妥珠单抗、奥唑米星奥英妥珠单抗、伊匹单抗、拉贝珠单抗、林妥珠单抗、马妥珠单抗、美泊利单抗、莫维珠单抗、motovizumab、那他珠单抗、尼妥珠单抗、nolovizumab、numavizumab、奥瑞珠单抗、奥马珠单抗、帕利珠单抗、帕考珠单抗、pecfusituzumab、培妥珠单抗、帕妥珠单抗、培克珠单抗、ralivizumab、兰尼单抗、reslivizumab、瑞利珠单抗、resyvizumab、罗维珠单抗、卢利珠单抗、西罗珠单抗、西利珠单抗、索土珠单抗、tacatuzumab tetraxetan、他度珠单抗、他利珠单抗、替非组单抗、托珠单抗、托利珠单抗、曲妥珠单抗、tucotuzumab celmoleukin、tucosituzumab、umavizumab、乌珠单抗和维西珠单抗。

[0252] 根据本公开并且根据本公开使用的药物组合物,除包含活性成分(即本公开的抗体或缀合物化合物)之外,还可包含药学上可接受的赋形剂、载剂、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员众所周知的其他材料。此类材料应是无毒的并且不应干扰活性成分的功效。载剂或其他材料的确切性质将取决于施用途,该施用途可以是经口,或通过注射,如皮肤、皮下或静脉内。

[0253] 用于经口施用的药物组合物可以是片剂、胶囊、粉剂或液体形式。片剂可以包含固体载剂或佐剂。液体药物组合物通常包含液体载剂,诸如水、石油、动物或植物油、矿物油或

合成油。可以包括生理盐水溶液、葡萄糖或其他糖溶液或二醇，诸如乙二醇、丙二醇或聚乙二醇。胶囊可包含固体载剂，诸如明胶。

[0254] 对于静脉内、皮肤或皮下注射，或在病痛部位注射，活性成分将是肠胃外可接受的水溶液的形式，该水溶液无热原并具有合适的pH、等渗性和稳定性。本领域相关技术人员能够很好地使用例如等渗媒介物诸如氯化钠注射液、林格氏注射液(Ringer's Injection)、乳酸化林格氏注射液(Lactated Ringer's Injection)来制备合适的溶液。根据需要，可包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0255] 如本文在治疗疾患的上下文中所使用的术语“治疗”一般涉及治疗和疗法，不论人还是动物(如在兽医应用中)，其中获得一些所需的治疗作用，例如抑制疾患的进展，并且包括进展速率降低、进展速率终止、疾患消退、疾患改善和疾患治愈。还包括作为预防性措施的治疗(即预防、防止)。

[0256] 如本文所使用的术语“治疗有效量”涉及当根据所需治疗方案施用，有效地产生与合理的效益/风险比相称的一些所需治疗效果的活性化合物或包含活性化合物的材料、组合物或剂型的此量。

[0257] 类似地，如本文所用的术语“预防有效量”涉及当根据所需治疗方案施用，有效地产生与合理的效益/风险比相称的一些所需预防效果的活性化合物或包含活性化合物的材料、组合物或剂型的此量。

[0258] 用途

[0259] 本公开的抗体可用于靶向靶位置。靶位置可优选为增殖性细胞群。

[0260] 本公开的抗体是针对存在于增殖性细胞群上的抗原的抗体。在一些实施方案中，该抗原与增殖细胞群，例如肿瘤细胞群中存在的抗原的量相比，在非增殖细胞群中不存在或以降低的水平存在。

[0261] 靶位置可以是体外、体内或离体。

[0262] 本公开的抗体包括具有抗癌活性效用的抗体。因此，本公开提供了用于疗法的如本文所述的人源化抗体。本公开还提供了用于治疗增殖性疾病的如本文所述的人源化抗体。类似地，本公开提供了如本文所述的人源化抗体在制造用于治疗增殖性疾病的药物中的用途。

[0263] 本公开还提供了抗体药物缀合物，其包含与药物部分缀合的如本文所述的人源化抗体。此类缀合物包括具有抗癌活性用途的那些特别地，本公开的缀合物包含缀合，即通过接头共价附接至可以是毒素的药物部分的抗体。当药物不缀合至抗体时，该药物具有细胞毒性作用。药物部分的生物学活性因此是通过缀合至抗体来调节。本公开的抗体-药物缀合物(ADC)可选择性地将有效剂量的细胞毒性剂递送至肿瘤组织，从而可实现更大的选择性，即更低的有效剂量。

[0264] 因此，本公开提供了用于疗法中的如本文所述的缀合物化合物。本公开还提供了用于治疗增殖性疾病的如本文所述的缀合物化合物，以及如本文所述的缀合物化合物在制造用于治疗增殖性疾病的药物中的用途。

[0265] 本领域普通技术人员能够容易地确定候选缀合物是否治疗任何具体细胞类型的增殖性疾患。

[0266] 术语“增殖性疾病”涉及不是所期望的过度或异常细胞的不需要或不受控制的细

胞增殖,诸如赘生性或增生性生长(无论是在体外或体内)。增殖性疾患的实例包括但不限于良性、恶化前和恶性细胞增殖,包括但不限于赘生物和肿瘤(如组织细胞瘤、胶质瘤、星形细胞瘤、骨瘤)、癌症(如肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、肠癌、结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌、肝癌、肾癌、膀胱癌、胰腺癌、脑癌、肉瘤、骨肉瘤、卡波西肉瘤(Kaposi's sarcoma)、黑素瘤)、淋巴瘤、白血病、银屑病、骨疾病、纤维增殖性病征(如结缔组织的纤维增殖性病征)以及动脉粥样硬化。

[0267] 可治疗任何类型的细胞,包括但不限于肺、胃肠(包括如,肠、结肠)、乳房(乳腺)、卵巢、前列腺、肝脏(肝)、肾脏(肾)、膀胱、胰腺、大脑和皮肤。

[0268] 特别感兴趣的病症包括但不限于癌症,包括转移性癌症和转移性癌细胞,诸如循环肿瘤细胞,该细胞可被发现在体液诸如血液或淋巴液中循环。特别感兴趣的癌症包括肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肾癌、头颈癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤和脑肿瘤,诸如但不限于胶质瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤和室管膜瘤。

[0269] 其他目标病症包括其中IL13R α 2过表达或其中IL-13R α 2拮抗将提供临床益处的任何疾患——例如在炎性疾患(诸如但不限于炎性肠病和纤维化)中。

[0270] 考虑到本发明的抗体和抗体-药物缀合物(ADC)可用于治疗如以肿瘤抗原的过表达为特征的各种疾病或病症。示例性疾患或过度增殖性病征包括良性或恶性肿瘤;白血病、血液病以及淋巴样恶性肿瘤。其他包括神经元、胶质、星形细胞、下丘脑、腺体、巨噬细胞、上皮、基质、囊胚、炎性、血管生成和免疫学的(包括自身免疫性的)病症。

[0271] 通常,待治疗的疾病或病症是过度增殖性疾病,诸如癌症。本文中待治疗的癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更特定实例包括鳞状细胞癌(如上皮鳞状细胞癌)、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃部或胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾部或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌以及头颈癌。

[0272] ADC化合物可用于治疗的自身免疫性疾病包括风湿病(诸如例如,类风湿性关节炎、舍格伦氏综合征(Sjögren's syndrome)、硬皮病、狼疮诸如SLE和狼疮性肾炎、多肌炎/皮肤炎、冷球蛋白血症、抗磷脂抗体综合征和银屑病性关节炎)、骨关节炎、自身免疫性胃肠道和肝脏病症(诸如例如,炎性肠病(如溃疡性结肠炎和克罗恩氏病(Crohn's disease))、自身免疫性胃炎和恶性贫血、自身免疫性肝炎、原发性胆汁肝硬化、原发性硬化性胆管炎和乳糜泻)、血管炎(诸如例如,ANCA相关性血管炎,包括Churg-Strauss血管炎、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)和多动脉炎)、自身免疫性神经性病征(诸如例如,多发性硬化症、眼阵挛肌阵挛综合征、重症肌无力、视神经脊髓炎、帕金森氏病(Parkinson's disease)、阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)和自身免疫性多发性神经病、肾病症(诸如例如,肾小球肾炎、古德帕斯丘氏综合征(Goodpasture's syndrome)和伯杰氏病(Berger's disease))、自身免疫性皮肤病征(诸如例如,银屑病、风团、荨麻疹、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和皮肤红斑狼疮)、血液病症(诸如例如,血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜、输血后紫癜和自身免疫性溶血性贫血)、动脉粥样硬化、葡萄膜炎、自身免疫性听力疾病(诸如例如,内耳疾病和听力损失)、白塞氏病(Behcet's disease)、雷诺氏综

合征(Raynaud's syndrome)、器官移植和自身免疫性内分泌病症(诸如例如,糖尿病相关的自身免疫性疾病,诸如胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、艾迪生氏病(Addison's disease)和自身免疫性甲状腺疾病(例如格雷夫斯病(Graves' disease)和甲状腺炎))。更优选的此类疾病包括例如类风湿性关节炎、溃疡性结肠炎、ANCA相关的血管炎、狼疮、多发性硬化、舍格伦氏综合征、格雷夫斯病、IDDM、恶性贫血、甲状腺炎和肾小球肾炎。

[0273] 制剂

[0274] 尽管本公开的抗体和缀合物化合物可以单独使用(如,施用),但往往优选将其作为组合物或制剂呈现。

[0275] 在一些实施方案中,所述组合物是药物组合物(如,制剂、配制物、药物),其包含如本文所述的抗体或缀合物化合物以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0276] 在一些实施方案中,所述组合物是包含至少一种如本文所述的抗体或缀合物化合物连同本领域技术人员熟知的一种或多种其他药学上可接受的成分的药物组合物,该其他药学上可接受的成分包括但不限于药学上可接受的载剂、稀释剂、赋形剂、佐剂、填充剂、缓冲剂、防腐剂、抗氧化剂、润滑剂、稳定剂、增溶剂、表面活性剂(如润湿剂)、掩蔽剂、着色剂、调味剂和甜味剂。

[0277] 在一些实施方案中,所述组合物还可包含其他活性剂,例如其他治疗剂或预防剂。合适的载剂、稀释剂、赋形剂等可以在标准药学文献中找到。参见,例如,Handbook of Pharmaceutical Additives,第2版(M.Ash和I.Ash编辑),2001(Synapse Information Resources,Inc.,Endicott,New York,USA),Remington's Pharmaceutical Sciences,第20版,pub.Lippincott,Williams&Wilkins,2000;和Handbook of Pharmaceutical Excipients,第2版,1994。

[0278] 还公开了制备药物组合物的方法,其包括掺混至少一种如本文所定义的[11C]-放射性标记的缀合物或缀合物样化合物连同本领域技术人员熟知的一种或多种其他药学上可接受的成分,如载剂、稀释剂、赋形剂等。如果配制成离散单位(如片剂等),每个单位含有预定量(剂量)的活性化合物。

[0279] 如本文所用的术语“药学上可接受的”涉及在合理医学判断范围内适用于与所讨论的受试者(如,人)的组织接触使用而没有过量毒性、刺激性、过敏响应、或其他问题或并发症、与合理的效益/风险比相称的化合物、成分、材料、组合物、剂型等。每种载剂、稀释剂、赋形剂等在与制剂的其他成分相容的意义上也必须是“可接受的”。

[0280] 本公开的制剂可由药剂学领域中熟知的任何方法来制备。此类方法包括使活性化合物与构成一种或多种辅助成分的载剂缔合的步骤。一般来说,通过使活性化合物与载剂(如液体载剂、细碎的固体载剂等)均匀且紧密地缔合,且接着在必要时将产品成形来制备制剂。

[0281] 制剂可以被制备成提供快速或缓慢释放;立即、延迟、定时或持续释放;或它们的组合。

[0282] 适用于肠胃外施用(如通过注射)的制剂包括水性或非水性、等渗、无热原、无菌液体(如溶液、悬浮液),其中活性化合物溶解、悬浮或以其他方式提供(如在脂质体或其他微粒中)。此类液体可另外含有其他药学上可接受的成分,诸如抗氧化剂、缓冲剂、防腐剂、稳定剂、抑菌剂、助悬剂、增稠剂和使制剂与预期接受者的血液(或其他相关体液)等渗的溶

质。赋形剂的实例包括例如水、醇、多元醇、甘油、植物油等。适用于此类制剂中的等渗载剂的实例包括氯化钠注射液、林格氏溶液或乳酸化林格氏注射液。典型地，液体中活性成分的浓度为约1ng/ml至约10μg/ml，例如约10ng/ml至约1μg/ml。制剂可以以单位剂量或多剂量密封容器，例如安瓿和小瓶呈现，并且可存储于冷冻干燥(冻干)条件下，只需要在使用前立即添加无菌液体载剂，例如注射用水。临时注射溶液和悬浮液可由无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0283] 剂量

[0284] 本领域技术人员将认识到，本公开的抗体、缀合物化合物和组合物的适当剂量可因患者而异。确定最优剂量一般将涉及在治疗益处的水平和任何风险或有害副作用之间进行平衡。所选剂量水平将取决于多种因素，包括但不限于特定化合物的活性、施用途径、施用时间、化合物的排泄速率、治疗持续时间、组合使用的其他药物、化合物和/或材料、疾患的严重程度以及患者的物种、性别、年龄、体重、疾患、一般健康状况和既往医疗史。化合物的量和施用途径将最终由医师、兽医或临床医生酌定，但是总体上将剂量选择在作用部位获得局部浓度，其实现所需效果而不导致大致上有害或有毒的副作用。

[0285] 施用可在整个治疗过程中以单个剂量、连续或间歇地(如以适当的间隔以分剂量)实现。确定最有效施用手段和剂量的方法为本领域技术人员熟知并且将随着用于疗法的制剂、疗法的目的、所治疗的一种或多种靶细胞和所治疗的受试者而变化。单次或多次施用可根据由治疗医师、兽医或临床医生选择的剂量水平和模式来执行。

[0286] 一般来说，活性化合物的合适剂量在每天每千克受试者体重约100ng至约25mg(更典型地约1μg至约10mg)的范围内。当活性化合物为盐、酯、酰胺、前药等时，施用量基于母体化合物来计算，且因此待使用的实际重量成比例增加。

[0287] 在一个实施方案中，根据以下剂量方案将活性化合物施用至人受试者：约100mg，每日3次。

[0288] 在一个实施方案中，根据以下剂量方案将活性化合物施用至人受试者：约150mg，每日2次。

[0289] 在一个实施方案中，根据以下剂量方案将活性化合物施用至人受试者：约200mg，每日2次。

[0290] 然而，在一个实施方案中，根据以下剂量方案将缀合物化合物施用给人患者：约50或约75mg，每天3或4次。

[0291] 在一个实施方案中，根据以下剂量方案将缀合物化合物施用给人患者：约100或约125mg，每日2次。

[0292] 上文描述的剂量量可适用于抗体，缀合物(包括药物部分和至抗体的接头)或适用于有效量的提供的药物化合物，例如在切割接头后可释放的化合物的量。

[0293] 为了预防或治疗疾病，适当剂量将取决于如上文所定义的待治疗疾病的类型、疾病的严重性和病程、分子是出于预防还是治疗的目的施用、先前疗法、患者的临床史和对抗体的响应，以及主治医师的判断。一次或通过一系列治疗将分子适当地施用给患者。根据疾病的类型和严重性，约1μg/kg至15mg/kg(如0.1-20mg/kg)的分子是用于施用给患者的初始候选剂量，例如无论是通过一次或多次分开施用还是通过连续输注。典型的日剂量范围可以为约1μg/kg至100mg/kg或更大，这取决于上面提到的因素。待向患者施用的示例性ADC剂

量在约0.1至约10mg/kg患者体重的范围内。对于几天或更久时间内的重复施用(这取决于疾患),维持治疗直到发生所需的对疾病症状的抑制。示例性给药方案包括施用约4mg/kg的初始负荷剂量,之后每周、每两周或每三周施用另外剂量的ADC的过程。可以使用其他剂量方案。通过常规技术和测定容易监控这种疗法的进程。

[0294] 受试者/患者

[0295] 受试者/患者可以是动物、哺乳动物、胎盘哺乳动物、有袋类动物(如,袋鼠、袋熊)、单孔目动物(如,鸭嘴兽)、啮齿类动物(如,豚鼠、仓鼠、大鼠、小鼠)、鼠类(如,小鼠)、兔类动物(如,兔)、禽类(如,鸟)、犬科动物(如,狗)、猫科动物(如,猫)、马科动物(如,马)、猪科动物(如,猪)、绵羊类动物(如,绵羊)、牛科动物(如,奶牛)、灵长类动物、类人猿(如,猴或猿)、猴(如,狨猴、狒狒)、猿(如,大猩猩、黑猩猩、猩猩、长臂猿)或人。

[0296] 此外,受试者/患者可以是其任何发育形式,例如胎儿。在一个优选的实施方案中,受试者/患者是人类。

[0297] 实施方案

[0298] 本公开提供了抗-IL13R α 2抗体。本公开的抗体的特别考虑的实施方案包括:

[0299] 一种结合至白介素-13受体亚基 α -2(IL13R α 2)的抗体,所述抗体包含有包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID:NO 15中所示的互补决定区(CDR)的重链;和/或包含以下的轻链:(i)SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID:NO 18中所示的CDR;和(ii)位于位置30处的丝氨酸残基(参考SEQ ID NO:3编号),其中该可变区是完全人的。在一个实施方案中,所述抗体是完全人的,包括恒定区。在一个相关的实施方案中,本发明提供了包含所述抗体和吡咯并苯二氮杂萘二聚体的抗体缀合物。在一个实施方案中,所述轻链是人 κ 轻链。

[0300] 一种结合至白介素-13受体亚基 α -2(IL13R α 2)的抗体,其中所述抗体包含有包含选自自由以下组成的组的氨基酸序列的重链可变区:SEQ ID NO:3;SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;和SEQ ID NO:8。在一些此类实施方案中,所述抗体还包含有包含以下的轻链可变区:具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和/或具有SEQ ID NO.18的氨基酸序列的VL CDR3。在一些实施方案中,所述抗体还包含有包含以下的轻链可变区:具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO.18的氨基酸序列的VL CDR3。在一些实施方案中,所述可变区是完全人的。在一些实施方案中,所述抗体是完全人的。例如,所述抗体中所含的任何恒定区还可以是完全人的抗体。

[0301] 因此,在一些实施方案中,所述抗体包含:

[0302] (i)具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO.18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的;

[0303] (ii)具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO.18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的;

[0304] (iii)具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:16的

氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的;

[0305] (iv) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的;或

[0306] (v) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的。

[0307] 在一些实施方案中,所述抗体还包含有包含选自以下组成的组的氨基酸序列的轻链可变区:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11。

[0308] 一种结合至白介素-13受体亚基 α -2 (IL13R α 2)的抗体,其中所述抗体包含有包含选自以下组成的组的氨基酸序列的轻链可变区:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11。在一些此类实施方案中,所述抗体还包含有包含以下的重链可变区:具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和/或具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3。在一些实施方案中,所述抗体还包含有包含以下的重链可变区:具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3。在一些实施方案中,所述可变区是完全人的。在一些实施方案中,所述抗体是完全人的。例如,所述抗体中所含的任何恒定区还可以是完全人的抗体。

[0309] 因此,在一些实施方案中,所述抗体包含:

[0310] (i) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的;

[0311] (ii) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的;

[0312] (iii) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的;

[0313] (iv) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区,任选地其中所述可变结构域和/或所述抗体是完全人的。

[0314] 在一些实施方案中,所述抗体还包含有包含选自以下组成的组的氨基酸序列的

重链可变区:SEQ ID NO:3;SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;和SEQ ID NO:8。

[0315] 因此,本公开的特别考虑的抗体包括包含以下的那些:

[0316] i) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0317] ii) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0318] iii) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0319] iv) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;

[0320] v) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0321] vi) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0322] vii) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0323] viii) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;

[0324] ix) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0325] x) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0326] xi) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0327] xii) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;

[0328] xiii) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0329] xiv) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0330] xv) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0331] xvi) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区;

[0332] xvii) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0333] xviii) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0334] xix) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基

酸序列的轻链可变区;和

[0335] xx)具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0336] 本公开的优选抗体包括包含以下的那些:

[0337] 一具有SEQ ID NO:3 (VHA;HuCL47 VH)的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4 (VKA;HuCL47 VL)的氨基酸序列的轻链可变区;

[0338] -具有SEQ ID NO:5 (VHA回复)的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4 (VKA;HuCL47 VL)的氨基酸序列的轻链可变区;和

[0339] -具有SEQ ID NO:8 (VHA3)的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11 (VKA2)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0340] 本公开的特别优选的抗体包括包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区的那些。

[0341] ***

[0342] 在前文描述中或所附权利要求书中或附图中公开的特征(以其特定形式,或者根据用于执行所公开的功能的手段或者用于获得所公开结果的方法或工艺被表述)在适当时可单独地或以此类特征的任何组合的形式用于以多样化形式实现本发明。

[0343] 虽然已经结合上文描述的示例性实施方案描述了本发明,但当给出本公开时,许多等同修改和变型对于本领域技术人员而言将是显而易见的。因此,以上阐述的本发明的示例性实施方案被认为是说明性的而不是限制性的。在不背离本发明的精神和范围的情况下可以对所述实施方案作出各种改变。

[0344] 为避免任何疑问,本文提供的任何理论解释都是为了提高读者的理解。本发明人不希望受到这些理论解释中的任一种束缚。

[0345] 本文所使用的任何小节标题仅出于组织性目的且不被解读为限制所描述的主题。

[0346] 在包括所附权利要求的整个说明书中,除非上下文另外要求,否则词语“包含(comprise)”和“包括(include)”及变型(诸如“包含(comprises/comprising)”和“包括(including)”)将被理解为暗示包括规定的整数或步骤或者整数或步骤的组但不排除任何其他整数或步骤或者整数或步骤的组。

[0347] 必须注意,除非上下文另有明确指明,否则如在本说明书和所附权利要求书中所使用,单数形式“一个/种(a/an)”和“该/所述”包括复数个提及物。范围可在本文中表达为自“约”一个特定值起和/或至“约”另一个特定值止。当表示这类范围时,另一个实施方案包括从一个特定值和/或到另一个特定值。类似地,当通过使用先行词“约”将值表述为近似值时,应理解,特定值形成另一个实施方案。与数值相关的术语“约”是任选的并且意指例如 $\pm 10\%$ 。

[0348] 序列

[0349] SEQ ID NO:1[鼠CL47 VH,CDR加下划线]

QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFSNYLMNWVKQRPEQDL

[0350] DWIGRIDPYDGDIDYNQNFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY
CARGYGTAYGVVDYWGQGTSTVTVSS

- [0351] SEQ ID NO:2[鼠CL47 VL,CDR加下划线]
DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQP
- [0352] PKLLIYAASRQGS¹GV²PARFSGSGSGTD³FTSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKE
VPWTFGGG⁴TKLEIK
- [0353] SEQ ID NO:3[HuCL47 VH(克隆47VHA),CDR加下划线]
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQG
- [0354] LEWMGRIDPYDGDIDYNQNF¹KDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED²TAV
YYCARGYGTAYGV³DYWGQGT⁴SVTVSS
- [0355] SEQ ID NO:4[HuCL47 VL(克隆47VKA),CDR加下划线]
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA¹SESVDNYGISFMN²WYQQKPGQA
- [0356] PRLLIYAASRQGS¹GIPDRFSGSGSGTD²FTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVP
WTFGGG³TKLEIK
- [0357] SEQ ID NO:5[克隆47VHA回复,CDR加下划线]
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQG
- [0358] LEWIGRIDPYDGDIDYNQNF¹KDRATLTVDKSASTAYMELSSLRSED²TAVY
YCARGYGTAYGV³DYWGQGT⁴SVTVSS
- [0359] SEQ ID NO:6[克隆47VHA1,CDR加下划线]
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQG
- [0360] LEWIGRIDPYDGDIDYNQNF¹KDRVTITRDTSASTAYMELSSLRSED²TAVY
YCARGYGTAYGV³DYWGQGT⁴SVTVSS
- [0361] SEQ ID NO:7[克隆47VHA2,CDR加下划线]
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQG
- [0362] LEWMGRIDPYDGDIDYNQNF¹KDRVTITVDTSASTAYMELSSLRSED²TAV
YYCARGYGTAYGV³DYWGQGT⁴SVTVSS
- [0363] SEQ ID NO:8[克隆47VHA3,CDR加下划线]
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNWVRQAPGQG
- [0364] LEWMGRIDPYDGDIDYNQNF¹KDRVTITRDKSASTAYMELSSLRSED²TAV
YYCARGYGTAYGV³DYWGQGT⁴SVTVSS
- [0365] SEQ ID NO:9[克隆47VKA回复,CDR加下划线]
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRA¹SESVDNYGISFMN²WFQQKPGQA
- [0366] PRLLIYAASRQGS¹GIPDRFSGSGSGTD²FTLTISRLEPEDFAVYFCQQSKEVP
WTFGGG³TKLEIK

- [0367] SEQ ID NO:10[克隆47VKA1,CDR加下划线]
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFQQKPGQA
- [0368] PRLLIYAASRQGS GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQSKEVP
WTFGGGTKLEIK
- [0369] SEQ ID NO:11[克隆47VKA2,CDR加下划线]
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFMNWFYQQKPGQA
- [0370] PRLLIYAASRQGS GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYFCQQSKEVP
WTFGGGTKLEIK
- [0371] SEQ ID NO:12[人IL13RA2的细胞外结构域(27-343) (Uniprot Q14627)]
- [0372] DTEIKVNPPQDFEIVDPGYLGYLYLQWQPPLSLDHFKECTVEYELKY
RNIGSETWKTITKNLHYKDGFDLNGIEAKIHTLLPWQCTNGSEVQSSW
AETTYWISPQGIPETKVQDMDCVYYNWQYLLCSWKPGIGVLLDTNYNLF
YWYEGLDHALQCVDYIKADGQNIGCRFPYLEASDYKDFYICVNGSSENK
- [0373] PIRSSYFTFQLQNIVKPLPPVYLTFTRESSCEIKLKWSIPLGPIPARCFDYEIE
IREDDTTLVTATVENETYTLKTTNETRQLCFVVRSKVNIYCSDDGIWSEW
SDKQCWEGEDLSKKTLLRhhhhhh
- [0374] Hhhhhh=C-末端His标签
- [0375] SEQ ID NO:13[HuCL47 CDRH1]
- [0376] NYLMN
- [0377] SEQ ID NO:14[HuCL47 CDRH2]
- [0378] RIDPYDGDIDYNQNFKD
- [0379] SEQ ID NO:15[HuCL47 CDRH3]
- [0380] GYGTA YGV DY
- [0381] SEQ ID NO:16[HuCL47 CDRL1]
- [0382] RASESVDNYGISFMN
- [0383] SEQ ID NO:17[HuCL47 CDRL2]
- [0384] AASRQGS
- [0385] SEQ ID NO:18[HuCL47 CDRL3]
- [0386] QQSKEVPWT
- [0387] 本公开的声明
- [0388] 概述本公开的方面的以下经编号的声明形成说明书的一部分。
- [0389] 101.一种结合至白介素-13受体亚基 α -2(IL13Ra2)的抗体,其中所述抗体包含:
- [0390] 重链可变区,其包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3;SEQ ID

NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;和SEQ ID NO:8;和

[0391] 轻链可变区,其包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11。

[0392] 102.根据声明101所述的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和:

[0393] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0394] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0395] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0396] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0397] 103.根据声明101所述的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和:

[0398] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0399] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0400] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0401] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0402] 104.根据声明101所述的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和:

[0403] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0404] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0405] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0406] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0407] 105.根据声明101所述的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和:

[0408] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0409] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0410] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0411] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0412] 106.根据声明101所述的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和:

[0413] (i)具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0414] (ii)具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0415] (iii)具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;或

[0416] (iv)具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0417] 107.根据声明101或102所述的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

[0418] 108.根据任何前述声明所述的抗体,其中所述抗体是选自以下组成的组的抗体片段:Fab、Fab'、F(ab')₂和scFv。

[0419] 109.根据任何前述声明所述的抗体,其中所述抗体还包含源自一种或多种人抗体的抗体恒定区。

[0420] 110. 根据任何前述声明所述的抗体, 其中所述抗体以不大于 5×10^{-10} M、诸如不大于 2.5×10^{-10} M的亲和力(K_D)结合IL13R α 2。

[0421] 111. 根据任何前述声明所述的抗体, 其中所述抗体以不大于 1.5×10^{-10} M的亲和力(K_D)结合IL13R α 2。

[0422] 112. 根据任何前述声明所述的抗体, 其中所述抗体竞争性地抑制包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体与IL13R α 2的结合。

[0423] 113. 根据任何前述声明所述的抗体, 其中所述抗体以比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体高的亲和力(KD)结合IL13R α 2。

[0424] 114. 根据任何前述声明所述的抗体, 其中所述抗体在人类受试者中具有比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体的免疫原性低的免疫原性。

[0425] 115. 根据任何前述声明所述的抗体, 其中所述抗体具有与包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体相比改善的稳定性特性。

[0426] 116. 一种抗体药物缀合物, 其包含与药物部分缀合的根据任何前述声明所述的抗体。

[0427] 117. 根据声明116所述的抗体药物缀合物, 其中所述药物部分是细胞毒性药物部分。

[0428] 118. 一种药物组合物, 其包含根据声明101至117中任一项所述的抗体或抗体药物缀合物和药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。

[0429] ***

[0430] 119. 一种结合至白介素-13受体亚基 α -2(IL13R α 2)的抗体, 其中所述抗体包含:

[0431] 重链可变区, 其包含选自以下组成的组的氨基酸序列: SEQ ID NO:3; SEQ ID NO:5; SEQ ID NO:6; SEQ ID NO:7; 和SEQ ID NO:8; 和

[0432] 轻链可变区, 其包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和/或具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3。

[0433] 120. 根据声明119所述的抗体, 其中所述抗体包含有包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区。

[0434] 121. 根据声明119或120所述的抗体, 其中所述抗体包含:

[0435] (i) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区, 和包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区;

[0436] (ii) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区, 和包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区;

[0437] (iii) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区的重链可变区, 和包含具有

SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区；

[0438] (iv) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区;或

[0439] (v) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的VL CDR3的轻链可变区。

[0440] 122.根据声明119-121中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含有包含选自以下组成的组的氨基酸序列的轻链可变区:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11。

[0441] 123.一种结合至白介素-13受体亚基 α -2(IL13R α 2)的抗体,其中所述抗体包含:

[0442] 轻链可变区,其包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:4;SEQ ID NO:9;SEQ ID NO:10;SEQ ID NO:11;和

[0443] 重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2,和/或具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3。

[0444] 124.根据声明123所述的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2,和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3。

[0445] 125.根据声明123或124所述的抗体,其中所述抗体包含:

[0446] (i) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0447] (ii) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区;

[0448] (iii) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区;

[0449] (iv) 包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2和具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的VH CDR3的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0450] 126.根据声明123-125中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含有包含选自以下组成的组的氨基酸序列的重链可变区:SEQ ID NO:3;SEQ ID NO:5;SEQ ID NO:6;SEQ ID NO:7;和SEQ ID NO:8。

[0451] 127.根据声明119-126中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含:

[0452] i) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区;

[0453] ii) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸

序列的轻链可变区；

[0454] iii) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区；

[0455] iv) 具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区；

[0456] v) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区；

[0457] vi) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区；

[0458] vii) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区；

[0459] viii) 具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区；

[0460] ix) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区；

[0461] x) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区；

[0462] xi) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区；

[0463] xii) 具有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区；

[0464] xiii) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区；

[0465] xiv) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区；

[0466] xv) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区；

[0467] xvi) 具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区；

[0468] xvii) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区；

[0469] xviii) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的轻链可变区；

[0470] xix) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的轻链可变区；或

[0471] xx) 具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的轻链可变区。

[0472] 128. 根据声明119-127中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的重链可变区,和具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区。

[0473] 129.一种抗体,其包含:

[0474] 重链可变区,其包含具有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的VH CDR1、具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的VH CDR2,和/或具有SEQ ID NO.15的氨基酸序列的VH CDR3;和/或

[0475] 轻链可变区,其包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的VL CDR1、具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的VL CDR2和/或具有SEQ ID NO.18的氨基酸序列的VL CDR3。

[0476] 130.根据声明129所述的抗体,其中所述抗体结合至白介素-13受体亚基 α -2 (IL13R α 2)。

[0477] 131.根据声明129或130中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含位于位置30(参考SEQ ID NO:3编号)处的丝氨酸残基。

[0478] 132.根据声明129至131中任一项所述的抗体,其中所述可变区是完全人的。

[0479] 133.根据声明129至132中任一项所述的抗体,其中所述抗体是完全人的抗体。

[0480] 134.根据声明129至133中任一项所述的抗体,其中所述轻链是人 κ 轻链。

[0481] 135.根据声明119-134中任一项所述的抗体,其中所述抗体是选自由以下组成的组的抗体片段:Fab、Fab'、F(ab')₂和scFv。

[0482] 136.根据声明119-134中任一项所述的抗体,其中所述抗体还包含源自一种或多种人抗体的抗体恒定区。

[0483] 137.根据声明119-136中任一项所述的抗体,其中所述抗体以不大于 5×10^{-10} M、诸如不大于 2.5×10^{-10} M的亲和力(K_D)结合IL13R α 2。

[0484] 138.根据声明119-137中任一项所述的抗体,其中所述抗体以不大于 1.5×10^{-10} M的亲和力(K_D)结合IL13R α 2。

[0485] 139.根据声明119-138中任一项所述的抗体,其中所述抗体竞争性地抑制包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体与IL13R α 2的结合。

[0486] 140.根据声明119-139中任一项所述的抗体,其中所述抗体以比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体高的亲和力(KD)结合IL13R α 2。

[0487] 141.根据声明119-140中任一项所述的抗体,其中所述抗体在人类受试者中具有比包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体的免疫原性低的免疫原性。

[0488] 142.根据声明119-141中任一项所述的抗体,其中所述抗体具有与包含具有SEQ ID NO:1的氨基酸序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:2的氨基酸序列的轻链可变区和任选的抗体恒定区的抗体相比改善的稳定性特性。

[0489] 143.一种抗体药物缀合物,其包含缀合至药物部分的根据声明119-142中任一项所述的抗体。

[0490] 144.根据声明143所述的抗体药物缀合物,其中所述药物部分是细胞毒性药物部分。

[0491] 145.根据声明144所述的抗体药物缀合物,其中所述细胞毒性药物部分是吡咯并苯二氮杂萘二聚体。

[0492] 146.一种药物组合物,其包含根据声明119至145中任一项所述的抗体或抗体药物

缀合物和药学上可接受的稀释剂、载剂或赋形剂。

[0493] ***

[0494] 201. 根据声明101至146中任一项所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物,其用于治疗方法中。

[0495] 202. 根据声明101至146中任一项所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物,其用于治疗受试者的增殖性疾病的方法中。

[0496] 203. 根据声明202所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物,其中所述增殖性疾病是癌症。

[0497] 204. 根据声明203所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物,其中所述癌症是选自由以下组成的组的癌症:肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肾癌、头颈癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤和脑肿瘤,诸如但不限于胶质瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤和室管膜瘤。

[0498] 205. 根据声明101至146中任一项所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物在制造用于治疗方法中的药物中的用途。

[0499] 206. 根据声明101至146中任一项所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物在制造用于受试者的增殖性疾病的治疗方法中的药物中的用途。

[0500] 207. 根据声明206所述的用途,其中增殖性疾病是癌症。

[0501] 208. 根据声明207所述的用途,其中所述癌症是选自由以下组成的组的癌症:肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肾癌、头颈癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤和脑肿瘤,诸如但不限于胶质瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤和室管膜瘤。

[0502] 209. 一种治疗增殖性疾病的方法,其包括向有需要的受试者施用根据声明101至146中任一项所述的抗体、抗体药物缀合物或药物组合物。

[0503] 210. 根据声明209所述的方法,其中向受试者施用化疗剂与所述抗体、抗体药物缀合物,或药物组合物的组合。

[0504] 211. 根据声明208至210中任一项所述的方法,其中所述癌症是选自由以下组成的组的癌症:肺癌、乳腺癌、胰腺癌、卵巢癌、肾癌、头颈癌、间皮瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤和脑肿瘤,诸如但不限于胶质瘤、髓母细胞瘤、星形细胞瘤和室管膜瘤。

[0505] ***

[0506] 301. 一种多核苷酸,其编码根据声明101至115或119至142中任一项所述的抗体。

[0507] 302. 一种载体,其包含声明301所述的多核苷酸。

[0508] 303. 如声明302所述的载体,其中所述载体是表达载体。

[0509] 304. 一种宿主细胞,其包含根据声明302至303中任一项所述的载体。

[0510] 305. 根据声明304所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是原核的、真核的或哺乳动物的。

[0511] 实施例

[0512] 材料和方法

[0513] 抗体的表达和纯化

[0514] 根据制造商的说明书培养和扩增细胞系;使Expi293F™细胞生长在Expi293™表达培养基(ThermoFisher A1435102)上。简而言之,将细胞在37℃轨道孵育箱内的125mL摇瓶培养瓶(Corning™431143)中在125rpm和8%CO₂气氛下培养,并在整个方法期间保持为3-

5x10⁶个细胞/毫升。使用LUNA-II™自动细胞计数器(Logo Biosystems Ltd)通过台盼蓝排除测定法一式两份测定细胞密度。如Thermo Fisher方案中所述,对两种细胞系都遵循30mL体积的DNA转染程序。在转染当天,选择存活力≥95%的细胞(经由显微镜/细胞计数器检查)并将其在25.5mL细胞特异性表达培养基中稀释至2.5x10⁶/ml(对于Expi293F™)。对于Expi293F™,将30μg的质粒DNA(15μg重链+15μg轻链)在Opti-MEM® I减血清培养基(Reduced-Serum Medium, ThermoFisher 31985070)中稀释至总共1.5mL,同时在单独小瓶中将81μL ExpiFectamine™293 Reagent在Opti-MEM® I减血清培养基中稀释至总共1.5mL。将每份轻轻混合并在室温下孵育5分钟,然后小心合并以获得3mL的总体积。将其在室温下再孵育20分钟以使DNA-脂质复合物形成,然后将混合物小心地添加到细胞烧瓶中。如前所述,在第5天收获培养物,使用LUNA-II™自动细胞计数器测量细胞存活力和密度。为了收获,将细胞离心(2000G, 15min, 4℃)并去除上清液,然后在纯化前通过0.22μm过滤器进行无菌过滤。纯化通过标准蛋白A色谱进行。

[0515] ELISA

[0516] IL13RA2-6His(27-343)的重组人细胞外结构域获自Sino biological(Ref10350-H08H)。将50μl 1 μg/ml于PBS中的人IL13RA2在4℃下在MaxiSorpELISA板上包被过夜。第二天早上,将板用PBS/Tween200.02%洗涤。每个孔添加有200μl Superblock封闭缓冲液,并在室温下在定轨振荡器上以120rpm孵育1小时。制备每种抗体的稀释系列,其中每种抗体变体是在PBS/Tween200.02%中稀释的。将抗体添加到经封闭的抗原包被板中,并在室温下在定轨振荡器上以120rpm振荡孵育1小时。然后将板用200μl的PBS/Tween200.02%洗涤3次,并将75μl二抗(以1:4000稀释于PBS/Tween200.02%中的小鼠抗-人-HRP)加入孔中并在室温下以120rpm在定轨振荡器上振荡孵育1小时。然后将板用200μl的PBS/Tween200.02%洗涤3次。为了使ELISA显色,将75μl的TMB-Turbo底物添加到孔中并在室温下在定轨振荡器上以120rpm振荡孵育,直至出现蓝色,然后用添加75μl的0.6NHC1来终止反应。将板在Envision上在450nm下读取,并使用GraphPad prism软件分析曲线。

[0517] 热迁移分析

[0518] 将蛋白质热迁移染料,2.5μL 1:1000稀释液((Life Technologies cat.446148)添加到96孔光学板内的样品蛋白质(17.5μL的0.5mg/mL于PBS中)并彻底混合。每个样品一式四份进行。用光学粘合剂膜密封板,并通过在500g下离心1分钟去除孔中的气泡,然后置于冰上。将密封板引入到7500实时PCR系统(7500Real-Time PCR System)中,随后如下搭建实验:

[0519]	反应体积	20μl		
	渐变模式	持续		
	步骤	渐变速率	温度℃	时间(mm:ss)
	1	100%	25.0	02:00
	2	1%	99.0	02:00

[0520] 使用蛋白质热位移v1.2软件(Life Technologies)分析数据。

[0521] 加速稳定性分析

[0522] 将抗体在45℃下在无菌PBS中孵育7-8天,之后通过ELISA、SEC、HIC和RP色谱进行分析。

[0523] Biacore分析

[0524] 使用人IL13RA2-6His包被的传感器的Biacore分析被用于计算克隆47变体的表观亲和力和常数。将一系列稀释的抗体变体施加到IL13RA2传感器表面并保持600秒分钟以计算缔合常数 K_a ,然后施加缓冲液(HBS-EP+)并保持1800秒以计算缔合常数 K_d 。两个常数的比率将提供表观 K_D ,因为抗体的二价会影响结合动力学。

[0525] HPLC尺寸排阻色谱(SEC)

[0526] 使用Shimadzu HPLC系统(或等效系统),使用TSKgel Super SW mAb HTP 4um 4.6mm x 15em柱进行SEC分析。流动相为200mM磷酸钾、250mM氯化钾、10%v/v异丙醇,pH 6.95,且流速为0.5毫升/分钟并在280nm下检测。

[0527] HPLC疏水性相互作用色谱(HIC)

[0528] 使用Shimadzu HPLC系统(或等效系统),使用Proteomix HIC Butyl-NP5,5um,无孔,4.6×35mm(Sepax)柱进行HIC分析SEC分析。流动相A是1.25M(NH₄)₂SO₄、25mM NaOAc(pH 5.50),并且流动相B是75%25mM NaOAc(pH 5.50)、25%异丙醇,且流速为0.8毫升/分钟并在214nm下检测。

[0529] HPLC反相色谱

[0530] 反相色谱使用Shimadzu HPLC系统(等效系统)使用Aeris Widepore XB-C18, 200Å,3.6μm,2.1x150mm(Phenomenex,00F-4482-AN)柱进行。流动相A是水+0.1%v/v TFA并且流动相B是乙腈+0.1%v/v TFA。在上样前,通过向40μL样品(5mg/ml)中添加30μL水、20μL硼酸钠和10μL DTT来制备样品。然后将其在37℃下孵育30分钟,添加100μL 49:49:2乙腈/水/甲酸。使柱以1毫升/分钟、在80℃的温度下运行,且在214nm下检测。

[0531] 体外细胞毒性

[0532] 将A375/NCI-H1299细胞在完全生长时稀释至 5×10^4 个细胞/毫升,其中将100μL细胞添加至EDGE板中的各孔中。将细胞在37℃/5%CO₂下孵育2-6小时,以使细胞有时间粘附。以11点以1:4系列稀释将ADC从50μg/mL稀释至47.7pg/mL,留下最终的阴性对照样品(即没有ADC的样品),每个浓度一式二份运行。将稀释的ADC添加到含靶细胞的EDGE板中,并将板在加湿孵育箱中阜阳5天(~120小时)。为了确定ADC的细胞毒性作用,使用Cell Titre Glow(Promega),将40μL读取溶液添加到板上的每个孔中并在37℃/5%CO₂孵育1-5小时。孵育后,在光学读板仪(Molecular Devices Spectramax i3X)上读取板,并通过机器固有的软件(Sofimax Pro)分析数据。总体而言,数据是一式三份运行每个细胞系的结果。

[0533] FACS分析

[0534] 将NCI-H1299细胞在测定缓冲液(含0.1%BSA/0.1%叠氮化钠的PBS)中稀释至 2×10^6 个细胞/毫升,并将50μL添加到96-孔板中的每个孔中。将HuCL47和克隆47抗体稀释至最高浓度40μg/ml(266nM)并1:4稀释获得7种稀释液,以及仅缓冲液。将50μL抗体添加至50μL细胞中以获得20μg/ml的浓度。将板在室温下孵育1小时,然后将板离心并洗涤3次。使用以1:250稀释的山羊F(ab')₂抗人IgG Alexa Fluor 488-缀合抗体(Life Technologies目录

号H10120)以用于在测定缓冲液中进行检测,将50 μ L添加到细胞中,并在室温下孵育一小时后,将细胞如前一样离心和洗涤,用7.5%甲醛固定并在流式细胞仪上分析,且使用FlowJo进行数据分析。

[0535] 实施例1-人源化抗体的设计和产生

[0536] 从鼠抗-IL13R α 2抗体“克隆47”开始制取许多人源化抗-白介素-13受体亚基 α -2(IL13R α 2)抗体变体。鼠“克隆47”的重链和轻链可变区序列分别为SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2。将这些与人可变片段数据库进行比较,并选择与位于Vernier处的克隆47和规范残基具有最高同源性的人框架区用于CDR移植。

[0537] 对于VH人源化,选择IGHV1-3和IGHJ1-01框架用于CDR移植。最初的IGHV1-3人框架中的苏氨酸T30被丝氨酸S30替代,所述丝氨酸S30在人种系的这个位置处也很常见并且与鼠VH序列中在这个位置处被发现的丝氨酸相匹配。所得的人源化VH结构域(SEQ ID NO:3)被命名为“克隆47VHA”。

[0538] 通过将回复突变引入到“克隆47VHA”(SEQ ID NO:3)序列中来制取克隆47VH的进一步的人源化型式。这些人源化VH结构域被命名为“克隆47VHA回复”(SEQ ID NO:5)、“克隆47VHA1”(SEQ ID NO:6)、“克隆47VHA2”(SEQ ID NO:7)和“克隆47VHA3”(SEQ ID NO:8)。制取变体“克隆47VHA1”、“克隆47VHA2”和“克隆47VHA3”是为了分别评估鼠VCI残基M48、V71和K73(根据Kabat编号)的影响。

[0539] 对于VL人源化,选择IGKV3-NL5和IGHJ2-01框架用于CDR移植。所得的人源化VL结构域(SEQ ID NO:4)被命名为“克隆47VKA”。

[0540] 通过将回复突变引入到“克隆47VKA”(SEQ ID NO:4)序列中来制取克隆47VL的进一步的人源化型式。这些人源化VL结构域被命名为“克隆47VKA回复”(SEQ ID NO:9)、“克隆47VKA1”(SEQ ID NO:10)和“克隆47VKA2”(SEQ ID NO:11)。制取变体“克隆47VKA1”和“克隆47VKA2”是为了评估两个鼠VCI苯丙氨酸残基F36和F87的影响,这两个残基都是人种系中的酪氨酸残基。

[0541] 将每个制取的轻链和重链变体克隆和配对,转染到Expi293细胞中,使其表达并对其进行纯化。表1给出了Expi293细胞中重链和轻链构建体的瞬时共转染的表达水平和抗体产量。获得3ml纯化的抗体。标有(*)的克隆的表达水平超过200 μ g/ml并被选中用于进一步分析。

[0542] 表1:人源化变体的表达

	VH 构建体	VK 构建体	IgG $\mu\text{g/ml}$	产量(mg)
	克隆 47 VHA*	克隆 47 VKA	281	0.843
	克隆 47 VHA	克隆 47 VKA 回复	175	0.525
	克隆 47 VHA*	克隆 47 VKA1	231	0.693
	克隆 47 VHA*	克隆 47 VKA2	300	0.900
	克隆 47 VHA 回复*	克隆 47 VKA	312	0.936
	克隆 47 VHA 回复	克隆 47 VKA 回复	100	0.300
	克隆 47 VHA 回复*	克隆 47 VKA1	243	0.729
	克隆 47 VHA 回复*	克隆 47 VKA2	212	0.636
[0543]	克隆 47 VHA1	克隆 47 VKA	175	0.525
	克隆 47 VHA1	克隆 47 VKA 回复	112	0.336
	克隆 47 VHA1	克隆 47 VKA1	175	0.525
	克隆 47 VHA1	克隆 47 VKA2	143	0.429
	克隆 47 VHA2	克隆 47 VKA	187	0.561
	克隆 47 VHA2	克隆 47 VKA 回复	131	0.393
	克隆 47 VHA2	克隆 47 VKA1	187	0.561
	克隆 47 VHA2	克隆 47 VKA2	168	0.504
	克隆 47 VHA3	克隆 47 VKA	156	0.468
	克隆 47 VHA3	克隆 47 VKA 回复	137	0.411
	克隆 47 VHA3	克隆 47 VKA1	81	0.243
[0544]	克隆 47 VHA3*	克隆 47 VKA2	200	0.600

[0545] 每种人源化克隆与IL13R α 2的结合是通过ELISA评估。所有测试的克隆在与IL13R α 2的结合方面看起来都相似。

[0546] 实施例2-人源化抗体的表征

[0547] 在Biacore上测量了嵌合(Ch)克隆47和选定人源化变体对人IL13R α 2的结合亲和力。结果在下表2中给出。表观亲和力表明所述人源化变体表现出与嵌合(Ch)克隆47相比改善的与人IL13R α 2的结合。

[0548] 表2

[0549]	变体	$K_{\text{结合}} (1/\text{Ms})$	$K_{\text{解离}} (1/\text{s})$	$K_{\text{D表观}} (\text{nM})$
	Ch克隆47	1.25×10^5	6.58×10^{-5}	0.53
	VHA/VKA	1.12×10^5	1.12×10^{-5}	0.10
	VHA/VKA1	1.24×10^5	2.65×10^{-5}	0.21
	VHA/VKA2	1.31×10^5	8.20×10^{-6}	0.06
	VHA回复/VKA	1.15×10^5	5.30×10^{-6}	0.05

[0550] 通过蛋白质热迁移和在37℃与4℃下8天的温度稳定性测定来评估嵌合克隆47和选定人源化变体的稳定性。结果在下表3中给出。经受应激条件的选定人源化变体表现出与嵌合克隆47相当的稳定性。

[0551] 表3

		8 天稳定性(PBS)						
		4℃			37℃			
	克隆	PTS T _m	SEC	RP	HIC	SEC	RP	HIC
[0552]	Ch 克隆 47	71.4	4.86/97.0	3.80/3.48	2.19	4.88/84.9	3.80/3.47	2.19
	VHA/VKA	73.1	4.84/96.8	3.79/3.42	2.18	4.85/89.6	3.79/3.41	2.18
	VHA/VKA1	70.3	4.84/96.6	3.79/3.45	2.19	4.84/89.2	3.79/3.55	2.18
	VHA/VKA2	72.0	4.87/93.0	3.78/3.52	2.19	4.85/92.6	3.78/3.53	2.18
[0553]	VHA 回复/VKA	74.1	4.82/97.3	3.78/3.40	2.19	4.83/93.1	3.78/3.39	2.18
	VHA 回复/VKA1	72.3	4.82/97.8	3.79/3.43	2.19	4.83/91.2	3.80/3.54	2.19
	VHA3/VKA2	71.9	4.83/97.5	3.76/3.42	2.19	4.84/92.1	3.75/3.52	2.19

[0554] 蛋白质热迁移(PTS):以℃表示的平均T_m(一式四份)

[0555] SEC:洗脱时间(min)/%单体

[0556] RP:HC/LC滞留时间(min)

[0557] HIC:滞留时间(min)

[0558] 还在于4℃或45℃下孵育8天之后通过ELISA评估表3中所列的变体与IL13Rα2的结合。如表4所示,在测试的变体中,只有VHA/VKA变体未表现出由于应激条件(在45℃下孵育8天)引起的减少,表明它是最稳定的。这些结合数据还表明人源化变体VHA回复/VKA和VHA3/VKA2与嵌合克隆47相比,具有改善的稳定性特性。

[0559] 表4

[0560]	克隆47变体	EC ₅₀ 45℃ (ng/ml)	EC ₅₀ 4℃ (ng/ml)
	Ch克隆47	16.8	77.7
	VHA/VKA	18.4	17.8
	VHA/VKA1	12.3	58.1
	VHA/VKA2	20.4	147.9

VHA回复/VKA	16.4	45.6
VHA回复/VKA1	12.8	1012.0
VHA3/VKA2	12.3	25.8

[0561] 基于该数据,包含SEQ ID NO:3的VH和SEQ ID NO:4的VL的VHA/VKA变体(其是完全人的,没有引入小鼠回复突变)是表现最好的。该人源化抗-IL13R α 2抗体被命名为“HuCL47”。

[0562] 鼠“克隆47”和“HuCL47”的序列比较示于图1中。

[0563] 实施例3-抗-IL13R α 2抗体的理论pI

[0564] 上述抗-IL13R α 2抗体中的某些抗-IL13R α 2抗体的理论pI是基于其重链和轻链序列使用可在<https://web.expasy.org/protparam/>获得的“Protparam”工具进行计算的。结果在表5中给出。

[0565] 表5

[0566]

抗体	VH/VL序列	pI
Ch克隆47	SEQ ID NO:1/SEQ ID NO:2	6.95
VHA/VKA (HuCL47)	SEQ ID NO:3/SEQ ID NO:4	7.63
VHA回复/VKA回复	SEQ ID NO:5/SEQ ID NO:9	7.64
VHA1/VKA1	SEQ ID NO:6/SEQ ID NO:10	7.64
VHA2/VKA2	SEQ ID NO:7/SEQ ID NO:11	7.28

[0567] 实施例4-克隆47和HuCL47的比较

[0568] 通过使用NCI-H1299细胞和未修饰的经纯化抗体的标准FACS分析针对与NCI-H1299细胞的结合比较嵌合克隆47和HuCL47。使用缀合至嵌合克隆47和HuCL47的吡咯并苯二氮杂草二聚体(PBD)弹头,对A375和NCI-1299细胞两者进行体外细胞毒性分析。

[0569] 结果示于:图2(与NCI-H1299细胞的结合)、图3(与IL13R α 2的结合)、表6(对NCI-H1299细胞的细胞毒性)和表7(对A-375细胞的细胞毒性)。

[0570] 表6

[0571]

ADC	EC ₅₀ (pM)
Ch克隆47-PBD	135.3
VHA/VKA (HuCL47) -PBD	113.7
B12-PBD	12400

[0572] 表7

ADC	EC ₅₀ (pM)
Ch 克隆 47-PBD	7.6
VHA/VKA (HuCL47)-PBD	7.8
B12-PBD	6864

[0575] ***

[0576] 参考文献

[0577] 上面引用了许多出版物,以便更全面地描述和公开本发明以及本发明所属的现有技术水平。这些参考文献中的每一者的全部内容通过引用并入。

[0578] 对于标准分子生物学技术,参见Sambrook,J.,Russel,D.W.Molecular Cloning, A Laboratory Manual.第3版2001,Cold Spring Harbor,New York:Cold Spring Harbor Laboratory Press。

SEQUENCE LISTING

<110> ADC治疗有限公司(ADC THERAPEUTICS SA)
 <120> 抗-IL13R α 2抗体(ANTI-IL13R α 2 ANTIBODIES)
 <130> P22119681WP
 <150> GB 2011993.9
 <151> 2020-07-31
 <160> 18
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体(synthetic construct)
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Asp Leu Asp Trp Ile
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115
 <210> 2
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成构建体(synthetic construct)
 <400> 2

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
 65 70 75 80
 Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
 85 90 95
 Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 3

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 3

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 4

<211> 111

Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

	100	105	110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 6			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 合成构建体(synthetic construct)			
<400> 6			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1 5 10 15			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr			
20 25 30			
Leu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
35 40 45			
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe			
50 55 60			
Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr			
65 70 75 80			
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85 90 95			
Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
100 105 110			
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 7			
<211> 119			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 合成构建体(synthetic construct)			
<400> 7			
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
1 5 10 15			
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr			
20 25 30			
Leu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
35 40 45			

Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 8

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 8

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30
 Leu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe
 50 55 60
 Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 9

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 9

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
		35					40					45			
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Arg	Gln	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65				70					75					80	
Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys
				85				90					95		
Glu	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 10

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 10

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Phe	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
		35					40					45			
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Arg	Gln	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65				70					75					80	
Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys
				85				90					95		
Glu	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105					110		

<210> 11

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 11

Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
1				5					10					15	
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Tyr
			20					25					30		
Gly	Ile	Ser	Phe	Met	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro
		35					40					45			
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Arg	Gln	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Asp
	50					55					60				
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
65				70					75					80	
Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys
				85					90					95	
Glu	Val	Pro	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	
			100					105						110	

<210> 12

<211> 323

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 12

Asp	Thr	Glu	Ile	Lys	Val	Asn	Pro	Pro	Gln	Asp	Phe	Glu	Ile	Val	Asp
1				5					10					15	
Pro	Gly	Tyr	Leu	Gly	Tyr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Trp	Gln	Pro	Pro	Leu	Ser
			20					25					30		
Leu	Asp	His	Phe	Lys	Glu	Cys	Thr	Val	Glu	Tyr	Glu	Leu	Lys	Tyr	Arg
		35					40					45			
Asn	Ile	Gly	Ser	Glu	Thr	Trp	Lys	Thr	Ile	Ile	Thr	Lys	Asn	Leu	His
	50					55					60				
Tyr	Lys	Asp	Gly	Phe	Asp	Leu	Asn	Lys	Gly	Ile	Glu	Ala	Lys	Ile	His
65				70					75					80	
Thr	Leu	Leu	Pro	Trp	Gln	Cys	Thr	Asn	Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Ser	Ser
				85					90					95	
Trp	Ala	Glu	Thr	Thr	Tyr	Trp	Ile	Ser	Pro	Gln	Gly	Ile	Pro	Glu	Thr
			100					105					110		
Lys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	Cys	Val	Tyr	Tyr	Asn	Trp	Gln	Tyr	Leu	Leu
			115					120						125	

Cys Ser Trp Lys Pro Gly Ile Gly Val Leu Leu Asp Thr Asn Tyr Asn		
130	135	140
Leu Phe Tyr Trp Tyr Glu Gly Leu Asp His Ala Leu Gln Cys Val Asp		
145	150	155
Tyr Ile Lys Ala Asp Gly Gln Asn Ile Gly Cys Arg Phe Pro Tyr Leu		
	165	170
Glu Ala Ser Asp Tyr Lys Asp Phe Tyr Ile Cys Val Asn Gly Ser Ser		
	180	185
Glu Asn Lys Pro Ile Arg Ser Ser Tyr Phe Thr Phe Gln Leu Gln Asn		
	195	200
Ile Val Lys Pro Leu Pro Pro Val Tyr Leu Thr Phe Thr Arg Glu Ser		
	210	215
Ser Cys Glu Ile Lys Leu Lys Trp Ser Ile Pro Leu Gly Pro Ile Pro		
225	230	235
Ala Arg Cys Phe Asp Tyr Glu Ile Glu Ile Arg Glu Asp Asp Thr Thr		
	245	250
Leu Val Thr Ala Thr Val Glu Asn Glu Thr Tyr Thr Leu Lys Thr Thr		
	260	265
Asn Glu Thr Arg Gln Leu Cys Phe Val Val Arg Ser Lys Val Asn Ile		
	275	280
Tyr Cys Ser Asp Asp Gly Ile Trp Ser Glu Trp Ser Asp Lys Gln Cys		
	290	295
Trp Glu Gly Glu Asp Leu Ser Lys Lys Thr Leu Leu Arg His His His		
305	310	315

His His His

<210> 13

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 13

Asn Tyr Leu Met Asn

1 5

<210> 14

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 14

Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Gly Asp Ile Asp Tyr Asn Gln Asn Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 15

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 15

Gly Tyr Gly Thr Ala Tyr Gly Val Asp Tyr

1 5 10

<210> 16

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 16

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 17

Ala Ala Ser Arg Gln Gly Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成构建体(synthetic construct)

<400> 18

Gln	Gln	Ser	Lys	Glu	Val	Pro	Trp	Thr
1				5				

VK

在111个残基重疊中的同一性为80.2%；评分：483.0；空位频率：0.0%

克隆47	1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESDNYGISFNNWFQQKPGQPKLLIYAASRQGS
人源化克隆47	1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDNYGISFNNWYQQKPGQAPRLLIYAASRQGS
克隆47	61	GVPARFSGSGGTDFTSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKVPWTFGGGTKLEIK
人源化克隆47	61	GIPDRFSGSGGTDFTLTISRLEPEDFAVYCCQQSKVPWTFGGGTKLEIK

VH

在119个残基重疊中的同一性为81.5%；评分：530.0；空位频率：0.0%

克隆47	1	QVQLQQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFSNYLMNNVKQRPEQDLWIGRIDPYDGDIDY
人源化克隆47	1	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFSNYLMNNWVRQAPGGGLEWMGRIDPYDGDIDY
克隆47	61	NQNFKDKAILTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVVYCARGYGTAYGVVDYWGQTSVTVSS
人源化克隆47	61	NQNFKDRVTITRDTASATAYMELSSLRSEDTAVVYCARGYGTAYGVVDYWGQTSVTVSS

图1

HuCL47和克隆47抗-IL13RA2 IgG至NCI-H1299细胞

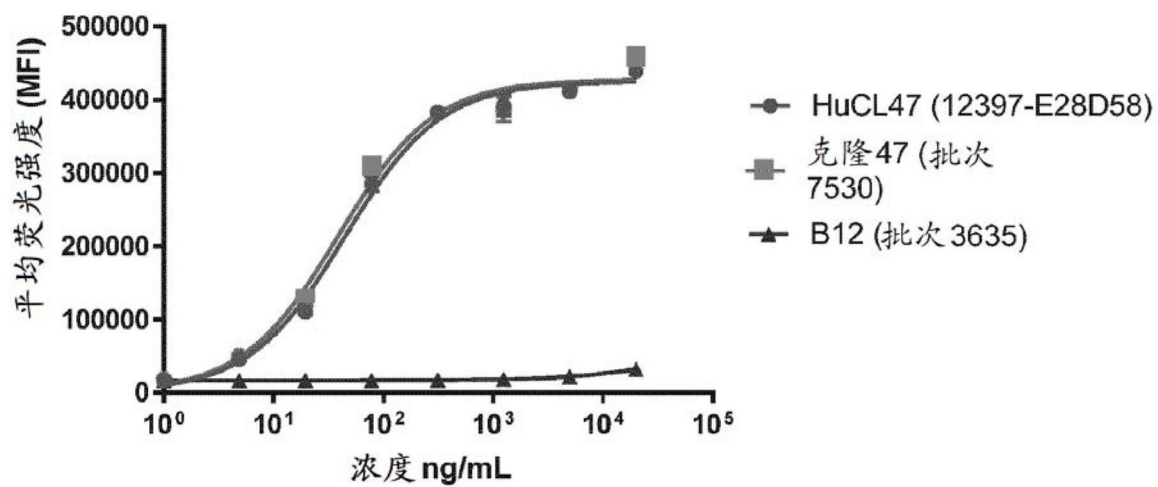


图2

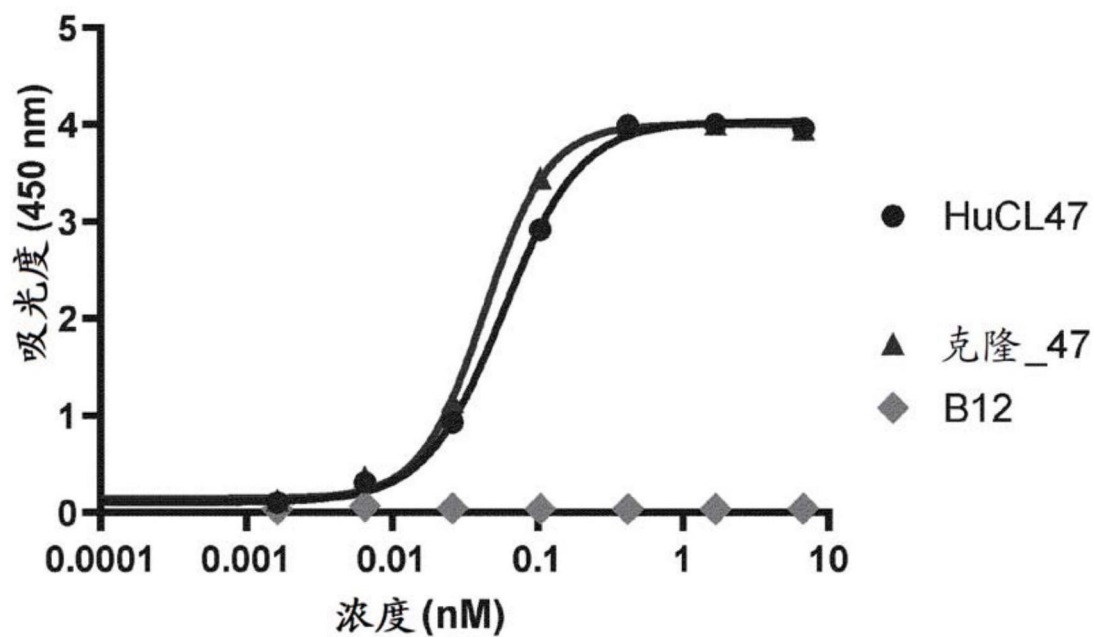


图3